SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

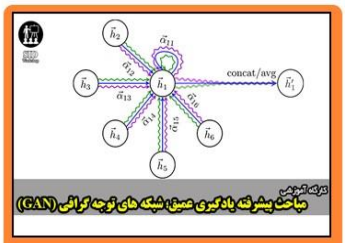
کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)

کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

افزايش قدرت سولفورزدايي بيولوژيک از طريق کلونينگ و بيان ژن اکسيدوردوکتاز بدست آمده از باکتري رودوکوکوس اريتروپوليس IGTS8

حديث بهزادي[1]، جمشيد راهب[2]، الهام آقائي[2]، سودابه اکبرزاده شعرباف[2,3]**
۱) دانشگاه آزاد اسلامي واحد قم تلفن: ۰۹۱۸۳۳۱۰۰۱۲ E.mail: biologyst2004@ yahoo.com
۲) پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتيك و زيست فن آوري تلفن ۴۵۸۰۳۰۱
۳) دانشگاه آزاد اسلامي واحد علوم و تحقيقات تهران

چکيده:
احتراق سوختهاي فسيلي باعث آزاد شدن اکسيد گوگرد به داخل اتمسفر شده و علاوه بر آلودگي هوا، بخش عمده اي از بارانهاي اسيدي را سبب مي شود، براي حل اين مشکلات حذف ميکروبي گوگرد پيشنهاد شده است. يکي از مهمترين اين باکتريها سويه *رودوکوکوس اريتروپوليس* IGTS8 مي باشد که به عنوان يک سويه مدل در تحقيقات گوگردزدايي مطرح است. در اين تحقيق ژن اکسيدوردوکتاز باکتري *رودوکوکوس اريتروپوليس* IGTS8 از داخل وکتور PTZ57OR با استفاده از آنزيمهاي *Hind*III و *Eco*RI بدست آمد و بداخل پلاسميد PKK223-3 که با همين آنزيمها برش داده شده بود، وارد گرديد. سپس پلاسميد حاصل به داخل سويه Ecoli *(DH5α)* ترانسفورم شد و بعد از تأييد صحت کلونينگ با استفاده از آنزيمهاي محدود الاثر بررسي براي بيان پروتئين مورد نظر آغاز گرديد. در زمانهاي مختلف بعد از القاء با IPTG (ايزوپروپيل β– تيوگالاکتورياز) نمونه برداري انجام شد و بر روي ژل اکريل آميد ۱۲% برده شده در اينحالت يک باند مشخص در ناحيه 86KD مشاهده گرديد که نشان دهنده بيان ژن اکسيدوردوکتاز در داخل وکتور بياني مي باشد.
کلمات کليدي: گوگردزدايي بيولوژيک، *رودوکوکوس اريتروپوليس* IGTS8 ، ژن اکسيدوردوکتاز

Cloning and Expression of Oxidoreductase Gene from *Rhodococcus Erythropolis* IGTS8 for Enhancement of Biological Desulphurization

Combustion of fossil fuels leads to the release of sulfur oxides into the environment, contributing significantly to air pollution and being the principal cause of acid rain.
Microbial desulphurization has been suggested for solving these problems. The *Rhodococcus-erythropolis* IGTS8 is one of the most important of these bacteria which can be used as a model organism in desulphurization researches. Oxidoreductase gene of *Rhodococcus-erythropolis* IGTS8 was digested with *Hind* III and *Eco*RI restriction enzymes from PTZ57R plasmid and cloned into the PKK233-3 plasmid. Recombinant plasmid was transformed into the competent cells E.coli strain, *DH5α*. Plasmid was extracted from bacteria and analyzed with restriction enzyme digestion. After confirmation of clones, induction was performed at different times with IPTG. The expression of recombinant protein was tested with 12% SDS-PAGE gel. Oxidoreductase protein was detected as a 86KD band.
Keywords: Biological desulphurization, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8*,* oxidoreductase.

مقدمه:
حضور گوگرد در نفت و ساير سوختهاي فسيلي باعث ايجاد خوردگي و زنگ زدگي در محصولات توليدي و فرسايش تجهيزات پالايشگاهي مي شود (۴) از طرف ديگر در اثر احتراق سوخت هاي فسيلي اکسيد سولفور($SO_{2,3}$) بداخل اتمسفر آزاد مي شود که منجر به توليد بارانهاي اسيدي مي گردد(۱۱ ،۵ ،۱). روش رايج براي گوگردزدايي از ترکيبات واسطه مثل نفت سفيد و گازوئيل هيدرودسولفوريزاسيون(HDS) مي باشد. از آنجا که ترکيبات هتروسيکل آروماتيک حاوي گوگرد مثل تيوفن و دي بنزوتيوفن به اين روش مقاوم مي باشند، استفاده همزمان از تکنيک گوگردزدايي بيولوژيک توصيه مي گردد(9 ,8 ,7 ,6). يک ارگانيسم کليدي در رابطه با پروسه سولفورزدايي ميکروبي از نفت، باکتري *رودوکوکوس اريتروپوليس* IGTS8 ميباشد که قادر است دي بنزوتيوفن (DBT) را به عنوان تنها منبع گوگرد مصرف کند (9 ،8 ،5 ،2). در اين باکتري سه ژن dsz A,B,C بر روي يک پلاسميد خطي به طول 120kb قرار گرفته است (9, 10) که مسئول واکنش تبديلي دي بنزوتيوفن (DBT) به 2 هيدروکسي بي فنيل (2HBP) و سولفيد هيدروژن مي باشد (2, 3, 4). از آنجائيکه براي انجام اين واکنش به FMNH2 و NADPH به عنوان کاتاليزور نياز مي باشد، کلونينگ ژن اکسيدوردوکتاز که تأمين کننده اين مواد مي باشد به عنوان هدف اصلي در اين تحقيق مد نظر قرار گرفت.

مواد و روشها:
۱) مواد: ماکروزن مولکولي Low Molecular weight , II و آنزيم هاي محدود الاثر *Hind*III , *Eco*RI بکار رفته از شرکت Fermentase خريداري شد. کيت خالص سازي DNA Agrose GeL DNA Extraction و آنزيم T4 DNA Ligase محصول شرکت Roche مي باشد. از روي ژل
۲) سويه هاي باکتريايي: مطالعات بر روي کلون PTZ57OR صورت پذيرفت که در اثر کلونينگ ژن اکسيدوردوکتاز از باکتري IGTS8 به داخل وکتور PTZ57R بدست آمده است. پس از تأئيد کلون حاصل توسط PCR، ژن اکسيدوردوکتاز از داخل آن تخليص شده و به داخل وکتور PKK223-3 کلون شد و سپس به داخل سويه DH5α و Ecoli ترانسفورم گرديد. بعد از تأئيد صحت کلونينگ با استفاده از آنزيم هاي محدود الاثر بررسي براي بيان پروتئين موردنظر صورت گرفت.

۳) استخراج پلاسميد: استخراج پلاسميد به روش Large Scale (ليز قليايي) و طبق رفرنس شماره ۱۱ صورت گرفت.
۴) طراحي پرايمر و روش PCR : ابتدا پرايمرهاي مناسب با سكانس هاي زير طراحي شد:

رفت 5`-GAA TTC ATG TCT GAC AAG CCG AAT GCC-3`
برگشت 5`-TCT AGA CTA TTG ACC TAA CGG AGT CGG-3`

و سپس تكثير قطعات نوكلئوتيدي ژن اكسيدوردوكتاز با استفاده از يك دستگاه Corbett Research انجام گرديد.
۵) بيان پروتئين: بررسي براي بيان پروتئين موردنظر با استفاده از ژل اكريلاميد(SDS PAGE) انجام شد.

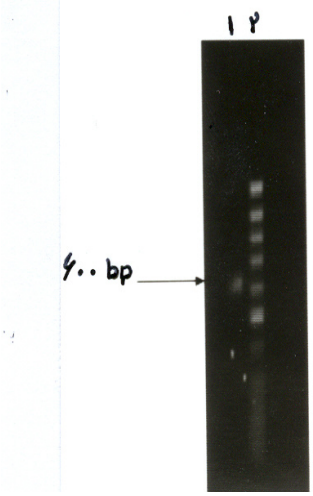
نتايج و بحث:

در اين تحقيق ابتدا سكانس ژن اكسيدوردوكتاز بطول(bp ۵۷۹) در باكتري *رودوكوكوس اريتروژوليس*IGTS8 از طريق Gene bank بدست آمد و سپس براي طراحي پرايمر مورد استفاده قرار گرفت. در اينحالت سايت برش با آنزيم *Eco*RI در ابتداي پرايمر رفت و سايت برش با آنزيم *Hind*III در انتهاي پرايمر برگشت قرار داده شد. PCR از DNA ي پلاسميد PTZ57OR در دماي Annealing ۵۷ درجه سانتي گراد به مدت يک دقيقه و ۳۰ سيكل با انجام شد. در اينحالت يک باند در ناحيه bp ۶۰۰ مشاهده شد كه نشان دهنده وجود ژن اكسيدوردوكتاز در پلاسميد PTZ57OR مي باشد. سپس پلاسميد توسط آنزيمهاي محدود الاثر بريده شد و ژن اكسيدوردوكتاز جدا گرديد (شكل يك) و در داخل وكتور بياني PKK223-3 كه توسط آنزيمهاي محدود الاثر *Hind*III , *Eco*RI بريده شده بود، كلون شد سپس محصول Ligation بداخل باكتري پذيراي مناسب (Ecoli, *DH5α*) ترانسفورم گرديد و پس از استخراج پلاسميد، كلونها با آنزيمهاي محدود الاثر بريده شد(شكل دو). در اينحالت ژن اكسيدوردوكتاز در ناحيه bp ۶۰۰ جدا گرديد كه نشان دهنده صحت كلونينگ مي باشد. سپس براي بررسي بيان پروتئين موردنظر، يك تك كلون باكتري بصورت اورنايت كشت داده شد و بعد با ضريب رقت 1/50 در محيط LB حاوي Amp تلقيح گرديد و بعد از رسيدن OD به ميزان مناسب، ايندكشن با IPTG 1mM انجام شد سپس در زمانهاي مختلف بعد از القا نمونه برداري انجام شد و بر روي ژل اكريلاميد ۱۲% حاوي SDS برده شد(شكل سه)، در اينحالت يك باند شارپ در ناحيه ۸۶KD بدست آمد كه نشاندهنده بيان ژن اكسيدوردوكتاز در داخل وكتور بياني مي باشد.

يكي از روشهاي اساسي در افزايش قدرت سولفورزدائي بيولوژيك استفاده از سويه هاي مهندسي شده مي باشد كه داراي توان بالائي درحذف گوگرد از تركيبات نفتي مي باشد. از آنجا كه ژن اكسيدوردوكتاز نقش اصلي را در عمل ژنهاي گوگردزدائي dszA, C بازي مي كند، استفاده از نسخه هاي افزايش يافته اين ژن يكي از راهكارهاي اساسي در استفاده از سويه هاي مهندسي شده مي باشد كه در اين تحقيق مورد بررسي قرار گرفت.

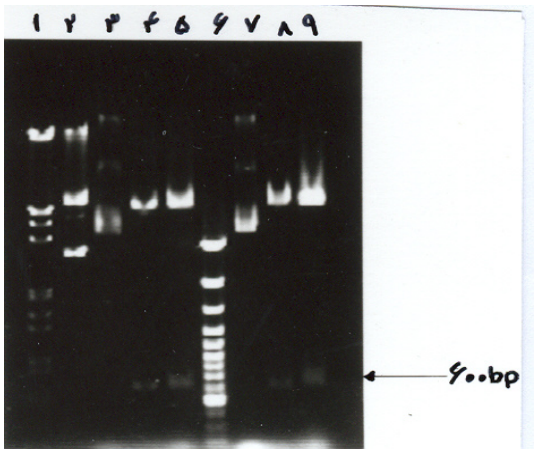
منابع:

۱. Bos, P., and Kuenen, J.G.(1990) Microbial treatment of coal, pp.343-377. In H.L.Ehrlich and C.L.Brierley (ed.) Microbial mineral recovery. Mc Graw-Hill book co. New York.
۲. Denis-Larose, C., Labbe, D., Bergeron, H. and et al. (1997) Conservation of plasmid-encode dibenzothiophene deulfurization genes in several rhodococci. Appl. Envir. Microbiol. 63:2915-2919.
۳. Denis-larose, C., Bergeron, H., Labbe, D. and et al. (1998) Characterization of the basic replicon of rhodococcus plasmid Psox and development of a Rhodococcus-Escherichia coli Shuttlevector. Appl. Envir. Microbiol. 64:4363-4367.
۴. Denome, S.A., Olson, E.S. and Young, K.D. (1993) Identification and cloning of genes involved in specificdesulfurization of debenzothiophene by Rhodococcus SP.strain IGTS8. Appl. Envir. Microbial. 59:2837-2843.
۵. Foght, J.M., Fedorak, P.M., Gray, M.R. et al. (1990) Microbial desulfurization of petroleum. PP.379-407. In H.L.Ehrlich and C.L.Brierley(et.) microbial mineral recovery. Mc Graw Hill book Co. New York.
۶. Gray, K.A., Pogrebinsky, O.S., Mrachko, G.T. et al. (1996) Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. Nature Biotechnology. 14:1705-1709.
۷. Grossman, M.J., Lee. M.K, prince, R.C. et al (1999) Microbial desulfurization of a crudeoil middle distillate fraction:analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. Appl. Envir. Microbial. 65:181-188.
۸. Honda, H., Sugiyama, D., Saito, I. et al (1998) High cell density culture of Rhodococcus rhodochrous by PH-stat feeding and debenzothiophene degradation. J of Fermentation and Bioengineering. 85(3):334-338.
۹. Maghsoudi, S., Kheirolomoon, A., Vossoughi, M. et al. (2000) Selective desulfurization of debenzothiophene by newly isolated Corynebacterium sp. Strain P32C1. Biochemical engineering Journal. 5:11-16.
۱۰. Oldfield, C., Poogrebinsky, O., Simmonds, J. et al. (1997) Elucidation of the metabolic pathway for debenzothiophene desulfurization why *Rhodococcus* SP.strain IGTS8 (ATCC53968). Microbiology. 143:2961-2973.
۱۱. Manyatis, T., Firtsch, E.F. and Sambrooks (1995) Molecular cloning:a lab manual cold spring Harbor laboratory, cold spring Harboor, N.Y.



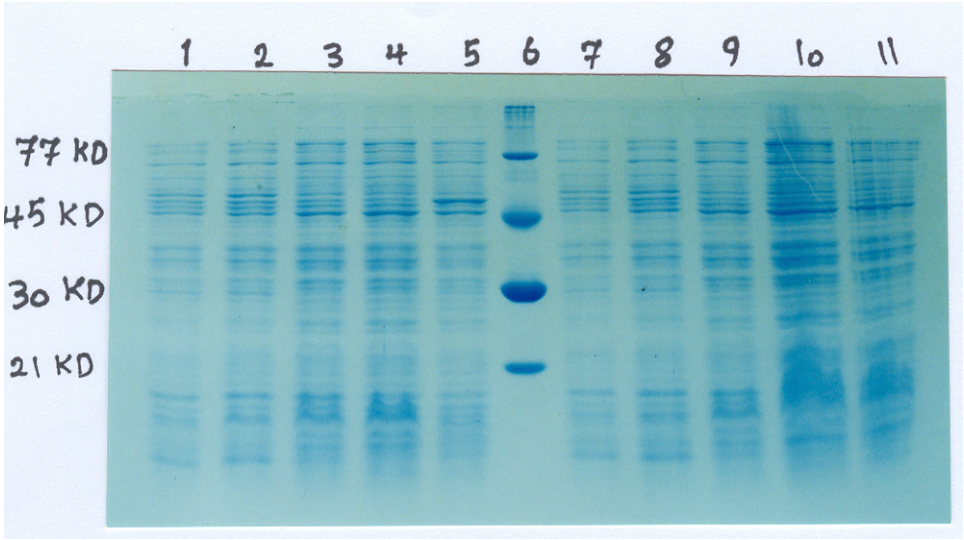
شكل يك: تائيد صحت كلون موجود با استفاده از تكنيكPCR

۱) محصول PCR كلون PTZ57OR
2) ماركر وزن مولكولي ۱۰۰bp



شكل دو: تائيد صحت كلون ژن اكسيدوردوكتاز در داخل وكتور بياني***PKK 223-3***
با استفاده از برشهاي آنزيمي

۱) ماركر وزن مولكولي ۱۰۰bp
۲) كلون A، شامل وكتور *PKK 223-3* حاوي ژن اكسيدوردوكتاز
۳) كلون A بريده شده با آنزيم هاي *Eco*RI + *Hind*III
٤) كلون A بريده شده با آنزيم هاي *Eco*RI + *Hind*III
٥) ماركر وزن مولكولي ۱۰۰bp = ٥ ميكروليتر
٦) كلون D، شامل وكتور *PKK 223-3* حاوي ژن اكسيدوردوكتاز
۷) كلون D بريده شده با آنزيم هاي *Eco*RI + *Hind*III
۸) كلون D بريده شده با آنزيم هاي *Eco*RI + *Hind*III



شکل سه: بررسي بيان سيتوپلاسمي ژن اكسيدوردوكتاز در پلاسميد PKK233-3 تحت پروموتور tac توسط ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد

۱) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده (D) ، قبل از القاء با IPTG
۲) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده (D) ، يكساعت پس از القاء با IPTG
۳) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده (D) ، سه ساعت پس از القاء
٤) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده (D) ، ۲۷ ساعت پس از القاء
٥) عصاره باكتري حاوي پلاسميد *PKK 233-3* (كنترل منفي)
٦) وزن مولكولي
۷) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده (A) ، قبل از القاء با IPTG
۸) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده (A) ، يكساعت پس از القاء با IPTG
۹) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده (A) ، سه ساعت پس از القاء
۱۰) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده (A) ، ۲۱ ساعت پس از القاء
۱۱) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده (A) ، ۲۷ ساعت پس از القاء

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

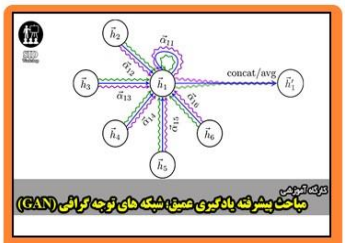
کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)

کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی