مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۶، شماره ٤، تابستان ۱۳۸٤

جداسازی و کلونینگ ژن اکسیدوردوکتاز از یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس

جمشید راهب[*1] (Ph.D)، الهام آقائی‌مقدم[1,2] (M.Sc)، شمیم نقدی[1] (M.Sc)، مهلقا قربانلی[3] (Ph.D)، غلامرضا بخشی‌خانیکی[2] (Ph.D)

۱- پژوهش‌گاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

۲- دانشگاه پیام‌نور تهران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی گرگان

چکیده

سابقه و هدف: یکی از محدودیت‌های فرآیند پالایش و مصرف مواد نفتی مشکلات ناشی از وجود ترکیبات گوگردی در آن‌ها است. استفاده از سوخت‌های فسیلی منجر به آزادسازی SO_2 و به‌دنبال آن آلودگی محیط‌زیست می‌شود. برای حل این مشکلات، حذف میکروبی گوگرد پیشنهاد شده است. از آن‌جا که کارایی باکتری‌های سولفورزدا محدود است، توجه محققین به افزایش کارایی آن‌ها از طریق دست‌کاری‌های ژنتیکی معطوف شده است. انجام چنین دست‌کاری‌هایی معطوف به بررسی ژنتیک فرایند حذف گوگرد باکتری‌های بومی و سپس کلون کردن ژن‌های مؤثر در این فرایند است. در این رابطه، چند سویه باکتری در ایران جداسازی شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. سه ژن B ،C و dsz A، دارای توالی DNAی، ۴ کیلوبازی هستند که حامل ژن‌های سولفورزدا برای مسیر 4S می‌باشند، که این توالی، در باکتری تازه جدا شده رودوکوکوس FMF شناسایی و جداسازی شد و سپس در باکتری سودوموناس آئروجینوزا کلون گردید. ژن dszD تولید کننده آنزیم اکسیدوردکتاز در جهت مسیر سولفورزدایی 4S می‌باشد. در این طرح اقدام به شناسایی، جداسازی و کلونینگ dszD از یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس نموده و سپس کلون مذکور را تأیید نمودیم.

مواد و روش‌ها: یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس را که دارای فعالیت سولفورزدایی است در داخل شیکر انکوباتور RPM ۲۰۰ و۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد و DNA ژنومی آن استخراج گردید و سپس در شرایط بهینه، PCR انجام گرفت. ژن اکسیدوردوکتاز (ژن dszD) از روی ژل آگارز استخراج و در پلاسمید PTZ57R کلون و داخل میزبان *E-coli (DH5 α)* ترانسفورم شد. نقشه ژنی این پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های محدودکننده به‌دست آمد و سپس تعیین توالی و همولوژی‌های لازم انجام گرفت.

یافته‌ها: با توجه به این‌که باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد، دارای سویه‌های مختلف می‌باشد و همین‌طور از تشابه توالی نوکلئوتیدی بین ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد و ژن اکسیدوردوکتاز رودوکوکوس اریتروپولیس مورد آزمایش، این طور به نظر می‌رسد که سویه در دست بررسی می‌تواند شباهت‌ها و یا قرابت‌هایی با باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد داشته باشد.

نتیجه‌گیری: نتیجه سکانس ژن اکسیدوردوکتاز این سویه از باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس که تحت نام FRF.Seq است، نشان می‌دهد که تعداد نوکلئوتیدهای مربوط به ژن اکسیدوردوکتاز باکتری مورد آزمایش مساوی با تعداد نوکلئوتیدهای مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد یعنی ۵۷۹bp است.

واژه‌های کلیدی: ژن اکسیدوردوکتاز (ژن dszD)، باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس، سولفورزدایی، پلاسمید PTZ57R

[*] نویسنده مسئول. تلفن: ۴۴۵۸۰۳۸۷- ۰۲۱، نمابر: ۴۴۵۸۰۵۵-۰۲۱، E-mail: jam@nrcgeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۳/۳/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۲/۳۱

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

با توجه به مشکلاتی که در چند دهه اخیر از یک‌سو نسبت به کاهش ذخایر سوخت‌های فسیلی و افت آن‌ها در دنیا به وجود آمده و از سوی دیگر با پیچیده‌تر شدن واحدهای پالایشگاهی برای تطبیق و رعایت مقررات خاص حفظ محیط‌زیست و افزایش هزینه تمام شده انرژی مورد نیاز؛ لازم گردیده تا کشورهای پیشرفته درصدد برآیند با روش‌های ساده و کم‌هزینه‌تر، از فشار حاصل بر محیط‌زیست بکاهند. یکی از موفق‌ترین روش‌ها، استفاده از ترشحات سلول‌های زنده (آنزیم) می‌باشد. در این رابطه محققین و دانشمندان از حدود ۵۰ سال قبل سعی برآن داشته‌اند که جداسازی گوگرد را از طریق روش‌های بیوشیمی و میکروارگانیزم‌ها انجام دهند که خوشبختانه در این راه موفقیت‌هایی به دست آورده‌اند، به‌طوری‌که واحدهای تجاری آن، در آینده نزدیکی نصب و مورد بهره‌برداری قرار خواهند گرفت و با اجرای این پروژه، کیفیت ساختاری مواد نفتی ارتقاء می‌یابد.

گوگرد موجود در ترکیبات نفتی باید حذف گردد. راه حل موجود سولفورزدایی به طریق شیمیایی (Hydrodesulfrization, HDS) می‌باشد. در این روش گوگرد آلی تحت فشار و حرارت بالا در حضور کاتالیست‌های فلزی احیا شده و ایجاد گاز (H_2S) می‌گردد. ضمناً روش سولفورزدایی (HDS) هزینه بالایی در بردارد. بنابراین روش HDS یک روش مطلوب نیست، ولی با این حال به‌طور گسترده‌ای در صنایع نفتی در جهان استفاده می‌شود [۷،۳،۸،۲،۹،۱]. برای حل این مشکلات، حذف بیولوژیک گوگرد پیشنهاد شده است. یکی از این روش‌ها، روش حل میکروبی گوگرد (Microbial Desulfurization, MDS) می‌باشد. باکتری‌های زیادی شناسایی شده‌اند که با استفاده از مسیرهای هوازی و بی‌هوازی اقدام به حذف گوگرد از ترکیبات نفتی می‌نمایند. بنابراین گزارشات اندکی در استفاده از این طریق وجود دارد. اما در فرآیند هوازی، باکتری‌های زیادی شناسایی شده‌اند که به طور انتخابی دی‌بنزوتیوفن (DBT) یا ترکیبات دیگر را سولفورزدایی می‌کنند. در حالی که بیش‌تر باکتری‌ها با استفاده از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و گوگرد، کیفیت سوخت را پائین می‌آورند؛ فرآیند ایده‌آل آن است که در آن حذف گوگرد بدون آسیب دیدن اسکلت کربنی صورت گیرد [۱۴،۱۲]. انواع مختلفی از ترکیبات آلی حلقوی حاوی گوگرد در سوخت‌های فسیلی وجود دارد اما دی‌بنزوتیوفن (DBT) که یک ترکیب آلی گوگرددار است از طرف محققین به عنوان مولکول شاخص در مطالعات حذف میکروبی گوگرد مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۲،۸]. شاخص‌ترین گونه باکتری که مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی روی آن انجام شده است رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* نام دارد. بررسی حذف اختصاصی گوگرد توسط این باکتری پیشرفت‌های زیادی داشته است، به طوری که مدت زمان استفاده از دی‌بنزوتیوفن و تبدیل آن به HBP-۲ از سال ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۷به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. سویه *R.IGTS8* با استفاده از مسیر ۴S قادر به جداسازی گوگرد از دی‌بنزوتیوفن طی یک فرآیند چهار مرحله‌ای و در نهایت تولید HBP-۲ است. در این فرآیند، دو آنزیم منواکسیژناز به نام‌های DSZA و DSZC و یک آنزیم دسولفیناز به نام DSZB شرکت دارند. DSZA باعث تبدیل $DBTO_2$ به HBPsi می‌گردد.

DSZB با استفاده از اتصال نوکلئوفیلی مولکول‌های آب روی اتم گوگرد HBPsi، باعث تشکیل HBP-۲ و آزاد شدن SO_2 می‌گردد. در طرح قبلی موفق شدیم که سه ژن کدکننده آنزیم‌های مسیر ۴S را در سودوموناس آئروجینوزا کلون کرده و صنعت سولفورزدایی را در این باکتری بررسی نماییم [۵،۱۵،۱۳،۷،۱۱،۱۰،۴]. با شناسایی ژن کدکننده آنزیم اکسیدورودوکتاز، که یکی از اساسی‌ترین کاتالیزورهای واسطه‌ای مسیر گوگردزدایی ۴S در باکتری‌ها می‌باشد، در طرح‌های بعدی با بیان انبوه این ژن به موازات ژن‌های مسیر سولفورزدایی ۴S در باکتری‌ها، میزان سولفورزدایی را می‌توان بالاتر برد. از آن‌جایی که آزمایش‌های invitro نشان داده است که افزایش NADH و FMNH2 باعث افزایش قدرت سولفورزدایی در باکتری‌های سولفورزدا می‌شود، لزوم

Archive of SID
www.SID.ir

کلونینگ و بیان انبوه این ژن جهت افزایش سولفورزدایی قابل درک است. در این طرح هدف، جداسازی و کلونینگ ژن اکسیدوردوکتاز از یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس و تعیین توالی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱) سویه‌های باکتریایی.

الف) یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس که از دانشگاه شهید بهشتی (ابراهیم‌پور غلامحسین، دانشگاه شهید بهشتی) که دارای فعالیت سولفورزدایی است در اختیار ما قرار گرفت.

ب) سویه‌هایی از *E.coli* تحت عنوان *DH5α* و *Jm110* متعلق به مرکز ژنتیک بوده و مورد استفاده قرار گرفت.

۲) کشت سویه‌ای از باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس و استخراج DNAی ژنومی آن. این باکتری در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به مدت یک روز در داخل شیکر انکوباتور با RPM ۲۰۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد.

۳) طراحی پرایمر و روش PCR.

ابتدا پرایمرهای مناسب با سکانس‌های زیر طراحی شدند. توالی '۳-5'-GAA TTC ATG TCT GAC AAG CCG AAT GCC به عنوان پرایمر رفت و توالی ۵'-TCT AGA CTA TTG ACC TAA CGG AGT CGG-۳' به‌عنوان پرایمر برگشت در نظر گرفته شدند. تکثیر قطعات نوکلئوتیدی ژن اکسیدوردوکتاز به‌وسیله روش PCR با استفاده از دستگاه Corbett research صورت گرفت. برنامه PCR به صورت یک سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

مقادیر زیر با استفاده از کیت (شرکت سیناژن) استفاده شد. برای حجم ۱۰۰میکرولیتر،

10X Buffer	10µl
dNTP	2µl
MgCl2	6µl
پرایمررفت	1µl
پرایمر برگشت	1µl
Taqآنزیم	1µl
آب مقطر	78µl

استخراج ژن اکسیدوردوکتاز از روی ژل آگارز با استفاده از کیت Agarose Gel DNA Extraction (شرکت Roche) انجام شد.

۴) تهیه سلول پذیرا و انجام کلونینگ. در این مرحله از کیت InsT/A clone TM PCR product cloning kit (شرکت Fermentase) استفاده شد.

۵) استخراج پلاسمید. بعد از یک شبانه روز چند کلنی سفید انتخاب کرده و از کلنی سفید به روش Miniprep استخراج پلاسمید انجام گردید.

۶) **Mapping**. با کمک آنزیم‌های محدودکننده‌ای که در وکتور پلاسمیدی *PTZ57R* و همین‌طور آنزیم‌هایی که در دو طرف پرایمر رفت و پرایمر برگشت ژن اکسیدوردوکتاز طراحی شده، آنالیز کلون‌ها انجام گرفت.

۷) آماده کردن نمونه‌های کلون شده جهت تعیین توالی.

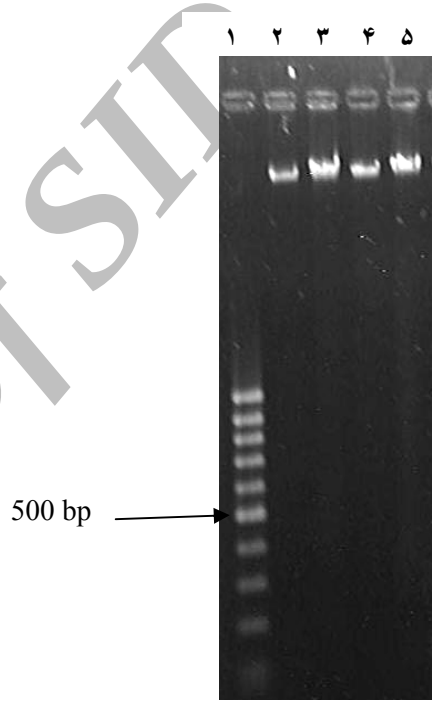
۸) بررسی هومولوژی‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNA star

نتایج

جهت طراحی پرایمرها، ابتدا سکانس ژن اکسیدوردوکتاز (ژن dszD)، رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* را از بانک اطلاعاتی ژن (Gene bank) به‌دست آورده که ۵۷۹bp می‌باشد و سپس برای طراحی پرایمر رفت (Forward)، ۲۱

Archive of SID
www.SID.ir

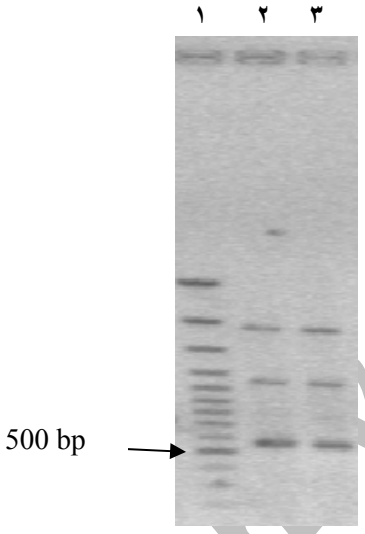
نوکلئوتید از اول سکانس این ژن برداشته و با ابتدای آن توالی آنزیم EcoRI (GAA TTC) اضافه شد. برای طراحی پرایمر برگشت (Reverse)، از آخر سکانس ژنومی اکسیدوردوکتاز *IGTS8* استاندارد، ۲۱ نوکلئوتید به صورت معکوس و Compelement شده، انتخاب و به اول پرایمر برگشت، توالی آنزیم XbaI (TCT AGA) اضافه شد. سپس یکی از سویه‌های باکتری رودوکوکوس که از دانشگاه شهید بهشتی در اختیار ما قرار گرفت کشت داده و DNA ژنومی آن استخراج شد (شکل ۱).



شکل ۱. ۱) مارکر ۱۰۰bp، ۲) ستون‌های بعدی مربوط به DNA کروموزومی باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس

جهت تکثیر ژن اکسیدوردوکتاز، از DNA ژنومی استخراج شده و تکنیک PCR با Annealing ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ سیکل با پرایمرهای طراحی شده استفاده شد (شکل ۲).

نتیجه PCR، حضور سه باند بر روی ژل آگارز ۱ درصد بود، یکی از این قطعات که از نظر وزنی و تعداد نوکلئوتیدها به ژن اکسیدوردوکتاز *IGTS8* استاندارد (۵۷۹bp) شبیه‌تر بود، یعنی باندی که در حدود ۶۰۰bp بر روی ژل آگارز بود بریده و سپس باند مورد نظر از روی ژل، با استفاده از کیت Agarose Gel DNA Extraction kit خالص سازی و استخراج شد. این باند ژن اکسیدوردوکتاز متعلق به سویه‌ای از باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس، بعد از خالص‌سازی و تغلیظ به‌عنوان Insert، با استفاده از کیت InsT/Aclone TM PCR Product cloning kit در ناحیه مولتی‌پل کلونینگ سایت وکتور *pTZ57R*، کلون شد. پلاسمید *pTZ57R* حاوی مارکر bla (سایت مقاومت به آمپی‌سیلین و توانایی α-Complemention) می‌باشد. سپس این محصول Ligation به‌داخل باکتری پذیرای مناسب به نام *E.coli (DH5α)* ترانسفورم شد. در مرحله بعد، استخراج پلاسمید انجام شد و هر دو کلون با آنزیم‌های محدودکننده بریده شد (شکل ۳).

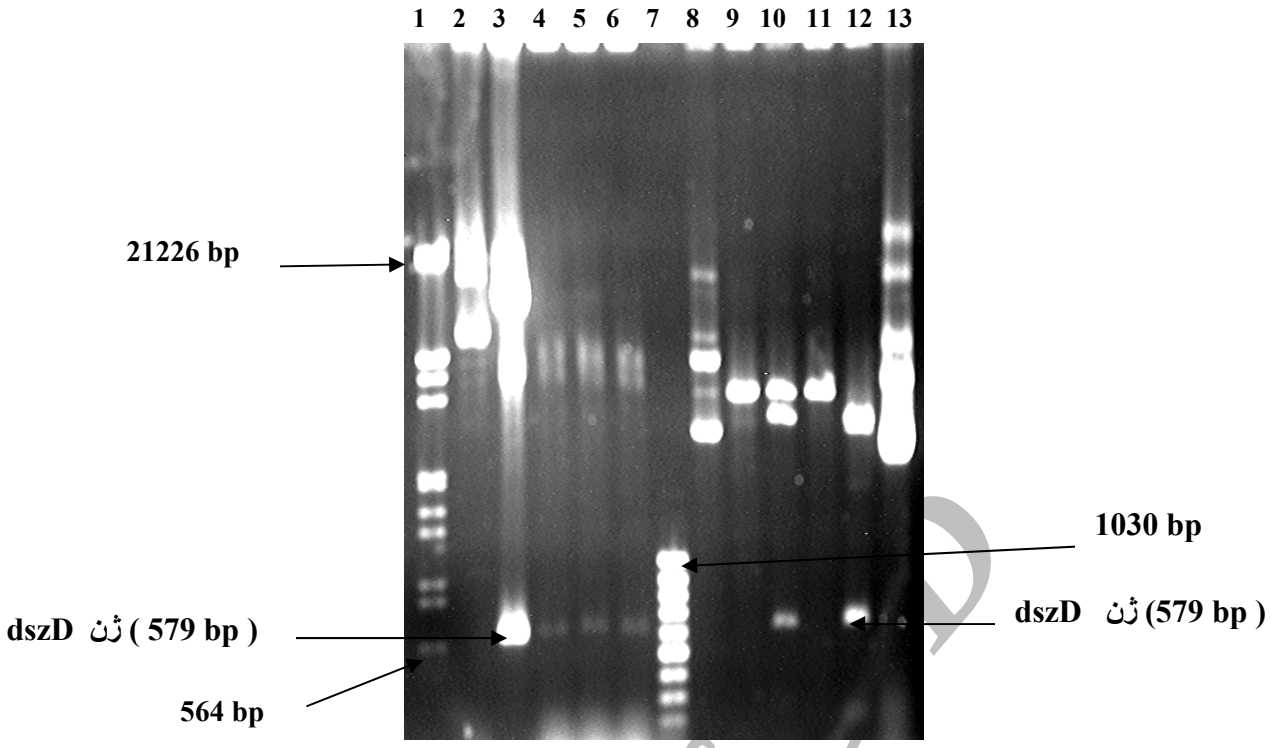


شکل ۲. ستون اول: مارکر ۱۰۰bp، ستون دوم و سوم: محصول PCR مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس

نتیجه سکانس باکتری این سویه از رودوکوکوس اریتروپولیس که تحت نام FRF.seq است، نشان می‌دهد که تعداد نوکلئوتیدهای مربوط به ژن اکسیدوردوکتاز باکتری مورد آزمایش مساوی با تعداد نوکلئوتیدهای مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد، یعنی ۵۷۹bp است. در مرحله بعد توسط برنامه DNA star، توالی ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس (FRF.seq) با توالی ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد، Align و مقایسه شد (ضمیمه ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۳. Mapping کلون ژن اکسیدوردوکتاز مربوط به رودوکوکوس اریتروپولیس

1)مارکر λ۳ = ۴ ماکرولیتر

2)کلون شماره ۱ حاوی ژن اکسیدوردوکتاز = ۵ ماکرولیتر

3) کلون شمارهٔ ۱ دایجست شده با آنزیم BamHI = ۱۰ ماکرولیتر

4)کلون شمارهٔ ۱ دایجست شده با آنزیم EcoRI = ۱۰ ماکرولیتر

5)کلون شمارهٔ ۱ دایجست شده با آنزیم HindIII = ۱۰ ماکرولیتر

6)کلون شماره ۱ دایجست شده با آنزیم E. coRI + HindIII = ۱۰ ماکرولیتر

7)مارکر bp ۱۰۰ = ۴ ماکرولیتر

8)کلون شماره ۳ حاوی ژن اکسیدوردوکتاز = ۵ ماکرولیتر

9) کلون شمارهٔ ۳ دایجست شده با آنزیم BamHI = ۱۰ ماکرولیتر

10)کلون شماره ۳ دایجست شده با آنزیم EcoRI = ۱۰ ماکرولیتر

11)کلون شمارهٔ ۳ دایجست شده با آنزیم HindIII = ۱۰ ماکرولیتر

12)کلون شماره ۳ دایجست شده با آنزیم EcoRI + HindIII = ۱۰ ماکرولیتر

13)کنترل منفی = ۱۰ ماکرولیتر

نتیجه این‌که فقط در ۱۴نوکلئوتید با یک‌دیگر متفاوت بودند یعنی حدود ۹۸ درصد توالی ژن اکسیدوردوکتاز باکتری‌ها شبیه توالی ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد می‌باشد، بنابراین ۹۸ درصد توالی، Conserve شده است و فقط در ۲ درصد از توالی با هم اختلاف دارند. برای پی بردن به این‌که آیا وجود ۲ درصد اختلاف نوکلئوتیدی، تأثیری در بیان اسیدهای آمینه و درنهایت بیان آنزیم اکسیدوردوکتاز دارد یا خیر؛ دوباره توسط برنامه کامپیوتری DNA star توالی ژن اکسیدوردوکتاز مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس (Translate DNA sequence FRF.seq) و همین‌طور توالی ژن اکسیدوردوکتاز مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد (Translate DNA sequence IGTS8.seq) نیز ترجمه شد، که ترجمه هر دو

www.SID.ir

دقیقاً ۱۹۳ اسیدآمینه است. سپس توالی هر دو اسید آمینه توسط همین برنامه کامپیوتری با هم مقایسه و Align گردید، که کاملاً توالی اسیدهای آمینه هر دو آنزیم اکسیدوردوکتاز شبیه یک‌دیگر بود و تنها تفاوت آن در یک اسید آمینه واقع در ناحیه Stop codon می‌باشد که تأثیری در بیان آنزیم ندارد (ضمیمه ۲). از تشابه توالی نوکلئوتیدی در این دو باکتری این طور به‌نظر می‌رسد که سویه در دست بررسی، می‌تواند شباهت‌ها و یا قرابت‌هایی با باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد داشته باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در طی این تحقیق، ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8*، با استفاده از پرایمرهایی که قبلاً بر اساس ژن اکسیدوردوکتاز باکتری استاندارد طراحی شده بود به‌وسیله تکنیک PCR جداسازی و کلون گردید و پس از تأیید کلونینگ، تعیین توالی شد. نتایج حاصل از تعیین توالی، مبیّن شباهت صددرصدی این ژن با ژن اکسیدوردوکتاز باکتری استاندارد بود.

در رابطه با شناسایی ژن اکسیدوردوکتاز و بررسی توالی آن مک فارلند [۱۱]، در مقاله خود متذکر شده که پروتئین مربوط به این ژن از نظر توالی با پروتئین دیگری از خانواده رودوکوکوس به‌نام *ThcE* همولوژی دارد. *ThcE* به الکل دهیدروژنازهای گروه III تعلق دارد و سنتز آن به‌وسیله آترازین، تیوکربامات، هربی‌سایدها یا الکل‌های نوع اول القا می‌شود.

در رابطه با شناسایی نحوه عملکرد پروتئین اکسیدوردوکتاز، با بررسی مسیر 4S، متوجه شدند که آنزیم خاصی باید حضور داشته باشد تا تأمین کننده عامل احیا (FMNH2) باشد. با این پیش فرض، Gray و همکارانش [۶] برای اولین بار اقدام به جداسازی ژن dszD از باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس نمودند. در مراحل بعد، افرادی همچون Xi و همکارانش [۱۶]، از پروتئین اکسیدوردوکتاز ویبریو هاروی برای تأمین عامل احیای مسیر گوگردزدایی استفاده کردند و بازده این مسیر را چندین برابر افزایش دادند. به این ترتیب آن‌چه ضروری به نظر می‌رسد کار بر روی افزایش بیان این ژن و استفاده از تشدیدکننده‌ها در بیان آن است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط پژوهش‌گاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری حمایت شده است. از مسئول واحد ارسال سکانسینگ جناب آقای مهدی شفا به خاطر همکاری‌های لازم قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Bressler DC, Fedorak PM. Identification of disulfides from the biodegradation of dibenzothiophene. Appl Microbiol, 2001; 67:5084-93.

[2] Chang JH, Rhee SK, Chang YK, Chang HN. Desulfurization of diesel oils by a newly isolated dibenzothiophene-degrading Nocarida sp. strain CYKS2. Biotechnol Prog, 1998; 14(6):851-5.

[3] Denis-Larose C, Bergeron H, Labbe D, Greer CW, Hawari J, Grossman MJ, Sankey BM, et al. Characterization of the basic replicon of Rhodococcus –Escherichia shuttle vector. Appl Envir Microbiol, 1998; 64:4363-7.

[4] Frassinetti S, Setti L, Corti A, Farrinelli P, Montevecchi P, Vallini G. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of Rhizobium meliloti. Can J Microbiol, 1998; 44:289-97.

[5] Gallagher JR, Olson ES, Stainley DC. Microbial desulfurization of dibenzothiophene A-sulfure specific pathway. FEMS Microbiol letters, 1993; 107(1):31-6.

[6] Gray KA, Pogrebinsky OS, Mrachko GT, Xi L, Monticello DJ, Squires CH. Molecular mechanism of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. Nat Biotechnol, 1996; 14:1705-9.

[7] Iwabuchi N, Sunairi M, Urai M, Itoh C, Anzai H, Nakajima M, et al. Extracellular polysaccharides of Rhodococcus rhodochrous S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacria. Appl Envir Microbiol, 2002; 68:2337-43.

[8] Li MZ, Squires CH, Monticello DJ, Childs JD. Genetic analysis of the dsz promoter and associated regulatory regions of Rhodococcus erythropolis IGTS8. J Bacteriol, 1996; 178:6409-18.

[9] Lee MK, Senius JD, Grossman MJ. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. Appl Envir Microbiol, 1995; 61:4362-6.

[10] Lizama HM, Wilkins LA, Scott TM. Debenzothiophene sulfure can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate reducing bacteria. Biotechnol Letters, 1995; 17(1):113-6.

[11] Oldfield C, Pogrebinsky O, Simmonds J, Olson ES, Kulpa CF. Elucidation of metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by Rhodococcus strain IGTS8 (ATCC53968). Microbiology, 1997; 143:2961-73.

[12] Ohshiro T, Kanbayashi Y, Hine Y, Izumi Y. Involvement of coenzyme in dibenzothiophene degrading enzyme system from Rhodococcus erythropolis D-l. Biosci Biotech Biochem, 1995; 59:1349-51.

[13] Purdy RF, Lepo JE, Ward B. Biodesulfurization of organic-sulfur compounds. Curr Microbiol, 1993; 27:219-22.

[14] Piddington CS, Kovacevich BR, Rambosek J. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of Rhodococcus sp. Strain IGTS8. Appl Envir Microbiol, 1995; 61:468-75.

[15] Mcfarland BL. Biodesulfurization. Curr Opin Microbiol, 1999; 2:257-64.

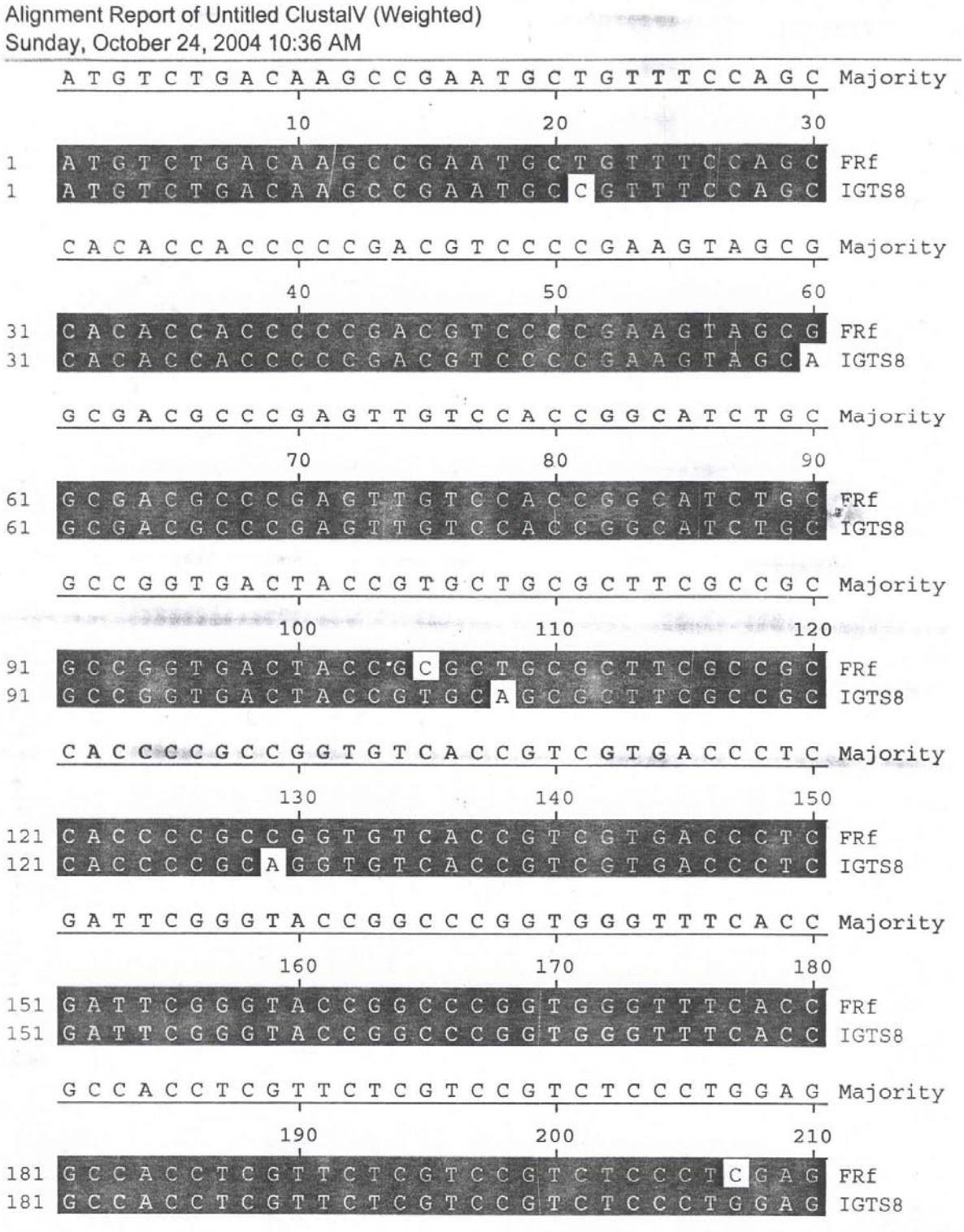
Archive of SID

www.SID.ir

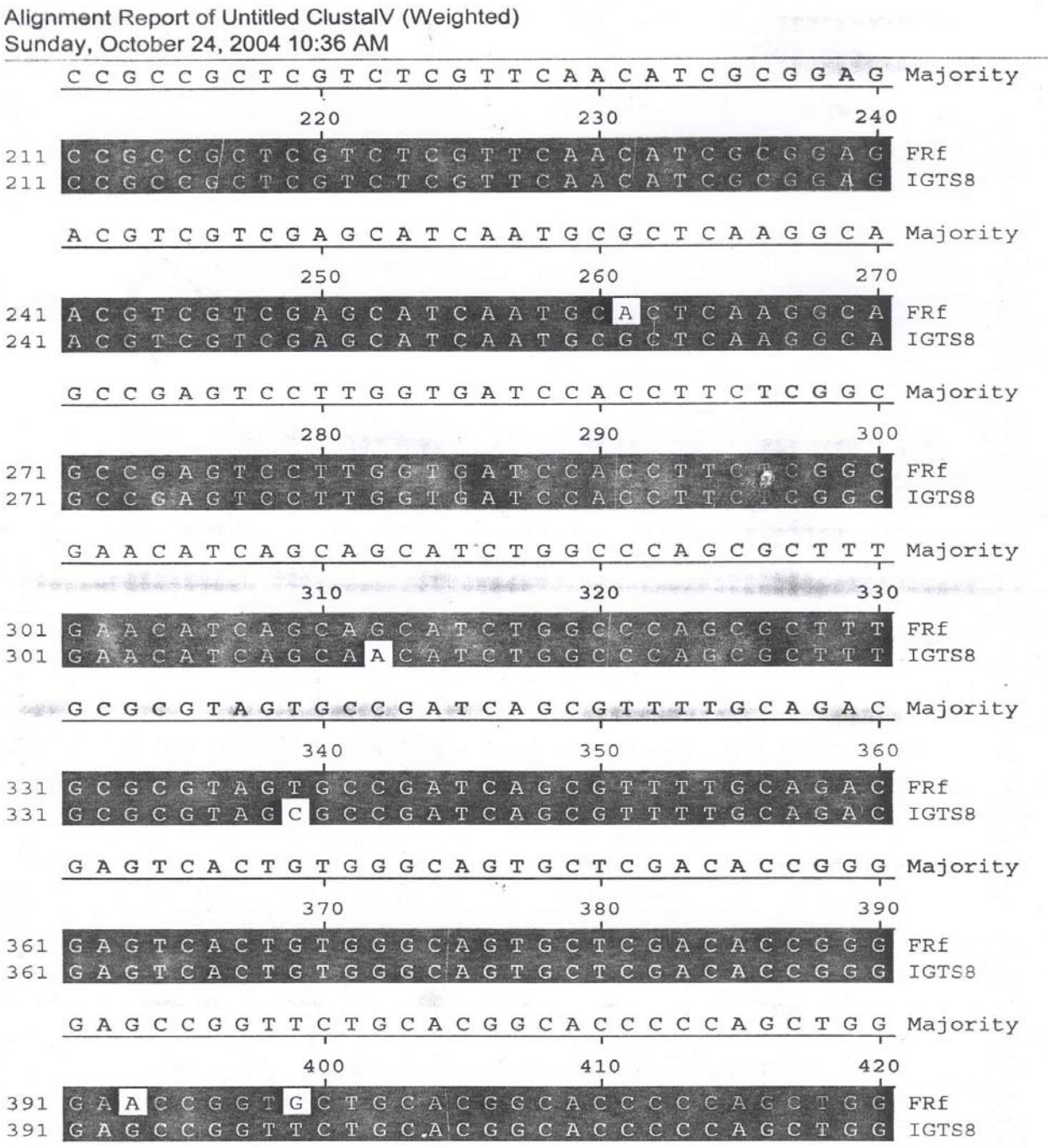
ضمیمه‌ها

[16] Xi L, Squires CH, Monticello DJ, Childs JD. A flavin reductase stimulates dszA and dszC proteins of Rhodococcus erythropolis IGTS8 in vitro. Biochem Biophys Res Commun, 1997; 230:73-5.

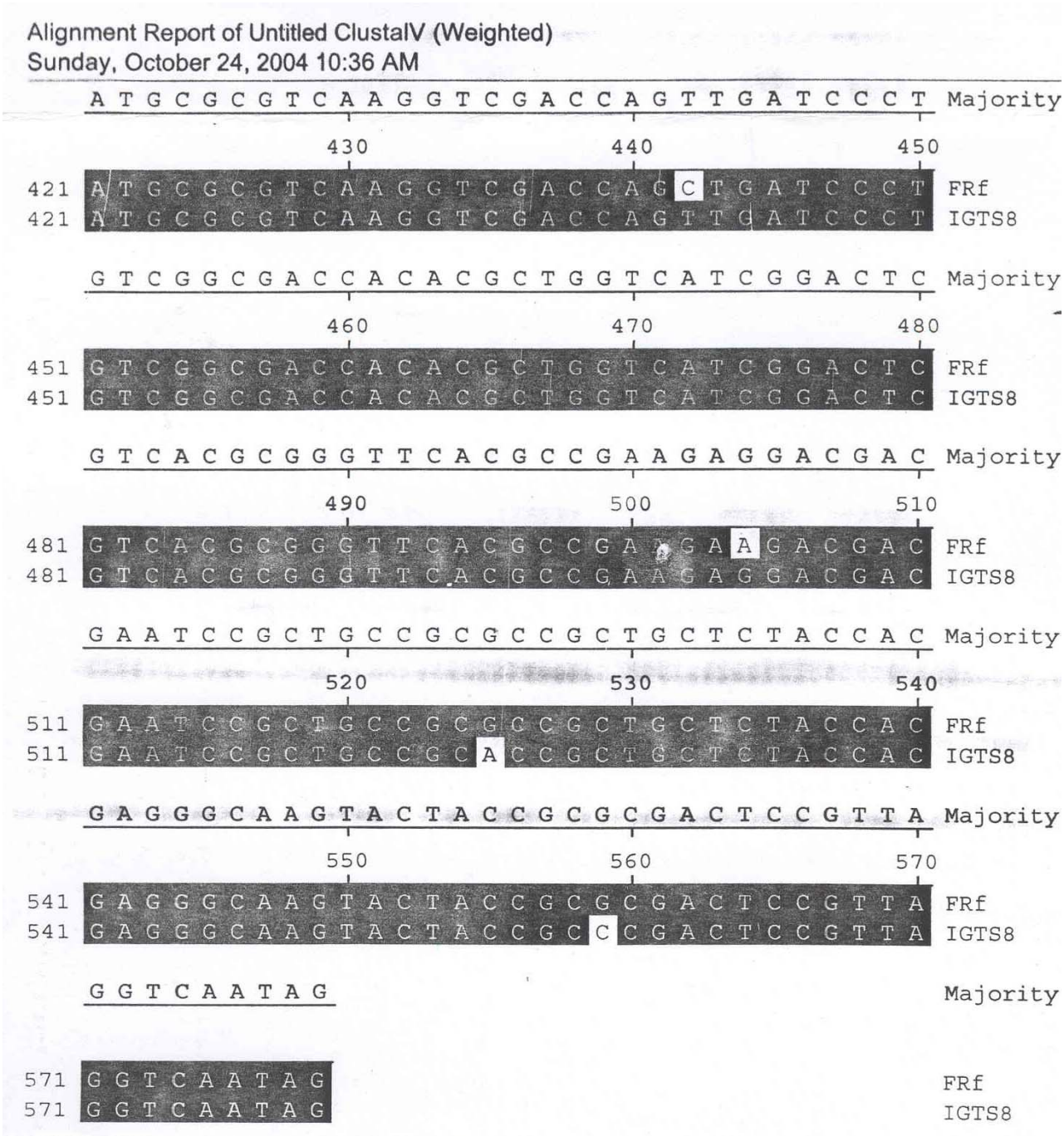
ضمیمه ۱.



www.SID.ir


Alignment Report of Untitled ClustalV (Weighted)
Sunday, October 24, 2004 10:36 AM
CCGCCGCTCGTCTCGTTCAACATCGCGGAG Majority
220 230 240
211 CCGCCGCTCGTCTCGTTCAACATCGCGGAG FRf
211 CCGCCGCTCGTCTCGTTCAACATCGCGGAG IGTS8
ACGTCGTCGAGCATCAATGCGCTCAAGGCA Majority
250 260 270
241 ACGTCGTCGAGCATCAATGCACTCAAGGCA FRf
241 ACGTCGTCGAGCATCAATGCGCTCAAGGCA IGTS8
GCCGAGTCCTTGGTGATCCACCTTCTCGGC Majority
280 290 300
271 GCCGAGTCCTTGGTGATCCACCTTCTCGGC FRf
271 GCCGAGTCCTTGGTGATCCACCTTCTCGGC IGTS8
GAACATCAGCAGCATCTGGCCCAGCGCTTT Majority
310 320 330
301 GAACATCAGCAGCATCTGGCCCAGCGCTTT FRf
301 GAACATCAGCAACATCTGGCCCAGCGCTTT IGTS8
GCGCGTAGTGCCGATCAGCGTTTTGCAGAC Majority
340 350 360
331 GCGCGTAGTGCCGATCAGCGTTTTGCAGAC FRf
331 GCGCGTAGCGCCGATCAGCGTTTTGCAGAC IGTS8
GAGTCACTGTGGGCAGTGCTCGACACCGGG Majority
370 380 390
361 GAGTCACTGTGGGCAGTGCTCGACACCGGG FRf
361 GAGTCACTGTGGGCAGTGCTCGACACCGGG IGTS8
GAGCCGGTTCTGCACGGCACCCCCAGCTGG Majority
400 410 420
391 GAACCGGTGCTGCACGGCACCCCCAGCTGG FRf
391 GAGCCGGTTCTGCACGGCACCCCCAGCTGG IGTS8

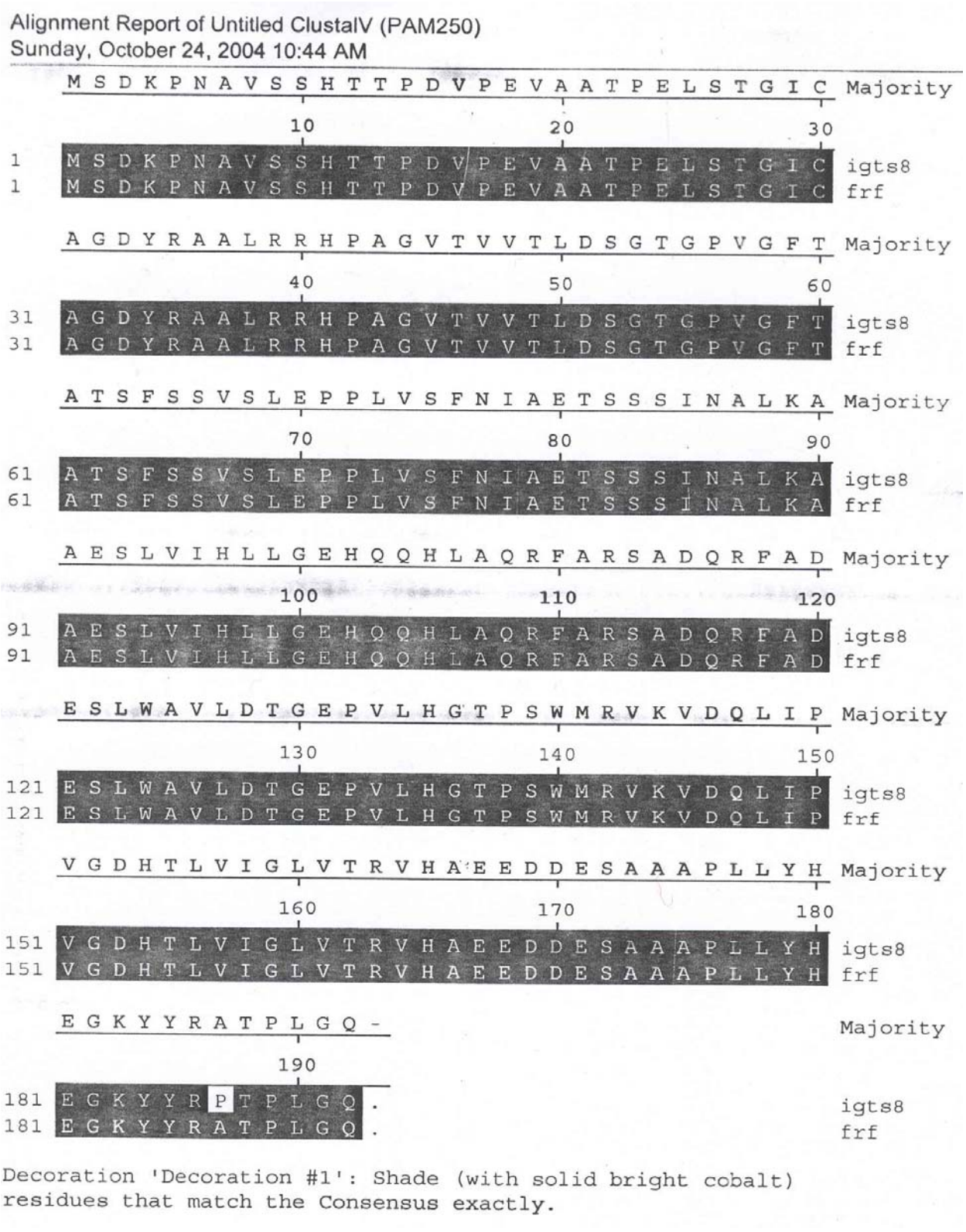
www.SID.ir



Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid bright cobalt) residues that match the Consensus exactly.

www.SID.ir

ضمیمه ۲.



www.SID.ir