

افزایش قدرت سولفورزدایی بیولوژیک از طریق کلونینگ و بیان ژن اکسیدوردوکتاز بدست آمده از باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 با استفاده از وکتور بیانی PET21a

جمشید راهب* (Ph.D)، الهام آقایی مقدم (M.Sc)، حدیث بهزادی (M.Sc)

چکیده

سابقه و هدف: بیودسولفوریزاسیون یک روش میکروبی است که طی آن با استفاده از سویه‌های بهینه شده باکتریایی سعی در افزایش توان قدرت گوگردزدایی از ترکیبات نفتی می‌شود، یکی از روش‌های موثر استفاده از ژن‌های اکسیدوردوکتاز افزایش یافته می‌باشد که FMNH2 مورد نیاز برای فعالیت ژن‌های گوگردزدایی را در دسترس قرار می‌دهند. در این مطالعه ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 که به عنوان یک سویه مدل در تحقیقات گوگردزدایی مطرح است با استفاده از تکنیک PCR بدست آمد. سپس برای بدست آوردن بیان بالاتر از وکتور بیانی PET21a استفاده شد.

مواد و روش‌ها: پلاسمید نو ترکیب PTZ57 OR از باکتری Ecoli-DH5α استخراج و توسط آنزیم‌های محدود کننده HindIII و EcorI برش داده شد که ژن اکسیدوردوکتاز به طول 600 bp جدا شد سپس در وکتورهای بیانی مختلف PKK و PET-21a کلون گردید و برای بررسی بیان سیتوپلاسمی پروتئینی مورد نظر پس از القاء با IPTG در زمان‌های مختلف بر روی ژل آکریل امید برده شد.

یافته‌ها: پس از تایید وجود ژن اکسیدوردوکتاز در پلاسمید PTZ57R بوسیله PCR این ژن در وکتور بیانی PKK کلون شد که در شرایط القایی یک باند ضعیف بر روی ژل SDS-page در ناحیه 25 KDa نشان داد. که برای بدست آوردن بیان بالاتر از وکتور PET-21a استفاده شد که باند شارپی را در همان ناحیه نشان داد. نتیجه‌گیری: جداسازی کلونینگ و بیان انبوه ژن اکسیدوردوکتاز در باکتری Ecoli منجر به افزایش قدرت بیان ژن‌های گوگردزدائی در سویه‌های مهندسی شده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، گوگردزدائی بیولوژیک، اکسیدوردوکتاز.

مقدمه

[-]

مواد و روش‌ها

مواد: weight , II Low Molecular

EcoRI , HindIII

Fermentase

[]

T4 DNA Ligase Agrose GeL DNA Extraction

Roche

PTZ57OR سویه‌های باکتریایی:

PTZ57R IGTS8

PCR

PKK223-3

Ecoli DH5α

IGTS8

dszA,B,C

Kb

Large استخراج پلاسمید:

dszD

() Scale

طراحی پرایمر و روش PCR :

-GAA TTC ATG TCT GAC AAG CCG

NADPH FMNH2

AAT GCC-3`

FMNH2 dszD

-TCT AGA CTA TTG ACC TAA CGG

AGT CGG-3`

Corbett Research

بیان پروتئین:

(SDS PAGE)

NADH, FMNH2

invitro

نتایج

Gene bank IGTS8

Ligation

(Ecoli, DH5α)

EcoRI

bp

()

HindIII

PTZ57OR

DNA PCR

1 2 3 4 5 6 7 8 9

()

Annealing 57

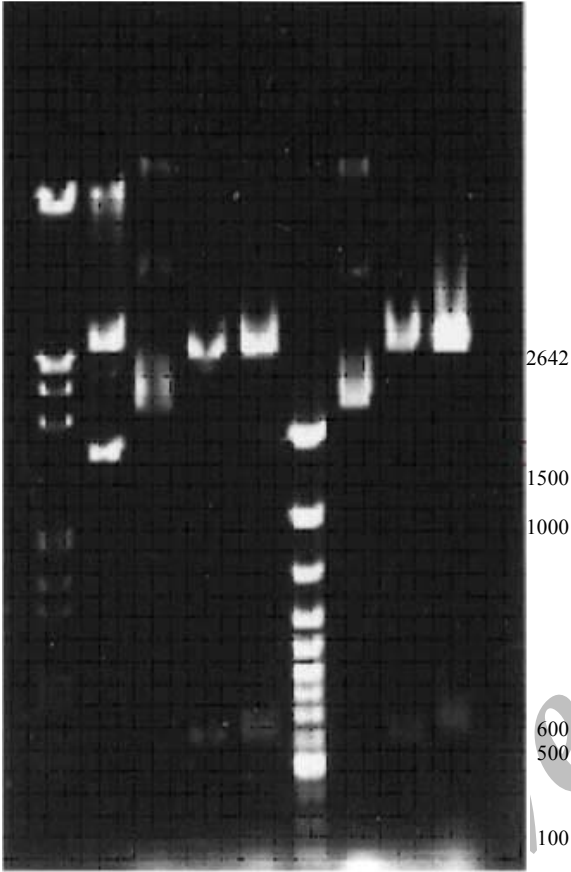
bp

PTZ57OR

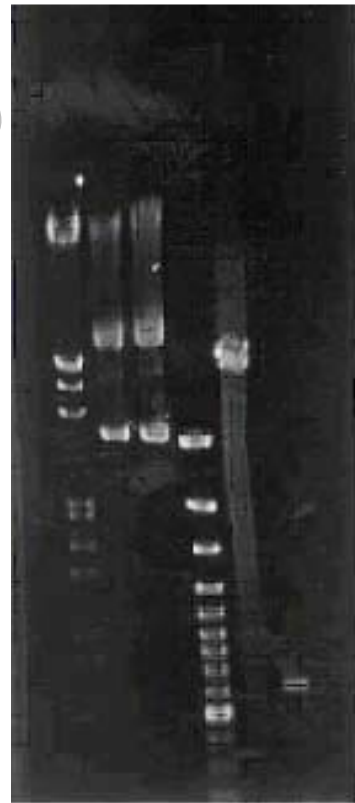
PKK223-3

PKK223-3

EcoRI, HindIII



1 2 3 4 5 6



pKK 233-3

insert pKK 233-3 (λ₃)

pKK 233-3 A (

EcoRI HindIII A (

pKK 233-3 A (100 bp (

D (

EcoRI HindIII

bp

pKK 233-

pKK 233-3

%1

3

pKK 233-3 (100bp (

pKK 233-3 (100bp (

(600 bp) (EcoRI HindIII

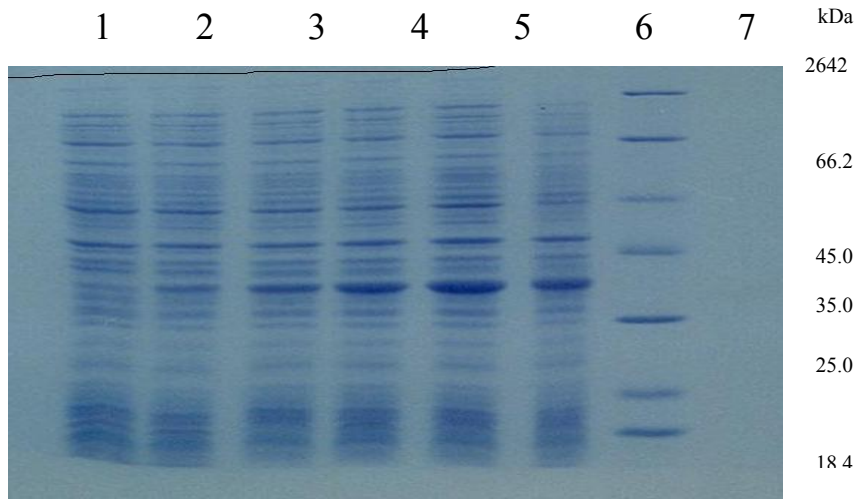
pTZ57OR

OD

Amp

LB

IPTG mM



SDS-PAGE

T7

PET-21a

PET-21a

DH5 α

IPTG

IPTG

(

IPTG

bp 600

dszD

PET-21a

PET-21a

aDH5

IGTS8

(

) PET-21a

(

)

PET-21a

PTZ57R

IPTG mM

PKK233-3

tac

()

% SDS - PAGE

PET-

PKK233-3

بحث و نتیجه گیری

21a

dszA dszC

PET-

T7

NADH

KD 22

21a

DszD

FMNH2

PET-

21a

NADH

DszD

dsz A,C

Dsz A, C

dszD

[1] In H.L. Ehrlich and C.L. Brierley (ed.) Microbial mineral recovery. Mc Graw-Hill book co. New York.

Dsz D

[2] Denis-Larose C. Labbe D. Bergeron H. and et al. Conservation of plasmid-encode dibenzothiophene deulfurization genes in several rhodococci. Appl. Envir. Microbiol. 1997; 63: 2915-2919.

[3] Denis-larose C. Bergeron H. Labbe D. and et al. Characterization of the basic replicon of rhodococcus plasmid Psox and development of a Rhodococcus-Escherichia coli Shuttlevector. Appl. Envir. Microbiol. 1998; 64: 4363-4367.

[4] Denome S.A. Olson E.S. and Young, K.D. Identification and cloning of genes involved in specificdesulfurization of debenzothiophene by Rhodococcus SP.strain IGTS8. Appl. Envir. Microbial. 1993; 59: 2837-2843.

[5] Foght J.M. Fedorak P.M. Gray M.R. and et al. Microbial desulfurization of petroleum. 1990; 379-407. In H.L.Ehrlich and C.L.Brierley(et.) microbial mineral recovery. Mc Graw Hill book Co. New York.

dszD

dszD

[6] Gray K.A. Pogrebinsky O.S. Mrachko G.T. and et al. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1705-1709.

[7] Grossman M.J. Lee. M.K prince R.C. and et al. 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. 1999; 65: 181-188.

[8] Honda H. Sugiyama D. Saito I. and et al. High cell density culture of Rhodococcus rhodochrous by PH-stat feeding and debenzothiophene degradation. J of Fermentation and Bioengineering. 1998; 85: 334-338.

[9] Maghsoudi S. Kheirilomoon A. Vossoughi M. and et al. Selective desulfurization of debenzothiophene by newly isolated Corynebacterium sp. Strain P32C1. Biochemical engineering Journal. 2000; 5: 11-16.

[10] Oldfield C. Poogrebinsky O. Simmonds J. and et al. Elucidation of the metabolic pathway for debenzothiophene desulfurization why Rhodococcus SP.strain IGTS8 (ATCC53968). Microbiology. 1997; 143: 2961-2973.

منابع

Archive of SID