

بیان ژن کدکننده متالوتیونین تیپ ۳ برنج (*OsMTI-3a*) در باکتری *E. coli*

Expression of gene encoding rice *OsMTI-3a* in *E. coli*

ایمان سلیمانی‌فرد^{۱*}، آذر شاه‌پیری

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

Soleimanifard I¹, Shahpiri A^{*1}

1. MSc Student, Assistant Professor, Isfahan University of Technology, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

متالوتیونین‌ها (MTs) گروهی از پروتئین‌های با وزن ملکولی پایین و غنی از آمینواسید سیستئین هستند که به واسطه دارا بودن گروه تیول فراوان، با فلزات مختلف اتصال پیدا می‌کنند. در گیاهان ایزوفرم‌های مختلفی از MT وجود دارد. در این پژوهش به منظور بررسی نقش ایزوفرم *OsMTI-3a* از گیاه برنج که متعلق به تیپ ۳ می‌باشد، توالی کدکننده این ایزوفرم در ناقل یانی pET41a همسانه‌سازی و به میزان یافته *E. coli* سویه (DE3) Rosetta ترانسفورم شد. پس از القای باکتری با IPTG، تولید این پروتئین همراه با شریک الحاقی GST در فاز محلول تایید شد. سویه شاهد نیز با انتقال پلاسمید بدون ژن به سویه (DE3) Rosetta تولید شد. مقایسه منحنی رشد سلول‌های باکتری بیان کننده پروتئین نوترکیب با باکتری شاهد در محیط حاوی هر یک از فلزات Cu, Zn, Cd و Ni و همچنین مقدار کاهش فلزات در محیط کشت و تجمع آن‌ها در رسوب باکتریایی توسط دستگاه طیف سنج جذب اتمی (AAS) نشان داد که سویه ترا ریخته قابلیت جذب فلزات را به صورت Cd>Ni>Zn>Cu دارد.

واژه‌های کلیدی

برنج
بیان هتروولوگ
فلزات سنگین
متالوتیونین
E. coli

مقدمه

دیده شده است. برخلاف انتهای آمینی، تعداد و الگوی سیستئین ها در انتهای کربوکسیلی این تیپ ها یکسان بوده به طوری که شش C-X-C-X-X- X-C-X-C-X-X-C-X در انتهای کربوکسیلی آنها قرار دارد. بر خلاف سه تیپ بالا، در تیپ ۴، سه دمین غنی از سیستئین وجود دارد (Cobbett and Goldsbrough 2002; Hall 2002). تجزیه های بیان ژن نشان داده اند که ژن های کد کننده MT گیاهی الگوی بیان متفاوتی را در بافت های مختلف دارند؛ این امر می تواند بیانگر این مطلب باشد که ایزو فرم های گوناگون این ژن ها ممکن است عملکرده ای متفاوتی را در بافت های ویژه داشته باشند (Yang et al. 2011; Cobbett and Goldsbrough 2002; Guo et al. 2003; Freisinger 2007; Guo 2005; Zhou et al. 2005). بر اساس نتایج این مطالعات مشخص شده که ژن های تیپ ۱ معمولاً در ریشه به مقدار بیشتری بیان می شوند؛ در صورتی که ژن های تیپ ۲ در برگ ها بیان بیشتری دارند. ژن های تیپ ۳ در گیاهان تولید کننده میوه های گوشتشی مانند موز، سیب و آناناس عمده ای در طی رسیدگی میوه ها بیان می شوند؛ اما در گیاهانی که میوه گوشتشی تولید نمی کنند آرابیدوپسیس سطح بیان در برگ ها بیشتر است (Zhu et al. 2008). در گیاه برنج مشخص شد که ژن کد کننده یکی از ایزو فرم های MT تیپ ۳ (EF136378) به صورت عمده در برگ بیان می شود؛ این در حالی است که این ژن در ساقه به صورت اندک و در جوانه و ریشه به ندرت بیان شد (Oil Palm) *Elaeis guineensis* (Ramli and Abdullah 2010).

علی رغم وجود اطلاعات بسیار در مورد اثر تیمارهای مختلف فلز و یا دیگر تشکیلات محیطی بر بیان ژن های کد کننده MT گیاهی در سطح mRNA، تحقیقات بسیار اندکی بر روی عملکرد و نقش اختصاصی اعضای این خانواده پروتئینی صورت گرفته است. استفاده از روش های مبتنی بر مهندسی زنگنه و انجام آزمایشات با انتقال هر یک از ژن های کد کننده MT گیاهی به موتاسیون یافته های حساس به فلز در باکتری و یا مخمر، می تواند راهکار مناسبی را جهت بررسی عملکرد ژن های مرتبط با هوموستازی

در دهه های اخیر، همزمان با توسعه صنعتی جوامع بشری، ورود آلاینده های محیطی به اکوسیستم های طبیعی افزایش بی سابقه ای یافته است به طوری که در برنامه ریزی سازمان های بین المللی آلودگی های زیست بوم در کنار محدودیت منابع آب از مهم ترین تهدیدات قرن حاضر معرفی شده است (Hyun et al. 1998; Freisinger 2008). در این میان، آلوده کننده های فلزی درصد قابل توجهی از آلاینده های زیستی را به خود اختصاص داده اند. به دلیل ویژگی تجزیه ناپذیری شیمیایی و زیستی، پالایش آلاینده های فلزی از طبیعت بسیار دشوار می باشد که این عوامل سبب افزایش تاثیرات مخرب آنها بر محیط زیست شده است (Chaney 1997; Lovely et al. 1997). تقریباً تمام فلزات سنگین در بدن، پیامدهای زیانباری از خود بر جای می گذارند. بعضی از آنها مانند کادمیوم، نیکل و جیوه حتی در مقادیر ناچیز نیز برای انسان سمی و خطرناک می باشند (Zazouli et al. 2010).

متالو-تیونین ها^۱ (MTs)، پروتئین های درون سلولی با وزن مولکولی کم (۵ تا ۱۰ کیلو دالتون) و غنی از آمینواسید سیستئین می باشند که در بسیاری از موجودات تکسلولی و پرسلولی مانند حیوانات، گیاهان عالی، قارچ ها و سیانوباکتری ها شناسایی شده و در هوموستازی فلزات ضروری و نیز کاهش سمیت فلزات سنگین نقش مهمی را ایفا می کنند (Freisinger 2008). وجود ایزو فرم های متعدد از MT در گیاهان می تواند دلیلی بر اهمیت نقش آنها در این جانداران باشد. ایزو فرم های گیاهی MT بر اساس نحوه توزیع آمینواسید سیستئین موجود در انتهای آمینی پروتئین، در چهار تیپ گروه بندی شده اند. در تیپ های ۱، ۲ و ۳ دو دمین^۲ سرشار از آمینواسید سیستئین در دو انتهای کربوکسیلی و آمینی پروتئین وجود دارد که توسط یک ناحیه فاصله انداز عاری از سیستئین از هم جدا می شوند. به جز در مواردی استثنای در تیپ ۱، شش آمینواسید سیستئین به صورت موتیف C-X-C (X: هر آمینو اسیدی به جز سیستئین)، در تیپ ۲، هشت سیستئین بصورت موتیف C-X-C و C-X-X-C در تیپ ۳، چهار سیستئین به صورت موتیف C-X-C-X-C در انتهای آمینی پروتئین

¹ Metallothioneins = MTs² Domain

باfer (10X) PCR و MgSO₄ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار انجام شد. واکنش PCR در ۳۰ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت کردن در دمای C ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای C ۶۲° به مدت یک دقیقه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای C ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای C ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و خالص سازی آن به وسیله Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (فرمتاز، K0513) انجام شد. در گام بعد، محصول PCR خالص سازی شده از ژل، با آنزیم های HindIII (فرمتاز) و EcoRI (فرمتاز) مورد هضم قرار گرفت و سپس خالص سازی محصول واکنش از روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام شد. با هدف ایجاد جایگاه های مناسب جهت قرار گیری قطعه ژنی در وکتور، پلاسمید pET41a با اندازه ۵۹۳۳ جفت باز به عنوان وکتور بیانی با آنزیم های HindIII و EcoRI برش داده شد و خالص سازی محصول واکنش از روی ژل آگارز یک درصد انجام شد. واکنش لیگاکسیون بین پلاسمید خطی شده pET41a و قطعه ژن کد کننده OsMTI-3a با استفاده از آنزیم Lیگاز (فرمتاز) صورت گرفت. بعد از آن، محصول واکنش T4 DH5α لیگاکسیون با روش الکتروپوریشن به باکتری های مستعد انتقال داده شد. جهت انتخاب باکتری های تاریخت، واکنش PCR از کلنی های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی LB (Luria Bertani) (حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر) انجام شد (Sambrook and Russell 2001). جهت بررسی صحت همسانه سازی قطعه ژن کد کننده OsMTI-3a در وکتور، پلاسمید های استخراج شده از کلنی های تایید شده، با دو آنزیم EcoRI و HindIII برش داده شدند و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. در نهایت جهت تایید صحت توالی نوکلئوتیدی، استخراج پلاسمید های نوترکیب pET41a-OsMTI-3a توسط کیت استخراج پلاسمید (فرمتاز، Pioneer) انجام گرفت و جهت توالی بایی به شرکت K0502 ارسال شد.

فلزات ایجاد کند و نیز اطلاعات تازه ای را در رابطه با تعیین ایزو فرم های مختلف MT در واکنش با فلزات فراهم سازد. در گیاه برنج ژن های کد کننده ایزو فرم های مختلف از هر چهار تیپ MT شناسایی شده است، با این وجود اطلاعات اندکی از نقش و عملکرد اختصاصی این ایزو فرم ها در رابطه با قابلیت آنها در اتصال به فلزات در دسترس می باشد. در این پژوهش توالی کد کننده ایزو فرم a OsMTI-3a که یکی از دو ایزو فرم شناسایی شده MT تیپ ۳ گیاه برنج است، به باکتری E. coli انتقال داده شد و سپس تاثیر بیان ژن مذکور بر میزان تحمل سلول های باکتری به فلزات سنگین مورد بررسی قرار گرفت. توالی ژن کننده این ایزو فرم دارای ۱۸۹ جفت باز بوده و پروتئینی به طول ۶۲ آمینواسید را سنتز می کند. این ایزو فرم در توالی خود دارای ۱۰ آمینواسید سیستین می باشد؛ به طوری که چهار سیستین در انتهای آمینی و شش سیستین در انتهای کربوکسیلی توزیع یافته است. دو ناحیه غنی از سیستین در این پروتئین، توسط یک ناحیه فاصله انداز عاری از سیستین از یکدیگر جدا شده اند.

مواد و روش ها

تکثیر، همسانه سازی و توالی بایی ژن ایزو فرم حاضر، متعلق به MT تیپ ۳ گیاه برنج با شماره ثبت Zhou et al. AF001396 در بانک ژن و نام OsMTI-3a می باشد (2006). توالی ژن کد کننده این ایزو فرم از کتابخانه cDNA مرکز pFLCI (http://www.dna.affrc.go.jp) که در پلاسمید NIAS همسانه سازی شده تهیه شد. جهت تکثیر توالی ژن کد کننده، آغازگر اختصاصی رفت (Forward) با توالی نوکلئوتیدی 5'-ATATGAATTCAATGTCGGACAAGTGCG-3' (زیر جایگاه آنزیم برشی EcoRI خط کشیده شده است) و آغازگر اختصاصی برگشت (Reverse) با توالی نوکلئوتیدی 5'-ATATAAGCTTCACTTGCCGCACCTGC-3' (زیر جایگاه آنزیم برشی HindIII خط کشیده شده)، بر اساس ابتدا و انتهای توالی کد کننده ژن OsMTI-3a طراحی شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱/۷۵ واحد آنزیم Pfu پلیمراز (فرمتاز)، ۵۰ نانو گرم pFLCI-cDNA-OsMTI-3a به عنوان الگو، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر

غلهٔ ۱/۵ میلی‌مولار مس، دو میلی‌مولار نیکل، یک میلی‌مولار روی و ۰/۶ میلی‌مولار کادمیوم به عنوان غلهٔ ۱۰ آستانه تحمل به فلز سلول‌های باکتری شاهد Rosetta-pET41a تعیین شد.(Karbasizaed et al. 2003; Spain 2003; Rajbanshi 2008) سپس به تعداد فلزات مورد بررسی، باکتری‌های Rosetta-pET41a pET41a (شاهد) و Rosetta-pET41a-OsMTI-3a (باکتری حاوی پلاسمید pET41a-OsMTI-3a) در محیط کشت LB به همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلرامفینیکل (۵ میلی‌گرم بر لیتر) رشد داده شدند. به هنگام رسیدن OD₆₀₀ به ۰/۷، القای بیان پروتئین در هر دو سویه توسط IPTG و به غلهٔ نهایی ۱۰۰ میکرومولار انجام شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه یکی از نمک‌های کلرید کادمیوم، سولفات‌مس، سولفات‌روی و کلرید نیکل به محیط کشت اضافه شد به طوری که غلهٔ نهایی فلز‌های کادمیوم، مس، روی و نیکل در محیط کشت به ترتیب به ۰/۶، ۱/۵، یک و دو میلی‌مولار رسید. رسم منحني رشد باکتری‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf, Rs323C) با اندازه‌گیری OD₆₀₀ صورت گرفت. در دو زمان اضافه شدن فلز به محیط کشت (T0) و شش ساعت پس از آن (T1)، جهت بررسی توانایی باکتری در حذف فلز از محیط کشت، نمونه‌هایی از محیط کشت در فالکون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه و g × ۵۰۰۰ سانتریفیوژ (Eppendorf, 5810R) شد. فاز بالایی (محیط کشت) فالکون‌ها به دقت برداشته و در لوله‌های جداگانه‌ای نگهداری شد. جهت تعیین مقدار فلز، هر نمونه به وسیله دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی^۱ (Rayleigh, WFX-210) ارزیابی شد.

نتایج و بحث

پس از قرارگیری و همسانه‌سازی ژن کد کننده OsMTI-3a در پلاسمید pET41a و ترانسفورم آن به باکتری DH5α، توسط واکنش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعهٔ ۲۰۹ جفت بازی در کلنهای رشد یافته نشان داده شد. سپس کلنهای واجد ژن، مورد واکنش هضم دو طرفه آنژیمی به وسیله EcoRI و HindIII قرار گرفتند. جدا شدن قطعه

E. coli پیان پروتئین نوترکیب در باکتری pET41a-OsMTI-3a و نیز پلاسمید pET41a مستعد باکتری E. coli (S. Nezhad et al. 2003) ترانسفورم شدند. به دلیل حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین بر روی پلاسمید pET41a و نیز مقاومت باکتری Rosetta (DE3) به آنتی‌بیوتیک کلرامفینیکل (Novagen, 2005)، سلول‌های باکتری ترانسفورم شده در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلرامفینیکل (۵ میلی‌گرم بر لیتر) و بر روی انکوباتور با ۱۸۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷°C کشت داده شدند. هنگامی که OD₆₀₀ به ۰/۷ رسید، IPTG^۱ به عنوان ماده القاگر به غلهٔ نهایی ۱۰ میلی‌مولار به محیط‌های کشت اضافه شد. در فواصل زمانی مختلف نمونه‌برداری از سوسپانسیون باکتریایی در ویال‌های اپندورف (Mohammadi Nezhad et al. 2013) میلی‌لیتری صورت گرفت (Eppendorf, 5418) شدند. بعد از آن، محلول رویی ویال‌ها دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۲۰۰ میکرولیتر تریس-اسیدکلریدریک ده میلی‌مولار (pH=8) سوسپانسیون شد. به منظور استخراج پروتئین‌های محلول، دیواره سلول‌های باکتری با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (Hielscher, UP50H) تخریب شد. سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در g × ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴°C صورت پذیرفت و فاز رویی آن جهت بررسی میزان بیان پروتئین محلول بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگذاری شد.

بررسی میزان تحمل سلول‌های E. coli به فلزات سنگین جهت بررسی تاثیر بیان پروتئین OsMTI-3a بر میزان تحمل به فلزات سلول‌های E. coli (S. Nezhad et al. 2013). ابتدا تاثیر غلهٔ ۱۰ آستانه تحمل های ZnSO₄·7H₂O، CdCl₂·H₂O، Rosetta-pET41a و NiCl₂ و CuSO₄·5H₂O، (باکتری Rosetta حاوی پلاسمید pET41a) ارزیابی شد و غلهٔ آستانه تحمل هر یک از فلزات مشخص شد (Mohammadi et al. 2013). بر اساس تحلیل منحنی‌های رشد فلزات،

^۱ Atomic absorption spectroscopy

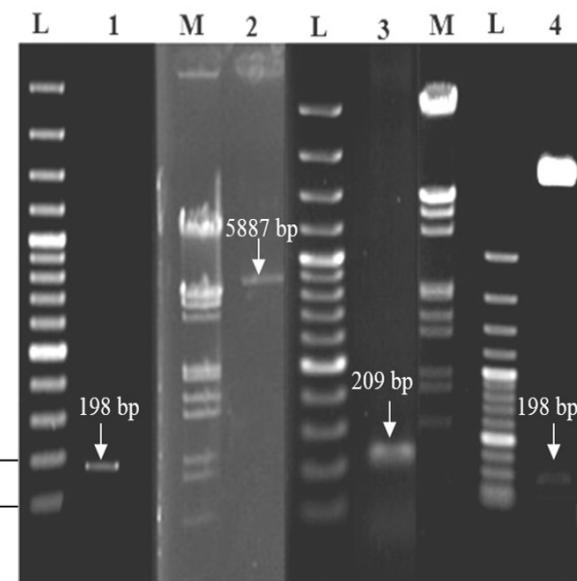
^۱ Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

یافی ژن کد کننده متالوتیونین تیپ ۳ بونج (OsMTI-3a)...

(OsMTI-3a) به ترتیب ۳۵/۵ و ۳۸/۹ کیلو دالتون پیش‌بینی شد (http://web.expasy.org/protparam). وجود باندهای پروتئینی با وزن مولکولی موردنظر بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد تولید موفق پروتئین‌های GST و GST-OsMTI-3a را در فاز محلول تایید کرد (شکل ۳).

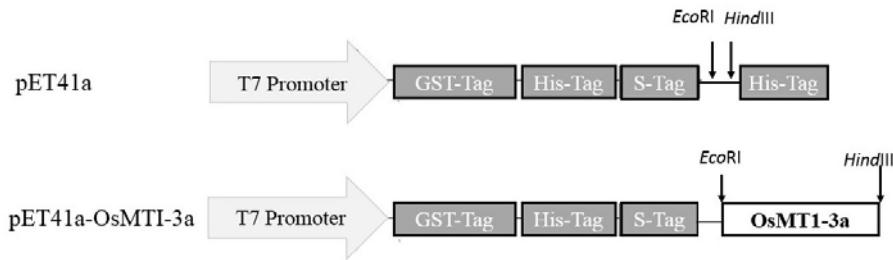
منحنی رشد سلول‌های باکتری Rosetta-pET41a-OsMTI-3a در مقایسه با سلول‌های باکتری شاهد Rosetta-pET41a در حضور فلز بررسی شد. نتایج نشان داد که در غلظت‌های آستانه تحمل فلزات کادمیوم، نیکل و روی، سلول‌های Rosetta-pET41a-OsMTI-3a که بیان کننده پروتئین a GST-OSMTI-3a می‌باشند، دارای OD₆₀₀ نهایی بالاتری نسبت به باکتری‌های شاهد بودند؛ این در حالی است که در مورد فلز مس، OD₆₀₀ نهایی باکتری‌های Rosetta-pET41a-OsMTI-3a با باکتری شاهد تقریباً یکسان بود (شکل ۴). به منظور اطمینان از این که مقاومت مشاهده شده در سلول‌های بیان کننده پروتئین a GST-OsMTI-3a به فلزات در اثر افزایش ظرفیت این سلول‌ها برای جذب فلز می‌باشد، بررسی افزایش تجمع فلز در رسوب باکتریایی و به تبع آن کاهش فلز در محیط کشت سلولی مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور میزان فلزات در فاز محیط کشت در دو زمان اضافه شدن فلز به محیط کشت (T0) و زمان ثابت شدن رشد سلولی باکتری (شش ساعت پس از افزودن فلز به محیط کشت؛ T1) سنجیده شد. نتایج نشان داد که بیان پروتئین a GST-OsMTI-3a در محیط‌های حاوی فلزات کادمیوم، روی و نیکل کاهش این فلزات را در فاز محیط کشت سلولی سبب شد و در نتیجه تجمع این فلزات را در فاز رسوب باکتریایی به دنبال داشت؛ بطور مشخص در زمان T1 سویه Rosetta-pET41a-OsMTI-3a نسبت به سویه شاهد Rosetta-pET41a فلزات کادمیوم، روی و نیکل را به ترتیب به میزان ۱۷/۲، ۸/۴ و ۱۲/۶ درصد از فاز محیط کشت حذف کرد. در مورد فلز مس، در دو زمان T0 و T1، مقدار فلز در محیط Rosetta-pET41a-OsMTI-3a و Rosetta-pET41a سویه بثابت بود و به نظر می‌رسد بیان OsMTI-3a نقشی در جذب فلز نداشت (شکل ۵).

به طول ۱۹۸ جفت باز از پلاسمید نوترکیب pET41a-OsMTI-3a موفقیت همسانه‌سازی ژن کد کننده OsMTI-3a در وکتور pET41a را تایید کرد (شکل ۱). همچنین از طریق توالی‌بایبی، صحت توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنی با استفاده از آغازگرهای T7 Promoter/Terminator تایید شد.



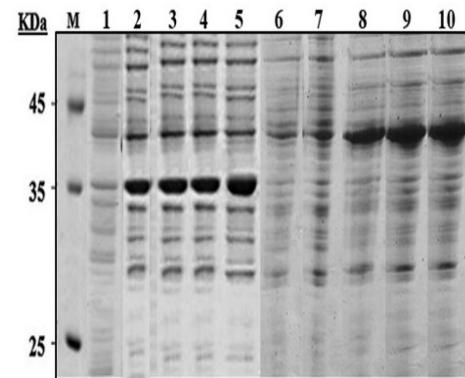
شکل ۱- روند تولید پلاسمید نوترکیب pET41a-OsMTI-3a بر روی ژل آکارز. ستون (۱) الکتروفورز محصول خالص‌سازی شده هضم آنزیمی-3a با EcoRI و HindIII تکثیر شده به وسیله واکنش PCR؛ ستون (۲) الکتروفورز پلاسمید خطی شده بوسیله آنزیم‌های EcoRI و HindIII؛ ستون (۳) الکتروفورز محصل و واکنش Colony PCR یکی از کلتهای واحد قطعه ژنی با تکثیر قطعه ۲۰۹ (ستون ۴) الکتروفورز واکنش هضم دو طرفه آنزیمی با آنزیم‌های EcoRI و HindIII و جداسازی قطعه a به طول ۱۹۸ جفت باز؛ ستون (M) نشانگر مولکولی III (فرمتاز)؛ ستون (L) DNA Ladder (100-۳۰۰ bp).

پلاسمیدهای pET41a-OsMTI-3a و pET41a به میزان بیانی E. coli سویه (DE3) Rosetta، جهت تولید پروتئین نوترکیب انتقال داده شدند. توالی کد کننده این ایزوform در ناقل بیانی pET41a در S-His-Tag و GST-Tag می‌باشد (شکل ۲). وزن مولکولی دنباله‌های پروتئینی در پلاسمید pET41a (با نام کلی GST) و نواحی بیان GST‌ونده در پلاسمید pET41a-OsMTI-3a (با نام اختصاری-

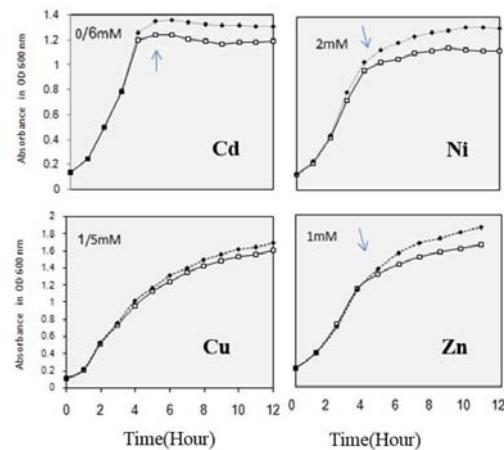


شکل ۲- شکل شماتیک نواحی بیان شونده بر روی پلاسمید pET41a و pET41a-OsMTI-3a

در سال‌های اخیر با توجه به گسترش فعالیت‌های صنعتی و افزایش روز افزون آلاینده‌های فلزی به محیط زیست، شناسایی و درک مکانیسم‌های تحمل به تنفس فلزات در جانداران مختلف به منظور به کارگیری و نیز بهبود آنها توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در این ارتباط، یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های شناخته شده، کلاته شدن یون‌های فلزی از طریق گروه تیول آمینواسید سیستئین موجود در MT‌ها می‌باشد (Hall 2002). در گیاهان ایزوفرم‌های متعددی از MT وجود دارد که در اثر عوامل گوناگون و در مراحل مختلف رشدی گیاه و در بافت‌های متفاوتی بیان می‌شوند که این امر فرضیه نقش اختصاصی بودن آنها را تقویت می‌کند (Cobbett and Goldsbrough 2002). علی‌رغم شناسایی و مطالعه ایزوفرم‌های MT در گیاهان اطلاعات نادری از نقش ایزوفرم‌های MT در کلاته کردن فلزات مختلف وجود دارد. به سبب اکسیداسیون آمینواسیدهای سیستئین در مجاورت با اکسیژن و نیز تجزیه شدن سریع پروتئین، در عمل مطالعه مستقیم و استخراج MT گیاهی بسیار دشوار می‌باشد؛ لذا بیان ایزوفرم‌های گوناگون MT به همراه دنباله‌های پروتئینی در میزان‌هایی نظری باکتری E. coli راه حلی مناسب به منظور سهولت در تولید، خالص‌سازی و مطالعه عملکرد آنها می‌باشد (Freisinger 2008; Huang and wang 2010; Chaturvedi et al. 2012). پژوهش فرم نوترکیب پروتئین OsMTI-3a برنج در باکتری E. coli سویه Rosetta (DE3) در الحاق با دنباله GST تولید شد. سپس نقش اختصاصی آن در تنفس فلزی ایجاد شده در محیط کشت سلولی بررسی شد. نتایج بررسی منحنی رشد سویه نوترکیب pET41a-OsMTI-3a در حضور فلزات نشان



شکل ۳- بررسی ژل SDS-PAGE بیان پروتئین‌های GST (شاهد) ۲۵/۵ کیلوdalton و ۳۸/۹ GST-OsMTI-3a کیلوdalton تولید شده در باکتری E. coli سویه (M) مارکر پروتئینی، محتوای پروتئین‌های محلول استخراج شده در زمان‌های صفر، ۱، ۲، و ۴ ساعت پس از القای IPTG از سلول‌های باکتری حاوی پلاسمید pET41a (ستون‌های ۵-۲) و pET41a-OsMTI-3a (ستون‌های ۷-۱۰)؛ ستون‌های ۱ و ۶ به ترتیب محتوای پروتئینی IPTG باکتری حاوی پلاسمید pET41a-OsMTI-3a و pET41a بدون القای

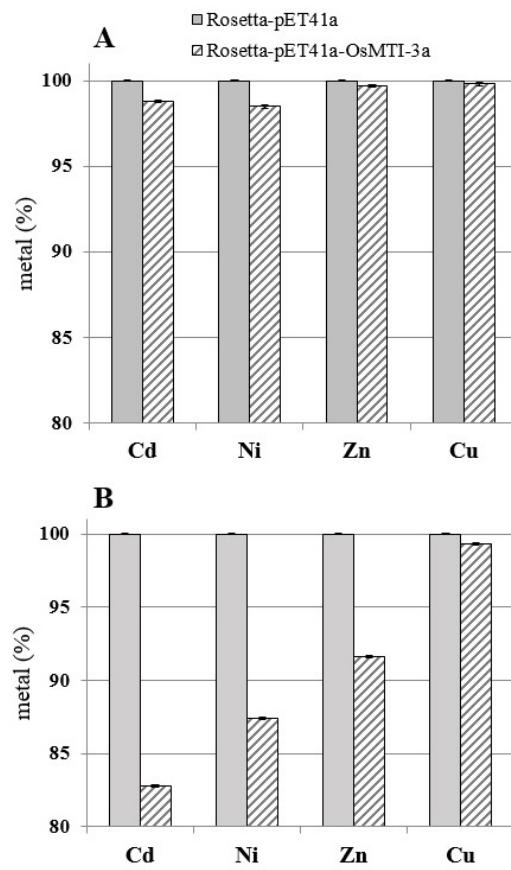


شکل ۴- مقایسه تأثیر بیان پروتئین‌های نوترکیب بر نحوه رشد باکتری در حضور فلزات مختلف. (□) سویه حاوی پلاسمید pET41a (◆) سویه حاوی پلاسمید pET41a-OsMTI-3a

بیان ژن کد کننده متالوتیونین تیپ ۳ برنج (OsMTI-3a)...

برابری میزان تجمع فلز روی در سلول‌های باکتری *E. coli* شد (Abdullah 2002). همانند پژوهش حاضر گزارش‌های دیگری نیز وجود دارد که نشان می‌دهد بیان ژن MT در باکتری *E. coli* به طور موثری سبب افزایش تحمل باکتری به فلز کادمیوم می‌شود؛ از آن جمله در آزمایشی با بیان فراوان پروتئین SbMT-2 در *E. coli* الحاق با دنباله پروتئینی GST، مقاومت سلول‌های باکتری *E. coli* به فلز کادمیوم افزایش یافت (Chaturvedi et al. 2012). همچنین بیان پروتئین الحاقی GST-dMT ۱ در مطالعات صورت *E. coli* به فلز کادمیوم شد (Blindauer 2008). مطالعات صورت گرفته بر روی ایزوفرم‌های MT برنج نشان داده‌اند ایزوفرم‌های تیپ‌های ۱ تا ۳، علی‌رغم فقدان یک ناحیه غنی از سیستئین در مقایسه با تیپ ۴، از توانایی بالاتری جهت کلاته کردن فلزات سنگین برخودارند. در یک پژوهش، تولید پروتئین نوترکیب ایزوفرم OsMTI-1b از OsMTI-1a در مقایسه با ایزوفرم OsMTII-1a از تیپ ۴ بر تحمل باکتری *E. coli* به فلزات مطالعه شد؛ نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش بیان پروتئین OsMTI-1b برنج موجب کاهش فلزات نیکل، کادمیوم و روی از فاز محیط کشت و در نتیجه تحمل بیشتر باکتری تولید کننده پروتئین به این فلزات می‌شود در صورتی که بیان پروتئین OsMTII-1a برنج در باکتری، تنها موجب افزایش نسبی تحمل باکتری به فلز نیکل در محیط سلولی شد و در تحمل باکتری به دیگر فلزات بررسی شده تاثیر چندانی نداشت (Mohammadi Nezhad et al. 2013). مطالعه بر روی بیان ژن OsMTI-1a نشان داد تولید این پروتئین بر روی تحمل سلول‌های باکتری *E. coli* به فلزات کادمیوم و روی تاثیرگذار بوده و آن را بهبود بخشید (Shumei et al. 2006; Rodriguez-Llorente et al. 2010). همچنین در آزمایشی دیگر نیز با بیان فراوان ژن OsMTI-1a در سلول‌های مخمر و گیاه برنج نتایج مشابهی بدست آمد؛ بدین صورت که سبب تجمع قابل توجه فلز روی در مقایسه با شاهد شد (Yang et al. 2009). از سوی دیگر بیان ایزوفرم‌های مختلف MT گیاه برنج در تمامی پژوهش‌های انجام گرفته فوق، همانند تحقیق حاضر، نشان داد که هیچ یک از این ایزوفرم‌ها قابلیت کلاته کردن فلز مس را ندارند.

داد که بیان ژن *OsMTI-3a* در افزایش تحمل سلول‌های باکتری به فلزات کادمیوم، نیکل و روی تاثیرگذار بوده، اما در افزایش تحمل به فلز مس نقشی نداشت. با کشت باکتری نوترکیب و شاهد در محیط حاوی فلزات و سپس اندازه‌گیری میزان فلز در محیط کشت مشخص شد تحمل در سویه بیان کننده پروتئین GST-OsMTI-3a به دلیل تجمع فلز در درون سلول‌های باکتری می‌باشد و بدین ترتیب نتایج به دست آمده از منحنی‌های رشد تایید شد. این افزایش تحمل به فلز به احتمال زیاد به دلیل نقش پروتئین نوترکیب در کلاته کردن فلزات حاصل شده است.



شکل ۵- درصد فلز در فاز محیط کشت در باکتری شاهد (A) Rosetta-pET41a و باکتری (B) زمان ثابت شدن رشد باکتریها (T0)؛ (T1). هر داده میانگین (± انحراف معیار) دو آزمایش مستقل می‌باشد.

شواهدی نیز در تاثیر بیان فرم نوترکیب ایزوفرم‌های تیپ ۳ گیاهی در باکتری بر افزایش تحمل آن به فلزات وجود دارد به طوری که در پژوهشی بیان ایزوفرم GST-EgMT-3 منجر به افزایش سه

منابع

- Abdullah SNA, Cheah SC, Murphy DJ (2002) Isolation and characterization of two divergent type 3 metallothioneins from oil palm, *Elaeis guineensis*. Plant Physiology and Biochemistry 40: 255-263.
- Blindauer CA (2008) Metallothioneins with unusual residues: histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. Journal of Inorganic Biochemistry 102: 507-521.
- Chaney RL (1997) Phytoremediation of soil metals. Current Opinion In Biotechnology 8: 279-284.
- Chaturvedi AK, Mishra A, Tiwari V, Jha B (2012) Cloning and transcript analysis of type 2 metallothionein gene (SbMT-2) from extreme halophyte *Salicornia brachiatia* and its heterologous expression in *E. coli*. Gene 499: 280-287.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annual Review of Plant Biology 53: 159-182.
- Freisinger E (2007) Spectroscopic characterization of a fruit specific metallothionein *M. acuminata* MT3. Inorganica Chimia Acta 360: 369-380.
- Freisinger E (2008) Plant MTs-Long neglected members of the metallothionein superfamily. Dalton Transactions 47: 6663-6675.
- Guo WJ (2005) Functional characterization of metallothionein gene family in Arabidopsis. PhD Thesis Purdue university, USA.
- Guo WJ, Bundithya W, Goldsbrough PB (2003) Characterization of the arabidopsis metallothionein gene family: Tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. New Phytologist 59: 369-381.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany 53: 1-11.
- Huang GY, Wang YS (2010) Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicennia marina*) in response to metal stress. Aquatic Toxicology 199: 86-92.
- Hyun H, Chang AC, Parker DR, Page AL (1998) Cadmium solubility and phytoavailability in sludge treated soils: effect of soil organic carbon. Journal of Environmental Quality 27: 329-334.
- Karbasiqaed V, Badami N, Emtiaz G (2003) Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. African Journal of Biotechnology 2: 379-383.

- Lovely DR, Coates JD (1997) Bioremediation of metal contamination. Current Opinion in Biotechnology 8: 285-289.
- Mohammadi Nezhad R, Shahpuri A, Mirlohi A (2013) Discrimination between two rice metallothionein isoforms belonging to type 1 and type 4 in metal-binding ability. Biotechnology and Applied Biochemistry 60: 275-282.
- Novagen (2005) pET System Manual. 11th ed.
- Rajbanshi A (2008) Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment plant. Our nature 6: 52-57.
- Ramli Z, Abdullah SNA (2010) Functional Characterisation of the Oil Palm Type 3 Metallothionein-like Gene (MT3-B) Promoter. Plant Molecular Biology Reporter 28: 531-541.
- Rodriguez-Llorente ID, Perez-Palacios P, Doukkali B, Caviedes MA, Pajuelo E (2010) Expression of the seed-specific metallothionein MT4a in plant vegetative tissues increases Cu and Zn tolerance. Plant Science 178: 327-332.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York.
- Shumei J, Cheng Y, Guan Q, Liu D, Takano T, Liu S (2006) A metallothionein like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. Biotechnology Letters 28: 1749-1753.
- Spain A (2003) Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. Undergraduate Research 2: 1-6.
- Yang J, Wang Y, Liu G, Yang C, Li C (2011) *Tamarix hispida* metallothionein-like ThMT3, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ and NaCl in transgenic yeast. Molecular Biology Reports 38: 1567-1574.
- Yang Z, Wu Y, Li Y, Ling HQ, Chu C (2009) Osmt1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. Plant Molecular Biology 70: 219-229.
- Zazouli MA, Bandpei AM, Maleki A, Saberian MH (2010) Determination of cadmium and lead contents in black tea and tea liquor from Iran. Asian Journal of Chemistry 22: 1387-1393.
- Zhou GK, Xu YF, Li J, Yang LY (2006) Molecular analyses of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). Biochemistry and Molecular Biology 387: 87-93.
- Zhu GH, Zhang JJ, Chen JS, Peng XX (2008) Characterization of a rice metallothionein type 3 gene with different expression profiles under various nitrogen forms. Biologia Plantarum 52: 668-673.