# اندازه‌گیری یون روی با استفاده از پروتئین فلوئورسنت سبز بهبود یافته (EGFP) نمایش یافته در سطح باکتری

**ساقی حکیمی نائینی و رضا حسن ساجدی***

**ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۴

## چکیده

امروزه با افزایش فعالیتهای صنعتی و کشاورزی، آلودگی محیط زیست به فلزات سنگین و سمی افزایش پیدا کرده است. روی فلزی است که با وجود داشتن فواید بسیار، در غلظتهای بیش از حد مجاز سمی بوده و باعث بروز مشکلات و اختلالات بسیاری از جمله مرگ و میر جانوران، نقصهای رشدی و آسیبهای بافتی می‌شود. بنابراین توسعه یک سیستم ساده، ارزان و سریع برای شناسایی فلزات سمی بسیار حائز اهمیت است. در این مطالعه، برهمکنش بین پروتئین فلوئورسانس سبز بهبود یافته ( =EGFP Enhanced Green Fluorescent Protein) بیان شده بر روی سطح باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) و پروتئین EGFP خالص شده با غلظتهای مختلف نمک کلرید روی با استفاده از روش طیف سنجی فلوئورسانس ( Fluorescence Spectroscopy) بررسی گردید. نتایج نشان داد که در حضور روی، نشر فلوئورسانس سبز پروتئین افزایش می‌یابد که با غلظت روی در محلول هماهنگ است. براساس نتایج به دست آمده کمترین غلظت روی قابل شناسایی (Limit of Detection) توسط پروتئین EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری (Cell Surface Display) و پروتئین خالص شده به ترتیب ۰/۳۱ نانومولار و ۱۸ نانومولار می‌باشد همچنین مطالعه مشابه در حضور غلظت ۲ نانومولار از یونهای فلزی مختلف، نشان داد نشر فلوئورسانس پروتئین EGFP تنها در حضور روی افزایش پیدا می‌کند و سایر فلزات تأثیر چندانی نداشته و یا اندکی میزان نشر را کاهش می-دهند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که EGFP نمایش یافته در سطح باکتری جهت شناسایی و تعیین یون روی بسیار اختصاصی عمل نموده و نسبت به EGFP خالص شده حساسیت بسیار بیشتری در تشخیص و شناسایی یون روی دارد.

**واژه‌های کلیدی:** پروتئین فلوئورسانس سبز بهبود یافته، بیان سطحی، یون روی، فلوئورسانس

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۵۹، پست الکترونیکی: sajedi_r@modares.ac.ir

## مقدمه

روی فلزی با رنگ سفید متمایل به آبی است که بر اثر رطوبت هوا تیره رنگ می‌شود و در حین احتراق رنگ سبز براقی تولید می‌کند. این فلز بعد از آهن، آلومینیوم و مس چهارمین فلز مورد استفاده در دنیا بوده و حالت اکسیداسیون متداول این عنصر +۲ می‌باشد (۲۰ و ۲۱) .روی کاربردهای وسیعی در زمینه صنعت دارد که از جمله آنها می‌توان به آبکاری الکتریکی فلزها جهت جلوگیری از زنگ زدگی آنها، گالوانیزه کاری آهن، تولید ظروف، خودروسازی، کشتی سازی، باتری سازی و تولید آلیاژ برنج اشاره کرد (۲۱ و ۲۹). همچنین این فلز در زمینه پزشکی نیز بسیار حائز اهمیت بوده و جهت درمان جوشهای پوستی، جلوگیری از پیری زودرس، ساخت پروتئینهای ساختاری پوست، تولید ویتامینهای مورد مصرف روزانه و مواد معدنی، درمان سرماخوردگی و آنفولانزا، جلوگیری از سرطان، بی‌اشتهایی عصبی و ریزش مو، تسریع بخشیدن به بهبود زخمها، تولید انسولین و موارد دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶، ۸ و ۱۱). در واقع روی یک ماده معدنی ضروری برای بدن است که در ساختار بعضی از پروتئینها

و آنزیمهای لازم و همچنین برخی از ژنها، شرکت می‌کند و بعد از آهن، بیشترین میزان را در بدن داراست و به طور عمده در ماهیچه‌ها ذخیره می‌شود، اما در یاخته‌های خونی سفید و قرمز، پرده شبکیه چشم، استخوانها، پوست، کلیه‌ها، کبد و پانکراس نیز یافت می‌شود (۱۰ و ۱۱). با این وجود، مصرف بیش از حد روی باعث بروز مشکلاتی از جمله آشفتگی معده، استفراغ، کاهش HDL و افزایشLDL، سرگیجه، سردرد، خواب آلودگی، بروز نقصهای رشدی از قبیل هیپوپلازی سر و چشم، ادم قلبی، تغییر شکل کیسه زرده، کاهش میزان رنگدانه در بافتها، تغییر انحنای محوری و دم اولیه در دوران جنینی، ناهماهنگی عملکرد عضلات و کم خونی می‌شود (۹، ۲۴ و ۳۰). همچنین مقدار بیش از حد روی در محیط زیست باعث بروز آلودگیهای زیست محیطی مانند مرگ و میر لاروهای zebrafish می‌گردد (۱۸ و ۲۴). بنابراین وجود یک سیستم ساده برای ارزیابی میزان فلز روی موجود در خون و محیط زیست بسیار ضروری و حائز اهمیت می‌باشد (۳ و ۱۶). تکنیکهایی که جهت بررسی فلزات از جمله فلز روی استفاده می‌شوند شامل رسوب شیمیایی، تبادل یونی، تقطیر، طیف سنجی جذب اتمی، طیف سنجی جرمی، طیف سنجی جذب نور مرئی- فرابنفش و طیف سنجی جذب اشعه X می‌باشد (۱۹ و ۲۵). تکنیکهای مذکور بسیار دقیق هستند اما از معایب اصلی آنها می‌توان به هزینه بالایی که دارند اشاره کرد (۳ و ۱۶). میکروارگانیسم‌ها، به دلیل کاربردهای زیادی که در حفاظت از محیط زیست دارند گزینه مناسبی جهت شناسایی و تشخیص فلزات هستند. حسگرهای زیستی مبتنی بر سلول معمولاً کم هزینه و زیست سازگار بوده و می‌توانند یک پاسخ حساس به سمیت نمونه را در اختیار پژوهشگران قرار دهند (۷ و ۱۹). به عنوان یک ابزار مؤثر جهت مهندسی پروتئین و ساخت حسگرهای زیستی، سیستم نمایش در سطح سلول کاربردهای فراوانی در صنعت و پزشکی دارد. سیستم‌های نمایش در سطح می توانند کاربردهای وسیعی در زمینه توسعه واکسنهای زنده، مهندسی پروتئین، کاتالیستهای زیستی، حسگرهای زیستی، جاذبهای زیستی، غربالگری کتابخانه پپتیدی، تولید آنتی بادیها و تشخیص تغییر یک اسیدآمینه داشته باشند. امروزه می‌توان با استفاده از سیستم نمایش بر روی سطح سلول، بیوسنسورهایی را طراحی کرد که شناسایی فلزات سنگین را انجام دهند (۱۲ و ۳۱). اخیراً سازه ژنی شامل پروتئین هسته‌زایی یخ (INP) در قالب یک موتیف لنگری که در درون دیواره باکتری قرار می‌گیرد، جایگاه برش آنزیم پروتئاز TEV که به موتیف لنگری INP متصل می‌شود و EGFP که خارج از باکتری به صورت متصل به جایگاه برش TEV قرار می‌گیرد (به طور خلاصه INP -TEV protease cleavage site-EGFP) طراحی شده است که منتج به بیان موفقیت آمیز EGFP بر روی سطح باکتری و تخلیص پروتئین گردید (۱۳ و ۲۸).

پروتئین فلوئورسنت سبز (GFP) توسط Shimomura از عروس دریایی *Aequorea victoria* جدا شد و این پروتئین اولین پروتئین فلوئورسنت سبزی می‌باشد که ساختار اولیه آن مشخص و کلون شده است و به طور وسیعی از آن به عنوان یک ژن گزارشگر استفاده می‌شود (۴ و ۳۳). GFP از ۲۳۸ اسید آمینه با جرم مولکولی ۲۷ کیلودالتون تشکیل شده است. این پروتئین یک ساختار منحصر به فرد که شامل یک بشکه بتای کوچک و فشرده حاوی یازده رشته بتا به همراه یک گروه فلوئوروفور که در مرکز آن بر روی یک مارپیچ آلفا تعبیه شده است، می‌باشد (۴ و ۲۳). شکل گیری گروه فلوئوروفور به صورت خود به خودی از طریق حلقوی شدن داخل مولکولی سه واحد آمینواسیدی شکل می گیرد. آزمایشهای متعددی نشان می‌دهد که کل ساختار پروتئین برای تشکیل گروه فلوئوروفور مورد نیاز است (۲۶). GFP نوع وحشی ویژگیهایی دارد که باید بهبود یابد از جمله این ویژگیها می‌توان به روشنایی کم و تأخیر در تشکیل فلوئوروفور اشاره کرد. به این ترتیب به منظور بهبود این ویژگیها بر روی آن جهش‌های متعددی صورت گرفته است. EGFP دارای دو جهش (T۶۵S و L۶۴F) در

منطقه فلوئوروفورش می‌باشد و ویژگیهای طیفی آن بهبود یافته است و یکی از پروتئینهای فلوئورسنت درخشان و پایدار نوری است (۲۶ و ۳۲). بسیاری از نسخه های بهبود یافته GFP با ویژگیهای بهبود یافته مانند گوناگونی در رنگ با خواص طیفی مختلف که رنگ از منطقه آبی تا زرد طیف مرئی را نشان می دهند، در دسترس هستند (۲۲). مطالعات متعدد با هدف بررسی پتانسیل اتصال فلز به پروتئین GFP با بررسی ساختار پروتئین و طراحی چندین جهش انجام شده است (۲۲). GFP گزارشگری است که نشر فلوئورسانس آن بدون افزودن سوبسترای خارجی تولید می شود (۴). این پروتئین نور را در طول موج ۴۷۵ نانومتر جذب می کند و نور سبز را در ۵۰۹ نانومتر منتشر می کند (۴ و ۲۲). GFP به طور گسترده‌ای برای اندازه گیری بیان ژن در سلولها شناخته شده و جهت تجزیه و تحلیل روند تشخیص در سیستمهای پستانداران نیز استفاده می‌شود (۲۲).

مطالعات قبلی نشان داده است که یون روی با حالت برانگیخته گروه کروموفور GFP واکنش می‌دهد و سبب افزایش انتقالات الکترونی و به دنبال آن باعث افزایش نشر فلوئورسانس این پروتئین می‌شود و این رفتار وابسته به مقدار یون روی و زمان می‌باشد، بنابراین در این مطالعه، از سیستم EGFP نمایش یافته بر روی سطح باکتری *E. coli* جهت شناسایی و تعیین یون روی در مقایسه با EGFP خالص استفاده شد (۲۴).

## مواد و روشها

**مواد:** مارکر وزن مولکولی پروتئین (شرکت BIO BASIC)، آمپی‌سیلین (شرکت جابرابن حیان)،IPTG (شرکت SinaClon)، تریس، SDS، کوماسی بلو G250، آگارز، آمونیوم پر سولفات و TEMED (شرکت Acros)، گلاسیال استیک‌اسید، متانول، گلیسرول از شرکت دکتر مجللی، اتانول (شرکت بیدستان)، ستون نیکل آگارز (شرکت Qiagen)، Soy peptone (شرکت QUELAB)، اسید کلریدریک (شرکت شیمی دارویی نوترون)، عصاره مخمر (شرکت Micromedia Trading) و EDTA، آکریل آمید، ایمیدازول، فسفوریک اسید، دی تیو تریول، آگار، نمکهای $CaCl_2$، $ZnCl_2$ و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت Merck خریداری گردید.

همچنین سازه ژنی به شکل Site_EGFP pET21a+_InaK-N_TEV Protease Cleavage شرکت (ShineGene Molecular Biotech) داخل وکتور pET21a+ سنتز و به سویه باکتریایی *E. coli* DH5α انتقال داده شد. ژن آنزیم TEV Protease (شرکت Invitrogen™ life technology) در وکتور $pP_{RO}EX$ HTa سنتز شد. از باکتری *E. coli* سویه DH5α جهت تکثیر وکتور و از سویه *E. coli* BL21 (DE3) به منظور بیان سطحی پروتئین مد نظر استفاده شد. محلولهای استوک آمپی‌سیلین (۱۰۰mg/ml) تهیه و پس از فیلتر با فیلتر دیسکی با منافذ ۰/۲ میکرون به نسبت ۱:۱۰۰۰ به محیط کشت افزوده شد.

**بیان و تخلیص EGFP سطح سلولی:** وکتورهای حاوی سازه ژنی InaK-N_TEV Protease Cleavage Site_EGFP به سویه بیانی *E. coli* BL21 (DE3) به منظور بیان ژن پروتئین مربوطه از طریق شوک حرارتی انتقال یافت و روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد و یک کلونی از باکتریهای حاوی پلاسمید نوترکیب بیانی به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با هوادهی مطلوب (۲۵۰rpm) در انکوباتور همزن‌دار انکوبه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر باکتری رشد کرده به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی-بیوتیک انتقال داده شد و تا افزایش جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ (اسپکتروفتومتر میکروپلیت μQuant از شرکت BioTek)، در۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. نهایتاً، بیان در غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG در ۲۴ ساعت و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

برای تخلیص پروتئین EGFP سطح سلولی پس از اتمام مدت زمان بیان، سوسپانسیون باکتریهای القاء شده در حجم ۵۰ میلی‌لیتر به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. جداسازی سایر اجزا موجود در محیط کشت از سلولهای باکتریایی به وسیله بافر انکوباسیون TEV (۰/۵ میلی‌مولار EDTA، ۵۰ میلی‌مولار Tris-Base با pH ۸)، انجام گرفت. پس از شستشو، ۲۰۰ میکرولیتر بافر مربوط به انکوباسیون با لیزوزیم (۲۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH ۸، ۲ میلی‌مولار EDTA و ۱ درصد Triton x-100) حاوی ۲ میلی‌گرم پودر آنزیم لیزوزیم به رسوب باکتری اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ویال حاوی باکتریهای لیز شده و محتویات داخل سلولی، به مدت ۱ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و رسوب آن نگه داشته شد. پس از آن رسوب باکتریایی به مدت ۴ ساعت در ۲۰ درجه سانتی گراد با ۵۰ rpm با آنزیم پروتئاز TEV انکوبه شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و محلول رویی که شامل پروتئین EGFP خالص شده به همراه TEV می‌باشد حفظ و رسوب دور ریخته شد. پس از آن جهت حصول اطمینان از تخلیص نمونه پروتئینی از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE احیایی استفاده شد. SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد در شرایط احیایی انجام شد.

**اندازه گیری نشر فلوئورسانس سبز EGFP:** جهت بررسی اثر یون روی بر نشر فلوئورسانس سبز EGFP خالص شده و نمایش یافته بر روی سطح باکتری، ابتدا روی با غلظت ۵ نانومولار در بافر PBS (۳/۲ میلی‌مولار $Na_2HPO_4$، ۰/۵ میلی‌مولار $KH_2PO_4$، ۱/۳ میلی‌مولار KCl و ۱۳۵ میلی-مولار NaCl با pH ۷/۴) به EGFP خالص شده با غلظت ۱۰۰ng/ml در بافر PBS اضافه شد به منظور تعیین بهترین زمان انکوباسیون، نشر فلوئورسانسEGFP بلافاصله پس از اضافه کردن روی و ۵۰ تا ۳۰۰ دقیقه انکوباسیون در ۴ درجه سانتی‌گراد، در طول موج تحریکی ۴۷۰ نانومتر و محدوده طول موج نشری ۶۰۰-۴۸۰ نانومتر با slit ۱۰ خوانده شد (دستگاه فلوئورسانس از شرکت Perkin Elmer مدلLS55). همچنین برای بررسی اثر یون روی با غلظت ۵ نانومولار بر شدت نشر فلوئورسانسEGFP نمایش یافته بر روی سطح باکتری، باکتریها به اندازه‌ای رقیق شدند که شدت نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح آنها به پروتئین خالص شده با غلظت ذکر شده نزدیک شود و سپس در شرایطی کاملاً مشابه با EGFP خالص شده خوانش نشر آنها انجام گردید. در سل کوارتز یک سانتیمتری، حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر از بافر PBS با pH برابر ۷/۴، پروتئین EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و خالص شده و همچنین نمک کلرید روی با غلظتهای ذکر شده اضافه شد.

**تعیین پارامترهای اندازه‌گیری یون روی:** جهت بررسی اثر غلظتهای مختلف یون روی بر EGFP بیان شده سطحی و EGFP خالص شده، پس از ۳۰۰ دقیقه انکوباسیون در ۴ درجه سانتی‌گراد، برای EGFP نمایش یافته سطحی و خالص شده به ترتیب محدوده غلظت ۰ تا ۵ نانومولار و ۰ تا ۱۵۰ نانومولار روی انتخاب و مطابق با بخش بالا طیف گیری انجام شد. سپس منحنی شدت نشر فلوئورسانس علیه غلظتهای گوناگون یون روی رسم شد و از روی آن محدوده خطی، معادله خط و LOD به دست آمد.

**تعیین اختصاصیت EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری نسبت به روی:** به منظور به دست آوردن اختصاصیت روش نسبت به یون روی، نمکهای مختلف کلرید با غلظت ۲ نانومولار بر روی EGFP نمایش یافته سطحی اثر داده شد و طیف نشری پروتئین طبق روشهای فوق ثبت و شدت نشر پروتئین در حضور یونهای گوناگون در محدوده طول موج ۶۰۰-۴۸۰ نانومتر با یکدیگر مقایسه شد.

**آنالیز آماری:** تمام آزمایشها در این تحقیق حداقل ۳ بار تکرار گردید. به منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار های

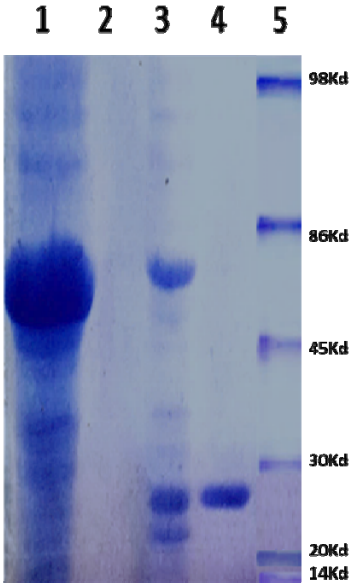
GraphPad prism7 و Microsoft office Excel2019استفاده شد. بدین منظور در زیر شاخه نرم افزار GraphPad prism7 و در بخش آنالیز داده‌ها از آنالیزهای آماری Linear regression، Column analyses، Gausian و log(agonist) vs. response -- Find ECanything استفاده شد. از نرم افزار Excel نیز جهت رسم نمودارهای پاسخ به مقدار استفاده شد.

## نتایج

**بیان سطحی EGFP:** ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون باکتریهای القاء نشده و القاء شده با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و دور همزن rpm ۲۵۰، سوسپانسیون باکتری القاء نشده و القاء شده با IPTG در محیط کشت زیر نور فرابنفش حاصل از دستگاه ترانس ایلومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج نشان داد که سوسپانسیون باکتری القاء نشده، نشر فلوئورسانس ندارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت بیان پروتئینهای هدف به صورت سطحی انجام شده است. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با دور RCF ۵۷۰۰ سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل از نمونه‌های القاء نشده، فاقد نشر فلوئورسانس بودند در حالی که نمونه‌های القاء شده با IPTG حتی در روشنایی هم سطح بالایی از نشر فلوئورسانس سبز را نشان می‌دادند که خود حاکی از سطح بیان بالای پروتئین هدف در این روش است (شکل ۱).

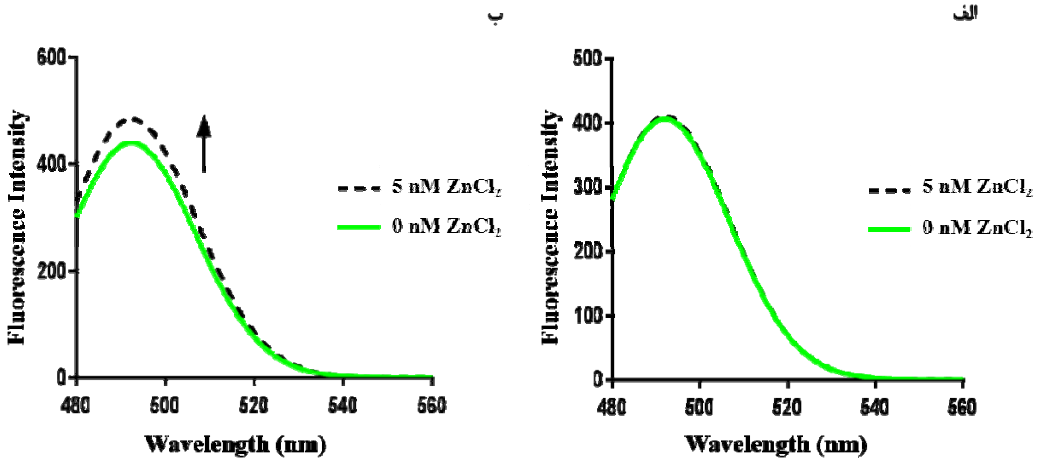
جهت مشاهده بیان سطحی پروتئین هدف در سلول باکتری میزبان از تکنیک SDS-PAGE نیز استفاده شد. همان طور که در شکل ۲ نیز نشان داده شده است، میزان بیان سازه مد نظر با وزن مولکولی تقریبی ۴۷ کیلودالتون در رسوب باکتریایی بیشتر از نمونه رویی می‌باشد که این موضوع می‌تواند تأییدی بر بیان موفقیت آمیز EGFP در سطح سلول باکتری باشد.

شکل۱- مشاهده بیان سطحی EGFP به وسیله نور فرابنفش و مرئی در سویه باکتریایی *E. coli* BL21(DE3)، نمونه‌ها به ترتیب از چپ به راست شامل سوسپانسیون باکتریایی القاء نشده با IPTG که بر خلاف حالت القاء شده زیر نور فرابنفش از خود فلوئورسانس نشر نمی‌دهد، سوسپانسیون باکتریایی القاء شده با IPTG که فلوئورسانس سبز نشر می‌دهد، رسوب حاصل از سوسپانسیون باکتریهای القاء شده با IPTG که حتی در زیر نور مرئی هم دارای فلوئورسانس می‌باشند و رسوب حاصل از سوسپانسیون باکتریهای القاء نشده که فاقد فلوئورسانس هستند.




شکل ۲- مشاهده بیان سطح سلولی EGFP در سویه *E .coli* BL21(DE3) به کمک ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید. نمونه‌های مورد بررسی از شماره ۱ تا ۵ به ترتیب شامل رسوب باکتری القاء شده با IPTG، محلول رویی باکتری القاء شده با IPTG، رسوب لاشه‌های باکتری القاء شده با IPTG پس از لیز شدن با آنزیم لیزوزیم و ۴ ساعت تیمار با آنزیم پروتئاز TEV، پروتئین EGFP خالص شده با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون و شماره ۵ مارکر وزن پروتئین بر حسب کیلودالتون.

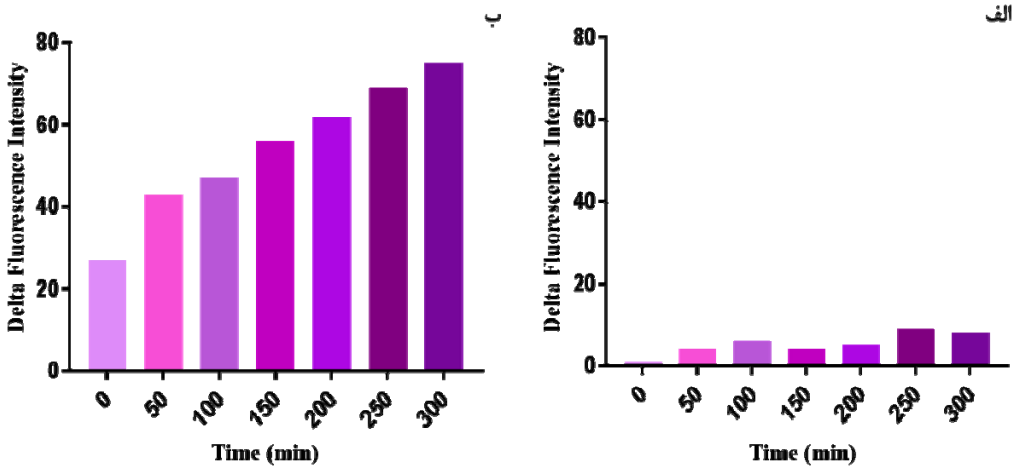
**اثر $Zn^{2+}$ بر فلوئورسانس EGFP:** برای مشاهده اثر اولیه روی بر نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و خالص شده، از غلظت ۵ نانومولار نمک کلرید روی استفاده شد. براساس نتایج به دست آمده، در حضور غلظت ۵ نانومولار کلرید روی بعد از گذشت ۵۰ دقیقه میزان نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری افزایش یافت این در حالی است که نشر فلوئورسانس EGFP خالص شده پس از ۵۰ دقیقه تیمار با ۵ نانومولار روی، تغییر چندانی از خود نشان نداد، بنابراین از غلظتهای ۰ تا ۵ نانومولار روی جهت بررسی تغییرات نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری در مراحل بعدی تحقیق استفاده شد. غلظتهای مختلف کلرید روی جهت بررسی تغییرات نشر فلوئورسانس EGFP خالص شده با توجه به این نتیجه و نیز مقاله Virapong Prachayasittikul و همکارانش، در غلظتهای بالاتر انتخاب شد (۲۲) (شکل۳)



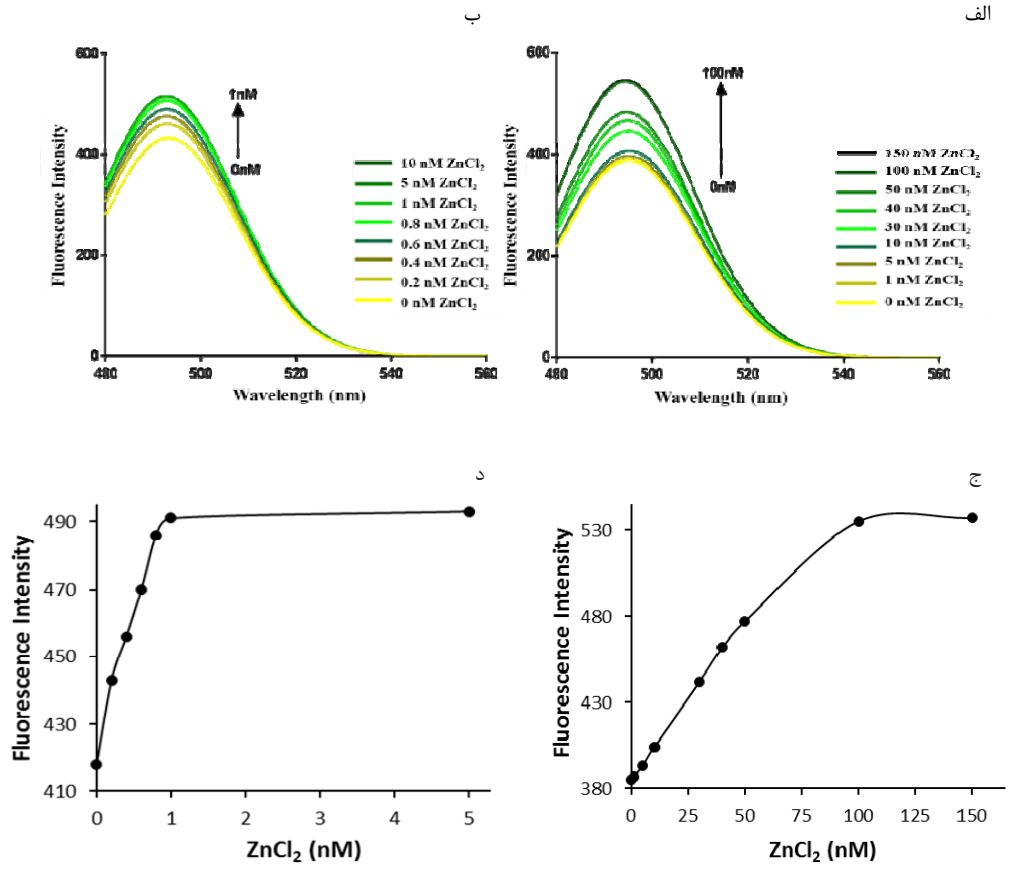

شکل۳- مقایسه تأثیر یون روی بر میزان نشر فلوئورسانس EGFP خالص شده و بیان شده بر روی سطح باکتری، الف) اثر غلظت ۵ نانومولار روی بر نشر فلوئورسانس EGFP خالص شده و ب) اثر غلظت ۵ نانومولار روی بر روی نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر سطح باکتری *E.coli* .BL21(DE3)

**اثر $Zn^{2+}$ بر تغییرات وابسته به زمان فلوئورسانس EGFP** : با توجه به شکل ۴ بررسی اثر زمان بر تغییرات نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر سطح باکتری در حضور غلظت ۵ نانومولار روی حاکی از افزایش میزان نشر فلوئورسانس این پروتئین بود در حالی که میزان نشر فلوئورسانس EGFP خالص شده در حضور غلظت ۵ نانومولار روی با گذشت زمان افزایش ناچیزی نشان داد. براساس این نتایج در زمان ۳۰۰ دقیقه میزان نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری به حداکثر مقدار خود رسید و پس از آن ثابت شد، لذا در ادامه پروژه از این زمان استفاده شد.

**اثر غلظتهای مختلف یون $Zn^{2+}$ بر طیف فلوئورسانس EGFP و تعیین رفتار وابسته به غلظت آن:** همان طور که در شکل ۵ قابل مشاهده است، با افزایش غلظت نمک کلرید روی در محیط پس از گذشت ۳۰۰ دقیقه، شدت فلوئورسانس پروتئین EGFP خالص شده و بیان شده بر روی سطح باکتری در طول موج تحریکی ۴۷۰ نانومتر افزایش یافت و EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری نسبت به EGFP خالص شده در حضور یون روی حساسیت بیشتری از خود نشان داد.

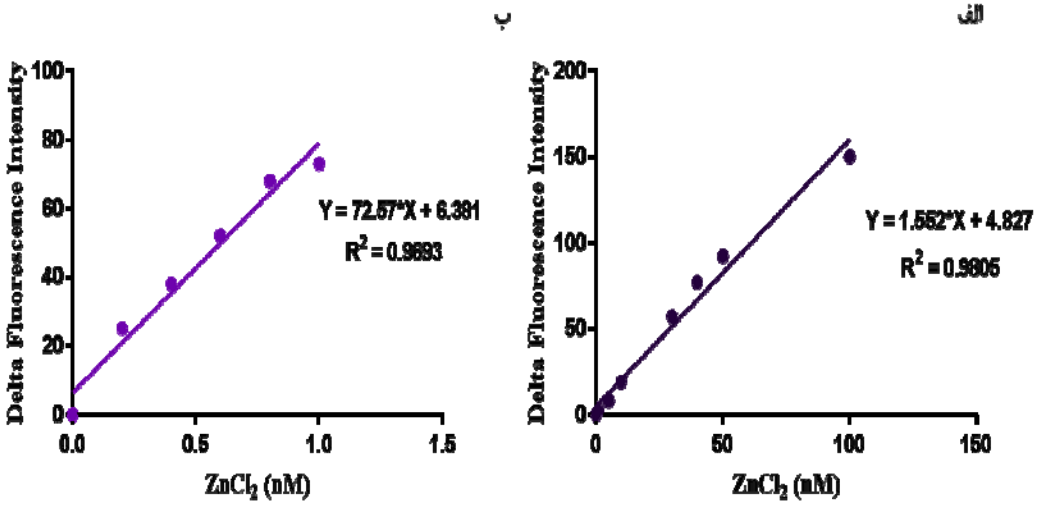



شکل۴- الف) اثر گذشت زمان بر روی میزان نشر فلوئورسانس EGFP خالص شده در حضور غلظت ۵ نانومولار روی و ب) اثر گذشت زمان بر روی میزان نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری در حضور غلظت ۵ نانومولار روی.




شکل۵- الف) اثر غلظتهای مختلف روی (تا ۱۵۰ نانومولار) بر طیف نشری فلوئورسانس ذاتی پروتئین EGFP خالص شده و ب) اثر غلظتهای مختلف روی (تا ۵ نانومولار) بر طیف نشری فلوئورسانس ذاتی پروتئین EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری *E. coli* در طول موج تحریکی ۴۷۰ نانومتر (زمان ۳۰۰ دقیقه، بافر PBS، pH۷/۴). ج) نمودار شدت نشر فلوئورسانس EGFP خالص شده علیه غلظتهای مختلف نمک کلرید روی پس از ۳۰۰ دقیقه انکوباسیون و د) نمودار شدت نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری علیه غلظتهای مختلف نمک کلرید روی بعد از ۳۰۰ دقیقه انکوباسیون( P-value < 0.05 ).

**حساسیت و محدوده خطی اندازه‌گیری یون $Zn^{2+}$ با استفاده از تغییر فلوئورسانس EGFP:** نمودار اختلاف شدت نشر فلوئورسانس علیه غلظتهای گوناگون نمک کلرید روی بعد از گذشت زمان ۳۰۰ دقیقه، نشان می‌دهد که میزان افزایش شدت نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و خالص شده به ترتیب با غلظتهای ۰ تا ۱ و ۰ تا ۱۰۰ نانومولار یون روی تقریباً رابطه خطی داشته و هماهنگ (متناسب) با افزایش غلظت نمک در محیط، میزان نشر نیز افزایش می‌یابد. همچنین با استفاده از آنالیزهای آماری حد تشخیص را نیز محاسبه نموده که براساس آن، کمترین غلظت $Zn^{2+}$ که باعث افزایش نشر فلوئورسانس می‌شود به ترتیب ۰/۳۱ نانومولار و ۱۸ نانومولار به ترتیب برای EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و EGFP خالص شده می‌باشد. بنابراین EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری نسبت به EGFP خالص شده در تشخیص و شناسایی روی از حساسیت بالاتری برخوردار است (شکل ۶).

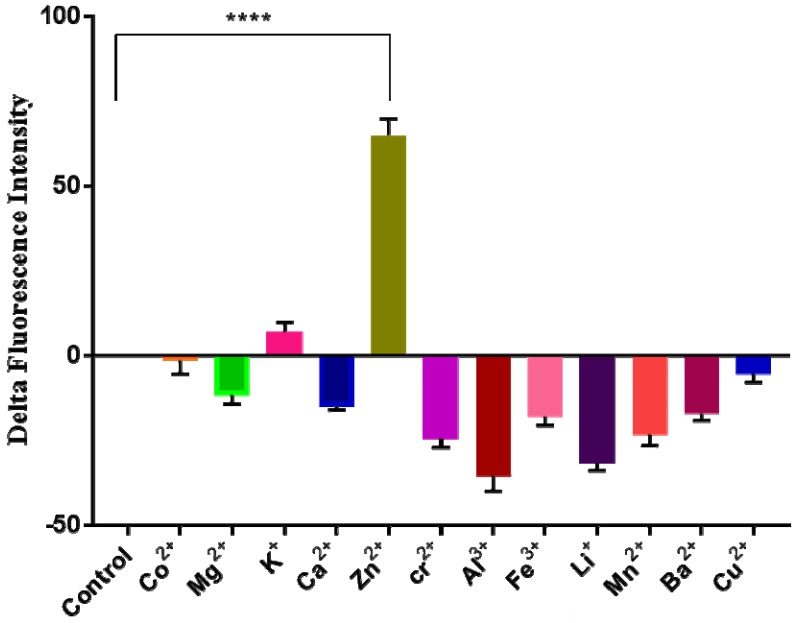



شکل۶- نمودار اختلاف شدت فلوئورسانس EGFP خالص شده در غلظتهای مختلف نمک کلرید روی (الف) و EGFP بیان شده بر سطح باکتری در غلظتهای مختلف نمک کلرید روی (ب).

**اختصاصیت روش برای شناسایی روی:** میزان نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری در حضور غلظت ۲ نانومولار نمکهای مختلف کلرید بعد از ۳۰۰ دقیقه، اندازه‌گیری شد و با توجه به شکل ۷ پروتئین EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری برای شناسایی روی به شکل اختصاصی عمل کرده و شدت نشر فلوئورسانس آن در معرض کلرید روی افزایش می‌یابد، این در حالی است که در حضور نمکهایی مانند پتاسیم کلرید و کوبالت کلرید مقدار اندکی تغییر در میزان نشر رخ می‌دهد و یا تغییری در نشر مشاهده نمی‌شود. همچنین مابقی نمکها نیز باعث کاهش اندکی در میزان نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر سطح باکتری می‌شوند.

## بحث

امروزه به دلیل توسعه فعالیتهای صنعتی و کشاورزی، آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین و سمی در سراسر جهان گسترش یافته است و مناطق جغرافیایی متعددی دچار آلودگی به فلزات سنگین شده‌اند (۵ و ۱۷).




شکل ۷- اختصاصیت پروتئین EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری در شناسایی روی و شدت نشر آن در حضور غلظت ۲ نانومولار از نمکهای کلرید مختلف.

فلزات سنگین و سمی برای هومئوستازی بدن، آنتی اکسیدانها، اندامهایی مانند کبد و کلیه، مجاری تنفسی و سایر قسمتها خطرات زیادی دارند. کادمیوم، سرب، نیکل، روی، مس، کروم و همچنین سایر فلزات سمی به دلیل ایجاد مسمومیت و کاربردهای وسیعی که در صنعت دارند، بسیار قابل توجه بوده و همچنین به عنوان یک مشکل بسیار جدی برای محیط زیست و آلودگی آبهای سطحی و زیرزمینی به حساب می‌آیند و سلامت عمومی را به خطر می‌اندازند (۱، ۱۸ و ۲۴). بنابراین نظارت بر روی مقدار این فلزات سنگین برای جلوگیری از بروز چنین خطراتی از جمله آلودگیهای زیست محیطی بسیار ضروری است (۲۴). روی فلزی بسیار مفید است که در حوزه‌های مختلفی از جمله صنعت، کشاورزی، پزشکی بسیار پرمصرف و حائز اهمیت می‌باشد این در حالی است که اگر مقدار این فلز در محیط زیست، تغذیه جانوران و انسان از حد مجاز خود فراتر رود باعث ایجاد مسمویتهای شدید و مرگ و میر موجودات زنده می‌گردد (۹، ۱۸ و ۲۰). بنابراین نظارت دقیق بر روی مقدار روی موجود در خون انسان، غذا، آب آشامیدنی، آبهای زیرزمینی و محیط زیست موضوع بسیار مهمی در سلامت عمومی است. بنابراین ضروری است که روشی حساس، مؤثر و ارزان قیمت وجود داشته باشد که بتواند به طور مؤثر حضور و میزان فلز روی را در محیط زیست تعیین نماید (۲، ۲۵ و ۲۷). تکنیکهای مرسومی که جهت تجزیه و تحلیل فلزات سنگین استفاده می‌شود شامل رسوب شیمیایی، تبادل یونی، تقطیر، جداسازی غشاء، طیف سنجی جذب اتمی، طیف سنجی جرمی، طیف سنجی جذبی و طیف سنجی جذب اشعه X می‌باشد (۱۹ و ۲۵) . این تکنیکها باوجود دقیق بودن معایبی نیز دارند که از جمله آنها می‌توان به هزینه بالا و همچنین صرف زمان طولانی اشاره کرد، بنابراین وجود یک سیستم ساده جهت نظارت بر فلزات سنگین و کنترل مقدار آنها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. میکروارگانیسمها، به دلیل پتانسیل شدیدی که در حفاظت از محیط زیست دارند و همچنین کاملاً زیست سازگار هستند، گزینه بسیار مناسبی جهت شناسایی و گزارش مقدار فلزات سنگین هستند (۲۵). زیست حسگرهای مبتنی بر سلول معمولاً

ارزان قیمت بوده و به راحتی در دسترس هستند و سریع می‌توانند یک پاسخ حساس به سمیت نمونه را در اختیار قرار دهند (۱۹ و ۲۵).

یکی از راههای توسعه حسگرهای زیستی مبتنی بر سلول استفاده از سیستمهای نمایش سطحی میکروبی می‌باشد. این سیستمها دارای کاربردهای فراوانی در زمینه صنعت و بیوتکنولوژی می‌باشند. سیستمهای نمایش در سطح می توانند کاربردهای وسیعی در زمینه توسعه واکسنهای زنده، مهندسی پروتئین، کاتالیستهای زیستی، حسگرهای زیستی، جاذبهای زیستی و تولید آنتی‌بادیها داشته باشند (۱۵). با بیان پروتئینها در سطح سلول جداسازی و تخلیص آنها از سایر پروتئینهای سیتوپلاسمی تسهیل شده و فعالیت پروتئین هدف افزایش می‌یابد، بنابراین می‌توان از این سیستمها جهت ساخت بیوسنسورهای باکتریایی استفاده نمود (۱۴).

در این مطالعه، پس از بیان سطحی EGFP و تخلیص آن (شکلهای ۱ و ۲)، اثر یون روی بر نشر فلوئورسانس EGFP در این دو حالت مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به اینکه اثر اولیه غلظت ۵ نانومولار روی پس از گذشت ۵۰ دقیقه، بر روی میزان نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و خالص شده، باعث افزایش نشر EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری شده است و تأثیر چندانی بر روی میزان نشر EGFP خالص شده نداشته است، می‌توان به حساسیت بیشتر EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری نسبت به EGFP خالص شده در شناسایی روی اشاره کرد (شکل۳). همچنین مقایسه اثر گذشت زمان بر روی میزان نشر فلوئورسانس EGFP خالص شده و بیان شده بر روی سطح باکتری در حضور غلظت ۵ نانومولار روی حاکی از افزایش چشمگیر نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری در مقایسه با EGFP خالص شده می‌باشد که این خود نیز تأییدی بر حساسیت بیشتر EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری نسبت به حالت خالص شده می‌باشد (شکل۴). هدف این تحقیق در این بررسی طراحی و ساخت یک بیوسنسور مبتنی بر سلول بسیار حساس و دقیق جهت اندازه‌گیری یون روی با استفاده از سیستم نمایش سطح سلولی و EGFP بود تا بتوان شرایط تشخیص روی را بهینه کرد. بنابراین براساس نتایج به دست آمده، پس از افزودن $Zn^{+2}$ به محلول حاوی این پروتئین، افزایش شدت نشر فلوئورسانس برای EGFP خالص شده و EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری مشاهده شد. در این مرحله افزایش تدریجی نشر فلوئورسانس برای EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و خالص شده به ترتیب تا ۱ و ۱۰۰ نانومولار کلرید روی ادامه یافت و بین EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و خالص شده تفاوت معنی داری در حساسیت مشاهده شد (شکل ۵). در گزارشی که توسط Virapong Prachayasittikul و همکارانش در سال ۲۰۰۱ منتشر شد، از پروتئین GFP بیان شده در درون سلول باکتریایی به عنوان یکی از شناسایی کننده‌های فلز روی استفاده شد و کمترین غلظت روی قابل شناسایی برای پروتئین GFP درون سلولی در این مطالعه ۰/۵ میلی‌مولار و پاسخ خطی فلوئورسانس در معرض یون روی در محدوده غلظت ۰/۰۵ میکرومولار تا ۵ میلی‌مولار گزارش شده است (۲۲). این در حالی است که نتایج در اینجا نشان می دهد نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و پروتئین EGFP خالص شده به ترتیب در غلظتهای حدود ۰/۳۱ نانومولار و ۱۸ نانومولار نمک کلرید روی شروع به افزایش کرده و دچار تغییر شدند، همچنین EGFP بیان شده سطحی و خالص شده یک پاسخ خطی فلوئورسانس را در معرض یون روی به ترتیب در غلظتهای ۰/۲ تا ۱ نانومولار و ۱ تا ۱۰۰ نانومولار با ضریب همبستگی نزدیک به یک ارائه می‌دهند (شکل۶). بررسی اختصاصیت روش، جهت شناسایی روی در غلظت ۲ نانومولار فلزات مختلف کلرید نیز بیانگر افزایش نشر EGFP بیان شده در سطح باکتری تنها در حضور روی بود (شکل۷). بنابراین می‌توان

گفت که EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری به عنوان یک بیوسنسور باکتریایی نسبت به پروتئین خالص شده EGFP و همچنین EGFP خالص شده نسبت به GFP حساسیت بالاتری در شناسایی یون روی دارد.

**تشکر و قدردانی**

از حمایتهای معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می شود.

## منابع

۱- ابراهیمی، ک.، ۱۳۹۷. بیوسنتز نانوذرات مس با استفاده از عصاره آبی گل *Postia puberula* و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن. مجله پژوهش های سلولی مولکولی. جلد ۳۱. شماره ۴. ص: ۶۴۸-۶۶۱.

۲- آشنگرف، م.، خالدی، ا.، ۱۳۹۷. سنتز سریع و برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم توسط *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Cd11 و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن. مجله پژوهش های سلولی مولکولی. جلد ۳۱. شماره۴. ص: ۶۶۲-۶۷۲

3- Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J.E., Castillo, R.N., Moreno, A.M. and Prieto, P., 2001. Use of flow cytometry and confocal microscopy techniques to investigate early CdCl2-induced nephrotoxicity in vitro. Toxicology in vitro, 15(4-5), pp.407-412.

4- Bálint, E.É., Petres, J., Szabó, M., Orbán, C.K., Szilágyi, L. and Ábrahám, B., 2013. Fluorescence of a histidine-modified enhanced green fluorescent protein (EGFP) effectively quenched by copper (II) ions. Journal of fluorescence, 23(2), pp.273-281.

5- Biran, I., Babai, R., Levcov, K., Rishpon, J. and Ron, E.Z., 2000. Online and in situ monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium. Environmental Microbiology, 2(3), pp.285-290.

6- DiSilvestro, Robert A., 2004. Handbook of minerals as nutritional supplements. Chemical Rubber Company press, pp.135-155

7- D'souza, S.F., 2001. Microbial biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 16(6), pp.337-353.

8- Evans, J.R. and Lawrenson, J.G., 2017. Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. Cochrane Database of Systematic Reviews, (7).

9- Hambidge, K.M. and Krebs, N.F., 2007. Zinc deficiency: a special challenge. The Journal of nutrition, 137(4), pp.1101-1105.

10- Johnstone, J., Roth, D.E., Guyatt, G. and Loeb, M., 2012. Zinc for the treatment of the common cold: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Canadian Medical Association Journal, 184(10), pp.E551-E561

11- Kelishadi, R., Hashemipour, M., Adeli, K., Tavakoli, N., Movahedian-Attar, A., Shapouri, J., Poursafa, P. and Rouzbahani, A., 2010. Effect of zinc supplementation on markers of insulin resistance, oxidative stress, and inflammation among prepubescent children with metabolic syndrome. Metabolic syndrome and related disorders, 8(6), pp.505-510.

12- Kim, Y.S., Jung, H.C. and Pan, J.G., 2000. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. Applied and Environmental Microbiology, 66(2), pp.788-793.

13- Kobashigawa, Y., Nishimiya, Y., Miura, K., Ohgiya, S., Miura, A. and Tsuda, S., 2005. A part of ice nucleation protein exhibits the ice-binding ability. FEBS letters, 579(6), pp.1493-1497.

14- Latifi, A.M., Khajeh, K., Farnoosh, G., Hassanpour, K. and Khodi, S., 2015. The Cytoplasmic and periplasmic expression levels and folding of organophosphorus hydrolase enzyme in Escherichia coli. Jundishapur journal of microbiology, 8(12), pp.2687-0308.

15- Lee, S.Y., Choi, J.H. and Xu, Z., 2003. Microbial cell-surface display. Trends in biotechnology, 21(1), pp.45-52.

16- Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A., 2006. Microbial biosensors. Analytica chimica acta, 568(1-2), pp.200-210.

17- Lin, T.J. and Chung, M.F., 2009. Detection of cadmium by a fiber-optic biosensor based on localized surface plasmon resonance. Biosensors and Bioelectronics, 24(5), pp.1213-1218.

18- Liu, L., Yan, Y., Wang, J., Wu, W. and Xu, L., 2016. Generation of mt: egfp transgenic

zebrafish biosensor for the detection of aquatic zinc and cadmium. Environmental toxicology and chemistry, 35(8), pp.2066-2073.

19- Liu, Z., Zhang, C., He, W., Yang, Z., Gao, X. and Guo, Z., 2010. A highly sensitive ratiometric fluorescent probe for Cd2+ detection in aqueous solution and living cells. Chemical Communications, 46(33), pp.6138-6140.

20- Maret, W., 2013. Zinc and the zinc proteome. In Metallomics and the Cell (pp. 479-501). Springer, Dordrecht.

21- Meija, J., Coplen, T.B., Berglund, M., Brand, W.A., De Bièvre, P., Gröning, M., Holden, N.E., Irrgeher, J., Loss, R.D., Walczyk, T. and Prohaska, T., 2016. Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 88(3), pp.265-291.

22- Palfi, M., Kovacs, E., Szilagyi, L., Miklossy, I., Abraham, B. and Lanyi, S., 2010. Fluorescence quenching analysis of histidine-tagged enhanced green fluorescent protein. university politehnica of bucharest scientific bulletin series b-chemistry and materials science, 72(2), pp.45-52.

23- Péterffy, J.P., Szabó, M., Szilágyi, L., Lányi, S. and Ábrahám, B., 2015. Fluorescence of a histidine-modified enhanced green fluorescent protein (EGFP) effectively quenched by copper (II) ions. Part II. Molecular determinants. Journal of fluorescence, 25(4), pp.871-883.

24- Prachayasittikul, V., Ayudhya, C.I.N. and Bulow, L., 2001. Lighting E. coli cells as biological sensors for Cd 2+. Biotechnology letters, 23(16), pp.1285-1291.

25- Raja, C.E. and Selvam, G.S., 2011. Construction of green fluorescent protein based bacterial biosensor for heavy metal remediation. International Journal of Environmental Science & Technology, 8(4), pp.793-798.

26- Richmond, T.A., Takahashi, T.T., Shimkhada, R. and Bernsdorf, J., 2000. Engineered metal binding sites on green fluorescence protein. Biochemical and biophysical research communications, 268(2), pp.462-465.

27- Tanimoto, A., Hamada, T., Higashi, K. and Sasaguri, Y., 1999. Distribution of cadmium and metallothionein in $CdCl_2$-exposed rat kidney: Relationship with apoptosis and regeneration. Pathology international, 49(2), pp.125-132.

28- Warren, G.J., 1987. Bacterial ice nucleation: molecular biology and applications. Biotechnology and genetic engineering reviews, 5(1), pp.107-136.

29- Wiaux, J.P. and Waefler, J.P., 1995. Recycling zinc batteries: an economical challenge in consumer waste management. Journal of power sources, 57(1-2), pp.61-65.

30- World Health Organization, 2007. The impact of zinc supplementation on childhood mortality and severe morbidity. Geneva: World Health Organization.

31- Yao, W., Fan, W., Xu, X., Deng, X. and Zhang, W., 2012. A novel cell-surface display system for heterologous gene expression in Escherichia coli by using NCgl1221423 as the anchoring protein. African Journal of Microbiology Research, 6(14), pp.3564-3570

32- Zhang, G., Gurtu, V. and Kain, S.R., 1996. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. Biochemical and biophysical research communications, 227(3), pp.707-711.

33- Zonouri, S.S., Fatehinia, M., Nuritabar, S. and Manuchehri, S., 2015. Characterization of Ice nucleation Bacteria and their Applications. Cumhuriyet Science Journal, 36(3), pp.1726-1732.

# Monitoring the Zinc ion using the recombinant enhanced green fluorescent protein (EGFP) based on E. coli surface display

**Hakimi Naeeni S. and Sajedi R.H.**

**Dept. of Biochemistry, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran**

## Abstract

Environmental pollution by toxic metals, particularly heavy metals, arises as a result of industrial, agricultural and sewage disposal activities. Zinc ion has many benefits but it can cause many disorders including growth defects and tissue damage at higher concentrations. Accordingly, development of a simple and inexpensive system for monitoring toxic metals pollution is therefore needed. In this study, the interaction between the surface displayed recombinant enhanced green fluorescence protein (EGFP) in *E. coli* BL21 (DE3) strain as well as the purified protein and zinc chloride ($ZnCl_2$) in different concentrations has been investigated by fluorescence spectroscopy measurements. The results showed that in the presence of $Zn^{2+}$, the green fluorescence emission of the protein increased along with the increasing zinc doses. The detection limit of $Zn^{2+}$ using the displayed and purified EGFP were determined to around 0.31 nM and 18 nM, respectively. Besides, in the presence of 2 nM concentration of various metals, the fluorescence emission increased only in the presence of $Zn^{2+}$ and the other metals had little or no effect on emission. Therefore, it can be concluded that the biosensor based on bacterial surface display system expressing EGFP has a higher sensitivity and specificity in monitoring the zinc ions than the purified protein.

**Key words:** Enhanced green fluorescence protein, surface display, heavy metals, zinc, fluorescence spectroscopy.