همسانه سازی و بررسی بیان ژن متالوتیونین *smtA* در باکتری *اشریشیا کلی* به منظور جذب فلزات سنگین

بهناز صفار[۱،۲*] محسن مبینی دهکردی[۲] و محسن پولادیان[۲]

[۱] **شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، پژوهشکده زیست فناوری**

[۲] **شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه ژنتیک**

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۴

چکیده

یکی از راههای جذب فلزات سنگین علاوه بر روشهای شیمیایی و فیزیکی، استفاده از فرآورده‌های زیستی می باشد. یکی از این فرآورده ها، پروتئینهای جاذب فلزات سنگین مانند متالوتیونین می باشد. هدف از این مطالعه، همسانه‌سازی ژن متالوتیونین *smtA* از سیانوباکتری *سینکوکوس ایلانگاتوس* سویه PCC7942 ، بیان و بررسی جذب فلز توسط آن می‌باشد. بدین منظور ژن *smtA* در ناقل همسانه‌سازی T/A، همسانه‌سازی و در باکتری (*DH5α*) *E.coli* تراریخت شد. صحت تراریختی با Colony-PCR بررسی شد. سپس ژن مورد نظر به داخل ناقل بیانی pET15b زیرهمسانه سازی و در باکتری (*BL21*) *E.coli* تراریخت گردید. صحت تراریختی با بررسی الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید گردید. القای بیان ژن توسط IPTG انجام شد و بیان پروتئین توسط تریس-تریسین SDS-PAGE و وسترن بلات بررسی شد. بررسی جذب یون کادمیم توسط پروتئین توسط دستگاه جذب اتمی صورت گرفت. نتایج توالی‌یابی، صحت تراریختی را تائید کرد. بیان پروتئین تولید شده با روش های SDS-PAGE و وسترن بلات تایید گردید. بررسی جذب فلز نشان داد که یک میلی گرم پروتئین SmtA می تواند به میزان ۲۸ نانو مول یون کادمیم را جذب نماید.

واژه‌های کلیدی: متالوتیونین، *smtA*، جذب فلزات سنگین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۱۹ ، پست الکترونیکی: saffar_b@sci.sku.ac.ir

مقدمه

در حال حاضر یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست محیطی، آلودگی ناشی از تجمع فلزات سنگین در محیط است که این آلودگی اثرات نامطلوبی بر سلامت انسان و اکوسیستم می‌گذارد (۲۲). از جمله فلزات سنگین، می توان کادمیم را نام برد که به وفور در محیط زندگی انسانها وجود دارد. این فلز از طرق مختلف وارد بدن شده و به علت خصوصیات فیزیکو شیمیایی، در متابولیسم بعضی از عناصر ضروری دخالت کرده و عوارض مختلفی از قبیل کم خونی، بیماری استخوانی، کبدی و کلیوی ایجاد می کند. برای برداشت این فلزات از محیط، از روشهای مختلف فیزیکی و شیمیایی استفاده شده است. امروزه از باکتریها، گیاهان و محصولات پروتئینی آنها نیز به این منظور استفاده می‌شود (۷). یکی از روشهای حفاظتی موجودات در برابر آسیبهای ناشی از فلزات در سطح مولکولی و سلولی القای سنتز متالوتیونین‌ها (MT) است (۱۲).

متالوتیونین یک واژه عمومی برای یک ابرخانواده است که شامل پروتئینها و پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین (۷-۶ کیلودالتون) می‌باشند. نام‌گذاری این دسته از پروتئینها به نام متالوتیونین به دلیل محتوای بالای تیولات سولفور و فلز در

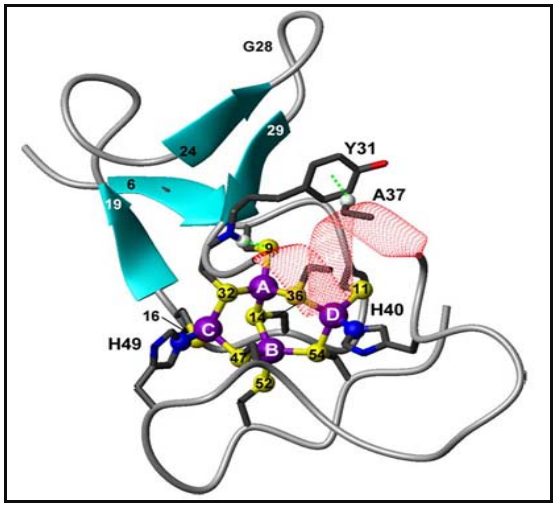
آنها است. متالوتیونین‌ها نه‌تنها در جانوران، بلکه در ریزسازواره‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی و حتی در گیاهان عالی دیده می شوند و بر اساس شباهتهای موجود در توالی و ارتباطات فیلوژنتیکی به چندین خانواده تقسیم می‌شوند (۱۴). این پروتئینها می توانند باعث خنثی شدن مقادیر اضافه فلزات سنگین در سلول شده و از میان-کنشهای غیراختصاصی ساختارهای سلول با فلزات سنگین جلوگیری کنند. همچنین به دلیل القاء شدن آنها توسط فلزات سنگین، می توان آنها را به عنوان بیومارکرهایی برای آلودگیهای غیر آلی در نظرگرفت (۹).

سیانوباکتری *سینکوکوس ایلانگاتوس* سویه PCC7942 یک پروکاریوت تک سلولی فتوسنتزکننده است که در معرض بسیاری از تنشهای محیطی در طبیعت می باشد. این باکتری به فلزات سنگین محیط اطراف با القای پروتئینهایی مانند متالوتیونین پاسخ داده و در نهایت آسیبهای حاصل از آنها را تقلیل می دهد. *smtA* اولین متالوتیونین باکتریایی است که به دقت مورد مطالعه قرار گرفته است. پروتئین کد شده توسط این ژن توالی کوتاه تری نسبت به معادلهای خود در حیوانات و گیاهان دارد. این پروتئین دارای ۵۶ اسیدآمینه، شامل ۹ سیستئین می‌باشد و دارای یک خوشه حاوی چهار فلز می باشد که دو باقیمانده هیستیدینی در پیوند با فلز شرکت دارند (تصویر ۱) (۳).

علاوه بر کاربردهای مختلف زیست محیطی به عنوان جاذب فلزات سنگین و حسگرهای زیستی این پروتئین کاربردهای پزشکی نیز دارد. هدف از این مطالعه، همسانه سازی و بیان ژن متالوتیونین *smtA* در باکتری *E. coli* و بررسی جذب یون فلزی کادمیم توسط آن می باشد.

مواد و روشها

مواد، سویه های باکتری و روشها: باکتریهای استفاده شده شامل سویه‌های آزمایشگاهی همسانه سازی و بیانی باکتری *E.coli* به ترتیب با نامهای DH5α و BL21(DE3) از شرکت سیناژن تهیه گردید



تصویر ۱- ساختار سه بعدی SmtA طبیعی مربوط به سیانوباکتری *سینکوکوس ایلانگاتوس* سویه PCC7942 . این پروتئین دارای یک خوشه، حاوی چهار فلز است. محل قرارگیری یونهای فلزی در این پروتئین در شکل با D, C, B, A نشان داده شده است. همان‌طور که در تصویر دیده می‌شود، در SmtA، دو باقیمانده هیستیدینی نیز در پیوند با فلز شرکت دارند (۳).

از محیطهای کشت لوریا برتانی (LB) مایع و جامد جهت رشد باکتری *E. coli* استفاده گردید. آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به منظور غربالگری از شرکت سیگما خریداری شد. پلاسمید همسانه سازی با نام pTZ57R/Tکه جزء ناقلهای T/A-cloning می‌باشد، به صورت کیت InsT/Aclone PCR cloning kit و پلاسمید بیانی pET15b(+)از شرکت فرمنتاز خریداری شد. آنزیم Taqپلی‌مراز از شرکت سیناژن، آنزیمهای محدودالاثر *Nde*I و *Hind*III و آنزیم DNA T4 لیگاز و *RNase H* از شرکت فرمنتاز تهیه شدند. روشهای مولکولی استفاده شده در این پژوهش بر اساس روشهای استاندارد می باشد (۱۶).

تهیه و تکثیر ژن: ژن *smtA* یکی از ژنهای سیانوباکتری *سینکوکوس ایلانگاتوس* سویه PCC7942 می‌باشد. در مطالعه قبلی، این ژن توسط اولیگونکلئوتیدهای همپوشان (شرکت ژن فن آوران) با روش PCR مورد سنتز قرار

گرفته است (۱۱). در این تحقیق از کدونهای ترجیحی *E.coli* جهت سنتز اولیگونکلئوتیدهای استفاده شده است (۱۱). جهت تکثیر ژن، از واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. مقدار ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X ، ۰/۲۵ میکرو لیتر از آنزیم *Taq* DNA polymerase،۰,۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (50mM)، ۰/۵ میکرولیتر (10mM) dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۲۰ پیکو مول و ۵۰ نانوگرم از محصول سنتز DNA در واکنش PCR استفاده شد. چرخه های واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشتی ۵ دقیقه ای ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و ۳۰ چرخه تکثیری شامل ۳۰ ثانیه واسرشتی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد و یک دقیقه گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت ۵ دقیقه نگهداری در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به منظور گسترش نهایی بود. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

همسانه‌سازی ژن *smtA* در ناقل T/A : محصول PCRطبق روش کیت InsT/Aclone PCR cloning kit در ناقلpTZ57R/T قرار گرفت. تراریختی ناقل نوترکیب حاصل با روش شوک حرارتی بدرون باکتری *E.coli*(*DH5α*) مستعد شده انجام شد و باکتریها بر روی محیط جامد LB حاوی Xgal-IPTG و آمپی‌سیلین (به غلظت ۵۰ µg/ml) کشت داده شدند. برای تولید باکتریهای مستعد شده از روش کلرید کلسیم استفاده شد (۱۶). بعد از گذشت ۱۲ ساعت کلنیهای سفید و آبی مشاهده شدند. برای تأیید تراریختی، کلنیهای سفید موجود بر روی پلیت، Colony-PCR شدند. برای این منظور کلنیهای سفید بر روی محیطهای انتخابی کشت مجدد گردید. سپس مقداری از باکتری در ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط و در ظرف آب جوش به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. بعد از ۲ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ دوردردقیقه (rpm) از ۲ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان منبع پلاسمید نوترکیب برای PCR استفاده گردید.

زیرهمسانه‌سازی ژن *smtA* در ناقل pET15b(+) : ناقل T/A حاوی ژن مورد نظر و ناقل pET15b(+) با آنزیمهای محدودالاثر*Nde*I و *Hind*III مورد هضم قرار گرفتند. برای جداسازی قطعات مورد نظر محلولهای واکنش برش بر روی ژل آگارز ۱ درصد با دمای ذوب پایین الکتروفورز شد. سپس توسط کیت استخراج DNA از ژل آگارز مورد جداسازی قرار گرفتند. باند مربوط به ژن و pET15b(+) برش یافته از ژل جدا شدند. واکنش الحاق ژن متالوتیونین با ناقل بیانی pET15b در حجم ۲۰ میکرولیتر در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انجام شد و محصول الحاق به باکتریهای مستعد شده DH5α و سپس BL21(DE3)به روش شوک حرارتی انتقال یافت(۱۳). سویه میزبان نوترکیب بر روی محیط LB حاوی عامل انتخابی آمپی‌سیلین به مدت یک شب کشت گردید. به منظور غربالگری کلنیهای نوترکیب از میان کلنیهای کشت شده ۵ کلونی انتخاب شد و مورد کلنی- PCR و هضم آنزیمی با آنزیمهای *Nde*I و *Hind*III قرار گرفتند. در ادامه کلنیهای مثبت (کلنیهای دارای باندی برابر نمونه PCR کنترل مثبت) جهت توالی یابی با استفاده از دو پرایمر موجود انتخاب شدند.

القای بیان و بررسی تولید پروتئین: به منظور بررسی بیان ژن، یک تک همسانه از باکتری تراریخت، در محیط LB مایع دارای آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۵۰ µg/ml کشت شبانه داده شد و سپس ۵ میلی‌لیتر از آن به ۵۰ میلی-لیتر از همان محیط تلقیح و پس از رسیدن OD به حد مطلوب (۰/۶-۰/۴) القاء توسط IPTG با غلظت یک میلی-مولار انجام شد. نمونه برداری قبل از القاء و در زمانهای مختلف پس از القاء (۲ساعت، ۴ساعت و ۱۶ساعت) صورت گرفت. بدین نحو که هر بار ۵ میلی لیتر از محیط جدا و مورد سانتریفیوژ قرار گرفت. نمونه‌ها درrpm ۵۰۰۰

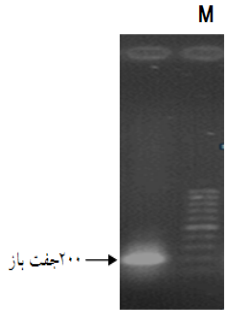
به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و رسوب سلولی بعد از حل شدن در بافر TE و تاثیر امواج ماوراء صوت (قدرت ۸۰ درصد و پالس ۰/۵) در دورrpm ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جهت بررسی بیان، بر روی ژل پلی اکریل امید با نام تریس-تریسین SDS-PAGE که منحصراً برای پروتئینها و پپتیدهای کوچک کاربرد دارد، برده شد. روش آماده کردن این ژل نیز مانند ژل پلی‌آکریل‌آمید سدیم دو-دسیل سولفات می باشد، با این تفاوت که این ژل دارای ۳ قسمت می‌باشد. ژل بالایی با غلظت ۵، میانی ۱۰ و پایینی ۱۶ درصد اکریل امید می‌باشد (۱۷).

تعیین غلظت پروتئین نوترکیب به کمک روش برادفورد انجام شد. بدین صورت که بعد از تهیه آلبومین سرم گاوی (BSA) از شرکت سینا ژن بر اساس میزان جذب (OD) نمودار استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر رسم گردید و در مرحله‌ی بعد با استفاده از آن غلظت پروتئین نوترکیب تخمین زده شد (۸). به منظور انجام وسترن بلات ابتدا مقدار مساوی از پروتئین قبل از القاء و بعد از القاء روی ژل SDS-PAGE برده شد. پروتئینها از ژل پلی اکریل امید توسط بافر انتقال (تریس ۲۵ میلی مولار/ گلیسین ۱۹۲ میلی مولار همراه با متانول ۲۰ درصد) به مدت یک شبانه روز با شدت ۸۰ میلی امپر به غشای PVDF منتقل شدند. مرحله مسدود سازی با قرار دادن کاغذ در Skim Milk 5 درصد به مدت دو ساعت صورت گرفت. سپس آنتی بادی mouse anti-(His)6 peroxidase (شرکت سیتو متین ژن) با رقت ۱ به ۲۰۰۰ اضافه گردید. پس از شست و شوی کاغذ PVDF با بافر شست و شو (Tris ۰۲/. مولار، NaCl نیم مولار و HCL 6 نرمال) ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه، سوبسترای TMB اضافه گردید. با ظاهر شدن باند آبی تیره پروتئین مورد نظر شناسایی گردید.

جذب فلز: جهت بررسی توانایی پروتئین مورد نظر در اتصال به یونهای کادمیم از دستگاه جذب اتمی (GBC M932 plus) با روش تغییر یافته صفار و همکاران استفاده گردید (۱۵). به محلول پروتئین با غلظت مشخص کلرید کادمیم با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار اضافه شد (۱۵). نمونه ها به مدت دو ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس به آن استن با غلظت نهایی ۸۰ درصد (v/v) اضافه شده و به آرامی تکان داده شد تا به خوبی مخلوط گردد. بعد از نگهداری بر روی یخ به مدت یک ساعت، محلول مورد نظر در دمای ۴ درجه به مدت ۳۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید تا پروتئینهای مذکور رسوب گردند. محلول رویی برداشته شده و توسط دستگاه جذب اتمی میزان یونهای متصل نشده اندازه گیری گردید.

نتایج

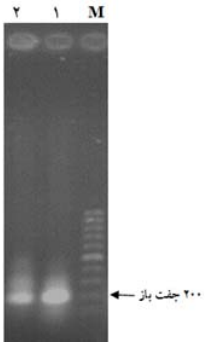
تهیه و تکثیر ژن : پس از تکثیر ژن *smtA* با استفاده از پرایمر های رفت و برگشت محصول PCR بر روی ژل اگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید همان طور که در تصویر۲ مشاهده می شود مطابق انتظار فقط یک باند حدود ۲۰۰ جفت بازی روی ژل مشاهده می شود.



تصویر۲- تکثیر ژن به کمک PCR و تأیید آن توسط الکتروفورز برروی ژل آگارز. ستون اول (M)نشانگر ۱۰۰ جفت بازی SM0321 فرمنتاز. ستون دوم محصول PCR که نشان دهنده باند ۲۰۰ جفت بازی ژن سنتز شده است.

همسانه سازی ژن *smtA* در ناقل pTZ57R/T: محصول PCRدر ناقلpTZ57R/T قرار گرفت و محصول الحاق به باکتری (*E.coli*(*DH5α* مستعد شده منتقل گردید و کلنیهای سفید و آبی مشاهده شدند. برای تأیید تراریختی، کلنیهای

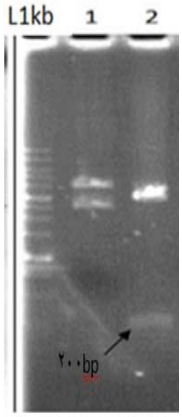
سفید موجود بر روی پلیت کشت داده شده و مورد Colony PCR قرار گرفتند. نتایج حاصل بر روی ژل اگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. تصویر ۳ محصول ۲۰۰ جفت بازی را نشان می دهد.



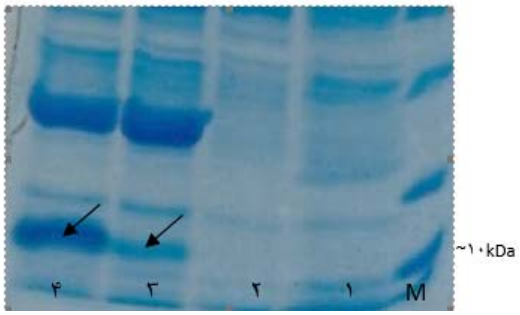
تصویر ۳ – تأیید کلنیهای حاوی ناقل pTZ57R/T-*smtA* توسط PCR از کلنیهای سفید منتخب. ستون اول (M) نشانگر ۱۰۰ جفت بازی SM0321 فرمنتاز. ستونهای دوم و سوم نشان دهنده محصول PCR از کلنیهای نوترکیب که باند مورد انتظار در ناحیه ۲۰۰ جفت بازتشکیل داده اند.

زیر همسانه سازی ژن *smtA* در ناقل بیانی pET15b : قطعات بریده شده ژن *smtA* و ناقل pET15b بریده شده از روی ژل آگارز تخلیص شد و با یکدیگر الحاق شدند. محصول الحاق به باکتریهای مستعد DH5α و سپس BL21(DE3) منتقل شد و بعد از کشت روی محیط حاوی آمپی سیلین ، حضور پلاسمید نوترکیب توسط روش هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت (تصویر ۴). تأیید نهایی توسط تعیین توالی صورت گرفت (شرکت ژن فن آوران). نتیجه تعیین توالی نشان داد که توالی ژن مذکور فاقد نوارایی ناخواسته می باشد.

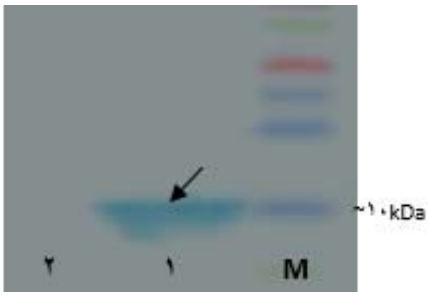
بیان ژن *smtA* و تأیید آن: ژن *smtA* توسط IPTG القاء شد و نمونه های پروتئینی تحت شرایط دناتوره به همراه نشانگر پروتئینی (SM1889) روی ژل پلی آکریل آمید تریس تریسین الکتروفورز شدند (تصویر ۵). در مقایسه با نشانگر پروتئینی در ناحیه ۱۰ کیلودالتونی باند پروتئینی نوترکیب مشاهده شد و با وسترن بلاتینگ تأیید گردید (تصویر ۶). بیشترین بیان در زمان ۴ ساعت پس از القاء مشاهده شد. در تصویر ۵ وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی علیه His-Tag پروتئین نوترکیب نشان داده شده است.



تصویر۴- محصول برش پلاسمید pET15b نوترکیب توسط آنزیمهای *Nde*I و *Hin*dIII:۱: pET15b برش نخورده ۲: pET15b برش خورده و خروج قطعه200 جفت بازی، M : مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی SM0312 فرمنتاز



تصویر۵- Tris-Tricin SDS-PAGE حاصل از پروتئین نوترکیب بیان شده. M: مارکر وزن مولکولیSM1889 (فرمنتاز). ۱: باکتری BL21(DE3) فاقد پلاسمید۲: باکتری ترانسفرم شده با ناقل نوترکیب قبل از القاء، ۳و ۴ به ترتیب ۲و۴ ساعت پس از القاأ با IPTG . فلشها باند پروتئین مورد نظر را نشان می دهد.



تصویر۶- وسترن بلاتینگ. M: مارکر وزن مولکولی (abcam Ultra protein Ladder) ۱: نمونه پروتئین ۴ ساعت پس از القاء نشان داده

شده است ۲: باکتری ترانسفرم شده با ناقل نوترکیب قبل از القا (به عنوان کنترل منفی). فلش باند مورد نظر را نشان می دهد.

جذب یون کادمیوم توسط پروتئین نوترکیب: پس از تأیید بیان پروتئین نوترکیب، محلول کلرید کادمیم با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار به پروتئین مورد نظر اضافه شد و پس از رسوب پروتئین، میزان کادمیم متصل نشده با روش جذب اتمی مورد ارزیابی قرار گرفت. بنابراین با توجه به غلظت اولیه یون کادمیم می توان میزان یون کادمیم جذب شده را محاسبه نمود. اختلاف میزان جذب پروتئین کنترل و نمونه، بیانگر میزان جذب پروتئین نوترکیب بیان شده می باشد. جدول ۱، میزان جذب یون کادمیم به ازای هر میلی گرم پروتئین را نشان می دهد.

جدول ۱ : بررسی میزان جذب یون کادمیم به ازای میلی گرم پروتئین

نمونه / میزان جذب یون کادمیم	پروتئین کنترل	پروتئین نمونه
نانو مول بر میلی گرم پروتئین	38.18 38.49 38.30	66.39 66.47 65.92

پروتئین نمونه: پروتئین حاصل از باکتری تراریخته حاوی ژن متالوتیونین ۴ ساعت بعد از القاء، پروتئین کنترل :پروتئین حاصل از باکتری حاوی پلاسمید قبل از القاء. نتایج به دست آمده حاصل ۳ تکرار مستقل می باشد که نشان دهنده تکرار پذیری آزمایش می باشد.

بحث

میکروارگانیسم‌ها و به ویژه باکتریها نقش بسیار مهمی در حذف زیستی فلزات سنگین داشته و در بیوتکنولوژی کاربرد دارند (۱). با توجه به اینکه متالوتیونین باکتری *سینکوکوس ایلانگاتوس* می‌تواند به فلزات سنگین مثل کادمیوم، مس، ارسنیک، جیوه و نقره متصل شود گزینه خوبی برای جذب فلزات سمی به شمار می‌رود. البته استفاده‌های دیگری مثل استفاده دارویی و غیره برای آن در نظر گرفته می‌شود(۲۱).

با در نظر گرفتن پلاسمید مورد استفاده در این مطالعه القای بیان پروتئین SmtA توسط غلظت نهایی یک میلی مولار IPTG که غلظت مناسب برای القای بیان در ناقلهای حاوی پروموتور T7lac می باشد، انجام شد و پس از آن دمای رشد باکتریها از ۳۷ به ۳۰ درجه سانتی گراد کاهش داده شد، زیرا رشد باکتریها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد منجر به تجمع محصولات پروتئینی به شکل اجسام رسوبی خواهد شد در حالی که رشد در دمای پایین تر باعث تولید پروتئین به حالت محلول و فعال می شود (۱۳). با توجه به نتایج SDS-PAGE پروتئین مورد نظر ۴ ساعت بعد از القاء به خوبی بیان شده است. وزن مولکولی پروتئین مورد نظر با در نظر گرفتن اضافه شدن توالی کوتاهی از ناقل بیانی و نیز شش اسیدآمینه هیستیدین (موجود درتوالی ناقل بیانی)، حدود ۱۰ کیلودالتون محاسبه شده است. باند مشاهده شده در ژل به خوبی تأیید شد و با توجه به اینکه پروتئین به خوبی بیان شده است، می توان گفت که *E.coli* میزبان مناسبی برای بیان این پروتئین می باشد. همچنین با توجه به جدول شماره ۱ میزان جذب فلز توسط نمونه کنترل (پروتئین حاصل از باکتری حاوی پلاسمید قبل از القاء) به میزان تقریبی ۳۸/۳۲ (میانگین اعداد) نانو مول و نمونه پروتئین مورد نظر ۴ ساعت پس از القاء بمیزان ۶۶/۲۶ نانو مول به ازای هر میلی گرم پروتئین می باشد. با توجه به یکسان بودن تمام عوامل جذب در نمونه های کنترل و پروتئین SmtA می توان گفت که این پروتئین

جذبی حدود ۲۸ نانو مول در میلی گرم پروتئین داشته است.

با توجه به اهمیت متالوتیونین *smtA* مطالعات زیادی تاکنون بر روی آن صورت گرفته است. (۵، ۱۰و۱۹). اولین بار شای و همکاران (۱۹۹۲) بیان ژن *smtA* را در باکتری *E. coli* توسط وارد کردن به ناقل pGEX3X (pGPMTl) به صورت فیوژن پروتئین SmtA-GST انجام داده‌اند و با خالص‌سازی این پروتئین به بررسی خصوصیات اتصال به فلز در آن پرداخته‌اند (۱۸). مطالعات بعدی بر روی این پروتئین نشان داد که توالی پروتئینی دارای چند اسیدآمینه اضافی درانتهای کربوکسیل خود می باشد که در زمان شای و همکاران هنوز شناخته نشده بود (۱۸). در سال ۲۰۰۱ Blindauer و همکارانش به منظور بررسیهای ساختاری SmtA این پروتئین را در *E.coli* بیان کردند. در این مطالعه، پروتئین بیان شده با استفاده از تکنیکهای اسپکترومتری جرمی، کروماتوگرافی مایع و اسپکتروسکوپی NMR، مورد ارزیابیهای ساختاری قرار گرفت (۴). در سال ۲۰۰۷ نیز، Blindauer و همکارانش با استفاده از پرایمرهای دارای جهش هیستیدینهای ۴۰ و ۴۹ به سیستئین، جهش هدفمند در *smtA* ایجاد کردند. پلاسمید مورد استفاده pMHNR1.1 بود و باکتریهای(DE3)*BL21* ترانسفورم شده پس از رشد در محیط LB و القاء با IPTG، در معرض $ZnSo_4$ (۰/۵ میلی-مولار) قرار گرفتند. ارزیابی موتانتها با استفاده از تکنیک-NMR نشان داد که تمایل آنها به فلز کم شده است (۶). در سال ۲۰۱۰ Xu و همکارانش، به روش سنتزی و با استفاده از پنج اولیگونوکلئوتید ۶۰ نوکلئوتیدی (*smtA P1*تا *smtA P5*) و یک اولیگونوکلئوتید ۳۰ نوکلئوتیدی، ژن نوترکیبی به نام *smtA1* ساختند. *cDNA* سنتز شده در ناقل pYK2697 که بر اساس ناقل pCAMBIA-1301 بود قرارداده شد. این ناقل با روش الکتروپوریشن به آگروباکتریوم منتقل و از طریق آن گیاه ترانس ژنی تولید شد. سپس به منظور ارزیابی افزایش تحمل گیاه ترانس ژن، غلظت ۵۰۰ میکرومولار محلول Zn بر روی گیاه مورد آزمایش قرار گرفت و نشان داده شد که بیان متالوتیونین *smtA*، افزایش داشته و میزان تحمل گیاه آرابیدوپسیس را به فلز روی افزایش داده است (۲۳). در سال ۲۰۱۲ نیز بیان *smtA* به صورت سطحی و به شکل فیوژن با یک دمین متصل شونده به کیتین و نیز LPP-OMPA توسط آموزگار و همکارانش انجام شد که منجر به افزایش جذب روی گردیده است(۲۰). علاوه بر این بررسی جذب کادمیم در دو سویه حساس و مقاوم *ساکارومایسز سرویزیه* نشان داده است که میزان جذب در سویه حساس بیشتر است. بنابراین کاهش میزان دریافت فلز و افزایش تعداد متالوتیونین‌های اختصاصی فلز، مکانیسم مقاومت به کادمیم در سویه مقاوم است (۲).

در این مطالعه با توجه به شناخت کامل توالی پروتئینی و استفاده از کدونهای ترجیحی *E.coli* در طراحی اولیگونکلئوتیدهای مورد استفاده و بهینه سازی بیان در دمای ۳۰ درجه میزان پروتئین تولید شده و جذب یون فلز کادمیم در مقایسه با مطالعات صورت گرفته بیشتر می باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

باتوجه به آلودگی روزافزون فلزات سنگین و تأیید اثرات مخرب و مضر این فلزات بر سلامت انسان و اکوسیستم، توسعه راهکارهای مختلفی مانند روشهای فیزیکی یا شیمیایی لازم به نظر می‌رسد. البته در مواردی به دلیل کارآیی کم و هزینه زیاد، محققان را به سمت روشهای زیستی و زیست فناوری سوق داده است. از جمله این روشها استفاده از پروتئینها و پپتیدهایی است که تمایل و اختصاصیت بالاتری برای فلزات سنگین سمی نظیر کادمیم، جیوه، سرب داشته باشند. در این راستا بیان متالوتیونین-هایی که دارای تمایل بیشتری به فلزات سنگین هستند، چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای در جهت توسعه روشهای حذف فلزات سنگین، حس‌گرهای زیستی و داروها ایجاد کرده

است. در این پژوهش، ژن متالوتیونین سینکوکوس *ایلانگاتوس سویه PCC7942* ، سنتز، همسانه سازی و سپس بیان گردید. توالی‌یابی، صحت کلن‌سازی را تأیید کرد و وسترن بلات نشان دهنده بیان پروتئین بود. میزان جذب فلز توسط نمونه در مقایسه با نمونه کنترل با استفاده از جذب اتمی مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که پروتئین مورد نظر به میزان تقریبی ۲۸ نانومول به ازای میلی‌گرم پروتئین کل افزایش جذب داشته است.

تشکر و قدر دانی

این پژوهش باحمایت مالی دانشگاه شهرکرد در قالب طرح پژوهشی انجام شده است.

منابع

۱. اخوان سپهی ،ع .، شریفیان، س .، ذوالفقاری، م و خلیلی درمنی، م. ۱۳۹۳، بررسی میزان مقاومت کلیفرمهای روده‌ای جدا شده از پسابهای صنعتی، خانگی و بخشهایی از تصفیه خانه شهر اراک به فلزات سنگین. مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی . دوره ۲۷، شماره ۲، ۱۶۷-۱۷۸.

۲. حسنی، ع.، اعتمادی فر، ز و نحوی، ا. ۱۳۹۳، بررسی تحمل و جذب فلزات مس و سرب توسط سه سویه استاندارد مخمر. مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی .دوره ۲۷، شماره ۲، ۱۷۹-۱۹۱.

3-Blindauer CA, 2011. Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. J Biol Inorg Chem, 16:1011-1024.

4-Blindauer CA, Harrison MD, Parkinson JA, Robinson AK, Cavet JS, Robinson NJ Sadler, Proc PJ, 2001. A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. P Natl Acad Sci USA, 98: 9593–9598.

5- Blindauer CA, Harrison MD, Robinson AK, Parkinson JA, Bowness PW, Sadler PJ, Robinson NJ, 2002. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. Mol. Microbiol, 45:1421–1432.

6-Blindauer CA, Tahir Razi M, Campopiano DJ, Sadler PJ, 2007. Histidine ligands in bacterial metallothionein enhance cluster stability. J Biol Inorg Chem, 12:393–405.

7-Bonaventural C, Johnson FM, 1997. Healthy environments for healthy people: Bioremediation today and tomorrow. Environ Health Persp, 105:5-20.

8-Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem, 72: 248–254.

9-Ceratto N, Dondero F, Loo J.W, Burlando B, Viarengo A, 2002. Cloning and sequencing of a novel metallothionein gene in *Mytilus galloprovincialis*. Com Biochem and Phys Part C, 131:217–222.

10-Daniels MJ, Turner-Cavet JS, Selkirk R, Sun H, Parkinson JA, Sadler PJ, Robinson NJ, 1998. Coordination of Zn2+ (and Cd2+) by prokaryotic metallothionein involvement of his-imidazole. J Biol Chem, 273: 22957–22961.

11-Hajjari M, Saffar B, 2011. The construction of a short gene by a very fast, modified, and simplified gene synthesis and the analysis of various effects on this synthesis. Braz Arch Biol Techn, 54(1): 53-60.

12- Hijova E, 2004. Metallothioneins and zinc: their functions and interactions. Bratisl Lek Listy, 105(5-6):230-234.

13- Http://www.novagen.com/pet System Manual.

14-Romero-Isart N, 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. J Inorg Biochem, 88:388–396.

15- Saffar B, Yakhchali B, Arbabi M, 2007. Development of a bacterial surface display of hexahistidine peptide using CS3 pili for bioaccumulation of heavy metals. Curr Microbiol, 55: 273-277.

16-Sambrook J, Russell DW, 2001. Molecular cloning; a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

17-Schagger H, 2006. Tricin-SDS-PAGE. Nature publishing group, 1:16-23

18-Shi J, Lindsay WP, Huckle JW, Morby AP, and Robinson NJ, 1992. Cyanobacterial metallothionein gene expressed in *Escherichia*

Metal-binding properties of the expressed protein. FEBS, 303(2, 3):159-163.

19-Shimizu T, Hiyama T, Ikeuchi M, 1992. Nucleotide sequence of a metallothionein gene of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. Plant Mol. Biol. 20:565–567.

20-Tafakori V, Ahmadian GH, Amoozegar MA, 2012. Surface display of bacterial Metallothioneins and a chitin binding domain on *Escherichia coli* increase Cadmium adsorption and cell immobilization. Appl Biochem Biotech, 167(3): 462-473.

21-Valls M, de Lorenzo V, 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. FEMS Microbiol. Rev. 26: 327–338.

22-Wangj L, Chen C, 2009. Biosorption of heavy metals removal and their future. Biotechnol Adv, 27:195-226.

23-Xu J, Tian YT, Peng RH, Xiong AS, Zhu B, Hou XL, Yao QH, 2010. Cyanobacteria MT gene *smtA* enhance zinc tolerance in *Arabidopsis*. Mol Biol Rep, 37:1105–1110.

Cloning and expression of *smtA* metallothionein in *Escherichia coli* for heavy metal absorption

Saffar B.[1,2], Mobini Dehkordi M.[2] and Pooladian M.[2]

[1] Biotechnology Research Institute, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

[2] Genetics Dept., Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

One way to absorb heavy metals in addition to chemical methods is the use of biological elements. One of the metal adsorption proteins is metallothionein. Goal: The purpose of this study is gene cloning and expression of *Synechococcus* PCC7942 metallothionein *smtA* and protein production and analysis of metal uptake by the protein. Methods: The gene *smtA* was cloned into the T / A cloning vector and then were transferred into the *E.coli (*DH5α). Colony-PCR evaluates the accuracy of the transformation and sequence detection was carried out. The gene was subcoloned into the expression vector pET15b and transferred into the *E.coli* (BL21). Gene expression was induced by IPTG and proteins were analyzed by Tris-Trisin SDS-PAGE and Western blotting. Metal uptake of protein was measured by atomic absorption. Results: Sequencing, confirmed the accuracy of the transformation. SDS-PAGE and Western blot analysis confirmed protein expression. Metal absorption showed that one milligram of protein adsorbs 28 nmol of cadmium ion.

Key words: Metallothionein , *smtA*, heavy metal absorption