ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴
صفحه ۳۱۲-۳۰۵

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

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

ایمـان سلیمانی‌فـرد[۱]، آذر شاه‌پیـری[*۱]

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

Soleimanifard I[1], 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 تیپ۳ می‌باشد، توالی کدکننده این ایزوفرم در ناقل بیانی pET41a همسانه‌سازی و به میزبان بیانی *E. coli* سویه Rosetta (DE3) 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 Rosetta (DE3) تولید شد. مقایسه منحنی رشد سلول‌های باکتری بیان‌کننده 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 تراریخته قابلیت جذب فلزات را به صورت Cd>Ni>Zn>Cu دارد.

واژه‌های کلیدی

برنج
بیان هترولوگ
فلزات سنگین
متالوتیونین
E. coli

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.1.1]

مقدمه

در دهه‌های اخیر، همزمان با توسعه صنعتی جوامع بشری، ورود آلاینده‌های محیطی به اکوسیستم‌های طبیعی افزایش بی‌سابقه‌ای یافته است به طوری که در برنامه‌ریزی سازمان‌های بین‌المللی آلودگی‌های زیست بوم در کنار محدودیت منابع آب از مهم‌ترین تهدیدات قرن حاضر معرفی شده‌است (Hyun et al. 1998; Freisinger 2008). در این میان، آلوده کننده‌های فلزی درصد قابل توجهی از آلاینده‌های زیستی را به خود اختصاص داده‌اند. به دلیل ویژگی تجزیه‌ناپذیری شیمیایی و زیستی، پالایش آلاینده‌های فلزی از طبیعت بسیار دشوار می‌باشد که این عوامل سبب افزایش تاثیرات مخرب آنها بر محیط زیست شده‌است (Chaney 1997; Lovely et al. 1997). تقریبا تمام فلزات سنگین در بدن، پیامدهای زیان‌باری از خود بر جای می‌گذارند. بعضی از آنها مانند کادمیوم، نیکل و جیوه حتی در مقادیر ناچیز نیز برای انسان سمی و خطرناک می‌باشند (Zazouli et al. 2010).

متالوتیونین‌ها[1] (MTs)، پروتئین‌های درون سلولی با وزن مولکولی کم (۵ تا ۱۰ کیلودالتون) و غنی از آمینواسید سیستئین می‌باشند که در بسیاری از موجودات تک‌سلولی و پرسلولی مانند حیوانات، گیاهان عالی، قارچ‌ها و سیانوباکتری‌ها شناسایی شده و در هوموستازی فلزات ضروری و نیز کاهش سمیت فلزات سنگین نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Freisinger 2008). وجود ایزوفرم‌های متعدد از MT در گیاهان می‌تواند دلیلی بر اهمیت نقش آنها در این جانداران باشد. ایزوفرم‌های گیاهی MT بر اساس نحوه توزیع آمینواسید سیستئین موجود در انتهای آمینی پروتئین، در چهار تیپ گروه‌بندی شده‌اند. در تیپ‌های ۱، ۲ و ۳ دو دمین[2] سرشار از آمینواسید سیستئین در دو انتهای کربوکسیلی و آمینی پروتئین وجود دارد که توسط یک ناحیه فاصله‌انداز عاری از سیستئین از هم جدا می‌شوند. به جز در مواردی استثنا 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-C، C-X-C و C-X-X-C و در تیپ۳، چهار سیستئین به صورت موتیف C-X-X-C-X-C-X-C در انتهای آمینی پروتئین دیده شده‌است. برخلاف انتهای آمینی، تعداد و الگوی سیستئین‌ها در انتهای کربوکسیلی این تیپ‌ها یکسان بوده به طوری که شش سیستئین به صورت موتیف C-X-C-X-X- X-C-X-C-X-X-C-X-C 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). تجزیه‌های بیان ژن نشان داده‌اند که ژن‌های کدکننده MT گیاهی الگوی بیان متفاوتی را در بافت‌های مختلف دارند؛ این امر می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که ایزوفرم‌های گوناگون این ژن‌ها ممکن است عملکردهای متفاوتی را در بافت‌های ویژه داشته باشند (Yang et al. 2011; Cobbett and Goldsbrough 2002; Guo et al. 2003; Freisinger 2007). بر اساس نتایج این مطالعات مشخص شده که ژن‌های تیپ ۱ معمولا در ریشه به مقدار بیشتری بیان می‌شوند؛ در صورتی که ژن‌های تیپ ۲ در برگ‌ها بیان بیشتری دارند. ژن‌های تیپ ۳ در گیاهان تولیدکننده میوه‌های گوشتی مانند موز، سیب و آناناس عمدتا در طی رسیدگی میوه‌ها بیان می‌شوند؛ اما در گیاهانی که میوه گوشتی تولید نمی‌کنند مانند آرابیدوپسیس سطح بیان در برگ‌ها بیشتر است (Guo 2005; Zhou et al. 2006). در گیاه برنج مشخص شد که ژن کدکننده یکی از ایزوفرم‌های MT تیپ ۳ (*EF136378*) به صورت عمده در برگ بیان می‌شود؛ این در حالی است که این ژن در ساقه به صورت اندک و در جوانه و ریشه به ندرت بیان شد (Zhu et al. 2008). مطالعه بیان ژن MT تیپ ۳ در *Elaeis guineensis* (Oil Palm) نشان داد که پروموتر ژن *MT3-b* در بافت ریشه دارای فعالیت بوده در حالی که در برگ و مزوکارپ میوه فعالیتی از خود نشان نداد (Ramli and Abdullah 2010).

علی‌رغم وجود اطلاعات بسیار در مورد اثر تیمارهای مختلف فلز و یا دیگر تنش‌های محیطی بر بیان ژن‌های کدکننده MT گیاهی در سطح mRNA، تحقیقات بسیار اندکی بر روی عملکرد و نقش اختصاصی اعضای این خانواده پروتئینی صورت گرفته‌است. استفاده از روش‌های مبتنی بر مهندسی ژنتیک و انجام آزمایشات با انتقال هر یک از ژن‌های کدکننده MT گیاهی به موتاسیون یافته‌های حساس به فلز در باکتری و یا مخمر، می‌تواند راهکار مناسبی را جهت بررسی عملکرد ژن‌های مرتبط با هوموستازی

[1] Metallothioneins = MTs
[2] Domain

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.1.1]

فلزات ایجاد کند و نیز اطلاعات تازه‌ای را در رابطه با تعیین ایزوفرم‌های مختلف MT در واکنش با فلزات فراهم سازد.

در گیاه برنج ژن‌های کدکننده ایزوفرم‌های مختلف از هر چهار تیپ MT شناسایی شده‌است؛ با این وجود اطلاعات اندکی از نقش و عملکرد اختصاصی این ایزوفرم‌ها در رابطه با قابلیت آنها در اتصال به فلزات در دسترس می‌باشد. در این پژوهش توالی کدکننده ایزوفرم OsMTI-3a که یکی از دو ایزوفرم شناسایی شده MT تیپ ۳ گیاه برنج است، به باکتری *E. coli* انتقال داده‌شد و سپس تاثیر بیان ژن مذکور بر میزان تحمل سلول‌های باکتری به فلزات سنگین مورد بررسی قرار گرفت. توالی ژن کننده این ایزوفرم دارای ۱۸۹ جفت باز بوده و پروتئینی به طول ۶۲ آمینواسید را سنتز می‌کند. این ایزوفرم در توالی خود دارای ۱۰ آمینواسید سیستئین می‌باشد؛ به طوری که چهار سیستئین در انتهای آمینی و شش سیستئین در انتهای کربوکسیلی توزیع یافته است. دو ناحیه غنی از سیستئین در این پروتئین، توسط یک ناحیه فاصله انداز عاری از سیستئین از یکدیگر جدا شده‌اند.

مواد و روش‌ها

تکثیر، همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن *OsMTI-3a*

ایزوفرم حاضر، متعلق به MT تیپ ۳ گیاه برنج با شماره ثبت *AF001396* در بانک ژن و نام *OsMTI-3a* می‌باشد (Zhou et al. 2006). توالی ژن کدکننده این ایزوفرم از کتابخانه cDNA مرکز NIAS (http://www.dna.affrc.go.jp) که در پلاسمید pFLCI همسانه‌سازی شده تهیه شد. جهت تکثیر توالی ژن کدکننده، آغازگر اختصاصی رفت (Forward) با توالی نوکلئوتیدی 5'-ATATGAATTCATGTCGGACAAGTGCG-3' (زیر جایگاه آنزیم برشی *Eco*RI خط کشیده شده است) و آغازگر اختصاصی برگشت (Reverse) با توالی نوکلئوتیدی 5'-ATATAAGCTTTCACTTGCCGCACTTGC-3' (زیر جایگاه آنزیم برشی *Hin*dIII خط کشیده شده)، بر اساس ابتدا و انتهای توالی کدکننده ژن *OsMTI-3a* طراحی شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱/۷۵ واحد آنزیم *Pfu* پلیمراز (فرمنتاز)، ۵۰ نانوگرم pFLCI–cDNA-OsMT1-3a به‌عنوان الگو، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR(۱۰X) و $MgSO_4$ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار انجام شد. واکنش PCR در ۳۰ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت کردن در دمای 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 ۷۲°C به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی ابتدایی در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و در پایان مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و خالص‌سازی آن به وسیله Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (فرمنتاز، K0513) انجام شد. در گام بعد، محصول PCR خالص‌سازی شده از ژل، با آنزیم‌های *Hin*dIII (فرمنتاز) و *Eco*RI (فرمنتاز) مورد هضم قرار گرفت و سپس خالص‌سازی محصول واکنش از روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام شد. با هدف ایجاد جایگاه‌های مناسب جهت قرارگیری قطعه ژنی در وکتور، پلاسمید pET41a با اندازه ۵۹۳۳ جفت باز به عنوان وکتور بیانی با آنزیم‌های *Hin*dIII و *Eco*RI برش داده شد و خالص‌سازی محصول واکنش از روی ژل آگارز یک درصد انجام شد. واکنش لیگاسیون بین پلاسمید خطی شده pET41a و قطعه ژن کدکننده *OsMTI-3a* با استفاده از آنزیم T4 لیگاز (فرمنتاز) صورت گرفت. بعد از آن، محصول واکنش لیگاسیون با روش الکتروپوریشن به باکتری‌های مستعد DH5α انتقال داده شد. جهت انتخاب باکتری‌های تراریخت، واکنش Colony PCR از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی LB (Luria Bertani) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) انجام شد (Sambrook and Russell 2001). جهت بررسی صحت همسانه‌سازی قطعه ژن کدکننده *OsMTI-3a* در وکتور، پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های تایید شده، با دو آنزیم *Hin*dIII و *Eco*RI برش داده شدند و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد لکتروفورز شد. در نهایت جهت تایید صحت توالی نوکلئوتیدی، استخراج پلاسمیدهای نوترکیب pET41a-OsMTI-3a توسط کیت استخراج پلاسمید (فرمنتاز، K0502) انجام گرفت و جهت توالی‌یابی به شرکت Bioneer ارسال شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.1.1]

بیان پروتئین نوترکیب در باکتری *E. coli*

پلاسمید نوترکیب pET41a-OsMTI-3a و نیز پلاسمید pET41a فاقد قطعه ژنی موردنظر (شاهد) جهت تولید پروتئین، با روش الکتروپوریشن، به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) ترانسفورم شدند. به دلیل حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین بر روی پلاسمید pET41a و نیز مقاومت باکتری Rosetta (DE3) به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (Novagen 2005)، سلول‌های باکتری ترانسفورم شده در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (۵ میلی‌گرم بر لیتر) و بر روی انکوباتور با ۱۸۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷°C کشت داده شدند. هنگامی که OD_{600} به ۰/۷ رسید، IPTG[1] به عنوان ماده القاگر به غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار به محیط‌های کشت اضافه شد. در فواصل زمانی مختلف نمونه‌برداری از سوسپانسیون باکتریایی در ویال‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری صورت گرفت (Mohammadi Nezhad et al. 2013). سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در $g \times$ ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴°C سانتریفوژ (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 $g \times$ ۱۲۰۰۰ و 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* سویه Rosetta (DE3)، ابتدا تاثیر غلظت‌های مختلفی از نمک‌های $CdCl_2.H_2O$، $ZnSO_4.7H_2O$، $CuSO_4.5H_2O$ و $NiCl_2$ بر رشد باکتری شاهد Rosetta-pET41a (باکتری Rosetta حاوی پلاسمید pET41a) ارزیابی شد و غلظت آستانه تحمل هر یک از فلزات مشخص شد (Mohammadi Nezhad et al. 2013). بر اساس تحلیل منحنی‌های رشد فلزات، غلظت ۱/۵ میلی‌مولار مس، دو میلی‌مولار نیکل، یک میلی‌مولار روی و ۰/۶ میلی‌مولار کادمیوم به عنوان غلظت‌های 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 (شاهد) و Rosetta-pET41a-OsMTI-3a (باکتری Rosetta حاوی پلاسمید pET41a-OsMTI-3a) در محیط کشت LB به همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (۵ میلی‌گرم بر لیتر) رشد داده شدند. به هنگام رسیدن OD_{600} به ۰/۷، القای بیان پروتئین در هر دو سویه توسط IPTG و به غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار انجام شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه یکی از نمک‌های کلرید کادمیوم، سولفات مس، سولفات روی و کلرید نیکل به محیط کشت اضافه شد به طوری که غلظت نهایی فلزهای کادمیوم، مس، روی و نیکل در محیط کشت به ترتیب به ۰/۶، ۱/۵، یک و دو میلی‌مولار رسید. رسم منحنی رشد باکتری‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf, Rs323C) با اندازه‌گیری OD_{600} 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 $g \times$ 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[2] (Rayleigh, WFX-210) ارزیابی شد.

نتایج و بحث

پس از قرارگیری و همسانه‌سازی ژن کدکننده *OsMTI-3a* در پلاسمید pET41a و ترانسفورم آن به باکتری DH5α، توسط واکنش Colony PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ژنی ۲۰۹ جفت بازی در کلنی‌های رشد یافته نشان داده شد. سپس کلنی‌های واجد ژن، مورد واکنش هضم دو طرفه آنزیمی به وسیله *Eco*RI و *Hind*III قرار گرفتند. جدا شدن قطعه

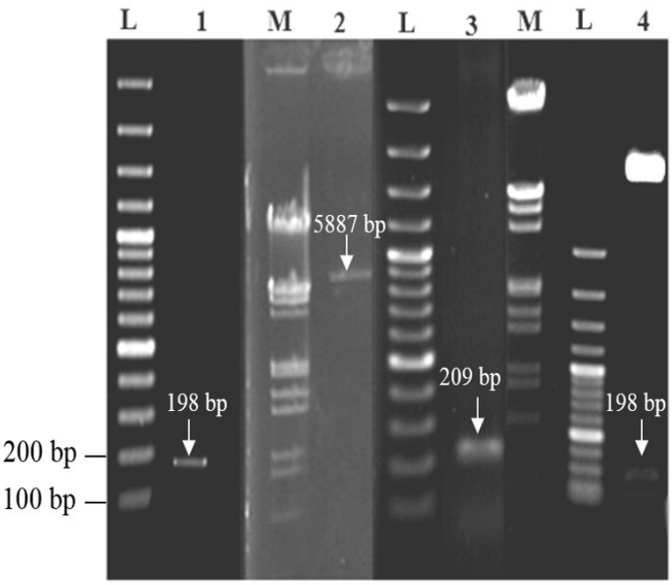
[1] Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

[2] Atomic absorption spectroscopy

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.1.1]

به طول ۱۹۸ جفت باز از پلاسمید نوترکیب pET41a-OsMTI-3a موفقیت همسانه‌سازی ژن کدکننده *OsMTI-3a* در وکتور pET41a را تایید کرد (شکل۱). همچنین از طریق توالی‌یابی، صحت توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنی با استفاده از آغازگرهای T7 Promoter/Terminator تایید شد.



شکل۱- روند تولید پلاسمید نوترکیب pET41a-OsMTI-3a بر روی ژل آگارز. ستون۱) الکتروفورز محصول خالص‌سازی شده هضم آنزیمی *OsMTI-3a* با *Hin*dIII و *Eco*RI تکثیر شده به وسیله واکنش PCR؛ ستون۲) الکتروفورز پلاسمید خطی شده بوسیله آنزیم‌های *Hin*dIII و *Eco*RI؛ ستون۳) الکتروفورز محصول واکنش Colony PCR یکی از کلنی‌های واجد قطعه ژنی با تکثیر قطعه ۲۰۹ جفت بازی؛ ستون۴) الکتروفورز واکنش هضم دو طرفه آنزیمی با آنزیم‌های *Hin*dIII و *Eco*RI. جداسازی قطعه OsMTI-3a به طول ۱۹۸ جفت باز ؛ ستون M) نشانگر ملکولی III (فرمنتاز)؛ ستون L) DNA Ladder (۱۰۰-۳۰۰۰ bp)

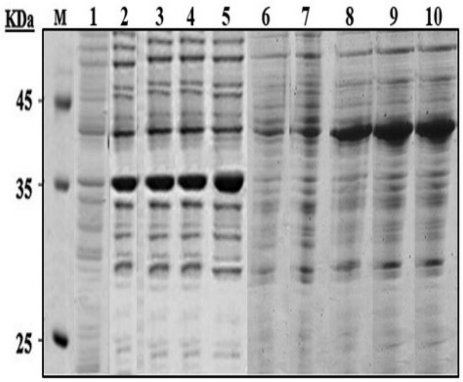
پلاسمیدهای pET41a-OsMTI-3a و pET41a به میزبان بیانی *E. coli* سویه Rosetta (DE3)، جهت تولید پروتئین نوترکیب انتقال داده شدند. توالی کدکننده این ایزوفرم در ناقل بیانی pET41a در الحاق با توالی کدکننده سه دنباله پروتئینی شامل His-Tag، S-Tag و GST-Tag می‌باشد (شکل۲). وزن مولکولی دنباله‌های پروتئینی در پلاسمید pET41a (با نام کلی GST) و نواحی بیان شونده در پلاسمید pET41a-OsMTI-3a (با نام اختصاری GST-OsMTI-3a) به ترتیب ۳۵/۵ و ۳۸/۹ کیلودالتون پیش‌بینی شد (http://web.expasy.org/protparam). وجود باندهای پروتئینی با وزن مولکولی موردنظر بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲درصد 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 GST-OSMTI-3a می‌باشند، دارای OD_{600} نهایی بالاتری نسبت به باکتری‌های شاهد بودند؛ این در حالی است که در مورد فلز مس، OD_{600} نهایی باکتری‌های Rosetta-pET41a-OsMTI-3a با باکتری شاهد تقریبا یکسان بود (شکل ۴). به منظور اطمینان از این که مقاومت مشاهده شده در سلول‌های بیان کننده پروتئین 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 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 کشت باکتری Rosetta-pET41a-OsMTI-3a و سویه Rosetta-pET41a ثابت بود و به نظر می‌رسد بیان *OsMTI-3a* نقشی در جذب فلز نداشت (شکل ۵).

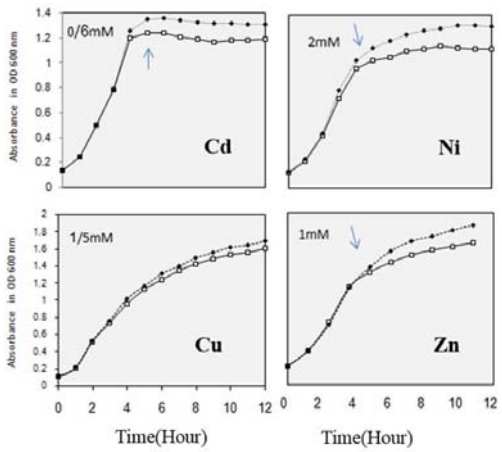
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.1.1]



شکل۲- شکل شماتیک نواحی بیان شونده بر روی پلاسمید pET41a و pET41a-OsMTI-3a.



شکل۳- بررسی ژل SDS-PAGE بیان پروتئین‌های GST (شاهد) ۳۵/۵ کیلودالتون و GST-OsMTI-3a ۳۸/۹ کیلودالتون تولید شده در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) .M مارکر پروتئینی؛ محتوای پروتئین‌های محلول استخراج شده در زمان‌های صفر،۱، ۲، و۴ ساعت پس از القای IPTG از سلول‌های باکتری حاوی پلاسمید pET41a (ستون‌های ۲-۵) و OsMTI-3a-pET41a (ستون‌های ۱۰-۷)؛ ستون‌های ۱و ۶) به ترتیب محتوای پروتئینی باکتری حاوی پلاسمید pET41a و pET41a-OsMTI-3a بدون القای IPTG.

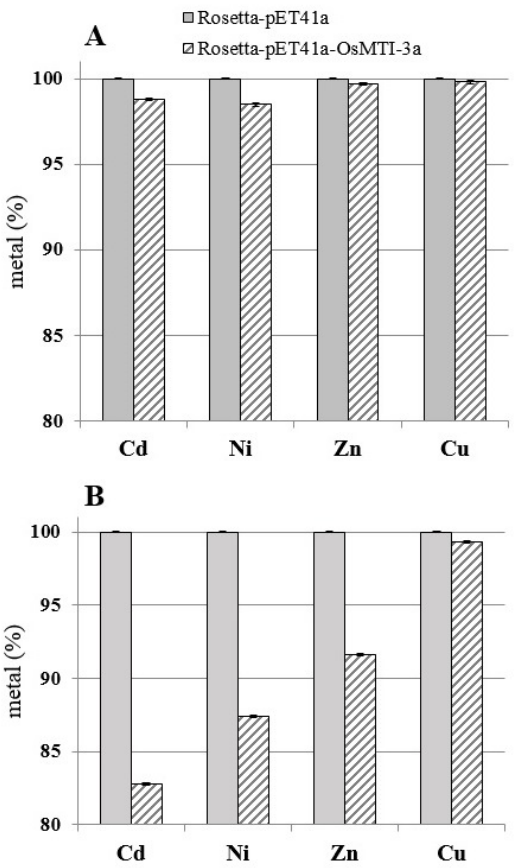


شکل۴- مقایسه تأثیر بیان پروتئین‌های نوترکیب بر نحوه رشد باکتری در حضور فلزات مختلف. (□) سویه حاوی پلاسمید pET41a؛ (♦) سویه حاوی پلاسمید pET41a-OsMTI-3a

در سال‌های اخیر با توجه به گسترش فعالیت‌های صنعتی و افزایش روز افزون آلاینده‌های فلزی به محیط زیست، شناسایی و درک مکانیسم‌های تحمل به تنش فلزات در جانداران مختلف به منظور به کارگیری و نیز بهبود آنها توجه زیادی را به خود جلب کرده‌است. در این ارتباط، یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های شناخته شده، کلاته شدن یون‌های فلزی از طریق گروه تیول آمینواسید سیستئین موجود درMTها 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 کلاته‌کردن 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 میزبان‌هایی نظیر باکتری *E. coli*، راه‌حلی مناسب به منظور سهولت در تولید، خالص‌سازی و مطالعه عملکرد آنها می‌باشد (Freisinger 2008; Huang and wang 2010; Chaturvedi et al. 2012). در این 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 تنش فلزی ایجاد شده در محیط کشت سلولی بررسی شد. نتایج بررسی منحنی رشد سویه نوترکیب Rosetta-pET41a-OsMTI-3a در حضور فلزات نشان

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.1.1]

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 بیان‌کننده پروتئین GST-OsMTI-3aبه 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.



شکل۵- درصد فلز در فاز محیط کشت در باکتری شاهد Rosetta-pET41a و باکتری Rosetta-pET41a-OsMTI-3a؛ A) زمان اضافه شدن فلز به محیط کشت (T0)؛ B) زمان ثابت شدن رشد باکتریها (T1). هر داده میانگین (± انحراف معیار) دو آزمایش مستقل می باشد.

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 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 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 موجب افزایش تحمل باکتری *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 کلاته‌کردن فلزات سنگین برخوردارند. در یک پژوهش، تولید پروتئین نوترکیب ایزوفرم OsMTI-1b از تیپ ۱ 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.1.1]

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 brachiata* 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 Purdure 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 l99: 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.

Karbasizaed V, Badami N, Emtiazi 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, Shahpiri 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 Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} 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 contentsin 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.1.1]