

بیان دگر ساخت ژن کدکننده یک ایزوفرم تیپ ۲ متالوتیونین گیاه برنج (*OsMTI-2b*) در اشرشیاکلی

Heterologous Expression of a rice metallthionein isoform type 2 (*OsMTI-2b*) in *Escherichia coli*

سهیل پیرزاده^۱، آذر شاهپیری^{*۱}

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

Pirzadeh S¹, Shahpiri A^{*1}

1- MSc Student, Associate Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۱)

چکیده

متالوتیونین‌ها (MT) پروتئین‌های با وزن مولکولی کم، غنی از سیستئین (Cys) هستند که به واسطه داشتن گروه‌های تیول آمینو اسید Cys توانایی اتصال به فلزات سنگین را دارند. در گیاهان ایزوفرم‌های مختلفی از MT وجود دارد که بر اساس آرایش سیستئین در چهار تیپ قرار می‌گیرند. در این تحقیق به منظور بررسی نقش ایزوفرم *OsMTI-2b* از گیاه برنج که متعلق به تیپ ۲ می‌باشد، توالی کدکننده این ایزوفرم، در ناقل بیانی pET41a همسانه‌سازی و به باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) منتقل 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 منحنی‌های رشد سلول‌های باکتری بیان‌کننده پروتئین‌های نو ترکیب با باکتری شاهد نشان داد سویه‌های بیان‌کننده *OsMTI-2b* در محیط حاوی فلزات Pb، Ni، Cd و Zn تحمل بیشتری نسبت به سویه شاهد دارند. همچنین اندازه‌گیری فلزات در محیط کشت نشان داد که در محیط کشت سویه R-MTI-2b فلزات Pb، Cd، Ni، Zn و Cu به ترتیب به میزان 150 ± 8 ، 130 ± 8 ، 11 ± 8 ، 14 ± 75 و 7 ± 47 میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت. در مقایسه با این سویه میزان فلز در محیط کشت سویه شاهد بدون تغییر باقی ماند.

واژه‌های کلیدی

برنج
بیان دگر ساخت
متالوتیونین

مقدمه

گیاهان مکانیزم‌های مختلفی برای مقابله با سمیت فلزات سنگین دارند. یکی از مهم‌ترین این مکانیزم‌ها، کلاته شدن فلزات توسط لیگاندهای سیتوپلاسمی با میل ترکیبی بالاست. کلاته‌کننده‌های درون سلولی و غنی از آمینواسیدهای سیستئین (Cys)، از جمله متالوتیونین‌ها (MTs) نقش مهمی را در این زمینه ایفا می‌کنند (Cobbett and Goldsbrough 2002; Hall 2002; Murphy et al. 1997). متالوتیونین‌ها پروتئین‌های درون سلولی با وزن مولکولی کم، غنی از سیستئین و پایدار در برابر دما هستند که در موجودات مختلف یوکاریوتی شامل قارچ‌ها، گیاهان، بی مهرگان و پستانداران و بعضی از پروکاریوت‌ها مانند سیانوباکتری‌ها یافت می‌شوند (Hassinen et al. 2011). MTها به واسطه داشتن گروه‌های تیول آمینو اسید Cys توانایی اتصال به فلزات سنگین را دارند (Freisinger 2011; Cobbett and Goldsbrough 2002). گیاهان ایزوفرم‌های مختلف MT وجود دارد که بر اساس نحوه توزیع آمینو اسید سیستئین در چهار تیپ مختلف قرار می‌گیرند. 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 به صورت موتیف C-X-X-C و C-X-C و C و در تیپ ۳ چهار سیستئین به صورت موتیف C-X-X-C-X-C در انتهای آمینو، تعداد و الگوی سیستئین‌ها در انتهای کربوکسیلی این تیپ‌ها یکسان بوده به طوری که شش سیستئین به صورت موتیف C-X-C-X-C-X-X-C-X-C-X-C-X-C-X-C در انتهای کربوکسیلی آن‌ها قرار دارد. برخلاف این سه تیپ، در تیپ ۴، سه دمین غنی از سیستئین وجود دارد (Cobbett and Goldsbrough 2002; Hall 2002). نقش دقیق زیستی این پروتئین‌ها هنوز مورد بحث است. یکی از نقش‌های پیشنهادی برای این پروتئین‌ها، هوموستازی و سم‌زدایی فلزات سنگین می‌باشد. MTها به دلیل قابلیت بالای اتصال فلز می‌توانند کاتیون‌های دو ظرفیتی مورد نیاز برای متالوآنزیم‌ها و فاکتورهای رونویسی را تامین نمایند (Blindauer CA. 2008). بررسی الگوی بیان ژن متالوتیونین در بافت‌های مختلف گیاهی نشان داد که ژن‌های کدکننده MT الگوی بیان متفاوتی را در بافت‌های مختلف دارند. این امر می‌تواند بیانگر این مطلب باشد

که ایزوفرم‌های گوناگون ممکن است نقش‌های مختلفی در گیاهان داشته باشند (Cobbett and Goldsbrough Yang et al. 2011; Guo et al. 2003; Freisinger 2007; 2002). به طور کلی ژن‌های تیپ ۱ معمولاً در ریشه به مقدار بیشتری بیان می‌شوند؛ در صورتی که ژن‌های تیپ ۲ در برگ‌ها بیان بیشتری دارند. ژن‌های تیپ ۳ در گیاهان تولید کننده میوه‌های گوشتی مانند موز، سیب و آناناس عمدتاً در طی رسیدگی میوه‌ها بیان می‌شوند اما در گیاهانی مانند آراییدوپسیس که میوه گوشتی تولید نمی‌کند سطح بیان در برگ‌ها بیش تر است (Guo 2005; Zhou et al. 2006). برخلاف MTهای جانوران، به دلیل تولید کم و سختی جداسازی این پروتئین از بافت‌های گیاهی، تاکنون مطالعات کمی انجام شده است و تنها تعداد معدودی از پروتئین‌های MT به طور مستقیم از بافت‌های گیاهی استخراج شده است (Nies 1999). بیان دگر ساخت این پروتئین نیز در سیستم‌های پروکاریوتی به دلیل کوچک بودن و عدم پایداری در برابر پروتئازها و همچنین حلالیت پایین به دلیل وجود میزان سیستئین بالا با مشکلات زیادی روبرو بوده است. با این حال در سال‌های اخیر بیان دگر ساخت ژن کد کننده MTهای گیاهی در سیستم‌های بیان پروکاریوتی با استفاده از الحاق MT با پپتیدها یا پروتئین‌های پایداری مانند گلو تاتیون S- ترانسفراز (GST) امکان پذیر شده است (Mohammadi Nezhad et al. 2013). در تحقیق حاضر به منظور بررسی امکان اتصال فلزات مختلف به ایزوفرم *OsMTI-2b* که یکی از ایزوفرم‌های MT برنج متعلق به تیپ ۲ می‌باشد، توالی کدکننده ایزوفرم *OsMTI-2b* به باکتری *E. coli* انتقال داده شد و بیان این پروتئین به صورت شریک الحاقی با پروتئین GST مورد تایید قرار گرفت. سپس تاثیر بیان دگر ساخت این پروتئین بر میزان مقاومت سلول‌های باکتری به فلزات سنگین ارزیابی شد و همچنین میزان فلز حذف شده از محیط توسط سویه تراریخت در مقایسه با سویه شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

توالی کامل cDNA کدکننده ایزوفرم *OsMTI-2b* (با شماره دسترسی AB00282 در پایگاه اطلاعاتی NCBI) که در وکتور

PME18SFL3 قرار گرفته بود از کتابخانه cDNA برنج مرکز NIAS ژاپن (<http://www.dna.affrc.go.jp>) تهیه شد. جهت تکثیر توالی ژن کدکننده، آغازگر اختصاصی رفت با توالی 5'-ATATGAATTCATGTCGTGCTGCGGTGGC-3' (زیرمحل جایگاه برشی *EcoRI* خط کشیده شده‌است) و آغازگر اختصاصی برگشت با توالی نوکلئوتیدی 5'ATATAAGCTTCTAGTTGCAGTTGCAGCAGGAGC-3' (زیرمحل جایگاه برشی *HindIII* خط کشیده شده‌است) بر اساس ابتدا و انتهای ژن مورد نظر طراحی شد. لازم به ذکر است دو جایگاه برشی *EcoRI* و *HindIII* در داخل ژن وجود نداشت. به همین دلیل از این دو جایگاه آنزیمی برای همسانه‌سازی ژن مورد نظر استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱/۷۵ واحد آنزیم *Pfu* پلیمرز (فرمنتاز)، ۵۰ نانوگرم PME18SFL3-OsMTI-2b به‌عنوان الگو، پنج پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X) PCR 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 ۶۲°C 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 پنج دقیقه و در پایان مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و خالص‌سازی آن به‌وسیله Silica Bead DNA Gel Extraction Kit فرمنتاز (K0513) انجام شد. در گام بعد، محصول PCR خالص‌سازی شده از ژل با آنزیم‌های *HindIII* (فرمنتاز) و *EcoRI* (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 جفت‌باز به‌عنوان وکتور بیانی با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* 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-2b با استفاده از آنزیم T4 لیگاز (فرمنتاز)

صورت گرفت. بعد از آن، محصول واکنش لیگاسیون با روش الکتروپوریشن به باکتری‌های مستعد DH5 α انتقال داده شد. جهت انتخاب باکتری‌های تراریخت، واکنش Colony PCR از کلنی‌های رشدیافته بر روی محیط کشت انتخابی LB (Luria Bertani) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر) انجام شد. جهت بررسی صحت همسانه‌سازی قطعه ژن کدکننده OsMTI-2b در وکتور، پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های تأیید شده، با دو آنزیم *HindIII* و *EcoRI* برش داده شدند و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. در نهایت، جهت تأیید صحت توالی نوکلئوتیدی استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب pET41a-OsMTI-3a توسط کیت استخراج پلاسمید (فرمنتاز، Bioneer K0502) انجام گرفت و جهت توالی‌یابی به شرکت ارسال شد. نتیجه توالی‌یابی با توالی اصلی این ژن هم‌ردیف سازی شد.

پلاسمید نو ترکیب pET41a-OsMTI-2b با روش الکتروپوریشن، به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) ترانسفورم شد. سویه حاصل R-MTI-2b نام‌گذاری شد. علاوه بر این سویه، سویه شاهد با انتقال پلاسمید pET41a فاقد ژن به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) تولید شد. به‌دلیل حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین بر روی پلاسمید pET41a و نیز مقاومت باکتری Rosetta (DE) به آنتی-بیوتیک کلرامفنیکل، سویه‌های R-MTI-2b و شاهد در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (۵ میلی گرم بر لیتر) در انکوباتور با ۱۸۰ دور در دقیقه با دمای ۳۷°C کشت داده شدند. هنگامی که OD600 به ۰/۷ رسید IPTG به‌عنوان ماده القاگر به غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار به محیط‌های کشت اضافه شد. در فواصل زمانی مختلف نمونه برداری از سوسپانسیون باکتریایی در ویال‌های اپندورف ۱/۵ میلی-لیتری صورت گرفت (Mohammadi Nezhad et al. 2013). سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰×g و در دمای ۴°C سانتریفوژ (Eppendorf5418) شدند. بعد از آن محلول رویی ویال‌ها دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۲۰۰ میکرولیتر تریس اسیدکلریدریک ۱۰ میلی‌مولار (pH=8) سوسپانسیون شد. به-منظور استخراج پروتئین‌های محلول، دیواره سلول‌های باکتری با

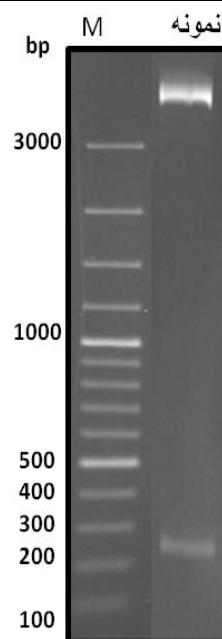
استفاده از دستگاه اولتراسونیک (Hielscher, UP50H) تخریب شد. به منظور حذف بقایای سلولی سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در $12000 \times g$ و در دمای 4°C صورت پذیرفت و پروتئین موجود در فاز محلول جهت بررسی بیان بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگذاری شد. به منظور تایید بیان هترولوگ پروتئین از وسترن بلات استفاده شد (Shahpiri et al. 2014). با توجه به وجود شریک الحاقی GST در ناحیه N- ترمینال پروتئین از آنتی- بادی اولیه ضد GST (Rabbit Anti-GST-tag pAb) استفاده شد. خالص سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی جذبی انجام شد. بدین منظور پروتئین محلول استخراج شده از ستون های His-Trap HP (ساخت شرکت GE Healthcare) که از قبل با استفاده از بافر A بارگذاری (ایمیدازول ۱۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی- مولار و ۳۰ میلی مولار تریس- اسید کلریدریک، $\text{pH}=8$) به تعادل رسیده بودند، عبور داده شدند. جهت شستشوی پروتئین های باند شده غیر اختصاصی میزان ۱۰ میلی لیتر از مخلوط بافر B فیلتر شده سرد (ایمیدازول ۴۰۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی مولار و ۳۰ میلی مولار تریس- اسید کلریدریک، $\text{pH}=8$) و بافر A فیلتر شده سرد با نسبت ۱۰ درصد بافر B و ۹۰ درصد بافر A بر روی ستون بارگذاری شد و اجازه داده شد تا از ستون خارج شود. سپس جهت جداسازی پروتئین هدف ۱۰ میلی لیتر بافر حاوی ۴۰ درصد بافر B و ۶۰ درصد بافر A بر روی ستون بارگذاری شد و هر میلی لیتر خروجی ستون در لوله های اپندورف ۱/۵ میلی لیتری بر روی یخ در دمای 4°C نگهداری شدند. کیفیت خلوص پروتئین خارج شده در ویال ها با استفاده از SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت بررسی تاثیر بیان پروتئین OsMTI-2b بر میزان تحمل باکتری به فلزات روی، نیکل، مس، کادمیوم و سرب سویه R-MTI-2b به همراه سویه شاهد در ۸۰ میلی لیتر محیط کشت LB به همراه آنتی بیوتیک های کانامایسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (پنج میلی گرم بر لیتر) کشت شدند (Mohammadi et al. 2013). 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 ۲۰ دقیقه هر یک از نمک- های NiCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CdCl_2 , H_2O

$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ به محیط کشت اضافه شد به طوری که غلظت های نهایی هر یک از فلزهای Cu , Zn , Cd , Ni و Pb به ۰/۹، ۱، ۲، ۵/۲ و ۱ میلی مولار رسید. این غلظت ها غلظت هایی از فلز هستند که طی مطالعات قبلی برای باکتری می توانند سمیت ایجاد کنند (Mohammadi Nezhad 2012). رسم منحنی رشد باکتری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf, Rs323C) با اندازه گیری OD_{600} صورت گرفت. در دو زمان اضافه شدن فلز به محیط کشت (T_0) و شش ساعت پس از آن (T_1) جهت بررسی توانایی باکتری در حذف فلز از محیط کشت، نمونه هایی از محیط کشت در فاکون به حجم ۱۰ میلی لیتر ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه و $5000 \times g$ سانتریفیوژ شد. فاز بالایی (محیط کشت) فاکون ها به دقت برداشته و در لوله های جداگانه ای نگهداری شد. جهت تعیین مقدار فلز، هر نمونه به وسیله دستگاه طیف سنج جذب اتمی (PerkinElmer Analyst 700) ارزیابی شد.

نتایج

پس از قرارگیری و همسانه سازی ژن کدکننده OsMTI-2b در پلاسمید pET41a و ترانسفورم آن به باکتری DH5 α ، واکنش Colony PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ژنی ۲۴۳ جفت بازی در کلنی های رشد یافته تایید شد. سپس کلنی های واجد ژن، مورد واکنش هضم دو طرفه آنزیمی به وسیله *EcoRI* و *HindIII* قرار گرفتند. جدا شدن قطعه به طول ۲۴۳ جفت باز از پلاسمید نو ترکیب pET41a-OsMTI-2b موفقیت همسانه سازی ژن کدکننده OsMTI-2b در وکتور pET41a را تایید کرد (شکل ۱). همچنین از طریق توالی یابی، صحت توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنی با استفاده از آغازگرهای T7 Promoter/Terminator تایید شد. پلاسمیدهای OsMTI-2b- pET41a و pET41a به میزبان بیانی *E. coli* سویه (DE3) Rosetta، جهت تولید پروتئین نو ترکیب انتقال داده شدند. توالی کدکننده این ایزوفرم در ناقل بیانی pET41a در الحاق با توالی کدکننده سه دنباله ی پروتئینی شامل His-Tag، S-Tag و GST-Tag می باشد (شکل ۲).

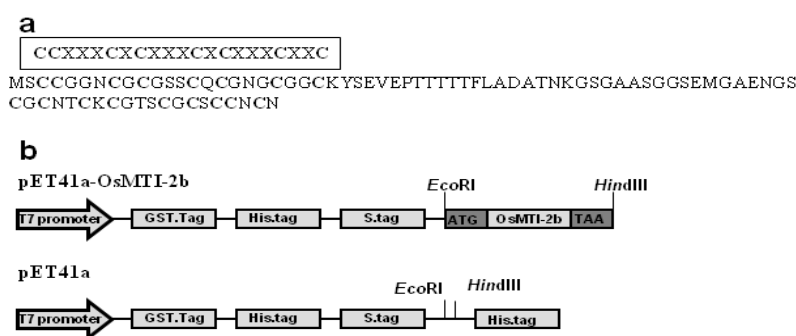


شکل ۱- الکتروفورز واکنش هضم دو طرفه آنزیمی با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* و جداسازی قطعه *OsMTI-2b* به طول ۲۴۳ جفت باز؛ ستون ۱: DNA Ladder و ستون ۲: محصول هضم آنزیمی

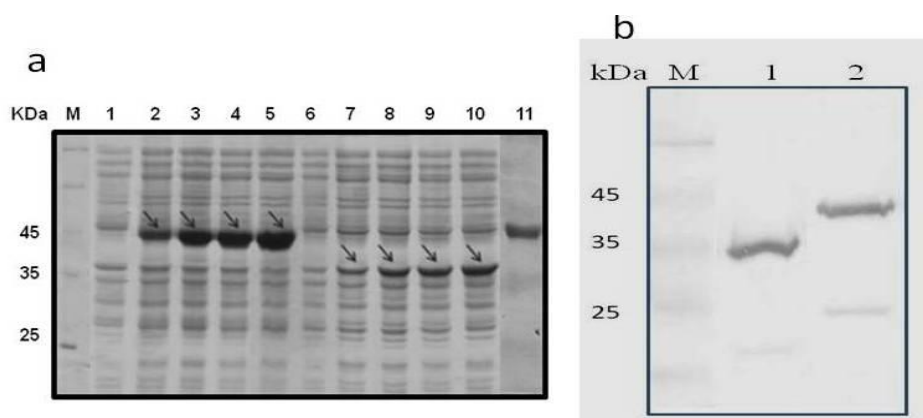
با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی خالص‌سازی پروتئین انجام شد. سپس به منظور ارزیابی کیفیت خالص‌سازی، پروتئین پس از خالص‌سازی بر روی SDS-PAGE بارگذاری شد (شکل ۳a- ستون ۱۱). مشاهده تک باند با وزن مولکولی مورد انتظار علاوه بر تایید بیان پروتئین *GST-OsMTI-2b* نشان دهنده کیفیت خالص‌سازی مناسب این پروتئین بود.

منحنی رشد سلول‌های باکتری *R-MTI-2b* در مقایسه با سلول‌های باکتری شاهد *Rosetta-pET41a* در حضور فلزات مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد در محیط‌های کشت حاوی فلزات *Cd*، *Zn*، *Ni* و *Pb* سلول‌های *R-MTI-2b* که بیان کننده پروتئین *GST-OsMTI-2b* می‌باشند، دارای OD_{600} نهایی بالاتری نسبت به باکتری‌های شاهد بودند این در حالی است که در مورد فلز مس، OD_{600} نهایی باکتری‌های *R-MTI-2b* با باکتری شاهد تقریباً یکسان بود (شکل ۴). به منظور اطمینان از این که مقاومت مشاهده شده در سلول‌های بیان کننده پروتئین *GST-OsMTI-2b* 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 (T_0) و زمان ثابت شدن رشد سلولی باکتری (شش ساعت پس از افزودن فلز به محیط کشت؛ T_1) سنجیده شد. نتایج نشان داد در محیط کشت سویه *R-MTI-2b* میزان فلزات *Pb*، *Cd*، *Ni*، *Zn* و *Cu* به ترتیب به میزان ۱۵/۸۵، ۱۳/۰۷، ۱۱/۸، ۱۴/۵۱ و ۷/۴۷ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت. این در حالی بود که در محیط کشت سویه شاهد میزان فلز بدون تغییر باقی ماند (شکل ۵). بنابراین به نظر می‌رسد بیان پروتئین دگر ساخت *GST-OsMTI-2b* در سویه *R-MTI-2b* باعث افزایش تحمل این سویه نسبت به سویه شاهد شده و همچنین میزان فلز انباشته شده در این سویه را افزایش داده است.

وزن مولکولی دنباله‌های پروتئینی در پلاسمید *pET41a* (با نام کلی *GST*) و نواحی بیان شونده در پلاسمید *pET41a-OsMTI-2b* (با نام اختصاری *GST-OsMTI-2b*) به ترتیب ۳۵/۵ و ۴۳/۹ کیلودالتون پیش‌بینی شد (<http://web.expasy.org/protparam>). وجود باندهای پروتئینی با وزن مولکولی مورد نظر بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد تولید موفق پروتئین‌های *GST* و *GST-OsMTI-2b* را در فاز محلول تایید کرد (شکل ۳a). همچنین با توجه به وجود *GST-tag* در ناحیه N-terminal امکان تایید بیان پروتئین با تکنیک وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد *GST* فراهم شد. در این آزمایش نیز وجود باند با وزن مولکولی ۳۵/۵ کیلودالتون در سویه شاهد و باند با وزن ۴۳/۹ کیلودالتون در سویه اصلی به ترتیب تایید کننده بیان *GST* و *GST-OsMTI-2b* بود (شکل ۳b).



شکل ۲-ا: توالی آمینو اسیدی پروتئین OsMTI-2b. ب: نواحی بیان شونده بر روی پلاسمید pET41a و pET41a-OsMTI-2b



شکل ۳-ا: بررسی ژل SDS-PAGE بیان پروتئین‌های GST (شاهد) ۳۵/۵ کیلودالتون و GST-OsMTI-2b ۴۳/۹ کیلودالتون تولید شده در باکتری *E. coli* سویه *M. Rosetta (DE3)*. مارکر پروتئینی؛ محتوای پروتئین‌های محلول استخراج شده در زمان‌های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از القای IPTG از سلول‌های باکتری حاوی پلاسمید pET41a-OsMTI-2b (ستون‌های ۲-۵) و پلاسمید pET41a (ستون‌های ۷-۱۰)؛ به ترتیب محتوای پروتئینی باکتری حاوی پلاسمید pET41a و pET41a-OsMTI-2b بدون القای IPTG. پروتئین خالص شده GST-OsMTI-2b با ستون His-Trap HP. استفاده از تکنیک وسترن بلات برای تایید GST در سویه شاهد (ستون ۱) و GST-OsMTI-2b در سویه حاوی پلاسمید pET41a-OsMTI-2b.

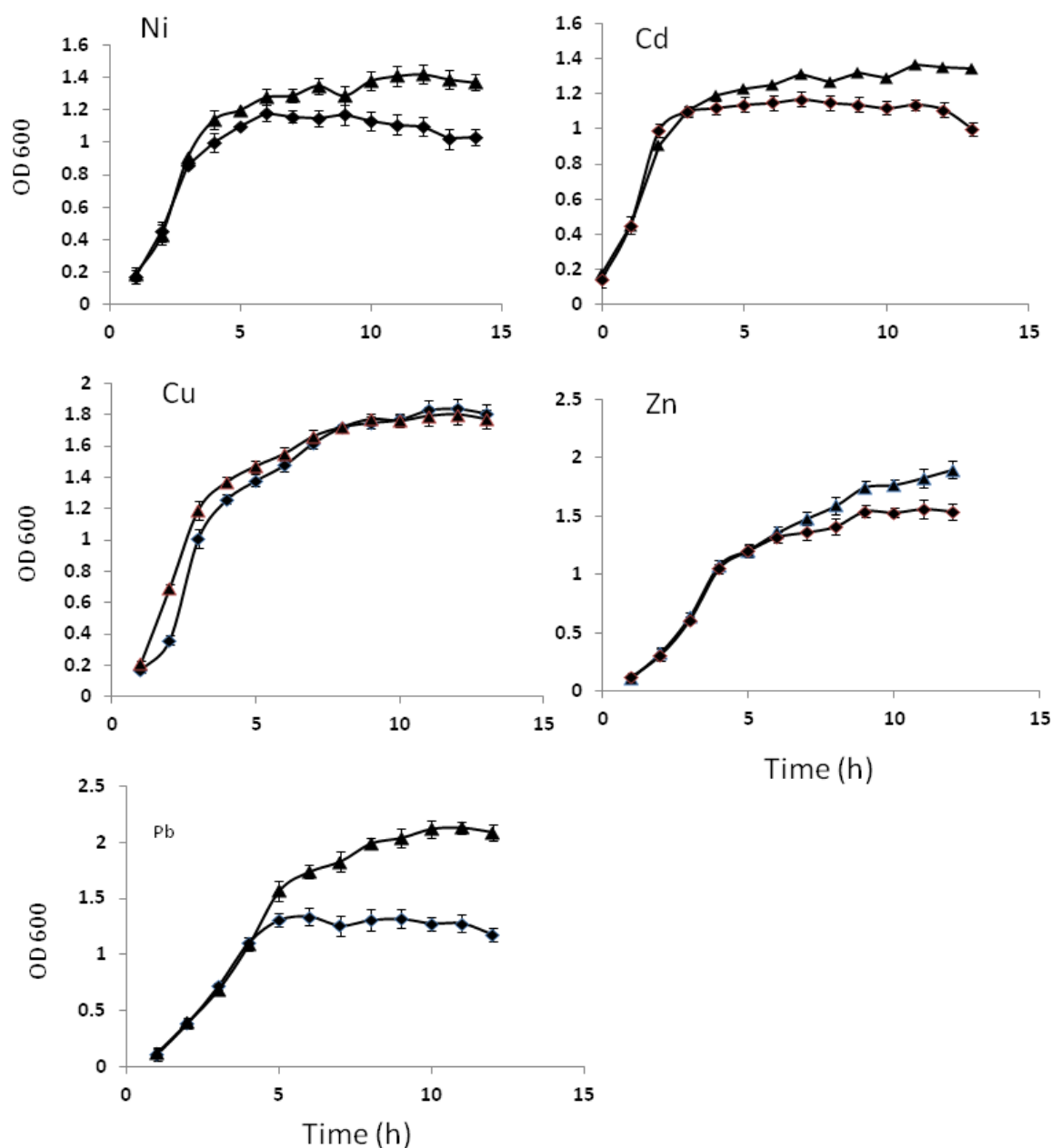
بحث

OsMTI-2a در این اندام مشاهده نشد (Zhou et al. 2006). بنابراین این نتایج نشان دهنده این موضوع می‌باشد که ایزوفرم‌های مختلف MT ممکن است دارای نقش‌های اختصاصی در بافت‌های مختلف باشند. در مطالعه دیگری یک عنصر تنظیم‌کننده پاسخ به فلز (MRE) در بالادست ژن کدکننده این ایزوفرم و هم-چنین دیگر ژن‌های کدکننده MT در گیاه برنج مانند، *OsMT-I-1a*، *OsMT-I-1b*، *OsMT-I-4a*، *OsMT-I-4b*، *OsMT-I-4c* (Zhou et al. 2006). در انطباق با این مسئله مشاهده شد که بیان این ژن‌ها در گیاه برنج با فلزات تنظیم می‌شود (Shumei et al. 2012; Gautam et al. 2006). علاوه بر وجود MRE عناصر

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. ایزوفرم *OsMTI-2b* با داشتن ۸ سیستئین در انتهای آمینو متعلق به تیپ ۲ MT می‌باشد (Zhou et al. 2006). تجزیه بیان ژن کدکننده این ایزوفرم نشان می‌دهد که بیان این ژن در ساقه برنج چندین برابر میزان بیان این ژن در برگ‌های این گیاه می‌باشد (Umeda et al. 1998). هم‌چنین بیان این ژن در گلوم برنج بعد از گرده افشانی تایید شد. این در حالی است که بیان دو ژن دیگر MT متعلق به تیپ ۲ یعنی *OsMTI-2c* و

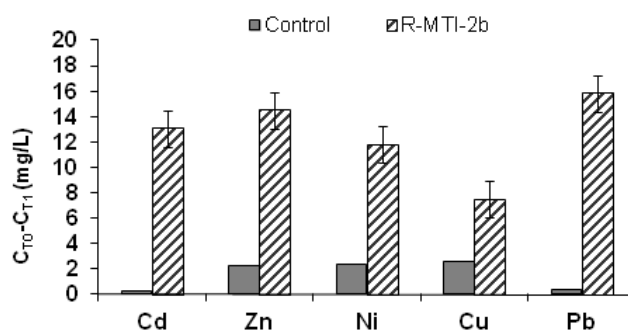
(2006). بنابراین به نظر می‌رسد علاوه بر فلزات، عوامل محیطی دیگری بتوانند بیان ژن کدکننده *OsMTI-2b* را تحت تاثیر قرار دهند.

تنظیم‌کننده دیگری مانند عنصر پاسخ به آنتی‌اکسیدان، عنصر پاسخ به اکسین، عنصر پاسخ به آپسیزیک اسید، عنصر پاسخ به دما در بالادست ژن کدکننده *OsMTI-2b* مشاهده شده‌است (Zhou et al.).



شکل ۴- مقایسه تاثیر بیان پروتئین‌های نو ترکیب بر نحوه رشد باکتری در حضور فلزات مختلف. (◊) سویه حاوی پلاسمید pET41a؛ (Δ) سویه حاوی پلاسمید pET41a-OsMTI-2b. هر داده میانگین (± انحراف معیار) دو آزمایش مستقل می‌باشد.

بررسی شد. نتایج بررسی منحنی رشد سویه نو ترکیب R-MTI-2b در حضور فلزات نشان داد که بیان ژن، *OsMTI-2b* در افزایش تحمل سلول‌های باکتری به فلزات کادمیوم، نیکل، روی و سرب تاثیرگذار است، اما در افزایش تحمل به فلز مس نقشی ندارد. با کشت باکتری نو ترکیب و شاهد در محیط حاوی فلزات و سپس اندازه‌گیری مقدار فلز در محیط کشت مشخص شد سویه بیان کننده پروتئین GST-OsMTI-2b قادر به تجمع مقدار قابل توجهی از فلزات کادمیوم، نیکل، روی و سرب نسبت به سویه شاهد می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد پروتئین *OsMTI-2b* با کلاته کردن فلز باعث کاهش سمیت فلز برای باکتری می‌شود و بنابراین سویه حاصل تحمل بیشتری به این فلزات نشان می‌دهد. در تطابق با این نتایج مطالعات قبلی نیز بر روی دیگر MT‌های گیاه برنج نشان داد که تولید دگر ساخت *OSMTI-1b* متعلق به تیپ ۱ و *OsMTI-3a* متعلق به تیپ ۳ باعث افزایش تحمل باکتری به فلزات نیکل، کادمیوم و روی در مقایسه سویه شاهد (سویه حاوی پلاسمید بدون ژن) می‌شود (Mohammadi Nezhad et al. 2013; Shahpiri et al. 2015). بیان دگر ساخت ایزوفرم *OsMTII-1a* که متعلق به تیپ ۴ می‌باشد قابلیت اتصال به فلز نشان نداد. بیان دگر ساخت 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.



شکل ۵- میزان فلز حذف شده از محیط کشت باکتری شاهد و باکتری R-MTI-2b. هر داده میانگین ($\pm$ انحراف معیار) دو آزمایش مستقل می‌باشد.

علی‌رغم شناسایی و مطالعه ایزوفرم‌های مختلفی از MT در گیاهان اطلاعات نادری از نقش ایزوفرم‌های مختلف MT در کلاته کردن فلزات مختلف وجود دارد. به سبب اکسیداسیون آمینواسیدهای سیستمین در مجاورت با اکسیژن و نیز تجزیه شدن سریع پروتئین، مطالعه مستقیم و استخراج MT گیاهی بسیار دشوار می‌باشد؛ لذا بیان ایزوفرم‌های گوناگون MT به همراه دنباله‌های پروتئینی در میزبان‌هایی نظیر باکتری *E. coli* راه حلی مناسب به منظور سهولت در تولید، خالص سازی و مطالعه عملکرد آن‌ها می‌باشد. در این پژوهش فرم نو ترکیب پروتئین *OsMTI-2b* برنج در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3)، در الحاق با دنباله GST تولید شد؛ سپس تاثیر این بیان هترولوگ در ایجاد مقاومت باکتری تراریخته در برابر تنش فلزی ایجاد شده

منابع

- Blindauer CA (2008) Metallothioneins with unusual residues: histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102: 507-521.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182.
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 730-750.
- Freisinger E (2007) Spectroscopic characterization of a fruit specific metallothionein *M. acuminata* MT3. *Inorganica Chimica Acta* 360: 369-380.
- Freisinger E (2011) Structural features specific to plant metallothioneins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16: 1035-1045.
- Gautam N, Verma PK, Verma S, Tripathi RD, Trivedi PK, Adhikari B, Chakrabarty D (2012) Genome-wide identification of rice class I metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to heavy metal stress. *Journal of Functional and Integrative Genomics* 12:635-47.
- 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. *Journal of New Phytologist* 59: 369-381.

- Guo WJ (2005) Functional characterization of metallothionein gene family in Arabidopsis. Dissertation, Purdue university, USA.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.
- Hassinen VH, Tervahauta AI, Schat, Karenlampi SO (2011) Plant metallothioneins metal chelators with ROS scavenging activity. *Journal of Plant Biology* 13: 225-232.
- Murphy A, Zhou J, Goldbrough P, Taiz L (1997) Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology* 113:1293-1301.
- 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. *Journal of Molecular Biology Reports* 38: 1567-1574.
- Zhou GK, Xu YF, Li J, Yang LY (2006) Molecular analyses of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 387: 87-93.
- Mohammadi Nezhad, R, A Shahpiri and A Mirlohi (2013) Heterologous Expression and Metal-Binding Characterization of a Type 1 Metallothionein Isoform (OsMTI-1b) from Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Protein* 32: 131-137.
- Mohammadi Nezhad R (2012) The Effect of Heterologous Expression of Rice (*Oryza sativa*) Class I and Class II Metallothionein Isoforms on Metal Tolerance of *Escherichia coli*, Dissertation, Isfahan University of Technology IRAN. (In Farsi).
- Shahpiri A, Soleimanifard I, Asadollahi MA (2015) Functional characterization of a type 3 metallothionein isoform (OsMTI-3a) from rice. *Journal of Biological Macromolecules* 73:154-159
- Shahpiri A, N Talaei, C Finnie (2014) Spatio-temporal appearance of α -amylase and limit dextrinase in barley aleurone layer in response to gibberellic acid, abscisic acid and salicylic acid. *Journal of Science of Food and Agriculture* 95: 141-147
- Shumei J, Y Cheng, Q Guan, D Liu, T Takano and S Liu (2006) A metallothionein like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. *Journal of Biotechnology Letters* 28: 1749-1753.
- Umeda M, YL L JY, Z NM and H. Uchimiya (1998). A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. *Journal of Gene* 206: 29-35.
- Zhou GK, YF Xu, J Li and LY Yang (2006) Molecular analyses of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39: 595-606.