ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶
صفحه ۲۱۵ - ۲۰۷

# بیان دگر ساخت ژن کدکننده یک ایزوفرم تیپ۲ 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- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

**Pirzadeh S[1], 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 به‌واسطه 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 به‌منظور بررسی نقش ایزوفرم *OsMTI-2b* از گیاه برنج که متعلق به تیپ ۲ می‌باشد، توالی‌کد کننده‌ی این ایزوفرم، در ناقل بیانی pET41a همسانه‌سازی و به باکتری *E.coli* سویه‌ی 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 بیان‌کننده‌ی پروتئین‌های نوترکیب با باکتری شاهد نشان داد سویه‌های بیان‌کننده OsMTI-2b در محیط حاوی فلزات Pb، Cd، Ni 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 به‌ترتیب به میزان ۰/۷±۱۵//۸۵، ۰/۸±۱۳/۰۷، ۰/۸± ۱۱/۸، ۰/۷۵±۵۱/ ۱٤ و ۰/٦±۷/٤۷ میلی‌گرم بر لیترکاهش یافت. در مقایسه با این سویه میزان فلز در محیط کشت سویه شاهد بدون تغییر باقی ماند.**

**واژه‌های کلیدی**

برنج
بیان دگرساخت
متالوتیونین

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.6.8 ]

## 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 درون‌سلولی 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 مهره‌گان و پستاندارن 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). در گیاهان ایزوفرم‌های مختلف MT وجود دارد که بر اساس نحوه توزیع آمینو اسید سیستئین در چهار تیپ مختلف قرار می‌گیرند. به‌جز در مواردی استثنا در تیپ ۱، شش آمینواسید سیستئین به‌صورت موتیف C-X-C (x: هر آمینو اسیدی به جز سیستئین)، در تیپ ۲ هشت سیستئین به‌صورت موتیف C-X-X-C و-C X-C C و در تیپ ۳ چهار سیستئین به‌صورت موتیف -C X-X-C-X-C-X-C در انتهای آمینو پروتئین دیده شده‌است. برخلاف انتهای آمینو، تعداد و الگوی سیستئین‌ها در انتهای کربوکسیلی این تیپ‌ها یکسان بوده به طوری که شش سیستئین به‌صورت موتیف -C X-C-X-X-X-C-X-C-X-C-X-X-X-C-X-C در انتهای کربوکسیلی آن‌ها قرار دارد. بر خلاف این سه تیپ ، در تیپ ٤، 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 به‌دلیل 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; 2002; Guo et al. 2003; Freisinger 2007). به‌طور کلی ژن‌های تیپ ۱ معمولا در ریشه به مقدار بیش‌تری بیان می‌شوند؛ در صورتی که ژن‌های تیپ ۲ در برگ‌ها بیان بیش‌تری دارند. ژن های تیپ ۳ در گیاهان تولید کننده میوه‌های گوشتی مانند موز، سیب و آناناس عمدتا در طی رسیدگی میوه‌ها بیان می‌شوند اما در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس که میوه گوشتی تولید نمی‌کنند سطح بیان در برگ‌ها بیش‌تر است (Guo 2005; Zhou et al. 2006). برخلاف MTهای جانوران، به‌دلیل تولید کم و سختی جداسازی این پروتئین از بافت‌های گیاهی، تاکنون مطالعات کمی انجام شده‌است و تنها تعداد معدودی از پروتئین‌های MT به‌طور مستقیم از بافت‌های گیاهی استخراج شده‌است (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 گلوتاتیون –S– ترانسفراز (GST) امکان‌پذیر شده‌است (Mohammadi Nezhad et al. 2013). در تحقیق حاضر به‌منظور 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 به‌صورت 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



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.6.8 ]

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 *Eco*RI خط کشیده شده‌است) و آغازگر اختصاصی برگشت با توالی نوکلئوتیدی 5′ATATAAGCTTCTAGTTGCAGTTGCAGCAGGAGC-3′ (زیرمحل جایگاه برشی *Hin*dIII خط کشیده شده‌است) بر اساس ابتدا و انتهای ژن مورد نظر طراحی شد. لازم به ذکر است دو جایگاه برشی *Eco*RI و *Hin*dIII 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* پلیمراز (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 ۱/۲درصد 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 *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 جفت‌باز به‌عنوان 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-2b 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 رشدیافته بر روی محیط کشت انتخابی LB (Luria Bertani) حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰میلی گرم بر لیتر) انجام شد. جهت بررسی صحت همسانه‌سازی قطعه ژن کدکننده *OsMTI-2b* در وکتور، پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های تائید شده، با دو آنزیم *Hin*dIII و *Eco*RI برش داده شدند و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. در نهایت، جهت تائید 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. نتیجه توالی‌یابی با توالی اصلی این ژن هم‌ردیف سازی شد.

پلاسمید نوترکیب 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 کشتLB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (۵ میلی‌گرم 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 g ×۱۲۰۰۰ 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



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.6.8 ]

استفاده از دستگاه اولتراسونیک (Hielscher,UP50H) تخریب شد. به‌منظور حذف بقایای سلولی سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در g ×۱۲۰۰۰ و در دمای ٤°C صورت پذیرفت و پروتئین موجود در فاز محلول جهت بررسی بیان بر روی ژلSDS-PAGE ۱۲درصد بارگذاری شد. به‌منظور 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. خالص‌سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی جذبی انجام شد. بدین‌منظور پروتئین محلول استخراج شده از ستون‌های His-Trap HP (ساخت شرکت GE Healthcare) که از قبل با استفاده از بافر A بارگذاری (ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی-مولار و ۳۰ میلی‌مولار تریس- اسید کلریدریک، ۸ =pH) به تعادل رسیده بودند، عبور داده شدند. جهت شستشوی پروتئین‌های باند شده غیر اختصاصی میزان ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط بافر B فیلتر شده سرد (ایمیدازول ٤۰۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی‌مولار و ۳۰ میلی‌مولار تریس- اسید کلریدریک، ۸ =pH) 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 میلی‌لیتر بافر حاوی ٤۰ درصد بافر B و ٦۰ درصد بافر A بر روی ستون بارگذاری شد و هر میلی‌لیتر خروجی ستون در لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری بر روی یخ در دمای ٤°C نگهداری شدند. کیفیت خلوص پروتئین خارج شده در ویال‌ها با استفاده از SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.

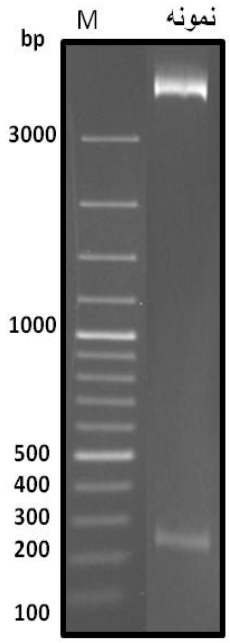
جهت بررسی تاثیر بیان پروتئین OsMTI-2b بر میزان تحمل باکتری به فلزات روی، نیکل، مس ، کادمیوم و سرب سویه R-MTI-2b به همراه سویه شاهد در ۸۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB به همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (پنج میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند ( Mohammadi Nezhad et al. 2013). به هنگام 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 $CdCl_2.H_2O$، $Zn\ SO_4.7\ H_2O$، $CuSO_4.5H_2O$، $NiCl_2$ و $Pb(CH3COO)_2.3H_2O$ به محیط کشت اضافه شد به طوری‌که غلظت‌های نهایی هر یک از فلزهای Cd، Zn، Cu، Ni و Pb به ۰/۹، ۱، ۲، ۲/۵ و ۱ میلی‌مولار رسید. این غلظت‌ها غلظت‌هایی از فلز هستند که طی مطالعات قبلی برای باکتری می‌توانند سمیت ایجاد کنند (Mohammadi Nezhad 2012). رسم منحنی رشد باکتری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf, Rs323C) با اندازه‌گیری $OD_{600}$ 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، نمونه‌هایی از محیط کشت در فالکون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه و g × ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز بالایی (محیط کشت) فالکون‌ها به دقت برداشته و در لوله‌های جداگانه‌ای نگهداری شد. جهت تعیین مقدار فلز، هر نمونه به‌وسیله دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی (PerkinElmer Analyst 700) ارزیابی شد.

## نتایج

پس از قرارگیری و همسانه‌سازی ژن کدکننده OsMTI-2b در پلاسمید pET41a و ترانسفورم آن به باکتری DH5α، توسط واکنش Colony PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ژنی ۲٤۳ جفت‌بازی در کلنی‌های رشدیافته تایید شد. سپس کلنی‌های واجد ژن، مورد واکنش هضم دو طرفه آنزیمی به‌وسیله *Eco*RI و *Hin*dIII قرار گرفتند. جدا شدن قطعه به طول ۲٤۳ جفت‌باز از پلاسمید نوترکیب pET41a-OsMTI-2b موفقیت همسانه‌سازی ژن کدکننده OsMTI-2b در وکتور pET41a را تایید کرد (شکل ۱). همچنین از طریق توالی‌یابی، صحت توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنی با استفاده ازآغازگرهای T7 Promoter/Terminator تایید شد. پلاسمیدهای pET41a-OsMTI-2b– و pET41a به میزبان بیانی *E. coli* سویه‌ی (DE3) Rosetta، جهت تولید پروتئین نوترکیب انتقال داده شدند. توالی کدکننده این ایزوفرم در ناقل بیانی pET41a در الحاق با توالی کدکننده سه دنباله‌ی پروتئینی شامل His-Tag، S-Tag و GST-Tag می‌باشد (شکل۲).



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.6.8 ]




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

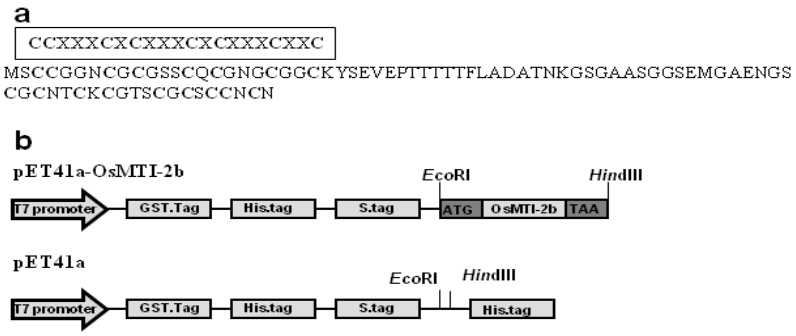
وزن مولکولی دنباله‌های پروتئینی در پلاسمید pET41a (با نام کلی GST) و نواحی بیان شونده در پلاسمید pET41a-OsMTI-2b (با نام اختصاری GST-OsMTI-2b) به‌ترتیب ۳۵/۵ و ۴۳/۹ کیلودالتون پیش‌بینی شد (http://web.expasy.org/protparam). وجود باندهای پروتئینی با وزن مولکولی مورد نظر بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد تولید موفق پروتئین‌های GST و GST-OsMTI-3a را در فاز محلول تائید 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 کیلو دالتون در سویه اصلی به‌ترتیب تایید کننده بیان GST و GST-OsMTI-2b بود (شکل ۳b).

با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی خالص‌سازی پروتئین انجام شد. سپس به‌منظور 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 خالص-سازی مناسب این پروتئین بود.

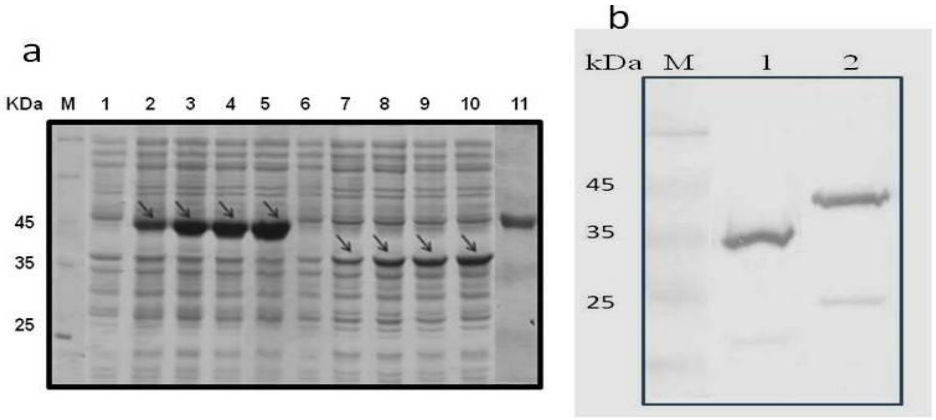
منحنی رشد سلول‌های باکتری R-MTI-2b در مقایسه با سلول‌های باکتری شاهد Rosetta-pET41a در حضور فلزات مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد در محیط‌های کشت حاوی فلزات Cd، Zn، Ni و Pb سلول‌های R-MTI-2b که بیان کننده پروتئین GST-OSMTI-2b می‌باشند، دارای $OD_{600}$ نهایی بالاتری نسبت به باکتری‌های شاهد بودند این در حالی است که در مورد فلز مس، $OD_{600}$ نهایی باکتری‌های R-MTI-2b با باکتری شاهد تقریبا یکسان بود (شکل ٤). به‌منظور 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 به‌ترتیب به میزان ۱۵/۸۵، ۱۳/۰۷، ۱۱/۸، ۱٤/۵۱و ۷/٤۷ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت. این در حالی بود که در محیط کشت سویه شاهد میزان فلز بدون تغییر باقی ماند (شکل ۵). بنابراین به‌نظر 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.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.6.8 ]




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




شکل ۳ – a: بررسی ژل SDS-PAGE بیان پروتئین‌های GST (شاهد) ۳۵/۵ کیلودالتون و GST-OsMTI-2b ٤۳/۹کیلودالتون تولید شده در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3). M: مارکر پروتئینی؛ محتوای پروتئین‌های محلول استخراج شده در زمان‌های صفر،۱، ۲، ۳و٤ ساعت پس از القای IPTG از سلول‌های باکتری حاوی پلاسمید pET41a–OsMTI-2b (ستون‌های ۲–۵) و پلاسمید pET41a (ستون‌های ۷–۱۰)؛ ستون‌های ۱و٦: به ترتیب محتوای پروتئینی باکتری حاوی پلاسمید pET41a و pET41a–OsMTI-2b بدون القای IPTG. پروتئین خالص شده GST-OsMTI-2b با ستون b.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.

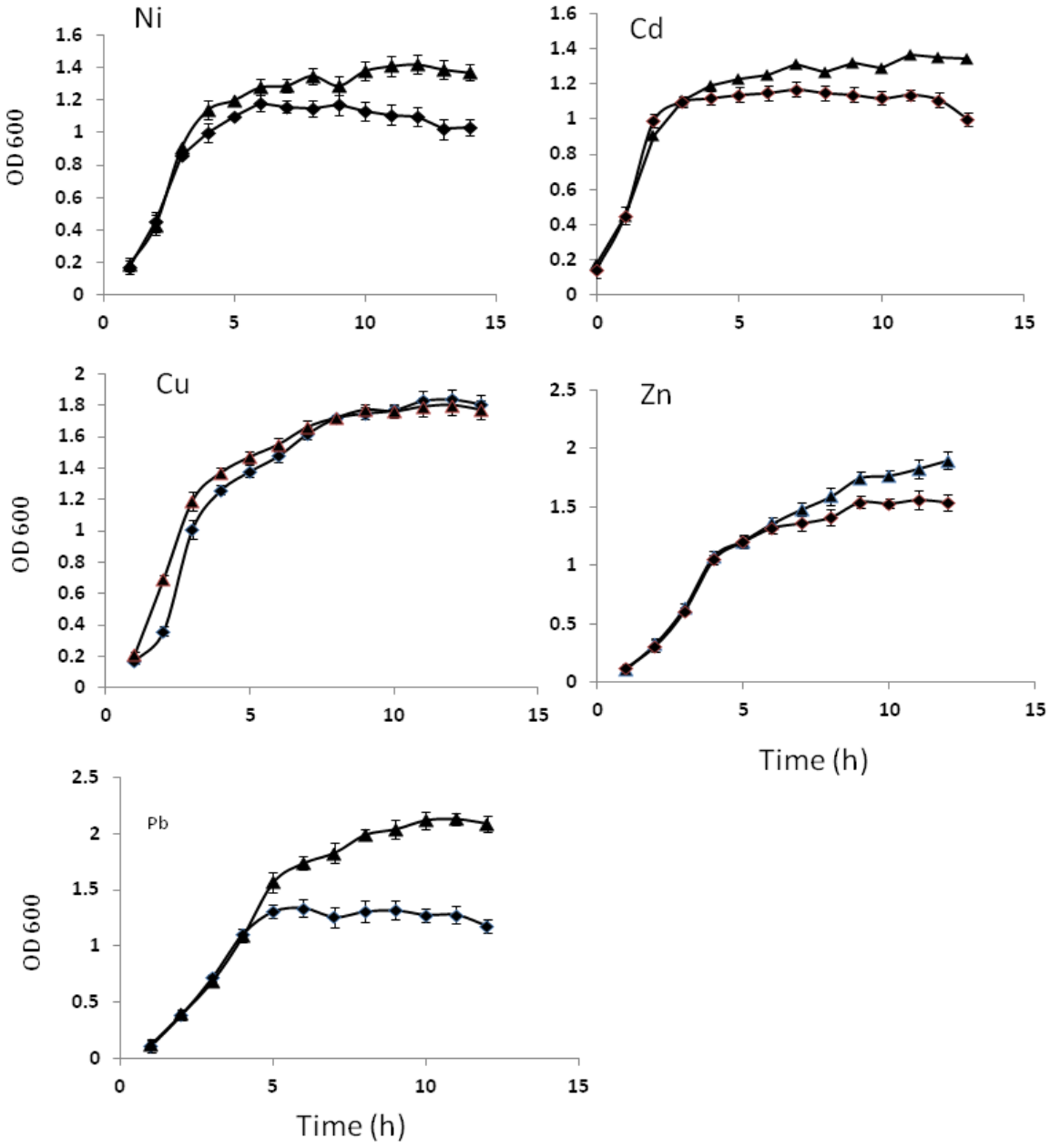
## بحث

در گیاهان ایزوفرم‌های متعددی از MT وجود دارد که در اثر عوامل گوناگون و در مراحل مختلف رشدی گیاه و در بافت‌های متفاوتی بیان می شوند. 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 *OsMTI-2a* در این اندام مشاهده نشد (Zhou et al. 2006). بنابراین این نتایج نشان دهنده این موضوع می‌باشد که ایزوفرم-های 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* تایید شد (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.2006; Gautam et al. 2012). علاوه بر وجود MRE عناصر



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.6.8 ]

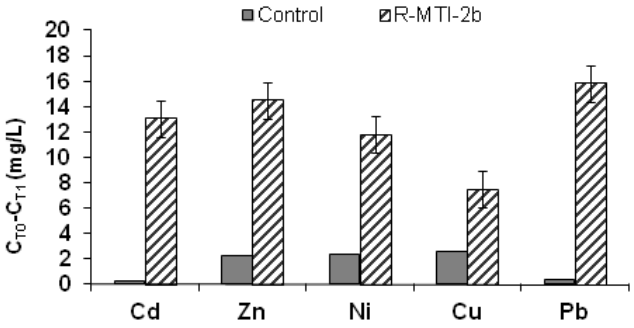
تنظیم‌کننده دیگری مانند عنصر پاسخ به آنتی‌اکسیدان، عنصر پاسخ به اکسین، عنصر پاسخ به آبسیزیک اسید، عنصر پاسخ به دما در بالادست ژن کدکننده *OsMTI-2b* مشاهده شده‌است (Zhou et al. 2006). بنابراین به‌نظر می‌رسد علاوه بر فلزات، عوامل محیطی دیگری بتوانند بیان ژن کدکننده *OsMTI-2b* را تحت تاثیر قرار دهند.




شکل٤- مقایسه تأثیر بیان پروتئین‌های نوترکیب 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.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.6.8 ]




شکل۵- میزان فلز حذف شده از محیط کشت باکتری شاهد و باکتری R-MTI-2b. هر داده میانگین (± انحراف معیار) دو آزمایش مستقل می‌باشد.

علی‌رغم شناسایی و مطالعه ایزوفرم‌های مختلفی از MT در گیاهان اطلاعات نادری از نقش ایزوفرم‌های مختلف MT در کلاته‌کردن فلزات مختلف وجود دارد. به‌سبب اکسیداسیون آمینواسیدهای سیستئین در مجاورت با اکسیژن و نیز تجزیه شدن سریع پروتئین، مطالعه مستقیم و استخراج MT گیاهی بسیار دشوار می‌باشد؛ لذا بیان ایزوفرم‌های گوناگون MT به‌همراه دنباله‌های پروتئینی در میزبان‌هایی نظیر باکتری *E. coli*، راه حلی مناسب به‌منظور سهولت در تولید، خالص سازی و مطالعه عملکرد آن‌ها می‌باشد. در این پژوهش فرم نوترکیب پروتئین OsMTI-2b برنج در باکتری *E. coli* سویه (Rosetta (DE3، در الحاق با دنباله‌GST تولید شد؛ سپس تاثیر این بیان هترولوگ در ایجاد مقاومت باکتری تاریخته در برابر تنش فلزی ایجاد شده بررسی شد. نتایج بررسی منحنی رشد سویه نوترکیب 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 نوترکیب 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 به‌نظر 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 دگرساخت 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 ٤ 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.

## 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 Chimia 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.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.6.8 ]

Guo WJ (2005) Functional characterization of metallothionein gene family in Arabidopsis. Dissertation, Purdure 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 $Cd^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Cu^{2+}$ 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 Characterizaton 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 Esherichia coli, Dissertation, Isfahan University of Technology IRAN. (In Farsi).

Shahpiri A, Soleimanifard I, Asadollahi MA (2015) Functional characterization of a type 3 metallolthionein 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.

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.6.8 ]