

طراحی و ساخت وکتور نو ترکیب merB به منظور پاکسازی زیستی جیوه آلی

Construction of *merB* recombinant vector in order to bioremediation of organic mercury

علیرضا تاری نژاد^{۱*}، حمیده باغی^۱، مریم فرشباغ بنام^۱، محمد پاژنگ^۲

Alireza Tarinejad^{1*}, Baghi Hamideh², Farshbaf Benam Maryam, and Pazhang
Mohammad³

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی ۲- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده

علوم، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

1. Department of Agricultural Biotechnology,
2. Cellular and molecular biology Dept., Basic science Faculty,
Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: atarinejad@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۹)

چکیده

متیل جیوه یکی از فرم های پایدار جیوه آلی است که می تواند وارد زنجیره غذایی موجودات زنده گردد و خطرات زیست محیطی جبران ناپذیری را برای اکوسیستم طبیعی بوجود آورد. پایداری جیوه و هزینه زیاد روشهای مرسوم پالایش عوامل نگران کننده ای هستند. در این رابطه، روش های بیولوژیکی مانند استفاده از بیوراکتورهای مبتنی بر باکتری ها یا آنزیم های آنها بعنوان یکی از روش های میکروپالایی راه حلی پایدار، کم هزینه و دوست دار محیط زیست ارائه می دهد. در این پژوهش ژن *merB* از باکتری *Serratia marcescens* مناطق آلوده به جیوه جداسازی شده و سپس جهت کلونینگ در وکتور بیانی، با آنزیم های *NdeI* / *NcoI* برش داده شد و پس از خالص سازی، به وکتور بیانی pET28a(+) الحاق صورت گرفت. وکتور نو ترکیب pET28(a⁺)-*merB* به باکتری *E. coli* سویه TOP10 منتقل و در آن تکثیر شد. سپس روی کلنی های رشد یافته در محیط گزینشی کانامایسین واکنش زنجیره ای پلیمرز روی کلنیها صورت گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمرز روی پلاسمید با آغازگرهای اختصاصی ژن انجام و پس از تایید با هضم آنزیمی پلاسمید برای تعیین توالی ارسال شد. نتایج به دست آمده صحت همسان سازی ژن *merB* را در وکتور بیانی نشان داد. این وکتور نو ترکیب به منظور بیان پروتئین مورد نظر به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) منتقل و بیان پروتئین مورد نظر با کاربرد روش SDS-PAGE تایید شد. در نهایت عملکرد پروتئین MerB در محیط حاوی جیوه بررسی و نتایج بیانگر افزایش مقاومت به جیوه در باکتری های نو ترکیب به دست آمده بود. به کمک این سیستم و با تولید آنزیم MerB می توان از طریق روش های مختلف زیست پالایی اقدام به پاکسازی جیوه از مناطق آلوده نمود.

واژه های کلیدی

جیوه،
ژن کاهنده جیوه آلی،
وکتور نو ترکیب

مقدمه

ورود جیوه آلی از طریق صنایع و کشاورزی به محیط زیست یکی از جدی ترین مشکلات زیست محیطی در کشور به شمار می آید. زیست پالایی توسط باکتری ها یکی از راهکار های مناسب و عملی برای پاکسازی آلاینده ها از محیط محسوب می گردد که در آن از پتانسیل موجودات زنده در جهت حذف یا کاهش آلاینده ها استفاده می شود. میکروارگانیسم ها با اصلاح و تغییر ژنتیکی، به طور موثر و کارآمد آلودگی های سمی نظیر جیوه را حذف می کنند. اصلاح ژنتیکی باکتری ها در حذف اختصاصی فلزات از آب های آلوده توسط محققین مختلف انجام شده است (Bae et al. 2000; Majare and Bulow 2001). سیستم مقاومت به جیوه آلی، بر روی یک پلاسمید بزرگ (R831) یافت شده است. آنزیم MerB موجود در این پلاسمید از باکتری *E. coli* سویه J53-1 استخراج و به همراه پروموتور T7 در *E. coli* تولید شده و ۳٪ از حجم پروتئین سلول را به خود اختصاص داد. این آنزیم لیز پروتونی پیوندهای C-Hg را در نمک های آلی جیوه (آلکیل، وینیل، آلیل و آریل) با سرعت زیاد انجام می دهد (Begley et al. 1986).

در میان مواد مختلف سمی که توسط فعالیت های صنعتی انتشار می یابد، فلزات سنگین به عنوان شاخص کلیدی هستند که به طور موثر و مداوم در اکثر بستر های زیست محیطی مورد سنجش واقع شده اند (Amiard et al. 1995). فلزات سنگین قابلیت پالایش در اکوسیستم های آبی را ندارند و با ایجاد آلودگی به تدریج در اعماق دریا رسوب می کنند. فلزات سنگینی که از منابع انسانی وارد محیط زیست می شود بسیار فراتر از میزانی است که به وسیله فرآیندهای طبیعی ایجاد می شود. در این میان جیوه که نسبت به سایر فلزات سنگین بیشترین تمایل را به رسوبات سطحی بستر دارد، با ورود به دریا عمده تاً توسط ذرات معلق و مواد آلی محلول در آب به رسوبات بستر می پیوندد (Goldblum et al. 2006).

جیوه یکی از سمی ترین فلزات سنگین می باشد و می تواند سبب ایجاد اثرات کلیوی و عصبی در انسان و حیات وحش شود که به عنوان یک ماده سمی با اولویت در بسیاری از کشورها شناخته

شده است (Gaudet et al. 1995). جیوه به شکل آلی و غیر آلی در محیط زیست وجود دارد. نوع آلی آن به مراتب از سمیت و خصوصیت تجمع پذیری بالاتری در زنجیره غذایی برخوردار است (Dietz et al. 2000, Houserova et al. 2006, Porcella et al. 1994). به این دلیل این عنصر یکی از نگران کننده ترین عناصر سنگین اکوسیستم های آبی است. برخی از باکتری های ساکن رودخانه های آلوده به دلیل اینکه به میزان زیاد در معرض جیوه قرار می گیرند، قادرند ژن های مقاومت به جیوه را بین یکدیگر رد و بدل کنند و بدین ترتیب در برابر غلظت های سمی جیوه مقاوم می شوند (Wagner Dobler et al. 2000). مقاومت در برابر غلظت های سمی جیوه در باکتری ها به واسطه محصولات ژن های اپرون mer صورت می گیرد. در اکثر باکتری ها، اپرون mer از ژن های mer R T P A B D تشکیل شده است. MerB در تجزیه جیوه آلی نقش دارد. MerA، Hg^{2+} را که بسیار سمی است به Hg^0 احیا می کند. Hg^0 بسیار فرار است و به سرعت از محیط اطراف باکتری خارج می شود (Deckwer et al. 2006, Kiyono et al. 2006, Tothova et al. 2006).

اولین تحقیقات در زمینه مقاومت باکتری ها به جیوه به وسیله Moore و همکاران وی در سال ۱۹۶۰ انجام شد. این افراد مقاومت باکتری *Staphylococcus aureus* جدا شده از نمونه های کلینیکی، به ترکیبات جیوه را گزارش کردند. پس از آن تحقیقات گسترده ای در زمینه باکتری های مقاوم به جیوه و توانایی حذف جیوه صورت گرفت (Barkay et al 2003). Bae و همکاران در سال ۲۰۰۳ با همسان سازی ژن merR در *E. coli* و بیان آن در سطح سلول مشاهده کردند که پروتئین حاصل علاوه بر جذب جیوه قادر به جذب فلزات سنگین دیگر مثل روی (Zn^{2+}) و کادمیم (Cd^{2+}) نیز می باشد. آن ها شیوه ای جدید با کارایی بالا برای حذف فلزات سنگین مختلف از پساب کارخانجات، ابداع کردند (کفیل زاده و همکاران ۱۳۸۶). آنزیم MerB در باکتری *Pseudomonas* سویه K62 مورد بررسی قرار گرفته است (Tezuka and Tonomura 1978). *Pseudomonas putida* و *Klebsiella pneumoniae* از دیگر باکتری های مقاوم به جیوه

دمایی و تعداد سیکل های به شرح جدول ۲ توسط جفت آغازگرهای اختصاصی *merB* طراحی شده با نرم افزار Vector NTI صورت گرفت (جدول ۳). پس از جداسازی ژن *merB* (که در انتهای آغازگرها سایت های برشی *NcoI* و *NdeI* طراحی شده بود) و تکثیر وکتور pET 28 a(+), هر دو با آنزیم های برشی *NdeI* / *NcoI* برش داده شدند. واکنش برش توسط آنزیمهای برشی به صورت جداگانه در حجم ۵۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ °C انجام و محصول هضم شده روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین 1% LMP بارگذاری شد.

خالص سازی، الحاق و تراریزش محصول الحاق

بعد از برش دوگانه، خالص سازی ژن *merB* حاوی جایگاه-های برشی و وکتور با استفاده از کیت خالص سازی شرکت Gen All انجام شد. پس از خالص سازی قطعات حاصل از جداسازی ژن *merB* و آماده سازی وکتور، واکنش الحاق صورت پذیرفت.

جدول ۱- مخلوط واکنش زنجیره ای پلیمرز

Table 1- PCR reaction mix

Material	Stock	Volume (μl)
H ₂ O		12.5
PCR Buffer	10X	2
MgCl ₂	50 mM	0.5
dNTP mix	10 mM	0.5
Forward Primer	10 μM	1
Reverse Primer	10 μM	1
Target DNA	50 ng	1.5
Taq DNA polymerase	5 U/μl	1

جدول ۲- برنامه زمانی و دمایی چرخه های واکنش زنجیره ای پلیمرز

Table 2- PCR Programe

	Time	Temprature
30 cycles	5 min	94°C
	45 sec	94°C
	45 sec	52°C
	1 min	72°C
	10 min	72°C

جدول ۳- لیست آغازگرهای استفاده شده

Table 3- mer B Primers sequence

Primer	Sequence
Forward	5'- ATGAAGCTCGCCCATATA
Reverse	5'- TCACGGTGTCTAGATGAC

هستند (Essa et al. 2002). تحقیقات نشان می دهد که هماهنگی آنزیم *MerB* با *MerA* و سرعت عمل آن، به واسطه جیوه آلی کاسته می شود. جهت بهبود جنبش واکنش لیز جیوه آلی، ژن *merB* با هدف ورود به شبکه آندوپلاسمی و ترشح به دیواره سلولی مهندسی شد. گیاهان توتون (*Nicotiana tabacum*) حاصل با آنزیم *MerB* در شبکه آندوپلاسمی و *MerA* موجود در سیتوپلاسم، ۱۰ تا ۷۰ برابر بیشتر از گیاهان دارای *MerB* سیتوپلاسمی مقاومت از خود نشان دادند (Bizily et al. 2003). هر دو ژن *merA* و *merB* با هدف گیاه پالایی به گیاه مدل آرابدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) انتقال داده شد و بیان و عملکرد آنزیم ها مورد بررسی قرار گرفت (Bizily et al. 2000). همچنین ژن *merB* مهندسی شده از باکتری *Streptococcus aureus* به عنوان مارکر گزینشی مناسب در ترانسفورماسیون گیاهان استفاده شده است (Choi et al. 2005). ژنوم کلروپلاست گیاه توتون با ژن های *merA* و *merB* تراریخته و پارامترهایی نظیر جذب، انتقال اشکال مختلف جیوه از ریشه به ساقه و تبخیر آن مورد بررسی قرار گرفته است (Hussein et al. 2007). گیاهان توتون تراریخت بواسطه آگروباکتریوم ژن *merB* را دریافت کرده اند و مقاومت ۲/۵ μmol/L به فنیل مرکوری استات از خود نشان دادند (Jilin et al. 2002). این پژوهش با هدف جداسازی ژن مربوط به جیوه آلی از باکتریهای بومی *Serratia marcescens* موجود در منطقه، کلون آن در داخل وکتور بیانی pET28a(+) و بررسی پاکسازی جیوه آلی در محیط کشت باکتری های حاوی وکتور نو ترکیب B-mer-PET28a(+) انجام شد.

مواد و روش ها

استخراج پلاسمید، واکنش زنجیره ای پلیمرز و هضم آنزیمی

در این تحقیق، ابتدا از باکتری بومی *Serratia marcescens* حاوی ژن *merB* استخراج پلاسمید به روش پیشنهاد شده توسط Birnboim and Doly (۱۹۷۹) صورت گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تکثیر اختصاصی ژن *merB* طبق جدول ۱ چرخه

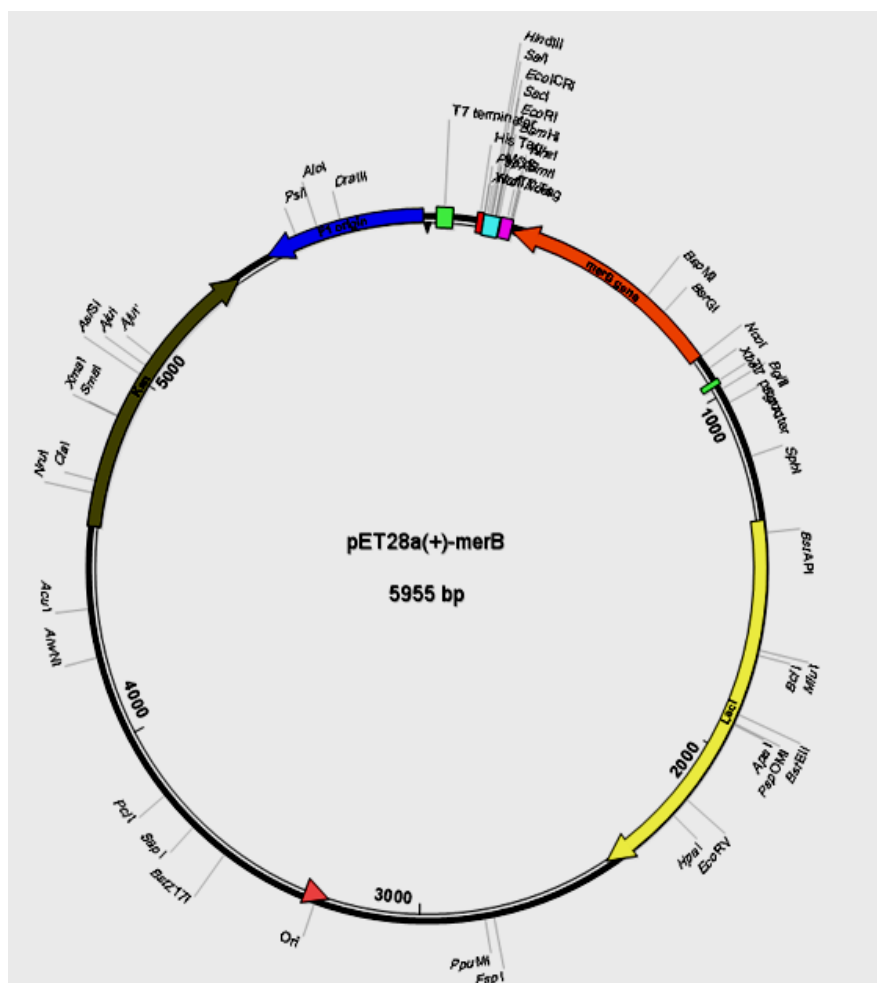


Figure 1- Constructed recombinant plasmid with *merB* gene. شکل ۱- شماتیک وکتور نو ترکیب ساخته شده حاوی ژن *merB*

نوترکیب PCR روی کلنی، PCR روی پلاسمید، هضم آنزیمی و توالی یابی صورت گرفت.

بررسی عملکرد باکتری های حاوی وکتور نوترکیب در محیط
حاوی جیوه آلی با انتقال وکتور نوترکیب pET28a+ - merB
به سویه BL21 و القا با IPTG

پس از تایید وکتور های نو ترکیب، این وکتور ها به سویه بیانی BL21 که مستعد دریافت DNA شده بود، به روش شوک حرارتی منتقل شدند و در محیط LB حاوی کانامایسین ۵۰ ug/mL کشت داده شدند. هم زمان با آن، وکتور (+) pET-28a فاقد ژن مورد نظر نیز، به روش شوک حرارتی به سویه بیانی BL21 منتقل گردید و در محیط LB کانامایسین دار کشت شد. در ادامه، یک کلنی نو ترکیب انتخاب و کشت خطی از آن تهیه شد و سپس این کلنی

(اجزای واکنش الحاق عبارتند از: ژن *merB* به مقدار ۳۰۰ ng/uL وکتور pET28a(+) به مقدار ۱۰۰ ng/uL، آنزیم T4 DNA Ligase (1U)، T4 DNA Ligase Buffer (10x)، دو میکرولیتر و آب سه میکرولیتر) در این راستا مقدار ۲ میکرولیتر از وکتور جهت اطمینان از برش یافتن آن با هر دو آنزیم، برای واکنش ریلیگاسیون مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام واکنش لیگاسیون و ریلیگاسیون به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۶°C، به ازاء هر بار تراریزش *E. coli* به روش شوک حرارتی، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش لیگاسیون و ریلیگاسیون مورد استفاده قرار گرفت. نتیجه رشد تعدادی کلنی در محیط گزینشی بود که محصول واکنش لیگاسیون تراریزش شده بود. شکل ۲ شماتیک سازه ساخته شده را نشان می‌دهد. جهت تایید وکتورهای

زنجیره ای پلیمرز به همراه 2 میکرولیتر از ماده رنگی Dye بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شد تا تکثیر قطعه مربوط به ژن *merB* تایید شود (شکل ۲).

تایید وکتور بیانی PET28a+

به منظور فراهم آوردن امکان بیان *merB* در باکتری، وکتور pET-28a(+) که یک وکتور بیانی در باکتری است، برای انجام همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفت. قبل از همسانه سازی تایید وکتور با دو واکنش هضم در حضور آنزیم های برشی *NdeI/SmaI* و *NcoI/SmaI* صورت گرفت. محصول واکنش هضم اول دو قطعه با طول تقریبی ۱۳۰۸ و ۴۰۶۱ جفت باز و محصول واکنش هضم دوم دو قطعه با طول تقریبی ۱۳۶۷ و ۴۰۰۲ بر روی ژل آگارز ۱ درصد ایجاد کردند (شکل ۳).

همسانه سازی DNA ژن *merB* در وکتور بیانی pET28a(+)

ژن *merB* تکثیر یافته، با استفاده از سایت های برشی *NdeI/NcoI* که به ترتیب در ساختار آغازگرهای مستقیم و معکوس طراحی شده بودند و دارای دو انتهای چسبنده برای هر دو آنزیم می باشند، برش یافت. واکنش هضم توسط آنزیم های برشی به صورت جداگانه در حجم ۵۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گرفت. محصول هضم شده روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین (LMP) ۱٪ بارگذاری شد و باند مربوط به ژن *merB* با اندازه ۶۳۹ جفت باز از روی ژل جداسازی و به منظور واکنش لیگاسیون خالص سازی شد (شکل ۴).

برش آنزیمی وکتور بیانی pET28a(+)

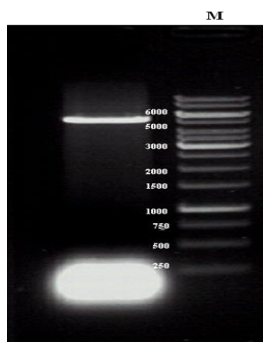
با توجه به برش ژن *merB* به وسیله آنزیم های *NdeI* و *NcoI*، وکتور pET28a+ هم پس از تکثیر، به منظور همسانه سازی این قطعه، به وسیله دو آنزیم *NdeI* و *NcoI* برش داده شد. با توجه به اینکه وکتور مورد نظر حالت حلقوی داشت، پس از واکنش هضم با دو آنزیم برشی *NdeI* و *NcoI* به حالت خطی در آمده و پس از بارگذاری روی ژل LMP، باندی حدودا با طول ۵۳۱۱ جفت باز، برای همسانه سازی ژن *merB* از روی ژل خالص سازی گردید (شکل ۴).

در یک فالکن محتوی ۵ میلی لیتر محیط کشت LB مایع دارای آنتی بیوتیک کانامایسین، کشت و به مدت یک شب در دمای ۳۷ °C با سرعت ۱۶۰ دور بر دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت. تهیه کشت مایع از روی کلنی برای وکتور فاقد ژن مورد نظر نیز صورت گرفت. در مرحله بعد، ۲/۵ میلی لیتر از کشت حاوی وکتور نو ترکیب به فلاسک های ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۷۵ میلی لیتر محیط LB مایع، منتقل شد. در مورد وکتور فاقد ژن نیز عملیات القا به همین روش انجام شد. فلاسک ها در انکوباتور ۳۷ °C با سرعت ۱۶۰ rpm شیک شده و پس از رسیدن تراکم باکتری ها به ۰/۸ OD= با برداشتن یکی از فلاسک های حاوی وکتور نو ترکیب به عنوان نمونه شاهد قبل از القا، IPTG با غلظت نهایی ۱ mM به فلاسک ها افزوده شده و در دماهای ۲۲، ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی-گراد و زمان های مختلف انکوباسیون صورت گرفت و جهت بررسی بیان در ساعات مختلف، نمونه برداری انجام گرفت.

جهت مشاهده افزایش مقاومت به جیوه در باکتری های تراریخته و عملکردی بودن آنزیم *merB* تولیدی از وکتور نو ترکیب، میزان رشد باکتری های *E.coli* BL21 حاوی وکتور نو ترکیب، باکتری-های *E.coli* BL21 دارای وکتور خالی با گذشت زمان در محیط حاوی جیوه اندازه گیری و به صورت نمودار ترسیم شد. باکتری-های *E.coli* بدون وکتور و باکتری های تراریزش شده با وکتور PET28a+-*merB* بعد از رسیدن به OD_{۶۰۰} = ۰/۳ به چهار فلاسک منتقل شدند. در تیمارهای مستقل به هر یک از نمونه ها مقادیر جیوه ۵، ۱۰ و ۲۰ ppm اضافه شده و به همراه یک تیمار شاهد بدون جیوه در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی گراد در دو تکرار قرار داده شد.

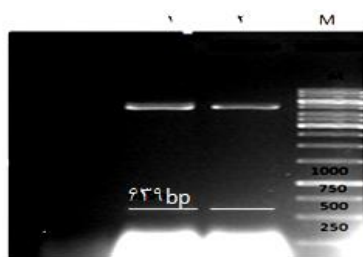
نتایج

تکثیر ژن *merB* در دمای چسبیدن ۵۲ درجه سانتی گراد و توسط جفت آغازگرهای اختصاصی این ژن که در ابتدا و انتهای آغازگرها سایت برشی *NdeI / NcoI* طراحی شده بود، با ۳۵ چرخه از واکنش زنجیره ای پلیمرز و به کمک آنزیم *Taq DNA polymerase* انجام شد. مقدار 10 میکرولیتر از محصول واکنش



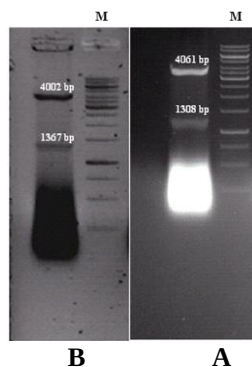
شکل ۴- تصویر الکتروفورز محصول برش آنزیمی وکتور pET-28a(+) توسط آنزیم‌های برشی *NcoI* و *NdeI* روی ژل آگارز ۱٪. جدا شدن وکتور خطی با اندازه حدود ۵۳۱۱ جفت باز با اندازه مورد انتظار برای وکتور pET-28a(+) مطابقت داشت (M: مارکر 1KB).

Figure 4- Electrophoresis image of PET-28a(+) vector digest with *NcoI* and *NdeI* restriction enzymes on 1% agarose gel. 5311bp band had matched with expected size of vector in linear form. (M=1KB Ladder marker).



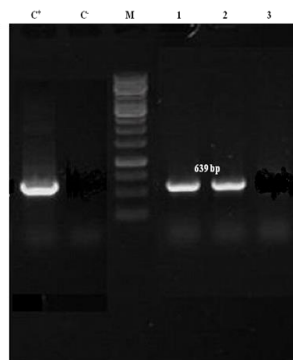
شکل ۷- تصویر الکتروفورز محصول برش وکتور نو ترکیب *merB* - pET-28a(+) با آنزیم‌های *NcoI* و *NdeI* روی ژل آگارز و جدا شدن *merB* با اندازه ۶۳۹ جفت باز (M: مارکر 1KB).

Figure 7- Electrophoresis image of PET-28a(+)-*merB* vector digest with *NcoI* and *NdeI* restriction enzymes on agarose gel. 639bp band had matched with expected size of gene. (M=1KB Ladder marker).



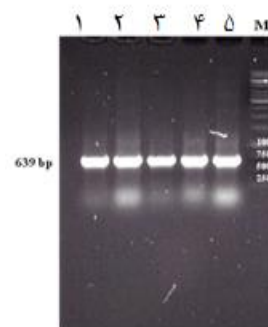
شکل ۳- تصویر الکتروفورز هضم وکتور PET-28a(+) با آنزیم‌های برشی روی ژل آگارز ۱٪: (الف) هضم وکتور با آنزیم‌های برشی *SmaI* و *NdeI*. (ب) هضم وکتور با آنزیم‌های برشی *smaI* و *NcoI* (M: مارکر 1KB).

Figure 3- Electrophoresis image of PET-28a(+) vector digest with restriction enzymes on 1% agarose gel. (a) Vector digest with *smaI* and *NdeI*, (b) Vector digest with *smaI* and *NcoI*. (M=1KB Ladder marker).



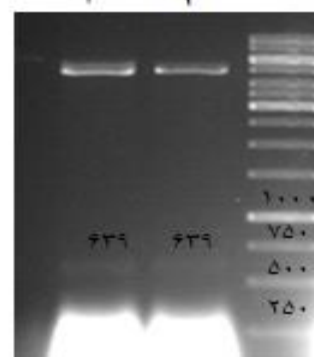
شکل ۶- تصویر الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های رشد یافته در محیط گزینشی کانامایسین. C^+ و C^- به ترتیب نمونه بدون DNA و ژن *merB* اولیه می‌باشند. مشاهده باند ۶۳۹ جفت باز نشان می‌دهد که کلنی‌های باکتری حاوی وکتور نو ترکیب هستند (M: مارکر 1KB).

Figure 6- Electrophoresis image of PCR product with specific primers of *merB* gene on extracted plasmid of transformed colony. 639bp band showed existence of gene into transformed bacteria. (M=1KB Ladder marker).



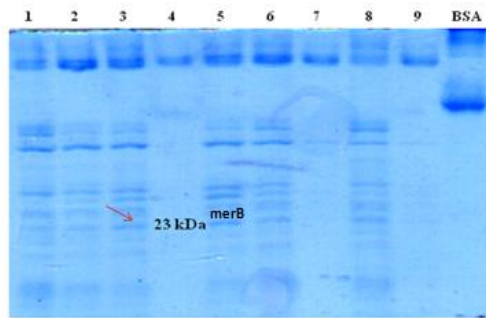
شکل ۲- تصویر الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *merB* روی دی ان ای استخراج شده از باکتری *Serratia marcescens*. باند ۶۳۹ جفت‌بازی با اندازه مورد انتظار برای ژن *merB* مطابقت داشت. ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ تکرارهای مستقل هستند. (M: مارکر 1KB).

Figure 2- Electrophoresis image of PCR product with specific primers of *merB* gene on extracted DNA of *Serratia marcescens*. 639bp band had matched with expected size of *merB* gene. 1, 2, 3, 4, and 5 are independent replications. (M=1KB Ladder marker).



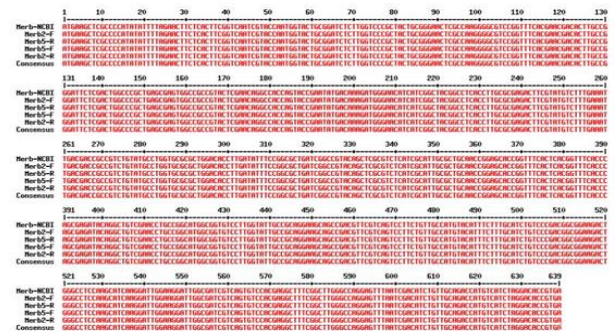
شکل ۵- تصویر الکتروفورز محصول هضم ژن *merB* با آنزیم‌های برشی *NcoI* و *NdeI* روی ژل آگارز. باند مربوط به ژن *merB* با اندازه ۶۳۹ جفت باز که با اندازه مورد انتظار برای ژن *merB* مطابقت داشت، از روی ژل جداسازی شد (M: مارکر 1KB).

Figure 5- Electrophoresis image of *merB* gene digest with *NcoI* and *NdeI* restriction enzymes on agarose gel. 639bp band had matched with expected size of gene. (M=1KB Ladder marker).



شکل ۹- تصویر الکتروفورز پروتئین روی ژل آکریل آمید ۱۵٪ باند مربوط به پروتئین MerB به اندازه ۲۳ kDa در لاین‌ها قابل مشاهده است. چاهک شماره-های ۱-۸ به ترتیب متعلق به نمونه‌های پیش القا و چاهک شماره ۴، ۷ و ۹ وکتور خالی است. در چاهک شماره‌های ۱-۳ نمونه‌های با القای دمای ۲۲، چاهک های ۵ و ۶ نمونه های با القای دمای ۲۸ و چاهک ۸ با القا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بارگذاری شده‌اند. چاهک شماره ۱۰ متعلق به BSA است و به عنوان نشانگر استفاده شده است.

Figure 9- Electrophoresis image of protein merB on 15% acrylamide gel. Related band to merB protein with size 23kDa is visible in lanes. Lanes 1-8 belong to pre-induced samples with IPTG and lane 9 is empty vector. Lanes 1-3, 5-6, and 8 related to pre-induced samples in 22, 28, and 37°C, respectively. Lane 10 was BSA protein and used as protein marker.



شکل ۸ - توالی آمینواسیدی به دست آمده با توالی آمینواسیدی مربوط به پروتئین MerB موجود در NCBI با استفاده از نرم‌افزار Multialign مقایسه شد. توالی مورد توافق در این زیرهمچینی تطابق کامل توالی آمینوسیدی پروتئین MerB حاصل از وکتور همسانه‌سازی شده با توالی پروتئین MerB موجود در NCBI را نشان می‌دهد.

Figure 8- The amino acid sequence to the protein amino acid sequence obtained by MerB available at NCBI using the software Multialign were compared. Consensus sequence in this under the picking Full compliance amino acid sequence MerB Protein The resulting Cloning vector shows to MerB protein sequences in the NCBI.

شده را با نمونه ثبت شده در NCBI برای ژن merB نشان داد (شکل ۸).

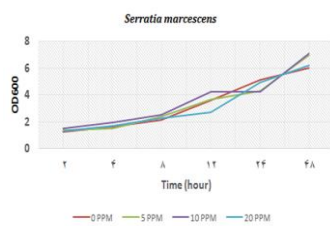
بررسی بیان پروتئین نو ترکیب PET28-merB در باکتری

باکتری‌های *E.coli* BL21 حاوی وکتور نو ترکیب با سه تیمار مدت زمان القای ۲۲، ۲۸ و ۳۷ ساعت با IPTG القا شدند. تمامی نمونه‌ها پس از اتمام مدت القا برای بارگذاری در SDS-PAGE آماده شدند. مارکر در کنار نمونه‌ها بارگذاری شد. به علت اینکه وکتور pET28a+ در باکتری *E.coli* BL28 یک وکتور نشتی بوده و بدون القا با IPTG هم قادر به بیان ضعیف پروتئین مورد نظر است بنابراین باند ضعیفی مربوط به MerB در نمونه پیش از القا مشاهده می‌شود. (شکل ۹).

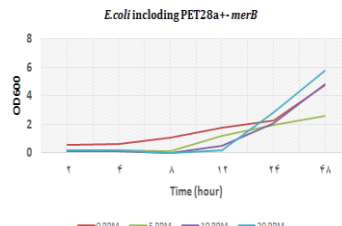
تائید کلنی‌های نو ترکیب برای حضور ژن merB

از سه طریق انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی کلنی‌های نو ترکیب، انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز روی پلاسمید نو ترکیب خالص سازی شده از باکتری‌های تراریزش شده (شکل ۶). و هضم برشی برای وکتور نو ترکیب با آنزیمهای برشی *NcoI* و *NdeI* صورت گرفت (شکل ۷).

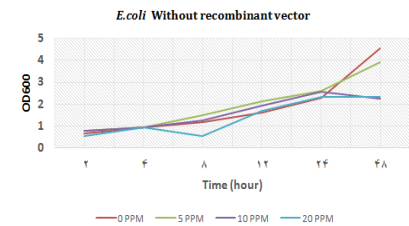
برای بررسی توالی DNA های همسانه‌سازی شده، نمونه DNA وکتور نو ترکیب merB - PET-28a(+) تایید شده برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. توالی‌های ثبت شده در NCBI برای ژن merB با نتایج حاصل از توالی‌یابی، مقایسه گردید. برای توالی‌یابی کامل ژن merB آغازگرهای دو طرف محل ورود merB در وکتور استفاده شدند. نتیجه حاصل از توالی‌یابی صحت و تطابق کامل توالی هر دو نمونه وکتور ارسال



شکل ۱۲- تاثیر میزان جیوه در محیط کشت روی رشد باکتری *S.marcescens*



شکل ۱۱- تاثیر میزان متیل جیوه در محیط کشت روی رشد باکتری *E.coli* تراریزش شده با *PET28a+-merB*



شکل ۱۰- تاثیر میزان متیل جیوه در محیط کشت روی رشد باکتری *E.coli* بدون وکتور نو ترکیب

Figure 10- Methyl mercury effect into medium on *E.coli* growth containing empty vector

Figure 11- Methyl mercury effect into medium on *E.coli* growth containing PET28a+-merB vector

Figure 12- Methyl mercury effect into medium on *S. marcescens* growth

در غلظت‌های ۱۰ تا ۲۰ پی پی ام برخورداری باشد و نشانگر این موضوع است باکتری *S. marcescens* موجود در کشور نیز بعلت دارا بودن پروتئین MerB از توان بالقوه‌ای برای پاکسازی زیستی جیوه آلی برخوردار است.

بحث

نزدیک به پنج دهه از اولین تحقیقات در زمینه مقاومت به جیوه در باکتری‌ها می‌گذرد. این تحقیقات بیشتر به سمت شناسایی باکتری‌های مقاوم به جیوه جدا شده از محیط‌های طبیعی و مطالعه و دست‌ورزی ژن‌های مقاومت به جیوه در این باکتری‌ها سوق داده شده است. در سال ۱۹۸۷ با اندازه‌گیری میزان حذف Hg^{2+} از فلاسک‌های حاوی باکتری‌های مقاوم به جیوه، مکانیسم مقاومت در برابر جیوه مورد بررسی قرار گرفت (Barkay 1987). Ray و همکاران (۱۹۸۹) توانایی حذف جیوه توسط باکتری‌های آزادزی تثبیت کننده ازت (عمدتاً *Azotobacter* و *Beijerinckia*) جدا شده از خاک مناطق آلوده به جیوه را بررسی کردند و باکتری‌هایی با توانایی ۸۳٪ در حذف جیوه، جداسازی نمودند. Frischmut و همکاران (۱۹۹۳) با به کار بردن باکتری‌های مقاوم به جیوه در راکتورهای زیستی در مدت ۴ تا ۷ هفته مشاهده کردند که این باکتری‌ها جیوه را از پساب کارخانجات با کارایی ۸۲ تا ۹۹٪ حذف می‌کنند. Horn و همکاران (۱۹۹۴) برای اولین بار نشان دادند که باکتری‌های مقاوم به جیوه قادر به حذف این فلز سمی از پساب کارخانجات می‌باشند. بنابراین این باکتری‌ها

بررسی میزان عملکرد پروتئین MerB با اندازه‌گیری میزان رشد باکتری در محیط حاوی جیوه آلی

جهت مشاهده افزایش مقاومت به جیوه در باکتری‌های تراریخته و عملکردی بودن آنزیم merB تولیدی از وکتور نو ترکیب، میزان رشد باکتری‌های *E. coli* BL₂₁ حاوی وکتور نو ترکیب pET28-merB باکتری‌های *E. coli* BL₂₁ داری وکتور خالی و *S. marcescens* با گذشت زمان در محیط حاوی جیوه آلی اندازه‌گیری و به صورت نمودار ترسیم شد. میزان OD باکتری‌ها بعد از گذشت مدت زمان ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دو تکرار اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل بیانگر این است که رشد باکتری‌های *E. coli* حاوی وکتور خالی تا ۱۲ ساعت بعد از ریختن جیوه به شدت تحت تاثیر محیط حاوی جیوه قرار گرفته و قادر به رشد در مقادیر ۱۰ ppm و ۲۰ جیوه نمی‌باشند (شکل ۱۰). باکتری‌های حاوی وکتور نو ترکیب PET28a+-merB دارای قابلیت رشد در محیط حاوی متیل جیوه بودند با این حال با افزایش میزان جیوه محیط رشد باکتری‌ها نسبت به نمونه شاهد به ویژه در ساعات اولیه کاهش یافت. بنابراین نتایج حاصل از توانایی رشد باکتری‌های *E. coli* حاوی وکتور خالی و تراریخته نشان دهنده عدم مقاومت باکتری‌های *E. coli* و عملکرد پروتئین MerB در باکتری‌های تراریخته و افزایش مقاومت آن‌ها به جیوه موجود در محیط می‌باشد (شکل ۱۱). باکتری *S. marcescens* قادر به رشد در محیط حاوی جیوه بودند و با گذشت زمان مقدار رشدشان با نمونه شاهد تفاوت چندانی نشان نداد و همانطوری که در شکل ۱۲ مشخص است باکتری *S. marcescens* توانست از رشد بالایی

سیستم‌هایی با کارایی بسیار بالا و موثر در حذف ترکیبات آلی هستند. در این پروژه از باکتری مقاوم به جیوه *Serratia marcescens* (ATCC 13880) جهت جداسازی ژن *merB* با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز استفاده گردید. جهت بررسی بیان و خالص سازی پروتئین *merB* ژن در داخل وکتور بیانی همسانه سازی شد. برای تایید مرحله همسانه سازی ژن در داخل وکتور نوترکیب، از هضم برشی، واکنش زنجیره ای پلیمرز و توالی یابی استفاده شد. پس از تایید مرحله همسانه سازی ژن *merB* وکتور نوترکیب جهت بررسی بیان پروتئین *merB* باکتری بیانی *E. coli* BL21 منتقل شد. القای بیان توسط القاگر IPTG با غلظت ۱ mM در مدت زمان و دماهای مختلف، انجام شد. این مطالعه مقدمه‌ای جهت خالص سازی آنزیم *MerB* و طراحی و اجرای عملی سیستم حذف آلودگی‌های جیوه به کمک بیوراکتورهاست که با تثبیت این آنزیم در بستر راکتور و ایجاد شرایط بهینه اقدام به پاکسازی جیوه می‌گردد.

نتیجه گیری کلی

با بررسی رشد باکتری‌های تراریخته در محیط حاوی جیوه مقاومت آن‌ها نسبت به باکتری‌های بدون وکتور نوترکیب به میزان قابل توجهی افزایش یافت که نتایج نشانگر عملکرد بالای پروتئین *MerB* تولید شده از وکتور نوترکیب در حذف جیوه و افزایش مقاومت باکتری‌ها می‌باشد.

تقدیر و تشکر

از معاون پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بخاطر فراهم نمودن امکانات مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Amiard C, Amiard-Triquet C, M'eayer C. 1995. Experimental study of bioaccumulation, toxicity and regulation of some trace metals in various estuarine and coastal organisms, in proceedings of the symposium on heavy metals in water organisms. *Experimental Marine Biology and Ecology* 106: 73-89.
- Bae W, Chen W, Mulchandani A, Mehra RK. 2000. Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatin. *Biotechnology and Bioengineering* 70: 518-524.

توانایی زیادی در حذف جیوه از محیط اطراف خود دارند، همانطوری که در این تحقیق پاکسازی زیستی جیوه آلی امکان پذیر گردید. Chen و Wilson (۱۹۹۷) با دست‌ورزی ژنتیکی *E. coli*، این باکتری را برای پاکسازی محیط‌های آلوده به جیوه آماده نمودند. این سوش‌ها به نحوی دست‌ورزی ژنتیکی شدند که پروتئین‌های *MerP*، *MerT* را برای انتقال هر چه بیشتر Hg^{2+} به درون سیتوپلاسم، در سطح خود بروز دهند. Von Canstein و همکاران (۱۹۹۹) سوشی از باکتری *Pseudomonas putida* مقاوم به جیوه را از رسوبات رودخانه‌ای آلوده به جیوه در آلمان جدا کردند. آن‌ها برای اولین بار از این سوش‌ها برای تصفیه پساب حاوی جیوه در کارخانه کلرآلکالی استفاده کردند. آن‌ها با طراحی یک راکتور زیستی در مقیاس آزمایشگاهی و فراهم نمودن شرایط بهینه از نظر دما، مواد غذایی، pH و ... برای رشد باکتری، توانایی ۹۰ تا ۹۸٪ را در حذف جیوه به وسیله این باکتری بدست آوردند. از طرف دیگر Masaru و همکاران (۱۹۹۹) برای اولین بار مقاومت به جیوه را در باکتری‌های بی‌هوازی به خصوص جنس *Clostridium* مورد بررسی قرار دادند. Okino و همکاران (۲۰۰۰) سوشی از *Pseudomonas putida* را شناسایی کردند که قادر به حذف جیوه از محیط کشت به میزان ۹۲ تا ۹۸٪ بود. Nakamura و همکاران (۱۹۹۰) و Petrova (۲۰۰۲) فرضیه افزایش احتمال جداسازی باکتری‌های مقاوم به جیوه در مناطق آلوده به این فلز سمی را در مقایسه با مناطق غیر آلوده مطرح ساختند. Schelert و همکاران (۲۰۰۴) آرکیای گرمادوست مقاوم به جیوه از دهانه چشمه‌های آب گرم جدا کردند.

در سال‌های اخیر طراحی و ساخت راکتورهای زیستی جهت تصفیه فاضلاب‌های حاوی فلزات سنگین توسعه یافته است که بسیار کارآمد و اقتصادی است. راکتورهای زیستی با بستر متحرک

- Barkay T. 1987. Adaptation of aquatic microbial communities to $Hg(II)$ stress. *Applied and Environmental Microbiology* 53(12): 2725-2732.
- Barkay T, Miller SM, Summers AO. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 355-384.
- Begley TP, Walts AE, Walsh CT. 1986. Mechanistic studies of a protonolytic organomercurial cleaving enzyme: bacterial organomercurial lyase. *Biochemistry* 25: 7192-7200.

- Birnboim HC, Doly J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
- Bizily SP, Kim T, Kandasamy MK, Meagher RB. 2003.** Subcellular targeting of methylmercury lyase enhances its specific activity for organic mercury detoxification in plants. *Plant Physiology* 131: 463-471.
- Bizily SP, Rugh CC, Meagher RB. 2000.** Phytoremediation of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nature Biotechnology* 18: 213-217.
- Chen Sh, Wilson DB. 1997.** Construction and characterization of *E. coli* genetically engineering for bioremediation of contaminated environments. *Applied and Environmental* 63: 2442-2445.
- Choi YI, Noh EW, Lee HS, Han MS, Lee JS, Choi KS. 2005.** An efficient and novel plant selectable marker based on organomercurial resistance. *Journal of Plant Biology* 48: 351-355.
- Deckwer WD, Becker FU, Ledakowicz S, Wagner Dobler I. 2006.** Microbial removal of ionic mercury in a three phase fluidized bed reactor. *Environmental Science and Technology* 38: 1858-1865.
- Dietz R, Riget F, Cleeman M, Aarkrog A, Johansen P, Hansen JC. 2000.** Comparison of brewery s waste biomass. *Journal of Hazardous Materials* 151: 65-70.
- Essa AM, Macaskie LE, Brown NL. 2002.** Mechanisms of mercury bioremediation. *Biochemical Society Transactions* 30: 672-674.
- Frischmut A, Wappen P, Deckwer WD. 1993.** Isolation of microbes and characterization of their transformation capabilities. *Journal of Biotechnology* 29: 39-55.
- Gaudet C, Lingard S, Cureton P, Keenleyside K, Smithe S, Raju G. 1995.** Canadian environmental quality guidelines for mercury. *Water Air and Soil Pollution* 80: 1149-1159.
- Goldblum DK, Rak A, Ponnappalli MD, Clayton CJ. 2006.** The Fort totten mercury pollution risk assessment: A case history. *Journal of Hazardous Materials* 136: 406-417.
- Horn JM, Brunke M, Deckwer WD, Timmis KN. 1994.** *Pseudomonas putida* strains wich constitutively overexpress mercury resistance for bioremediation of organomercurials pollutants. *Applied and Environmental* 60: 357-362.
- Houserova P, Kuban V, Spurny P, Habarta P. 2006.** Determination of total mercury and mercury species in fish and aquatic ecosystems of moravian rivers. *Veterinarni Medicina* 51: 101-110.
- Hussein H, Ruiz ON, Terry N, Daniell H. 2007.** Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots and volatilization. *Environmental Science and Technology* 41: 8439-8446.
- Jilin T, Ruijuan S, Yuke H. 2002.** Sequence modification of *merB* gene and high organo- mercurial resistance of transgenic tobacco plants. *Chinese Science Bulletin* 47: 2084- 2088.
- Kafilzadeh F, Mirzaei N, Kargar M. 1386.** Evaluate the ability of Kor river bacteria in biological removal of mercury. *Environmental Sciences* [In persian]
- Kiyono M, Pan Hau H. 2006.** Genetic engineering of bacteria for environmental remediation of mercury. *Health society* 52: 199-20
- Majare M, Bülow L. 2001.** Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 19: 67-73.
- Mansouri B, Salehi J, Rezaei M. 2014.** Leachate and pollution levels of heavy metals in the groundwater near municipal solid waste landfill site of mashhad, Iran. *Iranian Journal of Toxicology* 8 (25): 1070-1071.
- Moore B. 1960.** A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2(7148): 453-458.
- Nakamura K, Sakamoto M, Uchiyama H, Yagi O. 1990.** Organomercury volatilizing bacteria in the mercury polluted sediment of Minamata bay, Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 304-305.
- Okino S, Iwasaki K, Yagi O, Tnaka H. 2000.** Development of a biological mercury removal-recovery system. *Journal of Chemistry* 22: 783-788.
- Petrova MA, Mindlin S, Gorlenko Z, Kalieva E, Soina V, Bogdanova E. 2002.** Mercury resistance bacteria from permafrost sediments and prospects for their use in comparative studies of mercury resistance determinants. *Genetika* 38 (11): 1569-1574.
- Porcella DB. 1994.** Mercury in the environment: Biogeochemistry. Pages 3-19 in Watras CJ, Huckabee JW, eds. *Mercury pollution: Integration and Synthesis*. Florida: CRC Press.
- Ray S, Gachhui R, Pahan K, Chaudhury J, Mundal A. 1989.** Detoxification of mercury and organomercurials by nitrogen fixing soil bacteria. *Journal of Biosciences* 14: 173 -182.
- Schelert J, Dixit V, Hoang V, Simbahan J, Drozda M, Blum P. 2004.** Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *Journal of Bacteriology* 186: 427-437.
- Tezuka T, Tonomura K. 1978.** Purification and properties of a second enzyme catalyzing the splitting of carbon-mercury linkages from mercury- resistant *Pseudomonas* K-62. *Journal of Bacteriology* 135: 138-143.
- Tothova T, Pritas P, Javorsky P. 2006.** Mercuric reductase gene transfer from soil bacteria to rumen bacteria. *Folia Microbiol* 51: 317-319.
- Von Canstein H, Li Y, Timmis KN, Deckwer WD, Wagner Dobler I. 1999.** Removal of mercury from chlor alkali electrolysis wastewater by a mercury resistance *Pseudomonas putida* strain. *Applied and Environmental* 65: 5279-5284.
- Wang J, Chen C. 2006.** Biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol* 24: 427-451.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

Construction of *merB* recombinant vector in order to bioremediation of organic mercury

Alireza Tarinejad^{1*}, Hamideh Baghi¹, Maryam Farshbaf Benam¹, and Mohammad Pazhang²

1. Department of Agricultural Biotechnology, 2. Cellular and molecular biology Dept., Basic science Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

*Corresponding Author: atarinejad@yahoo.com

Abstract

Organic mercury is a sustainable form of mercury that enters the food chain of organisms and cause dangerous environmental hazards for natural ecosystem. Mercury stability and high cost conventional refining methods are disturbing factors. In this field, biological methods such as the use of bacteria or enzyme based for microbial remediation provided low-cost strategy and environmental lover of bioremediation. In this research, *merB* gene isolated from resistance bacteria by PCR technique by specific primers containing *NcoI* and *NdeI* restriction sites, so after amplification, it cut with restriction enzymes and after purification of gene, ligation was performed into *PET28 a+* expression vector. *PET28a+-merB* recombinant vector was transferred into *E. coli* strain TOP10 by heat shock. The recombinant bacteria were selected in kanamycin selective medium. The presence of gene in transformed bacteria was confirmed by PCR on plasmid and by enzymatic digestion. Results confirmed the accuracy of cloning of *merB* gene into this expression vector. In order to the expresse its protein, the recombinant vector was transferred into *E. coli* BL21 (DE3). Expression of the protein was confirmed by SDS-PAGE method. Finally, the growth of *E.coli* strain BL21 containing the recombinant vector with *E coli* BL21 bacteria including empty vector was measured by adding methyl mercury into the environment during 48 hours. Growth ability of *E.coli* containing the empty vector indicates lack of bacteria resistance to mercury, on the other hand; *merB* protein in transformed bacteria increased their resistance to methyl mercury in the environment. Therefore, bioremediation of organic mercury from pollutant environments could be possible by using this methodology.

Key Words: Organic mercury, reducing gene of organic mercury, recombinant vector