مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ٦، شماره ٢، پاییز و زمستان ٩٦
صفحه ٣١٩-٣٠٩

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

طراحی و ساخت وکتور نوترکیب merB به منظور پاکسازی زیستی جیوه آلی

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

علیرضا تاری نژاد[1*]، حمیده باغی[1]، مریم فرشباف بنام[1]، محمد پاژنگ[2]

Alireza Tarinejad[1*], Baghi Hamideh[2], Farshbaf Benam Maryam, and Pazhang Mohammad [3]

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: ۹٦/۱۲/۱۹)

چکیده

متیل جیوه یکی از فرم های پایدار جیوه آلی است که می‌تواند وارد زنجیره غذایی موجودات زنده گردد و خطرات زیست محیطی جبران‌ناپذیری را برای اکوسیستم طبیعی بوجود آورد. پایداری جیوه و هزینه زیاد روشهای مرسوم پالایش عوامل نگران کننده‌ای هستند. در این رابطه، روش‌های بیولوژیکی مانند استفاده از بیوراکتورهای مبتنی بر باکتری ها یا آنزیم‌های آنها بعنوان یکی از روشهای میکروب پالایی راه حلی پایدار، کم هزینه و دوست دار محیط زیست ارایه 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 آنزیمهای *Nde*I /*Nco*I برش داده شد و پس از خالص سازی، به وکتور بیانی (+)pET28a الحاق صورت گرفت. وکتور نوترکیب pET28(a+)-merB به باکتری *E.coli* سویه TOP10 منتقل و در آن تکثیر شد. سپس روی کلنی‌های رشد یافته درمحیط گزینشی کانامایسین واکنش زنجیره ای پلیمراز روی کلنیها صورت گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمراز روی پلاسمید با آغازگرهای اختصاصی ژن انجام و پس از تایید با هضم آنزیمی پلاسمید برای تعیین توالی ارسال شد. نتایج به‌دست آمده صحت همسانه‌سازی ژن *merB* را در وکتور بیانی نشان داد. این وکتور نوترکیب به‌منظور بیان پروتئین مورد نظر به باکتری *E. coli* سویه $BL_{21}(DE_3)$ 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 باکتری‌های نوترکیب به‌دست آمده بود. به کمک این سیستم و با تولید آنزیم MerB می‌توان از طریق روش‌های مختلف زیست پالایی اقدام به پاکسازی جیوه از مناطق آلوده نمود.

واژه‌های کلیدی

جیوه،
ژن کاهنده جیوه آلی،
وکتور نوترکیب

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]

مقدمه

ورود جیوه آلی از طریق صنایع و کشاورزی به محیط زیست یکی از جدی‌ترین مشکلات زیست محیطی در کشور به شمار می‌آید. زیست پالایی توسط باکتری‌ها یکی از راهکار های مناسب و عملی برای پاکسازی آلاینده ها از محیط محسوب می‌گردد که در آن از پتانسیل موجودات زنده در جهت حذف یا کاهش آلاینده‌ها استفاده می‌شود. میکروارگانیسم‌ها با اصلاح و تغییر ژنتیکی، به طور موثر و کارآمد آلودگی‌های سمی نظیر جیوه را حذف می‌کنند. اصلاح ژنتیکی باکتری‌ها در حذف اختصاصی فلزات از آب‌های 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 می‌دهد (Begley *et al*. 1986).

در میان مواد مختلف سمی که توسط فعالیت‌های صنعتی انتشار می‌یابد، فلزات سنگین به عنوان شاخص کلیدی هستند که به طور موثر و مداوم در اکثر بستر های زیست محیطی مورد سنجش واقع شده‌اند (Amiard *et al*. 1995). فلزات سنگین قابلیت پالایش در اکوسیستم‌های آبی را ندارند و با ایجاد آلودگی به تدریج در اعماق دریا رسوب می‌کنند. فلزات سنگینی که از منابع انسانی وارد محیط زیست می‌شود بسیار فراتر از میزانی است که به وسیله فرآیندهای طبیعی ایجاد می‌شود. در این میان جیوه که نسبت به سایر فلزات سنگین بیشترین تمایل را به رسوبات سطحی بستر دارد، با ورود به دریا عمدتاً توسط ذرات معلق و مواد آلی محلول در آب به رسوبات بستر می‌پیوندد (Goldblum *et al*. 2006).

جیوه یکی از سمی ترین فلزات سنگین می‌باشد و می‌تواند 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 غیرآلی در محیط زیست وجود دارد. نوع آلی آن به مراتب از سمیت و خصوصیت تجمع‌پذیری 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 نگران‌کننده ترین عناصر سنگین اکوسیستم‌های آبی است. برخی از باکتری‌های ساکن رودخانه‌های آلوده به دلیل اینکه به میزان زیاد در معرض جیوه قرار می‌گیرند، قادرند ژن‌های مقاومت به جیوه را بین یکدیگر رد و بدل کنند و بدین ترتیب در برابر غلظت‌های سمی جیوه مقاوم می‌شوند (Wagner Dobler *et a*l. 2000). مقاومت در برابر غلظت‌های سمی جیوه در باکتری‌ها به واسطه محصولات ژن‌های اپرون mer صورت می‌گیرد. در اکثر باکتری‌ها، اپرون mer از ژن‌های *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 می‌کند. Hg^0 بسیار فرار است و به سرعت از محیط اطراف باکتری خارج می‌شود (Deckwer *et al*. 2006, Kiyono *et al*. 2006, Tothova *et al*. 2006).

اولین تحقیقات در زمینه مقاومت باکتری‌ها به جیوه به وسیله Moore و همکاران وی در سال ۱۹۶۰ انجام شد. این افراد مقاومت باکتری *Staphylococcus aureus* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی، به ترکیبات جیوه را گزارش کردند. پس از آن تحقیقات گسترده‌ای در زمینه باکتری‌های مقاوم به جیوه و توانایی حذف جیوه صورت گرفت (Barkay *et al* 2003). Bae و همکاران در سال ۲۰۰۳ با همسانه‌سازی 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 می‌باشد. آن‌ها شیوه‌ای 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 باکتری‌های مقاوم به جیوه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]

هستند (Essa *et al.* 2002). تحقیقات نشان می‌دهد که هماهنگی آنزیم MerB با MerA و سرعت عمل آن، به واسطه جیوه آلی کاسته می‌شود. 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 گیاه‌پالایی به گیاه مدل آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) انتقال داده شد و بیان و عملکرد آنزیم‌ها 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 ژن‌های *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 اگروباکتریوم ژن *merB* را دریافت کرده‌اند 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 باکتری‌های حاوی وکتور نوترکیب B PET28a(+)-mer انجام شد.

مواد و روش‌ها

استخراج پلاسمید، واکنش زنجیره ای پلیمراز و هضم آنزیمی

در این تحقیق، ابتدا از باکتری بومی *Serratia marcescens* حاوی ژن *mer B* استخراج پلاسمید به روش پیشنهاد شده توسط Birnboim and Doly (۱۹۷۹) صورت گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر اختصاصی ژن *merB* طبق جدول ۱ چرخه دمایی و تعداد سیکل های به شرح جدول ۲ توسط جفت آغازگرهای اختصاصی *merB* طراحی شده با نرم افزار Vector NTI صورت گرفت (جدول۳). پس از جداسازی ژن *mer*B (که در انتهای آغازگرها سایت‌های برشی *Nco*I و *NdeI* طراحی شده بود) و تکثیر وکتور pET 28 a(+)، هر دو با آنزیم های برشی *Nde*I / *Nco*I برش داده شدند. واکنش برش توسط آنزیمهای برشی به صورت جداگانه در حجم ۵۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ ºC انجام و محصول هضم شده روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین LMP 1% بارگذاری شد.

خالص سازی، الحاق و تراریزش محصول الحاق

بعد از برش دوگانه، خالص سازی ژن *mer B* حاوی جایگاه‌های برشی و وکتور با استفاده از کیت خالص سازی شرکت Gen All انجام شد. پس از خالص‌سازی قطعات حاصل از جداسازی ژن *merB* و آماده‌سازی وکتور، واکنش الحاق صورت پذیرفت.

جدول۱- مخلوط واکنش زنجیره ای پلیمراز

Table 1- PCR reaction mix

Material	Stock	Volume (µl)
H_2O		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

جدول۲- برنامه زمانی و دمایی چرخه های واکنش زنجیره ای پلیمراز

Table 2- PCR Programe

	Time	Temprature
	5 min	94Cº
30 cycles	45 sec	94Cº
	45 sec	52Cº
	1 min	72Cº
	10 min	Cº۷۲

جدول۳- لیست آغازگرهای استفاده شده

Table 3- *mer B* Primers sequence

Primer	Sequence
Forward	5'- ATGAAGCTCGCCCCATATA
Reverse	5'- TCACGGTGTCCTAGATGAC

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]

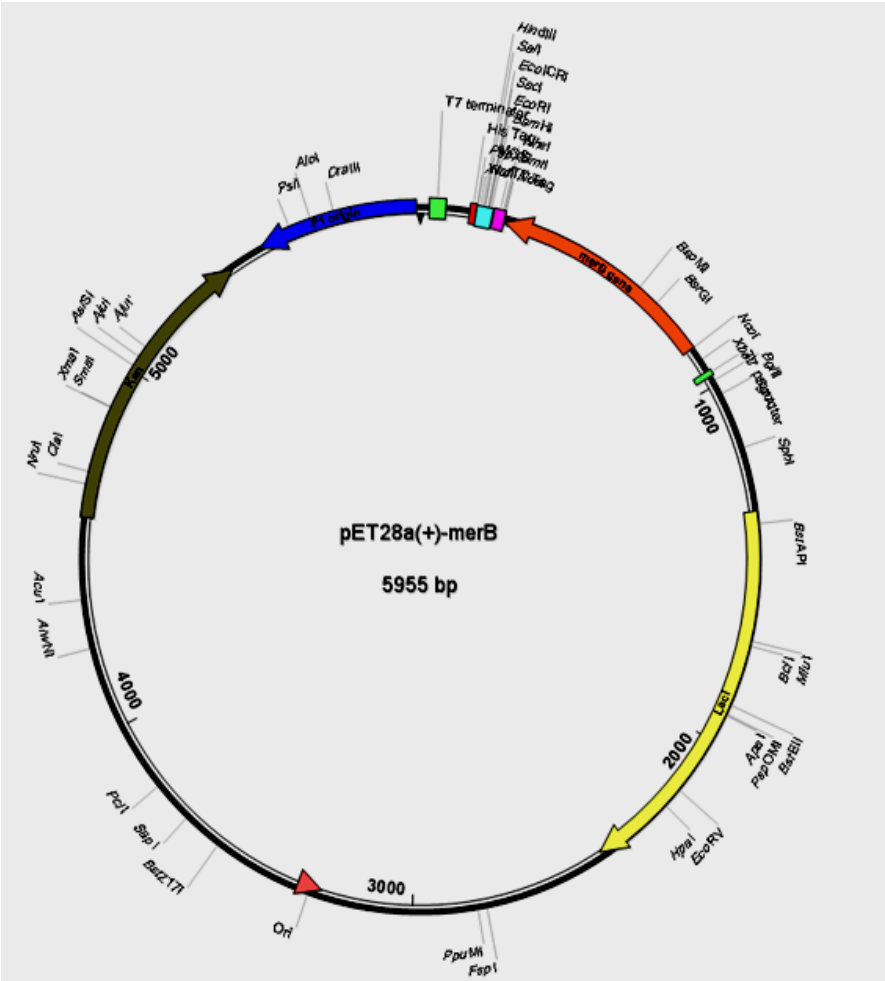


Figure 1- Constructed recombinant plasmid with *merB* gene.

شکل ۱- شماتیک وکتور نوترکیب ساخته شده حاوی ژن *merB*

(اجزای واکنش الحاق عبارتنداز: ژن *merB* به‌مقدار ۳۰۰ng/uL، وکتور pET28a(+) به‌مقدار 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 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 نوترکیب، این وکتور ها به سویه بیانی BL21که مستعد دریافت DNA شده بود، به روش شوک حرارتی منتقل شدند و در محیط LB حاوی کانامایسین ۵۰ug/mL کشت داده شدند. همزمان با آن، وکتور pET-28a(+) فاقد ژن مورد نظر نیز، به روش شوک حرارتی به سویه بیانی BL21 منتقل گردید و در محیط LB کانامایسین‌دار کشت شد. در ادامه، یک کلنی نوترکیب انتخاب و کشت خطی از آن تهیه شد و سپس این کلنی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]

در یک فالکن محتوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین، کشت و به مدت یک شب در دمای ۳۷ ºC با سرعت ۱۶۰ دور بر دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت. تهیه کشت مایع از روی کلنی برای وکتور فاقد ژن موردنظر نیز صورت گرفت. در مرحله بعد، ۲/۵ میلی‌لیتر از کشت حاوی وکتور نوترکیب به فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۷۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع، منتقل شد. در مورد وکتور فاقد ژن نیز عملیات القا به همین روش انجام شد. فلاسک‌ها در انکوباتور ۳۷ ºC با سرعت ۱۶۰ rpm شیک شده و پس از رسیدن تراکم باکتری‌ها به ۰/۸ =OD با برداشتن یکی از فلاسک‌های حاوی وکتور نوترکیب به عنوان نمونه شاهد قبل از القا، IPTG با غلظت نهایی ۱ mM به فلاسک‌ها افزوده شده و در دماهای ۲۲، ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های مختلف انکوباسیون صورت گرفت و جهت بررسی بیان در ساعات مختلف، نمونه‌برداری انجام گرفت.

جهت مشاهده افزایش مقاومت به جیوه در باکتری‌های تراریخته و عملکردی بودن آنزیم merB تولیدی از وکتور نوترکیب، میزان رشد باکتری‌های *E.coli* BL21 حاوی وکتور نوترکیب، باکتری‌های *E.coli* BL21 داری وکتور خالی با گذشت زمان در محیط حاوی جیوه اندازه‌گیری و به‌صورت نمودار ترسیم شد. باکتری‌های *E.coli* بدون وکتور و باکتری های تراریزش شده با وکتور PET28a+-merB بعد از رسیدن به ۰/۳ =۶۰۰ OD به چهار فلاسک منتقل شدند. در تیمارهای مستقل به هر یک از نمونه‌ها مقادیر جیوه ۵ ، ۱۰ و ppm ۲۰ اضافه شده و به همراه یک تیمار شاهد بدون جیوه در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دو تکرار قرار داده شد.

نتایج

تکثیر ژن *mer*B در دمای چسبیدن ۵۲ درجه سانتی‌گراد و توسط جفت آغازگرهای اختصاصی این ژن که در ابتدا و انتهای آغازگرها سایت برشی *Nde*I / *Nco* I طراحی شده بود، با ۳۵ چرخه از واکنش زنجیره ای پلیمراز و به کمک آنزیم *Taq* DNA polymerase انجام شد. مقدار 10 میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز به همراه 2 میکرولیتر از ماده رنگی Dye بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شد تا تکثیر قطعه مربوط به ژن *mer*B تایید شود (شکل۲).

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 همسانه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. قبل از همسانه‌سازی تایید وکتور با دو واکنش هضم در حضور آنزیم‌های برشی *Nde*I/*Sma*I و *Nco*I/*Sma* I صورت گرفت. محصول واکنش هضم اول دو قطعه با طول تقریبی ۱۳۰۸ و ٤٠٦١ جفت باز و محصول واکنش هضم دوم دو قطعه با طول تقریبی ۱۳٦۷ و٤٠٠۲ بر روی ژل آگارز ۱ درصد ایجاد کردند (شکل۳).

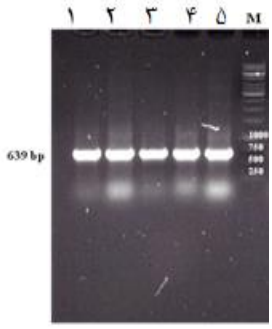
همسانه‌سازی DNAی ژن *merB* در وکتور بیانی pET28a(+)

ژن *merB* تکثیر یافته، با استفاده از سایت‌های برشی *NdeI/NcoI* که به ترتیب در ساختار آغازگرهای مستقیم و معکوس طراحی شده بودند و دارای دو انتهای چسبنده برای هر دو آنزیم می‌باشند، برش یافت. واکنش هضم توسط آنزیم‌های برشی به صورت جداگانه در حجم ۵۰ میکرولیتردر 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 ٦۳۹ جفت باز از روی ژل جداسازی و به منظور واکنش لیگاسیون خالص‌سازی شد (شکل ٤).

برش آنزیمی وکتور بیانی pET28a(+)

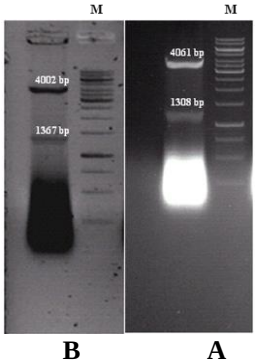
با توجه به برش ژن *merB* به وسیله آنزیم‌های *Nde*I و *Nco*I ، وکتور pET28a+ هم پس از تکثیر، به منظور همسانه سازی این قطعه، به وسیله دو آنزیم *Nde*I و *Nco*I برش داده شد. با توجه به اینکه وکتور مورد نظر حالت حلقوی داشت، پس از واکنش هضم با دو آنزیم برشی *Nde*I و *Nco*I به حالت خطی در آمده و پس از بارگذاری روی ژل LMP، باندی حدودا با طول ۵۳۱۱ جفت باز، برای همسانه‌سازی ژن *mer*B از روی ژل خالص سازی گردید (شکل ٤).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]



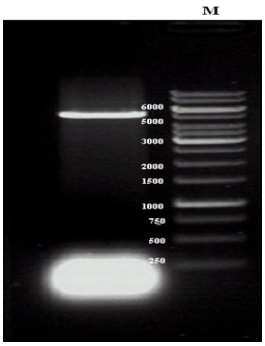
شکل ۲- تصویر الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *merB* روی دی ان ای استخراج شده از باکتری *Serratia marcescens*. باند ٦٣٩ جفت‌بازی با اندازه مورد انتظار برای ژن *merB* مطابقت داشت . ۱، ۲، ۳، ٤، ٥ تکرارهای مستقل هستند. (M: مارکر1KB).

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).



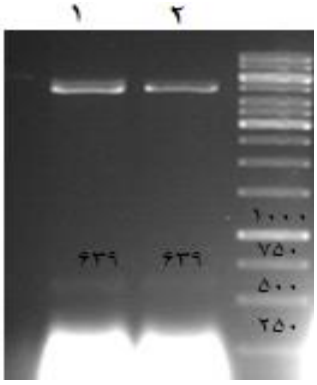
شکل ۳- تصویر الکتروفورز هضم وکتور PET-28a(+) با آنزیم‌های برشی روی ژل آگارز ۱٪. (الف) هضم وکتور با آنزیم‌های برشی *Sma*I و *Nde*I. (ب) هضم وکتور با آنزیم‌های برشی *sma*I و *Nco*I (M: مارکر1KB).

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).



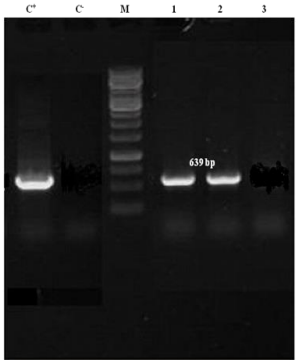
شکل ٤- تصویر الکتروفورز محصول برش آنزیمی وکتور pET-28a(+) توسط آنزیم‌های برشی *Nco*I و *Nde*I روی ژل آگارز۱٪. جدا شدن وکتور خطی با اندازه حدود ٥٣١١ جفت باز با اندازه مورد انتظار برای وکتور pET-28a(+) مطابقت داشت (M: مارکر1KB).

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).



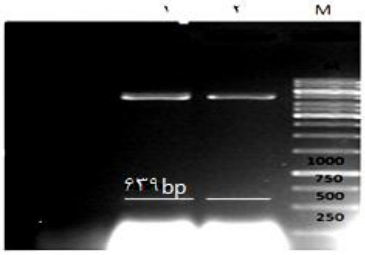
شکل ٥- تصویر الکتروفورز محصول هضم ژن *merB* با آنزیم‌های برشی *Nco*I و *Nde*I روی ژل آگارز. باند مربوط به ژن *merB* با اندازه 639 جفت باز که با اندازه مورد انتظار برای ژن *merB* مطابقت داشت، از روی ژل جداسازی شد (M: مارکر1KB).

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).



شکل٦- تصویر الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز 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 ٦٣٩ جفت بازی نشان می‌دهد که کلنی‌های باکتری حاوی وکتور نوترکیب هستند (M: مارکر1KB).

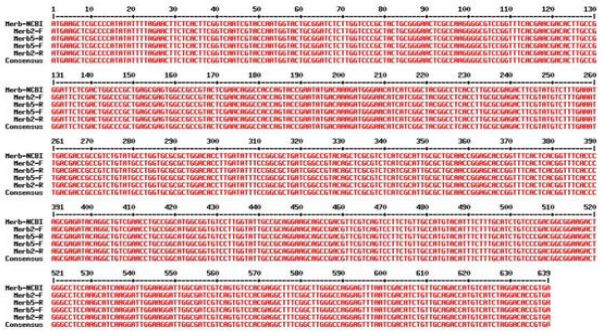
Figure 6- Electrophoresis image of PCR product with specific primers of merB gene on extracted plasmid of transformed colony. 639bp band showed existance of gene into transformed bacteria. (M=1KB Ladder marker).



شکل۷- تصویر الکتروفورز محصول برش وکتور نوترکیب pET-28a(+) - *merB* با آنزیم‌های *Nco*I و *Nde*I روی ژل آگارز و جدا شدن *merB* با اندازه ٦٣٩ جفت‌باز (M: مارکر1KB).

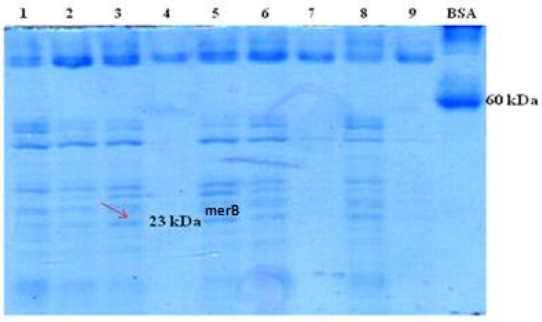
Figure 7- Electrophoresis image of PET-28a(+)-merB vector digest with *NcoI* and *NdeI* restriction enzymes on agarose gel. 639bp band had matched with expected size of gene. (M=1KB Ladder marker).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]



شکل ۸ – توالی آمینواسیدی به دست آمده با توالی آمینواسیدی مربوط به پروتئین MerB موجود در NCBI با استفاده از نرم¬افزار Multialign مقایسه شد. توالی مورد توافق در این زیرهمچینی تطابق کامل توالی آمینوسیدی پروتئین MerB حاصل از وکتور همسانه¬سازی شده با توالی پروتئین MerB موجود در NCBI را نشان می¬دهد

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 Coloning vector shows to MerB protein sequences in the NCBI.



شکل۹– تصویر الکتروفورز پروتئین روی ژل آکریل‌آمید 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 شماره٤، ۷ و ۹ وکتور خالی است. در چاهک شماره‌های ۱–۳ نمونه‌های با القای دمای ۲۲، چاهک های ۵ و ٦ نمونه های باالقای 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 37ºC, respectively. Lane 10 was BSA protein and used as protein marker.

تائید کلنی‌های نوترکیب برای حضور ژن *merB*

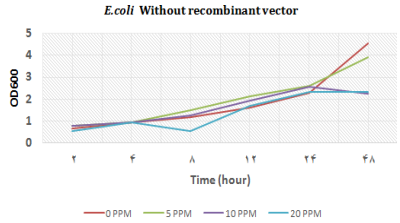
از سه طریق انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی کلنی‌های نوترکیب، انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز روی پلاسمید نوترکیب خالص سازی شده از باکتریهای تراریزش شده (شکل ٦). و هضم برشی برای وکتور نوترکیب با آنزیمهای برشی *Nco*I و *Nde*I صورت گرفت (شکل ۷).

برای بررسی توالی DNA های همسانه‌سازی شده، نمونه DNA وکتور نوترکیب PET-28a(+) – merB تایید شده برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. توالی‌های ثبت شده در NCBI برای ژن *mer*B با نتایج حاصل از توالی‌یابی، مقایسه گردید. برای توالی‌یابی کامل ژن *mer*B آغازگرهای دو طرف محل ورود *merB* در وکتور استفاده شدند. نتیجه حاصل از توالی‌یابی صحت و تطابق کامل توالی هر دو نمونه وکتور ارسال شده را با نمونه ثبت شده در NCBI برای ژن *mer*B نشان داد (شکل۸).

بررسی بیان پروتئین نوترکیب PET28-merB در باکتری

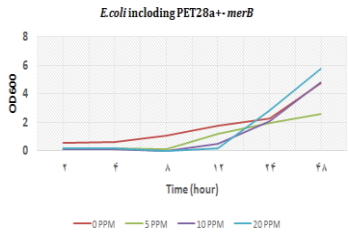
باکتری‌های *E.coli* BL21 حاوی وکتور نوترکیب با سه تیمار مدت زمان القای ۲۲، ۲۸ و ۳۷ ساعت با IPTG القا شدند. تمامی نمونه‌ها پس از اتمام مدت القا برای بارگذاری در SDS-PAGE آماده شدند. مارکر در کنار نمونه‌ها بارگذاری شد. به علت اینکه وکتور pET28a+ در باکتری *E.coli* BL28 یک وکتور نشتی بوده و بدون القا با IPTG هم قادر به بیان ضعیف پروتئین مورد نظر است بنابراین باند ضعیفی مربوط به MerB در نمونه پیش از القا مشاهده می‌شود. (شکل۹).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]



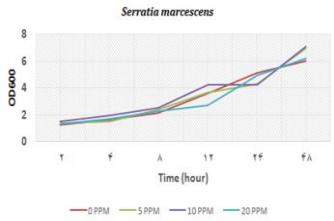
شکل ۱۰- تاثیر میزان متیل جیوه در محیط کشت روی رشد باکتری *E.coli* بدون وکتور نوترکیب

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



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

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



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

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

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 نوترکیب، میزان رشد باکتری‌های *E.coli* BL$_{21}$ حاوی وکتور نوترکیب pET28-merB، باکتری‌های *E.coli* BL$_{21}$ داری وکتور خالی و *S. marcescens* با گذشت زمان در محیط حاوی جیوه آلی اندازه‌گیری و به صورت نمودار ترسیم شد. میزان OD ٦٠٠ باکتری‌ها بعد از گذشت مدت زمان ٢ ، ٤ ، ٨ ، ١٢ ، ٢٤ و ٤٨ ساعت در دو تکرار اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل بیانگر این است که رشد باکتری‌های *E.coli* حاوی وکتور خالی تا ١٢ ساعت بعد از ریختن جیوه به‌شدت تحت تاثیر محیط حاوی جیوه قرار گرفته و قادر به رشد در مقادیر ١٠ ppm و ٢٠ جیوه نمی‌باشند (شکل ١٠). باکتری‌های حاوی وکتور نوترکیب 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 ١١). باکتری *S.marcescens* قادر به‌رشد در محیط حاوی جیوه بودند و با گذشت زمان مقدار رشدشان با نمونه شاهد تفاوت چندانی نشان نداد و همانطوری که در شکل ١٢مشخص است باکتری *S.marcescens* توانست از رشد بالایی در غلظت‌های ١٠ تا ٢٠ پی پی ام برخوردار باشد و نشانگر این موضوع است باکتری *S .marcescens* موجود در کشور نیز بعلت دارا بودن پروتیین 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 ١٩٨٧ با اندازه گیری 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 (١٩٨٩) توانایی حذف جیوه توسط باکتری‌های آزادزی تثبیت کننده ازت (عمدتاً *Azotobacter* و *Beijerinkia*) جدا شده از خاک مناطق آلوده به جیوه را بررسی کردند و باکتری‌هایی با توانایی ٨٣٪ در حذف جیوه، جداسازی نمودند. Frischmut و همکاران (١٩٩٣) با به کار بردن باکتری‌های مقاوم به جیوه در راکتورهای زیستی در مدت ٤ تا ٧ هفته مشاهده کردند که این باکتری‌ها جیوه را از پساب کارخانجات با کارآیی ٨٢ تا ٩٩٪ حذف می‌کنند. Horn و همکاران (١٩٩٤) برای اولین بار نشان دادند که باکتری‌های مقاوم به جیوه قادر به حذف این فلز سمی از پساب کارخانجات می‌باشند. بنابراین این باکتری‌ها

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]

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 MerT، MerP 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 (۲۰۰٤) 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 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 پلیمراز 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 پلیمراز و توالی یابی استفاده شد. پس از تایید مرحله همسانه‌سازی ژن *merB*، وکتور نوترکیب جهت بررسی بیان پروتئین merB، به 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 خالص‌سازی 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 وتشکر

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 phytochelatins. Biotechnology and Bioengineering 70: 518–524.

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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]

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, Ledakowitcz S, Wagner Dobler I. 2006. Microbial removal of ionic mercury in a three phase fluidzed bed reactor. Environmental Science andTechnology 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, Ponnapalli 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, Kaliaeva 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]

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 Baghi [1], Maryam Farshbaf Benam[1], and Mohammad Pazhang[2]

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 *Nco*I *and Nde*I 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-11]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.2.6]