



زیست پالایی هم زمان جیوه معدنی و آلی با استفاده از وکتور نو ترکیب pET28a(+)-merA-merB

حمیده باغی سفیدان^۱، علیرضا تازی نژاد^{۲*}

^۱ کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، آذربایجان، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

چکیده

سابقه و هدف: جیوه به دلیل پایداری و هزینه زیاد روش های متداول پالایش یک مشکل بزرگ زیست محیطی در جهان است. روش های زیستی مانند استفاده از بیوراکتورهای مبتنی بر باکتری ها یا آنزیم های آنها یکی از روش های زیست پالایی هستند. برای تجزیه ترکیبات آلی و معدنی جیوه از آنزیم های باکتریایی MerA و MerB استفاده می شود. این مطالعه با هدف همسانه سازی توام ژن های *merA* و *merB* در وکتور بیانی (+) pET28a به منظور تولید آنزیم های فعال MerA و MerB طراحی گردید.

مواد و روش ها: ابتدا ژن های *merA* و *merB* از ژنوم باکتری های مقاوم به جیوه جداسازی و در داخل وکتور بیانی (+) pET28a کلون گردید. به منظور ارزیابی درستی همسانه سازی ژن مورد نظر، از روش PCR و هضم آنزیمی استفاده شد. وکتور نو ترکیب pET28a(+)-merA-merB به دست آمده به درون باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21 منتقل شد. برای مشاهده افزایش مقاومت به جیوه معدنی و جیوه آلی در باکتری تراریخته و عملکردی بودن آنزیم تولیدی از وکتور نو ترکیب، میزان رشد باکتری های *اشریشیا کلی* سویه BL21 حاوی وکتور نو ترکیب به همراه باکتری های *اشریشیا کلی* سویه BL21 بدون ژن های *merA* و *merB* در محیط حاوی جیوه معدنی و جیوه آلی در مدت ۴۸ ساعت اندازه گیری شدند.

یافته ها: رشد باکتری *اشریشیا کلی* حاوی وکتور نو ترکیب در محیط حاوی جیوه معدنی و جیوه آلی در زمان ها و غلظت های مختلف جیوه اندازه گیری و نتایج نشان داد که رشد باکتری های *اشریشیا کلی* حاوی وکتور بدون ژن هدف تا ۱۲ ساعت پس از افزودن جیوه به شدت در تاثیر محیط حاوی جیوه قرار گرفته و قادر به رشد در مقادیر ۱۰ و ۲۰ ppm جیوه نمی باشند. اما باکتری های حاوی وکتور نو ترکیب pET21a(+)-merA-merB در محیط حاوی جیوه رشد مناسبی داشتند. SDS-PAGE پروتئین های باکتری حاوی وکتور نو ترکیب روی ژل آکریل آمید نشان داد که پس از ۱۶ ساعت القا با IPTG 1mM در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس بیشترین بیان پروتئین های MerA (۶۲ کیلودالتون) و MerB (۲۳ کیلودالتون) مشاهده می شود.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از توانایی رشد باکتری های *اشریشیا کلی* حاوی وکتور نو ترکیب، عملکرد پروتئین های MerA و MerB در باکتری های تراریزش شده را نشان داد. همچنین افزایش مقاومت باکتری نو ترکیب به جیوه معدنی و جیوه آلی موجود در محیط بیانگر این مساله است که می توان آلاینده های فلزات سنگین در محیط زیست را با مدیریت مناسب از راه ساخت وکتور نو ترکیب پاکسازی نمود.

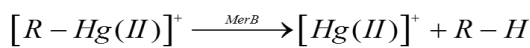
واژگان کلیدی: زیست پالایی، ژن *merA* ژن *merB* همسانه سازی.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۷

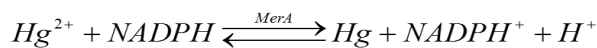
مقدمه

کنترل می نمایند (۶).

اساس ژنتیکی مقاومت به جیوه در بعضی از گونه های باکتریایی به اثبات رسیده است. در باکتری های گرم منفی مقاوم به جیوه، پس از وارد شدن جیوه آلی به سلول، پیوند C-Hg ترکیبات آلی توسط آنزیم *merB* شکافته شده و جیوه معدنی آزاد می شود (۷).



محصول ژن *merA* آنزیمی به نام مرکوریک ردوکتاز می باشد که نقش کلیدی را در حذف جیوه عهده دار است. این آنزیم Hg^{2+} را طبق مکانیسم زیر به Hg^0 که سمیت کمتری برای سلول یا ارگانیسم دارد، تبدیل می نماید:



Hg^0 تقریباً به فرم گازی و بسیار فرار بوده و به آسانی از سیتوپلاسم و محیط اطراف باکتری خارج و بدین ترتیب میکروارگانیسم ها قادر به حذف این فلز سمی از محیط اطراف خود و یا داخل سلول می باشند (۶).

اولین تحقیقات در زمینه مقاومت باکتری ها به جیوه به وسیله مور (Moore) و همکاران انجام شد (۸). این افراد مقاومت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس (S. aureus)* جدا شده از نمونه های بالینی، 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. هورن (Horn) و همکاران در سال ۱۹۹۴ برای اولین بار نشان دادند که باکتری های مقاوم به جیوه قادر به حذف این فلز سمی از پساب کارخانه ها می باشند (۹).

در سال ۱۹۸۷ با اندازه گیری میزان حذف Hg^{2+} از فلاسک های حاوی باکتری های مقاوم به جیوه، مکانیسم مقاومت در برابر جیوه مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

رای (Ray) و همکاران در سال ۱۹۸۹ توانایی حذف جیوه توسط باکتری های آزادزی تثبیت کننده از (عمدتاً *Azotobacter* و *Beijerinckia*) جدا شده از خاک مناطق آلوده به جیوه را

جیوه یکی از سمی ترین فلزات سنگین می باشد و یک ماده سمی با اولویت بالا در بسیاری از کشورها شناخته می شود. جیوه به شکل آلی و غیر آلی در محیط زیست وجود دارد و نوع آلی آن به مراتب از سمیت و خصوصیت تجمع پذیری بالایی در زنجیره غذایی برخوردار است به این دلیل این عنصر یکی از نگران کننده ترین عناصر سنگین اکوسیستم های آبی است (۱). تماس مزمن با ترکیبات جیوه می تواند باعث بیماری آلزایمر، پارکینسون، تداخل در سیستم تناسلی، آسیب تنفسی، سیستم های عصبی مرکزی-کلیوی و باعث اوتیسم و مشکلات رفتاری شود (۲).

ابزار فیزیکوشیمیایی پالایش جیوه تبدیل یا دفع، انجماد و تثبیت، ادغام، شستن خاک، استخراج اسید، عملیات حرارتی، انجماد، رسوب، جذب، فیلتراسیون غشایی هستند. این تکنولوژی ها گران قیمت هستند و سازگار با محیط زیست نیستند. همچنین حجم زیادی زیست توده جیوه تولید می نمایند که به نوبه خود باعث ایجاد مشکلات دفع می شوند (۳). زیست پالایی یک تکنیک مدیریت زباله است و به استفاده از موجودات زنده برای حذف یا خنثی کردن آلاینده ها از یک وضعیت آلوده گفته می شود. بر اساس تعریف آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده آمریکا (US EPA)، زیست پالایی فرایندی است که به طور طبیعی از موجودات زنده برای تجزیه مواد خطرناک به مواد کمتر سمی یا غیر سمی استفاده می کند (۴). از میان اکثر روش های حذف آلودگی فلزات سنگین از طبیعت، زیست پالایی نیازمند کمترین هزینه و زمان بوده و موجب تغییر شکل آلاینده ها از فرم خطرناک به فرم کم خطر یا بی خطر می گردد (۵).

مقاومت به جیوه در برخی از باکتری های گرم مثبت و منفی از مکان های مختلف تعیین شده است. در باکتری ها، مقاومت در برابر جیوه به وسیله اپرون *mer* انجام می شود. اپرون *mer* از ژن های *merRTPABD* تشکیل یافته و محصول ژن های *merP* و *merT* در انتقال به $Hg(II)$ درون سیتوپلاسم باکتری نقش کلیدی ایفا می کنند. *MerR* و *MerD* بیان ژن های اپرون را

بررسی کردند و باکتری هایی با توانایی ۸۳٪ در حذف جیوه، جداسازی نمودند (۱۱).
 فریشموت (Frischmut) و همکاران در سال ۱۹۹۳ با به کار بردن باکتری های مقاوم به جیوه در راکتورهای زیستی در مدت ۴ تا ۷ هفته مشاهده کردند که این باکتری ها جیوه را از پساب کارخانجات با کارایی ۸۲ تا ۹۹٪ حذف می کنند. بنابراین، این باکتری ها توانایی زیادی در حذف جیوه از محیط اطراف خود دارند (۱۲).

بررسی صحت ژن های *merA* و وکتور نوترکیب *pET28a(+)-merB*

۱- برش آنزیمی ژن *merA*: قطعات DNA تکثیر یافته، با استفاده از سایت های برشی *NheI* و *BamHI* که به ترتیب در ساختار آغازگرهای رو به جلو و عقب طراحی شده بودند و دارای دو انتهای چسبنده برای هر دو آنزیم می باشند، برش یافت. واکنش هضم توسط آنزیم های برشی به صورت دوگانه در حجم ۵۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ °C انجام و محصول هضم شده بر روی ژل آگاروز با نقطه ذوب پایین (۱٪) LMP بارگذاری شد (۱۷).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر
merA-F-NheI	5'-GCTAGCATGACCACCCTGAAAATCACC-3'
merA-R-BamHI	5'-GGATCCTCATCCGGCGCAGCAGCAA-3'
merB-F-NcoI	5'-CCATGG-ATGAAGCTCGCCCATATAT-3'
merB-R-NdeI	5'-CATATG-TCACGGTGTCTAGATGACA-3'

۲- برش آنزیمی وکتوربیانی نوترکیب *pET28a(+)-merB* برای به دست آوردن وکتور نوترکیب *pET28a(+)-merB* ابتدا از باکتری *S. marcescens* استخراج پلاسمید (pDU1358) صورت گرفت. واکنش PCR به منظور تکثیر ژن *merB* با استفاده از جفت آغازگرهای رفت و برگشت بر اساس توالی موجود در سایت NCBI با شماره دستیابی M15049.1 برای ژن *merB* انجام گرفت (۱۸). توالی آنزیم های برشی *NcoI* و *NdeI* به منظور همسانه سازی در ابتدای پرایمر در نظر گرفته شد (جدول ۱). ژن *merB* و وکتور *pET28a(a)* با آنزیم های *NcoI* و *NdeI* برش داده شدند و پس از بارگذاری بر روی ژل آگاروز، باندهای مورد نظر خالص سازی و واکنش لیگاسیون

در ایران گروه های باکتریایی مختلف *اشریشیا کلی*، *سراشیا مارسنسس*، *سودوموناس* و *باسیلوس* را از رسوبات و آب رودخانه کر جداسازی و به عنوان باکتری های مقاوم به جیوه شناسایی شدند (۱۳). این مطالعه مقدمه ای برای زیست پالایی جیوه از طریق روش های مختلفی مانند میکروب پالایی با تولید باکتری های نوترکیب با ظرفیت بالای حذف جیوه، تولید بیوسنسورها و طراحی بیوراکتور ها بر پایه باکتری و یا آنزیم جهت پاکسازی جیوه معدنی و جیوه آلی از مناطق آلوده می باشد. برای تثبیت پروتئین بر روی بستر بیوراکتور، نیاز به خالص سازی پروتئین های *MerA* و *MerB* و بهینه سازی فعالیت آنزیم در شرایط خارج از سلول می باشد.

مطالعه حاضر با هدف همسانه سازی هم زمان ژن های *merA* و *merB* در وکتور بیانی (+) pET28a به منظور تولید همزمان آنزیم های فعال *MerA* و *MerB* طراحی گردید.

مواد و روش ها

الف) جداسازی و تکثیر ژن های merA برای این کار ابتدا از باکتری کلبسیلا پنمونیه حاوی ژن *merA* استخراج پلاسمید (pKP048) به روش پیشنهاد شده توسط بیربوم (Birnbom) و دولی (Doly) صورت گرفت (۱۴). پلاسمید های استخراج شده از این روش می توانند برای برش با اندونوکلازها و متعاقباً در همسانه سازی استفاده شود. واکنش PCR (۱۵) به منظور تکثیر ژن های *merA* و *merB* با استفاده از جفت آغازگرهای رفت و برگشت که بر اساس توالی های موجود در سایت NCBI با شماره دستیابی M15049.1 و KJ187752.1 به ترتیب برای ژن

حرارتی منتقل شد (۱۹). نتیجه نشان دهنده رشد تعدادی کلنی بر روی محیط گزینشی حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین بود.

د) تایید ساخت وکتور نوترکیب pET28a(+)-merA-merB :
۱- واکنش زنجیره ای پلی مرز بر روی کلنی های نوترکیب: ۱۸ کلنی نوترکیب با استفاده از خلال دندان استریل، به عنوان DNA الگو به سایر مواد محصول واکنش PCR اضافه شد و الکتروفورز محصول PCR حاصل از کلنی های نوترکیب انجام شد.

۲- واکنش زنجیره ای پلی مرز بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی ها: پلاسمید ۲ کلنی مشاهده شده حاصل از واکنش اتصال به روش Birnboim and Doly استخراج (۱۴) و واکنش زنجیره ای پلی مرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی ها صورت گرفت (۱۵).

۳- واکنش همضم بر روی پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده: برای اطمینان کامل از تایید حضور پلاسمید نوترکیب حاوی ژن های *merA* و *merB* در کلنی های حاصل از واکنش اتصال، از روش همضم آنزیمی استفاده گردید. پلاسمیدهایی که وجود ژن در آن ها از طریق واکنش زنجیره ای پلی مرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* تایید شده بود، توسط آنزیم های برشی *HindIII* و *XbaI* برش داده شدند.

۴- تعیین توالی ژن همسانه سازی شده: برای بررسی توالی ژن های همسانه سازی شده *merA* و *merB* به صورت جداگانه، ۳ نمونه DNA پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-merA-merB تایید شده به منظور تعیین توالی براساس پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده از روی وکتور (۲۰) به شرکت ماکروژن کره جنوبی به منظور توالی یابی ارسال گردید.

توالی های ثبت شده در NCBI برای ژن *merA* با شماره دستیابی KJ187752.1 و ژن *merB* با شماره دستیابی M15049.1 با نتایج حاصل از توالی یابی، با استفاده از دو نرم افزار BLAST و Multialign مقایسه گردیدند. نتیجه حاصل از توالی یابی درستی و تطابق کامل توالی هر سه نمونه پلاسمید

بین ژن *merB* و وکتور pET28a(+) در دمای ۱۵ درجه سلیسیوس به مدت یک ساعت انجام گرفت.

وکتور نوترکیب pET28a(+)-merB به باکتری *شریشیا کلی* سویه Top10 منتقل شد. نوترکیب بودن وکتور pET28a(+)-merB با روش های PCR روی پلاسمید، همضم برشی و توالی یابی تایید گردید. وکتور نوترکیب pET28a(+)-merB به دست آمده به داخل باکتری *شریشیا کلی* منتقل و تکثیر شد. به منظور همسانه سازی ژن هدف، ابتدا وکتور مورد نظر با روش های استخراج پلاسمید از باکتری استخراج و خالص سازی شد و در مرحله بعدی به وسیله همان آنزیم ها برش دهنده ژن هدف، وکتور برش داده شد. با توجه به اینکه وکتور مورد نظر حالت حلقوی داشت، پس از واکنش همضم با دو آنزیم برش دهنده *NheI/BamHI* ۱۰۰ μl به حالت خطی در آمده و بر روی ژل LMP الکتروفورز شد و بانندی به طول تقریبی ۵۹۵۰ جفت باز، به منظور همسانه سازی ژن هدف از روی ژل خالص سازی گردید. اجزای واکنش همضم به حجم ۵۰ میکرولیتر عبارت بود از ژن *merA* و نیز وکتور هر کدام به مقدار ۲۰۰ نانوگرم، Buffer Tango10X به مقدار ۵ میکرولیتر، ۵ واحد از هر کدام از آنزیم های برشی *NheI/BamHI*، آب مقطر استریل ۱۵ میکرولیتر که به صورت همضم دوگانه در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۶ ساعت برش داده شدند (۱۷).

ج) همسانه سازی DNA ژن *merA* در وکتور بیانی نوترکیب pET28a(+)-merB پس از همضم آنزیمی، ژن *merA* و وکتور نوترکیب pET28a(+)-merB از روی ژل آگاروز جداسازی و با استفاده از کیت (Expin™ Combo GP DNA;) شرکت GeneAll خالص سازی انجام شد. واکنش اتصال بین ژن *merA* و وکتور pET28a(+)-merB (اجزای واکنش شامل: ژن *merA* به ۳۰۰ ng/μl، وکتور pET28a(+)-merB به ۱۰۰ ng/μl، آنزیم T4 DNA Ligase (1u)، Buffer (10x) دو میکرولیتر و آب ۳ میکرولیتر) به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ °C انجام شد (۲۱). مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول اتصال به ازای هر بار تراریزش، به سلول های *شریشیا کلی* سویه Top10 مستعد شده با ۷۵ mM CaCl₂ با کمک شوک

بودن آنزیم های MerA و MerB تولیدی از وکتور نوترکیب، میزان رشد باکتری های *اشریشیا کلی* سویه BL21 حاوی وکتور نوترکیب، باکتری های *اشریشیا کلی* سویه BL21 فاقد ژن های *merA* و *merB* در زمان های مختلف در محیط حاوی جیوه اندازه گیری و به صورت نمودار ترسیم گردید. باکتری های *اشریشیا کلی* حاوی وکتور بدون ژن هدف و باکتری های تراریزش شده با وکتور pET28a(+)-merA-merB پس از رسیدن به $OD_{600} = 0.3$ به چهار فلاسک منتقل شدند. در تیمارهای مستقل به هر کدام از نمونه ها مقادیر جیوه ۵، ۱۰ و ۲۰ ppm اضافه شد (۲۲) و به همراه یک تیمار شاهد بدون جیوه در انکوباتور شیکردار ۳۷ در دمای درجه سلیسیوس قرار داده شدند. میزان OD_{600} باکتری ها پس از گذشت مدت زمان ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دو تکرار اندازه گیری گردید. (ط) بررسی میزان جیوه آلی و معدنی در محیط کشت باکتری به روش (ICP Inductively Coupled Plasma): باکتری ها پس از رسیدن به OD_{600} حدود ۰/۳ به فلاسک های جداگانه منتقل شدند. در تیمارهای مستقل به هر یک از نمونه ها مقادیر ۲۰ و ۴۰ ppm جیوه اضافه شد و به همراه تیمارهای شاهد بدون جیوه در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سلیسیوس قرار داده شد. میزان جیوه محیط کشت باکتری ها پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت با دو تکرار اندازه گیری شدند (۲۳).

یافته ها

الف) تکثیر ژن *merA* پس از استخراج پلاسمید از باکتری *کلبسیلا نمونیه* واکنش PCR به منظور تکثیر ژن *merA* انجام گرفت. محصول PCR باند ۱۶۶۸ جفت بازی را بر روی ژل الکتروفورز نشان داد که با اندازه مورد انتظار برای ژن *merA* مطابقت داشت (شکل ۱).

جهت تایید تکثیر ژن *merA* واکنش هضم با کمک آنزیم *EcoRI* انجام شد، زیرا با توجه به توالی های موجود در NCBI سایت برشی آنزیم در وسط ژن کاهنده جیوه معدنی قرار دارد و بعد از واکنش هضم، دو قطعه با طول ۱۰۲۳ و ۶۶۳ جفت باز ایجاد شد. مشاهده این دو قطعه بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بیانگر

ارسال شده را با نمونه ثبت شده در NCBI برای ژن *merA* و ژن *merB* نشان داد.

ه) انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21 پس از تایید پلاسمیدهای نوترکیب، این پلاسمیدها به باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21 به روش شوک حرارتی تراریزش شدند و در محیط LB جامد حاوی کانامایسین ($50 \mu\text{g/ml}$) کشت شدند. یک روز بعد با یکی از تک کلنی های رشد کرده کشت خطی تهیه شد.

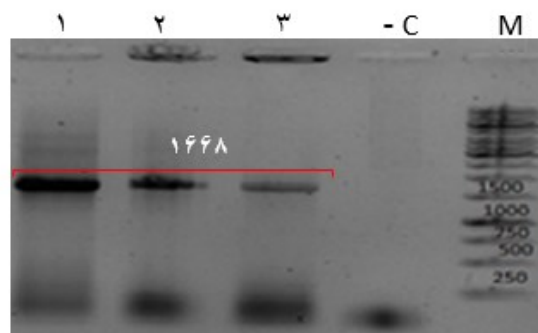
و) بررسی بیان ژن های *merA* و *merB* به روش SDS-PAGE: باکتری نوترکیب در ۵۰ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین پیش کشت شده و به مدت یک شبانه روز در دمای 37°C با سرعت rpm ۱۸۰ درون گرمخانه قرار گرفت. در مرحله بعد، ۳ میلی لیتر از پیش کشت باکتریایی، به فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین ($50 \mu\text{g/ml}$)، منتقل شد. فلاسک در گرمخانه شیکر دار با سرعت rpm ۱۸۰ قرار داده شد و پس از رسیدن تراکم باکتری به $OD_{600} = 0.8$ ، ۲۰ میلی لیتر از آن به عنوان نمونه شاهد پیش از القا برداشته، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به فلاسک اضافه و برای بررسی بیان در ساعات صفر، ۱۲ و ۱۶ ساعت نمونه برداری صورت گرفت. در کنار این تیمارها، القای کنترل منفی (باکتری حاوی پلاسمید فاقد ژن هدف) با همین شرایط آماده شد (۲۰). تمامی نمونه ها پس از اتمام مدت القا برای بارگذاری در SDS-PAGE آماده شدند (۲۴). مارکر پروتئینی SMO431 شرکت فرمتاز به عنوان نشانگر در کنار نمونه ها بارگذاری شد. (ز) تخلیص پروتئین: برای این منظور، پروتئین دارای دنباله هیستیدینی موجود در وکتور pET28a(+) از پروتئین های درون سلولی دیگر، از کروماتوگرافی تمایلی با کمک ستون تمایلی نیکل آگاروز (Ni-NTA Nitritoltri acetic acid) استفاده شد (۲۱).

ح) بررسی عملکرد باکتری های دارای وکتور نوترکیب در محیط حاوی جیوه معدنی و جیوه آلی: به منظور مشاهده افزایش مقاومت به جیوه در باکتری های تراریخته و عملکردی

merA و وکتور نوترکیب pET 28a (+) در دمای ۱۵ درجه سلیسیوس، به مدت ۴ ساعت انجام شد. برای بررسی تشکیل وکتور نوترکیب pET28a(+)-merA-merB، واکنش PCR بر روی کلنی های نوترکیب، واکنش PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های نوترکیب، هضم آنزیمی و توالی یابی صورت گرفت. با الکتروفورز محصول PCR حاصل از کلنی های نوترکیب، مشاهده شد که ۲ عدد از کلنی های مربوط به چاهک های ۱-۱۸ باند مربوط به ژن *merA* را که تقریباً ۱۶۶۸ جفت باز بود، نشان دادند (شکل ۳) که نشان از صحت انجام همسانه سازی بود.

با الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز حاصل از پلاسمید استخراج شده، مشاهده شد که ۳ عدد از پلاسمیدهای مربوط به کلنی های ۳، ۶ و ۷ باند مربوط به ژن *merA* را که تقریباً ۱۶۶۸ جفت باز بود، نشان دادند که نشان از صحت انجام همسانه سازی بود (شکل ۴).

شماتیک سازه نوترکیب pET28a(+)-merA-merB در حالت حلقوی در شکل ۵ نشان داده شده است. پلاسمیدهای نوترکیب که در واکنش زنجیره ای پلی مرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* وجود ژن هدف در آن ها تایید شده بود، توسط آنزیم های برشی *HindIII* و *XbaI* برش داده شدند. سپس با بارگذاری محصول هضم در ژل آگارز، همان طور که انتظار می رفت دو قطعه به اندازه تقریبی ۲۳۰۷ جفت باز مربوط به ژن های ترکیبی *merA-merB* (اندازه ژن *merA* ۱۶۶۸ و ژن

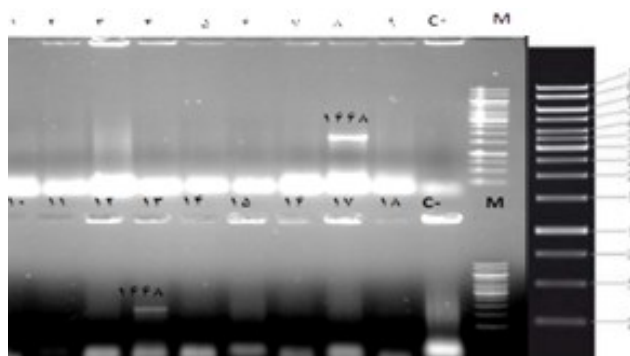


شکل ۱: تصویر الکتروفورز (ژل آگاروز ۱٪) محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* روی DNA کلبسیلا نمونه. باند ۱۶۶۸ جفت بازی با اندازه مورد نظر برای ژن *merA* مطابقت داشت. ستون های ۱ و ۲ تکرارهای مستقل و -C کنترل منفی هستند (M: مارکر 1Kb).

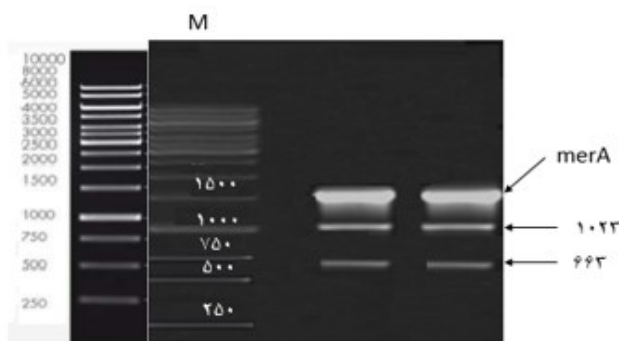
تایید تکثیر ژن کاهنده جیوه معدنی در محصول PCR می باشد (شکل ۲).

در گام بعدی، ژن *merA* و وکتور نوترکیب pET28-merBa(+) با آنزیم های *BamHI* و *NheI* برش داده شدند. محصول هضم شده بر روی ژل آگاروز با نقطه ذوب پایین (LMP 1%) بارگذاری شد و باند مربوط به ژن *merA* با اندازه ۱۶۶۸ جفت باز و باند مربوط به pET28a (+)-merB حدوداً با طول ۵۹۵۰ جفت باز، برای همسانه سازی ژن *merA* از روی ژل جداسازی و به منظور واکنش لیگاسیون با استفاده از کیت شرکت Gen all خالص سازی شدند.

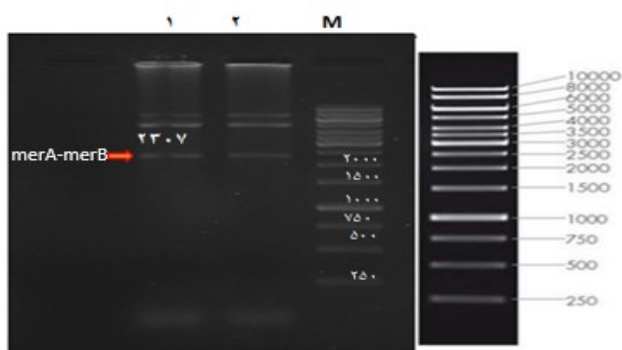
ب) همسانه سازی ژن *merA* در وکتور نوترکیب pET28a (+)-merB و تایید آن: واکنش لیگاسیون بین ژن



شکل ۳: تصویر الکتروفورز محصول واکنش PCR روی کلنی های باکتری. -C: نمونه بدون DNA می باشد. مشاهده باند ۱۶۶۸ جفت بازی نشان می دهد که ۲ تا از کلنی های باکتری حاوی وکتور نوترکیب هستند (M: مارکر 1Kb).



شکل ۲: تصویر الکتروفورز محصول واکنش هضم ژن *merA* با آنزیم *EcoRI* بر روی ژل آگاروز ۱٪. با توجه به توالی های موجود در NCBI، دو باند مورد انتظار به اندازه ۱۰۲۳ و ۶۶۳ جفت باز مشاهده شد که بیانگر تایید ژن *merA* در محصول PCR می باشد (M: مارکر 1Kb).



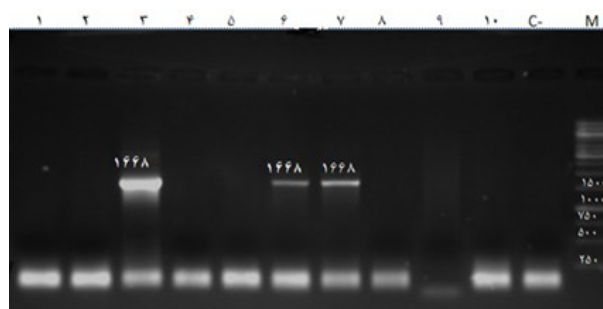
شکل ۶: تصویر الکتروفورز محصول برش وکتور نوترکیب pET28a+-merB-merA با آنزیم های *Hind*III و *Xba*I روی ژل آگاروز ۱٪ و جدا شدن merA+merB با اندازه ۲۳۰۷ جفت باز (M: مارکر 1Kb).

اندازه گیری میزان رشد باکتری ها در محیط حاوی جیوه آلی و معدنی: نتایج نشان داد که رشد باکتری های اشریشیا کلی حاوی وکتور فاقد ژن های *merA* و *merB* تا ۱۲ ساعت پس از ریختن جیوه به شدت تحت تاثیر محیط حاوی جیوه قرار می گیرد و حتی قادر به رشد در مقادیر ۱۰ و ۲۰ ppm جیوه نمی باشند (شکل ۹).

باکتری های حاوی وکتور نوترکیب pET28a(+)-merA-merB دارای قابلیت رشد در محیط حاوی جیوه بودند. با این حال با افزایش میزان جیوه به محیط، رشد باکتری ها نسبت به نمونه شاهد به ویژه در ساعت های اولیه کاهش یافت. بنابراین نتایج توانایی رشد باکتری های اشریشیا کلی حاوی وکتور بدون ژن هدف و تراریخته نشان دهنده عدم مقاومت باکتری های اشریشیا کلی بدون وکتور نوترکیب و عملکرد پروتئین های *MerA* و *MerB* در باکتری های تراریخته و افزایش مقاومت آن ها نسبت به جیوه موجود در محیط می باشد (شکل ۱۰).

د) اندازه گیری میزان جیوه آلی و معدنی در محیط کشت باکتری به روش ICP (*Inductively Coupled Plasma*): نتایج حاصل بیانگر این است که باکتری تراریخته حاوی وکتور *PET28a+merB-merA* از توان بالقوه ای برای پاکسازی جیوه آلی و معدنی برخوردار است. به طوری که از ۴۰ ppm جیوه ریخته شده در محیط فقط ۴ ppm جیوه پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت باقی ماند.

ه) بررسی بیان ژن *merA* و ژن *merB* به روش SDS-PAGE

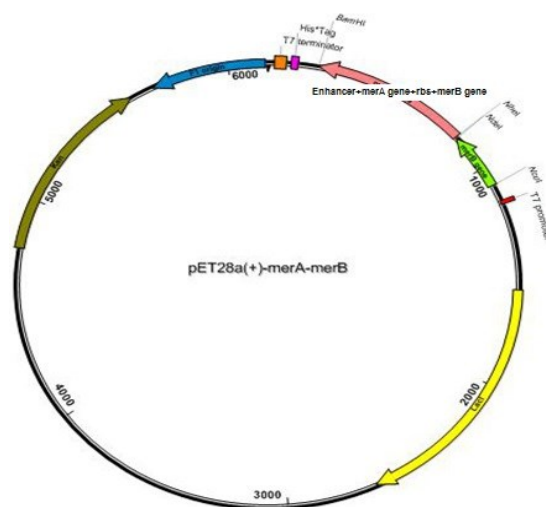


شکل ۴: تصویر الکتروفورز محصول PCR روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های رشد یافته در محیط گزینشی کانامایسین-دار. C- نمونه بدون DNA می باشد. مشاهده باند ۱۶۶۸ جفت بازی نشان می دهد که کلنی های باکتری حاوی وکتور نوترکیب هستند (M: مارکر 1Kb).

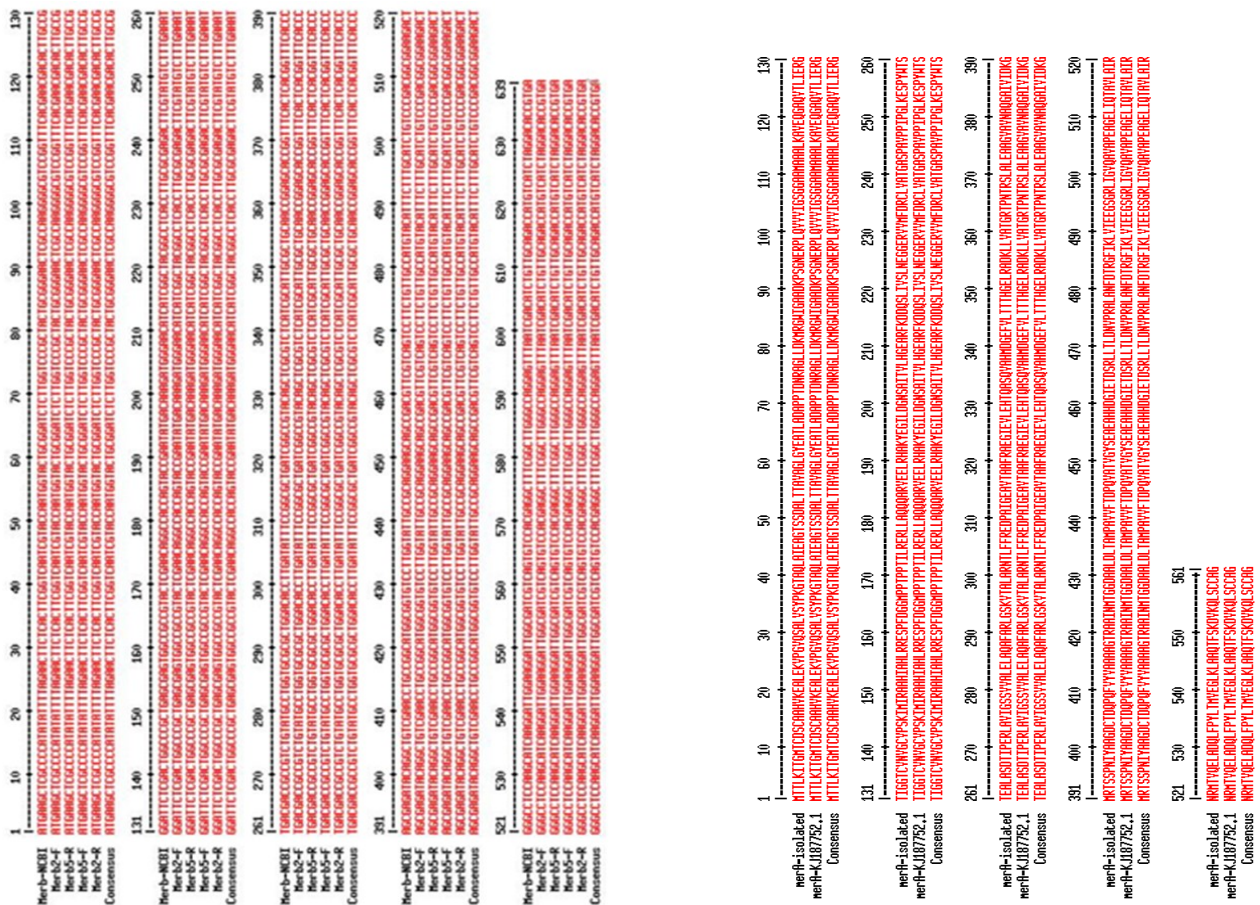
merB ۶۳۹ جفت باز) قطعه دیگر به اندازه ۵۳۱۱ جفت باز مربوط به وکتور pET28a(+), مشاهده شد. با توجه به تشکیل دو قطعه پیش بینی شده از برش آنزیمی، پلاسمید نوترکیب تایید گردید (شکل ۶).

نتایج مقایسه توالی های پلاسمیدهای نوترکیب با ژن های *merA* و ژن های *merB* موجود در NCBI، درستی و مطابقت کامل *merB* و *merA* درج شده در پلاسمید را با توالی ژن های *merB* و *merA* موجود در NCBI تایید کرد که بیانگر همسانه سازی صحیح ژن ها در وکتور بیانی pET28a (+) می باشد (شکل های ۷ و ۸).

ج) بررسی میزان عملکرد پروتئین های *MerA* و *MerB*

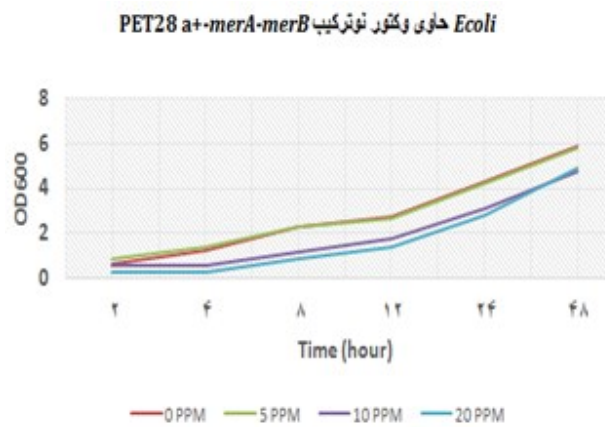


شکل ۵: شماتیک وکتور نوترکیب تهیه شده حاوی ژن های *merA* و *merB* در حالت حلقوی

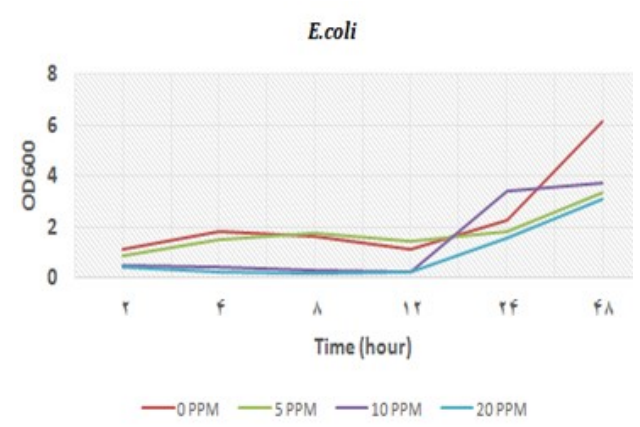


شکل ۸: زیرهمچینی توالی DNA ژن merB حاصل از وکتور همسانه سازی شده با توالی همان ژن در NCBI. رنگ قرمز تمام توالی نوکلئوتیدی مورد توافق بیانگر شباهت کامل توالی ژن merB حاصل از وکتور همسانه سازی شده با توالی ژن merB موجود در NCBI می باشد (۲۴).

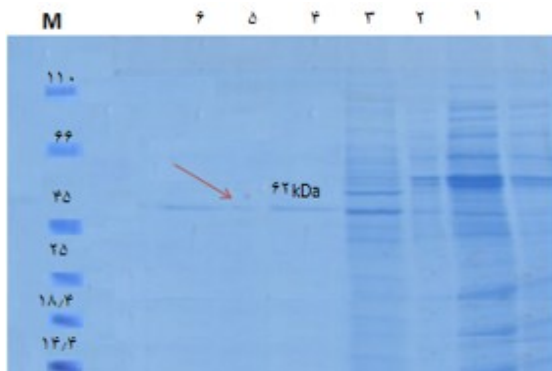
شکل ۷: زیرهمچینی توالی آمینواسیدی پروتئین حاصل از وکتور همسانه سازی شده MerA با توالی پروتئین MerA موجود در NCBI. رنگ قرمز تمام آمینواسیدهای مورد توافق بیانگر شباهت کامل توالی آمینواسیدی پروتئین MerA حاصل از وکتور همسانه سازی شده با توالی پروتئین MerA موجود در NCBI می باشد (۳۴).



شکل ۱۰: تاثیر میزان جیوه در محیط کشت روی رشد باکتری اشریشیا کلسی. تراریزش شده با merA(+)-pET28a-merB.



شکل ۹: تاثیر میزان جیوه در محیط کشت روی رشد باکتری اشریشیا کلسی حاوی وکتور بدون ژن هدف.



شکل ۱۲: تصویر SDS-PAGE تخلیص پروتئین روی ژل آکریل آمید ۱۲/۵ درصد. (۱) لودینگ، (۲) واشینگ، (۳) Elution1، (۴) Elution2، (۵) Elution3، (۶) Elution4، M: مارکر.

بیشترین انتشار جیوه به درون محیط زیست از سال ۱۸۰۰ رخ داده و با انقلاب صنعتی بر اساس سوختن زغال سنگ، سنگ معدن فلزی، ذوب و استخراج معادن طلا مرتبط است و به طور تدریجی در جهان مقدار آن افزایش یافته است. به ویژه در آسیا، آمریکای جنوبی وضعیت بدتر شده که نیازمند مقررات و قوانین سختگیرانه و تعیین اقدامات پالایش هست (۲۵).

گزارش های متعددی از باکتری های مقاوم به جیوه به داشتن قابلیت جذب زیستی جیوه وجود دارد بسیاری از گونه های سودوموناس، باکتری های اسید لاکتیک (LAB) و باسیلوس در شرایط زیست محیطی برای جذب جیوه ارائه شده است (۲۶-۲۹). عیسی (Isa) و همکاران مکانیسم جدید دیگری برای حذف جیوه با کاربرد بالقوه زیست پالایی گزارش کردند (۳۰). آنها گزارش نمودند که باکتری کلبسیلا نمونه یک ارگانوتیول فرار بنام دی متیل دی سولفات (DMDS) تولید می کند که به طور کارآمد می تواند جیوه را رسوب دهد. با این حال ماهیت شیمیایی رسوب مشخص نشد. علاوه بر این، DMDS یک ماده خطرناک و سولفید هیدروژن سمی است که می تواند خسارت جبران ناپذیری به محیط زیست وارد نماید و این عوامل یکی از علل شکست این پروژه بود.

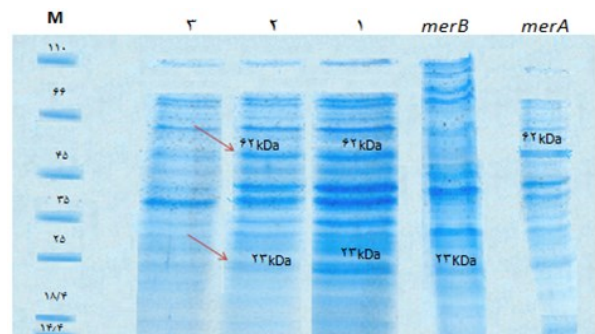
بیوتکنولوژی، با استفاده از روش مهندسی ژنتیک راه های جدیدی در تحقیقات زیست پالایی جیوه باز می کند. یکی از این روش های جدید، انتقال اپرون mer به سویه باکتری بسیار مقاوم در برابر تابش دینوکوکوس ردیودورانس

بررسی بیان پروتئین ژن هدف بر روی ژل آکریل آمید، پروتئین MerA با وزن مولکولی ۶۲ کیلودالتون و پروتئین MerB با وزن مولکولی ۲۳ کیلو دالتون را نشان داد. علت اینکه وکتور pET28a (+) در باکتری اشریشیا کلی سویه BL21 یک وکتور نشستی بود، بدون القا با IPTG هم قادر به بیان ضعیف پروتئین است. بنابراین باند ضعیف مربوط به MerA و MerB در نمونه پیش از القا مشاهده گردید (شکل ۱۱).

(و) بررسی خالص بودن پروتئین: برای این منظور، پروتئین دارای دنباله هیستیدینی موجود در وکتور نوترکیب از پروتئین های درون سلولی دیگر از کروماتوگرافی تمایلی با کمک ستون تمایلی نیکل آگارز Nitrotri acetic acid (Ni-NTA) استفاده شد و باند مورد نظر ۶۲ کیلودالتونی مربوط به merA خالص سازی شد (شکل ۱۲).

بحث

به دلیل اثرات مضر جیوه بر شکل زندگی، آن یک تهدید جهانی برای انسان و سایر موجودات است. اگرچه جیوه یک عنصر طبیعی است که در سراسر جهان وجود دارد. فعالیت های انسانی به ویژه استخراج معادن و سوزاندن سوخت های فسیلی باعث افزایش ورود جیوه به درون محیط زیست شده است.



شکل ۱۱: تصویر SDS-PAGE پروتئین روی ژل آکریل آمید ۱۲/۵. باند مربوط به بیشترین بیان پروتئین MerA با اندازه ۶۲ کیلودالتون و پروتئین MerB با اندازه ۲۳ کیلودالتون، زمان ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس در چاهک ۱ قابل مشاهده است. چاهک ۲ مدت القای ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس. چاهک ۳ مربوط به نمونه پیش از القا می باشد. M: مارکر.

بالایی برای حذف ترکیبات آلی جیوه نشان داد. بر این اساس در شرایط آزمایشگاهی خالص سازی *merB* ها در حال پیشرفت است (۳۳).

نتیجه گیری

پس از ساخت وکتور نوترکیب ژن احیاکننده جیوه معدنی و جیوه آلی و تایید وکتور نوترکیب ساخته شده از طریق هضم آنزیمی، PCR و توالی یابی، رشد باکتری های تراریزش شده در محیط حاوی جیوه نشان داد که مقاومت آن ها نسبت به باکتری های بدون وکتور نوترکیب به میزان قابل توجهی افزایش یافت. این مساله نشان دهنده عملکرد بالای پروتئین های *MerA* و *MerB* تولید شده در حذف جیوه و افزایش مقاومت باکتری ها می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه به دلیل حمایت مالی این تحقیق کمال امتنان را دارند.

(*Deinococcus radiodurans*) بود (۳۱).

بایی (Bae) و همکاران در سال ۲۰۰۱ انتقال ژن *merR* به درون *اشریشیا کلی* را مهندسی کردند که با اتصال بسیار اختصاصی به جیوه (II) باعث شد که شش برابر بیشتر از نوع وحشی جیوه را پاکسازی نماید (۳۲).

از آنجایی که دی متیل دی سولفات (DMDS) تولیدی از کلبسیلا نمونه خطرناک است، در این مطالعه آنزیم کاهنده جیوه معدنی (*merA*) مربوط به کلبسیلا نمونه خالص سازی و به وکتور pET28a-merB (+) از قبل طراحی شده تراریزش شد. سپس برای بررسی زیست پالایی به باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21 منتقل شد. اگرچه پیش بینی شده که ممکن است بین *merA* و *merB* ارتباطی وجود داشته باشد. اما جزئیات تعامل *merB-merA* همچنان ناشناخته باقی مانده است (۲۹).

طیف ضعیف مقاومت به جیوه از باسیلوس سویه RCGO7 و فرم های دیگری از ژن های *merB* و ژن های *merB* هتروزیگوس به درون *اشریشیا کلی* حساس به جیوه درج شدند. ترکیب *merA* باسیلوس و *merB* سایر موجودات کارایی

References

1. Houserova P, Kuban V, Spurny P, Habarta P. Determination of total mercury and mercury species in fish and aquatic ecosystems of Moravian rivers. *Veterinarni Medicina*. 2006; 51: 100-110.
2. Mahbub KR, Krishnan K, Megharaj M, Naidu R. Bioremediation potential of a highly mercury resistant bacterial strain *Sphingobium* SA2 isolated from contaminated soil. *Chemosphere*. 2016; 144: 330-337.
3. Wagner-De Obler I. Bioremediation of mercury: Current research and industrial applications. Horizon Scientific Press. 2013.
4. Meagher RB. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Cur Opin Plant Biol*. 2000; 3(2): 153-162.
5. Abioye OP. Biological remediation of hydrocarbon and heavy metals contaminated soil. In: *Soil contamination*. Edited by Simone Pascucci. INTECH open Access Publisher. 2011; pp. 127-142.
6. Kafilzadeh F, Mirzayie N, Kargar M, Kargar MO. Investigation on bacterial ability of KOR river in mercury bioremediation. *J Environ Sci Technol*. 2000; 11(1): 97-106. [In Persian]

7. Dash HR, Das S. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial *mer* genes. Int Biodeterior Biodegrad. 2012; 75: 207-213.
8. Moore B. A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. Lancet.1960; 2: 453-458
9. Horn JM, Brunke M, Deckwer WD, Timmis KN. Pseudomonas putida strains which constitutively overexpress mercury resistance for bioremediation of organomercurials pollutants. Appl Environ. 1994; 60: 357-362.
10. Barkay T, Miller SM, Summers AO. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiol Rev. 2003; 27: 355-384.
11. Ray S, Gachhui R, Pahan K, Chaudhury J, Mundal A. Detoxification of mercury and organomercurials by nitrogen fixing soil bacteria. J Biosci.1989; 14: 173-182.
12. Frischmut A, Wappen P, Deckwer WD. Microbial transformation of mercury (II): I. Isolation of microbes and characterization of their transformation capabilities. J Biotechnol. 1993; 29: 39-55.
13. Kafilzadeh F, Mirzaei N, Kargar M. The ability of bacteria Kur River in biological removal of mercury. Environ Sci. 2009; 11: 97-106. [In Persian]
14. Birnboim HC, Doly JA. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979; 7: 1513-1523.
15. Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols. Methods Mol Biol. 2003; 226: 3-6.
16. Lu G, Moriyama EN. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. Briefings Bioinformatics. 2004; 5(4): 378-388.
17. Protocols and applications guide, Third Edition. Promega Corporation; 1996.
18. NCBI. 2018. Plasmid pDU1358 (from *S. marcescens*) mercurial resistance (*mer*) operon encoding organomercurial lyase (*merB*), mercury resistance protein (*merD*), complete cds, and mercury reductase (*merA*), 3' end. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M15049.1>
19. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1989.
20. Raymond S, Weintraub L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. Sci. 1959; 130 (3377): 711.
21. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, Christiansen G, Moreno-Roman P, Gutierrez AH. Role of metal ions on the activity of *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamidase. Am J Trop Med Hygiene. 2012; 87: 61-153.
22. Noghabi KA, Zahiri HS, Yoon SC. The production of a cold-induced extracellular biopolymer by *Pseudomonas fluorescens* BM07 under various growth conditions and its role in heavy metals absorption. Process Biochem. 2007; 42: 847-855.
23. Giesen Ch, Waenting L, Panne U, Jakubowski N. History of inductively coupled plasma mass

- spectrometry-based immunoassays. *Spectrochimica Acta Part B*. 2012; 76: 27-39.
24. Farshbaf Benam M. Genetic engineering of bacteria for bioremediation of organic mercury by nano technology. Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. 2015; 74-75.
 25. Dash HR, Das S. Bioremediation of inorganic mercury through volatilization and biosorption by transgenic *Bacillus cereus* BW-03(p PW-05). *Int Biodeterior Biodegrad*. 2015; 103: 179-185.
 26. Noghahi KA, Zahiri HS, Yoon SC. The production of a cold-induced extracellular biopolymer by *Pseudomonas fluorescens* BM07 under various growth conditions and its role in heavy metals absorption. *Process Biochem*. 2007; 42: 847-855.
 27. François F, Lombard C, Guigner J-M, Soreau P, Brian-Jaisson F, Martino G, Vandervennet M, Garcia D, Molinier A-L, Pignol D. Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78: 1097-1106.
 28. Kinoshita H, Sohma Y, Ohtake F, Ishida M, Kawai Y, Kitazawa H, Saito T, Kimura K. Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Res Microbiol*. 2013; 164:701-709.
 29. Deng X, Jia P. Construction and characterization of a photosynthetic bacterium genetically engineered for Hg²⁺ uptake. *Bioresource Technol*. 2011; 102: 3083-3088.
 30. Essa AMM, Creamer NJ, Brown NL, Macaskie LE. A new approach. to the remediation of heavy metal liquid wastes via off-gases produced by *Klebsiella pneumoniae* M426. *Biotechnol Bioeng*. 2006; 95: 576-583.
 31. Brim H, McFarlan SC, Fredrickson JK, Minton KW, Zhai M, Wackett LP, Daly MJ. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnol*. 2000; 18: 85-90.
 32. Bae W, Mehra RK, Mulchandani A, Chen W. Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67: 5335-5338.
 33. Huang CC, Narita M, Yamagata T, Endo G. Identification of three *merB* genes and characterization of a broad-spectrum mercury resistance module encoded by a class II transposon of *Bacillus megaterium* MB1. *Gene*. 1999; 239: 361-366.
 34. Khoshniat P. Isolation and cloning of mercuric reductase *merA* gene to a suitable expression vector and study of its expression. Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. 2015; 74-75.



Bioremediation of both mineral and organic mercury via the construction of recombinant vector pET28a(+)-merA-merB

Hamideh Baghi Sefidan¹, Alireza Tarinejad²

¹M.Sc. student, Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. ²Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Mercury due to stability and the high cost of conventional refinement methods is a major environmental problem in the world. Biological methods such as the use of bacterial-based bio-reactors or their enzymes are one of the bioremediation methods. MerA and MerB bacterial enzymes are used to decompose organic and inorganic compounds of mercury. This study was designed to clone *merA* and *merB* genes into the pET28a (+) expression vector for the production of MerA and MerB active enzymes.

Material & Methods: At first *merA* and *merB* genes were isolated from mercury-resistant bacterial genome and subsequently cloned into pET28a(+) expression vector. Confirmation of cloning the target gene was achieved by PCR and restriction enzymes. Then pET28a(+)-merA-merB recombinant vector was transformed into *E.coli* strain BL21. To assess resistance to inorganic and organic mercury by transformed bacteria and the functionality of the enzyme produced by a recombinant vector, the growth of *E.coli* strain BL21 containing the recombinant vector and without it were measured by adding mercury into the environment during 48 h.

Results: Recombinant bacterial growth in medium containing different levels of inorganic and organic mercury was measured at different times. The result showed that the growth of *E. coli* containing no target gene in the vector was affected after introducing mercury into the medium till 12 hours so that bacteria would not be able to grow at 10 and 20ppm mercury concentrations. However, transformed bacteria with pET28a(+)-merA-merB vector showed suitable growth in a mercury-containing medium. The SDS-PAGE analysis of extracted proteins from transformed bacteria with pET28a(+)-merA-merB vector on 12.5% acrylamide gel showed the highest MerA (62kDa) and MerB enzymes (23kDa) expression following 16 hours induction with 1mM IPTG at 37°C.

Conclusion: Growth ability of transformed *E.coli* with recombinant vector indicates MerA and MerB proteins function in transformed bacteria. Furthermore, increasing resistance of recombinant bacteria to inorganic and organic mercury indicates that heavy metal pollution in the environment can be cleaned up with proper management through the construction of a recombinant vector.

Keywords: Bioremediation, *merA* gene, *merB* gene, Cloning.

Correspondence to: Alireza Tarinejad

Tel: +98 4134327572

E-mail: atarinejad@yahoo.com

Journal of Microbial World 2018, 11(3): 230-242.