



زیست پالایی جیوه معدنی از طریق ساخت وکتور نوترکیب pET 21a(+)-merA

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

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان،
^۲دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان.

چکیده

سابقه و هدف: ورود جیوه معدنی 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 راهکارهای مناسب و عملی برای پاکسازی آلاینده ها از محیط محسوب می گردد. مطالعه حاضر با هدف ساخت وکتور نوترکیب حاوی ژن *merA* و نیز بررسی بیان آن به منظور پاکسازی جیوه انجام گردید.

مواد و روش ها: ابتدا ژن *merA* از ژنوم باکتری مقاوم به جیوه جداسازی و در داخل وکتور بیانی pET21a(+) کلون گردید. صحت همسانه سازی ژن مورد نظر از طریق واکنش PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت. وکتور نوترکیب pET21a(+)-*merA* به درون باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21 کلون شد. برای مشاهده افزایش مقاومت به جیوه معدنی در باکتری تراریخته و عملکردی بودن آنزیم تولیدی از وکتور نوترکیب، میزان رشد باکتری های *اشریشیا کلی* سویه BL21 حاوی وکتور نوترکیب به همراه باکتری های *اشریشیا کلی* سویه BL21 فاقد ژن *merA* در محیط حاوی جیوه معدنی در مدت ۴۸ ساعت اندازه گیری شدند. **یافته ها:** نتایج نشان داد که رشد باکتری *اشریشیا کلی* حاوی وکتور بدون ژن هدف تا ۱۲ ساعت پس از ریختن جیوه به شدت تحت تاثیر محیط حاوی جیوه قرار گرفته و قادر به رشد در مقادیر ۱۰ و ۲۰ ppm جیوه نمی باشند. در حالی که باکتری حاوی وکتور نوترکیب pET21a(+)-*merA* دارای قابلیت رشد خوبی در محیط حاوی جیوه بودند. SDS-PAGE پروتئین های باکتری حاوی وکتور نوترکیب بر روی ژل آکریل امید نشان داد که بیشترین بیان پروتئین MerA (با اندازه ۶۲ kDa)، پس از ۱۶ ساعت القا با IPTG یک میلی مولار در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به دست می آید.

نتیجه گیری: در مجموع توانایی رشد باکتری های *اشریشیا کلی* حاوی وکتور نوترکیب، نشان دهنده عملکرد پروتئین MerA در باکتری های تراریزش شده می باشد. همچنین افزایش مقاومت باکتری نوترکیب به جیوه معدنی موجود در محیط بیانگر این موضوع است که می توان آلاینده های فلزات سنگین در محیط زیست را با مدیریت مناسب از طریق ساخت وکتور نوترکیب پاکسازی نمود. **واژگان کلیدی:** زیست پالایی، جیوه، ژن *merA* وکتور نوترکیب.

پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۵

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۵

مقدمه

بزرگ آلودگی جیوه در محیط زیست هستند. فاضلاب ها منشا وسیع دو نوع جیوه آلی و غیرآلی مانند جیوه عنصری، جیوه متیل کلرید و دی متیل جیوه می باشند. جیوه به عنوان یک آلاینده زیست محیطی بزرگ، جزو توکسین های قابل تجمع

جیوه یکی از فلزات سنگین سمی است که از طریق آلاینده های صنعتی و رسوبات آنها در اکوسیستم، به طور وسیعی گسترش یافته است. سوخت های فسیلی یکی از منابع

(* آدرس برای مکاتبه: دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی.

شده و به اتمسفر باز می‌گردد. به این ترتیب باکتری‌ها قادر به حذف این فلز سمی از محیط اطراف خود هستند (۱۰). اولین مطالعه بر روی مقاومت باکتری‌ها نسبت به جیوه در *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) جدا شده از نمونه‌های کلینیکی به وسیله مور (Moore) انجام شد (۱۱). پس از آن تحقیقات گسترده‌ای در مورد باکتری‌های مقاوم به جیوه و توانایی حذف جیوه صورت گرفت. هورن (Horn) و همکاران در سال ۱۹۹۴ برای اولین بار نشان دادند که باکتری‌های مقاوم به جیوه قادر به حذف این فلز سمی از پساب کارخانجات می‌باشند (۱۲).

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 (۱۳). رای (Ray) و همکاران در سال ۱۹۸۹ توانایی حذف جیوه توسط باکتری‌های خاک زی تثبیت کننده از *ازتوباکتر* (*Azotobacter*) و *بایرینکیا* (*Beijerinckia*) را بررسی کردند. این باکتری‌ها قادر به حذف ۸۳ درصد از جیوه بودند (۱۴). فریشموت (Frischmut) و همکاران در سال ۱۹۹۳ با به کار بردن باکتری‌های مقاوم به جیوه در راکتورهای زیستی در مدت ۴ تا ۷ هفته مشاهده نمودند که این باکتری‌ها قادر به حذف ۸۲ تا ۹۹٪ جیوه از پساب کارخانجات می‌باشند (۱۵).

در ایران باکتری‌های مقاوم به جیوه مختلفی مانند *اشریشیا کلی* (*E. coli*) *سراشیا مارسه سنس* (*Serratia marcescense*)، *سودوموناس* (*Pseudomonas sp.*) و *باسیلوس* (*Bacillus sp.*) را از رسوبات و آب رودخانه کر جداسازی و شناسایی نمودند (۱۶). مطالعه حاضر مقدمه‌ای بر زیست پالایی جیوه از طریق روش‌های مختلفی مانند میکروب پالایی با تولید باکتری‌های نو ترکیب با ظرفیت بالای حذف جیوه، تولید بیوسنسورها و طراحی بیوراکتورها بر پایه باکتری و یا آنزیم جهت پاکسازی جیوه معدنی از مناطق آلوده می‌باشد.

برای تثبیت پروتئین بر روی بستر بیوراکتور، نیاز به خالص سازی پروتئین MerA و بهینه سازی فعالیت آنزیم در شرایط خارج از سلول می‌باشد. هدف از این مطالعه ساخت وکتور

زیستی (Bioaccumulative toxins) است که به مدت طولانی در محیط زیست پایدار باقی می‌ماند (۱). تماس مزمن با ترکیبات جیوه می‌تواند باعث بروز بیماری‌هایی مانند آلزایمر، پارکینسون، تداخل در سیستم تناسلی، آسیب تنفسی، سیستم‌های عصبی مرکزی-کلیوی، اوتیسم و مشکلات رفتاری گردد (۲). ابزار فیزیوشیمیایی پالایش جیوه تبدیل یا دفع، انجماد و تثبیت، ادغام، شستن خاک، استخراج اسید، عملیات حرارتی، انجماد، رسوب، جذب، فیلتراسیون غشایی هستند. این تکنولوژی‌ها گران قیمت و ناسازگار با محیط زیست می‌باشند. از طرفی موجب تولید حجم زیادی از زیست توده جیوه می‌شوند که به نوبه خود باعث ایجاد مشکلات دفع می‌گردد (۳). زیست پالایی (Bioremediation) یکی از تکنیک‌های مهندسی زیستی مطمئن جهت پاکسازی محیط‌های آلوده با استفاده از میکروب‌ها و آنزیم‌های آن‌ها، گیاهان و کرم‌های خاکی می‌باشد. این روش به دلیل طبیعی بودن و عدم تولید مواد سمی در مقایسه با سایر روش‌های پالایش مقرون به صرفه است. همچنین یک راه حل پایدار و دائمی بوده که موجب معدنی سازی آلاینده‌ها در محیط زیست می‌شود (۴ و ۵).

مقاومت به جیوه در برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی گزارش شده است. ژن‌های مقاومت به جیوه در باکتری‌ها، در یک اپرون بر روی پلاسمید و یا ترانسپوزون‌ها قرار دارند (۶). اپرون مقاومت به طیف ضعیفی از جیوه (narrow-spectrum mer resistance to inorganic mercury) تنها در مقابل جیوه غیرآلی مقاوم می‌باشد. اپرون مقاوم به طیف وسیع جیوه (broad-spectrum mer resistance to organomercurials) در مقابل هر دو نوع جیوه غیرآلی و آلی مقاومت نشان می‌دهد (۷ و ۸).

اپرون *merA* کد کننده آنزیم مرکوریک ردوکتاز است که یک آنزیم احیاکننده جیوه است. این پروتئین سیتوپلاسمی نقش اصلی را در حذف جیوه به عهده دارد. این آنزیم Hg^{2+} را به Hg^0 که سمیت کمتری دارد، تبدیل می‌کند (۹). Hg^0 به شدت فرار است و آزادانه از غشاهای بیولوژیکی به خارج سلول رانده

مورد نظر با روش های استخراج پلاسمید از باکتری استخراج و خالص سازی گردید. در مرحله بعد به وسیله آنزیم های یاد شده وکتور نیز برش داده شد. با توجه به اینکه وکتور مورد نظر حالت حلقوی دارد، پس از واکنش هضم با دو آنزیم برشی *BamHI/NheI* (۱۰ u/μl) به حالت خطی در آمد و بر روی ژل LMP الکتروفورز شد. به منظور همسانه سازی ژن هدف از روی ژل بانندی به طول تقریبی ۵۴۴۰ جفت باز، خالص سازی گردید. اجزای واکنش هضم شامل ژن *merA* (۲۰۰ نانوگرم)، وکتور (۲۰۰ نانوگرم)، *Buffer Tango10X* (۵ میکرولیتر)، ۵u از هر کدام از آنزیم های برشی *BamHI/NheI* و آب مقطر استریل (۱۵ میکرولیتر) بود که به صورت هضم دوگانه در دمای °C ۳۷ به مدت ۱۶ ساعت برش داده شدند (۲۰).
(ج) همسانه سازی DNA ژن *merA* در وکتور بیانی *pET21a(+)* مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول لایگیشن به ازای هر بار تراریزش، به سلول های *اشریشیا کلی* سویه Top10 مستعد شده با کلرید کلسیم (۷۵ میلی مولار) با کمک شوک حرارتی منتقل شد (۲۱). نتیجه نشان دهنده رشد تعدادی کلنی بر روی محیط گزینشی حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) بود. پس از هضم آنزیمی، ژن *merA* و وکتور *pET21a(+)* از روی ژل آگاروز جداسازی و با استفاده از کیت (112-102) DNA *Expin™ Combo GP* شرکت GeneAll خالص سازی انجام گردید. اجزای واکنش لایگیشن بین ژن *merA* و وکتور *pET21a(+)* شامل ژن *merA* (۳۰۰ ng/μl)، وکتور *pET21a(+)* (۱۰۰ ng/μl)، آنزیم *T4 DNA Ligase* (یک واحد)، *T4 DNA Ligase Buffer (10X)* (۲ میکرولیتر) و آب مقطر استریل (۳ میکرولیتر) بود. واکنش به مدت ۴ تا ۱۸ ساعت در دمای ۱۵ درجه سلیسیوس انجام شد (۲۰). شکل سازه نو ترکیب *pET21a(+)-merA* با استفاده از نرم افزار *SnapGene* ترسیم گردید (شکل ۱). مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول لایگیشن به ازای هر بار تراریزش، به ۵۰ میکرولیتر سلول های مستعد باکتری های *اشریشیا کلی* سویه TOP10 از طریق شوک حرارتی تراریزش شدند (۲۱).
(د) تایید ساخت وکتور نو ترکیب *pET21a(+)-merA* به

نو ترکیب حاوی ژن *merA* و نیز بررسی بیان آن جهت پاکسازی جیوه بود.

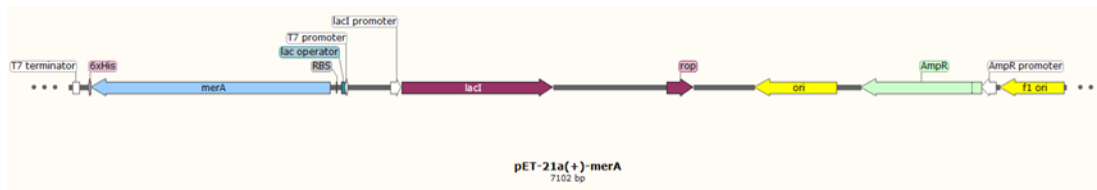
مواد و روش ها

(الف) جداسازی و تکثیر ژن *merA* در ابتدا باکتری *کلبسیلا نمونیه (Klebsiella pneumoniae)* سویه IBRC D10976M و حاوی ژن *merA* از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید. به منظور استخراج پلاسمید از روش پیشنهاد شده توسط دالی (Doly) و بیربوئیم (Birboim) استفاده گردید (۱۷). به منظور تکثیر ژن *merA* واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) با استفاده از پرایمرهای 5'-GCG*GAT CCTC *merA-R-BamHI* CGGCGCAGCACGAAAGCT-3' و 5'-TGCG*CTAGCATGACCACCCT GAAAATCAC *merA-F-NheI* CGGG-3' که بر اساس توالی های موجود در سایت NCBI با شماره دستیابی KJ187752.1 با استفاده از نرم افزار *Vector NTI* طراحی شده بود، انجام گرفت (۱۸ و ۱۹). توالی آنزیم های برشی *BamHI* و *NheI* به منظور همسانه سازی ژن تکثیر شده به درون وکتور در ابتدای 5' پرایمرها در نظر گرفته شد.

(ب) بررسی صحت ژن *merA* و وکتور *pET21a(+)* با روش هضم آنزیمی:

۱- برش آنزیمی ژن *merA*: قطعات DNA تکثیر یافته، با استفاده از سایت های برشی *NheI* و *BamHI* که در ساختار پرایمرها 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 °C ۳۷ انجام شد و محصول هضم شده بر روی ژل آگاروز با نقطه ذوب پایین (LMP) ۱ درصد بارگذاری شد (۲۰).

۲- برش آنزیمی وکتور بیانی *pET21a(+)*: با توجه به برش ژن *merA* و وکتور *pET21a(+)* پس از همسانه سازی در داخل باکتری *اشریشیا کلی* و کشت در محیط LB مایع به همراه باکتری تکثیر شد. به منظور همسانه سازی ژن هدف، ابتدا وکتور



شکل ۱: وکتور نوترکیب تهیه شده حاوی ژن merA در حالت خطی.

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 آمپی سیلین ($100 \mu\text{l/ml}$) کشت شدند. یک روز بعد با یکی از تک کلنی های رشد کرده کشت خطی تهیه گردید. (و بررسی بیان ژن *merA* به روش *SDS-PAGE*: باکتری نوترکیب در ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت داده شد و به مدت یک شبانه روز در دمای 37°C درجه سلیسیوس با سرعت 180 rpm درون انکوباتور قرار گرفت. در مرحله بعد، ۳ میلی لیتر از کشت باکتریایی، به فلاسک 500 میلی لیتری حاوی 200 میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین ($100 \mu\text{l/ml}$)، منتقل شد. فلاسک در انکوباتور با سرعت 180 rpm شیک داده شد و پس از رسیدن تراکم باکتری به $OD_{600} = 0.8$ ، میزان 20 میلی لیتر از آن به عنوان نمونه شاهد پیش از القا برداشته شد. IPTG با غلظت نهایی یک میلی مولار به فلاسک اضافه و برای بررسی بیان در ساعات صفر، دوازده و شانزده ساعت نمونه برداری صورت گرفت. در کنار این تیمارها، القای کنترل منفی (باکتری حاوی پلاسمید فاقد ژن هدف) با شرایط یاد شده آماده گردید. تمامی نمونه ها پس از اتمام مدت القا برای بارگذاری در SDS-PAGE آماده شدند (۲۲).

پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) با وزن مولکولی 66 کیلودالتون به عنوان مارکر در کنار نمونه ها بارگذاری شد. (ز) بررسی عملکرد باکتری های دارای وکتور نوترکیب در محیط حاوی جیوه معدنی: برای مشاهده افزایش مقاومت به جیوه در باکتری های تراریخته و عملکردی بودن آنزیم *MerA* تولیدی از وکتور نوترکیب، میزان رشد باکتری های *اشریشیا کلی* سویه *BL21* حاوی وکتور نوترکیب، باکتری های *اشریشیا*

روش های *PCR*، هضم آنزیمی و توالی یابی:

۱- واکنش زنجیره ای پلی مرز بر روی کلنی های نوترکیب: ذره ای از کلنی های جدید با استفاده از خلال دندان استریل، به عنوان DNA الگو به سایر مواد محصول واکنش *PCR* اضافه شدند 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 تمام کلنی های مشاهده شده حاصل از واکنش لایگیشن استخراج (17°C) شدند و واکنش زنجیره ای پلی مرز به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی ها صورت گرفت (۱۹).

۳- واکنش هضم بر روی پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده: برای اطمینان کامل از تایید حضور پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *merA* در کلنی های حاصل از واکنش لایگیشن، از روش هضم 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 *NheI* و *BamHI* برش داده شدند.

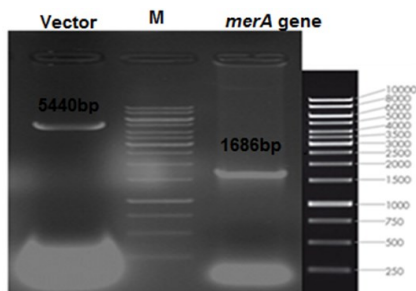
۴- توالی یابی ژن کلون شده: برای بررسی توالی ژن همسان سازی شده، ۳ نمونه DNA پلاسمید نوترکیب *pET21a(+)-merA* تایید شده، جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. توالی های ثبت شده در NCBI برای ژن *merA* با شماره دستیابی KJ187752.1 با نتایج حاصل از توالی یابی، با استفاده از دو نرم افزار *BLAST* و *Multialign* مقایسه گردیدند. نتیجه حاصل از توالی یابی صحت و تطابق کامل توالی هر سه نمونه پلاسمید ارسال شده را با نمونه ثبت شده در NCBI برای ژن *merA* نشان داد. (ه) انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *اشریشیا کلی* سویه

اندازه مورد انتظار برای ژن *merA* مطابقت داشت (شکل ۲). برای تایید تکثیر ژن *merA* واکنش هضم در حضور آنزیم *EcoRI* انجام شد. با توجه به توالی های موجود در NCBI سایت برشی آنزیم تقریباً در اواسط ژن قرار دارد و بعد از واکنش هضم دو قطعه با طول ۱۰۲۳ و ۶۶۳ جفت باز ایجاد می کند. مشاهده این دو قطعه بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بیانگر

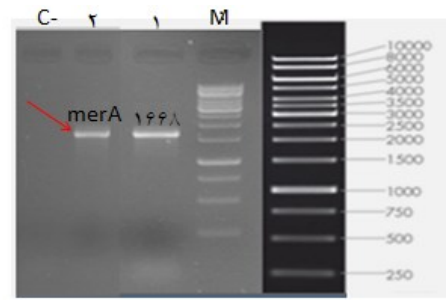
تایید تکثیر ژن *merA* در محصول PCR می باشد (شکل ۳). در گام بعدی، ژن *merA* و وکتور pET21a(+) با آنزیم های *BamHI* و *NheI* برش داده شدند. محصول هضم شده بر روی ژل آگاروز بارگذاری شد و باند مربوط به ژن *merA* با اندازه جفت باز ۱۶۸۶ و باند مربوط به pET21a(+) با طول تقریبی ۵۴۴۰ جفت باز، برای همسانه سازی ژن *merA* از روی ژل جداسازی و خالص سازی شدند (شکل ۴). سپس قطعات حاصل از جداسازی ژن *merA* و وکتور pET21a(+) از روی ژل، به میزان ۳ میکرولیتر از محصول خالص سازی جهت مقایسه غلظت محصول و تعیین نسبت ژن به وکتور در واکنش لیگیشن، بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شدند (شکل ۵).

ب) همسانه سازی ژن *merA* در وکتور pET21a(+): واکنش اتصال بین ژن *merA* و وکتور pET21a(+) در دمای ۱۵ °C و به مدت ۴ ساعت انجام شد.

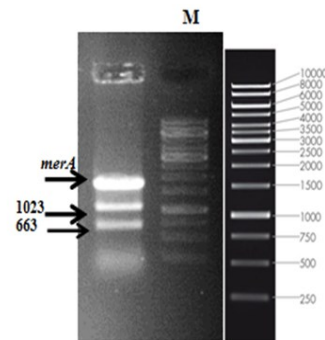
ج) بررسی تشکیل وکتور نوترکیب pET21a(+)-*merA*: به منظور تایید کلنی های نوترکیب و حضور ژن *merA* واکنش PCR بر روی کلنی های نوترکیب، واکنش PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های نوترکیب، هضم



شکل ۴: الکتروفورز محصول هضم برای DNA ژن *merA* و وکتور pET21a(+) توسط آنزیم های برشی *NheI* و *BamHI* بر روی ژل ۱ LMP درصد.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* بر روی DNA وکتور کلبسیلا نمونه. (M) مارکر ۱ Kb، ستون های ۱ و ۲) تکرارهای مستقل (باند ۱۶۸۶ جفت باز) حاصل از تکثیر ژن (*merA*)، (C-) کنترل منفی.

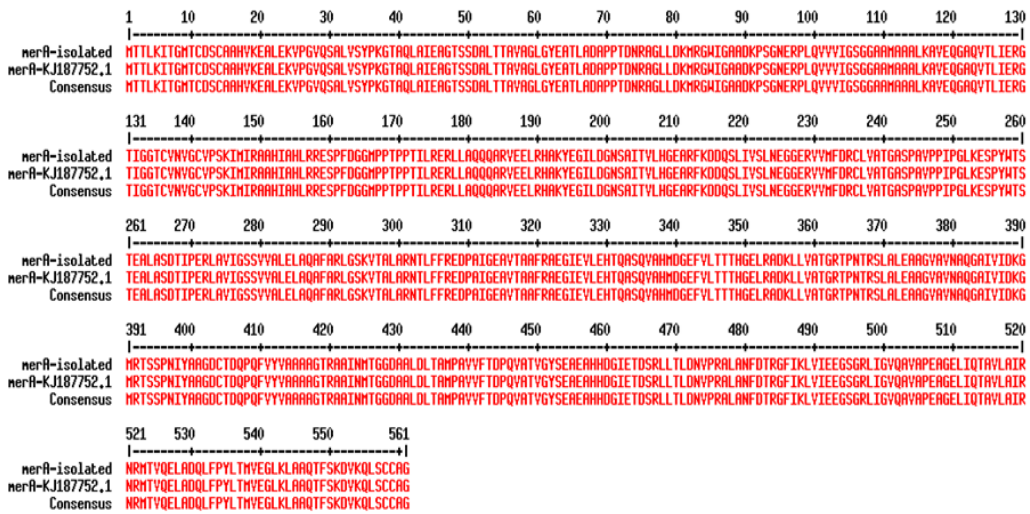


شکل ۳: الکتروفورز حاصل واکنش هضم ژن *merA* با آنزیم *EcoRI* (M) مارکر ۱ Kb، ستون ۱) دو باند مورد انتظار به اندازه ۱۰۲۳ و ۶۶۳ جفت باز تایید کننده حضور ژن *merA* در محصول PCR.

کلنی سویه BL21 فاقد ژن *merA* در زمان های مختلف در محیط حاوی جیوه اندازه گیری و به صورت نمودار رسم گردید. باکتری های /شیرشیا کلی حاوی وکتور بدون ژن هدف و باکتری های تراریزش شده با وکتور pET21a(+)-*merA* پس از رسیدن به OD₆₀₀= ۰/۳ به چهار فلاسک منتقل شدند. در تیمارهای مستقل به هر یک از نمونه ها مقادیر جیوه ۵، ۱۰، ۲۰ ppm اضافه شده و به همراه یک تیمار شاهد بدون جیوه در انکوباتور شیکردار ۳۷ در دمای درجه سلیسیوس قرار داده شدند (۲۳). میزان OD₆₀₀ باکتری ها پس از گذشت مدت زمان ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دو تکرار اندازه گیری گردید.

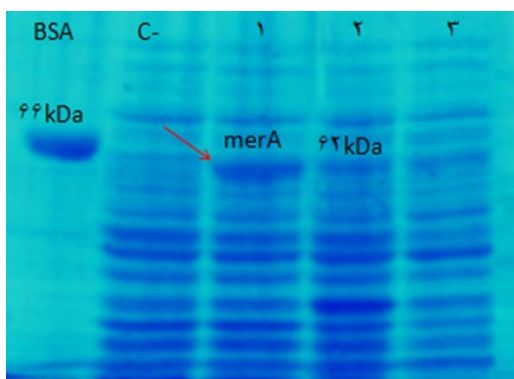
یافته ها

الف) تکثیر ژن *merA*: در این مطالعه محصول PCR، باند ۱۶۸۶ جفت باز را بر روی ژل الکتروفورز نشان داد که با



شکل ۹: هم ترازوی توالی آمینواسیدی پروتئین MerA حاصل از وکتور همسانه سازی شده با توالی پروتئین MerA موجود در NCBI. رنگ قرمز تمام آمینواسیدهای توالی مورد توافق، بیانگر شباهت کامل توالی آمینواسیدی پروتئین MerA حاصل از وکتور همسانه سازی شده با توالی پروتئین MerA موجود در NCBI می باشد.

(+) می باشد (شکل ۹).
 (د) اندازه گیری میزان رشد باکتری ها در محیط حاوی جیوه معدنی: نتایج حاصل بیانگر این است که رشد باکتری های اشیریشیا کلی حاوی وکتور فاقد ژن merA تا ۱۲ ساعت پس از ریختن جیوه به شدت تحت تاثیر محیط حاوی جیوه قرار گرفته و حتی قادر به رشد در مقادیر ۱۰ و ۲۰ ppm جیوه نمی باشند. مشاهده نشد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: SDS-PAGE پروتئین روی ژل آکریل آمید ۱۲/۵ درصد. (C- کنترل منفی مربوط به القای باکتری حاوی وکتور بدون ژن هدف، ستون ۱) باند مربوط به بیشترین بیان پروتئین MerA با اندازه ۶۲ کیلو دالتون، در زمان ۱۶ ساعت و با دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، ستون ۲) مدت القای ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، ستون ۳) نمونه پیش از القا می باشد.

از طرفی باکتری های حاوی وکتور نوترکیب pET21a(+)-merA 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 ساعات اولیه کاهش یافت. بنابراین نتایج توانایی رشد باکتری های اشیریشیا کلی حاوی وکتور فاقد ژن هدف و تراریخته نشان دهنده عدم مقاومت باکتری های اشیریشیا کلی بدون وکتور نوترکیب و عملکرد پروتئین MerA در باکتری های تراریخته و افزایش مقاومت آن ها به جیوه موجود در محیط می باشد.

(ه) بررسی بیان ژن merA به روش SDS-PAGE: بررسی بیان پروتئین ژن هدف بر روی ژل آکریل آمید، نشان داد که پروتئین MerA با وزن مولکولی ۶۲ کیلودالتون کمی پایین تر از BSA قرار می گیرد. با توجه به این که وکتور pET21a(+) در باکتری

بحث

است، در این تحقیق آنزیم کاهنده جیوه (*merA*) مربوط به کلبسیلا نمونیه خالص سازی و به وکتور pET21a(+) تراریزش شد. سپس برای بررسی زیست پالایی به باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21 منتقل شد.

اندازه گیری میزان رشد باکتری های نوترکیب در غلظت های ۵، ۱۰ و ۲۰ ppm جیوه معدنی نشان از مقاومت بالای این باکتری ها در مقابل این غلظت های جیوه می باشد. به طوری که میزان OD₆₀₀ باکتری ها در غلظت ۵ ppm جیوه بعد از گذشت ۴۸ ساعت با نمونه شاهد هیچ تفاوتی نشان نداد و به عدد ۱۲ رسید.

اما در غلظت های ۱۰ و ۲۰ ppm پس از گذشت ۴۸ ساعت به حدود ۸ رسید. در صورتی که در تیمار شاهد پس از گذشت ۴۸ ساعت OD₆₀₀ باکتری ها در تیمارهای حاوی جیوه به عدد ۴ نیز نرسید. این یافته نشان دهنده قدرت بالای وکتور نوترکیب ساخته شده در زیست پالایی جیوه می باشد.

همچنین، دی آ (Dea) و همکاران در سال ۲۰۱۴ با تزریق گاز سولفید هیدروژن به زیست توده سلول باکتری و مشاهده پیشرفت رسوب سیاه رنگ، تجمع جیوه از محیط گونه های مختلف *باسیلوس* مقاوم به جیوه را گزارش نمودند. به طوری که یکی از گونه های *باسیلوس* توانست حداکثر ۴۰/۶۰ درصد از ۵۰ ppm جیوه تجویز شده به محیط کشت را در زیست توده تجمع نماید (۳۰). این یافته نشان دهنده اهمیت باکتری ها، در پاکسازی زیستی جیوه از محیط می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده پیشنهاد می گردد که دیگر آنزیم های مربوط به اپرون حذف جیوه، خالص سازی و به صورت توام مورد بررسی قرار گیرد. تا با استفاده از مجموعه آنزیم ها در داخل یک وکتور بیانی، قادر به حذف دامنه وسیعی از فرم های مختلف جیوه باشیم.

نتیجه گیری

پس از ساخت وکتور نوترکیب ژن کاهنده جیوه معدنی و تایید وکتور نوترکیب ساخته شده از طریق هضم آنزیمی، PCR، و توالی یابی، رشد باکتری های تراریزش شده در محیط حاوی

جیوه به دلیل اثرات مضر که بر شکل زندگی انسان و موجودات دیگر دارد یک تهدید جهانی به شمار می رود. اگرچه جیوه یک عنصر طبیعی است و در سراسر جهان وجود دارد، اما فعالیت های انسانی به ویژه استخراج معادن و سوزاندن سوخت های فسیلی ورود جیوه به درون محیط زیست را افزایش داده است. بیشترین انتشار جیوه به درون محیط زیست از سال ۱۸۰۰ رخ داد و با انقلاب صنعتی بر اساس سوختن زغال سنگ، سنگ معدن فلزی، ذوب و استخراج معادن طلا مرتبط است (۶).

گزارش های زیادی از باکتری های مقاوم به جیوه با 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 گزارش شده است (۲۶-۲۳).

عیسی (Isa) و همکاران مکانیسم جدید دیگری برای حذف جیوه با کاربرد بالقوه زیست پالایی گزارش کردند (۲۷). این محققان گزارش نمودند که باکتری کلبسیلا نمونیه 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 نگردید. علاوه بر این، DMDS یک ماده خطرناک و سولفید هیدروژن سمی است که می تواند خسارت جبران ناپذیری به محیط زیست وارد نماید. 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 داینوکوکوس ردیودورانس (*Deinococcus radiodurans*) بود (۲۸).

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) منجر شد که ۶ برابر بیشتر از نوع وحشی جیوه را پاکسازی نماید (۲۹). از آنجایی که دی متیل دی سولفات (DMDS) تولیدی از کلبسیلا نمونیه خطرناک

جیوه نشان داد که مقاومت آن‌ها نسبت به باکتری‌های **تشکر و قدردانی** بدون وکتور نو ترکیب به میزان قابل توجهی افزایش یافت. نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید مدنی این امر نشان دهنده عملکرد بالای پروتئین MerA تولید آذربایجان به دلیل فراهم آوردن امکانات مالی این تحقیق کمال شده در حذف جیوه و افزایش مقاومت باکتری‌ها می‌باشد. امتنان را دارند.

References

1. Hirak RD, Surajit D. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial *mer* genes. Int Biodeterior Biodegrad. 2012; 75: 207-213.
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. 2013; Horizon Scientific Press.
4. Abioye OP. Biological remediation of hydrocarbon and heavy metals contaminated soil. In: Soil Contamination. Edited by Simone Pascucci. INTECH open Access Publisher; 2011.
5. Sinha RK, Valani D, Sinha S, Singh S, Herat S. Bioremediation of contaminated sites: A low-cost nature's biotechnology for environmental cleanup by versatile microbes, plants & earthworms. In: Timo Faerber, Johann Herzog, editors. Solid waste management and environmental remediation. Nova Science Publishers Inc; 2010: 1-72.
6. 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.
7. Silver S, Phung LT. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. J Ind Microbiol Biotechnol. 2005; 32: 587-605.
8. Yurieva O, Kholodii G, Minakhi L, Gorlenko Z, Kalyaeva E, Mindlin S, Nikiforov V. Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. Mol Microbiol. 1997; 24(2): 321-329.
9. Mahbub KR, Krishnan K, Naidu R, Megharaj M. Mercury resistance and volatilization by *Pseudoxanthomonas* sp. SE1 isolated from soil. Environ Technol Innovation. 2016; 6: 94-104.
10. Kiyono M, Pan Hau H. Genetic engineering of bacteria for environmental remediation of mercury. J Health Sci. 2006; 52: 199-204.
11. Moore B. A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. Lancet. 1960; 2(7148): 453-458.
12. 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.
13. Barkay T, Miller SM, Summers AO. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*. 2003; 27: 355-384.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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].
 17. Birnboim HC, Doly JA. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979; 7: 1513-1523.
 18. Lu G, Moriyama EN. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform*. 2004; 5(4): 378-388.
 19. Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *PCR protocols. Method Mol Biol*. 2003; 226: 3-6.
 20. *Protocols and applications guide*, Third Edition. Promega Corporation; 1996.
 21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1989.
 22. Raymond S, Weintraub L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Sci*. 1959; 130(3377): 711.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Deng X, Jia P. Construction and characterization of a photosynthetic bacterium genetically engineered for Hg²⁺ uptake. *Bioresource Technol*. 2011; 102: 3083-3088.
 27. 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.
 28. Brim H, McFarlan SC, Fredrickson JK, Minton KW, Zhai M, Wackett LP, Daly MJ. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste

29. 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.
30. Dea J, Dash HR, Das S. Mercury pollution and bioremediation—A case study on biosorption by marine mercury resistant bacteria. *Microb Biodegrad Bioremed.* 2014; 1: 137-166.



Bioremediation of mineral mercury via construction of recombinant vector pET21a(+)-*merA*

Hamideh Baghi Sefidan ¹, Alireza Tarinejad ²

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: Inorganic mercury entrance into the environment through industry and agriculture is one of the most serious environmental hazards in the country. Microbial bioremediation is considered as one of the practical solutions to clean up pollutant ions from the environment. The present study was conducted to construct a recombinant vector including *merA* gene, and also to investigate its expression in order to clean up mercury.

Material & Methods: *merA* gene from mercury resistance bacterial genome was isolated, and subsequently cloned into the pET21a(+) expression vector. Confirmation of cloning target gene was achieved by PCR and restriction enzyme digestion. Then pET21a(+)-*merA* recombinant vector was cloned into *E.coli* strain BL21. In order to assess increased resistance to mercury in recombinant bacteria, and the functionality of the enzyme produced by the recombinant vector, the growth rate of recombinant BL21 *E. coli* strains to contain *merA* gene, and without it was measured in a medium containing mercury for 48 hours.

Results: The results showed that the growth of *E. coli* strains without *merA* gene was strongly affected after introducing mercury into the media till 12 hours, and bacteria would not be able to grow at 10 ppm and 20 ppm mercury levels. However, transformed bacteria with pET21a(+)-*merA* vector showed suitable growth in mercury-containing media. SDS-PAGE analysis of recombinant bacterial proteins on acrylamide gel showed the highest MerA (62KDa) expression following 16 hours induction with 1mM IPTG at 37°C.

Conclusion: Overall, the growth ability of *merA*- containing recombinant bacteria reflects the action of MerA protein in transformed bacteria. Furthermore, increasing the resistance of recombinant bacteria to the mercury indicates that environmental heavy metal pollutants can be cleaned up properly through the construction of recombinant vectors.

Keywords: Bioremediation, Mercury, *merA* gene, Recombinant vector.

Correspondence to: Alireza Tarinejad

Tel: +98 4134327572

E-mail: atarinejad@yahoo.com

Journal of Microbial World 2017, 10(1): 6-17.