مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تولید فرم نوترکیب ایزوفرم تیپ 1 متالوتیونین برنج (OsMTI-1b) در باکتری اشریشیاکلی و بررسی قابلیت اتصال آن به فلز نیکل

رضوان محمدی نژاد[1]، آذر شاه پیری*[2]، آقافخر میرلوحی[3]

[1] کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[2]استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[3]استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ دریافت: 1391/08/01، تاریخ پذیرش: 1392/03/13

چکیده

گیاهان به مکانیسم‌های سلولی مختلفی در مقابله با اثر سمی فلزات سنگین مجهز شده‌اند. یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها، تولید پروتئین‌ها و پپتیدهای متصل شونده به فلزات، مانند متالوتیونین‌ها (MT) می‌باشد. متالوتیونین‌ها، گروهی از پروتئین‌ها با وزن مولکولی کم و غنی از آمینواسیدهای سیستئین هستند که دارای ظرفیت بالای اتصال به فلزات می‌باشند. در این تحقیق توالی کد کننده‌ی ایزوفرم OsMTI-1b از گیاه برنج، به عنوان گیاه مدل در بین تک لپه‌ای‌ها، در ناقل بیانی pET41a همسانه‌سازی و به میزبان بیانی *E. coli* سویه‌ی Rosetta (DE3) منتقل شد. پس از القا محیط کشت توسط IPTG، میزان مناسبی از پروتئین های نوترکیب در فاز محلول تولید و با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی خالص سازی شد. سلول‌های باکتری بیان‌کننده‌ی پروتئین‌های نوترکیب در محیط LB حاوی نمک $NiCl_2$ رشد داده شدند و منحنی رشد آن‌ها در مقایسه با شاهد ترسیم شد. مقدار کاهش فلز نیکل در محیط کشت و تجمع آن‌ها در رسوب باکتریایی توسط دستگاه طیف سنجی پلاسمای جفت شده‌ی القائی (ICP-AES) به‌دست آمد. بر اساس نتایج مشخص گردید بیان ایزوفرم OsMTI-1b از طریق افزایش تجمع درون سلولی فلز نیکل موجب افزایش تحمل باکتری *E. coli* به این فلز می‌گردد. همچنین، بررسی الگوی جذب نور و واکنش DTNB با پروتئین‌های انکوبه شده با فلز نیکل در شرایط این ویترو، تشکیل دستجات فلز/تیول در پروتئین نوترکیب GST-OsMTI-1b را اثبات نمود. یافته‌های پژوهش حاضر می‌تواند منعکس کننده نقش احتمالی ایزوفرم OsMTI-1b در تحمل گیاه برنج به تنش فلزات سنگین باشد.

کلمات کلیدی: *متالوتیونین، همسانه سازی، بیان دگرساخت پروتئین، فلزات سنگین.*

* نویسنده مسئول: آذر شاه پیری تلفن: 03113913354 Email: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir

مقدمه

امروزه آلودگی فلزات سنگین در خاک، یک مشکل عمده زیست محیطی محسوب می‌شود و بر سلامت انسان، موجودات زنده، تولیدات کشاورزی و زیست بوم اثر دارد. دوام بلند مدت بیولوژیکی و باقی ماندن این فلزات در خاک، سبب انباشته شدن آن‌ها در زنجیره غذایی و در نتیجه تأثیرات منفی بالقوه برای سلامتی انسان می گردد (Nies 1999; Ghosh & Singh 2005) اگر چه برخی از فلزات سنگین برای رشد گیاهان ضروری هستند اما غلظت‌های بالای این فلزات برای گیاهان سمی است زیرا باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و موجب وارد شدن خسارت به قسمت های مختلف گیاه می‌گردد. هم‌چنین، فلزات سنگین در غلظت‌های بالا جایگزین فلزات ضروری در مولکول هایی نظیر کلروفیل شده و باعث اختلال در فعالیت های حیاتی گیاه می شوند (Bremner & Beattie1990; Hall 2002). گیاهان به منظور استفاده از فلزات و جلوگیری از سمیت آن‌ها مکانیزم‌های مختلفی را توسعه داده‌اند. یکی از مهم‌ترین این مکانیزم‌ها، کلاته شدن فلزات توسط لیگاندهایی با میل ترکیبی بالاست. کلاته کننده‌های درون‌سلولی و غنی از آمینواسیدهای سیستئین (Cys)، از جمله متالوتیونین‌ها[1] (MTs) نقش مهمی را در این زمینه ایفا می‌کنند (Cobbett & Goldsbrough 2002; Hall 2002; Murphy *et al*. 1997).

MTها گروهی از پروتئین‌های غنی از Cys و با وزن مولکولی کم (5 تا 10 کیلودالتون) هستند که اولین بار در سال 1957 به عنوان پروتئین‌های متصل شده به کادمیوم از بافت کلیه‌ی اسب جدا شدند (Margoshes & Vallee 1957). از آن زمان تعداد زیادی ژن MT از موجودات مختلف از جمله حیوانات، گیاهان عالی، قارچ‌ها و برخی پروکاریوت‌ها مثل سیانوباکتری‌ها جداسازی شد. MTهادر گیاهان بر اساس الگوی توزیع آمینو اسیدهای Cys در چهار تیپ طبقه بندی می شوند. مشخصه‌ی پروتئین‌های تیپ 1، 2 و 3، وجود دو دمین غنی از Cys در دو انتهای آمینو و کربوکسی پروتئین است که توسط یک ناحیه فاصله انداز[2] عاری از Cys به طول 40–30 آمینواسید از هم جدا می‌شوند. در تیپ 4، آمینو اسیدهای Cys در سه دمین و عمدتاً به صورت موتیف‌های C-X-C (X هر آمینو اسیدی به غیر از Cys) پراکنده اند که هرکدام توسط فاصله اندازهایی با طول 15–10 آمینواسید از هم جدا می‌شوند (Cobbett & Goldsbrough 2002). در گیاهان ایزوفرم‌های متعددی از MT ها وجود دارند که در بافت ها و مراحل رشدی مختلف گیاه و در اثر القاء عوامل مختلف بیان می‌شوند (Cobbett and Goldsbrough 2002, Gue *et al*. 2003; Freisinger 2007; Yang *et al*. 2011). نقش دقیق زیستی این پروتئین‌ها هنوز مورد بحث است. یکی از نقش های پیشنهادی برای این

[1] Metallothioneins

[2] Spacer

پروتئین‌ها، هوموستازی و سم‌زدایی فلزات سنگین می باشد. MTها به دلیل قابلیت بالای اتصال فلز می‌توانند کاتیون های دو ظرفیتی بویژه روی و مس مورد نیاز برای متالوآنزیم‌ها و فاکتورهای رونویسی را تامین نمایند (Blindauer 2008; Gue 2008). همچنین این پروتئین‌ها قادر هستند با کلاته کردن یون‌های فلزی غیر ضروری مانند کادمیوم، سلول‌ها را از آسیب غلظت‌های سمی این فلزات حفظ نمایند (Domenech *et al*. 2007; Hassinen *et al*. 2011). از دیگر نقش-های پیشنهاد شده برای MTها، پاکسازی رادیکال‌های اکسیژنی و حفاظت سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو می باشد (Akashi *et al*. 2004; Mir *et al*. 2004; Xue *et al*. 2009; Yang *et al*. 2011). قابل ذکر است که برخلاف MTهای جانوران، تاکنون تنها تعداد معدودی از پروتئین های MT به طور مستقیم از بافت‌های گیاهی استخراج شده اند. مانع اصلی در این زمینه حساسیت بالای این پروتئین‌ها به تخریب پروتئولیتیک (به ویژه در نواحی فاصله انداز) و اکسیداسیون آمینواسیدهای Cys طی مراحل خالص‌سازی می‌باشد (Mir *et al*. 2004; Freisinger 2008; Huang and Wang 2010; Chaturvedi *et al*. 2012). به همین دلیل عمده تحقیقات صورت گرفته در مورد MTهای گیاهی، به آنالیز بیان ژن‌های کد کننده MT در پاسخ به فلزات مختلف و یا تنش‌های محیطی اختصاص یافته است. طی سال های اخیر استفاده از روش-های غیر مستقیم ازجمله بیان دگرساخت ایزوفرم‌ها در سیستم های بیان پروکاریوتی و یوکاریوتی و در الحاق با پپتیدها یا پروتئین‌های پایدار، امکان بررسی ویژگی های اتصال به فلزات پروتئین‌های MT گیاهی را فراهم نموده است (Freisinger 2008, Schicht and Freisinger 2009; Chaturvedi *et al*. 2012). در ژنوم گیاه برنج تعداد 11 مکان ژنی کد کننده MT از هر چهار تیپ وجود دارد. با این وجود اطلاعات اندکی در مورد نقش این ایزوفروم‌ها در پاسخ به تنش فلزات سنگین موجود است. در تحقیق حاضر با انتقال توالی کد کننده ایزوفرم OsMTI-1b (متعلق به تیپ 1 ژن های MT برنج) به باکتری *E. coli*، تاثیر بیان این ژن بر میزان مقاومت سلول‌های باکتری به فلز سنگین نیکل مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، با تولید و خالص سازی پروتئین نوترکیب، خصوصیات اتصال به فلز این ایزوفرم از طریق بررسی الگوی جذب نوری و واکنش رقابتی با ماده 5و5-دیتیوبیس (2 نیتروبنزوئیک) اسید[1] (DTNB)، در شرایط این ویترو مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

همسانه سازی ایزوفرم OsMTI-1b در ناقل بیانی pET41a

توالی DNA کد کننده و همچنین توالی آمینواسیدی ژن OsMTI-1b از پایگاه داده‌ی ژنوم برنج (http://rice.plantbiology.msu.edu/) به دست آمد. جایگاه دو آنزیم برشی *Hind*III و

[1] 5, 5' dithiobis (2nitrobenzoic) acid

*Eco*RI به ترتیب در دو انتهای '3 و'5 توالی مذکور اضافه گردید و توالی حاصل توسط شرکت GenScript در پلاسمید pUC57 سنتز شد. پلاسمید حامل ژن سنتز شده از طریق روش شوک الکتریکی به سلول‌های مستعد شده باکتری *E. coli* سویه DH5α منتقل و تکثیر شد. جهت بیان ژن OsMTI-1b، قطعه مذکور از پلاسمید pUC57-OsMTI-1b توسط آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Eco*RI جدا شد و در ناقل بیانی pET41a (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) که با آنزیم‌های مشابه خطی شده بود، همسانه سازی گردید. صحت همسانه‌سازی از طریق واکنش برش آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تائید صحت توالی نوکلئوتیدی، توالی ژن در پلاسمید نوترکیب pET-OsMTI-1b توسط شرکت Milligene فرانسه توالی یابی شد.

بیان و خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب

جهت تولید پروتئین، پلاسمید نوترکیب pET-OsMTI-1b و هم‌چنین پلاسمید pET41a فاقد قطعه به روش شوک الکتریکی به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه‌ی Rossete (DE3) منتقل شدند. به دلیل حضور ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین بر روی پلاسمید pET41a و همچنین مقاومت باکتری Rossete (DE3) به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل، سلول های باکتری ترانسفورم شده در محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (50 میلی گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (5 میلی گرم بر لیتر) در دمای 37 درجه سانتیگراد بر روی انکوباتور شیکردار با 180 دور در دقیقه کشت شدند. هنگامی که OD_{600} به 0/6 رسید،IPTG به عنوان ماده‌ی القاء کننده به غلظت نهایی 0/1 میلی مولار به کشت‌ها اضافه شد. در فواصل زمانی مختلف نمونه‌برداری از سوسپانسیون باکتری در لوله‌های اپندورف 1/5 میلی لیتری صورت گرفت. لوله‌ها به مدت 10 دقیقه در 12000 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردیدند و سپس محلول رویی لوله‌ها دور ریخته و رسوب حاصل در 200 میکرولیتر از بافر TE (10 میلی مولار تریس–اسید کلریدریک ، 1 میلی مولار EDTA، pH= 8) سوسپانسیون شد. به منظور استخراج پروتئین‌های محلول، دیواره سلول‌های باکتری با استفاده از روش سونیکیشن تخریب شد و پس از سانتریفیوژ به مدت 10 دقیقه در 12000 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد، فاز رویی برای بررسی میزان بیان پروتئین‌های محلول بر روی ژل SDS-PAGE 12٪ بارگذاری گردید. به منظور انجام عملیات خالص سازی پروتئین، سلول های باکتری نوترکیب و هم‌چنین باکتری شاهد در حجم زیاد کشت گردیدند و پروتئین های فاز محلول مطابق مرحله قبل استخراج شدند. خالص سازی پروتئین‌های هدف از سایر پروتئین‌های میزبان باکتریایی با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی و به کمک ستون‌های His-Trap HP (Amersham Biosciences) انجام شد. بدین منظور، ابتدا ستون‌ها با استفاده از بافر

بارگذاری A (ایمیدازول 10 میلی مولار، کلرید سدیم 500 میلی مولار و 30 میلی مولار تریس- اسید کلریدریک، pH= 8) به تعادل رسیدند. سپس کل پروتئین‌های محلول استخراج شده از ستون عبور داده شد. به منظور حذف پروتئین هایی که به صورت غیر اختصاصی به ستون اتصال یافتند، ستون با استفاده از محلول حاوی 10٪ بافر B (ایمیدازول 400 میلی مولار، کلرید سدیم 500 میلی مولار و 30 میلی مولار تریس- اسید کلریدریک، pH= 8) و 90٪ بافر A شستشو داده شد. در مرحله بعد جهت جدا نمودن پروتئین هدف، ستون با بافر جدا کننده C (مخلوط 10 تا 70٪ بافر Bو A) شستشو داده شد و هر میلی لیتر خروجی ستون در لوله‌های اپندورف 1/5 میلیی لیتری جمع آوری شد. میزان خلوص پروتئین‌های مورد نظر با استفاده از ژل SDS-PAGE 12٪ مورد بررسی قرار گرفت. برای حذف ایمیدازول و نمک کلرید سدیم، نمونه‌های پروتئینی خالص شده توسط کیسه‌های دیالیز (Sigma) با ممانعت عبوری 12 کیلو دالتون در برابر محلول 10 میلی مولار تریس- اسید کلریدریک، pH= 8، به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتیگراد دیالیز شدند. غلظت پروتئین‌های نوترکیب خالص GST و GST-OsMTI-1b با اندازه گیری میزان جذب نور در طول موج 280 نانومتر و با استفاده از قانون بیر- لمبرت محاسبه گردید.

بررسی میزان تحمل سلول‌های بیان کننده پروتئین‌های نوترکیب به فلزات سنگین

به منظور بررسی اثر بیان ایزوفرم OsMTI-1b بر تحمل سلول‌های باکتری به فلز نیکل، ابتدا غلظت‌های مختلفی از نمک $NiCl_2$ بر روی رشد باکتری شاهد (سلول‌های حاوی پلاسمید pET41a) اندازه‌گیری شد. پس از انتخاب غلظت مناسب، سلول‌های باکتری حامل پلاسمید pET-OsMTI-1b و هم‌چنین باکتری شاهد در محیط LB به همراه آنتی بیوتیک‌های کانامایسین (50 میلی گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (5 میلی گرم بر لیتر) رشد یافتند و هنگامی که OD_{600} به 0/6 رسید، بیان پروتئین‌های نوترکیب توسط IPTG به غلظت نهایی 0/1 میلی مولار القاء گردید. پس از گذشت 20 دقیقه غلظت 2/5 میلی مولار $NiCl_2$ به محیط‌های کشت اضافه شد و میزان رشد باکتری‌ها از طریق اندازه گیری جذب نوری در طول موج 600 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Beckman, DU 530) اندازه-گیری و منحنی رشد رسم شد. همچنین به منظور بررسی توانایی باکتری‌های نوترکیب در حذف فلز از محیط کشت، در دو زمان اضافه شدن فلز به محیط (T0) و شش ساعت پس از آن (T1) نمونه‌هایی به حجم 10 میلی لیتر تهیه و در 6000 دور در دقیقه به مدت 25 دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به دقت از فاز رسوب جداشده و در ظرف جداگانه ریخته شد. نمونه‌های مربوط به فاز رسوب باکتری و فاز

رویی به مدت 24 ساعت در آون 110 درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس به خاکستر حاصل یک میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ اضافه شد و به مدت دو ساعت در حمام آب 95 درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. بعد از این مدت مخلوط حاصل در دمای اتاق سرد شده و با آب مقطر دیونیزه به حجم نهایی 10 میلی لیتر رسانده شد. میزان فلز با استفاده از دستگاه طیف سنجی جفت شده‌ی القائی (ICP-AES) اندازه گیری شد.

بررسی قابلیت اتصال پروتئین نوترکیب GST-OsMTI-1b به فلز نیکل در شرایط این ویترو

جهت بررسی ظرفیت اتصال پروتئین‌های نوترکیب به فلز نیکل، ابتدا فرم عاری از فلز (آپو پروتئین) نمونه‌های پروتئینی شاهد (GST) و پروتئین الحاقی GST-OsMTI-1b به روش ذکر شده در منابع تولید گردید (Dallinger *et al.* 2001; Toriumi *et al.* 2005). هر کدام از نمونه های پروتئینی به مدت 20 دقیقه در دمای محیط با غلظت 50 میلی مولار دی تیوتریتول (DTT) انکوبه شدند. سپس به منظور جدا شدن فلزات احتمالی اتصال یافته به پروتئین‌های نوترکیب، pH نمونه‌ها به کمک اسید کلریدیک به مقدار 2 کاهش یافت و متعاقباً جهت حذف فلزات رها شده در محیط، نمونه‌های پروتئینی در برابر محلول 0/1 نرمال اسید کلریدیک، pH= 2، به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتیگراد دیالیز شدند. برای تولید کمپلکس‌های متصل شده به فلز نیکل، میزان 30 میکرومولار از هر کدام از نمونه‌های apo-GST و apo-GST-OsMTI-1b در حضور یون‌های فلز نیکل به نسبت مولی 10: 1 (پروتئین به فلز) در دمای 4 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس pH نمونه‌ها توسط محلول 200 میلی مولار تریس–اسید کلریدریک به تدریج افزایش یافت و در مقدار 8 ثابت گردید. به منظور حذف فلزات اتصال نیافته، نمونه‌های پروتئینی در برابر محلول 10 میلی مولار تریس–اسید کلریدریک، pH= 8 به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتیگراد دیالیز شدند. الگوی طیف جذبی نمونه های آپوپروتئین و نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده با فلز نیکل، در محدوده طول موج 220 تا 350 نانو متر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر ثبت گردید.

واکنش با DTNB

واکنش رقابتی نمونه‌های apo-GST-OsMTI-1b و Ni/GST-OsMTI-1b با DTNB مطابق با روش پیشنهادی Emoto *et al.* (1996) انجام شد. میزان 1/5 نانومول از هر کدام از نمونه های پروتئینی در 300 میکرولیتر محلول 10 میلی مولار تریس–اسید کلریدریک، pH= 8، رقیق گردید. با اضافه شدن 75 نانومول DTNB به محلول حاصل، واکنش آغاز گردید و تغییرات جذب نور در طول موج 412 نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در دمای اتاق ثبت گردید.

به عنوان واکنش کنترل، مخلوط فاقد نمونه‌ی پروتئینی استفاده گردید.

نتایج

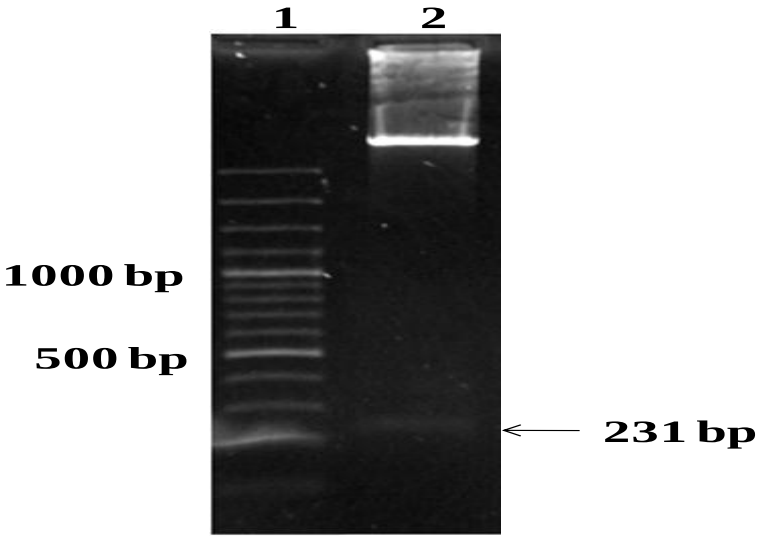
همسانه سازی ایزوفرم OsMTI-1b

ایزوفرم مورد بررسی در این پژوهش، متعلق به تیپ 1 ژن –های متالوتیونین گیاه برنج (شماره ثبت در بانک جهانی ژن AK059587) می باشد که پیش از این با عنوان OsMTI-1b نام گذاری شده است (Zhou *et al*. 2006). توالی ژن کد کننده این ایزوفرم 219 bp بوده و پروتئینی به طول 72 آمینواسید با وزن مولکولی 7/13 کیلودالتون را سنتز می‌نماید. همانند دیگر ایزوفرم های MT تیپ 1 گیاهی، این ایزوفرم نیز در توالی خود دارای 12 آمینواسید سیستئین می‌باشد که به طور مساوی در دو انتهای آمینو و کربوکسی پروتئین به ترتیب با آرایش CXCXXXCXCXXXCXC و CXCXXXCXCXXXCXC (X بیانگر هر آمینواسید به غیر از سیستئین می‌باشد) توزیع یافته اند. دو ناحیه غنی از سیستئین در این پروتئین، توسط یک ناحیه فاصله انداز عاری از سیستئین به طول 41 آمینواسید از یکدیگر جدا شده‌اند. توالی کد کننده این ایزوفرم به صورت مصنوعی سنتز شد و در ناقل بیانی pET41a در الحاق با توالی کد کننده سه دنباله ی پروتئینی شامل، His-tag، S-tag و GST-tag ادغام گردید. به منظور تائید صحت همسانه‌سازی از روش هضم آنزیمی استفاده شد. شکل 1، الگوی الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید pET-OsMTI-1b توسط آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III را نشان می‌دهد. جدا شدن قطعه به طول 231 bp از پلاسمید بیانگر صحت همانندسازی ژن OsMTI-1b در پلاسمید pET41a می‌باشد. صحت ترادف نوکلئوتیدی قطعه ادغام شده نیز از طریق توالی یابی مورد تائید قرار گرفت.

بیان دگرساخت و خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب GST و GST-OsMTI-1b

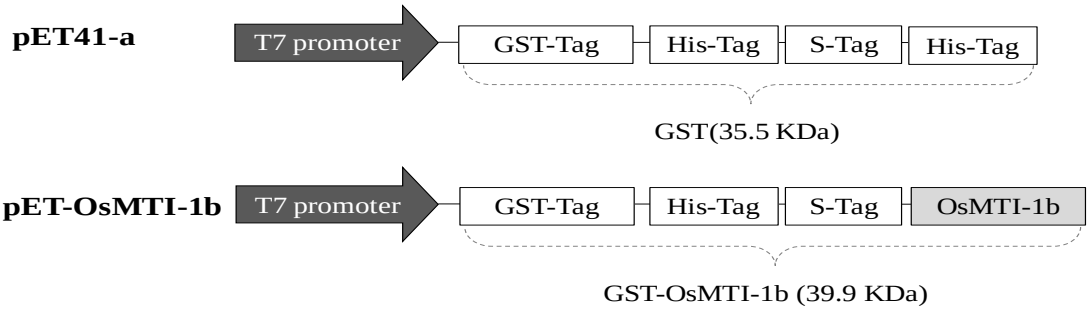
جهت تولید پروتئین نوترکیب، پلاسمید pET-OsMTI-1b و همچنین پلاسمید pET41a فاقد ژن به میزبان بیانی *E. coli* سویه‌ی Rosettea (DE3) منتقل شدند. پس از القاء کشت های باکتریایی توسط IPTG، پروتئین‌های محلول سیتوپلاسمی استخراج و بر روی ژل-SDS PAGE بارگذاری شدند. بیان دنباله‌های پروتئینی موجود بر روی پلاسمید pET41a (که به منظور تسهیل در نامگذاری، با نام کلی GST در طی این پژوهش مشخص گردیدند) از سویه‌ی حاوی پلاسمید فاقد ژن و پروتئین الحاقی GST-OsMTI-1b از سویه های ترانسفورم شده با پلاسمید حاوی ژن OsMTI-1b، مورد انتظار بود (شکل 2). وزن مولکولی پروتئین‌های GST و GST-OsMTI-1b به ترتیب 35/5 و 39/9 کیلودالتون پیش بینی شد (http://web.expasy.org/protparam). وجود

باندهای پروتئینی با وزن مولکولی مورد نظر بر روی ژل SDS-PAGE بیانگر تولید موفق پروتئین‌های نوترکیب در فاز محلول بود (شکل 3). دنباله‌ی GST به دلیل اندازه نسبتاً بزرگ و حلالیت مناسب خود به عنوان شریک الحاقی مناسب جهت تولید پروتئین‌های پایدار و محلول ذکر شده است (Esposito & Chatterjee, 2006). پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در فاز محلول توسط روش کروماتوگرافی جذبی خالص شدند. میزان تولید پروتئین خالص به ترتیب 10 و 20 میلی گرم بر لیتر برای پروتئین‌های GST و GST-OsMTI-1b محاسبه شد.



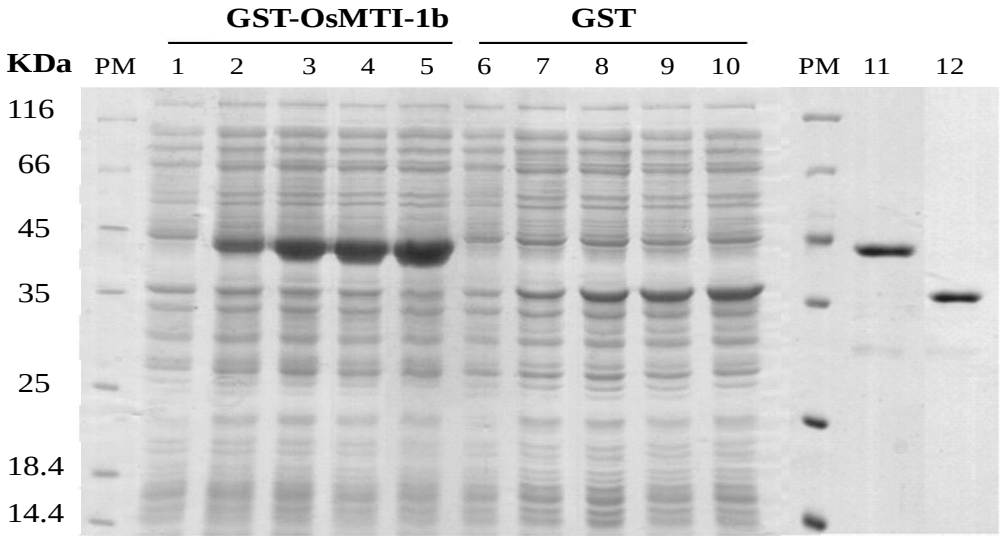
شکل 1- الکتروفورز محصول واکنش هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET-OsMTI-1b با آنزیم های *Hind*III و *Eco*RI بر روی ژل آگارز 1 درصد. ستون 1 : 100 bp DNA Ladder، ستون 2: قطعه OsMTI-1b به طول 231 bp جدا شده از پلاسمید pET-OsMTI-1b پس از برش با آنزیم های *Hind*III و *Eco*RI.

Figure 1- Restriction enzyme analysis of recombinant pET-OsMTI-1b plasmid with *Eco*RI and *Eco*RI enzymes. Lane 1: 100 bp plus DNA Ladder, Lane 2: the 231 bp fragment corresponding to OsMTI-1b, isolated from digested pET-OsMTI-1b plasmid.



شکل 2- نمای شماتیک نواحی بیان شونده بر روی پلاسمید pET41a (پلاسمید شاهد) و-pET OsMTI-1b که به ترتیب منجر به سنتز پروتئین هایی با وزن مولولکولی 35/5 (با نام قراردای GST) و 39/9 کیلودالتون (با نام قراردادی GST-OsMTI-1b) می گردد.

Figure 2- Schematic illustration of expression regions on pET41-a (control) and pET-OsMTI-1b plasmids, which encode for 35.5 (designated as GST) and 39.9 KDa (designated as GST-OsMTI-1b) proteins, respectively.



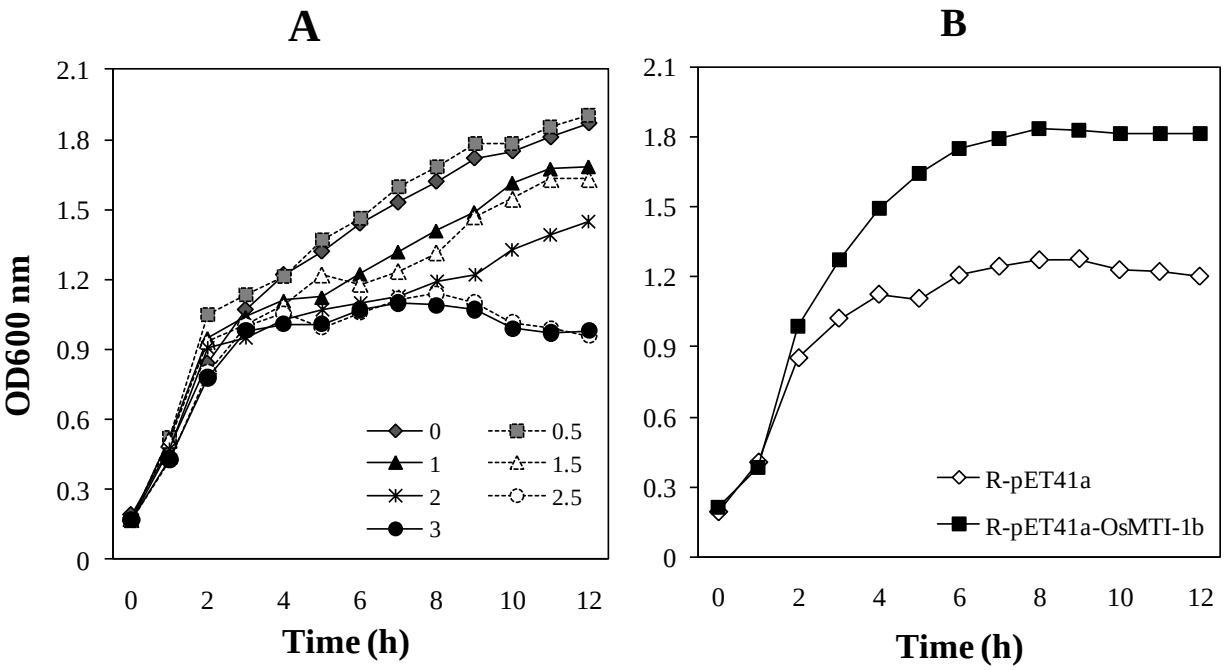
شکل 3- آنالیز SDS-PAGE بیان و خالص سازی پروتئین ها ی نوترکیب GST و -GST OSMTI-1b تولید شده در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) . PM: نشانگر پروتئینی؛ محتوای پروتئین های محلول استخراج شده در زمان های صفر، 1، 2، 3 و 4 ساعت پس از القاء IPTG از سلول های باکتری حامل پلاسمید pET-OsMTI-1b(ستون های 1-5) و pET41a (ستون های 6-10)؛ پروتئین های GST-OSMTI-1b و GST خالص شده (ستون های 11و 12).

Figure 3- SDS-PAGE analysis for verification of expression and purification of GST and GST-OsMT fusion proteins overexpressed in *E. coli* Rosetta (DE3) cells. PM, protein marker; Total soluble proteins extracted at 0, 1, 2, 3 and 4 hours after in induction with IPTG, from E. coli cells harboring pET-OsMTI-1b (lanes 1-5) and pET41a (lanes 6-10); Purified GST-OsMTI-1b and GST (lanes 11 and 12).

تاثیر بیان پروتئین نوترکیب GST-OSMTI-1b بر میزان تحمل باکتری *E. coli* به فلز نیکل

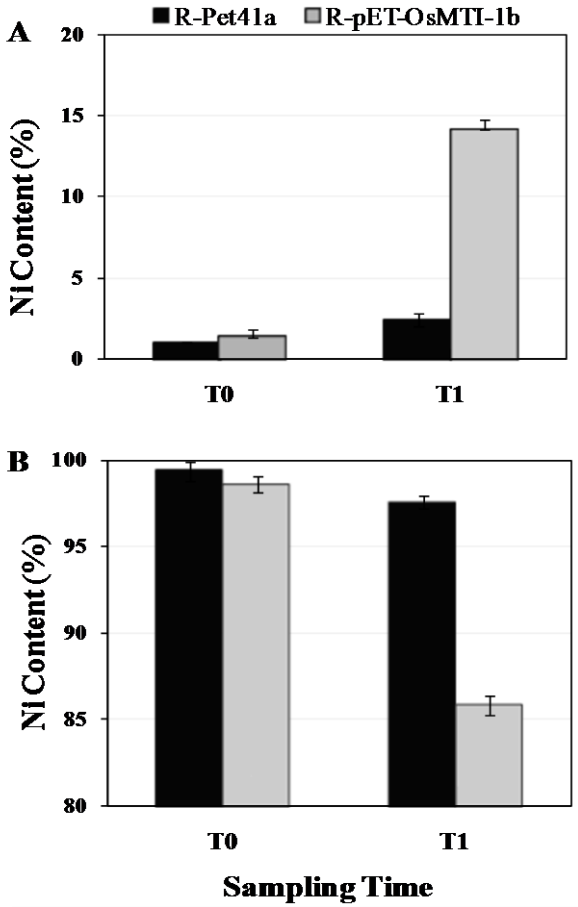
منحنی رشد سلول‌های باکتری شاهد (سلول‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pET41a فاقد ژن) در حضور غلظت‌های مختلف نمک $NiCl_2$ ترسیم شد. بر اساس نتایج، آستانه‌ی تحمل این سلول ها برای فلز نیکل غلظت 2/5 میلی مولار تعیین شد (شکل 4–A). در نتیجه، میزان رشد سلول‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pET-OsMTI-1b در مقایسه با سلول‌های شاهد در غلظت 2/5 میلی مولار نمک $NiCl_2$ بررسی شد. در این شرایط در حالی که میزان رشد سلول های شاهد به شدت کاهش یافت، سلول‌های حاوی پلاسمید pET-OsMTI-1b رشد عادی داشتند و میزان OD نهایی آن ها به 1/81 رسید که در مقایسه با سلول های شاهد 50/8٪ بیشتر بود (شکل 4–B).

به منظور اطمینان از این که افزایش مقاومت مشاهده شده در سلول‌های بیان کننده پروتئین GST-OsMTI-1b به فلز نیکل در اثر افزایش ظرفیت این سلول‌ها برای جذب فلز می باشد، میزان فلز تجمع یافته در سلول و همچنین کاهش فلز از محیط کشت در دو زمان اضافه شدن فلز به محیط (T0) و شش ساعت پس از آن (T1) اندازه گیری شد. بر اساس نتایج، در زمان T0 میزان تجمع فلز نیکل در سلول های بیان کننده پروتئین GST-OsMTI-1b و سلول‌های شاهد بسیار اندک و تقریباً مشابه بود. اما در زمان T1، سلول‌های بیان کننده پروتئین GST-OsMTI-1b، 14/16٪ از فلز به کار رفته در محیط کشت را در خود تجمع دادند که این میزان شش برابر میزان تجمع فلز در سلول‌های باکتری شاهد بود (شکل 5–A). بررسی میزان فلز نیکل در محیط کشت نیز بیانگر کاهش قابل توجه این فلز در زمان T1 از محیط کشت سلول‌های بیان کننده پروتئین بود (شکل 5–B).



شکل 4- A) تأثیر غلظت‌های مختلف نمک $NiCl_2$ بر منحنی رشد باکتری شاهد (سلول های حامل پلاسمید pET41a)؛ B) تأثیر بیان پروتئین نوترکیب GST-OsMTI-1b بر میزان تحمل سلول های باکتری *E. coli* در برابر غلظت 2/5 میلی مولار فلز نیکل.

Figure 4- A) Effect of different concentrations of $NiCl_2$ on growth curve of *E. coli* cells harboring pET41a plasmid (control cells); B) Effect of GST-OsMTI-1b overexpression on *E. coli* cells tolerance to 2.5 mM of Ni^{+2}.



شکل 5- بررسی میزان فلز نیکل در رسوب باکتریایی و محیط کشت سلول های بیان کننده پروتئین-های GST (شاهد) و GST-OsMTI-1b. A) میزان تجمع نیکل در رسوب سلول های باکتری در زمان-های صفر (T0) و شش ساعت پس از (T1) اضافه کردن فلز و IPTG به محیط کشت؛ B) میزان فلز در محیط‌های کشت در زمان های T0 و T1. هر داده میانگین (± انحراف معیار) دو آزمایش مستقل می‌باشد.

Figure 5- Accumulation of Ni^{+2} in the strains expressing GST and GST-OsMTI-1b A, Contents of metals in the cells at 0 (T0) and 6 h (T1) after addition of metals and IPTG to the medium. B, Contents of metals in the medium at T0 and T1. Each data represents the mean ± SD obtained from two independent experiments.

بررسی الگوی جذب نور پروتئین‌های انکوبه شده با فلز نیکل

قابلیت اتصال پروتئین نوترکیب GST-OsMTI-1b به فلز نیکل، از طریق انکوباسیون مستقیم این پروتئین در حضور فلز نیکل در شرایط این ویترو مورد ارزیابی قرار گرفت. اتصال یون های فلزی به گروه‌های تیول (SH) پروتئین‌های MT موجب تغییر در الگوی جذب نور این پروتئین ها می‌گردد که موقعیت و شدت

تغییرات به ماهیت و میزان فلز اتصال یافته بستگی دارد. این ویژگی تحت عنوان " انتقال بار لیگاند به فلز[1] " (LMCT) شناخته می‌شود (Freisinger 2008, 2011). طبق مطالعات پیشین، تشکیل دستجات تیول/نیکل ($S \rightarrow Ni^{+2}$) در پروتئین‌های MT با افزایش جذب نور در محدوده طول موج های 290 و 316 نانومتر همراه است (Cavet *et al*. 2003; Cun *et al*. 2008). همانطور که در شکل 6 مشاهده میگردد، طیف نوری نمونه‌های پروتئینی Ni/ GST-OsMTI-1b در مقایسه با نمونه apo-GST-OsMTI-1b افزایش جذب مشخصی را در محدوده‌ی ذکر شده برای دستجات $S \rightarrow Ni^{+2}$ نشان می‌دهد که بیانگر اتصال یون‌های فلز نیکل به پروتئین نوترکیب GST-OsMTI-1b می باشد. با مقایسه طیف جذب نور نمونه های apo-GST و Ni/ GST تغییر جذب قابل توجهی مشاهده نگردید. این امر نشان دهنده‌ی عدم تأثیر دنباله‌ی پروتئینی بر خصوصیات و قابلیت اتصال به فلز ایزوفرم OsMTI-1b می‌باشد.

بررسی قابلیت اتصال پروتئین‌های نوترکیب به نیکل از طریق واکنش با DTNB

توانایی پروتئین GST-OsMTI-1b برای اتصال به فلز نیکل از طریق واکنش رقابتی به DTNB نیز مورد بررسی قرار گرفت. در طی این واکنش، گروه های تیول آزاد پروتئین موجب احیاء شدن پل دی سولفیدی موجود در ساختار DTNB می‌شود. در نتیجه آن، آنیون 2-نیترو-5-تیوبنزوئیک اسید[2] (TNB^-) تولید می‌گردد که در طول موج 412 نانومتر دارای حداکثر جذب می‌باشد (Emoto *et al*. 1996; Toriumi *et al*. 2005). شکل 7، الگوی واکنش نمونه‌های پروتئینیapo-GST-OsMTI-1b و Ni/ GST-OsMTI-1b با DTNB را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج، واکنش نمونه‌ی apo-GST-OsMTI-1b با DTNB با سرعت اولیه 2190/81 نانومول بر دقیقه انجام شد و پس از اتمام واکنش میزان جذب نور در طول موج 412 نانومتر به 0/372 رسید. درحالی که در واکنش نمونه‌ی Ni/ GST-OsMTI-1b با DTNB میزان سرعت اولیه واکنش 4/7 برابر کاهش یافت (466/7 نانومول بر دقیقه) و میزان جذب نهایی در طول موج 412 نانومتر به 0/26 رسید. این نتایج بیانگر حضور وجود گروه‌های تیول آزاد کمتر در نمونه پروتئین GST-OsMTI-1b انکوبه شده با فلز نیکل و به عبارت دیگر بیانگر ظرفیت بالای این پروتئین برای اتصال به فلز نیکل می‌باشد.

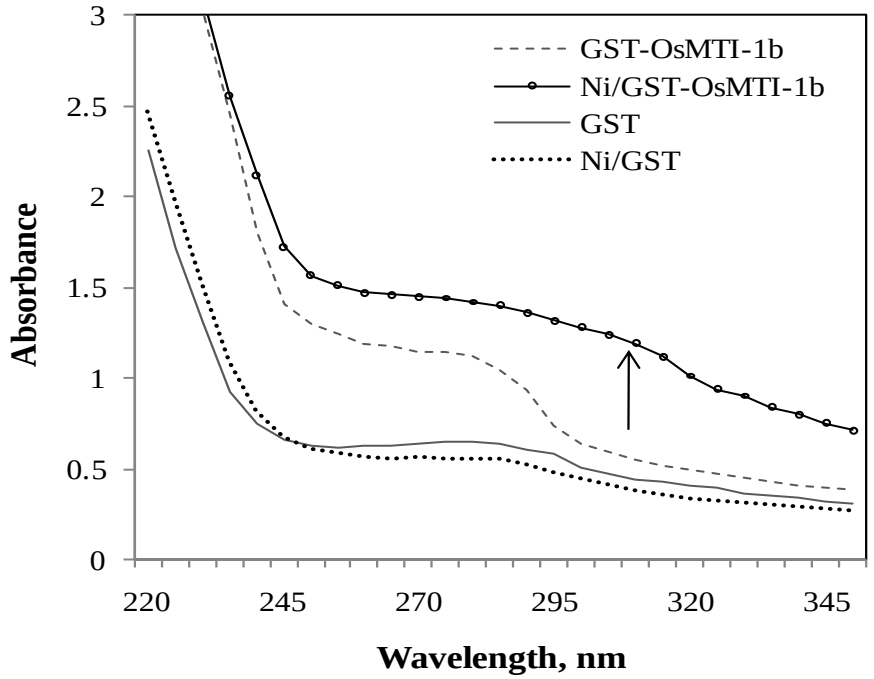
بحث

یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقابله با تنش فلزات سنگین در موجودات، تولید کلاته کننده-های درون سلولی غنی از آمینواسیدهای Cys مانند MTها می‌باشد. تعداد زیاد و آرایش ویژه

[1] Ligand to Metal Charge Transfer

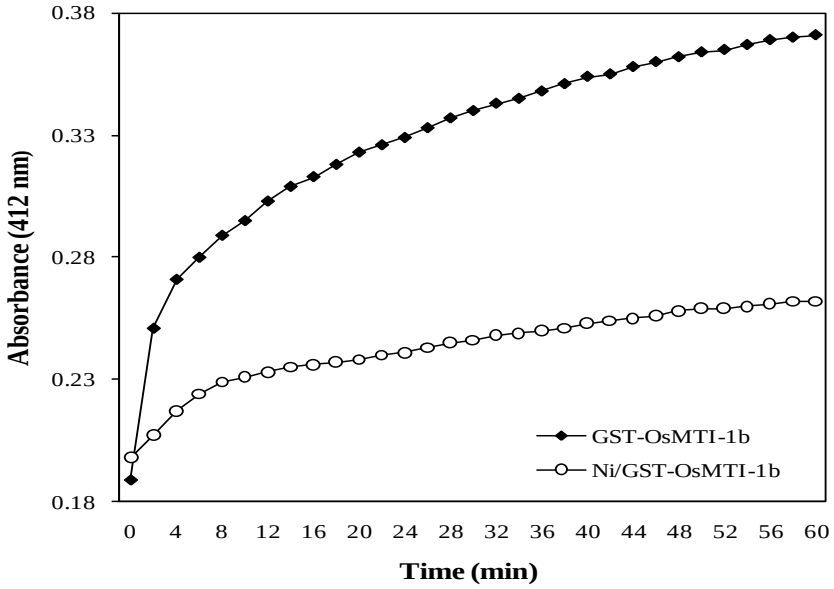
[2] [2] 2-nitro-5-thiobenzoic acid

آمینواسیدهای Cys در این پروتئین‌ها امکان اتصال آن‌ها به فلزات را فراهم نموده است (Cobbett & Goldsbrough 2002; Hall 2002). در گیاهان ایزوفرم‌های متعدد MT وجود دارد که در اثر عوامل گوناگون، در بافت‌ها و مراحل رشدی مختلف گیاه بیان می‌شوند. با این وجود استخراج و بررسی مستقیم ویژگی‌های این پروتئین‌ها از منابع گیاهی به دلیل حساسیت بالای آن‌ها به تخریب پروتئولیتیک و اکسید شدن آمینواسیدهای سیستئین در حضور اکسیژن، بسیار مشکل می‌باشد (Freisinger 2008; Huang and Wang 2010; Chaturvedi *et al*. 2012). بیان دگرساخت ایزوفرم‌های MT به عنوان پروتئین-های الحاقی در میزبان‌هایی نظیر *E. coli*، مخمر و آرابیدوپسیس، به عنوان راهکاری به منظور تسهیل تولید، خالص سازی و بررسی ویژگی های بیوشیمیایی این پروتئین‌ها در حال گسترش می-باشد.



شکل 6- الگوی جذب نور پروتئین های GST و GST-OsMTI-1b انکوبه شده با یون های فلزی نیکل. افزایش جذب نور در طیف نوری پروتئین Ni/GST-OsMTI-1b (ناحیه مشخص شده توسط فلش) بیانگر تشکیل دستجات نیکل/تیول در ساختار این پروتئین می باشد.

Figure 6- UV absorption spectra of GST and GST-OsMTI-1b proteins incubated with Ni^{+2} ions. The intensified absorptions in spectrum Ni/GST-OsMTI-1b complexes (shown with arrow), indicate the formation of Ni-thiolate clusters in protein.



شکل 7- مقایسه واکنش پروتئین GST-OsMTI-1b با DTNB، در دو فرم آپو و انکوبه شده با فلز نیکل. واکنش شامل 1/5 نانومول از نمونه پروتئینی و 75 نانو مول DTNB می باشد. پیشرفت واکنش با اندازه گیری میزان جذب در طول موج 412 نانومتر بررسی شد.

Figure 7- Comparing the reactivity of apo and Ni-incubated forms of GST-OsMTI-1b proteins with DTNB. 1.5 nmol of each protein sample was reacted with 75 nmol of DTNB and the absorbance was measured spectrophotometrically at 412 nm.

در پژوهش حاضر، تاثیر بیان دگرساخت ایزوفرم OsMTI-1b از تیپ 1 ژن های MT برنج، بر میزان تحمل باکتری *E. coli* به فلز نیکل مورد بررسی قرار گرفت. دنباله‌ی پروتئینی GST به دلیل حلالیت بالا و پایداری در برابر تخریب پروتئولیتیک (Esposito & Chatterjee 2006)، به عنوان شریک الحاقی در انتهای آمینی پروتئین مورد استفاده قرار گرفت که نتیجه آن تولید میزان قابل توجهی از فرم محلول پروتئین‌های GST و GST-OsMTI-1b در سیتوپلاسم سلول‌های *E. coli* بود. ترسیم منحنی رشد سلول‌های باکتری در حضور فلز نیکل نشان داد بیان ایزوفرم OsMTI-1b تاثیر قابل توجهی در افزایش تحمل باکتری *E. coli* به این فلز دارد. تاثیر بیان ژن های MT گیاهی در افزایش تحمل باکتری *E. coli* به برخی فلزات سنگین در تعدادی از مطالعات پیشین نیز گزارش شده است. Bilecen *et al.* (2005) نیز بیان داشتند بیان ایزوفرم dMT گندم دوروم (*Triticum durum*) در الحاق با دنباله‌ی GST، آستانه تحمل باکتری *E. coli* به فلز کادمیوم را به میزان چهار برابر افزایش بخشید. به طور مشابه بیان فراوان پروتئین GST-SbMT-2 از گیاه هالوفیت *Salicornia brachiata* موجب افزایش قابل توجه تحمل سلول‌های باکتری *E. coli* به فلزات روی، مس و کادمیوم شد (Chaturvedi *et al.* 2012). با اندازه‌گیری میزان

فلز در سلول‌های بیان کننده پروتئین‌های نوترکیب و محیط کشت مشخص گردید که بیان فراوان ایزوفرم OsMTI-1b سلول‌های باکتری را قادر می‌سازد میزان قابل توجهی از فلز نیکل را از محیط کشت جذب نموده و در خود تجمع دهند. بنابراین، به نظر می‌رسد تشکیل ساختارهای Ni/GST-OsMTI-1b در محیط داخل سلولی با کلاته نمودن نیکل، موجب حفاظت قسمت‌های مختلف سلول از آسیب این فلز و افزایش تحمل سلول های باکتری می‌گردد. در بررسی انجام شده توسط Sekhar *et al.* (2011) نیز بیان ایزوفرم CcMT1 از گیاه *Cajanus cajan* در باکتری *E. coli*، میزان تحمل این باکتری به فلزات کادمیوم و مس را از طریق افزایش تجمع درون سلولی این فلزات افزایش بخشید. همچنین بیان ایزوفرم MT3 از گیاه *Elaeis guineensis* در الحاق با دنباله‌ی GST، میزان تجمع فلز روی در سلول‌های باکتری *E. coli* را سه برابر افزایش داد (Abdullah *et al.* 2002). در پژوهش دیگر نیز، بیان ژن AhMT2a از گیاه *Arachis hypogae* موجب افزایش تحمل باکتری *E. coli* به فلزات کادمیوم، مس و سرب از طریق افزایش تجمع این فلزات در سیتوپلاسم سلول‌های باکتری شد (Quan *et al.* 2007).

به منظور بررسی توانایی پروتئین نوترکیب GST-OsMTI-1b برای اتصال به فلزات در شرایط این ویترو، فرم عاری از فلز آن تولید و در محیط حاوی فلز نیکل انکوبه شد. افزایش شدت جذب نور در محدوده LMCT مورد انتظار برای اتصال یون‌های نیکل به گروه های تیول ($S \rightarrow Ni^{+2}$) در الگوی جذب نور پروتئین GST-OsMTI-1b، مؤید تشکیل دستجات تیول/ نیکل در ساختار این پروتئین بود. از سوی دیگر واکنش با DTNB، حضور گروه‌های تیول آزاد کمتر در پروتئین GST-OsMTI-1b انکوبه شده با فلز نیکل در مقایسه با نمونه آپوپروتئین را تائید نمود.

یافته‌های پژوهش حاضر قابلیت بالای ایزوفرم OsMTI-1b در کلاته نمودن فلز نیکل و تاثیر بیان آن در افزایش تحمل باکتری *E. coli* به تنش این فلز را اثبات نمود. این نتایج می‌تواند منعکس کننده نقش این پروتئین در حفاظت سلول‌های گیاه برنج در برابر تنش فلزات باشد. با توجه به آلودگی روزافزون مزارع کشاورزی به فلزات سنگین و همچنین جایگاه ویژه برنج در بین غلات، استفاده از روش ارائه شده در این تحقیق به منظور بررسی نقش ایزوفرم‌های دیگر برنج تحت شرایط تنش فلزات مختلف، می‌تواند در اصلاح ارقام مقام برنج برای کشت در مناطق آلوده مؤثر باشد. از سوی دیگر با توجه به توانایی بالای سلول‌های باکتری ترانسفورم شده با ایزوفرم OsMTI-1b در تجمع فلز، این امکان وجود دارد که با دست ورزی میکروارگانیسم‌های مناسب، بتوان از ظرفیت بالای اتصال به فلزات این پروتئین‌ها برای پالایش زیستی مناطق آلوده به فلزات استفاده نمود.

منابع

Abdullah, SNA, Cheah SC, Murphy D J (2002). Isolation and characterization of two divergent type 3 metallothioneins from oil palm, *Elaeis guineensis*. Plant Physiology and Biochemistry 40: 255–263.

Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, Yokota A (2004). Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. Biochemical and Biophysical Research Communications 323: 72-78.

Bremner I, Beattie JH (1990) Metallothionein and the trace minerals. Annual Review of Nutrition10:63–83.

Bilecen K, Ozturk UH, Duru AD, Sutlu T, Petoukhov MV, Svergun DI, Koch MH, Sezerman UO, Cakmak I, Sayers Z (2005). *Triticum durum* metallothionein: isolation of the gene and structural characterization of the protein using solution scattering and molecular modeling. Journal of Biological Chemistry 280: 13701 –13711.

Blindauer CA (2008) Metallothioneins with unusual residues: histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. Journal of Inorganic Biochemistry 102: 507–521.

Cavet JS, Graham AI, Meng W, Robinson NJ (2003). A cadmium-lead-sensing ArsR-SmtB repressor with novel sensory sites. Journal of Biological Chemistry 277:38441–38448.

Chaturvedi AK, Mishra A, Tiwari V, Jha B (2012). Cloning and transcript analysis of type 2 metallothionein gene (SbMT- 2) from extreme halophyte *Salicornia brachiata* and its heterologous expression in *E. coli*. Gene 499: 280–287.

Cobbett C, Goldsbrough P (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annual Review of Plant Biology 53: 159–182.

Cun SJ, Li HY, Ge RG, Lin MCM, Sun H (2008). A histidine- and cysteine-rich metal binding domain at the C-terminus of heat-shock protein A from Helicobacter pylori: implication for nickel homeostasis and bismuth susceptibility. Journal of Biological Chemistry 283: 15142-15151.

Dallinger R, Wang Y, Berger B, Mackay EA, Kagi JH (2001). Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail, *Helix pomatia*. European Journal of Biochemistry 268: 4126–4133.

Domenech J, Orihuela R, Mir G, Molinas M, Atrian S, Capdevila M (2007). The Cd^{II} binding abilities of recombinant *Quercus suber* metallothionein: Bridging the gap between phytochelatins and metallothioneins. Journal of Biological Inorganic Chemistry 12: 867–882.

Emoto T, Kurasaki M, Oikawa S, Suzuki-Kurasaki M, Okabe M, Yamasaki F, Kojima Y (1996). Roles of the conserved serines of metallothionein in cadmium binding. Biochemical Genetics 34: 239–251.

Esposito DC, Chatterjee DK (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. Current Opinion in Biotechnology 17: 353–358.

Freisinger E (2011). Structural features specific to plant metallothioneins. Journal of Biological Inorganic Chemistry. 16: 1035–1045.

Freisinger E (2008). Plant MTs- Long neglected members of the metallothionein superfamily. Dalton Transactions 47: 6663–6675.

Freisinger E (2007). Spectroscopic characterization of a fruit specific metallothionein *M.acuminata* MT3. Inorganica Chimia Acta 360: 369-380

Ghosh M, Singh SP (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. Applied Ecology and Environmental Research 3: 1-18.

Guo W J, Metha M and Goldsbruogh PB (2008). Examining the specific contribution of individual Arabidopsis metallothionein to copper distribution and metal tolerance. Plant Physiology 146: 1697–1706.

Guo WJ, Bundithya W Goldsbrough PB (2003). Characterization of the arabidopsis metallothionein gene family: Tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. New Phytologist 59: 369-381.

Hall JL (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany 53: 1–11.

Hassinen VH, Tervahauta AI, Schat, Karenlampi SO (2011) Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity? Plant Biology 13: 225-232.

Huang GY, Wang YS (2010). Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicennia marina*) in response to metal stress. Aquatic Toxicology l99: 86-92.

Margoshes M, Vallee BL (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. Journal of the American Chemical Society 79: 4813-4814.

Mir G, Domenech J, Huguet G, Guo WJ, Goldsbrough P (2004). A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. Journal of Experimental Botany 55: 2483–2493.

Murphy A, Zhou J, Goldbrough P, Taiz L (1997). Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from Arabidopsis. Plant Physiology 1293–1301.

Nies DH (1999). Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology 51: 730-750.

Quan XQ, Shan L, Bi YP (2007). Cloning of metallothionein genes from *Arachis hypogaea* and characterization of AhMT2a. Russian Journal of Plant Physiology 54: 669–675.

Schicht O, Freisinger E (2009). Spectroscopic characterization of Cicer arietinum metallothionein. Inorganica Chimia Acta 362: 714–724.

Sekhar K, Priyanka, Reddy VD, Rao KV (2011). Metallothionein 1 (CcMT1) of pigeon-pea (*Cajanus cajan*, L.) confers enhanced tolerance to copper and cadmiumin *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*. Environmental and Experimental Botany 72: 131–139.

Toriumi S, Saito T, Hosokawa T, Takahashi Y, Numata T, Kurasaki M (2005). Metal binding ability of metallothionein-3 expressed in *E. coli*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 96: 295–301.

Xue T, Li X, Zhu W, Wu C, Yang G, Zheng C (2009). Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. Journal of Experimental Botany 60: 339-349.

Yang J, Wang Y, Liu G, Yang C, Li C (2011). *Tamarix hispida* metallothionein-like ThMT3, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} and NaCl in transgenic yeast. Molecular Biology Reports 38: 1567–1574.

Zhou GK, Xu YF, Li J, Yang LY (2006). Molecular analyses of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). Biochemistry and Molecular Biology 387: 87-93.

Heterologous Expression of a Rice Metallothionein type 1 Isoform in *Esherichia coli* and Study of It's Binding Ability to Nickel

Mohammadi Nezhad R.[1], Shahpiri A.*[2], Mirlohi A.[3]

[1]MSc, Department of Agriculture Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Agriculture Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
[3]Professor, Department of Agriculture Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

:

Abstract

Plants process several potential cellular mechanisms for detoxification of heavy metals. One of the most important mechanisms is synthesis of metal binding peptides and proteins such as metallothioneins (MTs). MTs are low molecular weight and cystein-rich proteins that can bind metal ions through their thiol groups. In this study the coding sequence of gene encoding OsMTI-1b isoforms from rice (), was cloned in pET41a and transferred into expression host, *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). After induction with IPTG, considerable amount of recombinant proteins was produced in the soluble fraction of the *E.coli* transforman. Recombinant proteins were purified using affinity chromatography. The tolerance of cells expressing recombinant proteins toward Ni, were compared to control by plotting their growth curve in addition to determination of the amount of accumulated Ni ions in bacterial cells and culture medium using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). According to the results, over-expression of OsMTI-1b isoform increased the tolerance of *E. coli* cells to Ni through accumulation of more metal ions inside cells. Furthermore, the UV absorption spectra and competitive reactions of *in vitro* Ni-incubated proteins with 5-5' dithiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB) revealed that GST-OsMTI-1b protein is able to form Ni-thiolate clusters. Taken together, these data indicate that OsMTI-1b isoform may be involved in protection of rice cells against heavy metal toxicity.
Keywords: *Cloning, Heavy metals, Heterologous protein expression, Metallothionein.*

* Corresponding Author: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir Tel: 03113913354 Email: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir