

Isolation and Cloning of mercuric reductase gene (*merA*) from mercury-resistant bacteria

Pariyas Khoshniat

MSc of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, pkhoshniat@yahoo.com

Alireza Tarinejad *

Associate Professor of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, atarinejad@yahoo.com

Mohammad Pazhang

Associate Professor of Cell and Molecular Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, pazhang@azaruniv.edu

Abstract

Introduction: Some of the bacteria having *merA* gene coding mineral mercury reducing enzyme, has genetic potential of Hg removing via reduction of mineral mercury and transformation of that to gas form and finally bioremediation of polluted area. The aim of this study is the isolation of *merA* gene from resistance bacteria and cloning of that into suitable expression vector and then the environmental bioremediation by the transformation of bacteria with this vector.

Materials and methods: A number of bacteria were collected in contaminated areas with mercury in order to isolate *merA* genes. Polymerase chain reaction had done on the four bacterial genomes including *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* and *Escherichia coli* using the specific primers in order to detect *merA* gene. For cloning, the primers containing restriction enzyme sites are used, *merA* gene was isolated and amplified. The amplified fragments were cloned in the expression vector pET21a+ and via heat shock method were transformed into *E. coli* TOP10 competent cell. For clustering of genes, Mega software version 4 was used and bioinformatic studies were achieved for predicted enzyme.

Results: *merA* gene with 1686 bp in length was isolated from *K pneumoniae* and *E. coli*. Recombinant vectors in transgenic bacteria were confirmed by various methods and finally were confirmed by sequencing. The result of clustering these genes with existence genes in NCBI showed high similarity.

Discussion and conclusion: The existence of *merA* gene in bacteria that adapted to Hg pollution area is because of resistance, so with cloning this gene into suitable expression vector and transformation of susceptible bacteria with this vector ability of resistance to Hg in bacteria for bioremediation could be given.

Key words: Mineral Mercury, Microbial bioremediation, *merA* gene, Cloning

* Corresponding author

Received: July 26, 2015 / **Accepted:** May 16, 2017

جداسازی و همسانه‌سازی ژن کاهنده جیوه معدنی (*merA*) از باکتری‌های مقاوم به جیوه

پریسا خوش‌نیت: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، ایران، pkhoshniat@yahoo.com
علیرضا تارینژاد*: دانشیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، ایران، atarinejad@yahoo.com
محمد پاژنگ: دانشیار زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، ایران، pazhang@azaruniv.edu

چکیده

مقدمه: برخی باکتری‌ها با داشتن ژن *merA* کدکننده آنزیم کاهنده جیوه معدنی، توانایی ژنتیکی برای حذف جیوه از طریق احیای جیوه معدنی و تبدیل آن به شکل گازی و در نتیجه پاکسازی منطقه آلوده را دارند. هدف مقاله حاضر، جداسازی ژن *merA* از باکتری‌های مقاوم به جیوه و همسانه‌سازی آن در وکتور بیانی مناسب به منظور طراحی وکتور پایه‌ای برای تولید این آنزیم در باکتری و استفاده از آن برای پاکسازی محیط‌زیست است.

مواد و روش‌ها: تعدادی باکتری موجود در مناطق آلوده به جیوه برای جداسازی ژن *merA* انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای جداسازی و همسانه‌سازی ژن *merA* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی ژنوم چهار باکتری *Escherichia coli*، *Serratia marcescens*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae* انجام شد. قطعه‌های تکثیری در وکتور بیانی pET21a+ همسانه‌سازی شدند و به روش شوک حرارتی به باکتری‌های مستعد *E. coli* TOP10 تراریز شدند. خوشه‌بندی ژن کلون‌شده با ژن‌های موجود از این نوع در NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA ویرایش ۴ و بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای توالی آنزیم پیش‌بینی شده انجام شدند.

نتایج: ژن *merA* با طول ۱۶۸۶ جفت‌باز از باکتری‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* جداسازی شد. وکتورهای نوترکیب به روش‌های مختلف تأیید شدند و درستی کار با انجام توالی‌یابی تأیید شد. نتایج خوشه‌بندی، شباهت زیاد این ژن با ژن آنزیم کاهنده جیوه معدنی *E. coli* و *K. pneumoniae* در NCBI را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: وجود ژن *merA* در باکتری‌های سازگار به مناطق آلوده به جیوه، یکی از عوامل مقاومت است که با همسانه‌سازی آن در وکتور حاوی پروموتور بیانی و انتقال آن به باکتری‌ها، ایجاد و یا افزایش توانایی باکتری‌های حساس در حذف مقادیر زیاد جیوه امکان‌پذیر خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: جیوه معدنی، زیست‌پالایی میکروبی، ژن *merA* همسانه‌سازی

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

جیوه یکی از فلزهای سنگین سمی است که از طریق آلاینده‌های صنعتی و رسوبات آنها به‌طور وسیعی در اکوسیستم گسترش یافته است. منشأ آلودگی جیوه، صنایع مصرف‌کننده آن شامل تولیدکننده‌های کلرآلکالی، رنگ‌ها، ضدعفونی‌کننده‌ها، مواد دارویی، کاغذ، خمیر کاغذ و ... هستند. سوخت‌های فسیلی یکی از منابع بزرگ آلودگی جیوه در محیط‌زیست (۱) و فاضلاب‌ها منشأ وسیع دو نوع جیوه آلی و غیرآلی مانند جیوه عنصری^۱، جیوه‌متیل کلرید^۲ و دی‌متیل‌جیوه^۳ هستند (۲). جیوه، آلاینده زیست‌محیطی بزرگ و جزو توکسین‌های قابل جمع‌آوری زیستی^۴ است که در محیط‌زیست به مدت طولانی پایدار می‌ماند (مدت پایداری آن بین ۰/۵ تا ۲ سال برآورد شده است) (۳). جیوه، شکل‌های شیمیایی خود را در محیط‌زیست تغییر می‌دهد، از یک مکان به مکان دیگر حرکت می‌کند و داخل خاک و رسوبات دفن می‌شود (۴). بیشتر گیاهان دریایی و حیوانات جیوه را جذب می‌کنند و موجودات شاخه‌های پایین چرخه غذایی (مانند پلانکتون‌ها) جیوه را در بدن خود به دام می‌اندازند. زمانی که گیاه‌خواران یا گوشت‌خواران شاخه‌های بالاتر زنجیره غذایی پلانکتون‌ها را می‌خورند، جیوه به بدن ماهی‌ها منتقل می‌شود و در نهایت، انسان‌ها آنها را مصرف می‌کنند. جیوه عاملی جهش‌زا، مهارکننده رشد، دارای آثار سمی و عامل بیشتر بیماری‌های مهم انسانی و سندرم است. آثار جیوه روی عملکرد اکوسیستم از نظر اقتصادی و بهداشتی درخور توجه است (۵).

زیست‌پالایی یکی از روش‌های مهندسی زیستی مطمئن برای پاکسازی محیط‌های آلوده با استفاده از میکروب‌ها یا آنزیم‌های آنها، گیاهان و کرم‌های خاکی

است (۶). از آنجا که این روش، فرایندی طبیعی است و مواد سمی در کنار محصولات آن تولید نمی‌شوند در مقایسه با سایر روش‌های پالایش مقرون به صرفه است. همچنین راه حلی پایدار و دائمی است که موجب معدنی‌سازی آلاینده‌ها^۵ در محیط‌زیست می‌شود (۷). مقاومت به جیوه در انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی مشاهده شده است. در باکتری‌ها، ژن‌های مقاومت به جیوه بیشتر در اپرونی روی پلاسمید و یا ترانسپوزون‌ها قرار دارند. اپرون مقاومت به طیف ضعیفی از جیوه^۶ (*merRTPADE*) فقط در برابر جیوه غیرآلی مقاوم است و اپرون مقاوم به طیف وسیع جیوه^۷ (*mer RTPAGBD*-E) در برابر هر دو نوع جیوه آلی و غیرآلی مقاومت نشان می‌دهد (۸ و ۹). در این اپرون، *merA* آنزیم کاهنده جیوه^۸ را رمز می‌کند و این پروتئین سیتوپلاسمی نقش اصلی را در حذف جیوه دارد. این آنزیم Hg^{2+} را طبق مکانیسم زیر به Hg^0 با سمیت کمتر تبدیل می‌کند (۱۰):



Hg^0 به‌شدت فرار است و آزادانه از غشاهای زیستی به بیرون سلول عبور می‌کند و به اتمسفر باز می‌گردد؛ این آخرین گام مسیر غیرسمی‌سازی جیوه در باکتری‌های مقاوم به جیوه است و به این ترتیب، باکتری‌ها جیوه را از محیط اطراف خود حذف می‌کنند (۱۰). با توجه به اهمیت جیوه از نظر آلودگی زیست‌محیطی، پاکسازی آن از روش مهندسی ژنتیک ضروری و کم‌هزینه است. پژوهش حاضر با هدف جداسازی ژن *merA* از باکتری‌های مقاوم به جیوه و تولید وکتور نو ترکیب بیانی، مقدمه‌ای برای مهندسی ژنتیک باکتری‌ها برای افزایش توانایی آنها در پاکسازی جیوه و تولید آنزیم *MerA* برای بررسی ویژگی‌های آنزیم در مطالعه‌های آینده است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها، شرایط رشد و آغازگرهای استفاده‌شده:
چهار نوع باکتری از باکتری‌هایی که پژوهشگران در پژوهش‌های پیشین از مناطق مختلف آلوده به جیوه جداسازی و به‌عنوان باکتری‌های مقاوم به جیوه شناسایی کرده بودند (۱۱ و ۱۲) شامل *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)، *Pseudomonas aeruginosae* (ATCC 9027)، *Escherichia coli* (ATCC 8739) و *Serratia marcescens* (ATCC 13880) از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه و در محیط کشت جامد nutrient agar حاوی آنتی‌بیوتیک اختصاصی هر باکتری به ترتیب آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، استرپتومایسین و سفوتاکسیم و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. سپس، باکتری‌های رشد کرده برای تهیه

پیش‌کشت در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی آنتی‌بیوتیک و ۲۴ ساعت در شیکر با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای استخراج پلاسمید باکتری‌ها از روش پیشنهادشده برنیویم و دالی^۹ استفاده شد (۱۳). کمیت و کیفیت DNA پلاسمیدی با روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز تعیین شد.

آغازگرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر با استفاده از توالی‌های موجود در NCBI^{۱۰} با نرم‌افزار Vector NTI طراحی شدند، گروه اول برای جداسازی و سنتز ژن (بدون سایت برشی) و گروه دوم که برای سنتز و توالی‌یابی استفاده شدند، دارای سایت برشی برای همسانه‌سازی در وکتور بیانی بودند (جدول ۱).

جدول ۱- لیست پرایمرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر

نام پرایمر	توالی پرایمر
Mer A-R	5'GCTCCGGCGCAGCACGAAAAGCT3'
Mer A-F	5'TGCATGACCACCCTGAAAATCACCGGG3'
Mer A- R- K- BamHI	5'GCG*GATCCTCCGGCGCAGCACGAAAAGCT3'
Mer A- F- K- NheI	5'TGCG*CTAGCATGACCACCCTGAAAATCACCGGG3'

درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ ثانیه و سپس مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس، برای ۳ میکرولیتر از محصول PCR به همراه نشانگر مولکولی ۱ کیلو باز روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد. برای تأیید ژن تکثیری با استفاده از آنزیم‌های برشی، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR خالص‌سازی‌شده توسط ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *EcoRI* در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت هضم شد.

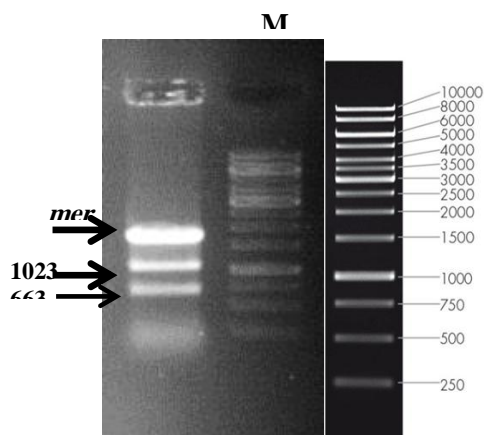
واکنش PCR^{۱۱}، جداسازی ژن *merA* و تأیید درستی توالی: واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر master mix (سیناژن)، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر DNA پلاسمیدی (الگو) و ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشتی بود. مراحل برنامه تکثیر ژن *merA* در دستگاه ترموسایکلر شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۳۵ چرخه شامل سه مرحله دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۵۸

همسانه‌سازی در وکتور بیانی pET21a+ و وکتور بیانی

pET21a+ (Invitrogen) در پژوهش حاضر برای همسانه‌سازی و توالی‌یابی استفاده شد. وکتور pET21a+ دارای توالی HIS-tag \times 6 در بخش انتهای کربوکسیل پروتئین مدنظر است که برای تخلیص پروتئین نو ترکیب در پژوهش‌های بعدی تعبیه شده است. این وکتور با داشتن پروموتور T7 در باکتری بیانی BL21 سوش DE3 بیان می‌شود. ژن انتخابگر آن برای گزینش، ژن مقاومت به آمپی‌سیلین (ژن بتالاکتاماز) است. قطعه‌های DNA تکثیر یافته با استفاده از سایت‌های برشی *NheI* و *BamHI* برش داده شدند که به ترتیب در ساختار آغازگرهای رفت و برگشتی طراحی شده بودند. واکنش هضم با آنزیم‌های برشی به شکل جداگانه در حجم ۵۰ میکرولیتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول هضم شده روی ژل آگارز با 1 LMP^{12} درصد بارگذاری و باند مربوط به ژن *merA* با اندازه ۱۶۸۶ جفت باز از روی ژل جداسازی و برای واکنش لیگاسیون خالص‌سازی شد؛ به این شکل که قطعه ژل حاوی DNA مدنظر پس از برش، ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه ترمومیکسر قرار گرفت. سپس ۴ برابر حجم، بافر LMP (Tris-HCl) ۲۰۰ میلی‌مولار و EDTA ۱ میلی‌مولار) به آن اضافه شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از حل شدن کامل ژل، ۱ برابر حجم، فنل اشباع به آن اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از خالص‌سازی با روش فنل کلروفرم، رسوب باقیمانده در ۲۰ میکرولیتر آب حل شد.

واکنش لیگاسیون در حضور آنزیم T4 لیگاز (فرمنتاز) و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت برای قطعه‌های تکثیری *merA* و وکتور برش یافته با آنزیم‌های برشی *BamHI* و *NheI* انجام شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول لیگاسیون به ازای هر بار تراریزش، به باکتری‌های مستعد شوک حرارتی *E. coli* سویه TOP10 منتقل شد و سپس در دمای ۳۷ درجه کشت داده شدند (۱۴). پس از گذشت یک شبانه‌روز، استخراج پلاسمید از کلنی‌های رشد کرده در محیط گزینش برای تأیید درستی همسانه‌سازی انجام شد. روش هضم آنزیمی برای اطمینان کامل از تأیید حضور پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *merA* در کلنی‌های حاصل از واکنش لیگاسیون استفاده شد. پلاسمیدهایی که وجود ژن در آنها طی واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* تأیید شده بود، با آنزیم‌های برشی *BamHI* و *NheI* برش داده شدند. برای بررسی توالی ژن همسانه‌سازی شده، نمونه DNA پلاسمید نو ترکیب *merA-pET21* تأیید شده برای تعیین توالی به مرکز توالی‌یابی Macrogen کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های ثبت شده در NCBI برای ژن *merA* با شماره دستیابی KJ187752.1 با نتایج حاصل از توالی‌یابی با دو نرم‌افزار بلاست^{۱۳} و مولتی‌الاین^{۱۴} مقایسه شدند. سپس توالی آمینواسیدی مربوط به توالی مورد توافق در هم‌ردیفی ژن *merA* همسانه‌سازی شده با استفاده از نرم‌افزار APE حاصل شد. توالی آمینواسیدی حاصل با توالی آمینواسیدی مربوط به پروتئین MerA موجود در NCBI با شماره دسترسی AJD77091.1 با استفاده از نرم‌افزار Multalign مقایسه شد.

نتایج



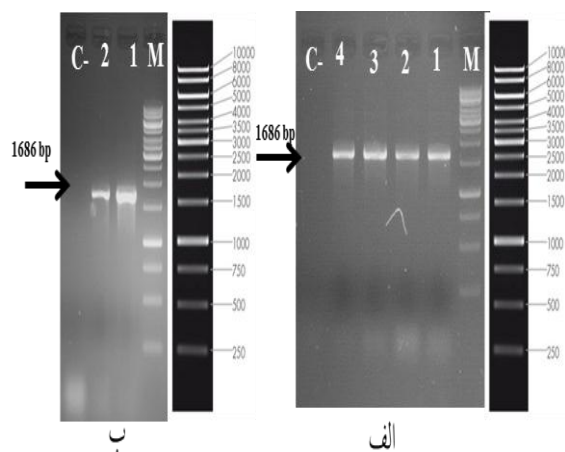
شکل ۲- الکتروفورز محصول واکنش هضم ژن *merA* با آنزیم *EcoRI* در ژل آگارز ۱ درصد. با توجه به توالی‌های موجود در NCBI، دو باند مورد انتظار با اندازه‌های ۱۰۲۳ و ۶۶۳ جفت باز مشاهده شدند که بیانگر تأیید درستی توالی ژن تکثیرشده توسط PCR بودند.

با جداسازی ژن *merA* روی ژنوم *K. pneumoniae* و *E. coli*، واکنش PCR روی ژنوم *K. pneumoniae* برای تکثیر ژن *merA* با استفاده از جفت آغازگرهای رفت و برگشتی دارای سایت برشی *NheI* و *BamHI* انجام شد.

نتایج رشد تعدادی کلنی در محیط گزینشی حاوی ۱۰۰g/ml آمپی‌سیلین را نشان دادند، در حالی که همسانه‌سازی ۱۰ میکرولیتر از محصول ری‌لیگاسیون هیچ کلنی را روی محیط گزینشی نشان نداد. هم‌زمان با کشت باکتری‌های حاصل از تراریزش محصول لیگاسیون و ری‌لیگاسیون، شاهد مثبت که باکتری‌های تراریخته با ۲ میکرولیتر وکتور خالی بودند و شاهد منفی که باکتری‌های مستعد شوک حرارتی *E. coli* خالی تراریخت نشده بودند، در محیط انتخابی آمپی‌سیلین کشت شدند. رشد مناسب شاهد مثبت کارایی سلول‌های مستعد تراریزش و عامل انتخابی روی وکتور را تأیید می‌کند و رشد نکردن شاهد منفی نبود آلودگی در سلول‌های مستعد و محیط کشت را نشان می‌دهد (شکل ۳).

پس از استخراج ژنوم باکتری‌های *Klebsiella pneumoniae* و *Serratia marcescens*، واکنش PCR برای جداسازی و تکثیر ژن *merA* با استفاده از جفت آغازگرهای رفت و برگشتی (جدول ۱) انجام شد. محصول PCR مربوط به ژنوم باکتری‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* به ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که با اندازه مدنظر برای ژن *merA* مطابق بود (شکل ۱).

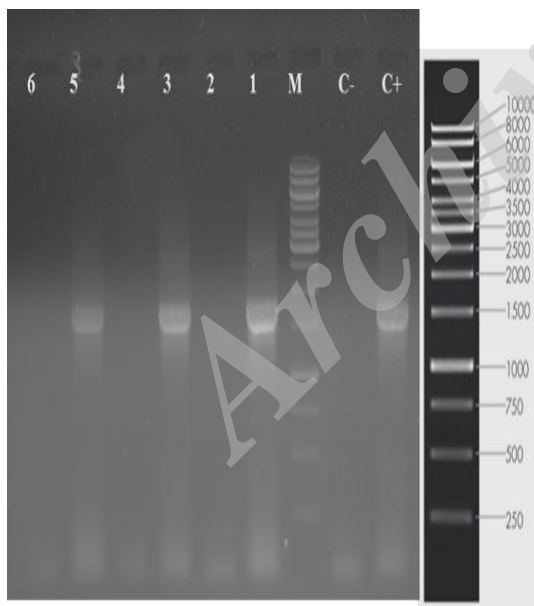
تأیید ژن *merA* با واکنش هضم در حضور آنزیم *EcoRI* انجام شد (شکل ۲). با توجه به توالی‌های موجود در NCBI، سایت برشی آنزیم تقریباً در اواسط ژن قرار دارد و پس از واکنش هضم، دو قطعه با طول‌های ۱۰۲۳ و ۶۶۳ جفت باز ایجاد می‌کند. مشاهده این دو قطعه روی ژل آگارز ۱ درصد بیان‌کننده تأیید ژن *merA* محصول PCR است.



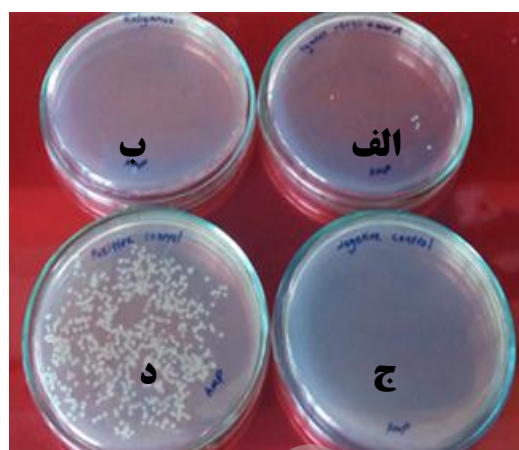
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *merA* در باکتری‌های الف. *K. pneumoniae* و ب. *E. coli* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که باند ۱۶۸۶ جفت باز مطابق انتظار حاصل شد. ۱، ۲، ۳ و ۴ تکرارهای مستقل هستند. M نشانگر (۱) کیلو باز شرکت Fermentas. C: شاهد منفی بدون DNA.

پلاسمید تمام کلنی‌های مشاهده شده حاصل از واکنش لیگاسیون استخراج شدند و واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌ها انجام شد. شکل ۴، نقشه پلاسمید نو ترکیب حاصل از کلون کردن DNA مربوط به *merA* در وکتور بیانی pET21a+ است.

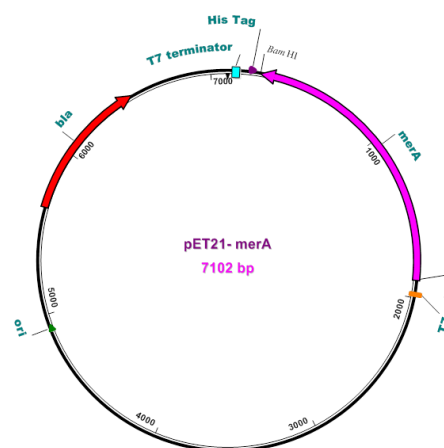
با بارگذاری محصول PCR حاصل از پلاسمید استخراج شده، پلاسمیدهای مربوط به کلنی‌های ۱، ۳ و ۵، باند مربوط به ژن *merA* را نشان دادند که تقریباً ۱۶۶۸ جفت باز بود و این، درستی انجام همسانه‌سازی را نشان داد (شکل ۵). از روش هضم آنزیمی برای اطمینان کامل از تأیید حضور پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *merA* در کلنی‌های حاصل از واکنش لیگاسیون استفاده شد.



شکل ۵- الکتروفورز محصول PCR انجام شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های حاصل از واکنش لیگاسیون (چاهک‌های ۱ تا ۶). C+: شاهد مثبت. C-: شاهد منفی. M: نشانگر (۱ کیلوباز شرکت Fermentas)



شکل ۳- تصویر کلنی‌های حاصل از تراریزش در محیط گزینشی آمپی‌سیلین‌دار. پتری الف. حاوی ۶ کلنی حاصل از تراریزش محصول لیگاسیون ژن *merA* و وکتور pET21a+، پتری ب. مربوط به باکتری‌های تراریخته با محصول ری لیگاسیون، رشد نکردن کلنی بیان کننده برش هر دو آنزیم برشی و تأیید کلنی‌های نو ترکیب حاصل از لیگاسیون است، پتری ج. شاهد منفی، مربوط به باکتری‌های تراریخت نشده خالی، رشد نکردن کلنی بیان کننده عدم آلودگی باکتری‌های مستعد تراریزش و محیط کشت است. پتری د. شاهد مثبت، مربوط به باکتری‌های تراریخته با وکتور خالی برش نیافته، رشد مناسب کلنی‌ها بیان کننده کارایی باکتری‌های مستعد تراریزش است.

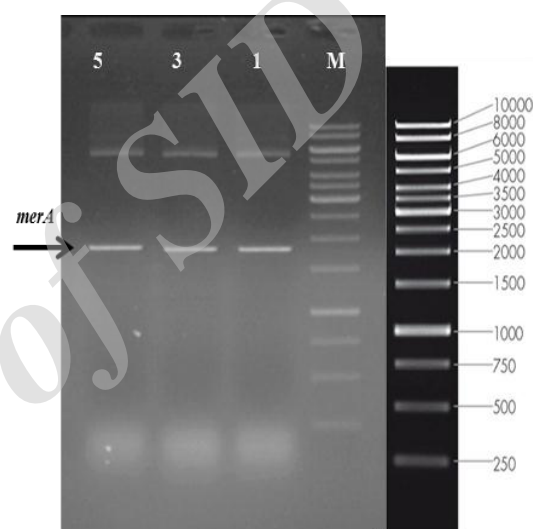


شکل ۴- نقشه پلاسمید نو ترکیب حاصل از همسانه‌سازی ژن *merA* در وکتور pET21a+ پروموتور T7 باکتروفاز در ناحیه ۵' ژن *merA* برای بیان ژن قرار دارد. ژن *bla* عامل مقاومت به آمپی‌سیلین است.

مطابقت کامل *merA* درج شده در پلاسمید را با توالی ژن *merA* موجود در NCBI تأیید کرد که همسانه‌سازی صحیح ژن در وکتور بیانی pET21 را نشان می‌دهد. توالی آمینواسیدی پیشگویی شده مربوط به توالی مورد توافق در هم‌ردیفی ژن *merA* همسانه‌سازی شده، تطابق کامل با توالی پروتئین MerA موجود در NCBI نشان می‌دهد (شکل ۷).

ویژگی‌های بیوانفورماتیکی توالی آنزیم حاصل و منشأ احتمالی تکامل ژن کلون‌شده: بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین حاصل با استفاده از برنامه پروتپارام^{۱۵} (یکی از برنامه‌های تحت هدایت وب سایت ExPASy که برای محاسبه شاخص‌های متنوع فیزیکی و شیمیایی توالی پروتئین ویژه به کار می‌رود) نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده پروتئین *merA* با فرمول مولکولی $C_{2570}H_{4176}N_{726}O_{803}S_{21}$ به ترتیب برابر ۵۸/۷۶۷ کیلو دالتون و ۵/۲۵ شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش حدود ۳۳/۳۳ است و در رسته پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شود. همچنین شاخص Aliphatic (عامل مهمی برای برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت) و نیمه‌عمر این پروتئین در محیط *in vivo* که با برنامه پروتپارام محاسبه شدند به ترتیب بیشتر از ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ساعت در سلول‌های *E. coli*، مخمر و انسانی بودند که پایداری و طول عمر زیاد این آنزیم را نشان می‌دهد (۱۵). این آنزیم از ۱۱ ماریچ آلفا، ۷ رشته بتا و ۱۹ فنر تشکیل شده است (شکل ۸). آنزیم کاهنده جیوه معدنی یک ماریچ قطبی انتقال‌دهنده درون غشایی دارد که در شکل ۹ نشان داده شده است. علامت‌دهی جیوه از طریق اتصال جیوه به دمین غشایی انجام می‌شود که به‌عنوان گیرنده علامت عمل می‌کند.

پلاسمیدهایی که وجود ژن در آنها طی واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *merA* تأیید شده بود با آنزیم‌های برشی *BamHI* و *NheI* برش داده شدند. با بارگذاری محصول هضم در ژل آگارز، همان‌طور که انتظار می‌رفت دو قطعه با اندازه تقریبی ۱۶۶۸ جفت باز مربوط به *merA* و ۵۳۳۴ جفت باز مربوط به وکتور مشاهده شدند (شکل ۶).

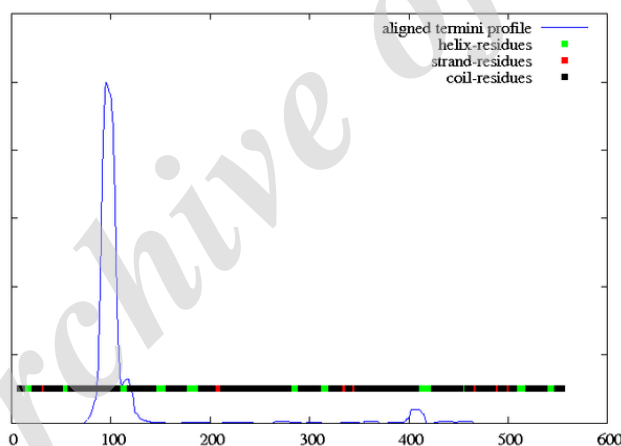


شکل ۶- الکتروفورز محصول برش پلاسمید نوترکیب pET21-*merA* کلنی‌های ۱، ۳ و ۵ با آنزیم‌های برشی *BamHI* و *NheI* روی ژل آگارز ۱ درصد و جداسدن *merA* با اندازه ۱۶۶۸ جفت باز، M نشانگر (۱ کیلوباز شرکت Fermentas).

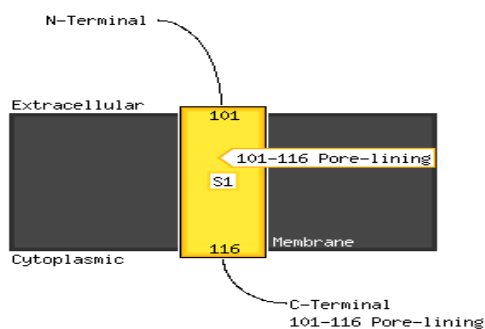
با توجه به تشکیل دو قطعه پیش‌بینی شده از برش آنزیمی، پلاسمید نوترکیب تأیید شد. سه نمونه DNA پلاسمید نوترکیب pET21-*merA* تأیید شده برای تعیین توالی به توالی‌یابی ارسال شدند. نتیجه حاصل از توالی‌یابی، درستی و تطابق کامل توالی هر سه نمونه پلاسمید ارسال شده را با نمونه ثبت شده در NCBI برای ژن *merA* نشان داد. نتایج مقایسه توالی‌های پلاسمیدهای نوترکیب با ژن *merA* موجود در NCBI، درستی و

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
nerA-K ₁ P	HTLTKITGHTCDSCAAHYKEALEKYPGVQSALVSYPKGTAQLAIEAGTSSDALTTAVAGLGYEATLADAPPTDNRAGLLDRKRGATIGRADKPSGNERPLQVYVYIGSGGAHAAALKAVEQGAQYTLIERG													
nerA-T	HTLTKITGHTCDSCAAHYKEALEKYPGVQSALVSYPKGTAQLAIEAGTSSDALTTAVAGLGYEATLADAPPTDNRAGLLDRKRGATIGRADKPSGNERPLQVYVYIGSGGAHAAALKAVEQGAQYTLIERG													
Consensus	HTLTKITGHTCDSCAAHYKEALEKYPGVQSALVSYPKGTAQLAIEAGTSSDALTTAVAGLGYEATLADAPPTDNRAGLLDRKRGATIGRADKPSGNERPLQVYVYIGSGGAHAAALKAVEQGAQYTLIERG													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
nerA-K ₁ P	TIGGTCVWVGCYPSKINIRAAHIAHLRRESFDDGMPPTPTILRELLAQQAQVEELRHAKYEGILDGNSAITVLHGEARFKDDQSLVSLNEGGERVYVDFRCLVATGASPAYPPTIPGLKESPYNTS													
nerA-T	TIGGTCVWVGCYPSKINIRAAHIAHLRRESFDDGMPPTPTILRELLAQQAQVEELRHAKYEGILDGNSAITVLHGEARFKDDQSLVSLNEGGERVYVDFRCLVATGASPAYPPTIPGLKESPYNTS													
Consensus	TIGGTCVWVGCYPSKINIRAAHIAHLRRESFDDGMPPTPTILRELLAQQAQVEELRHAKYEGILDGNSAITVLHGEARFKDDQSLVSLNEGGERVYVDFRCLVATGASPAYPPTIPGLKESPYNTS													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
nerA-K ₁ P	TEALASDIPERLAYIGSSVVALDLAQAFARLGSKYTALARNTLFFREDPAIGEAYTAFAEAGIEVLEHTQRSQVAMHDFEVLTTTGHGLRADKLLVATGRTPNTRSLALEAGVYVNAQGAIVYIDKG													
nerA-T	TEALASDIPERLAYIGSSVVALDLAQAFARLGSKYTALARNTLFFREDPAIGEAYTAFAEAGIEVLEHTQRSQVAMHDFEVLTTTGHGLRADKLLVATGRTPNTRSLALEAGVYVNAQGAIVYIDKG													
Consensus	TEALASDIPERLAYIGSSVVALDLAQAFARLGSKYTALARNTLFFREDPAIGEAYTAFAEAGIEVLEHTQRSQVAMHDFEVLTTTGHGLRADKLLVATGRTPNTRSLALEAGVYVNAQGAIVYIDKG													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
nerA-K ₁ P	MRTSSPNIYRAGDCTDQPFYVAAAGTTRAIIMTGGDARLDLTAMPYVFTDQVATVGYSEAEAHHDGIEVLEHTQRSQVAMHDFEVLTTTGHGLRADKLLVATGRTPNTRSLALEAGVYVNAQGAIVYIDKG													
nerA-T	MRTSSPNIYRAGDCTDQPFYVAAAGTTRAIIMTGGDARLDLTAMPYVFTDQVATVGYSEAEAHHDGIEVLEHTQRSQVAMHDFEVLTTTGHGLRADKLLVATGRTPNTRSLALEAGVYVNAQGAIVYIDKG													
Consensus	MRTSSPNIYRAGDCTDQPFYVAAAGTTRAIIMTGGDARLDLTAMPYVFTDQVATVGYSEAEAHHDGIEVLEHTQRSQVAMHDFEVLTTTGHGLRADKLLVATGRTPNTRSLALEAGVYVNAQGAIVYIDKG													
	521	530	540	550	561									
nerA-K ₁ P	NRMTYQELADQLFPYLTHVEGLKLAQTFSKDYKQLSCCAG													
nerA-T	NRMTYQELADQLFPYLTHVEGLKLAQTFSKDYKQLSCCAG													
Consensus	NRMTYQELADQLFPYLTHVEGLKLAQTFSKDYKQLSCCAG													

شکل ۷- توالی آمینواسیدی پروتئین MerA حاصل از وکتور همسانه‌سازی شده با توالی پروتئین MerA موجود در NCBI. رنگ قرمز تمام آمینو اسیدهای توالی مورد توافق، شباهت کامل توالی آمینواسیدی پروتئین MerA حاصل از وکتور همسانه‌سازی شده را با توالی پروتئین MerA موجود در NCBI نشان می‌دهد.



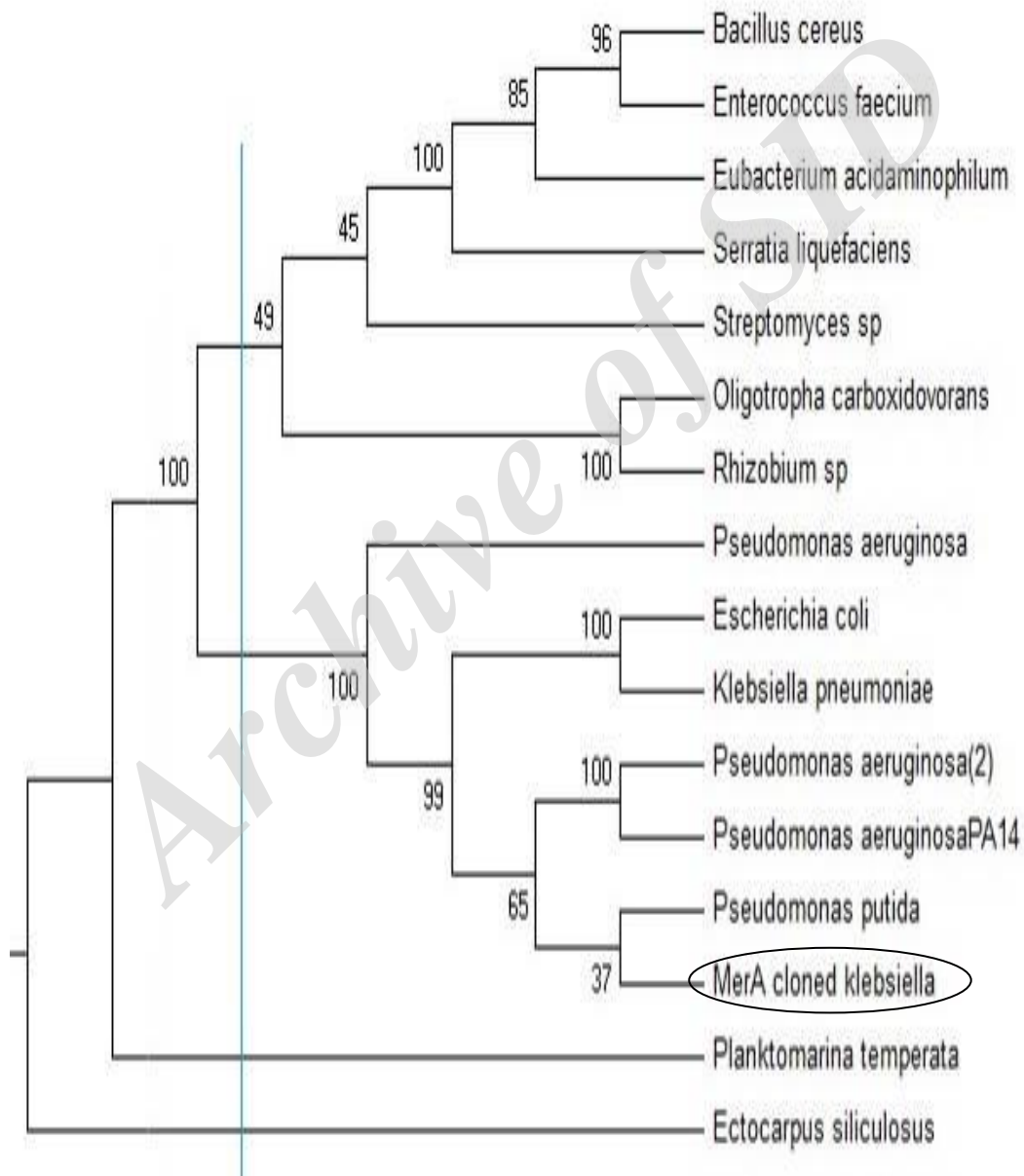
شکل ۸- بررسی ساختار آنزیم کاهنده جیوه معدنی از نظر ماریچ آلفا، رشته بنا و فنر



شکل ۹- توپولوژی دو بعدی آنزیم کاهنده جیوه معدنی، ماریچ قطبی به سمت منافذ در موقعیت آمینو اسیدهای ۱۰۱ تا ۱۱۶ قرار گرفته است.

محلی که چهار خوشه حاصل شده است، ژن مطالعه شده تشابه زیادی با ژن‌های موجود در ریزموجودات *Pseudomonase*، *Klebsiella* و *E. coli* نشان داد و بنابراین به نظر می‌رسد از یک ژن مشترک اجدادی طی تکامل ناشی شده‌اند.

توالی ژن کاهنده جیوه معدنی کلون‌شده با دیگر ژن‌های همتای خود در سایر ریزموجودات از نظر توالی آمینواسیدی بررسی و دندروگرام با نرم‌افزار MEGA ویرایش ۴ و با روش ادغام متوسط همسایه‌ها یا UPGMA ترسیم شد (شکل ۱۰). با برش دندروگرام از



شکل ۱۰- دندروگرام توالی آمینواسیدی MerA کلون‌شده از باکتری *K. pneumoniae* با سایر پروتئین‌های همتای خود در ریزموجودات

بحث و نتیجه‌گیری

سالانه هزاران تن جیوه وارد محیط‌زیست می‌شود و هزاران دلار برای حذف تقریباً نیم کیلوگرم جیوه با استفاده از فناوری‌های رایج هزینه می‌شود. بنابراین باید روش‌های جایگزین و عملی حذف جیوه از محیط‌زیست توسعه یابند (۱۶). روش‌های شیمیایی حذف فلزهای سنگینی مانند جیوه از فاضلاب‌ها علاوه بر هزینه‌های زیاد که صنعتگران را از به‌کارگیری این روش‌ها می‌ترساند، با تولید لجن رسوبات شیمیایی و لجن خود مواد زاید موجب بروز مشکلات ناسازگار با محیط‌زیست می‌شوند (۱۷). بنابراین زیست‌پالایی میکروبی، یکی از روش‌های زیستی درخور توجه حذف فلزهای سنگین از محیط‌زیست است که از نظر اقتصادی پایدار و سازگار با محیط‌زیست است. باکتری‌های زیست‌پالاینده از مکان‌های آلوده به آلاینده‌های آلی و معدنی جداسازی می‌شوند. میدی و همکاران در سال ۱۳۹۴، سویه‌هایی از باکتری *Pseudomonas* را برای حذف زیستی کروم از خاک‌های آلوده به نفت خوزستان جداسازی کردند (۱۸). اساس ژنتیکی مقاومت به جیوه در برخی گونه‌های باکتریایی به اثبات رسیده است؛ این باکتری‌ها با آنزیم القایی کاهنده جیوه معدنی که *merA* رمز می‌کند، موجب احیای Hg^{2+} به Hg^0 می‌شوند. این کاهنده نوعی فلاونوپروتئین وابسته به NADPH است که احیای Hg^{2+} به Hg^0 را کاتالیز می‌کند. از سویی، جیوه عنصری با فشار بخار زیاد تبخیر و محیط رشد اطراف باکتری عاری از جیوه می‌شود. این کاهنده جیوه در فضای بین سلولی قرار دارد و در غلظت‌های sub-inhibitory یون‌های جیوه و انواع جیوه‌های آلی القا می‌شود (۱۹).

مور^{۱۶} در سال ۱۹۶۰، نخستین پژوهش‌ها را در زمینه

مقاومت باکتری‌های مقاوم به جیوه انجام داد (۲۰). سپس مقاومت باکتری *Staphylococcus aureus* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی را به ترکیبات جیوه گزارش کردند. پس از آن، پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه باکتری‌های مقاوم به جیوه و توانایی حذف جیوه انجام شدند (۲۱). ری و همکاران^{۱۷} در سال ۱۹۸۹، توانایی باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت جدا شده از خاک مناطق آلوده به جیوه در حذف جیوه را بررسی و باکتری‌هایی با توانایی ۸۳ درصدی در حذف جیوه را جداسازی کردند (۲۲). چن و همکاران^{۱۸} در سال ۱۹۹۷ با دست‌ورزی ژنتیکی *E. coli*، این باکتری را برای پاکسازی محیط‌های آلوده به جیوه آماده کردند. این سویه‌ها به‌شکلی دست‌ورزی شدند که برای انتقال بیشتر Hg^{2+} به درون سیتوپلاسم خود، پروتئین‌های *MerT* و *MerP* را بیشتر بیان می‌کردند (۲۳). ون کنستاین^{۱۹} و همکاران در سال ۱۹۹۹ سوشی از باکتری *Pseudomonas putida* مقاوم به جیوه را از رسوبات آلوده به جیوه در آلمان جدا کردند. آنها برای نخستین بار از این سویه‌ها برای تصفیه پساب حاوی جیوه در کارخانه کلرآلکالی استفاده کردند (۲۴). بایی و همکاران^{۲۰} نیز در سال ۲۰۰۳ با همسانه‌سازی ژن *merR* در *E. coli* و بیان آن در سطح سلول مشاهده کردند که این پروتئین علاوه بر جیوه، فلزهای سنگین دیگری مانند Zn^{2+} و Cd^{2+} را جذب می‌کند. آنها شیوه‌ای جدید با کارایی زیاد برای حذف فلزهای سنگین مختلف از پساب کارخانه‌ها ابداع کردند (۲۵).

در مطالعه حاضر، ۴ نمونه باکتری مقاوم به جیوه از نظر داشتن اپرون *mer*، یکی از عوامل ژنتیکی مقاومت در برابر جیوه (۱)، بررسی شدند و در این میان با استفاده از روش PCR، ژن *merA* از باکتری‌های *E. coli* و *K.*

مجموعه آنزیم‌ها، دامنه وسیعی از شکل‌های مختلف جیوه (جیوه معدنی، جیوه آلی و ...) حذف شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان برای فراهم کردن امکانات مالی پژوهش حاضر در قالب پایان‌نامه تشکر می‌کنند.

References

- (1) Hirak RD., Surajit D. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2012; 75: 207-213.
- (2) Wang Q., Kim D., Dionysiou DD., Sorial GA., Timberlake D. Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems-a literature review. *Environmental Pollution* 2004; 131(2): 323-336.
- (3) Schroeder WH., Munthe J. Atmospheric mercury an overview. *Atmospheric Environment* 1998; 32(5): 809-822.
- (4) Siudek P., Falkowska L., Urba A. Temporal variability of particulate mercury in the air over the urbanized zone of the southern Baltic. *Atmospheric Pollution Research* 2011; 2(4): 484-491.
- (5) Afrasayab SH., Yasmin A., Hasnain SH. Characterization of some Indigenous mercury resistant bacteria from polluted environment. *Journal of Biological Science* 2007; 5(7): 792-797.
- (6) 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: Faerber T., Herzog J., editors. *Solid Waste Management and Environmental Remediation*. New York: Nova Science Publishers; 2010: 1-72.

pneumoniae جداسازی شد. ژن *merA* رمزکننده آنزیم کاهنده جیوه معدنی، ژن عملکردی این اپرون است که وجود آن در باکتری بیان‌کننده نقش اپرون mer در ایجاد مقاومت به جیوه در باکتری است (۱۰). در پژوهش مشابهی، کفیل‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۲ پس از بررسی مقاومت به جیوه باکتری‌های جداسازی‌شده از رسوبات آلوده خورموسی، با تکثیر ژن *merA* از باکتری *E. coli*، عامل مقاومت را پلاسمید حاوی اپرون *mer* گزارش کردند (۲۶). از دیگر روش‌های پاکسازی زیستی، تثبیت باکتری در بیدهای آلزینات کلسیم است که برای حذف نیکل از محیط استفاده می‌شود (۲۷).

در مطالعه‌ای برای طراحی حسگر زیستی، اپرون مقاومت به جیوه از ترانسپوزون ۲۱ در وکتور حاوی ژن *merA lux* قرار داده شد (۲۸). در سال ۲۰۱۰، ژن *merA* جداسازی‌شده از *E. coli* را در وکتور بیانی گیاه همسانه‌سازی کردند و برای گیاه‌پالایی به کالوس‌های توتون منتقل کردند (۲۹). در این بررسی، با هدف زیست‌پالایی میکروبی، پس از تکثیر ژن *K. pneumoniae* با آغازگرهای حاوی سایت برشی در وکتور بیانی pET21a+ با پروموتور مناسب قرار داده شد. در نهایت، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی آنزیم پیش‌بینی‌شده با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی بررسی شدند.

این مطالعه مقدمه‌ای برای زیست‌پالایی جیوه از طریق روش‌های مختلفی مانند زیست‌پالایی میکروبی با تولید باکتری‌های تراریخته با گنجایش زیاد حذف جیوه، طراحی بیوراکتورهای بر پایه باکتری و یا آنزیم است. امید است دیگر آنزیم‌های مربوط به این اپرون حذف جیوه، خالص‌سازی و بررسی شوند و با استفاده از

- (7) Perelo LW. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials* 2010; 177(1-3): 81-89.
- (8) Silver S., Phung LT. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 2005; 32 (11-12): 587-605.
- (9) Yurieva O., Kholodii G., Minakhi L., Gorlenko Z., Kalyaeva E., Mindlin S., et al. Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. *Molecular Microbiology* 1997; 24(2): 321-329.
- (10) Kiyono M., Pan Hau H. Genetic engineering of bacteria for environmental remediation of mercury. *Journal Health Science* 2006; 52(3): 199-204.
- (11) Aram M., Sharifi A., Kafeelzadeh F., Naghmachi M., Yasari E. Isolating Mercury-resistant Bacteria from Lake Maharloo. *International Journal of Biology* 2012; 4(3): 63-71.
- (12) Mirzaei N., Kafilzadeh F., Kargar M. Isolation and identification of mercury resistant bacteria from Kor River, Iran. *Journal of Biological Sciences* 2008; 8(5): 935-939.
- (13) Birnboim HC., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 1979; 7(6): 1513-1523.
- (14) Hanahan D. Techniques for transformation of *E. coli* In: Glover DM., editor. *DNA Cloning*. Oxford, Washington D.C: IRL Press; 1985: 109-135. (A Practical Approach; vol 1).
- (15) Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins MR., Appel RD., et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM. editor. *The proteomics protocols handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005: 571-607.
- (16) Wood A. Remediation Control Strategies and Cost Data for an Economic Analysis of a Mercury Total Maximum Daily Load in California. USGS [Open-File Report 03-284] 2003. Available from: <http://pubs.usgs.gov/of/2003/of03-284>.
- (17) Fooladi Fard R., Kamani H., Khaefee M. Elimination of heavy metals using the biological absorption method from aquatic solutions. Proceedings of the 9th National Iranian Congress of Chemical Engineering; November 23-25, 2004, Iran University of Science & Technology (IUST), Tehran, Iran.
- (18) Meybodi SM., Khorasani H. Biosorption of chromium by *Pseudomonas* sp. isolated from oil contaminated soils of Khuzestan. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4(14): 101-110.
- (19) Schottel JL. The mercuric and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid bearing strain of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 1978; 253(12): 4341-4349.
- (20) 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.
- (21) Barkay T., Miller SM., Summers AO. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 2003; 27(2-3): 355-384.
- (22) Ray S., Gachhui R., Pahan K., Chaudhury J., Mundal A. Detoxification of mercury and organomercurials by nitrogen fixing soil bacteria. *Journal of Biological Sciences* 1989; 14(2): 173-182.
- (23) Chen Sh., Wilson DB. Construction and characterization of *E. coli* genetically engineering for bioremediation of contaminated environments. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63(6): 2442-2445.
- (24) Von Canstein H., Li Y., Timmis KN., Deckwer WD., Wagner Dobler I. Removal of mercury from chloralkali electrolysis waste water by a mercury resistance

- Pseudomonas putida* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65(12): 5279-5284.
- (25) Bae W., Wu CH., Kostal J., Mulchandani A., Chon W. Enhanced with surface display *merR*. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69(6): 3176-3180.
- (26) Kafilzadeh F., Zahirian Y., Zolgharnein H. Isolation and molecular identification of mercury resistant bacteria and detection of *Escherichia coli* mercuric reductase gene from waste water of Khowr-e-Musa, Iran. *International journal biosciences* 2012; 3(8): 313-318.
- (27) Ahmady-Asbchin S., Jafari N., Moradi H. Immobilization of *Bacillus* in calcium alginate beads for biosorption of nickel. *BJM*. 2015; 4(13) :171-180
- (28) Selifonova O., Burlage R., Barkay T. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment, *Applied and environmental microbiology* 1993; 59(9): 3083-3090.
- (29) Shah TA., Arif A. Cloning of mercuric reductase (*merA*) gene isolated from wild strains of *Escherichia coli*. *Asian Journal of Bioscience* 2010; 5(1): 80-83.

¹- Elemental mercury

²- Methyl mercuric chloride

³- Dimethyl mercury

⁴- Bio accumulative toxins

⁵- Mineralization

⁶- narrow-spectrum *mer* resistance to inorganic mercury

⁷- broad-spectrum *mer* resistance to organomercurials

⁸- Mercuric ion reductase

⁹- Birnboim and Doly

¹⁰- National Center for Biotechnology Information

¹¹- Polymerase chain reaction

¹²- Low melting point

¹³- BLAST

¹⁴- Multialign

¹⁵- ProtParam

¹⁶- Moore.

¹⁷- Ray S, et al.

¹⁸- Chen sh, et al.

¹⁹- Von Canstein H, et al.

²⁰- Bae W, et al.