

طراحی، ساخت و بررسی زیست گزارشگری مبتنی بر پروتئین فلورسنت سبز با استفاده از میزبان *Escherichia coli* جهت تولون در دسترس زیستی

حسام طاوولی¹، خسرو خواجه^{2*}، مهدی زین الدینی³

- 1- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- 2- استاد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- 3- استادیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران

*تهران، صندوق پستی 14115-175

khajeh@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 93/11/4 پذیرش مقاله: 95/9/2)

چکیده- آلودگی آب یکی از مهمترین مشکلات انسان می‌باشد. ترکیبات BTEX (بنزن، تولون، اتیل بنزن و زایلن) کاربرد گسترده‌ای در صنعت دارند و اثرات سرطان‌زایی آنها بر انسان به اثبات رسیده است. بنابراین این بخش از آلودگی‌های آب (ترکیبات آروماتیک محلول در آب) دارای اهمیت زیادی هستند. سامانه‌هایی که قادرند وجود ترکیبات BTEX را در منابع آبی تشخیص دهند، از قبیل کروماتوگرافی گازی بسیار گران‌قیمت هستند؛ پس به سامانه‌های ساده‌تری برای کاهش تعداد نمونه‌هایی که برای آنالیز با سامانه‌های بسیار گران‌قیمت‌تر نسبت به آنها شک و تردید است، نیاز می‌باشد. زیست گزارشگرها زیرگروهی از زیست حسگرها می‌باشند که جهت حس کردن و بررسی بعضی از پیام‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یک زیست گزارشگر موجودی زنده مانند باکتری یا یک گیاه می‌باشد که از نظر ژنتیکی برای داشتن یک پروموتور حساس به یک پیام شیمیایی یا فیزیکی دست‌کاری شده است. فعال‌سازی پروموتور در حضور یک سیگنال منجر به تولید ژن گزارشگری می‌شود که به وسیله تجهیزات آزمایشگاهی قادر به احساس و اندازه‌گیری می‌باشد. در این تحقیق یک ژن پروتئین فلورسنت سبز به عنوان ژن گزارشگر در فرودست پروموتور *PtbuA1* به عنوان پروموتور حسگر BTEX در *Escherichia coli* استفاده شده است و پاسخ آن به ترکیبات BTEX مورد بررسی قرار گرفته است. یافته‌ها نشان می‌دهند که زیست گزارشگر ما قادر به احساس تولون می‌باشد. زمان و دمای بهینه نیز جهت این زیست گزارشگر به دست آمد. دمای 37 درجه سانتی‌گراد و زمان 48 ساعت بعد از القا به عنوان بهترین دما و زمان پاسخ زیست گزارشگر انتخاب شد. میزبان *E.coli* BL21 نیز به عنوان بهترین میزبان انتخاب شد.

کلید واژگان: زیست گزارشگر، زیست حسگر، تولون.

1- مقدمه

استفاده گسترده از سوخت‌های فسیلی مانند گازوئیل، بنزین و دیگر سوخت‌های به دست آمده از نفت موجب آلودگی آب و خاک به سبب نشت از خطوط انتقال و مخازن سوخت شده است [1]. بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن (BTEX) از مواد تشکیل دهنده سوخت‌های فسیلی رایج هستند [2] که به دلیل دارا بودن اثرات مضر بر سلامت انسان و محلولیت نسبی در آب، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند [3]، به عنوان مثال تولوئن دارای اثر سمی بر کبد و کلیه می‌باشد و باعث آسیب به سیستم عصبی مرکزی می‌شود [4-9]. از این روست که رصد پیوسته نمونه‌های محیطی جهت تشخیص به موقع وجود این آلودگی‌ها در خاک و به ویژه آب از اهمیت ویژه‌ای برای اجتماع و سازمان‌های دولتی که متولی بررسی، تشخیص و حذف آلودگی از منابع آب مصرفی هستند، برخوردار است. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی گازی توأم با طیف‌سنجی جرمی به طور سنتی برای بررسی حضور و سنجش غلظت ترکیبات هیدروکربنی آروماتیک در آب مورد استفاده قرار گرفته‌اند [2]. این روش‌ها حساس و دقیق بوده و بهترین روش سنجش این مواد در نمونه‌های محیطی‌اند [1].

گران قیمت بودن، حجیم بودن و وابسته بودن این روش‌ها به کارشناسان ماهر و لزوم بررسی نمونه‌های متعدد، استفاده از این روش‌ها را در مناطق نزدیک به محل نمونه‌برداری غیرممکن کرده است و لزوم استفاده از یک روش ساده‌تر و ارزاتر جهت محدود کردن تعداد نمونه‌هایی که برای تجزیه نهایی باید مورد آزمایش قرار گیرند، امری ضروری به نظر می‌رسد. زیست حسگرهای میکروبی یکی از جدیدترین ابزار مولکولی در بررسی‌های محیطی هستند [10-12] این دسته از زیست حسگرها که زیست گزارشگر نیز نامیده می‌شوند، به دفعات برای اندازه‌گیری و سنجش انواعی از هیدروکربون‌ها و همچنین

ترکیبات BTEX ساخته شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند [13,16]. در این گزارش نیز با استفاده از پلازمید (+) pGEM-7Zf که در آن فاکتور فعال کننده رونویسی *tbut* که از مسیر مصرف تولوئن و بنزن (*tbut*) در باکتری *Ralstonia pickettii* PKO1 انتخاب شده و به آن وارد شده بود و بیان آن تحت کنترل پروموتور *neomycin phosphotransferase (nptII)* به طور پیوسته انجام می‌شد و با به کارگیری پروموتور *PtbuA1* که به عنوان پروموتور برای ژن گزارشگر *gfp* قرار داده شده بود، یک پلازمید نو ترکیب ساخته و با انتقال آن به درون باکتری *Escherichia coli* سویه BL21 یک زیست گزارشگر ساخته شد.

نحوه عملکرد این توالی به نحوی است که با ورود ترکیبات BTEX به درون سلول و اتصال آنها به TbuT که به طور دائم در سلول تولید می‌شود، این فاکتور رونویسی فعال می‌شود و با اتصال به منطقه پروموتوری *PtbuA1* سبب شناسایی این پروموتور توسط آنزیم RNA پلیمراز دارای زیرواحد σ^{54} و شروع رونویسی از آن می‌گردد که این امر سبب تولید GFP و نشر نور سبز از جمعیت باکتری‌هایی می‌گردد که تحت تابش نور فرابنفش قرار گرفته‌اند. این اولین بار است که گزارشی مبنی بر بررسی چنین توالی در باکتری *Escherichia coli* به تفصیل بیان می‌شود و با استفاده از این نتایج می‌توان اطلاعاتی را مبنی بر اثر نوع باکتری بر پاسخ زیست گزارشگرهایی که از یک سیستم ژنتیکی ساخته شده‌اند، به دست آورد.

2- مواد و روش‌ها**2-1- مواد**

توالی طراحی شده توسط شرکت ژنکاست (Genecust) فرانسه ساخته شد و درون پیکره ناقل (+) pGEM-7Zf، بین جایگاه برش *XhoI* و *BamHI* قرار داده شد. باکتری *E. coli* BL21-DE3، *E. coli* DH5a و *E. coli* JM109 از

395 نانومتر به 490 نانومتر می‌گردد [17] اعمال شده بود. این توالی در فرودست توالی *PtbuAI* و در همان جهت قرار داده شد. یک توالی تقویت کننده ترجمه⁵ [18] که توالی آن در شکل 2 آورده شده است در حفاصل بین *gfp* و *PtbuAI* قرار داده شد که دارای یک توالی تقویت کننده ترجمه و یک محل اتصال ریبوزوم⁶ در فاصله بهینه از کدون آغاز ترجمه *gfp* می‌باشد. توالی T1-ter که نشان‌دهنده خاتمه دهنده رونویسی T1 می‌باشد در انتهای *gfp* قرار داده شد که توالی آن از بانک ژنی با عدد دسترسی AY243506.1 گرفته شد. توالی خاتمه دهنده رونویسی T7/SP6 برای جلوگیری از هر گونه رونویسی ناخواسته در جهت مخالف رونویسی *gfp* پس از T1-ter ولی در جهت عکس آن در توالی قرار داده شد. لازم به ذکر است که کدون *gfp* و *tbuT* برای بیان در میزبان *E. coli* بهینه شد. قبل از توالی خاتمه دهنده T7 محل برش قابل تشخیص با آنزیم محدود کننده⁷ *XhoI* و در سر دیگر توالی طراحی شده محل برش قابل تشخیص با آنزیم محدود کننده *BamHI* قرار داده شد.

3-2- ساختار ناقل pGEM-7Zf(+) و الحاق توالی به درون ناقل

نقشه ناقل pGEM-7Zf(+) و همچنین ساختار منطقه کلونسازی چندتایی⁸ (MCS) آن در شکل 3 آورده شده است. توالی طراحی شده پس از ساخت با استفاده از آنزیم‌های *BamHI* و *XhoI* بریده شد و به درون ناقل pGEM-7Zf(+) ای که با استفاده از همین آنزیم‌ها برش داده شده بود انتقال داده شد و پلازمید نوترکیب حاصل pGEM-7Zf(+)-ASLI نام گرفت.

شرکت نوژن (Novogene) خریداری گردید. تمامی مواد تشکیل دهنده محیط‌های کشت باکتری اعم از آگار، NaCl، تریپتون و عصاره مخمر از شرکت مرک (Merck) آلمان خریداری شد. محلول استاندارد تولوئن (2 میلی مولار تولوئن در متانول) از شرکت سیگما-آلدریچ (Sigma-Aldrich) خریداری شد و به میزان مورد نظر رقیق گردید.

2-2- طراحی توالی

توالی مورد نظر به ترتیب نشان داده شده در شکل 1 ساخته شد که در آن T7-ter توالی خاتمه دهنده رونویسی T7¹ است که توالی آن از پیکره پلازمید pET28a-c(+) گرفته شده است که به صورت دو تکرار جفتی متوالی پشت سر یکدیگر و در دو جهت مخالف قرار گرفته‌اند. توالی *tbuT* از بانک ژنی با عدد دسترسی AF100782.1 انتخاب شد و در همان جهت مشخص شده در شکل در توالی قرار داده شد. توالی پروموتری ژن نئومایسین فسفوترانسفراز² II با عدد دسترسی AF080390.1 از بانک ژنی به عنوان پروموتری توالی *tbuT* انتخاب شد و در جهت توالی *tbuT* درون توالی طراحی شده قرار داده شد. توالی پروموتری *PtbuAI* با عدد دسترسی U04052.1 از بانک ژنی انتخاب شد و در جهت مخالف پروموتری ژن نئومایسین فسفوترانسفراز II همان‌گونه که در شکل نشان داده شده است در توالی مربوطه جای داده شد.

توالی بخش ترجمه شونده ژن *gfp* از بانک ژنی با عدد دسترسی X83959.1 انتخاب گردید با این تفاوت که در آن جهش‌های Phe 64→Leu و Ser 65→The که به ترتیب سبب افزایش انحلال‌پذیری و جابجایی قرمز³ طول موج حد اکثر تحریک پروتئین فلورسانس سبز⁴ (GFP) از

⁵ Translational Optimizing sequence

⁶ Ribosome binding site (RBS)

⁷ Restriction enzyme

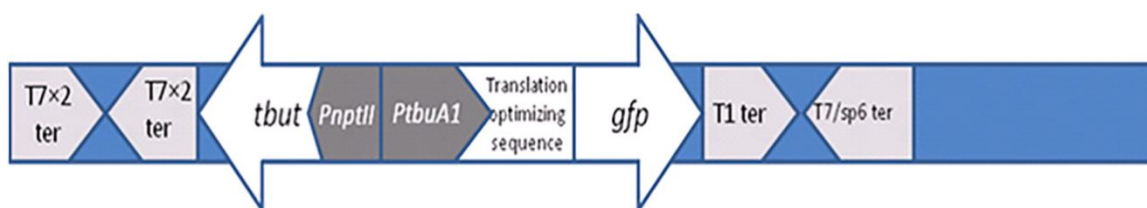
⁸ Multiple Cloning Site (MCS)

¹ T7 transcription terminator

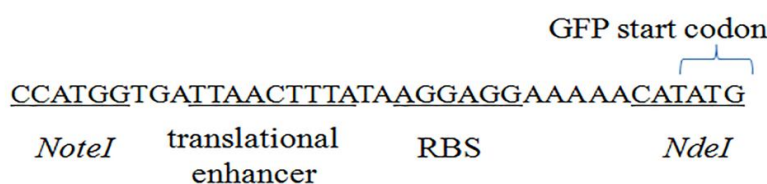
² Neomycin phosphotransferase II (nptII)

³ Redshift

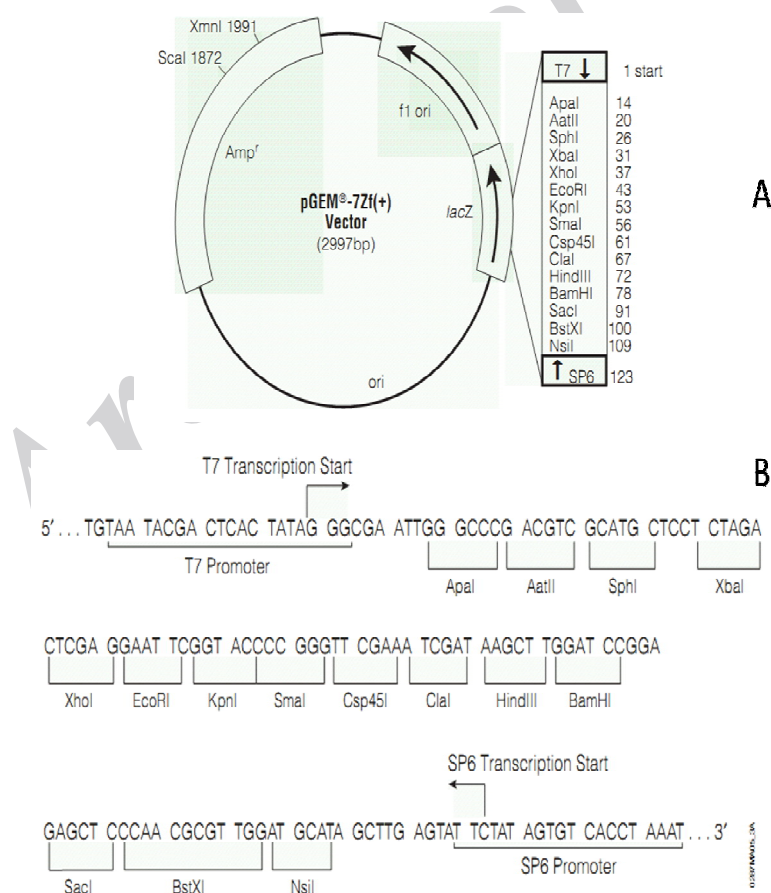
⁴ Green Fluorescence Protein (GFP)



شکل 1 توالی طراحی شده به طور کامل در شکل نشان داده شده است که در آن T7 خاتمه دهنده رونویسی T7 است، T1 خاتمه دهنده رونویسی T1 است، T7/SP6 خاتمه دهنده رونویسی T7/SP6 است. *tbut*، *PnptII* و *PtbaA1* به ترتیب ژن *GFP*، ژن *TbuT*، پروموتور نوامایسین فسفوترانسفراز II و پروموتور *tbaA1* می‌باشند. توالی تقویت کننده ترجمه در بین *gfp* و *PtbaA1* قرار دارد.



شکل 2 توالی تقویت کننده ترجمه که عبارت است از توالی تسهیل کننده ترجمه (Translational enhancer) و محل اتصال ریبوزوم (RBS) است را نشان می‌دهد. این توالی قبل از کدون ATG آغاز توالی کد کننده GFP قرار داده شده است و در دوطرف آن محل برش با آنزیم‌های محدودکننده *NoteI* و *NdeI* قرار دارد.



شکل 3 A نقشه حلقوی پلازمید pGEM-7zf(+) را نشان می‌دهد MCS آن به عنوان بخشی از ژن *lacZ* نمایش داده شده است. B نشان‌دهنده MCS با وضوح بیشتر می‌باشد و موقعیت محل‌های قابل شناسایی با هر یک از آنزیم‌های محدود کننده را به تفصیل نشان می‌دهد.

می‌شود تعریف شد.

7-2- آزمایش‌های القا

القاب باکتری‌ها در تمامی آزمایش‌ها به روش اشاره شده در این قسمت می‌باشد مگر اینکه در جای دیگری ذکر شده باشد. سلول‌های مورد نظر در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در محیط کشت لوری و برتانی⁷ (LB) که حاوی غلظت 100 میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک آمپسیلین بود به مدت شب تا صبح با سرعت تکان⁸ 200 دور در دقیقه کشت داده شدند و سپس از محیط کشت مورد نظر به مقدار 1 درصد به 10 میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپسیلین که درون ظرف‌های شیشه‌ای در داری که دارای حجم 80 میلی‌لیتر بودند، تلقیح صورت گرفت و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد تا به دانسیته نوری حدود 1 برسد. پس از رسیدن به این دانسیته نوری مقدار مورد نیاز از محلول الکلی تولوئن مورد نظر زیر هود میکروبی و تحت شرایط استریل به آن اضافه شد و پس از بستن درب ظرف و مهر و موم کردن آن با پارافیلیم⁹ در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با تکان 200 دور در دقیقه کشت داده شد.

8-2- سنجش RFU

پس از القا نمودن زیست گزارشگر با ماده تولوئن، در زمان 48 ساعت پس از القا مقدار 1 میلی‌لیتر از محیط کشت باکتری برداشت شد و پس از سانتریفیوژ نمودن در 4000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب باکتری بافر آب نمک و فسفات¹⁰ (PBS) به میزان 6 میلی‌لیتر اضافه گردید. مقدار دانسیته نوری مخلوط باکتریایی در طول موج 600 نانومتر اندازه‌گیری شد و همچنین میزان شدت فلورسانس آن نیز

2-4- ترایاخته¹ نمودن باکتری *E.coli* با استفاده از

پلازمید نو ترکیب pGEM-7Zf(+)-ASLI

ابتدا از هر یک از سویه‌های باکتریایی مورد نظر، باکتری‌های مستعد دریافت DNA به روش شیمیایی آماده شد [19]. باکتری‌های مستعد به طور جداگانه با استفاده از pGEM-7Zf(+)-ASLI به روش شوک حرارتی² ترایاخته ترایاخته شدند و ترایاخته شدن باکتری‌ها با روش استخراج پلاسمید مورد تأیید قرار گرفت.

2-5- انتخاب کلونی‌هایی که دارای خاصیت زیست

حسگری می‌باشند

محیط کشتی که حاوی 1% NaCl، 1% پپتون، 0/5% عصاره مخمر، 1% آگار و 70 میکرومولار ماده تولوئن بود در ظروف پتری³ آماده شد و کلونی‌هایی که ترایاخته شده بودند را در آنها به مدت 2 روز و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و سپس کلونی‌ها، زیر میکروسکوپ فلورسانس مورد مطالعه قرار گرفت. کلونی‌هایی که دارای خاصیت فلورسانس شده بودند برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

2-6- مطالعات طیف‌سنجی

شدت فلورسانس با استفاده از دستگاه فلورسانس PerkinElmer ساخت کشور ایالات متحده آمریکا که مجهز به نرم‌افزار ذخیره اطلاعات روی سیستم عامل ویندوز بود ثبت شد. طول موج تحریک 488 نانومتر و طول موج نشر 510 نانومتر بود. واحد فلورسانس نسبی⁴ (RFU) به صورت نسبت شدت فلورسانس باکتری‌ها در شرایط مشخص به مقدار زیست توده⁵ که به صورت دانسیته نوری⁶ در طول موج 600 نانومتر اندازه‌گیری

¹ Transform

² Heat shock

³ Petri dishes

⁴ Relative Fluorescence Unite (RFU)

⁵ Biomass

⁶ Optical Density

⁷ Luria Bertani

⁸ Shaking speed

⁹ Parafilm

¹⁰ Phosphate Buffer Saline (PBS)

بود مانند روش اشاره شده در بالا با غلظت 70 میکرومولار تولوئن القا شد و به مدت 48 ساعت در سه محیط کشت مختلف LB، تریفتیک برات² (TB) و 2x YT به طور جداگانه کشت داده شد و نسبت القا برای آنها محاسبه شد.

12-2- بررسی اثر مرحله رشد باکتری بر پاسخ زیست گزارشگر

سوش BL21-DE3 ای که دارای pGEM-7Zf(+)-ASLI بود در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در محیط کشت LB که حاوی غلظت 100 میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک آمپسیلین بود به مدت شب تا صبح با سرعت تکان 200 دور در دقیقه کشت داده شد و سپس از محیط کشت مورد نظر به مقدار 1 درصد به 10 میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپسیلین که درون ظرفهای شیشه ای در داری که دارای حجم 80 میلی‌لیتر بودند تلقیح صورت گرفت و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد تا به دانسیته نوری 0/1، 0/3، 0/4، 0/7 و 1/12 برسد و در این مرحله مانند روش اشاره شده در بالا با غلظت 70 میکرومولار تولوئن القا شد و به مدت 48 ساعت کشت داده شد و میزان RFU برای آن محاسبه شد.

13-2- رسم نمودار دوز- پاسخ زیست گزارشگر برای

ماده تولوئن و به دست آوردن معادله منحنی حاصل برای رسم نمودار دز - پاسخ که در آن لگاریتم غلظت تولوئن بر علیه RFU حاصل از آن غلظت که از زیست گزارشگر به دست آمده بود از نرم افزار پریزم (Prism) استفاده شد. رسم نمودار با استفاده از مدل ارائه شده در نرم افزار صورت گرفت و معادله منحنی نیز به دست آمد (لازم به ذکر است تمامی آزمایشات سه بار به طور جداگانه تکرار شدند).

تحت شرایط اشاره شده در بالا اندازه‌گیری شد. مقدار RFU با تقسیم نمودن شدت فلورسانس به مقدار دانسیته نوری به دست آمد.

9-2- بررسی اثر نوع باکتری بر پاسخ زیست گزارشگر

سویه‌های DH5 α ، BL21- DE3 و JM109 از باکتری *E. coli* که هر یک دارای pGEM-7Zf(+)-ASLI بودند به طور جداگانه کشت داده شدند و پس از القا با غلظت 70 میکرومولار تولوئن (تحت شرایط اشاره شده در بالا) و با گذشت 48 ساعت از القا و کشت تحت شرایط اشاره شده در بالا RFU هر یک از آنها سنجیده شد. به طور همزمان آزمایش یکسانی برای هر یک از سویه‌های اشاره شده در بالا نیز انجام شد، با این تفاوت که هیچ القایی صورت نگرفت ولی تمامی مراحل یکسان بود. مقدار RFU ای که تحت این شرایط به دست آمد RFU₀ نامیده شد. نسبت حاصل از تقسیم RFU به RFU₀ (RFU/RFU₀) نیز نسبت القا¹ نامیده شد و مقدار آن برای برای هر یک از سویه‌ها جداگانه گزارش شد.

10-2- بررسی اثر دما بر پاسخ زیست گزارشگر

سویه BL21-DE3 ای که دارای pGEM-7Zf(+)-ASLI بود مانند روش اشاره شده در بالا با غلظت 70 میکرومولار تولوئن القا شد و به مدت 48 ساعت در سه دمای مختلف 25، 30 و 37 درجه سانتی‌گراد به طور جداگانه با سرعت تکان 200 دور در دقیقه کشت داده شد. مقدار RFU، RFU₀ و نسبت القا برای آن محاسبه گردید.

11-2- بررسی اثر محیط کشت بر پاسخ زیست گزارشگر

سوش BL21-DE3 ای که دارای pGEM-7Zf(+)-ASLI

² Terrific broth

¹ Induction ratio

3- نتایج

3-1- به دست آوردن سویه‌های مورد نظر که دارای

خاصیت زیست حسگری می‌باشند

توالی طراحی شده توسط شرکت سازنده تولید و به صورت قرار گرفته در حدفاصل جایگاه‌های برش *XhoI* و *BamHI* در پلازمید pGEM-7Zf(+) تحویل گرفته شد. پلازمید نو ترکیب حاصل که pGEM-7Zf(+)- نام دارد به درون سه سویه مختلف باکتری *E. coli* ASLI نام دارد به درون سه سویه مختلف باکتری *E. coli* JM109، *E. coli* DH5 α ، BL21-DE3 انتقال داده شد و باکتری‌های ترایاخته شده که توانایی تولید پاسخ فلورسانس در موقع قرار گرفتن در معرض ماده تولوئن را داشتند جداسازی شدند.

3-2- بررسی اثر نوع باکتری بر پاسخ زیست گزارشگر

نتایج حاصل از بررسی اثر نوع سویه باکتریایی بر پاسخ زیست گزارشگر در شکل 4 آورده شده است، این نتایج نشان می‌دهد که زیست گزارشگر مبتنی بر سویه BL21-DE3 دارای بیشترین شدت پاسخ نسبت به ماده تولوئن بوده و زیست گزارشگر مبتنی بر سویه JM109 دارای کمترین شدت پاسخ می‌باشد. چنانچه حساسیت زیست گزارشگر میزان پاسخی که در یک زمان معین به غلظت مشخصی از یک ماده خاص می‌دهد تعریف شود، به

نحوی که هرچه شدت پاسخ فلورسانس بیشتر باشد زیست گزارشگر حساستر است، پس می‌توان گفت زیست گزارشگر مبتنی بر سویه DH5 α همانطور که در شکل نشان داده شده است از این لحاظ حساستر از سویه JM109 و ضعیفتر از سویه BL21-DE3 می‌باشد.

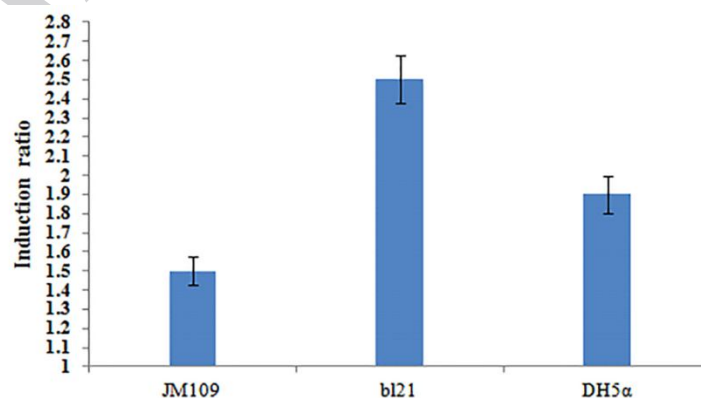
3-3- بررسی اثر دما بر پاسخ زیست گزارشگر

همان‌گونه که در جدول 1 نشان داده شده است بهترین دمای کشت بعد از مرحله القا با تولوئن دمای 37 درجه سانتی‌گراد می‌باشد. اگرچه تفاوت چندان زیادی بین مقدار نسبت القایی که در دمای 25 و 30 درجه سانتی‌گراد به دست آمده است با این مقدار وجود ندارد.

3-4- بررسی اثر محیط کشت بر پاسخ زیست

گزارشگر

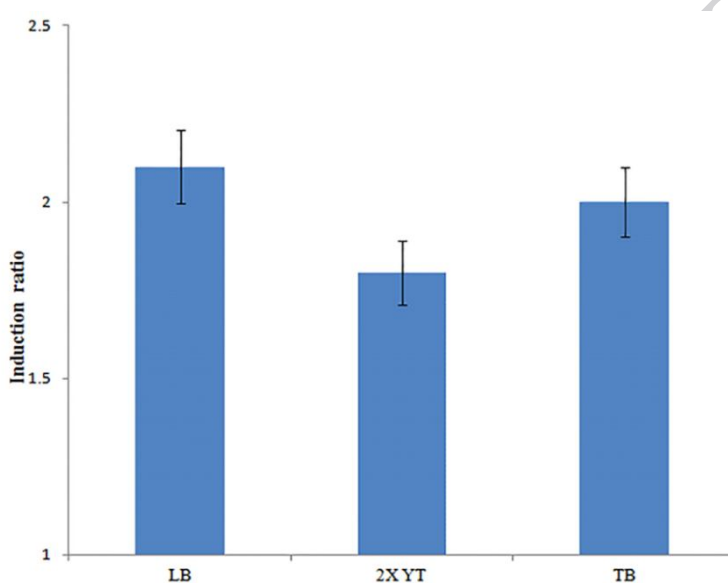
از میان محیط کشت‌هایی که مورد بررسی قرار گرفته است، به نظر می‌رسد محیط کشت LB تاحدودی سبب افزایش حساسیت زیست گزارشگر به ماده تولوئن می‌گردد ولی با یک نظر کلی می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که نوع محیط کشت اثر چندانانی بر پاسخ زیست گزارشگر ندارد. نتایج این بخش از مطالعات در شکل 5 نمایش داده شده است.



شکل 4 نسبت القا صورت گرفته با ماده تولوئن در هر یک از سوش های ترایاخته شده با پلازمید pGEM-7Zf(+)- ASLI نشان داده شده است.

جدول 1 اثر دماهای مختلف بر پاسخ زیست گزارشگر که به صورت نسبت القا نشان داده شده است.

دما	تولون	دانسیتة نوری	فلورسانس	RFU	نسبت القا
25 c°	+	21/0	75/19	94	1/32
25 c°	-	56/0	40	71	
30 c°	+	26/0	61	234	1/48
30 c°	-	67/0	106	158	
37 c°	+	17/0	60	352	2
37 c°	-	57/0	5/96	169	



شکل 5 اثر محیط کشت‌های مختلف بر پاسخ زیست گزارشگر مبتنی بر باکتری *E. coli* سوش *BL21-DE3* نشان داده شده است

جدول 2 اثر فاز رشد زیستگزارشگر مبتنی بر باکتری *E. coli* سوش *BL21-DE3* بر پاسخ زیستگزارشگر بر مبنای RFU نشان داده شده است

دانسیتة نوری	RFU
0/1	80 ± 2
0/3	82 ± 4
0/4	85 ± 6
0/7	82 ± 3
1/12	100 ± 5

3-5- بررسی اثر مرحله رشد بر پاسخ زیست گزارشگر
همان‌طور که در جدول 2 نشان داده شده است به نظر می‌رسد اینکه القا کردن زیست گزارشگر درچه مرحله‌ای از رشد باکتری صورت گیرد در میان دانسیته‌های نوری 0/1 تا 0/7 تفاوت چندانی ندارد، ولی القا کردن در دانسیته نوری حدود 1 و بالاتر از 1 سبب بروز حساسیت بیشتری از زیست گزارشگر می‌گردد، به طوری که القا در دانسیته حدود 1 سبب بروز RFU ای از زیست گزارشگر می‌گردد که از نظر مقدار 20% بیشتر از RFU بروز کرده از زیست گزارشگر در ODهای القای کمتر می‌باشد.

3-6- رسم نمودار دز- پاسخ زیست گزارشگر برای**ماده تولوئن**

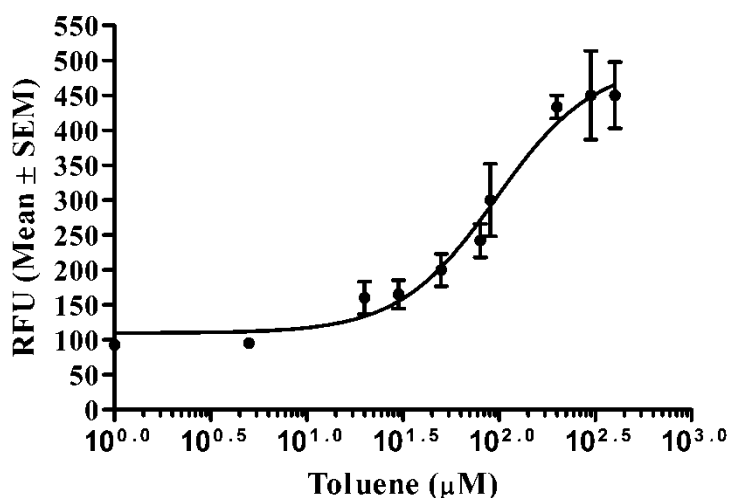
رسم نمودار دز - پاسخ در نرم افزار Prism با استفاده از مد رگرسیون غیر خطی¹ و با انتخاب مدل رسم نمودار لگاریتم غلظت ماده آگونیست بر علیه پاسخ با شیب نمودار متغیر² منحنی مانند آنچه در شکل 6 نمایش داده شده است را نشان داد که معادله آن به صورت $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC}_{50} - \text{HillSlope} * X)})$ می باشد که در آن Y پاسخ زیست گزارشگر در هر غلظتی از تولوئن می باشد و Bottom کمترین مقدار Y، Top بیشترین مقدار Y، LogEC_{50} نقطه وسط بین Top و Bottom می باشد و Hill Slope شیب هیل است. اطلاعات استخراج شده از نمودار مقدار Bottom را 106/3، مقدار Top را 495/5، مقدار ضریب هیل را 1/772 و مقدار Log EC_{50} را 1/97 نشان داد که با گذاشتن آنها در معادله مربوطه معادله به این شکل در آمد $Y = 106.3 + (495.5 - 106.3) / (1 + 10^{(1.97 - X) * 1.772})$ که این معادله در حقیقت معادله منحنی استاندارد تولوئن می باشد. چنانچه این معادله را برای X یعنی غلظت ماده تولوئن نوشته شود معادله به دست آمده در قسمت قبل به این شکل در می آید $X = 1.97 - \text{Log} (495.5 / Y - 106.5 - 1) / 1.772$.

4- بحث

اینکه هر سه سویه بررسی شده در این تحقیق که با استفاده از pGEM-7Zf(+)-ASLI تراپاخته شده بودند توانایی رشد را داشتند و زنده ماندند و حتی در محیط LB آگار حاوی ماده تولوئن از خود خاصیت فلورسانس بروز دادند خود نشان می دهد که توالی طراحی شده در این آزمایش فاقد اثر سمی بر میزبان *E. coli* یا حداقل سه سویه DH5α، BL21- DE3، JM109 می باشد. اگر چه شرکت سازنده پلازمید pGEM-7Zf(+) بهترین میزبان

برای نگهداری این پلازمید را سویه JM109 معرفی نموده است ولی نتایج نشان داد که سویه BL21-DE3 توانایی تولید بهترین پاسخ زیست گزارشگری را داراست. از آنجا که برای بروز پاسخ زیست گزارشگر در توالی طراحی شده عوامل متفاوتی از قبیل میزان نفوذ پذیری غشای سلولی به ماده تولوئن، میزان تولید TbuT، میزان زیر واحد σ^{54} آنزیم RNA پلیمرز در سلول و توانایی تولید GFP و پایداری آن مؤثر است و این سویه های استفاده شده ممکن است از این نظر متفاوت باشند بنابراین دلیلی به طور قطع برای این موضوع نمی توان ذکر کرد. همان طور که کانکوا و همکارانش در مورد زیست گزارشگر مبتنی بر ژن گزارشگر لوسیفرز گزارش داده اند [20] دما یکی از عوامل بسیار مهمی است که می تواند بر پاسخ زیست گزارشگر اثر گذارد ولی در بسیاری از تحقیقاتی که بر روی زیست گزارشگرها انجام می شود اثر دما بررسی نمی شود [۳، ۱۴] و دمای بهینه رشد باکتری به عنوان دمای انجام آزمایش انتخاب می شود. در این تحقیق اثر دما بر پاسخ زیست گزارشگر بررسی شد، اگرچه نتایج نشان داد دما اثر چندانی بر پاسخ زیست گزارشگر حداقل در محدوده دمایی بررسی شده ندارد و بهترین دما برای بررسی پاسخ زیست گزارشگر همان دمای بهینه رشد باکتری یعنی 37 درجه سانتی گراد نشان داده شد. اینکه حساسیت یک زیست گزارشگر به دما تابعی از نوع ژن گزارشگر³ یا نوع میزبان و یا تابعی از هر دو است نیاز به بررسی بیشتری دارد. بررسی نوع محیط کشت انتخابی نشان داد از میان محیط کشت های انتخاب شده محیط LB برای بررسی پاسخ زیست گزارشگر محیط مناسبی است. اثر مرحله ای از رشد باکتری که در آن القا با ماده BTEX صورت می گیرد بر پاسخ زیست گزارشگر نیز در بعضی از مقالات بی اهمیت [3] و در بعضی دیگر مهم و قابل بررسی ذکر شده است [۱۴، ۲۰].

¹ Nonlinear regression² Log(agonist) vs. response -- Variable slope³ Reporter gene



شکل 6 نمودار دز - پاسخ زیست گزارشگر مبتنی بر باکتری *E. coli* سوش BL21-DE3.

در گزارش هالورسون 0/02 میکرومولار و برای زیست گزارشگر ما 5 میکرومولار می‌باشد. از این نتایج این‌گونه به نظر می‌رسد که زمان مورد نیاز برای پاسخ زیست گزارشگر و کمترین مقداری از ماده مؤثر که زیست گزارشگر به آن پاسخ می‌دهد، تابعی از نوع میزبان و پیشینه مقداری از ماده مؤثر که زیست گزارشگر به آن پاسخ می‌دهد، تابعی از توالی زیست حسگری است که میزبان با آن تریاخته شده است. برای اندازه‌گیری مقدار تولوئن حل شده در یک محلول آبی یا سنجش مقدار ترکیبات BTEX آبی که در یک محلول آبی حل شده‌اند بر مبنای تولوئن می‌توان از معادله نمودار استاندارد تولوئن تغییر یافته که به دست آمده $X = 1.97 - 1/1.772 \times \log(495.5/Y - 106.5)$ استفاده کرد و با قرار دادن پاسخ زیست گزارشگر در معادله به جای Y بر مبنای RFU می‌توان به راحتی مقدار تولوئنی که در نمونه آب مورد بررسی حل شده و یا مقدار معادل تولوئن ترکیبات BTEX آبی که در آب حل شده است را به دست آورد.

5- منابع

- [1] Zhong, Z., Fritzsche, M., Pieper, S. P., Wood, T. K., Lear, K. L., Dandy, D. S., and Reardon, K. F. (2010) Fiber optic monoxygenase biosensor for toluene concentration

در این تحقیق اثر مرحله رشد باکتری که در آن القا صورت می‌گیرد بر پاسخ زیست گزارشگر نیز بررسی شد که نتایج نشان داد مرحله‌ای از رشد باکتری که در آن القا صورت می‌گیرد بر پاسخ زیست گزارشگر اثر چندانی ندارد. با توجه به شباهتی که میان توالی استفاده شده در این تحقیق و تحقیقاتی که هالورسون [3] در سال 2002 میلادی ولی با استفاده از سویه A506 میزبان *Pseudomonas fluorescens* انجام داده است شاید بتوان اینگونه نتیجه گرفت که عدم حساسیت پاسخ زیست گزارشگر به مرحله ای از رشد که در آن القا صورت می‌گیرد تابعی از نوع توالی طراحی شده می‌باشد که میزبان با آن تریاخته شده است. اگرچه مقایسه نتایجی که در این تحقیق با استفاده از *E. coli* به عنوان میزبان به دست آورده شد و هالورسون با استفاده از سوش A506 باکتری *Pseudomonas fluorescens* به دست آورد نشان داد زمان مورد نیاز برای پاسخ زیست گزارشگر وقتی میزبان باشد 10 برابر زمان مورد نیاز نسبت به وقتی میزبان *Pseudomonas fluorescens* است ولی هر دو زیست گزارشگر این محدودیت را دارند که در غلظت‌های بالاتر از 100 میکرومولار تولوئن پاسخ منطقی به غلظت تولوئن نمی‌دهند و همچنین کمترین مقدار تولوئن قابل تشخیص

- [12] Yagi, K. (2007) Applications of whole-cell bacterial biosensors in biotechnology and environmental science. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1251-1258.
- [13] Trögl, J., Chauhan, A., Ripp, S., Layton, A. C., Kuncová, G., and Sayler G. S. (2012) *Pseudomonas fluorescens* HK44: Lessons Learned from a Model Whole-Cell Bioreporter with a Broad Application History. *Sensors.* 12, 1544-1571.
- [14] Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Rand, T.A., Schupp, J. M, Hill, K.K., Keim, P., Jackson, P.J. (1998) Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (3), 1006-1012.
- [15] Zeinoddini, M., Khajeh, K., Behzadi, F., Hosseinkhani, S., Saeedinia, A. R., and Barjesteh, H. (2010) Design and Characterization of an Aequorin-based Bacterial Biosensor for Detection of Toluene and Related Compounds. *J. Photochem. Photobiol.* 86, 1071-1075.
- [16] Applegate, B. M., Kehrmeier, S. R., and Sayler, G. S. (1998) A chromosomally based tod-luxCDABE whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2730-2735.
- [17] Heim, R., Cubitt, A.B. and Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature* .373, 663-664
- [18] Miller, W. G., and Lindow, S. E. (1997) An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene.* 191, 149-153.
- [19] Green, R. M., and Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold spring harbor laboratory press, York, USA.
- [20] Kuncova, G., Pazlarova, J., Hlavata, A., Ripp, S., and Sayler, G. S. (2011) Bioluminescent bioreporter *Pseudomonas putida* TVA8 as a detector of water pollution. Operational conditions and selectivity of free cells sensor. *Eco. Indic.* 11, 882-887.
- measurement in aqueous samples. *Biosens. Bioelectron.* 26, 2407-2412.
- [2] Li, Y. -F., Li, F. -Y., Ho, C. -L and Liao, V. H. -C. (2008) Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. *Environ. Pollut* 152, 123-129.
- [3] Stiner, L., and Halverson, L. J. (2002) Development and Characterization of a Green Fluorescent Protein-Based Bacterial Biosensor for Bioavailable Toluene and Related Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4), 1962-1971.
- [4] Hartley, W.R., Englande, A. J. (1992) Health Risk Assessment of the Migration of Unleaded Gasoline - A Model for Petroleum Products. *Water Sci. Technol.* 25 (3), 65-72.
- [5] Baelum, J., Andersen, I., Lundqvist, G. R. (1985) Response of solvent-exposed printers and unexposed controls to six-hour toluene exposure. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 11, 271-280.
- [6] Andersen, I., Lundqvist G. R, Molhave L. (1983) Human response to controlled levels of toluene in six-hour exposures. *Scand. J. Work. Environ. Health* 9, 405-418.
- [7] Echeverria, D., Fine L., Langolf, G. (1991) Acute behavioural effects of toluene and ethanol in human subjects. *Br. J. Ind. Med.* 48, 750-761.
- [8] Rahill A. A., Weiss, B., Morrow P.E, (1996). Human performance during exposure to toluene. *Aviat. Space. Environ. Med.* 67(7). 640-7.
- [9] Iregren A. (1986) Subjective and objective signs of organic solvent toxicity among occupationally exposed workers. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 12, 469-475.
- [10] Purohit. H.J.(2003) Biosensors as molecular tools for use in bioremediation. *J. Cleaner. Prod.* 11, 293-301.
- [11] Ron, E. (2007) Biosensing environmental pollution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 252-256.