ششمین کنگره سراسری عناصر کمیاب ایران
تهران، دانشگاه تهران، ۶ الی ۸ اسفند ۱۳۹۸

انجمن عناصر کمیاب ایران

اندازه‌گیری یون روی با استفاده از EGFP نمایش یافته در سطح باکتری

ساقی حکیمی نائینی[1]، رضا حسن ساجدی*

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

امروزه با افزایش فعالیت های صنعتی و کشاورزی، آلودگی محیط زیست به فلزات سنگین و سمی افزایش پیدا کرده است. روی فلزی است که با وجود داشتن فواید بسیار، در غلظت های بیش از حد مجاز سمی بوده و باعث بروز مشکلات و اختلالات بسیاری از جمله مرگ و میر جانوران، نقص های رشدی و آسیب های بافتی می شود. بنابراین توسعه یک سیستم ساده، ارزان و سریع برای شناسایی فلزات سمی بسیار حائز اهمیت است. در این مطالعه، برهمکنش بین پروتئین فلوئورسانس سبز بهبود یافته (EGFP) بیان شده بر روی سطح باکتری E. coli سویه BL21(DE3) و پروتئین EGFP خالص شده با غلظت های مختلف نمک کلرید روی با استفاده از روش طیف سنجی فلوئورسانس بررسی گردید. نتایج نشان داد که در حضور روی، نشر فلوئورسانس سبز پروتئین افزایش می یابد که با غلظت روی در محلول هماهنگ است. براساس نتایج بدست آمده کمترین غلظت روی قابل شناسایی توسط پروتئین EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و پروتئین خالص شده به ترتیب ۰/۳۱ نانومولار و ۱۸ نانومولار می باشد همچنین مطالعه مشابه در حضور غلظت ۲ نانومولار از یون های فلزی مختلف، نشان داد نشر فلوئورسانس پروتئین EGFP تنها در حضور روی افزایش پیدا می کند و سایر فلزات تاثیر چندانی نداشته و یا اندکی میزان نشر را کاهش می دهند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که EGFP نمایش یافته در سطح باکتری جهت شناسایی و تعیین یون روی بسیار اختصاصی عمل نموده و نسبت به EGFP خالص شده حساسیت بسیار بیشتری در تشخیص و شناسایی یون روی دارد.

کلمات کلیدی: پروتئین فلوئورسانس سبز بهبود یافته، بیان سطحی، یون روی، فلوئورسانس

* نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ، آدرس ایمیل: sajedi_r@modares.ac.ir

مقدمه

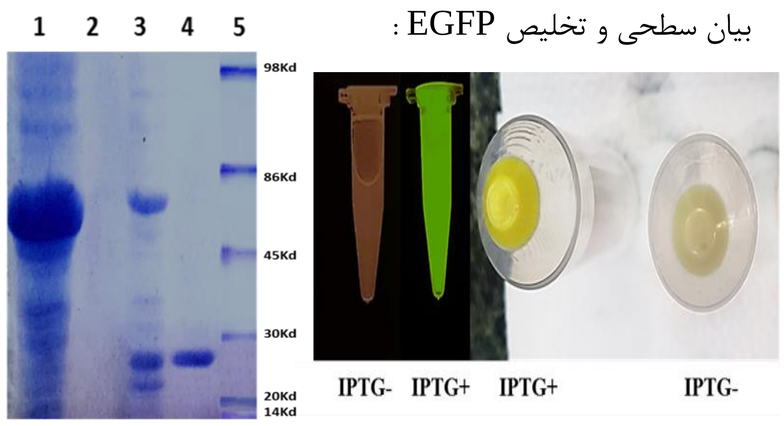
روی یک ماده معدنی ضروری برای بدن است که در ساختار بعضی از آنزیم‌ها و همچنین برخی از ژن‌ها، شرکت می‌کند و بعد از آهن، بیشترین میزان را در بدن داراست و به طور عمده در ماهیچه‌ها ذخیره می‌شود، با این وجود، مصرف بیش از حد روی باعث بروز مشکلاتی از جمله آشفتگی معده، استفراغ، سردرد، خواب آلودگی، بروز نقص های رشدی، ناهماهنگی عملکرد عضلات و کم خونی می شود. بنابراین وجود یک سیستم ساده برای ارزیابی میزان فلز روی موجود در خون و محیط زیست بسیار ضروری و حائز اهمیت می باشد. تکنیک های مرسومی که جهت بررسی فلز روی استفاده می شوند بسیار گران و زمان بر هستند. میکروارگانیسم ها، به دلیل کاربردهای زیادی که در حفاظت از محیط زیست دارند گزینه مناسبی جهت شناسایی و تشخیص فلزات هستند. حسگرهای زیستی مبتنی بر سلول معمولا کم هزینه و زیست سازگار بوده و می توانند یک پاسخ حساس به سمیت نمونه را در اختیار ما قرار دهند و به عنوان یک ابزار مؤثر جهت مهندسی پروتئین و ساخت حسگرهای زیستی، سیستم نمایش در سطح سلول کاربرد های فراوانی در صنعت و پزشکی دارد.

مواد و روش ها

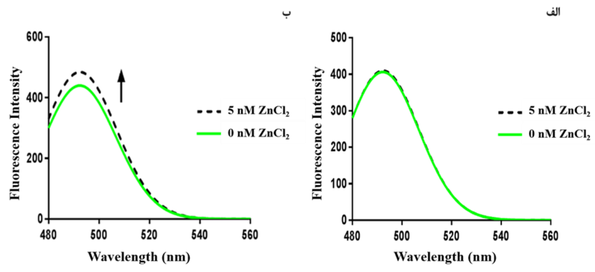
جهت بررسی اثر یون روی بر نشر فلوئورسانس سبز EGFP خالص شده و نمایش یافته بر روی سطح باکتری، ابتدا روی با غلظت ۵ نانومولار به EGFP خالص شده اضافه شد. به منظور تعیین بهترین زمان انکوباسیون، نشر فلوئورسانس EGFP بلافاصله پس از اضافه کردن روی و ۵۰ تا ۳۰۰ دقیقه انکوباسیون در ۴ درجه سانتی گراد، در طول موج تحریکی ۴۷۰ نانومتر و محدوده طول موج نشری ۶۰۰-۴۸۰ نانومتر خوانده شد. همچنین برای بررسی اثر یون روی با غلظت ۵ نانومولار بر شدت نشر فلوئورسانس EGFP نمایش یافته بر روی سطح باکتری، باکتری ها به اندازه ای رقیق شدند که شدت نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح آن ها به پروتئین خالص شده با غلظت ذکر شده نزدیک شود و سپس در شرایطی کاملا مشابه با EGFP خالص شده خوانش نشر آن ها انجام شد. جهت بررسی اثر غلظت های مختلف یون روی بر EGFP بیان شده سطحی و EGFP خالص شده، پس از ۳۰۰ دقیقه انکوباسیون در ۴ درجه سانتی گراد، برای EGFP نمایش یافته سطحی و خالص شده به ترتیب محدوده غلظت ۰ تا ۵ نانومولار و ۰ تا ۱۵۰ نانومولار روی انتخاب و مطابق با بخش بالا طیف گیری انجام شد. سپس منحنی شدت نشر فلوئورسانس علیه غلظت های گوناگون یون روی رسم شد و از روی آن محدوده خطی، معادله خط و LOD به دست آمد. به منظور به دست آوردن اختصاصیت روش نسبت به یون روی، نمک های مختلف کلرید با غلظت ۲ نانومولار بر روی EGFP نمایش یافته سطحی اثر داده شد و طیف نشری پروتئین طبق روش های فوق ثبت و شدت نشر پروتئین در حضور یون های گوناگون در محدوده طول موج ۶۰۰-۴۸۰ نانومتر با یکدیگر مقایسه شد.

نتایج

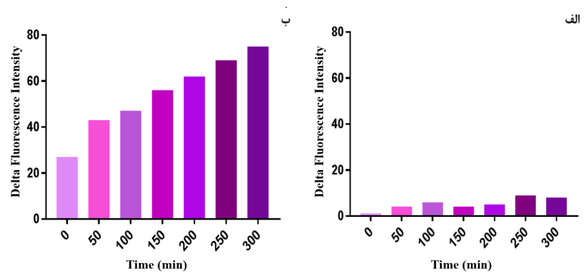
بیان سطحی و تخلیص EGFP :



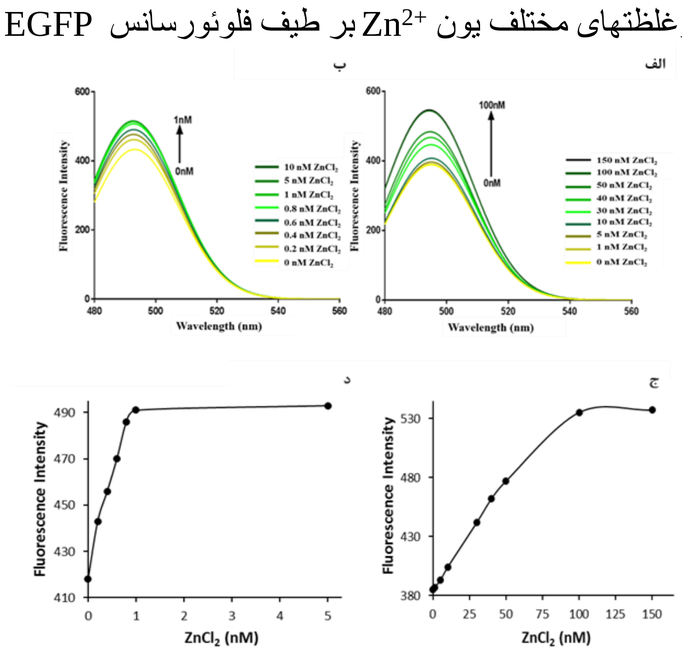
اثر Zn^{2+} بر فلوئورسانس EGFP:



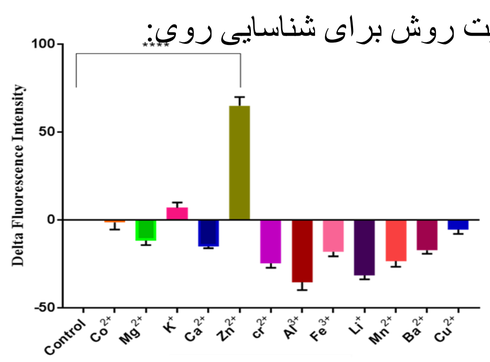
اثر Zn^{2+} بر تغییرات وابسته به زمان فلوئورسانس EGFP:



اثر غلظتهای مختلف یون Zn^{2+} بر طیف فلوئورسانس EGFP



اختصاصیت روش برای شناسایی روی:



بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، پس از بیان سطحی EGFP و تخلیص آن، اثر یون روی بر نشر فلوئورسانس EGFP در این دو حالت مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به این که اثر اولیه غلظت ۵ نانومولار روی پس از گذشت ۵۰ دقیقه، باعث افزایش نشر EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری شده است، می توان به حساسیت بیشتر EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری نسبت به EGFP خالص شده در شناسایی روی اشاره کرد. بنابراین براساس نتایج به دست آمده، پس از افزودن Zn^{2+} به محلول حاوی این پروتئین، افزایش شدت نشر فلوئورسانس برای EGFP خالص شده و EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری مشاهده شد. در این مرحله افزایش تدریجی نشر فلوئورسانس برای EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و خالص شده به ترتیب تا ۱ و ۱۰۰ نانومولار کلرید روی ادامه یافت و بین EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و خالص شده تفاوت معنی داری در حساسیت مشاهده شد. در گزارش قبلی، از پروتئین GFP بیان شده در درون سلول باکتریایی به عنوان یکی از شناسایی کننده های فلز روی استفاده شد و کمترین غلظت روی قابل شناسایی برای پروتئین GFP درون سلولی در این مطالعه ۰/۵ میلی مولار و پاسخ خطی فلوئورسانس در معرض یون روی در محدوده غلظت ۰/۰۵ میکرومولار تا ۵ میلی مولار گزارش شده است. این در حالیست که نتایج در اینجا نشان می دهد نشر فلوئورسانس EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری و پروتئین EGFPخالص شده به ترتیب در غلظت های حدود ۰/۳۱ نانومولار و ۱۸ نانومولار نمک کلرید روی شروع به افزایش کرده و دچار تغییر شدند. بررسی اختصاصیت روش، جهت شناسایی روی در غلظت ۲ نانومولار فلزات مختلف کلرید نیز بیانگر افزایش نشر EGFP بیان شده در سطح باکتری تنها در حضور روی بود.

نتیجه گیری کلی

میتوان گفت که EGFP بیان شده بر روی سطح باکتری به عنوان یک بیوسنسور باکتریایی نسبت به پروتئین خالص شده EGFP و همچنین EGFP خالص شده نسبت به GFP حساسیت بالاتری در شناسایی یون روی دارد و به شکل اختصاصی عمل می کند.

منابع

1.Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J.E., Castillo, R.N., Moreno, A.M. and Prieto, P., 2001. Use of flow cytometry and confocal microscopy techniques to investigate early CdCl2-induced nephrotoxicity in vitro. Toxicology in vitro, 15(4-5), pp.407-412.

2. Bálint, E.É., Petres, J., Szabó, M., Orbán, C.K., Szilágyi, L. and Ábrahám, B., 2013. Fluorescence of a histidine-modified enhanced green fluorescent protein (EGFP) effectively quenched by copper (II) ions. Journal of fluorescence, 23(2), pp.273-281.

3. Biran, I., Babai, R., Levcov, K., Rishpon, J. and Ron, E.Z., 2000. Online and in situ monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium. Environmental Microbiology, 2(3), pp.285-290.

4. DiSilvestro, Robert A., 2004. Handbook of minerals as nutritional supplements. Chemical Rubber Company press, pp.135-155

5. D'souza, S.F., 2001. Microbial biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 16(6), pp.337-353.

6.Lee, S.Y., Choi, J.H. and Xu, Z., 2003. Microbial cell-surface display. Trends in biotechnology, 21(1), pp.45-52