

بررسی مولکولی ساختار ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد

(*Asipencer ruthenus*) طی قرارگیری در معرض فلز مس

آسیه هادیان^۱، شهلا جمیلی^{۲*}، محمد پورکاظمی^۳، علی ماشین چیان^۱، مهتاب یارمحمدی^۳

* shahlajamili45@yahoo.com

۱- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۳- موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

چکیده

جانداران هنگامی که در معرض یون های فلزی هستند مکانیسم های دفاعی متفاوتی برای حفاظت خود در برابر اثرات منفی این یونها و ترکیباتشان دارند. متالوتیونین به عنوان یکی از این مکانیزم های دفاعی در بدن موجودات زنده تولید میشود. متالوتیونین وابسته به گروهی از پروتئین ها می باشد که در پاسخ به فلزات سنگین مثل مس در سلولهای مهره داران القا می شود. اخیراً توجه ویژه روی نقشی که این پروتئین در متابولیسم فلزات و سمیت زدایی از آنها بازی می کند متمرکز شده است. ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) گونه استورژن وابسته به بستر می باشد و به دلیل اینکه جهت تغذیه به بی مهرگان در طول چرخه غذایی خود وابسته است، شاخص خوبی جهت پایش کیفیت اکوسیستم آبی می باشد. افزودن مس به آب منجر به القاء متالوتیونین در آبزیان می گردد. در این بررسی ساختار ژن متالوتیونین در بافت کبد تاسماهی استرلیاد که در معرض غلظت زیر حد کشنده مس قرار گرفته بود مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج حاصل شده ساختار ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد برای نخستین بار شناسایی و به ثبت رسید. مقایسه توالی متالوتیونین در ماهی استرلیاد با توالی آن در سایر ماهی ها نشان داد ساختار اصلی ژن در متالوتیونین تاسماهی استرلیاد بسیار شبیه متالوتیونین در سایر ماهی ها میباشد. همچنین نتایج نشان داد ساختار اصلی ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد شامل ۲۰ اسید آمینه سیستمین است که میتواند توسط گروه تیولات خود به فلزات متصل شود. که این امر میتواند نشان دهنده این باشد که متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد میتواند به فلزات متصل شود. با این وجود ساختار اصلی متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد منحصر به فرد است و معلوم نیست که این امر میتواند روی عملکرد این پروتئین اثر بگذارد یا خیر.

کلمات کلیدی: فلز آلائی رنگین کمان، انرژی قابل هضم، انرژی قابل متابولیسم، نسبت انرژی به پروتئین

* نویسنده مسئول

مقدمه

متالوتیونین گروهی از پروتئین ها با وزن مولکولی پائین (۶ - ۲ کیلو دالتون) می باشد که غنی از اسید آمینه سیستئین است و در پاسخ به یون های فلزی در بدن جانداران سنتز می شود و در بسیاری از جانوران، گیاهان عالی، یوکاریوت ها و پروکاریوت ها شناسایی شده است (Kojima et al., 1996).

متالوتیونین (MT) که در سال ۱۹۵۷ توسط Margoshes و Vallee از قشر کلیه ی اسب جداسازی شد، در گروه پروتئین های داخل سلولی قرار می گیرد. عملکردهای بیولوژیکی متالوتیونین ها شامل ذخیره، حمل و نقل یا تفکیک فلزات ضروری و سمیت زدایی فلزات سمی می باشد. با توجه به اهمیت سمیت زدایی MTS، می توان این پروتئین را به عنوان زیست نشانگر آلودگی فلزات سمی در محیط زیست در نظر گرفت (Vardy et al., 2013).

متالوتیونین ترکیب آمینو اسیدی غیر متعارفی دارد که شامل اسید آمینه های آروماتیک نمی باشد و از آن مهمتر اینکه حدود یک سوم ترکیب آن شامل اسید آمینه سیستئین می باشد. تحقیقات اخیر در زمینه متالوتیونین روی نقشی که متالوتیونین در زمینه سم زدایی فلزات بازی می کند متمرکز شده است.

این پروتئین نقش مهمی را در برقراری تعادل حیاتی فلزات در بدن جانداران بازی می کند، به طوریکه بیان ژن متالوتیونین به آسانی توسط محرک های توکسیکولوژیک و یا فیزیولوژیک القاء می شود. توالی آمینواسیدهای ژن متالوتیونین در بسیاری از پستانداران بیانگر این واقعیت است که متالوتیونین تقریباً در تمام آنها دارای ۶۱ آمینو اسید می باشد. بخشی از متالوتیونین که با فلزات باند می شود شامل ۲۰ اسید آمینه سیستئین می باشد که در کنار اسید آمینه های اصلی (لیزین و آرژنین) به صورت دو سایت غنی از تیول مرتب شده اند (Eckschlager et al., 2009).

ماهیان خاویاری (Acipenseridae) گونه های کهنی هستند که به بیش از ۶۵ میلیون سال پیش برمی گردند (wilimovsky, 1956). امروزه تمام ۲۷ گونه از ماهی های خاویاری که در اروپا، آسیا و آمریکای شمالی یافت می شوند تحت حمایت کنوانسیون CITES قرار

دارند. ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) گونه ای از ماهی های خاویاری کفزی می باشد که انحصاراً در زیستگاههای آب شیرین زندگی می کند. اصلی ترین غذای استرلیاد در تمام رودخانه ها ارگانیزم های کفزی می باشد (Doering et al., 2015).

ماهی های خاویاری عموماً قابلیت بالایی در بایواکومولیشن (تجمع زیستی) آلاینده های پایدار در محیط زیست دارند که این به دلیل محتوای بافت چربی بالا و سبک زندگی ویژه شان می باشد. به عنوان مثال زمان زیادی طول می کشد تا این گونه به بلوغ برسد همچنین طول عمر بالایشان و رژیم غذایی وابسته به بستر می تواند دلایلی برای پتانسیل بالای این ماهی در تجمع زیستی آلاینده ها باشد (Kruse et al., 2002). در این تحقیق تلاش شد تا با قرار گرفتن تاسماهی استرلیاد در معرض غلظت های غیرکشنده مس، ساختار ژن متالوتیونین در این ماهی شناسایی شده و مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

تعداد ۷۲ عدد ماهی استرلیاد با میانگین وزنی ۳۸/۵-۱۸ گرم، طی ۱۴ روز در معرض غلظت زیر حد کشنده ۸/۷۵ میلی گرم بر لیتر سولفات مس قرار گرفتند.

نمونه برداری در بهمن ماه سال ۱۳۹۳ انجام شد. ماهی های در معرض قرار گرفته به طور تصادفی از چاهک ها انتخاب شدند و پس از بیهوش شدن توسط میخک، بافت های کبد جداسازی شده و به سرعت به فریزر با دمای ۸۰°C - منتقل گردیدند.

استخراج RNA از بافت های کبد تاسماهی استرلیاد با استفاده از TRIZOL Reagent و دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در کلیه موارد، Total RNA توسط آنزیم DNaseI (Fermentas, France) جهت جلوگیری از تکثیر DNA ژنومی تیمار شدند.

کیفیت نمونه های RNA با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و کمیت آن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری نانودراپ (Nanodrop-ND1000) بررسی شد. سپس رشته اول cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم از Total RNA در هر نمونه و

آنزیم (Fermentas, France) Reverse-Transcriptase، تهیه شد. عدم آلودگی با DNA ژنومی توسط PCR نمونه های RNA در غیاب آنزیم سنتز کننده cDNA (Reverse Transcriptase) آزمایش شد. برای آنالیز صحت سنتز cDNA، بر روی cDNA سنتزی واکنش PCR انجام شد. در واکنش پلی مرازی از پرایمرهای 18s rRNA F&R طراحی شده مخصوص نمونه های یوکاریوتی به همراه GTP PCR Master Mix, 2X از شرکت پیشگامان انتقال ژن استفاده شد.

واکنش تکثیر ژن مورد نظر در ۳۰ چرخه انجام گرفت. پس از پایان واکنش تکثیر، مقدار ۵ µl از نمونه بر روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد تا کیفیت قطعات ژنی پس از تکثیر مورد ارزیابی قرار گیرد. پس از تایید صحت ساخت cDNA واکنش زنجیره ای پلیمرازی با پرایمرهایی که توالی مربوط به آن در جدول ۱ آورده شده است با شرایط ذکر شده گذاشته شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تکثیر ژن متالوتیونین با استفاده از آغازگرهای طراحی شده انجام گردید (Doering et al., 2014).

جدول ۱: توالی های پرایمر های سنتز شده

Table 1: Sequences of sterlet oligonucleotide primers used in amplification of cDNA ends PCR, in sequencing of full-length cDNA.

Primer name		Primer Sequence(5'-3')	length
MT1	F	5 ATGGATCCGCAATCTTGCACG 3	192 NT
	R	5 TCACTTGCAGCAGCCGGTGTC 3	
MT2	F	5ACTCGTCACCGGGAAACAAAGC 3	205 NT
	R	5 CGTTTGCCTCCAGACATAGGGG 3	

جدول ۲: سیکل حرارتی PCR

Table 2: PCR thermal cycling

سیکل حرارتی PCR			
First denaturation	5 min	94°C	۱
Denaturation	30s	94°C	
Annealing	54s	56°C	×۳۰
Extension	30s	72°C	
Final extension	5 min	72°C	۱

محصولات PCR به دست آمده در فریزر ۲۰°C- درجه سانتی گراد برای آنالیزهای بعدی نگهداری گردیدند. نمونه های محصولات نهایی منتخب واکنش زنجیره ای پلیمراز مناسب (باند های پررنگ و ضخیم فاقد اسمیر، دایمر پرایمر، باند غیر اختصاصی) به همراه پرایمر فوروارد جهت تعیین توالی به روش sanger به شرکت Shine gene واقع در چین ارسال گردیدند و توالی ژن متالوتیونین به دست آمد. سکانس های حاصل از تعیین توالی با استفاده از

نرم افزار Blast با توالی های موجود در بانک ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شدند.

نتایج

نتایج به دست آمده در این بررسی منجر به شناسایی توالی نوکلئوتیدی و توالی اسید آمینه ای ژن متالوتیونین در ماهی استرلیاد برای نخستین بار در دنیا و ثبت آن

گردید. همچنین نتایج به دست آمده داد که ژن متالوتیونین در کبد ماهی های استرلیاد در معرض قرار گرفته توسط مس نسبت به تیمار شاهد به میزان بیشتری بیان گردید. توالی نوکلئوتیدی و توالی اسید آمینه ای ژن متالوتیونین در ماهی استرلیاد در شکل ۱ آمده است. براساس نتایج به دست آمده وزن مولکولی این پروتئین حدود ۶۳۰۴ گرم بر مول تخمین زده شد. همچنین مشخص گردید که

ساختار ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد شامل ۲۰ اسید آمینه سیستمین است که این خصوصیت اختصاص به تمام متالوتیونین هایی دارد که تا کنون شناسایی شده اند. نتایج نشان می دهند که ناحیه کد کننده متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد شامل ۱۹۲ نوکلئوتید بوده که ۶۳ اسید آمینه را کد می کند.

ATG GAT CCG CAA TCT TGC ACG TGC GCT CAG GGT GGT TCA
Met D P Q S C T C A Q G G S

TGC AGC TGC GGT GAT AAC TGC AAA TGC ACG GAC TGC AAA
C S C G D N C K C T D C K

TGC AAA ACT TGC AAG AAA AGC TGC TGC TCC TGT TGT CCC
C K T C K K S C C S C C P

ACC GAC TGC AGC AAA TGT GCC CAG GGC TGC GTC TGC AAA
T D C S K C A Q G C V C K

GGG GGA GCC ACC TGC GAC ACC GGC TGC TGC AAG TGA AAAC
G G A T C D T G C C K Stop K

شکل ۱: توالی نوکلئوتیدی پروتئین کد کننده ژن متالوتیونین. اسید آمینه ها نیز نشان داده شده اند. اسید آمینه های متفاوت با حروف ایتالیک مشخص شده اند. موتیف CXXXCC که ویژه متالوتیونین در ماهیان میباشد هایلایت شده است.

Figure1: Nucleotide sequence of the protein coding region of S-MT. Amino acids are shown. Dissimilarity in amino acids are point to italics. The CXXXCC motif, which is a typical of MTs from fishes is highlighted.

بحث

ساختار اصلی ژن در متالوتیونین تاسماهی استرلیاد بسیار شبیه متالوتیونین در سایر ماهی ها می باشد. برای مثال وجود موتیف CXXXCC در α -domain ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد نتیجه یک جابه جایی در موقعیت نهم C در α -domain می باشد که خصیصه ماهی ها می باشد. در حالیکه در سایر کلادها متالوتیونین شامل یک موتیف CXCC در این ناحیه می باشد.

چندین مورد در ساختار پروتئین متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد گزارش شده است که آن را از سایر گونه های ماهیان استخوانی متمایز می کند. به عنوان مثال تعداد جفت اسید آمینه های سیستمین_لیزین (C_K) و یا لیزین_سیستمین (K_C) وجه تمایز متالوتیونین در بین ماهی ها و پستانداران می باشد. تعداد این جفت در متالوتیونین پستانداران ۷_۵ عدد می باشد که زیاده تر از

ماهی ها می باشد (D'Auria et al., 2001; Scudiero et al., 2005) که دارای ۴ جفت (C_K) می باشند، استثنا موجود در متالوتیونین common carp (Cyprinus carpio) می باشد که دارای ۵ جفت می باشد. در حالیکه ژن متالوتیونین در ماهی استرلیاد و همچنین در عضو دیگر از تاسماهیان با قرابت زیاد نسبت به تاسماهی استرلیاد، یعنی *Acipenser transmontanus* و *Acipenser fulvescens* شامل ۷ KC(CK) می باشد و این جفت های اضافه در موقعیت های ۲۵_۲۶ و ۲۷_۲۸ و ۶۲_۶۳ وجود دارد.

تفاوت دیگر در ساختار ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد و متالوتیونین در سایر ماهی ها ی استخوانی، که با *Acipenser transmontanus* و *Acipenser fulvescens* مشابه می باشد، طول پروتئین متالوتیونین می باشد. طول این پروتئین در ماهی های استخوانی، به

منحصر به فرد است و معلوم نیست که این امر میتواند روی عملکرد این پروتئین اثر بگذارد یا خیر.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم میدانم از فاطمه هادیان به سبب مساعدت های سازنده و نیز کلیه عزیزانی که با همکاریهای صمیمانه و همه جانبه خود موجبات اجرای این پژوهش رافراهم نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

منابع

- Blair, J.E. and Hedges, S.B., 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Molecular Biology and Evolution*, 22(11): 2275–2284.
DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msi225>
- D'Auria, S., Carginale, V., Scudiero, R., Crescenzi, O., Di Maro, D., Temussi, P.A., Parisi, E. and Capasso, C., 2001. Structural characterization and thermal stability of Notothenia coriiceps metallothionein. *Biochem. J.* 354: 291–299.
- Doering, J.A., Wiseman, S., Beitel, S.C., Giesy, J.P. and Hecker, M., 2014. Identification and expression of aryl hydrocarbon receptors (AhR1 and AhR2) provide insight in an evolutionary context regarding sensitivity of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to dioxin-like compounds. *Aquat. Toxicol.* 150: 27–35.
DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.02.009.
- Doering, Jon A., Beitel, Shawn C, Bryanna K. Eisner, Timon Heide, Henner

استثنا ماهی قزل الای رنگین کمان (*O.mykiss*) و اتلانتیک سالمون (*S. salar*) که دارای ۶۲ اسید آمینه هستند ، دارای ۶۰ اسید آمینه است. درحالیکه ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد و نیز *Acipenser transmontanus* و *Acipenser fulvescens* دارای ۶۳ اسید آمینه می باشد که از تمام متالوتیونین های شناسایی شده در ماهی های استخوانی طولتر می باشد. مقایسه توالی متالوتیونین در ماهی استرلیاد با توالی آن در دوگونه مشابه از تاسماهیان *Acipenser fulvescens* و *Acipenser transmontanus* نشان می دهدکه تفاوت در ساختار اولیه متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد با سایر ماهی های مشابه از جمله دو گونه مای خاویاری ذکر شده در جایگاه ۱۱ می باشد یعنی جایگاه *Acipenser transmontanus* دارای آلانین (A) می باشد در حالیکه متالوتیونین در استرلیاد و *Acipenser fulvescens* دارای گلیسین می باشند (G). همچنین در جایگاه ۹ که در آن متالوتیونین استرلیاد دارای آلانین (A) و اما تاسماهیان *Acipenser fulvescens* و *Acipenser transmontanus* دارای (T) می باشند.

تخمین زده میشود که ماهیان خاویاری حدود ۳۰۰ میلیون سال پیش ازاجدادشان به سوی زیر شاخه جدید Actinopterygii که هم در برگیرنده ماهی های استخوانی و هم استورژن ها می باشد، متمایز گشته اند (Kumar and Hedges, 1998, Blair and Hedges, 2005).

بنابراین اینطور به نظر می رسد که ژن متالوتیونین شناسایی شده در تاسماهی استرلیاد قدیمیترین فرم از متالوتیونین های شناسایی شده در ماهیان استخوانی تاکنون می باشد.

اگرچه اتصال متالوتیونین در ماهی استرلیاد به فلزات مشخص نشده است اما ساختار اصلی متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد شامل ۲۰ اسید آمینه C است که می تواند توسط گروه تیولات خود به فلزات متصل شود. که این امر می تواند نشان دهنده این باشد که متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد میتواند به فلزات متصل شود. با این وجود ساختار اصلی متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد

- Hollert, Giesy, John P. Markus Hecker, and Steve B. Wiseman., 2015,** Identification and response to metals of metallothionein in two ancient fishes: White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*), *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 171(2015): 41–48.
DOI: 10.1016/j.cbpc.2015.03.002
- Kojima, Y. and Hunziker, P.E., 1996.** Amino acid analysis of metallothionein. *Methods Enzymol.* 205: 419–215. Kagi JHR, Vallee BL. 1960.
- Kumar, S. and Hedges, S.B., 1998.** A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, 392: 917–919. doi:10.1038/31927.
- Kruse, G.O. and Scarnecchia, 2002,** Assessment of bioaccumulated metal and organochlorine compounds in relation to physiological biomarkers in Kootenai River white sturgeon, *J. Appl. Ichthyol.* 18(2002): 430–438. DOI:10.1046/j.14390426.2002.00381.x.
- Scudiero, R., Temussi, P.A. and Parisi, E., 2005.** Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study. *Gene*, 345(1): 21–26. DOI:10.1016/j.gene.2004.11.024.
- Eckschlager, T., Adam, V., Hrabeta, J., Figova, K. and Kizek, R., 2009.** *Curr. Protein Pept. Sci.*, 10: 360.
- Vardy, D.W., Oellers, J., Doering, J.A., Hollert, H., Giesy, J.P. and Hecker, M., 2013.** Sensitivity of early life stages of white sturgeon, rainbow trout, and fathead minnow to copper. *Ecotoxicology* 22: 139–147. DOI:10.1007/s10646-012-1010-4.
- Wilimovsky, N.J., 1956.** *Protoscaphirhynchus squamosus*, a new sturgeon from the Upper Cretaceous of Montana. *J. Paleontol.* 30: 1205–1208.

Analysis of metallothionein gene structure in sterlet (*Acipenser ruthenus*) during copper exposure

Hadian A.¹; Jamili Sh.^{2*}; Pourkazemi M.²; Mashinchian A.¹; Yarmohammadi M.³

*shahlamjili45@yahoo.com

1-Marine Biology Department, Faculty of Marine Science and Technology, Science and Research Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization

3- International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization

Abstract

Aquatic organisms present, not only simple sources of accumulated metal, but can interact with metals, altering their toxicity. Due to exposition of biosphere with metals, organisms have developed various defense mechanisms to protect themselves against adverse effects of these ions and their compounds. MT is one of that which represent a critical mechanism for detoxification of metals. The Sterlet (*Acipenser ruthenus*) is a bottom-feeding sturgeon species and because the fish are dependent on invertebrate species for food throughout their life cycle, the Sterlet could be a good indicator of the quality state of water ecosystem. Addition of copper to water leads to the induction of metallothionein. The present study analyzed metallothionein gene that (MT) excreted from liver of Sterlet (*Acipenser ruthenus*) exposed to sub-lethal copper concentrations (0.075 mg/L (-1)). To begin to elucidate molecular mechanism(s) of sensitivity of sturgeons to metals a RNA encoding metallothionein (MT) was purified from livers of Sterlet then a cDNA was synthesized and the MT gene was amplified. The primary structure of Sterlet metallothionein (S-MT) contained 20 cysteine residues, which is the same as MTs of teleost fishes. However, the primary structure of Sterlet metallothionein contained 63 amino acids, which is longer than any MT identified in teleost fishes but similar to Lake sturgeon and White sturgeon. The complete nucleotide sequence of the Sterlet metallothionein gene has been detected. We have determined the structure of the fish copper-binding protein by DNA sequence analysis of the gene.

Keywords: Metallothionein, Copper, Sterlet, Gene structure

*Corresponding author