بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک

بیان ژن متالوتیونین در باکتری *اشریشیا کولی*

استاد راهنما:
دکتر بهناز صفار

استاد مشاور:
دکتر محسن مبینی دهکردی

توسط:
محسن پولادیان

تیر ماه ۱۳۹۱

دانشکده علوم

گروه ژنتیک

پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم/آقای ..... با عنوان "....." در تاریخ ..... توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه .....به تصویب رسید.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه دکتر ..... با مرتبه علمی استادیار	امضاء
۲- استاد مشاور پایان‌نامه ..... صفار با مرتبه علمی استادیار	امضاء
۳- استاد داور پایان‌نامه دکتر.....با مرتبه علمی.....	امضاء
۴- استاد داور پایان‌نامه دکتر.....با مرتبه علمی	امضاء
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی دکتر.....با مرتبه علمی.....	امضاء

دکتر .....

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده علوم

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

همراه با تقدیم تشکر از راهنمایی‌های اساتید راهنما و مشاور و کمک‌های دوستانی که در پیشرفت و اتمام کار دست یاری نشان دادند و حمایتهای والدین گرامی خود و در نهایت این جسم ضعیف که مرا در این راه یاری رساند، هرچند که مطمئن نبودن از رضای الهی نسبت به راهی که پیش پای خود یافتم جان حرکت را از من ربود، که اگر این همه نبود و امید به وعده "بگو به فضل خدا و رحمت او باید دلشاد باشید که همانا این از آنچه که جمع می‌کنید بالاتر است" نبود مرا توان ادامه راه نیز ممکن نبود.

تقدیم به رهبر مملکتم امام خامنه‌ای

چکیده

سوال اساسی تحقق این بود که آیا می‌توان ژن متالوتیونین *smtA* را در باکتری *E. coli* مورد بیان قرار داد. بدین منظور ژن متالوتیونین *smtA* که مربوط به یک سیانوباکتری بود به کمک سنتز تسهیل شده ژن به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد ساخت قرار گرفت. سپس به درون وکتور کلونینگ pTZ57R/T که از وکتورهای T/A-cloning محسوب می‌شود وارد گردید و بدین وسیله در سویه کلونینگ DH5α کلون گردید. در ادامه به وکتور بیانی pET15b(+) وارد شد و از این طریق در درون میزبان باکتریایی بیانی BL21(DE3) مورد بیان قرار گرفت. القای بیان ژن توسط IPTG در باکتری‌های BL21(DE3) انجام شد. مقایسه الگوی بیان پروتئینی باکتری نوترکیب در ساعات مختلف بعد از القا نسبت به قبل از القا باند حدود ۱۰ کیلودالتونی را نشان داد، که می‌تواند نشان‌دهنده بیان پروتئین مورد نظر باشد. بدین ترتیب راهی به سوی تولید و خالص سازی این پروتئین و استفاده‌های بعدی آن در آینده باز خواهد شد.

کلمات کلیدی: متالوتیونین، بیان، جذب زیستی فلز

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته ۱

۱-۱ بیان زیستی متالوتیونین و جذب آلودگی‌های فلزات سنگین ۲

۱-۱-۱ متالوتیونین‌ها ۳

۱-۱-۲ دسته بندی متالوتیونین‌ها ۳

۱-۱-۳- ویژگی‌های متالوتیونین‌ها ۴

۱-۱-۳-۱ ویژگی‌های عمومی ۴

۱-۱-۳-۲ متالوتیونین در انسان ۵

۱-۱-۳-۳ پیشینه مطالعه متالوتیونین ۷

۱-۱-۳-۴ اتصال به فلزات در زمینه زیستی ۹

۱-۱-۳-۵ تنوع متالوپروتئین‌ها ۱۲

۱-۱-۳-۶ مکانیسم عمل متالوتیونین‌ها ۱۴

۱-۱-۳-۷ جایگاه پروتئین حاصل از ژن *smtA* در بین سایر متالوپروتئین‌ها ۱۸

۱-۲ بیان ژن متالوتیونین *smtA* در باکتری *E. coli* ۲۳

۱-۲-۱ متالوتیونین *SmtA* ۲۴

۱-۲-۲ مختصری در مورد بیان نوترکیبی ژن‌ها ۲۵

۱-۲-۳ مختصری راجع به باکتری *E. coli* ۲۷

۱-۲-۴ سیستم‌های بیانی pET ۲۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۱

۲-۱ مواد ۳۲

۲-۱-۱ ترادف ژن و سویه‌های باکتری ۳۲

۲-۱-۲ محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها ۳۳

۲-۱-۳ پلاسمیدها و کیت پلاسمیدی ۳۳

۲-۱-۴ آنزیم‌ها ۳۶

۲-۱-۵ مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی ۳۷

۲-۱-۶ دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز ۳۷

۲-۲ روش‌ها ۳۸

۲-۲-۱ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر قطعه متالوتیونین ۳۸

۲-۲-۲ بررسی محصول PCR توسط ژل الکتروفورز ۴۰

۲-۲-۳ کشت و ذخیره سلول‌های باکتری ۴۲
۲-۲-۴ روش همسانه سازی (کلون سازی) درون وکتور T/A-coloning ۴۳
۲-۲-۵ بررسی صحت همسانه‌سازی با استفاده از تست کلنی‌ها بوسیله PCR ۴۸
۲-۲-۶ استخراج پلاسمید از باکتری ۴۹
۲-۲-۷ انتقال ژن کلون‌شده به وکتور بیانی pET15b(+)..... ۵۲
۲-۲-۷-۱هضم وکتور نوترکیب T/A-mt و وکتور بیانی pET15b با آنزیم محدودالاثر..... ۵۳
۲-۲-۷-۲ استخراج باندهای مورد نظر از ژل آگارز ۵۴
۲-۲-۷-۳ الحاق ژن MT با وکتور بیانی pET15b ۵۵
۲-۲-۷-۴ انتقال محصول الحاق به درون سلول‌های باکتریایی مستعد تلقیح..... ۵۶
۲-۲-۸ القای بیان و بررسی تولید پروتئین..... ۵۶
۲-۲-۸-۱ القای تولید پروتئین با استفاده از IPTG ۵۶
۲-۲-۸-۲ آماده‌سازی نمونه‌ها برای الکتروفورز بر روی ژل..... ۵۷
۲-۲-۸-۳ بررسی بیان پروتئین‌های نوترکیب توسط ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۵۸

فصل سوم : نتیجه..... ۶۱
۳-۱ مقدمه..... ۶۲
۳-۲ سنتز ژن *smtA* و تکثیر از آن..... ۶۲
۳-۲ کلون‌سازی ژن *smtA*..... ۶۳
۳-۲-۲ وارد کردن ژن به وکتور T/A و وارد کردن آن به باکتری..... ۶۳
۳-۲-۲ تایید روند کار توسط PCR..... ۶۴
۳-۴ انتقال ژن از وکتور T/A به درون وکتور pET15b(+) و وارد کردن آن به باکتری..... ۶۴
۳-۴-۱ انتقال وکتور $pET_{15}b$ خریداری شده به باکتری DH5α ۶۴
۳-۴-۲ استخراج پلاسمیدهای T/A-MT و $pET_{15}b$ از باکتری‌های نوترکیب..... ۶۵
۳-۴-۳ برش آنزیمی پلاسمیدها و خالص‌سازی قطعات..... ۶۵
۳-۴-۴ تایید روند خالص‌سازی توسط ژل الکتروفورز و اتصال قطعات خالص شده به یکدیگر..... ۶۷
۳-۵ تهیه باکتری‌های حاوی وکتور بیانی نوترکیب و بررسی تولید پروتئین..... ۶۷
۳-۵-۱ انتقال وکتور بیانی نوترکیب به باکتری DH5α..... ۶۷
۳-۵-۲ بررسی صحت کلون‌های نوترکیب..... ۶۷
۳-۵-۳ استخراج پلاسمید نوترکیب و انتقال آن به میزبان بیانی BL21..... ۷۰
۳-۶ القای تولید پروتئین در باکتری‌های نوترکیب و بررسی تولید پروتئین..... ۷۰
۳-۶-۱ القای تولید پروتئین و تفکیک پروتئین‌ها توسط الکتروفورز ۷۰
۳-۶-۲ بررسی‌های نرم‌افزاری پروتئین بیان شده..... ۷۱

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۷۳
۴-۱ مقدمه ۷۴
۴-۲ دلیل استفاده از باکتری *E. coli* ۷۵
۴-۳ دلیل استفاده از ژن *smtA* ۷۵
۴-۴ مروری بر تحقیقات گذشته و مقایسه آن با این تحقیق ۷۶
۴-۵ بررسی نتایج به دست آمده ۷۷
۴-۵-۱ مثبت شدن نتیجه PCR برای کنترل‌های منفی ۷۸
۴-۵-۲ باند ۱۰ کیلودالتونی پروتئین در الکتروفورز ۷۷
۴-۵-۳ میزان بیان القا شده و حلالیت پروتئین به دست آمده ۷۸

پیشنهادات ۸۱
منابع ۸۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱ ژل الکتروفورز از متالوتیونین تهیه شده از *پلورودلز والتل*.....۵
شکل۱-۲ مدل‌های پیشبینی شده از ساختار متالوتیونین و تغییرات آن.....۱۵
شکل۱-۳ مقایسه متالوتیونین گیاهی و جانوری ۱۷
شکل۱-۴ ترادف کردن چندگانه متالوتیونین‌های باکتریایی.....۲۱
شکل۱-۵ ساختار NMR پروتئین SmtA محلول، گرفته شده از *سینکوکوکوس* PCC 7942.....۲۲
شکل ۱-۶ لوکوس X64585 در باکتری *سینکوکوکوس* PCC 7942.....۲۵
شکل۲-۱ توالی نوکلئوتیدی ژن سنتزی *SmtA* به همراه انتهای برشی ۳۲
شکل۲-۲ پلاسمید بیانی $pET_{15}b(+)$ ۳۴
شکل۲-۳ نقشه محدودالاثر وکتور pTZ57R/T ۳۵
شکل۲-۴ نحوه ورود قطعه ژنی به درون وکتور TA ۳۵
شکل۲-۵: نحوه تهیه کشت‌های باکتریایی برای گرفتن تک کلونی.....۴۳
شکل۲-۶ کلونی‌های آبی و سفید در باکتری‌های فاقد توالی کامل سازی α.....۴۷
شکل۲-۷ استخراج پلاسمید در یک نگاه.....۵۰
شکل۳-۱ سنتز و تکثیر ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....۶۳
شکل۳-۲ بررسی محصولات کلونی PCR.....۶۴
شکل۳-۳ بررسی محصولات استخراج پلاسمید.....۶۵
شکل ۳-۴ ایجاد برش توسط آنزیم‌های محدودکننده.....۶۶
شکل۳-۵ انجام برش باندهای DNA از روی ژل آگارز.....۶۶
شکل۳-۶ بررسی صحت کلون‌های نوترکیب توسط PCR ۶۸
شکل۳-۷ نتیجه توالی‌یابی پلاسمید نوترکیب.....۶۹
شکل۳-۸ تصویر ژل الکتروفورز SDS-PAGE برای نمونه‌های قبل و بعد از القا.....۷۰
شکل۳-۹ هم‌ترادف‌یابی پروتئین در باکتری *E. coli*.....۷۲

شکل۴-۱ توالی قسمتی از وکتور نوترکیب در اطراف ژن ورودی.....۷۸
شکل۴-۲ ژل الکتروفورز در تحقیق انجام شده توسط کوستال و همکاران.....۸۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۱-۱مقایسه *SmtA* با چند متالوتیونین دیگر.....۱۸
جدول۱-۲ خانواده‌های حسگرها و ذخیره‌های فلزی در سیتوزول ۱۹
جدول۱-۳ خصوصیات سویه‌های بیانی BL21 برای تولید پروتئین.....۲۸
جدول۲-۱ دو پرایمر استفاده شده برای واکنش PCR ۳۳
جدول۲-۲ مشخصات ژنوتیپی باکتری‌های DH5α و BL21(DE3) ۳۳
جدول۲-۳ جایگاه برشی آنزیم‌های *NdeI* و *HindIII* ۳۶
جدول۲-۴ جایگاه برشی و نحوه تک رشته‌ای شدن انتهایی در توالی برشی *HindIII* ۳۶
جدول۲-۵ مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی.....۳۷
جدول۲-۶ دستگاه‌ها و ابزارهای استفاده شده به همراه نام شرکت و مدل بعضی از آن‌ها.....۳۹
جدول۲-۷ الیگونوکلئوتیدهای استفاده شده در آزمایش حجاری و صفار برای ساخت ژن *SmtA*.....۳۹
جدول۲-۸ ترکیبات واکنش سنتز ژن.....۳۹
جدول۲-۹ برنامه PCR جهت انجام واکنش زنجیره‌ای آنزیم Taq پلیمراز.....۴۰
جدول۲-۱۰ واکنش PCR با آنزیم Taq پلیمراز جهت تکثیر قطعه ژنی.....۴۰
جدول۲-۱۱ ساخت بافر ۱۰ X TBE ۴۲
جدول۲-۱۲ ساخت محیط کشت لوریا برتانی (LB) ۴۴
جدول ۲-۱۳ محلول شماره یک استخراج پلاسمید ۴۹
جدول۲-۱۴ محلول شماره دو استخراج پلاسمید.....۴۹
جدول ۲-۱۵ محلول شماره سه استخراج پلاسمید.....۵۰
جدول۲-۱۶ حذف پروتئین‌ها به روش فنل-کلروفرم.....۵۱

جدول۲-۱۷ روند کلی سیستم بیانی pET ۵۲
جدول۲-۱۸ ترکیبات لازم برای انجام برش آنزیمی پلاسمید T/A ۵۳
جدول۲-۱۹ ترکیبات لازم برای انجام برش آنزیمی پلاسمید pET15 ۵۳
جدول۲-۲۰ واکنش الحاق بین قطعه MT و وکتور برش یافته pET15b ۵۵
جدول۲-۲۱ بافر لیز پیشنهادی برای شکستن باکتری‌ها ۵۷
جدول۲-۲۲ ترکیبات مورد نیاز برای ساخت بافر نمونه پروتئینی ۵ X ۵۸
جدول۲-۲۳ ارتباط درصد ژل با اندازه پروتئین ۵۸
جدول۲-۲۴ ترکیبات مورد نیاز برای تهیه ۵ میلی‌لیتر ژل جداکننده ۱۲ درصد ۵۹
جدول۲-۲۵ ترکیبات مورد نیاز برای تهیه ۲ میلی‌لیتر ژل متراکم کننده در غلظت ۵%آکریل آمید ۵۹
جدول ۲-۲۶ ترکیبات بافر ژل آکریل آمید ۵۹
جدول ۳-۱ تحلیل توالی نوکلئوتیدی ژن *smtA* توسط برنامه PROTPARAM ۷۱
جدول ۴-۱ تحقیقات انجام شده بر روی بیان متالوتیونین‌ها ۷۶
جدول۴-۲ وجود کدون کمیاب agg در ژن سنتز شده ۸۰

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱ بیان زیستی متالوتیونین و جذب آلودگی‌های فلزات سنگین

- موضوع پایان نامه در مورد بیان ژن متالوتیونین[1] (ژن یک پروتئین متصل شونده به فلز) در باکتری *اشریشیا کولی*[2] برای استفاده از خاصیت جذب فلزی آن است، بنابراین لازم است در ابتدا هریک از واژه‌های بکار رفته در موضوع بحث توضیح داده شود. بررسی بر روی ژن متالوتیونین به دلیل داشتن خاصیت جذب فلز، بیشتر تحت عناوین "اصلاح زیستی" [3] و جاذب‌های زیستی[4] و انباشتگی فلزات[5] و جذب فلزی[6] و غیره مطرح است.

[1] Metallotionein
[2] *Escherichia coli*
[3] Bioremediation
[4] Bioabsorbant
[5] Metal Acumulation
[6] Metalloadsobtion

۱-۱-۱ متالوتیونین

متالوتیونین به پروتئین‌های کوچک غنی از اسیدآمینه سیستئین، متصل شونده به یون‌های فلزی گفته می‌شود، که یک خانواده پروتئینی را تشکیل می‌دهند و به طور خلاصه MT گفته می‌شود. متال (metal) به معنای فلز و پسوند تیونین (thionein) از محتوای سیستئین (Cys) آنها که دارای سولفور است، گرفته شده است.

با اینکه سیستئین اسیدآمینه اصلی برای اتصال به فلز است، برخی از اشکال متالوتیونین از سولفیدها و کلرید-های غیر آلی برای اتصال به فلز استفاده می‌کنند. در برخی از متالوتیونین‌ها (بیشتر در انواع باکتریایی) اسیدآمینه هیستیدین در اتصال به اتم روی (Zn) نقش دارد. فیتوکلاتین[1] یا PC نیز یک نوع متالوتیونین دیگر است که از واحدهای گلوتاتیون به روش آنزیمی در سلول به وجود می‌آید. PC در برخی از موجودات به همراه MTهای اصلی و در برخی به تنهایی حضور دارد و به فراوانی در گیاهان دیده می‌شوند [۳ و ۲].

۱-۱-۲ دسته بندی متالوتیونین‌ها

بعد از اینکه برای اولین بار مارگوش و والی (۱۹۵۷) یک پروتئین متصل شونده به کادمیوم که بعدها متالوتیونین نام گرفت، را از قشر کلیه اسب خالص‌سازی کردند، این پروتئین‌های جاذب فلز مورد توجه قرار گرفتند [۴].

دانشمندان کشورهای آمریکا، آلمان ، ژاپن، سوئیس و انگلستان برای سال‌ها پیرامون آن تحقیق کردند و نتایج آنها نشان داد که پروتئین MT به عنوان قوی‌ترین رباینده رادیکال‌های آزاد (یعنی با توانایی بیش از ۱۰ هزار برابر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز[2]) می‌باشد. برای اولین بار فولر و همکاران (۱۹۸۷) این پروتئین‌ها را به سه کلاس طبقه‌بندی کردند (کلاس‌های I، IIو III). کلاس I دارای همولوژی با MT اسب بود و کلاس II بدون این همولوژی و کلاس III شامل پپتیدهای غنی از سیستئین و سنتز شده آنزیمی بود، که امروزه در گروه جداگانه فیتوکلاتین‌ها قرار دارد.

حضور این پروتئین در گروه‌های رده‌بندی متنوع موجودات از پروکاریوت‌ها تا انسان مشخص شده است. با وجودی که توالی (ساختار اول) آن تشابه عمومی در جانداران نشان نمی‌دهد، ولی وجود تشابه در درون بعضی گروه‌های رده‌بندی دیده شده است [۲].

از نظر ساختار فضایی دوم نیز ناهمگون (یعنی دارای تفاوت زیاد) هستند و ساختار فضایی سوم آنها بسیار ناهمگون‌تر است. پروتئین MT در مهره‌داران و خارپوستان[3] و سخت‌پوستان[4] ساختار دو قسمتی[5] دارند و شامل دو دو دمین[6] و در نتیجه دو خوشه فلزی[7] جداگانه می‌باشد. ولی در مخمر و پروکاریوت‌ها ساختار یک بخشی[8] دارد

[1] Phitochelatin
[2] Superoxide dismutases
[3] Echinoderm
[4] Crustacean
[5] Bidominal
[6] Domain
[7] Metallic cluster
[8] Monodominal

دارد (یعنی یک دمین با یک خوشه فلزی). در مورد سایر رده‌ها نیز حدس‌هایی راجع به ساختار سوم آنها زده می‌شود ولی به طور دقیق تعیین نشده است. مثلاً در مورد نرم‌تنان و کرم‌های لوله‌ای حالت دوبخشی و در مگس سرکه حالت یک‌بخشی و در گیاهان حالت دوبخشی یا حد وسط (یعنی دو دومین که تشکیل یک خوشه فلزی[1] می‌دهد) در نظر گرفته می شود [۲].

کاگی و بینز (۲۰۰۱) توسط به کارگیری شاخص‌های رده‌بندی و نیز الگوی پراکندگی واحدهای سیستئین در طول توالی MT این پروتئین را به ۱۵ خانواده طبقه‌بندی کردند. پانزدهمین خانواده MTهای گیاهی بودند، که کوبت و گولدسبروق (۲۰۰۲) این گروه را به چهار نوع بسته به نحوه قرارگیری مناطق حاوی سیستئین و مناطق فاقد سیستئین (فاصله‌اندازها[2]) دسته‌بندی کردند [۲]. امروزه مشخص شده که این منطقه میانی در پایداری و نیز نیز تمایل به اتصال به فلز نقش دارد [۵].

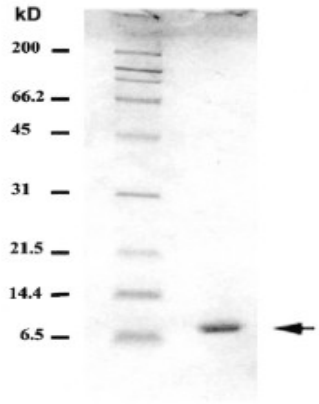
ایجاد ساختار چهارم هم در برخی موارد در این پروتئین‌ها مشاهده شده است، که احتمالاً برای برخی از فعالیت‌های فیزیولوژیک مورد نیاز می‌باشد. این ساختارها به واسطه پیوندهای دی‌سولفیدی، اتصالات فلزی یا اتصالات وابسته به فسفات‌های معدنی ایجاد می‌شوند. به عنوان مثال *smtA* در سیانوباکتری با ایجاد ساختارهای جفت که مشابه انگشت‌روی[3] است فعالیت تنظیم فلز روی[4] را انجام می‌دهد [۲].

۱-۱-۳ ویژگی‌های متالوتیونین‌ها

۱-۱-۳-۱ ویژگی‌های عمومی

خانواده پروتئینی متالوتیونین‌ها شامل پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بین ۳۵۰۰ تا ۱۴۰۰۰ دالتون هستند. به عنوان مثال پروتئین متالوتیونین با وزن بین ۶/۵ تا ۱۴ کیلودالتون در شکل زیر از دوزیستی به نام "*پلورودلز والتل*[5]" جداسازی شده و بر روی ژل الکتروفورز نمایان می‌باشد [۶].

[1] Codominal
[2] Spacer
[3] Zn Finger
[4] Zn-regulatory
[5] Pleurodeles waltl



شکل ۱-۱: ژل الکتروفورز از متالوتیونین تهیه شده از *پلورودلز والتل* [۶]. ستون سمت راست باندی در ناحیه بالای ۶/۵ کیلودالتون مربوط به متالوتیونین را نشان می‌دهد.

متالوتیونین‌ها قادر به اتصال به فلزات زیستی (روی، مس و سلنیوم) و فلزات سنگین زنوبیوتیک[۱] که در سلول-های زنده نقشی ندارند (مانند: کادمیوم، نقره، جیوه و آرسنیک) می‌باشد. این عمل به واسطه اسیدآمینه‌های Cys که ۳۰ درصد واحدهایش را تشکیل می‌دهد، انجام می‌شود. نقش این پروتئین در موجودات احتمالاً تنظیم فلزات فیزیولوژیکی و حفاظت در برابر استرس‌های اکسیدکننده می‌باشد. خیلی از میکروارگانیسم‌ها ترکیبات دارای قدرت بالای جذب فلز را ترشح می‌کنند که رُفت‌گر[۲] گفته می‌شوند. این پروتئین‌ها در خارج سلول به فلزات خاصی متصل و سپس کمپلکس حاصله به داخل سلول جذب می شود [۲].

باکتری‌هایی مثل *تیوباسیلوس فرواکسیدانس*[۳] دارای متابولیسم فلز هستند و انرژی خود را از شکستن سولفید-های فلزات به دست می‌آورند [۷].

۱-۱-۳-۲ متالوتیونین در انسان

این پروتئین در انتقال فلز Zn در درون و بین سلول‌های عصبی[۴] نقش دارد و نیز به نظر می‌رسد در تنظیم پروتئین P53 دارای نقش باشد. به علاوه اختلال عمل آن در انسان احتمالاً در ایجاد سرطان و بیماری آتیزم دخالت دارد. افزایش بیان MT ها در سرطان‌های سینه، کلون، کلیه، کبد، شش، تخمدان، پروستات، دهان و . . . دیده شده در حالی که کاهش بیان آن در کارسینوم‌های هپاتوسیت و آدنوکارسینوم‌های کبدی دیده شده است. بعلاوه احتمال داده می‌شود که یکی از عوامل افزایش مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی افزایش سطح متالوتیونین‌ها باشد [۸]. بسیاری از فلزات سنگین علائمی مشابه بیماری آتیزم[۵] را باعث می‌شوند [۵]. بعلاوه

[1] Xenobiotice
[2] Sidrophore
[3] *Tiobacillus ferrooxidans*
[4] Zinc signaling
[5] Autism

درمان با متالوتیونین‌ها برای افراد مبتلا به بیماری‌های خودایمنی مثل آماس مغز و نخاع شوکی[1] اثرات بهبودی بخشی با جلوگیری از دمیلیناسیون[2] و آسیب آکسونی و نیز افزایش سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت[3] و درنتیجه ترمیم بافتی نشان داده است [۹].

به علاوه درمان موش‌های مبتلا به آرتریت القا شونده با کلاژن[4] توسط متالوتیونین‌های نوع ۱و۲ از طریق کاهش بیان حدواسط‌های التهابی مثل TNF و سیکلو-اکسیژناز II باعث کاهش شدت بیماری می‌شود [۱۰].

واحدهای سیستئین متالوتیونین می‌تواند رادیکال‌های اکسیدکننده مضر مثل سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل را با اکسایش یافتن خود به سیستین[5] و آزادسازی یون‌های متصل به خود در محیط مهار کند [۱۱].

در سال ۱۹۸۷ دولت ژاپن MT را به عنوان یکی از ۸۶۳ پروژه استراتژیک کلیدی خود قرار داد و کشفیات زیادی در این زمینه به دست آوردند. در سال ۱۹۹۵ سازمان یونسکو[6] (سازمان آموزشی، علمی و فرهنگی سازمان ملل متحد) MT را به عنوان یکی از محصولات بیوتکنولوژیک برای عرضه به جهان پیشنهاد داد.

می‌دانیم که با افزایش سن انسان مقادیر رادیکال‌های آزاد در بدن او افزایش می‌یابد [۱۲]. شرایط غیر طبیعی نیز از جمله سیگار کشیدن، آلودگی‌ها، نور UV و داروها باعث افزایش بیشتر این رادیکال‌ها می‌شوند. افزایش این عناصر یکی از عوامل تعیین کننده پیری و بیماری‌ها است. به عبارت دیگر در پزشکی انسانی، رادیکال‌های آزاد که به عنوان فاکتور تعیین‌کننده پیری و فاکتور بیماری‌زایی شناخته می‌شوند با حضور پروتئین‌های متالوتیونین کنترل می‌شوند. دیگر عملکردهای شناخته شده این پروتئین شامل حذف سمیت فلزات سنگین، مشارکت در متابولیسم عناصر ضروری، ارتقا دادن واکنش‌های استرسی ارگانیسم‌ها، حفظ فلز روی، جلوگیری از سرطان و تشکیل تومورها می‌باشد.

پروتئین MT خیلی گران قیمت بوده و قیمت بین المللی در اوایل تولید خود ۶۶/۵ دلار آمریکا برای هر میلی‌گرم آن بود [۱۲]. شرکت تجاری Ok چین در سال ۱۹۹۷ موفق به تولید در مقیاس وسیع با خلوص ۹۵ درصد و با روند کاهشی قیمت تمام شده آن شدند و هم‌اینک کپسول‌های آن را با نام "کپسول‌های متالوتیونین S و T[7] " با خواص دارویی بسیار به بازار عرضه کرده‌اند. این کپسول در سال ۱۹۹۹ از FDA آمریکا کنترل کیفیت گرفته است.

[1] Encephalomyelitis
[2] Demyelination
[3] Oligodendrocyte precursors
[4] Collagen-induced arthritis
[5] Cystine
[6] UNESCO
[7] S&T Metallothionein Capsule

- کپسول متالوتیونین بنا به گفته شرکت تولیدکننده علاوه بر خواص فوق با افزایش دادن واکنش همولیزین آنتی‌بادی سرمی و عملکرد فاگوسیتی ماکروفاژها باعث تنظیم ایمنی بدن و با کاهش دادن کلسترول کل سرم (بیش از ۴۰ درصد) و تری‌گلیسرید سرمی (بیش از ۵۰ درصد) باعث تنظیم لیپید خون می‌شود [۱۲]. بعلاوه از طریق کاهش دادن لیپیدپروکسید (LPO) در بدن و قدرت بخشیدن به اثر حفاظتی سوپراکسید دیسموتاز باعث تاخیردادن فرایند پیری و بسیاری اثرات مفید دیگر می‌شود.

۱-۱-۳-۳ پیشینه مطالعه متالوتیونین

از مطالعاتی که پیرامون بیان ژن متالوتیونین در جانداران مختلف شده است، موارد زیر را می‌توان به عنوان نمونه ذکر کرد:

شای و همکاران (۱۹۹۲) برای اولین بار ژن *smtA* را که به تازگی جداسازی شده بود، توسط وکتور pGEX3X در باکتری *E. coli* بیان کردند و ویژگی‌های اتصال به فلز را در آن بررسی کردند [۱۳]. این وکتور قطعه گلوتاتیون-s-ترانسفراز (GST) را به ابتدای ژن متصل می‌کند.

سوسا و همکارانش (۱۹۹۸) ژن‌های ترکیبی *YMT-lamB* (متالوتیونین مخمر متصل به پروتئین غشایی باکتری *E. coli*) و *HMT-lamB* (برای منشاء انسانی) را تولید و در باکتری *E. coli* بیان کردند [۱۴]. به عنوان مارکر از حساسیت باکتری‌های حاوی هیبریدهای پروتئینی Lamb نسبت به یک یا چند فاژ مختلف استفاده شد و نیز مشخص شد که میزان جذب فلز توسط باکتری حاوی ژن *lamB153-YMT* (۱۵۳ شماره کدونی است که در ژن *lamB* برش می‌خورد و به ژن هدف متصل می‌شود) ۱۰ برابر و برای *lamB153-HMT* بیست برابر (۳۰ نانومول از کادمیوم در هر میلی‌گرم وزن خشک سلول) حالت عادی است، در حالی که این میزان برای پروتئین بیانی PolyHis به تنهایی در *E. coli* پنج برابر است.

در مطالعه‌ی دیگری موریس و همکاران (۱۹۹۹) ژن متالوتیونین از جلبک دریایی *فوکوس وسیکولوسوس*[1] جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفت و سپس توسط وکتور pET29a در *E. coli* وارد شد [۱۵]. در این آزمایش از S-tag متصل به MT برای خالص‌سازی در ستون‌های کروماتوگرافی استفاده شد و چون S-tag و MT به حرارت مقاوم بودند، توسط حرارت از پپتیدهای حساس به حرارت تشخیص داده شد. به علاوه در این آزمایش اثر توالی اتصالی[2] در متالوتیونین‌ها بر روی عملکرد این پروتئین‌ها مورد بررسی قرار گرفته است و نیز تنظیم بیان این ژن در پاسخ به مقادیر فلز مس مورد بررسی قرار گرفت.

[1] *Fucus Vesiculosus*
[2] Linker