بررسی مولکولی ساختار ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد (*Asipencer ruthenus*)طی قرارگیری در معرض فلز مس

آسیه هادیان[۱]، شهلا جمیلی[۱،۲]*، محمد پورکاظمی[۲]، 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 ساختارژن متالوتیونین در بافت کبد تاسماهی استرلیادکه 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 ساختاراصلی 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 امینه سیستئین 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: قزل آلای 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 امینه سیستئین است و در پاسخ به یون های فلزی دربدن جانداران سنتز می شودو 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 کلیه‌ی اسب جداسازی شد، در گروه پروتئین‌های داخل سلولی قرار می‌گیرد. عملکردهای بیولوژیکی متالوتیونین‌ها شامل ذخیره، حمل و نقل یا تفکیک فلزات ضروری و سمیت‌زدایی فلزات سمی می‌باشد. با توجه به اهمیت سمیت‌زدایی MTs، می‌توان این پروتئین را به عنوان زیست‌نشانگر آلودگی فلزات سمی در محیط زیست در نظر گرفت (Vardy *et al.*, 2013).

متالوتیونین ترکیب آمینو اسیدی غیر متعارفی دارد که شامل اسید امینه های آروماتیک نمی باشد و از آن مهمتر اینکه حدود یک سوم ترکیب آن شامل اسید امینه سیتئین 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 توکسیلولوژیک 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 امینو اسید می باشد. بخشی از متالوتیونین که با فلزات باند می شود شامل ۲۰ اسید امینه سیستیین می باشد که در کنار اسید امینه 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 بسترمی تواند دلایلی برای پتانسیل بالای این ماهی درتجمع زیستی آلاینده ها باشد(Kruse *et al.*, 2002).
دراین تحقیق تلاش شد تا با قرارگرفتن 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 قرارگرفتند.

نمونه برداری در بهمن ماه سال ۱۳۹۳ انجام شد. ماهی های در معرض قرار گرفته به طور تصادفی ازچاهک ها انتخاب شدند و پس از بیهوش شدن توسط میخک، بافت های کبد جداسازی شده وبه 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&Rطراحی 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 µl ۵ 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	

جدول۲: سیکل حرارتی PCR

Table 2: PCR thermal cycling

سیکل حرارتیPCR			
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 (باندهای 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 گردیدندو توالی ژن متالوتیونین به دست آمد. سکانس‌های حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Blast با توالی‌های 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 نوکلیوتیدی و توالی اسید امینه ای ژن متالوتیونین در ماهی استرلیاد برای نخستین بار در دنیا وثبت آن

گردید.همچنین نتایج به دست آمده دادکه ژن متالوتیونین درکبد ماهی های استرلیاد درمعرض قرارگرفته توسط مس نسبت به تیمار شاهد به میزان بیشتری بیان گردید.توالی نوکلیوتیدی و توالی اسید امینه ای ژن متالوتیونین در ماهی استرلیاد در شکل ۱آمده است.براساس نتایج به دست آمده وزن مولکولی این پروتئین حدود ۶۳۰۴ گرم بر مول تخمین زده شد. همچنین مشخص گردید که ساختارژن متالوتونین در تاسماهی استرلیاد شامل ۲۰ اسید امینه سیستئین است که این خصوصیت اختصاص به تمام متالوتیونین هایی دارد که تا کنون شناسایی شده اند. نتایج نشان میدهند که ناحیه کد کننده متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد شامل ۱۹۲نوکلئوتید بوده که ۶۳ اسید امینه 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 امینه ها نیز نشان داده شده اند.اسید امینه های متفاوت با حروف ایتالیک مشخص شده اند. موتیف CXXXCC که ویژه متالونیونین 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

ساختاراصلی ژن در متالوتیونین تاسماهی استرلیاد بسیار شبیه متالوتیونین در سایر ماهی ها می باشد. برای مثال وجود موتیف CXXXCC درα-domain ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد نتیجه یک جابه جایی در موقعیت نهم C در α-domain می باشدکه خصیصه ماهی ها می باشد. درحالیکه در سایرکلادها متالوتیونین شامل یک موتیف CXCC در این ناحیه می باشد.

چندین مورد درساختار پروتئین متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد گزارش شده است که آن را ازسایرگونه های ماهیان استخوانی متمایز می کند. به عنوان مثال تعداد جفت اسید امینه های سیستئین_لیزین (C_K) و یا لیزین_سیستئین (K_C) وجه تمایز متالوتیونین دربین ماهی ها و پستانداران می باشد. تعداد این جفت در متالوتیونین پستانداران ۵_۷ عدد می باشد که زیادتر 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. درحالیکه 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_۲۶و 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

استثنا ماهی قزل الای رنگین کمان (*O.mykiss*) و اتلانتیک سالمون (*S. salar*) که دارای ۶۲ اسید امینه هستند ، دارای ۶۰ اسید امینه است. درحالیکه ژن متالوتیونین در تاسماهی استرلیاد و نیز *Acipenser transmontanus* و *Acipenser fulvescens* دارای ۶۳ اسید امینه می باشد که از تمام متالوتیونین های شناسایی شده در ماهی های استخوانی طویلتر می باشد.

مقایسه توالی متالوتیونین در ماهی استرلیاد با توالی ان 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 جاییکه *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 ان متالوتیونین استرلیاد دارای آلانیین (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 امینه 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 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 نیزکلیه 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

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. *Protoscaphirhyncus squamosus*, a new sturgeon from the UpperCretaceous of Montana. J. Paleontol. 30: 1205–1208.

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

Hadian A.[1]; Jamili Sh.[1,2]*; Pourkazemi M.[2]; Mashinchian A.[1]; Yarmohammadi M.[3]

*shahlajamili45@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- Intrenational 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 mechanismfor detoxificationof metals.The Sterlet (*Acipenser ruthenus*) is a bottom-feeding sturgeon specie 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 gen that (MT) excreted from liver of Sterlet (*Acipenser ruthenus*) exposed to sub-lethal copper concentrations (0.075mgL(-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 synthetized and the MTgene 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