Journal of Police Medicine

Summer 2015; Vol. 4, No. 2: 133-140

Original Article

Design and Evaluation of Biosensor Expressing Luciferase Reporting Gene under *pbr* Promoter for the Detection of Lead

Received: 10 March 2015 **Revised:** 7 May 2015 **Accepted:** 21 May 2015

Esmail Nourmohammadi[1]
Majid Sadeghizadeh[2*]
Saman Hosseinkhani[3]
Mohamad Nourmohammadi[4]
Hoda Khoshdel Sarkarizi[5]

[1]M.Sc., Molecular Genetics, Dept. of Genetics, Faculty of Biology Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Professor, Dept. of Genetics, Faculty of Biology Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[3]Associate Professor, Dept. of biochemistry, Faculty of Biology Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[4]Ph.D Candidate, Occupational Health, Dept. of Health, Faculty of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[5]Ph.D Candidate, Anatomy Sciences, Dept. of Anatomy & Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

ABSTRACT

Background: Lead is one of the four metals that has most complication on human health. Although there has been no known vital effect for it, lead can be collected in living systems to be toxic. Lead enters the environment by different approaches. One of the methods for heavy metals impurity detection in environment is cellular biosensor. Cellular biosensor is cell containing one reporting gene under the control of promoter that is sensitive to an element (such as heavy metals). One of the important operons in Ralstonia bacterium resistance to heavy metals is *pbr*. This research was done to design biosensor containing *pbr* promoter with Luciferase reporting gene in E.coli (DH5α) as host.

Materials and Methods: The *pbr* promoter sequence with pbrR as regulator gene in 634 nucleotide size was synthesized and Luciferase reporting gene in pGL3 plasmid was located under this promoter. Then the recombinant plasmid was transferred to E.coli (DH5α). These bacteria were able to detect the lead in the environment and were used to detect different concentrations of lead in medium.

Results: The least concentration of lead that can significantly express Luciferase reporting gene was 1μM and the most concentration of it was 100μM. It seemed that the concentration above 100μM caused decrease in reporting gene expression through toxic effects on biosensor survival.

Conclusion: The results indicated that this biosensor can detect 1-100 μMol concentration of the heavy metal "Lead" in aqueous solutions.

Keywords: lead, biosensor, *pbr* promoter, luciferase

[*]**Corresponding Author:**
Majid Sadeghizadeh
Tel: (+98)2182884484
e-mail: sadeghma@modares.ac.ir

تابستان ۱۳۹۴- دوره ۴ - شماره ۲- صفحات ۱۴۰-۱۳۳

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

طراحی و بررسی زیست حسگر تشخیص‌دهنده فلز سرب مبتنی بر میزان بیان ژن گزارشگر لوسیفراز تحت پروموتر «*pbr*»

تاریخ دریافت: ۱۹ اسفند ۱۳۹۳ **تاریخ اصلاح:** ۱۷ اردیبهشت ۱۳۹۴ **تاریخ پذیرش:** ۳۱ اردیبهشت ۱۳۹۴

چکیده

مقدمه: سرب یکی از چهار فلزی است که بیشترین عوارض را بر سلامت انسان دارد. با آنکه هیچ نقش حیاتی برای آن شناخته نشده، می‌تواند در سیستم‌های زیستی آن‌قدر تجمع یابد تا به حد سمی برسد. سرب از طرق مختلف وارد محیط زیست می‌شود. یکی از روش‌های سنجش آلودگی فلزات سنگین در محیط، زیست حسگر سلولی است که سلول حاوی یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتر حساس به یک عامل (نظیر فلزات سنگین) می‌باشد. یکی از اپرون‌های مهم در مقاومت باکتری رالستونیا به فلزات سنگین، اپرون *pbr* است و هدف از این مطالعه طراحی زیست حسگر حاوی ناحیه پروموتری *pbr* به همراه ژن گزارشگر لوسیفراز می‌باشد و از باکتری E.coli سویه DH5α به‌عنوان میزبان استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: توالی پروموتری *pbr* به همراه ژن تنظیمی *pbrR* با سایز ۶۳۴ نوکلئوتید سنتز شد و ژن گزارشگر لوسیفراز در پلاسمید pGL3، تحت این ناحیه پروموتری قرار گرفت سپس پلاسمید نوترکیب به باکتری E.coli سویه DH5α منتقل شد. باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب قادر به تشخیص سرب در محیط می‌باشد و از زیست حسگر ساخته‌شده به‌منظور سنجش غلظت‌های مختلف سرب در محیط کشت استفاده گردید.

یافته‌ها: کمترین غلظت سرب که قادر است باعث بیان معنی‌دار ژن گزارشگر لوسیفراز شود، یک میکرومولار بود و حداکثر بیان ژن گزارشگر در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده گردید. به نظر می‌رسد غلظت بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار، به‌واسطه اثرات سمی بر بقای حسگر باعث کم شدن بیان ژن گزارشگر گردیده است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که این حسگر قابلیت سنجش غلظت‌های یک تا ۱۰۰ میکرومولار فلز سنگین سرب در محیط‌های آبی را دارد.

کلید واژه‌ها: سرب، حسگر زیستی، پروموتر *pbr*، لوسیفراز

اسماعیل نورمحمدی[۱]
مجید صادقی زاده[۲*]
سامان حسینخانی[۳]
محمد نورمحمدی[۴]
هدی خوشدل سرکاریزی[۵]

[۱]کارشناسی ارشد، ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۲]استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۳]دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۴]دانشجوی دکترای تخصصی، بهداشت حرفه‌ای، گروه بهداشت، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
[۵]دانشجوی دکتری تخصصی، علوم تشریح، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران.

[*]نویسنده مسئول:
مجید صادقی زاده
تلفن: ۲۱۸۲۸۸۴۴۸۴(۹۸+)
پست الکترونیک:
sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

سرب عنصری فلزی و نرم به رنگ سفید مایل به آبی و فوق‌العاده سمی است. این عنصر به‌طور طبیعی در محیط زیست وجود دارد ولی آلودگی‌های ناشی از آن در اکثر موارد حاصل فعالیت‌های بشری می‌باشد. نمک‌های سرب از راه اگزوز اتومبیل‌ها وارد محیط زیست شده؛ خاک، آب و هوا را آلوده می‌کنند. رنگ و صنایع رنگ سازی، نشت نفت، باتری‌ها و معادن، مسیر دیگری از ورود سرب به محیط

Journal of Police Medicine
Summer 2015; Vol. 4, No. 2: 133-140

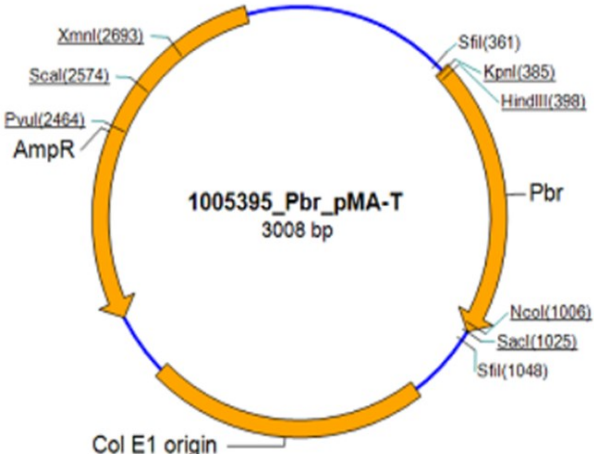
زیست جانوران و گیاهان است. یکی از مهم‌ترین دلایل ورود سرب به محیط، بی‌دقتی استفاده‌کنندگان مواد حاوی سرب است.
سرب از طریق ورود به زنجیره غذایی (تغذیه مواد غذایی حاوی این فلزات) و تنفس هوای آلوده، وارد بدن انسان و حیوان می شود. امروزه معتقدند روزانه تنها ۳۳ درصد سرب واردشده به بدن افراد شهرنشین، از طریق هواست و مصرف فرآورده‌های دریایی از قبیل ماهی و میگو راه ورودی دیگری به بدن انسان است. این عنصر در استخوان، کبد، آب‌شش، کلیه، تخمدان و به میزان کمتر در عضله ماهی تجمع می‌یابد [۱].
باآنکه هیچ نقش حیاتی برای سرب شناخته نشده، می تواند در سیستم‌های زیستی آن‌قدر تجمع یابد تا به حد سمی برسد [۲]. عوارض ورود سرب به بدن انسان، ایجاد مسمومیت حاد و مزمن است. از مهم‌ترین عوارض مسمومیت حاد، آنسفالوپاتی و ضایعات مغزی است و در اثر مسمومیت مزمن، بیماری‌هایی نظیر فلج، التهاب کلیه، کم‌خونی، بالا رفتن مقدار اسید اوریک در خون، نقرس سربی و سقط جنین بروز می‌کند [۳].
روش‌های آنالیز متداول و معایب استفاده از آن‌ها
حضور و میزان اغلب فلزات موجود در نمونه‌های محیطی می‌تواند توسط روش‌های آنالیز متداول نظیر اسپکترومتری، روش FIAAS یا متدهای الکتروشیمیایی مورد ارزیابی قرار گیرد. از معایب این روش‌ها، هضم نمونه‌های محیطی تحت درجه حرارت یا فشار بالا و شرایط اسیدی می‌باشد (که سبب آزاد شدن یون های فلزی در محلول می‌گردد) و لحاظ نشدن دسترس‌پذیری زیستی این عناصر در نمونه‌های محیطی است (زیرا مجموع مقادیر در دسترس از لحاظ زیستی و مقادیر غیرقابل‌دسترس را توأماً اندازه می‌گیرند [۴]؛ در حالیکه فقط مقداری که به لحاظ زیستی در دسترس باشد، سمیت زیستی ایجاد می‌کند [۵]). از معایب دیگر این روش‌ها، پرهزینه و زمان‌بر بودن و سختی انجام آن‌ها است.
زیست حسگر سلولی
زیست حسگر سلولی عضوی از خانواده زیست حسگرها (بیوسنسورها) است و به‌طورکلی سلول حاوی یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتر حساس به حضور یک عامل (نظیر آلوده‌کننده‌های محیطی مانند فلزات سنگین) است که قادر است در حضور این فاکتور، سیگنالی ایجاد کند که قابل شناسایی و اندازه‌گیری است. این سیگنال می‌تواند شامل تولید نور (ژن های گزارشگر فلورسنتو لومینسنت) یا سیگنال الکتروشیمیایی (ژن *lac Z* که فعالیت آن به‌صورت تغییر الکتریکی با استفاده از الکترود شناسایی می‌شود) باشد. کاربرد حسگرهای زیستی سلولی فلزات سنگین، در سنجش آلودگی فلزات سنگین، علاوه بر مزیت سنجش غلظت‌های در دسترس زیستی این عناصر، زمان و هزینه کمتری صرف کرده و آسان‌تر نیز می‌باشد.
در حسگرهای باکتریایی مخصوص فلزات، بیان ژن گزارشگر تحت کنترل واحد تنظیمی ژنتیکی (گیرنده) حساس به فلزات سنگین قرار می‌گیرد. بیشتر واحدهای تنظیمی استفاده‌شده در ساخت حسگرهای زیستی از باکتری‌هایی منشأ می‌گیرند که به‌طور طبیعی دارای سیستم‌های مقاومتی تنظیم شونده نسبت به فلزات سنگین هستند [۶].
امروزه با استفاده از پروموتر ژن‌های مقاومت به فلزات سنگین، حسگرهای بسیاری طراحی و ساخته شده و استفاده از آن‌ها به‌شدت در حال افزایش است. ازجمله پروموترهایی که در تحقیقات گذشته مورد استفاده قرار گرفته است، می‌توان به پروموتر اپرون *pbr* (که باعث مقاومت به سرب در باکتری رالستونیا متالیدورانس می شود اشاره کرد [۷]).
در بین روش‌های سنجشی مورداستفاده در تحقیقات زیستی، روش‌هایی که بر اساس نشر نور عمل می‌کنند، به‌دلیل حساسیت بالا و سهولت کاربردشان در بین محققان محبوب تر هستند. بیولومینسانس فرایندی است که طی آن، نور از یک واکنش کاتالیز آنزیمی (مثل واکنش آنزیم لوسیفراز بر لوسیفرین در کرم شب تاب) حاصل می‌شود. در این فرایند، انرژی به وسیله مولکول ساطع کننده نور جذب شده، سبب برانگیخته شدن مولکول می‌شود. زمانی که مولکول به حالت پایه یا اولیه خود برمی‌گردد انرژی اضافی به‌صورت نور خارج می‌شود. هدف از این مطالعه طراحی و ساخت حسگر زیستی بیان‌کننده ژن گزارشگر لوسیفراز تحت ناحیه پروموتری *pbr* برای تشخیص فلز سنگین سرب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

از طریق سایت NCBI توالی پلاسمید pMOL30 مشخص گردید. سپس ناحیه پروموتری همراه با ژن تنظیمی *pbr* به اندازه ۶۳۴ جفت باز مشخص شده و به‌منظور سنتز به شرکت میلژن[1] آلمان فرستاده شد. پلاسمیدی تحت عنوان 1005395_pbr_pMA-T حاوی پروموتر *pbr* و ژن تنظیم‌کننده *pbrR* به‌صورت لیوفلیزه از شرکت میلژن دریافت شد. به‌منظور اطمینان از صحت توالی سنتز شده، ناحیه پروموتری آن توالی‌یابی گردید.
pGl3-Control به‌عنوان وکتور حاوی ژن لوسیفراز و باکتری E.coli سویه DH5α به‌عنوان میزبان مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور دست‌یابی به مقدار زیادی پلاسمید، پلاسمید pMA-T به باکتری E.coli منتقل گردید. سپس با استفاده از کیت AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer) پلاسمید pMA-T استخراج شد (کمیت و کیفیت آن‌ها با روش

1: Millegen

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۲- صفحات ۱۴۰-۱۳۳

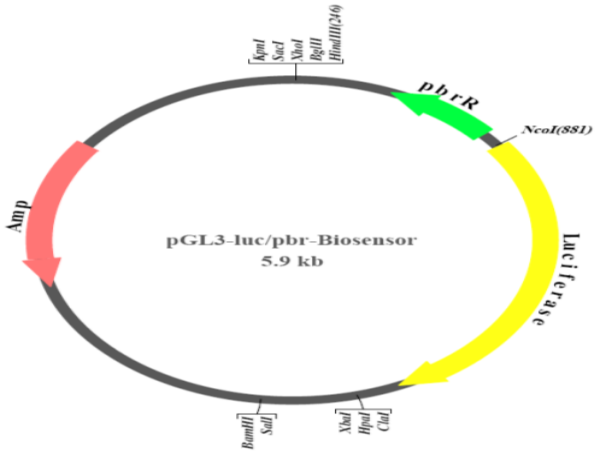


شکل ۱: پلاسمید حاوی ناحیه پروموتری pbr و ژن تنظیم کننده pbrR

اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید) سپس توسط دو آنزیم HindIII و NcoI (خریداری‌شده از شرکت فرمنتاز[1]) برش داده شده، و ناحیه پروموتری به همراه ژن تنظیم کننده از طریق ژل الکتروفورز جدا گردید و با برش pGL3 توسط دو آنزیم HindIII و NcoI واکنش الحاق توالی پروموتری *pbr* در وکتور pGL3 توسط آنزیم لیگاز (Fermentase) انجام گردید. پلاسمید نوترکیب حاصل pGL3-luc/pbr-Biosensor نام‌گذاری شد. توالی جایگاه‌های برش به نحوی طراحی شده بود که پروموتر به‌طور صحیح و در موقعیت مناسب نسبت به ژن لوسیفراز در وکتور pGL3-control قرار گیرد.

سپس پلاسمید های نوترکیب pGL3-luc/pbr-Biosensor با استفاده از مستعدسازی باکتری با روش شیمیایی کلرید کلسیم به باکتری DH5α منتقل گردیده و با استفاده از پلیت های انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین از باکتری های بدون پلاسمید متمایز گردیدند. جهت تشخیص کلنی‌های حاوی ناحیه پروموتری *pbr*، پس از استخراج پلاسمید از کلنی‌های رشد کرده، با استفاده از پرایمرهایی که برای قطعه کلون شده طراحی شده بود، PCR انجام گرفت (جدول ۱).

جهت بررسی کارایی پروموتر *pbr* سنجش آنزیمی لوسیفراز در حضور فلز سرب انجام شد که در آن ۵۰ ماکرولیتر از کشت شبانه زیست حسگر در حضور غلظت های مختلف سرب به مدت ۱۲ ساعت کشت داده شد [۱۰].



شکل ۲: پلاسمید نوترکیب (pGL3-luc/pbr-Biosensor)

پس از کشت باکتری حاوی پلاسمید pGL3-luc/pbr-Biosensor در حضور غلظت‌های مختلف سرب، با استفاده از سانتریفیوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) رسوب داده شد پس از جدا کردن محیط کشت، به پلیت حاصل بافر لیز افزوده و در شرایط دمای پایین سونیکاسیون صورت گرفت. سپس میزان بیان لوسیفراز توسط دستگاه لومینومتر (شرکت برتولد[2]) اندازه‌گیری شد.

به‌منظور دست‌یابی به زمان مناسب برای کشت زیست حسگر سلولی ساخته شده (pGL3-luc/pbr-Biosensor)، ۵۰ میکرولیتر از محصول کشت شبانه حسگر، در زمان‌های مختلف (۱۶، ۱۲ و ۸ ساعت) در حضور غلظت‌های مختلف سرب در انکوباتور با شیک ۲۵۰ قرار گرفت و میزان بیان لوسیفراز سنجیده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA و t-test) برای مقایسه میانگین‌های گروه‌های آزمایشی استفاده شد. آزمون فوق توسط برنامه نرم‌افزاری SPSS انجام پذیرفت. سپس با استفاده از اطلاعات به‌دست‌آمده از این محاسبات، کلیه نمودارهای مربوط، در برنامه نرم‌افزاری Excel رسم گردید.

یافته‌ها

به منظور شناسایی زمان مناسب برای به‌دست آوردن حداکثر بیان لوسیفراز در زیست حسگر ساخته‌شده، زیست حسگر در غلظت های متفاوت سرب در زمان‌های متفاوت کشت داده شد. نتایج سنجش

جدول ۱: پرایمرهای سنتز شده برای ناحیه پروموتری *pbr*.

ژن	پرایمر	ترادف	طول قطعهٔ حاصل
pbr	پیشرو	GCGATCTAAGTAAGCTTCGAATG	۶۳۴
	پیرو	TGGCGTCTTCCATGGCAACC	

[1]: Fermentase, [2]: Berthold

Journal of Police Medicine
Summer 2015; Vol. 4, No. 2: 133-140

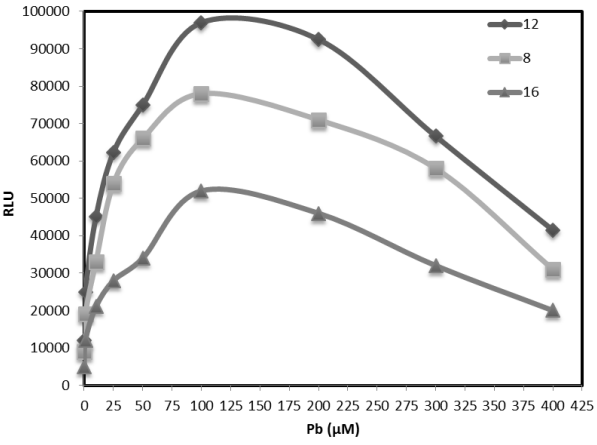
آنزیم لوسیفراز در نمودار آمده است و همان‌طور که مشاهده می‌شود، حداکثر بیان ژن لوسیفراز در زمان ۱۲ ساعت می‌باشد (نمودار ۱).
بررسی میزان بیان لوسیفراز در غلظت‌های مختلف نمک کلراید سرب (PbCl2) در عدم حضور سرب، ژن تنظیم‌کننده مانع روشن شدن پروموتر و درنتیجه بیان لوسیفراز می‌گردد و در حضور آن، سرب به پروتئین تنظیم‌کننده متصل شده، مانع اتصال آن به اپراتور می‌گردد؛ درنتیجه پروموتر فعال‌شده و لوسیفراز بیان می گردد. داده‌های به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که حداقل غلظتی که توسط این حسگر زیستی قابل‌تشخیص است یک میکرو مولار و حداکثر غلظت قابل‌تشخیص صد میکرومولار است. بعد از صد میکرومولار تا دویست میکرومولار، میزان بیان لوسیفراز با شیب کم کاهش می‌یابد و از آن به بعد به خاطر اثرات منفی سرب بر رشد و میزان حضور پلاسمید در باکتری، بیان با شیب زیاد کاهش می‌یابد. (نمودار ۲)
همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، در محدوده غلظت ۱۰۰-۱۰ میکرومولار سرب، نمودار خطی با ضریب رگرسیون بالا بوده و می‌توان با استفاده از رابطه $y = ۵۴۴/۰x + ۴۴۶۶۴$ (y میزان RLU ثبت‌شده توسط لومینومتر و x میزان سرب به میکرومولار)، در مورد غلظت‌های مجهول سرب در محیط کشت باکتری اظهار نظر نسبتاً دقیقی کرد. (نمودار ۳)

بحث و نتیجه‌گیری

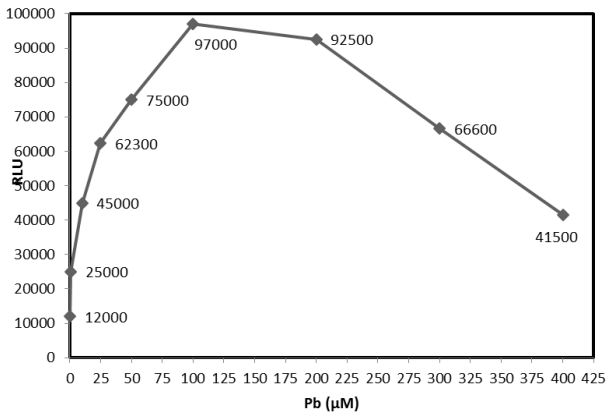
فلزات سنگین سمی‌ترین موادی هستند که محیط زیست را آلوده می‌کنند. ازآنجایی‌که این آلاینده ها زیست-تجزیه پذیر (Biodegradable) نیستند، در محیط تجمع یافته و در گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و حیوانات اثرات سمی نظیر ایجاد جهش ژنتیکی و اختلال در عملکرد آنزیم‌ها ایجاد می‌کنند [۱]؛ ازاین‌رو اندازه‌گیری غلظت آلاینده‌های مذکور در بسیاری از موارد ازجمله تصفیه خاک و آب‌های حاوی این یون‌ها و کنترل آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از این مواد، از اهمیت فراوانی برخوردار است.
کاربرد بیوسنسورها یا زیست‌حسگرهای سلولی فلزات سنگین که حاوی یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتری حساس به حضور انواع یون‌های سنگین می‌باشند، در حضور این آلاینده‌ها سیگنالی ایجاد می‌کند که قابل‌شناسایی و اندازه‌گیری است؛ درنتیجه استفاده از آن‌ها در سنجش غلظت‌های در دسترس زیستی فلزات سنگین، با صرف زمان و هزینه کمتر و نیز سهولت کاربرد حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به ساخت حسگر زیستی حاوی ناحیه‌های پروموتری *pbr* از پلاسمید pMol30 باکتری رالستونیا متالیدورانس توسط محققین دیگر، بهینه‌سازی آن با قابلیت سنجش فلز سرب در یک سیستم زیستی که در آن ژن گزارشگر لوسیفراز تحت ناحیه پروموتری *pbr* در این تحقیق موردتوجه قرار گرفت [۱۱ و ۷].

حسگر زیستی pGL3-luc/pbr-Biosensor

گونه R.mettalidurans CH34 چندین سیستم مقاومتی دارد که می‌تواند به‌وسیله آن‌ها، غلظت مواد سمی را تا غلظت غیرسمی آن‌ها کاهش دهد. یک سیستم بسیار اختصاصی برای مقاومت به سرب در پلاسمید pMOL30 شناخته شده است [۱۲]. این اپرون به‌صورت بسیار مؤثری غلظت یون سرب را کاهش می‌دهد و مجهز به مکانیسم‌های خاصی برای انتقال و جداسازی سرب است که می‌تواند به‌منظور ساخت حسگر زیستی مورد استفاده قرار گیرد. اپرون *pbr* شامل ژن‌های *pbrD*، *pbrC*، *pbrB*، *pbrA* است که در آن‌ها *pbrA* یک ATPase بوده و مسئول دفع سرب است. *pbrD* نقش چپرون را بازی کرده و در تجمع سرب در سلول نقش دارد. *pbrC* به‌عنوان یک انتقال‌دهنده کمکی عمل می‌کند و در نهایت *pbrB* در انتقال سرب از فضای پریپلاسمی به بیرون نقش دارد. دیگر عضوهای این سیستم دفع سرب، در *pbrR*، *pMOL30* و *pbrT* بوده که در یک سیستم اپرونی دیگر بیان می‌شوند و در آن‌ها *pbrR* یک ژن تنظیم‌کننده از خانواده ژن‌های تنظیم‌کننده MerR



نمودار ۱: سنجش فعالیت بیانی گزارشگر pGL3-luc/pbr-Biosensor در زمان‌های متفاوت.



نمودار ۲: بیان لوسیفراز در غلظت‌های مختلف سرب.

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۲- صفحات ۱۴۰-۱۳۳

بوده و در تنظیم بیان اپرون *pbr* نقش دارد [۷].
نشان داده شده که این واحدهای ژنتیکی در خارج از محیط ژنتیکی خود نیز فعال هستند و می‌توان آن‌ها را به ارگانیسم‌های دیگر نیز منتقل کرد [۱۱، ۹، ۷]. داده‌های به‌دست‌آمده در مورد زیست حسگر *pbr* نشان داد که کمترین غلظت سرب که باعث بیان لوسیفراز می‌گردد؛ یک میکرومولار بوده و حداکثر بیان لوسیفراز در غلظت صد میکرومولار سرب دیده می‌شود. در غلظت‌های بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرومولار کاهش بیان لوسیفراز بسیار کم است و بعد از ۲۰۰ میکرومولار، کاهش بیان شدت چشمگیری می‌یابد که به نظر می‌رسد علت آن، اثرات سمی سرب بر رشد باکتری و یا کاهش تعداد کپی‌های پلاسمید نوترکیب در باکتری باشد. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۸ توسط Chakraborty و همکارانش با استفاده از پروموتر اپرون *pbr* انجام شد، کمترین غلظت سرب که باعث بیان ژن گزارشگر می‌شود، ۵۰ میکرومولار و حداکثر آن، ۲۵۰ میکرومولار گزارش شد [۷]. در آن تحقیق از DH5α به عنوان میزبان و از ژن گزارشگر GFP بهره برده بودند. به نظر می رسد مهم‌ترین عامل در بروز تفاوت بین داده‌های به دست آمده این تحقیق و نتایج تحقیقات Chakraborty، استفاده از گزارشگرهای متفاوت باشد. لوسیفراز نسبت به GFP بسیار حساس‌تر بوده و بیان پایین آنزیم نیز قادر است سیگنال قابل‌تشخیص تولید کند. یکی دیگر از دلایل این تفاوت این است که آن‌ها بیان ژن گزارشگر را در محیط جامد سنجش کرده بودند یعنی تمام داده‌های خود را بر اساس بیان ژن گزارشگر در محیط جامد آنالیز کرده بودند درحالی‌که ما داده‌های خود را از کشت زیست حسگر در محیط کشت مایع به‌دست آورده و آنالیزها را بر اساس آن قرار داده‌ایم. با توجه به اینکه سرب در محیط جامد قابلیت تحرک چندانی ندارد ممکن است برای بیان حداکثری گزارشگر نیاز به مقدار بیشتری سرب باشد. بررسی منحنی رشد باکتری DH5α بدون پلاسمید و باکتری دارای پلاسمید نوترکیب (حسگر زیستی pGL3-luc/pbr-Biosensor) در غلظت‌های مختلف سرب نشان می‌دهد که رشد باکتری DH5α تا ۳۰۰ میکرومولار سرب به‌تدریج با شیب کم کاهش می‌یابد که این پدیده می‌تواند به علت وجود اپرون *zntA* در باکتری E.coli می‌باشد. این اپرون مسئول دفع فلزاتی همچون سرب است و تمایل به مقاومت در برابر سرب تا غلظت ۳۰۰ میکرومولار را به باکتری E.coli می‌دهد و پس ازآن کاهش رشد با شیب زیاد ادامه می‌یابد. این در حالی است که در زیست حسگر pGL3-luc/pbr-Biosensor کاهش رشد باکتری با شیب کم تا ۶۰۰ میکرومولار ادامه می‌یابد سپس با شیب زیاد کاهش می‌یابد. حاصل نتایج Chakraborty و همکارانش نشان می‌داد که رشد باکتری DH5α در ۳۵۰ میکرومولار به‌طور کامل متوقف می‌شود [۷]. درحالی‌که داده‌های ما، این نتیجه‌گیری را تأیید نمی‌کند. تفاوت نمودار رشد بین زیست حسگر و باکتری E.Coli سویه DH5α به خاطر حضور پروتئین تنظیم‌کننده *pbrR* در حسگر زیستی است. مشخص شده که این پروتئین دارای موتیف های متصل شونده به سرب است و با اتصال به سرب، از اپراتور جدا شده، ضمن آنکه به RNA پلیمراز اجازه می‌دهد تا اپرون *pbr* فعال گردد در کمک به دفع سرب و جلوگیری از برداشت سرب از محیط نیز مشارکت دارد. علت مقاومت بالای پلیمراز به سرب این است که پروتئین تنظیم‌کننده با اتصال به سرب باعث محافظت از سایر اجزای سلولی می‌گردد. با توجه به نتایج تحقیقات ما با بهینه‌سازی زیست حسگر *pbr*، می‌توان غلظت سرب را در محیط آبی اندازه‌گیری کرد. در محدوده ۱۰۰-۱۰ میکرومولار ضریب رگرسیون بسیار بالاست و نمودار به شکل خطی است. (R^2 = ۰/۹۶۰) در این محدوده می‌توان با استفاده از فرمول $y = ۵۴۴/۰x + ۴۴۶۶۴$ که در آن y میزان عدد به‌دست‌آمده توسط لومینومتر و x میزان میکرومولار سرب است، در مورد غلظت‌های مجهول سرب در محیط کشت باکتری اظهار نظر کرد و می‌توان با بهینه‌سازی این زیست حسگر و رسم منحنی های استاندارد مختلف برای محیط‌های آبی و خون و غیره در مورد میزان حضور سرب در آن‌ها اظهار نظر کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کمک‌ها و راهنمایی‌های تمام دوستان و دانشجویان در آزمایشگاه دکتر صادقی زاده، آزمایشگاه دکتر حسینخانی و نیز مرکز تحقیقات کاربردی معاونت بهداد ناجا کمال تشکر و امتنان را داریم.

منابع

1. Winder C, Stacey NH. Occupational toxicology. CRC Press 2004; 294-335.
2. Kohler S, Belkin S, Schmid RD. Reporter gene bio-assays in environmental analysis. Fresenius J Anal Chem 2000; 366:769-79.
3. Woolf AD, Goldman R, Bellinger DC. Update on the clinical management of childhood lead poisoning. Pediatr Clin North Am 2007; 54: 271-94.
4. Vreeke MS. Electrochemical biosensors for affinity assays. Part 1997; 1: 39.
5. Belkin S, Smulski DR, Dadon S, Vollmer AC, Van Dyk TK, Larossa RA. A panel of stress-responsive luminous bacteria for the detection of selected classes of toxicants. Water Res 1997; 31: 3009-16.
6. Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbiol Biot 1999; 51: 730-50.
7. Chakraborty T, Gireesh Babu P, Alam A, Chaudhari A. GFP expressing bacterial biosensor to measure lead contamination in aquatic environment. Curr Sci 2008; 94: 6-25
8. Kricka LJ, Stanley PE, Tsuji A. Bioluminescence

Journal of Police Medicine
Summer 2015; Vol. 4, No. 2: 133-140

and Chemiluminescence: Progress and Perspectives; Proceedings of The 13Th International Symposium, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan 2-6 August 2004. World Scientific 2005.
9. Hynninen A, Tonismann K, Virta M. Improving the sensitivity of bacterial bioreporters for heavy metals. Bioeng Bugs 2010; 1: 132-8.
10. Sambrook J, Russell David W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press 1989.
11. Tauriainen S, Karp M, Chang W, Virta M. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. Biosens Bioelectron 1998; 13: 931-8.
12. Mergeay M, Monchy S, Vallaeys T, Auquier V, Benotmane A, Bertin P, et al. Ralstonia metallidurans, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. FEMS Microbiol Rev 2003; 27: 385-410.

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۲- صفحات ۱۴۰-۱۳۳