

Metalotionein 1 daripada *Eleusine indica* L. Memberikan Toleransi terhadap Logam Berat dalam *Escherichia coli*

(Metallothionein 1 from *Eleusine indica* L. Confers Heavy Metal Tolerance in *Escherichia coli*)

ROOHAIDA OTHMAN* & NORUL HUDA MOHD NASIR

ABSTRAK

Metalotionein (MT) berpotensi besar dalam pemuliharaan alam sekitar disebabkan peranannya yang penting dalam metabolisme dan penyahtoksikan ion logam melalui proses pengkelatan ion logam. cDNA MT1 daripada Eleusine indica L. (eiMT1) telah diampifikasi dan diekspreskan dalam Escherichia coli. Pengekspresan protein rekombinan diaruh menggunakan 1 mM IPTG pada 37°C selama 4 jam. Protein rekombinan dengan berat molekul 12 kDa telah diperoleh dan dituliskan menggunakan dua kaedah penulenan iaitu kromatografi penukaran ion dan kromatografi penurasan gel. Analisis jujukan protein rekombinan telah mengesahkan bahawa protein eiMT yang diekspreskan mengandungi jujukan asid amino sebagaimana dijangkakan bagi protein yang dikodkan oleh cDNA eiMT1. Untuk menilai keupayaan protein eiMT ini memberikan toleransi terhadap logam berat bagi E. coli, sel bakteria yang ditransformasikan dengan plasmid yang membawa cDNA eiMT1 telah dikulturkan dalam media yang mengandungi ion tembaga (Cu), zink (Zn), besi (Fe), kromium (Cr) dan kadmium (Cd). Sel yang mengekspres eiMT didapati menunjukkan tahap pertumbuhan yang lebih tinggi berbanding sel jenis liar di dalam media yang mengandungi kesemua ion logam serta mampu bermandiri di dalam Cu, Zn, Fe dan Cr sehingga kepekatan 500 µM manakala bagi Cd sehingga kepekatan logam 400 µM. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa eiMT membolehkan peningkatan toleransi sel E. coli terhadap logam berat dan memainkan peranan penting dalam menyingkirkan ion logam berlebihan. Hal ini mencadangkan bahawa eiMT juga kemungkinan mampu melakukan penyahtoksikan ion logam berlebihan dalam E. indica. Oleh itu, sel E. coli yang membawa cDNA eiMT di samping tumbuhan E. indica sendiri boleh diaplikasikan dalam proses remediasi dengan menyerap logam berat dalam persekitaran yang tercemar.

Kata kunci: *Eleusine indica* L.; logam berat; metalotionein; protein rekombinan; rumput sambau

ABSTRACT

Metallothionein (MT) has a huge potential in environmental conservation due to its important role in metal ion metabolism and detoxification by chelating the metal ions. MT1 cDNA from Eleusine indica L. (eiMT1) was amplified and expressed in Escherichia coli cells. Recombinant protein expression was induced using 1 mM IPTG at 37°C for 4 h. Recombinant protein with the molecular mass of 12 kDa was obtained and purified through two purification methods involving ion exchange chromatography and gel filtration chromatography. Sequence analysis of the recombinant protein confirmed that the expressed eiMT protein contained amino acid sequence as expected for the protein encoded by the eiMT1 cDNA. To evaluate the ability of this eiMT protein to confer heavy metal tolerance in E. coli, the bacterial cells transformed with the recombinant plasmids containing the eiMT1 cDNA were grown in media containing copper (Cu), zinc (Zn), iron (Fe), chromium (Cr) and cadmium (Cd) ions. The eiMT-expressing cells showed higher growth level compared to wild type cells in media containing all metal ions and was able to survive in Cu, Zn, Fe and Cr until 500 µM in concentration while for Cd until 400 µM. These results showed that eiMT allowed enhanced heavy metal tolerance in E. coli cells and played an important role in removing excess metal ions. This suggested that the eiMT protein might also be capable of detoxifying metal ions in E. indica. Hence, both the E. coli cells containing the eiMT cDNA as well as the E. indica plant itself may be applied in remediation process by adsorbing heavy metals in polluted environment.

Keywords: *Eleusine indica* L.; goose grass; heavy metal; metallothionein; recombinant protein

PENGENALAN

Sisa logam berat terutama plumbum (Pb), kromium (Cr) dan arsenik (As) merupakan bahan pencemar yang semakin meningkat kepekataannya dalam alam sekitar berpunca daripada aktiviti antropogenik seperti perkilangan, pertanian, perlombongan, kumbahan dan penggunaan

kenderaan bermotor telah banyak dilaporkan di seluruh dunia (Ali et al. 2019; Tchounwou et al. 2012) termasuklah di Malaysia (Salam et al. 2019; Shazili et al. 2006). Kajian akuatik di perairan laut Semenanjung Malaysia mendapati bahawa kuprum (Cu) merupakan bahan paling bertoksik terhadap hidupan air dan tanah diikuti kadmium (Cd),

mangan (Mn) dan aluminium (Al) (Shuhaimi-Othman et al. 2013). Lantaran pencemaran ekosistem yang berlaku dan semakin pesat, Pertubuhan Bangsa-bangsa Bersatu (WHO) telah mewartakan rang undang-undang sedunia mengenai kepekatan maksimum bagi logam berat berbahaya khususnya Cd, Pb dan merkuri (Hg) dalam aktiviti perindustrian dan pertanian (Pascal et al. 2013). Bagi mengatasi masalah pencemaran ini, aktiviti pemuliharaan alam sekitar dijalankan menerusi tindak balas penyerapan agen ekstraksi terhadap logam berat termasuk pendekatan fitoremediasi iaitu menggunakan tumbuhan hiperpengumpul yang dapat mengumpul logam pada kepekatan yang tinggi (Eapan & D'Souza 2005; Kozminska et al. 2018). *Eleusine indica* (L) Gaertn. atau lebih dikenali sebagai rumput sambau atau 'goose grass' merupakan sejenis tumbuhan hiperpengumpul yang didapati tumbuh melata di negara tropika dan subtropika (Holm et al. 1977; Lee & Ngim 2000). Kerintangan rumput sambau terhadap logam berat dipercayai disebabkan oleh kehadiran metalotionein (MT) yang berupaya mengumpul dan menyimpan logam berat pada kepekatan yang tinggi dalam akar dan daun (Mishra & Dubey 2006) tanpa memberikan kesan sampingan terhadap tumbesaran dan pembiakannya (Mahajan & Kaushal 2018; Pilon-Smits 2005). Selain rumput sambau *E. indica*, MT juga hadir dalam pelbagai jenis organisma termasuk bakteria, fungi, tumbuhan dan haiwan (Blindauer 2011; Ziller & Fraissinet-Tachet 2018). MT merupakan protein kaya asid amino sistein (30% daripada keseluruhan residu asid aminonya) dengan berat molekul yang rendah iaitu kurang daripada 7 kDa (Eapan & D'Souza 2005; Vasak 2005). Terdapat empat kelas protein MT iaitu MT1, MT2, MT3 dan MT4 berdasarkan motif sistein pada kawasan terminal-amino (terminal-N) dan terminal-karboksi (terminal-C) (Freisinger 2011; Leszczyszyn et al. 2013). MT1, MT2 dan MT3 mempunyai dua domain pada terminal-N dan -C yang kaya dengan residu sistein dan dipisahkan oleh kawasan tengah yang mengandungi 40 asid amino dengan masing-masing mempunyai motif berulang yang berbeza. Manakala MT4 pula berbeza daripada MT lain kerana ia mempunyai tiga domain kaya-sistein yang dipisahkan oleh 10 hingga 15 residu asid amino (Freisinger 2011; Nezhad et al. 2013). Selain daripada itu, MT1 dan MT2 adalah produk gen secara langsung manakala MT3 yang dikenali sebagai fitokelatin merupakan produk tindak balas enzim fitokelatin sintase terhadap substratnya, glutation (Cobbett 2000).

Kandungan residu asid amino sistein yang tinggi membolehkan MT mengikat banyak ion logam dengan membentuk kumpulan logam-tiolat pada terminal-N dan -C melalui pembentukan ikatan ionik antara kumpulan tiol dalam sistein dengan ion logam (Tarasava et al. 2016; Vasak 2005). Oleh itu, kumpulan tiol dalam sistein adalah bebas dan tidak membentuk ikatan dwisulfida (Tarasava et al. 2016). Pengikatan MT dengan logam berat seperti zink (Zn), Cu dan Cd didapati penting untuk memudahkan

penglipatan protein supaya ia lebih padat yang menyebabkan konformasi protein menjadi lebih stabil (Tarasava et al. 2016). MT memainkan peranan penting dalam homeostasis unsur perlu seperti Zn dan Cu serta dalam penyahtoksikan unsur tak perlu seperti kadmium (Cd) dan merkuri (Hg) disebabkan oleh bilangan residu sisteina yang banyak dalam protein ini (Krezel & Maret 2017). MT dipercayai mengambil bahagian dalam metabolisme dan penyahtoksikan logam dengan cara pengkelatan ion logam berat, seterusnya menghalang ion logam tersebut daripada berinteraksi dengan ligan intrasel seperti metalloprotein (Cobbett & Goldsbrough 2002).

Keupayaan MT melakukan penyahtoksikan logam telah diaplikasikan dalam penggunaannya sebagai biopenanda tahap pencemaran dalam haiwan seperti kepah laut dan burung *great tits* (*Parus major*) yang masing-masing digunakan secara meluas sebagai penunjuk pencemaran logam dalam ekosistem marin dan terestrial (Amiard et al. 2006; Vanparys et al. 2008). Dalam burung *great tits*, kepekatan MT dalam hepar dan ginjal didapati berkorelasi dengan tahap Cd (Vanparys et al. 2008) manakala dua gen yang mengekodkan MT didapati diekspres lebih tinggi secara signifikan dalam ginjal burung tersebut dari kawasan bandar berbanding pedalaman (Watson et al. 2017). MT tumbuhan juga berpotensi diaplikasikan bagi meningkatkan keupayaan tumbuhan untuk hidup dalam habitat yang mengalami pencemaran logam berat seperti padi transgenik (*Oryza sativa*) yang berjaya menyingkirkan Cu dan Cd daripada tisu akarnya melalui peningkatan aktiviti enzim antioksidan secara signifikan (Yang et al. 2009). Selain daripada itu, sel *E. coli* yang mengekspreskan MT1 *O. sativa* menunjukkan peningkatan toleransi terhadap ion nikel, Cd dan Zn serta mampu mengumpul lebih banyak ion logam berbanding sel jenis liar (Nezhad et al. 2013) manakala *Arabidopsis* transgenik yang mengekspreskan MT1 daripada *Cajanus cajan* didapati bermandiri dengan kandungan ion Cu dan Cd yang tinggi dalam akar (Sekhar et al. 2011).

Dalam kajian lepas, cDNA putatif MT1 daripada *E. indica*, *eiMT1*, telah berjaya dipencilkan dan dicirikan. Gen ini mempunyai jujukan asid amino yang sepadan dengan MT kelas I *Allium sativum*, *Cynodon dactylon* dan *O. sativa* (Nik Marzuki et al. 2006). Tumbuhan tembakau transgen yang membawa gen *eiMT1* juga telah dihasilkan bagi mengenal pasti fungsi gen ini (Nik Marzuki et al. 2010). Bagi mengenal pasti fungsi sebenar MT1 *E. indica*, pengekspresan protein rekombinan bagi gen ini telah dijalankan. Keupayaan toleransi protein *eiMT1* terhadap ion logam termasuk logam berat turut dijalankan dengan menumbuhkan sel *E. coli* yang mengekspres *eiMT1* di dalam media yang mengandungi ion logam pada kepekatan yang berbeza. Kajian ini akan membantu untuk menjelaskan ciri dan fungsi *eiMT1* *E. indica* serta menunjukkan nilai potensinya dalam merawat pencemaran logam berat.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGLONAN CDNA *EIMT1* KE DALAM VEKTOR PENGEKSPRESAN

cDNA *eiMT1* telah diamplifikasikan daripada klon pPCR-Blunt II-TOPO-*eiMT1* menggunakan GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega, USA) dengan pencetus FeiMT1 5' ACG GTC CAT ATG TCT TGC AGC TGC GGA TCA 3' dan ReiMT1 5' GTC GAC TTA GCA GTT GCA GTT GCA GGG GTT GCA CTT 3' yang masing-masing mengandungi tapak penyekatan bagi enzim *NdeI* dan *Sall*. Produk tindak balas rantai polimerase (PCR) dituliskan daripada gel menggunakan kit pengekstrakan gel (Qiagen, USA) dan kemudiannya diklonkan ke dalam vektor pengklonan pGEM-T menggunakan sistem pGEM-T Easy vector PCR Product Cloning Kit (Promega, USA). Klon rekombinan yang terhasil, pGEM-T-*eiMT1*, seterusnya dicernakan menggunakan enzim penyekat *NdeI* dan *Sall*. Fragmen DNA selitan *eiMT1* dituliskan dan diligasi ke dalam tapak penyekatan *NdeI* dan *Sall* dalam vektor pengekspresan pET28b(+) (Novagen, Jerman) lalu menghasilkan klon rekombinan yang dipanggil pET-*eiMT1*. Konstruk rekombinan ini dijangka mengekodkan protein lakuran dengan berat molekul 12 kDa yang terdiri daripada protein *eiMT1* bersaiz 6 kDa dan 6 kDa tag-pohistidina, telah ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* strain BL21(DE3) untuk pengekspresan protein rekombinan lakuran.

PENGEKSPRESAN DAN PENULENAN PROTEIN REKOMBINAN EIMT1

Transforman pET-*eiMT1* telah ditumbuhkan pada 37°C dalam media Luria Bertani (LB) sehingga OD₆₀₀ mencapai 0.6 lalu diaruh dengan penambahan isopropiltio-b-D galaktosida (IPTG) pada kepekatan akhir 1 mM. Selepas 4 jam eraman, kultur bakteria dituai melalui pengemparan pada 4000 × g selama 10 minit pada 4°C. Pelet diampai dengan 1 mL penimbal fosfat 1X yang mengandungi garam *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) dan dilisis secara sonikasi menggunakan mesin Vibracell (Sonic and Materials, USA) selama 10 saat pada frekuensi 50 Hz di atas ais dan tiub dibiarkan dalam ais selama 5 minit. Lisis sel ini diulangi sebanyak lima kali diikuti oleh pengemparan pada kelajuan 20,000 × g selama 40 minit. Selepas pengemparan, fraksi supernatan yang mengandungi protein terekspres yang terlarut disimpan pada -20°C untuk pencirian protein yang diminati. Pelet yang mengandungi protein terekspres yang tidak terlarut diampai dengan 500 µL 6X penimbal sampel protein lalu disimpan pada -20°C. Pengekspresan protein rekombinan secara skala besar dilakukan dengan menggunakan 1000 mL medium. Penulenan protein lakuran dilakukan menggunakan resin Ni-NTA dalam kit Qiaexpressionist™ (Qiagen, Jerman) berdasarkan panduan pengeluar. Protein rekombinan sasaran dielut daripada turus menggunakan penimbal yang mengandungi 6 M urea. Seterusnya, protein rekombinan ternyahasli yang terelut ini dituliskan melalui turus

pertukaran anion 1 mL 15S Q-Sepharose menggunakan AKTAprime plus (GE Healthcare, UK) lalu dipekatkan menggunakan turus Amicon Ultra (Milipore, Ireland) bersaiz 3 kDa melalui pengemparan pada 4000 g selama 30 minit pada 4°C. Supernatan yang terkumpul (1 mL) kemudiannya dituliskan melalui turus penurasan gel (1.6 × 60 cm) Superdex™ 200 10/300 GL (Amersham Biosciences, UK) menggunakan AKTApurifier (GE Healthcare, UK). Fraksi protein yang terkumpul kemudiannya dipekatkan dan dianalisis menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida-SDS (SDS-PAGE) 12.5% (w/v) berdasarkan kaedah Laemmli (1970).

PENENTUAN JUJUKAN PROTEIN REKOMBINAN

Pengenalpastian dan analisis protein rekombinan tertulen dilakukan melalui kaedah pencapjarian jisim peptida menggunakan spektrometri jisim MALDI-TOF/TOF (MALDI-TOF/TOF-MS/MS). Protein rekombinan tertulen telah dilakukan pencernaan tripsin dalam-larutan (Shevchenko et al. 2007) dan seterusnya dihantar kepada perkhidmatan MALDI-TOF/TOF-MS/MS di National University of Singapore (NUS). Profil jisim peptida telah dianalisis menggunakan perisian carian Mascot (Matrix Science, USA, <http://www.matrixscience.com>) untuk memadankan data dengan maklumat dalam pangkalan data. Penjajaran jujukan protein telah dilakukan menggunakan program *Multiple Sequence Alignment* menerusi perisian Clustal Omega. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Jujukan peptida pula telah dibandingkan dengan pangkalan data *NCBI non-redundant* (nr) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

PENGASAIAAN KERINTANGAN KLON REKOMBINAN PET-EIMT1 TERHADAP ION LOGAM

Kemandirian sel *E. coli* rekombinan terhadap logam berat terpilih telah dilakukan berdasarkan protokol Moreau et al. (2008) dengan sedikit modifikasi. Kultur semalaman sebanyak 10 µL (10⁻¹ pencairan) bagi sel *E. coli* BL21(DE3) yang membawa plasmid rekombinan pET-*eiMT1* disebar di atas piring agar LB yang mengandungi antibiotik kanamisin (50 µg/mL) dan 0.5 mM IPTG. Piring LB agar ini juga mengandungi logam berat (Cu, Zn, Cd, Fe dan Cr) pada kepekatan 100, 200, 300, 400, 500 atau 600 µM. Piring-piring ini kemudiannya dieram pada 37°C selama 16 jam. Koloni tunggal yang tumbuh di atas agar seterusnya dianalisis bagi menentukan kerintangan klon rekombinan kepada setiap logam berat. Manakala sel kawalan adalah sel *E. coli* yang membawa vektor pengekspresan pET28b(+).

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

PENGEKSPRESAN PROTEIN REKOMBINAN EIMT1

Protein rekombinan metalotionein I *E. indica* (*eiMT1*) telah berjaya diekspreskan menggunakan vektor pET28b(+) dalam *E. coli* BL21 (DE3) pada 37°C (Rajah 1). Jalur yang

mewakili protein bersaiz lebih kurang 12 kDa dijangka mewakili protein rekombinan eiMT berdasarkan bilangan asid amino yang dikodkan oleh *eiMT1*. Protein rekombinan eiMT1 didapati diekspreskan sebagai fraksi larut iaitu di dalam supernatan (Rajah 1, lajur 4). Kajian lepas menunjukkan beberapa protein rekombinan yang dihasilkan menggunakan vektor pengekspresan siri pET telah berjaya diekspreskan pada 37°C seperti MT1 daripada tumbuhan toleran-kuprum *Elsholtzia haichowensis* (EhMT1) (Xia et al. 2012) dan daripada *O. sativa* (OsMT1-1b) (Nezhad et al. 2013). Selain itu, protein rekombinan MT2 daripada makroalga, *Fucus vesiculosus* juga telah dihasilkan menggunakan vektor dan suhu pengekspresan yang sama (Morris et al. 1999). eiMT1 mengandungi tag-pohistidina pada terminal-N untuk memudahkan penulenan protein rekombinan menggunakan kromatografi pegun afiniti logam (Ni-NTA).

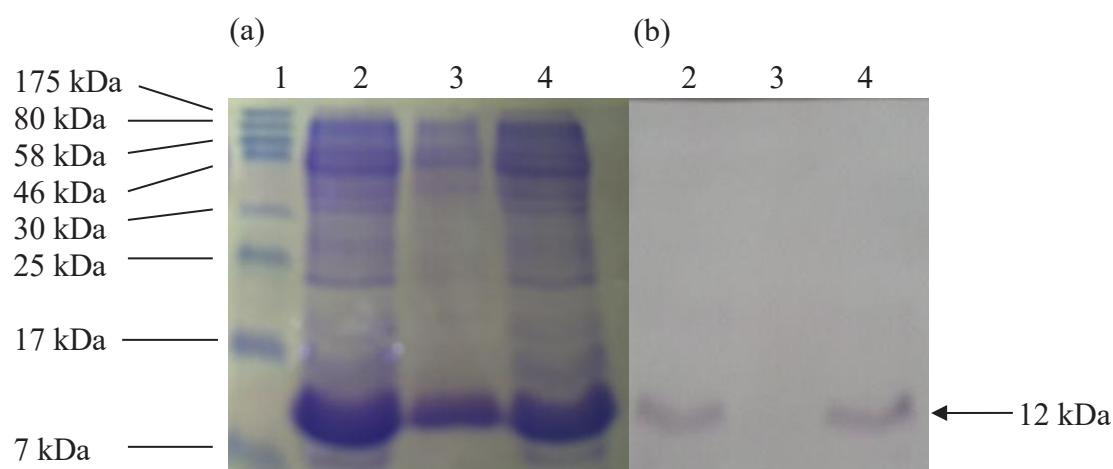
PENULENAN PROTEIN REKOMBINAN EIMT1

Penulenan protein melalui kromatografi afiniti Ni-NTA dilakukan dengan menggunakan protein rekombinan eiMT1 yang telah ternyahasli untuk memastikan tag polihistidina yang terlakur pada protein rekombinan terdedah keluar dan membolehkannya mengikat resin agaros pengkelat logam Ni-NTA (Rajah 2). Penyahaslian protein rekombinan berlaku semasa kromatografi keafinitian Ni-NTA melalui penggunaan penimbal yang mengandungi urea. Kehadiran urea menyebabkan konformasi protein terganggu dengan melemahkan interaksi hidrofobik lalu meleraikan lipatan protein seterusnya mendedahkan tag polihistidina keluar dan membolehkannya melekat pada resin Ni-NTA (Bennion & Daggett 2003). Protein rekombinan eiMT1 berjaya dielut keluar dan kemudiannya ditulenan menggunakan kromatografi penukaran anion (IEX) melalui resin 15S Q-Sepharose lalu dielut keluar pada kepekatan NaCl 320 mM (Rajah 2). Beberapa fraksi semasa proses pembasuhan,

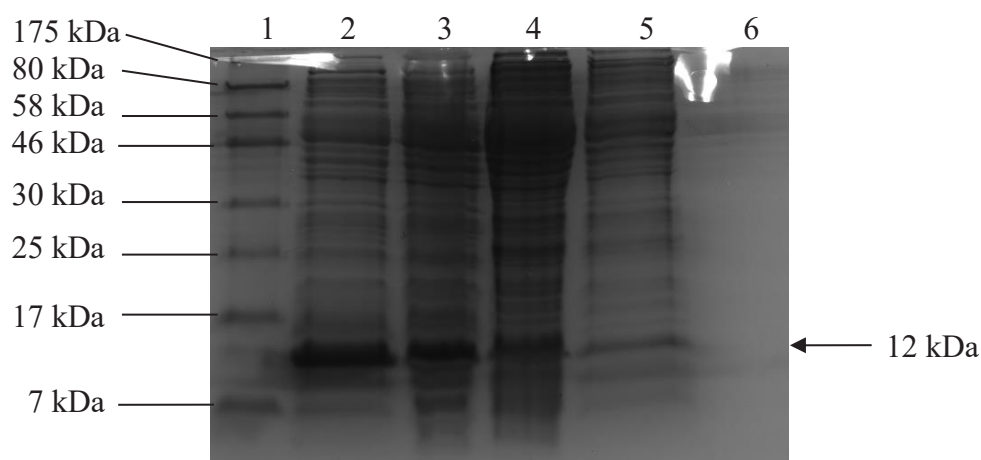
pengikatan dan pengelutan telah dianalisis menggunakan SDS-PAGE yang menunjukkan bahawa protein rekombinan telah ditulenan secara separa (Rajah 3). Dalam kajian lepas, kromatografi IEX telah digunakan untuk menulenan protein MT Kelas I daripada kerang *Ruditapes decussatus* (Simes et al. 2003) dan MT kelas II daripada makroalga, *Fucus vesiculosus* (Morris et al. 1999). Seterusnya, langkah penulenan tambahan telah dilakukan menerusi kromatografi penurasan gel Superdex 200 yang berjaya mengelut keluar protein rekombinan eiMT1 menggunakan 150 mM NaCl. Analisis SDS-PAGE menunjukkan eiMT1 rekombinan berjaya ditulenan yang diwakili oleh jalur tunggal sekitar 12 kDa (Rajah 3).

ANALISIS JUJUKAN PROTEIN REKOMBINAN

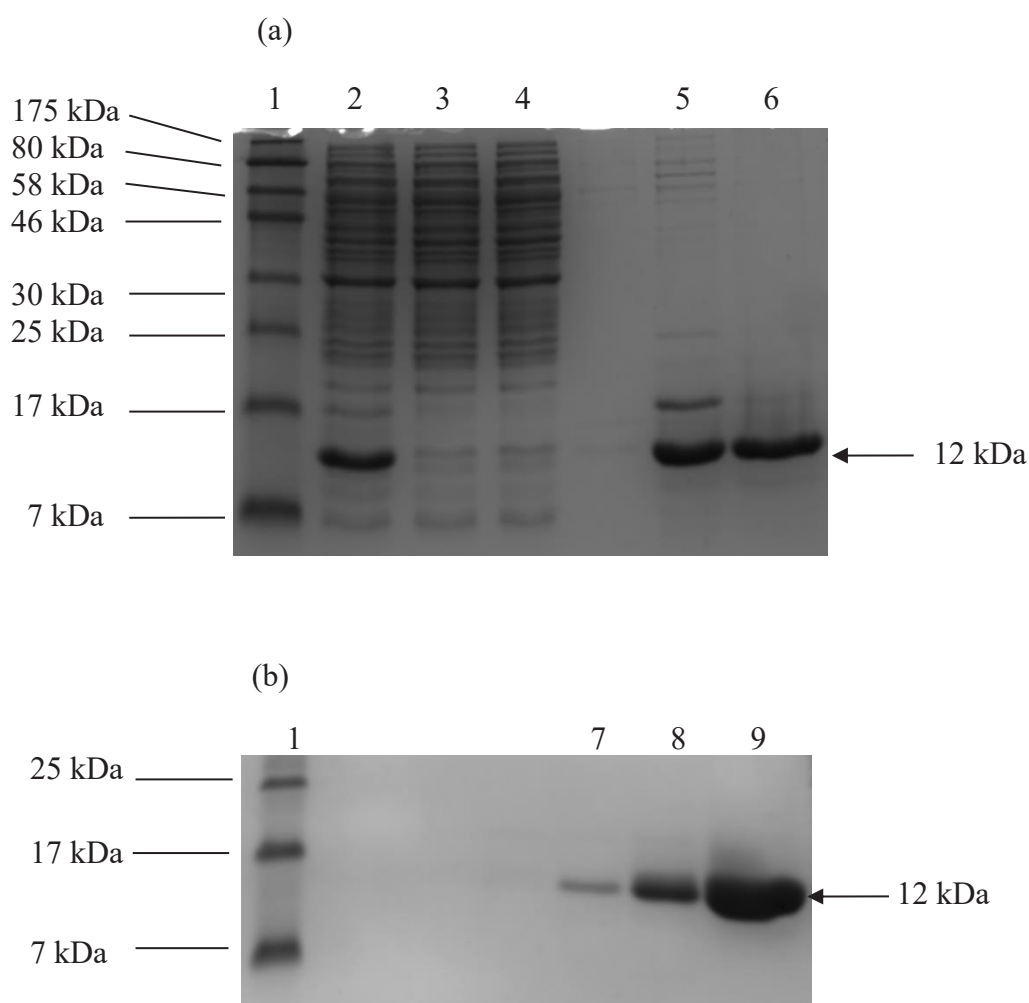
Hasil spektrum jisim MALDI-TOF/TOF-MS/MS bagi eiMT1 memberikan lima jujukan peptida (Jadual 1). Penjajaran jujukan lima peptida ini dengan jujukan asid amino yang dikodkan oleh cDNA eiMT1 menggunakan perisian Clustal Omega menunjukkan pertindihan 100% antara kesemua jujukan tersebut (Rajah 4). Hasil ini mengesahkan identiti protein rekombinan yang telah diekspreskan dan ditulenan iaitu kemungkinan besar protein rekombinan eiMT1. Analisis blastX yang dilakukan bagi setiap peptida secara berasingan menunjukkan jujukan peptida A mempunyai persamaan 100% dengan kawasan terpulihara cDNA eiMT1 (AAY85354) dan cDNA kelas I MT *Allium sativum* (GI22651401). Peptida B pula didapati mempunyai persamaan sebanyak 88% dengan kawasan terpulihara MT1 sementara peptida yang lain iaitu peptida C mempunyai 6% persamaan, peptida D mempunyai 16% persamaan dan peptida E mempunyai 57% persamaan. Kesemua peptida mengandungi kawasan terpulihara MT yang diwakili oleh residu asid amino yang ditandakan merah (Rajah 4). Peptida A, D dan E adalah bahagian tengah gen MT1 yang tidak mengandungi asid amino sistein serta memisahkan terminal-N dan terminal-C yang



RAJAH 1. SDS-PAGE (15%) (a) dan pemblotan western (b) menunjukkan sel BL21(DE3) mengandungi pET-*eiMT1* yang diaruh menggunakan 1 mM IPTG pada 37. Lajur 1: Penanda protein (Biolabs). Lajur 2: Ekstrak kasar sel diaruh dengan IPTG; Lajur 3: fraksi tidak larut dalam pelet; Lajur 4: fraksi larut dalam supernatan



RAJAH 2. Analisis SDS-PAGE (15%) menunjukkan eiMT1 rekombinan yang dituliskan menggunakan kromatografi keafinitian Ni-NTA. Lajur 1: Penanda protein piawai berjulat lebar (Biolabs). Lajur 2: Ekstrak kasar eiMT1 rekombinan sebelum kromatografi; Lajur 3: Sampel protein basuhan fraksi 4; Lajur 4: Sampel protein basuhan fraksi 5; Lajur 5: Sampel protein terelut fraksi 13; Lajur 6: Sampel protein terelut fraksi 14



RAJAH 3. SDS-PAGE 15% menunjukkan eiMT1 rekombinan yang telah dituliskan menggunakan kromatografi penukaran ion (IEX) (a) diikuti dengan kromatografi penurasan gel Superdex 200 (b). Lajur 1: Penanda protein piawai berjulat lebar (Biolabs); Lajur 2: Ekstrak kasar protein rekombinan eiMT1; Lajur 3, 4, 5 dan 6: Hasil penulenan dari IEX fraksi elutan 4, 5, 14 dan 15. Lorong 7, 8 dan 9: Hasil penurasan gel fraksi 19, 20 dan 21

kaya dengan residu sistein manakala peptida B merupakan sebahagian daripada terminal-C yang mengandungi residu sistein (Freisinger 2011; Leszczyszyn et al. 2013).

KERINTANGAN SEL *E. COLI* REKOMBINAN TERHADAP ION LOGAM

Sel *E. coli* rekombinan yang membawa plasmid pET-eiMT1 telah dianalisis untuk menilai keupayaannya bermandiri dalam media yang mengandungi ion logam. Kemandirian sel kawalan iaitu *E. coli* yang hanya membawa vektor pengkespresan pET28b adalah sangat rendah dalam kesemua ion logam dan dalam kepekatan ion logam yang meningkat, sel jenis liar menunjukkan pola pertumbuhan yang malar dalam ion logam perlu (Cu, Zn dan Fe) serta pola penurunan pertumbuhan dalam ion logam tidak perlu (Cr dan Cd). Pertumbuhan sel kawalan didapati tidak melebihi 20±3 CFU setiap piring ($\times 10^3$) dan direncat dengan pertambahan ion Cu, Zn dan Cr apabila kepekatan ion logam pada 500 μM (Rajah 5(a), 5(b) dan 5(e)) dan 600 μM bagi Fe (Rajah 5(d)) manakala bagi Cd pada kepekatan yang lebih rendah iaitu pada 300 μM (Rajah 5(c)). Ketoksikan Cd tersebut juga hanya mampu diatasi oleh sel kawalan *E. coli* pada kepekatan yang jauh lebih rendah berbanding ion logam lain sejajar dengan kajian lepas yang menunjukkan perencatan pertumbuhan sel *E. coli* K-12 MG1655 sebanyak 50% pada 0.3 mM Cd dan terencat sepenuhnya pada kepekatan 0.6 mM (Hossain et al. 2012). Corak pertumbuhan malar sel kawalan yang ditunjukkan dalam ion logam perlu iaitu Cu, Zn dan Fe menunjukkan bahawa terdapat mekanisme bagi menangani

peningkatan tahap ion dalam sel yang mungkin melibatkan pengikatan pada metaloprotein seperti metalochaperon diikuti dengan efluks melalui pelbagai protein pengangkut pada membran sel (Blindauer 2011). Bagi Fe pula, terdapat protein penyimpan besi dalam sel iaitu ferritin dan bakterioferitin yang mengubah ion Fe kepada bentuk yang tidak toksik dan boleh disimpan di dalam sel (Honarmand Ebrahimi et al. 2015). Langkah tambahan ini berkemungkinan menerangkan keupayaan sel kawalan untuk mandiri pada kepekatan ion Fe yang lebih tinggi berbanding ion lain. Pola pertumbuhan yang menurun bagi sel kawalan apabila dirawat dengan Cr dan Cd menunjukkan ketiadaan mekanisme dalam sel untuk menyahtoksikkan kedua-dua ion dan menyebabkan sel mati (Foster & Robinson 2011).

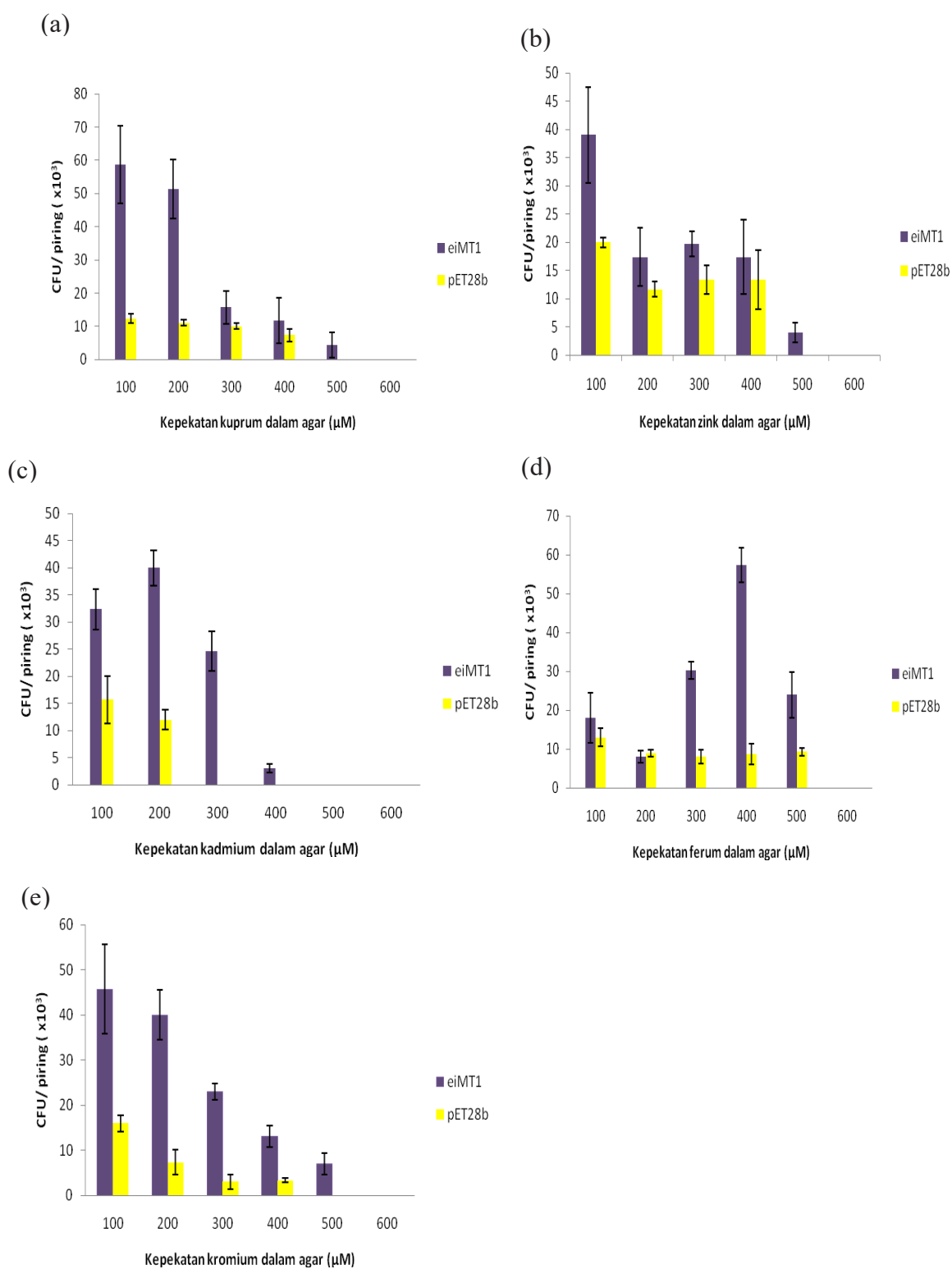
Pertumbuhan sel yang mengekspreskan eiMT1 dalam Cu, Zn, Cd dan Cr didapati menurun dengan peningkatan kepekatan ion logam manakala pertumbuhannya dalam Fe meningkat dengan bertambahnya kepekatan sehingga mencapai tahap maksimum dan seterusnya menurun. Sel tersebut berjaya tumbuh di atas piring agar yang mengandungi Cu, Zn, Fe dan Cr sehingga 500 μM (Rajah 5(a), 5(b), 5(d) dan 5(e)). Bagi kultur yang mengandungi Cd, sel *E. coli* yang mengekspreskan eiMT1 dapat bermandiri sehingga kepekatan ion logam pada 400 μM walaupun diketahui bahawa Cd merupakan logam yang sangat toksik bagi manusia, haiwan dan bakteria berbanding logam yang lain (Rajah 5(c)) (Begg et al. 2015). Sel *E. coli* rekombinan mencapai tahap pertumbuhan paling tinggi pada 100 μM dalam kehadiran Cu ($58 \pm 9 \times 10^3$ CFU),

JADUAL 1. Hasil spektrum jisim MALDI-TOF/TOF-MS/MS bagi protein rekombinan eiMT1

No. Peptida	Posisi	Jujukan peptida	Jisim
Peptida A	40-56	STGAQATVVLGVAPPEQK	1655.8962
Peptida B	61-78	AATSGETAHGCGCGSSNP	1628.6895
Peptida C	14-30	GSTVHMSSGSSNCGSSK	1612.6690
Peptida D	1-13	HHHHHHSSGLVPR	1537.7631
Peptida E	33-39	MPDLEEK	861.4022

Peptida A	-----STGAQATVVLGVAPPEQK-----
Peptida B	-----AATSGETAHGCGCGSSNP-----
Peptida C	-----GSTVHMSSGSSNCGSSK-----
Peptida D	-----HHHHHHSSGLVPR-----
Peptida E	-----MPDLEEK-----
eiMT1	SCSCGSSNCGSSCKGKMKJYDLEEKSTGAQATVVLGVAPPEQKLFKAATESGETAHGCGCGSSCKNPNCC

RAJAH 4. Penjajaran jujukan peptida protein rekombinan eiMT1 dengan jujukan asid amino eiMT1 menggunakan perisian Clustal Omega. Residu yang diwarnakan merah merupakan residu yang terpulihara



RAJAH 5. Hasil ujian kerintangan eiMT1 terhadap media pertumbuhan yang mengandungi logam Cu (a), Zn (b), Cd (c), Fe (d) dan Cr (e). Data adalah \pm S.E bagi tiga replikat

Zn ($39 \pm 9 \times 10^3$ CFU) dan Cr ($32 \pm 5 \times 10^3$ CFU) sementara pertumbuhan tertinggi dalam Cd adalah pada $200 \mu\text{M}$ ($40 \pm 7 \times 10^3$ CFU). Pada kepekatan tersebut, pertumbuhan dalam Cu adalah lima kali ganda berbanding sel kawalan manakala bagi Cd dan Cr adalah sekitar tiga kali ganda.

Sementara itu, perbezaan yang dicerap bagi pertumbuhan dalam Zn didapati tidak jauh berbeza daripada sel kawalan iaitu kurang daripada dua kali ganda.

Hasil ini menunjukkan bahawa eiMT1 mampu bertoleransi dengan Cu dan Cd serta membolehkan sel

eiMT1 memandiri dalam kultur tersebut (Amiard et al. 2006). Hal ini juga disokong oleh kajian lepas mengenai pengekspresan berlebihan CcMT1 daripada pigeonpea (*C. cajan* L.) di dalam *E. coli* yang didapati membantu meningkatkan toleransi *E. coli* terhadap Cu dan Cd ditunjukkan oleh peningkatan pertumbuhan pTY12-CcMT1 sebanyak tiga kali ganda berbanding pengkulturan tanpa logam Cu (Sekhar et al. 2011). Begitu juga, peningkatan toleransi kepada Cu telah dipamerkan dalam sel *E. coli* yang mengekspreskan EhMT1 daripada tumbuhan toleran-kuprum *E. haichowensis* dan pertumbuhannya didapati meningkat naik sehingga hampir dua kali ganda berbanding sel kawalan (Xia et al. 2012).

Keupayaan untuk toleransi kepada pelbagai logam malah dengan kerintangan yang lebih tinggi telah ditunjukkan oleh mcMT-1 daripada *Festuca rubra* cv. Merlin (Ma et al. 2003). Sel yis *Saccharomyces cerevisiae* yang mengekspreskan mcMT-1 daripada *F. rubra* cv. Merlin mampu memandiri dalam ion Cu sehingga 3000 μM , bagi Cd dan Cr sehingga 550 μM manakala 600 μM bagi Zn. Kultivar Merlin berasal dari kawasan perlombongan plumbum dan zink di United Kingdom telah menunjukkan keupayaan toleransi pelbagai logam disebabkan oleh pengikatan mcMT-1 yang tidak khusus kepada ion logam tertentu. Toleransi yang signifikan terhadap Zn, Cu dan Cd juga telah dicerap dalam sel *E. coli* yang mengekspreskan protein rekombinan JcMT2a dari *Jatropha curcas* L. (Mudalkar et al. 2014).

Sebaliknya, pertumbuhan sel *E. coli* rekombinan yang mengekspreskan eiMT1 dalam kultur yang mengandungi Fe didapati menunjukkan pola yang berlawanan dengan hasil yang diperoleh bagi logam yang lain (Rajah 5(d)). Pertumbuhan sel rekombinan pada kepekatan Fe di bawah 300 μM adalah menyamai pertumbuhan sel kawalan dan mencapai lima kali ganda berbanding sel kawalan dalam 400 μM Fe seterusnya mula direncat pada kepekatan yang lebih tinggi (Rajah 5(d)). Fe telah dikenal pasti untuk mempunyai afiniti yang lebih rendah bagi tapak pengikatan logam dalam MT berbanding ion logam lain (Foster & Robinson 2011). Oleh itu, pada kepekatan Fe di bawah 300 μM , MT1 tidak mengikat Fe namun sel hos masih boleh bermandiri kerana Fe berlebihan dalam sel diikat oleh protein penyimpanan besi iaitu ferritin dan bakterioferritin yang terdapat dalam sel hos (Honarmand Ebrahimi et al. 2015). Apabila kepekatan Fe dalam sel mencapai 300 μM dan terus meningkat naik, pengikatan logam ini yang berlebihan oleh MT mula berlaku dan menjadikan sel toleran terhadap kepekatan ion yang tinggi dan membolehkan sel memandiri. Keupayaan mengumpul logam bagi eiMT1 didapati tidak terhad kepada logam perlu seperti Cu, Zn dan Fe. Ia juga didapati berfungsi terhadap logam tak perlu seperti Cd dan Cr pada kepekatan yang sangat tinggi. Oleh itu, eiMT1 berkemungkinan mengikat ion logam secara tidak khusus berdasarkan afiniti MT terhadap ion logam *in vitro* mengikut urutan hierarki Hg > Cu, Ag, Bi » Cd > Pb > Zn > Co (Vasak 1991).

KESIMPULAN

Kajian ini menunjukkan *E. coli* yang mengekspreskan eiMT1 mempunyai toleransi lebih tinggi kepada pelbagai ion logam termasuk logam berat berbanding sel kawalan. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa eiMT1 berfungsi untuk mengurangkan kesan ketoksikan terhadap ion logam terutamanya logam berat. Walau bagaimanapun, mekanisme terperinci toleransi masih belum jelas. Oleh itu, kajian lanjutan sewajarnya dilakukan bagi memahami bagaimana eiMT1 berfungsi dalam rumput sambau yang membolehkan tumbuhan tersebut memandiri pada tahap logam berat yang berlebihan. Hasil kajian ini berpotensi untuk diaplikasikan terus dalam proses fitoremediasi iaitu dengan menggunakan sel *E. coli* yang membawa cDNA *eiMT* di samping tumbuhan *E. indica* sendiri untuk menyerap logam berat dalam persekitaran yang tercemar.

PENGHARGAAN

Penghargaan kepada Allahyarham Dr. Amir Rabu yang telah memulakan penyelidikan ini namun tidak berkesempatan untuk menyaksikan hasil kajian ini.

RUJUKAN

- Ali, H., Khan, E. & Ilahi, I. 2019. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry* 2019: 6730305.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. & Rainbow, P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76(2): 160-202.
- Begg, S.L., Eijkelkamp, B.A., Luo, Z., Couñago, R.M., Morey, J.R., Maher, M.J., Ong, C.Y., McEwan, A.G., Kobe, B., O'Mara, M.L., Paton, J.C. & McDevitt, C.A. 2015. Dysregulation of transition metal ion homeostasis is the molecular basis for cadmium toxicity in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Communications* 6: 6418.
- Bennion, B.J. & Daggett, V. 2003. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Science* 100(9): 5142-5147.
- Blindauer, C.A. 2011. Bacterial metallothioneins: Past, present, and questions for the future. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16: 1011-1024.
- Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology* 3(3): 211-216.
- Cobbett, C.S. & Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182.
- Eapen, S. & D'Souza, S.F. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances* 23(2): 97-114.
- Foster, A.W. & Robinson, N.J. 2011. Promiscuity and preferences of metallothioneins: The cell rules. *BMC Biology* 9: 25.
- Freisinger, E. 2011. Structural features specific to plant metallothioneins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16(7): 1035-1045.

- Holm, L.G., Plucknett, D.L., Pancho, J.V. & Herberger, J.P. 1977. *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. East West Center: The University Press of Hawaii, Honolulu p. 609.
- Honarmand Ebrahimi, K., Hagedoorn, P.L. & Hagen, W.R. 2015. Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin. *Chemical Reviews* 115(1): 295-326.
- Hossain, S.T., Mallick, I. & Mukherjee, S.K. 2012. Cadmium toxicity in *Escherichia coli*: Cell morphology, Z-ring formation and intracellular oxidative balance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 86: 54-59.
- Kozminska, A., Wiszniewska, A., Hanus Fajerska, E. & Muszynska, E. 2018. Recent strategies of increasing metal tolerance and phytoremediation potential using genetic transformation of plants. *Plant Biotechnology Reports* 12(1): 1-14.
- Krezel, A. & Maret, W. 2017. The functions of metamorphic metallothioneins in zinc and copper metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 1237-1257.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, L.J. & Ngim, J. 2000. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. *Pest Management Science* 56: 336-339.
- Leszczyszyn, O.I., Imam, H.T. & Blindauer, C.A. 2013. Diversity and distribution of plant metallothioneins: A review of structure, properties and functions. *Metallomics* 5(9): 1146-1169.
- Ma, M., Lau, P.S., Jia, Y.T., Tsang, W.K., Lam, S.K.S., Tam, N.F.Y. & Wong, Y.S. 2003. The isolation and characterisation of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from heavy-metal tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Science* 164: 51-60.
- Mahajan, P. & Kaushal, J. 2018. Role of phytoremediation in reducing cadmium toxicity in soil and water. *Journal of Toxicology* 2018: 1-16.
- Mishra, S. & Dubey, R.S. 2006. Heavy metal uptake and detoxification mechanisms in plants. *International Journal of Agricultural Research* 1(2): 122-141.
- Moreau, J.L., Baudrimont, M., Carrier, P., Peltier, G. & Bourdineaud, J.P. 2008. Metal binding and antioxidant properties of chimeric tri- and tetra-domained metallothioneins. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 90(5): 705-716.
- Morris, C.A., Nicolaus, B., Sampson, V., Harwood, J.L. & Kille, P. 1999. Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Journal of Biochemistry* 338: 553-560.
- Mudalkar, S., Golla, R., Sengupta, D., Ghatty, S. & Reddy, A.R. 2014. Molecular cloning and characterisation of metallothionein type 2a gene from *Jatropha curcas* L., a promising biofuel plant. *Molecular Biology Reports* 41: 113-124.
- Nezhad, R.M., Shahpiri, A. & Mirlohi, A. 2013. Discrimination between two rice metallothionein isoforms belonging to type 1 and type 4 in metal-binding ability. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 60(3): 275-282.
- Nik Marzuki, S., Roslina, M.Y., Che Radziah, C.M.Z. & Ismanizan, I. 2010. Transformation of metallothionein gene (*eiMT1*) from *Eleusine indica* into tobacco, *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Sains Malaysiana* 39(6): 927-933.
- Nik Marzuki, S., Shaiful, A.S., Chin, I.S., Belinda, M.Y.S., Mushrifah, I., Shahrul Hisham, Z.A. & Shahidan, S. 2006. Molecular cloning and sequencing of metallothionein gene from *Eleusine indica*. *Malaysian Applied Biology* 35: 71-74.
- Pascal, M., Corso, M., Chanel, O., Declercq, C., Badaloni, C., Cesaroni, G., Henschel, S., Meister, K., Haluza, D., Martin-Olmedo, P. & Medina, S. 2013. Assessing the public health impacts of urban air pollution in 25 European cities: Results of the Aphekom project. *Science of the Total Environment* 49: 390-400.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.
- Salam, M.A., Paul, S.C., Shaari, F.I., Rak, A.E., Ahmad, R.B. & Kadir, W.R. 2019. Geostatistical distribution and contamination status of heavy metals in the sediment of Perak River, Malaysia. *Hydrology* 6(2): 30. DOI:10.3390/hydrology6020030.
- Sekhar, K., Priyanka, B., Reddy, V.D. & Rao, K.V. 2011. Metallothionein 1 (CcMT1) of pigeonpea (*Cajanus cajan*, L.) confers enhanced tolerance to copper and cadmium in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* 72: 131-139.
- Shazili, N.A.M., Yunus, K., Ahmad, A.S., Abdullah, N. & Rashid, M.K.A. 2006. Heavy metal pollution status in the Malaysian aquatic environment. *Aquatic Ecosystem Health* 9: 137-145.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V. & Mann, M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterisation of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 1(6): 2856-2860.
- Shuhaimi-Othaman, M., Nadzifah, Y., Nur-Amalina, R. & Umairah, N.S. 2013. Deriving freshwater quality criteria for copper, cadmium, aluminum and manganese for protection of aquatic life in Malaysia. *Chemosphere* 90: 2631-2636.
- Simes, D.C., Bebianno, M.J. & Moura, J.G. 2003. Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology* 63: 307-318.
- Tarasava, K., Loebus, J. & Freisinger, E. 2016. Localization and spectroscopic analysis of the Cu(I) binding site in wheat metallothionein E_c-1. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 371.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K. & Sutton, D.J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia Supplementum* 101: 133-164.
- Vanparys, C., Dauwe, T., Van Campenhout, K.V., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R. & Eens, M. 2008. Metallothionein (MTs) and δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Science of The Total Environment* 401: 184-193.
- Vasak, M. 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19: 13-17.
- Vasak, M. 1991. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. In *Methods in Enzymology Metallochemistry*, edited by Riordan, J.F. & Vallee, B.L. 205: 452-458.
- Watson, H., Videvall, E., Andersson, M.N. & Isaksson, C. 2017. Transcriptome analysis of a wild bird reveals physiological responses to the urban environment. *Scientific Reports* 7: 44180.
- Xia, Y., Lv, Y., Yuan, Y., Wang, G., Chen, Y., Zhang, H. & Shen, Z. 2012. Cloning and characterisation of a type

- 1 metallothionein gene from the copper-tolerant plant *Elsholtzia haichowensis*. *Acta Physiologia Plantarum* 34: 1819-1826.
- Yang, Z., Wu, Y., Li, Y., Ling, H.L. & Chu, C. 2009. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 70: 219-229.
- Ziller, A. & Fraissinet-Tachet, L. 2018. Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: A multifunctional protein. *Metallomics* 10(11): 1549-1559.
- Roohaida Othman* & Norul Huda Mohd Nasir
Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia
- Roohaida Othman*
Institute of Systems Biology
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia
- *Pengarang untuk surat-menyurat: roohaida@ukm.edu.my
- Diserahkan: 20 Mei 2019
Diterima: 5 Disember 2019