

التعبير الجيني لمورثة الـ *aapJ* من بكتيريا البروسيلة الضائية ضمن *E. coli*هبة محمد¹، محمد قويدر¹، أيمن المريري²

ملخص

تزايدت مشكلة الإصابة بالبروسيلات بسبب الخسائر الاقتصادية الناجمة عن تأثير المرض في الثروة الحيوانية، خاصة في إنتاج الحليب ومشتقاته والتي تعد من مصادر الدخل الرئيسية لمعظم دول العالم التي تعتمد على الحيوانات كمصدر أساسي للغذاء، بالآتي ينعكس هذا التأثير على الإنسان مباشرة، فتركزت العديد من الجهود للوقاية من الإصابة بداء البروسيلة من خلال تطوير لقاح فعلي يهدف إلى إنتاج مستضدات ذات كفاءة عالية. تم دراسة العديد من المورثات المرزعة للبروتينات المسؤولة عن الفوعة عند البروسيلة عن طريق عزلها ومن ثم التعبير عنها. فتم في هذه الدراسة التعبير الجيني لمورثة الـ *aapJ* ضمن بكتيريا الـ *Escherichia coli* BL21 (DE3) وذلك تحت سيطرة المحضض pT7 بواسطة التحريض بالـ IPTG (Isopropylthio D- galactoside)، حيث أظهرت هلامة عديد الأكريلاميد (SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel) أن بروتين الـ *aapJ* المعبر عنه يمتلك وزن جزيئي بحدود 27 kDa. كما تمت تنقية هذا البروتين بواسطة كروماتوغرافيا الألفة، والحصول عليه بشكله النقي، وتم التحري عن القدرة الإستمناعية للبروتين بإجراء المقايسة المناعية الأنزيمية.

الكلمات الدالة: البروسيلة الضائية، مورثة الـ *aapJ*، المحضض T7، التعبير البروتيني، التنقية، الأليزا.

المقدمة

للمرض (Blasco et al., 2006). بينما تنتقل إلى الإنسان عبر التماس المباشر مع الحيوانات المصابة، وعبر تناول الحليب الملوث ومن إنتاجاته الطازجة، ولا يمكننا نفي إمكانية انتقال هذه البكتيريا عبر الاتصال الجنسي (Atluri et al., 2011). من أهم الصفات التي تميز البروسيلة عن باقي البكتيريا بأنها تفتقر إلى عوامل الفوعة Virulence التقليدية المعروفة مثل: المحفظة والأهداب Fimbria والذيفانات الخارجية External toxins إضافة إلى الأنزيمات الخارجية External enzymes والبلاسميدات والكبسولات Capsules (DelVecchio et al., 2002). تكمن فوعة البروسيلة في قدرتها على دخول الخلايا مدمرة الاستجابة الطبيعية والنوعية للمضيف، تستطيع البروسيلة كونها من البكتيريا داخل خلوية تجنب آليات الدفاع للمضيف حيث إن التوازن بين المضيف وعوامل الفوعة للبروسيلة هو الذي يحدد استطاعة المضيف القضاء على البكتيريا أو قدرة البروسيلة على إحداث الإصابة (Porte et al., 2003).

تعد البروسيلة *Brucella* (بكتيريا سالبة الغرام) من مسببات الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان، حيث تُصيب العديد من الحيوانات الأهلية (Boschiroli et al., 2001). وتعد البروسيلة الضائية من الأمراض الخمجية لدى الماعز والأغنام، وهي من أكثر أنواع البروسيلة إمرضية للإنسان، ويعود ذلك إلى عدم فقدانها لفوعتها Virulence عند انتقالها إلى الإنسان (Georgios et al., 2005). وتختلف قابلية الحيوانات للإصابة بالمرض تبعاً لعوامل عديدة كالعمر والحالة الصحية والتغذية وحالة الحمل فضلاً عن عوامل أخرى مثل جرعة بكتيريا البروسيلة المسببة

¹ قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم - جامعة دمشق.

hibamohammad88@gmail.com

² قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية

تاريخ استلام البحث 2013/6/12 وتاريخ قبوله 2013/12/31.

وقد ساعدت التقنيات الجزيئية في دراسة بعض المورثات المرزمة للبروتينات المسؤولة عن الفوعة عند البروسيليا إما عن طريق عزلها أو تطهيرها ومن ثم التعبير عنها مثل (Al-Mariri et al., 2010) p39، إلا أن هناك مورثات حددت نظرياً ضمن جينوم البروسيليا مقارنة مع المتعضيات الأخرى ولم يتم دراستها عملياً مثل: *pheB* (Delrue et al., 2004)، ومورثات *aapJ*, *Q*, *aapJ*, *Q*, *M*, *P* الموجودة على الصبغي الأول للبروسيليا الضائنية والمرزمة لبروتينات L-amino acid permease (Delrue et al., 2001; DelVecchio et al., 2009; Tsolis et al., 2002).

تتنتمي مورثة الـ *aapJ* إلى الأوبيرون *aapJQMP* المنتمي إلى عائلة الناقل ABC (ATP-binding) (cassette)، والذي يُرمز بروتينات الـ L-amino acid permease (AAP)، حيث أن *aapJ* عبارة عن بروتين مرتبط بالبلازما المحيطة Periplasmic binding protein، *aapM* - *aapQ* بروتينات غشائية Integral membrane protein، *aapP* هو بروتين ATP Subunit binding حيث يعمل *aap* على نقل مجموعة واسعة من الأحماض الأمينية من طرف لآخر عبر الغشاء (Walshaw & Poole., 1996)، منها الغلوتامات Glutamate، والهستيدين Histidine، والإسبارتات Aspartat. مستخدماً حلمة الـ ATP للقيام ببعض العمليات الفيزيولوجية والحصول على الطاقة.

إن السيطرة على تعبير هذه الجين *aapJ* يساعد في تنظيم تجمع الأحماض الأمينية الخلوية، وفي الواقع إن لهذا البروتين دور في تنظيم استجابة للصدمة الحرارية عند البروسيليا الضائنية، وقد وجد أن له دور في تكوين مناعة عند الأغنام المريضة (Teixeira-Gomes et al., 1997)، ومن المحتمل أن يكون لها دور في الفوعة وأنه مثير للاهتمام في البروتينات المناعية للأغنام المريضة (ANA) (et al., 2000).

إن الهدف من دراستنا هو التعبير الجيني لمورثة *aapJ* لأول مرة لدى بكتيريا البروسيليا الضائنية *B. melitensis* بغية الحصول على البروتين المؤشب Recombinant

هذا، وتبذل دول العالم جهوداً جبارة لاستئصال داء البروسيليات من العالم بأسره، نظراً للخسائر الاقتصادية التي تسببها بكتيريا البروسيليا الضائنية في مجال صناعة الأغنام والماعز، بالإضافة إلى حدوث العدوى حيوانية المصدر zoonotic بهذه الأنواع البكتيرية (Michael et al., 2006). ولتحقيق هذا الغرض، تم استخدام السلالة Rev. 1 من البروسيليا الضائنية كلقاح أعطى نتائج جيدة نسبياً (Corbel., 1997). إلا أن اللقاح Rev. 1 يمتلك بعض العيوب، وهي: صعوبة التمييز بين الحيوانات الممنعة وتلك المصابة بشكل طبيعي، حيث أن الـ Rev. 1 يثير أضعافاً ضد عديد السكريد الشحمي lipopolysaccharide الأملس، كما أنه يسبب الإجهاض للإناث الحوامل مُطهراً احتمالاً قوياً للتحويل إلى الشكل الممرض، حيث يبقى بهذه الفوعة الكبيرة عند الإنسان (Golding et al., 2001). وهكذا توجد حاجة ماسة لإيجاد لقاح يكون غير مُعدٍ للإنسان، وإنما فعال في تحريض استجابة مناعية وقائية واسعة للسيطرة على داء البروسيليات. وازدادت في الآونة الأخيرة البحث عن مستضد استمناعي قادر على تحقيق الحماية دون الآثار الجانبية (Al-mariri et al., 2010).

أغلب الدراسات العلمية تُشير إلى تداخلات التفاعلات المصلية الخاصة باستعمال LPS بين أنواع البكتيريا المختلفة مثل (*Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157). وتلأفي هذه المشكلة لأبد من البحث عن مستضدات وتوصيفها بالاعتماد على طرائق دراسة المحتوى البروتيني لعزلات البروسيليا (Connolly et al. 2006).

وتبين من خلال سلسلة جينوم البروسيليا الضائنية *Brucella melitensis* 16M بأنه يحتوي على (Base pair) 3,294,935 زوج من الأسس الأزوتية موزعة على صبغيين حلقيين يبلغ حجم الصبغي الأول 2,117,144 bp في حين يبلغ حجم الآخر 1,177,787 bp تقريباً. واللذين يرمزان نحو 3,197 مجالاً مفتوحاً للقراءة (ORF) Open reading frame (Halling et al., 2005).

لمدة 15 دقيقة بدرجة 4 مئوية) ومن ثم يحتفظ بالطافي. ضخمت مورثة البروتين *aapJ* (1032pb/ 343 aa) بدءاً من الجينوم المعزول من سلالة البروسيللا الضائية 16M (DelVecchio et al., 2002) وذلك باستعمال كل من المرئسة

:BF-XhoI (5'-

ATATATCTCGAGATGAAAAAACTCTC

(5'- :BR- BamHI والمرئسة ATGACG -3')

ATATATGGATCCTTAGCGCACGGGGAT

(3'- GC ، حيث تم إضافة موقعي أنزيمي التقييد *XhoI*

و*BamHI* في النهاية 5' والنهائية 3' وذلك لأغراض

التسليط. تم تضخيم المورثة عن طريق تفاعل الـ PCR

(Polymerase chain reaction) وذلك باستخدام أنزيم

بلمرة عالي الوثوقية AccuPrim™Taq Polymerase

High fidelity وهو من شركة (Invitrogen)، وتم

التفاعل حسب شروط الشركة المصنعة. وتم استخدام

بلاسميد التعبير الجيني pET-15b (Novagen®) بهدف

التعبير البروتيني لمورثة الـ *aapJ* ضمن بكتيريا *E. coli*،

حيث يتميز هذا البلاسميد باحتوائه محض PT7 الذي

يحض على انتساخ المورثة، ووجود لاحقة الهستيدين التي

تساعد في تنقية البروتين المشوب. تم تقطيع كل من ناتج

تفاعل الـ PCR والبلاسميد pET-15b بأنزيمي التقييد

المذكورين سابقاً، ومن ثم تم ربطهما باستعمال أنزيم الربط

Ready-To-Go™ T4 DNA ligase Kit من شركة

(GE life science). وذلك حسب شروط الشركة

المصنعة. أُستعمل ناتج تفاعل الربط في تحوير الخلايا *E.*

coli BL21 بطريقة الصعق الكهربائي، حيث تم إدخال

بلاسميد التعبير الجيني pET-15b الحاوي على مورثة الـ

aapJ إلى البكتيريا (الشكل 1)، ومن ثم تم انتقاء عدة

مستعمرات نامية على الوسط الحاوي على الأمبيسلين. حيث

تم فيما بعد التأكد من صحة تسلسل المورثة ومكانها في

البلاسميد من خلال السلسلة (Mohammad et al., in

press)، وتم اختيار مستعمرة من أجل التعبير البروتيني.

protein بشكله النقي ودراسة استمناعية البروتين المؤشب مع مصول أغنام مُصابة تجريبياً لاستخدامه مستقبلاً كلقاح قد يكون فعال في القضاء على البروسيللا لدى الحيوانات الأهلية.

1. مواد وطرائق البحث:

1.2. السلالات البكتيرية والبلاسميدات: Strains and

Plasmids

أُستخدمت سلالة *E. coli* BL21(DE3)

(DelphiGeneticsSA, Charleroi, Belgium) من

أجل التسليط والتعبير البروتيني لمورثة الـ *aapJ*. زُرعت

مستعمرات الـ *E. coli* BL21(DE3) بشكل روتيني في

الدرجة 37° مئوية في الوسط السائل Luria-Bertani

broth (LB) أو على الوسط الصلب LB آغار.

تم الحصول على كل من سلالاتي البروسيللا واليرسينيا

من (Unité de Recherche en Biologie)

Moléculaire, Facultés Universitaires Notre-

Dame de la Paix, Namur, Belgium) وكخطوة سابقة

لتنشيط البروسيللا زُرعت سلالاتها في وسط التسمية الخاص

بالبروسيللا (HIMEDIA Laboratories) مضافاً له

حوالي 5% من مصل الحصان المثبط (PAN Biotech)

GmbH) ومن ثم حضن المجموع كحدٍ أدنى مدة 48 ساعة

بدرجة 37° مئوية. في حين استخدم لتنشيط البكتيريا المنماة

الموقية الملحي الفوسفاتي Phosphate buffered saline

(PBS) البارد حيث غُسلت به مرتين، ومن ثم حُضن الناتج

مباشرة بدرجة 60°م مدة نصف ساعة، وبغرض التأكد من

موت البروسيللا تمت زراعة 1ml من معلق البكتيريا على

وسط آغار صلب. ولتحضير خلاصة بروسيللا ویرسينيا

منحلة، تم حل 1 gm من وزن البكتيريا الرطب في 5 ml

من الموقية الفوسفاتي المبرّد المضاف له محلول البروتياز

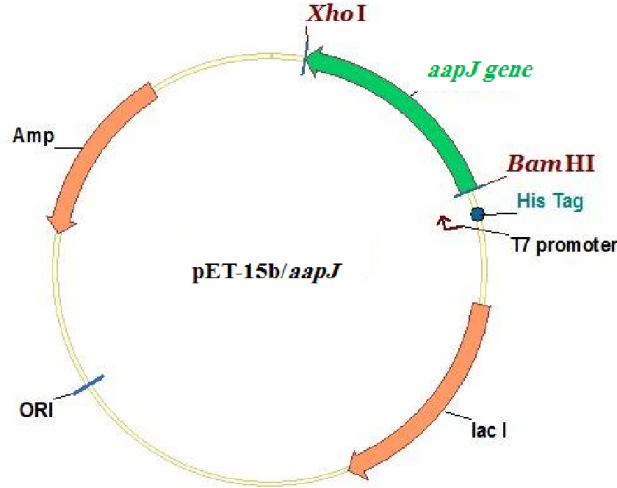
(المكون من 1mM من PMSF ومعقد البروتياز المثبط من

شركة Roche والمزود بمقدار 1 ميلي غرام اميلي لينتر من

الليزوزيم) ومن ثم حضن في الثلج مدة نصف ساعة

وعرض 5 مرات للأموح فوق الصوتية مدة 15 ثانية بالثلج

أما حطام البكتيريا فيزال بالتثقيب (بسرعة 15000 X g



الشكل 1: موقع مورثة الـ *aapJ* في البلاسميد pET-15b

المُفجر بواسطة مثقلة ذات سرعة 12000 rpm في درجة الحرارة 4 م ولمدة 20 دقيقة، حيث يتم تجميع السائل الطافي كمستخلص منحل Soluble (السيتوبلازما المحيطة والسيتوبلازما)، بينما يتم تعليق الراسب في موفي فوسفات الصوديوم Phosphate buffer (20 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 20 mM imidazole, 6 M Urea)، ومن ثم حضانة المعلق في الثلج ولمدة ساعة، وتم التثقيف بمثقلة ذات سرعة 12000 rpm في درجة الحرارة 4 م ولمدة 20 دقيقة، حيث يُعد السائل الطافي كمستخلص غير منحل Insoluble (Inclusion bodies).

4.2. تنقية البروتين:

تم استخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة للبروتينات (FPLC) AKTAprime من شركة (GE lifescience)، وفي خطوة سابقة للتنقية قمنا بتهيئة عمود الكروماتوغرافيا ذات الألفة للهستيدين (HisTrap™ HP, GE) (lifescience, Germany) بتمرير حجم من موفي الشطف Elution Buffer (50 mM من موفي الفوسفات، و 300 mM NaCl و 250 mM من الإيميدازول Imidazole) فيه (pH= 8.0) ومن ثم غسل بموفي الربط (Binding Buffer) والذي له نفس تركيب محلول الشطف باستثناء الإيميدازول (20 mM) Imidazole هذا وقد تم تحميل

2.2. التعبير البروتيني لمورثة الـ *aapJ*:

تم استنبات مستعمرة بكتيرية (مستعمرة بكتيرية منفردة نموذجية للأيشريشيا قولونية من حيث المظهر واللون والرائحة) من نانج التحول البكتيري Transformation في أنبوب يحتوي 5ml من وسط LB والمضاف له أمبسلين 100µg/ml. حُضن المستنبت البكتيري فيما بعد ليلة كاملة في حاضنة درجة حرارتها 37°م مع الرج بسرعة 170 rpm، وفي اليوم الآتي تم إضافة 300 µl من هذا المستنبت إلى 50ml من وسط (LB + Ampicillin) وحضانة بالدرجة 37°م مع الرج بسرعة 170 rpm حتى تُصبح الكثافة الضوئية (Optic density) (OD₆₀₀) (0.5-0.7)، ومن ثم التحريض على التعبير البروتيني من خلال إضافة IPTG بتركيز نهائي 0.5 mM إلى الوسط، وحضانة في حاضنة درجة حرارتها 37°م ولمدة أربع ساعات. (Mariri et al., 2012).

2.3. استخلاص البروتين المأشوب

تم تثقيف Centrifuge الخلايا البكتيرية بعد 4 ساعات من التعبير البروتيني، حيث تم التخلص من الطافي Supernatant وحل الراسب بمحلول الـ PBS 1X، ومن ثم تمريره على جهاز تفجير الخلايا (Constant) Fresh press cell (systems®)، وتطبيق ضغط أعظمي يبلغ 1 KBr ولمدة 10 دقائق، يتم فيما بعد تثقيف المُستخلص

وبروتينات عينة الـ flow through وعينات الطافي الأول والطاقي الثاني؛ ثم إضافة ضد الفأر وحيد النسيلة المضاد للهيستدين الموسوم بأنزيم بيروكسيداز نبات فجل الخيل Histidine Tag (6xHis) Mouse Monoclonal Antibody (clone 3D5) HRP Conjugate (Invitrogen Life Science Technologies) وتم الكشف عن الارتباط النوعي من خلال مداد الـ TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) (Amresco, USA) للغشاء في موقى فوسفات السيترات (0.05 M Na_2HPO_4 ، 0.025 M citric acid، pH 5.0)، وأضيف 2 mM H_2O_2 لضبط فعالية البيروكسيداز (Laemmli et al., 1970).

6.2. قياس تركيز البروتين:

تم قياس تركيز البروتين النقي بواسطة استخدام كاشف برادفورد Bradford (Bradford., 1976) وباستخدام بروتين مصّل البقر Bovine serum albumin كبروتين عياري، حيث حُضِر كاشف صبغة Bradford بتخفيفه، وتم فلترته. بالمقابل تم تحضير خمسة تخفيفات من البروتين العياري ألبومين مصّل البقر Bovine serum albumin وهي (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)، ليتم معايرة محاليل البروتين ضمن مكررين، أُضيف 10 μl من كل من محلول العينة والبروتين العياري في كل بئر من آبار الصفيحة ضمن مكررين، أُضيف 200 μl من الكاشف المخفف لكل بئر ومزجت العينة والكاشف جيداً. حضنت الصفيحة في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، حيث ازدادت الامتصاصية بمرور الوقت. قيس الامتصاصية بطول الموجة 595nm، بالآتي تم حساب تركيز العينة.

7.2 المقايسة المناعية الأنزيمية: ELISA

• تم تثبيت مستضدات البروسيل الضائية والبرسينيا المعوية ذات النمط المصلي O9 (10⁶/100 \square l) وذلك بعد تفجيرها باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية؛ والبروتين aapJ (100 ng/100 \square l) ضمن صفيحة المقايسة المناعية الأنزيمية (96 بئر) وحفظها بالدرجة 4° م مدة 16 ساعة، في اليوم الآتي تم إضافة موقى الإقفال Blocking buffer

المستخلص البروتيني ذو التركيز 1 مايكروغرام / مايكروليتر في جهاز التنقية بطريقة الحقن مع سرعة تدفق خلال العمود تساوي 1 مل / ليتر بالدقيقة، حيث يتم في هذه المرحلة ارتباط البروتين المزيل بالهيستدين مع العمود بينما تخرج البروتينات الأخرى من العمود، وتتبع هذه المرحلة بغسل العمود بموقى الربط والحاوي على تركيز منخفض من الإيميدازول من أجل التخلص من البروتينات غير المرتبطة بالعمود، حيث يتم جمع البروتينات غير المرتبطة بالعمود والمسماة Flowthrough. فيما بعد يتم فصل البروتين المؤشب المرتبط بالعمود باستخدام محلول الشطف Elution buffer الحاوي على تركيز مرتفع من الإيميدازول ذو الألفة الأعلى مع العمود مؤدياً إلى انفكاك البروتين عن العمود.

5.2. الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد

والتبصيم المناعي Western blot:

يتم ترحيل البروتين بعد التعبير البروتيني والاستخلاص والتنقية بهدف التأكد من نجاحها، حيث استخدمت هلامة سلفات دودوسيل الصوديوم عديد الأكريلاميد بتركيز 12 % SDS-PAGE (المتضمنة لهلامة التكديس Stacking gel ولهلامة الفصل Running gel)، بغية ترحيل عينات البروتين النقي وبروتينات عينة الـ flow through وعينات الطافي الأول والطاقي الثاني (inclusion bodies) ضمن موقى الترحيل (25mM Tris-Base, 200mM Glycine and 0.1% SDS)، وبعد هجرة البروتينات في الهلامة، تم صبغها بمحلول أزرق الكوماسي (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma), 45% Methanol and 10% Acetic Acid)، ومن ثم نقلها إلى محلول إزالة الصبغة حتى ظهور العصابات البروتينية.

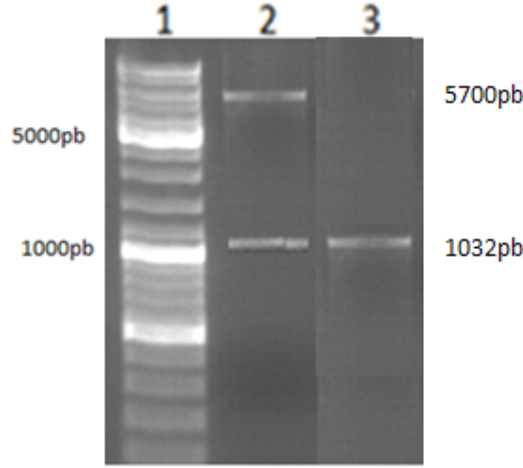
ومن أجل تقنية التبصيم المناعي (Towbin et al., 1979)، تم نقل البروتينات من الهلامة (12% وزن/حجم عديد الأكريلاميد polyacrylamide) إلى أغشية نتروسيللوز ذات ثقوب بحجم 0.2 ميكرومتر -0.2 μm Bio-rad, (pore-size nitrocellulose membranes) (USA). أُجْرِيَ الاختبار باستخدام عينات البروتين النقي

الامتصاصية بجهاز قارئ صفائح الإليزا على طول موجة 450nm (Francisco, 1995).

3. النتائج:

1.3. التعبير الجيني لمورثة الـ *aapJ*:

عُزلت مورثة الـ *aapJ* من الـ DNA الجينومي المُستخلص من البروسيللا الضأنية وذلك بتضخيمها بواسطة الـ PCR وباستخدام مُرئسات نوعية، فتبين أن طول شذفة الـ DNA يبلغ 1032 pb (الشكل 2)، وتم تنسيل المورثة في بلاسميد pET-15b، بعد معاملتها بأنزيمي التقويد BamHI و XhoI، رُحل ناتج التفاعل على هلامة الأغاروز، فظهر لدينا شذفتان الأولى بطول 5700bp وتمثل البلاسميد والثانية بطول 1032pb وتمثل مورثة *aapJ* الشكل (2)، وقد تم التأكد من صحة تسلسل المورثة ومكانها في البلاسميد من خلال السلسلة.



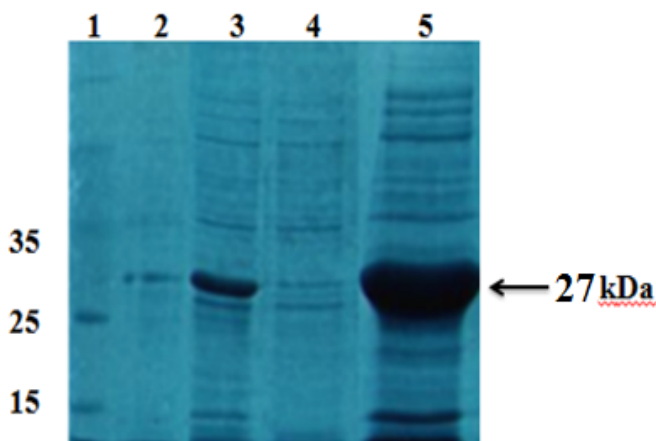
الشكل 2: صورة هلامة الآغاروز 1.5 % لناتج تضخيم مورثة الـ *aapJ* وناتج تقطيع البلاسميد pET 15b-*aapJ* بأنزيمي التقويد (BamHI- XhoI)، المسار (1) واسم أطوال معيارية، المسار (2) الـ DNA البلاسميدي المقطع الحاوي على المورثة، (المسار 2) عصابة الـ *aapJ* بطول 1032 bp

الـ IPTG بتركيز 0.5mM ودرجة حرارة 37°C. تم ترحيل الخلايا البكتيرية الحاوية pET/*aapJ* باستخدام الـ IPTG على هلامة عديد الأكريلاميد 12% SDS-PAGE (Bio tecfischer®)، وذلك قبل وبعد التحريض على التعبير البروتيني. حيث تبين أن بروتين الـ AapJ تم إنتاجه بوزن جزيئي 27 kDa تقريباً مقارنة مع واسم

تم فيما بعد التعبير البروتيني لمورثة الـ *aapJ* ضمن بكتيريا الـ *E. coli* BL21(DE3)، وذلك تحت سيطرة المحضض PT7 promoter، حيث تم إدخال البلاسميد pET/*aapJ* ضمن بكتيريا الـ *E. coli* BL21(DE3) بواسطة التحول البكتيري Transformation، وقد تبين أن البروتين تم إنتاجه بعد أربع ساعات من التحريض باستخدام

Protein kDa باستخدام برنامج الوزن الجزيئي للبروتين
 http://www.bioinformatics.) Molecular Weight
 .(org/sms/prot_mw.html

(Protein ladders, البروتين العياري للأوزان الجزيئية،
 Thermo Fisher Scientific Inc, Germany) (الشكل
 3، المسار 5)، بينما يبلغ الوزن الجزيئي النظري لبروتين
 الـ AapJ اعتماداً على تسلسل الحموض الأمينية 37.11

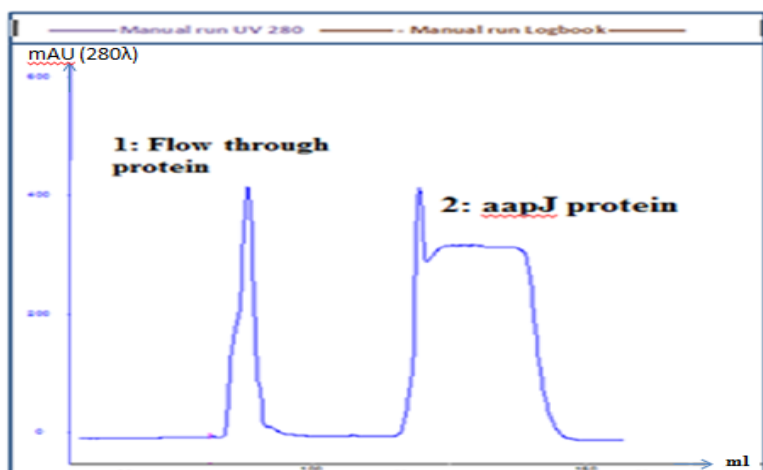


الشكل (3) صورة هلامة عديد الأكريلاميد
 SDS – PAGE (12 %): يمثل المسار (1)
 واسم البروتين العياري للأوزان الجزيئية،
 المسار (2) الطافي الأول، المسار (3) الطافي
 الثاني (inclusion bodies)، المسار (4) قبل
 التحريض باستخدام الـ IPTG، المسار (5)
 بعد أربع ساعات من التحريض.

(الشكل 4)، حيث تشير الذروة الأولى إلى بروتينات
 البكتيريا غير المرتبطة بعمود التنقية Flow-through،
 والتي تم التخلص منها باستخدام محلول ذي قوة أيونية
 منخفضة (Binding buffer)، في حين تمثل الذروة الثانية
 بروتين AapJ النقي الذي أزاحه من العمود مركب
 الأيميدازول الموجود بتركيز مرتفع في محلول الشطف
 (Elution buffer).

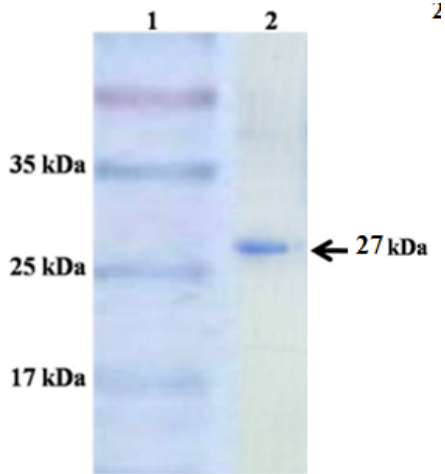
2.3. استخلاص البروتين المؤشب وتنقيته:

استخلص البروتين المؤشب بواسطة جهاز تفجير
 الخلايا، وتم ترحيل ناتج الاستخلاص على هلامة عديد
 الأكريلاميد 12% حيث تبين أن البروتين متوضع في الجدار
 الخلوي للبكتيريا على شكل غير منحل Inclusion bodies
 (الشكل 3، المسار 3)، فيما بعد تمت تنقيته بواسطة عمود
 الكروماتوغرافيا ذو الألفة للهستيدين His-tag Affinty،



الشكل (4): منحنى تنقية البروتين عن
 طريق عمود كروماتوغرافيا الألفة.

المسار(2)، حيث تم تحديد الوزن الجزيئي للبروتين 27 KDa تقريباً. وتم قياس تركيز بروتين الـ AapJ النقي بواسطة كاشف برادفورد وباستخدام ألبومين مصل البقر BSA كبروتين عياري وقد بلغ: $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$.



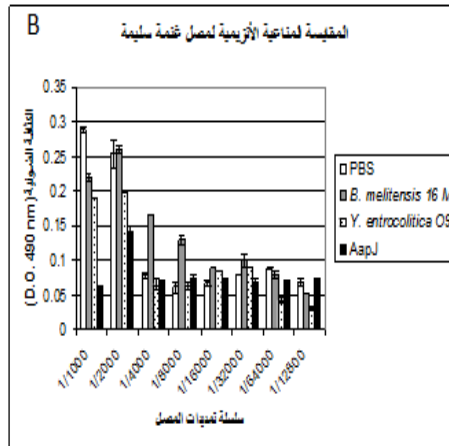
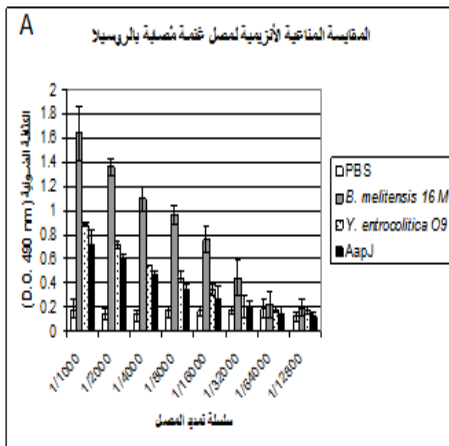
ويُوضح الشكل (5) التعبير النوعي للبروتين AapJ بواسطة اختبار التصميم المناعي Western blot، باستخدام الضد وحيد النسيلة موجه ضد ذيل الهيستيدين. وقد تمت عملية الرحلان فنتبين وجود بروتين ذو وزن جزيئي 27 كيلو دالتون، يشبه ذلك المُكتشف aapJ (الشكل 5،

الشكل (5): التصميم المناعي: يمثل المسار (1) واسم البروتين العياري للأوزان الجزيئية، المسار (2): بروتين AapJ النقي

1/12800 - 1/64000 - 1/32000 - 1/16000 - 1/1000. ويبين الشكل (6) نتائج اختبار المقايسة المناعية الإنزيمية ELISA. حيث تم التأكد من الارتباط النوعي للبروتين AapJ المأشوب والنقي بمصل غنمة مصابة بالبروسيلة الضائنية *B. melitensis*، وعدم ارتباطه بمصل غنمة سليمة.

3.3. المقايسة المناعية الإنزيمية: ELISA

بعد الحصول على البروتين المؤشوب بالشكل النقي، تم إجراء المقايسة المناعية، بحيث تُبنت مستضدات كلاً من خلاصة بكتيريا البروسيلة وخلاصة اليرسينيا والبروتين AapJ في آبار صفيحة المقايسة المناعية، وتم إضافة المصل بتركيز مختلفة - 1/8000 - 1/4000 - 1/2000



الشكل(6): يمثل نتائج اختبار المقايسة المناعية الإنزيمية ELISA لتحديد قدرة بروتين الـ AapJ المأشوب والنقي على الارتباط بمصل غنم مصاب بالبروسيلة الضائنية *B. melitensis* (A)، وعدم قدرته على الارتباط بمصل غنمة سليمة (B)، حيث تم استخدام البروسيلة الضائنية *B. melitensis* 16M، واليرسينيا *Y. enterocolitica* O:9 كشاهد ايجابي، واستخدم الموقى PBS كشاهد سلبي لمقايسة.

4. المناقشة:

هذه (Ribeiro., 2002); exsA (Kohler et al., 2002) المستضدات قادرة على تحريض الاستجابة المناعية الخلوية الواسطة والاستجابة المناعية الخلوية عند الفأر، ولكن فقط Cu/Zn (SOD) ومحددات مستضدية من ببتيدات P39 و هي التي حرّضت بعض المستوى من الحماية عند الفئران. لذا نحن بحاجة للبحث عن المزيد من المستضدات الاستمناعية من البروسيليا. فتم دراسة مورثة الـ *AapJ* لأول مرة لدى بكتيريا البروسيليا الضأنية *B. melitensis*، فعزلت ونُسلت بنجاح ذلك بتضخيمها بواسطة الـ PCR وباستخدام مُرئسات نوعية، ثم تم تسليق مورثة الـ *aapJ* ضمن بكتيريا الـ *E. coli* DH10B وذلك باستخدام بلاسميد الـ pET-15b، وقد تمت سلسلة مورثة *aapJ* المنسلة ضمن البلاسميد pET-15، ومقارنة ناتج التسلسل مع التسلسل الموجود في قاعدة بيانات بكتيريا البروسيليا الضأنية، وقد تبين وجود تشابه تام بنسبة 100% (Mohammad et al., in press). وقد تم في هذا البحث لأول مرة وبصورة ناجحة التعبير البروتيني لمورثة البلاسما المحيطية (برميز الحمض الأميني *AapJ*) من البروسيليا الضأنية *B. melitensis* M16، ضمن بكتيريا الـ *E. coli* BL21 (DE3) وتحت سيطرة المُحضض PT7، الأمر الذي يحاكي ما قد تم في أبحاث سابقة من محاولات لإنتاج بروتينات البلاسما المحيطية لعدد من الأجناس البكتيرية المختلفة مثل الأشريكة القولونية *E. Coli* (Alipour., 2008) والريزوبيوم *Rhizobium* (Walshaw and Poole, 1996) *Leguminosarum*، حيث تم استخلاص البروتين الذي تم تنقيته بواسطة عمود الكروماتوغرافيا ذو الألفة للهستيدين His-tag Affinty، والحصول عليه بشكل نقي وبوزن جزيئي 27 kDa، وهذا ما دل عليه وجود عُصابة بهذا الحجم بالمقارنة مع بروتينات البكتيريا في كل من هلامة الأكرلاميد المصبوغة بأزرق الكوماسي في الشكل (3) ونتيجة التبصيم المناعي في الشكل (5). تم التأكد من الارتباط النوعي للبروتين المنقى المدروس بمصل غنمة مُصابة بالبروسيليا الضأنية *B. melitensis*، بينما كان ناتج الارتباط سلبياً مع مصل غنمة سليمة (الشكل 6). أظهرت نتائج لوتسون وزملاؤه (1997)

تعد البروسيليا من أهم المشاكل التي تواجه الصحة العامة في أنحاء كثيرة من العالم، فهناك العديد من دول الشرق الأوسط خاصة النامية منها تعيش تحت عبء هذا المرض (Hegazy, 2009)، فقد زاد انتشاره في السنوات الأخيرة في سوريا (Pappas, 2006) نتيجة التربية المكثفة للحيوانات المنتجة للحوم والألبان، واستيراد الحيوانات من دول ينتشر فيها المرض. يعتمد تشخيص البروسيليا على التاريخ المرضي وظهور الأعراض بالإضافة إلى زراعة الدم والاختبارات المصلية التي من أهمها تفاعل رايت (Wright test) وتفاعل وردية بنغال (Rose Bengal) والمقايسة المناعية الأنزيمية (Sirmatel et al., 2002). يتم الآن التركيز على بروتينات استمناعية من البروسيليا لاستخدامها كمستضدات في التشخيص المصلي وإنتاج اللقاحات، فتعد اللقاحات البروتينية المؤشبة التي بإمكانها تحفيز استجابة مناعية مفيدة جداً في السيطرة على داء البروسيلات والوقاية منه، ذلك من خلال اكتشاف مستضدات تمتلك المقدرة على إثارة الاستجابة المناعية للمضيف (Al-Mariri, 2008). إن سلالة البروسيليا الضأنية Rev.1 هي واحدة من أكثر اللقاحات الحية الموهنة شيوعاً ضد البروسيليا الضأنية والتي تحرض مستوى حماية عالي عند الماعز والأغنام. ولكن من الممكن أن يتداخل عديد السكريد الشحمي الأملس LPS في سلالة اللقاح Rev.1 بالتمييز بين الحيوانات المصابة والملقحة مما يعيق برنامج مكافحة البروسيليا. ومهما يكن فإن هذه السلالة يمكن أن تسبب الإجهاض عندما يتم إعطاؤها للحيوانات الحامل وهي ما تزال ممرضة للبشر. ولتجنب هذه العيوب نحتاج إلى لقاح مغاير، من بين اللقاحات القادرة على تحريض الاستجابة المناعية الخلوية الواسطة Th1 التي يتم تطويرها، مستضدات تأسببية للبروسيليا مثل:

HtrA (Roop et al., 2001), GroEL (Amirmozafari et al. 2008), GroEs (Oliveira et al., 1996), Cu\Zn (SOD) (Toth et al., 1995, Onate et al., 1999), Yajc (Vemulapalli et al., 2000), P39 (Al-Mariri et al., 2010), L7/ L12

السيتوبلاسمية للبروسيلات (12، 19، 24، 28، 32، 54 كيلو دالتون) الارتباط بأضداد الحيوانات المُصابة بالبروسيلات، على العكس من الحيوانات الملقحة بالسلالة Rev.1 (Debbarh et al., 1995). يمكننا الاستنتاج على ضوء نتائج الأبحاث المنشورة ودراستنا بأن البروتين AapJ يمكن أن يُستخدم في تشخيص الإصابة بالبروسيلات، ويمكن استخدامه مستقبلاً في تطوير لقاح فعلي بغية القضاء على داء البروسيلات.

أنه ثلاثة بروتينات سيتوبلاسمية (p17, p15, p39) من البروسيلات قد ارتبطت بأضداد البروسيلات لدى الأغنام المُصابة تجريبياً وبألفة جيدة. كما أظهرت نتائج Cloeckaert وزملاؤه (2001) أنه يمكن استخدام المستضد BP26 في تشخيص داء البروسيلات لدى الأغنام والأبقار. أيضاً وجد Chaudhuri وزملاؤه (2010) أن المستضد OMP28 يمكنه الارتباط بأضداد البروسيلات المتواجدة لدى الأبقار المُصابة بالبروسيلات. بينما تملك البروتينات

المراجع

المراجع الأجنبية

- Al-Mariri, A. (2008) Ultraviolet C lethal effect on *Brucella melitensis*. *New Microbiol*, 31: 47-55.
- Al-Mariri, A. (2010) Protection of BALB/c mice against *Brucella melitensis* 16 M infection induced by vaccination with live *Escherichia coli* expression *Brucella* P39 protein. *Vaccine*, 28: 1766-1770.
- Al-Mariri A, Mahmoud NH, Hammoud R. (2012). Efficacy evaluation of live *Escherichia coli* expression *Brucella* P39 protein combined with CpG oligodeoxynucleotides vaccine against *Brucella melitensis* 16M, in BALB/c mice. *Biologicals*. 2012 Mar;40(2): 140-5. doi: 10.1016/j.biologicals..01.002.
- Alipour, M, Seyed Latif Mousavi Gargari, Iraj Rasooli and Shideh Montaser Kouhsari, (2008). Cloning, Expression and Immunoactivity of PeIplasmic Binding Protein, FepB. *Biological Sciences*, 3 (9): 1042-1047.
- Amirmozafari N, Ghazi F, Mostafazadeh A, Mostafaie A, Rajabnia R (2008) Comparison of heat shock response in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Pak J Biol Sci*, 11 (2):188-194.
- Ana p. Teixeira-Gomes, Axel Cloeckaert, and ichel S. Zygmunt. (2000). Characterization of Heat, Oxidative, and Acid Stress Responses in *Brucella melitensis*. Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, Institut National de la Recherche. *American Society for Microbiology*; 68(5): 2954–2961.
- Atluri, V.L., Xavier, M.N., De Jong, M. F., Den Hartigh, A. B., Tsolis, R. E. M. (2011). "Interactions of the Human Pathogenic Species with Their Hosts". *Annual Review of Microbiology* 65:523-541.
- Boschiroli, M. L., Foulongne, V., and O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.* 4 : 58-64
- Bradford, M.M. (1976). A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Blasco, J.M. (2006). Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. *Small Rum. Res.*, vol.62, p.33-37.
- Chaudhuri P, Prasad R, Kumar V, Basavarajappa AG. (2010). Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis. *Mol Cell Probes*;24(3):142-5.
- Cloeckaert A, Baucheron S, Vizcaino N, Zygmunt MS. (2001). Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep *Clin Diagn Lab Immunol.* ;8(4):772-5.
- Connolly JP, Comerchi D, Alefantis TG, Walz A, Quan M, Chafin R, Grewal P, Mujer CV, Ugalde RA, DelVecchio VG (2006) Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics*. 6 (13):3767-3780.
- Debbarh HS, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G. (1995). Identification of sero-reactive *Brucella*

- melitensis* cytosoluble proteins which discriminate between antibodies elicited by infection and Rev.1 vaccination in sheep. *Vet Microbiol*;44(1):37-48.
- Delrue, R. M., Lestrade, P., Tibor, A., Letesson, J. J and De Bolle X (2004). *Brucella* pathogenesis genes identified from random large-scale screens. *FEMS microbiology letters*. 9;231(1):1-12.
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P., and Letesson, J. J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell. Microbiol*. 3: 487- 497
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G., and Mujer, C.V. (2002) The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol*. 90:587–592
- DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyripides N, Overbeek R. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis* *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 99(1), 443-448.
- Francisco A. Uzal, Alejandra E. Carrasco, Susana Echaide, Klaus Nielsen, Carlos A. Robles. (1995). Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. *J Vet Diagn Invest*. 7:473-475.
- Georgios, M.D., Nikolaos Akritidis, M.D., Mile Bosilkovski, M.D., and Epameinondas Tsianos, M.D. (2005). Brucellosis. *The new Eng. J. of Med.* 352:2325-2336
- Golding, B., D. E. Scott, O. Scharf, L. Huang, M. Zaitseva, C. Lapham, N. Eller, and H. Golding. (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes. Infect.* 3:43-48.
- Halling, S. M., Peterson-Burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L., Qing, Z., Li, L. L., Kapur, V., Alt, D. P., and Olsen, S. C. (2005). Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol*. 187: 2715 - 2726.
- Hegazy YM, Ridler AL, Guitian FJ. (2009). Assessment and simulation of the implementation of brucellosis control program in an endemic area of the Middle East. *Epidemiol Infect*. 137: 1436–1448.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., and Liautard, J.P. (2002) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99: 15711–15716.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685 (15 August 1970); doi:10.1038/227680a0
- Letesson J J, Tibor A, van Eynde G, Wansard V, Weynants V, Denoel P, and Saman E. (1997). Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*; 4(5): 556–564.
- Michael J. Corbel. (2006). Brucellosis in Humans and Animals, World Health Organization Medical, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 89 pages.
- Mohammad. H, kweder. M, Al Mariri. A. (in press). Isolation And Cloning Of *AapJ* Gene From *Brucella melitensis*. *Damascus University Journal*. ISSN 1626-5487/830/.
- Oliveira, S. C., J. S. Harms, M. Banai, and G. A. Splitter. 1996. Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. *Cell. Immunol*. 172:262-268.
- Olate, A. A., R. Vemulapalli, E. Andrews, G. G. Schurig, S. Boyle, and H. Folch. 1999. Vaccination with live

- Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. **Infect. Immun.** 67:986-988
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. (2006). The new global map of human brucellosis. **Lancet Infect Dis** 6: 91-99.
- Porte P., Naroeni A., Ouahrani-Bettache S., and Liautard J.P. (2003). Role of the *Brucella suis*, Lipopolysaccharide O Antigen in Phagosomal Genesis and in Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion in Murine Macrophages. **Infect. Immun.** 71: 1481-1490.
- Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, Langella P. (2002) Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. **Appl Environ Microbiol**;68(2):910-6.
- Roop II, R.M., Phillips, R.W., Hagius, S., Walker, J.V., Booth, N.J., Fulton, W.T., Edmonds, M.D. and Elzer, P.H. (2001). Re-examination of the role of the *Brucella melitensis* HtrA stress response protease in virulence in pregnant goats. **Vet. Microbiol.** 82, 91-95.
- Sirmatel, F., Turker, M., and Bozkurt, A.I. (2002). Evaluation of the methods used for the serologic diagnosis of brucellosis. **Mikrobiyol Bul** 36: 161-167.
- Teixeira-Gomes, A. P., A. Cloeckert, G. Be'zard, R. A. Bowden, G. Dubray, and M. S. Zygmunt. (1997). Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic proteins using two-dimensional electrophoresis and immune blotting. **Electrophoresis** 18:1491-1497.
- Towbin H, Staehelin T, and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**;76(9):4350-4354
- Toth, T. E., J. A. Cobb, S. M. Boyle, R. M. Roop, and G. G. Schurig. (1995). Selective humoral immune response of BALB/c mice to *Brucella abortus* proteins expressed by vaccinia virus recombinants. **Vet. Microbiol.** 45:171-183.
- Tsolis Renee M., Rekha Seshadri, Renato L. Santos, Felix J. Sangari, Juan M. Garcí'a Lobo, Maarten F. de Jong, Qinghu Ren, Garry Myers, Lauren M. Brinkac, William C. Nelson, Robert T. DeBoy, Samuel Angiuoli, Hoda Khouri, George Dimitrov, Jeffrey R. Robinson, Stephanie Mulligan, Richard L. Walker, Philip E. Elzer, Karl A. Hassan, Ian T. Paulsen. (2009). Genome Degradation in *Brucella ovis* Corresponds with Narrowing of Its Host Range and Tissue Tropism. **PLoS ONE.** 4(5): e5519
- Vemulapalli, R., S. Cravero, C. L. Calvert, T. E. Toth, N. Sriranganathan, S. M. Boyle, O. L. Rossetti, and G. G. Schurig. (2000). Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 7:114-118.
- Walshaw, D. L. & Poole, P. S. (1996). The general l-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that in uences efflux of solutes. **MolMicrobiol.** 21, 1239-1252.

Gene Expression of *Brucella melitensis* Bacteria *aapJ* Gene in *E. coli*

Hiba Mohammad¹, Mahmud kweder¹, Ayman Al Mariri²

ABSTRACT

The problem of brucellosis disease has increased due to economic losses resulting from the impact of brucellosis on animals, especially the production of milk and its derivatives. The latter are the main source of income for most countries of the world that depend on animals as their primary source of food and therefore, this effect has been reflected directly on humans. Many efforts have been attempted to prevent the spread of brucellosis disease by the development of an effective vaccine, which is designed to produce antigens with high efficiency. Many of proteins encoding genes that are responsible for virulence in the brucellosis, have been studied, isolated, and then expressed. In this study, the expressed AapJ protein was extracted then purified with tag affinity chromatography. The analysis using SDS-PAGE showed that the purified protein has a molecular weight of around 27 kDa. The recombinant protein immunity was investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Keywords: *B. melitensis*, *aapJ* gene, overexpressed, purified, ELISA.

¹Department of Biological (zoology), Faculty of Science, Damascus University.
hibamohammad88@gmail.com

²Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission, P.O. Box 6091, Damascus Syria

Received on 12/6/2013 and Accepted for Publication on 31/12/2013.