Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی

زمستان1388، دوره یکم، شماره سوم، صفحه52 - 48

ارزیابی دو روش جونز و یامادا در استخراج پروتئین H-NS از سویه هالوموناس بومی ایران

شاداب شهریاری[1] ، پریناز قدم[1]*، محمد رضا صعودی[1] ، فاطمه یاریان[1] ،نیکه شریعتیان[1]

1- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)

*نویسنده مسئول: دکتر پریناز قدم، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س) pghadam@alzahra.ac.ir

دریافت: 88/11/17 پذیرش: 88/12/25

چکیده:

زمینه وهدف:در باکتری ها پروتئین های کوچک و متعددی با خاصیت اتصال به DNA وجود دارند که نقش مهمی در ساختمان و انعطاف پذیری نوکلئوئیدها بازی می کنند.به این ها پروتئین های همراه نوکلئوئید می گویند که با خم کردن یا پل زدن DNA ساختار نوکئوتید را فراهم می سازند. گروهی از این ها پروتئین های بازی و کوچکی هستند که به دلیل تشابه با هیستون ها، پروتئین شبه هیستونی نامیده می شود. یکی از فراوان ترین پروتئین های شبه هیستونی در باکتری های گرم منفی، H-NS است. این پروتئین نقش مهم و پیچیده ای در پاسخ به بسیاری از تغییرات محیطی ایفا می کند و تنظیم کننده بیان ژنی می باشد.خیلی از باکتری های گرم منفی چندین عضو از این خانواده را دارند.این پروتئین بیان صدها ژن را خاموش می کند و در فشرده کردن DNA نیز نقش دارد.بر خلاف تصور قبلی تحقیقات اخیر برای این پروتئن جایگاه اختصاصی با تمایل بالا در DNA یافته اند.

روش بررسی: با استفاده از اسید پرکلریک (PCA) پنج درصد سردو سولفات آمونیوم این پروتئین از *E. Coli* (به عنوان کنترل) و Halomonas استخراج شد.نتیجه این استخراج بر روی ژل SDS-PAGE 15% مشاهده گردید.

یافته ها: در این مطالعه حضور پروتئین H-NS در گونه ای از باکتری هالوموناس با دو روش جونز ویامادا بررسی شد . با مطالعه پروتئین استخراجی با روش یامادا از این باکتری، باند 15 kD در کنار مارکر وزن مولکولی مشاهده گردید .

نتیجه گیری: با توجه به اینکه پروتئین H-NS در باکتری های گرم منفی نقش بسیار مهمی دارد و از سوی دیگر این پروتئین تا به حال در گونه های مختلف هالوموناس مطالعه نشده است ، با بررسی که صورت گرفت فرضیه حضور این پروتئین در این باکتری هالوموناس تقویت شد.همچنین مشخص شد که با استفاده از روش یامادا اسخراج این پروتئین امکان پذیر است.

واژه های کلیدی: پروتئین شبه هیستونی، H-NS، هالوموناس، استخراج DNA

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

باکتری ها نیز مانند سایر میکروارگانیزم ها با مساله فشرده کردن DNA کروموزومی خود روبرو هستند (1). عوامل مختلفی در ایجاد این فشردگی دخیل هستند که از جمله این عوامل، پروتئین های اتصالی به نوکلئوتیدها نقش مهمی ایفا می کنند (2). حضور این پروتئین ها نه تنها بر شکل گیری ماده ژنتیکی، بلکه بر عملکرد های DNA، از جمله همانند سازی، نوترکیبی و رونویسی نیز نقش دارند (3).

H-NS یکی از فراوانترین پروتئین های اتصالی به DNA در باکتری *E.Coli* است که در باکتری های گرم منفی نیز توزیع گسترده ای دارد. این پروتئین ها حدود 30 سال پیش به عنوان یک فاکتور رونویسی شناسایی شده است (4) و بعدها نقش آن به عنوان پروتئینی که در ساختار و عملکرد DNA کروموزومی نقش دارد، شناخته شد (5). داده های زیادی، عملکرد ژنتیکی و بیوشیمایی پروتئین H-NS را در باکتری *E. Coli* تایید می کنند (6).

این پروتئین، کوچک بوده و بیش از 20000 کپی از آن در هر سلول وجود دارد که pI خنثی دارد. پروتئین H-NS توالی خاصی را برای اتصال انتخاب نمی کند ولی به طور خاص، DNA خمیده را برای اتصال ترجیح می دهد (7). طی سال های اخیر، پروتئین مشابه H-NS در بیشتر باکتری های گرم منفی شناسایی شده است. از بین این پروتئین ها، تشابه کمی بین آنها و پروتئین H-NS موجود در باکتری *E. Coli* وجود دارد که توالی آنها نیز با این پروتئین مشابه نیست (8) و این تفاوت بیشتر در ناحیه N –ترمینال پروتئین وجود دارد (9). فرم فعال پروتئین H-NS به صورت دایمر است، در حالی که الیگومرهای بزرگی از آن نیز شناسایی شده است (10). این پروتئین از ناحیه N- ترمینال خود به صورت الیگومر درآمده و از طریق ناحیه C- ترمینال خود به DNA اتصال می یابد که این خصوصیت در پروتئین های وابسته دیگر نیز وجود دارد. نقش پروتئین H-NS در فیزیولوژی باکتری ها هنوز شناخته نشده است، اما به نظر می رسد که نقش مهمی در تنظیم ژن های موثر بر پاسخ باکتری به تغییرات محیطی دارد (6). طی مطالعات صورت گرفته، افزایش قابل توجهی در تعداد پروتئین های وابسته به H-NS در باکتری های گرم منفی در زمان های متفاوت چرخه سلولی مشاهده شده است اما هیچ گونه مطالعه ای در رابطه با حضور پروتئین شبه هیستونی H-NS در باکتری های هالوفیل صورت نگرفته است.

با توجه به اهمیت این پروتئین و نقش کلیدی آن در تفسیر تفاوتهای ساختاری و عملکردی DNA کروموزومی در باکتری های گرم منفی مختلف ،در این تحقیق برای اولین بار حضور پروتئین H-NS در یک باکتری هالوفیل گرم منفی مورد مطالعه قرار گرفته است. پروتئین استخراج شده ، از لحاظ الگوی حرکت الکتروفورزی نیز با پروتئین H-NS در باکتری *E.Coli* که به عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود، مقایسه شد.

روش بررسی:

سویه های باکتریایی و محیط کشت: باکتری *E. Coli* (ATCC 23922) و باکتری گرم منفی متعلق به جنس هالوموناس که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است. باکتری *E. Coli* در محیط LB و دمای 37 درجه سانتی گراد با حرکت دورانی rpm 100 رشد کرد. باکتری هالوموناس نیز در محیط اختصاصی NA با 10% نمک و دمای 33 درجه سانتی گراد با

حرکت دورانی rpm 100 رشد کرد. منحنی رشد هر دو سویه با طول موج nm 620 و طی 24 ساعت رسم شد.

لیز سلولی و استخراج پروتئین: توده سلولی متعلق به باکتری *E. Coli* و هالوموناس در مرحله فاز لگاریتمی به وسیله سانتریفوژ جمع آوری شد. پروتئین مورد بررسی، از توده سلولی دو سویه، استخراج و رسوب داده شد. از آنجا که پروتئین H-NS، یک پروتئین شبه هیستونی است و شباهت زیادی با هیستون های یوکاریوتی دارد، با روش جونز (11) که مخصوص استخراج پروتئین های هیستونی است، استخراج شد. در این فرایند، پروتئین مورد نظر در اسید پر کلریک (PCA) 5% سرد به صورت محلول در آمد و به کمک استون رسوب داده شد. به این ترتیب که سه تا پنج برابر حجم رسوب سلولی اسید پر کلریک (

www.SID.ir

Archive of SID

(PCA)5% سرد اضافه شد سپس 30 دقیقه و در 4 درجه سانتی گراد همزده شد. مخلوط حاصل به مدت 2 دقیقه در4 درجه سانتی گراد و با دور rpm 12000 سانتریفوژشد و محلول رویی از رسوب جدا گردید. به شکل فوق ،دو بار استخراج از رسوب انجام شد و محلول های حاصل از سه بار استخراج جمع آوری گردید. از این مرحله به بعد استخراج در دمای حدود 15-18 درجه سانتی گراد انجام گرفت .بر روی محلول جمع آوری شده قطره قطره اسید کلریدریک 6 نرمال افزوده شد تا غلظت نهایی اسید کلریدریک در محلول به 0/3 نرمال برسد. این عمل در حین هم زدن و به مدت 1 دقیقه انجام گرفت. بعد از آن سه برابر حجم محلول به آن استون افزوده شد و به مدت 5-10 دقیقه در دمای15-18 درجه سانتی گراد و با دور rpm 1500 سانتریفوژ گردید. به سه برابر حجم رسوب حاصل استون :اسید کلریدریک 0/1 نرمال (به نسبت 1:6) افزوده و به مدت 10 دقیقه در دمای15-18 درجه سانتی گراد و با دور rpm 1500 سانتریفوژ شد . رسوب به دست آمده سه مرتبه با سه برابر حجم ، استن و با همان شرایط سانتریفوژ شسته و نهایتا در خلا خشک گردید. در این مطالعه، روش دیگری که برای استخراج پروتئین مورد استفاده قرار گرفت، روش Yamada (12) بود که مخصوص استخراج پروتئین H-NS است. در این روش از سولفات آمونیوم با غلظت 40-60% برای رسوب پروتئین استفاده شد. به این ترتیب که به 3/5 برابر حجم رسوب سلولی بافر I افزوده شد (بافر I شامل بافر 10 میلی مولار تریس –استات (pH 7/8) ، 4/6 میلی مولار منیزیم استات، 24 میلی مولار پتاسیم استات، 150 میلی مولار سوکروز و 0/6 میلی مولار دی تیو ترئیتول بود). پس از سونیکه کردن به مدت 5 دقیقه در rpm 50000 به مدت 3 ساعت و در 4 درجه سانتی گراد ساتتریفوژ شد. محلول رویی از رسوب جدا شد و حجم آن با استفاده از بافر I 6/2 برابر گردید.به آرامی به این محلول در حین هم زدن و در 4 درجه سانتی گراد آمونیوم سولفات جامد افزوده شد تا غلظت آن در محلول به 40% رسید و 20 دقیقه در 4 درجه سانتی گراد همزده شد. بعد از آن به مدت 15 دقیقه در rpm 8000 و دمای 4 درجه سانتی گراد ساتریفوژ شد. به محلول رویی طبق شرایط قبل آمونیوم سولفات جامد افزوده شد تا غلظت آن در محلول به 60% رسید .بعد از انجام سانتریفوژ رسوب جدا و بعد از حل شدن در بافر، دیالیز گردید.

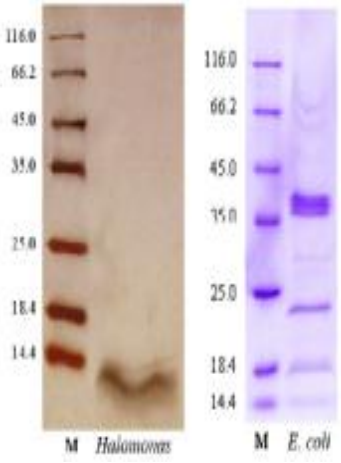
الکتروفورز با ژل پلی اکریل آمید: برای اندازه گیری وزن مولکولی پروتئین استخراج شده که kD 15 است، ژل پلی اکریل آمید 15% مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز به صورت عمودی صورت گرفت و باند پروتئینی مورد نظر به کمک رنگ آمیزی با کوماسی بلو و نیترات نقره مشاهده شد.

یافته ها:

باکتری *E. Coli* (ATCC 23922) و باکتری گرم منفی متعلق به جنس هالوموناس کشت داده شدند و به منظور تعیین فاز لگاریتمی که در ان تولید پروتئین H-NS حد اکثر می باشد ،منحنی رشد دو باکتری، طی 24 ساعت و در طول موج nm 620 رسم شد .

طبق مطالعات صورت گرفته، حضور پروتئین H-NS در باکتری *E. Coli* تایید شده است، بنابراین باکتری فوق به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. استخراج پروتئین در میانه فاز لگاریتمی رشد انجام شد. در ابتدا پروتئین استخراج شده با روش جونز، بر روی ژل پلی اکریل آمید 15% الکتروفورز شد و نتیجه آن برای مشاهده بهتر با نیترات نقره و کوماسی بلو، رنگ آمیزی و مشاهده گردید (شکل 1).

۱ ۲

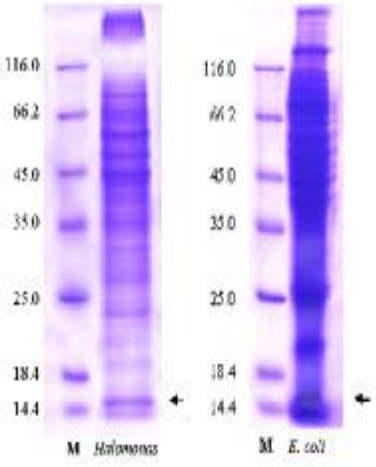


شکل1- ژل پلی اکریل آمید 15% از نمونه پروتئین استخراج شده از 1- باکتری هالوموناس که با نیترات نقره رنگ آمیزی شده است 2- باکتری *E. Coli*، رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به شکل 1 ، باند 15 kD که نشان دهنده پروتئین H-NS می باشد، در هیچ یک از سویه ها مشاهده نگردید. به نظر می رسید که فرایند انجام شده برای استخراج پروتئین H-NS مناسب نمی باشد، بنابراین از روش Yamada (1990) که مخصوص استخراج پروتئین H-NS است، استفاده شد. نتایج استخراج پروتئین، بر روی ژل پلی اکریل آمید 15% و به کمک رنگ آمیزی کوماسی بلو مشاهده شد. باند 15 kD در حرکت الکتروفورزی و با توجه به مارکر وزن مولکولی، برای هر دو سویه مورد بررسی مشاهده شد (شکل 2). ۲ ۱



شکل 2- پروتئین استخراج شده با استفاده از روش Yamada بر روی ژل پلی اکریل آمید 15% : 1- باکتری هالوموناس،شامل باند مورد نظر در ناحیه 15 kD و مارکر وزن مولکولی 2- باکتری *E. Coli*، شامل باند 15 kD و مارکر وزن مولکولی (رنگ آمیزی با کوماسی بلو)

بحث :

در سلول باکتری DNA ژنومی در ساختاری به نام نوکلئوئید فشرده می شود.در میان پروتئین های همراه نوکلئوئید باکتریایی ، خانواده هتروژنی از پروتئین ها به نام پروتئین های شبه هیستونی وجود دارند که در ارگانیزاسیون DNA نقش اساسی دارند (1-3) .در بین آنها پروتئین H-NS که یک پروتئین پایدار نسبت به گرماست یکی از مهمترین پروتئین های شبه هیستونی در *E.coli* می باشد که به مقدار زیاد در فاز لگاریتمی بیان می شود و به خوبی در این باکتری مورد مطالعه قرار گرفته است(13).این پروتئین کوچک است و 136 اسید آمینه و تقریبا 15 کیلو دالتون وزن دارد(14).پروتئین H-NS علاوه بر نقشی که در تشکیل نوکلئوئید ایفا می کند بیان حدود 200 ژن را بطور مستقیم یا غیر مستقیم کنترل می نماید(15).با توجه به اهمیت این پروتئین ،حضور آن در باکتری هالوموناسی که از سطح خاک نمکی منطقه کرج جداسازی شده بود بررسی گردید. در این مطالعه دو روش جونز (11) و یامادا(12) برای استخراج این پروتئین مورد استفاده قرار گرفتند و از *E.coli* به عنوان کنترل استفاده شد.با توجه به این که این پروتئین در باکتری *E. coli* به مقدار زیاد در فاز لگاریتمی بیان می شود بنابر این هردو باکتری کشت داده شدند و در این فاز جمع آوری شدند.از آنجا که این پروتئین شباهت زیادی به پروتئین های هیستونی دارد و روش جونز مخصوص استخراج هیستون ها می باشد ابتدا از این روش برای استخراج استفاده شد ولی آنالیز با استفاده از SDS- PAGE بندی با وزن مولکولی 15 کیلو دالتون را نشان نداد. در روش یامادا از سولفات آمونیوم برای رسوب دهی پروتئین استفاده شد که نتیجه آن مشاهده بندی با حرکت الکتروفورزی مشابه با H-NS در هر دو باکتری بود.بنابر این روش یامادا روش مناسبی برای استخراج این پروتئین از هالوموناس می باشد و مطالعات تکمیلی لازم است که با تخلیص آن به بررسی و مقایسه این پروتئین در باکتری های هالوفیل و مزوفیل بپردازیم.

نتیجه گیری:

با توجه به عدم مطالعه این پروتئین در هالوموناس، مطالعه بر روی پروتئین H-NS در این باکتری انجام گرفت و مشخص شد که از روش یامادا برای استخراج این پروتئین می توان استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

تحقیق ارائه شده، قسمتی از طرح پژوهشی مصوب دانشگاه الزهرا(س) می باشد و از لحاظ مالی توسط دانشگاه حمایت شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

references:

1- Dame R, *The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial Chromatin*, Molecular Microbiology. 2005; 56: 858-870.

2- Dame, Luijsterburg M, Krin E, *DNA bridging: a property shared among H-NS-like Proteins*, Journal of Bacteriology. 2005; 187:1 845-1848.

3- Johnson RC, Johnson LM, Schmidt JW. *Major nucleoid proteins in the structure and function of Escherichia coli chromosome*, In: Patrick Higgins, N. (Ed). ACM Press, Washington, DC. 2005; 65-131.

4- Jacquet M, Cukier-Kahn R, Pla J, Gros F. *A thermostable protein factor acting on in vitro DNA transcription,Biochem Biophys,* Res Commun, 1971; 45 : 1597–1607.

5- Atlung T, Hansen FG.*Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome Replication and the cell cycle in Escherichia coli*, Journal of Bacteriology. 2002; 184:1843-1850.

6- Tendeng C, Krin E, Soutourina O. *Anovel H-NS-like p. rotein from an Antarctic Psychrophilic bacterium reveals a crucial role for the N-terminal domain in termal stability*. The Journal of Biological Chemistry. 2003; 278: 18754-18760.

7- Rimsky S. *Structure of the Histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome Superstructure*. Current Opinion in Microbiology, 2004; 7: 109-114.

8- Bertin P, Benhabiles N, Evelyne K. *The structural and functional of H-NS-like protein is Evolutionarily conserved in gram-negative bacteria*, Molecular Microbiology. 1999; 31: 319-329.

9- Luijsterburg MS, Noom MC, Wuite G, Dame RT. *The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: A molecular perspective,* Journal of Structural Biology. 2006; 165: 262–272 .

10- Tendeng C, Bertin Ph. *H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins*, TREND in microbiology, 2003; 11: 511-519.

11- Johns E W. *Studies on histones, preparative methods for Histone fractions from calf thymus*, Biochem J., 1964; 92: 55-59.

12- Yamada H, Muramatsu S, Mizuno T. *An Escherichia coli protein that preferentially bind to sharply curved DNA*, J. Biochem. 1990; 108: 420-425.

13-Dorman C. *JH-NS: a universal regulator for a dynamic genome*, Nat. Rev. Microbiol., 2004; 2: 391–400.

14-Spurio R, Durrenberger M, Falconi M, La Teana A, Pon C L, Gualerzi C O. *Lethal overproduction of the Escherichia coli nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy*, Mol. Gen. Genet.1992; 231:201–211.

15-Hommais F, Krin E, Laurent-Winter C. *Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS*, Mol. Microbiol., 2001; 40: 20–

www.SID.ir