مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۵، بهار و تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۳۳- ۲۸

کلون و بیان ژن رسپتور ویتامین B_{12} (btuB) از باکتری Ecoli O_{157} H_7

مریم قاجار کوهستانی[1*]، مجید علی پور[1]، علی رضایی[2]

۱-دانش آموخته میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
۲- گروه سلولی و مولکولی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل
۳- گروه میکروبیولوژی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
نویسنده رابط: مریم قاجار کوهستانی، دانش آموخته میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

همراه:۰۹۱۱۳۵۳۲۹۰٤ Email:Maryam.Qajar@yahoo.com

چکیده:

زمینه و هدف: تولید وشناسایی پروتئین اتصالی پری پلاسمی انتقال دهنده ویتامین B_{12} (BtuB) از باکتری *ای. کولی* O157:H7.

روش بررسی: ژن کد کننده btuB که مسئول تولید پروتئین انتقال دهنده ی ویتامین B_{12} است با موفقیت تکثیر گردید. این ژن با حذف کدون خاتمه به وکتور PET_{28} (a) + اضافه شد تا His-tag از طریق وکتور به پروتئین اضافه شود. بعد از ترنسفورم سازه در Ecoli BL_{21} (DE_3) ،القا سلول ها با IPTG ، آنالیز SDS- PAGE کل پروتئین ها انجام شد.

یافته ها: پروتئینی با وزن مولکولی 66 کیلو دالتون مشاهده گردیده است.

نتیجه گیری: تکثیر ژن bp 1845 ای و تولید پروتئین BtuB با وزن مولکولی66 کیلو دالتون ؛

کلمات کلیدی : ویتامین B_{12} ، BtuB، Ecoli O157 H7 ، Cloning

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

همه ی ارگانیسم ها به کوفاکتور ارگانومتالیک مثل کوبالامین نیاز دارند و آن را باید از منابع خارجی بدست آورند. چندین آنزیم، به کوبالامین به عنوان کوفاکتور نیاز دارند(۱۱و٤) . باکتری های گرم منفی برای ورود مواد غذایی کم نیاز مانند کوبالامین از عرضغشای خارجی، نیاز به انتقال‌دهنده ی غشای خارجی، شیب الکترو شیمیایی در غشای سیتوپلاسمی و کمپلکس پروتئینی غشای داخلی TonB- EXb B- EXb D دارند(۱۰و٦و٤و۳). انتقال دهنده ی غشای خارجی BtuB ساختمان معمولی بشکه ی بتا دارد. این انتقال دهنده دارای دو دومین است:

۱- دومین بشکه ی بتای غشای خارجی که دارای ۲۲ رشته ی بتای غیر موازی است. ارتباط رشته های بتاء، به وسیله ی ۱۱ لوپ خارج سلولی طویل و پیچ های کوتاه پری‌پلاسمی برقرار می شود.

۲- دومین کرک یا توپی که کانال بشکه ی بتا را مسدود می کند. دومین کرک در N– ترمینال این پروتئین قرار گرفته است و دارای Ton B – Box است که در باقیمانده های 12-6 قرار گرفته است. انتقال کوبالامین از رسپتور BtuB وابسته به انرژی است اما غشای خارجی فاقد انرژی است به دلیل اینکه پورین موجود در غشای خارجی مانع از ایجاد شیب غلظت می‌گردد بنابراین انرژی در غشای سیتوپلاسمی تولید می شود و به وسیله ی Ton B به غشای خارجی منتقل می شود(۱۰و٤و۳). لوپ های خارج سلولی L_2 و L_3 در اتصال به ویتامین B_{12} نقش دارند(۳). ویتامین B_{12} بعد از عبور BtuB وارد پری پلاسم و در آنجا به پروتئین اتصالی BtuF متصل می شود(۱۰و۳) و به وسیله ی آن به انتقال دهنده ی ABC منتقل می شود. این انتقال دهنده از پرمئاز Btu C و Btu D تشکیل شده است که Btu C دارای جایگاه اتصال به ATP است که انرژی انتقال را با هیدرولیز ATP فراهم می کند(۹و۷و۱). ژن کد کننده ی این پروتئین از 1845جفت باز تشکیل شده است(٦).

مواد و روش ها :

- مواد شیمیایی و آنزیم ها

آنزیم Taq Polymerase از شرکت ژن فن آوران، آنزیم T_4 Ligase از شرکت فرمنتاز، آنزیم های اندونوکلئاز محدود کننده از شرکت سیناژن و بقیه ی مواد شیمیایی از شرکت Sigma یا Merck تهیه گردید.

کیت جداسازی DNA از ژل و کیت تخلیص پلاسمید از شرکت Bioneer (کره) تهیه و پرایمرها نیز توسط همین شرکت (Bioneer) سنتز گردیدند.

- سویه های باکتریایی، پلاسمید و محیط کشت

Ecoli O_{157} H_7 (ATCC 43889) از دانشگاه شاهد و Ecoli BL_{21} (DE_3) از شرکت سیناژن و پلاسمید PET 28a (+) محصول شرکت Novagen (U.S.A) بوده است.

Ecoli BL_{21} (DE_3) از شرکت سیناژن بوده و محیط های کشت Luria- Bertani (LB) Broth یا LB- Agar برای رشد سویه های Ecoli در دمای $37\ ^{\circ}C$ مورد استفاده قرار گرفته است. برای رشد Ecoli ترانسفورم شده از محیط LB واجد 50 $\mu g\ mL^{-1}$ آنتی بیوتیک کاناماسین استفاده گردید.

- کلون ژن btuB

برای تکثیر ژن btuB از Ecoli O_{157} H_7 (ATCC 43889)استفاده گردید. و این DNA ژنومیک با استفاده از Polymerase chain Reaction تکثیر گردید.

پرایمرهای Reverse

5́ CAGT CTCGAG, GAA, GGT, GTA, GCT, GC 3́

و Forward

5́ AGTC GGATCC, ATG, ATT, AAA, AAG, CT 3́

برای طویل سازی ژن btuB ، و با حذف کدون خاتمه از انتهای ژن استفاده و توالی انتهایی His -tag از طریق وکتور اضافه گردید. (فلش ها ترادف شناسایی آنزیم های محدود کننده BamHI و Xho I).

شرایط PCR

شامل 5 µL از DNA ، 1 µL از هر پرایمر (20 پیکومول)، ۰.۲ µM از dNTP ،1.5mM از $MgCL_2$، ۰.۲µ /M از Taq DNA Polymerase و

Archive of SID

www.SID.ir

2.5از Buffer PCR در غلظت نهایی 25 µL در یک ترمال سایکلر انجام شد.

روند PCR به قرار زیر است

دناتوریشن اولیه با مدت زمان 5 دقیقه و 30 سیکل در 94 c̊ با زمان یک دقیقه و 56 c̊ با زمان یک دقیقه و 72 c̊ با زمان 2 دقیقه و 20 ثانیه و طویل سازی نهایی با دمای 72 c̊ به مدت 5 دقیقه انجام شده است.

محصول PCR به وسیله ی الکتروفورز در 1 % (w/v) از ژل آگاروز رویت شد. و باندی با اندازه ی 1845 bp مشاهده گردید. بعد با استفاده از کیت، محصول PCR تخلیص شد. برش محصول PCR با استفاده از Xho I و BamH I صورت گرفت و ژن برش خورده در وکتور PET_{28a} (+) کلون گردید. سازه ی جدید PET_{28a} (+) btuB – نامیده شد و DNA نوترکیب به داخل (DE_3) BL_{21} (به عنوان میزبان بیانی) ترانسفورم گردید. کلنی ها از محیط LB Agar حاوی $50\ Mg\ mL^{-1}$ از کانامایسین انتخاب و بعد از کشت در محیط مایع حاوی کانامایسین به مقدار 1.5 cc به تیوپ اضافه شد و بعد از سانتریفیوژ رسوب حاصل با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید تخلیص گردید.

ORF تولید شده به وسیله ی آنزیم های محدودکننده و تعیین توالی تأیید گردید. (۸و۷)

بیان پروتئین BtuB

یک کلنی را وارد 5 mL از محیط کشت LB- Broth واجد 50 µl از آنتی بیوتیک کانامایسین کرده و محیط در دمای 37 c̊ با دور 220 rpm شیکر گردید. وقتی ODی محیط با طول موج 600 nm به حدود 0.6 رسید، 50 µL ایزوپروپیل D– تیوگالاکتوزید (IPTG) به محیط اضافه و محیط کشت در دمای 37c̊ به مدت 4-5h ساعت شیکر گردید و۵cc.۱از این محصول با دور 5000 rpm در دمای 4 c̊ به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ و پلت حاصله با بافر نمک فسفات (PH 7.4 , PBS) مخلوط شد و سلول ها به همراه sample buffer در دمای 100 c̊ به مدت 5 دقیقه لیز گردیدند. و همه ی پروتئین ها به وسیله ی SDS-PAGE روی ژل 10% آنالیز و با کوماسی بریلیانت بلو رنگ آمیزی و بعد با رنگزدایی، یک باند 66 کیلودالتونی در ژل مشاهده شد که مؤید تولید پروتئین BtuB است که در نمونه ی کنترل منفی غیر قابل شهود می‌باشد(۸و۵و۲).

یافته ها:

- تکثیر ژن btuB با استفاده از PCR

ژن btuB از Ecoli O_{157} H_7 با استفاده از PCR تکثیر و در وکتور PET_{28a} (+) کلون گردید. (شکل 1. a) سازه ی حاصله به وسیله ی آنالیز آنزیم محدود کننده و تعیین توالی DNA تأیید شد.

btuB – $PET_{28a(+)}$ در Ecoli BL_{21} (DE_3) ترانسفورم و بیان btuB نوترکیب همراه با C-Terminal His-Tag با موفقیت انجام شد.

- آنالیز آنزیمی ژن btuB

ژن btuB با استفاده از آنزیم EcoR I هضم گردید و چون دارای سایت برش روی نوکلئوتید شماره های 1192 (GAATTC) می باشد. دو باند با اندازه های 1192bp , 653bp مشاهده شد که صحت ژن btuB کلون شده در PET_{28a} (+) را نشان می دهد. (شکل 1.b)

- بیان پروتئین BtuB

پلت ها بعد از افزودن IPTG القاء گردیدند و پروتئین نوترکیب BtuB تولید شد. بعد از القا با IPTG ، وزن مولکولی پروتئین حاصل از ترانسفورم در Ecoli (DE_3) Bl_{21} در حدود 66 کیلو دالتون نشان داده شد. (شکل 1.c)

بحث:

btuB ژنی است با اندازه ی 1845 نوکلئوتید که کد کننده ی پروتئین BtuB که وابسته به غشای خارجی است می باشد و در جذب ویتامین B_{12} به فضای پری پلاسمی، در باکتری Ecoli ضروری است(۱۱و۶و۳).

BtuB از 594 اسید آمینه تشکیل شده و آنالیز توالی DNA مؤید حضور ترادف نشانه ی 20 اسید آمینه ای است که در طی عبور از غشای سیتوپلاسمی برداشته می شود. این پروتئین دارای 11 لوپ است که اندازه ی لوپ

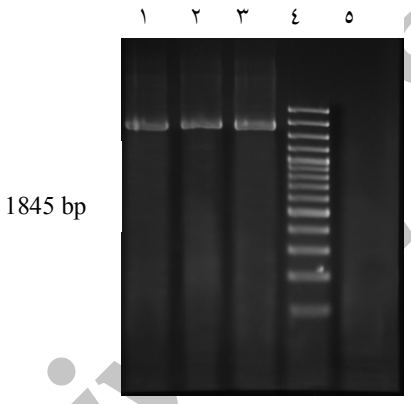
Archive of SID

www.SID.ir

ها در آن از 19-9 باقیمانده‌ی اسیدآمینه با هم فرق دارند(۳)، BtuB دارای وزن مولکولی در حدود 66 KD است(٤).

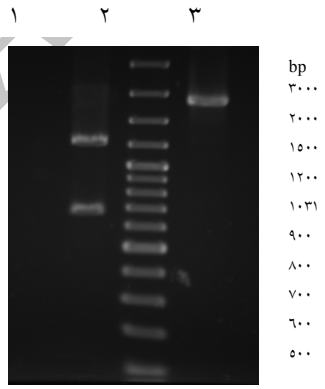
برای فراهم شدن B_{12} مورد نیاز سلول، این ماده باید از طریق غشای خارجی، فضای پری پلاسمی و غشای سیتوپلاسمی به سلول برسد. ویتامین B_{12} برای عبور از غشای خارجی از رسپتور Bt uB استفاده می کند که یک مسیر وابسته به انرژی را از طریق TonB- EXb B- EXb D از غشای سیتوپلاسمی دریافت می کند. بعد وارد پری پلاسم و در آنجا به پروتئین اتصالی BtuF متصل می شود(۱۰و۹و۳)و به وسیله ی آن به انتقال دهنده ی ABC منتقل می شود که این انتقال دهنده از پرمئاز BtuC و BtuD تشکیل شده که BtuC دارای جایگاه اتصال به ATP است که انرژی انتقال را با هیدرولیز ATP فراهم می کند و مسیر برای ورود ویتامین B_{12} به داخل سلول تسهیل گردد.

در مطالعه ای که در سال 1985 انجام شد قطعه ی 9.1 کیلوبازی حاوی ژن btuB از فاژ انتقال به داخل پلاسمید کلون گردید ولی در این تحقیق با طراحی پرایمرهای اختصاصی Reverse و Forward و به کمک آنزیم های محدود کننده Bam HI و XhoI ، ORF توانستیم ژن 1845 bp ای را تکثیر و پروتئین BtuB را تولید کنیم.



شکل1a : الکتروفروگرام ژن btuB پس از تکثیر بوسیلهPCR

ستون ۱ کنترل منفی
ستون ۲ مارکر ملکولی
PCR ستون های ۳، ٤، ٥ و ٦ محصولات

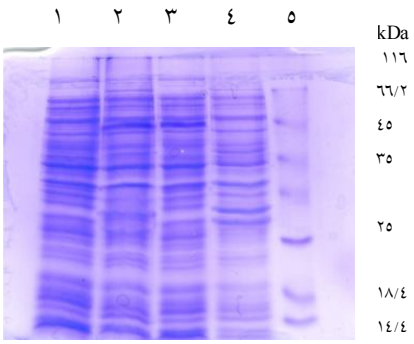


ستون ۱ هضم محصول PCR با آنزیم محدود کننده EcoRI
ستون ۲ مارکر مولکولی
ستون ۳ محصول PCR قبل از هضم

شکل 1b :الکتروفروگرام هضم آنزیمی ژن **btuB**

Archive of SID

www.SID.ir



ستون۲و۳ کنترل مثبت

ستون ۱و٤ کنترل منفی

ستون ۵ مارکر پروتئین

شکل۱c : SDS-PAGE آنالیز کل پروتئین

نتیجه گیری :

با توجه به کارهای انجام شده ثابت گردید که ژنbtuB دارای ۱۸٤٥bp بوده و پروتئین نوترکیب تولیدی فقط یک باند ٦٦KDa ای را بروز می دهد که نشان دهنده ی وزن مولکولی پروتئینBtuB است.

تقدیر و تشکر:

کمال تشکر و قدر دانی خود را از مسئول محترم آزمایشگاه های دانشگا ه آزاد اسلامی واحد بابل سرکار خانم فریبا احمدی وجناب دکتر ذوالفقاری مدیر گروه رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و جناب دکتر محمد سلیمانی درجاق عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد قم وبخصوص جناب دکتر مجید علیپور مدیر گروه رشته ی علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد بابل و تمامی عزیزانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش یارای ما بودند،اعلام می نمایم.

فهرست مراجع:

1- Anastassia,M.,christion.K ,2008, ATP-binding Cassette transporters in Esherichia coli,, jornal homepage:www.elsevier.com/locate/bbamem , Biochimica et Biophysica Acta 1778(2008)1757-1771

2- Cohen, S. N., A.C.Y.Chang, and L.Hsu, 1972. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in bacteria : Genetic Transformation of Escherichia coli by R-Factor DNA. Proc.Nat.Acad. Sci. vol.69, No.8: 2110- 2114.

3- D.krewulak ,K., J.V. Hans,2007, Structural biology of bacterial iron uptake,www.elsevier.com/locate/bbamem , Biochimica et Biophysica Acta1778(2008)1781-1804

4- D.shultis, D., D.P.Michael urdy, N.b.Christian , C.W.Michael, 2006,Outer Membrane Active Transport: Structur of the BtuB:TonB Complex. Advancement of Science,vol 312

5- GIOVANNA -LUZZI AMES,1974, Resulation of Bacterial Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis on Slabs, the jornal of Biological chemister,VOL.249,NO2,

6- Heller, K., J.M.Barbara, and J.K. Robert , 1985,Cloning and Experition of the Gene for the Vitamin B12 Receptor Protein in the outer Membrane of Escherichia coli , jornal of Bacteriology, vol,161, NO, 3

7-Helling, R. B., H. M. Goodman, and H. W. Boyer, 1954. Analysis of Endonuclease R. EcoRI Fragments of DNA from lambdoid Bacteriophages and other viruses

Archive of SID

www.SID.ir

by Agarose-Gel Electrophoresis. Journal of Virology. Vol. 14, No.5: 1235-1244

8-Micklos, D.A., G.A.Freyer, and D.A. crotty, 2002. DNA science. Cold spring Harbor laboratory press, New York

9- Postle ,K., A.L.Ray,2006, TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes , Biometals,Springer Scince+ Business Media B.V.2007

10-P.chimenton,D., J.k.robert,and C.w. Michel,2005,Comparative Structural Analysis of TonB-Dpendent Outer Membrane Transporters: Implications for the Transport Cycle , PROTEINS:Structure,function,and Bioinformatics 59:240-251

11- Ravnum,S., and D.I.Andersson,1997,Vitamin B12 repression of the btuB gene in Salmonella typhimurium is mediated via a translational control which reuires leader and coding sequence.Molecular microbiology(23)1997(1),35-42

Archive of SID

www.SID.ir