مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره سوم (پیاپی ۱۶) پاییز ۱۳۹۲
صفحات ۱۹۷-۱۸۸

Original Article

ساخت شاتل وکتور بیانی برای باکتری های *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سابتیلیس*

محمدرضا رشیدی[۱]، مجید مقبلی[۲*]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *باسیلوس سابتیلیس* به دلیل ویژگی های غیربیماری زا بودن و توانایی ترشح مقادیر بالای پروتئین، به عنوان یک میزبان خوب برای کلون سازی ژن و بیان پروتئین در نظر گرفته می شود. اما کارایی انتقال DNA پلاسمیدی اتصال یافته به درون سلول های *باسیلوس سابتیلیس* مستعد در مقایسه با سلول های *اشریشیا کلی* مستعد شده با کلرید کلسیم پایین می باشد. بنابراین بهتر است مراحل اولیه کلون سازی با استفاده از یک شاتل وکتور در *اشریشیا کلی* انجام شود و سپس *باسیلوس سابتیلیس* با مقدار زیادی از وکتور هیبرید ترانسفورم گردد. این مطالعه با هدف ساخت یک شاتل وکتور با استفاده از پلاسمیدهای pWB980 و pET-16b به منظور کلون سازی و بیان ژن در *باسیلوس سابتیلیس* انجام شد.

مواد و روش ها: پلاسمید pWB980 به روش لیز قلیایی از میزبان خود جداسازی شد. به منظور دست یابی به قطعه مورد نظر با استفاده از آنزیم های برش دهنده *Eco*RI و *Sna*BI هضم دوگانه انجام شد. سپس یک توالی نوکلئوتیدی ویژه از پلاسمید pET-16b نیز به وسیله ی PCR تکثیر شد و مورد هضم دوگانه قرار گرفت. در مرحله بعد با انجام واکنش اتصال بین این دو قطعه پلاسمیدهای ایجاد شده به *اشریشیا کلی* TOP10 منتقل شدند. در نهایت سلول های دارای شاتل وکتور غربالگری و پس از استخراج پلاسمید با یک روش مناسب به *باسیلوس سابتیلیس* WB600 منتقل گردید.

یافته ها: شاتل وکتور حاصله به سادگی در هر دو میزبان همانندسازی کرد. این پلاسمید در *باسیلوس سابتیلیس* ثبات مناسبی از خود نشان داد که در حفظ آن در میزبانش بسیار سودمند است.

نتیجه گیری: شاتل وکتور pMR12 به دلیل داشتن ۸ جایگاه منحصر به فرد در پلی لینکر و با اندازه مناسب ۴/۵ kb می تواند یک سیستم کارآمد به منظور کلون سازی آسان ژن محسوب گردد. این اولین گزارش از ساخت یک شاتل وکتور بیانی برای *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سابتیلیس* در ایران می باشد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سابتیلیس*، کلون سازی، شاتل وکتور.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۲

مقدمه

باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtillis*) یک باکتری خاک زی، گرم مثبت و میله ای شکل می باشد که به صورت طبیعی مقادیر فراوانی از پروتئین های مختلف را با غلظت های بالا به درون محیط کشت ترشح می نماید. در مقایسه با باکتری های گرم منفی شناخته شده مانند *اشریشیا کلی* (*E. coli*)، باکتری *باسیلوس سابتیلیس* به عنوان یک ارگانیسم GRAS (عموماً ایمن شناخته شده) در نظر گرفته می شود. به همین دلیل

*) آدرس برای مکاتبه: دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۲۲۲۱۸۶۱۲ پست الکترونیک: moghbeli552@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

امروزه این باکتری به عنوان یک میزبان خوب به منظور کلون سازی و بیان ژن برای تولید پروتئین های هترولوگ ترشحی مورد توجه بسیاری قرار گرفته است (۱).

تاکنون از باکتری های گرم منفی و مثبت و پلاسمیدهای آن ها برای کلون سازی و بیان اغلب ژن ها استفاده شده است. با این وجود برای سیستم های میزبان- وکتور در *باسیلوس ساتیلیس*، تاکنون دو عیب عمده گزارش شده است:

اول اینکه، DNA پلاسمیدی جز در موارد خاص ناپایدار می باشد و حتی DNA کلون شده در پلاسمید نیز ناپایدار است (۷-۲). دوم این که، کارایی انتقال DNA پلاسمیدی‌حاصل از واکنش اتصال (Ligation) به درون سلول های مستعد *باسیلوس ساتیلیس* در مقایسه با سلول های *اشریشیا کلی* مستعد شده با کلرید کلسیم پایین می باشد (۸). زیرا این انتقال وابستگی زیادی به شکل و نسبت پلاسمیدهای موجود در محلول DNA پلاسمیدی جدا شده دارد (۹ و ۱۰).

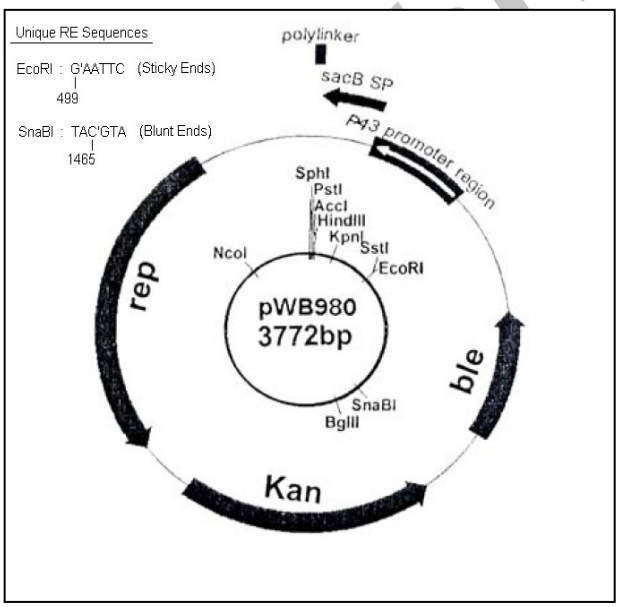
به منظور غلبه بر مشکلات یاد شده از پروتوپلاست استفاده می شود (۱۱). با این وجود فرآیند تکنیکی موثر در انتقال به پروتوپلاست در مقایسه با سیستم سلول مستعد ایجاد شده با روش اسپیزیزن (Spizizen) همیشه ساده نمی باشد (۱۲). هدف از این پژوهش، ساخت شاتل وکتوری است که قادر به تکثیر در هر دو باکتری *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سابتیلیس* باشد و بتواند معایب موجود در سیستم های میزبان- وکتور *باسیلوس سابتیلیس* را رفع نماید.

مواد و روش‌ها

الف) پلاسمیدها، سویه های باکتریایی و شرایط رشد: *باسیلوس سابتیلیس* سویه WB600 و *اشریشیا کلی* سویه TOP10 مورد استفاده در این پژوهش به ترتیب توسط آقای دکتر باقر یخچالی و دکتر روح ا... درستکار اهدا گردیدند.

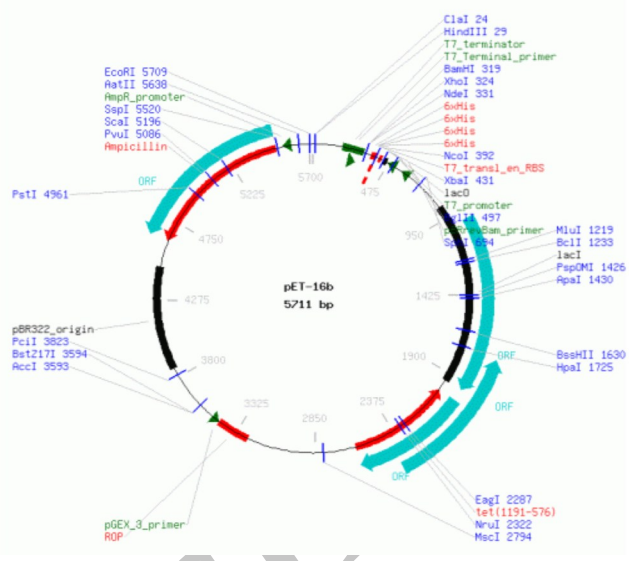
تمام سویه ها بر روی محیط های کشت LB Agar (Quelab, Canada) و یا LB broth (Quelab, Canada) که در صورت نیاز دارای آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (۱۰۰ µg/ml) و کانامایسین (۱۰ µg/ml) (Sigma, USA) بودند، کشت داده شدند. پلاسمیدهای مورد استفاده نیز pET-16b (شکل ۱) به عنوان منشأ قطعه مورد نیاز برای تکثیر در *اشریشیا کلی* و پلاسمید pWB980 (شکل ۲) به عنوان منشأ قطعه مورد نیاز برای تکثیر در *باسیلوس سابتیلیس* بودند.

ب) جداسازی پلاسمید pWB980 و هضم برشی: جداسازی پلاسمید از *باسیلوس سابتیلیس* سویه WB600 با استفاده از روش های استاندارد با تغییرات مختصری انجام گردید (۱۳ و ۱۴). پلاسمید pWB980 توسط دو آنزیم برش دهنده ی *Eco*RI (Vivantis, Malaysia) و *Sna*BI (Fermentas, Lithuania) مطابق با روش درج شده در کاتالوگ آنزیم ها برای دست یابی به قطعه مورد نظر شامل مبدا همانندسازی (*ori*) باسیلوسی به منظور تکثیر پلاسمید در *باسیلوس*، مارکر مقاومت به کانامایسین، جایگاه کلون سازی چندگانه و پروموتر قوی برای بیان ژن در *باسیلوس سابتیلیس* برش داده شد. قطعه واجد ژن های مورد نظر به وسیله کیت جداسازی DNA از ژل (Vivantis, Malaysia) مطابق با روش شرکت سازنده کیت خالص سازی گردید.



شکل ۱: پلاسمید pWB980، محل برش آنزیم ها بر روی شکل نشان داده شده است.

www.SID.ir



شکل ۲: پلاسمید pET16b

ج) انجام PCR بر روی pET-16b و هضم برشی: به منظور جداسازی قطعه حامل *ori* برای تکثیر پلاسمید در *اشریشیا کلی* (pBR322 ori) و مارکر مقاومت به آمپی سیلین (Amp^r) از پلاسمید pET-16b، واکنش PCR بر روی این پلاسمید به کمک پرایمر F با ترادف ۲۲ جفت بازی به صورت 5'-CCAGGAATTCCGTAAAAAGGCC-3' و پرایمر R با ترادف ۲۸ جفت بازی به صورت 5'-CTAAATACGTATTCAAATATGTATCCGC-3' (Kopenhagen, Danmark) انجام گردید. پرایمرها به گونه ای طراحی گردیدند تا محصول PCR دارای دو انتهای *SnaBI* و *Eco*RI باشد (در زیر محل کد کننده جایگاه ها خط کشیده شده است).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA ی الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر dNTP Mix، ۲میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱میکرولیتر(۱ واحد) آنزیم KOD DNA Polymerase (زیست فناوری کوثر، ایران) و ۱۵/۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Hettich, Germany) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

سپس بر روی محصول PCR با دو آنزیم یاد شده واکنش هضم دو گانه انجام گردید. محصول هضم شده پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ ، به وسیله کیت جداسازی DNA از ژل استخراج گردید.

د) واکنش اتصال برای ساخت شاتل وکتور و انتقال به اشریشاکلی: واکنش اتصال بین ۱۰۰ نانوگرم از قطعه حاصل از پلاسمید pWB980 (حدود ۲/۸ kb) و ۱۸۰ نانوگرم از محصول PCR (حدود ۱/۷ kb) برقرار گردید و سپس با روش استاندارد (۱۶) به باکتری *اشریشیا کلی* Top10 انتقال داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط انتقال بر روی محیط کشت LB Agar حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ µg/ml) کشت داده شد. کلنی های رشد یافته جداگانه کشت داده شدند و پلاسمید آنها استخراج گردید. از میان این پلاسمیدها، شاتل وکتور pMR12 بر اساس اندازه و تجزیه و تحلیل با آنزیم های برش دهنده انتخاب شد.

ه) ارزیابی قطعات متصل شده در پلاسمید pMR12: پلاسمید به دست آمده از مرحله قبل به وسیله آنزیم های *Sna*BI و *BamHI* مورد هضم قرار گرفت. در صورتی که جهت دو قطعه متصل شده بر اساس طراحی مورد نظر باشد، پس از الکتروفورز محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز، انتظار می رود که دو باند با اندازه های ۲/۲ kb و ۲/۳ kb حاصل گردد. به منظور تایید نهایی بر روی پلاسمید pMR12 با استفاده از پرایمرهای قبلی PCR گذاشته شد.

و) انتقال پلاسمید pMR12 به باسیلوس سابتیلیس: به منظور تهیه *باسیلوس سابتیلیس* حامل شاتل وکتور pMR12، یک کلنی تک از *باسیلوس سابتیلیس* WB600 بر روی پلیت LB Agar کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری گردید. سپس مقدار یک میلی لیتر از محلول OTB استریل: (0.75 g yeast extract; 8 g glucose; 1.0 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$; pH 7.0 در 1000 ml) درون یک

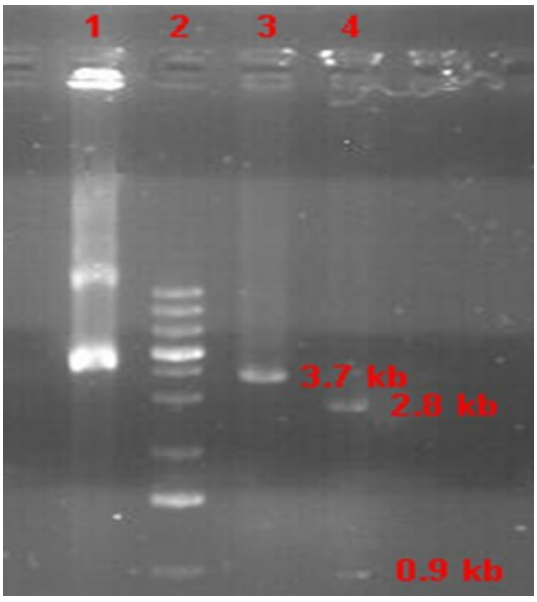
Archive of SID

www.SID.ir

میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل ریخته شد و با پیپت پاستور استریل آنقدر کلنی به محلول تلقیح گردید تا جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۸ برسد.

سپس ۵ µl از پلاسمید pMR12 به محتویات لوله افزوده و به مدت ۲ ساعت بر روی انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه با دور ۱۸۰rpm قرار داده شد. در نهایت ۱۰۰ µl از سوسپانسیون، بر روی پلیت LB Agar حاوی کانامایسین (۱۰ µg/ml) پخش گردید. پلیت به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. از یکی از کلنی های رشد یافته بر روی محیط، جداسازی پلاسمید انجام گردید و سپس بر روی آن واکنش هضم با آنزیم *Sna*BI بررسی شد.

ی) پایداری شاتل وکتور در باسیلوس سابتیلیس: باسیلوس سابتیلیس حامل پلاسمید pMR12، ۲۰ بار بر روی پلیت حاوی کانامایسین (۱۰ µg/ml) کشت داده شد. پس از هر مرحله کشت دادن، از باکتری رشد کرده جداسازی پلاسمید انجام و سپس هضم آنزیمی با آنزیم های *Eco*RI و *Sna*BI مورد بررسی قرار گرفت.

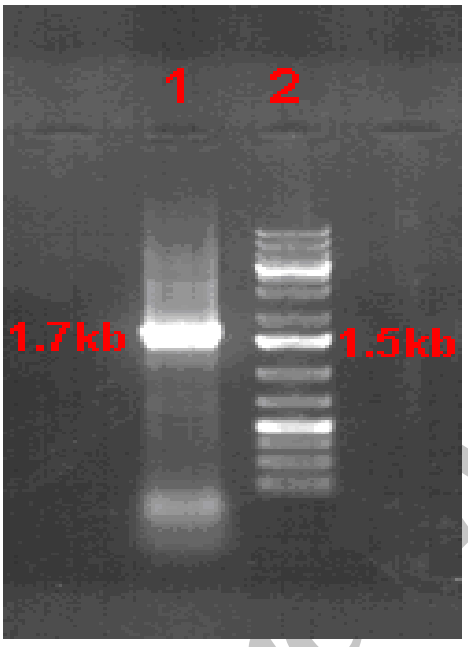


شکل۳: جداسازی و هضم آنزیمی پلاسمید pWB980. ۱) پلاسمید pWB980، ۲) مارکر 1kb(Fermentas)، ۳) پلاسمید pWB980 هضم شده با آنزیم *SnaBI*، ۴) پلاسمید pWB980 هضم شده با آنزیم *Sna*BI و *EcoRI*.

یافته ها

در شکل ۳ نتایج حاصل از جداسازی پلاسمید pWB980 و هضم آنزیمی آن با آنزیم های مختلف و باند ۲/۷ kb مورد نظر نشان داده شده است. سپس باند یاد شده از روی ژل جداسازی و خالص گردید.

شکل ۴ نیز نتایج PCR بر روی پلاسمید pET16b و باند مورد انتظار حدود ۱/۷ kb را نشان می دهد.

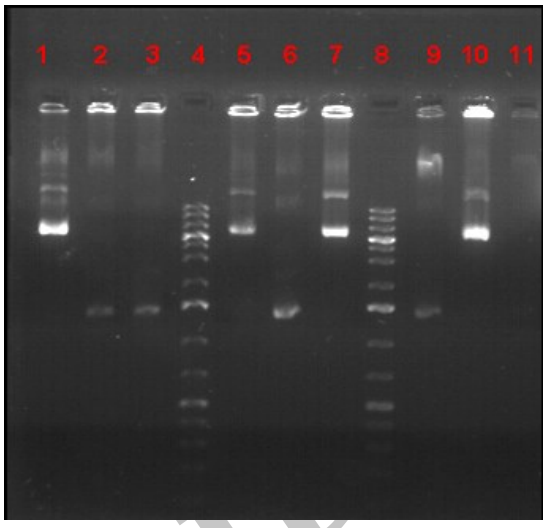


شکل۴: محصول PCR بر روی پلاسمید pET16b. ۱) محصول PCR، ۲) مارکر 1kb (Fermentas).

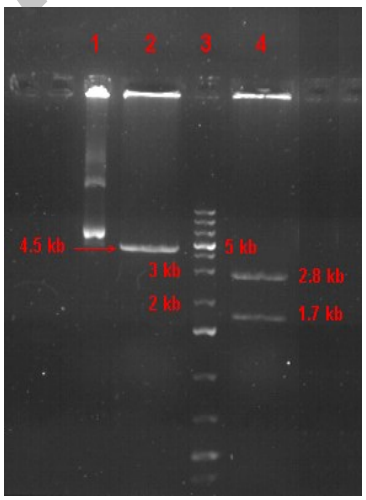
از انتقال واکنش اتصال به باکتری *اشریشیاکلی* تعداد ۶۵ کلنی مشاهده گردید. تعداد ۹ کلنی دوباره کشت داده شد و از آنها پلاسمید استخراج گردید (شکل ۵). از این تعداد، ۵ کلنی دارای پلاسمیدهای با اندازه مورد انتظار (۴/۵ kb) بودند. همان طور که در شکل ۶ مشخص است از هضم با آنزیم های *Eco*RI و *SnaBI* بر روی پلاسمید جداسازی شده از کلنی شماره ۸ دو قطعه ۱/۷ kb و ۲/۸ kb و از هضم تک آنزیمی آن یک قطعه ۴/۵ kb به دست آمد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵: محصول استخراج پلاسمید از کلنی ها. ۱) کلنی شمارهٔ ۱، ۲) کلنی شمارهٔ ۲، ۳) کلنی شمارهٔ ۳، ۴) مارکر 1kb، ۵) کلنی شمارهٔ ۴، ۶) کلنی شمارهٔ ۵، ۷): کلنی شمارهٔ ۶، ۸) مارکر 1kb، ۹) کلنی شمارهٔ ۷، ۱۰) کلنی شمارهٔ ۸، ۱۱) کلنی شمارهٔ ۹.

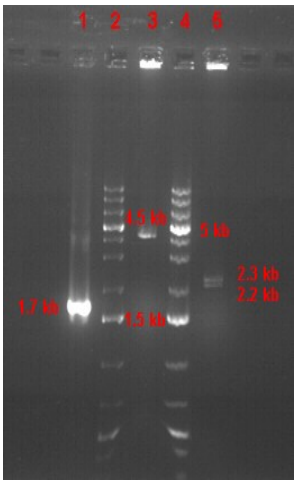


شکل ۶: هضم آنزیمی پلاسمید. ۱) پلاسمید جداسازی شده از کلنی شمارهٔ ۸، ۲) محصول هضم پلاسمید با آنزیم *SnaBI*، ۳) مارکر 1kb، ۴) محصول هضم پلاسمید با آنزیم *Sna*BI و *Eco*RI.

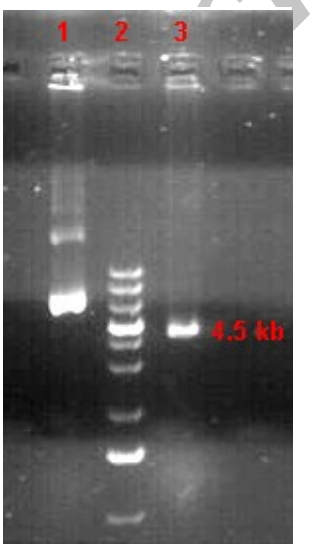
با توجه به شکل ۷، پلاسمید به دست آمده، پلاسمید مورد نظر می باشد. زیرا هم اندازهٔ مورد انتظار را داشت (۴/۵ kb) و هم جهت گیری اتصال آن صحیح بود. زیرا از هضم آنزیمی این پلاسمید با آنزیم های *Sna*BI و *Bam*HI باندهای مورد نظر ۲/۲ kb و ۲/۳ kb به دست آمد.

پلاسمید حاصل به صورت pMR12 نام گذاری شد.

پس از انتقال پلاسمید pMR12 به *باسیلوس ساتیلیس* سویه WB600، بر روی پلیت تعداد ۱۱ کلنی رشد کرد. به دنبال جداسازی پلاسمید از یکی از کلنی ها و هضم تک آنزیمی آن با آنزیم *SnaBI*، مطابق انتظار باند ۴/۵ kb حاصل گردید (شکل ۸).



شکل ۷: محصول PCR و هضم آنزیمی پلاسمید. ۱) محصول PCR بر روی پلاسمید حاصل از کلنی شماره ۸، ۲ و۴) مارکر 1kb،۳) پلاسمید جدا شده از کلنی شماره ۸، ۵) محصول هضم با دو آنزیم *Sna*BI و *Bam*HI بر روی پلاسمید کلنی ۸.



شکل ۸: پلاسمید pMAR جدا شده از *باسیلوس ساتیلیس*. ۱) پلاسمید pMR12، ۲) مارکر 1kb، ۳) محصول هضم بر روی پلاسمید pMR12 با *SnaBI*.

Archive of SID

www.SID.ir

پلاسمید جدا شده پس از هر بار پاساژ بر روی محیط کشت مانند پلاسمید اولیه دارای اندازه ۴/۵ kb بود. همچنین پس از هضم دو گانه آنزیمی قطعات مورد انتظار ۱/۷ kb و ۲/۸ kb شناسایی گردد. در نهایت مشخص گردید که این پلاسمید دارای پایداری مناسب در *باسیلوس سابتیلیس* می باشد.

بحث

سولیوان (Sulivan) و همکاران در سال ۱۹۸۴ و ترامبل (Trumble) و همکاران در سال ۱۹۹۲ روش جداسازی پلاسمید از *باسیلوس* را بر پایه استفاده از شیب غلظتی سزیوم کلراید- اتیدیوم بروماید (CsCl-EtBr) و روش جداسازی دیگری را با استفاده از جوشاندن ارائه نمودند (۱۷ و ۱۸). در این تحقیق جداسازی پلاسمید از *باسیلوس سابتیلیس* بر پایه استفاده از لیز قلیایی و با ایجاد تغییراتی به ویژه در استفاده از لیزوزیم انجام گرفت که نسبت به روش CsCl-EtBr ساده تر و کم هزینه تر می باشد (۱۹و۲۰). هرچند که پلاسمید جداسازی شده از کیفیت پایین تری برخوردار بود.

در سال ۱۹۹۲، بروکنر (Brukner) شاتل وکتوری را بر اساس یک ساختار پایه ای شامل اجزای پلاسمید باکتری گرم مثبت pUB110 و پلاسمید باکتری گرم منفی pBR322 ساخت (۱۹). ژن های *bla* و *ori* از وکتور pBR322 و ژن های مقاومت به کانامایسین و نئومایسین و *ori* گرم مثبت از وکتور pUB110 گرفته شدند. به دلیل پایداری این وکتور از نظر ساختاری، وی تصمیم گرفت تا مجموعه ای از شاتل وکتورها را بر اساس این وکتور بسازد. به این ترتیب که ژن *bla* و پلی لینکر وکتور pRB273 را با ناحیه مشابه در pUC18 جایگزین نمود. در وکتور حاصله (pRB373) تعداد ۱۱ جایگاه برش منحصر بفرد وجود دارد.

اما در مطالعه حاضر به منظور ساخت شاتل وکتور pMR12، ژن *bla* و *ori* برای *اشریشیا کلی*، از وکتور pET-16b و ژن km^R و *ori* باکتری *باسیلوس سابتیلیس* از پلاسمید pWB980 گرفته شد. وکتور حاصله (pMR12)، واجد ۸ جایگاه برش منحصر بفرد برای کلون سازی ژن می باشد. در مطالعه بروکنر به منظور بیان ژن های فاقد پروموتر، یک پروموتر مشتق از *باسیلوس سابتیلیس* با نام *vegII* به درون وکتور pRB373 وارد شد که رونویسی را به سمت پلی لینکر هدایت کند. در شاتل وکتور pMR12، نیز پروموتر قدرتمند P43 از طریق برش پلاسمید pWB980 به شاتل وکتور وارد شد تا رونویسی از ژن های فاقد پروموتر را انجام دهد.

سولیوان (Sulivan) و همکاران در سال ۱۹۸۴ از الحاق کامل pUC9 و pUB110 شاتل وکتور pMK3 را ساختند (۱۶). اندازه وکتور حاصله برابر با ۷/۲ kb شد. اما در مطالعه حاضر، تنها قطعاتی که برای عملکرد صحیح شاتل وکتور ضروری بودند به هم متصل شدند. این مساله کاهش چشمگیر اندازه شاتل وکتور به ۴/۵ kb را به دنبال داشت.

بر اساس گزارش تریو-کوت (Trieu-Cuot) و همکاران در سال ۱۹۹۱ در مورد شاتل وکتور قابل انتقال pAT187 ، راحتی کار با این وکتور (مشتق از pAT18) در حد متوسط می باشد (۲۰). زیرا این پلاسمید تنها دو جایگاه کلون سازی را داشت و ژن مقاومت به آن در باکتری های گرم مثبت های بی هوازی به صورت ضعیفی می تواند انتخابی باشد. از جمله مزایای یاد شده برای pAT18، داشتن پلی لینکر مناسب، انتخاب کلنی ها بر اساس فرآیند تکمیل *lacZ* و تعداد نسخه های زیاد می باشد.

pMR12 نیز دارای پلی لینکر مناسب (۸ جایگاه منحصر به فرد) و تعداد نسخه زیاد در *اشریشیا کلی* می باشد. زیرا *ori* مربوط به تکثیر آن از پلاسمید pET-16b گرفته شده که حدود ۴۰ عدد در هر سلول ایجاد می کند. از این رو آن را می توان در گروه پلاسمید های دارای نسخه زیاد طبقه بندی نمود. همچنین سولیوان (Sulivan) و همکاران در سال ۱۹۸۴، از *اشریشیا کلی* JM83 و *باسیلوس سابتیلیس* YB886 به عنوان میزبان استفاده کردند (۱۶).

ناگامی (Nagami) و همکاران در سال ۱۹۸۸، از میزبان *اشریشیا کلی* MC1061 برای بیان ژن *lacZ* و *باسیلوس سابتیلیس* MI112 استفاده نمودند (۲۱). ترامبل (Trumble) و همکاران در سال ۱۹۹۲ نیز از سویه های HB101، TB1 و

Archive of SID

www.SID.ir

MS229/*اشریشیا کلی* و سویه BR151 *باسیلوس سوبتیلیس* استفاده کردند (۱۸).

هارت (Hardt) و آلونسو (Alonso) در سال ۱۹۸۷ از *باسیلوس سوبتیلیس* سویه pLS1 و *اشریشیا کلی* سویه HB101 استفاده نمودند (۲۲). در این مطالعه از *اشریشیاکلی* TOP10 به دلیل کارایی انتقال بالا (10^9 cfu/µg plasmid) و *باسیلوس سوبتیلیس* WB600 که میزبان مناسبی برای کلون سازی و بیان پلاسمیدهای باکتری های گرم مثبت است استفاده شد. اغلب مشاهده شده قطعاتی که به صورت پایدار در یک پلاسمید حفظ می شوند، وقتی به یک وکتور دیگر منتقل می شوند ایجاد بی ثباتی ساختاری می کنند. بعضی اوقات حتی معکوس شدگی قطعه الحاق شده نیز زیان آور است (۱۹). در تحقیق حاضر به دلیل رعایت جهت ژن های واقع بر روی قطعه الحاق شده ۱/۷ kb، ثبات ساختاری در شاتل وکتور pMR12 مشاهده شد. زیرا پس از ۲۰ پاساژ و نهایتاً استخراج پلاسمید و انجام هضم آنزیمی دو گانه، تغییری در الگوی باندهای حاصل از هضم برشی نسبت به حالت پیش بینی شده مشاهده نگردید.

نتیجه گیری

تاکنون تعداد زیادی شاتل وکتور برای *اشریشیا کلی* و باکتری های مختلف مانند *باسیلوس سابتیلیس* ساخته شده است تا امکان کلون سازی و بیان ژن ها در باکتری های مختلف به جز *اشریشیا کلی* وجود داشته باشد (۲۴-۲۲). در این مطالعه برای اولین بار در ایران شاتل وکتور واجد توانایی تکثیر در دو باکتری *باسیلوس سابتلیس* و *اشریشیا کلی* ساخته شد تا کلون و بیان ژن های مختلف را در *باسیلوس سابتیلیس* تسهیل نماید. این شاتل وکتور به دلیل دارا بودن ۸ جایگاه کلون سازی منحصر به فرد و داشتن اندازه مناسب ۴/۵ kb می تواند به عنوان یک سیستم برتر کلون سازی و بیان ژن در کشور معرفی گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین و کارکنان دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان به دلیل فراهم آوردن امکانات مورد نیاز برای انجام این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Yamane K, Bunai K, Kakeshita H. Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*. Biosci Biotechnol Biochem. 2004; 68: 2007-2023.
2. Clewell DB, Yagi Y, Tomich P. Amplification of drug resistance in relation to pAMa in *Streptococcus faecalis*, in Mitsuhasi, S. 2nd ed. University Park Press. Baltimore; 1979.
3. Gryczan TJ. Contente S, Dubnau D. Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. J Bacterial. 1978; 134: 318-329.
4. Kreft J, Burger KJ, Goebel W. Expression of antibiotic resistance genes from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet. 1983; 190: 384-389.
5. Ostroff GR, Pene JJ. Molecular cloning with bifunctional plasmid vectors in *Bacillus subtilis*, I. Construction and analysis of *B. subtilis* clone banks in *Escherichia coli*. Mol Gen Genet. 1984; 193: 299-305.
6. Ostroff GR, Pene JJ. Molecular cloning with bifunctional plasmid vectors in *Bacillus subtilis*, II. Transfer of sequences propagated in *Escherichia coli* to *B. subtilis*. Mol Gen Genet.

Archive of SID

www.SID.ir

1984; 193: 306-311.

7. Uhlen M, Flock JI, Philipson L. RecE independent deletions of recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*. Plasmid. 1981; 5: 161-169.

8. Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci. USA. 1972; 69: 2110-2114.

9. Canosi U, Morelli G, Trautner TA. The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. Mol Gen Genet. 1978; 166: 259-267.

10. De Vos WM, Venema G, Canosi U, Trautner TA. Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: fate of plasmid DNA. Mol Gen Genet. 1981; 181: 424-433.

11. Chang S, Cohen SN. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. Mol Gen Genet. 1979; 168: 111-115.

12. Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyrbonucleate. Proc Natl Acad. 1958; 44 (10):1072 -1078.

13. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol. 1981; 145(3): 1365-1373.

14. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Sci. USA. 1958.

15. Wu SC, Wong SL. Development of improved pUB110- based vectors for expression and excretion studies in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1999; 72 (1-2): 185-189.

16. Sullivan MA, Yasbin RE, Young FE. New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. Gene. 1984; 29: 21-26.

17. Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem. 1981; 114: 193-201.

18. Trumble WR, Sherf BA, Reasoner JL, Seward PD, Denovan BA, Douthart RJ, West JW. Protein expression from an *Escherichia coli* - *Bacillus subtilis* multifunctional shuttle plasmid with synthetic promoter sequences. Prot Exp Purif. 1992; 3: 169-177.

19. Bruckner R. A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Gene. 1992; 122: 187-192.

20. Trieu-Cuot P, Carlier C, Poyart-Salmeron C, Courvalin P. Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a *lacA* gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. Gene. 1991; 102: 99-104.

21. Nagami Y, Kimura M, Teranishi Y, Tanaka TB. Construction of a new shuttle expression vector for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* by using a polycistronic system. Gene. 1988;

Archive of SID

www.SID.ir

69: 59-69.

22. Leonhardt H, Alonso JC. Construction of a shuttle vector for inducible gene expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J Gen Microbiol. 1988; 134: 605-609.

23. Ehrlich SD, Niadudet B, Michel B. Use of plasmids from *Staphylococcus aureus* for cloning of DNA in *Bacillus subtilis*. Curr Top Microbiol Immunol. 1981; 96: 19-29.

24. Kreft J, Hughes C. Cloning vectors derived from plasmids and phage of *Bacillus*. Curr Top Microbiol Immunol. 1981; 96: 1-17.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 3, October 2013

Original Article

Construction of an expression shuttle vector for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

Mohammad Reza Rashidi[1], Majid Moghbeli[2]

[1]MSc, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives: *Bacillus subtilis* is considered as a suitable host for gene cloning and protein expression due to non-pathogenicity and ability to secrete high amounts of proteins. However, transformation efficiency of ligated plasmid DNA into competent cells of *B. subtilis* is low, as compared to that into $CaCl_2$ shocked cells of *Escherichia coli*. Therefore, cloning the target in *E. coli* using a shuttle vector before transfer into *B. subtilis* by a high amount of hybrid vector is more efficient. The aim of this study is construction a shuttle vector using pW980 and pET-16b plasmids for gene cloning and expression in *B. subtilis*.

Materials and Methods: pWB980 plasmid was isolated from its host using alkaline lysis method. It was undergone a double digestion to obtain the segment of interest using *EcoRI* and *SnaBI* enzymes. Then a special fragment of pET-16b plasmid was also amplified by PCR and was double digested. Ligation reaction was performed between these two segments and then it was transferred to *E. coli* TOP10. Following screening the cells containing shuttle vector, plasmid was extracted and was transferred to *B. subtilis* WB600 by an effective method.

Results: The resulting shuttle vector replicated easily in both hosts. It showed good stability in *B. subtilis,* which is helpful for its maintenance in its host.

Conclusion: In this study, the resulting shuttle vector - pMR12 - had 8 unique cloning site in its polylinker and a suitable size (5.4 kb), which make it possible to simply gene cloning into it. This is the first report of construction of an expression shuttle vector for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* in Iran.

Keywords: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, Cloning, Shuttle vector.

Correspondence to: Majid Moghbeli
Tel: +989122218612
E-mail: moghbeli552@gmail.com

Journal of Microbial World 2013, 6(3): 188-197.

www.SID.ir