کلون و بیان ژن رسپتور ویتامین B_{12} (*btu*B) از باکتری *E. coli* O_{157} H_7

مریم قاجار کوهستانی*[۱]، مجید علی پور[۲]، علی رضایی[۳]

۱و ۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران، صندوق پستی: ۷۵۵

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، دانشکده پرستاری مامایی، گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، صندوق پستی: ۳۶۴-۳۷۱۸۵

(*عهده‌دار مکاتبات- maryam.qajar@yahoo.com)

چکیده

ژن *btu*B از باکتری *E. coli* O157:H7 از ۱۸۴۵ جفت باز تشکیل شده است. این ژن پروتئین BtuB را کد می‌کند که پروتئین انتقال‌دهنده‌ی ویتامین B_{12} نامیده می‌شود. پروتئین BtuB برای جذب کوبالامین در باکتری *E. coli* ضروری است. این انتقال دهنده دارای دو بخش است: بخش بشکه‌ی بتا و بخش توپی. بخش توپی کانال بشکه‌ی بتا را مسدود می‌کند. ویتامین B_{12} در حضور کلسیم با گرایش زیاد به پروتئین BtuB جذب می‌شود. لوپ‌های خارج سلولی L2 و L3 به ویتامین B_{12} متصل می‌شوند. ژن کدکننده‌ی پروتئین BtuB از باکتری *E. coli* O157:H7 تکثیر گردید. این ژن بصورت پروتئین واجد His (6) –tagged در انتهای C کلون و بیان گردید. ژن *btu*B با طراحی پرایمر ویژه با PCR تکثیر می‌شود. محصول PCR و وکتور انتخابی با آنزیم‌های تحدیدی برش و به هم متصل می‌شوند و تولید سازه‌ای (Construct) را می‌کنند که به میزبان *E. coli BL21(DE3)* انتقال می‌یابند (Transformation)، سپس سلول‌های ترانسفورم شده پس از القا با IPTG و پس از آنالیز SDS-PAGE کل پروتئین فقط یک باند مشخص با وزن مولکولی ۶۶KDa را آشکار کرد. با خالص‌سازی پروتئین BtuB وزن مولکولی دقیق آن معین گردید. با توجه به اینکه این پروتئین دارای لوپ‌های خارج سلولی فراوانی می‌باشد از این رو یکی از اهداف این پژوهش تولید و شناسایی پروتئین اتصالی پری پلاسمی انتقال دهنده ویتامین B_{12} (BtuB) از باکتری *E. coli* O157:H7 و هدف دیگر تعیین وزن دقیق مولکولی پروتئین BtuB است.

کلمات کلیدی: ویتامین B_{12}، BtuB، *E. coli* O157 H7، سکون سازی.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

همه‌ی ارگانیسم‌ها به کوفاکتور ارگانومتالیک مثل کوبالامین نیاز دارند به طوری‌که آن را باید از منابع خارجی بدست آورند. چندین آنزیم، به کوبالامین به عنوان کوفاکتور نیاز دارند. باکتری‌های گرم منفی برای ورود مواد غذایی کم نیاز مانند کوبالامین از عرض غشای خارجی، نیاز به انتقال‌دهنده‌ی غشای خارجی، شیب الکتروشیمیایی در غشای سیتوپلاسمی وکمپلکس پروتئینی غشای داخلی TonB- EXb B- EXb D دارند. انتقال‌دهنده‌ی غشای خارجی BtuB ساختمان معمولی بشکه‌ی بتا دارد. این انتقال‌دهنده دارای دو دومین است:

۱- دومین بشکه‌ی بتای غشای خارجی که دارای ۲۲ رشته‌ی بتای غیرموازی است. ارتباط رشته‌های بتاء، به وسیله‌ی ۱۱ لوپ خارج سلولی طویل و پیچ‌های کوتاه پری‌پلاسمی برقرار می‌شود.

۲- دومین کرک یا توپی که کانال بشکه‌ی بتا را مسدود می‌کند. دومین کرک در N– ترمینال این پروتئین قرار گرفته است و دارای Ton B – Box است که در باقیمانده‌های ۱۲-۶ 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 می‌شود و به وسیله‌ی Ton B به غشای خارجی منتقل می‌شود.

لوپ‌های خارج سلولی L_2 و L_3 در اتصال به ویتامین B_{12} نقش دارند. ویتامین B_{12} بعد از عبور BtuB وارد پری پلاسم و در آنجا به پروتئین اتصالی BtuF متصل می‌شود و به وسیله‌ی آن به انتقال‌دهنده‌ی ABC منتقل می‌شود. این انتقال‌دهنده 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 می‌کند. ژن کدکننده‌ی این پروتئین از ۱۸۴۵ جفت باز تشکیل شده است.

در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۸۵ در ارتباط با ژن *btu*B انجام شد قطعه‌ی ۹/۱ کیلو بازی حاوی ژن *btu*B از فاژ انتقالی به داخل پلاسمید کلون گردید و در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ توسط Cadieux و همکاران (۳) انجام شد نشان داده شده است پلاسمیدهای واجد *btu*B پلی پپتیدی با وزن ملکولی ۶۶ کیلو دالتون را کد می‌کنند، و این پروتئین از ۵۹۴ اسید آمینه تشکیل شده است و دارای ترادف نشانه ی ۲۰ اسید آمینه‌ای است که در طی عبور از غشای سیتوپلاسمی برداشته می‌شود. اندازه لوپ‌ها در BtuB از ۱۹-۹ باقیمانده اسیدآمینه فرق می‌کند. در سال ۲۰۰۶، Cherezove و Martin (۴) ساختمان x-ray کریستالوگرافی چندین انتقال‌دهنده نشان‌دار که سطح اتصال سوبسترا از دومین کرک داخلی و لوپ‌های خارج سلولی را دارند نشان دادند و نتیجه‌گیری کردند که حذف لوپ‌ها با کاهش اتصال و انتقال کوبالامین همراه است. مشخص شده است که کمپلکس BtuB و TonB در حضور سوبسترای ویتامین B_{12} تشکیل می‌شود. در سال ۱۹۹۷ Ravnum و Andersson (۱۲) بررسی کردند که بیان ژن *btu*B از سالمونلاتیفی موریوم که برای انتقال ویتامین B_{12} مورد نیاز است با حضور ویتامین B_{12} خارجی مهار می‌شود و مشخص کردند که کنترل بیان این ژن هم در سطح رونویسی و هم در سطح ترجمه اعمال می‌شود. کنترل در سطح ترجمه نیاز به ترادف

Archive of SID

www.SID.ir

راهنما (Leader Sequeuce) و هم ترادف کد کننده (Coding) دارد. ژن *btu*B ابتدا به عنوان جایگاه جهش‌هایی معین شد که موجب مقاومت به باکتریوفاژ BF23 و کولیسین E می‌شده است. علت نامگذاری BtuB آن است که در انتقال ویتامین B_{12} نقش دارد.

از این‌رو هدف از انجام این پژوهش تولید و شناسایی پروتئین اتصالی پری پلاسمی انتقال دهنده ویتامین B_{12} (BtuB) از باکتری *E. coli* O157:H7 و هدف بلند مدت آن بررسی اثرات محافظتی پروتئین BtuB در مقابل دوز کشنده باکتری *E. coli* O157:H7 و سایر باکتری‌های گرم منفی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- مواد شیمیایی و آنزیم‌ها: آنزیم Taq Polymerase از شرکت ژن فن‌آوران، آنزیم T_4 Ligase از شرکت فرمنتاز، آنزیم‌های اندونوکلئاز محدودکننده از شرکت سیناژن و بقیه‌ی 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.

- سویه‌های باکتریایی، پلاسمید و محیط کشت: *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 از دانشگاه شاهد و *E. coli* BL_{21} (DE_3) از شرکت سیناژن و پلاسمید PET28a (+) محصول شرکت Novagen آمریکا بوده است.

محیط‌های کشت Luria- Bertani (LB) Broth یا LB-Agar برای رشد سویه‌های *E. coli* در دمای ۳۷°c استفاده شد. برای رشد *E. coli* ترانسفورم شده از محیط LB واجد ۵۰ $\mu g\ mL^{-1}$ آنتی بیوتیک کاناماسین استفاده گردید.

- **تکثیر ژن *btu*B:** برای تکثیر ژن *btu*B از *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 استفاده گردید. این DNA ژنومیک با استفاده از PCR 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 طویل‌سازی ژن *btu*B، و با حذف کدون خاتمه از انتهای ژن استفاده و توالی انتهایی His- tag از طریق وکتور اضافه گردید (فلش‌ها ترادف شناسایی آنزیم‌های محدود کننده BamHI و Xho I).

شرایط PCR: شامل ۵μL (۱۰۰ng) از DNA ، 1μL از هر پرایمر (۲۰ پیکومول)، ۰/۲ μM از dNTP، ۱/۵mM از $Mgcl_2$، ۰/۲ u/μl از Taq DNA Polymerase و ۲/۵μl از Buffer PCR در غلظت نهایی ۲۵ μL در یک ترمال سایکلر انجام شد.

جدا شدن اولیه با مدت زمان ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل در ۹۴°c با زمان یک دقیقه، ۵۶°c با زمان یک دقیقه، ۷۲°c با زمان ۲ دقیقه و ۲۰ ثانیه و طویل‌سازی نهایی با دمای ۷۲°c به مدت ۵ دقیقه انجام شده است.

محصول PCR به وسیله‌ی الکتروفورز در ۱٪ (w/v) از ژل آگاروز رویت شد و باندی با اندازه‌ی ۱۸۴۵bp مشاهده گردید. بعد با استفاده از کیت، محصول PCR تخلیص گردید. برش محصول PCR

Archive of SID
www.SID.ir

با استفاده از Xho I و BamH I صورت گرفت و ژن برش خورده در وکتور (+) PET_{28a} کلون گردید. سازه‌ی جدید $PET_{28a}(+) - btuB$ نامیده شد و DNA نوترکیب به داخل BL21 (DE_3) (به عنوان میزبان بیانی) ترانسفورم گردید. کلنی‌ها از محیط LB Agar حاوی ۵۰μg mL^{-1} از کانامایسین انتخاب شدند. بعد از کشت ۱/۵ ml از محیط مایع حاوی کانامایسین با استفاده از سانتریفیوژ رسوب حاصل جمع آوری و با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید تخلیص گردید. ORF تولید شده به وسیله‌ی آنزیم‌های محدودکننده و تعیین توالی تأیید گردید (۹ و ۱۰).

کلون ژن *btu*B: پس از تخلیص محصول PCR و DNA پلاسمیدی، آن‌ها را با آنزیم‌های محدود کننده‌ی BamHI و Xho I هضم نمودیم و برای الحاق ژن در پلاسمید از سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* BL_{21} (DE_3) استفاده شد.

بیان پروتئین BtuB: کلنی‌های رشد یافته از باکتری‌ها را وارد ۵ mL از محیط کشت LB- Broth واجد ۵۰μl از آنتی‌بیوتیک کانامایسین کرده و در دمای ۳۷°c با دور ۲۲۰rpm شیک گردید. وقتی ODی محیط با طول موج ۶۰۰nm به حدود ۰/۶ رسید، ۵۰μL ایزوپروپیل D–تیوگالاکتوزید (IPTG) به محیط اضافه و محیط کشت در دمای ۳۷ °c به مدت ۴-۵h ساعت شیکر گردید و ۱/۵ ml از این محصول با دور ۵۰۰۰rpm در دمای ۴°c به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و پلت حاصله با بافر نمک فسفات(PBS، pH ۷/۴) مخلوط شد و سلول‌ها به همراه sample buffer در دمای ۱۰۰°c به مدت ۵ دقیقه لیز گردیدند. همه‌ی پروتئین‌ها به وسیله‌ی SDS-PAGE روی ژل ۱۰٪ آنالیز و با کوماسی بریلیانت بلو رنگ آمیزی و بعد با رنگزدایی، یک باند ۶۶ کیلودالتونی در ژل مشاهده شد که مؤید تولید پروتئین BtuB است که در نمونه‌ی کنترل منفی قابل مشاهده نمی‌باشد (۴، ۶ و ۱۰).

نتایج

- تکثیر ژن *btu*B با استفاده از PCR: ژن *btu*B از *E. coli* O_{157} H_7 با استفاده از PCR تکثیر و در وکتور (+) PET_{28a} کلون گردید (شکل a۱)

سازه‌ی حاصله به وسیله‌ی آنالیز آنزیم محدود کننده و تعیین توالی DNA تأیید شد.

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

- آنالیز آنزیمی ژن *btu*B: ژن *btu*B با استفاده از آنزیم EcoRI هضم گردید و چون دارای سایت برش روی نوکلئوتید شماره‌های ۱۱۹۲ (ĠAATTC) می‌باشد. دو باند با اندازه‌های ۶۵۳bp، ۱۱۹۲bp مشاهده شد که صحت ژن *btu*B کلون شده در (+) PET_{28a} را نشان می‌دهد (شکل b۱).

- آنالیز کلون‌ها: پلاسمید تخلیص شده از کلون‌ها با آنزیم‌های BamHI و XhoI هضم شده و بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. همان طور که در شکل مشخص شده است کلون منفی فاقد ژن الحاقی است. اما وکتورهای حاوی ژن در اثر هضم آنزیمی دو باندی (باند وکتور و قطعه الحاقی) دیده می‌شوند که نشان دهنده جدا شدن قطعه الحاقی از پلاسمید است (شکل c۱).

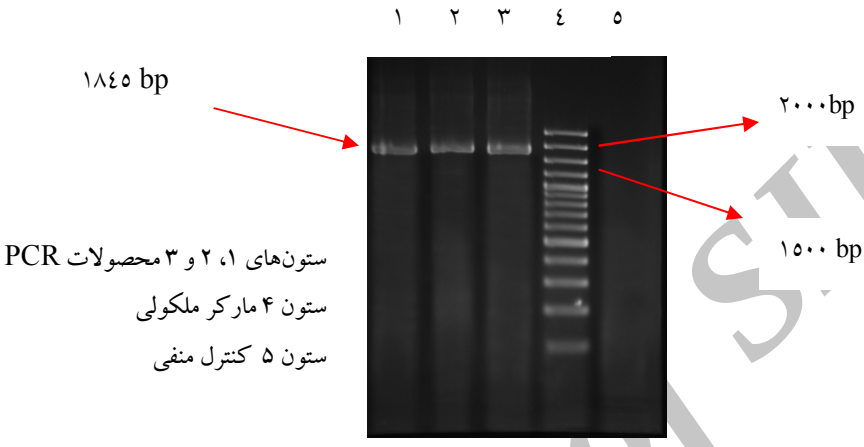
- بیان پروتئین BtuB: پلت‌ها بعد از افزودن IPTG القاء گردیدند و پروتئین نوترکیب BtuB

Archive of SID

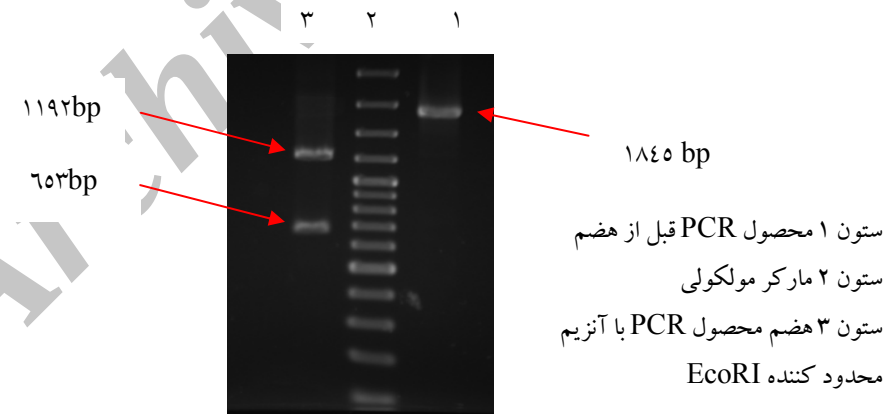
www.SID.ir

تولید شد. بعد از القا با IPTG، وزن مولکولی پروتئین حاصل از ترانسفورم در E. coli BL21 (DE_3) در حدود ۶۶ کیلو دالتون نشان داده شد. (شکل ۱ d)

با توجه به کارهای انجام شده ثابت گردید که ژن*btu*B دارای ۱۸۴۵bp بوده و پروتئین نوترکیب تولیدی فقط یک باند 66KDa ای را بروز می‌دهد که نشان‌دهنده‌ی وزن مولکولی پروتئین BtuB است.

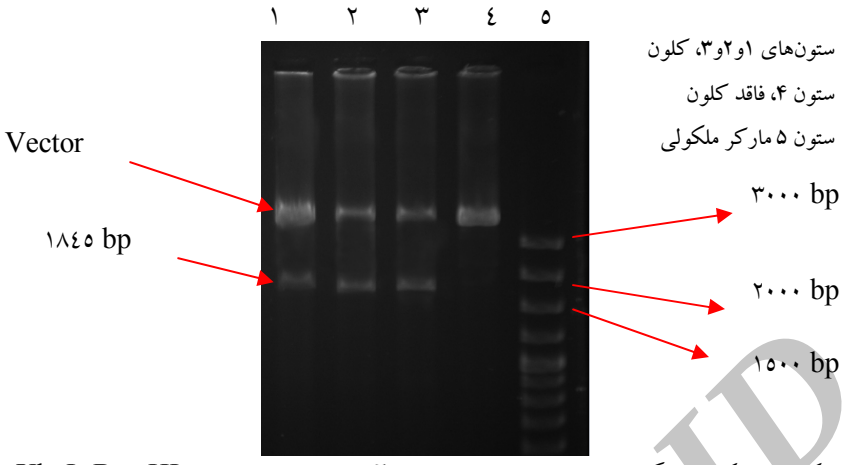


شکل ۱a: الکتروفروگرام ژن *btu*B پس از تکثیر بوسیله PCR

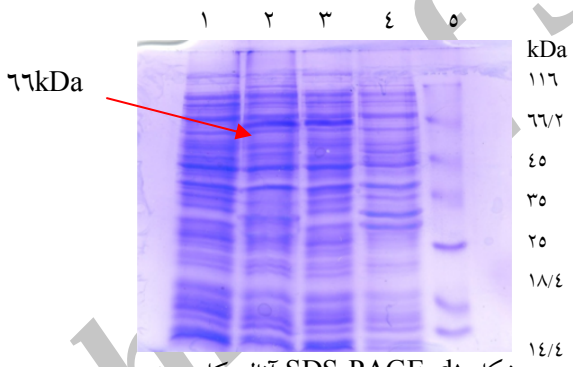


شکل ۱b: الکتروفروگرام هضم آنزیمی ژن *btu*B

Archive of SID
www.SID.ir



شکل c۱: الکتروفروگرام هضم پلاسمید نو ترکیب با آنزیم‌های محدودکننده BamHI و XhoI



شکل d۱: آنالیز کل پروتئین SDS-PAGE

بحث

btuB ژنی است با اندازه‌ی ۱۸۴۵ نوکلئوتید که کدکننده‌ی پروتئین BtuB که وابسته به غشای خارجی است و در جذب ویتامین B_{12} به فضای پری پلاسمی، در باکتری *E. coli* ضروری است (۱).

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 BtuB استفاده می‌کند که یک مسیر وابسته به انرژی را از طریق TonB- EXbB- EXbD از غشای سیتوپلاسمی دریافت می‌کند. بعد وارد پری پلاسم و در آنجا به پروتئین اتصالی BtuF متصل می‌شود و به وسیله‌ی آن به انتقال‌دهنده‌ی ABC منتقل می‌شود 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 می‌کند و مسیر برای ورود ویتامین B_{12} به داخل سلول تسهیل می‌گردد (۱۱ و ۱۲).

در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۸۵ انجام شد قطعه‌ی ۹/۱ کیلو بازی حاوی ژن *btuB* از فاژ انتقالی به داخل پلاسمید کلون گردید و با مشکلاتی از قبیل بیان

Archive of SID

www.SID.ir

ژن‌های دیگر به همراه ژن *btu*B همراه بوده که میزان القای این پروتئین را کاهش می‌داد، ولی مزیت این کار به نسبت کارهایی که در سال‌های قبل انجام شده، این است که کاملاً اختصاصی و فقط در جهت بیان BtuB پیش رفته چون با طراحی پرایمرهای اختصاصی Reverse و Forward و به کمک آنزیم‌های محدود کننده Bam HI, XhoI و ORF توانستیم ژن bp ۱۸۴۵ ای را تکثیر و پروتئین BtuB را تولید کنیم.

سپاسگزاری

کمال تشکر و قدردانی خود را از مسئول محترم آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل سرکار خانم فریبا احمدی و جناب آقای دکتر محمد سلیمانی درجاق عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد قم و بخصوص جناب آقای دکتر مجید علی پور مدیر گروه رشته‌ی علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد بابل و تمامی عزیزانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش یارای ما بودند، اعلام می‌نمایم.

منابع

1. Anastassia, M. and Christion, K., 2008. ATP-binding Cassette transporters in Esherichia coli,, jornal homepage: www. elsevier.com/locate/bbamem , Biochimica et Biophysica Acta 1778, 1757-1771.
2. Cadieux, N., Phu, G. P., David, S. A. C. and Robert, J. K., 2003. Differential Substrate- in duced Signaling through the tonB – dependent Lran Sportter BtuB, National Academy of Sciences, Vol. 100, NO. 19: 10688-10693
3. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L., 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.
4. Cherezov, V., and C.Martin, 2006, Picditre- Scale Crystalli Zation of membrane proteins, journal of Applied Crystallo graphy, NO.39:604-606.
5. Chimenton, D., Robert, J. K. and Michel, C. W., 2005. Comparative Structural Analysis of TonB-Dpendent Outer Membrane Transporters: Implications for the Transport Cycle, PROTEINS: Structure, function and Bioinformatics 59:240-251.
6. GIOVANNA -LUZZI AMES, 1974. Resulation of Bacterial Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis on Slabs, the Journal of Biological chemistry, Vol. 249, No. 2.
7. Heller, K., Barbara, J. M. and Robert, J. K., 1985. Cloning and Experition of the Gene for the Vitamin B12 Receptor Protein in the outer Membrane of Escherichia coli , Journal of Bacteriology, Vol.161, No. 3.
8. Krewulak, D. K. and Hans, J. V., 2007. Structural biology of bacterial iron uptake,www.elsevier.com/locate/bbamem , Biochimica et Biophysica Acta 1778, 1781-1804.
9. Helling, R. B., Goodman, H. M. and Boyer, H. W., 1954. Analysis of Endonuclease R. EcoRI Fragments of DNA from lambdoid Bacteriophages and other viruses by Agarose-Gel Electrophoresis. Journal of Virology. Vol. 14, No.5: 1235-1244.
10. Micklos, D. A., Freyer, G. A. and Crotty, D. A., 2002. DNA science. Cold spring Harbor laboratory press, New York.
11. Postle, K. and Ray, A. L., 2006. TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes, Biometals, Springer Scince+ Business Media B.V.2007.
12. Ravnum, S. and Andersson, D. I., 1997. Vitamin B12 repression of the *btu*B gene in Salmonella typhimurium is mediated via a translational control which reuires leader and coding sequence. Molecular Microbiology, 23(1): 35-42.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Shultis, D., Michael urdy, D. P., Christian, N. B., Michael, C. W., 2006. Outer Membrane Active Transport: Structur of the BtuB: TonB Complex. Advancement of Science, vol 312.

Archive of SID

www.SID.ir