

کلون و بیان ژن رسپتور ویتامین B₁₂ (btuB) از باکتری Ecoli O₁₅₇ H₇

مریم قاجار کوهستانی^{۱*}، مجید علی پور^۱، علی رضایی^۲

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

Email: Maryam.Qajar@yahoo.com

همراه: ۰۹۱۱۳۵۳۲۹۰۴

چکیده:

زمینه و هدف: تولید و شناسایی پروتئین اتصال پری پلاسمی انتقال دهنده ویتامین B₁₂ (BtuB) از باکتری ای. کولی O157:H7.

روش بررسی: ژن کد کننده btuB که مسئول تولید پروتئین انتقال دهنده ی ویتامین B₁₂ است با موفقیت تکثیر گردید. این ژن با حذف کدون خاتمه به وکتور + (a) PET₂₈ اضافه شد تا His-tag از طریق وکتور به پروتئین اضافه شود. بعد از ترنسفورم سازه در Ecoli BL₂₁ (DE₃)، 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 1845 bp ای و تولید پروتئین BtuB با وزن مولکولی 66 کیلو دالتون.

کلمات کلیدی: ویتامین B₁₂، BtuB، Ecoli O157 H7، Cloning

مقدمه:

آنزیم Taq Polymerase از شرکت ژن فن آوران، آنزیم T₄ Ligase از شرکت فرمتاز، آنزیم های اندونوکلاز محدود کننده از شرکت سینازن 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 O₁₅₇ H₇ (ATCC 43889) از دانشگاه شاهد و Ecoli BL₂₁ (DE₃) از شرکت سینازن و پلاسمید (+) PET 28a محصول شرکت (U.S.A) Novagen بوده است.

Ecoli BL₂₁ (DE₃) از شرکت سینازن بوده و محیط های کشت LB- Luria- Bertani (LB) Broth یا LB- Agar برای رشد سویه های Ecoli در دمای 37 °C مورد استفاده قرار گرفته است. برای رشد Ecoli ترانسفورم شده از محیط LB واجد 50 μg mL⁻¹ آنتی بیوتیک کاناماسین استفاده گردید.

- کلون ژن btuB

برای تکثیر ژن btuB از Ecoli O₁₅₇ H₇ (ATCC 43889) استفاده گردید. و این DNA ژنومیک با استفاده از Polymerase chain Reaction تکثیر گردید.

پرایمرهای Reverse

5' CAGT CTCGAG, GAA, GGT, GTA,
3' GCT, GC
و Forward

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

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

شرایط PCR

شامل 5 μL از DNA، 1 μL از هر پرایمر (20 پیکومول)، 0.2 μM از dNTP، 1.5mM از MgCl₂ و 0.2 μM از Taq DNA Polymerase و

همه ی ارگانسیم 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 (۱۰ و ۱۱). باکتری های گرم منفی برای ورود مواد غذایی کم نیاز مانند کوبالامین از عرضگشای خارجی، نیاز به انتقال دهنده ی غشای خارجی، شیب الکترو شیمیایی در غشای سیتوپلاسمی و کمپلکس پروتئینی غشای داخلی TonB- EXB B- EXB D دارند (۱۰ و ۱۱ و ۱۳). 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 بتا، به وسیله ی ۱۱ لوپ خارج سلولی طویل و پیچ های کوتاه پری پلاسمی برقرار می شود.

۲- دومین کرک یا تویی 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 6-12 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 می گردد بنابراین انرژی در غشای سیتوپلاسمی تولید می شود و به وسیله ی Ton B به غشای خارجی منتقل می شود (۱۰ و ۱۳). لوپ های خارج سلولی L₂ و L₃ در اتصال به ویتامین B₁₂ نقش دارند (۳). ویتامین B₁₂ بعد از عبور BtuB وارد پری پلاسم و در آنجا به پروتئین اتصال BtuF متصل می شود (۱۰ و ۳) و به وسیله ی آن به انتقال دهنده ی ABC منتقل می شود. این انتقال دهنده از پرمناز 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 (۱ و ۹). ژن کد کننده ی این پروتئین از 1845 جفت باز تشکیل شده است (۶).

مواد و روش ها :

- مواد شیمیایی و آنزیم ها

کیلودالتونی در ژل مشاهده شد که مؤید تولید پروتئین BtuB است که در نمونه ی کنترل منفی غیر قابل شهود می باشد (۲ و ۵).

یافته ها:

- تکثیر ژن btuB با استفاده از PCR

ژن btuB از Ecoli O₁₅₇ H₇ 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 BL₂₁ (DE₃) 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 (DE₃) BL₂₁ 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 B₁₂ به فضای پری پلاسمی، در باکتری Ecoli ضروری است (۱ و ۳ و ۴).

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

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

روند PCR به قرار زیر است

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

محصول PCR به وسیله ی الکتروفورز در 1 % (w/v) از ژل آگاروز رویت شد. و بانندی با اندازه ی 1845 bp مشاهده گردید. بعد با استفاده از کیت، محصول PCR تخلیص شد. برش محصول PCR با استفاده از Xho I 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 (DE₃) BL₂₁ (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. (۷ و ۸)

بیان پروتئین BtuB

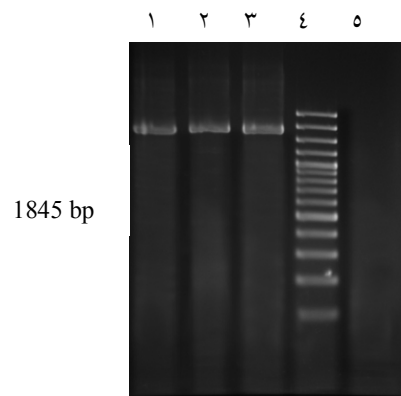
یک کلنی را وارد 5 mL از محیط کشت LB- Broth واجد 50 µl از آنتی بیوتیک کانامایسین کرده و محیط در دمای 37 °C با دور 220 rpm شیکر گردید. وقتی OD₆₀₀ محیط با طول موج 600 nm به حدود 0.6 رسید، 50 µL ایزوپروپیل D- تیوگلاکتوزید (IPTG) به محیط اضافه و محیط کشت در دمای 37 °C به مدت 4-5h ساعت شیکر گردید و 5000 rpm. از این محصول با دور 5000 rpm در دمای 4 °C به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ و پلت حاصله با بافر نمک فسفات (PBS , PH 7.4) مخلوط شد و سلول ها به همراه sample buffer در دمای 100 °C 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

اتصال به ATP است که انرژی انتقال را با هیدرولیز ATP فراهم می کند و مسیر برای ورود ویتامین B₁₂ 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.

ها در آن از 9-19 باقیمانده ی اسیدآمینو با هم فرق دارند(۳)، BtuB دارای وزن مولکولی در حدود 66 KD است(۴).

برای فراهم شدن B₁₂ مورد نیاز سلول، این ماده باید از طریق غشای خارجی، فضای پری پلاسمی و غشای سیتوپلاسمی به سلول برسد. ویتامین B₁₂ 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 پرمناز BtuC و BtuD تشکیل شده که دارای جاگاه

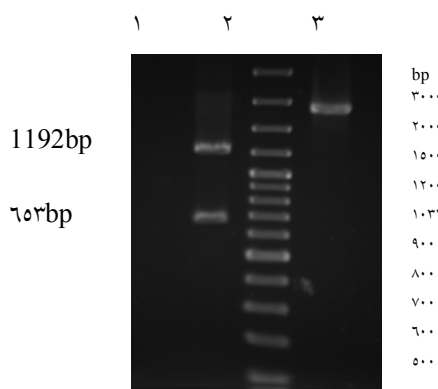


شکل 1a: الکتروفوروگرام ژن btuB پس از تکثیر بوسیله PCR

ستون ۱ کنترل منفی

ستون ۲ مارکر ملکولی

PCR ستون های ۳، ۴، ۵ و ۶ محصولات



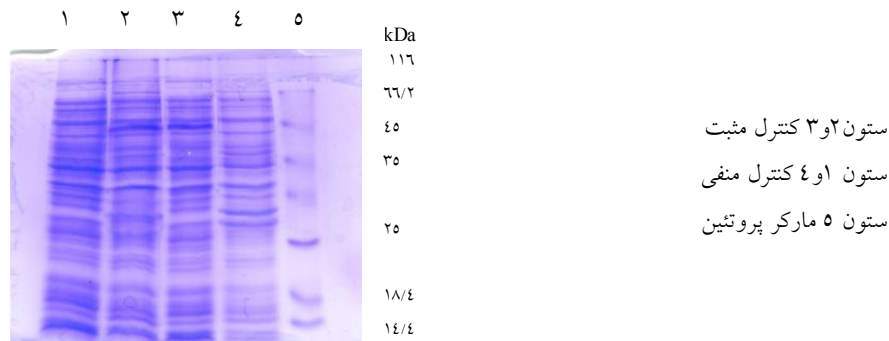
ستون ۱ هضم محصول PCR با آنزیم

EcoRI محدود کننده

ستون ۲ مارکر مولکولی

ستون ۳ محصول PCR قبل از هضم

شکل 1b: الکتروفوروگرام هضم آنزیمی ژن btuB



شکل ۱c: SDS-PAGE آنالیز کل پروتئین

احمدی و جناب دکتر ذوالفقاری مدیر گروه رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و جناب دکتر محمد سلیمانی در جاق عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد قم و بخصوص 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.

نتیجه گیری :

با توجه به کارهای انجام شده ثابت گردید که ژن *btuB* دارای 1845bp بوده و پروتئین نوترکیب تولیدی فقط یک باند 66KDa ای را بروز می دهد که نشان دهنده ی وزن مولکولی پروتئین *BtuB* است.

تقدیر و تشکر:

کمال تشکر و قدر دانی خود را از مسئول محترم آزمایشگاه های دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل سرکار خانم فریبا

فهرست مراجع:

- 1- Anastassia, M., christion, K., 2008, ATP-binding Cassette transporters in *Escherichia coli*, journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbame m , *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/bbame , *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(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 journal 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* , journal 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

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 Science+ 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