J.Agric.Chem. and Biotech.,Mansoura Univ.,Vol. 3 (1): 19 - 28, 2012

CLONING OF MUTACIN GENE FROM *Streptococcus mutans* AND ITS PROTEIN EXPRESSION USING pT_7-HIS PLASMID

Al-Homsi, L.[1]; S. Al-Okla[2] and A. Q. Abbady[3*]
[1] Biotechnology Dept., Fac. Agric., Damascus University, Syria.
[2] Animal Biology Dept., Fac. of Science, Damascus University, Syria.
[3] Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria.
[*] Corresponding author. E-mail: abdabady@gmail.com
Tel.: +963 11 213580; fax: +963 11 6112289.

تنسيل مورثة ببتيد الميوتاسين من العقدية الطافرة *Sreptococcus mutans* والتعبير البروتيني عنها باستخدام البلازميد pT_7-His

لميس الحمصي[1]، سعاد العقلة[2] و عبد القادر عبادي[3*]
[1] قسم التقانة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق
[2] قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق
[3] قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية
[*] للبريد الإلكتروني: abdabady@gmail.com

الملخص

العقدية الطافرة *Streptococcus mutans* هي خلايا كروية سبحية موجبة الغرام ولا هوائية اختيارية، توجد بشكل عام في التجويف الفموي للإنسان، من أهم ما يميزها هو قدرتها على إنتاج نوع خاص من المضادات الميكروبية Bacteriocins قصيرة السلسلة الببتيدية تسمى الميوتاسين Mutacin. يثبط الميوتاسين نمو أنواع أخرى من العقديات الطافرة والعديد من البكتيريات موجبة الغرام وكذلك بعض سالبة الغرام. نظرا لصعوبة الحصول عليه وتكلفة إنتاجه المرتفعة، فقد هدفنا في هذه الدراسة إلى تصميم نظام لإنتاج ببتيد الميوتاسين بطرائق تأشيبية تتضمن بناء المورثة المرمزة للببتيد بتفاعل بلمرة خاص ثم تنسيلها والتعبير عنها، باستخدام البلازميد pT_7-His، كجزء من معقد بروتيني ضخم عالي الإنتاجية والانحلالية وقابل للتنقية والكشف من خلال خصائصه اللونية.

تم بناء التسلسل النكليوتيدي المرمز للميوتاسين عن طريق تفاعل البلمرة المتراكب Overlap PCR باستخدام بادئات طويلة ذات نهايات متتامة، بحيث تغطي مجتمعة كامل طول المورثة إضافة إلى بادئتين قصيرتين لتضخيم هذه الشدفة من الدنا، قطع بعد ذلك كل من المورثة والبلازميد pT7-His بأنزيمات التقييد المناسبة تمهيداً لربطهما ومن ثم تحوير سلالة *E. coli* بنتائج عملية الربط، لقد أعطت نتائج هذا العمل مستعمرات إيجابية قادرة على إنتاج ببتيد الميوتاسين مرتبطاً بالبروتين المتفلور الأخضر المؤشب بصورة منحلة ضمن السيتوبلازم. أمكن تنقية هذا المعقد البروتيني المؤشب (30 كيلودالتون) باستخدام الكروماتوغرافيا ذات التجاذب المعدني كما أوضحه الفصل الكهربائي على جل الأكريلاميد (SDS-PAGE) بعد صبغها. سيتعين علينا في المراحل اللاحقة اختبار أفضل الظروف لتحرير الميوتاسين من هذا المعقد ومن ثم اختبار تأثيره التضادي على حيوية العديد من السلالات البكتيرية. سيتيح تطوير هذا النظام توفير كميات كبيرة من عقار الميوتاسين بغية دراسة استخدامه مستقبلياً كمضاد بكتيري واسع الطيف.

الكلمات المفتاحية: العقدية الطافرة، الميوتاسين، التنسيل المورثي، pT_7-His، التعبير البروتيني.

المقدمة

تنتج العديد من البكتيريا ببتيدات مضادة للأحياء الدقيقة Antimicrobial peptides يُطلق عليها اسم البكتيريوسين Bacteriocin، إحدى مجموعات البكتيريوسين هي مجموعة Lantibiotic الحاوية على اللنتيونين Lanthionin، حيث تنتجها البكتيريا عادة بهدف كبح الأنواع المنافسة الموجودة في بيئتها (Jack *et al.*, 1995). تكمن آلية عمل هذه الببتيدات في قدرتها على قتل البكتيريا عن طريق تمزيق أغشيتها الخلوية

إما من خلال تكوين ثقوب (Matsuzaki *et al.*, 1998) أو إتلاف الطبقة ثنائية الليبيد (Marassi *et al.*, 1999) أو إزالة استقطاب الغشاء (Ulvatne *et al.*, 2004). لهذا السبب فهي لا تُحدث مقاومة كما هو الحال بالنسبة للمضادات الحيوية التقليدية، حيث يُنظر لهذه الببتيدات كأدوية جديدة مضادة للبكتيريا بصورة واسعة الطيف (Sang and Blecha, 2008)، فآثارها التثبيطية ممكن أن تطال البكتيريا موجبة وسالبة الغرام، بما فيها تلك المقاومة للمضادات الحيوية التقليدية، كما يمكن أن تثبط أنواعاً من Mycobacteria، الفيروسات المغلفة، الفطور، وحتى الخلايا المحورة والسرطانية وذلك على عكس معظم المضادات الحيوية التقليدية. أيضا فإن المضادات البكتيرية لها القدرة على تعزيز المناعة من خلال تحفيز إنتاج بعض الإنترلوكينات (Amsterdam *et al.*, 1994).

تعتبر الببتيدات القصيرة التي تنتجها lactic acid bacteria (LAB)، مثل المكورات العقدية *Streptococci*، من أكثرها أهمية كمضادات حيوية واعدة، وهذا النوع من المكورات هو عبارة عن بكتيريا موجبة الغرام غير متحركة، لا هوائية اختيارية أو إجبارية، تحلل الدم على وسط الآغار المدمى، بعضها يمثل جزء من الفلورة الطبيعية وبعضها الآخر عبارة عن عوامل ممرضة. من أهم أنواع هذه المكورات هو النوع *S. mutans* الذي يوجد بشكل شائع في التجويف الفموي للإنسان ولها ارتباط وثيق بتسوس الأسنان، وقد تم توصيف هذه البكتيريا للمرة الأولى من قبل Clarke عام 1924. تكمن فائدتها في قدرتها على إنتاج نوع من الببتيدات القصيرة المضادة للبكتيريا تسمى الميوتاسين Mutacin (Hamada and Ooshima, 1975; Caufield *et al.*, 1985)، وهو مضاد بكتيري فعال ضد الأنواع ذات الصلة القريبة وبصورة واسعة الطيف تجاه البكتيريا موجبة الغرام (Parrot *et al.*, 1990).

يتألف الميوتاسين الناضج من 24 حمض أميني بوزن جزيئي صغير يقدر بحوالي 2364 دالتون، وقد أظهرت سلسلة الببتيد احتوائه على 6 ثمالات سيرين منزوعة الماء، أربع منها تشترك بتكوين جسر كبريتي. وللميوتاسين المنتج من السلالة CH43 *S. mutans* العديد من الإيجابيات على خلاف غيره من المضادات الحيوية التقليدية، حيث أن له طيف واسع تجاه نطاق كبير من البكتيريا موجبة الغرام تتضمن *Staphylococci* و*Enterococci* التي توصف عادة بأنها مقاومة للأدوية ومسؤولة بشكل رئيسي عن الالتهابات في القثطرة intravascular catheters (IVC). ونظرا لطبيعة عمله الفريدة تجاه البكتيريا الحساسة له لم تلاحظ أي مقاومة ضده، أيضا فإنه متحمل للحرارة بشكل كبير ويعمل في نطاق واسع من درجات الحموضة مما يجعله مناسبا للاستعمال في مختلف الظروف، وبسبب طبيعته الكارهة للماء يساعد على تغطية سطح القثطرة لمنع التصاق البكتيريا. من ناحية أخرى، ونظرا لأنه يُنتج من أفراد موجودة طبيعيا في فلورا الفم عند الإنسان فهو لا يثير استجابة مناعية وليس له أية آثار سمية على المضيف (Baca Garcia and Liebana Urena, 1990; Jack *et al.*, 1995; Qi *et al.*, 2004).

من أهم معوقات استثمار هذا النوع الجديد من المضادات الحيوية يكمن في صعوبة إنتاجها باستخلاصها من مصادرها الطبيعية أو في ارتفاع تكلفة تركيبها بالتصنيع الكيميائي المباشر، نظرا لبنيتها العضوية المعقدة وتطلبها في بعض الأحيان لأحماض أمينية نادرة تكون باهظة الثمن. تم اللجوء مؤخراً إلى طرائق إنتاج بديلة تتمثل باستخدام الهندسة الوراثية والتعبير البروتيني في سبيل إنتاج الببتيدات القصيرة بصورة مؤشبة. حيث تربط هذه الببتيدات ضمن بنى بروتينية مندمجة Fusion proteins مع بروتينات ذات خصائص فريدة من حيث ذوبانها ومكان تموضعها بعد التعبير عنها في الخلايا، ومن هذه البروتينات Green Florescent Protein (GFP) (Wu *et al.*, 2009)، والبروتين Maltose Binding Protein (MBP) (di Guan *et al.*, 1988; Pryor and Leiting, 1997)، والبروتين N-Utilization substance (NusA) (Davis *et al.*, 1999)، والبروتين glutathione S-transferase (GST) (Smith and Johnson, 1988)، وكذلك البروتين Thioredoxin (TRX) (LaVallie *et al.*, 1993). إن وجود الببتيد القصير ضمن هذه البنية البروتينية الضخمة يؤمن من جهة الذوبانية العالية وإمكانية التحقق من التعبير عنه خلال خطوات العمل، ومن جهة ثانية، يخفف من تأثيره السام على الخلية المضيفة أثناء مراحل الإنتاج.

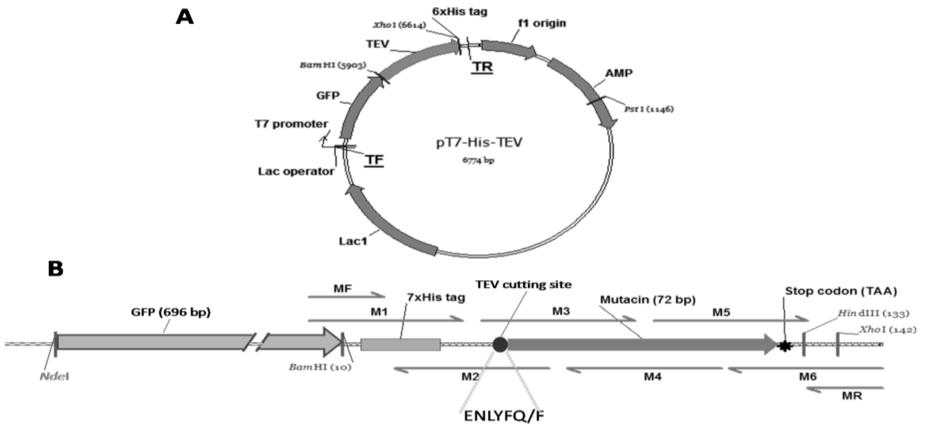
هذه البنى البروتينية المعقدة قد تكون عائق في وجه الدراسات البنيوية والوظيفية للببتيدات المندمجة معها (Bucher *et al.*, 2002) لذلك فإن من الضروري إزلتها خلال مراحل التصنيع بالاستعانة بأنواع خاصة من أنزيمات الهضم البروتيني (البروتيآز) مثل Enterokinase، Thrombin، Factor Xa و TEV protease (Parks *et al.*, 1994; Jenny *et al.*, 2003). حيث تؤمن هذه الأنزيمات القطع بصورة موجهة ضمن تسلسل محدد من الأحماض الأمينية، التي تم إضافتها صنعيا خلال مراحل التنسيل، التي تسبق الببتيد مما يؤدي إلى تحريره من المعقد ليتم تنقيته بعدها بصورة عالية.

من هذا المنطلق، هدف هذا العمل إلى وصف محاولة إنتاج ببتيد الميوتاسين المؤشب للعقدية الطافرة باستخدام أنظمة التنسيل المورثي والتعبير البروتيني في الإشريكية الكولونية *E. coli*، وذلك باستخدام البلازميد pT_7-His، الذي يتيح لنا الحصول على الميوتاسين في بنية بروتينية مندمجة مع بروتين الفلورة الخضراء العالي الذوبانية (Wu *et al.*, 2009). سيتيح توفر هذا الببتيد إجراء جملة من الدراسات بهدف تقييم دوره وإمكانية استخدامه لاحقاً كمضاد حيوي واسع الطيف.

المواد والطرائق

السلالات البكتيرية، شروط النمو والبلازميد

تم تهيئة سلالات *E. coli* المستخدمة في التنسيل والتعبير البروتيني، وهي على التتالي TOP 10 وDE_3 Rosetta لاستقبال البنى البلازميدية، ومن ثم نميت على وسط Luria Bertani broth (LB) المزود بالمضاد الحيوي Ampicillin (Applichem) في الدرجة 37°م، وأما البلازميد الذي استخدم بالتنسيل والتعبير البروتيني فهو pT_7-His، الذي زودنا به مشكورا البروفسور Yu Ding (Fudan University, China) (الشكل. 1).



الشكل. 1: خريطة مفصّلة لبنية بلازميد التعبير البروتيني pT_7–His ومورثة الميوتاسين

(A) شكل ترسيمي يظهر بعض مكونات البلازميد pT7-His وهي تشمل المحضض T7، المورثة المقاومة للأمبسلين Amp، التسلسل المرمز لواسمة الهيستيدين السباعية 7×His tag، التسلسل المسؤول عن تضاعف البلازميد f1 origin ضمن السلالة E. coli، مورثة بروتين GFP، مورثة بروتين TEV protease وموقع أنزيمي التقييد *Xho*I و*Bam*HI، بالإضافة لوجود موقعي البادئتين TR, TF. يظهر الشكل (B) عملية تركيب مورثة الميوتاسين باستخدام ست بادئات متشافعة جزئياً M1-6 وبعدها جرى تضخيم هذه الشدفة بتفاعل بلمرة عالي الدقة باستخدام البادئتين MF/MR. تنتهي شدفة الدنا بموقعي أنزيمي التقييد BamHI/XhoI اللذان يستخدمان في تنسيلها في بلازميد حاوي على مورثة البروتين الأخضر المفلور GFP، بحيث يستمر التسلسل المرمز للميوتاسين Mutacin على نسق طور قرائته in frame وينتهي الطور من الناحية الكربوكسيلية بمرمز الانتهاء TAA، وينفصل البروتين الأخضر عن الميوتاسين بتسلسلات مرمزة لسباعي الهستيدين يليها موقع قطع انزيم البروتياز TEV، الذي سيستخدم لاحقا لتحرير ببتيد الميوتاسين القصير من هذا البروتين المندمج.

تنسيل مورثة الميوتاسين في بلازميد التعبير البروتيني

تم بدايةً تصميم 6 بادئات ذات نهايات متتامة (M1-M6) بحيث تغطي كامل طول المورثة ومن ثم تم تضخيم هذه المورثة باستخدام زوج من البادئات النوعية الأمامية MF والعكسية MR (جدول. 1 والشكل.B1)، صُممت هذه البادئات اعتماداً على التتالي النكليوتيدي الموجود في البنك الجينومي للعقدية الطافرة *Streptococcus mutans* (Accession: AAF99577.1) بعد إضافة تسلسل أنزيمات التقييد المستخدمة للبادئات القصيرة. وقد تم التضخيم باستخدام تفاعل البلمرة المتراكب عالي الدقة بوجود أنزيم البوليمراز AccuPrim ™ Taq polymeras high fidelity Kit (Invitrogen) وذلك لتجنب أي خطأ في تسلسل النكليوتيدات أثناء تضخيم المورثة، تضمن برنامج البلمرة فترة التمسخ الأولية Initial

denaturation مدة 3 دقائق في الدرجة 95°م اتبعت هذه الخطوة 20 دورة تفاعل بلمرة Incremental PCR تتضمن تغير درجة الالتحام كل 5 دورات (45°م، 50°م ،55°م و60°م) بغية حصول الالتحام بين البادئات الست والحصول على المورثة المطلوبة بحيث كل دورة يتم فيها (التمسخ Denaturation في الدرجة 94°م مدة 15 ثانية، الإلتحام Annealing مدة 30 ثانية، والاستطالة Extantion في الدرجة 72°م لمدة 45 ثانية).

جدول 1: التسلسل النيكليوتيدي للبادئات التي تم استخدامها في تنسيل مورثة الميوتاسين

البروتوكول	اسم المرئسات	التسلسل النكليوتيدي للمرئسات	الطول
بادئات تركيب المورثة	BamHI-M1	5′-ATATGAGTGGATCCCACCATCATCATCATCATCATGAGAAC-3'	41
	M2	5′-AAACTTGAGAACTGGAAGTATAGGTTCTCATGATGATGATG-3′	41
	M3	5′-CTTCCAGTTCTCAAGTTTGAGTTTATGTTCATTAGGATGTA-3′	41
	M4	5′-GAAACTAGGATTTTTCACCCCTGTACATCCTAATGAACATA-3′	41
	M5	5′-GTGAAAAATCCTAGTTTCAATAGTTACTGTTGCTAATGAAA-3′	41
	XhoI-M6	5′-ATATTCGCTCGAGACAAAGCTTTCATTAGCAACAGTAACTA-3′	41
البادئات المضخمة لمورثة الميوتاسين	MF	5′-ATATGAGTGGATCCCACCAT-3;	20
	MR	5′-ATATTCGCTCGAGACAAAGC-3′	20
البادئات الخاصة بالبلاسميد pT_7-His	TF	5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′	20
	TR	5′-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3′	20

استخدم بعدها ناتج تفاعل البلمرة السابق كقالب لتطبيق تفاعل بلمرة ثاني عالي الدقة باستخدام البادئتين القصيرتين (Mutacin F/R) بغية تضخيم المورثة، تضمن برنامج البلمرة التمسخ الأولي مدة 3 دقائق في الدرجة 95°م اتبعت هذه الخطوة بـ 35 دورة تتضمن كل دورة (التمسخ في الدرجة 94°م مدة 15 ثانية، الالتحام في الدرجة 55°م مدة 30 ثانية، والاستطالة في الدرجة 72°م لمدة 45 ثانية). بعد إجراء التفاعل تم فصل الشدفة على جل الأغاروز (2%) بوجود موقي الفصل الكهربائي TAE (40mM Tris-Base, 1mM EDTA, 0.1% Acetic Acid and pH:7)، ثم تنقية المورثة المضخمة من باقي مكونات تفاعل البلمرة باستخدام طاقم PCR clean-up system (Promega). بعدها تم مُعاملة كلاً من البلازميد pT_7-His ومورثة الميوتاسين بأنزيمات التقييد *Bam*HI و*Xho*I (Fermentas)، ثم أجريت عملية الربط (Ligation) باستخدام Ready-To-Go™ T4 DNA Ligase Kit (GE healthcare) بنسبة (6:1) لكل من البلازميد والشدفة، على التتالي. استخدم نتائج الربط في تحوير السلالة *E. coli* Top 10 بطريقة الصعق الكهربائي Electroporation، ونميت البكتيريا المحورة على أوساط حاوية على الأمبيسيلين 100µg\ml. بعد النمو، تم اختبار عدد من المستعمرات النامية على أطباق الزرع بتفاعل بلمرة باستخدام بادئات نوعية للبلازميد pT_7-His (TR/TF) (جدول. 1) وذلك لانتقاء المستعمرات البكتيرية الحاوية على التراكيب البلازميدية الصحيحة. نميت المستعمرات الموجبة وعزلت منها البنى البلازميدية بوساطة Plasmid Miniprep Kit (Qiagen)، حيث قيس تركيزها ومن ثم تم التأكد من دقة التنسيل وصحة تسلسلاتها، إما بمعاملة هذه البنى البلازميدية بأنزيمات التقييد للتأكد من أن شدفة الدنا منسلة في المكان الصحيح، أو من خلال سلسلة العينات باستخدام البادئة TR التي تغطي كامل مورثة الميوتاسين الموجودة ضمن البلازميد وذلك للتأكد من خلو تسلسل المورثة من الطفرات.

التعبير عن بروتين الميوتاسين المؤشب

بعد إدخال البنى البلازميدية إلى خلايا التعبير البروتيني *E. coli* Rosetta، نميت في دوارق الزرع في 250 مل من وسط الاستنبات Luria Bertani (Tryptone 2.5g, Yeast extracts 1.25g, NaCl 2.5g) ، المضاف له أمبيسيلين 100µg\ml، وذلك في الدرجة 19°م وبسرعة دوران لا تقل عن 200 دورة في الدقيقة. عند تحقق العكارة المطلوبة (OD_{600}=0.5)، تم إضافة مادة IPTG (IsoPropel β-D-ThioGalactoside) (Promega) لتحريض عملية التعبير في وسط الزرع بتركيز 0.5mM. بعد

16 ساعة من الحضن، تم تثفيل الوسط وتجميع الراسب الخلوي ومن ثم حله بالموقي الملحي PBS 1X (10.14mM $Na_2 HPO_4.7H_2O$, 0.13M NaCl, 1.76mM KH_2PO_4, 2.7mM KCl, adjust to pH 7.4 with HCl) ومن ثم إعادة تعليقه بوساطة جهاز تحطيم الخلايا Sonnicator (Lab Sonic) حسب البرنامج التالي (2min, pluse 15/45, Ampli 40%) وذلك ضمن الثلج، تم بعدها التثفيل للتخلص من البقايا الخلوية ومن ثم تمرير الخلاصة الخلوية على أعمدة النيكل (Ni-NTA Agarose; Qiagen) التي لها القدرة على التقاط البروتين المؤشب من خلال ذيله الهستيديني. بعد مراحل مستفيضة من الغسل لأعمدة النيكل بالموقي (16.2mM Na_2HPO_4, 3.8mM $NaHPO_4$, 500mM NaCl, 20mM Imidazol pH:7.4)، تم تحرير البروتين النقي من العمود عن طريق تمرير نفس الموقي السابق ولكن بوجود تركيز عالي من الإيميدازول Imidazol (500mM)، تم إدارة عملية التنقية تلك من خلال نظام الكروموتوغرافيا الآلـي AKTA prime (GE Healthcare).

بعد التعبير والتنقية، استخدم جل سلفات دودوسيل الصوديوم عديد الأكريلاميد 12% SDS-PAGE (المتضمنة لجل التكديس Stacking gel 5% ولجل الفصل Running gel 12%)، بغية فصل العينات المأخوذة من مختلف المراحل. حيث تم الفصل في الموقي (25mM Tris-Base, 200mM Glycine and 0.1% SDS)، وبعد الفصل الكهربائية في الجل، تم صبغه بموقي أزرق الكوماسي (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma), 45% Methanol and 10% Acetic Acid)، وذلك للتأكد من حسن سير العملية.

النتائج والمناقشة

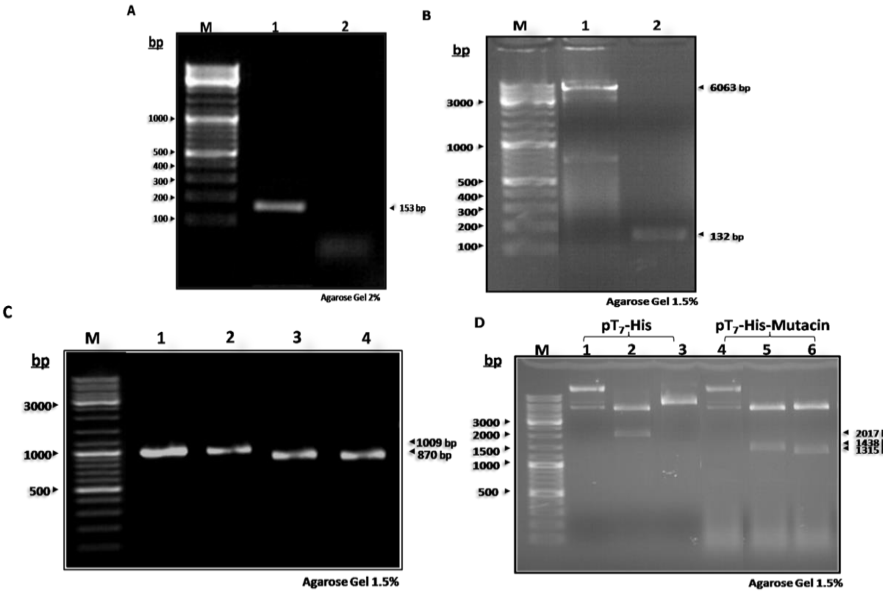
تضخيم مورثة الميوتاسين

بدايةً قمنا بتصميم البادئات المتتامة جزئياً التي تغطي كامل مورثة الميوتاسين ومن ثم تم تطبيق تفاعل البلمرة المتراكب Overlap PCR الذي تمت أمثلته بغية الحصول على المورثة المطلوبة، حيث يظهر لدى فصل ناتج تفاعل البلمرة هذا على جل الأغاروز بعد تطبيقه، شدفة تمثل مورثة الميوتاسين بطول 153bp (شكل. A2).

تنسيل مورثة الميوتاسين في البلازميد pT_7-His

بعد الحصول على كمية كافية من كل من شدفة المورثة والبلازميد pT_7-His، تمت معاملتهما بأنزيمي التقييد *Xho*I و*Bam*HI ومن ثم ربطهما لإنتاج البنى البلازميدية المطلوبة (الشكل. B2). باستخدام نواتج التنسيل السابقة تم تحوير السلالة *E. coli* TOP 10 ومن ثم تنميتها على أوساط انتقائية. أُجري بعد ذلك تفاعل بلمرة لعدد من المستعمرات النامية للتأكد من دخول البنى البلازميدية، حيث تظهر بنتيجة إجراء التفاعل مباشرة على المستعمرات شدفة بطول 1009bp إن كانت إيجابية – أي حاوية على البلازميد وبه شدفة المورثة - بينما تظهر المستعمرات السلبية الحاوية على البلازميد فقط شدفة بطول 870bp (الشكل. C2).

للتحقق من صحة تنسيل شدفة المورثة في البلازميد، تم عزل البنى البلازميدية بطريقة Plasmid miniprep من المستعمرات الإيجابية ومعاملتها بأنزيمات التقييد *Pst*I/*Hind*III و*Pst*I/*Bam*HI واستخدم البلازميد الأصلي كشاهد سلبي، ثم فصلت شدف القطع الناتجة على جل الآغاروز 1.5% (الشكل. D2)، حيث نلاحظ على جل الفصل أن الشدفة 1438bp الناتجة عن معاملة البنية البلازميدية بالأنزيمين *Pst*I/*Bam*HI (المسار 5) أقصر من الشدفة 2017bp الناتجة عن معاملة البلازميد الشاهد بنفس الأنزيم (المسار 2). وهذا يفسره استبدال قطعة الدنا المرمزة للبروتياز في البلازميد الشاهد بقطعة أصغر تحتوي على مورثة الميوتاسين في البنية البلازميدية الناتجة. من ناحية أخرى، فإن معاملة البنية البلازميدية بالأنزيمين *Pst*I/*Hind*III تظهر شدفتين بطولين مختلفين هما البلازميد وشدفة حاوية على مورثة الميوتاسين 1315bp (المسار 6)، بينما تظهر شدفة واحدة عند معاملة البلازميد الشاهد بنفس الأنزيمين (المسار 3) وذلك لعدم احتواء البلازميد على موقع قطع للأنزيم *Hind*III والذي يوجد فقط ضمن التسلسل المرمز لببتيد الميوتاسين. لزيادة التحقق، تم إرسال بعض البنى البلازميدية المؤكدة للسلسلة باستخدام بادئات خاصة التي تمسح كامل طول المورثة، وقد أكدت هذه النتائج صحة طول البنى البلازميدية وخلوها بالكامل من الطفرات.

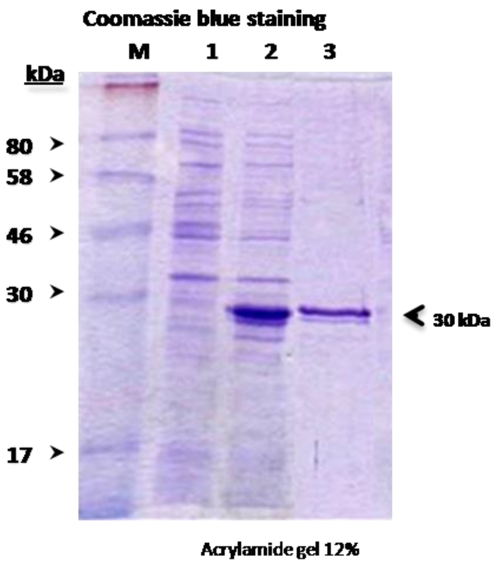


الشكل. 2: تضخيم مورثة الميوتاسين ومراحل تنسيلها في البلازميد

(A) شكل يوضح ناتج فصل تفاعل البلمرة المتراكب على جل الآغاروز 2%، حيث طبق التفاعل على البادئات المصنعة مسبقاً: المسار 1: مورثة الميوتاسين، المسار 2: شاهد سلبي باستخدام الماء بدلاً من الدنا. (B) ناتج معاملة شدفة مورثة الميوتاسين والبلازميد pT7-His بأنزيمات التقييد *Xho*I و*Bam*HI، المسار 1 البلازميد المقطوع، المسار 2 شدفة المورثة المعاملة بأنزيمي التقييد. (C) نواتج تفاعل البلمرة الذي تم إجراؤه على المستعمرات البكتيرية للتأكد من دخول البنى البلازميدية باستخدام البادئتين TR/TF. (D) التأكد من صحة البنى البلازميدية الناتجة عن عملية التنسيل من خلال قطعها بأنزيمات التقييد *Pst*I/*Hind*III و *Pst*I/*Bam*HI وفصل نواتج القطع: البلازميد pT7-his (المسار 1) والبنى البلازميدية الحاوي على المورثة (المسار 4) قبل عملية القطع، بينما يحتوي المسارين (2 و5) البلازميد والبنى البلازميدية على الترتيب بعد استخدام الأنزيمين (*Pst*I/*Bam*HI)، ويظهر المسارين (3 و6) البلازميد و البنى البلازميدية بعد معاملتها بالأنزيمين (*Pst*I/*Hind*III)، يمثل المسار M سلم الدنا الجزيئي في كافة الأشكال.

التعبير البروتيني

بغية تحريض التعبير البروتيني لمورثة الميوتاسين في البنى البلازميدية، تم نقلها إلى خلايا *E. coli* BL-21(DE3) Rosetta بعملية الصعق الكهربائي وبعد التأكد من صحة العملية تم تنمية المستعمرات البكتيرية الموجبة في وسط الاستنبات بوجود الأمبيسيلين، حيث تم تحريض التعبير البروتيني في الخلايا البكتيرية من خلال إضافة مادة IPTG وحضنها في شروط التنمية المثلى. بعدها تم تجميع الخلايا ومن ثم تحطيمها بالأمواج فوق الصوتية. انطلاقاً من هذه الخلاصة الخلوية، تمت تنقية البروتين المندمج المؤشب بأعمدة الكروموتوغرافيا ذات التجاذب المعدني، حيث أن وجود واسمة الهيسيتيدين السباعية في هذا البروتين المؤشب يمكنه من الارتباط بشوارد النيكل المنتشرة على ملاط العمود. بعد مراحل مستفيضة من الغسل، يمكن تحرير البروتين النقي من العمود بتمرير موقي حاوي على مركب الإيميدازول المنافس الشره لواسمة الهيسيتيدين والقادر على إزاحة البروتين النقي من العمود. لمتابعة عملية التعبير والتنقية تم فصل عينات من هذه الخلاصات الخلوية عبر جل الأكريلاميد (الشكل. 3)، وذلك قبل (مسار 1) وبعد 16 ساعة (مسار 2) من عملية التحريض أو حتى بعد عملية التنقية (مسار 3) ومن ثم صبغ الجل بأزرق الكوماسي. لقد أوضح الشكل ظهور عصابة مميزة للبروتين المؤشب بطول 30 كيلودالتون حصريا بعد التحريض، وقد أمكن تنقية هذا البروتين باستخدام الكروماتوغرافيا ذات الإلفة كما يظهره الشكل (3).



الشكل 3: التعبير البروتيني عن البروتين المندمج الحاوي على ببتيد الميوتاسين

ناتج فصل الخلاصات البروتينية على جل الأكريلاميد 12%، المسار 1: الخلاصة الخلوية قبل عملية التحريض، المسار 2: الخلاصة الخلوية بعد 16 ساعة من التحريض وأما المسار 3: فهو للبروتين النقي (30 كيلودالتون) بعد عملية التنقية، إضافة لوجود واسم البروتين المعياري (M). تم إظهار البروتينات من خلال الصبغ بأزرق الكوماسي.

لقد تجنبنا في هذا العمل مشكلة فقدان البروتين لبنيته الفراغية وترسبه أثناء عملية التعبير البروتيني، وذلك من خلال استخدام البنى المندمجة، بحيث تم ربط الميوتاسين ببروتين الفلورة الخضراء العالي الذوبانية (Wu *et al.*, 2009)، فهو يتيح التعبير عن البنية البروتينية المندمجة بشكل منحل في السيتوبلازما دون تراكمها في الأجسام الضمنية (Inclusion Bodies)، كما هو الحال في بعض أنظمة التعبير البروتيني ذات المحضضات الأكثر فاعلية. من ناحية أخرى، يحتوي البروتين المؤشب، الناتج عن التعبير في هذا البلازميد، على واسمة الهيسيتيدين السباعية 7xHistidine tag من الناحية الكربوكسيلية للبروتين المندمج، بين بروتين الفلورة الميوتاسين، وذلك نظراً لوجود التسلسل المرمز لهذا الذيل في بنية البلازميد، الأمر الذي يتيح لنا من

المراجع

Amsterdam, D.; E.A. Gorzynski; T.R. Beam and C. Rotstein (1994). Susceptibility of bacteraemic isolates of gram-positive cocci to daptomycin and other antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 33, 1060-1064.

Baca Garcia, P. and J. Liebana Urena (1990). Bacteriocins of *Streptococcus mutans*: mutacins. *Rev Eur Odontoestomatol.* 2, 127-130.

Bucher, M.H.; A.G. Evdokimov and D.S. Waugh (2002). Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58, 392-397.

Caufield, P.W.; N.K. Childers; D.N. Allen and J.B. Hansen (1985). Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. *Infect Immun.* 48, 51-56.

Davis, G.D.; C. Elisee; D.M. Newham and R.G. Harrison (1999). New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 65, 382-388.

di Guan, C.; P. Li; P.D. Riggs and H. Inouye (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene.* 67, 21-30.

Hamada, S. and T. Ooshima (1975). Inhibitory spectrum of a bacteriocin like substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 54, 140-145.

Jack, R.W.; J.R. Tagg and B. Ray (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev.* 59, 171-200.

Jenny, R.J.; K.G. Mann and R.L. Lundblad (2003). A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr Purif.* 31, 1-11.

LaVallie, E.R.; E.A. DiBlasio; S. Kovacic; K.L. Grant; P.F. Schendel and J.M. McCoy (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y).* 11, 187-193.

Marassi, F.M.; S.J. Opella; P. Juvvadi and R.B. Merrifield (1999). Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J.* 77, 3152-3155.

Matsuzaki, K.; K. Sugishita; N. Ishibe; M. Ueha; S. Nakata; K. Miyajima and R.M. Epand (1998). Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry.* 37, 11856-11863.

Mota-Meira, M.; G. LaPointe; C. Lacroix and M.C. Lavoie (2000). MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 24-29.

Parks, T.D.; K.K. Leuther; E.D. Howard; S.A. Johnston and W.G. Dougherty (1994). Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem.* 216, 413-417.

Parrot, M.; P.W. Caufield and M.C. Lavoie (1990). Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol.* 36, 123-130.

Pryor, K.D. and B. Leiting (1997). High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. *Protein Expr Purif.* 10, 309-319.

Qi, F.; P. Chen and P.W. Caufield (1999). Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol.* 65, 3880-3887.

Qi, F.; P. Chen and P.W. Caufield (2000). Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol.* 66, 3221-3229.

Qi, F.; W.C. Page and P. Chen (2004). Mutacin I biosynthesis genes and proteins. *www.freepatentsonline.com.* US006699970B2, 01-37.

Sang, Y. and F. Blecha (2008). Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim Health Res Rev.* 9, 227-235.

Smith, D.B. and K.S. Johnson (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67, 31-40.

Ulvatne, H.; O. Samuelsen; H.H. Haukland; M. Kramer and L.H. Vorland (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett.* 237, 377-384.

Wu, X.; D. Wu; Z. Lu; W. Chen; X. Hu and Y. Ding (2009). A novel method for high-level production of TEV protease by superfolder GFP tag. *J Biomed Biotechnol.* 2009, 591923.

CLONING OF MUTACIN GENE FROM *Streptococcus mutans* AND ITS PROTEIN EXPRESSION USING pT_7-HIS PLASMID

Al-Homsi, L.[1]; S. Al-Okla[2] and A. Q. Abbady[3*]
[1] Biotechnology Dept., Fac. Agric., Damascus University, Syria.
[2] Animal Biology Dept., Fac. of Science, Damascus University, Syria.
[3] Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria.
[*] Corresponding author. E-mail: abdabady@gmail.com
Tel.: +963 11 213580; fax: +963 11 6112289.

ABSTRACT

Streptococcus mutans is gram positive, facultative anaerobic bacteria and commonly found in the human oral cavity. The most important feature is its ability to produce an antimicrobial short peptide (Bacteriocin) known as Mutacin which is a short peptide chain of amino acids. Mutacin can inhibit the growth of other mutans streptococci, many gram positive and some gram negative bacteria. In this work, we aimed to design a novel system to produce the Mutacin using recombinant methods. These include the construction of the coding sequence of the peptide by special PCR followed by gene cloning and expression in the plasmid pT_7-His. Mutacin was produced as a part of a high solubility and productivity fusion protein which is able to be purified and detected by its colorimetric properties.

The whole gene of Mutacin was constructed using PCR with long overlapping primers which cover the whole gene and with two additional short primers to amplify it. Digested Mutacin fragment, as well as the pT_7-His plasmid, were ligated and then used to transform *E. coli* strain. The positive colonies expressed a soluble fusion protein (30 kDa) of the Mutacin with the Green Florescent Protein (GFP) in the cytoplasm. This fusion protein was purified by metal affinity chromatography, as shown after SDS-PAGE separation and gel staining. In the next work, we will test the best conditions to release the Mutacin from the fusion protein in order to study its antibiotic activity against many bacterial strains. The development of this system will provide large quantities of the Mutacin for future studies and applications as broad spectrum antibacterial peptide.

Keywords: *Streptococcus mutans*, Mutacin, pT_7-His, gene cloning, protein expression

قام بتحكيم البحث

أ.د / فتحى اسماعيل على حوقه	**كلية الزراعة – جامعة المنصورة**
أ.د / ساميه محمد مرسى بيومى	**كلية الزراعة – جامعة المنصورة**