

عزل مورثة الـ *AapJ* وتنسيلها من بكتريا البروسيلا الضائنية

هبة محمد⁽¹⁾ ومحمود قويدر⁽²⁾ وأيمن المريري⁽³⁾

تاريخ الإيداع 2013/04/14

قبل للنشر في 2013/07/10

المُلخَص

تعدُّ البروسيلا بكتيريا ممرضة مشتركة بين الإنسان والحيوانات الأهلية، وقد تزايدت الخسائر الاقتصادية الناجمة عن تأثير البروسيلا في الثروة الحيوانية التي تنعكس بدورها على الإنسان، وهي بذلك تمثل ضراً للصحة والاقتصاد في سورية. وقد تركّزت الجهود للوقاية من الإصابة بداء البروسيلا من خلال اللجوء إلى استخدام لقاحات مُحضرة من سلالات البروسيلا، يجري العمل حالياً لتحضير بروتينات مؤشبة يمكن استخدامها لقاحاً أو محسناً للقاح تقليدي، وذلك من خلال دراسة المورثات المرشحة للبروتينات المسؤولة عن الفوعة عند البروسيلا عن طريق تنسيلها. عُرِّلت ووضِّحت في هذه الدراسة مورثة الـ *aapJ* المرشحة لـ برميض الحمض الأميني بواسطة تفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) باستخدام الـ DNA الجينومي للبروسيلا الضائنية، وباستخدام مرئسات نوعية تحتوي مواقع تقييد لأنزيمي BamHI - XhoI، وقد تبين أن طول الشدفة يبلغ 1032 pb، أُدخلت بعد ذلك الشدفة إلى بلاسميد التعبير المورثي pET-15b المقطوع بأنزيمات التقييد نفسها، ومن ثم أُدخل البلاسميد المؤشبة ضمن بكتيريا *Escherichia coli* DH10B، بواسطة تقنية التحول البكتيري Transformation، بهدف تنسيل المورثة، اختبرت بعد ذلك المستعمرات التي نمت على أوساط تحتوي على الأمبسلين، واستخلص منها البلاسميد الذي عُومل بأنزيمي التقييد BamHI وXhoI للتأكد من احتوائه على مورثة الـ *aapJ*، وبين إجراء عملية السلسلة أن مورثة الـ *aapJ* التي نسلت خالية من أي طفرة ناتجة عن عملية التنسيل.

الكلمات المفتاحية: البروسيلا الضائنية، *aapJ*، PCR، عزل، تنسيل، سلسلة.

(1) طالبة ماجستير، (2) الأستاذ المشرف، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

(3) الأستاذ المشرف المشارك، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية، سورية.

Isolation And Cloning Of *AapJ* Gene From *Brucella melitensis*

H. Mohamad⁽¹⁾, M. Kweider⁽²⁾ and A. Al-Mariri⁽³⁾

Received 14/04/2013

Accepted 10/07/2013

ABSTRACT

Economic losses resulting from the impact of brucellosis on animals have increased, which is reflected in turn on humans. *Brucella* is pathogenic bacteria shared by humans and pet animals. They still pose a significant risk that threatens health and economics in Syria. Many efforts have focused to prevent the spread of brucellosis disease, by resorting to the use of vaccines prepared from *Brucella* strains, where now the target is preparation of vaccine components proteins of *Brucella* can be used as a vaccine or an improved traditional vaccine. In this study, the *aapJ* gene encoding permeas amino acid has been isolated and amplified by Polymerase chain reaction (PCR) using *B. melitensis* 16M genomic DNA, and using a qualitative primer containing restriction sites of both XhoI–BamHI. It was found that the length of the segment was 1032 pb. Then, the segment was inserted to the plasmid gene expression (pET-15b) that was cut by the same restriction enzymes, then the recombinant plasmid was put into the *E. coli* DH10B bacteria, by bacterial transformation technology, so as to clone the gene, the next step was to choose colonies that grew on media containing ampicillin, extract the plasmid of them, and treat it by the two restriction enzymes XhoI and BamHI, so as to confirm that it contains the *aapJ* gene cloned gene sequence analysis revealed, no mutations were introduced during the cloning process.

Key world: *B. melitensis*, *aapJ*, PCR, Isolated, Cloning, Sequence.

⁽¹⁾ MCS., Student, ⁽²⁾ Supervisor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

⁽³⁾ Associated Supervisor, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy commission of Syria.

المقدمة

يعدُّ داء البروسيلات Brucellosis من الأمراض المشتركة التي تصيب الإنسان والحيوان zoonotic disease، فهو مرض حيواني المنشأ (Paulsen et al., 2002)، يصيب الحيوان ثم ينتقل إلى الإنسان ضمن ظروف معينة. يُعرف هذا المرض بالإجهاض المعدي عند الحيوان، وعند الإنسان بالحمى المالطية (Malta Fever) (Michael et al., 2006)، إن العامل المسبب لهذا المرض هو بكتيريا البروسيلات *Brucella*، يرجع اكتشاف هذا المرض إلى الطبيب الإنجليزي ديفيد بروس (David Bruce) سنة 1878، الذي عزل البروسيلات الضأنية *B. Melitensis* أول مرة، ومن هنا جاءت تسمية المرض بداء البروسيلات (Jeffrey et al., 2011). هناك أربعة أنواع من البروسيلات تكون ممرضة للإنسان: البروسيلات المجهضة: *B. abortus*، والبروسيلات الضأنية: *B. melitensis*، والبروسيلات الخنزيرية: *B. sui*، والبروسيلات الكلبية: *B. canis*، يعتمد هذا التصنيف بشكل أساسي على الاختلاف في القدرة الإراضية وعلى المضيف المفضل لهذه الأنواع (Moreno et al., 2002; Lucero et al., 2006).

تتميز البروسيلات بأنها بكتيريا سالبة الغرام وعصوية وصغيرة، أبعادها من 0.5 إلى 0.7 ميكرومتر وهوائية، لها القدرة على الحركة على الرغم من عدم امتلاكها للسياط، وتتميز عن غيرها من البكتيريا بأنها لا تملك عوامل فوعة واضحة Obvious virulence factors مثل السياط Flagella، أو الكبسولات Capsules، أو الأنزيمات الخارجية Exoenzymes، أو الخلايا الحالة Cytolysins، أو البلاسميدات Plasmids، أو التبديل المستضدي Antigenic variation (Pappas et al., 2005).

يتألف جينوم البروسيلات الضأنية 16M من 3,294,935 bp زوجاً من الأسس الأزوتية موزعة على صبغيتين حلقيتين يبلغ حجم الأولى 2,117,144 bp، في حين يبلغ حجم الآخر 1,177,787 bp، وهما يرمزان لنحو 3,197 مجالاً مفتوحاً للقراءة (Open ORFs) (Delvecehio et al., 2002) reading frames).

درست بعض المورثات المرمزة لبروتينات الفوعة لدى البروسيلات مثل: *p39* (Al-Mariri et al., 2010) و *htrA* (Roop et al., 2001)، حيث استخلص البروتين من البروسيلات وحُقنت الفئران بهذا البروتين، ف لوحظ أنه قادر على تحريض استجابة مناعية خلطية ضده، وتبين عند حذف مورثة الـ *htrA* (High temperature requirement protease) المرمزة لهذا البروتين في كل من البروسيلات المجهضة *B. abortus* ذات السلالة 2308، والبروسيلات المجهضة ذات السلالة S19، والبروسيلات الضأنية *B. melitensis* ذات السلالة 16M التي حُقنت فيما بعد في الفئران، انخفاض الفوعة لدى السلالة الأم (Phillips et al., 1995). وهناك العديد من المورثات لدى

البروسيليا التي حُددت نظرياً ضمن جينوم البروسيليا مقارنة بالمتعضيات الأخرى، ولم تُدرس عملياً مثل: *pheB* (Delrue et al., 2001)، ومورثات (*aapJ*, *Q*, *M*, *P*) الموجودة على الصبغي الأول للبروسيليا الضائية والمرمزة لبروتينات الـ L-amino acid permease (Delrue et al., 2004).

تنتمي مورثة الـ *aapJ* إلى الأوبيرون *aapJQMP* المنتمي إلى عائلة الناقل ABC (ATP-binding cassette)، الذي يُرمز ببروتينات الـ L-amino acid permease (AAP)، إذ إنّ *aapJ* عبارة عن بروتين مرتبط بالبلازما المحيطة Periplasmic binding protein، *aapM* – *aapQ* بروتينات غشائية Integral membrane protein، *aapP* هو بروتين Subunit binding ATP، إذ يعمل AAP على نقل مجموعة واسعة من الأحماض الأمينية (Walshaw et al., 1996) منها الغلوتامات Glutamate، والهستيدين Histidine، والإسبارتات Aspartat.

وضعت البنية الأولى لـ Periplasmic binding protein عام 2005 (Müller et al., 2006)، حيث يوجد في البلازما المحيطة بين الغشاء الداخلي والخارجي للبكتيريا سالبة الغرام (Fischer et al., 2010)، وهو يتكون من فصين بينهما شق لتوضع الركيزة، ولذلك يدعى أيضاً بـ الموقع الرابط للركيزة Substrate binding site المؤلف من مجالين يحيطان بالركيزة (Gonin et al., 2007)، حيث يوجد الأرجنين في SBS ويشكل جسراً ملحياً مع مجموعة الكاربوكسيلات على الركيزة، وهو أمر مهم لتعرف الركيزة. إن السيطرة على تعبير هذه المورثة *aapJ* يُساعد على تنظيم تجمع الأحماض الأمينية الخلوية، وفي الواقع إن لهذا البروتين دوراً في التنظيم استجابة للصدمة الحرارية عند البروسيليا الضائية، وكما وجد أن له دوراً في تكوين مناعة عند الأغنام المريضة (Teixeira-Gomes et al., 1997)، ومن المحتمل أن يكون له دور في الفوعة، وأنه مثير للاهتمام في البروتينات المناعية للأغنام المريضة (Ana et al., 2000).

هَدَفَت هذه الدراسة إلى عزل مورثة الـ *aapJ* أول مرة عند البروسيليا الضائية بواسطة الـ PCR وتنسيلها ضمن بلاسميد التعبير المورثي.

مواد البحث وطرائقه

1. السلالات البكتيرية والبلاسميدات: Strains and Plasmids

استُخدمت سلالة البروسيليا الضائية *B. melitensis* 16M من أجل استخلاص الـ DNA الجينومي الحاوي على مورثة الـ *aapJ*، واستخدمت سلالة *E. coli* DH10B من أجل تنسيل مورثة الـ *aapJ*.

واستخدم بلاسميد التعبير المورثي pET-15b (Novagen®) بهدف تنسيل مورثة الـ *aapJ* ضمن البكتيريا، إذ يتميز هذا البلاسميد باحتوائه مورثة مقاومة للأمبسلين لغزيلة المستعمرات الإيجابية الحاوية على البلاسميد.

2. استخلاص الـ DNA الجينومي: Genomic DNA extraction

استُخلصَ ونُقِيَ الـ DNA الجينومي للبروسيلة الضائية *B. Melitensis* 16M باستخدام طريقة CTAB/NaCl، وقيس تركيز الـ DNA المستخلص بواسطة جهاز الـ Nanodrop® (Thermo).

3. تضخيم المورثة: Gene Amplification

ضُخِّمَت مورثة *aapJ* بواسطة تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز Polymerase chain reaction وذلك باستخدام الـ DNA الجينومي لبكتيريا البروسيلة الضائية كقالب، ومرئستين نوعيتين صُمِّمَتَا بالاعتماد على التسلسل النكليوتيدي لمورثة الـ *aapJ* المأخوذ من البنك الجينومي للبروسيلة الضائية: التسلسل النكليوتيدي للمرئسة الأمامية: 5'-ATATATCTCGAGATGAAAAAACTCTCATGACG-3' التسلسل النكليوتيدي للمرئسة العكسية: 5'-ATATATGGATCCTTAGCGCACGGGGATGC-3'، إذ تحتوي المرئسة الأمامية على التسلسل النكليوتيدي لأنزيم التقيد XhoI، والمرئسة العكسية على التسلسل النكليوتيدي لأنزيم التقيد BamHI (المشار لها بالخط)، واستخدم أنزيم High-fidelity DNA Polymerase في تفاعل الـ PCR، حيث احتوى أنبوب التفاعل المكونات الآتية: DNA بتركيز 200 ng/μl، Primer بتركيز 25 p.mol/ μl، High-fidelity DNA Polymerase بتركيز 0.02U/μl، 1X buffer، ضمن الشروط الآتية: التسخن الأولي Initial denaturation بدرجة 98° م مدة 30 ثانية، 30 دورة (التسخن Denaturation بدرجة 98 مدة 10 ثوان، التشفاع Annealing بدرجة 65 مدة 30 ثانية، الاستطالة Extension بدرجة 72 مدة 30 ثانية)، ينتهي التفاعل بدورة أخيرة بدرجة 72 مدة 10 دقائق.

4. تنسيل المورثة ضمن البلاسميد: Cloning of the gene

تقطيع المورثة والبلاسميد باستخدام أنزيمات التقيد: Restriction Enzymes

عُومِلَت كل من مورثة *aapJ* وبلاسميد التعبير المورثي الـ pET-15b بأنزيمي التقيد BamHI و XhoI (Fermentase®)، إذ يعتمد عمل هذه الأنزيمات على قطع الـ DNA في تسلسلات محددة بحيث تترك نهاية متتامة يمكن استخدامها لاحقاً لربط هذه المورثة بالبلاسميد ذلك كخطوة أولى لعملية التنسيل. إذ احتوى تفاعل قطع المورثة: DNA بتركيز 1000 ng/μl، Tango Buffer 2x، 10U XhoI، 10U BamHI، في حين ضم تفاعل قطع البلاسميد: 10U XhoI، 10U BamHI، Tango Buffer 2x، من ثم حُضِن

المزيج مدة ثلاث ساعات بدرجة حرارة 37°م، فيما بعد تُبَطَّ نشاط الأنزيمات بوضع المزيج في حمام مائي 80°م مدة 20 دقيقة، رُحِلَ كل منهما على هلامة أغاروز 0.8% ثم قصت الشدفتان، ونقيتا باستخدام الـ QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN®).

ربط المورثة مقطوعة النهايتين إلى البلاسميد المقطوع: Ligation Reaction

رُبطت شذفة المورثة والبلاسميد المقطوعان بواسطة أنزيم الربط T4 Ligase (Promega®)، إذ يعمل هذا الأنزيم على إعادة الربط بتشكيل روابط فوسفاتية ثنائية الإستر بين شوارد الهيدروكسيل OH في الموقع 3' والفوسفات PO₄ في الموقع 5'. احتوى تفاعل الربط: Ligase buffer 10 X، 1 U/μl من أنزيم الربط T4 Ligase، DNA (aapJ) بتركيز 45.26 ng/μl، DNA (pET-15b) بتركيز 50ng/μl.

التحول البكتيري: Transformation

أدخل البلاسميد الحاوي على مورثة *aapJ* إلى بكتيريا *E. coli* DH10B ذات الكفاءة بواسطة تقنية التحول البكتيري الكيميائي Chemical transformation بهدف تنسيل المورثة، ومن ثم نُمِّي ناتج التحول البكتيري على أطباق تحتوي الصاد الحيوي الأمبسلين لانتهاء المستعمرات البكتيرية الإيجابية الحاوي على البلاسميد، اختيرت فيما بعد مستعمرة واحدة وبشكل عشوائي من الطبق ووضعت في أنبوب يحتوي 3ml من وسط (Amp+LB)، ومن ثم حُصِنَتْ في حاضنة درجة حرارتها 37°م مدة ليلة كاملة، ومن ثم استُخلص البلاسميد بواسطة تقنية الـ Miniprep، وتم التأكد من احتواء البلاسميد على المورثة من خلال تقطيعه بواسطة أنزيمات التقطيع (BamHI- XhoI) وترحيل الناتج على هلامة أغاروز بتركيز 0.8%.

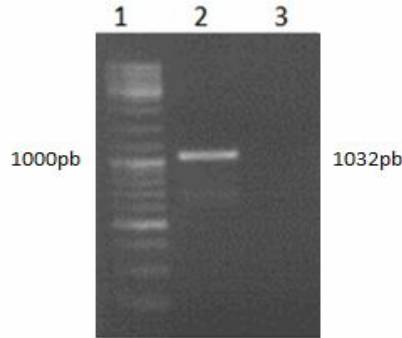
سلسلة الـ DNA : DNA Sequencing

استخدمت هذه الطريقة لمعرفة التسلسل الدقيق للأسس الأزوتية لشذفة الـ DNA، والتأكد من خلو المورثة من أي طفرة ممكن حدوثها في أثناء التنسيل، وقد أُجريت سلسلة المورثة في هيئة الطاقة الذرية، وحُضِرَت العينة لدراستها باستخدام جهاز تحديد تسلسل النكليوتيدي للدنا (genetic analyzer (applied bio system ABI 310). والكيت المستخدم Cycle sequencing ready reaction mix بطريقة Bid Dye Terminator Chemistry.

النتائج

تضخم المورثة: Gene Amplification

استُخلص الـ DNA الجينومي للبروسيلة الضأنية وقيس تركيزه على طول موجة 260 نانومتراً باستخدام جهاز الـ Nanodrop (Thermo®)، وقد بلغ تركيزه 1587.4 ng/μl، عزلت فيما بعد مورثة *aapJ* بواسطة الـ PCR، باستخدام الـ DNA الجينومي المستخلص كقالب، بوجود مُرئسات نوعية، رُحِّل بعد ذلك 5μl من ناتج الـ PCR على هلامة الآغاروز (1.5%) والمضاف إليها بروميد ايثيديوم Ethidium bromide، فتبيّن باستخدام الأشعة فوق البنفسجية أن طول شذفة الـ DNA المضخمة يبلغ (الشكل 1)، وهذا ما يوافق تسلسل المورثة في قاعدة بيانات الـ NCBI، نقي فيما بعد ناتج التضخيم، ومن ثم قيس تركيزه على طول موجة 260 nm إذ بلغ تركيزه نحو 380.5 ng/μl.



الشكل (1) صورة هلامة الآغاروز 1.5% باستخدام الأشعة فوق البنفسجية لناتج تضخيم مورثة الـ *aapJ*: (المسار 1) واسم الـ DNA العياري، (المسار 2) عصابة الـ *aapJ* بطول 1032 bp، (المسار 3) شاهد سلبي باستخدام الماء بدلا من الـ DNA.

تنسيل مورثة الـ *aapJ*: Cloning of *aapJ* gene

بعد نجاح عملية تضخيم المورثة من الـ DNA الجينومي للبروسيلة الضأنية والحصول على المورثة بشكل نقي، وللقيام بتنسيل المورثة في البلاسميد pET-15b، عُوِّمِلت كل من المورثة المعزولة والبلاسميد pET-15b بأنزيمات التقويد XhoI و BamHI، وفي خطوة لاحقة نقيت المورثة والبلاسميد بعد عملية الرحلان الكهربائي وقيس تركيزهما باستخدام جهاز الـ Nanodrop (Thermo®) الذي بلغ 10 ng/μl، 12 ng/μl على التوالي، تمهيدا لعملية الربط إذ استخدم أنزيم الربط T4 Ligase لربط المورثة إلى البلاسميد ومن ثم الحصول على بلاسميد مأثوب.

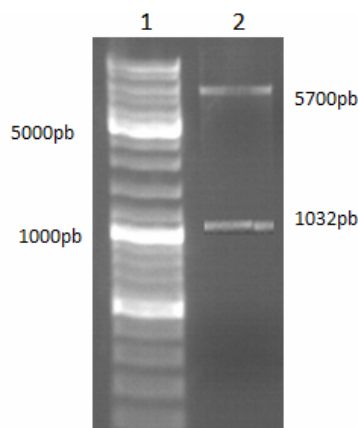
بعد تنسيل مورثة الـ *aapJ* ضمن البلاسميد، أُدخل البلاسميد المأشوب إلى بكتيريا *E. coli* DH10B الخاصة بالتنسيل بواسطة التحول البكتيري Transformation، حيث نُمِّي ناتج التحول البكتيري على طبق بتري يحتوي على وسط LB + Amp الذي يسمح فقط بنمو البكتيريا الحاوية على البلاسميد الذي يُكسبها صفة المقاومة (الشكل 2).



الشكل (2) يوضح المستعمرات البكتيرية الإيجابية لناتج التحول البكتيري لخلايا *E. coli* DH10B الحاوية على بلاسميد الـ *pET/aapJ* على طبق بتري يحتوي على وسط *LB+Amp*.

التأكد من تنسيل المورثة ضمن البلاسميد:

عُزل البلاسميد من إحدى المستعمرات البكتيرية الناتجة على طبق البتري لناتج التحول البكتيري بواسطة الـ *Miniprep*، وتم التأكد من احتواء البلاسميد على مورثة الـ *aapJ* من خلال تقطيع البلاسميد بواسطة أنزيمي التقطيع (*BamHI-XhoI*)، وعند ترحيل ناتج التفاعل على هلامة الأغاروز، ظهر لدينا شذفتان الأولى بطول 5700bp وتمثل البلاسميد، والثانية بطول 1032pb وتمثل مورثة *aapJ* (الشكل 3)، مما يؤكد نجاح عملية تفاعل الربط ودخول الشذفة في مكانها الصحيح.



الشكل (3) صورة هلامية الآغاروز لنتائج تقطيع البلاسميد pET 15b-*aapJ* بأنزيمي التقطيع (BamHI- XhoI)، المسار (1) واسم أطوال معيارية، المسار (2) الـ DNA البلاسميدي المقطع الحاوي على المورثة.

نتائج سلسلة الـ DNA : DNA Sequencing

يُظهر الشكل (4) تسلسل مورثة الـ *aapJ* التي يبلغ طولها 1032 bp، وهي تُرمز بروتين AppJ ذا الوزن الجزيئي 37.11kDa، إذ يتألف هذا البروتين من 343 ثمالة حمض أميني (الشكل 5).

atgaaaaaaaaactctcatgacgggtgtattgggtgcgggcgctgttggcatcgcttcg
 ggagcatccgcagacacgctttccgatgtgaaggcgaaggtttctacagtgcggcgta
 aacacggggctacttggtttgctgcgcccaatgataagggtgaatggtccggttcgac
 gttgattattgccgtgacggtgacgttcggcgatcttcggtgatccgaccaaggtgaagtc
 actcctctcaatgcaaaagagcgtttcacggcgtttcaatccggtgaggtggacgttctg
 atccgcaacacgacctggacctcagccgcgatacgtcgttggctcgaftttgctggc
 atcaactactatgacggccagggttcgatcaattcaagaagctggcgggcatcaat
 tccgattgcagctttcgggtgcttccatctgctccaggccggcagcagaccgagctg
 aacatggccgactattccgcgccaataagatggaatataatccggtgtctttgagaag
 atcgaagaagccaatgccgcttatgattccggcgttgtagcgcctatagaccgaccag
 tccagcctttacggggttctgctggcgttgccaatccggacgatcacgtacctgccg
 gaaatcattccaaggagcctttcggcctgaccgttcgcaaggtgacgccaggtgggcg
 gatgtcgttcgctggacgataatgcgctgctcaatgccgaggaatagccattacgcag
 gccaatgtcgaagagatgaagaagtcgataatccggatacaagcgtcttctcggcgcg
 gaagcagacaccaagatcggcaccgatctggcctcgacaaggactgggtggtgaagatc
 atcaagggtgtcggcaattacggcgaatcttcgagcgcgaacttggtcggcagccccg
 ctcaagatcgcacggcctcaacgccagtggaacaaggcggcctgcaatatggcatc
 cccgtgc**ctaa**

الشكل (4) تسلسل مورثة *aapJ*، تبدأ بـ ATG وتنتهي بـ TAA التوقف

ثم فُورن ناتج السلسلة مع التسلسل الموجود في قاعدة بيانات بكتيريا البروسبلا الضائية، وذلك باستخدام برنامج الـ BLAST التابع لمركز المعلومات التقانة الحيوية NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)، وقد تبين وجود تطابق بنسبة 100% مقارنة بالتسلسل الموجود في قاعدة البيانات؛ الأمر الذي يدل على نجاح عملية تنسيل المورثة ضمن البلاسميد، وخلوه من أي طفرة في أثناء التنسيل. كما فُورنت مورثة الـ *aapJ* لدى بكتيريا البروسبلا الضائية *B. melitensis* بجينوم بكتيريا أخرى باستخدام برنامج الـ Blast، وقد أظهرت تشابها بنسبة 90% مع *Ochrobactrum anthropic*، و 77% مع *Mesorhizobium loti* (الشكل 6).

1	11	21	31	41	51	
1	MKKTLMTGVL	GAAALFGIAS	GASADTLDV	KAKGFLQCGV	NTGLLGFASP	NDKGEWSGFD 60
61	VDYCRAVASA	IFGDPTKVKF	TPLNAKERFT	AFQSGEVDVL	IRNTTWTISR	DTSLGLDFAG 120
121	INYYDGGQFM	INSKLAGIN	SALQLSGASI	CVQAGTTTEL	NMADYFRANK	MEYNPVVFEK 180
181	IEEANAAYDS	GRCDAYTTDQ	SSLYGVRLAL	ANPDDHVILP	EIISKEPFGL	TVRQGDARWA 240
241	DVVRWTHNAL	LNAEEYGITQ	ANVEEMKSD	NPDIKRLLGA	EADTKIGIDL	GLDKDWVVKI 300
301	IKGVGNNGEI	FERNIGSGSP	LKIARGLNAQ	WNKGGLOQYGI	PVR	

الشكل (5) تسلسل الأحماض الأمينية لبروتين الـ *AapJ* والمؤلف من 343 ثمالة حمض أميني

<i>B. melitensis</i>	CGGCGCTGTTTGGCATCGCTTCG
<i>B. suis</i>	CGGCGCTGTTTGGCATCGCTTCG
<i>Ochrobactrum anthropic</i>	CGGCGCTGTTTAGCGTAGCTTCG
<i>Mesorhizobium loti</i>	CGGGTCTGGCCGGCTTCTCGGCG

الشكل (6) مقارنة تسلسل النكليوتيدات لمورثة الـ *aapJ* لدى بكتيريا *B. melitensis* مع *B. suis*، و *Ochrobactrum anthropic*، و *Mesorhizobium loti*

المناقشة

عُزلت ونُسلت بنجاح مورثة الـ *AapJ* أول مرة لدى بكتيريا البروسيليا الضأنية *B. melitensis*، إذ عُزلت مورثة الـ *AapJ* من الـ DNA الجينومي المُستخلص من البروسيليا الضأنية وذلك بتضخيمها بواسطة الـ PCR وباستخدام مُرئسات نوعية، فتبين أن طول شذفة الـ DNA يبلغ 1032 pb، ثم نُسلت مورثة الـ *AapJ* ضمن بكتيريا الـ *E. coli* DH10B؛ وذلك باستخدام بلاسميد الـ pET-15b وهذا ما يوافق تسلسل المورثة في قاعدة بيانات الـ NCBI، وقد جرت سلسلة مورثة الـ *aapJ* المنسلة ضمن البلاسميد pET-15b في هيئة الطاقة الذرية السورية، ومقارنة ناتج السلسلة بالتسلسل الموجود في قاعدة بيانات بكتيريا البروسيليا الضأنية، وقد تبين وجود تشابه تام بنسبة 100% مقارنة بالتسلسل الموجود في قاعدة البيانات؛ الأمر الذي يدل على نجاح عملية تنسيل المورثة ضمن البلاسميد، وخلوه من أي طفرة في أثناء التنسيل. كما فورنت مورثة الـ *aapJ* لدى بكتيريا البروسيليا الضأنية *B. melitensis* بجينوم بكتيريا أخرى باستخدام برنامج الـ Blast، وقد أظهرت تشابهاً بنسبة 90% مع *Ochrobactrum anthropic*، و 77% مع *Mesorhizobium loti*. الأمر الذي يحاكي ما قد جرى في دراسات سابقة من عزل المورثة المرزمة لبروتين البلاسما المحيطية لعدد من الأجناس المختلفة مثل الأشرية القولونية *E. coli* والريزوبيوم، ففي دراسة سابقة قام بها Majid Alipour وزملاؤه عام 2008، عُزلت المورثة المرزمة لبروتين البلاسما المحيطية من الـ DNA الجينومي لـ *E. coli* O157 وضُخمت بواسطة PCR باستخدام أنزيمي تقويد HindIII - EcoRI ونُسلت باستخدام بلاسميد pET 23a، وكان ناتج الرحلان الكهربائي ظهور شذفة بطول 957 pb، إذ إن البروتينين ذا الوزن الجزيئي 34 kDa، يتألف من 318 ثمالة حمض أميني. أما الدراسة التي قام بها Turlough وزملاؤه عام 2002، فقد عُزلت وضُخمت مورثة الـ *aapJ* من الريزوبيوم *R. tropici* بواسطة PCR ونُسلت ضمن *E. coli* DH5a باستخدام البلاسميد Pjq200، وفي دراسة أخرى قام بها Walshaw و Poole عام 1996 حيث نسل الأوبيرون *aapJQMP* من الريزوبيوم باستخدام أنزيمي التقويد XbaI/HindIII والبلاسميد pJP2. وسيُنتج البروتين الـ AapJ في المراحل اللاحقة من الدراسة، بشكله النقي، ويجري التحري عن استمناعيته بغية استخدامه لقاخاً فعالاً للقضاء على البروسيليا.

REFERENCES

- Al-Mariri, A, 2010. Protection of BALB/c mice against *Brucella melitensis* 16 M infection induced by vaccination with live *Escherchia coli* expression *Brucella* P39 protein. Vaccine 28.
- Ana p. Teixeira-Gomes, Axel Cloeckert, and ichel S. Zygmunt, 2000. Characterization of Heat, Oxidative, and Acid Stress Responses in *Brucella melitensis*. Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, Institut National de la Recherche.
- Delrue, R. M., Lestrade, P., Tibor, A., Letesson, J. J and De Bolle X, 2004. *Brucella* pathogenesis genes identified from random large-scale screens FEMS microbiology letters.
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P., and Letesson, J. J, 2001. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular tracking. Cell. Microbiol. 3: 487- 497
- Delvechio V., Kapatral P., Elzer G., Patra C.V., Mujer, 2002. The genome of *Brucella melitensis*. Veterinary Microbiology. Volume 90, Issues 1-4, 20 December, Pages 587-592.
- Fischer M, Zhang QY, Hubbard RE, Thomas GH, 2010. Caught in a TRAP: substrate-binding proteins in secondary transport. Trends Microbiology. 18 (10): 471–478
- Gonin S., Arnoux P., Pierru B., Lavergne J., Alonso B., Sabaty M., Pignol D, 2007. Crystal structures of an Extracytoplasmic Solute Receptor from a TRAP transporter in its open and closed forms reveal a helix-swapped dimer requiring a cation for alpha-keto acid binding. BMC Struct. Biol. 7: 11.
- Jeffrey Ryan, Jan Glarum, 2011. Biosecurity and Bioterrorism: Containing and Preventing Biological. P.75
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Grayon, M., and Jacques, I, 2006. A new variant of *Brucella melitensis*. Clin Microbiol Infect 12, 593-596.
- Majid Alipour, Seyed Latif Mousavi Gargari, Iraj Rasooli and Shideh Montaser Kouhsari, 2008. Cloning, Expression and Immunoactivity of Peliplasmic Binding Protein, FepB. Biological Sciences 3 (9): 1042-1047.
- Michael J. Corbel. 2006. Brucellosis in Humans and Animals, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Moreno, Edgardo and Ignacio Moriyon. 2002. *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence.
- Müller A., Severi E., Mulligan C., Watts A.G., Kelly D.J., Wilson K.S., Wilkinson A.J., Thomas G.H, 2006. Conservation of structure and mechanism in primary and secondary transporters exemplified by SiaP, a sialic acid binding virulence factor from *Haemophilus influenzae*. J. Biol. Chem. 281 (31):

- Paulsen, Ian T., Rekha Seshadri, Karen E. Nelson, Jonathan A. Eisen, John F. Heidelberg, Timothy D. Read, Robert J. Dodson, Lowell Umayam, Lauren M. Brinkac, Maureen J. Beanan, Sean C. Daugherty, Robert T. Deboy, 2002. The *Brucella* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (13148-13153)
- Pappas Georgios, M.D., Nikolaos Akritidis, M.D., Mile Bosil kovski, M.D., and Epameinondas Tsianos, M.D, 2005. Brucellosis. The new Eng. J. of Med. 352:2325-2336
- Phillips, R. W., Elzer, P. H., and Roop, R. M, 1995. A *Brucella melitensis* high temperature requirement A (*htrA*) deletion mutant demonstrates a stress response defective phenotype *in vitro* and transient attenuation in the BALB/c mouse model. Microb. Pathog. 19: 227 – 84
- Roop II, R.M., Phillips, R.W., Hagius, S., Walker, J.V., Booth, N.J., Fulton, W.T., Edmonds, M.D. and Elzer, P.H, 2001. Re-examination of the role of the *Brucella melitensis* HtrA stress response protease in virulence in pregnant goats. Vet. Microbiol. 82, 91-95.
- Teixeira-Gomes, A. P., A. Cloeckert, G. Be´zard, R. A. Bowden, G. Dubray, and M. S. Zygmunt, 1997. Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic proteins using two-dimensional electrophoresis and immune blotting. Electrophoresis 18:1491–1497.
- Walshaw, D. L. & Poole, P. S, 1996. The general l-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that influences efflux of solutes. MolMicrobiol 21, 1239-1252.