

CLONING AND EXPRESSION OF *Brucella melitensis* ZINC PROTEASE GENE

Zaiter, Dana*; Dina Ali**; B. Al Balaa***; A. Al Mariri*** and Ebtsam Hamad****

* Dept. of Plant Biology, Fac. of Science, Damascus University, Syria

** Dept. of Animal Biology, Fac. of Science, Damascus University, Syria

*** Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria

**** Department of Environmental Science- Damascus University- Syria

تدسييل مورثة الزنك بروتياز والتعبير عنها لدى البروسيلة الضائية
دانا زعتر*، دينا علي**، بسام البلعة***، أيمن المريري*** و ابتسام حمد****
* قسم علم الحياة النباتية - كلية العلوم- جامعة دمشق - سوريا
** قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم - جامعة دمشق - سوريا
*** قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية - هيئة الطاقة الذرية السورية
**** قسم العلوم البيئية - جامعة دمشق

المخلص

تم عزل ومضاعفة مورثة الزنك بروتياز بواسطة الـ PCR باستخدام الـ DNA المُستخلص من جينوم البروسيلة الضائية. صُمم زوج من المرئسات لهذه المورثة بحويان مواقع التقيد لأنزيمي NdeI و BamHI في النهايتين 5' و 3' على التوالي. حيث استخدمت تلك المرئسات في مضاعفة شذفة بطول 927 pb. هُضمت الشذفة وأدخلت ضمن بلازميد التعبير pET-15(b) المقطوع بنفس الأنزيمات، أدخل البلازميد المؤشب فيما بعد ضمن بكتريا الـ *Escherichia coli* BL21 (DE3) للتعبير عن بروتين الزنك بروتياز. تبين بعد ساعتين من الحث بتركيز مختلفة من IPTG، أن التعبير عن هذا البروتياز حرّض الموت الخلوي البكتيري.
الكلمات المفتاحية: البروسيلة الضائية، الزنك بروتياز، PCR، عزل، تنسيل، تعبير بروتيني.

المقدمة

داء البروسيلات Brucellosis من أهم الأمراض المعدية التي تصيب الإنسان والحيوان الإجهاض المعدية، وعند الإنسان بالحمى المالطية Malta fever، يؤثر هذا الداء على الثروة الحيوانية والتي تُعد من مصادر الدخل الرئيسية لمعظم الدول، يظهر هذا التأثير بشكل خسائر اقتصادية فادحة تتمثل بانخفاض إنتاج الحيوان المُصاب للحليب، العقم والإجهاض بالإضافة إلى تكلفة العلاج لحالات احتباس المشيمة والتهاب الضرع (Ko and Splitter, 2003)، وتتعاظم خطورته لسهولة انتقاله للإنسان وتأثيره على صحته وسلامته خصوصاً في البلدان التي تعتمد على المجترات كمصادر أساسية للغذاء، بالإضافة إلى صعوبة تشخيصه نتيجة لتداخل أعراضه مع أعراض الكثير من الأمراض التي تصيب الإنسان (Corbel, 1997b).

تنتمي البروسيلة إلى مجموعة البكتريا العصوية الكروية Coccobacilli، الهالبة لجرام، عديمة المحفظة (الكبسول)، غير مشكلة للأبواغ، لا هوائية اختيارية، تنمو بدرجات حرارة تتراوح بين 20-40 م°، درجة الحموضة المثلى pH تتراوح بين 6.6-7.0 (Pappas et al., 2005). تصنف البروسيلة تحت صف البكتيريا الأولية α -Proteobacteria. معظم أنواع هذا الصف تمتلك المقدرة على العيش ضمن خلايا حقيقيات النوى (Ugalde, 1999; Sieira et al. 2000). يعتمد تصنيف أنواع البروسيلة بشكل أساسي على اختلاف القدرة الامراضية وعلى المضيف (العائل) المفضل، حيث إن هنالك أربعة أنواع

ممرضة للإنسان: البروسيلة المجهضة، البروسيلة الضائفة، البروسيلة الخنزيرية والبروسيلة الكلبية. ويعتبر تحديد نوع البروسيلة مؤشراً على طريقة العدوى.

تكمّن فوعة البروسيلة في مقدرتها على دخول واستيطان خلايا المضيف (العائل) حيث تتضاعف داخلها مدمرةً الاستجابة المناعية الطبيعية والتنوعية للمضيف (العائل) وذلك من أجل توسيع نطاق فوعتها. لم يتم بعد فهم الآلية الوراثية لهذه الظاهرة جيداً، إلا أن اكتشاف المورثات المساهمة في انهيار الجهاز المناعي له أهمية أساسية في فهم فوعة البكتريا وآلية إحداثها للمرض إضافةً إلى إمكانية تصميم لقاحات فعالة.

يتضمن جينوم البروسيلة الضائفة نحو 3,294 kb موزعة على صبغيين حلقيين يبلغ حجم الأول 2,117 kb في حين يبلغ حجم الآخر 1,177 kb تقريباً، واللذين يرمزان لنحو 3,197 مجاًلاً مفتوحاً للقراءة (ORF (Open Reading Frames) (Halling et al., 2005).

بدأت الدراسات الوراثية التقليدية للبروسيلة في بداية هذا القرن وذلك بإحداث طفرات عشوائية *spontaneous mutants*، ركزت هذه الدراسات بدايةً على النمط الظاهري والثبات والاستقلاب إضافةً إلى فوعة تلك السلالات الطافرة (Halling et al., 1991). اتجهت هذه الدراسات فيما بعد نحو دراسة المورثات المرمنة للبروتينات المسؤولة عن الفوعة لدى البروسيلة إما عن طريق عزلها أو تطهيرها، مثل: *manB* (Kohler et al., 2002)، *htrA* (Roop et al., 2001)، (Almariri et al., 2001)، *exsA* (Rosinha et al., 2002). إلا أن هنالك العديد من المورثات تم تحديدها ضمن جينوم البروسيلة مقارنةً مع المتعضيات الأخرى ولكن لم تتم دراستها من خلال عزلها والتعبير عنها، مثل *dsbA*، *pheB*، *vsrb* إضافةً إلى مورثة الـ *zinc protease* (Delrue et al., 2004).

تلعب أنزيمات البروتياز خصوصاً المنتجة من قبل البكتيريا الممرضة دور العوامل السامة للمضيف (العائل) (Miyoshi and Shinoda, 2000) كما أنها تساهم في الفوعة والإمراضية. ترمز هذه المورثة أنزيم الزنك بروتياز المنتمي إلى صف الـ *Metalloprotease*، والذي يضم معظم الأنزيمات الحاوية على الزنك في الموقع الفعال إضافةً إلى أن بعض الأنزيمات تحمل في موقعها الفعال أيونات معدنية أخرى مثل المنغنيز أو الكوبالت أو النحاس، حيث يقوم هذا الأنزيم بتفكيك الرابطة الببتيدية في البروتينات.

أظهرت الدراسات امتلاك بعض الذيفانات المفروزة من قبل البكتريا فاعلية الزنك بروتياز مثل الذيفان العصبي *neurotoxin* الذي تفرزه الـ *Clostridium botulinum* (Lalli et al., 2003)، و ذيفان الجمرة *Anthrax Lethal Toxin* المفروز من قبل الـ *Bacillus anthrax* (Shoop et al., 2005). حيث تبين أن لهذه الأنزيمات تأثيرات مرضية متنوعة، مثل تنخر أو نزف الأنسجة المتضررة وذلك نتيجةً لهضم العناصر البنائية للخلية، تشكيل الودمات، حلّ العديد من البروتينات البلازمية، إضافةً إلى حدوث الإنتانات الدموية.

تهدف الدراسة إلى عزل هذه المورثة والتعبير عنها للحصول على الأنزيم بشكلٍ نقي حيث يُمكن استخدامه كمستضدٍ نوعي في دراساتٍ مستقبليةٍ تتناول الاستجابة المناعية للبروسيلة، عدا عن إمكانية استخدامه في تطوير لقاحاتٍ فعالة.

MATERIALS AND METHODS: المواد والطرق

1. السلالات البكتيرية والبلازميد وظروف النمو: *Bacterial strains, plasmid and growth conditions*

استُنبئت البروسيلة الضائفة *B. melitensis* Rev 1 المعزولة من حليب ملوث على وسط إنتقائي *Brucella selective Agar* (HIMEDIA)، أتبع ذلك بتميمتها على وسط *Brucella* (Acumedia) *Broth* على درجة 37 °م. البلازميد المستخدم في التنسيل والتعبير *pET-15b* (Novagen, Madison, WI). تمت تهيئة سلالات الـ *E. coli* المستخدمة في التنسيل والتعبير وهي على التوالي *DH10β* (Gibco BRL) و *BL21 (DE3)* (Novagen) لاستقبال البلازميد المؤشب ومن ثم نميت على وسط *Luria-Bertani broth (LB)* (Bio Basic INC) الحاوي على $100 \mu\text{g/ml}$ من الأمبيسلين (Applichem) على درجة 37 °م.

2- تقانك البيولوجيا الجزيئية: *Molecular biology techniques*

1-1- إستخلاص الجينوم: *Genome extraction*

تقانات البيولوجيا الجزيئية المتبعة عموماً تمت وفقاً لـ Sambrook et al. (1989). حيث استخلص جينوم البروسبلا الضائفة *B. melitensis* باستخدام Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). وقيست نقاوة الـ DNA المستخلص بجهاز الـ (Thermo) Nanodrop بطول موجة 600 nm.

2-2- عزل مورثة الزنك بروتيل: Isolation of the gene

عُزلت مورثة الزنك بروتيل بواسطة تقانة الـ PCR باستخدام مرئستين، مرئسة أمامية 3'- ATATATCATATGCGCTGGCAAGGCCGT- 5' (NdeI) و مرئسة عكسية 3'- ATATATGGATCCCTAAACATCGCCGCTG- 5' (BamHI). صُممت هذه المرئسات اعتماداً على تسلسل المورثة المأخوذ من البنك الجينومي للبروسبلا الضائفة وذلك بعد إضافة تسلسل أنزيمات التقييد المستخدمة إليها. استعمل كيت HotStar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen) في تفاعل الـ PCR وذلك لتجنب حدوث أي خطأ في تسلسل المورثة أثناء عملية التضخيم، أضيف فقط الـ DNA بتركيز (300 ng/μl) والـ Primer بتركيز (25pmol/μl). خضع هذا التفاعل للشروط التالية: التسخن الأولي Initial denaturation على درجة 95 °م لمدة خمسة دقائق، أتبع ذلك بتكرار دورة-مؤلفة من ثلاث دورات أساسية- 35 مرة. تتألف هذه الدورة (التمسيخ Denaturation على درجة 95 °م لمدة دقيقة، الالتحام Annealing على درجة 63 °م لمدة دقيقة والاستطالة Extension على درجة 72 °م لمدة دقيقة) ينتهي التفاعل بدورة أخيرة على درجة 72 °م لمدة عشر دقائق. تم تنسيل منتج التفاعل ضمن بلازميد pET-15b بعد معاملتهما بأنزيمي التقييد NdeI و BamHI (Fermentas) وربطهما بأنزيم الليغاز (Fermentas) T4 DNA ligase.

3-2- تنسيل المورثة: Cloning of the gene

أدخل البلازميد الناتج pET-15b-zinc protease ضمن سلالتين من بكتريا *E. coli* المهيأة كيميائياً إحداهما خاصة بالتنسيل والأخرى بالتعبير وهي على التوالي DH10β و BL21(DE3)، تم ذلك من خلال عملية التحول الوراثي Transformation.

4-2- إستخلاص البلازميد من الخلايا: Extraction of the plasmid

عُزل البلازميد من السلالات البكتيرية باستخدام (Qiagen) Plasmid Midi kit تبعاً لتعليمات المنتج. قيس كمية البلازميد المنقى عن طريق قياس الامتصاصية بطول موجة 260 nm و 280 nm باستخدام جهاز الـ (Thermo) Nanodrop.

5-2- التعبير عن البروتين المؤشب: Expression of the recombinant protein

بعد ادخال بلازميد pET-15b-zinc protease ضمن *E. coli* BL21 (DE3) بهدف التعبير عن البروتين المرغوب، نُميت المستعمرات الناتجة في مزرعة ابتدائية 3 ml في وسط LB-Amp ليلية كاملة على درجة 37 °م ثم أخذ من هذه المزرعة 200 μl ونقلت إلى مزرعة 20 ml للتعبير عن البروتين المرغوب. أضيف الـ (Promega) (IPTG) Isopropyl b-D-thiogalactoside إلى وسط الزرع بعدة تراكيز على درجة 37 °م مع الرج بسرعة 200 rpm لمدة خمس ساعات تقريباً، أخذ 1 ml من المزرعة بعد كل ساعة لقياس الكثافة الضوئية (O.D₆₀₀) وذلك من أجل مراقبة معدل نمو الخلايا المضيفة (العائلة) خلال الزمن.

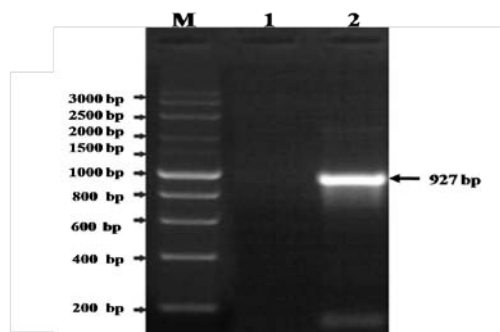
رُجل ناتج التعبير على هلامة سلفات دوديسيل الصوديوم عديد الأكريلاميد SDS-PAGE المحضرة وفق Sambrook et al. (1989) باستخدام هلامة تكديس Stacking Gel بتركيز 5 % و هلامة فصل Resolving Gel بتركيز 12 % للتأكد من نجاح التعبير عن البروتين المرغوب.

RESULTS AND DISCUSSION: النتائج والمناقشة

1- عزل وتنسيل مورثة الزنك بروتيل:

بعد استخلاص جينوم البروسبلا الضائفة عُزلت مورثة الزنك بروتيل بواسطة تقانة الـ PCR باستخدام مرئسات نوعية (GenBank NO.AE008917.1). حيث تبين تبعاً لاختبار الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 1.5 % أن طول شذفة الـ DNA يبلغ 927 bp (الشكل 1)، تُرمز سلسلة متعدد ببتيد مؤلفة من 308 ثمالة حمض أميني، إضافة إلى أن الحجم المتوقع نظرياً للبروتين الناتج اعتماداً

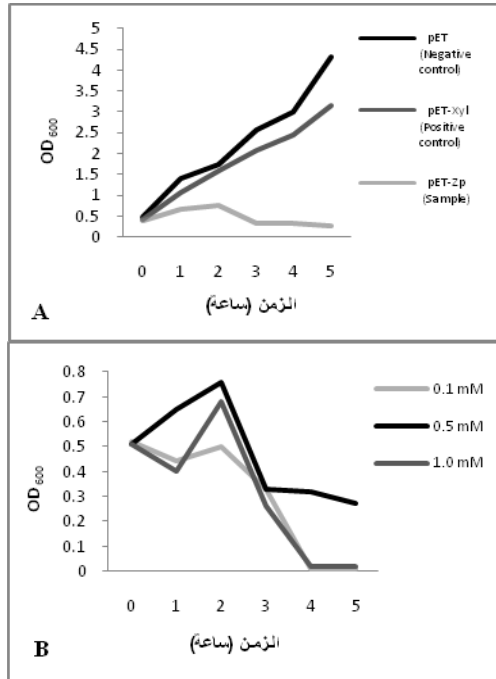
على تسلسل الحموض الأمينية يبلغ تقريباً 33 kDa (protein calculator program V3.3). تمت تنقية مورثة الزنك بروتياز من الهلامية باستخدام PCR clean up system kit (Promega)، بلغ تركيز الـ DNA المُنقى المُقاس بواسطة جهاز الـ (Thermo) Nanodrop نحو 96.4 ng/µl. أدخلت المورثة المُنقاة فيما بعد ضمن بلازميد التعبير pET-15b بعد معاملتهما بأنزيمات القطع المناسبة. أتبع ذلك بعملية التحول البكتيري ضمن سلالات بكتيريا الـ *E. coli* بهدف التنسيل ومن ثم التعبير عن البروتين المرغوب.



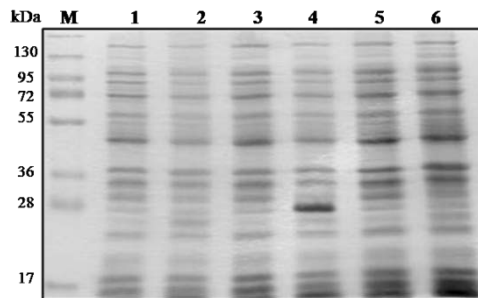
الشكل (1) عصابة مورثة الزنك بروتياز بعد تضخيمها بطول 927 bp حيث تمّ تحيلها على هلامية الأغروز 1.5% الحاوية على الايثيديوم برومايد وإظهارها باستخدام الأشعة فوق البنفسجية M.U.V واسمة عصابة معيارية، 1. شاهد سلبي، 2. مورثة الزنك بروتياز

2- التعبير عن البروتين المؤشب:

نُميت *E. coli* BL21 (DE3) الحاوية على بلازميد pET-15b-zinc protease في وسط LB بدرجة حرارة 37 °م. لوحظ بعد ساعتين من الحث بتركيز مختلفة من IPTG تتراوح بين 0.1-1.0 mM انخفاض معدل نمو الخلايا المضيفة وانخفاض كثافتها الضوئية ($O.D_{600}$) انخفاضاً ملحوظاً مقارنة مع الشاهد الإيجابي لمورثة مرمزة لبروتين معلوم الوزن الجزيئي pET-xyI والشاهد السلبي لبكتيريا حاوية على بلازميد فقط pET. مما يدل على إمكانية مساهمة بروتين الزنك بروتياز بموت الخلايا المضيفة (الشكل 2). إضافة إلى أن الرحلان الكهربائي على هلامية الـ SDS-PAGE لم يُظهر أية فروق ملحوظة بين البروتينات المفترزة من البكتيريا قبل التحريض وبعده. ومن الممكن أن تدل هذه النتيجة على أن مورثة الزنك بروتياز ترمز بروتيناً ساماً للخلايا يسبب تواجده بتركيز مرتفعة في الوسط تفكيك الخلايا المضيفة وموتها (الشكل 3).



الشكل (2) تناقص مستوى الكثافة الضوئية للبكتريا الحاوية على بلازميد الـ pET-15b-zp بعد ساعتين من التحريض.
 (A) مقارنة الكثافة الضوئية للبكتريا الحاوية على بلازميد الـ pET-15b-zinc protease مع الشاهدين الايجابي والسلبي بالدرجة 37 °م، حيث أضيف الـ IPTG إلى الوسط عندما بلغت الكثافة الضوئية OD₆₀₀ 0.5 (B).
 تناقص الكثافة الضوئية للبكتريا بعد تحريض التعبير عن مورثة الزنك بروتينز بإضافة تراكيز مختلفة من الـ IPTG.



الشكل (3) الرحلان الكهربائي للبروتينات قبل التحريض (مسار 1، 3، 5) وبعده (مسار 2، 4، 6) للشاهدين السلبي والايجابي إضافة إلى pET-zp على التوالي ضمن بكتريا *E. coli* BL21 (DE3) عبر هلامة عديد الأكريلاميد المصبوغة بأزرق الكوماري يمثل المسار الأول البروتينات المحددة الطول في سلم البروتينات الجزيئي (Protein marker).

من الممكن أن يكون سبب حدوث هذه الظاهرة هو حدوث موت خلوي مبرمج للخلايا المضيفة Programmed cell death أو ما يُدعى بالـ Apoptosis أثناء عملية التعبير، وهو عبارة عن عملية انتحار فيزيولوجية للخلايا (Jacobson et al., 1997)، يعود سبب هذا الموت إلى مساهمة بعض أنواع أنزيمات البروتياز في هذه العملية. والتي من الممكن أن تُحفز بدأها إما عن طريق بروتياز خارجي المنشأ exogenous protease يدخل ضمن الخلايا، أو بواسطة بروتياز داخل خلوي intracellular protease يُفرز بواسطة العديد من المحفزات. يسبب تفعيل البروتياز تفكيك معظم البروتينات الخلوية والذي ينتج عنه الموت الكيميائي الحيوي للخلية إضافةً إلى حدوث تغيرات في الشكل المورفولوجي (Lee et al., 2000).

من المحتمل أيضاً أن يعود تثبيط النمو الخلوي أثناء عملية التعبير إلى حدوث فرط في التعبير عن البروتين المرغوب عند استخدام بلازميدات متعددة الانتساخ multicopy plasmids تمت هندستها من أجل إنتاج كميات كبيرة من البروتين. قام المخبريون بدراسة المزرعة أثناء التعبير ووجدوا أن سلوك البكتيريا المحرصة كان غريباً، حيث نمت في البداية ببطء (Tubulekas and Hughes, 1993) ومن ثم أنتجت كميات جيدة من بروتينات الصدمة الحرارية (Dong et al., 1995; Vind et al., 1993) ليتوقف فيما بعد نموها تماماً (Dong et al., 1995).

دُرست أنزيمات البروتياز المنتمية لهذا الصف وتبين أن التعبير عنها وتنقيتها غالباً ما يكون صعباً نظراً لسميتها وانخفاض انحلاليتها في العشاء (Siddiqui et al., 2007). كما أظهرت الدور الذي تقوم به تلك الأنزيمات لدى العديد من الأنواع البكتيرية الممرضة خصوصاً في أدوية البنية الخلوية للمضيف (العائل) (Fricke et al., 1995).

ان موت الخلايا في هذه الدراسة يشبه إلى حد كبير الموت المبرمج للخلايا، إلا أن الآلية الكامنة وراء حدوث ذلك لم تُوضح بعد، إن فهم دور البروتياز في قتل البكتيريا واكتشاف المتطلبات الجزيئية التي تحرض ذلك من الممكن أن يمدنا بأفكار جديدة حول آليات أخرى للموت الخلوي، لذلك سنتناول في دراسات مستقبلية البحث عن دور الأنزيمات المنتمية لصف الـ Metalloprotease والذي ما زالت الدراسات حوله محدودة في الموت الخلوي للبكتيريا إضافةً إلى محاولة التعبير ضمن نظام تعبير آخر من الممكن أن يشمل حقيقيات النوى.

المراجع العلمية: REFERENCES

- Al-Mariri, A., A. Tibor, P. Mertens, X. De Bolle, P. Michel, J. Godefroid, K. Walravens, and J. J. Letesson (2001) Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun* 69:4816-22.
- Corbel, M. J (1997a) Brucellosis: an overview. *Emerging infectious diseases* 3, 213-221.
- Corbel, M. J (1997b) Recent advances in brucellosis. *J Med Microbiol* 46:101-3.
- Delrue, R. M., P. Lestrade, A. Tibor, J. J. Letesson, and X. De Bolle (2004) *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett* 231:1-12
- Dong, H., L. Nilsson, and C. G. Kurland (1995) Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol* 177:1497-504.
- Fricke, B., T. Buchmann and S. Friebe (1995) Unusual chromatographic behaviour and one-step purification of a novel membrane proteinase from *Bacillus cereus*. *J Chromatogr A* 715:247-58.
- Halling, S. M., B. D. Peterson-Burch, B. J. Bricker, R. L. Zuerner, Z. Qing, L. L. Li, V. Kapur, D. P. Alt, and S. C. Olsen (2005) Completion of the

- genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* 187:2715-26.
- Halling, S. M., P. G. Dettileux, F. M. Tatum, B. A. Judge, and J. E. Mayfield (1991) Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement. *Infect Immun* 59:3863-68.
- Jacobson, M. D., M. Weil, and M. C. Raff (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-54.
- Ko, J., and G. A. Splitter (2003) Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16:65-78.
- Kohler, S., V. Foulongne, S. Ouahrani-Bettache, G. Bourg, J. Teyssier, M. Ramuz, and J. P. Liautard (2002) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15711-16.
- Lalli, G., S. Bohnert, K. Deinhardt, C. Verastegui, and G. Schiavo (2003) The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol* 11:431-37.
- Lee, S. W., Ko, Y. G., Bang, S., Kim, K. S. & Kim, S (2000) Death effector domain of a mammalian apoptosis mediator, FADD, induces bacterial cell death. *Molecular microbiology* 35, 1540-49.
- Miyoshi, S., and S. Shinoda. (2000). Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* 2:91-98.
- Pappas, G., N. Akritidis, M. Bosilkovski, and E. Tsianos (2005) Brucellosis. *N Engl J Med* 352:2325-36.
- Roop, R. M., 2nd, R. W. Phillips, S. Hagijs, J. V. Walker, N. J. Booth, W. T. Fulton, M. D. Edmonds, and P. H. Elzer (2001) Re-examination of the role of the *Brucella melitensis* HtrA stress response protease in virulence in pregnant goats. *Vet Microbiol* 82:91-95.
- Rosinha, G. M., D. A. Freitas, A. Miyoshi, V. Azevedo, E. Campos, S. L. Cravero, O. Rossetti, G. Splitter, and S. C. Oliveira (2002) Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. *Infect Immun* 70:5036-44.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shoop, W. L., Y. Xiong, J. Wiltsie, A. Woods, J. Guo, J. V. Pivnichny, T. Felcetto, B. F. Michael, A. Bansal, R. T. Cummings, B. R. Cunningham, A. M. Friedlander, C. M. Douglas, S. B. Patel, D. Wisniewski, G. Scapin, S. P. Salowe, D. M. Zaller, K. T. Chapman, E. M. Scolnick, D. M. Schmatz, K. Bartizal, M. MacCoss, and J. D. Hermes (2005) Anthrax lethal factor inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7958-63 .
- Siddiqui, A. A., R. Jalah, and Y. D. Sharma (2007) Expression and purification of HtpX-like small heat shock integral membrane protease

- of an unknown organism related to *Methylobacillus flagellatus*. J Biochem Biophys Methods 70:539-46.
- Sieira, R., D. J. Comerci, D. O. Sanchez, and R. A. Ugalde (2000) A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. J Bacteriol 182:4849-55.
- Tubulekas, I., and D. Hughes (1993) Growth and translation elongation rate are sensitive to the concentration of EF-Tu. Mol Microbiol 8:761-70.
- Ugalde, R. A (1999) Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. Microbes Infect 1:1211-19
- Vind, J., M. A. Sorensen, M. D. Rasmussen, and S. Pedersen (1993) Synthesis of proteins in *Escherichia coli* is limited by the concentration of free ribosomes. Expression from reporter genes does not always reflect functional mRNA levels. J Mol Biol 231:678-88.

CLONING AND EXPRESSION OF *Brucella melitensis* ZINC PROTEASE GENE

Zaiter, Dana*; Dina Ali**; B. Al Balaa***; A. Al Mariri*** and Ebsam Hamad****

* Dept. of Plant Biology, Fac. of Science, Damascus University, Syria

** Dept. of Animal Biology, Fac. of Science, Damascus University, Syria

*** Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria

**** Department of Environmental Science- Damascus University- Syria

ABSTRACT

The zinc protease gene was isolated and amplified by PCR using extracted *B. melitensis* genomic DNA as a template. A primer pair was designed from this gene containing restriction sites of NdeI and BamHI at 5' and 3' end, respectively. Those Primers were used to amplify an insert of 927 pb. This amplicon was digested and inserted into the NdeI-BamHI cut expression vector pET-15b. This recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for protein expression. Following induction by several amounts of IPTG, the expression of this protease induced bacterial cell death, two hours after expression induction.

Keywords: *B. melitensis*; zinc protease; PCR; isolation; cloning; protein expression.

كلية الزراعة – جامعة المنصورة
كلية الزراعة – جامعة كفر الشيخ

قام بتحكيم البحث
أ. د / فتحي اسماعيل حوقة
أ. د / سمير عبد المعطي القاضي