

## CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF DSBA PROTEIN OBTAINED FROM *Brucella melitensis*

Ali, Dina\*; Dana Zaiter\*\*; B. Al Balaa\*\*\*, A. Al Mariri\*\*\* and E. Kassem\*

\* Biological (Zoology) Dept. Fac. of Science, Demascus Univ.

\*\* Biological (Botany) Dept., Fac. of Science, Demascus Univ.

\*\*\* Molecular Biology and Biotechnology Nuclear Energy Tound. Syria

تنسيل وتعبير وتنقية بروتين الـ DsbA الناتج من بكتريا البروسيللا الضأنية

دينا علي<sup>1</sup>، دانا زعيتر<sup>2</sup>، بسام البلعة<sup>3</sup>، أيمن المريري<sup>3</sup> و عصام قاسم<sup>1</sup>

<sup>1</sup> قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم - جامعة دمشق.

<sup>2</sup> قسم علم الحياة النباتية - كلية العلوم - جامعة دمشق.

<sup>3</sup> قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية

### المُلخَص

صُخمت المورثة المرزمة لأنزيم أكسيدو ريدوكتاز ثنائي السلفونيد انطلاقاً من جينوم البروسيللا الضأنية عن طريق تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز الـ PCR وباستخدام مرئسات نوعية، ومن ثم تم إدخالها في بلازميد التعبير الجيني الـ pET-15b. وبالتالي تم إدخال البلازميد pET-15b / dsbA في نظام التعبير البروتيني لبكتيريا الاشريشكية القولونية *E. coli* BL21DE3، حيث تم التعبير عن هذه المورثة بشكل عالي بوساطة التحريض بالـ IPTG. ولقد أظهر التحليل باستخدام هلامة الرحلان البروتيني SDS-PAGE بأن البروتين المعبر عنه يمتلك وزن جزيئي بحدود 28 kDa. كما تم تنقية هذا البروتين المشوب فيما بعد باستخدام عمود الألفة للمخلب المعدني. **كلمات مفتاحية:** أنزيم الأكسدة ثنائي السلفونيد، التفاعل السلسلي للبوليميراز، التنسيل، التعبير البروتيني، التنقية، البروسيللا الضأنية.

### المُقَدِّمة

يُعد داء البروسيلات Brucellosis من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان zoonotic disease (Boschiroli et al., 2001) وهو مُنتشر في بلاد حوض البحر الأبيض المتوسط، شبه الجزيرة العربية والقارة الهندية وبعض أجزاء المكسيك والأمريكيتين الوسطى والجنوبية (Corbel, 1997). يُعرف هذا المرض في الحيوانات باسم الإجهاض المُعدي، وفي الإنسان باسم الحمى المالطية Malta fever أو الحمى المتموجة Undulant fever. إن العامل المسبب لهذا المرض هو بكتيريا البروسيللا *Brucella* وذلك نسبةً إلى أول من اكتشفها وهو David Bruce عام 1887. يُصيب هذا المرض المواشي بشكل خاص ولكن يكثر أيضاً بين فئات معينة من الناس الذين يعتبروا أكثر تعرضاً من غيرهم للإصابة وهؤلاء هم الرعاة والمزارعون والعاملون في المسالخ والأطباء البيطريون. هناك عدة طرق للعدوى بهذا المرض، أكثرها شيوعاً شرب الحليب ومنتجاته الملوثة ببكتيريا البروسيللا (Pappas et al., 2005). كما ويتم انتقال العدوى إلى الإنسان من خلال الاتصال المباشر ببول أو براز أو إفرازات المهبل. ومن الممكن أيضاً أن تنتقل العدوى عن طريق الرضاعة الطبيعية من أم مصابة إلى الرضيع (Al-Tawfiq, 2006). وقد تم التعرف على حالات انتقلت العدوى فيها عبر الاتصال الجنسي (Young, 1995)، كما يمكن أن تنتقل العدوى عن طريق نقل وزراعة أعضاء ملوثة كزراعة نقي العظم. لا يُعد المرض بالغ الخطورة إلا في حالات نادرة (عند عدم تلقي العلاج)، حيث يؤدي إلى حدوث مضاعفات قاتلة مثل الالتهاب الرئوي Pneumonia أو التهاب السحايا البكتيري Bacterial meningitis.

هناك أربعة أنواع من البروسيللا تكون ممرضة للإنسان: البروسيللا المجهضة *B. abortus*، البروسيللا الضائية *B. melitensis*، البروسيللا الخنزيرية *B. suis*، البروسيللا الكلبية *B. canis* حيث سميت هذه الأنواع اعتماداً على مضيفها المفضل (Moreno et al., 2002).

يحتوي جينوم *B. melitensis* على 3,294,935 bp زوج من الأسس الأوتوتية موزعة على صبغيين حلقيين يبلغ حجم الصبغي الأول 2,117,144 bp في حين يبلغ حجم الآخر 1,177,787 bp تقريباً. يحمل هذان الصبغيان نحو 3,197 مجالاً مفتوحاً للقراءة Open reading frame (Moreno, 1998). يتميز صبغي البروسيللا بوجود أصل تضاعف يماثل أصل التضاعف لدى *α-proteobacteria* إضافة إلى وجود مورثات التدبير المنزلي Housekeeping genes والتي تُساهم في تضاعف الـ DNA، الانتساح، الترجمة، الانقلاب المركزي وبناء جدار الخلية (Vizcaino et al., 2000). هناك العديد من الأبحاث التي درست بعض المورثات المُرمزة لبروتينات الفوعة عند البروسيللا مثل: L7/L12 (Oliveira et al., 1996)، HtrA (Roop et al., 1994)، P39 YajC (Vemulapalli et al., 1998) وتم استخدام بروتيناتها كمستضدات تشخيصية قادرة على تحريض الاستجابة المناعية. إلا أن هناك العديد من المورثات تم التعرف عليها ضمن جينوم البروسيللا مُقارنة مع جينوم المتعضيات الأخرى ولكن لم يتم دراستها من خلال عزلها وتنسيتها مثل: *dsbA*, *phb*, *znu* (Delrue et al., 2001).

يُعد أنزيم الـ DsbA ثيو دي سلفونيد أكسيدو ريدكتاز Periplasmic thio-disulfide oxidoreductase، الأنزيم الأساسي في عائلة الـ Dsb التي تضم: أنزيم الـ DsbA، والـ DsbB، والـ DsbC، وأنزيم الـ DsbD، حيث يكون هذا الأنزيم مسؤول وبشكل مباشر عن تشكيل الرابطة الكبريتية للبروتينات المُصنعة حديثاً والمُفرزة إلى السيتوبلازما المحيطة للبكتيريا سالبة الغرام والتي تُساهم بدورها في التقاف وتحديد البنية ثلاثية الأبعاد لهذه البروتينات (Sevier et al., 2002; Kadokura et al., 2003).

تُرمز هذا الأنزيم مورثة الـ *dsbA*، وهو عبارة عن بروتين أحادي الجزيئة يتوضع ضمن السيتوبلازما المحيطة للبكتيريا، ويمتلك زوج من ثمالات السيستئين تشكل الموقع الفعال لهذا الأنزيم، والتي تكون مُوكسدة في حال الأنزيم الفعال (Bardwell et al., 1991).

يُساهم هذا الأنزيم في تشكيل الروابط الكبريتية من خلال منح الرابطة الكبريتية المتواجدة ضمن موقعه الفعال إلى زوج السيستئين في البروتينات التي تكون في طور تشكيل بنيتها ثلاثية الأبعاد (Frech et al., 1991). وبالمقابل يُصبح أنزيم الـ DsbA بحالة مُرجعة. ولكي يستعيد دوره التحفيزي في أكسدة بروتينات أخرى، يحتاج إلى إعادة أكسده ويكون ذلك من خلال بروتين متوضع في الغشاء الداخلي للبكتيريا، يُدعى بالـ DsbB (Bardwell et al., 1993)، الذي يرتبط بدوره بجزيئة الـ quinone (مركب عضوي حلقي يحتوي على زمرتين كربوكسيليتين) والتي تُعتبر كمصدر لطاقة الأكسدة (Bardwell et al., 1993)، حيث تنتقل هذه الطاقة إلى ثمالات السيستئين الموجودة في أنزيم الـ DsbB، ومنه إلى أنزيم الـ DsbA، والذي بدوره يمنحها إلى البروتين الهدف ليشكل بنيته ثلاثية الأبعاد.

أظهرت العديد من الأبحاث دور أنزيم الـ DsbA في إحداث الفوعة عند العديد من البكتيريا الممرضة وذلك عن طريق مساهمته في تشكيل الرابطة ثنائية الكبريت لبروتينات الفوعة، وقد تبين أنه عند إحداث طفرة في التتاليات النيوكليوتيدية المرمزة لثمالات السيستئين المتواجدة ضمن الموقع الفعال لهذا الأنزيم فقدان البروتينات لوظيفتها وذلك بسبب عدم تشكل البنية ثلاثية الأبعاد لها (Peek et al., 1992).

فقد بينت الدراسات مساهمة هذه الأنزيم في الاصطناع الحيوي للذيفانات داخلية الإفراز secreted enterotoxins لدى بكتيريا الـ *Vibrio cholerae* (Peek et al., 1992)، وللذيفان *Bordetella pertussis* المُسبب لمرض السعال الديكي (Stenson et al., 2002).

تهدف هذه الدراسة إلى عزل مورثة الـ *dsbA* لأول مرة عند البروسيللا الضائية *Brucella melitensis* والتعبير البروتيني عنها بغية الحصول على البروتين ودراسة مستقبله كمستضد نوعي يتم حقنه ضمن المضيف الطبيعي.

## المواد والطرائق

لقد تم إستعمال الطرائق وفقاً لـ Sambrook et al., (1989)

## 1- السلالات والبلازميدات **Strains and plasmids**

### 1-1 السلالات **Strains**

استُخدمت سلالة البروسيلا الضأنية *B. melitensis Rev1* من أجل استخلاص الـ DNA الجينومي الحاوي على مورثة الـ *dsbA*، بينما استُخدمت كلاً من الـ *Escherichia coli* DH10B والـ *E. coli* BL21DE3 كسلالة عائل من أجل التنسيل والتعبير البروتيني لمورثة الـ *dsbA* على التوالي.

### 2-1 البلازميدات **Plasmids**

تم استخدام بلازميد التعبير الجيني الـ pET – 15b (Novagen®) من أجل التنسيل والتعبير البروتيني لمورثة الـ *dsbA* ضمن بكتيريا الـ *E. coli*، حيث يتصف هذا البلازميد بامتلاكه لمحضض الـ PT7 الذي يحض على انتساخ المورثة، بالإضافة إلى وجود لاحقة الهيستيدين تساعد في تنقية البروتين المشوب.

### 2- استخلاص الجينوم **Genome extraction**

تم استخلاص الـ DNA الجينومي باستخدام Wizard SV gel and PCR clean – Up system (1400 ng ml) (Thermo®) Nano drop المنقى باستخدام الـ DNA المُنقى باستخدام الـ Wizard SV gel and PCR clean – Up system (1400 ng ml) (Thermo®) Nano drop المنقى باستخدام الـ

### 3-2 عزل مورثة الـ *dsbA* بواسطة التفاعل السلسلي البوليميرازي **Polymerase chain reaction**

تم تصميم مرئسات نوعية بالاعتماد على التسلسل النيكلوتيدي لمورثة الـ *dsbA* المأخوذ من البنك الجينومي للبروسيلا الضأنية وذلك بإضافة مواقع تقييد في طرف كل من هذه المرئسات والتي تتناسب مع إدخال الشدفة المضخمة في بلازميد التعبير المورثي لاحقاً. التسلسل النيكلوتيدي للمرئستين الأمامية والعكسية على التوالي:

↓ NdeI

5` ATATATCATATGCCTGTAGCGCTTAATCG 3`

↓

BamHI

5` ATATATGGATCCTCAAAGAGCGCTGTCGAT 3`

حيث تضم المرئسة الأمامية التسلسل النيكلوتيدي لأنزيم التقييد الـ NdeI، بينما تضم المرئسة العكسية التسلسل النيكلوتيدي لأنزيم التقييد الـ BamHI.

تم عزل مورثة الـ *dsbA* من خلال تضخيمها بواسطة تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز *Polymerase chain reaction* (Techne®)، حيث استُخدم الـ DNA الجينومي لبكتيريا البروسيلا الضأنية

*Brucella melitensis* كقالب، واستُخدم أنزيم البلمرة High fidelity DNA polymerase.

احتوى أنبوب تفاعل التضخيم المكونات التالية: الـ DNA 1µl ممدد بنسبة 1/10، الـ dNTPs 0.5µl، الـ Taq polymerase 0.5µl، الـ MgCl<sub>2</sub> 1µl، الـ 10x buffer 2.5µl، تم إجراء الـ PCR ضمن الشروط التالية: خمس دقائق في 95°م، 35 دورة (ثلاثين ثانية في الدرجة 94°م، 30 ثانية في درجة انصهار المرئسات المُلائمة، ثلاثين دقيقة في 72°م و 10 دقائق في 72°م).

4- تنسيل مورثة الـ *dsbA* **Cloning of dsbA gene**

#### 1-4 تفاعل ربط مورثة الـ *dsbA* إلى بلاسميد الـ pET Ligation reaction

تم مُعاملة كلاً من مورثة الـ *dsbA* وبلاسميد التعبير المورثي الـ pET-15b بواسطة أنزيمات التقطيع، ثم تم ترحيل كلاً منهما على هلامة الأغاروز ذات التركيز 0.8 % ثم قص الشدقتين وتنقيتهما بواسطة الـ QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN®)، حيث بلغ تركيز كلاً من مورثة الـ *dsbA* وبلاسميد الـ pET بواسطة جهاز الـ NanoDrop (Thermo®) 26.2 ng \ ml و 18 ng \ ml على التوالي، ثم تم الانتقال إلى المرحلة التالية وهي ربط المورثة إلى البلازميد باستخدام أنزيم الربط Ligase T4، حيث يعمل هذا الأنزيم على وصل قطع الـ DNA ذات النهايات اللزجة وذلك من خلال ربط زمرة الهيدروكسيل في النهاية 3' مع الفوسفات من النهاية 5' للنيكليوتيدات المتجاورة وبذلك تتكون روابط فوسفورية ثنائية الأستر، يحتاج هذا الأنزيم الـ ATP كعامل مساعد.

#### 2-4 تحضير الخلايا البكتيرية لتكون مهيبة لاستقبال البلازميد Competant cells

تم تحضير كلاً من بكتيريا الـ *E. coli* DH10B والـ *E. coli* BL21DE3 لتكون مهيبة لاستقبال البلازميد، حيث تم وضع كل من هذه البكتيريا في محلول الـ CaCl<sub>2</sub> 60 mM / Glycerol 15% البارد، ثم حُفظت في درجة الحرارة 80 °م إلى حين استخدامها.

#### 3-4 التحول البكتيري Transformation

تم إدخال البلازميد الحاوي على المورثة إلى بكتيريا الـ *E. coli* DH10B بواسطة تقنية التحول البكتيري الـ Chemical Transformation بهدف تنسيل المورثة.

#### 4-4 استخلاص البلازميد Extraction of the plasmid

أستخلص البلازميد من إحدى المستعمرات الايجابية النامية على طبق البتري لنتائج التحول البكتيري، وتم قياس تركيز البلازميد المُستخلص بواسطة جهاز الـ Nanodrop.

#### 5 - التعبير البروتيني لمورثة الـ *dsbA* Overexpression of *dsbA* gene

تم إدخال البلازميد الحاوي على مورثة الـ *dsbA* إلى داخل بكتيريا الـ *E. coli* BL21DE3 بهدف التعبير البروتيني لمورثة الـ *dsbA*، حيث تم في البداية استنابت المستعمرات الناتجة ضمن 3 ml وسط الـ LB+Amp لمدة ست عشرة ساعة في حاضنة ذات درجة الحرارة 37 °م، وفي اليوم التالي أُضيف 200 µl من المُستنبت إلى أريونة تحتوي على 10 ml من وسط الـ LB وحتى الوصول إلى تركيز OD 600 على (0.5 – 0.7). فيما بعد تم التحريض على التعبير البروتيني من خلال إضافة الـ Isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG 100mM) ضمن حاضنة درجة حرارتها 37 °م لمدة أربعة ساعات.

#### 6- استخلاص البروتين المُشوب وتنقيته Protein extraction and purification

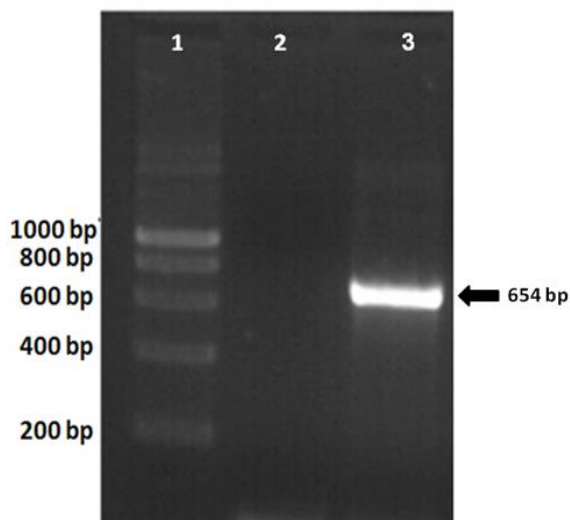
تم استخلاص البروتين المُشوب من إحدى الخلاصات البكتيرية التي عبرت عنه، حيث تم تنفيل المُستنبت البكتيري وحل الراسب بمحلول الـ Buffer Lysis (pH 8) 50Mm Tris Hcl، 1Mm EDTA، 300 µl لكل غرام من وزن الراسب، ثم أُضيف الليوزيم Lysozyme (التركيز النهائي 300 µl \ ml) وتحريك المُعلق لمدة ثلاثين دقيقة و بدرجة حرارة 4 °م تم خلالها إضافة محلول sodium deoxychlate (التركيز النهائي له 1 mg \ ml)، ووضع المُعلق في درجة حرارة الغرفة وإضافة محلول الـ MgCl<sub>2</sub> (التركيز النهائي له 10 mM)، ثم تم التنفيل والاحتفاظ بالطافي (الطافي الأول)، ثم تم إعادة حل الراسب بمحلول الـ Lysis Buffer والتنفيل والاحتفاظ بالطافي (الطافي الثاني)، ثم تم حل الراسب بمحلول الـ Lysis Buffer يحتوي البولة الـ 8 M Urea وحضن المُعلق في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين، ثم تم التنفيل من جديد والاحتفاظ بالطافي (الطافي الثالث).

بعد استخلاص البروتين المُشوب من الخلاصة البكتيرية تم تنقيته بواسطة أعمدة الكروماتوغرافيا الألفة للهيستيدين، حيث تم تحميل 2 ml من الطافي الثالث الحاوي على البروتينات والذي تم ترشيحه على عمود الألفة بمعدل تدفق 1.0 ml / min، ثم تم غسل العمود بواسطة محلول الـ binding buffer (8 x Phosphate buffer، 20 mM imidazole، H<sub>2</sub>O) يحتوي تركيز منخفض من الإيميدازول من أجل التخلص من البروتينات غير المرتبطة بالعمود ومن ثم تم فصل البروتين المُشوب المُرتبط باستخدام محلول الـ Elution buffer يحتوي تركيز عالي من الإيميدازول (8 x Phosphate buffer، 500 mM imidazole، H<sub>2</sub>O).

### النتائج والمناقشة

#### 1-3 تضخيم مورثة الـ *dsbA*

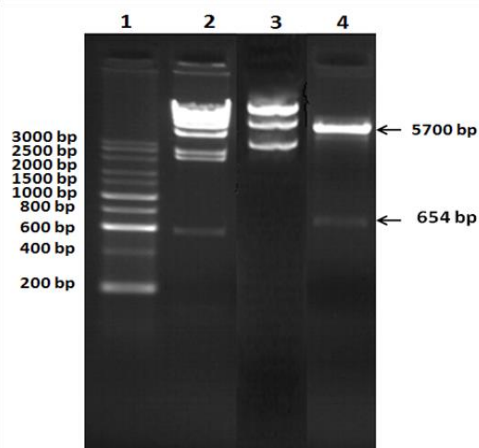
عُزلت مورثة الـ *dsbA* من الـ DNA الجينومي للبروسيلة الضائنية بواسطة الـ PCR ثم تم تحليل ناتج التفاعل السلسلي للبوليميراز بهدف التأكد من عزل المورثة من خلال ترحيل  $5 \mu\text{l}$  من ناتج الـ PCR على هلامة الأغاروز المضاف لها الإيتيديوم برومايد bromide ethidium ذات التركيز 1.5% (الشكل 1). حيث تبين من خلال إظهار الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية أن شدة الـ DNA التي تم الحصول عليها تظهر بطول 654 bp مطابق لطول تسلسل المجال مفتوح القراءة الـ Open reading frame (ORF) الممثل للمورثة والمأخوذ من البنك الجينومي للبروسيلة الضائنية (Genebank (AE008917).



الشكل 1. صورة لهلامة الأغاروز 1.5% باستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV لناتج تضخيم مورثة الـ *dsbA* واسمة عصابة معيارية (المسار 1)، شاهد سلبي (المسار 2)، عصابة الـ *dsbA* 654 bp (المسار 3).

### 2-3 تنسيل مورثة الـ *dsbA*

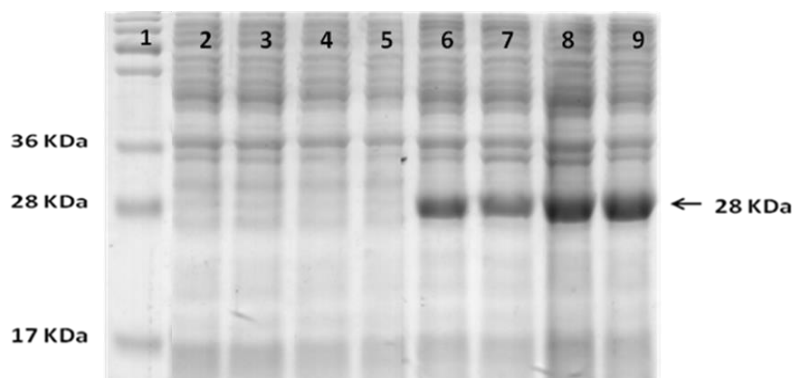
تم ربط مورثة الـ *dsbA* بعد معاملتها بوساطة أنزيمات التقييد إلى بلازميد الـ pET-15b، ثم تم إدخال البلازميد الناتج الـ pET-15b/*dsbA* إلى بكتيريا الـ *E. coli* DH10B بهدف التنسيل، فيما بعد عُزل البلازميد من إحدى المستعمرات البكتيرية الناتجة وتم التأكد من احتواء البلازميد على مورثة الـ *dsbA* من خلال تقطيع البلازميد بوساطة أنزيمي التقييد الـ BamHI والـ NdeI وترحيل الناتج على هلامة الأغاروز ذات التركيز 1.5% وبوجود البلازميد، حيث يُوضح الشكل (2) صورة لهلامة الأغاروز لناتج تقطيع البلازميد بوساطة أنزيمات التقييد، وبوجود بلازميد مغلق كشاهد إيجابي، حيث تظهر عصابتين، تمثل العصابة ذات الطول 654 bp مورثة الـ *dsbA*، في حين تظهر عصابة البلازميد بطول 5700 bp مطابق لطول البلازميد الأصلي.



الشكل 2. هلامة الأغاروز 1.5 % لنتائج تقطيع البلازميد بواسطة أنزيمات التقييد واسمة أطوال معيارية (المسار 1)، واسمة الأطوال المعيارية العالية (المسار 2)، بلازميد مغلق كشاهد إيجابي (المسار 3)، والـ DNA البلازميدي المُعامل بأنزيمات التقييد (المسار 4).

### 3-3 التعبير البروتيني لمورثة الـ *dsbA*

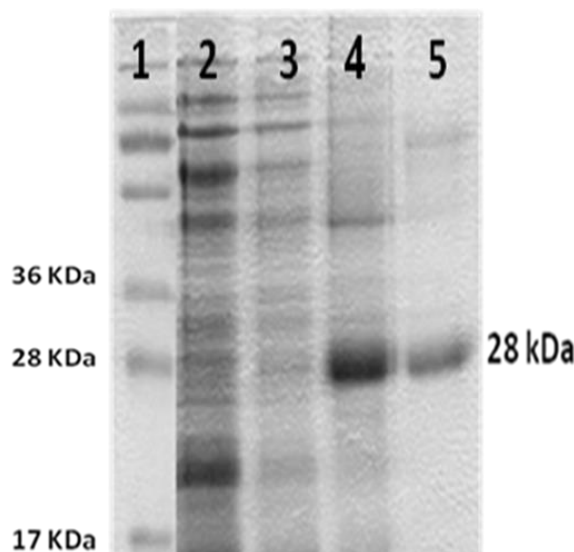
تم التعبير البروتيني لمورثة الـ *dsbA* داخل بكتيريا الـ *E.coli* BL21DE3 تحت سيطرة المُحضض PT7، حيث تم إدخال البلازميد *pET-15b / dsbA* ضمن بكتيريا الـ *E.coli* BL21DE3 بواسطة تقنية التحول الكيميائي Chemical Transformation. يُوضح الشكل (3) صورة لهلامة الـ SDS – PAGE ذات التركيز 12 % باستخدام صبغة أزرق الكوماسي Coomassie brilliant blue R – 250، فقد بين تحليل الـ SDS-PAGE لخلصة الـ *E.coli* BL12 DE3 المحولة بالبلازميد *pET-15b / dsbA* أن البروتين تم إنتاجه بعد أربع ساعات من التحريض باستخدام الـ IPTG وبتركيز 0.1 mM وفي درجة الحرارة 37° م . إن حجم منتج التعبير البروتيني الـ DsbA يبلغ تقريباً (28 kDa).



الشكل 3. صورة لهلامة الـ SDS – PAGE 12% لنتائج الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد متبوعة بتلوين أزرق الكوماسي لخلصات من *E.coli* BL21 (DE32) الحاملة للبلازميد *pET-15b / dsbA*، قبل التحريض بواسطة الـ IPTG (المسار 2، 3، 4، 5) وبعد أربع ساعات من التحريض (المسار 6، 5، 8، 9)، تظهر واسمة عصابة معيارية للأوزان الجزيئية على أقصى اليسار.

4-3 استخلاص البروتين المأشوب وتنقيته

أستخلص البروتين المأشوب، ثم تم تنقيته بواسطة أعمدة الكروماتوغرافيا الألفة للهستيدين وترحيله على هلامة عديد الأكريلاميد، حيث تم تحديد الوزن الجزيئي للبروتين 28 KDa بالمقارنة مع واسمة العصابة المعيارية للأوزان الجزيئية (الشكل 4). تبين بأن البروتين المأشوب متوضع في الجدار الخلوي للبكتيريا (الشكل 4، المسار 3).



الشكل 4. صورة لهلامة لـ SDS – PAGE 12%، يمثل المسار الأول واسمة عصابة معيارية للأوزان الجزيئية، والمسار الثاني الطافي الأول (ستوبلاسما)، والمسار الثالث الطافي الثاني (ستوبلاما محيطية)، والمسار الرابع البروتين المتوضع في الجدار الخلوي للبكتيريا، بينما يمثل المسار الخامس بروتين الـ 28 kDa DsbA المنقى بواسطة الكروماتوغرافيا.

## المراجع REFERENCES

- Al-Mariri A., A Tibor., P Mertens., X DeBolle., 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. and Immun.*, 69: 4816-4822.
- Al-Tawfiq JA. (2006). Brucella epididymo-orchitis: a consideration in endemic area. *Int Braz. J Urol.*, 32: 313-5.
- Bardwell 1. C. A., J. O Lee., G Jander., N Martin., D Belin. and J Beckwith. (1993). A pathway for disulfide bond formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1038-1042.
- Bardwell 1. C. A., K McGovern., and J Beckwith. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cel.*, 1 67, 581-589.
- Boschirolu M.L., V. Foulongne., and D. O'Callaghan. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4(1): p. 58-64.
- Corbel M. J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, 3: 213-321.
- Delrue R.M., M Martinez-Lorenzo., P Lestrade., I Danese., V Bielarz., P Mertens., X De Bolle., A Tibor., J.P. Gorvel., and Letesson, J.J. (2001).

- Identification of *Brucella spp.* genes involved in intracellular tracking. *Cell. Microbiol.*, 3, 487-497.
- Dornand J, A Gross., V Lafont., J Liutard., J Oliaro., JP Liutard.(2002). The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet. Microbiol.*, 90:383-94.
- Frech C. (1996). Preferential binding of an unfolded protein to DsbA. *Embo J.*, 15 (2): p. 392-98.
- Kadokura H., F. Katzen., and J. Beckwith. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev., Biochem.*, 72: p. 111-35.
- Missiakas D., C. Georgopoulos., and S. Raina. (1993). Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene dsbB, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7084-7088.
- Missiakas D. and S. Raina. (1997). Protein folding in the bacterial periplasm. *J Bacteriol.* 179 (8): p. 2465-71.
- Moreno E., A Cloeckaert., I Moriyon. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.*, 90:209-27.
- Moreno E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS. Microbiol. Rev.*, 22:255-275.
- Oliveira SC., and G. A. Splitter. (1996). Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine*, 14:959–962.
- Peek JA., and RK Taylor. (1992). Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 89(13): p. 6210-4.
- Pappas G., MD., MD Nikolaos Akritidis., MD Mile Bosilkovski., and MD Epameinondas Tsianos. (2005). Brucellosis. *The new Eng. J. of Med.* 352: 2325-2336.
- Raina S., and D Missiakas. (1997). Making and breaking disulfide bonds. *Annu Rev Microbiol.* 51: p. 179-202.
- Refai M. (2002). Incidence and control of brucellosis in the near east region. *Vet Mecrobiol*; 90: 81-110.
- Roop RM., TW Fletcher., NM Sriranganathan., SM Boyle., and GG Schurig. (1994). Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. *Infect. Immun.* ,62:1000–1007.
- Sevier., CS., and CA Kaiser. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3(11): p. 836-47.
- Stenson T. H., and AA Weiss. (2002). DsbA and DsbC are required for secretion of pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 70:2297-2303.
- Vizcaino N., A Cloeckaert., J. M Verger., M Grayon., and L Fernandez-Lago. (2000). DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect.*, 2:1089-1100.
- Vemulapalli R., AJ Duncan, SM Boyle, N Sriranganathan, TE Toth, and GG Schurig. (1998). Cloning and sequencing of yajC and secD homologs



- of *Brucella abortus* and demonstration of immune responses to YajC in mice vaccinated with *B. abortus* RB51. *Infect. Immun.*, 66:5684–5691.
- Yu J., H Webb., and TR Hirst. (1992). A homologue of the Escherichia coli DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 6(14): p. 1949-58.
- Young E. (1995). An overview of human brucellosis. *Clin. Infect. Dis.*, 21: 283-290.

## **CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF DSBA PROTEIN OBTAINED FROM *Brucella melitensis***

**Ali, Dina\*; Dana Zaiter\*\*; B. Al Balaa\*\*\*, A. Al Mariri\*\*\* and E. Kassem\***

\* Biological (Zoology) Dept. Fac. of Science, Demascus Univ.

\*\* Biological (Botany) Dept., Fac. of Science, Demascus Univ.

\*\*\* Molecular Biology and Biotechnology Nuclear Energy Tound. Syria

### **ABSTRACT**

The thio disulfide oxidoreductase gene was amplified from *Brucella melitensis* genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) technique using specific primers and inserted into expression vector pET-15b, then the pET-15b / *dsbA* Sonstruction was transformed into *E. coli* BL21(DE3). This gene was highly overexpressed by IPTG induction. SDS-PAGE analysis showed that the expressed protein is about 28 kDa. Finally, recombinant protein was purified with a metal-chelating affinity column.

**Keywords:** *dsbA*, PCR amplification, gene cloning, expression, purification, *Brucella melitensis*

كلية الزراعة – جامعة المنصورة  
كلية الزراعة – جامعة المنصورة (فرع دمياط)

قام بتحكيم البحث:  
أ.د./ محمد منصور قاسم  
أ.د./ حسين عبدالله محمد الفضالي