

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

تنسيل مورثة الزنك بروتياز والتعبير عنها لدى البروسيلات 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

الملخص

تم عزل ومضاعفة مورثة الزنك بروتياز بواسطة الـ PCR باستخدام الـ DNA المُستخلص من جينوم البروسيلات الضائية. صُمم زوج من المرشحات لهذه المورثة يحويان مواقع التقييد لأنزيمي NdeI و BamHI في النهايتين 5' و 3' على التوالي. حيث استخدمت تلك المرشحات 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: البروسيلات الضائية، الزنك بروتياز، PCR، عزل، تنسيل، تعبير بروتيني.

المقدمة

داء البروسيلات Brucellosis من أهم الأمراض المعدية التي تصيب الإنسان والحيوان (Corbel, 1997a) يُعرف عند الحيوانات باسم الإجهاض المعدي، 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 انتاج الحيوان المصاب 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 البروسيلات إلى مجموعة البكتريا العصوية الكروية Coccobacilli، السالبة 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 البروسيلات 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 البروسيلات بشكل أساسي على اختلاف القدرة الامراضية وعلى المضيف (العائل) المفضل، حيث إن هنالك أربعة أنواع

ممرضة للإنسان: البروسيلة المجهضة، البروسيلة الضأنية، البروسيلة الخنزيرية والبروسيلة الكلبية. و يعتبر تحديد نوع البروسيلة مؤشراً على طريقة العدوى.

تكمن فوعة البروسيلة في مقدرتها على دخول واستيطان خلايا المضيف (العائل) حيث تتضاعف داخلها مدمرة الاستجابة المناعية الطبيعية والنوعية 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 إضافة إلى إمكانية تصميم لقاحات فعالة.

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

بدأت الدراسات الوراثية التقليدية للبروسيلة في بداية هذا القرن وذلك بإحداث طفرات عشوائية بدلت *spontaneous mutants*، ركزت هذه الدراسات بداية على النمط الظاهري والثبات والاستقلاب إضافة إلى فوعة تلك السلالات الطافرة (Halling et al., 1991). اتجهت هذه الدراسات فيما بعد نحو دراسة المورثات المرزمة 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 مقارنة مع المتعضيات الأخرى ولكن لم تتم دراستها من خلال عزلها والتعبير عنها، مثل *dsbA*، *pheB*، *vsrb* إضافة 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 إضافة 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 الذايفانات المفروزة من قبل البكتريا فاعلية الزنك بروتياز مثل الذايفان العصبي *neurotoxin* الذي تفرزه الـ *Clostridium botulinum* (Lalli et al., 2003)، و ذايفان الجمرة *Anthrax Lethal Toxin* المفروز من قبل الـ *Bacillus anthrax* (Shoop et al., 2005). حيث تبين أن لهذه الأنزيمات تأثيرات مرضية متنوعة، مثل تتخر أو نرف الأنسجة المتضررة وذلك نتيجة لهضم العناصر البنائية للخلية، تشكيل الودمات، حلّ العديد من البروتينات البلازمية، إضافة 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*

استنتبت البروسيلة الضأنية *B. melitensis* Rev I المعزولة من حليب ملوث على وسط إنتقائي *Brucella selective Agar* (HIMEDIA)، أتبع ذلك بتنميتها 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 µg/ml من الأمبيسلين *ampicillin* (Applichem) على درجة 37 °م.

2- تقانات البيولوجيا الجزيئية: *Molecular biology techniques*

1-2- إستخلاص الجينوم: *Genome extraction*

تقانات البيولوجيا الجزيئية المتبعة عموماً تمت وفقاً لـ Sambrook et al. (1989). حيث استخلص جينوم البروسيلة الضائنية *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 بروتياز: Isolation of the gene

عُزلت مورثة الزنك بروتياز 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 للبروسيلة الضائنية 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 (التمسخ 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. تمّ 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)، تمّ ذلك من خلال عملية التحول الوراثي Transformation.

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

عُزل البلازميد من السلالات البكتيرية باستخدام Plasmid Midi kit (Qiagen) تبعاً لتعليمات المنتج. قيس كمية البلازميد المُنقى 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 كاملة على درجة 37 °م ثمّ أخذ من هذه المزرعة 200 μl ونقلت إلى مزرعة 20 ml للتعبير عن البروتين المرغوب. أضيف الـ (IPTG) Isopropyl b-D-thiogalactoside (Promega) 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 Optic Density (O.D₆₀₀) وذلك من أجل مراقبة معدل نمو الخلايا المضيفة (العائلة) خلال الزمن.

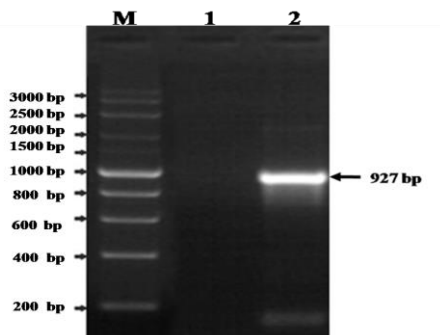
رُجل ناتج التعبير على هلامة سلفات دوديسيل الصوديوم عديد الأكريلاميد SDS-PAGE المحضرة وفق Sambrook et al. (1989) باستخدام هلامة تكديس Stacking Gel بتركيز 5 % و هلامة فصل Resolving Gel بتركيز 12 % للتأكد من نجاح التعبير عن البروتين المرغوب.

النتائج والمناقشة: RESULTS AND DISCUSSION

1- عزل وتنسيل مورثة الزنك بروتياز:

بعد استخلاص جينوم البروسيلة الضائنية عُزلت مورثة الزنك بروتياز 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 لسلسلة متعدد ببتيد مؤلفة من 308 ثمانية حمض أميني، إضافة إلى أن الحجم المتوقع نظرياً للبروتين الناتج اعتماداً

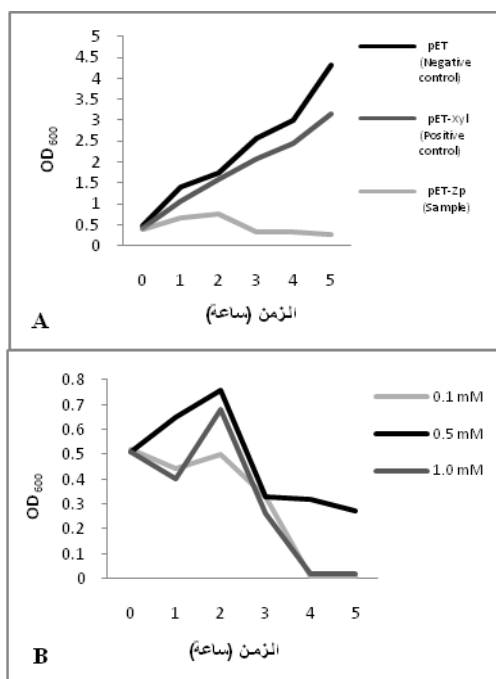
على تسلسل الحموض الأمينية يبلغ تقريباً 33 kDa (protein calculator program V3.3). تمت تنقية مورثة الزنك بروتياز من الهلام باستخدام PCR clean up system kit (Promega)، بلغ تركيز الـ DNA المُنقى المُقاس بواسطة جهاز الـ (Thermo) Nanodrop نحو 96.4 ng/μl. أدخلت المورثة المُنقاة فيما بعد ضمن بلازميد التعبير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



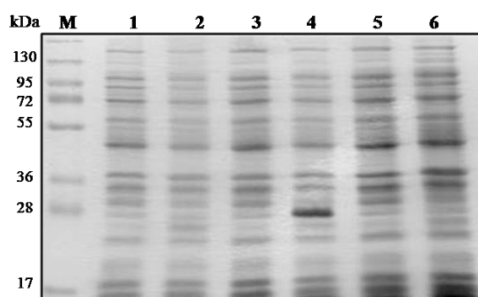
الشكل (1) عصابة مورثة الزنك بروتياز بعد تضخيمها بطول 927 bp حيث تمّ ترحيلها على هلامة الأغاروز 1.5% الحاوية على الايثيديوم برومايد وإظهارها باستخدام الأشعة فوق البنفسجية M.U.V. واسمة عصابة معيارية، 1. شاهد سلبي، 2. مورثة الزنك بروتياز

2- التعبير عن البروتين المؤشَب:

نُميت *E. coli* BL21 (DE3) الحاوية على بلازميد pET-15b-zinc protease في وسط LB درجة حرارة 37 °م. لوحظ بعد ساعتين من الحث بتركيز مختلفة من الـ 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 لبكتريا حاوية على بلازميد فقط pET. مما يدل على إمكانية مساهمة بروتين الزنك بروتياز بموت الخلايا المضيفة (الشكل 2). إضافة إلى أن الرحلان الكهربائي على هلام الـ SDS-PAGE لم يُظهر أية فروق ملحوظة بين البروتينات المفردة من البكتريا 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 0.5 OD₆₀₀ (B). تناقص الكثافة الضوئية للبكتريا بعد تحريض التعبير عن مورثة الزنك بروتياز 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 الـ pET-zp على التوالي ضمن بكتريا *E. coli* BL21 (DE3) عبر هلامة عديد الأكريلاميد المصبوغة بأزرق الكومازي 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 بدورها 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 إضافة 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 البكتريا المرحضة 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 المنتمة لهذا الصف وتبين أن التعبير عنها وتنقيتها غالباً ما يكون صعباً نظراً لسميتها وانخفاض انحلاليتها في الغشاء (Siddiqui et al., 2007). كما أظهرت الدور الذي تقوم به تلك الأنزيمات لدى العديد من الأنواع البكتيرية الممرضة خصوصاً في أذية 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 البكتريا 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 المنتمة لصف الـ Metalloprotease والذي ما زالت الدراسات حوله محدودة في الموت الخلوي للبكتريا إضافة 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. Hagius, 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 / فتحى اسماعيل حوقة
أ. د / سمير عبد المعطى القاضى