J. of Agricultural Chemistry and Biotechnology, Vol. 1 (2): 123 - 131, 2010

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 Biotechology Nuclear Energy Tound. Syria**

تنسيل وتعبير وتنقية بروتين الـ DsbA الناتج من بكتريا البروسـيلا الضـأنيـة

دينا علي[1]، دانا زعيتر[2]، بسام البلعة [3]، أيمن المريري[3]و عصام قاسم[1]

[1] قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم – جامعة دمشق.
[2] قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق.
[3] قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية

المُلخص

ضُخمت المورثة المرمزة لأنزيم أكسيدو ريدوكتاز ثنائي السلفوئيد انطلاقاً من جينوم البروسيلا 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 المأشوب فيما بعد باستخدام عمود الألفة للمخلب المعدني.

كلمات مفتاحية : أنزيم الأكسدة ثنائي السلفوئيد، التفاعل السلسلي للبوليميراز، التنسيل، التعبير البروتيني، التنقية، البروسيلا الضأنية.

المُقدمة

يُعد داء البروسيلات Brucellosis من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان zoonotic disease وهو مُنتشر في بلاد حوض البحر الأبيض المتوسط، شبه الجزيرة العربيـة (Boschiroli *et al* ., 2001) 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 البروسيلا *Brucella* وذلك نسبةً إلى أول من اكتشفها وهو David Bruce عام 1887.

ُصيب 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 البروسيلا (Pappas *et al.*, 2005). كما ويتم انتقال العدوى إلى الإنسان من خلال الاتصال المباشر ببول أوبراز أوإفرازات 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 البروسيلا تكون ممرضة للإنسان،: البروسيلا المجهضة *B. abortus*، البروسيلا الضأنية *B. melitensis*، البروسيلا الخنزيرية B. suis، البروسيلا 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 الآزوتية موزعة على صبغيين حلقيين يبلغ حجم الصبغي الأول 2,117,144 bp في حين يبلغ حجم الآخر1,177,787 bp تقريباً. يحمل هذان الصبغيان نحو 3,197 مجالاً مفتوحاً للقراءةOpen reading frame (Moreno, 1998).

يتميز صبغي البروسيلا بوجود أصل تضاعف يماثل أصل التضاعف لدى *α-proteobacteria* إضافةً إلى وجود مورثات التدبير المنزلي Housekeeping genes والتي تُساهم في تضاعف الـ DNA، الانتساخ، الترجمة، الانقلاب المركزي وبناء جدار الخلية (Vizcaino *et al*., 2000).

هناك العديد من الأبحاث التي درست بعض المورثات المُرمزة لبروتينات الفوعة عند البروسيلا مثل: L7/L12 (Oliveira *et al*.,1996)، HtrA (Roop *et al*.,1994)، (Almariri *et al*., 2001) P39، YajC (Vemulapalli *et al*., 1998) وتم استخدام بروتيناتها كمستضدات تأشيبية قادرة على تحريض الاستجابة المناعية. إلا أن هناك العديد من المورثات تم التعرف عليها ضمن جينوم البروسيلا مُقارنةً مع جينوم المتعضيات الأخرى ولكن لم يتم دراستها من خلال عزلها وتنسيلها مثل: *dsbA, pheb, znu* (Delrue *et al*., 2001).

يُعد أنزيم الـ DsbA ثيو دي سلفوئيد 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 مُباشر عن تشكيل الرابطة الكبريتية للبروتينات المُصنعة حديثاً والمُفرزة إلى السيتوبلاسما المحيطية للبكتريا سالبة الغرام والتي تُساهِم بدورها في التفاف وتحديد البنية ثلاثية الأبعاد لهذه البروتينات (Sevier *et al*., 2002 ;2003 ,.Kadokura *et al*).

تُرمِز هذا الأنزيم مورثة الـ *dsbA*، وهو عبارة عن بروتين أحادي الجزيئة يتوضع ضمن السيتوبلاسما المحيطية للبكتيريا، ويمتلك زوج من ثمالات السيستيئين تشكل الموقع الفعال لهذا الأنزيم، والتي تكون مُؤكسَدة 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 السيستيئين في البروتينات التي تكون في طور تشكيل بنيتها ثلاثية الأبعاد (Frech *et al*., 1991; Bardwell *et al* 1996)، وبالمقابل يُصبح أنزيم الـ DsbA بحالة مُرجَعة. ولكي يستعيد دوره التحفيزي في أكسدة بروتينات أخرى، يحتاج إلى إعادة أكسدته 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 كربوكسيلتين) والتي تُعتبر كمصدر لطاقة الأكسدة (Bardwell *et al*., 1993)، حيث تنتقل هذه الطاقة إلى ثمالات السيستيئين 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 السيستيئين 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* toxin المُسبب لمرض السعال الديكي (Stenson *et al*., 2002).

تهدف هذه الدراسة إلى عزلِ مورثة الـ *dsbA* لأول مرة عند البروسيلا الضأنية *Brucella melitenis* والتعبير البروتيني عنها بغية الحصول على البروتين ودراسته مستقبلاً كمستضد نوعي يتم حقنه ضمن المضيف الطبيعي.

المواد والطرائق

لقد تم إستعمل الطرائق وفقا لـ Sambrook *et al*., (1989)

1- السلالات والبلازميدات Strains and plasmids

1-1 السلالات Strains

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

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 المأشوب.

2- استخلاص الجينوم Genome extraction

تم استخلاص الـ DNA الجينومي باستخدام Wizard SV gel and PCR clean – Up system، وتنقيته حيث بلغ تركيز الـ DNA المُنقى باستخدام الـ Nano drop (Thermo ®): 1400 ng ml

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

تم تصميم مرئسات نوعية بالاعتماد على التسلسل النيكليوتيدي لمورثة الـ *dsbA* المأخوذ من البنك الجينومي للبروسيلا الضأنية وذلك بإضافة مواقع تقييد في طرف كل من هذه المُرئسات والتي تتناسب مع إدخال الشدفة المُضخمة في بلازميد التعبير المورثي لاحقاً.

التسلسل النيكليوتيدي للمرئستين الأمامية والعكسية على التتالي:

↓NdeI

5`ATATATCATATGCCTGTAGCGCTTAATCG 3`

↓ BamHI

5` ATATATGGATCCTCAAAGAGCGCTGTCGAT 3`

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

تم عزل مورثة الـ *dsbA* من خلال تضخيمها بوساطة تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز Polymerase chain reaction (® Techne)، حيث اسْتُخدِم الـ DNA الجينومي لبكتيريا البروسيلا الضأنية *Brucella melitensis* كقالب، واسْتُخدِم أنزيم البلمرة High fidelity DNA polymerase.

احتوى أنبوب تفاعل التضخيم المكونات التالية: DNA 1µl ممدد بنسبة 1/10، dNTPs 0.5µl، 1µl من كل مرئسة أمامية وعكسية، Taq polymerase 0.5µl، MgCl2 1µl ، buffer10x 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 المُرئسات 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 Ligation reaction pET

تم مُعاملة كلاً من مورثة الـ *dsbA* وبلاسميد التعبير المورثي الـ pET -15b بوساطة أنزيمات التقييد، ثم تم ترحيل كلاً منهما على هلامة الأغاروز ذات التركيز 0.8 % ثم قص الشدفتين وتنقيتهما بوساطة الـ QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGen ®)، حيث بلغ تركيز كلاً من مورثة الـ *dsbA* وبلاسميد الـ pET بوساطة جهاز الـ NanoDrop (Thermo ®): 26.2 ng \ ml و 18 ng \ ml على التتالي، 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 الـATP كعامل مساعد.

2-4 تحضير الخلايا البكتيرية لتكون مهيئة لاستقبال البلازميد Competant cells

تم تحضير كلاً من بكتيريا الـ *E.coli* DH10B والـ *E.coli* BL21DE3 لتكون مهيئة لاستقبال البلازميد، حيث تم وضع كل من هذه البكتيريا في محلول الـ CaCl2 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 بوساطة تقنية التحول البكتيري الـChemical Transformation بهدف تنسيل المورثة.

4-4 استخلاص البلازميد Extraction of the plasmid

أُستخلص البلازميد من إحدى المستعمرات الايجابية النامية على طبق البتري لناتج التحول البكتيري، وتم قياس تركيز البلازميد المُستخلص بوساطة جهاز الـNanodrop.

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 استنبات المستعمرات الناتجة ضمن 3 ml من وسط الـ LB+Amp لمدة ست عشرة ساعة في حاضنة ذات درجة الحرارة 37 °م، وفي اليوم التالي أُضيف 200 µl من المُستنبت إلى أرلينة تحتوي على 10 ml من وسط الـ LB وحتى الوصول إلى تركيز OD 600على(0.7 – 0.5) . فيما بعد تم التحريض على التعبير البروتيني من خلال إضافة الـ Isopropyl b-D-thiogalactoside (100mM IPTG) ضمن حاضنة درجة حرارتها37 °م لمدة أربعة ساعات.

6- استخلاص البروتين المأشوب وتنقيته Protein extraction and purification

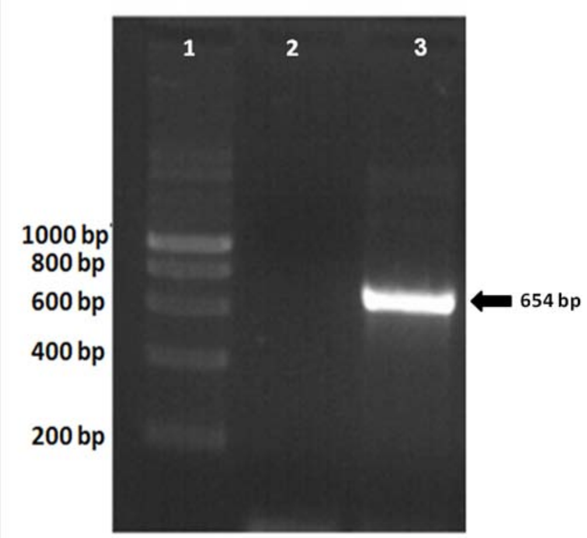
تم استخلاص البروتين المأشوب من إحدى الخلاصات البكتيرية التي عبرت عنه، حيث تم تثفيل المستنبت البكتيري وحل الراسب بمحلول الـ Buffer Lysis ((pH 8) 50Mm Tris Hcl، 1Mm EDTA،1Mm EDTA، 50Mm NaoH،PMSF 100mM,0.0871gr/5ml)، بحيث يتم إضافة حجم 3 ml لكل غرام من وزن الراسب، ثم أضيف الليزوزيم Lysozyme (التركيز النهائي 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 المعلق في درجة حرارة الغرفة وإضافة محلول $MgCl_2$ (التركيز النهائي له 10 mM)، ثم تم التثفيل والاحتفاظ بالطافي (الطافي الأول)، ثم تم إعادة حل الراسب بمحلول Lysis Buffer والتثفيل والاحتفاظ بالطافي (الطافي الثاني)، ثم تم حل الراسب بمحلول الـ Lysis Buffer يحتوي البولة 8 M Urea وحضن المُعلق في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين، ثم تم التثفيل من جديد والاحتفاظ بالطافي (الطافي الثالث).

بعد استخلاص البروتين المأشوب من الخلاصة البكتيرية تم تنقيته بوساطة أعمدة الكروماتوغرافيا الألفة للهيستيدين، حيث تم تحميل 2 ml من الطافي الثالث الحاوي على البروتينات والذي تم ترشيحة على عمود الالفة بمعدل تدفق 1.0 ml / min، ثم تم غسل العمود بوساطة محلول الـbinding buffer (8 × Phosphate buffer، 20 mM imidazole، H2O) يحتوي تركيز منخفض من الايميدازول من أجل التخلص من البروتينات غير المرتبطة بالعمود ومن ثم تم فصل البروتين المأشوب المُرتبط باستخدام محلول الـ Elution buffer يحتوي تركيز عالي من الايميدازول (8 × Phosphate buffer، 500 mM imidazole، H2O).

النتائج والمناقشة

1-3 تضخيم مورثة الـ *dsbA*

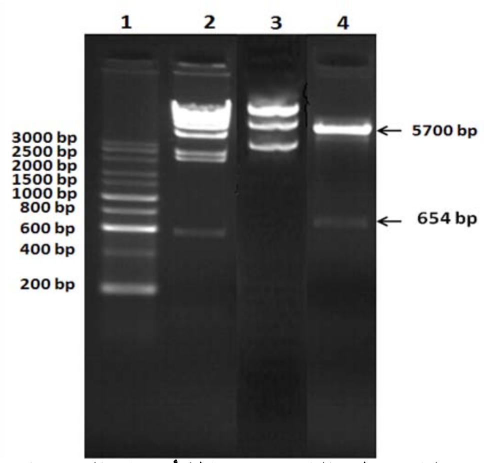
عُزلت مورثة الـ *dsbA* من الـ DNA الجينومي للبروسيلا الضأنية بوساطة الـ PCR ثم تم تحليل ناتج التفاعل السلسلي للبوليميراز بهدف التأكد من عزل المورثة من خلال ترحيل 5 µl من ناتج الـ PCR على هلامة الأغاروز المُضاف لها الإيثيديوم بروميد ethidium bromide ذات التركيز 1.5% (الشكل 1). حيث تبين من خلال إظهار الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية أن شدفة الـ DNA التي تم الحصول عليها تظهر بطول 654 bp مُطابق لطول تسلسل المجال مفتوح القراءة الـ Open reading frame (ORF) الممثل للمورثة والمأخوذ من البنك الجينومي للبروسيلا الضأنية (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*

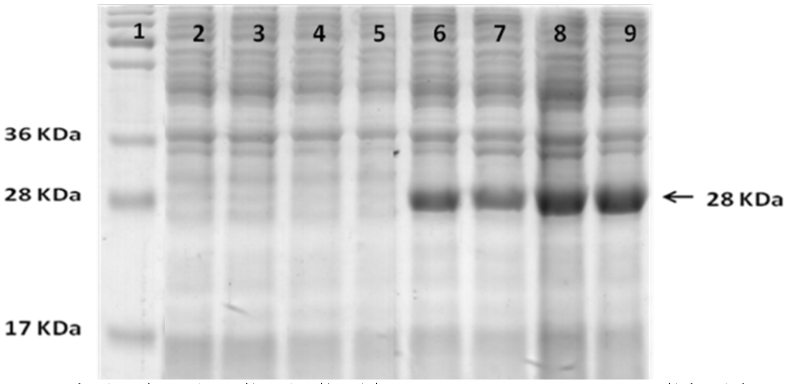
تم ربط مورثة الـ *dsbA* بعد معاملتها بوساطة أنزيمات التقييد إلى بلازميد الـ pET -15b، ثم تم إدخال البلازميد الناتج pET -15b/*dsbA* إلى بكتيريا الـ *E.coli* DH10B بهدف التنسيل، فيما بعد عُزل البلازميد من إحدى المستعمرات البكتيرية الناتجة وتم التأكد من احتواء البلازميد على مورثة الـ *dsbA* من خلال تقطيع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



الشكل 2. هلامة الأغاروز 1.5 % لناتج تقطيع البلازميد بوساطة 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*

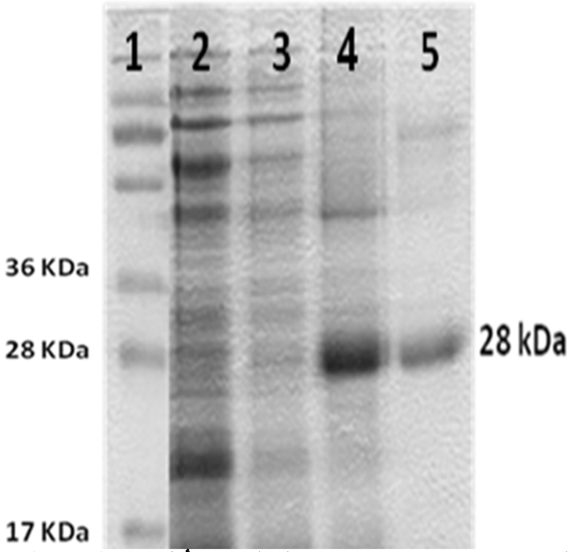
تم التعبير البروتيني لمورثة الـ *dsbA* داخل بكتيريا الـ *E.coli* BL21DE3 تحت سيطرة المُحضض PT7، حيث تم إدخال البلازميد pET -15b / *dsbA* ضمن بكتيريا الـ *E.coli* BL21DE3 بوساطة تقنية التحول الكيميائي Chemical Transformation. يُوضح الشكل (3) صورة لهلامة الـ SDS – PAGE ذات التركيز 12 % باستخدام صبغة أزرق الكوماسي Coomassie brilliant blue R – 250، فقد بين تحليل الـ SDS-PAGE لخُلاصة 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 الـDsbA يبلغ تقريباً (28 kDa).



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

4-3 استخلاص البروتين المأشوب وتنقيته

أستخلص البروتين المأشوب، ثم تم تنقيته بوساطة أعمدة الكروماتوغرافيا الألفة للهيستيدين 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 12% SDS – PAGE، 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 بوساطة الكروماتوغرافيا.

REFERENCES المراجع

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*., l 67, 581-589.

Boschiroli 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 Lestrate., I Danese., V Bielarz., P Mertens., X De Bolle., A Tibor., J.P. Gorvel., and Letesson, J.J. (2001).

Identi¢cation of *Brucella spp*. genes involved in intracellular tr⁄cking. *Cell. Microbiol*., 3, 487-497.
Dornand J, A Gross., V Lafont., J Liautard., J Oliaro., JP Liautard.(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 Biotechology 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*

قام بتحكيم البحث:

أ.د./ محمد منصور قاسم — كلية الزراعة – جامعة المنصورة

أ.د./ حسين عبدالله محمد الفضالى — كلية الزراعة – جامعة المنصورة(فرع دمياط)