كلونة وتعبير جين Staphylokinase المنتج من بكتريا *Staphylococcus aureus* في بكتريا *E. coli* DH5α

حارث كامل بنية وحسن عطية فرحان
كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الانبار

الخلاصة

انتخبت العزلتان المحليتان (A2 وA5) من بين 12 عزلة من بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* لقدرتها العالية على انتاج بروتين الستافلوكاينيز. تم عزل الدنا الكروموسومي للعزلات المنتخبة واستخدم كقالب لبناء الجين *sak*. واستخدمت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في الحصول على قطعة دنا بحجم 490 زوج قاعدي. تم ربط قطعة الدنا على ناقل الكلونة pRSETA باستخدم انزيم T4 DNA Ligase للحصول على قطعة الدنا الهجينة pRSETA-*sak* ثم ادخالها الى السلالة *E. coli* DH5α بطريقة التحول الوراثي. نجح الجين *sak* في التعبير داخل الخلايا المتحولة وانتاج بروتين Staphylokinase بعد الحصول على نتيجة موجبة لاختبار الكازئيين اضافة الى استخدام الدنا البلازميدي المستخلص من السلالة المتحولة كقالب لبناء الجين *sak* مرة اخرى.

الكلمات المفتاحية: الستافلوكاينيز، كلونة، تفاعل البلمرة المتسلسل.

E-mail: harithkamil@yahoo.com

Cloning and Expression of Staphylokinase gene produced from *Staphylococcus aureus* in *E. coli* DH5α

H. K. Buniya and H. A. Farhan
College of Education for Pure Sciences\ University of Anbar

Abstract

We selected two local bacterial isolated (A2 and A5) for *Stahylococcus aureus* according its high ability to produce Staphylokinase. The Chromosomal DNA isolated and used as a template to amplified *sak* gene. By polymerase Chain Reaction (PCR) we obtained 490 base pair DNA fragment, and ligated with linearized pRSETA cloning vector to produced pRSETA-*sak* recombinant DNA. The ligation products were transformed into *E. coli* DH5α. *sak* gene successful to produced target protein and gave positive result in caseinolytic assy. Then using Extracted DNA plamid as a template to amplified *sak* gene again.

Keywords: Staphylokinase, cloning, PCR

المقدمة

يعد بروتين Staphylokinase المنتج بواسطة بكتريا *Stahylococcus aureus* من العوامل المهمة في إذابة الخثرة المتخصصة للفايبرين (1). يتألف هذا البروتين من 163 حامض أميني بوزن جزيئي يبلغ 15.5 كيلو دالتون ويشفر له الجين *sak* بحجم 489 زوج قاعدي (2). أدت الدراسات المتلاحقة لهذا البروتين البكتيري إلى فهم أكبر لميكانيكية عمله كمذيب للخثرة الدموية، حيث يرتبط هذا البروتين مع البلازمينوجين (Plasminogen) ليكون معقد بنسبة 1:1، ليقوم هذا المعقد بتحويل البلازمينوجن إلى بلازمين (Plasmin) وهو بدوره يقوم بتحليل بروتين الفايبرين المكون الرئيسي لخثرة الدم (3). ولبروتين الستافلوكاينيز الألفة العالية للإتحاد مع البلازمين على سطح الخثرة الدموية (4). يعد بروتين الستافلوكاينيز من المركبات الرخيصة نسبيا موازنة مع بقية عوامل إذابة الجلطة ويتمّ العمل حاليا على الوصول به إلى الإنتاج على المستوى التجاري ولكن لايزال تأثيره المناعي كون مصدره بكتيري هو العامل المحدد الأكبر لاستخدامه على نطاق واسع (5). توضحت خصائص الستافلوكاينيز في

تحليله للخثرة بعدد من الدراسات بكونه ذو تخصص عالي للفايبرين، عمر النصف للستافلوكاينيز في البلازما (6.3) دقيقة (6). أجريت العديد من الدراسات على كلونة جين *sak* منها الدراسة التي اجراها(2) حيث تمَّ عزل الجين من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureua* وكلونته في بكتريا *E. coli* حيث تمَّ تحميل الجين على البلازميد الناقل pET ونقله إلى العزلة القياسية (GJ1158) *E. coli* بعملية التحول Transformation. وفي دراسة اخرى تم تحميل الجين على الناقل pET-32 وكلونته في السلالة *E. coli* DH5α (7). تم دراسة الظروف المثلى لإنتاج بروتين ستافلوكاينيز في البكتريا المحورة وراثيا(E.coli JM 109 (DE3 وكانت درجة الحرارة المثلى لإنتاج بروتين الستافلوكاينيز فيها 37°م حسب الدراسة وكانت العزلة المحورة اكثر كفاءة في إنتاج البروتين المذكور (8). أمّا التعبير عن الجين المشفر للإنزيم في البكتريا فيعتمَّد ويتأثر ببعض الجينات والبروتينات المنظمة لعملية التعبير، إذ ذكر (9) إنَّ البروتين CcpA يقوم بكبح الاستنساخ والتعبير لأكثر من 300 جين ومن بينها الجين .*sak*

المواد وطرائق العمل

- **جمع العينات:** جُمعت العزلات البكتيرية من مختبرات مستشفى الرمادي العام في مدينة الرمادي ومن حالات مرضية مختلفة وتم الاعتماد على تشخيص المختبر اولا ومن ثم تم اجراء الاختبارات الكيموحيوية لتاكيد نوع البكتريا (10).
- **الكشف عن البروتين:** لمعرفة قدرة البكتريا على أنتاج بروتين الستافلوكاينيز Staphylokinase تم الاعتماد على فحص الكازيين Caesinolytic assay وحسب ما موصوف في (11). حُضرت مزرعة سائلة للعزلات البكتيرية بعمر 18 ساعة، أُخذ من كل مزرعة 1 مل ووضعت في أنبوبة ابندورف سعة 1.5 مل وحُطمت الخلايا بجهاز الموجات فوق الصوتية (Sonicetor (Qsonica, USA، وأستُخدم جزء من المزرعة المتحللة في اختبار الكازين. مُزج 36 مل من محلول الدارئ (50 mMTris- HCL\ 150 mM NaCl) مع 400 ملغم من الاكاروز وبعد إتمام عملية الإذابة بواسطة الحرارة وباستخدام جهاز المايكروويف لمدة دقيقة واحدة، أُضيف 2 مل الحليب الساخن مع 1 مل من بلازما الدم، مُزجت جيدا وصُبت في طبق بتري وتُرِكت الى ان تتصلب، تم بعدها عمل حفر في الهلام المتصلب ووضع في كل حفرة 50 مايكروليتر من البكتريا المتحللة وحُضنت لمدة 18 ساعة بدرجة 37 مئوية. تم ملاحظة وجود منطقة شفافة حول الحفرة كدليل على فعالية البروتين. وتم اختيار العزلات التي اعطت اكبر قطر للمنطقة الشفافة.
- **بناء الجين *sak*:** تم بناء ومضاعفة جين *sak* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) باستخدام الدنا الكروموسومي المعزول من العزلات البكتيرية كقالب وباستخدام بوادئ متخصصة لجين sak (forward: 5 CGG***GGATCC***CTCAAGTTCATTCGAC 3) و(Reverse: 5 *CGG**GAATTC**TTTCCTTTCTATAACAAC* 3) والمجهزة من شركة Eurofine Genomics India Pvt, Ltd الهندية. وتمت برمجة الجهاز المدراج الحراري (Thermal Cycler (TECHNE TC-3000 وحسب الخطوات التالية 1- مرحلة المسخ الاولي (95°م لمدة 10 دقائق)، 2- مرحلة المسخ (95°م/ دقيقة واحدة)، 3- مرحلة التصاق البوادئ Annealing (57°م/ دقيقة واحدة)، 4- مرحلة الاستطالة (72°م/ دقيقة واحدة)، تم تكرار المراحل 2 و3 و4 بعدد دورات بلغ 40 دورة ثم تليها المرحلة الخامسة وهي مرحلة الاستطالة النهائية بدرجة حرارة 72مْ ولمدة 10 دقائق ثم تخفض درجة الحرارة الى 5°م في الخطوة الأخيرة. بعد انتهاء التفاعل تم الكشف عن نواتج التفاعل عن طريق ترحيلها على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% ولفترة 40 دقيقة بفرق جهد يبلغ 70 ملي فولت.

- **تنقية نواتج PCR:** تمّ استعمال عدة تنقية الدنا QIAquick PCR purification kit المجهز من شركة QIAGEN. لتنقية نواتج التضخيم لإزالة النيوكليتيدات والأملاح وحسب تعليمات الشركة المجهزة.
- **قطع ناقل الكلونة (البلازميد pRSETA) ونواتج PCR باستعمال الأنزيمات القاطعة:** استخدم الأنزيمان *Bam*HI و *Eco*RI لقطع ناقل الكلونة pRSETA المستعمل في الدراسة، وحضر مزيج التفاعل حسب ما جاء في تعليمات شركة Promega.
- **استخلاص الدنا من هلام الاكاروز:** استعملت عدة استخلاص الدنا QIAquick Gel Extraction Kit والمجهزة من شركة QIAGEN لاستخلاص ناقل الكلونه المعامل بالأنزيمات القاطعة من هلام الاكاروز وحسب تعليمات الشركة.
- **ربط ناقل الكلونة مع نواتج PCR (الجين *sak*):** بعد معاملة ناقل الكلونة (البلازميد pRSET) ونواتج PCR بأنزيمي القطع BamHI وEcoRI، استعملت عدة ربط الدنا *AccuPower* Ligation PreMix والمجهزة من شركة BIONEER الكورية لربط ناقل الكلونة مع الجين *sak* وحسب تعليمات الشركة المجهزة أضيف لكل أنبوبة ابندروف المكونات الموضحة في الجدول (1).

جدول (1) التراكيز النهائية لمكونات تفاعل لصق الدنا الهدف بناقل الكلونة

ت	المواد المستخدمة في التفاعل	التركيز النهائي
1	pRSET (Linear vector DNA)	100 ng
2	Insert DNA *sak* gene	30 ng
3	Water, nuclease-free	to 20 µl
	Total volume	20 µl

- **التحول الوراثي Transformation:** تم نقل القطعة الهجينة المكونة من ناقل الكلونة (pRSET) والجين (*sak*)(pRSETA-sak) وبعملية التحول الوراثي الى بكتريا *E. coli* DH5α ويتم الكشف عن نجاح عملية الكلونة حيث لقحت أنبوبة اختبار حاوية على وسط لوريا السائل والمدعم بالامبسيلين بتركيز (100µg/مل) بأحد المستعمرات الناتجة من عملية التحول الوراثي ثم لوحظ التعبير الجيني من خلال اختبار فعالية الانزيم بطريقة اختبار الكازيين (2).

النتائج والمناقشة

- **عزل البكتريا:** تمت تنمية العزلات على وسط اكار الدم Blood Agar وتمت ملاحظة الصفات المظهرية وشكل المستعمرات على الوسط بعدها تم تنقية العزلات عن طريق زراعتها على وسط المانيتول الملحي Manitol Salt Agar وهو وسط اختياري لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* ولوحظ تغير لون الوسط من الى الأحمر إالى اللون الاصفر وهو من الاختبارات التشخيصية لهذه البكتريا اضافة الى اجراء اختبار انتاج خميرة التجلط Cogulase والتي تنتجها المكورات العنقودية الذهبية فقط (10)
- **اختبار الكازيين Caseinolytic assa:** استخدم اختبار الكازيين لتحديد قابلية البكتريا في انتاج بروتين الستافلوكاينيز من خلال تكوين هالة شفافة حول المستعمرة كدلالة على ايجابية الاختبار. وكانت العزلتين A2 و A5 الاكفأ في انتاج اليروتين حين ان قطر الهالة كان 9 و13 سم على التوالي شكل (1).

شكل (1) اختبار الكازيين للكشف عن قدرة البكتريا المنتخبة على انتاج البروتين Staphylokinase . الحفرة رقم 3 للعزلة المنتخبة A5 والحفرة رقم 6 للعزلة المنتخبة A2

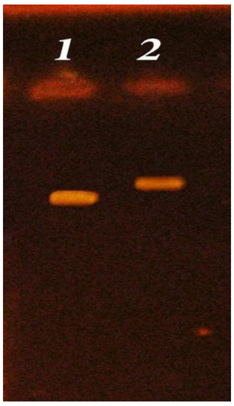
- **استخلاص الدنا الكروموسومي:** يظهر الشكل (2) ظهور الدنا الكروموسومي بشكل حزمة مفردة ومتألقة على هلام الاكاروز بتركيز 0.8% بعد ترحيله كهربائيا لمدة 40 دقيقة والكشف عنه بواسطة جهاز (UV transilluminator) وقدر تركيزه بحوالي 120-200 نانوغرام/ مايكروليتير.

الشكل (2) الترحيل الكهربائي للدنا الكروموسومي على هلام الاكاروز بتركيز 0.8% وفرق جهد قدره 70 ملي فولت لمدة 40 دقيقة

المسار 1 الدنا المجيني للعزلة البكتيرية *Staphylococcus aureus A2*

المسار 2 الدنا المجيني للعزلة البكتيرية *Staphylococcus aureus A5*

- **استخلاص البلازميد (pRSETA):** يوضح الشكل (3) الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي للناقل pRSETA (المسار رقم 2) ويعدّ البلازميد المذكور من النواقل المستعملة بصورة واسعة في عمليات التعبير عن البروتينات المنتجة خارج مضائفها كونه يعمل بنظام T7 المشتق من العاثي T7 ويعود السبب إلى كون T7 RNA polymerse يكون متخصص فقط للحفاز المذكور ويكون معدل الاستنساخ أسرع 4-5 مرات من معدل بناء RNA polymerse *E.coli* اذ يبلغ معدل الاستنساخ 200 نيوكليوتدية/ ثانية (12)، ويحتوي الناقل pRSETA على عدد من المواضع الحساسة المقروءه لعدد من الأنزيمات القاطعة ويتواجد البلازميد بعدد كبير من النسخ في الخلية الواحدة (من النوع المسترخي) كونه يحمل منشأ تكرار من البلازميد pUC9 (13).

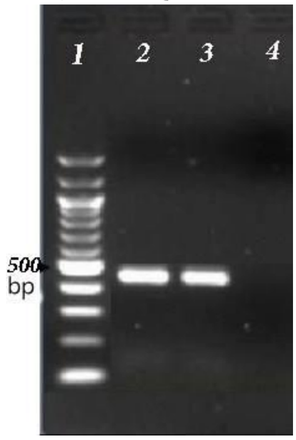


شكل (3) الترحيل الكهربائي للبلازميد pRSETA على هلام الاكاروز بتركيز 0.8% وفرق جهد قدره 70 ملي فولت لمدة 40 دقيقة

المسار 1 ناقل الكلونة pRSETA المعامل بالانزيمات القاطعة *Bam*HI و *Eco*RI

المسار 2 ناقل الكلونة pRSETA

- **بناء (تضخيم) الجين المشفر لأنزيم ستافلوكاينيز:** يوضح الشكل (4) نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل لبناء الجين المطلوب المتمثل بحزمة دنا تمثل الجين *sak*، إذ تشير المعلومات الواردة في موقع قاعدة البيانات NCBI إلى أن الجين *sak* المشفر لأنزيم الستافيلوكاينيز في بكتيريا *Staphylococcus aureus* يبلغ حجمه 490 زوج قاعدي (2 ، 14).



شكل (4) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد قدره 70 ملي فولت لمدة 40 دقيقة

المسار 1 الدليل الحجمي 100 bp DNA Ladder

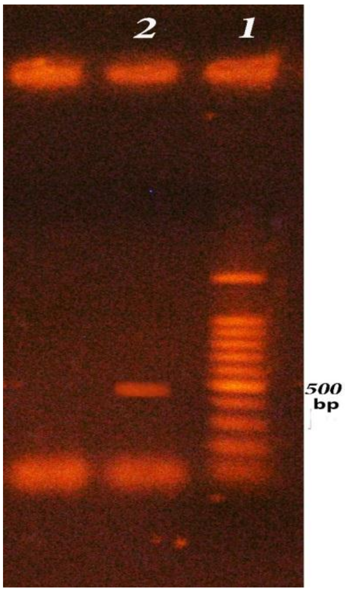
المسار 2 الجين *sak*

المسار 3 الجين *sak*

المسار 4 معاملة السيطرة السالبة

- **تقطيع ناقل الكلونة والجين *sak*:** بعد عملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لناقل الكلونة المعامل بالانزيمات القاطعة وغير المعامل بهذه الانزيمات تم الكشف عن نجاح عملية القطع كما موضح في الشكل (3) المسار رقم 1، حيث وجد اختلاف في موقعيهما على هلام الاكاروز بعد فحصه بجهاز UV transilluminator ويعود السبب في اختلاف موقعيهما الى تحول ناقل الكلونة المقطوع من الشكل الحلقي الفائق الالتفاف إلى الشكل الخطي وباختلاف شكلهما تختلف سرعتهما على هلام الاكاروز.
- **ربط الجين *sak* بناقل الكلونة البلازميد pRSET :** تم ربط الجين *sak* بناقل الكلونة البلازميد pRSETA ليتم الحصول على قطعة دنا هجينة Recombinant DNA التي هي عبارة عن ناقل الكلونة البلازميد pRSETA الحامل للجين *sak* وقد رمز لهذة القطعة البلازميد (pRSETA-*sak*) ومن ثم نقلت وإدخلت قطعة الدنا الهجينة الى بكتيريا *E. coli* DH5α بعملية التحول الوراثي. أن جميع الخلايا النامية على وسط

لوريا المدعم بالامبسيلين حاملة لناقل الكلونة المرتبط به الجين *sak* (pRSETA-*sak*). اظهرت النتائج وكما موضح في الشكل (5) عن بناء الجين *sak* بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وباستعمال البلازميد (pRSETA-*sak*) المستخلص من بكتيريا *E. coli* DH5α المتحولة كقالب لبناء الجين دلالة على وجود الجين *sak* في البلازميد المستخلص من البكتيريا *E. coli* DH5α بعد التحول الوراثي.

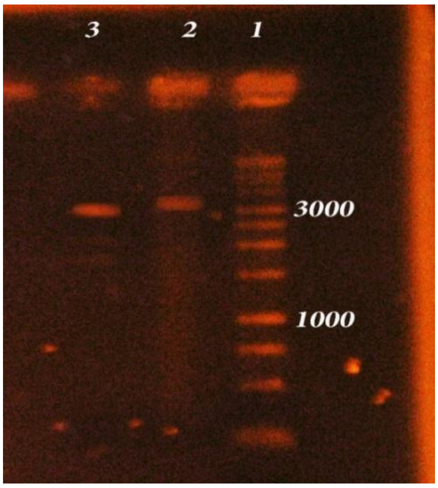


شكل (5) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد قدره 70 ملي فولت لمدة 40 دقيقة

المسار 1 الدليل الحجمي 100bp DNA Ladder

المسار 2 الجين *sak* المحمول على البلازميد pRSETA

أما نتيجة الترحيل الكهربائي للبلازميد الأصلي (pRSETA) والبلازميد (pRSETA-*sak*) المستخلص من بكيتريا *E. coli* DH5α فتبين اختلافاً في الحجم بين البلازميدين عند مقارنتهما بدليل الحجمي 1kbp وهذا يدلّ على نجاح عملية اللصق بين قطعة الجين *sak* وناقل الكلونة مع العلم أنّ كلا البلازميدين عوملا بأحد الأنزيمات القاطعة لضمان تشابهما بالشكل الخطي (6).



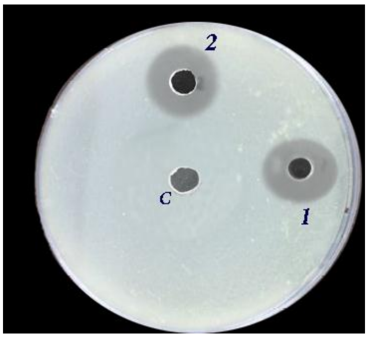
شكل (6) الترحيل الكهربائي للبلازميد pRSETA المعامل وغير المعامل بالأنزيمات القاطعة على هلام الاكاروز بتركيز 0.8% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 40 دقيقة

المسار 1 الدليل الحجمي 1kbp DNA Ladder

المسار 2 البلازميد pRSETA المعامل بأنزيم القطع *Bam*HI

المسار 3 قطعة الدنا هجينة Recombinant DNA (pRSETA-*sak*) المعاملة بأنزيم القطع *Bam*HI

- **التعبير عن الجين المشفر لبروتين الستافلوكاينيز:** بعد تلقيح أنبوبة اختبار حاوية على وسط لوريا السائل و المدعم بالأمبسلين بأحد المستعمرات النامية بعد عملية التحول الوراثي حضنت بالحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة لمدة 18 ساعة وتم اجراء اختبار الكازيين للكشف عن قابلية البكتريا المتحولة على انتاج بروتين ستافلوكاينيز وكانت النتيجة موجبة ولوحظ تكون هالة حول المستعمرات النامية دلالة على نجاح الجين في التعبير في البكتريا *E. coli* DH5α التي تحولت بعملية التحول الوراثي Transformation، الشكل (7) وهو مطابق لما جاء في بحوث سابقة استخدمت هذا الاختبار للتحقق من نجاح عملية التعبير لجين المشفر للستافلوكاينيز (2، 7 و8).



شكل (7) يوضح اختبار الكازئين caseinolytic Test للبكتريا المتحولة

1- بكتريا *Staphylococcus aureus* A2

2- بكتريا *E. coli (DH5α)* بعد عملية التحول الوراثي C – السيطرة control

المصادر

1. Lack, C. H. (1948). Staphylokinase: an activator of plasma protease. Nature, London., P. 161.
2. Pulicherla, K. K.; Gadupudi, G. S.; Rekha, V. P. B.; Seetharam, K.; Anmol, K. & Sambasiva Rao, K. R. S. (2011). Isolation, Cloning and Expression of Mature Staphylokinase from Lysogenic *Staphylococcus aureus* Collected from a Local Wound Sample in a Salt Inducible *E. coli* Expression Host. Int. J. Adv. Sci. Technol., 30:35-42.
3. Kaur, R. & Sekhon, B. S. (2012). Enzymes as drugs: an overview. J. Pharm. Educ. Res., 3: 29-41.
4. Bokarewa, M. I.; Jin, T. & Tarkowski, A. (2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. Int. J. Biochem. Cell Biol., 38(4): 504-509.
5. Collen, D.; Schlott, B.; Engelborghs, Y.; Van Hoef, B.; Hartmann, M.; Lijne, H. R. & Behnke, D. (1993). On the mechanism of activation of human plasminogen by recombinant staphylokinase. J. Biol. Chem., 268: 467-474.
6. Vanderschueren, S.; Barrios, L.; Kerdsinchai, P.; Van den Heuvel, P.; Hermans, L.; Vrolix, M.; De Man, F.; Benit, E.; Muyldermans, L.; Collen, D. & Werf, F. (1995). A randomized trial of recombinant staphylokinase versus alteplase for coronary artery patency in acute myocardial infarction. The STAR Trial Group. Circulation, 92 (8): 2044-2049.
7. Reedy, Y.; Prakash, R. & Anandakumar, S. (2014). Isolation, cloning and expression of recombinant Staphylokinase gene against Thrombosis. Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 6(4): 266-270.
8. Jasim, H. M.; Dellol, R. A. & Hamzah, A. S. (2015). Optimum conditions of Staphylokinase production cloned in *E. coli* JM109 (DE3). Int. J. Microbiol. App. Sci., 4(12): 10-19.

9. Moreno, M. S.; Schneider, B. L.; Maile, R. R.; Weyler, W. & Saier, M. H. (2001). Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole- genome analyses. Mol. Microbiol., 39: 1336-1381.
10. Al-Marjani, M. F.; Abdal, A. K. & Edan, D. S. (2015). Identification of an Efflux Pump Gene, *norA*, in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Baghdad. World. J. Pharmaceutical Res., 4(4):346-356.
11. Remmert, L. F. & Cohen, P. P. (1949). Partial purification and properties of a proteolytic enzyme of human serum. J. Biol. Chem., 181: 431-448.
12. Studier, F. & Moffatt, B. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective High- level expression of cloned genes. J. Mol. Biol., 189: 113-130.
13. Sambrook, J. & Russell, D. (2001). Molecular Cloning: Laboratory Manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor, New York. USA.
14. Thi, H. T. N. & Dinh, T. Q. (2012). Cloning, high-level expression, purification and characterization of a staphylokinase variant, SakfC, from *Staphylococcus aureus* QT08 in *Escherichia coli* BL21. Afr. J. Biotechnol., 11(22): 5995-6003.