أستنسال وتعبير جينات *Bacillus subtilis* المشفرة لأنزيم السليليزفي بكتيريا *Streptomyces* sp.

ايهاب داود سلمان
قسم التقنيات الأحيائية، كلية العلوم،جامعة بغداد

الخلاصة

أستعملت في هذه الدراسة العزلة المحلية *Bacillus subtilis* المنتجة لأنزيم الــسليليز ذي الفعالية المشابهة لأنزيم الأندوكلوكانيز Endo- 1,4-β-D-glucanase والثابت حراريا عند مديات من درجات الحرارة تراوحت من 50 الى 60 م°.

في محاولة لتحديد حجم القطعة الكروموسومية الحاملة للجينات المــشفرة لأنــزيم الــسليليز. اجريت تجربة الأستنسال العشوائي لكروموسوم هذه العزلة المهضوم جزيئيا بوساطة انــزيم التقييد *Eco* R1 والملحوم بناقل الأستنسال المكوكي pSU101 والمقطــوع بــالأنزيم نفــسه واستعملت العزلة المحلية *Streptomyces* sp.SH-H مضيفا للبلازميد الهجين الذي اطلــق عليه pSU102

أظهرت المستعمرات المتحولة بالبلازميد قدرة على افراز انزيم السليليز ووجد ان قطعة مــن الدنا الكروموسومي للعزلة قيد الدراسة قدر حجمها بــ (4.5 – 5) كيلوزوج قاعدي تحمــل الجينات المشفرة لأنزيم السليليز .

المقـــــدمـــــة

أنزيم السليليز هو معقد انزيمي مكون من ثلاثة انزيمات على الأقل هي الأندوكلوكانيز Endo- 1,4-β- D- glucanase (Endoglucanase) ، اكسوكلوكانيز (Exoglucanase) Exo-1,4-β-D-glcanase وبيتاكلوكوسايديز (β-glucosidase) (1 ، 2) . تعمل هذه الأنزيمات الثلاثة على تفكيك جزيئة السليلوز محررة الكلوكوز كناتج نهائي (3 ، 4)، ويمكن الأستفادة من هذه العملية التي تعرف بالتحلل الحياتي للسليلوزفي العديد من التطبيقات الصناعية والزراعية (5) تؤدي الأحياء المجهرية دورا مهما في هذه العملية بوصفها مصدرا مهما لمعقد انزيم السليليز فضلا عن امكانية تطويعها وتطوير انتاجها باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية . لقد ساهمت تجارب أستنسال الجين المشفر لأنزيم الأكسوكلوكانيز والمحور وراثيا في بكتيريا

Escherichia coli الى انتاج بروتين جديد Novel protein ذي مواصفات خاصة وبكميات كبيرة (6) ،كذلك لوحظ زيادة انزيم الأندوكلوكانيز عند وضع الجين المشفر لهذا الأنزيم تحت سيطرو حفاز قوي واستنساله في بكتيريا *E. coli* (4) لقد ساعدت تجارب الأستنسال على فهم وتحليل تطور الجينات المشفرة لمعقد انزيم السليليز (7) أذ لوحظ ان أنزيم الأكسوكلوكانيز المفرز من بكتيريا *Streptomyces reticuli* مكون من 746 حامضا أمينيا وبلغ حجم الجين المشفر لهذا الأنزيم 2288 زوجا قاعديا،كما وجد ان هذا الجين غني بقواعد الكوانين والسايتوسين اذ تصل نسبتهما الى 72% (8) .

لقد أشير في العديد من الدراسات (9 ، 10 ، 11) الى أن اهم المحددات التي تواجه عملية أستنسال جينات معقد انزيم السليليز ، أذ عد استعمال بكتيريا *E. coli* مضيفا لهذه الجينات واحدا من اهم المحددات وذلك لأن هذه البكتيريا لاتملك نظامي الأفراز و التحوير بعد عملية الترجمة واللذين يعدان مهمين لأفراز معقد انزيم السليليز وحمايته من البروتيزات ، فضلا عن ان هذه البكتيريا السالبة لصبغة جرام تختلف في طبيعتها الفسيولوجية والبنائية عن باقي أنواع البكتيريا الموجبة لصبغة جرام لذلك بدا الأتجاه للبحث عن مضايف جديدةلها القدرة على

افرازالأنزيمات الى الوسط ومن هذه المضايف بعض انواع البكتيريا التابعة لجنس *Streptomyces* .

لقد اجريت هذه الدراسة بهدف التعرف على الجين المشفر لمعقد انزيم السليليز وأستنساله في مضيف تابع لجنس الستربتومايسس .

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية وناقل الاستنسال

1- العزلة *Bacillus subtilis* المنتجة لانزيم السليليز قد تم عزلها مسبقاً من ترب المناطق الزراعية المحيطة بمدينة بغداد (12).

2- العزلة المحلية *Streptomyces* sp.SH-H استعملت مضيفاً في تجربة الاستنسال التي تم الحصول عليها مسبقاً من قبل (13).

3- ناقل الأستنسال pSU101 كما في الشكل (1) ، (14) .

الاوساط الزرعية

1- وسط Kosmachev السائل الذي استعمل في تنشيط وتنمية البكتريا الخيطية Actinomyces المفككة للسيليلوز (15).

2- وسط Kosmachev الصلب الذي استعمل في الكشف عن قدرة البكتريا الخيطية المتحولة على انتاج انزيم السليليز (15).

3- وسط زرعي (ME-YE) Yeast Extract-Malt Extract الذي استعمل في تنشيط وتنمية العزلة *Streptomyces* sp.SH-H (16).

4- وسط R2YE الذي استعمل في اخلاف الخلايا منزوعة الجدار (17).

استخلاص الدنا

استخلص كل من الدنا الكلي والدنا البلازميدي من العزلة *Bacillus subtilis* بالطريقة التي وردت في (18 ، 19) كذلك استخلص الدنا الكلي من بكتريا *Streptomyces* كما ذكر في (20، 21) .

تقطيع الدنا الكروموسومي للعزلة *Bacillus subtilis* وناقل الاستنسال pSU101 :

استعمل الانزيم *Eco* R1 لهضم كل من الدنا الكروموسومي للعزلة *Bacillus subtilis* وناقل الاستنسال pSU101 وتمت عملية الهضم استناداً الى الشركة المجهزة GIBCO-USA لتثبت حصول هضم كل من الدنا الكروموسومي والبلازميدي . فحص الدنا المقطع بتحميل (0.012) مللیلتر من كل تحضير في هلام الاكاروز بتركيز (0.7 %) ورحل كهربائياً مدة ساعتين ونصف بفرق جهد (65) فولت ، ثم فحص الهلام بوساطة جهاز المولد للاشعة فوق البنفسجية .

لحم الدنا الكروموسومي للعزلة *Bacillus subtilis* المقطع مع ناقل الاستنسال pSU101:

اجريت عملية اللحم باستعمال الانزيم اللاحم T4-DNA Ligase، اذ تمت عملية اللحم استناداً الى تعليمات الشركة المجهزة USA-GIBCO . تم التثبت من كفاية عملية اللحم بترحيل جزء من مزيج التفاعل وجزء من انموذج السيطرة ودنا غير مقطع بانزيم التقييد لكل من كروموسوم العزلة *Bacillus subtilis* وناقل الاستنسال pSU101 .

لقد نشئ بموجب هذه الخطوة ناقل استنسال اطلق عليه pSU102 يتكون من جزء دنا كروموسومالعزلة ملحوماً مع ناقل الاستنسال pSU101 المقطع بالانزيم القاطع نفسه *Eco* R1 وقد استعمل الناقل الجديد في تجربة التحول اللاحقة .

التحول Transformation

استعملت العزلة *Streptomyces* sp.SH-H كمضيفاً بعد تحويل خلاياها الى خلايا منزوعة الجدار (22) . اجريت عملية تحويل الخلايا منزوعة الجدار بوساطة ناقل الاستنسال pSU102 (23). بعد اتمام عملية التحول جرى اخلاف الخلايا منزوعة الجدار باستعمال الوسط الزرعي R2YE اذ حضنت الاطباق بدرجة (28) م لحين ظهور المستعمرات . لقد تم التثبت من عدم قدرة العزل *Streptomyces* sp.SH-H على افراز انزيم السليليز قبل استعمالها في تجربة التحول وذلك بتنميتها على الوسط الزرعي (ME-YE) وتنشيطها باستعمال وسط Kosmachev السائل ثم اعادة زرعها على وسط Kosmachev الصلب ، وحضنت الاطباق على درجة حرارة (28)مْ مدة خمسة ايام ، ليجري بعد ذلك التثبت من عدم

قدرة العزلة على افراز انزيم السليليز وذلك بغمر الاطباق بمحلول اليود مدة (20–30) ثانية ثم سكب المحلول . وتركت الاطباق مدة (10) دقائق ويلاحظ ظهور الهالة حول المستعمرات الهجينة التي لها القدرة على افراز السليليز (24) .

انتخاب المستعمرات الهجينية

انتخبت المستعمرات الهجينية المحاطة بمنطقة Lethal Zygosis التي تعد مؤشراً على تحويلها بالبلازميد ، اذ ان هذه الصفة معتمدة من العديد من الباحثين في مجال بكتريا *Streptomyces* دليلاً على نقل البلازميد على الخلايا المستلمة سواء كانت عملية تحول (Transformation) او اقتران (Conjugation) (25 ، 26 ، 27) لتأكيد قابلية البلازميد pSU102 على التعبير بشكل صحيح في مضيفه الجديد نقلت المستعمرات الراجعة المنوّه بها انفاً على وسط Kosmachev الصلب بطريقة Replica plates بحيث يحوي كل طبق على (20) مستعمرة راجعة . حضنت الاطباق على درجة حرارة (28) م مدة خمسة ايام . بعد ذلك تم الكشف عن المستعمرات الهجينة التي لها القدرة على افراز السليليز وذلك بغمر الاطباق بمحلول اليود مدة (20–30) ثانية ثم سكب المحلول وتركت الاطباق مدة (10) دقائق ويلاحظ ظهور الهالة حول المستعمرات الهجينية التي لها القدرة على افراز السليليز (24). لقد تم انتخاب المستعمرات الهجينة التي استطاعت من النمو على وسطKosmachev الصلب وكونت حولها هالة بعد اضافة محلول اليود ، كُررّت العملية مرات عديدة للتثبت من قدرة المستعمرات الهجينة على افراز السليليز . لقد تم انتخاب المستعمرات التي لها القدرة على افراز انزيم السليليز بالاعتماد على النسبة بين قطر الهالة (Z) الى قطر المستعمرة (G) (28) .

النتائج والمناقشة

لغرض تحديد حجم قطعة الدنا الكروموسومي الحاوية على الجينات المشفرة لانزيم السليليز ، اجريت تجربة الاستنسال العشوائي الذي استعمل فيها كروموسوم العزلة قيد

الدراسة وناقل الاستنسال pSU101 . يلاحظ من الشكل (1) احتـواء ناقـل الاستنـسال ذي الحجم (20.5) كيلو زوج قاعدي على ثلاثة مواقع حساسة لانزيم التقييـد *Eco* R1 وهـذا يعني في حالة قطعه بهذا الانزيم سوف نحصل على ثلاث قطـع احـدهما ذو حجـم كبيـر واخرتان صغيرتان ذو حجمين متقاربين شكل(2) . كما يلاحظ ايضاً في الـشكل نفـسه الهضم الجزئي لدنا كروموسوم العزلة قيد الدراسة وبأنزيم التقييد نفسه .

لقد وجد في تجربة تحول العزلة *Streptomyces* sp.SH-H بالبلازميد pSU102 بان هنالك (60) مستعمرة من مجموع (200) مستعمرة (بنسبة تحول 30%) اظهرت قدرة على افراز السليليز وهذه النسبة تعد منهفضة اذا ما قورنت بكفاية التحويل العالية في بكتريـا *Streptomyces* بالاعتماد على تقنية الخلايا منزوعة الجدار التي تصل الى (80%) (29، 30 ، 31) . ان سبب هذا الانخفاض قد يرجع الى ان العزلة هي من العزلات المحلية وغير الخاضعة لعمليات التطويع الوراثي .

اختيرت (10) مســتعمرات هجينة اظهرت قدرة واضحة على افراز انـزيم الـسيليليز ، اذ بلغت قيمة (Z / G) لهذه المستعمرات (2.0) وجرى غربلتها مرات عديدة للتثبـت مـن ثبات قدرتها على افراز انزيم السليليز واستقرار البلازميد باكملة في هذه المستعمرات الـذي اظهر قدرة ثابتة على افراز انزيم السليليز بعد عملية الغربلة هذه (شكل 3) . لقد وجد ان (70 %) من المستعمرات الهجينة المنتجة لانزيم السليليز تبقى محافظة على كفايتها بعد عملية انبات السبورات لهذه المستعمرات (32) .

ولغرض تأكيد ان هذه المستعمرات الهجينة قد تم تحويلها فعلاً بوسـاطة البلازميـد الهجين pSU102 ولتحديد حجم القطعة الحاملة للجينات المشفرة لمعقد السليليز والمرتبطة مع هذا البلازميد الهجين . هضم دنا البلازميد الهجين المستخلص من احد المستعمرات المتحولة بوساطة انزيم التقييد *Eco* R1 الذي رحل كهربائياً مع كل من دنا البلازميد pSU101 ودنا البلازميد pSU102 من دون تقطيع ، اذ لوحظ ظهور قطعة يقدر حجمهـا (4.5 – 5.0) كيلو زوج قاعدي مقارنة بدنا كروموسوم العاثي (λ) المقطع بانزيم التقييد *Hind* III كدليل حجمي ، اذ انفصلت هذه القطعة من البلازميد الهجين pSU102 بعد هضمه بوساطة انزيم

التقييد *Eco* R1 (شكل 4) الذي يعطي انطباعاً على ان هذه القطعة تحمل الجينات المشفرة لانزيم السليليز ، اذ اشارت عدد من الدراسات الى ان الحجم المقدر لقطعة الدنا الكروموسومية الحاملة للجينات المشفرة لانزيم السليليز تقع على قطعة من دنا كروموسوم العزلة *Bacillus subtilis* يبلغ حجمها (4.5-5.0) كيلو زوج قاعدي (33، 34).

يمكن استنتاج من هذه الدراسة ان الجينات المشفرة لانزيم السليليز تقع على قطعة من دنا كروموسوم العزلة *Bacillus subtilis* يبلغ حجمها (4.5 – 5.0) كيلو زوج قاعدي ، كما لوحظ ايضاً ان العزلة المحلية *Streptomyces* sp.SH-H قد اظهرت قابلية جيدة على استقبال البلازميد الهجين ، الذي يعطي فرصة لاستعمال العزلة مضيفاً في تجارب الاستنسال

المصادر

1- Bisaria, V.S. and Ghose, T.K. (1981). Microbio. Technol. 3: 90-104.

2- Mullings, R. (1985). Microbio. Technol. 7: 1314-1322.

3- Saddler, J.N. (1986). J. Microbio. 33 : 83-92.

4- Beguin, P.; Gilks, N.P.; Kilburn, D.G.; Miller, J.R.C.; Oneill, G.P. and Warren, R.A.J. (1987). Crit. Rev. Biotechnol. 16: 126-162.

5- Ewad, M.T.S.; AL-Tai, A.M.; Abdul-Nour, B.A.; Al-Attiyah, S.S. and Baban, R.S. (1989). J.Biol. Sci. Res. 20 : 241-254.

6- Walter, S. and Schrempf, H. (1996). Mol. Gen. Genet. 251 : 186-195.

7-Fukumori F.; Sashihava, N.; Kudo, T. and Horikoshi, K. (1986). J. Bacteriol. 168 : 479-485.

8- Scholochtermeier, A.; Walter, S.; Schroeder,; Mooran, M. and Schrempf. M. (1992). Mol. Microbiol. 6 : 3611-3621.

9- Guan, J. Fan, C.; Wu., Q.; Zhang, F.; Jiang, M. and Zhang, Y. (1995). J. Chuan. Hsueh. *Pao*. 22(4): 322-328.

10- Walter, S.and Schrempf, H. (1995). Appl. Environ. Microbiol. 61(2) : 487-494.

11- Page, N.; Kluepfel, D.; Shareck, F. and Morosli, R. (1996). *Appl.* Environ. Microbiol. 62(1): 109-114

12- Salman, E.D. (2000). Isolation of thermophilic cellulose producing bacteria and the role of plasmid cellulose production. Ph.D. thesis. College of science, University of Baghdad (In Arabic).
13- Ibrahim, M.A.; AL-Diwany, J.; Khayat, A.I.; Kaddouri, N.A. and Kaddri, F.W (1984). J.Biol. Sci. Res. 15: 17-27.
14- Ali, N.A.(1995). Iraqi J. Sci. 36(4): 1079-1089.
15- Loginova, L.G.; Yuspova, I.K. and Tashpulatov, Z. (1981). *Appl.* Biochem. Microbiol. 17: 133-139.
16- Chater, K.F.; Hopood, D.A.; kieser, T. and Thompson, C.J. (1982). Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96: 95-96.
17-Thompson, C.J.;Ward, J.M.and Hopood, D.A. (1980). J. Bacteriol. 151: 677-688.
18-Marmur, J. (1961) .J. Mol. Biol. 3: 208-218.
19- Al-Delami,A.G (1997).Bacteriological and genetical study of medically important traits among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* Ph.D. thesis college of veterinary medicine. University of Baghdad (In Arabic).
20- Pospiech and Neumann. (1995). Salting out procedure for the isolation of genomic DNA. (Cited by salman 2000).
21- Al-Azawi, H.A.; Al-Bakri, G.H. and Ali, N.A. (1996). Iraqi J. Microbiol. 8(2) : 3-9.
22- Lazim, H.A.; Ali, N.A. and Al-Bakri G.H. (1998). Iraqi J. Sci. 39: 606-624 (in Arabic).
23- Thomson, C.J.; Kieser, T.; Ward, J.M. and Hopwood, D.A. (1982).Gene. 20: 51-62
24- Yeoh, H.H.; Khow, E. and Lim, G. (1985). Micrologia. 77: 161-162.
25- Bibb, M.J. and Hopwood, D.A. (1981). J. Gen. Microbiol. 126: 437-442.
26- Chater, K.F. and Hopood, D.A. (1984). (Goodfellow, M., Mordarski, M.and Williams, S.T.ed.) Academic Press. London. Pp. 230-278.
27- Hopood, D.A.; Chater, K.F. and Bibb, M.J. (1995). Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model *Sreptomycete* . (cited by salman 2000).

28- Salman, A.D. (1982). Production of amylase by *Bacillus subtilis*. M.Sc. thesis. College of Agriculture. University of Baghdad. (In Arabic).

29- Bibb, M.J.; Ward, J.M. and Hopwood, D.A. (1978). Nature. 274: 398-400.

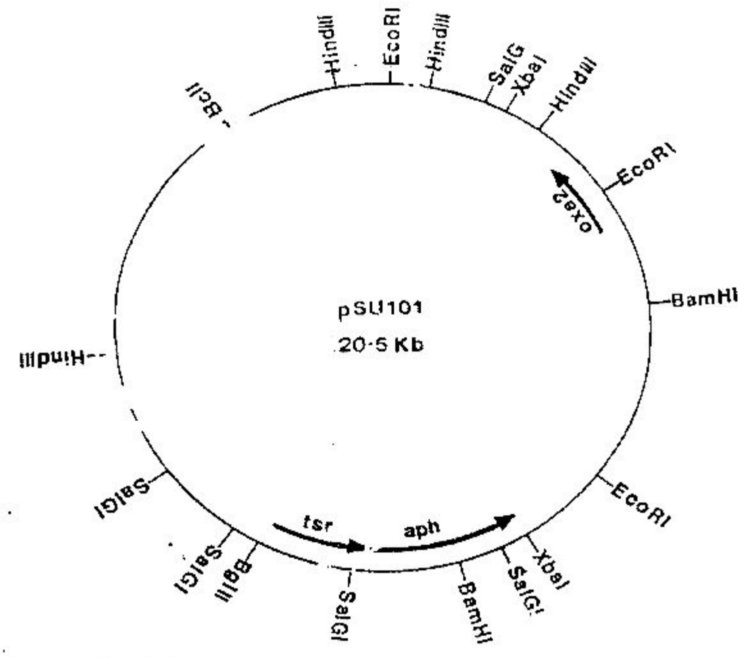
30- Garica, D.M.; Martin, J.F.; Manro, B.; Demain, A. and Kirase, P. (1987). Appl. Environ. Microbiol. 53: 1376-1381.

31- Anne, J.; Mellaert, L.V. and eyssem, H. (1990). *Appl. Microbiol.* Biotech. 32: 431-435.

32- Ghangas, G.S. and Wilson, D. (1987). Appl. Environ. Microbiol. 53: 1470-1475.

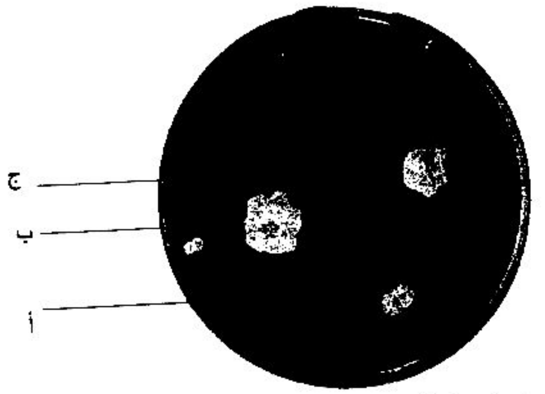
33- Hinchliffe, E. (1984). J. Gen. Microbiol. 130 : 1285-1291.

34- Guan, J.; Fan, C.; Wu, Q.; Zhang, F.; Jiang, M.and Zhang, Y. (1995). Chuan. Hsueh. Pao. 22: 322-328. (Abstract).

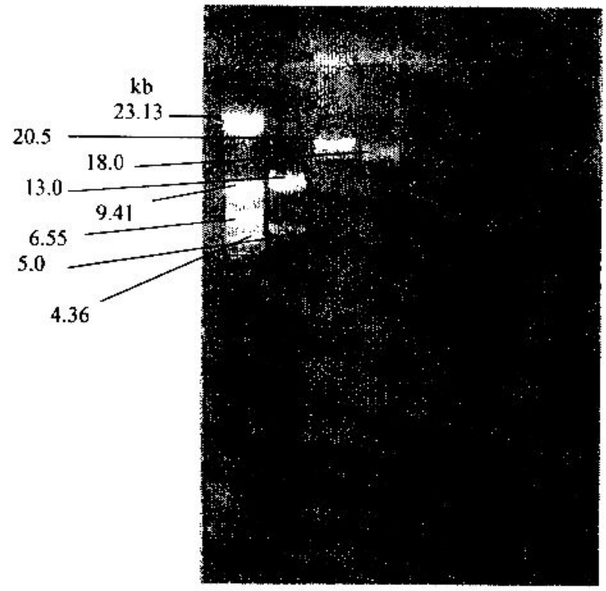


شكل (1) خارطة التقييد لناقل الأستنسال المكوكي pSU101 عن (14)

شكل (2) الترحيل الكهربائي للدنا في (0.7) أكاروز في دارئ Tris-borate ذو الأس الهيدروجيني (8) وبفرق جهد (1.5) فولت/ سم لمدة (2.5)ساعة .
اذ تمثل المجالات 1، 2، 3، 4 الدنا الكروموسومي للعزلة *Bcillus subtilis* والدنا الكروموسومي المهضوم جزئيا بأنزيم التقييد *Eco* RI وناقل الأستنسال البلازميدي pSU 101 وناقل الأستنسال البلازميدي المهضوم بأنزيم التقييد *Eco* RI لكل منهما وعلى التوالي .



شكل (3) انتاج معقد أنزيم السليليز من العزلة *Streptomyces* sp. SH-H (أ) قبل التحول(ب) بعد التحول (ج) الهالة الشفافة .



شكل (4) الرحلان الكهربائي للدنا في (0.7) أكاروز في دارئ Tris- borate ذو الأس الهيدروجيني (8) وبفرق جهد (1.5) فولت / سم ^{2} .

اذ تمثل المجالات 1 ، 2 ، 3 ، 4 الدنا الكرموسومي للعاثي (λ) المقطع بانزيم التقييد *Hind* III دليلا حجميا ودنا البلازميد الهجين pSU102 والمهضوم بأنزيم التقييد *Eco* R1 وناقل الأستنسال البلازميدي pSU101 والبلازميد الهجين pSU101 لكل منهما وعلى التوالي .

Cloning and expression of *Bacillus subtilis* genes in *Streptomyces* sp.

E. D.Salman
Department of Biotechnology, College of Science,
University of Baghdad

Abstract

A local isolate *Bacillus subtilis* was used, which producing thermophilic complex enzyme having similar activity of endogluganase enzyme (Endo-1,4-ß-Dglucanase).

Partially digested chromosomal DNA of *Bacillus subtilis* by *Eco* R1 restriction enzyme randomly cloned into *Eco* R1 pSU101 shuttle vector. The resulted hybrid plasmid was transformed into protoplast of *Streptomyces* sp. SH-H.

The result revealed that cellulose genes, which expressed into transformed cells are located on chromosomal DNA fragment having size 4.5-5 kb in size.