استنسال وزيادة التعبير للجين *bshA* المسؤول عن خفض الكوليسترول في بكتريا *E.coli MC1022* لتفتيت حصوة المرارة

الخلاصة

يعد بلازميد *pJET1.2/blunt end vector* من بلازميدات بكتريا /*E.coli* الخاص لزيادة التعبير الجيني وقد تم نقل الجين *bshA* المسوول عن التشفير لانزيم bile salt hydrolase (EC.3.5.1.24) الماخوذ من عزلة *Lactobacillus acidophilus* (probiotic) علاج Anticandidaالمسوول عن خفض الكوليسترول الغير صحي في الانسان والحيوان الى المضيف *E.coli* لزيادة عدد نسخ الجين داخل البكتريا باستخدام تقنية بلمرة الدنا المتسلسل (PCR) وتحديد التفاعل المتسلسل للقواعد النتروجينية البالغة (801) زوج قاعدي .

صمم البادئ الخاص للجين *bshA* يحوي على موقعين لانزيمات التقييد (*PstI , SacI*) وتم استنسال البلازميد وتحويل الاتحادات الجديدة الى *E.coli MC1022* بطريقة التحويل (Transformation) وتم قياس التغيير في التعبير الجيني للجين *bsh* اعتماد طريقة قياس تعبير RNA الكلي وصنع الدنا المتمم لبكتريا *E.coli* واشارت النتائج الى زيادة تعبير RNA الكلي ونتائج التعبير الجيني اختلفت من 89.1 نانوغرام / مل الى 109.7 نانوغرام / مل.

استخدمت العزلة البرية والمتحولة لتفتيت حصوة المرارة التي يشغل الكوليسترول حوالي 70% من حجمها مختبريا وذلك باستغلال تغيرالتعبير الجيني للجين *bsh* , حددت نسبة التفتيت وانخفاض تركيز حصوة المرارة في الوسط الغذائي Nutrient broth المضاف اليه املاح الصفراء بمقدار 35% للبكتريا المتحولة جينيا مقارنة بالطراز البري اذ سجلت نسبة التخفيض لتركيز الحصوة 12% مقارنة بالسيطرة.

Abstract:-

The bile salt hydrolase gene (*bshA*) encoding bile salt hydrolase enzyme (EC 3.5.1.24) from probiotic isolate *Lactobacillus acidophilus Ar* strain which is responsible for assimilation cholesterol were studied in the present work. About 801 bp in length DNA fragment of *Lb. acidophilus Ar* strain was amplified by PCR techniques. Two restriction sites (*Pstl/Sacl*) were added to each end of that fragment for manipulation DNA during cloning.

Amplified fragment inserted into pJET1.2\blunt end vector respectively. pJET1.2\blunt end vector is overexpression plasmid for *E coli MC1022*, is a shuttle vector which is able to replicate in *E. coli.* Recently , gallbladder stones have been contained cholesterol saturated a proximal 70% ,therefor , led us to investigate to use transformer *E. coli MC1022 pJET/bshA* to dissolve gallbladder stones cholesterol by means of bacterial culture in vitro . Total mRNA was produced using easy—spinTM total RNA extraction kit PCR cDNA—RT to observe the change transformer *E. coli MC1022 pJET/bshA* to fragment gallstone in bacterial culture . Our data shows increase bacterial *bsh* expression help to reduce gallstones concentration in culture when bile salt presented as stimulation agent for the association *bsh* genes were 35% compare with wild type the reducing concentration was 12% .

(هدف الدراسة):-

1- اجراء التحويرالجيني في بكتريا ايشريشيا القولونية *E.coli MC1022* وزيادة تعبيرها للجين *bsh* وذلك بزيادة عدد نسخ الجين المعبرة من خلال ادخال ناقل التعبير *pJET1.2/blunt end* الحامل للجين *bshA*

2- جعل بكتريا ايشريشيا القولونية *E.coli MC1022* ذات صفة علاجية لتفتيت حصوة المرارة جنبا الى جنب الادوية الاخرى التي تستخدم لنفس الغرض وتلافي التدخل الجراحي لتفتيت الحصوة وذلك من خلال زيادة تعبير الجين *bsh* وقياس تفتيت حصوة المرارة مختبريا من خلال الكشف عن نسبة الكوليسترول المتناقص داخل الحصوة بفعل البكتريا المحولة جينيا.

المفصـــــــل

المقدمـــــــة:-

حصى المرارة هي تراكيب صغيرة يتكون حجمها 70% كوليسترول واملاح الكاليسيوم مع البليروبين. تتكون بعد ترسيب وتركز العصارة الصفراوية نتيجة لخلل معين داخل جسم الانسان او الحيوان يكون خلل توازن هرموني او ارتفاع الكوليسترول في الدم وامراض الجهاز الهضمي او اعتلال وراثي يسببه خلل جيني يودي ترسيبها في كيس الصفراء. (1)

تختلف نسبة تشبع الكوليسترول بملاح الصفراء حسب الفئات العمرية (2) وهذا جعل التوجه في علاجها باستخدام ادوية حاوية على احد املاح الصفراء كحامض Urosodeoxycholoic acid الذي يساعد على تفتيت الحصى وبالتالي انخفاض الكوليسترول الغذائي الضارLDL في الدم او بواسطة توجيه الموجات الفوق صوتية لتفتيتها لكن لاتخلو من الخطر لانها تترك بعض اجزاء الحصى المتبقية الصغيرة قد تؤدي الى مضاعفات اخرى مثل سد القناة الصفراء(3).

تتواجد بكتريا Probiotic في جسم الانسان بشكل طبيعي ومفيد للصحة العامة وان البكتريا الصديقة اكثر انواعها انواعها مساعد لبكتريا (microflora) وممكن الحصول عليها من الغذائي الصحي(4).

وجد الباحثون ان بكتريا Probiotic تساعد على تقليل انواع البكتريا الضارة التي تسبب العديد من التهابات , وترفع القدرة المناعية (12) , وتعيد التوازن الحيوي في الجسم ولها دور اساسي في خفض الكوليسترول LDL الضار بالدم من 3 غم/لتر الى 1.5غم/لترالذي بسبب امراض القلب وتصلب الشرايين ولها العديد من الطرق استهلاك الكوليسترول منها (5):-

- تنتج البكتريا مادة hydroxyl methyl glutamate والتي تثبط الجين المسؤول عن تخليق انزيم HMG-CoA- reductase .
- يكون لها نشاط تحويل الاملاح الصفراء deconjugate bile salt والتي ليس لها القدرة على امتصاص الدهون ممايقلل من الكويسترول في الدم اذ يرسب بفعل هذه الاملاح.
- استهلاك الميكروب للكوليسترول اثناء النمو في الامعاء الدقيقة وجعله قابل للامتصاص في الدم(5).

اتسمت Probiotic بكثير من الفوائد الصحية للانسان والحيوان على حدا سواء صفات تجعلها مقاومة للعيش داخل الجسم ولم تكن صفاتها علاجية للامراض المزمنة والمستعصية وانما هي من اجل علاقة تكافلية Symbiosis في الامعاء (6) لذا جاء هدف هذه الدراسة , الى استغلال احد الجينات المهمة في المساعدة على خفض الكوليسترول وهو جين bile salt hydrolase وانتخب من احد جينات البكتريا probiotic *Lb.acidophilus* التي تتسم باعلى تعبير للجين*bshA* (7) لاحتوائها اكثر من نسخة , قطعت احد النسخ

للجين *bshA* واعادة اتحاده في ناقل التعبير الجيني *pJET1.2/blunt end vector* وحولت الاتحادات الجديدة الى البكتريا *E.coli MC1022* , وجعل من صفة خفض الكوليسترول صفة علاجية بزيادة تعبير الجينات المسؤولة وطبقت مختبريا في هذه الدراسة لتفتيت حصوة المرارة في الوسط الغذائي للبكتريا وذلك لجعلها علاج مرافق لعلاجات حصوة المرارة التي منها استخدام تركيز من الاملاح الصفراء لاذابة الحصوة والذي يعمل احد محفزات جين *bsh* الخالي من التاثيرات الجانبية ويساعد على تجنب الاطباء للجوء الى التدخل الجراحي عند علاج حصوة المرارة.

المواد وطرق العمل

الادوات والمواد المستخدمة

اسم الجهاز
Spectrophotometer
Nanodrop
Microcenterfuge
Centerfuge
Vortex
Conventional PCR
Waterbath
Real time –PCR
Electrophoresis
.ABI PRISM Big ^{TM} kit
برنامج (clone manager 9.2)
انبوب Zymo-spin IIICG column
المواد المستخدمة
عدة GeneJET Plasmid Miniprep
عدةThermo scientific clone JET PCR cloning
Mdeman , Rogasa , Sharpe) MRS
(Luria- Bertani) (LB)
عدة ^{Tm} Total RNA extraction eazy – spin
العدة الكاشفة (Cholesterol liquicolor test Al225)

ظروف تنمية العزلات البكتيرية وتحديد البلازميد

نشطت البكتريا *Lactobacillus acidophilus Ar* في وسط MRS (Mdeman , Rogasa , Sharpe) السائل وبعدها انتخاب مستعمرة واحدة من وسط MRS الصلب بعد تنميتها في درجة حرارة 37م˚ لمدة 48 ساعة لتشخيص الجين (*bshA*) ونوع السلالة البكتيرية باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. ولقح وسط (LB) (Luria- Bertani) السائل ببكتريا *E.coli MC1022* كوسط انتخابي يحوي على 100 مايكروغرام / مل المضاد الحيوي الامبسلين , ونميت في درجة حرارة 37م˚ لمدة 18 ساعة في حاضنة هزازة 250 دورة\دقيقة (جدول 1). وتم حساب نسبة التغيير في نمو الخلايا البكتيرية قبل وبعد اضافة الاملاح الصفراء وفق المعادلة التالية(9):-

% Survival = Final (cfu/ml) /control (cfu/ml) x 100

استخدم في هذه الدراسة الناقل *pJET1.2/blunt end* البالغ حجمه 2.9 Kb الخاص بالتعبير الجيني في بكتريا *E.coli* عند التحويل لغرض استنسال الجين (*bshA*) ذو القابلية العالية على التضاعف (شكل (1)).

جدول (1):- انواع البكتريا المستخدمة في الدراسة

اسم البكتريا	المواصفات
Lactobacillus acidophilus Ar	نوعها Probiotic بكتريا تعطى دواء مضاد لخمائر *Candida albicans*
E.coli MC1022	بكتريا تستخدم لاغراض الاستنسال والتحويل الجيني لها قابلية عالية على التضاعف

قياس تحمل بكتريا *Lactobacillus acidophilus Ar* للكوليسترول واملاح الصفراء

نميت البكتريا *Lb. acidophilus Ar* في وسط MRS السائل الحاوي على 4 غم/ مل من الكوليسترول الحر في درجة حرارة 37م° لمدة 48 ساعة (8) , ونميت مرة اخرى في الوسط MRS السائل والبكتريا *E.coli MC1022* في وسط (LB) بانبوبين على التوالي حاويان على 0.5% احد الاملاح الصفراء تستخدم لعلاج مرضى حصوة المرارة (Sodium salt of urodeoxycholoic acid) وحضن الانبوبين في درجة حرارة 37م° لمدة 48 و18 ساعة على التوالي , وتم قياس مقدار امتصاصية النمو على O.D = 600 نانوميتر في جهاز Spectrophotometer (9).

التشخيص الجزيئي لبكتريا *Lb. acidophilus Ar* والجين *bshA*

انتخبت مستعمرة واحدة من طبق وسط MRS الصلب لبكتريا *Lb. acidophilus Ar* واستخدمت البادئات لغرض تشخيص نوع البكتريا مستخدمين بادئ الدنا المسؤول عن *16SrRNA* (10) , والبادئ المسؤول عن جين (*bshA*) الذي صمم في برنامج (clone manager 9.2) يحوي على مواقع انزيمات القطع (*PstI*, *SacI*) لغرض الاستنسال (جدول 2).

جدول(2): تسلسل البوادئ المستخدمة لتشخيص نوع بكتريا *Lb. acidophilus Ar* وتشخيص الجين *bshA*

اسم البادئ	تسلسل القواعد النيتروجينية
Lb. acidophilus. 16SF	5´ACTACCAGGGTATAATCC3´
Lb. acidophilus. 16SR	5´AGCTGAACCAACAGATTCAC3´
bshA F	5´AAGAGCTCATGTGACATCAATTATATT3´ *SacI*
bshA R	5´TTCTGCAGTTAGTTTTGATGGTTAAATTTAG3´ *PstI*

علقت المستعمرة المنتخبة في 10 µl من الماء المعقم (milli Q water) وسحب منه 1µl واضيف الى خليط التفاعل المتضاعف لسلسة DNA واكمل حجم التفاعل 40 µl (جدول3).

مكونات خليط تفاعل البلمرة	الحجم مايكروليتر
محلول الدارئ لخليط PCR	4 مايكروليتر
dNTP	1 مايكروليتر
البادئ الامامي	0.5 مايكروليتر
البادئ العكسي	0.5 مايكروليتر
قالب الدنا البكتريا *Lb. acidophilus Ar*	1 مايكروليتر
انزيم DNA Taq poly	0.5 مايكروليتر
ماء معقم Milli Q H_2O	32.5 مايكروليتر
المجموع	40 مايكروليتر

وزعت محتويات التفاعل على عشرة انابيب ذات حجم 0.5 مايكروليتر وبواقع 10 مايكروليتر جزء من الانابيب اضيف لها البادئ للدنا 16SrRNA والجزء الاخر اضيف لها البادئ الجين *bshA* , ادخلت في جهاز البلمرة الحراري Thermal cycler for DNA ونفذ البرنامج التالي لتحديد الدورات الحرارية :-

عدد الدورات	نوع التفاعل	الدرجة الحرارية	الوقت
	المسخ الاولي (بدء العملية)	94م°	3 دقيقة
مقدارها 35 دورة	المسخ	94م°	1 دقيقة
	الالتحام	55م°	30 ثانية
	اضافة النيوكليوتيدات وعمل الانزيم	72م°	30 ثانية
	الاستطالة	72م°	4 دقيقة

الرحلان الكهربائي باستخدام اكار الاكاروز

تم فصل نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام هلام الاكاروز 1% (وزن , حجم) وفصل نواتج تضاعف البلازميدات المكلونة ونواتج التضاعف المقطوعة بانزيمات القطع باستخدام 7% (وزن , حجم) من الهلام في دارئ الرحلان الكهرائي pH 8.3 TBE x1 ,لون الهلام بـ 0.5 ماكروليتر بصبغة الاثيديوم بروماید وتم الكشف عن احجام الحزم باستخدام جهاز الاشعة فوق البنفسجية (UV) (11).

التحليل الجزيئي التسلسلي للجين *bshA*

تم تحليل الجين*bshA* لمعرفة عدد تسلسل القواعد النتروجينية المشفرة لهذا الجين , اضيف 7 مل من نواتج تفاعل البلمرة للجين *bshA* مع 3مل من محلول exosap واستخدمت الدورة الحرارية 37م°لمدة 30 دقيقة بعدها رفعت الحرارة الى 80م° لمدة 15 دقيقة . واضيف3 مل ماء معقم الى 2 مل بوادئ الجين *bshA* (جدول 3) مع 6 مل صبغة (ABI PRISM Big) ووضعت في جهاز (Bio system Omni) للتفاعل الحراري حسب البرنامج التالي :-

	نوع التفاعل	درجة الحرارة	الوقت
	البدء	80م°	15 دقيقة

عدد الدورات الحرارية 25 دورة	البدء	96م˚	2 دقيقة
	فتح شريط الدنا	96م˚	10 ثانية
	ارتباط البادئ	50م˚	5 ثانية
	الاستطالة	60م˚	4 دقيقة

القراءة التحليلية المتسلسلة للجين *bshA* تم تنقيتها بواسطة الجهاز ABI PRISM Big ^{TM} kit .

استنسال الجين *bshA* في الناقل *pJET1.2/blunt end*

استخدم الناقل pJET1.2/blunt end للاستنسال والتعبير الجيني الخاص ببكتريا *E.coli MC1022* وذلك باستخلاص الناقل باستخدام عدة GeneJET Plasmid Miniprep واستخدمت للاستنسال عدة Thermo scientific clone JET PCR cloning .

انزيمات التقييـــــد

سحب 5مايكروليتر من البلازميد *pJET1.2/blunt end* مع نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للجين *bshA* باضافة 9مايكروليترماء مقطر و 2مايكروليتر من انزيمات التقييد *PstI* و *SacI* انزيمات قطع 4 مايكروليتر محلول الانزيمات الدارئ خلط المكونات برفق وتحضن في 37م˚ حمام مائي لمدة 2 ساعة . استخدمت عدة Thermo scientific clone JET PCR cloning , لصق الجين *bshA* ببلازميد pJET1.2 في 7.6 PH حسب الخطوات التالية :-

الخطوات	الحجم مايكروليتر
البلازميد المقطوعة بانزيمات القطع	2مايكروليتر
الجين *bshA* المقطوع بانزيمات القطع	3 مايكروليتر
انزيم T_4DNA االلايكيز اللاصق	lمايكروليتر
محلول الدارئ الانزيم	2 مايكروليتر
ماء مقطرمعقم	2 مايكروليتر

حضن بحرارة 22م˚ لمدة 20 دقيقة باستخدام Thermo cycle

التحول البكتيري باستخدام $CaCl_2$

حضنت البكتريا *E.coli MC1022* في 100 مل من وسط (LB) في 37م˚ لمدة 18 ساعة لبلوغ النمو (O.D= 0.35- 0.6) والذي يعادل 10^6* 1 خلية / مل . حضنت الخلايا في حمام مائي ثلجي لوقف النمو 10 دقيقة نبذت بسرعة 3500 rpm لمدة 10 دقيقة ازيل الرائق واخذت الخلايا المترسبة وعلقت برفق في 10 مل من M1 $CaCl_2$ البارد وخلط 200 مايكروليتر من العالق البكتيري مع 5 مايكروليتر من البلازميد الحامل للجين *bshA* تم تسميته (ناقل *pJET / bshA*) (14) وترك في حمام ثلجي لمدة 30 دقيقة . صدم الخليط حراريا بحمام مائي 42م˚ لمدة 30 ثانية وترك عندها في حمام ثلجي لمدة 10 دقيقة واضيف له 1 مل من وسط (LB) السائل وحضنت في حمام مائي الهزاز في درجة حرارة 37م˚ لمدة 1-2 ساعة بعدها نبذ بسرعة 5000 rpm لمدة 5 دقيقة واهل الرائق واخذ الراسب والذي هو عبارة عن خلايا متحولة واضيف لها 500 مايكروليتر من وسط (LB) السائل

ومزجت واخذ منها 100 مايكروليتر من الخلايا المتحولة بذلك زرعت في اطباق وسط (LB) الصلب الحاوي على 5 مايكروغرام/ مل مضاد حيوي الامبسيلين (13).

التعبير الجيني للخلايا المستنسلة

أ- استخلاصRNA الكلي

نمي الطراز البري من بكتريا *E.coli MC1022* والطراز المحور جينيا في وسط (Nutrient broth) السائل الحاوي على 0.5% املاح الصفراء Na-Urohydroxycholic acid في انبوب معقم خاص حاوي على نسبة من trizol (extra gene) لمدة 24 ساعة في درجة 37م˚ استخلص الرنا الناتج من التعبير الجيني باستخدام عدة (Total RNA extraction eazy – spin ^{Tm}) بعد الطرد المركزي للمزروع البكتيري بسرعة 16000xg لمدة 15 دقيقة اضيف للخلايا المترسبة كحول الايثانول 96%(v:v) ونسبة (1:1) من دارئ التحليل الخلوي الخاص لاستخلاص الرنا ونقل الخليط الى انبوب خاص Zymo-spin IIICG column لغرض الطرد المركزي عند السرعة 14000 xg لمدة 30 ثانية باخذ الـcolumn الحاوي على الرنا ويضاف له 80 مايكروليتر من DNase I reaction mix مباشرة ويحضن بدرجة حرارة الغرفة 25م˚ لمدة 15 دقيقة ثم طرد مركزي دقيق لمدة 30 ثانية اهمل الرائق وتعاد الخطوة مرة واحدة بعدها يضاف 700 مايكروليتر محلول الدارئ لغسل الرنا ويعاد الطرد المركزي مرتين لمدة 30 ثانية ثم ينقل الى column matrix الحاوي على الرنا بحذر ويضاف له 100 مايكروليترDNase /RNase – free water مباشرة ويعاد الطرد المركزي الدقيق لمدة 30 ثانية لتاكد من غسل الرنا ويقاس تركيزه (نانوغرام / مل) بجهاز النانودروب (Act gene) على طول موجي 260 نانوميتر وتحفظ في -70م˚(3).

ب:- قياس التعبير الجيني من بلمرة الدنا المتمم

صنع الدنا المتمم (cDNA) من RNA المستخلص باستخدام عدة Maxime RT pre mix بخطوتين باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بخلط 1 مايكروليتر من قالب الرنا المستخلص مع 0.05 مايكروليتر من البادئ (Oligo dT (T_{14}) ويكمل الحجم بالماء المقطرالمعقم 15 مايكروليتر في انبوبة Maxime RT pre mix بعد (1-2) دقيقة يضاف 5 مايكروليتر من الانزيم (Reverse transcriptase RT) ليصبح حجم خليط تفاعل البلمرة 20 مايكروليتر وينظم جهازتفاعل البلمرة من(2-5) دورات حسب خطوات التفاعل الاتية:-

خطوات التفاعل	درجة حرارة التفاعل	الوقت
تصنيع الدنا المتمم	45م˚	60 دقيقة
خطوة عدم تفاعل RTase	95م˚	5 دقيقة

يقاس تركيز نواتج التفاعل الدنا المتمم في تقنية nanodrop على طول موجي 260 نانوميتر وتحفظ في -20.

الوسط الكاشف لقدرة *E.coli MC1022* المستنسلة على تفتيت حصوة المرارة

حضر (5) مكررات من وسط nutrient broth كما ياتي:-

- (السيطرة1) انبوبين اختبار يحوي على 0.5% املاح الصفراء Sodium salt of urodeoxycholoic acid مع 1 مل من حصوة المرارة الشبه ذائبة بتركيز 1.30 غم/مل (0.66 غم حصوة المرارة مذابة في 25 مل ايثانول 96%) (5) والاخر الكوليسترول الحر الشبه ذائب بتركيز 1.35 غم/مل (0.33 غم كوليسترول الحر مذاب في 50 مل ايثانول 96%) (6) ,يستخدم لقياس امتصاصية تركيزحصوة المرارة والكوليسترول الحر في الوسط الغذائي بدون نمو بكتيري.
- (السيطرة2) يستخدم لتنمية *E.coli MC1022* الطراز البري في انبوبين اختبار بدون وجود 0.5% املاح الصفراء Sodium salt of urodeoxycholoic acid احدهم 1 مل من حصوة المرارة الشبه ذائبة بتركيز 1.30 غم/مل (0.66 غم حصوة المرارة مذابة في 25 مل ايثانول 96%) والاخر الكوليسترول الحر الشبه ذائب بتركيز 1.35 µg/ml (0.33 غم كوليسترول الحر مذاب في 50 مل ايثانول 96%) يستخدم للكشف عن دور الاملاح الصفراء لحث تعبيرالجين *bsh* .

- تنمية بكتريا *E.coli* الطراز البري والطراز المستنسل مضاف اليه 0.5% املاح الصفراء 1مل من حصوة المرارة الشبه ذائبة بتركيز 1.30 مايكروغرام/ مل (0.66 غم حصوة المرارة مذابة في 25 مل ايثانول 96%).
- تنمية بكتريا *E.coli* الطراز البري والطراز المستنسل مضاف اليه 0.5% املاح الصفراء 1 مل من الكوليسترول الحرالشبه ذائب بتركيز 1.35 مايكروغرام/مل(0.33 غم كوليسترول الحر مذاب في 50مل ايثانول 96%).

اخذت الطريقة التي اوردها (8) في تقدير مستوى الكوليسترول (طريقة لونية انزيمية Enzymatic colorimetric method) وباستيعمال العدة الكاشفة (Cholesterol liquicolor test Al225) من شركة (Human) الفرنسية . يؤخذ من النمو البكتيري الراكد 300 مايكروليتر في انابيب اختبار جافة ومعقمة واضيف لكل منها 700 مايكروليتر من كاشف الكوليسترول مزجت الانابيب جيدا , حضنت مدة 5 دقائق في درجة 37م˚ وقرات امتصاصية النماذج والمحلول الكوليسترول القياسي على طول موجي 520 نانوميتر مقارنة مع امتصاصية انبوب (السيطرة 1, 2) وقدر تركيز الكوليسترول في الوسط البكتيري من المعاملة الاتية (6,7):-

$$\text{تركيز الكوليسترول (dl/mg)} = \frac{\text{امتصاصية النموذج}}{\text{امتصاصية المحلول القياسي}} \times 200$$

وقدرت النسبة المئوية لتخفيض الكوليسترول في الوسط الحاوي على حصوة المرارة بحسب المعادلة التالية (6, 8) :-

$$\text{نسبة تخفيض الكوليسترول بالوسط} = \frac{\text{امتصاصيةالكوليسترول في الوسط بعد تنمية البكتريا}}{\text{امتصاصيةالكوليسترول في الوسط قبل تنمية البكتريا}} \times 100$$

<u>النتائـــــج</u>

تشخيص صفات بكتريا *Lb. acidophilus Ar*

تمتلك بكتريا *Lb.acidophilus Ar* وبكتريا *E.coli MC1022* قابلية التحمل والنمو في 0.5% املاح الصفراءSodium salt of urodeoxycholoic acid في وسط MRS السائل(9), بوجود 4 مغم/ مل من الكوليسترول في درجة 37م° لمدة 48 ساعة وكان مقدار النمو 1.85 cfu/ ml على طول موجي 600 نانوميتر . وبكتريا *E.coli MC1022* تمتلك الحساسية للمضاد الحيوي الامبسلين.

التشخيص الجزيئي لبكتريا *Lb.acidophilus Ar*

شخص نوع البكتريا *Lb.acidophilus Ar* باستخدام البادئ لقطعة الدنا المشفرة لل *16SrRNA* وبلغت قطعة الدنا 690 زوج قاعدة وهي طريقة متبعة للتفريق وتشخيص بين الانواع البكترية التابعة لنفس الجنس وذلك بسبب التغاير الكبير لهذا النوع من الجينات والذي يستخدم كصفة تشخيصية (14) , وحدد وجود الجين *bshA* باستخدام البادئ الامامي والعكسي واعطى حزمة دلالة وجود الجين (الشكل2)

واظهر التحليل المتسلسل لتتابعات قطعة جين *bshA* عدد القواعد النتروجينية التي يتكون منها الجين والبالغة 801 زوج قاعدة وهناك تطابق بمقدار 44% مع عزلات تابعة لنفس نوع البكتريا وتم مقارنتهامع قاعدة بيانات لنظام برنامج Blast programme في NCBI عند تطابق الجين مع عزلة *Lb. acidophilus Ar* مع الجينات النظيرة له في تسلسل الجين (15) (شكل 3) .

استنسال الجين *bshA* في الناقل pJET1.2/ blunt end

ظهرت نتائج الاتحادات الجديدة *pJET1.2/bshA* بعد عملية الاستنسال بقطع الجين *bshA* للبكتريا *Lb. acidophilus Ar* وتحميله على الناقل *pJET1.2* وتحويله الى البكتريا *E.coli MC1022* في عملية الرحلان الكهربائي بجل الاكاروز مقارنة مع السيطرة (C^-) البكتريا الغير متحولة والسيطرة (C^+) البلازميد المستخلص(الشكل 3).

اعيد فصل الجين *bshA* عن الناقل المستنسل باستخلاصه من البكتريا المتحولة واعادة عملية القطع بانزيمات التقييد وترحيله مرة اخرى للتاكد من استنسال الناقل وفصل الجين عنه للتاكد من نجاح عملية الاستنسال (15)(شكل 4)

التعبير الجين للناقل *pJET1.2/ bshA* في بكتريا *E.coli*MC1022

أ- تقدير التغير في التعبير عن RNA الكلي

اظهرت قيم قياس تركيز RNA الكلي المستخلص الناتج من التعبير الجيني للبكتريا *E.coliMC1022* قبل وبعد التحويل بالناقل *pJET/bshA* واظهرت النتائج زيادة التعبير الجيني للرنا الكلي بشكل ملحوظ مقارنة بالطراز البري للبكتريا وهي البكتريا الغير متحولة النامية في الاملاح الصفراء واصبح التركيز الرنا من (89.1 – 109.7 نانوغرام \ مل) وهذا دليل على كفاءة عملية استنسال الناقل وتحويل البكتريا واعطت حزم

الرنا المرحلة كهربائيا اكثر تالقا تحت UV light للحزم rRNA (23S:16S) بمقدار (800bp,1000bp) على التوالي مقارنة مع المصادر (16).(جدول 6)(شكل 5, 7).

جدول(6):- تغير التعبير الجيني وتراكيز الرنا الكلي في البكتريا *E.coli MC1022* المتحولة مقارنة بالسيطرة

خلايا البكتريا	تركيز RNA الكلي نانوغرام \ مل
بكتريا *E.coli* الطراز البري في وسط N.b خالي من الاملاح الصفراء	45
بكتريا *E.coli* الطراز البري في وسط N.b حاوي على0.5 من الاملاح الصفراء	89.1
بكتريا *E.coli* المتحولة بالناقل *pJET/bshA* في وسط N.b حاوي على0.5 من الاملاح الصفراء	109.7

ب:- تقدير التغيير في التعير الجيني من خلال الدنا المتمم cDNA للرنا الكلي

اظهرت نتائج تفاعل البلمرة للرنا الكلي باستخدام انزيم البلمرة العكسيRevers transcriptase RT زيادة بتغير التعبير الجيني بمقدار (57.8 – 136.4 نانوغرام \ مل) بين الطراز البري والطراز المتحول لبكتريا *E.coli MC1022* مقارنة مع السيطرة من خلال قياس الامتصاصية لتركيز الدنا المتمم بعد تفاعل البلمرة PCR واظهر الترحيل مقدار الحزمة الناتجة بمقدار 4500bp (17) (جدول 7) (شكل6, 8)

جدول (7):- تغير التعبير الجيني وتراكيز الدنا المتمم في البكتريا *E.coli MC1022* المتحولة مقارنة بالسيطرة

خلايا البكتريا	تركيز الدنا المتمم نانوغرام \ مل
بكتريا *E.coli MC1022*الطراز البري في وسط N.b خالي من الاملاح الصفراء	57.8
بكتريا *E.coli MC1022* الطراز البري في وسط N.b حاوي على0.5 من الاملاح الصفراء	136.4
بكتريا *E.coli MC1022*المتحولة بالناقل *pJET/bshA* في وسط N.b حاوي على0.5 من الاملاح الصفراء	172.9

قياس مقدار تفتيت حصوة المرارة في وسط *E.coli MC1022* المتحولة

ظهرت النسب المئوية لتخفيض تركيز حصوة المرارةالشبه ذائبة في وسط N.B السائل وبمقارنة مع الكوليسترول الحر فارق كبير في الوسط الذي نميت به بكتريا الطراز البري لنفس البكتريا وذلك لاحتواء حصوة المرارة على نسبة عالية من الكوليسترول تصل 70% وهذه النتائج اضافت للبكتريا المتحولة صفة علاجية مهمة لعلاج حصوة المرارة (جدول 8). قرنت نسب التخفيض لتركيز الحصوة من قبل البكتريا *E.coli MC1022* في الوسط الغذائي مع نسب تخفيض تركيز الكوليسترول الحر في نفس الوسط وكانت

متقاربة جدا مايدل على احتواء حصوة المرارة على نسبة الكوليسترول مما يساعد على سهولة تفتيتها من قبل الادوية والبكتريا المتحورة جينيا (جدول 9) و(جدول 10).

الجدول(9) :- نسبة تخفيض تركيز حصوة المرارة في وسط نمو بكتريا *E.coli MC1022* المحورة جينيا

خلايا البكتريا في وسط يحوي حصوة المرارة	تركيز حصوة المرارة mg/dl	تركيز حصوة المرارة نانوغرام \ مل	نسبة تخفيض حصوة المرارة في الوسط
انبوب (السيطرة) وسط البكتيري حاوي على حصوة المرارة فقط	130	1.30	لايوجد
بكتريا *E.coli* الطراز البري نميت في وسط خالي من 0.5 % الاملاح الصفراء بوجود حصوة المرارة	130	1.30	لايوجد
بكتريا *E.coli* الطراز البري نميت في وسط يحوي 0.5 % من الاملاح الصفراء مع حصوة المرارة	112	1.12	%12
بكتريا *E.coli* الطراز المتحول نميت في وسط يحوي 0.5 % من الاملاح الصفراء مع حصوة المرارة	81	0.81	%35

الجدول(10) :- نسبة تخفيض تركيز الكوليسترول الحرفي وسط نمو بكتريا *E.coli MC1022* المحولة جينيا

خلايا البكتريا في وسط يحوي حصوة المرارة	تركيز حصوة المرارة mg/dl	تركيز حصوة المرارة نانوغرام \ مل	نسبة تخفيض حصوة المرارة في الوسط
انبوب (السيطرة) الوسط البكتيري حاوي على الكوليسترول الحر فقط	135	1.35	لايوجد
بكتريا *E.coli* الطراز البري نميت في وسط خالي من 0.5 % الاملاح الصفراء بوجود الكوليسترول الحر	135	1.35	لايوجد
بكتريا *E.coli* الطراز البري نميت في وسط يحوي 0.5 % من الاملاح الصفراء مع	126	1.26	%10

الكوليسترول الحر			
بكتريا *E.coli* الطراز المتحول نميت في وسط يحوي 0.5 % من الاملاح الصفراء مع الكوليسترول الحر	101	1.01	%20

المميزات:-

1- استنسال بلازميد pJET1.2/blunt end vector من بلازميدات بكتريا /*E.coli* الخاص لزيادة التعبير الجيني وقد تم نقل الجين *bshA* المسوول عن التشفير لانزيم bile salt hydrolase (EC.3.5.1.24) الماخوذ من عزلة *Lactobacillus acidophilus* (probiotic) علاج Anti-candida المسؤول عن خفض الكوليسترول الغير صحي في الانسان والحيوان الى المضيف بكتريا الايشريشيا القولونية *E.coli* لزيادة عدد نسخ الجين داخل البكتريا باستخدام تقنية بلمرة الدنا المتسلسل (PCR) وتحديد التفاعل المتسلسل للقواعد النتروجينية البالغة (801) زوج قاعدي .

2- صمم البادئ الخاص للجين *bshA* يحوي على موقعين لانزيمات التقييد (*PstI , SacI*) وتم استنسال البلازميد وتحويل الاتحادات الجديدة الى *E.coli MC1022* بطريقة التحويل (Transformation).

3- وتم قياس التغيير في التعبير الجيني للجين *bsh* في البكتريا المتحولة اعتماد طريقة قياس تعبير RNA الكلي وصنع الدنا المتمم لبكتريا *E.coli* واشارت النتائج الى زيادة تعبير RNA الكلي ونتائج التعبير الجيني اختلفت من 89.1 نانوغرام / مل الى 109.7 نانوغرام / مل.

4- استخدمت العزلة البرية والمتحولة لتفتيت حصوة المرارة التي يشغل الكوليسترول حوالي 70% من حجمها مختبريا وذلك باستغلال تغيرالتعبير الجيني للجين *bsh* , حددت نسبة التفتيت وانخفاض تركيز حصوة المرارة في الوسط الغذائي Nutrient broth المضاف اليه املاح الصفراء بمقدار 35% للبكتريا المتحولة جينيا مقارنة بالطراز البري اذ سجلت نسبة التخفيض لتركيز الحصوة 12% مقارنة بالسيطرة ز

التطبيقات :-

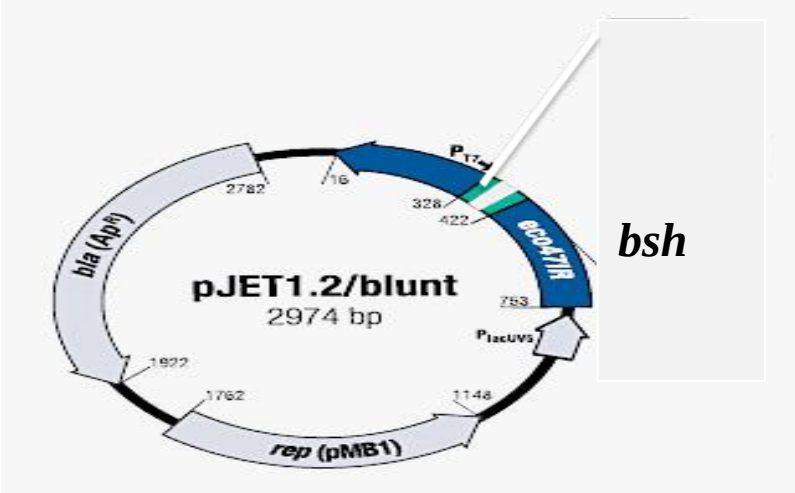
1- العمل على تجربة البكتريا (probiotic) المتحولة جينيا على الحيوانات المختبرية (in vivo imaging) من اجل استخدامها بشكل علاج يباع في الصيدليات ووصفها من قبل الاطباء كعلاج مرافق للادوية الاخرى او تنوب عنها.
2- دراسة زيادة التعبير الجيني لكل الجينات ذات صفات علاجية لبكتريا probiotic والمفيدة لكثير من الامراض مثل Probiotic genes involved the regulation of host immune response

الادعاءات:-

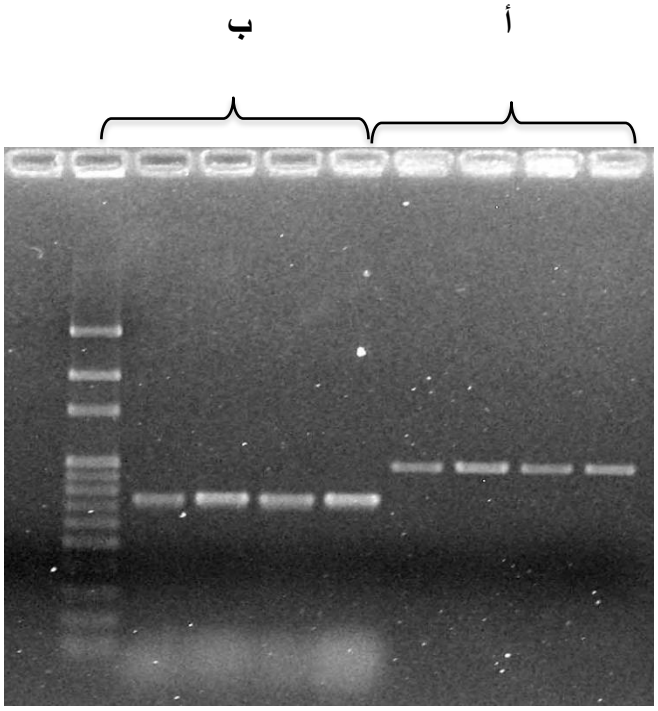
اشارت كثير من الدراسات الى قدرة البكتريا المفيدة في جسم الانسان للحفاظ على صحة الانسان والحيوان ووقايته من الامراض لاحتواءها على الكثير من الجينات ذات نواتج علاجية ومفيدة لصحة الانسان . ودراسات اخرى اكدت ان صفات هذه البكتريا لايمكن ان تكون صفة علاجية للامراض وانما هي صفة تكافلية رغم نقص عددها وعدم تواجدها في الجسم مايسبب العديد من المشاكل المناعية والهضمية (10) . لذا حرصت دراستنا في هذا البحث لتحويل هذه الصفات من ادوات لمعيشة تكافلية الى صفات علاجية وذلك باستغلال الجينات المهمة وزيادة تعبيرها الجيني داخل البكتريا المفيدة مثل (probiotic) او (microflora) ومنها الجين*bsh* المسؤول عن خفض الكوليسترول في الدم وانتقاء جين من بكتريا عالية التعبير الجيني مثل *Lb.acidophilus Ar* حيث استنسل على ناقل *pJET1.2/blunt end* وتحويله الى بكتريا *E.coli MC1022* ذات التعبير الجيني والاستنسال لزيادة عدد نسخ الجينات المعبرة عن *bsh* داخل البكتريا وقدرتها لخفض الكليسترول ومنها تكون علاج لحصوة المرارة كونها حاوية مايقارب 70% كوليسترول (5) ممكن جعل منها علاج مرافق للادوية الخاصة بعلاج الحصوة وتجنب التدخل الجراحي والتي اغلبها من الاملاح الصفراء والتي تعد محفزلعمل جينات *bsh* وكانت النتائج دالة على زيادة تعبير الجين *bsh* ادى الى زيادة في تاكل وتفتيت حصوة المرارة حيث انخفض تركيزها في الوسط الغذائي من (1.30- 0.81 نانوغرام \ مل) (جدول9) .وكانت نسب استهلاك البكتريا للكوليسترول الحر في نفس الوسط قريبة وتغير تركيزه من(51.3- 1.01 نانوغرام \ مل) (جدول 10) (شكل 9).

عناصر الحماية:-

1- تفتيت حصوة المرارة تحوي 70% كوليسترول وذلك باستخدام طريقة الاستنسال وزيادة التعبير للجين *bshA* المسوول عن خفض الكوليسترول في بكتريا .
2- اشارة الى عنصر الحماية رقم (1) , تم استنسال الجين *bshA* المسوول عن خفض الكوليسترول فيالدم وانتقاء جين من بكتريا عالية التعبير الجيني مثل *L. acidophilus Ar* حيث استنسل على ناقل التعبير *pJET1.2/blunt end* وتحويله الى بكتريا *E.coli MC1022* .
3- اشارة الى عنصر الحماية رقم (1) , تم تجريب الى بكتريا *E.coli MC1022* المتحولة جينيا بالناقل المستنسل الجديد *pJET1.2/bshA* مختبريا لتفتيت حصوة المرارة داخل الوسط الغذائي البكتيري و بزيادة عدد نسخ الجينات المعبرة عن *bsh* داخل البكتريا وقدرتها على خفض الكوليسترول ومنها تكون علاج لحصوة المرارة كونها حاوية مايقارب 70% كوليسترول , جعل منها علاج مرافق للادوية الخاصة بعلاج حصوة المرارة وتجنب التدخل الجراحي. تم اختيار استنسال جينات *bsh* لانها تفعل بوجود الاملاح الصفراء , ونتائج زيادة التعبيرالجيني ادت الى زيادة فيتاكل وتفتيت حصوة المرارة حيث انخفض تركيزها في الوسط الغذائي من (1.30- 0.81 نانوغرام\ مل).



شكل (1):- الخارطة الجينية للناقل pJET1.2/blunt end يحمل الجين (*bshA*)



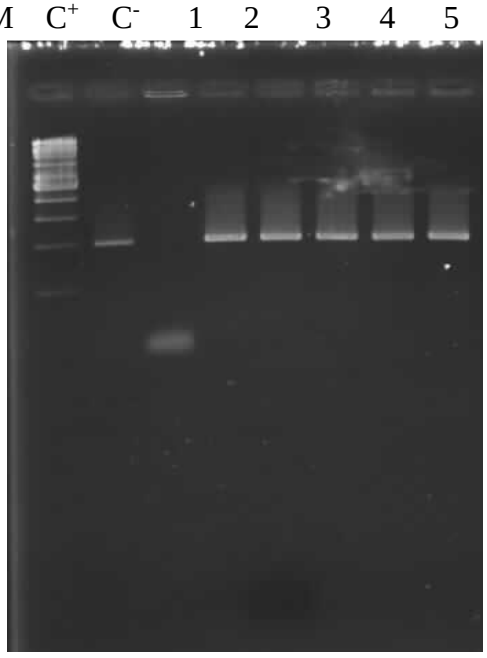
الشكل 2:- أ- حزم تفاعل البلمرة للجين المسؤول 16S rRNA في بكتريا *Lb. acidophilus Ar* باستخدام البادئ المتخصص . ب- حزم تفاعل البلمرة للجين المسؤول عن *bshA* في بكتريا *Lb. acidophilus Ar* باستخدام البادئ . حزم الدليل 100 زوج قاعدة.

P*st*I revers primer

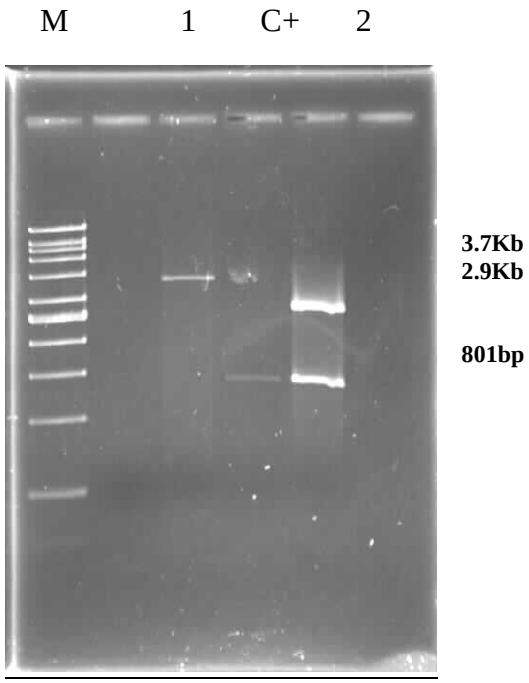
CYKATTKRTWRGGARWYCTTCTAGAAGATCTGCAGTTAGTTTTGATGGTTAAATTTAGTTTTATCAAGCATATTATAAGWG
ATCAAATTGCTGCTATCTAGATCTTCTTTATTCATATCAACAACGTTAATTTGTTTGTTTGAATAAGTGGTGTAGTAGAAA
ATACCTTTGTCTAAGTTAGTTCCATCAGAATAAATTGTATATTCAAATGAGTTTGGACCAACTTCATCCAGTCCCTTTTGT
TGTTCAACCGAATGTAAAATGTGGAAGTAAGTATCAATATTTTCTTCTTCGGTTTCAGCAATTGGAGCATTAAATTTATTG
AAAGCTACTCTGACAAAACGTGATTCAGAATCCATTCCACCTGGTAAGTTGTGAGACCCTAATCCACGGCTGTAGCCAGCC
ATATTTACTTTATCTGAGAAGTTATTTTTAGGCATTTTTGGAGATACGTCAGCATAGTTATTTAAATTGAATAATTGCTTT
GGAAATTGTGGATTATTAGTTAAGCAGCCAACTGGATTATCATAAATATGCATTCCATCTTTGTCTGTTTCAACAACTAAT
GATGTACCTGTTTTATCTGCAATAAGCCAGTGAAGAGAGGAGGTTTGCATTTTTTCGCTGAAATTTAAATCGGCGATGTTG
ATTCTGCTAAGTAAATCCTTTACTTCGCTAATAGTGCTACACTGTCCTAAAATCCAAGGGATGAATTCAAAGGAAGCAATA
TTATCTTTATTTTCTTTTTCTTCGTAATATGTAGCATTTCCTGGATAGTTGAGTCCGGCCATACCTAAACCT

SacI

(شكل 3):- تسلسل القواعد النتروجينية للشريط العكسي للجين *bshA* والبالغة 801 زوج قاعدة

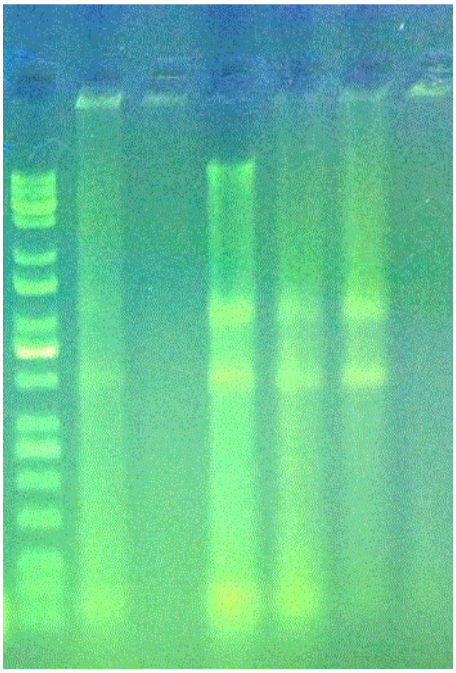


الشكل (3):- C^+ حزمة (السيطرة) توضح حزمة قطعة الجين *bshA* , (1-5) حزم توضح بلمرة الجين *bshA* داخل المستعمرة الواحدة بعد تحويل الناقل , (C^-) الكتريا الغير متحولة (السيطرة), (M) الدليل 1000 زوج قاعدة .



الشكل (4):- C^+ **حزمة (السيطرة) توضح حزمة قطعة بلمرة الجين *bshA* , حزمة (1) الناقل** 3.7Kb *pMG36e/bshA* , **حزمة (2) قطع الناقل** *pJET/bshA* **بانزيمات التقييد** *PstI/SacI* وظهور الحزم ,(2.9 Kb+ 801bp) **(M) الدليل 1000 زوج قاعدة**

Ladder c a b



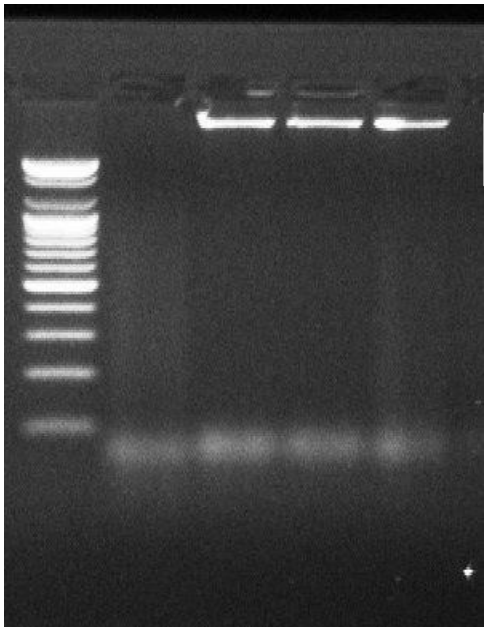
gDNA contamination

lane (1)23SrRNA 1Kbp

lane (2)16SrRNA 0.8Kbp

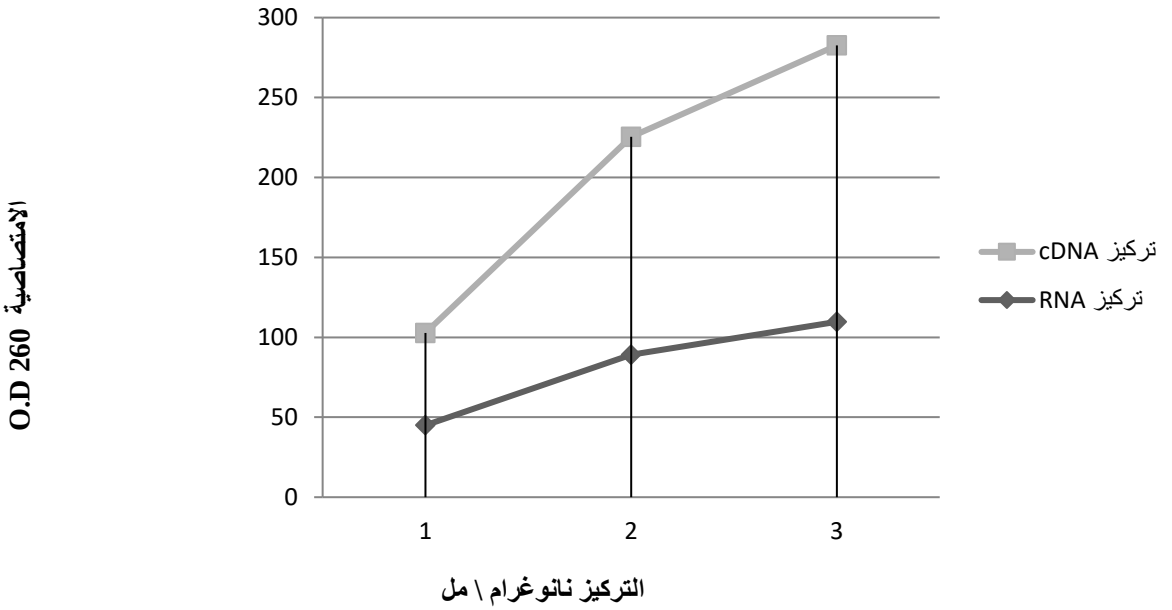
شكل(5):- يبين الرحلان الكهربائي لحزم الرنا المستخلص من البكتريا *E.coli MC1022* المتحولة جينيا (c) اكثر تالقا ضوئيا من البكتريا الطراز البري (b)

Ladder a b c

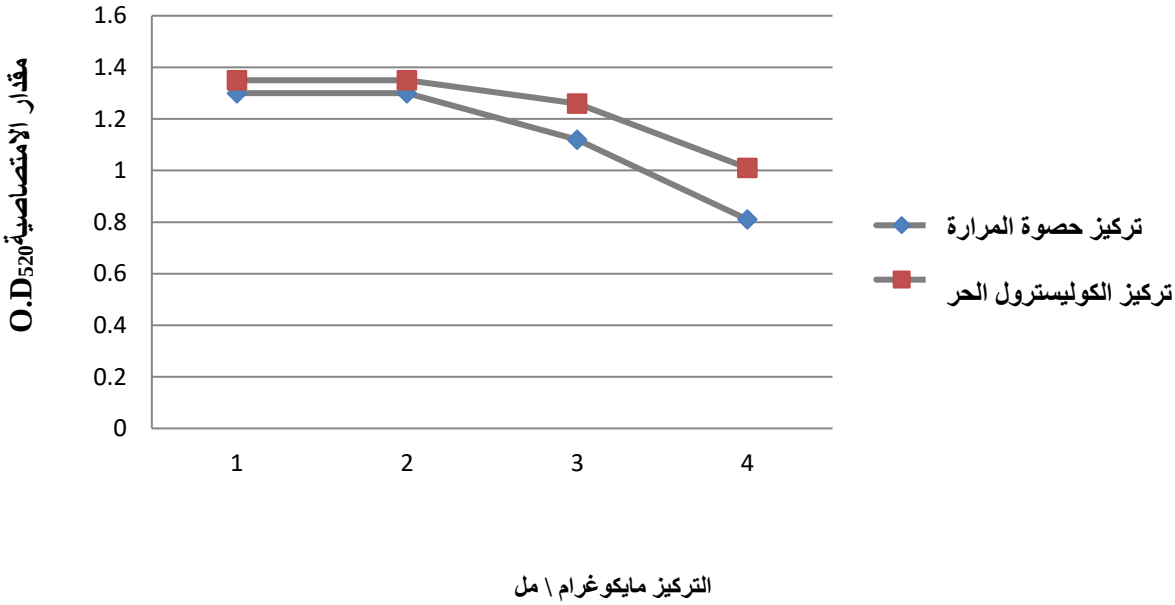


cDNA 4500bp

شكل (6):- الرحلان الكهربائي لحزم الدنا المتمم 4.5 كيلوقاعدة لبكتريا المحورة جينيا (c) الدليل 100 زوج قاعدة



الشكل (7):- زيادة تركيز تعبير RNA والدنا المتمم cDNA في البكتريا *E.coli MC1022* المتحولة



شكل (9) : يظهر انخفاض بتراكيز حصوة المرارة والكوليسترول الحر في وسط تنمية بكتريا *E.coli MC1022* المتحولة جينيا

المصادر

1- N Khare, D Sharma, U Somashekar, A Prakash, S Prakash, M Mendki and A Anvikar . *Detection of bacterial DNA in cholesterol gall stones*. The Internet Journal of Surgery; 2007, 16 (2).

2- A. M. Prouty,1 W. H. Schwesinger and J. S. Gunn. Biofilm Formation and Interaction with the Surfaces of Gallstones by *Salmonella* spp. Department of Microbiology and Department of General Surgery,2 University of Texas Health Science Center at San Antonio; 2002, 70, (5): 2640–2649.

3- J N Plevris, S W Walker, D J Harrison, A Dhariwal, P C Hayes and I A D Bouchier. mary culture of bovine gall bladder epithelial cells" Department of Medicine, Royal Infirmary; , 2015 ,(34): 1612-1615.

4- Guarner F , Khan AG , Garisch J . World Gastroenterology Practice Guideline. Probiotics and prebiotics . The American Journal of gastroenterology Supplements; 2011 ,(1):34–40.

5- N Khare, D Sharma, U Somashekar, A Prakash, S Prakash, M Mendki and A Anvikar. Detection of bacterial DNA in cholesterol gall stones. The Internet Journal of Surgery; 2007, 16 (2).

6- A. A Al-Saleh; A. A.M. Metwalli and H. M. Abu-Tarboush. Bile Salts and Acid Tolerance and Cholesterol Removal from Media by some Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Food Science and nutrition Dept. College of Food Science and Agric. King Saud Univ. Riyadh, Saudi Arabia; 2006 ,1 (1).

7- E. Flore , T. Ngongang , B. Tiencheu , B. T. Fossi , A. U. Achidi , D. M. Shiynyuy , H. M. Womeni and Z. N. François. Isolation and Identification of Cholesterol Lowering Probiotic Bacteria from Palm Wine (*Raffia mambillensis*). Journal of Microbiology Research; 2016, 6(5): 93-102

8- Madani, G., Mirlohi, M., Yahay, M., & Hassanzadeh, A. How Much *In Vitro* Cholesterol Reducing Activity of *Lactobacilli* Predicts Their *In Vivo* Cholesterol Function? International Journal of Preventive Medicine; 2013 , 4(4): 404–413.

9- Hatice, B., Belma, A., Gulcin, A. (2010), The Role of Resistance To Bile Salts And Acid Tolerance of Exopolysaccharides (Epss) Produced By Yogurt Starter Bacteria, Arch. Biol. Sci., 62(2),323-328.

10- A. C. Anderson, M. Sanunu, C. Schneider, A. Clad, L. Karygianni, E. Hellwig, and A. Al-Ahmad . Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. US National Library of Medicine .National Institutes of Health ; 2014,14 (312) :1471-2180.

11- G. A. Wilshaw , H. R. Smith and E. S. Anderson. Application of Agarose Gel Electrophoresis to the Characterization of Plasmid DNA in Drug-resistant Enterobacteria . Journal of General Microbiology; 1979, (114): 15-25.

12- Hua MC, Lin TY, Lai MW, Kong MS, Chang HJ, Chen CC. Probiotic Bio-Three induces Th1 and anti-inflammatory effects in PBMC and dendritic cells . World J. of Gastroenterology ; 2010(16): 3529-3540.

13- R.l Green and E. J. Rogers . Chemical Transformation of *E. coli* .US National Library of Medicine ,National Institutes of Health; 2013 , (529): 329–336.

14- J. E. Clarridge . Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases . US National Library of Medicine National Institutes of Health; 2004, 17(4): 840–862.

15- Majeed AA and Ozokus E. Cloning and over expression of bile salt hydrolase gene A(*bshA*) from *Lactobacillus acidophilus Ar* in *E. coli* .Bioengineering and sciences Institute, Kahraman marash sutchu imam University ,Turkey;2014:1-53.

16- K. Sung, S. A. Khan, . S. Nawaz and A. A. Khan.A simple and efficient Triton X-100 boiling and chloroform extraction method of RNA isolation from Gram-positive and Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Letter ;2004,229 (1): 97-101.

17- O. E. Petrova , F. Garcia-Alcalde, C. Zampaloni, and K. Sauer. Comparative evaluation of rRNA depletion procedures for the improved analysis of bacterial biofilm and mixed pathogen culture transcriptomes. US National Library of Medicine National Institutes of Health; 2017,(7): 41114.