

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۱۵۳-۱۶۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۲۰

مطالعه لایه سطحی و پارا اسپورال بادی (*Bacillus thuringiensis israelensis* (MH14) و پیش‌بینی پایدارسازی (Cry4Ba) با ایجاد جهش نقطه‌ای بر اساس یافته‌های بیوانفورماتیک

غزال باب‌المراذ: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، g.babolmorad@gmail.com
گیتی امتیازی*: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، emtiaz@yahoo.com

چکیده

مقدمه: باسیلوس تورنجینسیس مهم‌ترین عامل زیستی است که با تولید پارا اسپورال بادی، نقش مهمی در مقابله با آفات کشاورزی دارد. همچنین، لایه سطحی تولید می‌کند که ساختاری کریستالی از جنس پروتئین یا گلیکوپروتئین است و کاربرد وسیعی در نانوبیوتکنولوژی دارد. بنابراین، مطالعه آن دارای اهمیت است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، پارا اسپورال بادی خالص‌سازی شده، مخلوط کریستال / اسپور با کوماسی بلو G250 رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. با ایجاد جهش نقطه‌ای، افزایش پایداری در پروتئین CRY4Ba پیش‌بینی شد و جایگاه حفره‌ها در این پروتئین توسط نرم افزار molegro پیش‌بینی شد. در نهایت، لایه سطحی استخراج و شکل و وزن مولکولی آن بررسی شد. به منظور مقایسه لایه سطحی و پاراسپورال بادی، برخی ویژگی‌های پروتئین آن‌ها توسط پایگاه Protparam تعیین شد.

نتایج: یافته‌ها گویای وجود کریستال‌های پروتئینی چند وجهی بود که پس از آزاد شدن از اسپور مجتمع می‌شوند و کریستال‌های درشت‌تر تشکیل می‌دهند. همچنین، در این پژوهش پیش‌بینی می‌شود که با جایگزینی اسید آمینه آسپارتیک اسید موقعیت ۴۵۱ با ایزولوسین، پروتئین مقاوم‌تر کننده حشرات CRY4Ba ایجاد می‌شود. این پروتئین سه زیر واحدی حاوی ۵۹ حفره است و همانند لایه سطحی از همین سویه، درصد حضور اسیدهای آمینه متیونین، هیستیدین، سیستئین و تریپتوفان در آن بسیار پایین است.

بحث و نتیجه‌گیری: باسیلوس تورنجینسیس در فاز اسپورزایی، کریستال‌های کننده حشرات تولید می‌کند که این کریستال‌ها پس از رها شدن از اسپور مجتمع می‌شوند و کریستال‌های درشت‌تر را تشکیل می‌دهند. پیش‌بینی می‌شود که جایگزینی آسپارتیک اسید موقعیت ۴۵۱ با ایزولوسین، موجب افزایش پایداری پروتئین CRY4Ba می‌شود. این باکتری در فاز رویشی پروتئین سطحی ۱۰۰KD تولید می‌کند که از لحاظ ریخت‌شناسی و درصد برخی اسیدهای آمینه به پارا اسپورال بادی شباهت بسیاری دارد.

واژه‌های کلیدی: لایه سطحی، پارا اسپورال بادی، CRY4Ba، *Bacillus thuringiensis israelensis* (MH14)

مقدمه

لایه سطحی^۱ ساختار کریستالی منظمی است که سطح بسیاری از باکتری‌ها و آرکناها را به طور کامل می‌پوشاند، ساختار پروتئینی دارد و بالغ بر ۱۵ درصد کل پروتئین سلول را شامل می‌شود (۱). توالی‌های ژن‌های لایه سطحی گویای آن است که آن‌ها شباهت کمی با هم دارند مگر در S-layer homology (slh) domain که عامل اتصال این پروتئین به پپتید و گلیکان است (۲).

لایه سطحی باسیلوس‌ها معمولاً دارای ساختار P₄ یا P₂ است، اگر چه لایه سطحی برخی سویه‌های باسیلوس آنتراسیس^۲، باسیلوس کواگولانس^۳ و باسیلوس استناروترموفیلوس^۴ ساختار خطی یا مورب دارد (۳). سطح باسیلوس تورنجینسیس^۵ دارای لایه سطحی با تقارن P₂ است که سطح خارجی آن صاف و سطح داخلی آن موج‌دار است (۴). وزن مولکولی لایه سطحی در باسیلوس‌ها بین ۶۶ تا ۲۵۵ KD است. باسیلوس آنتراسیس دو نوع (EA1 و Sap) Slp دارد که در طی رشد سنتز می‌شوند به این ترتیب که Sap قبل از EA1 سنتز می‌شود (۵). در باسیلوس تورنجینسیس پروتئین لایه سطحی، Slp A نامیده می‌شود که بسیار به Sap شباهت دارد (۶). باسیلوس تورنجینسیس باکتری است که در فاز اسپورزایی، سمی از جنس پروتئین تولید می‌کند که کشنده حشرات است، مجتمع می‌شود و پارا اسپورال‌بادی^۶ تشکیل می‌دهد. پارا اسپورال‌بادی‌ها معمولاً به خاطر شکل کریستالی خود با نام Cry (از کلمه کریستال آمده است) پروتئین/توکسین^۷ شناخته می‌شود (۷). عامل کشنده حشرات در *Bacillus thuringiensis israelensis* دلتا توکسین

است که زمانی که میکروارگانیسم در حالت مرگ است تولید می‌شود (۸). Cry پروتئین‌ها ویژگی‌های شیمیایی بسیار خاصی دارند وزن مولکولی آن‌ها بالاست، در برابر پروتئولیز مقاوم هستند و در اسیدپتید قلیایی محلول می‌شوند (۹). Cry توکسین‌ها در سطح اسپور قرار دارند و توسط آگزوسپوریوم^۸ محافظت می‌شود (۱۰). به این انکلوژن‌بادی‌ها^۹ کریستال‌های پروتئینی کشنده حشرات می‌گویند. چهار کلاس اصلی از ژن‌های Cry و پروتئین‌های Cry بر اساس اختصاصیت میزبان و درجه تشابه توالی آمینو اسیدشان شناخته شده است: Cry I، Cry II، Cry III و Cry IV (۱۱). از آنجا که باسیلوس تورنجینسیس با تولید کریستال‌های پروتئینی خود مهم‌ترین عامل زیستی کنترل آفات در سراسر جهان است (۱۲) و از طرفی تولیدکننده لایه سطحی است که لایه S با زیر واحدهایی در مقیاس نانو و خاصیت خود آرایه‌اش کاربرد وسیعی در نانوبیوتکنولوژی دارد (۱۳)، استخراج و خالص‌سازی لایه سطحی و پارا اسپورال‌بادی و مطالعه ویژگی‌های آن‌ها دارای اهمیت است. از آنجا که پروتئین Cry به عنوان سم کشنده حشرات استفاده می‌شود افزایش مقاومت و پایداری آن در بیوتکنولوژی و کشاورزی با اهمیت است.

در این مطالعه، از دو سرور MaStab و CUPSAT برای پیش‌بینی افزایش پایداری پروتئین Cry4Ba بر اساس جهش نقطه‌ای در یک اسید آمینه این پروتئین استفاده شد. CUPSAT^{۱۰} یک ابزار تحت وب برای تجزیه تحلیل و پیش‌بینی تغییرات پایدار پروتئین بر اساس جهش نقطه‌ای (جهش تک اسید آمینه‌ای) است.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری و شرایط کشت:

باسیلیوس تورنجینسیس *MH14* از آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه اصفهان تهیه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط BHIB^{۱۱} کشت داده شد. سویه یاد شده پس از کشت در محیط NA به شکل اسپور در دمای منفی ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آماده‌سازی نمونه کریستال / اسپور برای بررسی با

میکروسکوپ نوری: اسمیری از مخلوط اسپور / باکتری / کریستال به روی لام قرار داده شده با حرارت تثبیت و با محلول کوماسی‌بلو G250 به مدت ۳ دقیقه رنگ آمیزی شد. سپس با آب مقطر شسته، خشک و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۱۰۰ مشاهده شد.

جداسازی و خالص‌سازی پاراسپورال بادی:

مخلوط اسپور / کریستال از محیط NA در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه دور rpm ۱۰۰۰۰ برای نشست اسپورها سانتریفیوژ^{۱۲} و مایع رویی حاوی کریستال‌های پروتئینی برای زدودن کامل اسپورها، ۵ بار دیگر سانتریفیوژ شد. در نهایت، کریستال‌های پروتئینی با سانتریفیوژ در دور rpm ۱۹۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه حاصل شدند (۱۵) سپس، دو نمونه برای مشاهده میکروسکوپی تهیه شد: نمونه اول به طور مستقیم روی لام قرار داده، لامل‌گذاری و با میکروسکوپ مشاهده شد. نمونه دوم ابتدا با کوماسی‌بلو G250 رنگ آمیزی و پس از آن با میکروسکوپ بررسی شد.

تعیین غلظت پروتئین با معرف بردفورد^{۱۳}: برای

تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد و از (BSA) Bovine serum albumin به عنوان استاندارد استفاده شد (۱۶).

این برنامه از پتانسیل محیط ساختاری اتم خاص و توان زاویه پیچش برای پیش‌بینی Delta Delta G، تفاوت در انرژی آزاد آشکار بین پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته استفاده می‌کند و نیازمند ساختار پروتئین با فرمت Protein Data Bank و جایگاه اسید آمینه‌ای که قرار است در آن جهش رخ دهد، است. نتایج شامل اطلاعاتی در مورد جایگاه جهش، ویژگی‌های ساختاری (دسترسی حلال، ساختار دوم و زاویه چرخش) و اطلاعات جامع در مورد تغییرات در ثبات پروتئین در شرایط ۱۹ تعویض ممکن در یک جهش خاص اسید آمینه است و نتایج را بر اساس ۱۵۳۸ جهش از دنا تورا سیون حرارتی و ۱۶۰۳ جهش از دنا تورا سیون شیمیایی آزمایش می‌کند. در انتها چندین آزمایش اعتبار سنجی برای اطمینان از قابل اعتماد بودن و دقت کار انجام می‌دهد. بر این اساس بیش از ۸۰ درصد دقت در پیش‌بینی را به همراه دارد (۱۴). MuStab نیز برای پیش‌بینی تغییرات پایداری پروتئین بر اساس جایگزینی اسیدهای آمینه طراحی شده است.

در این مطالعه برای نخستین بار لایه سطحی *Bacillus thuringiensis israelensis* (MH14) استخراج، وزن مولکولی آن تعیین و با میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. همچنین، برای نخستین بار پاراسپورال بادی از اسپورهای این باکتری استخراج و با میکروسکوپ نوری بررسی شد و با ایجاد جهش نقطه‌ای در توالی پروتئین CRY4Ba با استفاده از دو سرور CUPSAT و MaStab افزایش پایداری پروتئین پیش‌بینی شد و برخی ویژگی‌های Slp و CRY4Ba از *Bacillus thuringiensis israelensis* (MH14) توسط سرور protparam بررسی شد.

بررسی میکروسکوپی لایه سطحی

باسیلوس تورنجینسیس MH14: برای بررسی ریخت‌شناسی لایه سطحی مقداری از لایه سطحی خالص بر روی لام قرار گرفت. پس از خشک شدن در دمای اتاق ساختار آن توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

نتایج

با توجه به این که *باسیلوس تورنجینسیس* می‌تواند سم ضد حشرات تولید کند، غربال‌گری سوبیه‌های تولیدکننده کریستال پاراسپورال بادی و مطالعه ساختار آن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. برای بررسی اطلاعات بیشتر در مورد Cry toxin با استفاده از سرورهای موجود اطلاعاتی در مورد این سم حاصل شد. در این پژوهش ساختار و ویژگی‌های سم Cry4Ba از *Bacillus Thuringiensis Israelensis* با یافته‌های بیوانفورماتیکی بررسی شده است. بر اساس اطلاعات به‌دست آمده از NCBI دلتا اندو توکسین سم حشره‌کش است که در طی اسپورزایی تولید می‌شود. اندو توکسین تولید شده به اپیتلیوم روده متصل می‌شود و با لیز سلول‌ها به مرگ منجر می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده، دلتا اندو توکسین فعال شامل سه دومین^{۱۶} ساختاری است: دومین N انتهایی یا هلیکال یا دومین I، که در قرار گرفتن سم در غشا و ایجاد سوراخ نقش دارد؛ در حالی که دومین شماره II و III در اتصال به گیرنده نقش دارند. دومین شماره III یا دومین C انتهایی از لحاظ ساختاری به دومین متصل شونده به کربوهیدرات ۶ (CBM6) شباهت دارد و امکان دارد که حشره به طور اختصاصی از واکنش پروتئین-پروتئین و یا پروتئین-کربوهیدرات توسط دومین شماره II و III تشخیص داده شود.

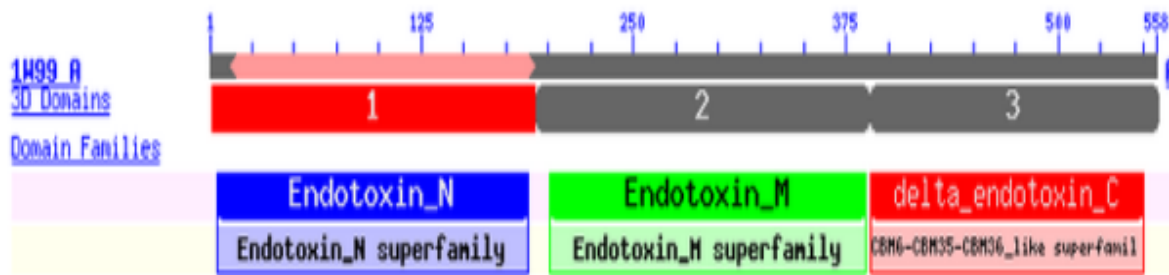
مطالعات بیوانفورماتیکی^{۱۴}: توالی و ساختار سه بعدی

پروتئین CRY4Ba از بانک اطلاعات پروتئین (PDB) به‌دست آمد. با استفاده از سرور CUPSAT افزایش پایداری پروتئین با جهش نقطه‌ای تصادفی بر اساس دنا تورا سیون حرارتی و دنا تورا سیون شیمیایی در ASP موقعیت ۴۵۱ پیش‌بینی شد. جهش‌های یکسان بر پایه هر دو نوع دنا تورا سیون انتخاب و با سرور MaStab نیز در رنجی از دما و اسیدیته بررسی و بهترین جهشی که پایداری را افزایش می‌داد پیش‌بینی شد. همچنین، جایگاه حفره در این پروتئین با استفاده از نرم افزار Molegro پیش‌بینی و جایگاه اتصال فلزات به این پروتئین بر اساس یافته‌های NCBI شناسایی شد. توالی پروتئین Slp از *Bacillus thuringiensis israelensis* از NCBI و توالی پروتئین CRY4Ba از بانک اطلاعات پروتئین (PDB) به‌دست آمد و با استفاده از سرور protparam برخی ویژگی‌های آن‌ها بررسی شد.

جداسازی لایه سطحی: هنگامی که جذب نوری سوپانسیون حاوی باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۹ رسید سلول‌ها سانتریفیوژ^{۱۱} و دو بار توسط آب دو بار تقطیر شسته شدند و تحت تیمار ۵ مولار گوانیدین هیدروکلراید به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (۱۵) و مایع‌رویی که حاوی پروتئین لایه سطحی است علیه ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ دیالیز^{۱۵} شد (۱۷).

تحلیل پروتئین لایه سطحی توسط SDS page:

انجام این تحلیل ۱۰ میکرولیتر نمونه پروتئین با ۱۰ میکرولیتر بافر نمونه مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. آنگاه روی ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد جریان یافت؛ سپس، ژل با کوماسی‌بلو G250 رنگ آمیزی و برای حذف رنگ‌های اضافی رنگ بری شد.



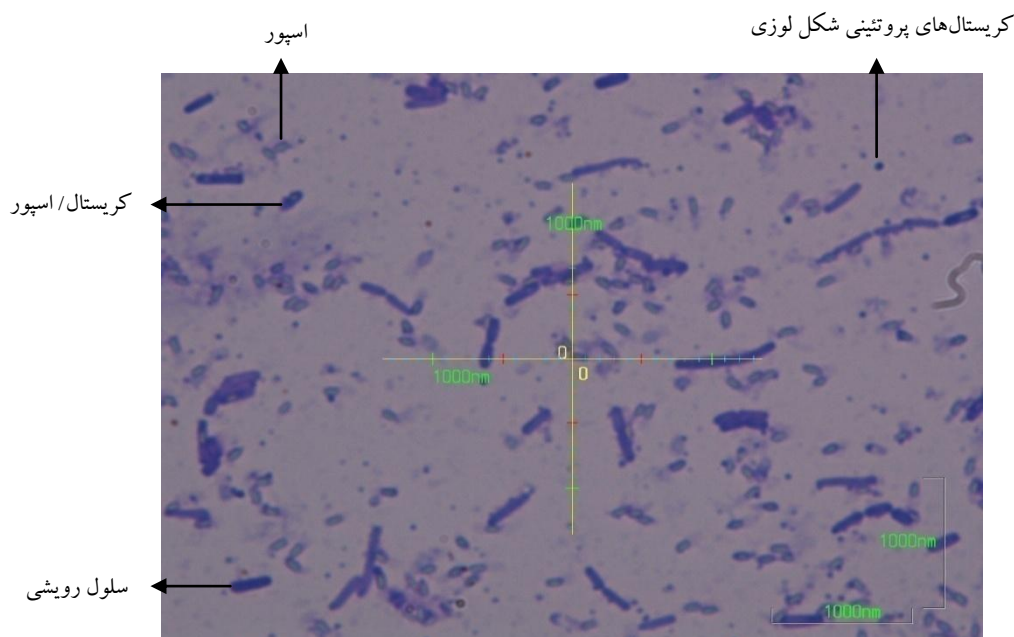
شکل ۱- موقعیت قرارگیری سه دومین پروتئین CRY4Ba بر اساس اطلاعات به دست آمده از NCBI اندوتوکسین تولید شده به اپتلیوم روده حشرات متصل می‌شود و با لیز سلول‌ها به مرگ منجر می‌شود.

تعیین شکل کریستال‌های آن با روش ساده رنگ آمیزی کوماسی بلو G250 بررسی شد.

در مشاهدات میکروسکوپ نوری از لام تهیه شده از کریستال/ اسپور/ باکتری رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو G250 مطابق شکل ۲ کریستال‌های آزاد شده از اسپورها قابل تشخیص است. آبی رنگ بودن کریستال‌ها تایید کننده ساختار پروتئینی آنهاست. ساختار لوزی شکل آنها نشان‌دهنده آن است که پاراسپورال بادی این سویه به شکل کریستال‌های لوزی شکل است. اسپورها سفید رنگ و بیضی شکل هستند و سلول‌های رویشی به شکل باسیل‌های آبی دیده می‌شوند، کریستال/ اسپورها هم به شکل اجسام سفید رنگ در سلول‌های آبی قابل مشاهده هستند که در واقع پاراسپورال‌بادی‌های ترشح شده از اسپور، اسپور را در برگرفته است که هم نشان‌دهنده آزاد شدن این کریستال‌های پروتئینی از اسپور است و هم نشان‌دهنده تولید بالای این کریستال‌ها از اسپور است به شکلی که اطراف اسپور سازنده‌اش را در برگرفته است (شکل ۲).

از آنجا که یافتن جایگاه اتصال به فلزات و مناطق حفاظت شده دارای اهمیت هستند و از طرفی ایجاد موتاسیون در این مناطق مطلوب نیست بنابراین، به کمک پایگاه اطلاعات NCBI جایگاه این مناطق مشخص شد. جایگاه اتصال به فلزات در همه Cry toxin‌ها شامل: سه اسید آمینه بسیار حفاظت شده پرولین، والین و آسپارتیک اسید است. این سه اسید آمینه جایگاه اتصال به فلزات هستند و می‌توانند به Ca^{2+} و Na^{+} متصل شوند. در مقایسه دومین شماره سه Cry4Ba با نه توالی مشابه (پروتئین‌های کریستالی کشنده حشرات، هیپوتیکال پروتئین و دلتا اندوتوکسین) مشخص شد که سه اسید آمینه حفاظت شده که در جایگاه‌های مشخصی از پروتئین قرار دارند و جایگاه اتصال به فلزات هستند در تمامی این نه توالی در سویه‌های مختلف باسیلوس تورنجینسیس بسیار حفاظت شده هستند. به علاوه توالی همه دلتا اندوتوکسین‌ها شباهت بالایی به یکدیگر دارند.

در این پژوهش پاراسپورال‌بادی باسیلوس تورنجینسیس MH14 برای بررسی بیشتر و



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ نوری از لام تهیه شده از کشت کهنه باسیلوس تورنجینسیس *MH14* کریستال‌های آزاد شده از اسپورها قابل تشخیص است، آبی رنگ بودن کریستال‌ها تایید کننده ساختار پروتئینی آن‌هاست. ساختار لوزی شکل آن‌ها نشان‌دهنده آن است که پاراسپورال بادی این سویه به شکل کریستال‌های لوزی شکل است. اسپورها سفید رنگ و بیضی شکل هستند. سلول‌های رویشی به شکل باسیل‌های آبی دیده می‌شوند. کریستال / اسپورها هم به شکل اجسام سفید رنگ در سلول‌های آبی قابل مشاهده هستند. بار نشان دهنده ۱۰۰۰ نانومتر است.

به شکل کریستال‌های آبی رنگ مشاهده می‌شود که تایید کننده جنس پروتئینی آن‌هاست (شکل ۳-ب). در شکل ۳ کریستال‌های درشت پاراسپورال بادی مشاهده می‌شود اما همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده این کریستال‌ها هنگامی که از اسپور رها می‌شوند به شکل کریستال‌های کوچک لوزی شکل هستند اما پس از خالص شدن به شکل کریستال‌های درشت مجتمع شده‌اند که نشان‌دهنده تمایل این کریستال‌ها برای مجتمع شدن پس از رهایی از اسپور است. شایان ذکر است که پس از استخراج پاراسپورال بادی میزان پروتئین نمونه با معرف برادفورد اندازه‌گیری شد که بر اساس منحنی استاندارد میزان پروتئین ۲۹ میکروگرم در ۱ میلی‌لیتر بوده است.

سپس نمونه خالص از پاراسپورال بادی تهیه شد به این شکل که مخلوط اسپور / کریستال از محیط NA در آب مقطر استریل جمع آوری و با دور ۱۰۰۰۰ rpm برای نشست اسپورها سانتریفیوژ و مایع رویی حاوی کریستال‌های پروتئینی برای زدودن کامل اسپورها ۵ بار دیگر سانتریفیوژ شد. در نهایت، کریستال‌های پروتئینی با سانتریفیوژ در دور ۱۹۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه حاصل شد. از پاراسپورال بادی‌های جداسازی شده دو لام تهیه شد یکی بدون رنگ آمیزی و یکی رنگ شده با کوماسی بلو G250، همان‌گونه که در شکل ۳ نشان داده شده، نمونه خالص پاراسپورال بادی رنگ آمیزی نشده به شکل کریستال‌های درشت چند وجهی (شکل ۳-الف) و نمونه رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو G250



شکل ۳- (الف) و (ب) - تصویر میکروسکوپ نوری از پاراسپورال‌بادی‌های جداسازی شده از اسپور است. این تصویر نشان دهنده تجمع کریستال‌های پروتئینی و تشکیل کریستال درشت پاراسپورال بادی است. بزرگ‌نمایی ۴۰X.

پیش‌بینی Delta Delta G، تفاوت در انرژی آزاد آشکار بین پروتئین‌های وحشی و جهش یافته استفاده می‌کند و نیازمند ساختار پروتئین با فرمت Protein Data Bank و جایگاه اسید آمینه‌ای که قرار است در آن جهش رخ دهد می‌باشد. نتایج شامل: اطلاعاتی در مورد جایگاه جهش، ویژگی‌های ساختاری (دسترسی حلال، ساختار دوم و زاویه چرخش) و اطلاعات جامع در مورد تغییرات در ثبات پروتئین در شرایط ۱۹ تعویض ممکن در یک جهش خاص اسید آمینه است و نتایج را بر اساس ۱۵۳۸ جهش از دنا تورا سیون حرارتی و ۱۶۰۳ جهش از دنا تورا سیون شیمیایی آزمایش می‌کند. در انتها چندین آزمایش اعتبار سنجی برای اطمینان از قابل اعتماد بودن و دقت کار انجام می‌دهد. بر این اساس بیش از ۸۰ درصد دقت در پیش‌بینی را به همراه دارد (۱۴) و MuStab نیز برای پیش‌بینی تغییرات پایداری پروتئین بر اساس جایگزینی اسیدهای آمینه طراحی شده است.

توالی و ساختار سه بعدی پروتئین CRY4Ba از بانک اطلاعات پروتئین (PDB) به دست آمد. با استفاده از سرور CUPSAT افزایش پایداری پروتئین با جهش نقطه‌ای تصادفی بر اساس دنا تورا سیون حرارتی و دنا تورا سیون شیمیایی در ASP موقعیت ۴۵۱ پیش‌بینی شد.

برای پیش‌بینی جایگاه حفره ساختار سه بعدی پروتئین Cry4Ba از بانک اطلاعات پروتئین (PDB) با PDB ID: 1W99 گرفته شد و با نرم افزار Molegro جایگاه حفره هایش پیش‌بینی شد. هر زیر واحد این پروتئین ۱۱ حفره دارد در حالی که مجموع این سه زیر واحد در کنار هم حاوی ۵۹ حفره است. جایگاه اتصال به فلزات که شامل سه اسید آمینه حفاظت شده آسپارتیک اسید موقعیت ۶۲۶، پرولین موقعیت ۴۸۴ و والین موقعیت ۴۸۶ است با استفاده از نرم افزار Molegro در ساختار سه بعدی پروتئین Cry4Ba تعیین و مشخص شد که جایگاه حفاظت شده اتصال فلزات در ناحیه حفره‌های پروتئین قرار ندارند.

از آنجا که Cry4Ba یک سم کشنده حشرات است افزایش مقاومت این پروتئین مطلوب است. بر این اساس کوشش شد که افزایش پایداری این پروتئین بر اساس جهش نقطه‌ای در یک اسید آمینه آن پیش‌بینی شود. برای این کار از دو سرور CUPSAT و MuStab استفاده شد. CUPSAT یک ابزار تحت وب برای پیش‌بینی تغییرات پایدار پروتئین بر اساس جهش نقطه‌ای (جهش تک اسید آمینه‌ای) است. این برنامه از پتانسیل محیط ساختاری اتم خاص و توان زاویه پیچش برای

جدول ۱- نتایج سرور CUPSAT از ایجاد جهش نقطه ای بر اساس دنا تورا سیون حرارتی در آسپارتیک اسید موقعیت ۴۵۱. پیش‌بینی می‌شود که جایگزینی آسپارتیک اسید موقعیت ۴۵۱ با اسیدهای آمینه والین، لوسین، ایزولوسین، متیونین، تریپتوفان، ترونین، فنیل‌آلانین، تیروزین و هیستیدین دارای پیچش مطلوب و ساختار پایدار است.

جایگاه جهش			
PDB	زنجیره	نوع اسید آمینه وحشی	جایگاه اسید آمینه
1W99	A	Asp	۴۵۱
ویژگی‌های ساختاری			
نوع رشته		درجه حلالیت	زاویه پیچش (Φ و Ψ)
شیت		درصد ۱۸/۰۴	$-134/1^\circ$ - $119/1^\circ$
اسیدهای آمینه جهش یافته			
$\Delta\Delta G$ پیش بینی شده (kcal/mol)	پایداری کلی	پیچش	اسید آمینه
-۲/۹۷	ناپایدار	نامطلوب	GLY
۰/۹	پایدار	نامطلوب	ALA
۵/۹۸	پایدار	مطلوب	VAL
۴/۱۱	پایدار	مطلوب	LEU
۶/۵۳	پایدار	مطلوب	ILE
۰/۸۳	پایدار	مطلوب	MET
-۲/۰۶	ناپایدار	نامطلوب	PRO
۳/۴۳	پایدار	مطلوب	TRP
-۲/۳	ناپایدار	نامطلوب	SER
۰/۷۱	پایدار	مطلوب	THR
۲/۹۹	پایدار	مطلوب	PHE
-۱/۵۴	ناپایدار	نامطلوب	GLN
۳/۸۱	پایدار	نامطلوب	LYS
۳/۲۸	پایدار	مطلوب	TYR
-۱/۴۹	ناپایدار	نامطلوب	ASN
-۳/۱۸	ناپایدار	مطلوب	CYS
۶/۵	پایدار	نامطلوب	GLU
-۰/۱۳	ناپایدار	نامطلوب	ARG
۰/۳۹	پایدار	مطلوب	HIS

جدول‌های ۱ و ۲ نشان‌دهنده نتایج پیش‌بینی پایداری Cry4Ba با جهش نقطه‌ای بر اساس دنا تورا سیون حرارتی و شیمیایی با استفاده از سرور CUPSAT در آسپارتیک اسید موقعیت ۴۵۱ هستند. از بین جهش‌های ایجاد شده جهش‌هایی که در هر دو مورد پایدار و دارای پیچش مطلوب و شامل: جایگزینی آسپارتیک اسید موقعیت ۴۵۱ با اسیدهای آمینه LEU, MET, TRP, THR, PHE, TYR, ILE و HIS بودند انتخاب و با سرور Mustab در رنجی از شرایط اسیدیته و دما بررسی شدند. جایگزینی همه اسیدهای آمینه به جز IEU موجب کاهش پایداری می‌شدند. شرایط در دو دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۱ تا ۸ بررسی شد. نتایج این پیش‌بینی برای جایگزینی ASP موقعیت ۴۵۱ با IEU در جدول ۳ بیان شده است. بر اساس نتایج سرور Mustab پیش‌بینی شد که ممکن است از بین این جهش‌ها جایگزینی ASP موقعیت ۴۵۱ با IEU در شرایط اسیدیته ۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، همچنین، اسیدیته ۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با بیشترین ضریب اطمینان (۲۳/۹۳ درصد)، و پس از آن در شرایط اسیدیته ۶ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، همچنین، اسیدیته ۳ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ضریب اطمینان ۲۳/۵۷ درصد موجب افزایش پایداری و مقاومت این سم شود. همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود جایگزینی ASP موقعیت ۴۵۱ با IEU در شرایط اسیدیته قلیایی در هر دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد موجب کاهش پایداری Cry4Ba می‌شود. همچنین، شرایط اسیدیته ۱ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نیز باعث کاهش پایداری می‌شود.

جدول ۳- نتایج پیش‌بینی جایگزینی ASP موقعیت ۴۵۱ با IEU در دو دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۱ تا ۸ با استفاده از سرور Mustab. نتایج نشان دهنده آن است که جایگزینی ASP موقعیت ۴۵۱ با IEU در شرایط اسیدیته ۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، همچنین اسیدیته ۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ضریب اطمینان ۲۳/۹۳ درصد؛ و پس از آن در شرایط اسیدیته ۶ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، همچنین اسیدیته ۳ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ضریب اطمینان ۲۳/۵۷ درصد موجب افزایش پایداری و مقاومت این سم می‌شود. همچنین، این جایگزینی در شرایط اسیدیته قلیایی در هر دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۱ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نیز باعث کاهش پایداری Cry4Ba می‌شود.

جایگزینی ASP موقعیت ۴۵۱ با IEU		
اسیدیته	دما (درجه سانتی‌گراد)	ضریب اطمینان
۸	۳۷	کاهش پایداری
۸	۲۵	کاهش پایداری
۷	۳۷	۲۳/۰۴
۷	۲۵	۲۲/۸۶
۶	۳۷	۲۳/۵۷
۶	۲۵	۲۳/۰۴
۵	۳۷	۲۳/۹۳
۵	۲۵	۲۳/۲۱
۴	۳۷	۲۳/۹۳
۴	۲۵	۲۳/۲۱
۳	۳۷	۲۳/۵۷
۳	۲۵	۲۳/۰۴
۲	۳۷	۲۳/۰۴
۲	۲۵	۲۲/۸۶
۱	۳۷	۲۲/۸۶
۱	۲۵	کاهش پایداری

از سوی دیگر باسیلوس تورنجینسیس در فاز رشد لگاریتمی، پروتئین سطحی تولید می‌کند. برای مطالعه بیشتر، این لایه توسط نمک گوانیدین هیدروکلراید استخراج شد. نتایج SDS page نشان دهنده حضور چند لایه پروتئینی بر روی ژل پلی‌آکریل آمید بود و یک باند قوی ۱۰۰KD مشاهده شد (شکل ۴).

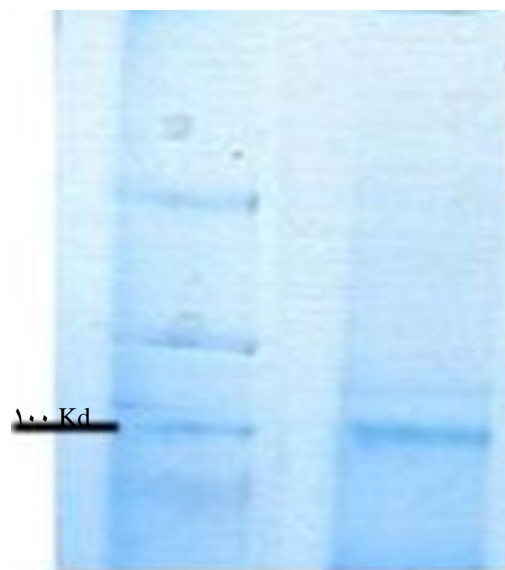
جدول ۲- نتایج سرور CUPSAT از ایجاد جهش نقطه ای بر اساس دنا تورا سیون شیمیایی در آسپارتیک اسید موقعیت ۴۵۱. پیش‌بینی می‌شود که جایگزینی آسپارتیک اسید موقعیت ۴۵۱ با اسیدهای آمینه لوسین، ایزولوسین، متیونین، تریتوفان، ترئونین، فنیل آلانین، تیروزین و هیستیدین دارای پیچش مطلوب و ساختار پایدار است.

جایگاه جهش			
جایگاه اسید آمینه	نوع اسید آمینه وحشی	زنجیره	PDB
۴۵۱	Asp	A	1W99
ویژگی‌های ساختاری			
زاویه پیچش (Φ و Ψ)		درجه حلالیت	نوع رشته
$119/1^\circ - 134/1^\circ$		درصد ۱۸/۰۴	شیت
اسیدهای آمینه جهش یافته			
اسید آمینه	پیچش	پایداری کلی	$\Delta\Delta G$ پیش بینی شده (kcal/mol)
GLY	نامطلوب	پایدار	-۲/۹۷
ALA	نامطلوب	پایدار	۰/۹
VAL	مطلوب	ناپایدار	۵/۹۸
LEU	مطلوب	پایدار	۴/۱۱
ILE	مطلوب	پایدار	۶/۵۳
MET	مطلوب	پایدار	۰/۸۳
PRO	نامطلوب	پایدار	-۲/۰۶
TRP	مطلوب	پایدار	۳/۴۳
SER	نامطلوب	پایدار	-۲/۳
THR	مطلوب	پایدار	۰/۷۱
PHE	مطلوب	پایدار	۲/۹۹
GLN	نامطلوب	پایدار	-۱/۵۴
LYS	نامطلوب	پایدار	۳/۸۱
TYR	مطلوب	پایدار	۳/۲۸
ASN	نامطلوب	پایدار	-۱/۴۹
CYS	نامطلوب	ناپایدار	-۳/۱۸
GLU	نامطلوب	پایدار	۶/۵
ARG	نامطلوب	پایدار	-۰/۱۳
HIS	مطلوب	پایدار	۰/۳۹

نشانه‌گر

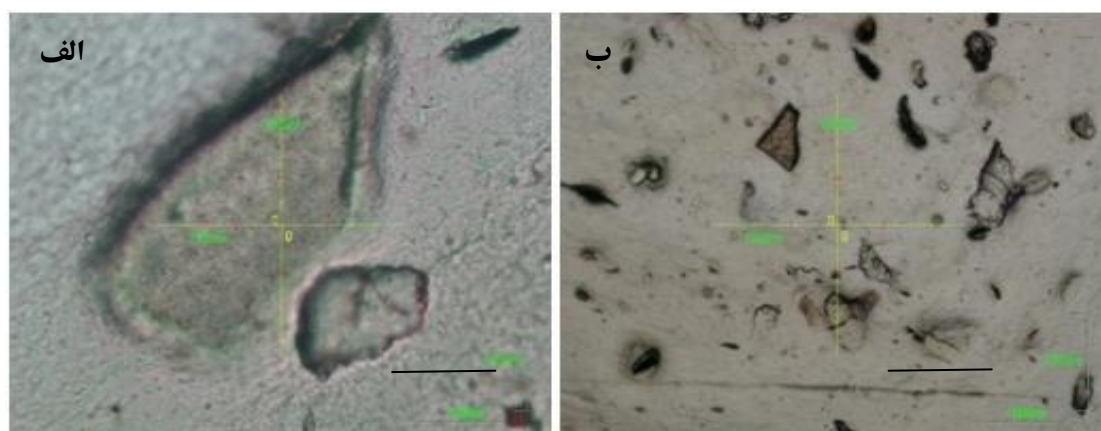
کرده‌اند. سایز برخی از این صفحات کریستالی به بیش از ۲ میکرومتر می‌رسد. البته برای کریستاله کردن لایه S معمولاً از سطوحی مانند میکا، لپیزوم و سیلیکون استفاده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که خودآرایه لایه S باسیلوس‌ها به روی سطوح هیدروفوب بهتر است. در پژوهشی که بر روی لایه S کالوباکتر انجام شد، شبکه کریستاله منظم در نمونه‌هایی که به روی سیلیکون هیدروفوب کریستاله شده بودند یافت شد (۱۸).

برای آنکه پروتئین Slp که در فاز لگاریتمی رشد تولید می‌شود را با پروتئین Cry4Ba مقایسه کنیم، توالی آن‌ها را که از NCBI به دست آمده بود با سرور protparam بررسی کرده، برخی ویژگی‌های آن‌ها را با یکدیگر مقایسه کردیم. مطابق جدول ۴ اطلاعات به دست آمده از سرور protparam گویای آن است که Slp از *Bacillus thuringiensis israelensis* فاقد اسید آمینه سیستئین است و درصد حضور اسیدهای آمینه تریپتوفان، متیونین و هیستیدین بسیار پایین است. همچنین، اسیدهای آمینه تریپتوفان، متیونین، هیستیدین و سیستئین کم‌ترین درصد حضور را میان اسیدهای آمینه پروتئین Cry4Ba دارند.



شکل ۴- نتایج SDS page پروتئین لایه سطحی باسیلوس تورنجینسیس *MH14*: مشاهده باند ۱۰۰kD

برای مقایسه آرایش پاراسپورال بادی با پروتئین لایه سطحی تصویر میکروسکوپ نوری از لایه سطحی تهیه شد. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده، تصویر میکروسکوپی لایه سطحی خالص نشان دهنده حضور کریستال‌های درشت و صفحات گسترده از پروتئین لایه سطحی است که منومرهای آن که به شکل خود آرایه به یکدیگر اتصال یافته و آرایش منظمی پیدا



شکل ۵- ساختار صفحات کریستالی پروتئین لایه سطحی باسیلوس تورنجینسیس *MH14* با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ X (الف) و ۴۰ X (ب). علامت بار نشان دهنده ۱۰۰۰ نانومتر است.

جدول ۴- درصد حضور برخی اسیدهای آمینه در پروتئین Slp و Cry4Ba از *Bacillus thuringiensis israelensis* بر اساس اطلاعات به دست آمده از prot param. اسیدهای آمینه تریتوفان، متیونین، هیستیدین و سیستئین کم‌ترین درصد حضور را میان اسیدهای آمینه در هر دو پروتئین دارند.

نوع اسید آمینه	(W) Trp	(M) Met	(H) His	(C) Cys
درصد حضور در پروتئین SlpA	۰/۹	۱/۸	۱	۰/۰
درصد حضور در پروتئین Cry4Ba	۱/۴	۱/۶	۱/۱	۰/۲

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مشاهده شده از کشت مخلوط اسپور کریستال گویای آزاد شدن کریستال‌های پروتئینی از اسپوره‌هاست. از آنجا که در رنگ آمیزی با کوماسی بلو G250 پروتئین‌ها به رنگ آبی دیده می‌شوند، آبی شدن کریستال‌ها در رنگ آمیزی با این رنگ اثبات‌کننده جنس پروتئینی این کریستال‌هاست که با یافته‌های شریف^{۱۷} و همکارش در سال ۱۹۸۸ مطابقت دارد (۱۹). باسیلوس تورنجینسیس باکتری است که در فاز اسپورزایی سمی کریستالی تولید می‌کند که کریستال‌های تک مجتمع می‌شوند و پاراسپورال بادی‌ها را تولید می‌کنند (۷) در لام تهیه شده از کریستال‌های پروتئینی خالص کریستال‌های درشتی مشاهده می‌شود که علت آن تجمع کریستال‌های تک پس از آزاد شدن از اسپور و تشکیل کریستال‌های درشت است. Cry4Ba از *Bacillus thuringiensis israelensis* یک سم منحصر به فرد برای از بین بردن لارو *Ades* و پشه آنوفل^{۱۸} است (۲۰). پیش‌بینی جایگاه و تعداد حفره‌ها در Cry4Ba با استفاده از نرم‌افزار Molegro انجام و مشخص شد در هر زیر واحد این پروتئین ۱۱ حفره وجود دارد. ولی پس از قرار گیری سه زیر واحد در کنار هم ۵۹ حفره در سه زیر واحد Cry4Ba توسط نرم‌افزار Molegro تشخیص داده شد که نشان‌دهنده آن است که تجمع زیر واحدها در کنار هم به تشکیل آرایشی منجر می‌شود که تعداد زیادی

حفره را در بر دارد. با توجه به اهمیت پایداری این سم در محیط کوشش شد افزایش پایداری این سم بر اساس جهش نقطه‌ای پیش‌بینی شود. برای آن که جهش در نقاط حفاظت شده مطلوب نیست این نقاط شناسایی و مشخص شد که سه اسید آمینه والین، پرولین و آسپارتیک اسید در جایگاه‌های خاص در تمامی Cry toxin‌ها محل اتصال به فلزات و بسیار حفاظت شده هستند. به علاوه با استفاده از نرم‌افزار Molegro مشخص شد که این سه اسید آمینه حفاظت شده در ناحیه حفره قرار ندارند. برای پیش‌بینی پایداری پروتئین از دو سرور CUPSAT و MuStab استفاده و پیش‌بینی شد که از بین جهش‌های ایجاد شده بهترین جهش جایگزینی ASP موقعیت ۴۵۱ با IEU در شرایط اسیدیته ۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، همچنین اسیدیته ۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با بیش‌ترین ضریب اطمینان (۲۳/۹۳ درصد) است که موجب افزایش پایداری سم می‌شود.

باسیلوس تورنجینسیس *MH14* که در این مطالعه استفاده شد پروتئین سطحی با وزن مولکولی ۱۰۰KD را تولید کرد. پنا^{۱۹} و همکارانش در سال ۲۰۰۶ از *Bacillus thuringiensis* سویه GPI پروتئین لایه سطحی ۱۰۰KD را خالص‌سازی کردند که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد. لایه سطحی GPI (Slp) ۹۹ درصد با پروتئین EA1 از باسیلوس آنتراسیس شباهت دارد. EA1 پروتئینی است که در طول فاز اسپورزایی تولید می‌شود و تولیدش تحت کنترل پروتئین

پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰۰KD است که با پروتئین Sap از *باسیلوس آنتراسیس* شباهت دارد. همچنین، این باکتری در فاز اسپورزایی کریستال‌های چند وجهی کوچکی ترشح می‌کند که این کریستال‌ها پس از آزاد شدن از اسپور، مجتمع می‌شوند و کریستال‌های درشت‌تر که همان سم کشنده حشرات است را تشکیل می‌دهند. شباهت‌هایی از لحاظ درصد حضور اسیدهای آمینه بین پروتئین Slp و پروتئین Cry4Ba وجود دارد. به این شکل که درصد حضور اسیدهای آمینه تریپتوفان، متیونین، هیستیدین و سیستئین در هر دو پروتئین بسیار پایین است. با توجه به این مسأله و شباهت ساختاری کریستال‌های این دو پروتئین و یافته‌های پنا و همکارانش می‌توان گفت ممکن است لایه سطحی *باسیلوس تورنجینسیس* که در سلول رویشی تولید می‌شود و پارا اسپورال بادی، از لحاظ ساختار کلی و درصد حضور برخی اسیدهای آمینه شباهت دارند. همچنین، پیش‌بینی می‌شود که جایگزینی ASP موقعیت ۴۵۱ با IEU در شرایط اسیدیته ۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، همچنین، اسیدیته ۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ضریب اطمینان ۲۳/۹۳ درصد موجب افزایش پایداری سم می‌شود.

References

- (1) Beveridge TJ., Pouwels PH., Sára M., Kotiranta A., Lounatmaa K., Kari K., et al. functions of s-layers. *FEMS microbiology reviews* 1997; 20 (1- 2): 99- 149.
- (2) Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews* 1998; 62 (3): 775- 806.

Sap است که هم در فاز لگاریتمی و هم فاز اسپورزایی تولید می‌شود. در مطالعه آن‌ها برای نخستین بار مشاهده شد که Slp هم می‌تواند همانند پارا اسپورال بادی در بیماری‌زایی باکتری مؤثر باشد (۱۵). با توجه به این یافته‌ها می‌توان گفت Slp استخراج شده از *باسیلوس تورنجینسیس MH14* با وزن مولکولی ۱۰۰KD شباهت بالایی به Slp GPI ۱۰۰KD دارد. همچنین، تصویر میکروسکوپ نوری تهیه شده از لایه سطحی خالص *باسیلوس تورنجینسیس* گویای حضور صفحات کریستالی درشت پروتئینی است که این کریستال‌ها از لحاظ ریخت‌شناسی شباهت بالایی به کریستال‌های خالص پارا اسپورال بادی دارند. برای بررسی شباهت‌های بین لایه سطحی و Cry toxin توالی Slp و Cry4Ba از *Bacillus thuringiensis israelensis* با استفاده از سرور Protparam بررسی شدند، که مشخص شد Slp از *Bacillus thuringiensis israelensis* فاقد اسید آمینه سیستئین و درصد حضور اسیدهای آمینه تریپتوفان، متیونین و هیستیدین بسیار پایین است. همچنین، اسیدهای آمینه تریپتوفان، متیونین، هیستیدین و سیستئین کم‌ترین درصد حضور را میان اسیدهای آمینه پروتئین Cry4Ba دارند. لوکروییچ^{۲۰} و همکارش در سال ۱۹۸۹ اعلام کردند پروتئین لایه سطحی *باسیلوس تورنجینسیس* ساختار کمابیش هیدروفوبی است که فاقد اسیدهای آمینه سیستئین، متیونین و تریپتوفان است (۵) این داده‌ها با اطلاعات به‌دست آمده از بررسی‌های بیوانفورماتیکی پروتئین Slp از *Bacillus thuringiensis israelensis* مطابقت دارد.

بنابراین، می‌توان گفت پروتئین سطحی *باسیلوس تورنجینسیس* که منورهای آن به شکل کریستال‌های درشت و صفحات گسترده خود آرایه می‌شوند،

- (3) Sleytr UB., Messner P. Crystalline surface layers on bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 1983; 37 (1): 311- 39.
- (4) Luckevich MD., Beveridge TJ. Characterization of a dynamic S layer on *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology* 1989; 171 (12): 6656- 67.
- (5) Mignot T., Mesnage S., Couture- Tosi E., Mock M., Fouet A. Developmental switch of S- layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Molecular microbiology* 2002; 43 (6): 1615- 27.
- (6) Ming S., Chenguang v., Ziniu Y. Cloning of parasporal body protein gen resembling to s-layer protein genes from *Bacillus thuringiensis* CTC strain [J]. *Acta Microbiologica Sinica* 2001; 2: 002.
- (7) Ammons DR., Reyna A., Granados JC., Samlal MS., Rampersad JN. An investigation of *Bacillus thuringiensis* in rectal-collected fecal samples of cows. *Current microbiology* 2009; 59 (5): 532- 36.
- (8) Moazami D. Composition for treatment against mosquito larvae and process for its preparation 2003; EP Patent 1, 306, 008.
- (9) Vázquez-Padróna RI., González-Cabrera J., Garcia- Tovar C., Neri-Bazanc L., López-Revillac R., Hernándezc M., et al. Cry1Ac Protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 Binds to Surface Proteins in the Mouse Small Intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 271 (1) 54- 8.
- (10) Du C., Nickerson KW. *Bacillus thuringiensis* HD-73 Spores Have Surface-Localized Cry1Ac Toxin: Physiological and Pathogenic Consequences. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62 (10): 3722- 6.
- (11) Höfte H., Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological reviews* 1989; 53 (2) 242- 55.
- (12) Ammounh H., Harba M., Idris E., Makke H. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. *Turkish journal of agriculture and forestry* 2011; 35: 421- 31.
- (13) Schuster B., Pum D., Sara M., Sleytr UB. S-layer proteins as key components of a versatile molecular construction kit for biomedical nanotechnology. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2006; 6 (8): 909- 20.
- (14) Parthiban V., Gromiha M M., Schomburg D. CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Research* 2006; 34 (suppl 2): W239- 242.
- (15) Pen~a G., Miranda-Rios J., de la Riva G., Pardo- López L., Sobero'n M., Bravo A. A *Bacillus thuringiensis* S- layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and environmental microbiology* 2006; 72 (1): 353- 60.
- (16) Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248- 54.
- (17) Pum D., Sára M., Sleytr UB. Structure. surface charge., and self-assembly of the S-layer lattice from *Bacillus coagulans* E38-66. *Journal of bacteriology* 1989; 171 (10): 5296- 303.
- (18) Habibi N., Zohrabi T. Isolation of S-Layer from *Caulobacter* and re-crystallization on planar supports. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4 (13): 57- 66.
- (19) Sharif FA., Alaeddinoğlu NG. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of industrial microbiology* 1988; 3 (4): 227- 29.
- (20) Boonserm P., Davis P., Ellar D J., & Li J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of molecular biology* 2005; 348 (2): 368- 82.

-
- 1- S- layer
 - 2- *Bacillus anthracis*
 - 3- *Bacillus coagulans*
 - 4- *Bacillus stearothermophilus*
 - 5- *Bacillus thuringiensis*
 - 6- Parasporal body
 - 7- Toxin
 - 8- Exosporium
 - 9- Inclusion body
 - 10- Cologne University Protein Stability Analysis Tool
 - 11- Brain heart infusion broth
 - 12- Centrifuge
 - 13- Bradford
 - 14- Bioinformatics
 - 15- Dialysis
 - 16- Domain
 - 17- Sharif
 - 18- Anophele
 - 19- Pen~a
 - 20- Luckevich

Study of the surface layer and parasporal body of *Bacillus thuringiensis Israelensis* (MH14) and prediction of Cry4Ba stabilization by point mutation method based on bioinformatics findings

Ghazal Babolmorad

M.Sc. of Microbiology, University of Isfahan, Iran, g.babolmorad@gmail.com

Giti Emtiazi*

Professor of Microbiology, University of Isfahan, Iran, emtiaz@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Bacillus thuringiensis* is the most important biological agent and by producing parasporal body it acts as a key role against agricultural pests. Furthermore, it produces Surface layer (S-layer) which is a protein or glycoprotein crystalline structure and has wide applications in nanobiotechnology. Accordingly it is significant to study more about this surface layer and toxin.

Materials and methods: In this study, purified parasporal body and mixed crystal/ spore were stained with coomassie blue G250 and were observed with light microscope. With a point mutation in CRY4Ba, protein stabilization was predicted and the location of protein cavities were predicted by Molegro software. Finally, the surface layer was extracted and its molecular weight and morphology were determined. To compare the surface layer and parasporal body, some features of them were estimated by the Protparam server.

Results: The results confirm the presence of polyhedral crystal proteins which were accumulated to form larger crystals after releasing spores. Also, it is predicted that in this research replacing the aspartic acid position- 451 with isoleucine, a more stable CRY4Ba pesticide protein is probably produced. This protein with three subunits contains 59 cavities and like the surface layer in this strain, it comprises low percent of methionine, histidine, cysteine and tryptophan.

Discussion and conclusion: In sporulation phase, *Bacillus thuringiensis* produces insecticidal crystals that integrate to form larger crystals. It is predicted that replacing the aspartic acid position- 451 with isoleucine would ameliorate the stability of CRY4Ba pesticide protein. This bacterium in vegetative phase produces a surface 100 KD protein which is similar to parasporal body in a shape and the percentage of some of amino acid.

Key words: S-layer, Parasporal body, CRY4Ba, *Bacillus thuringiensis Israelensis* (MH14)

* Corresponding author

Received: July 22, 2013 / **Accepted:** December 11, 2013