الملخص

جمعت 60 عينة حليب من أبقار مصابة بإلتهاب الضرع ألبقري السريري في محافظة البصرة. تم تحديد لأول مرة بالعراق عزلتين منها لبكتريا S. simulans أعطت واحده منها فعالية تثبيطية لبكتريا S. aureus ثم عزل جين اللايسوستافين الكلي و الفعال وحدد حجمه و تتابعه ثم تمت كلونته مع بلازميد pBluescript في بكتريا E. coli بطريقة الصعقة الكهربائية. تمت دراسة تأثير البكتريا المكلونه على بكتريا S. aureus حيث أظهرت مقدرتها على تثبيط النمو الجرثومي لهذه البكتريا، بعد ذلك تم تحضير جين لايسوستافين حاوي على مجموعة هستدين طرفيه لغرض العزل والتنقية فتم عزل بروتين اللايسوستافين باستخدام عمود الهس تاك، وقد ظهر كفاءة عاليه بالتنقية عند ترحيل البروتين على هلام الأكريل أمايد. تم تحديد تركيزه و تتابعه وحجمه الذي بلغ حوالي 000,27 دالتون. تم دراسة mRNA لجين اللايسوستافين وتحويله إلى cDNA ثم كلونة cDNA وتحديد تتابعه. كما ثم تم دراسة الحفاز المسيطر على عمل جين اللايسوستافين وتم تحديد فعاليته في إيقاف أو إطلاق بروتين اللايسوستافين وبالتالي إنتاج البروتين. وقد تم عزل تتابعات متكررة وبعدد 18 تتابع. ثم تم تحديد الجرعة نصف القاتلة للبروتين وتمت دراسة تأثير البروتين المعزول على بكتريا S. aureus في داخل وخارج النظام الحي.

Abstract

Sixty milk samples were recovered from cows suffering from clinical mastitis in Basra, two isolates are S. simulans and only one gave good antimicrobial activity against S. aureus on the basis of inhibition zone. All and active Lysostaphin gene was isolated, then determination the size and sequences of this gene. Cloning was done by using pBluescript plasmid to E. coli by electrical shock, the effect of cloning bacteria on S. aureus showed a significant antibacterial activity against S. aureus. A new lysostaphin gene was prepared with terminal Histidine group in order to isolate and purify lysostaphin protein by used special primers. His-tag column was chosen for isolation and purification of protein with short time. A high fidelity of this procedure appearance when running the protein in polyacrylamide gel, the molecular weight was about 27,000 Dalton. The mRNA of lysostaphin gene was studied and converted to cDNA which determined the sequences. The lysostaphin promoter was also studied and limited activity of the promoter to controlled the secretion of lysostaphin. Isolation of 18 repetitive sequences is consider shows the transposons in prolysostaphin gene site. The LD50 of lysostaphin was determined, then effect of lysostaphin against S. aureus in vivo and in vetro were studied.