مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ٤: از ۱-۱۲
زمستان ۱۳۸۹

بیان توالی بهینه شده ژن زیرواحد اصلی فاکتور کلونیزاسیون I اشریشیا کولی انتروتوکسیژنیک (ETEC)

زهرا احصایی[۱]، جعفر سلیمیان[۲*]، شهرام نظریان[۳]، میثم منصوری[۱]، جعفر امانی[٤]، راضیه خالصی[۱]، سیدمحمد مؤذنی[۵]

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
۵- استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۶/۱۶ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۹/۰۹

چکیده

هدف: اشریشیا کولی انتروتوکسیژنیک به‌عنوان مهم‌ترین عامل اسهال و مرگ و میر در کودکان در کشورهای در حال توسعه شناخته شده است. این باکتری سالانه موجب مرگ ۳۰۰ تا ۵۰۰ هزار کودک زیر ۵ سال می‌شود. به دلیل درمان مشکل و شیوع زیاد آن، طراحی یک واکسن مؤثر علیه این ارگانیسم از اهداف سازمان بهداشت جهانی است. پروتئین CfaB به‌عنوان زیرواحد اصلی فیمبریه، نقش مهمی در اتصال باکتری به سلول‌های پوششی روده دارد و آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه این پروتئین می‌تواند از اتصال باکتری به سطح بافت پوششی جلوگیری کند. از این رو این مولکول به تنهایی یا با سایر عوامل حدت‌زا در طراحی واکسن علیه این ارگانیسم مورد توجه بسیاری از محققین است. در این مطالعه، بیان فاکتور کلونیزاسیون B با هدف مطالعه ایمونوژنیسیته این پروتئین به‌عنوان جزئی از کاندیدای واکسن انجام شد.

مواد و روش‌ها: ژن *cfa*B با روش PCR، تکثیر و در ناقل pET28a همسانه‌سازی و بیان آن بررسی شد. با توجه به عدم بیان این ژن به‌علت وجود کدون‌های نادر، ژن *cfa*B با استفاده از کدون‌های متداول در اشریشیا کولی بهینه‌سازی و مجدداً در ناقل pET28a همسانه‌سازی و بیان شد.

نتایج: حضور باند ۲۰ کیلودالتونی در ژل SDS-PAGE، بیان پروتئین CfaB را نشان می‌داد که با روش ایمنو بلات با آنتی‌بادی anti-His tag و آنتی‌بادی ضد CfaB، تأیید و با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل تخلیص شد.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی کدون و بیان در میزبان‌های هترولوگ یک روش مفید در تولید پروتئین‌های نوترکیب به مقدار زیاد است.

کلیدواژگان: اشریشیا کولی انتروتوکسیژنیک، فاکتور کلونیزاسیون نوع I، بیان

۱- مقدمه

بیماری‌های التهابی مخصوصاً در کشورهای در حال توسعه، علت مرگ و میر حدود ٦۰ درصد کودکان زیر ٤ سال است [۱]. اسهال التهابی حاد، دومین عامل رایج مرگ در کودکان در کشورهای در حال توسعه است. اشریشیا کولی انتروتوکسیژنیک

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه امام حسین (ع)، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی، کدپستی: ۱٦۹۸۷۱۵۸٦۱
Email: jafarsalimyan@yahoo.com

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

(Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) رایج‌ترین عامل اسهال التهابی در این کشورهاست و منجر به حدود ۲۰ درصد همه موارد اسهالی کودکان این مناطق و حدود ۷۰ درصد اسهال مسافران می‌شود [۲]. این باکتری همچنین در مواقع بلایای طبیعی همانند سیل و زلزله شیوع پیدا می‌کند و سلامت افراد را به خطر می‌اندازد [۳]. شواهدی دال بر وجود پیدایش ایمنی اکتسابی علیه ETEC بعد از عفونت طبیعی وجود دارد؛ بنابراین امکان طراحی یک واکسن مؤثر علیه این ارگانیسم امکان‌پذیر است. توسعه واکسن مؤثر علیه ETEC به‌منظور کنترل بیماری یکی از اولویت‌های تحقیقاتی سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) است [٤].

عوامل حدت‌زای اختصاصی مانند انتروتوکسین‌ها (Enterotoxins) و فاکتورهای کلونیزاسیون (Colonization Factors: CF)، ETEC را از سایر سویه‌های اشریشیاکولی مولد اسهال متمایز می‌کند. باکتری ETEC بعد از اتصال و کلونیزه شدن در بافت پوششی (Epithelium) روده کوچک، با ترشح انتروتوکسین مقاوم یا حساس به حرارت باعث ترشح مایعات و الکترولیت‌ها از این سلول‌ها و اسهال می‌شود [۵]. اصطلاح CF و آنتی‌ژن فاکتور کلونیزاسیون (CF Antigen: CFA) برای سویه‌های مختلف ETEC کاربرد دارد و به مولکول‌های چسبنده‌ای اشاره می‌کند که موجب کلونیزاسیون ارگانیسم در روده میزبان می‌شود [٦]. بیش از ۲۵ نوع CF در سویه‌های ETEC انسانی شناسایی شده است. در میان این عوامل کلونیزاسیون، CFA/I اولین و رایج‌ترین CF شناسایی شده است. سویه‌های بیان کننده CFA/I در مناطق اندمیک آمریکای جنوبی و آسیا، گسترده هستند [۷]. ژن این فیمبریه (Fimberia) و توکسین مقاوم به حرارت روی پلاسمید NTP113 قرار گرفته است [۸، ۹]. بیان ٤ ژن *cfa*ABCE در اپرون CFA/I برای مونتاژ فیمبریه ضروری است. این فیمبریه از بیش از هزار کپی از زیرواحد اصلی پیلین (Pilin) (CfaB) و یک یا چند کپی از زیرواحد فرعی چسبنده (CfaE) تشکیل شده است [۱۰]. مطالعات اخیر به‌طور واضح نشان داده است که زیرواحد CfaB به‌عنوان زیرواحد اصلی CFA/I نقش مهمی در اتصال باکتری به سلول‌های پوششی روده دارد. این زیرواحد به‌عنوان شاخص آنتی‌ژنی فیمبریه محسوب می‌شود. زیرواحد CfaB پروتئین اتصالی است که به‌طور اختصاصی به شماری از توالی‌های کربوهیدراتی موجود در گلیکولیپیدها و گلیکوپروتئین‌های روده کوچک انسان متصل می‌شود. سیالوگلیکوپروتئین‌ها (Sialoglycoproteins) و گانگلیوزید GM2 (Ganglioside GM2) پذیرنده اتصالی به این پروتئین‌ها معرفی شده‌اند [۱۱]. به دلیل این‌که اتصال ETEC به سلول‌های روده‌ای برای ایجاد بیماری ضروری است؛ جلوگیری از اتصال باکتری می‌تواند بیماری اسهال ناشی از ETEC را کنترل نماید. آنتی‌بادی علیه CF می‌تواند مانع از چسبیدن اولیه این باکتری به میزبان شود. واکسن‌های حاوی CF در حیوانات آزمایشگاهی مؤثر بوده و در کارآزمایی بالینی در حال ارزیابی است. آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه CfaB از اتصال CFA/I به پذیرنده گانگلیوزیدی مشابه موجود روی اریتروسیت‌ها ممانعت می‌کند [۱۲]. همچنین نشان داده شده است که آنتی‌بادی مونوکلونال (Monoclonal) علیه این پروتئین از اتصال سلول‌های بیان کننده CFA/I به سلول‌های روده انسان جلوگیری می‌نماید [۱۳].

اطلاعات به‌دست آمده نشان می‌دهد که مولکول CfaB کاندیدای مناسب برای طراحی واکسن علیه ETEC است. پتانسیل استفاده از فاکتورهای چسبنده فیمبریه‌ای به‌عنوان واکسن، توجه بیشتری را به مطالعه این پروتئین‌ها جلب کرده است [۱۲]. در این تحقیق همسانه‌سازی و بیان ژن *cfa*B در ناقل بیانی pET28a، به‌منظور تولید پروتئین نوترکیب بررسی می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تخلیص ژنوم و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

باکتری ETEC از آزمایشگاه رفرانس، بیمارستان بوعلی تهیه و سپس ژنوم این باکتری با روش CTAB-NaCl (Cetyltrimethyl ammonium bromide) تخلیص شد [۱۳].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

توالی ژن *cfa*B از بانک ژن (شماره دسترسی: M55661) استخراج و براساس آن، آغازگر پیشرو و برگشت طراحی شد. آغازگر پیشرو دارای جایگاه برش آنزیم *Hind*III و ترادف 5'-TGTGCAGTGAGTGCTAAGCTTGTAGAG-3' و آغازگر برگشت واجد جایگاه برش آنزیم *Xho*I و ترادف 5'-AATACTCGAGTCAGGATCCCAAAGTC-3' بود. آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت Bioneer سنتز شد.

۲-۲- همسانه‌سازی ژن *cfa*B در ناقل pTZ57R/T

برای این منظور، ابتدا واکنش PCR با آنزیم پلیمراز با خاصیت غلط‌گیری بالا (High Fidelity) (شرکت Fermentas) در شرایط غلظت ٤ میلی‌مولار کلرید منیزیم و ۰/٤ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP و ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج شده ETEC در دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی شد. مراحل PCR شامل یک مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت۱۰ دقیقه بود. در نهایت برای تأیید محصول PCR، هضم آنزیمی *Eco*RI انجام شد.

محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (Bioneer) خالص‌سازی و واکنش الحاق با آنزیم T4 لیگاز برای محصول PCR و ناقل pTZ57R/T به‌مدت ۸ ساعت در دمای ۱٦ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از انجام همسانه‌سازی، پلاسمید نوترکیب حاصل با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد اشریشیا کولی سویه DH5α انتقال داده شد و باکتری‌ها روی پلیت لوریا برتونی (Luria Bertani: LB) آگار حاوی ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) و برومو- کلرو ایندول گالاکتوپیرانوزید (X-Gal) و آمپی‌سیلین (Ampicillin) (غلظت ۸۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) کشت داده شدند [١٤].

برای تأیید همسانه‌سازی ژن *cfa*B، از کلونی‌های سفید رنگ، کشت داده و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، کلونی- PCR انجام شد. سپس از کلونی‌های مثبت، پلاسمیدهای نوترکیب تخلیص و واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Xho*I و *Hind*III به‌مدت ٦ ساعت انجام شد. تمامی این مراحل با استفاده از روش‌های استاندارد انجام شد [١٤].

۲-۳- زیرهمسانه‌سازی ژن *cfa*B در ناقل بیانی pET28a

برای زیرهمسانه‌سازی، ابتدا واکنش هضم آنزیمی روی پلاسمید نوترکیب (pTZ57R/T-cfaB) و همچنین پلاسمید بیانی pET28a، با آنزیم‌های محدودالاثر *Xho*I و *Hind*III به‌مدت ٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه انجام گرفت. محصول PCR و ناقل pET28a برش خورده با کمک کیت تخلیص محصول PCR (Bioneer) تخلیص شد. واکنش الحاق در دمای ١٦ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۸ ساعت انجام و با روش شوک حرارتی به میزبان اشریشیا کولی سویه BL21DE3pLysS انتقال یافت. دو نوع واکنش هضم آنزیمی برای برش پلاسمیدهای نوترکیب طراحی شد. یکی از واکنش‌ها با آنزیم‌هایی انجام شد که محل برش آن‌ها در آغازگرها قرار داده شده بود. واکنش هضم آنزیمی دیگری با آنزیم *Eco*RI صورت گرفت که دارای یک جایگاه برش بر روی ناقل pET28a و یک جایگاه برش بر روی قطعه ژنی *cfa*B است. در نهایت برای اطمینان از صحت ترادف ژن، پلاسمید pET28a-*cfa*B تخلیص و برای تعیین ترادف به شرکت Shine Gene (China) ارسال شد.

۲-٤- بررسی بیان سازه ژنی pET28a-*cfa*B

برای بررسی بیان ژن هدف، بهینه‌سازی بیان برای ۳ کمیت،

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

غلظت IPTG، زمان و دمای القای بیان صورت گرفت. ابتدا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳ ساعت، غلظت‌های مختلف IPTG (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار) بررسی شد. سپس در غلظت یک میلی‌مولار IPTG و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، زمان القا (۲، ۳، ۵، ۷، ۱۲، ۱۸ ساعت) بررسی شد. بررسی بیان پروتئین نوترکیب در غلظت یک میلی‌مولار IPTG در دماهای (۲۵، ۳۰، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) صورت گرفت. همچنین با توجه به گزارش بیان ژن نوترکیب CF در محیط کشت CF حاوی کازوامینواسید ۱ درصد، عصاره مخمر ۰/۱۵ درصد، $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۰۵ درصد)، $MnCl_2.4H_2O$ (۰/۰۰۵ درصد) و محیط کشت سوپر براث (Super Broth Medium) (حاوی عصاره مخمر ۲ درصد، کلرید سدیم ۰/۵ درصد، تریپتون ۳/۲ درصد) [۱۵] نیز برای بیان پلاسمید pET28a-*cfa*B استفاده شد.

همچنین به‌منظور بیان، پلاسمید pET28a-*cfa*B به میزبان اشریشیا کولی سویه روزتا (Rosetta) انتقال یافت. این سویه دارای پلاسمید کد کننده tRNA کدون‌های نادر است. پس از رشد این باکتری روی محیط انتخابی، شرایط بیان پروتئین برای این میزبان با استفاده از القا کننده IPTG، فراهم شد. پس از جمع‌آوری سلول‌ها، سونیکاسیون (قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۷۵) انجام شد.

۲-۵- بهینه‌سازی کدون‌های ژن *cfa*B

با مشاهده عدم بیان ژن *cfa*B در شرایط مختلف بیانی، توالی ژن *cfa*B از لحاظ وجود کدون‌های نادر و درصد AT و GC توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی تجزیه و تحلیل شد. با کمک الگوریتم اپتیمم ژن (OptimumGene™) محتوای GC و پایداری mRNA بررسی شد. به‌منظور بیان بهینه پروتئین CfaB، ساختار این ژن با استفاده از بیشترین کدون‌های استفاده شده در میزبان اشریشیاکولی بهینه‌سازی شد. این ساختار پس از تأیید توسط شرکت Shine Gene (China) سنتز و توالی ژن *cfa*B بهینه‌سازی شده در بانک ژن ثبت شد.

۲-۶- بررسی بیان ژن بهینه‌سازی

ناقل نوترکیب pET28a-*cfa*B به میزبان بیانی BL21DE3pLysS انتقال یافت. برای القای بیان پروتئین نوترکیب، پس از رشد باکتری در محیط LB مایع، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به‌مدت ۳ ساعت اضافه شد.

۲-۷- بررسی محلول بودن پروتئین بیانی یا تجمع پروتئین به شکل اجسام تجمعی (Inclusion Bodies)

با توجه به بیان بالای ژن بهینه‌سازی شده، آزمایشی برای بررسی محلول بودن پروتئین نوترکیب بیانی درسلول باکتری انجام شد. ابتدا رسوب سلولی حاصل از بیان در بافر A (حاوی ایمیدازول (Imidazole) ۱۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار، سدیم دی‌هیدروژن فسفات ۵۰ میلی‌مولار) همگن و پس از سونیکاسیون (قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۷۵) و شکسته شدن سلول‌ها، نمونه‌ها سانتریفوژ و محلول رویی جمع‌آوری شد (نمونه ۱). بافر B (بافر حاوی اوره ۸ مولار، تریس-HCl ۱۰ میلی‌مولار، سدیم دی‌هیدروژن فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار) به رسوب حاصل از مرحله قبل اضافه و پس از ٤٥ دقیقه نگهداری در دمای اتاق سانتریفوژ شد (نمونه ۲). در ادامه رسوب حاصل از مرحله قبل به‌مدت ٤٥ دقیقه با بافر B مجاور و محلول رویی مانند مراحل بالا جداسازی شد (نمونه ۳). هر ۳ نمونه روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد [١٦].

۲-۸- تخلیص پروتئین از ستون نیکل- نیتریلوتری استیک اسید

ابتدا بیان ژن در مقیاس بالاتر (۱۰۰ میلی‌لیتر) صورت گرفت. به ازای رسوب سلولی حاصل از هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، ۵ میلی‌لیتر بافر B اضافه و یکنواخت شد. به رسوب حاصل از ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت دیگر از بیان

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

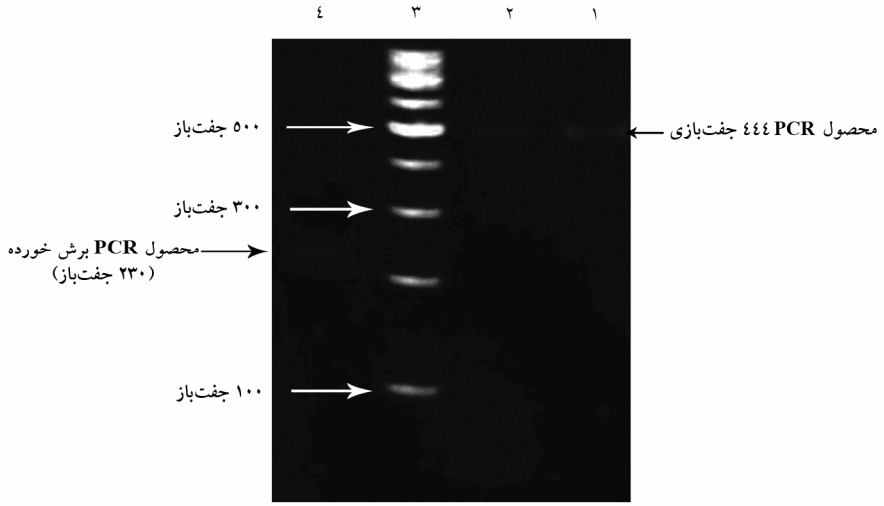
پروتئین نوترکیب ۵ میلی‌لیتر بافر A (حاوی ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار، سدیم دی‌هیدروژن فسفات ۵۰ میلی‌مولار) اضافه و نمونه‌ها به فواصل ۲۰ دقیقه و به‌مدت یک ساعت سونیکیت شد. تخلیص پروتئین با ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA و روش غیر واسرشت انجام گرفت. نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG و همچنین نمونه‌های تخلیص شده پس از تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد (Bradford)، روی ژل ۱۲درصد الکتروفورز شد [۱۶].

۲-۹- تأیید پروتئین نوترکیب

برای تأیید پروتئین نوترکیب بیان شده از روش ایمونوبلات (Immunoblot) با آنتی‌بادی پلی‌کلونال (Polyclonal) Anti-His Tag و آنتی‌بادی Anti-CfaB استفاده شد. پس از تفکیک باندهای پروتئینی با الکتروفورز SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)، این باندها با کمک سیستم وسترن بلاتینگ (Western Blotting) (Biorad, USA) و بافر انتقال (گلایسین ۳۹ میلی‌مولار، تریس ۴۸ میلی‌مولار، SDS ۰/۳۷ درصد و متانول ۲۰ درصد) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (Phosphate Buffer Saline Tween-20) (بافر PBS با ۵ درصد توئین-۲۰) حاوی ۵ درصد شیر خشک در دمای اتاق به‌مدت ۲ ساعت پوشانده شد. غشا در بین هر مرحله، با بافر PBST سه بار شستشو شد. ابتدا غشا با آنتی‌بادی Anti-His Tag با رقت ۱:۸۰۰۰ یا آنتی‌بادی Anti-CfaB با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. پس از آن، آنتی‌بادی کانژوگه با پراکسیداز از رقت ۱:۴۰۰۰ استفاده شد. در نهایت، برای آشکارسازی از ۱۰ میلی‌لیتر بافر آشکارساز (تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی ٦ میلی‌گرم دی‌آمینو بنزئیدین و ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه) استفاده شد. واکنش با آب مقطر متوقف شد [۱٦].

۳- نتایج

ژن کد کننده زیرواحد اصلی آنتی‌ژن CF (CfaB) بدون ترادف کد کننده علامت پپتید (Peptide Signal) با استفاده از آغازگرهای پیشرو و برگشت تکثیر شد. محصول PCR روی ژل با اندازه ٤٤٤ نوکلئوتید مشاهده شد. پس از هضم آنزیمی محصول با آنزیم *Eco*RI، قطعات ۲۱٦ و ۲۲۸ نوکلئوتید حاصل شد که به دلیل نزدیکی اندازه آن‌ها به یکدیگر روی ژل به‌صورت تک باند دیده می‌شود (شکل ۱).

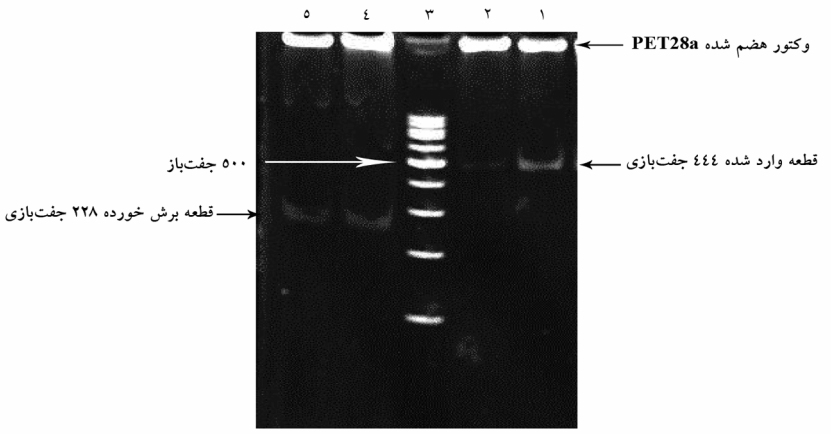


شکل ۱ تأیید محصول PCR ژن *cfa*B باکتری ETEC با استفاده از هضم آنزیمی (*Eco*RI)؛ **ستون ۱ و ۲)** محصول PCR (٤٤٤ جفت‌باز)، **ستون ۳)** نردبان DNA ۱۰۰ جفت‌بازی، **ستون ٤)** قطعه حاصل از هضم آنزیمی محصول (۲۳۰ جفت‌باز)

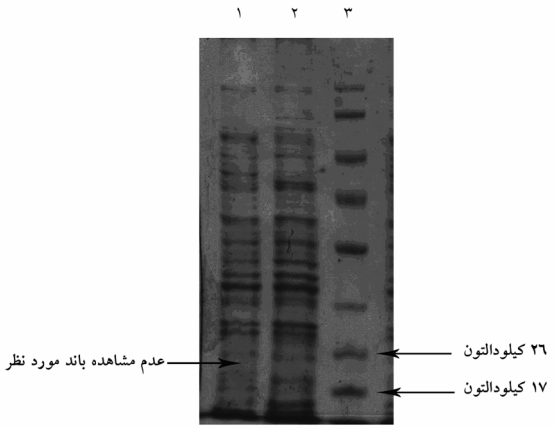
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

ژن مورد نظر در ناقل PTZ57R/T همسانه‌سازی شد و به میزبان اشریشیا کولی DH5α انتقال یافت. برای تأیید همسانه‌سازی ژن *cfa*B، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، کلونی- PCR انجام شد. برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T حاصل از الحاق، روی ژل الکتروفورز برده شد و وجود قطعه ٤٤٤ نوکلئوتید تأیید شد (شکل ارایه نشده است و همانند شکل ۲ است).

پس از آن ژن *cfa*B با آنزیم‌های *Hind*III و *Xho*I برش و در ناقل بیانی pET28a زیرهمسانه‌سازی شد و به میزبان اشریشیا کولی سویه BL21DE3plysS انتقال داده شد. دو نوع واکنش هضم آنزیمی برای برش پلاسمید حاصل طراحی شد. یکی از واکنش‌ها با آنزیم‌های *Xho*I و *Hind*III انجام و ژن هدف با اندازه ٤٤٤ نوکلئوتید مشاهده شد. واکنش هضم آنزیمی دیگری با آنزیم *Eco*RI که دارای یک جایگاه برش روی ناقل pET28a و یک جایگاه برش روی قطعه ژنی *cfa*B است، انجام و قطعه‌ای با طول حدود ۲۳۰ نوکلئوتید روی ژل مشاهده شد (شکل ۲). همچنین صحت ورود محصول نوترکیب در ناقل و عدم تغییرات نوکلئوتید در آن با تعیین توالی DNA تأیید شد.



شکل ۲ تجزیه و تحلیل ناقل PET28a حاوی قطعه مورد نظر با استفاده از هضم آنزیمی؛ **ستون ۱ و ۲)** ژن هدف (٤٤٤ جفت‌باز) و ناقل هضم شده PET28a با آنزیم‌های *Hind*III و *Xho*I، **ستون ۳)** نردبان DNA ۱۰۰ جفت‌بازی، **ستون ٤ و ۵)** قطعه ۲۲۸ جفت‌بازی و ناقل هضم شده حاصل از برش با آنزیم *Eco*RI

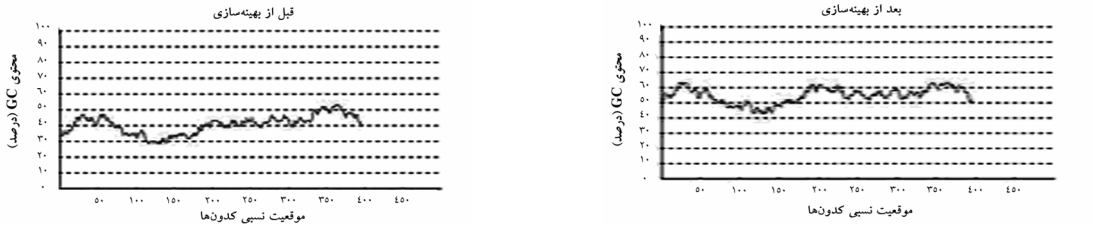


شکل ۳ بررسی بیان پروتئین طبیعی نوترکیب؛ **ستون ۱)** نمونه‌های بعد از القا، **ستون ۲)** نمونه قبل از القا (کنترل)، **ستون ۳)** نشانگر اندازه پروتئین

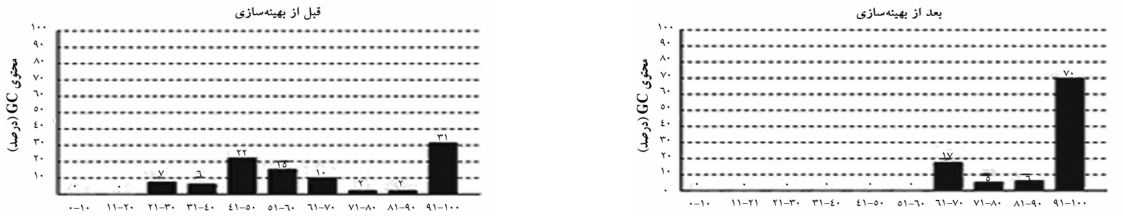
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

به‌منظور بیان پروتئین نوترکیب، القای بیان پروتئین در دما و مدت زمان‌های مختلف و تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت IPTG بررسی شد. همچنین بیان ژن مورد نظر در محیط کشت پیشنهاد شده برای بیان این ژن نظیر سوپر براث و محیط CF صورت گرفت و از باکتری روزتا به‌منظور افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده شد. نتایج الکتروفورز SDS-PAGE بیانگر عدم بیان پروتئین نوترکیب بود (شکل ۳).

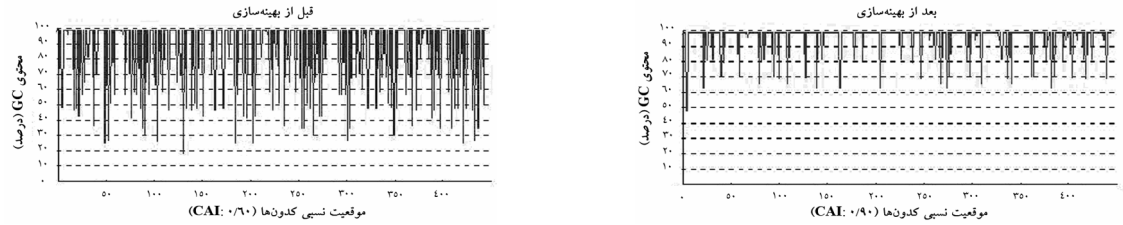
توالی ژن cfaB از لحاظ وجود کدون‌های نادر و درصد AT و GC توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی تجزیه و تحلیل شد. با بررسی توالی این ژن، این نتیجه حاصل شد که کدون‌های نادر پشت سر هم در توالی این ژن وجود دارد که با تعویض بعضی از کدون‌ها و حفظ توالی اسید آمینه می‌توان به تولید این پروتئین نوترکیب دست یافت. برای بهبود بیان پروتئین نوترکیب براساس کدون‌های رایج در اشریشیا کولی ترادف این ژن و درصد GC تغییر داده شد. نمودار ۱ و ۲، نتیجه حاصل از تغییر درصد GC و تغییر کدون‌ها را قبل و بعد از بهینه‌سازی نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودارهای ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، میزان GC از ۵۴/۴۰ درصد به ۷۷/۵۴ درصد افزایش داشت و درصد کدون‌های متداول (با فراوانی بیش از ۶۰ درصد) در توالی جدید افزایش یافت. همچنین میزان سازگاری کدون‌ها در میزبان اشریشیا کولی بررسی شد و پس از بهینه‌سازی، شاخص سازگاری کدون از ۰/۶ به ۰/۹ افزایش نشان داد (نمودار ۳). توالی پروتئین حاصل، با پروتئین طبیعی همخوانی داشت. در نهایت این ژن سنتتیک با شماره دسترسی GU355642 در بانک ژن به ثبت رسید.



نمودار ۱ متوسط درصد GC در طول توالی؛ متوسط درصد GC قبل از بهینه‌سازی برابر با ۴۰/۵۴، متوسط درصد GC بعد از بهینه‌سازی برابر با ۵۰/۷۷



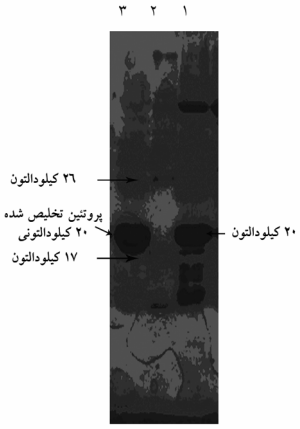
نمودار ۲ درصد توزیع کدون‌ها در طول توالی؛ برای کدون‌هایی که بالاترین فراوانی را دارند ارزش ۱۰۰ در نظر گرفته می‌شود. بعد از بهینه‌سازی ۷۰ درصد کدون‌ها را کدون‌های با فراوانی ۱۰۰ تشکیل می‌دهد.



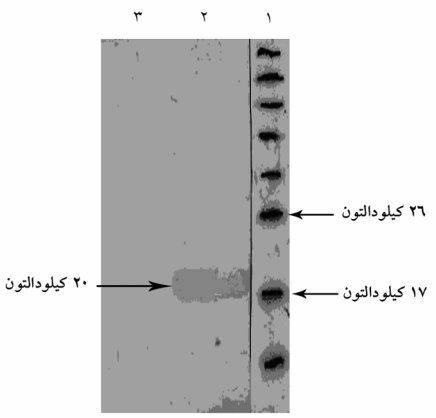
نمودار ۳ شاخص سازگاری کدون (Codon Adaptation Index: CAI)؛ نشان دهنده میزان سازگاری کدون‌های ژن خارجی با کدون‌های میزبان. مقدار این شاخص بیش از ۰/۹ در توالی نشان دهنده سطح بالای بیان ژن، CAI مربوط به ژن *cfa*B قبل از بهینه‌سازی ۰/۶، CAI بعد از بهینه‌سازی ۰/۹

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

پس از سنتز ژن و همسانه‌سازی آن در ناقل pET28a، تحت القای IPTG در مدت زمان ۳ ساعت و دمای ۳۷ درجه، بیان پروتئین نوترکیب بررسی شد. نمونه‌ها بعداز القا در ناحیه ۲۰ کیلودالتون دارای باندی قوی بودند. در حالی که نمونه قبل از القا دارای این باند نیستند (شکل ٤، ستون ۱). با استفاده از بافرهای لیز کننده فاقد اوره و واسرشت کننده حاوی اوره، جایگاه پروتئین نوترکیب و محلول بودن یا تجمع آن در اجسام تجمعی بررسی شد. پروتئین در نمونه حاصل از بافر A (حاوی ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار) و هم بافر B (حاوی اوره ۸ مولار) مشاهده شد. وجود پروتئین در بافر A نشان از محلول بودن پروتئین است و وجود آن در بافر B نشان دهنده بیان بالای پروتئین و تشکیل اجسام تجمعی است. پس از انجام کروماتوگرافی با ستون Ni-NTA، نمونه‌های خروجی ستون جمع‌آوری شد. پروتئین نوترکیب با درجه خلوص بالایی (بالاتر از ۹۰ درصد) در بافر E مشاهده شد (شکل ٤، ستون ۳). محصول پروتئین نوترکیب با کمک روش ایمونوبلات با آنتی‌بادی Anti-His Tag و Anti CfaB شناسایی شد که نتیجه حاصل از ایمونوبلات با Anti CfaB در شکل ۵ به نمایش در آمده است.



شکل ٤ الکتروفورز PAGE نمونه بیان شده بعد از القای IPTG و تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل (Ni-NTA) تحت شرایط طبیعی؛ **ردیف ۱)** نمونه بیان شده ژن *cfa*B بهینه‌سازی شده، پروتئین با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون، **ردیف ۲)** نشانگر پروتئینی SM0671، **ردیف ۳)** پروتئین تخلیص شده CfaB با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون



شکل ۵ تأیید پروتئین نوترکیب CfaB از طریق ایمونوبلات با anti CfaB؛ **ردیف ۱)** نشانگر پروتئینی SM0671، **ردیف ۲)** نمونه پروتئین نوترکیب بیان شده، **ردیف ۳)** نمونه القا نشده (کنترل منفی)

٤- بحث

باکتری ETEC یکی از مشکلات سلامت در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود [۱۳]. اولین و مهم‌ترین مرحله در ایجاد عفونت توسط ETEC، کلونیزه شدن آن‌ها در روده کوچک میزبان به کمک CF است. اکثریت سویه‌های ETEC بیماری‌زا و به‌طور خاص سویه‌های مولد توکسین حساس و مقاوم به حرارت، واجد این CF هستند. برای کنترل و جلوگیری از بیماری اسهال ناشی از ETEC، ممانعت از اتصال باکتری به سلول‌های پوششی ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین در طراحی واکسن علیه ETEC بایستی آنتی‌ژن‌های CF مورد توجه قرار گیرد؛ زیرا علاوه بر ممانعت از اتصال باکتری به سلول هدف، به لحاظ این‌که این ترکیبات روی اکثر سویه‌های بیماری‌زا قرار دارد می‌تواند حفاظت وسیع‌الطیف علیه سوش‌های مختلف باکتری ایجاد کند [۲]. مولکول CfaB به‌عنوان زیرواحد اصلی CF نوع I، یکی از ساختارهای سطحی است که در تعامل فیمبریه باکتری با پذیرنده روی سلول هدف نقش بسیار مهمی دارد و به‌طور اختصاصی به این پذیرنده‌ها متصل می‌شود: از این رو کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن است. مطالعات گذشته‌نگر نشان می‌دهد CF نوع I و CfaB

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

به‌عنوان زیرواحد اصلی آن مورد توجه تحقیقات مختلف در زمینه تهیه واکسن علیه ETEC بوده است [۱۱]. در این مطالعه با مورد توجه قرار دادن استراتژی تولید یکی از کاندیداهای واکسن، روند انجام کار با دو رویکرد اساسی صورت پذیرفت: همسانه‌سازی و بررسی بیان ژن زیرواحد اصلی آنتی‌ژن CF (CfaB) و رویکرد دوم تهیه ژن CfaB از راه سنتز به‌منظور تغییر کدون‌های این ژن با کدون‌های متداول در میزبان اشریشیا کولی.

در اولین رویکرد به‌منظور همسانه‌سازی ژن طبیعی cfaB، برای تکثیر قطعه ژنی از آنزیم پلیمراز با خاصیت غلط‌گیری بالا (مخلوطی از دو آنزیم Taq پلیمراز و یک آنزیم با خاصیت غلط‌گیری) (Fermentas) استفاده شد. لازم به ذکر است که این آنزیم دارای صحت بالا (٤ برابر آنزیم Taq به تنهایی) و کارایی زیاد است و همچنین قطعه تکثیر شده دارای دنباله A خواهد بود که همسانه‌سازی مستقیم آن را در ناقل pTZ57R/T امکان‌پذیر می‌کند. در تحقیق حاضر پس از طی مراحل زیرهمسانه‌سازی در ناقل بیانی (pET28a)، این نتیجه به‌دست آمد که بیان پروتئین نوترکیب CfaB با وارد کردن توالی طبیعی این ژن در سیستم بیانی (pET28a) امکان‌پذیر نیست. دما و ترکیب محیط کشت عوامل مهمی در بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب هستند. از این‌رو در این مطالعه به‌منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب CfaB در ناقل بیانی pET28a، بیان توالی طبیعی این ژن در سه محیط کشت (سوپر براث، LB و محیط CF) و دماهای مختلف و میزبان‌های مختلف (Bl21DE3pLysS روزتا) بررسی شد. در مطالعه لی (Li) و همکاران در سال ۲۰۰۸ به‌منظور بیان پروتئین نوترکیب CfaB از محیط سوپر براث استفاده شد و به‌نظر می‌رسد با توجه به این‌که این محیط کشت نسبت به محیط LB، تریپتون و عصاره مخمری بیشتری دارد، برای تولید مطلوب پروتئین‌های نوترکیب کاربرد دارد [۱۷]. فیور (Favre) و همکاران (سال ۲۰۰٦) پروتئین نوترکیب CF را در محیط کشت CF تولید کردند [۱۵]. این احتمال وجود دارد که این امر به دلیل وجود املاح در ترکیب این محیط کشت باشد که به‌صورت تنظیم کننده‌هایی برای رونویسی از ژن مزبور عمل می‌کند و باعث بیان پروتئین نوترکیب به‌صورت مطلوب شده است. هر چند در مطالعه حاضر با وجود به‌کارگیری این محیط‌های کشت باز هم بیان مطلوبی به‌دست نیامد.

ابتدا به‌منظور بیان پروتئین نوترکیب CfaB از سلول میزبان اشریشیاکولی سویه BL21DE3pLysS، استفاده شد. این میزبان به دلیل عدم وجود پروتئازهای سلولی و کاهش فعالیت پروتئازی روی محصول برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مناسب است، اما در این میزبان نتیجه مطلوب حاصل نشد. به دلیل این‌که میزبان روزتا (واجد پلاسمید کد کننده tRNA مربوط به کدون‌های کمیاب) بیان پروتئین‌های دارای کدون‌های کمیاب را افزایش می‌دهد [۱۸] و از طرفی توالی طبیعی ژن *cfa*B دارای کدون‌های کمیاب به‌صورت پشت سر هم است، این احتمال وجود داشت که با انتقال ناقل نوترکیب به این سویه، پروتئین مورد نظر بیان شود. ولی با وجود تغییرات صورت گرفته در شرایط بیان در این مطالعه، بیان این پروتئین روی ژل مشاهده نشد.

مطلب دیگری که مد نظر قرار گرفت نوع ناقل و پیشبرنده (Promoter) آن برای بیان این ژن در مطالعه حاضر بود. در سال ۲۰۰٤، مولکول CfaB (اسیدهای آمینه ۲٤–۱۷۰) در ناقل pMAL-p2، تحت کنترل پیشبرنده tac همسانه‌سازی شد. این پروتئین به‌صورت الحاق با MBP (Maltose Binding Protein) در میزبان BL21 تولید شد. با توجه به این‌که یکی از راه‌کارهای افزایش بیان پروتئین‌ها، الحاق ژن‌های آن‌ها با ژن‌های با بیان بالا و تولید پروتئین‌های الحاقی است، به‌نظر می‌رسد الحاق شدن CfaB با MBP باعث بیان این پروتئین شده است [۱۹، ۲۰]. همچنین ژن *cfa*B در سال ۲۰۰۸، همراه با اتصال دهنده (Asp-Asn-Lys-Glu) به‌صورت الحاق با ژن *cfa*E در pET24a همسانه‌سازی شد و پس از تولید پروتئین به‌منظور بررسی ساختار، کریستالوگرافی شد [۱۷]. لازم به ذکر است بیان این ژن در ناقل pET24a گزارش شده است. این ناقل از نظر پیشبرنده و ساختار بسیار شبیه pET28a است با

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

این تفاوت که فاصله میان ناحیه همسانه‌سازی ژن تا پیشبرنده در pET24a بسیار کم است که به علت عدم وجود توالی جایگاه اتصال به ریبوزوم (Ribosome Binding Site) و توالی His Tag است [۱۸]. این تفاوت‌ها این ناقل را برای رونویسی مناسب می‌سازد، بدین مفهوم که برای بیان ژن در این ناقل، بایستی عناصر تنظیمی در توالی آن اضافه شود. بنابراین با توجه به عدم موفقیت در مطالعه حاضر در بیان این ژن در pET28a، به‌نظر می‌رسد با توجه به خصوصیات ژن و ناقل pET24a، از عناصر تنظیمی دیگر و شاید بهینه‌سازی کدون‌های نادر استفاده شده باشد که در این بررسی به آن‌ها اشاره نشده است.

از آن‌جا که کدون‌های کد کننده اسیدهای آمینه ژن *cfa*B غنی از بازهای آدنین و تیمین و کدون‌های نادر است، به‌نظر می‌رسد استراتژی اول یعنی بیان این ژن در pET28a امکان‌پذیر نیست. یکی از این روش‌ها برای حل این مشکل، تغییر کدون‌های کمیاب با کدون‌های متداول در اشریشیا کولی است [۲۱]. از این‌رو دومین رویکرد تحقیق حاضر، بهینه‌سازی کدون‌ها و سنتز توالی بهینه شده *cfa*B به‌منظور افزایش تولید پروتئین نوترکیب بود. در این تحقیق، توالی این ژن با کمک الگوریتم اپتیمم ژن براساس کدون‌های متداول در اشریشیا کولی، بهینه‌سازی شد. همان‌طور که در بخش نتایج ذکر شد، این تغییرات باعث افزایش محتوای GC این ژن و نیمه‌عمر mRNA شد. تاکنون در مطالعات انجام گرفته روی ژن *cfa*B، تغییر در کدون‌های توالی کد کننده به‌منظور بیان بهینه پروتئین نوترکیب گزارش نشده است. پس از سنتز توالی بهینه‌سازی شده و همسانه‌سازی آن در ناقل بیانی (pET28a)، تولید پروتئین نوترکیب CfaB آزمایش و این نتیجه حاصل شد که تغییرات ایجاد شده باعث بیان این ژن در سطح بالایی می‌شود. در این تحقیق به‌منظور بیان ژن مورد نظر از سیستم بیانی pET28a استفاده شد. تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر بیان این ژن در ناقل pET28a وجود ندارد. ناقل بیانی pET با داشتن پیشبرنده قوی T7 قادر به بیان توالی‌های ژنی بعد از خود است و این ناقل بعد از بیان پروتئین نوترکیب به انتهای آمین آن پروتئین نشانگر 6HisTag و یک پروتئین تقریباً ٤ کیلودالتونی اضافه می‌کند. نشانگر 6HisTag برای تخلیص پروتئین نوترکیب بیان شده با انجام روش کروماتوگرافی میل ترکیبی کاربرد دارد. محصول نوترکیب با این نشانگر تمایلی، به‌خوبی خالص می‌شود و این نشانگر تأثیری در ایمنی‌زایی پروتئین مورد نظر ندارد.

بهینه‌سازی کدون و بیان در میزبان‌های هترولوگ یک روش مفید در تولید پروتئین‌های نوترکیب به مقدار زیاد است. پروتئین CfaB به‌عنوان یک مولکول ایمونوژن می‌تواند به‌عنوان یکی از اجزای مهم در تولید واکسن علیه عفونت ETEC مطرح باشد.

٥- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از راهنمایی و زحمات جناب آقای دکتر سلمانیان تقدیر وتشکر می‌شود.

٦- منابع

[1] Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev 2005; 18(3): 465-83.

[2] Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. Expert Rev Vaccines 2008; 7(6): 795-804.

[3] Wenneras C, Erling V. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. J Health Popul Nutr 2004; 22(4): 370-82.

[4] Enterotoxigenic *Escherichia coli*: advances in technical and laboratory aspects of research

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

and development of vaccines. Wkly Epidemiol Rec 2008; 83(10): 92-5.

[5] Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. Microbes Infect 2010; 12(2): 89-98.

[6] Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1997; 10(4): 569-84.

[7] Nicklasson M. Studies on the Expression and Regulation of Enterotoxins and Colonization Factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Institute of Biomedicine, Department of Microbiology and Immunology, Göteborg University, Printed at Vasastadens Bokbinderi AB, Göteborg, Sweden, 2008.

[8] Rudin A, Svennerholm AM. Colonization factor antigens (CFAs) of enterotoxigenic *Escherichia coli* can prime and boost immune responses against heterologous CFAs. Microb Pathog 1994; 16(2): 131-9.

[9] Evans DG, Evans DJ Jr, Clegg S, Pauley JA. Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1979; 25(2): 738-48.

[10] Mu XQ, Savarino SJ, Bullitt E. The three-dimensional structure of CFA/I adhesion pili: traveler's diarrhea bacteria hang on by a spring. J Mol Biol 2008; 376(3): 614-20.

[11] Jansson L, Tobias J, Lebens M, Svennerholm AM, Teneberg S. The major subunit, CfaB, of colonization factor antigen i from entero-toxigenic *Escherichia coli* is a glycol-sphingolipid binding protein. Infect Immun 2006; 74(6): 3488-97.

[12] Walker RI, Steele D, Aguado T; Ad Hoc ETEC Technical Expert Committee. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. Vaccine 2007; 25(14): 2545-66.

[13] Steinsland H, Valentiner-Branth P, Gjessing HK, Aaby P, Molbak K, Sommerfelt H. Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*: longitudinal study. Lancet 2003; 362(9380): 286-91.

[14] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laborator manual. NewYork: CSHL Press, 2001; Chapter 1, p: 1, 31; Chapter 15, p: 15, 20.

[15] Favre D, Lüdi S, Stoffel M, Frey J, Horn MP, Dietrich G, Spreng S, Viret JF. Expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors in *Vibrio cholerae*. Vaccine 2006; 24(20): 4354-68.

[16] Bollage DM, Michel DR, Edesttein SJ. Protein method. New York: Wiley-Liss, 1996; p: 45-55, 143-160.

[17] Li YF, Poole S, Rasulova F, McVeigh AL, Savarino SJ, Xia D. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analyses of several forms of the CfaB major subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I fimbriae. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 2009; 65(Pt 3): 242-7.

[18] Catalog: pET system manual (Novagen). 10th edition, 2002. [www.novagen.com]

[19] Anantha RP, McVeigh AL, Lee LH, Agnew

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]

MK, Cassels FJ, Scott DA, Whittam TS, Savarino SJ. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen i and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 2004; 72(12): 7190-201.

[20] Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J Biotechnol 2005; 115(2): 113-28.

[21] Nishikubo T, Nakagawa N, Kuramitsu S, Masui R. Improved heterologous gene expression in *Escherichia coli* by optimization of the AT-content of codons immediately downstream of the initiation codon. J Biotechnol 2005; 120(4): 341-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-17]