

Cloning, Expression and Purification of Mycolyltransferase C of *Mycobacterium tuberculosis* in the Prokaryotic Host

Haniyeh Aghababa¹, Ashraf Mohabbati Mobarez^{2*}, Mehrdad Behmanesh³, Nima Khoramabadi⁴, Mehdi Nejati⁵

1- M.Sc., Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Ph.D. Candidate, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5- Head Department of Bacterial Vaccines, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Alborz, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: mmmobarez@modares.ac.ir

Received: 24/May/2011, Accepted: 06/Dec/2011

Abstract

Objective: Antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis* includes three immunogenic proteins which are important TB vaccine candidates. The use of these protein as a component of subunit vaccines, as a part of DNA vaccines or recombinant BCG boosters, enhances their recombinant production. Recombinant production of these mycobacterial proteins located in the cell wall somehow differs from the other proteins, as they are partially apolar. Therefore, this study aims to produce recombinant Ag85C as a vaccine candidate.

Methods: Ag85C gene was cloned in pJET1.2 and subsequently in pET32a(+). Both recombinant plasmids were sequenced. Expression of the recombinant protein was induced with 1mM IPTG. Recombinant Ag85C was purified through dissolving the inclusions in 8M urea buffer, absorbed to Ni-NTA resins, washed by buffers with decreasing urea concentrations, and finally eluted in aqueous solution. Western blot analysis was performed using anti-6His tag antibody, rabbit anti-*M. tuberculosis* polyclonal antibody, and the serum from hospitalized TB patients.

Results: Ag85C successfully cloned in both plasmid vectors. The recombinant Ag85C expressed in the *E. coli* host and was purified with significant yield.

Conclusion: Western blot results along with that of sequencing ensure accurate production of recombinant Ag85C, retaining its partial epitopes.

Keywords: Ag85 Complex, Ag85C, Tuberculosis Vaccine, *Mycobacterium tuberculosis*

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 14, No 4, Winter 2012, Pages: 1-12

کلون، بیان و تخلیص مایکولیل ترانسفراز C مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در میزبان پروکاریوتی

هانیه آقابابا^۱، اشرف محبتی مبارز^{۲*}، مهرداد بهمنش^۳، نیما خرم آبادی^۴، مهدی نجاتی^۵

- ۱- کارشناس ارشد، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- سرپرست بخش واکسن‌های باکتریایی، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور، انستیتو پاستور ایران، البرز، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، گروه باکتری‌شناسی
Email: mmmobarez@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۰/۰۹/۱۶

دریافت مقاله: ۹۰/۰۳/۰۴

چکیده

هدف: کمپلکس آنتی‌ژن ۸۵ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل سه پروتئین ترشحی است که خاصیت ایمنی‌زایی دارند. این پروتئین‌ها کاندیداهای مهمی در طراحی واکسن سل هستند. برای استفاده از این پروتئین‌ها به‌عنوان واکسن‌های زیرواحدی یا به‌عنوان یادآور برای BCG نوترکیب یا واکسن‌های DNA، تولید آنتی‌ژن‌های پروتئینی به شکل نوترکیب الزامی است. پروتئین‌های مایکوباکتریوم که در دیواره هستند نسبتاً غیرقطبی است و تولید آن‌ها به شکل نوترکیب در سویه بیانی اشیریشیا کلی با پروتئین‌های دیگر متفاوت است. هدف از این مطالعه تولید و تخلیص آنتی‌ژن نوترکیب 85C به‌عنوان یک ایمونژن است. **مواد و روش‌ها:** آنتی‌ژن 85C در حامل پلاسمیدی pJET1.2 و در نهایت در (pET32a+) کلون و در هر دو پلاسمید تعیین توالی شد. القای تولید پروتئین با IPTG صورت گرفت و تخلیص با حل کردن اجسام توده‌ای داخل سلولی در اوره، جذب با رزین نیکل، حذف اوره با شیب کاهشی اوره در محلول‌های شستشو و در نهایت جمع‌آوری پروتئین نوترکیب به شکل محلول انجام شد. تأیید آنتی‌ژنیک پروتئین نوترکیب با وسترن بلات و توسط آنتی‌بادی ضد پلی‌هیستیدین، آنتی سرم پلی‌کلونال خرگوشی ضد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و سرم بیمار سلی بستری انجام شد. **نتایج:** ژن آنتی‌ژن 85C با موفقیت کلون و با تعیین توالی تأیید شد. آنتی‌ژن 85C در میزبان اشیریشیا کلی بیان و تخلیص شد. **نتیجه‌گیری:** نتایج وسترن بلات به موازات نتایج تعیین توالی نشان دهنده درستی تولید پروتئین آنتی‌ژن 85C نوترکیب و حفظ نسبی ساختار اپی‌توپی آن است.

کلیدواژگان: کمپلکس آنتی‌ژن ۸۵، آنتی‌ژن 85C، واکسن سل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۱-۱۲

مقدمه

از جمعیت جهان با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis*) آلوده هستند و سالانه منجر به مرگ حدود ۲ میلیون نفر می‌شود [۱]. در ۹۰ درصد از افراد، عفونت به‌صورت نهفته باقی مانده و در ۱۰ درصد باقی

توبرکلوزیس (Tuberculosis) یک بیماری قدیمی است که به‌عنوان یک معضل بهداشتی در سراسر جهان به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه مطرح است. ۱/۳ میلیارد نفر

بیماری به فرم فعال بروز می‌کند. هرچند که بیشتر آلودگی و مرگ و میر سل مربوط به کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه است، اما در سال‌های اخیر با شیوع بیماری‌های تضعیف کننده سیستم ایمنی مثل ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS)، پیدایش سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به آنتی‌بیوتیک و عدم کارایی واکسن BCG در بزرگسالان، این بیماری در کشورهای پیشرفته نیز رشد داشته است. بنابراین تلاش برای دستیابی و گسترش ابزارهای پیشگیری و درمان سل یک ضرورت جهانی است. مؤثرترین گام در طراحی استراتژی نوین پیشگیری از این بیماری، انجام مطالعات در راستای طراحی واکسن‌های مناسب است که برای این منظور شناسایی و بررسی انواع آنتی‌ژن‌های باکتری از نظر قدرت ایمنی‌زایی ضروری است [۲].

یکی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های این باکتری پروتئین‌های کمپلکس ۸۵ است. این مجموعه از سه پروتئین ترشحی مشابه با نام‌های آنتی‌ژن 85A، 85B، 85C تشکیل شده و عملکرد مایکولیل ترانسفراز (Mycolyl Transferase) داشته و در سنتز دیواره باکتری نقش اساسی ایفا می‌نماید. این آنزیم اسید مایکولیک (Mycolic Acids) را از یک تری‌هالوز ۶-۶-۶-دی‌میکولات (Trehalose-6-monomycolate) به دیگری انتقال داده و منجر به تشکیل تری‌هالوز ۶-۶-۶-دی‌میکولات (Trehalose 6,6'-dimycolate) یا همان فاکتور طنابی می‌شود [۳، ۴]. این پروتئین‌ها به وسیله ۳ ژن جداگانه کد شده و از لحاظ توالی (۶۸-۹۷ درصد) شباهت دارند. این آنزیم‌ها جزو فراوان‌ترین پروتئین‌های ترشحی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است که در مرحله اولیه بیماری ترشح می‌شود و به فراوانی در ماکروفاژهای آلوده به این باکتری یافت می‌شود [۵]. این مطلب تأیید می‌کند که این پروتئین‌ها نقش حیاتی در فیزیولوژی و بیماری‌زایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارد. به تازگی مشخص شده است که پروتئین C از این کمپلکس در اتصال کووالانسی اسید مایکولیک به آرابینوگالاکتان (Arabinogalactan) نقش مهمی دارد [۳، ۶، ۷]. توانایی

ایجاد ایمنی حفاظت کننده، این آنتی‌ژن‌ها را به کاندیدای مناسب برای تولید واکسن بر علیه بیماری سل تبدیل کرده است [۸، ۹]. همچنین این پروتئین‌ها به‌عنوان هدف در طراحی داروهای ضد مایکوباکتریومی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است [۱۰-۱۲]. از آنجایی که برای پیشگیری یا درمان بیماری سل، عامل ایمنی‌زا باید توانایی تحریک پاسخ‌های سلولی را داشته باشد [۱۳]، از این پروتئین در تولید واکسن‌های DNA نوترکیب و نیز سویه‌های نوترکیب BCG استفاده شده و تولید خود پروتئین در مقیاس بالا مطرح نبوده است. نتایج تحقیقات اخیر بر استفاده از سویه BCG یا سویه‌های نوترکیب BCG به‌عنوان واکسن اولیه و تزریق آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم به‌عنوان یادآور تأکید دارد [۱۴]. از طرفی استفاده از خود آنتی‌ژن‌های نوترکیب به‌عنوان عامل ایمنی‌زایی مطرح است. از این رو تولید آنتی‌ژن‌های پروتئینی به‌صورت نوترکیب برای استفاده در فرآیندهای ایمن‌سازی مورد توجه قرار گرفته است [۱۵، ۱۶].

جایگاه سلولی آنتی‌ژن 85C در دیواره مایکوباکتریوم است که محیطی به شدت آب‌گریز است. آنتی‌ژن 85C همانند سایر ترکیبات موجود در دیواره، خصوصیات غیرقطبی از خود نشان می‌دهد که بررسی‌های آزمایشگاهی و نیز بیواینفورماتیکی این مطلب را تأیید می‌نماید [۴، ۱۷]. تولید پروتئین‌های آب‌گریز به‌صورت نوترکیب و استخراج و تخلیص متعاقب آن‌ها از زمینه‌های چالش برانگیز است و تفاوت‌های بسیاری با تخلیص انواع پروتئین‌های محلول دارد. از این‌رو، تولید و تخلیص پروتئین‌هایی از این دست به ابداع استراتژی‌های خاصی هم در سطح طراحی و هم در مورد خالص‌سازی نیاز دارند. تولید و تخلیص آنتی‌ژن 85C مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پیش از این گزارش نشده ولی در مورد آنتی‌ژن 85A و آنتی‌ژن 85B گزارش‌هایی وجود دارد [۱۸-۲۰].

هدف این مطالعه، کلون ژن آنتی‌ژن 85C از کمپلکس پروتئینی آنتی‌ژن ۸۵ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ساخت یک پلاسمید نوترکیب با توانایی بیان پروتئین 85C، تولید و در

نهایت تخلیص این پروتئین نو ترکیب است.

کلون و بیان مایکولیل ترانسفران

سلول است با دقت خارج و این عمل دو نوبت دیگر تکرار شد. در انتها، میکروتیوب در ۶۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد تا باقی مانده کلروفرم نیز خارج شود. ۵ میلی گرم لیزوزیم به محتوای درون میکروتیوب اضافه و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. سپس ۵ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر آنزیم پروتئیناز K افزوده و ۵ ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد گرمادهی شد. پس از تیمار پروتئیناز K، استخراج ژنوم با استفاده از کیت (Bioneer) Genome AccPure kit و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

آغازگرها (Primers) و شرایط PCR

توالی‌های ثابت شده ژن آنتی ژن 85C مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در بانک ژنی، از پایگاه NCBI (National Center for Biotechnology Information) اخذ و توسط نرم افزار VectorNTI 11 بررسی شد. یک جفت آغازگر برای تکثیر کل ناحیه کد کننده این ژن بر اساس پلاسمید بیانی pET32a(+) (شکل ۱) طراحی شد که عبارتند از:
آغازگر بالادست:

H85CF:
5'AAAAGAGCTCATGACGTTCTTCGAACAGGTGCG3'

و آغازگر پایین دست:

H85CR:
5'AAAAAGCTTTGCTGCCGATGCTGGCTTGTGGCTC3'

جایگاه برش برای آنزیم *sacl* در انتهای 5' آغازگر بالادست و جایگاه برش برای آنزیم *HindIII* در انتهای 5' آغازگر پایین دست طراحی شد (حروف پررنگ).

تکثیر ژن مورد نظر با PCR توسط آنزیم PrimSTAR[®] HS انجام گرفت. واکنش با برنامه دمایی شامل ۹۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ دوره شامل ۹۸ درجه سانتی گراد (۱۰ ثانیه)، ۶۱ درجه سانتی گراد (۱۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه) و در نهایت یک مرحله ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

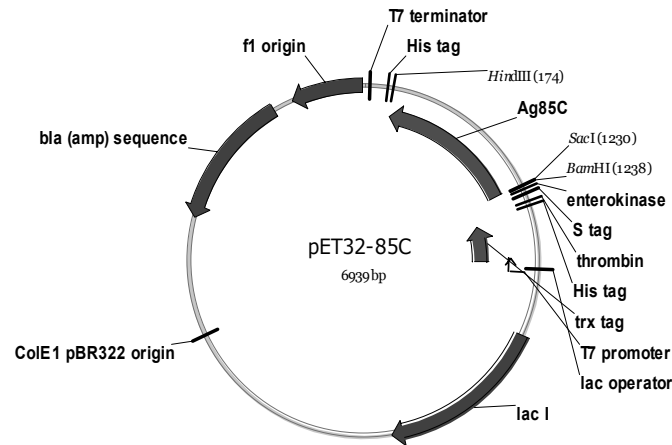
مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، ناقل‌ها و آنزیم‌ها

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) GM2163 و اشریشیا کلی Rosetta gami به ترتیب به عنوان میزبان‌های تکثیری و بیانی استفاده شد. پلاسمید pJET1.2 از کیت CloneJET[™] ساخت شرکت Fermentas و پلاسمید pET32a(+) (Novagen) برای کلون ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم‌های محدودالایر *SacI* و *HindIII* شرکت Fermentas و T4 DNA لیگاز شرکت TaKaRa استفاده شد. از آنزیم DNA Polymerase[®] HS PrimSTAR شرکت TaKaRa برای تکثیر قطعه ژن هدف از ژنوم باکتری با PCR استفاده شد که قدرت تصحیح خطای بسیار بالایی دارد.

استخراج DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

چند کلونی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv در یک میکروتیوب ۲ میلی لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) وارد و پس از افزودن مقداری پارافین مایع (برای جلوگیری از آئروسول (Aerocol) شدن باکتری) باکتری‌ها با حرارت غیرفعال شدند. مخلوط حاصل سانتریفوژ و رسوب حاصل دو بار با PBS شستشو داده شد. جسم سلولی باکتری‌ها در ۲۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl ۰/۱ مولار با pH: ۸ به شکل سوسپانسیون در آمد. سوسپانسیون باسیل سل ۴ مرتبه با استفاده از نیتروژن مایع و حمام آب گرم (۵۶ درجه سانتی گراد) منجمد و ذوب شد. برای جدا کردن پارافین و نیز ترکیبات آب‌گریز دیواره باکتری، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه و پس از ورتکس (Vortex)، در دور ۱۰۰۰۰ xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز آلی که حاوی کلروفرم و بخشی از چربی‌های دیواره



شکل ۱ نقشه پلاسمید pET32a-85C

پلاسمیدهای نو ترکیب pET32a(+) با هضم آنزیمی و تعیین توالی مجدد (همانطور که قبلاً شرح داده شد) انجام گرفت.

بیان و خالص سازی پروتئین نو ترکیب آنتی ژن 85C (rAg85C)

پلاسمید نو ترکیب pET32a-85C به میزبان بیانی اشریشیا کلی Rosetta Gami انتقال داده شد. باکتری‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب (RG-85C) در محیط مایع 2XYT حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین (Ampicillin)، ۵ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین (Kanamycin)، ۳۴ میکروگرم در میلی لیتر کلرامفنیکل (Chloramphenicol) و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر تتراسایکلین (Tetracycline) تلقیح و یک شب (حدود ۱۸ ساعت) در انکوباتور با حرکت دورانی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. از این کشت شبانه برای تلقیح محیط مایع 2XYT حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین استفاده شد. محیط مذکور در انکوباتور با حرکت دورانی قرار گرفت و زمانی که کدورت محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ رسید، پلاسمیدهای نو ترکیب با ۱ میلی مولار ایزوپروپیل - بتا - دی - تیوگالاکتوپیرانوزید (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside: IPTG) القا شد. سه نمونه در زمان‌های صفر تا سه از باکتری‌های القا شده گرفته و برای بررسی

کلون آنتی ژن 85C

محصول تکثیر ژن پروتئین 85C (۱۰۲۳ جفت باز) بعد از تکثیر با آنزیم PrimSTAR[®] HS و خالص سازی از روی ژل آگارز، در پلاسمید pJET1.2 طبق دستور کیت CloneJET[™] الحاق و محصول واکنش الحاق به باکتری اشریشیا کلی GM2163 انتقال داده شد. غربالگری پلاسمیدهای حاوی ژن مورد نظر تحقیق حاضر با روش کلونی PCR و با استفاده از آغازگرهای عمومی pJET1.2 و در نهایت آغازگرهای اختصاصی آنتی ژن 85C. با هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب، کلون شدن ژن آنتی ژن 85C در پلاسمید pJET1.2 تأیید شد. تأیید نهایی پلاسمیدهای نو ترکیب، با تعیین توالی انجام گرفت. نتایج تعیین توالی آن‌ها با نرم افزار Vector NTI 11.0 (Invitrogen) Advanced[™] بررسی و با توالی‌های مرجع مقایسه شد.

قطعه ژن آنتی ژن 85C با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های SacI و HindIII از pJET1.2 خارج و بعد از خالص سازی داخل pET32a(+) که توسط همین دو آنزیم بریده و سپس خالص شده بود، مجدداً با واکنش الحاق وارد شد. پلاسمیدهای نو ترکیب (pET32a-85C) به باکتری اشریشیا کلی GM2163 منتقل و کلون‌های نو ترکیب از طریق PCR روی کلونی با آغازگرهای اختصاصی آنتی ژن 85C غربالگری شد. تأیید نهایی

کلون و بیان مایکولیل ترانسفران

نمکی (pH: ۷/۴) به مدت یک شب دیالیز شد. میزان پروتئین با روش اسپکتروفوتومتری تعیین و مقدار کل پروتئین محلول خالص شده از یک لیتر کشت باکتری محاسبه شد.

وسترن بلات (Western Blot)

پروتئین نوترکیب از ژل SDS-PAGE با سیستم انتقال نیمه خشک (Bio-Rad) به کاغذ پلی وینیلیدین دی فلورید (Polyvinylidene Fluoride: PVDF) توسط دستگاه بلات Bio-Rad در شرایط نیمه خشک منتقل شد. برای کنترل انتقال پروتئین از رنگ پانسو (Ponceau S) استفاده و غشا به صورت نوارهای نازک حاوی پروتئین منتقل شده بریده شد. مسدودسازی غشای PVDF با محلول آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) ۵ درصد به مدت ۱ ساعت انجام گرفت. در مرحله بعد سه غشای جداگانه با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال (Polyclonal Antibodies) خرگوشی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس H37Rv (۱:۵۰۰۰)، آنتی‌بادی بر علیه 6His-tag (۱:۱۰۰۰۰) و سرم بیمار بستری (۱:۲۰۰۰) مبتلا به سل به مدت ۲ ساعت مجاور شدند. شستشو با بافر تریس نمکی محتوی ۰/۰۵ درصد توتین (Tris-) (Buffered Saline with Tween: TBS-T) انجام شد غشاها با آنتی‌بادی‌های ثانویه (موش ۱:۱۰۰۰۰، خرگوش ۱:۱۰۰۰۰ و انسان ۱:۵۰۰۰) برای مدت ۲ ساعت مجاور شدند. غشاها پس از شستشو با محلول سوبسترای کمیلومینسانت (Chemiluminescent Substrate) تحت شرایط استاندارد مجاور شده و بلافاصله باندهای فلورسنت روی غشاهای رادیوگرافی ثبت و ظاهر شد.

نتایج

کلون‌سازی و تعیین توالی آنتی ژن 85C

برای جلوگیری از هر گونه تغییر، ژن پروتئین 85C با PrimSTAR[®] HS DNA جفت‌باز به وسیله آنزیم

میزان بیان پروتئین در زمان‌های مختلف با SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) در ژل ۱۲/۵ درصد و رنگ‌آمیزی شده با کوماسی G-250 (Coomassie blue G250) ارزیابی شد.

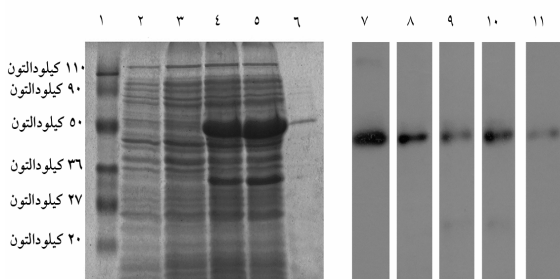
سلول‌های کشت RG-85C در ساعت‌های یک تا سه پس از القا جمع‌آوری و رسوب داده شدند. رسوب باکتری‌های مذکور بعد از شستشو با بافر فسفات نمکی، در بافر تخریب (۵۰ میلی‌مول NaH_2PO_4 ، ۳۰۰ میلی‌مول NaCl ، ۱۰ میلی‌مول ایمیدازول (Imidazole) و (Phenylmethanesulfonyl fluoride) PMSF) با pH: ۸ به شکل سوسپانسیون در آمد و در سه نوبت 5 دقیقه‌ای با فرکانس ۰/۶ ثانیه تحت اثر امواج فراصوت قرار گرفت تا سلول‌ها به‌طور کامل متلاشی شوند. در مرحله بعد، برای جداسازی اجسام جامد از فاز مایع، لیزات سلولی در ۱۸۰۰۰ g برای مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. یک نمونه از مایع رویی و یک نمونه از رسوب حاصل برای ردیابی پروتئین نوترکیب به وسیله SDS-PAGE بررسی شد.

برای تولید پروتئین نوترکیب rAg85C، یک کشت شبانه از باکتری RG-85C به شکلی که قبلاً شرح داده شد تهیه و از آن برای تلقیح ۱ لیتر محیط تازه 2XYT استفاده شد. بعد از اینکه باکتری‌ها به کدورت مناسب رسیدند با ۱ میلی‌مول IPTG القا و سه ساعت پس از آن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از طی شدن این زمان، سلول‌های باکتری با سانتریفوژ در ۹۰۰۰ g جمع‌آوری و با بافر فسفات نمکی شستشو داده شدند. سلول‌های باکتری در بافر B (۱۰۰ میلی‌مول NaH_2PO_4 ، ۱۰ میلی‌مول Tris-Cl و ۸ مول اوره؛ pH: ۸/۵) حل و پس از انتقال به ستون، با بافر C (۱۰۰ میلی‌مول NaH_2PO_4 ، ۱۰ میلی‌مول Tris-Cl و ۸ مول اوره؛ pH: ۸/۵) شستشو داده شدند. حذف اوره با استفاده از بافرهای حاوی شیب کاهش غلظت اوره (۸، ۶، ۴، ۲، ۱ و ۰ مولار اوره) انجام و در نهایت پروتئین‌ها با استفاده از محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار از ستون جدا و جمع‌آوری شدند. برای حذف ایمیدازول، محلول پروتئینی در برابر بافر فسفات

آنزیمی الحاق ژن آنتی ژن 85C در این پلاسمید را تأیید و تعیین توالی نیز درستی آن را تأیید نمود (شکل ۳).

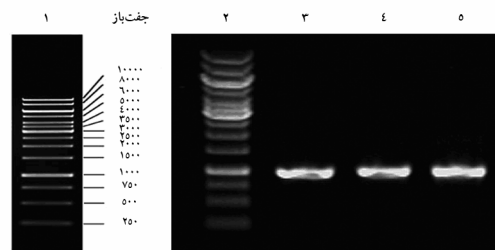
بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب آنتی ژن 85C

نتایج SDS-PAGE، بیان یک پروتئین در محدوده باند ۵۰ کیلودالتونی راهنمای وزنی را نشان می‌دهد که با وزن مولکولی حدود ۵۵ کیلودالتون پیش‌بینی شده همخوانی دارد (شکل ۱). وزن خود پروتئین آنتی ژن 85C حدود ۳۵ کیلودالتون است و اضافه شدن تایوردوکسین (Thioredoxin) به ابتدای آن توسط pET32a(+) موجب افزایش ۱۹ کیلودالتونی آن شده است. میزان بیان پروتئین‌ها بین ساعت اول و سوم تفاوت قابل ملاحظه‌ای نشان نمی‌دهد. با بررسی مایع رویی و رسوب حاصل از تخریب سلول‌ها با روش فراصوت باکتری‌ها با SDS-PAGE مشخص شد که بیشترین مقدار پروتئین نو ترکیب به صورت ذرات جامد غیرمحلول (اینکلوژن: Inclusion) در فاز رسوبی قرار دارد. بررسی الکتروفورتیک نتایج تخلیص rAg85C نشان‌گر خلوص قابل توجه این پروتئین است (شکل ۴).

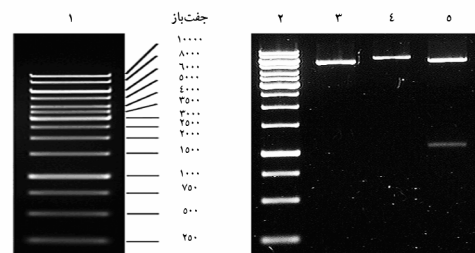


شکل ۴ نتایج بیان، تخلیص پروتئین و وسترن بلات آنتی ژن 85C؛ **چاهک ۱** راهنمای وزنی پروتئین، **چاهک ۲** سویه اشیریشیا کلی Rosetta gami حاوی پلاسمید pET32a(+)-85C القا نشده، **چاهک ۳** سویه اشیریشیا کلی RG القا نشده ساعت صفر، **چاهک ۴** سویه اشیریشیا کلی RG القا شده ساعت اول، **چاهک ۵** سویه اشیریشیا کلی RG القا شده ساعت سوم، **چاهک ۶** ۲۰ میکروگرم از پروتئین تخلیص شده نهایی، **چاهک ۷** وسترن بلات با آنتی‌بادی ضد ساختار پلی‌هیستیدین، **چاهک ۸** وسترن بلات با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی، **چاهک ۹، ۱۰، ۱۱** وسترن بلات با آنتی‌بادی سه بیمار مبتلا به سل

Polymerase که دارای قدرت تصحیح خطای بسیار بالایی است تکثیر شد (شکل ۲). به دلیل اضافه شدن توالی‌های شناسایی کننده آنزیم‌های SacI و HindIII و سه نوکلئوتید اضافی به‌عنوان دستگیره آنزیمی در دو طرف (جهت کمک به هضم آنزیمی مستقیم در صورت نیاز)، اندازه محصول PCR ۱۰۴۱ جفت‌باز است.



شکل ۲ تکثیر ژن مایکولیل ترانسفرز C با آنزیم PrimSTAR® HS DNA polymerase (۱) تصویر استاندارد راهنمای اندازه DNA، (۲) راهنمای اندازه DNA، (۳، ۴، ۵) محصول تکثیر ژن مایکولیل ترانسفرز C



شکل ۳ نتیجه هضم آنزیمی حامل بیانی pET32a-85C (۱) تصویر استاندارد راهنمای اندازه DNA، (۲) راهنمای اندازه DNA، (۳) هضم تک آنزیمی پلاسمید pET32a(+) با آنزیم HindIII، (۴) هضم تک آنزیمی پلاسمید pET32a-85C با آنزیم HindIII که حدود ۱ کیلوباز سنگین‌تر از پلاسمید خالی است. (۵) هضم دو آنزیمی پلاسمید pET32a-85C با آنزیم HindIII و SacI که خروج قطعه ۱ کیلوبازی را نشان می‌دهد.

محصول PCR با موفقیت در پلاسمید pJET1.2 کلون شد. هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب pJET-85C و تعیین توالی درستی کلون شدن ژن پروتئین 85C را تأیید می‌نماید. مقایسه نتایج تعیین توالی با توالی‌های مرجع نشان داد که هیچ‌گونه تغییر و جهشی در این قطعه ژن کلون شده روی نداده است. کلون ژن آنتی ژن 85C در pET32a(+) نیز با موفقیت کلون شد. هضم

کلون و بیان مایکولیل ترانسفران

تشخیص و درمان بیماری سل هستند [۲۶-۳۰]. مایکوباکتریوم‌ها به‌طور کلی از نظر ساختار دیواره سلولی تفاوت زیادی با سایر باکتری‌ها دارند. آب‌گریزی شدید ترکیبات موجود در دیواره آن‌ها موجب بروز خواص شاخص مایکوباکتریوم‌هاست که آن‌ها را از سایر ارگانیزم‌های پروکاریوت متمایز می‌سازد [۳۱]. جایگاه پروتئین‌های کمپلکس آنتی‌ژن‌های 85 کیلودالتونی، دیواره مایکوباکتریوم‌ها است و در ساخت آن نقش دارد؛ بنابراین متناسب با محیط سلولی خود، غیرقطبی است [۳، ۶، ۷]. بخش‌های ساختاری غیرقطبی پروتئین و عدم شکل‌گیری تاخوردگی طبیعی آن در یک میزبان پروکاریوتی دیگر مثل اشریشیا کلی موجب نامحلول شدن شدید آن حین تولید به شکل نوترکیب می‌شود. عدم محلولیت ممکن است یک دلیل برای اقبال کم محققین به تولید این گروه از پروتئین‌ها به‌صورت نوترکیب باشد که این‌که گزارشی از تولید آنتی‌ژن 85C به‌صورت نوترکیب در دست نیست.

برای به‌دست آوردن یک پروتئین نوترکیب که به‌طور ذاتی غیرقطبی است، یک راه حل استفاده از حامل‌های پلاسمیدی است که بخش‌هایی را برای افزایش محلولیت محصول پروتئینی به آن‌ها اضافه می‌کنند. میزان آب‌گریزی یک پروتئین نسبت عکس با مقدار تأثیرگذاری این بخش‌ها دارد. یکی از کاراترین حامل‌های پلاسمیدی که برای چنین منظوری استفاده می‌شود، PET32a(+) است که یک پروتئین به نام تایورودوکسین را در بخش ابتدایی مولکول پروتئین مورد نظر اضافه می‌کند (Trx-tag). تایورودوکسین از پروتئین‌های بسیار محلول است و تولید آن در اشریشیا کلی به سهولت انجام می‌شود. افزوده شدن تایورودوکسین به یک پروتئین غیرقطبی باعث ایجاد نوعی قطبیت نسبی و افزایش حلالیت کل محصول در محیط آبی می‌گردد. نکته قابل توجه در این‌جا نوع پاسخ ایمنی است که از این پروتئین انتظار می‌رود. در مسیر عرضه آنتی‌ژن، پروتئین توسط سلول‌های عرضه‌کننده در بدن میزبان به قطعات بسیار کوچک پپتیدی شکسته و به سلول‌های سیستم ایمنی ارائه می‌شود. از این رو شکل فیزیکی و تاخوردگی پروتئین نقش زیادی در عرضه این پپتیدها و در نهایت پاسخ به

براساس اندازه‌گیری با روش اسپکتروفتومتری، به‌دست آوردن پروتئین محلول از یک لیتر کشت باکتری میزبان ۶/۵ میلی‌گرم تعیین شد. نتایج وسترن بلات نشان می‌دهد rAg85B توسط آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی، آنتی‌بادی علیه بخش پلی‌هیستیدین و سرم بیمار قابل شناسایی است (شکل ۴). جمع بین نتایج آزمون وسترن و تعیین توالی ژن آنتی‌ژن 85C تأیید کننده کل فرآیند است.

بحث

بیماری سل و عامل ایجادکننده آن، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، به‌عنوان یکی از معضلات پیچیده سلامت، محققین را وادار به انجام تحقیقات گسترده‌ای در زمینه پیشگیری و درمان این بیماری کرده است [۲۱، ۲۲]. ایمنی‌زایی تعداد زیادی از ترکیبات سلولی باسیل سل به‌عنوان کاندیدای واکسیناسیون علیه آن مورد بررسی قرار گرفته و مطالعات گسترده‌ای در زمینه DNA واکسن‌ها و BCG نوترکیب و واکسن‌های زیرواحدی انجام شده است [۱۶]. یافته‌های اخیر نشان داده است که استفاده از DNA واکسن‌ها یا BCG نوترکیب به همراه یک یادآور پروتئینی به‌طور موفقیت‌آمیزی می‌تواند سبب تحریک سیستم ایمنی شود. از سوی دیگر، توانایی برخی آنتی‌ژن‌های پروتئینی به شکل نوترکیب، به تنهایی یا در ترکیب با پروتئین‌های دیگر و ادجوانت‌های (adjuvants) مختلف در ایجاد پاسخ‌های ایمنی حفاظتی گزارش شده است [۱۶، ۲۳-۲۵]. استفاده از ترکیبات پروتئینی به‌عنوان عامل ایمنی‌زا یا یادآور مستلزم تولید آنتی‌ژن‌های پروتئینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به‌صورت نوترکیب است. پروتئین‌های کمپلکس آنتی‌ژن‌های ۸۵ کیلودالتونی، فراوان‌ترین پروتئین‌های ترشحی از این باکتری است که در سنتز دیواره نقش مهمی دارد و خاصیت ایمنی‌زایی آن‌ها در خوکچه هندی گزارش شده است. این سه پروتئین (آنتی‌ژن 85A، آنتی‌ژن 85B، آنتی‌ژن 85C) کاندیدای خوبی برای طراحی واکسن،

هم و تجمع و ایجاد لخته را نمی‌دهد و از این لحاظ برتری خوبی به روش‌های دیگر دارد. میزان پروتئین نوترکیب محلول که نتیجه نهایی این روش است نیز نسبت به نتایج روش‌های تخلیص برای پروتئین‌های دیگر کمپلکس ۸۵ قابل توجه است [۱۸-۲۰].

نتایج وسترن با آنتی‌بادی ضد ساختار پلی‌هیستیدین تأیید کننده تولید پروتئین در حامل پلاسמידی pET32a(+) است که با نتایج تعیین توالی سازگاری دارد. نتایج وسترن با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی از یک طرف تأیید کننده تولید پروتئینی با خصوصیات یک پروتئین مایکوباکتریومی است که به موازات نتایج تعیین توالی تولید آنتی‌ژن 85C را تأیید می‌کند و از طرف دیگر نشان دهنده این مطلب است که پروتئین نوترکیب تولید شده حداقل به‌طور نسبی اپی‌توپ‌های طبیعی خود را حفظ کرده است. از این رو می‌توان ادعا کرد که روش تخلیصی که استفاده شد تا حد قابل قبولی می‌تواند ساختار پروتئین‌های نوترکیب را حفظ نماید. شناسایی آنتی‌ژن 85C نوترکیب توسط سرم بیماران مبتلا به سل که در بیمارستان بستری هستند نشان‌گر این است که پروتئین نوترکیب تولید شده در این پروژه با پروتئینی که باسیل سل حین بیماری تولید می‌نماید و بدن نسبت به آن واکنش نشان می‌دهد، مشابهت دارد. بنابراین از پروتئینی که با این روش تولید و تخلیص شده می‌توان در زمینه‌های مختلف از جمله تشخیص سرولوژی نیز استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته باکتری‌شناسی بوده و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

آن‌ها ندارد و به‌نظر می‌رسد بتوان از این ترکیب پروتئینی برای مقاصد ایمنی‌زایی استفاده کرد. در این مطالعه نیز تولید پروتئین آنتی‌ژن 85C در پلاسמיד pET32a(+) انجام گرفته و یک بخش پروتئینی با جرم حدودی ۱۸ کیلودالتون به ابتدای آن افزوده شده است. میزان بیان پروتئین نوترکیب در میزبان باکتریایی بسیار قابل توجه است و بررسی‌ها با SDS-PAGE حضور پروتئینی با وزن تقریبی ۵۵ کیلودالتون را تأیید می‌نماید. در تولید آنتی‌ژن 85C به شکل نوترکیب در اشریشیا کلی بیشتر پروتئین تولید شده به شکل جسم توده‌ای داخل سلولی است و این به علت عدم تاخوردگی کامل پروتئین مایکوباکتریوم در این میزبان است. راه‌کار مورد استفاده در مورد پروتئین‌هایی که به شکل جسم توده‌ای در داخل سلول میزبان تجمع می‌یابد، به‌کارگیری مواد شیمیایی با خاصیت واسرشته‌کنندگی مانند اوره و گوانیدینوم هیدروکلراید (Guanidinium Hydrochloride) است. مواد واسرشته‌کننده با باز کردن پیوندهای هیدروژنی سبب حل شدن اجسام توده‌ای می‌شود و امکان جذب آن‌ها توسط رزین نیکل را فراهم می‌آورد. اما حضور ماده واسرشته‌کننده استفاده آن را محدود می‌کند. برای حذف این مواد روش‌های متعددی پیشنهاد شده که در مورد پروتئین‌های مختلف، نتایج متفاوتی را در برداشته است. در این مطالعه برای حل کردن اجسام توده‌ای حاوی پروتئین آنتی‌ژن 85C از اوره ۸ مولار استفاده شد. حذف ابتدایی اوره با دیالیز نتایج خوبی در بر نداشت (اطلاعات در این‌جا ذکر نشده) و موجب لخته شدن پروتئین شد. برای به‌دست آوردن پروتئین محلول، روش‌های متعددی استفاده شد و در نهایت با استفاده از محلول‌های شستشو با شیب کاهشی اوره انجام گرفت. با استفاده از این روش در حین این‌که پروتئین به رزین نیکل متصل است، اوره حذف می‌شود و امکان ارتباط پروتئین‌ها با

منابع

[1] Thaiss CA, Kaufmann SH. Toward novel vaccines against tuberculosis: current hopes

and obstacles. *Yale J Biol Med* 2010; 83(4): 209-15.

- [2] Barker LF, Brennan MJ, Rosenstein PK, Sadoff JC. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. *Curr Opin Immunol* 2009; 21(3): 331-8.
- [3] Dheenadhayalan V, Shin KS, Chang CF, Chang CD, Wang SJ, McDonough S, McDonough P, Stehman S, Shin S, Torres A, Chang YF. Cloning and characterization of the genes coding for antigen 85A, 85B and 85C of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *DNA Seq* 2002; 13(5): 287-94.
- [4] Ronning DR, Vissa V, Besra GS, Belisle JT, Sacchettini JC. *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and 85C structures confirm binding orientation and conserved substrate specificity. *J Biol Chem* 2004; 279(35): 36771-7.
- [5] Anderson DH, Harth G, Horwitz MA, Eisenberg D. An interfacial mechanism and a class of inhibitors inferred from two crystal structures of the *Mycobacterium tuberculosis* 30 kDa major secretory protein (Antigen 85B), a mycolyl transferase. *J Mol Biol* 2001; 307(2): 671-81.
- [6] Jackson M, Raynaud C, Lanéelle MA, Guilhot C, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Gicquel B, Daffé M. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol Microbiol* 1999; 31(5): 1573-87.
- [7] Sanki AK, Boucau J, Ronning DR, Sucheck SJ. Antigen 85C-mediated acyl-transfer between synthetic acyl donors and fragments of the arabinan. *Glycoconj J* 2009; 26(5): 589-96.
- [8] Harth G, Lee BY, Wang J, Clemens DL, Horwitz MA. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996; 64(8): 3038-47.
- [9] D'Souza S, Rosseels V, Romano M, Tanghe A, Denis O, Jurion F, Castiglione N, Vanonckelen A, Palfliet K, Huygen K. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003; 71(1): 483-93.
- [10] Gobec S, Plantan I, Mravljak J, Svajger U, Wilson RA, Besra GS, Soares SL, Appelberg R, Kikelj D. Design, synthesis, biochemical evaluation and antimycobacterial action of phosphonate inhibitors of antigen 85C, a crucial enzyme involved in biosynthesis of the mycobacterial cell wall. *Eur J Med Chem* 2007; 42(1): 54-63.
- [11] Ronning DR, Klabunde T, Besra GS, Vissa VD, Belisle JT, Sacchettini JC. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nat Struct Biol* 2000; 7(2): 141-6.
- [12] Gobec S, Plantan I, Mravljak J, Wilson RA, Besra GS, Kikelj D. Phosphonate inhibitors of antigen 85C, a crucial enzyme involved in the biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14(13): 3559-62.
- [13] Almeida AS, Lago PM, Boechat N, Huard RC, Lazzarini LC, Santos AR, Nociari M, Zhu H, Perez-Sweeney BM, Bang H, Ni Q, Huang J, Gibson AL, Flores VC, Pecanha LR, Kritski

- AL, Lapa e Silva JR, Ho JL. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. *J Immunol* 2009; 183(1): 718-31.
- [14] Parida SK, Kaufmann SH. Novel tuberculosis vaccines on the horizon. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(3): 374-84.
- [15] Macedo GC, Bozzi A, Weinreich HR, Báfica A, Teixeira HC, Oliveira SC. Human T cell and antibody-mediated responses to the *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 85A, 85B, and ESAT-6 antigens. *Clin Dev Immunol* 2011; 351573.
- [16] Martin Montanes C, Gicquel B. New tuberculosis vaccines. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29 Suppl 1: 57-62.
- [17] Sacchetti JC, Ronning DR. The mycobacterial antigens 85 complex--from structure to function: response. *Trends Microbiol* 2000; 8(10): 441.
- [18] Mullerad J, Michal I, Fishman Y, Hovav AH, Barletta RG, Bercovier H. The immunogenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* 85B antigen. *Med Microbiol Immunol* 2002; 190(4): 179-87.
- [19] Salim K, Haedens V, Content J, Leblon G, Huygen K. Heterologous expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding antigen 85A in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(11): 4392-400.
- [20] Xie Y, Bao L, Hu C, Zhang W, Chen W. [Molecular cloning and expression of the immunodominant protein Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2002; 33(2): 172-4, 195.
- [21] Jassal MS, Bishai WR. Epidemiology and challenges to the elimination of global tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2010; 50 Suppl 3: S156-64.
- [22] Mori T, Leung CC. Tuberculosis in the global aging population. *Infect Dis Clin North Am* 2010; 24(3): 751-68.
- [23] Brooks JV, Frank AA, Keen MA, Bellisle JT, Orme IM. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun* 2001; 69(4): 2714-7.
- [24] Kolibab K, Yang A, Derrick SC, Waldmann TA, Perera LP, Morris SL. Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(5): 793-801.
- [25] Lu J, Wang C, Zhou Z, Zhang Y, Cao T, Shi C, Chen Z, Chen L, Cai C, Fan X. Immunogenicity and protective efficacy against murine tuberculosis of a prime-boost regimen with BCG and a DNA vaccine expressing ESAT-6 and Ag85A fusion protein. *Clin Dev Immunol* 2011; 617892.
- [26] Montgomery DL, Huygen K, Yawman AM, Deck RR, Dewitt CM, Content J, Liu MA, Ulmer JB. Induction of humoral and cellular immune responses by vaccination with *M. tuberculosis* antigen 85 DNA. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1997; 43(3): 285-92.
- [27] Pardini M, Giannoni F, Palma C, Iona E, Cafaro A, Brunori L, Rinaldi M, Fazio VM, Laguardia ME, Carbonella DC, Magnani M, Ensoli B, Fattorini L, Cassone A. Immune response and protection by DNA vaccines

- expressing antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 2006; 262(2): 210-5.
- [28] Hajizadeh R, Sato H, Carlisle J, Nadaf MT, Evans W, Shepherd BE, Miller RF, Kalams SA, Drake WP. *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85A induces Th-1 immune responses in systemic sarcoidosis. J Clin Immunol 2007; 27(4): 445-54.
- [29] Shi C, Wang X, Zhang H, Xu Z, Li Y, Yuan L. Immune responses and protective efficacy induced by 85B antigen and early secreted antigenic target-6 kDa antigen fusion protein secreted by recombinant bacille Calmette-Guérin. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2007; 39(4): 290-6.
- [30] Dou J, Tang Q, Zhao F, Chu L, Chen J, Cao M, Liu C, Wang Y, Li Y, Li JL. Comparison of immune responses induced in mice by vaccination with DNA vaccine constructs expressing mycobacterial antigen 85A and interleukin-21 and *Bacillus Calmette-Guérin*. Immunol Invest 2008; 37(2): 113-27.
- Alderwick LJ, Birch HL, Mishra AK, Eggeling L, Besra GS. Structure, function and biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. Biochem Soc Trans 2007; 35(Pt 5): 1325-8.