مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ٤: از ۷۱-۸۳
زمستان ۱۳۸۸

بیان، خالص‌سازی و بررسی فعالیت آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی SAP_2 کاندیدا آلبیکنس در سیستم مخمری پیکیا پاستوریس

الهه محمودی[۱]، حمیدرضا کلهر[۲]، محمّدحسین یادگاری[۳*]، مجید صادقی‌زاده[٤]، زهیرمحمّد حسن[٥]

۱- دانشجوی دکتری، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- استاد، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۶/۱۰ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۹/۰۳

چکیده

هدف: آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی (SAP_2) کاندیدا آلبیکنس نقش محوری در اتصال، تهاجم و بیماری‌زایی این مخمر فرصت‌طلب دارد. هدف از این مطالعه کلون نمودن، بیان و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم SAP_2 است. همچنین در این تحقیق برای اولین بار، از سیستم یوکاریوتی پیکیا پاستوریس برای بیان پروتئین نوترکیب SAP_2 استفاده شد.

مواد و روش‌ها: ژن Sap_2 کاندیدا آلبیکنس با انتهاهای چسبان *Eco*R1 و *Sac*II توسط PCR تکثیر و درون ناقل T/A ساب‌کلون شد. با استفاده از آغازگرهای عمومی توالی این ژن تعیین شد و سپس درون ناقل بیانی pGAPZαA قرار گرفت. سازه نوترکیب به درون مخمر پیکیا پاستوریس انتقال داده شد. ژن Sap_2 طی پدیده نوترکیبی همولوگ درون ژنوم مخمری پیکیا پاستوریس داخل شد. پروتئین بیان شده به کمک روش وسترن بلاتینگ و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه پروتئین SAP_2 تأیید شد. در نهایت پروتئین به‌دست آمده با کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA تخلیص و فعال بودن آنزیم تأیید شد.

نتایج: در این تحقیق تکثیر ژن Sap_2 کاندیدا آلبیکنس و وارد نمودن آن درون ژنوم مخمر بیانی پیکیا پاستوریس با روش نوترکیبی همولوگ انجام شد. علاوه بر این، کلونی از مخمر را به‌دست آمد که پروتئین نوترکیب SAP_2 را به محیط ترشح می‌کرد. بالاترین بیان پس از طی زمان ۹٦ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: القای ژن Sap_2 در مخمر پیکیا پاستوریس منجر به افزایش قدرت بیان انبوه این ژن نسبت به سیستم بیانی باکتریایی می‌شود. همچنین نیاز به تغییرات بعد از ترجمه و فعال نمودن آنزیم، به علت استفاده از سیستم بیانی یوکاریوتی، از بین می‌رود. برطبق یافته‌های تحقیق حاضر، آسپارتیل اسید پروتئیناز تخلیص شده در این تحقیق خود فعال بوده و قادر به تجزیه BSA به‌عنوان یک سوبسترا است. این پروتئین نوترکیب در pH اسیدی بیشترین فعالیت را دارد.

کلیدواژگان: کاندیدا آلبیکنس، کلونینگ Sap_2، پیکیا پاستوریس

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی،گروه قارچ‌شناسی پزشکی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: yadegar.m@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

۱- مقدمه

کاندیدا آلبیکنس (*Candida albican*) یکی از مهم‌ترین مخمرهای بیماری‌زای انسان است. این مخمر فرصت‌طلب دو شکلی (Dimorphism) (هیف، مخمر) اغلب به‌صورت فلور طبیعی در سطوح مخاطی وجود دارد اما می‌تواند به یک عامل تهدیدکننده زندگی در افرادی با پاسخ ایمنی کاهش‌یافته ناشی از سرطان، درمان طی پیوند اعضا، افراد HIV^+ (Human Immunodeficiency Virus) و افرادی با بیماری‌های زمینه‌ای تبدیل شده و ایجاد کاندیدیازیس سیستمیک (Systemic Candidiasis) نماید [۱]. چندین فاکتور مستعدکننده مانند قدرت چسبندگی، دو شکلی، تغییرات شکل ظاهری (Phenotype switching)، سرکوب سیستم ایمنی و تولید فسفولیپازها و آسپارتیل پروتئینازها (Aspartic Proteinases)، برای بیماری‌زایی کاندیدا مطرح شده است [۲]. از بین فاکتورهای مؤثر در بیماری‌زایی این مخمر، وجود آنزیم‌های آسپارتیل پروتئینازهای ترشحی (Secreted Aspartic Proteinase: SAP) به‌عنوان فاکتور بیماری‌زایی بالقوه، مطرح است. وجود SAPها و تهاجم گونه‌های کاندیدا با آزمون‌های بیوشیمیایی، ژنتیکی و ایمنوشیمی ثابت شده است [۳].

شش ژن نسبتاً همسان Sap_1-Sap_6 برای ترشح پروتئیناز در کاندیدا آلبیکنس وجود دارد. کاندیدا آلبیکنس در حالت مخمری در ابتدا یک مجموعه از ژن‌ها شامل Sap_{1-3} را بیان می‌کند که بیشتر در عفونت‌های مخاطی بیان می‌شوند. در عوض در شکل هیف ابتدایی، دیگر اعضای این ژن‌ها شامل Sap_{4-6} بیان می‌شوند که مؤثر در ایجاد عفونت‌های سیستمیک هستند. نقش آنزیم SAP_1 در ایجاد حفره در سطوح مخاطی بدن و توانایی آنزیم‌های SAP_{1-3} در چسبندگی به سلول‌های پوششی ثابت شده است و $SAP_{5,6,9}$ در تولید بیوفیلم (Biofilm) مؤثر است [٤، ٥]. سویه‌های کاندیدا آلبیکنس با ژن‌های حذف شده Sap_1 و Sap_3 صدمات بافتی کمتری در ساختار اپیتلیوم انسان (Reconstituted Human Epithelium: RHE) دارد. همچنین این سویه‌های جهش‌یافته، چسبندگی کمتر به سلول‌های پوششی دهانی و بیماری‌زایی کمتر در مدل واژینیت موش نشان دادند. سویه‌های این مخمر که ژن Sap_2 آن‌ها حذف شده بود، تقریباً هیچ نشانه‌ای از بیماری‌زایی در مدل واژینیت تجربی در موش نداشت. به‌علاوه تجزیه بافت‌های موش آلوده شده، نشان داد که حذف ژن Sap_2 در مخمر کاندیدا آلبیکنس توانایی چسبندگی مخمر به سطوح سلولی و ایجاد کلونیزاسیون (Colonization) را به شدت کاهش داده است [٦]. در آزمون ایمنوفلورسنت (Immunofluorescent) با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی، وجود پروتئین‌های SAP به‌عنوان آنتی‌ژن در سطح دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس طی نفوذ به بافت در کاندیدیازیس سیستمیک و عدم توانایی ماکروفاژها در فاگوسیتوز سلول‌های کاندیدا ثابت شده است [۷].

تحقیق روی SAP_7 نشان داده که این SAP تنها طی عفونت داخل رگی کاندیدیازیس تولید می‌شود و نقشی در عفونت واژنی در موش‌های مورد مطالعه ندارد. گروه‌های آزمایش مانند جهش‌یافته‌های فاقد Sap_7 ($Sap_{7\Delta}$) هیچ نقشی در ایجاد عفونت مخاطی نداشت [۸].

کاندیدا آلبیکنس ۸ کروموزوم دیپلوئید دارد که از بزرگ‌ترین به کوچک‌ترین کروموزوم به‌صورت ۱ تا ۷ شماره‌گذاری می‌شود و همچنین دارای یک کروموزوم با اندازه بسیار متغیر است که از سایرین بزرگ‌تر بوده و با R نشان داده می‌شود. این کروموزم دارای دو قسمت اتصال اضافی متغیر است که برای RNA ریبوزومی (rRNA) کد می‌شود. بررسی ترادف ژن *Sap* وجود خانواده این ژن‌ها را روی کروموزم R کاندیدا آلبیکنس نشان می‌دهد [۹]. در گونه بسیار شایع کاندیدا آلبیکنس وجود ۱۰ ژن *Sap* از Sap_{1-10} گزارش شده است. ترادف‌های آمینواسیدی SAPهای کاندیدا آلبیکنس نشان داده که درصد شباهت بین SAP_1، SAP_2 و SAP_3 در حدود ٦٨ درصد و بین مابقی اعضا ۲۵ درصد است [۱۰]. بیان ژن‌های *Sap* طی چرخه زندگی کاندیدا آلبیکنس بسته به شکل یا فنوتایپ آن متفاوت بوده و به‌صورت افتراقی تنظیم و بیان

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

می‌شود [۱۱]. برای مثال تولید بیشتر آنزیم SAP_4 طی شکل بیماری‌زایی هیف بیان می‌شود؛ در حالی‌که SAP_2 در حضور BSA (Bovine Serum Albumin) به‌عنوان منبع نیتروژن و از کلونی‌های سفید به‌دست می‌آید. آنالیز نورترن بلاتینگ (Northern blotting) از خانواده SAPهای کاندیدا نشان داد که SAP_1 و SAP_3 طی تغییرات شکل ظاهری کلونهای مات (Opaque) به سفید در سویه WHO-1 تولید می‌شود در حالی‌که SAP_2 طی جوانه زدن و تشکیل هیف در این مخمر و در محیط حاوی پروتئین به‌عنوان منبع نیتروژن تولید می‌شود [۱۲]. این پدیده می‌تواند نشان‌دهنده این مسئله باشد که کاندیدا آلبیکنس نیازمند پروتئینازهای خاص در هر مرحله از رشد و ایجاد بیماری بوده و همچنین هر آنزیم ویژگی‌های خاص خود را دارد که با بقیه متفاوت است [۱۳]. در یک مطالعه ٤ سوش از کاندیدا آلبیکنس سوش‌های H12 و ATCC10261 با قدرت بیماری‌زایی بالا و دو سوش مقاوم به کلوتریمازول (Clotrimazole) N و P به‌منظور بررسی توانایی ایجاد عفونت واژنی در مدل موش بزرگ آزمایشگاهی (رت) بررسی شد. نتایج نشان داد توانایی اتصال کاندیدا به پوشش واژن و ایجاد کاندیدیازیس واژنی در واژینیت رت به بیان دو ژن آسپارتیل پروتئیناز Sap_1 و Sap_2 مربوط است. آنالیز ساترن بلاتینگ (Southern blotting) به روش نقطه‌ای (Dot blot) و نورترن بلات (Northern blotting) از دورگه‌سازی RNA (Hybridization)های استخراج شده از مایع واژنی موش‌های آلوده شده از هر سوش با پروب‌های (Probes) اختصاصی نشان داد که در سوش‌های با قدرت بیماری‌زایی بالا، هر دو ژن طی هفته اول عفونت بیان می‌شود. در مقابل هیچ ژنی طی عفونی کردن رت‌ها به‌وسیله سویه‌های غیربیماری‌زای N بیان نشد. سوش نسبتاً بیماری‌زای P هر دو ژن Sap_1 و Sap_2 را بیان می‌کرد؛ اما سطح mRNA هر دو ژن پایین بود. همچنین سطح mRNA ژن Sap_1 زودتر از سطح mRNA ژن Sap_2 کاهش می‌یابد. در مورد چسبندگی و اتصال در هیستوپاتولوژی بافت‌های عفونی شده با رنگ‌آمیزی بافتی PAS (Providian Acid Shift) نشان داده شد که سوش غیرواژینوپاتیک N کمتر از سوش‌های بیماری‌زای بالقوه H12 و ATCC10261 و سوش نسبی P به سلول‌های پوششی واژن متصل می‌شود. همچنین قدرت تحریک تولید سلکتین E (یکی از اعضای خانواده مولکول‌های چسبان در روند التهاب) در آن‌ها بالاتر است. نتایج این تحقیق یک رابطه آشکار بین توانایی سوش‌های عفونت‌زا با ترشح SAP را ثابت کرد [١٤]. یکی از اختصاصات اصلی آنزیم‌های SAP کاندیدا آلبیکنس که باعث تمایز آن از آسپارتیل پروتئینازهای سلول‌های پستانداران می‌شود، داشتن ترادف‌های ترجیحی (Residue preference) در دو جایگاه اختصاصی P_1 و P_1' است که وجود این دو ناحیه باعث تشخیص محل برش در سوبسترا و اختصاصی شدن آن می‌شود. برای مثال با توجه به این‌که SAP_1، SAP_2، SAP_3 و SAP_6 باندهای پپتیدی بین آمینواسیدهای آب‌گریز بزرگ‌تر را می‌شکنند، اما دو ناحیه P_1 و P_1' اختصاصی هر آنزیم است به‌طوری که $SAP_{1,2,6}$ فنیل آلانین و SAP_3 لوسین را در محل P_1 ترجیح می‌دهد. بر پایه این گزارش‌ها احتمالاً نقش اصلی این پروتئینازها در کاندیدا آلبیکنس فراهم آوردن تغذیه برای سلول است [۱۵]. آنزیم آسپارتیل پروتئیناز اسیدی SAP_2 یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی مخمر بیماری‌زای کاندیدا آلبیکنس است. استخراج و خالص‌سازی این آنزیم از محیط کشت کاندیدا در مقادیر پایین و به‌صورت خالص، به‌منظور مطالعه عملکرد و فعالیت آنزیم، امکان‌پذیر نیست. علاوه بر این، تحقیق روی سویه‌های کاندیدا آلبیکنس بیماری‌زا در ایران در مبحث آنزیم‌های SAP و تولید ناقل‌های نوترکیب از این آنزیم‌ها انجام نشده است؛ به همین دلیل محققان حاضر بر آن شدند تا با بیان مهم‌ترین آنزیم خانواده SAPها از نظر بیماری‌زایی (آنزیم SAP_2) در یک ناقل مناسب و تخلیص پروتئین نوترکیب به یک منبع دائمی تولید آنزیم فوق دست یابند تا در مطالعات بعدی بتوان از آن برای تهیه واکسن، کیت‌های تشخیصی، تولید دارو علیه این مخمر و سایر مطالعات در ایران، استفاده نمود. همچنین در این مطالعه برای اولین بار از سیستم

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

یوکاریوتی پیکیا پاستوریس (*Pichia pastoris*) به‌منظور کلون و بیان آنزیم SAP_2 استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- پلاسمیدها و مواد واکنش

همه پلاسمیدها بعد از انتقال (Transfer) به روش استاندارد، تکثیر و خالص شدند [۱٦]. برای رشد مخمر پیکیای نوترکیب از محیط کشت YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose)، حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک زئوسین (Zeocin) (خریداری شده از Invitrogen) استفاده شد. DNA ژنومی کاندیدا آلبیکنس با روش فنل- کلروفرم [۱۷] استخراج شد. آنزیم‌های آندونوکلئاز *EcoR1* و *Sac*II (تهیه شده از شرکت Takara) هریک با غلظت ۱۵ واحد در میکرولیتر، *BspH1* (Fermentas) ۲۵ واحد در میکرولیتر و DNA لیگاز T_4 (Fermentas) با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر تهیه شد. آنتی‌بادی مونوکلونال (Monoclonal) SAP_2 برای انجام وسترن بلاتینگ از شرکت Takara ژاپن تهیه شد.

۲-۲- تکثیر PCR از ژن Sap_2

ژنوم کاندیدا آلبیکنس به‌عنوان الگو برای تکثیر ژن Sap_2 استفاده شد. با استفاده از آغازگرهایی (Primers) که حاوی ترادف‌های برش‌گر *Eco*R1 و *Sac*II است، کپی‌برداری از ژن Sap_2 کاندیدا آلبیکنس با طول ۱۲۰۰ جفت‌باز انجام شد (جدول ۱). در طراحی آغازگرها برای اطمینان از عدم وجود توالی‌های تکراری یا مکمل نرم‌افزار Gene Runner استفاده شد. آغازگرها توسط شرکت Bioneer با درجه خلوص HPSF (High Purified Salt Free) به‌صورت لیوفیلیزه (Lyophilized) ساخته شدند. شماره دستیابی ژن مورد مطالعه در NCBI (National Center Biotechnology Information)، ID3647354 است.

جدول ۱ توالی آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن Sap_2

جایگاه محدودکننده	دما	توالی	ـــــ
***Eco*R1**	۵۵	5'- CACGAATTCACTCCAACAACAACCAAAA-3'	جلویی
***Sac*II**	٥٤	5'-CATCCGCGGAGGTCAAGGTCAAGGCAGAAATACA-3'	برگشتی

نواحی خط کشیده شده جایگاه شناسایی آنزیم *Eco*R1 در آغازگر جلویی (Forward) و *Sac*II در آغازگر برگشتی (Reverse) است.

برنامه PCR به‌صورت زیر استفاده شد: واسرشت‌سازی اولیه (Initial Denaturation) به‌مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه، واسرشت‌سازی ثانویه به‌مدت ۳۰ ثانیه هرکدام در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال (Annealing) آغازگر، ٤٥ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای طویل‌سازی (Extension) ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲ دقیقه و طویل‌سازی نهایی برای ۱۰ دقیقه انجام شد. تعداد ۳۳ چرخه به دستگاه داده شد. غلظت DNA الگو ۱ میکروگرم و غلظت Mg^{2+}، ۳ میکرومولار بود.

۲-۳- کلون Sap_2 درون پلاسمید T/A

به دلیل بروز مشکلات متعدد در فرایند کلونینگ به روش نوترکیبی همولوگ، تصمیم گرفته شد که کلونینگ ابتدا در ناقل T/A انجام شود. به این منظور قطعات ژنی ابتدا به کمک PCR و با زمان ۲۰ دقیقه در مرحله طویل‌سازی نهایی تکثیر شد. محصول PCR در غلظت ۱۰/۸ نانوگرم در میکرولیتر پس از تخلیص به‌وسیله DNA لیگاز T_4 (Fermentas)، لیتوانی به

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

ناقل کلونینگ pTZ57R/T (Fermentas)، لیتوانی متصل و پلاسمید T/A-Sap2 بود. پلاسمید حاصل درون باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) ترانسفورم شد. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط LB آگار (Luria Bertani agar) حاوی آمپی‌سیلین (Ampicillin) رشد کرد. ناقل نوترکیب پس از استخراج، تعیین توالی (Sequencing) شد. توالی صحیح ژن Sap_2 توسط تعیین ترادف هر دو رشته (Double-strand sequencing) و با آغازگرهای عمومی (Universal) تأیید شد. هضم آنزیمی با همان آنزیم‌های *Eco*R1 و *Sac*II، Colony-PCR و تعیین توالی همگی تأیید بر اثبات ژن Sap_2 بود.

۲-٤- تراریختی (Transgenic) درون مخمر پیکیا پاستوریس

ناقل استفاده شده در این تحقیق pGAPZαA (Invitrogen) است. این ناقل دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک زئوسین است. این ناقل دارای دم پلی‌هیستیدین و اپی‌توپ C-myc بوده که به‌ترتیب برای تخلیص و تأیید وجود پروتئین ترشحی نوترکیب استفاده می‌شود. به‌منظور ساب‌کلونینگ قطعه ژنی مورد نظر از ناقل T/A به داخل ناقل بیانی pGAPZαA و با توجه به وجود کدون آغاز در آغازگر فرادست، دو آنزیم برشی محدودالاثر در دو طرف منطقه ورود ژن در ناقل T/A انتخاب شد. بدین منظور سازه نوترکیب T/A-Sap_2 و نیز ناقل بیانی pGAPZαA به کمک آنزیم‌های محدودالاثر *Eco*R1 و *Sac*II (Takara) (۱۵ واحد در هر میکرولیتر) بریده شدد. سپس واکنش الحاق با نسبت ۵ به ۱ از غلظت ۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از pGAPZaA و محصول PCR برابر ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T_4 (Fermentas) در دمای ۱٦ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از آن محصول واکنش اتصال به سلول‌های باکتریایی مستعد اشرشیاکلی سویه XL1-Blue وارد شد. ناقل نوترکیب Sap_2+pGAPZαA درون باکتری تکثیر شد.

باکتری‌های ترانسفورم شده قادر به رشد در محیط LB حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک زئوسین بود. پس از استخراج از درون باکتری به‌منظور ترانسفورم در مخمر پیکیا پاستوریس، Sap_2+pGAPZαA با آنزیم اختصاصی *BspH*1 (Fermentas) (۲۵ واحد در هر میکرولیتر) خطی شد. این آنزیم ناقل فوق را در محل پروموتور آن که برای انجام نوترکیبی همولوگ ضروری است، برش می‌دهد. برای حساس‌سازی مخمر پیکیا پاستوریس، سویه مخمری درون محیط YPD به‌مدت یک شبانه روز کشت داده شد و سپس وکتور نوترکیب به روش Litium acetate/ssDNA/PEG به داخل مخمر حساس شده انتقال داده شد [۱۸]. مخمرهای ترانسفورم شده روی پلیت‌های YPD حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۲۰ گرم پپتون (Peptone) و ۲۰ گرم گلوکز در یک لیتر از محیط به همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زئوسین در ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ روز کشت داده شد و کلونی‌ها تشکیل شد.

۲-۵- تأیید انجام نوترکیبی هومولوگ

برای تأیید ادغام ژن Sap_2 به درون ژنوم پیکیا پاستوریس، DNA کروموزمی پیکیا پاستوریس به روش DNA fast استخراج [١٦] و با استفاده از آغازگرهای AOX1 و pGAP که مکمل با مناطق همولوگ با ژنوم پیکیا می‌باشد، PCR انجام و باند ۱۸۰۰ جفت‌بازی مورد انتظار به‌دست آمد. کلون‌هایی از مخمر با ترانسفورم ناموفق که ژن Sap_2 موفق به ادغام درون آن‌ها نشده بود، باند ٦۰۰ جفت‌بازی داشتند.

جلویی pGAP: 5′-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3′

برگشتی AOX1: 5′-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3′

ترادف pGAP (پروموتور گالاکتوز) هم روی ناقل pGAPZαA و هم روی ژنوم مخمر پیکیا پاستوریس موجود است و محل انجام نوترکیبی همولوگ بین ناقل نوترکیب pGAPZαA به‌همراه ژن وارد شده Sap_2 است. ترادف AOX1 روی ناقل قرار دارد. بین دو ناحیه ذکر شده محل

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

ورود ژن Sap_2 است. آغازگرهای طراحی شده فوق درست در ناحیه قبل و بعد از ژن الحاقی روی ژنوم مخمر قرار داشته و بنابراین در صورت انجام صحیح نوترکیبی همولوگ، محصول PCR باید شامل ترادف ژن وارد شده درون مخمر (Sap_2) و ترادف‌های مربوط به دو ناحیه AOX1 و pGAP باشد. واکنش PCR به تعداد ۳۰ چرخه در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱ میکروگرم از DNA ژنومی مخمر و غلظت Mg^{2+}، ۱/۷۵ میکرومولار انجام شد.

۲-۶- تأیید بیان پروتئین نوترکیب

بیان SAP_2 در مخمر پیکیا پاستوریس به‌وسیله SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) و وسترن بلاتینگ (Western Bloting) تأیید شد. ٦٠ میکرولیتر از محلول رویی محیط کشت حاوی اسید پروتئیناز کاندیدا آلبیکنس به‌وسیله SDS-PAGE جدا و پروتئین‌ها ازروی ژل به غشای نیتروسلولزی ۰/٤٥ میکرومتر با استفاده از سیستم Minitrans blot (Sigma) منتقل شد. سپس غشاها با محلول شستشو [بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) حاوی کلرید سدیم، کلرید پتاسیم و فسفات دی سدیک به همراه توئین ۲۰ (Tween 20)] شسته و درون محلول بلوکه کننده (بافر PBS به همراه سرم آلبومین گاوی) برای ۱ ساعت انکوبه شد. غشاها بریده و با آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-Sap2p موش برای یک ساعت در درجه حرارت اطاق و برای یک شب در ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از شستشو با Anti-IgG کونژوگه شده با پراکسیداز انکوبه شد. بعد از آن با H_2O_2 و دی‌آمینو بنزن (Diaminobenzidine: DAB) انکوبه شد تا باندها مشاهده شود.

۲-۷- تخلیص پروتئین SAP_2 نوترکیب با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل

یک کلون از مخمر نوترکیب پیکیا پاستوریس ترشح کننده آنزیم SAP_2 در ۵۰ میلی‌لیتر محیط YPD حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۲۰ گرم پپتون و ۲۰ گرم گلوکز در یک لیتر به‌مدت ٤ شبانه‌روز در ۳۰ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط هوازی کشت داده شد. بعد از رسوب مخمرها، ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت به‌وسیله فیلترهای آمیکون (Amicon filter) با سطح حداقل (Cut off) ۱۰۰۰۰ mw (Molecular weight) به ۱۰ میلی‌لیتر تغلیظ شد. به‌وسیله NaOH ٦ مولار pH محیط کشت از pH=۳ به pH=۷ رسانده شد. بعد از دیالیز برای ۱۲ ساعت با بافر سدیم سیترات ۱۰ میلی‌مولار و pH=۸/٦، ماده تغلیظ شده به ستون Agaros Nickel His- Ni-NTA (select) منتقل شد. در ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی (Ni-NTA) (Qiagen، آلمان) پروتئین‌های حاوی His-tag با تمایل بالا به آن متصل می‌شود. ستون در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و در حالت به هم زدن به‌مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شد تا اتصال پروتئین مورد نظر با یون‌های نیکل صورت گیرد. در این فرایند باند پروتئینی مورد نظر، به‌وسیله ایمیدازول (Imidazole) (با غلظت ۲۵۰-٤۰۰ میلی‌مولار) از ستون خارج شد. در پایان فرایند تخلیص محصول به کمک SDS-PAGE ۱۲ درصد و وسترن بلاتینگ تأیید و مقدار محصول به‌دست آمده با روش برادفورد (Bradford) سنجیده شد.

۲-۸- بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم SAP_2

آنزیم SAP_2 یک پروتئاز بوده و دارای سوبسترا‌های متعددی از قبیل کازئین (Casein) و BSA است. در این تحقیق برای بررسی فعال بودن آنزیم تولیدی از سوبسترای BSA استفاده شد. محلول ۲۷۰ میکرولیتر از BSA ۱ درصد (وزنی/حجمی: W/V) در بافر KCl ۵۰ میلی‌مولار با pH=۵/۳ تهیه و به آن ۲۲۵ میکرولیتر (۳۰ میکروگرم) از محلول حاوی آنزیم تخلیص شده اضافه شد. نمونه کنترل منفی، سوبسترای BSA بدون آنزیم فوق است. بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برای ۱ ساعت فعالیت آنزیمی با افزودن ۷۰۰ میکرولیتر TCA (Trichloro Acetic acid) ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) متوقف و پروتئین‌های هضم نشده با سانتریفوژ

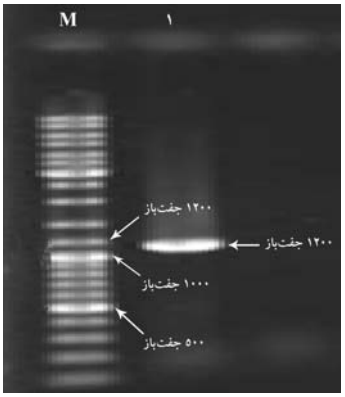
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

در ۵۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه رسوب داده شد. آنزیم SAP_2 باعث تجزیه پروتئین BSA می‌شود. پروتئولیز با کمک افزایش جذب محلول رویی (Supernatant) در OD (Optical Density) ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد (Unit) فعالیت آنزیم SAP به این صورت تعریف می‌شود: مقداری از آنزیم که نیاز است تا OD نمونه را ۰/۱ برای ۱ ساعت افزایش دهد [۱۹].

۳- نتایج

۳-۱- نتایج PCR

محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و باند اختصاصی حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز مشاهده شد (شکل ۱). قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با توالی ژن در NCBI هم‌خوانی دارد. محصول PCR مربوط به سویه ایزوله شده پس از تکثیر و مشاهده روی ژل آگارز، با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل، تخلیص شده و برای تعیین توالی به شرکت microgen کره جنوبی ارسال شد.



شکل ۱ محصول PCR ژن Sap_2 بر روی ژل آگارز ۱ درصد؛ **M)** DNA نشانگر اندازه ۱۰۰-۱۰۰۰۰ جفت‌بازی (۵ میکروگرم در میکرولیتر)، ۱) باند مربوط به ژن Sap_2 با اندازه ۱۲۰۰ جفت‌باز

نتیجه تعیین توالی دو طرفه ژن کلون شده، هیچ‌گونه جهشی را در جایگاه فعالیت (Active site) و اتصال (Binding site) و بقیه قسمت‌های ژن نشان نداد.

۳-۲- نتایج کلونینگ و ساب‌کلونینگ

کلونینگ ابتدا در ناقل T/A انجام شد. محصول درج ژن در ناقل T/A را، به داخل باکتری اشرشیاکلی سویه blue XL1 ترانسفورم شد که در تمام کلونی‌هایی که توسط Colony-PCR کنترل شد، قطعه مورد نظر وجود داشت. برای تأیید بیشتر از یکی از کلونی‌ها، پلاسمید استخراج شد. پلاسمید نوترکیب با دو آنزیم *Eco*R1 و *Sac*II که برای کلونینگ استفاده شده بود، هضم شد. خروج قطعه با طول حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز نشان‌دهنده کلون شدن قطعه در ناقل است. سپس محصول هضم با *Eco*R1 و *Sac*II بعد از تخلیص از ژل به داخل pGAPZαA که با *Eco*R1 و *Sac*II هضم شده بود، کلون شد. تعیین توالی، سازه نوترکیب را تأیید کرد.

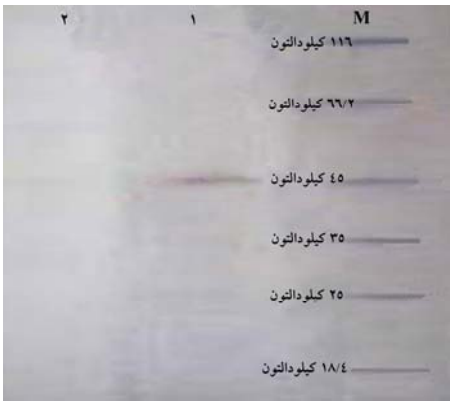
پس از ترانسفورم ناقل درون مخمر، تنها کلونی‌های مخمری مقاوم به زئوسین روی محیط YPD رشد نمود. استخراج DNA ژنومی مخمر و انجام PCR با آغازگرهای AOX1 از روی DNA ژنومی پس از قرارگیری درون پلاسمید درون آن نشان‌دهنده باند ۱۸۰۰ جفت‌بازی حاصل از نوترکیبی همولوگ است. کلونی‌هایی از مخمر با ترانسفورم ناموفق که ژن Sap_2 داخل آن نشده، باند ۶۰۰ جفت‌بازی داشتند (شکل ۲).

شکل ۲ PCR از روی DNA ژنومی مخمر با استفاده از آغازگرهای AOX1؛ **M)** DNA نشانگر اندازه ۱۰۰-۱۰۰۰۰ جفت‌بازی (۵ میکروگرم در میکرولیتر)، **۱)** باند ۶۰۰ جفت‌بازی مربوط به کنترل منفی (ژنوم مخمر بدون ژن داخل شده)، **۲)** باند ۱۸۰۰ جفت‌بازی مربوط به ژنوم مخمر همراه با ترانسفورم موفق (ژن داخل شده)، مشاهده باند ۱۸۰۰ جفت‌بازی تأیید ترانسفورم ژن Sap_2 درون ژنوم مخمر پیکیا پاستوریس است (۱۲۰۰ جفت‌باز مربوط به ژن Sap_2 و ۶۰۰ جفت‌باز مربوط به نواحی هومولوگ روی ژنوم مخمر)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

۳-۳- بیان ژن Sap_2

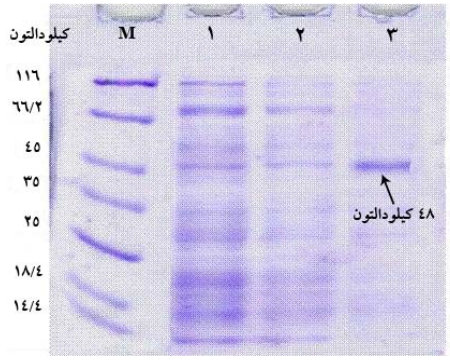
برای تأیید محصول پروتئینی SAP_2 از روش وسترن بلاتینگ توسط آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد SAP_2 استفاده شد. در این آزمایش چون برای ظهور باندها از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد SAP (Takara) متصل شده به یک آنزیم استفاده شد، میان‌کنش اختصاصی آنتی‌بادی، حضور پروتئین مورد نظر را تأیید کرد (شکل ۳).



شکل ۳ وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی منوکلونال علیه Sap_2؛ **M)** نشانگر پروتئینی ۱۴/۴، ۱۸/۴، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۶۶/۲ و ۱۱۶ کیلودالتون (Fermentase#RD 0431)، **۱)** عصاره محیطی پیکیا پاستوریس حاوی سازه که باند ۴۸ کیلودالتون دارد. **۲)** عصاره محیطی پیکیا بدون سازه (کنترل منفی)

۳-۴- تخلیص پروتئین SAP_2

پس از اطمینان از وارد شدن پلاسمید داخل ژنوم مخمر و مشاهده باند پروتئینی روی SDS-PAGE، کلونی که حاوی ژن Sap_2 در ژنوم آن بود رشد داده شد و پروتئین SAP_2 تخلیص شد. به انتهای کربوکسیل پروتئین SAP_2، ۶ اسیدآمینه هیستیدین اضافه شده که برای تخلیص به روش IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography) (با استفاده از ستون Ni-NTA) استفاده شد. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت YPD با یک کلون از مخمر نوترکیب پیکیای ترشح‌کننده آنزیم SAP_2 به‌مدت ۴ شبانه‌روز کشت داده شد. بعد از رسوب مخمرها، ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت توسط فیلترهای آمیکون به ۱۰ میلی‌لیتر تغلیظ یافت و در نهایت پروتئین نوترکیب SAP_2 توسط ستون تخلیص جدا شد. تعیین مقدار پروتئین، با آزمون برادفورد توسط اسپکتروفتومتر در OD ۲۸۰ نانومتر نشان داد که غلظت پروتئین به‌دست آمده برابر با ۰/۱±۷۵ میلی‌گرم در یک لیتر است (شکل ۴).



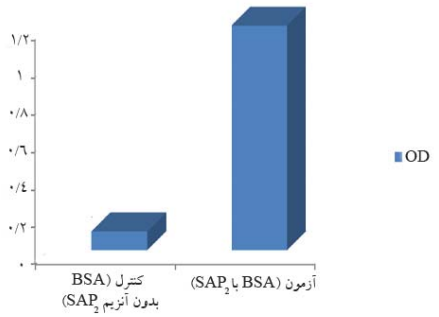
شکل ۴ تخلیص پروتئین Sap_2 روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد، رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بریلیانت بلو؛ M) نشانگر پروتئینی ۱۴/۴، ۱۸/۴، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۶۶/۲ و ۱۱۶ کیلودالتون، **۱)** خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۵۰ میلی‌مولار، **۲)** خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار، **۳)** خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار

۳-۵- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SAP_2 نوترکیب

برای اطمینان از فعال بودن آنزیم و مشخص کردن این که آنزیم تخلیص شده ساختار خود را طی تخلیص از دست نداده است، فعالیت آنزیم در لوله آزمایش اندازه‌گیری شد. مقدار تجزیه شدن سوبسترای BSA توسط SAP_2 با اسپکتروفتومتر در OD ۲۸۰ نانومتر بررسی شد. در لوله آزمایش که حاوی سوبسترا و آنزیم SAP_2 است، این آنزیم باعث تجزیه پروتئین‌های BSA شد و پپتیدهای کوچک حاصل شد. در لوله کنترل، تنها سوبسترای BSA بوده و آنزیم وجود ندارد. بنابراین با افزودن TCA به نمونه‌ها، سوبسترا و آنزیم رسوب و تنها پپتیدهای کوچک حاصل از پروتئولیز با اسپکتروفتومتر قابل بررسی هستند. بر مبنای آن‌که یک واحد فعالیت آنزیم SAP مقداری از آنزیم که نیاز است تا OD نمونه را به میزان

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

۰/۱ افزایش دهد، مقدار فعالیت آنزیم نوترکیب حاصل، ۳ واحد به ازای ۱ میکرولیتر (۰/۰۷۵ میکروگرم) آنزیم است (نمودار ۱). نتایج نشان داد که آنزیم در مقایسه با گروه کنترل فعالیت بالایی دارد. قابل ذکر است که فعالیت آنزیم خالص ۱۱ برابر نمونه کنترل منفی است که این نشان‌دهنده فعالیت بالای آنزیم تخلیص شده از سیستم یوکاریوتی است.



نمودار ۱ بررسی فعالیت پروتئولیتیکی SAP_2 با منحنی Excel؛ **ستون ۱)** نمونه کنترل منفی حاوی سوبسترا بدون آنزیم است. **ستون ۲)** محلول حاوی ۲۲۵ میکروگرم آنزیم تخلیص شده که باعث پروتئولیز BSA می‌شود. مقدار فعالیت آنزیم نوترکیب حاصل، ۳ واحد به ازای ۱ ماکرولیتر (۷۵ میکروگرم) آنزیم است.

٤- بحث

بیماری‌زای فرصت‌طلب کاندیدا آلبیکنس آنزیم SAP تولید می‌کند که این مخمر را قادر به استفاده از پروتئین‌های محیط به‌عنوان منبعی از نیتروژن می‌نماید و باعث رشد مخمر و بیماری‌زایی آن می‌شود [۱۲]. سوبستراهای زیست‌شناسی آنزیم‌های SAP فراوان بوده و شامل سرم آلبومین انسان (BSA)، کراتین، کلاژن، لاکتوفرین (Lactoferrin) و ایمنوگلوبولین‌های ترشحی (IgA که در حالت طبیعی به پروتئازهای باکتری مقاوم است) است. این آنزیم‌ها توسط قارچ برای تجزیه بافت‌های خارجی، جلوگیری از سیستم دفاعی میزبان و برای به‌دست آوردن آمینواسیدهایی که برای متابولیسم مخمر نیاز است به‌کار می‌روند. در تحقیقات قبلی ثابت شده که کاندیدا آلبیکنس نیازمند آنزیم‌های SAP در ایجاد کاندیدیازیس است. وجود این آنزیم‌ها با مراحل مختلف نفوذ به بافت میزبان و در نتیجه بیماری‌زایی ثابت شده است. بنابراین این آنزیم‌ها می‌توانند هدف خوبی برای توسعه دارو علیه این مخمر باشند [۲۰]. در این مطالعه برای اولین بار کلونینگ، بیان و تخلیص ژن کدکننده SAP_2 کاندیدا آلبیکنس در سیستم یوکاریوتی پیکیا پاستوریس انجام گرفت. این بررسی به‌منظور فراهم آوردن زمینه مطالعات آنزیمی، مهندسی پروتئین و ایمنولوژیکی از مهم‌ترین فاکتور بیماریزایی کاندیدا آلبیکنس (SAP_2) انجام شد. با وجود مزیت‌های زیاد سیستم بیانی اشرشیاکلی، اما به دلیل عدم توانایی در انجام اصلاحات پس از نسخه‌برداری نظیر حذف اینترون‌ها و تغییرات پس از ترجمه این سیستم برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی مثل پروتئین SAP_2 مناسب نیست. از طرفی بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول پستانداران نیز بسیار پرهزینه بوده و نیازمند تجهیزات کشت سلولی است.

بیان نمودن در مخمر متیلوتروف (Methylotroph) پیکیا پاستوریس علاوه بر دارا بودن مزایای سیستم باکتریایی مانند داشتن محیط کشت ارزان و فاقد سرم، سهولت در افزایش مقیاس تولید و القای کنترل شده، مزایای سیستم‌های یوکاریوتی شامل سطح بیان بالا، اصلاحات پس از نسخه‌برداری و ترجمه را نیز دارا است که این سیستم را برای تولید بهینه پروتئین‌های یوکاریوتی منحصر به فرد می‌سازد [۲۱]. در تحقیق حاضر برای اولین بار از ناقل مخمری (pGAPZαA شاتل ناقل طراحی شده برای مخمر پیکیا پاستوریس) برای تولید SAP_2 استفاده شده است. این ناقل حاوی ناحیه کدکننده علامت ترشحی آلفا برای خارج‌سازی پروتئین بیان شده در مخمر است. استفاده از این علامت ترشحی [آلفا فاکتور مشتق شده از ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*)] درون ناقل مخمری pGAPZαA، پروتئین نوترکیب را قادر می‌سازد تا در مسیری از ترشح هدایت شود که در آن تشکیل باندهای دی‌سولفیدی و گلیکوزیلاسیون می‌تواند قبل از ترشح پروتئین نوترکیب به

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

داخل محیط کشت صورت پذیرد. این ناقل همچنین دارای نواحی همولوگ با ژنوم مخمر بوده که آن را قادر به انجام نوترکیبی همولوگ می‌نماید. ناقل مخمری pGAPZαA ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک زئوسین و نشانگر (Marker) مخمری هیستیدین را نیز دارد که به آن اجازه رشد در محیط مخمری بدون هیستیدین را می‌دهد [۲۲]. درآزمایش‌های کلون کردن با هدف بیان ژن نوترکیب، به علت آن‌که بازده ترانسفورماسیون محصول الحاق به سویه بیانی، پایین است (به‌ویژه در حالتی که پروتئین نوترکیب بیان شده، دارای اثر سمّی بر سلول باشد) توصیه می‌شود که محصول الحاق ابتدا به سویه‌ای که پلاسمید بیانی نوترکیب در آن نمی‌تواند بیان شود، انتقال داده شود [۲۳]. در این تحقیق نیز، به دلیل بروز مشکلات متعدد در فرایند کلونینگ به روش نوترکیبی همولوگ، تصمیم گرفته شد که کلونینگ ابتدا در ناقل T/A به‌منظور کسب غلظت بالایی از پلاسمید نوترکیب و افزایش احتمال کسب آن در تراریخت سویه بیانی پیکیا پاستوریس، انجام شود. تکثیر ژن Sap_2 به‌منظور استفاده در فرایند T/A کلونینگ، با استفاده از آنزیم *Taq* پلیمراز انجام شد. این کار با هدف اضافه شدن نوکلئوتید آدنین به انتهای '۳ محصولات PCR الزامی بود. آنزیم *Taq* پلیمراز با اتکا بر خصوصیت دئوکسی نوکلئوتیدی ترانسفرازی خود و به‌صورت مستقل مبادرت به این کار می‌کند و استفاده از Pfu پلیمراز که فاقد این خصوصیت بود امکان‌پذیر نبود.

تعیین توالی ژن Sap_2 به‌صورت دو طرفه، به‌طور کامل انجام گرفت. دو توالی به‌دست آمده به‌طور مجازی در نرم‌افزار GenRuner ترجمه و مقایسه شدند. نتیجه تعیین توالی دو طرفه ژن کلون شده، هیچ‌گونه جهشی را در جایگاه فعالیت و اتصال و بقیه قسمت‌های ژن نشان نداد.

در مرحله تخلیص استفاده از ستون نیکل- سفارز (Nickel sepharose)، علاوه بر نقش کلیدی در خالص‌سازی پروتئین هدف، امکان حذف پروتئین‌های موجود در محلول رویی سلولی را نیز فراهم آورد. عامل جدا کننده پروتئین‌های نوترکیب از رزین، رقابت مولکول‌های ایمیدازول با جایگاه پلی‌هیستیدینی ادغام شده با پروتئین نوترکیب در اتصال به رزین‌های ستون است. در نهایت غلظت بالای ایمیدازول در بافر رقیق‌سازی، جدا شدن پروتئین نوترکیب را باعث می‌شود. ژل الکتروفورز از پروتئین خالص شده باند مورد انتظار در حدود ٤٨ دالتون را نشان داد. قوی بودن این باند تنها می‌تواند حکایت از اتصال محکم آن‌ها در مرحله تزریق نمونه به ستون داشته باشد و این امر مستلزم حضور برچسب پلی‌هیستیدینی (6XHis) است. برچسب هیستیدینی به‌منظور سهولت در تخلیص پروتئین است. این برچسب امکان تخلیص پروتئین اتصالی (Fusion protein) را به‌وسیله ستون IMAC فراهم می‌آورد [٢٤]. براساس نوع پروتئین، برچسب هیستیدینی به انتهای آمینی یا کربوکسیلی متصل می‌شود. قرار دادن برچسب در یک انتها ممکن است باعث پوشیده شدن آن در اثر تاخوردن پروتئین شود. در چنین مواردی برچسب را به انتهای دیگر پروتئین متصل می‌کنند. براساس مطالعات قبلی، متصل کردن برچسب هیستیدینی به انتهای کربوکسیل پروتئین SAP_2 در باکتری اشرشیاکلی تخلیص آن به روش واسرشته را امکان‌پذیر می‌کند [۲۵]. نکته قابل ذکر آن است که استفاده از ستون IMAC منجر به خلوص ۱۰۰ درصد پروتئین نمی‌شود؛ زیرا سلول پروتئین‌های غنی از هیستیدین دارد که به‌طور غیراختصاصی به ستون متصل می‌شوند. این مسئله در سیستم‌های یوکاریوتی شدیدتر است؛ چرا که یوکاریوت‌ها پروتئین‌های غنی از هیستیدین بیشتری دارند. به همین علت در سلول‌های یوکاریوتی برای کاستن از پروتئین‌های غیراختصاصی، شرایط اتصال به ستون و شستشو با افزایش غلظت NaCl تا ۲ مولار و افزودن دترجنت‌ها (Detergents) مانند توئین ۲۰ سخت‌تر می‌شود [٢٦]. در مطالعه حاضر نیز تخلیص پروتئین اتصالی SAP_2 با مشکل پروتئین‌های غیراختصاصی مواجه بود که با تغییر شرایط تخلیص تا حدی از این مشکل کاسته شد. پروتئین متصل شده به ستون IMAC از طریق کاهش pH یا افزایش غلظت ایمیدازول خارج می‌شود. از آن‌جایی که تأثیر تغییرات pH روی ساختار پروتئین SAP_2

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

مشخص نبود، از روش دوم که مبنی بر افزایش غلظت ایمیدازول بود، استفاده شد.

نمونه خارج شده از ستون در واکنش با آنتی‌بادی مونوکلونال علیه SAP_2، باند قوی در وسترن بلاتینگ نشان داد. این پروتئاز نوترکیب قادر به هضم پروتئین BSA در شرایط لوله آزمایش بود. همچنین میزان پروتئین SAP تولید شده در سیستم بیانی پیکیا در این تحقیق حدود هشت برابر بیشتر در مقایسه با سیستم بیانی اشرشیاکلی [۲۷] تولید را نشان داد.

با توجه به نکات ذکر شده، استفاده از مخمر پیکیا پاستوریس یک سیستم بیان مناسب برای نشان دادن نقش پروتئین SAP_2 در ایجاد بیماری در صورت وجود نداشتن دیگر عوامل مستعد کننده است. در بررسی حاضر یک سیستم بیانی تولید دایم پروتئین فعال SAP_2 در مقادیر بالابه‌دست آمد که برای مطالعه بیماری‌زایی در مدل‌های حیوانی مناسب است. این آنزیم تولید شده در پیکیا پاستوریس خود فعال بوده و قادر به هیدرولیز BSA است که مثالی از انواع پروتئین‌های میزبان به‌عنوان منبع نیتروژن است. انتظار می‌رود با افزایش هر چه بیشتر مطالعه در زمینه بررسی اثر پروتئین SAP_2 بر بیماری‌زایی کاندیدا آلبیکنس، اطلاعات هر چه مفیدتری در زمینه درک چهره واقعی فعالیت این عامل بیماری‌زا به‌دست آید تا در آینده بتوان از آن برای تهیه واکسن، کیت‌های تشخیصی و سایر مطالعات بهره برد. همچنین در سال‌های اخیر، به‌علت استفاده زیاد از داروهای ضد قارچی در کشور، مقاومت دارویی به‌خصوص در مورد داروهای آزولی (Azol) بسیار نگران‌کننده، شده است. در این راستا تحقیق حاضر می‌تواند به‌عنوان منبعی برای به‌دست آوردن داروی اختصاصی و هدف علیه عامل بیماری‌زای SAP_2 باشد. مطالعات انجام شده نیز بیانگر آن است که در مخمر بیماری‌زای کاندیدا آلبیکنس خانواده پروتئینی SAP در حد بالایی حفظ شده است و می‌تواند به‌عنوان کاندیداهای مهمی برای ساخت واکسن مطرح شوند [۲۸]. به‌علاوه در مطالعات آینده می‌توان با داشتن چنین سیستم بیانی بالا از تولید پروتئین حاضر، در جهت شناخت خواص ایمنولوژیکی، فیزیولوژیکی، داشتن نقش در پاتوژنیسیتی، فرایندهای سلولی و بررسی خاصیت چسبندگی به عوامل سرمی نظیر لاکتوفرین، فیبرینوژن، کلاژن و ... بهره برد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه تربیت مدرس، حمایت‌کننده این پروژه، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

٦- منابع

[1] Anassie EJ, MacGinnid MR, Pfaller MA. Candida virulence factors. In: Anassie EJ, MacGinnid MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. Churchil Livingstone Elsivier UK, New York, 2003; p: 203-24.

[2] De Melo AC, Dornelas-Ribeiro M, De Souza EP, Macrae A, Fracalanzza SE, Vermelho AB. Peptidase profiles from non-albicans Candida spp. isolated from the blood of a patient with chronic myeloid leukemia and another with sickle cell disease. FEMS Yeast Res 2007; 7(6):1004-12.

[3] Smolenski G, Sullivan PA, Cutfield SM, Cutfield JF. Analysis of secreted aspartic proteinases from Candida albicans: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes. Microbiol 1997; 143(Pt 2): 349-56.

[4] Dabas N, Morschhäuser J. A transcription factor regulatory cascade controls secreted

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

isolates in Taiwan. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 3): 249-58.

[11] Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M. Rapid detection of Candida albicans in clinical samples by DNA amplification of common regions from C. albicans-secreted aspartic proteinase genes. J Clin Microbiol 1998; 36(2): 395-401.

[12] White TC, Agabian N. Candida albicans secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. J Bacteriol 1995; 177(18): 5215-21.

[13] Morrow B, Srikantha T, Soll DR. Transcription of the gene for a pepsinogen, PEP1, is regulated by white-opaque switching in Candida albicans. Mol Cell Biol 2006; 12(7): 2997–3005.

[14] De Bernardis F, Cassone A, Sturtevant J, Calderone R. Expression of Candida albicans SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. Infect Immun 1995; 63(5): 1887-92.

[15] Borelli C, Ruge E, Schaller M, Monod M, Korting HC, Huber R, Maskos K. The crystal structure of the secreted aspartic proteinase 3 from Candida albicans and its complex with pepstatin A. Proteins 2007; 68(3): 738-48.

[16] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning.3th ed, CSHL Press, New York, 2001;1145-7.

[17] Simpson R, Adams P, Golemis E. Basic Methods in Protein Purification and Analysis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2008; 400-5.

[18] Cereghino GP, Cregg JM. Applications of yeast in biotechnology: protein production and aspartic protease expression in Candida albicans. Mol Microbiol 2008; 69(3): 586-602.

[5] Kalkanci A, Bozdayi G, Biri A, Kustimur S. Distribution of secreted aspartyl proteinases using a polymerase chain reaction assay with SAP specific primers in Candida albicans isolates. Folia Microbiol (Praha) 2005; 50(5): 409-13.

[6] Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsichlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B. Quantitative expression of the Candida albicans secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. Microbiol 2008; 154(Pt 11): 3266-80.

[7] Ray TL, Payne CD. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for Candida acid proteinase. Infect Immun 1988; 56(8): 1942-9.

[8] Taylor BN, Hannemann H, Sehnal M, Biesemeier A, Schweizer A, Röllinghoff M, Schröppel K. Induction of SAP7 correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice. Infect Immun 2005; 73(10): 7061-3.

[9] Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in Candida species. Mol. Microbiol 2004; 13(2): 357-68.

[10] Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of Candida albicans clinical

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

genetic analysis. Curr Opin Biotechnol 1999; 10(5): 422-7.

[19] Dubois N, Colina AR, Aumont F, Belhumeur P, de Repentigny L. Overexpression of Candida albicans secretory aspartyl proteinase 2 and its expression in Saccharomyces cerevisiae do not augment virulence in mice. Microbiol 1998; 144(Pt 8): 2299-310.

[20] Cutler JE. Putative virulence factors of Candida albicans. Annu Rev Microbiol 1991; 45:187-218.

[21] Romans A, Scorer A, Clare J. Foreign gene expression in yeast. a review. Yeasst 1992; 8: 423-88.

[22] Invitrogen. Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. http://www. invitrogen.com/site 2008; Cat. V200 20 and V205 20, 11th edition.

[23] Saeedinia A, Shamsara M, Bahrami A, Zeinoddini M Naseeri-Khalili M, Mohammadi R, Malek Sabet N, Sami Hosseinali. Heterologous Expression of Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor in Pichia pastoris. Biotechnol 2008; 7(3): 569-573.

[24] Lee S, Choi J, Kwon S. Cloning, expression, and characterization of a family B-type DNA polymerase from the hyperthermopilic Crenarchaeon sulfophobococcuc zilligii. Enzyme and Microb Technol 2006; 38: 821-83.

[25] Jochen D, Udo R. high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Mulecular diagno infect discases. 2ed Ed., Humana Press, Clifton, Newjersey, 2004; p: 179-90.

[26] Kurtzman D. Method for producing proteins in transformed Pichia. http://www.Patent strom.us/patents/6258559;us patent issued july10 2001.

[27] Staib P, Lermann U, Blass-Warmuth J, Degel B, Würzner R, Monod M, Schirmeister T, Morschhäuser J. Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in Candida albicans allows isoenzyme-specific inhibitor screening. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(1): 146-56.

[28] Vilanova M, Teixeira L, Caramalho I, Torrado E, Marques A, Madureira P, Ribeiro A, Ferreira P, Gama M, Demengeot J. Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. Immunol 2004; 111(3): 334-42.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]