

تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب اتصالی فریک انتروباکتین

سیدمهدي لاري‌بقال^۱، سيدلطيف موسوي‌گرگوي^{۲*}، ايرج رسولی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- دانشيار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۴/۳۱ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۴/۱۴

چکیده

هدف: باکتری اشرشیاکلی H7: O157: از زیرگروه اشرشیاکلی های خونریزی دهنده داخلی (انترومورازیک اشرشیاکلی) است. این باکتری تولید کننده توکسین شبيه شигا توکسین است که در ايجاد اسهال های خونی، غيرخونی و نشانگان يورمي هموليتیك نقش دارد. نشانگان يورمي هموليتیك يك عامل مهم ناتوانی كليسي در كودکان و بزرگسالان است. ژن *O157:H7* از باکتری اشرشیاکلی *sepA* با ۲۲۴۱ جفت‌بار، پروتئين غشائي به نام پروتئين اتصالي فريک انتروباکتین را کد مي کند که برای جذب فريک انتروباکتین در باکتری اشرشیاکلی ضروري است. در صورت ممانعت از جذب آهن توسط باکتری، می توان ميزبان را از تهاجم آن ايمن نمود. در اين مطالعه تأثير ايمني زيادي پروتئين غشائي FepA بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بهمنظور تهييه پروتئين نوترکیب FepA، پس از کشت باکتری اشرشیاکلی H7:O157:H7: با کمک واکنش زنجیره پلیمراز ژن *sepA* از اشرشیاکلی به طول ۲۲۴۱ جفت‌بار فراوان سازی و سپس روی ناقل بيانی (+) pET28a(+) کلون شد. پس از انتقال سازه نوترکیب به ميزبان اشرشیاکلی سويه BI21DE3، بيان پروتئين مورد نظر توسط غلظت‌های مختلف ايزوپروپيل تيو-تا-دي گالاكتوزيد القا و بهينه‌سازی شد. نتایج بيان با SDS-PAGE بررسی و پروتئين نوترکیب از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی با کمک ستون Ni-NTA تخلیص شد. در نهایت پس از تزريق پروتئين تخلیص شده به موش و تکمیل دوره ایمن‌سازی، تیتر آنتی‌بادی با سنجش الایزا ارزیابی شد.

نتایج: پروتئين نوترکیب با وزن ۸۵ کیلو Dalton تولید و تخلیص شد. تزريق پروتئين به موش‌های Balb/C نشان‌دهنده توان بالاي آن در تحريک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی و نیز توان آنتی‌بادی تولید شده در شناسابی پروتئين اتصالي فريک انتروباکتین که منجر به تقویت مقاومت موش در برابر LD_{50} ۱۰ است.

نتیجه‌گیری: با توجه به توان بالاي آنتی‌بادی نوترکیب در شناسابی پروتئين اتصالي فريک انتروباکتین، امكان استفاده از اين آنتی‌بادی در محدود کردن رشد و توسعه انتروباکترياسه مطرح می شود.

کلیدواژگان: آهن، FepA، اشرشیاکلی H7: O157: آنتی‌بادی

۱- مقدمه

قوی آهن به دست آمده و در حال حاضر با نام سیدروفور (Siderophore) شناخته می‌شوند. باکتری اشرشیاکلی O157: H7: (Escherichia coli)، زیرگروهی از اشرشیاکلی‌های انترومورازیک (Enterohemorrhagic Escherichia coli)

آهن یک نیاز غذایی مهم برای باکتری‌ها است به طوری که باکتری‌ها برای جذب آهن مورد نیاز برای رشد و تکثیر، در فرایند تکامل، قابلیت رقابت با فاکتورهای اتصال به آهن می‌زبانند. این توانایی با تولید کلاتورهای (Chelators)

*نشانی مکاتبه: تهران، بزرگراه خلیج فارس، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، صندوق پستی: ۱۵۹-۱۵۵-۱۸۱ Email: slmousavi@shahed.ac.ir

پری پلاسمیک آن را به انتقال دهنده ABC موجود در غشای سیتوپلاسمی تحويل می دهد و فعالانه از غشای سیتوپلاسمی عبور می کنند [۱۴]. استراتژی های اشرشیاکلی O157:H7 برای غلبه بر استرس آهن، تولید سیدروفور انتروباکتین است که به طور کلی به وسیله همه سویه های اشرشیاکلی در شرایط استرس آهن تولید می شود. برای ورود آهن به داخل سلول، پروتئین فریک انتروباکتین (FepA) نقش کلیدی دارد. پروتئین FepA در غشای خارجی قرار دارد و با مطالعاتی که صورت گرفته، مشخص شده است که این پروتئین دارای لوب های خارج سلولی است که در شناسایی کمپلکس فریک-سیدروفور مؤثر است [۱۵، ۱۶]. بنابراین به نظر می رسد که با تولید و تخلیص این پروتئین نوترکیب بتوان از آن به عنوان یک کاندید احتمالی برای تهیه واکسن استفاده کرد و با تولید آنتی بادی موجب کاهش رشد این باکتری شد. از آنجایی که منبع این باکتری بیشتر دامها هستند و با واکسیناسیون دامها می توان از انتقال آن به انسان جلوگیری کرد؛ بنابراین در این تحقیق بر مبنای فرضیات فوق این پروتئین به صورت نوترکیب تولید و اثر ایمنی زایی آن در مدل آزمایشگاهی مطالعه شد.

۲- مواد و روش ها

باکتری اشرشیاکلی H7: O157: H7 pET28a (پلاسمید Novagen)، ایالات متحده آمریکا) و باکتری اشرشیاکلی Novagen (BL21DE3)، ایالات متحده آمریکا) سویه BL21DE3 (Novagen) در این تحقیق بر مبنای فرضیات فوق این پروتئین به صورت نوترکیب تولید و اثر ایمنی زایی آن در مدل آزمایشگاهی مطالعه شد.

آغازگرهای (Primers) طراحی شده برای واکنش زنجیره ای PCR (Polymerase Chain Reaction: PCR) پلیمراز (Taq DNA polymerase) Taq DNA polymerase) T4 DNA ligase) (T4 DNA ligase) و آنزیم های محدود الایزر EcoRI و SalII از شرکت Fermentas (روسیه) خریداری شدند. کیت تخلیص

تولیدکننده توکسین شیگا (Shiga toxin (Stx2 و Stx1)) است که اصلی ترین توکسین این باکتری محسوب می شود و در ایجاد اسهال های خونی، غیرخونی و نشانگان یورمی همولیتیک (Hemolytic uremic syndrome) نقش دارد. آهن در فتوسترنز، تنفس، چرخه تری کربوکسیلیک اسید، انتقال اکسیژن، تثبیت نیتروژن، متانوژن (Methanogenesis)، تنظیم بیان ژن، و سترن DNA نقش داشته [۱، ۲] و در محلول های آبی به طور ضعیف حل می شود [۳، ۴]. به طور متوسط هر سلول باکتری برای انجام فرایندهای زیستی خود به 10^5 - 10^6 یون آهن احتیاج دارد [۵، ۶] و گاهی میزان آهن تا ۱/۸ درصد وزن خشک سلول افزایش می یابد [۷]. باکتری هایی که در بدن انسان تشکیل کلونی می دهند برای تأمین آهن مورد نیاز خود با یک مشکل جدی رو برو هستند و آن داخل سلولی بودن بیش از ۹۹/۹ درصد آهن بدن انسان است که عملاً از دسترس باکتری خارج است؛ به علاوه این که آهن خارج سلولی که در پلاسما و مایع لنفاوی یافت می شود به شدت در اتصال با ترانسفرین ها (Transferrins) هستند [۸]. باکتری ها برای دسترسی به آهن از مکانیزم های متفاوتی استفاده می کنند. در شرایط هوایی، باکتری ها و قارچ ها انواع لیگاندهای آهن فریک (Ferric iron) با وزن مولکولی کم به نام سیدروفور تولید می کنند [۹]. تاکنون بیش از ۵۰۰ نوع سیدروفور مختلف از نظر شیمیایی شناسایی شده است [۱۰]. برای عبور کمپلکس فریک- سیدروفور از غشای خارجی، باکتری ها نیاز به انرژی و گیرنده اختصاصی دارند. انرژی به وسیله نیترویی محركه پروتونی غشای سیتوپلاسمی تأمین می شود و انتقال آن به غشای خارجی از طریق کمپلکس پروتئینی TonB-ExxB-ExbD صورت می گیرد [۱۱، ۱۲]. باکتری اشرشیاکلی و چندین گونه دیگر خانواده انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) در شرایط فقر آهن سیدروفور انتروباکتین (Enterobactin) ترشح می کنند که به پروتئین غشای خارجی FepA متصل شده و به وسیله آن در فضای پری پلاسمیک آزاد می شود [۱۳]. پروتئین FepB به سیدروفور فریک انتروباکتین متصل و با عبور از فضای

بافر ۱X PCR بوده است. پارامترهای PCR برای تکثیر ژن *fepA* شامل واسرشهته اولیه (Initial Denaturating) در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه ۳ مرحله‌ای شامل واسرشهته شدن (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و پلیمریزاسیون (Polymerization) در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲/۵ دقیقه و در نهایت پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بودند. نتایج PCR پس از الکتروفورز روی ژل آغازر با غلظت ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide: EtBr) در طول موج ۲۶۰ نانومتر مشاهده شدند. پس از بارگذاری محصول واکنش روی ژل آغازر با دمای پایین و استفاده از کیت تخلیص DNA، قطعه مورد نظر تخلیص شد. با استفاده از نرم‌افزار *fepA* CLC جایگاه برش آنزیم‌های محدودالاثر، روی ژن *EcoRI* این ژن را به بررسی و مشخص شد که آنزیم محدودالاثر *EcoRI* با این ژن را به دو قطعه با اندازه‌های ۱۶۱۹ و ۶۲۲ برش می‌دهد و از این روش برای آنالیز اولیه ژن فراوان‌سازی شده، استفاده شد.

۳-۲- ساخت سازواره مولکولی همسانه‌سازی

ژن *fepA*

پلاسمید pET28a و محصول تخلیص شده PCR با دو آنزیم محدودالاثر *BamHI* و *Sall* در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ ساعت به صورت جداگانه هضم شدند، سپس محصولات هضم آنزیمی روی ژل آغازر با دمای پایین بارگذاری شده و با استفاده از کیت تخلیص DNA، قطعات مورد نظر تخلیص شدند. برای انجام واکنش الحق، واکنشی با حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم از قطعه مورد نظر و ۸۰ نانوگرم از پلاسمید هضم شده و ۲ واحد آنزیم *T4* لیگاز DNA با فرآیند *Taq* پلیمراز با غلظت نهایی ۱X در دمای ۱۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. محصول

DNA از ژل و تعیین توالی همسانه‌ها به شرکت تکاپوزیست (Nemaine شرکت Bioneer کره) سفارش داده شده‌اند. ستون میل ترکیبی Ni-NTA از شرکت QIAGEN خریداری شد.

۱-۲- تخلیص DNA الگو

برای کشت باکتری از محیط کشت (Lysogeny broth LB) آبگوشی استفاده شده است. به منظور تخلیص DNA ژنومی، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت به میکروتیوب متقل شد و سلول‌ها به کمک سانتریفوژ جمع‌آوری و در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) حل شد. به سوسپانسیون سلولی ۳۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS: Sodium dodecyl sulfate) ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر پروتیناز K اضافه و برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl (Cetyl trimethylammonium bromide) (۴ درصد NaCl و ۱۰ درصد CTAB) به مخلوط اضافه و ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در نهایت DNA ژنومی با استفاده از فنل-کلروفرم و تیمار با RNase عاری از DNase تخلیص شد. DNA ژنومی حاصل در بافر TE حل شد و خلوص و غلظت آن با اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۷].

۲-۲- تکثیر ژن *fepA*

فراآن‌سازی ژن *fepA* توسط ۲ آغازگر رفت با توالی ۵'-TAAAGGATCCATGAACAAAGAAGATTC-۳' جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر (*BamHI*) و آغازگر برگشتی ۵'-AGCAGTCGACGAAGTGAGTGTTAC-۳' جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر (*Sall*) صورت پذیرفت. حجم نهایی PCR ۳۰ میکرولیتر که حاوی ۲/۵ مول در لیتر از هر dNTP ۱۵۰ نانومولار در لیتر از هریک از آغازگرها، $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار در مخلوط واکنش، ۲/۵ واحد DNA پلیمراز *Taq*، ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو و

اولتراسونیک (Ultrasonic) با قدرت رزونانس ۷۵ درصد و آمپلیفیکاسیون (Amplification) ۰/۵ در ۶ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای و در حمام یخ لیز شدند. سلول‌های لیز شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۸۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس رسوب حاصل در بافر لیز کننده حاوی SDS-PAGE اوره ۸ مولار به خوبی حل شد و هر کدام با بررسی شدند. در ادامه پروتئین نوترکیب هدف با کمک ستون میل ترکیبی Ni-NTA پس از شستشو با بافرهای شستشو دهنده C با pH=۶/۳ و D با pH=۵/۹ و بافر فروشوبی E با pH=۴/۵ (ترکیب همه بافرهای ذکر شده شبیه به بافر B بوده و تنها pH آن‌ها تنظیم شده است) تخلیص شد و نتایج با SDS-PAGE بررسی شدند و در نهایت غلظت پروتئین با روش لوری (Lowry) اندازه‌گیری شد.

۶-۲- ایمن‌سازی موش‌ها

۲۰ سر موش Balb/C نر با سن ۶-۸ هفتاهی به صورت زیرجلدی و صفاقی با ۱۰ نانوگرم پروتئین نوترکیب تخلیص شده و با حجم مساوی از ادجوانات کامل فرونده (Freund's complete adjuvant) (مؤسسه رازی) ایمن‌سازی شدند. سه یادآور با همان مقدار پروتئین و ادجوانات ناقص به ترتیب با فاصله زمانی سه، پنج و هفت هفته از تزریق اول، تزریق شد. پس از تکمیل دوره تزریق به منظور بررسی تیتر آشی بادی از موش‌ها خون‌گیری انجام شد و پس از جداسازی سرم سنجش الیزای (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) غیرمستقیم در پلیت‌های ۹۶ چاهکی که با پروتئین نوترکیب FepA پوشش داده شده بودند، انجام شد.

ELISA -۷-۲

برای سنجش قدرت واکنش‌دهی آنتی بادی تولیدی بر علیه پروتئین FepA، سنجش ELISA غیرمستقیم در پلیت‌های

واکنش الحاق به باکتری اشرشیاکلی سوسن BL21DE3 با روش شوک حرارتی منتقل شدند و غربال‌گری همسانه‌های حاصل روی محیط LB آگار حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین (Kanamycin) انجام شد. به منظور تأیید همسانه‌سازی، پس از کشت همسانه‌های غربال شده در محیط LB آبگوشتی حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین، تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام شد [۱۸]. با انجام هضم آنزیمی قرار گرفتن قطعه در ناقل پلاسمیدی تأیید و در نهایت با انجام تعیین توالی از همسانه‌ها، صحت همسانه‌سازی تأیید شد. سیستم بیانی ساخته شده pET 28a-FepA *E.coli* BL21DE3 نام‌گذاری شد.

۴-۲- بیان پروتئین نوترکیب هدف

LB pET 28a-FepA *E.coli* BL21DE3 در محیط آبگوشتی حاوی ۶۰ میکروگرم در میکرولیتر کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور (Shaker Incubator) با ۲۰۰ دور در دقیقه هواده‌ی، کشت داده شدند و پس از رسیدن به جذب نوری (OD) ۰/۵ (Optical Density: OD) در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ایزوپروپیل تیو بتا- دی گالاكتوزید (Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranosid: IPTG) با غلظت ۰/۷ میلی مولار القا و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در شیکر انکوباتور با ۲۰۰ دور در دقیقه هواده‌ی انکوبه شدند. در ادامه سلول‌ها با سانتریفوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری و نتایج بیان پروتئین با SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) بررسی شدند.

۵-۲- تخلیص پروتئین نوترکیب

رسوب باکتریایی جمع‌آوری شده از مرحله قبل در بافر لیز کننده B ۱۰۰ NaH_2PO_4 میلی مولار، Tris ۱۰۰ میلی مولار و اوره ۸ میلی مولار) با pH=۸ حل شده و با استفاده از دستگاه

پس از اتمام عمل انتقال، کاغذ نیتروسلولر با محلول Ponceau S رنگ‌آمیزی شد تا از عمل انتقال اطمینان حاصل شود. محل باندهای مربوط به نشانه اندازه مولکولی علامت‌گذاری شد. ستون‌های مربوط به نمونه‌های مختلف از هم جدا و به مدت ۲ ساعت، در داخل بافر ثبیت کننده شناور شدند. بعد از شستشو با بافر PBS-T، آنتی‌بادی اولیه با رقت ۱:۱۰۰ به کاغذهای نیتروسلولز اضافه شد و بعد از ۲ ساعت نگهداری در دمای اتاق و شستشو با بافر PBS-T آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱:۱۰۰ روی کاغذهای بریده شده نیتروسلولز ریخته شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت. کاغذهای نیتروسلولز با بافر DAB شستشو داده شدند و در نهایت محلول DAB (Diaminobenzidine) به صورت تازه تهیه شد و روی کاغذها ریخته شد و پس از ظهور باندها واکنش ظهور با آب مقطر مهار شد. در نهایت از کاغذهای نیتروسلولز عکس تهیه شد.

۳- نتایج PCR - ۱-۳

برای انجام PCR ابتدا ژنوم به روشی که قبلاً ذکر شد استخراج شد. شکل ۱-الف نشان از یکپارچگی و عدم آلوودگی ژنوم تخلیص شده دارد. در شکل ۱-ب محصول PCR ژن DNA با آنزیم *Taq* پلیمراز *fepA* با اندازه مورد انتظار نشان داده شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود طول قطعه به دست آمده در مقایسه با شاهد با اندازه ژن *fepA* (۲۲۴۱ جفت‌باز) هم خوانی دارد که بیانگر تکثیر صحیح ژن است. مشاهده نشدن بندهای غیراختصاصی نشان از اتصال اختصاصی آغازگرها به دو سر ژن هدف است. برای آنالیز اولیه، ژن فراوان‌سازی شده به‌وسیله آنزیم محدود‌الاثر *ECORI* هضم آنزیمی شد که نتیجه در شکل ۱-ب نشان داده است و مطابق انتظار ژن به دو قطعه با اندازه‌های ۶۲۲ و ۱۶۱۹ برش خورد. برای اطمینان بیشتر ژن *fepA* همسانه شده تعیین ترادف شد که نتیجه حاصل با توالی‌های موجود در بانک ژن مطابقت داشت.

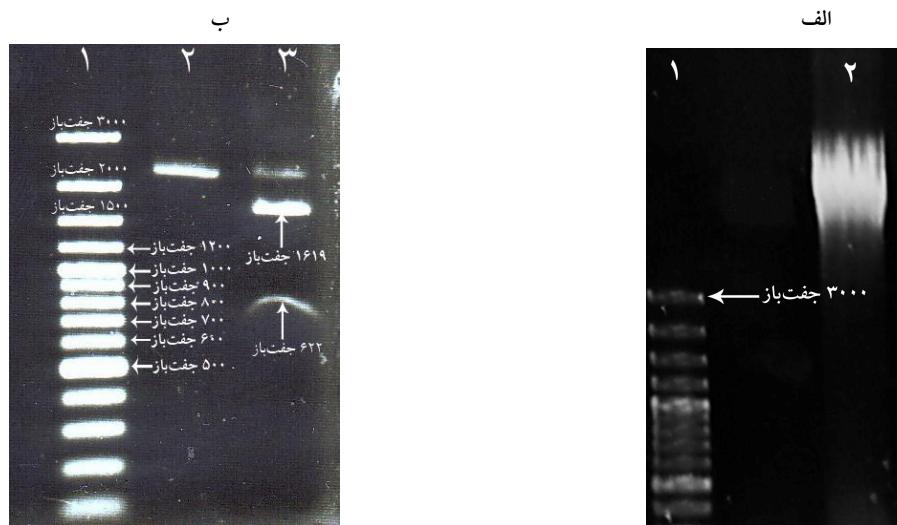
۹۶ چاهکی که با پروتئین نوترکیب FepA (در هر چاهک ۲ میکروگرم) پوشش داده شده بودند، انجام شد. پس از بلاکینگ (Blocking) با ژلاتین ۳ درصد (وزنی به حجمی: w/v) با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۲۰۰ سرم موش‌های این شده به چاهک اول، تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ سریالی از رقت‌ها تهیه شد همین کار برای موش‌های کترول نیز انجام شد. پس از شستشو با بافر PBS-T (Phosphate Buffered Saline-Tween 20) به آنتی‌بادی موشی با رقت ۱:۳۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد و سپس سوبستراتی OPD (O-phenylenediamine dihydrochloride) هیدروژن (H_2O_2) به چاهک‌ها اضافه و بعد از ۱۵ دقیقه، با مهار واکنش با اسید سولفوریک، در طول موج ۴۹۲ نانومتر، شدت رنگ با قرائت‌گر ELISA Reader (ELISA Reader) خوانده شد.

۸-۲- مقایسه بیان پروتئین FepA باکتری اشرشیاکلی O157: H7 در محیط‌های واحد و فقر آهن

به‌منظور بررسی نقش آهن در بیان پروتئین هدف از دو محیط M9 برای محیط فقر آهن و M9 حاوی ۲۰ میکرومولار از Fe_2SO_4 برای محیط حاوی آهن استفاده شد. میزان بیان پروتئین FepA در این دو محیط به‌وسیله لکه‌گذاری وسترن بررسی شد.

۹-۲- انجام لکه‌گذاری وسترن به‌منظور تأیید پروتئین بیان شده

۳۰ میکرولیتر از نمونه‌های مورد نظر که حاوی ۳۰ میکروگرم پروتئین بود به همراه نشانه اندازه مولکولی پروتئینی روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. انتقال بندهای پروتئینی از روی ژل اکریل آمید روی کاغذ نیتروسلولز با ولتاژ ۷۵ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه در تانک وسترن انجام شد.



شکل ۱ ژنوم تخلیص شده اشرشیاکلی H7:O157 با آنزیم *Taq* پلیمراز و محصول PCR ژن *sepA*؛ پانل (الف): ستون ۱) نشانه اندازه مولکولی DNA ladder (DNA مولکولی)، ستون ۲) ژنوم تخلیص شده اشرشیاکلی H7:O157 را نشان می‌دهد. پانل (ب): ستون ۱) نشانه اندازه مولکولی DNA، ستون ۲) محصول PCR ژن *sepA* با آنزیم *Taq* پلیمراز، ستون ۳) نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR

می‌شود پروتئین پس از شستشو و حذف پروتئین‌های غیراختصاصی، با خلوص قابل قبولی پس از فروشوابی با بافر E استحصال شد.

۴- ایمن‌سازی موش‌ها

در نمودار ۱ نتیجه الایزای غیرمستقیم سرم موش‌های ایمن شده علیه پروتئین نوترکیب FepA و موش‌های کنترل مشاهده می‌شود. تیتر آنتی‌بادی در موش‌های دریافت‌کننده پروتئین نوترکیب FepA در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل به خوبی افزایش یافته است.

۵- مواجهه موش‌های ایمن با باکتری O157: H7

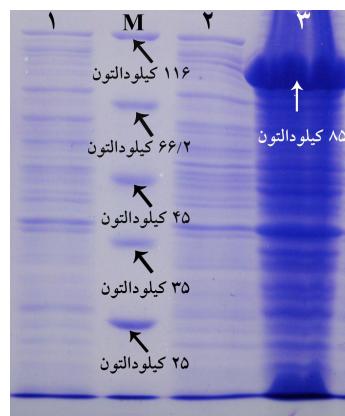
پس از تعیین LD_{50} تزریقی به میزان 10^8 ، تعداد ۲۰ سر موش نر C57BL/6J ایمن شده، با تزریق زیرصفاقی LD_{50} باکتری (10^9 - 10^{14} باکتری زنده) مواجه شدند تا میزان ایمنی آن‌ها بررسی شود.

۲-۳- بیان پروتئین نوترکیب هدف

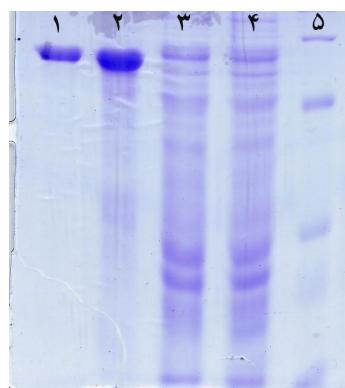
پس از الحاق ژن هدف به ناقل بیانی pET 28a و انتقال آن به سلول میزبان، بیان آن در غلظت‌های مختلف IPTG آزمایش شد. غلظت 0.007 میلی مولار از IPTG توانست به صورت کارآمد سیستم بیانی pET 28a-FepA *E. coli* BL21DE3 را القا کند. پس از لیز سلول و انجام الکتروفورز قسمت عمده پروتئین بیان شده در بخش رسوب سلولی مشاهده شد که نشان دهنده تشکیل اجسام نامحلول در داخل سلول است. نتایج حاصل از پروتئین سنجی نشان داد که پروتئین نوترکیب FepA حدود ۶۰ درصد پروتئین‌های سلول را به خود اختصاص داده است.

۳-۳- تخلیص پروتئین FepA

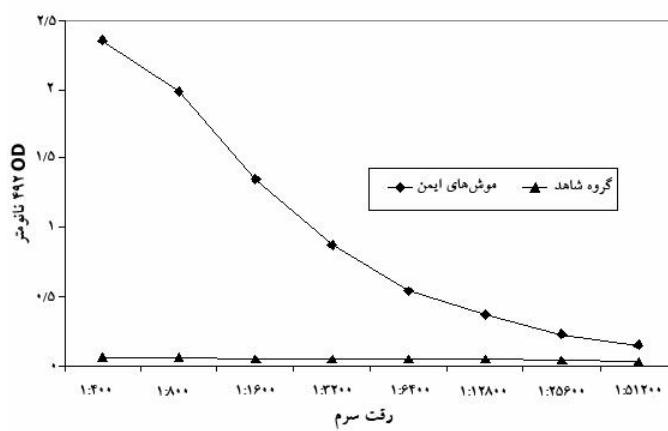
با توجه به این که پروتئین نوترکیب FepA در داخل سلول بیشتر به صورت اجسام نامحلول در می‌آمد، بتراپاین تخلیص آن در شرایط واسرشته، طبق دستورالعمل کیت QIAGEN صورت گرفت. همان‌طور که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده



شکل ۲ بررسی بیان پروتئین نوترکیب FepA روی ژل SDS-PAGE (ژل ۱۰ درصد؛ ستون ۱) نمونه محلول رویی حاصل از لیز سلولی پس از سانتریفوژ، ستون (M) نشانه اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۲) نمونه کنترل قبل از القا، ستون ۳) نمونه رسوب سلولی، پروتئین به صورت اجسام نامحلول تولید شده است.



شکل ۳ بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب FepA با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS-PAGE (۱۰ درصد؛ ستون های ۱، ۲) نمونه خروجی ستون پس از فروشوابی با بافر E، ستون های ۳، ۴) نمونه خروجی ستون پس از بارگذاری محلول حاوی پروتئین نوترکیب، ستون (۵) نشانه اندازه مولکولی پروتئین



نمودار ۱ نتیجه ELISA غیر مستقیم سرم موش های ایمن شده علیه پروتئین نوترکیب FepA.

۴- بحث

فرضیه واکسیناسیون گاو یا تیمار حیوانات با عاملی که سطح کلوبنیزاسیون یا ریزش باکتری اشرشیاکلی H7: O157: H7 را کاهش دهد به طور بالقوه می‌تواند منجر به کاهش در شیوع بیماری متنسب به اشرشیاکلی H7: O157: H7 در انسان شود. برای ورود آهن به داخل سلول، پروتئین فریک انتروباکتین (FepA) نقش کلیدی دارد. پروتئین FepA در غشاء خارجی قرار دارد و یک پروتئین ۸۱ کیلو Dalton است که از اسید آمینه تشکیل شده است. با مطالعاتی که صورت گرفته، مشخص شده است که این پروتئین دارای لوپ‌های خارج سلولی است که در شناسایی کمپلکس سیدروفور-فریک مؤثر است. این گیرنده منومریک از ۲۲ رشته بتای ناهمسو (Antiparallel) (Antiparallel domain) تشکیل شده‌اند. رشته‌های بتای دومن کرک (Cork domain) مجاور به‌وسیله ۱۱ لوپ خارج سلولی بلند که در سطح غشاء خارجی قرار گرفته و ۱۰ پیچ کوتاه چند اسید آمینه‌ای در سمت پری‌پلاسمی به هم‌دیگر ارتباط دارند. لوپ‌های بلند خارج سلولی در تشخیص و اتصال لیگاند شرکت می‌کنند. لوپ‌های بلند خارج غشایی در FepA از ۷ الی ۳۷ آمینو اسید تشکیل شده است [۱۵]. در این تحقیق، با توجه به اهمیت پروتئین FepA باکتری اشرشیاکلی H7: O157: H7 در جذب آهن و ایجاد بیماری از یک سو، و تأثیر آن در این‌زیستی علیه باکتری از سوی دیگر؛ این پروتئین برای تهیه آنتی‌بادی موشی علیه اشرشیاکلی استفاده شد. به‌منظور تهیه پروتئین مذکور به شکل نوترکیب، از سیستم بیانی pET که امکان دستیابی به بیان بالا در اشرشیاکلی و نیز تخلیص یک مرحله‌ای با روش میل ترکیبی نشان هیستیدین را فراهم می‌سازد، استفاده شد. در نهایت پروتئین نوترکیب به مقدار قابل توجه و با خلوص مطلوب به‌دست آمد. در ادامه پس از ایمن‌سازی موش‌ها، با انجام ELISA غیرمستقیم مشخص شد، آنتی‌بادی به خوبی توانایی شناسایی پروتئین نوترکیب FepA را داراست و موش‌های ایمن شده پس از مواجهه با باکتری زنده در مقیاس LD₅₀ ۱۰٪ زنده ماندند. در این موش‌ها آنتی‌بادی تولیدی احتمالاً با

آنالیز پروتئین نوترکیب با آنتی‌بادی چندتبار (Polyclonal) موشی و همچنین واکنش متقاطع آنتی‌زنی بین پروتئین FepA از اشرشیاکلی H7: O157: H7 و آنتی‌سرم پروتئین نوترکیب به روش وسترن‌بلات (Western blot) (انجام شد. از آنجا که روش SDS-PAGE تنها تولید پروتئینی با وزن مولکولی معین را نشان می‌دهد، برای اطمینان از صحبت ماهیت پروتئین تولید شده، از روش لکه‌گذاری وسترن استفاده گردید. این‌زیستی پروتئین نوترکیب به‌وسیله وسترن‌بلات با آنتی‌سرم موش‌ها بعد از تلقیح تأیید شد. آنتی‌بادی چندتبار موشی به‌طور اختصاصی با پروتئین نوترکیب واکنش داد، اما هیچ واکنشی با آنتی‌سرم کنترل منفی مشاهده نشده است (شکل ۴). باکتری اشرشیاکلی رشد یافته در محیط فاقد آهن در مقایسه با محیط واجد آهن دارای باندهای اضافی با وزن مولکولی حدود ۸۱ کیلو Dalton است که نشان می‌دهد این پروتئین در فقر آهن القا می‌شود.



شکل ۴ وسترن‌بلاتیگ پروتئین نوترکیب FepA و پروتئین FepB بیان شده در شرایط فقر آهن توسط باکتری؛ ستون (۱) نشانه اندازه مولکولی پروتئین، ستون (۲) نمونه سوب سلولی بعد از بیان پروتئین نوترکیب FepA، ستون (۳) نمونه تخلیص شده پروتئین نوترکیب FepA، ستون (۴) نمونه سوب سلولی باکتری رشد داده شده در شرایط فقر آهن است. ستون (۵) نمونه سوب سلولی باکتری رشد داده شده در شرایط آهن دار که نشان دهنده عدم بیان این پروتئین در شرایط وجود آهن است.

حاضر است. براساس نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد مکانیسم عمل حفاظتی، فاگوسیتوز باکتری به‌واسطه آنتی FepA باشد؛ هرچند ارزیابی کامل پاسخ‌های اینمی ناشی از واکسیناسیون با FepA نیاز به بررسی و مطالعات بیشتری دارد.

۵- تشكر و قدردانی

بدین‌وسیله از کمیسیون بیوتکنولوژی کشور برای تأمین هزینه‌های این پژوهش و دانشگاه شاهد در اختیار قرار دادن امکانات تحقیقاتی مورد نیاز، تشكر و قدردانی می‌نماییم.

اتصال به باکتری‌ها به صورت اپسونین (Opsonin) عمل کرده‌اند و این عمل مستقیم یا غیرمستقیم با فعال‌سازی سیستم کمپلمان مرتبط بوده است [۱۹]. آنتی‌بادی‌های ضد FepA شاید مانع جذب آهن توسط باکتری‌ها و موجب مرگ آن‌ها شده باشند. پدیده ممانعت جذب آهن از طریق سیدروفورها و ترانسفرین در خصوص گونه‌های سودوموناس (Pseudomonas) و نیسریا (Neisseria) به ترتیب با آنتی‌بادی‌های چندتبار [۲۰] و تکتبار (Monoclonal) [۲۱] مؤثر بر پروتئین‌های غشای خارجی وابسته تنظیمی به آهن (Iron Regulated Outer Membrane Proteins: IROMP) گزارش شده که تأیید‌کننده مکانیسم عمل آنتی‌بادی گزارش

۶- منابع

- [1] Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 881-941.
- [2] Crichton RR. Inorganic biochemistry of iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences. John Wiley & Sons, New York 2001.
- [3] Grass G. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *Biometals* 2006; 19(2): 159-72.
- [4] Shouldice SR, Dougan DR, Williams PA, Skene RJ, Snell G, Scheibe D, Kirby S, Hosfield DJ, McRee DE, Schryvers AB, Tari LW. Crystal structure of *Pasteurella haemolytica* ferric ion-binding protein A reveals a novel class of bacterial iron-binding proteins. *J Biol Chem* 2003; 278(42): 41093-8.
- [5] Braun V, Günter K, Hantke K. Transport of iron across the outer membrane. *Biol Met* 1991; 4(1): 14-22.
- [6] Abdul-Tehrani H, Hudson AJ, Chang YS, Timms AR, Hawkins C, Williams JM, Harrison PM, Guest JR, Andrews SC. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J Bacteriol* 1999; 181(5): 1415-28.
- [7] Rouf MA. Spectrochemical analysis of inorganic elements in bacteria. *J Bacteriol* 1964; 88: 1545-9.
- [8] Bridges KR, Seligman PA. Disorders of iron metabolism. In: *Blood Principles and Practice of Hematology*. Edited by Handlin RI, Lux SE, Stossel TP. London: JB Lippincott Company; 1995:1433-72.
- [9] Crosa JH, Mey AR, Payne SM. Iron Transport in Bacteria. ASM Press, Washington, DC. 2004.
- [10] Drechsel H, Winkelmann G. Iron chelation and siderophores. In: *Transition Metals in Microbial Metabolism*. Winkelmann G, Carrano CJ (Eds.). Harwood Academic, Amsterdam, 1997; p: 1-49.

- [11] Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* 2006; 19(2): 143-57.
- [12] Schalk IJ, Yue WW, Buchanan SK. Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Mol Microbiol* 2004; 54(1): 14-22.
- [13] Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(4): 691-6.
- [14] Köster W. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* 2001; 152(3-4): 291-301.
- [15] Buchanan SK. Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9(4): 455-61.
- [16] Buchanan SK. bacterial metal detectors. *Mol Microbiol* 2005; 58(5): 1205-9.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (M). 2nd edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 1989; p:1.21-1.52,2.60-2.80,7.3-7.35,9.14-9.22.
- [18] Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 1966; 5(2): 467-77.
- [19] Ala'Aldeen DA, Stevenson P, Griffiths E, Gorringe AR, Irons LI, Robinson A, Hyde S, Borriello SP. Immune responses in humans and animals to meningococcal transferrin-binding proteins: implications for vaccine design. *Infect Immun* 1994; 62(7): 2984-90.
- [20] Pintor M, Ferrón L, Gómez JA, Powell NB, Ala'Aldeen DA, Borriello SP, Criado MT, Ferreirós CM. Blocking of iron uptake from transferrin by antibodies against the transferrin binding proteins in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 1996; 20(3): 127-39.
- [21] Pintor M, Ferrón L, Gómez JA, Gorringe A, Criado MT, Ferreirós CM. Blocking of iron uptake by monoclonal antibodies specific for the *Neisseria meningitidis* transferrin-binding protein 2. *J Med Microbiol* 1996; 45(4): 252-7.