مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره سیزدهم، شمارهٔ ۵، شهریور ۱۳۹۰، صفحه ۱۴-۷

کلون سازی و تولید پروتئین نوترکیب مربوط به پایانه کربوکسیل انتهایی آنتی ژن مصونیت زای باسیل سیاه زخم

امیرهمایون کیهان(MSc)[۱]، عیسی طهماسب پور مرزونی(MSc)[۲]، نیما فرهادی(MSc)[۱]، مهدی کمالی(PhD)[۱*]

۱- مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران
۲- باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری

دریافت: ۸۹/۹/۴، اصلاح: ۸۹/۱۱/۲۰، پذیرش: ۹۰/۲/۷

خلاصه

سابقه و هدف: تولید آنتی بادی بر علیه آنتی ژن مصونیت زا (PA) می تواند در ایمونوتراپی و درمان بیماری سیاه زخم استفاده گردد. دومن مربوط به بخش کربوکسیل انتهایی PA مهمترین نقش را در تحریک سیستم ایمنی و بیماری زایی آن اعمال می کند. این مطالعه به منظور کلون (همسانه سازی) و تولید نوترکیب ناحیه کربوکسیلی PA این باکتری جهت تولید آنتی بادی انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه تجربی بر روی باکتری کشت یافته در شرایط محیط کشت انجام شد. پس از استخراج DNA از باکتری باسیلوس آنتراسیس، وجود ژن PA روی کروموزوم باکتری از طریق PCR تائید گردید. ناحیه مربوط به کربوکسیل انتهایی PA توسط PCR تکثیر و محصول PCR و پلاسمید توسط آنزیم های برش دهنده BamH I و Hind III برش داده شدند. محصول PCR و پلاسمید پس از الحاق به باکتری میزبان E. coli BL21 (DE3) تراریخت گردید. کلون ها توسط واکنش PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی مورد غربالگری و تائید قرار گرفتند. سپس تولید پروتئین نوترکیب مورد نظر به روش الکتروفورز SDS-PAGE و نهایتا وسترن مورد تائید قرار گرفت.

یافته ها: توالی بازهای ناحیه کربوکسیلی PA با استفاده از روشهای توالی یابی، PCR و برش آنزیمی، همسانه سازی (کلونینگ) ژن مورد نظر در باکتری را تائید کردند. الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن بلات دال بر تولید پروتئین نوترکیب مورد نظر با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون بود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که با روش کلون سازی می توان مقادیر زیادی از این پروتئین نوترکیب باسیل سیاه زخم را تولید نمود که روزنه را برای کاربردهای بعدی به ویژه تولید آنتی بادی و واکسن بر علیه بیماری مورد نظر باز می نماید.

واژه های کلیدی: باسیل سیاه زخم، پروتئین PA، کلون سازی، سیاه زخم.

مقدمه

بیماری سیاه زخم یا Anthrax در واقع یک بیماری مشترک دامی ـ انسانی می باشد که تقریباً در تمام جهان، به ویژه در بین جوامع در حال توسعه دیده می شود. عامل اصلی بیماری سیاه زخم، یک باکتری گرم مثبت تحت عنوان باسیل سیاه زخم (Bacillus anthracis) می باشد. از جنبه های نظری گزارشات بسیاری مبنی بر امکان استفاده از اسپور باسیلوس آنتراسیس به عنوان سلاح بیولوژیک وجود دارد (۱). اشکال مختلفی از راه های انتقال سیاه زخم وجود دارد که اشکال ریوی و گوارشی آن بسیار مهلک بوده و در اغلب موارد درمان ناپذیر می باشد. مهمترین دلایلی که این باکتری را کاندیدای مناسبی برای تهیه سلاح بیولوژیک و یک عامل بیوتروریستی می نماید، تولید اسپور بسیار کوچک آن، مقاومت بسیار زیاد، قدرت بیماریزایی بالا، قابلیت تولید انبوه و سهولت رهاسازی آن بصورت آئروسل می باشد (۲). همچنین ژن عامل بیماری سیاه زخم را می توان به باکتریهای دیگر وارد کرده و از آنها به عنوان سلاح بیولوژیک

▣ این مقاله حاصل پایان نامه امیرهمایون کیهان دانشجو رشته بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران می باشد.
* مسئول مقاله:
آدرس: تهران، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تلفن: ۸۸۶۱۷۷۱۱-۰۲۱
e-mail: mehkamali@yahoo.co.uk

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.5.1.8]

استفاده نمود. بنابراین از آنجایی که این باکتری به عنوان یکی از عوامل جنگ های بیولوژیک استفاده می گردد، لذا شناسایی و مطالعه آن همچنان برای امنیت و سلامتی یک جامعه از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. این باکتری دارای سه شاخص آنتی ژنیک اصلی شامل آنتی ژن کپسولی، آنتی ژن سوماتیک و کمپلکس سمی می باشد. کمپلکس سمی خاصیت آنتی ژنیک بالایی داشته و از سه قسمت پروتئینی شامل آنتی ژن مصونیت زا (Protective Antigen-PA)، فاکتور کشنده (Lethal Factor-LF) و فاکتور تورم زا (Edema Factor-EF) تشکیل شده است (۳و۴). ترشح سم دوگانه، شامل سم کشنده (lethal toxin) و سم خیز دهنده (edema toxin)، به عنوان فاکتورهای اساسی در بیماری زایی باسیلوس آنتراسیس محسوب می گردند (۵)، به عبارتی هیچ یک از سموم سه گانه فوق به تنهایی خاصیت سمیت ندارند. اما ترکیب دو عامل PA و LF که به Lethal Toxin موسوم است دارای خاصیت کشندگی بوده و ترکیب دو عامل PA و EF که به Edema Toxin معروف است دارای توان تورم زایی می باشد. در این بین ترکیب دو فاکتور EF و LF دارای هیچ خاصیت بیولوژیکی نبوده و تنها PA دارای خاصیت ایمونوژنیکی بالایی می باشد، البته LF نقش اصلی بیماریزایی را در این باکتری بازی می کند و وجود آن برای بروز علائم بالینی بیماری ضروری است (۶). با توجه به موارد ذکر شده، پروتئین PA به عنوان یکی از مهمترین شاخص آنتی ژنیک و علل بیماری زایی در این باکتری محسوب می گردد و مطالعه بر روی آن کمک زیادی به تشخیص و درمان بیماری خواهد نمود (۷و۸).

پروتئین مصونیت زا به عنوان یک ناقل برای تسهیل ورود فاکتورهای کشنده و خیز دهنده به داخل سیتوپلاسم سلول میزبان نیز عمل می کند (۹). وزن مولکولی این پروتئین ۸۲۶۸۴ دالتون بوده و متشکل از ۷۳۵ اسید آمینه می باشد. این پروتئین شامل نواحی برای اتصال به سلول، اتصال به عوامل تورم زا یا کشنده و نیز اتصالات درون غشایی است (۱۰). بدین ترتیب باعث انتقال توکسین سیاه زخم به داخل سلول می گردد. همچنین دارای خاصیت ایمنی زایی است که از نظر تهیه واکسن بسیار مهم خواهد بود. این پروتئین دارای چهار دومن، شامل دومن های ۱ تا ۴ می باشد که از لحاظ اجرایی مستقل می باشند. قلمرو اول (دومن ۱) شامل آمینواسیدهای ۱ تا ۲۵۸ بوده که ناحیه گسستگی فورین پروتئازی و بخش هیدروفوبیکی PA را شامل می شود. قلمرو دوم (دومن ۲) از اسید آمینه ۲۵۰ تا ۴۸۷ امتداد یافته و شامل لوپهای بسیار انعطاف پذیری است که مسئول ایجاد منافذ در غشای سلول هستند. در این قلمرو ناحیه ای حساس به کیموترپسین وجود دارد (۱۱).

سومین قلمرو (دومن ۳) که کوچکترین قلمرو این پروتئین محسوب می گردد، از اسیدآمینه های ۴۸۸ تا ۵۹۵ تشکیل شده و در اتصال LF و EF به PA دخالت دارد (۱۱). همچنین این دومن دارای ساختاری آبگریز بوده که در ارتباط پروتئین ـ پروتئین حائز اهمیت می باشد. چهارمین قلمرو (دومن ۴) که در طرف کربوکسیل انتهایی قرار دارد از اسیدآمینه ۵۹۶ تا ۷۳۵ امتداد می یابد. این ناحیه حاوی جایگاه اتصال به غشای سلول بوده و حذف کربوکسیل انتهایی آن از اتصال به سطح سلول جلوگیری می نماید. مطالعات اخیر نشان دادند که کربوکسیل انتهایی نه تنها بطور مستقیم در ایجاد اتصال نقش داشته و به عنوان مهمترین بخش پروتئین مصونیت زا محسوب می گردد، بلکه نقش بسیار مهمی در بیماری زایی آن و تحریک سیستم ایمنی دارد (۱۴-۱۲).

یکی از مهمترین روش ها برای پیشگیری و مبارزه با این باکتری، تولید واکسن موثر جهت ایمنی در برابر اثرات مهلک آن می باشد که این موضوع تا حدود زیادی بستگی به انتخاب یک شاخص آنتی ژنیک مناسب، فرآیند صحیح کلون سازی و انتخاب وکتور و باکتری مناسب دارد (۱۵). تاکنون مطالعات محدودی در زمینه تولید واکسن بر علیه یکی از این شاخص های آنتی ژنیک مذکور صورت گرفته است. در برخی از تحقیقات شاخص آنتی ژنیک LF به عنوان هدفی برای تولید واکسن مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶). اما از آنجایی که پروتئین PA از شاخص آنتی ژنیک بالاتری برخوردار می باشد در مطالعات دیگر، از این پروتئین به عنوان هدفی مناسب جهت تولید واکسن استفاده گردید. در این تحقیقات، از وکتورها و میزبان های سلولی مختلفی نظیر ساکارومایسس سرویزیه (۱۷) و باسیلوس سوبتیلیس (۱۸) برای کلونینگ ژن PA استفاده گردیده است.

بنابراین با توجه به نقش مهم پروتئین مصونیت زا در بیماری زایی باکتری باسیلوس آنتراسیس و با در نظر گرفتن اهمیت و خاصیت آنتی ژنیک بالای دامنه کربوکسیل انتهایی آن در بروز بیماری سیاه زخم، تولید آنتی بادی بر علیه این ناحیه پروتئینی کمک زیادی به ایمنی زایی در برابر این باکتری نموده و روزنه را برای ساخت واکسن بر علیه آن باز می نماید. این موضوع نیازمند روش صحیح همسانه سازی و تولید این پروتئین نوترکیب به مقادیر زیاد می باشد این مطالعه به منظور همسانه سازی یا کلون دامنه کربوکسیل (دومن ۴) پروتئین مصونیت زا به صورت نوترکیب، برای اولین بار بر روی وکتور pET28a و میزبان باکتریایی E. coli BL21 (DE3) انجام گردید.

مواد و روشها

کشت و تشخیص باسیل سیاه زخم: این مطالعه تجربی بر روی باکتری باسیلوس آنتراسیس کشت یافته در شرایط آزمایشگاه انجام گردید. برای کشت اولیه، از محیط Loria bertoni Agar استفاده شد. چند لوپ از استوک اولیه سویه باکتریایی مورد نظر که در ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شد، جهت اخذ کلونی تک بر روی LB agar منتقل گردید، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد (زمان انکوبه به همان ۲۴ ساعت محدود گردید تا از ایجاد اسپور جلوگیری شود، چرا که باسیلوس آنتراسیس به راحتی وارد فاز اسپورگذاری می شود). بعد از رشد باکتری و تشکیل کلونی هایی با ظاهر خشن (R) و رنگ شیری تا کرم و همچنین تأیید وجود باسیلوس آنتراسیس از طریق رنگ آمیزی گرم، دید مستقیم با میکروسکوپ نوری و تست های بیوشیمیایی، از روی یکی از کلونی های ایزوله، یک لوپ به درون ۱۰ سی سی محیط مایع LB broth تلقیح گردید تا از آن برای استخراج پلاسمید استفاده گردد. شرایط کشت، دما و میزان هوادهی با انکوباتور شیکردار به ترتیب ۳۷ درجه سانتیگراد با گردش ۱۲۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت بود. بعد از اتمام زمان کشت، باکتریها به سطح رشد مناسبی رسیدند که برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

طراحی پرایمر: جهت تشخیص وجود ژن ناحیه کربوکسیل انتهایی پروتئین مصونیت زا بر روی DNA باکتری، یک جفت پرایمر با توجه به اطلاعات موجود در بانک اطلاعات ژنی طراحی و سنتز گردید (سیناژن، ایران). سپس در دو ترادف

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.5.1.8]

مشخص شده زیر، به ترتیب سایت آنزیمی BamH I برای پرایمر بالادست (F) و سایت Hind III برای پرایمر فرودست (R) طراحی شد. توالی های پرایمرهای بالادست و پائین دست تشخیص پروتئین مصونیت زا عبارت بود از:

Forward 5`gat gga tcc ttt cat tat gat aga aat aac 3`
Revers 5` cta ga a agc tt t tat cct atc tca tag c 3`

آماده سازی DNA باکتری و شرایط PCR: بعد از اینکه سوش باکتری باسیلوس آنتراسیس در محیط LB broth به مدت ۲۰-۱۸ ساعت رشد داده شد، DNA آن با استفاده از کیت تخلیص ژنوم (High Pure PCR Tamplate Preparation, Roche) استخراج شد. سپس DNA تخلیص شده در ژل آگاروز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز و با رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید، کیفیت و غلظت آن مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تائید استخراج و تخلیص DNA، ژن مربوط به جایگاه کربوکسیل انتهایی PA از طریق PCR با شرایط زیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر گردید. واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و ۳ مرحله تکراری ۳۰ چرخه ای شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. پلیمریزاسیون نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید. سپس محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز شد. صحت تکثیر قطعات مورد نظر با آنزیم برش‌دهنده محدودالاثر Eco57I (AcuI) مورد تائید قرار گرفت. این آنزیم قطعه مورد نظر را در جایگاه ۱۸۲ برش داده و دو قطعه ۱۸۲ و ۲۴۳ بازی پدید می آورد.

پس از مرحله تائید، قطعه مورد نظر توسط آنزیم Pfu DNA polymerase با ۳ میکرولیتر DNA الگو، ۵ میکرولیتر باز X ۱۰، ۳ میکرولیتر $MgSO_4$، ۴ میکرولیتر dNTPs، ۳ میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم .Pwo.DNA pol و ۲۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه و در حجم ۵۰ میکرولیتر تکثیر گردید. واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و ۳ مرحله تکراری ۲۵ چرخه ای شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ دقیقه انجام گرفت. پلیمریزاسیون نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید. در پایان سنتز، مقدار ۵ میکرولیتر از مخلوط لوله واکنش همراه با ۱ میکرولیتر بافر لود کننده در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

آماده سازی محصول PCR: به منظور خالص سازی محصول PCR از بقیه مواد موجود در واکنش نظیر پرایمرها و نوکلئوتیدهای مصرف نشده، روغن معدنی، نمک و آنزیم پلیمراز، محصول PCR توسط کیت (High Pure PCR product Purification Kit, Roche) تخلیص گردیدند. پس از تخلیص، محصول PCR توسط دو آنزیم برش دهنده BamH I و Hind III، با ۲ میکرولیتر از هر آنزیم محدود کننده، ۲۰ میکرولیتر محصول PCR، ۳ میکرولیتر بافر X ۱۰ و ۳ میکرولیتر آب دیونیزه در حجم کلی ۳۰ میکرولیتری بر اساس پروتوکل شرکت سازنده آنزیم (Fermentase) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برش داده شد. محصولات برش داده مجددا توسط کیت استخراج و روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز گردید.

آماده سازی پلاسمید: باکتری حامل پلاسمید (pET28a) در محیط کشت LB مایع به مدت ۱۲ ساعت کشت گردید. پلاسمید آن بر اساس پروتوکل استاندارد استخراج و روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز شد. پلاسمید استخراج شده نیز همانند محصول PCR توسط دو آنزیم برش دهنده BamH I و Hind III در شرایط یکسان با ۲۰ میکرولیتر DNA پلاسمید، ۱۸ میکرولیتر بافر آنزیم X ۱۰، ۵ میکرولیتر از هر آنزیم محدود کننده و حدود ۹۰ میکرولیتر آب دیونیزه به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برش داده شد. محصول برش توسط کیت، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Roche) استخراج و روی ژل آگارز ۱٪ با ولتاژ ۱۰۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز شد.

الحاق و تراریخت: مخلوط ۱ به ۳ محصولات PCR و پلاسمید برش خورده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و بلافاصله به یخ منتقل گردید. دو میکرولیتر آنزیم T4 Ligase و ۵ میکرولیتر بافر X ۱۰ به آن اضافه گردید. به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۰ تا ۱۲ درجه سانتیگرا قرار داده شد. محصول الحاق شده در نهایت توسط کیت (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Roche) جهت تراریخت استخراج و تخلیص گردید. جهت همسانه سازی (کلون) از باکتری E. coli BL21 (DE3) استفاده گردید. سلولهای صلاحیت دار (Competent) بر اساس پروتوکل استاندارد با گلیسرول ۱۰ درصد در دمای ۴+ درجه سانتیگراد تهیه و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردیدند. پنج میکرولیتر از محصول الحاق و ۲۰ میکرولیتر از سلولهای صلاحیت دار با هم مخلوط و به مدت ۱ دقیقه در داخل یخ قرار داده شد. توسط دستگاه Gen Pulser با ولتاژ ۲۵۰۰ محصول الحاق به باکتری E. coli BL21 (DE3) منتقل و به مدت ۱ ساعت در محیط SCO کشت داده شد. رسوب باکتریهای محیط کشت SCO پس از سانتریفوژ در دور g ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، در محیط کشت LB جامد دارای کانامایسین (30µg/ml) به صورت چمنی کشت داده شد.

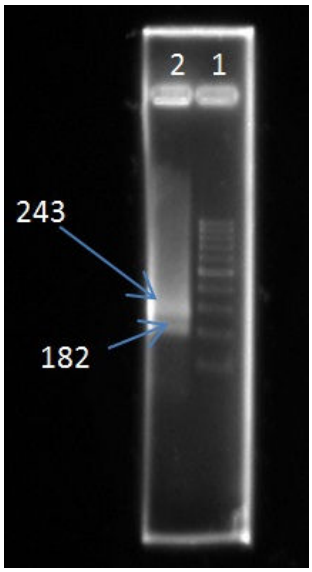
غربالگری کلنی ها: کلنی های محتوی پلاسمید بر اساس روش استاندارد استخراج شدند. وجود ژنوم نوترکیب از طریق PCR، برش آنزیمی و توالی یابی ارزیابی و مورد تائید قرار گفت. واکنش PCR مطابق شرایط انجام گرفته در همسانه سازی صورت گرفت. برش آنزیمی پلاسمید با آنزیم های EcoR I و Nde I بر اساس پروتوکل شرکت سازنده آنزیم (Fermentase) انجام گرفت. توالی یابی نیز توسط شرکت سیناکلون انجام شد.

به منظور بیان پروتئین، باکتری نوترکیب در دو لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری دارای محیط کشت LB مایع کانامایسین دار (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) کشت گردید. در OD=۰/۶ به یکی از لوله ها IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار افزوده شد. لوله ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد القاء و سپس رسوب هر لوله فالکون جمع آوری و با دستگاه سونیکاتور در محلول PBS شکسته شد. بیان پروتئین نوترکیب توسط الکتروفورز SDS-PAGE ۱۵ درصد با ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه و رنگ آمیزی کوماسی بلو جستجو گردید. همچنین در مرحله بعدی توسط وسترن بلاتینگ صحت بیان تائید گردید.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.5.1.8]

یافته ها

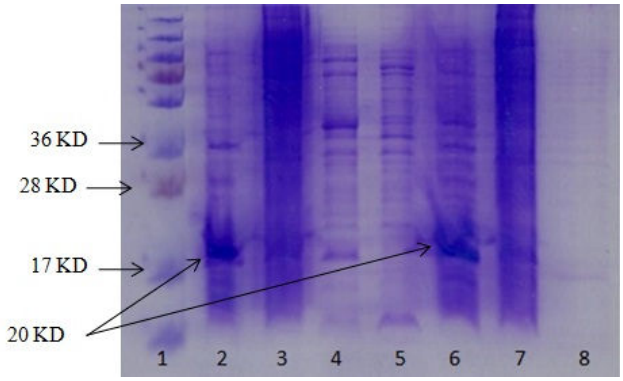
پس از کشت باکتری و استخراج DNA، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد، تشکیل باند ۴۲۳ جفت بازی مربوط به این ناحیه را نشان داد که تائید کننده انتخاب صحیح پرایمرها و تکثیر صحیح ژن مربوط به ناحیه کربوکسیل انتهایی پروتئین PA طی فرآیند PCR بود. الکتروفورز محصول تخلیص شده حاصل از برش قطعه ۴۲۳ جفت بازی مربوط به ناحیه کربوکسیل انتهایی پروتئین PA توسط آنزیم برش دهنده(Eco57I (AcuI، دو قطعه مورد انتظار ۱۸۲ و ۲۴۳ بازی را نشان داد که گویای تکثیر صحیح محصول مورد نظر بود (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز برش محصول PCR مربوط به ناحیه کربوکسیل انتهایی پروتئین PA باسیل سیاه زخم روی ژل آگارز ۲ درصد. ۱. DNA ladder و ۲. باندهای bp ۱۸۲ و ۲۴۳ حاصل از برش آنزیمی توسط Eco57I (AcuI)

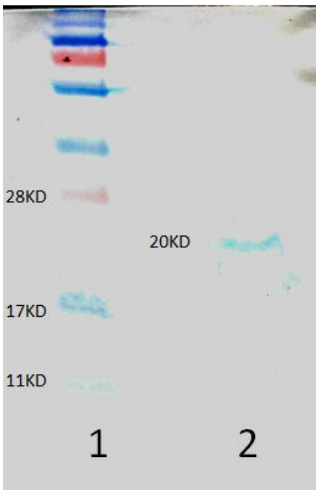
پس از تائید مرحله برش گذاری آنزیم محدودالاثر، الکتروفورز محصول حاصل از واکنش PCR توسط آنزیمPfu DNA polymerase ایجاد قطعه ۴۲۳ جفت بازی مورد انتظار را نشان داد. از طرفی بعد از تخلیص پلاسمیدها، صحت برش پلاسمیدها توسط آنزیم های محدود کننده BamH I و Hind III توسط الکتروفورز مورد تائید قرار گرفت.

پس از الحاق ژن مورد نظر به پلاسمید، نتیجه همسانه سازی با هر سه روشهای توالی یابی، PCR و برش آنزیمی مورد تائید قرار گرفت. در روش برش آنزیمی، پلاسمیدهای تخلیص شده توسط آنزیم برش داده شدند که جدا شدن قطعه ژن ۴۲۳ نوکلئوتیدی از وکتور بیانگر انجام موفق کلونینگ بود. رشد و تکثیر باکتریها در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین دال بر تائید فرآیند صحیح الحاق پلاسمید مورد نظر به باکتری(E. coli BL21 (DE3 بود. از آنجایی که پروتئین مورد نظر به صورت نامحلول در سیتوپلاسم بیان و تجمع می یابد، بیان پروتئین توسط الکتروفورز SDS-PAGE و رنگ آمیزی کوماسی بلو مشخص گردید. نتیجه حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE و رنگ آمیزی کوماسی بلو، بیان پروتئینی با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتونی را با غلظت بالا نشان داد که دال بر تائید کلون و بیان صحیح ژن مورد نظر بود (شکل ۲).



شکل ۲. الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین های استخراج شده باسیل سیاه زخم ستونها: ۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ۲) و ۴) بیان پروتئین مورد نظر با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون

برای تائید نهایی بیان پروتئین مورد نظر تکنیک وسترن بعد از الکتروفورز استفاده گردید. در انتهای N و C ترمینال پروتئین مورد نظر شش اسیدآمینه هیستیدین وجود داشت که در تائید نهایی بیان پروتئین توسط وسترن بلاتینگ با آنتی بادی His-Tag مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به نتیجه حاصل از وسترن، بیان پروتئین مورد نظر با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتونی که مربوط به ناحیه کربوکسیل انتهایی پروتئین PA بود به تائید نهایی رسید (شکل ۳).



شکل ۳. وسترن پروتئین مورد نظر. باند مربوط به ناحیه کربوکسیل انتهایی پروتئین PA باسیل سیاه زخم با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون بر روی کاغذ قابل مشاهده می باشد

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه توالی بازهای ناحیه کربوکسیلی PA با استفاده از روشهای توالی یابی، PCR و برش آنزیمی، همسانه سازی (کلونینگ) ژن مورد نظر در باکتری را تائید کردند. عامل سیاه زخم همگن ترین باکتری شناخته شده از نظر تنوع ژنتیکی است. بررسی ژنتیکی ایزوله های بسیار زیاد این عامل عفونت زا در مقایسه با سایر باسیلوسها نکته بسیار ارزشمندی را آشکار ساخته است که باکتریهای عامل سیاه زخم جدا شده از نمونه های متنوع و از نقاط مختلف جهان

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.5.1.8]

دارای شباهت ژنتیکی و یکنواختی ردیفهای ژنومی می باشند. علت همگنی و یکنواختی ژنتیکی عامل سیاه زخم، حِدّت بسیار (Virulance) بالا و قدرت کشندگی آن است که فرصت لازم برای ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی که منجر به تولید زیرگونه های مختلف می شود را به قربانی خود نمی دهد (۱۹).

یکی از کاندیداهایی که امروزه جهت استفاده تحت عنوان واکسن نوترکیب سیاه زخم انتخاب شده است ترکیب PA+LF یا همان فاکتور LeTx می باشد. این ترکیب با تحریک مناسب سیستم ایمنی هومورال، بخوبی باعث تولید پادتن بر علیه سموم مرگ آور سیاه زخم می شود (۲۱و۲۰). با این حال تولید نوترکیب هر یک از قسمتهای این سم و امتزاج آنها درون بدن باعث بروز علائم سیاه زخم می شود. زیرا LF همچنان می تواند بر علیه ماکروفاژها عمل نماید. اما از آنجا که تزریق LF به تنهایی نه خاصیت بیماریزایی دارد و نه ایمنوژنی، این مسئله گویای نقش منحصر به فرد PA در فرآیند بیماری زایی این باکتری می باشد (۲۲). لذا با همسانه سازی و بیان این قلمرو از LF می توان سیستم ایمنی را تحریک نمود. آنتی ژن مصونیت زا (PA)، مهمترین شاخص آنتی ژنیک و بیماریزایی بالای باکتری مولد سیاه زخم محسوب می شود. این پروتئین سمی نبوده ولی دارای خاصیت مصونیت زایی است و در واقع بخش تعیین کننده سم آنتراکس می باشد. این سم با اتصال به گیرنده غشای سلولی میزبان زمینه عملکرد دو بخش LF و EF (فاکتورهای کشنده و تورم زا) را فراهم می آورد، به طوری که ناحیه کربوکسیل انتهایی این پروتئین بیشترین نقش آنتی ژنیک را برای باکتری مورد نظر دارد (۲۳و۱۳). پیشگیری از آنتراکس به میزان زیادی به استفاده از واکسنها وابسته است، بنابراین تولید آنتی بادی بر علیه این پروتئین، به خصوص بخش کربوکسیل انتهایی آن کمک زیادی به ساخت واکسن و ایجاد مصونیت در برابر بیماری حاصل از این باکتری خواهد نمود. این کار نیازمند روش صحیح همسانه سازی و تولید نوترکیب این بخش پروتئین به مقادیر زیاد می باشد. تاکنون برای شاخص های آنتی ژنیک متعددی از این باکتری به ویژه پروتئین های خاص اسپور آن آنتی بادی منوکلونال طی فرآیند کلون و بیان تولید گردیده است که نتایج آن تا حدودی موفقیت آمیز بوده و تا حدود زیادی سبب ایمنی زایی موش نسبت به اثرات این باکتری گردید (۲۵و۲۴و۲۱). تاکنون مطالعات محدودی در زمینه تولید پروتئین نوترکیب PA به عنوان واکسن انجام گردیده که تفاوت اصلی این تحقیقات در استفاده از نوع میزبان های سلولی و وکتورها می باشد (۱۸و۱۷). در یکی از این مطالعاتی که اخیرا صورت گرفته از مخمر ساکارومایسس سرویزیه به عنوان باکتری میزبان و پلاسمید pET22b به عنوان وکتور، جهت کلون بخش کربوکسیل انتهایی پروتئین PA استفاده گردید که نتیجه آن منتهی به تولید واکسن گردید و نقش حفاظتی خوبی برای مدل های حیوانی در برابر باکتری مذکور داشت (۱۷).

در مطالعه ای دیگر از باکتری باسیلوس سوبتیلیس به عنوان باکتری میزبان برای کلونینگ پروتئین PA استفاده گردید که نتیجه این تحقیق نیز با موفقیت همراه بوده است (۱۸). اما در این مطالعه ژن مربوط به ناحیه کربوکسیل پروتئین PA برای اولین بار در وکتور pET28a و میزبان باکتریایی E. coli BL21 (DE3) همسانه و بیان گردید. از آنجایی که فرآهم سازی و استفاده از میزبان باکتریایی(DE3) E.coli BL21 و وکتور pET28a در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با انواعی از گونه های دیگر میزبانهای باکتریایی آسان تر می باشد لذا روش ارائه شده در این تحقیق می تواند به عنوان مسیری برای تولید پروتئین نوترکیب PA و واکسن در داخل کشور استفاده گردد. پروتئین نوترکیب ناحیه کربوکسیلی پروتئین PA برای اولین بار در ایران انجام گردید و در این روش شرایط بهینه جهت همسانه سازی و بیان پروتئین مورد نظر نیز مورد بررسی قرار گرفت که نهایتا منجر به بیان پروتئین مورد نظر به مقادیر بالا توسط باکتری حامل گردید. با توجه به اهمیت بیماری و نقش بیماری زایی بالای ناحیه کربوکسیل پروتئین PA در این باکتری، در دسترس بودن این بخش از پروتئین جهت تولید آنتی بادی علیه بیماری ضروری است، لذا تولید نوترکیب این بخش از پروتئین توسط روش مذکور، کمک زیادی به تولید آنتی بادی های مونوکلونال در مراحل بعدی می نماید که برای کنترل مدیریت اثرات ناشی از این بیماری حائز اهمیت می باشد.

با توجه به اهمیت کنترل و مدیریت بیماری سیاه زخم، تولید آنتی بادی و کنترل عفونت همراه با درمان می باشد. از آنجایی که ناحیه کربوکسیل پروتئین PA نقش به سزایی در بیماریزایی این باکتری دارد، تولید پروتئین نوترکیب و آنتی بادی بر علیه آن اولین قدم جهت کنترل و مبارزه با این عامل عفونی محسوب می گردد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات کلیه کارشناسان و مسئولان مرکز نانوبیوتکنولوژی پژوهشکده علوم پزشکی بقیه الله (عج) که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.5.1.8]

The Cloning and Expression of Carboxyl Terminal Part of Protective Antigen from Bacillus Anthracis

A.H. Keyhan (MSc) [1], E. Tahmasbpour Marzony (MSc) [2], N. Farhadi (MSc) [1], M. Kamali (PhD) [*1]

1. Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Young Research Club, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran

J Babol Univ Med Sci; 13(5); Sept 2011
Received: Nov 29th 2010, Revised: Feb 9th 2011, Accepted: Apr 28th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Antibody production against to protective antigen (PA) can be helpful in immunotherapy and anthrax treatment. The carboxyl terminal part of PA has the most important playing in immune system induction. The objective of this study is cloning and recombinant expression of carboxyl site of protective protein for antibody production.

METHODS: In this experimental study after DNA extraction from Bacillus anthracis, the presence of PA gene on bacterial chromosome was confirmed by PCR method. The site of carboxyl terminal from PA protein amplified by PCR method, then PCR productions and plasmid were cut out by BamH I and Hind III restriction enzymes. PCR production and plasmid transformed into E. coli BL21 (DE3). Clones containing gene of interest was determined by PCR reaction, enzyme digestion and sequencing. Moreover, the production of recombinant proteins was confirmed by SDS-PAGE and western methods.

FINDINGS: The sequence of carboxyl terminal part of PA was confirmed by sequencing, PCR and enzymatic digestion method which suggestion to intended gene cloning in E. coli BL21 (DE3). SDS-PAGE and western blotting confirmed the production of recombinant protein with 20 KD in molecular weight.

CONCLUSION: According to the results of this study, this recombinant protein can be produced in high levels by this method, which opens a new window for vaccine and monoclonal antibody production against the intended disease.

KEY WORDS: *Bacillus anthracis, PA protein, Cloning, Anthrax.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Post Code: 1393934453
Tel: +98 21 88617711
E-mail: mehkamali@yahoo.co.uk

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.5.1.8]

References

1. Pile JC, Malone JD, Eitzen EM, Friedlander AM. Anthrax as a potential biological warfare agent. Arch Intern Med 1998;158(5):429-34.
2. Little SF, Ivins BE. Molecular pathogenesis of Bacillus anthracis infection. Microbes Infect 1999;1(2):131-9.
3. Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentration of eukaryotic cells. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:3162-6.
4. Brossier F, Mock M, Sirard JC. Antigen delivery by attenuated Bacillus anthracis: new prospects in veterinary vaccines. J Appl Micribiol 1999;87(2):298-302.
5. Pezard C, Weber M, Sirard JC, Berche P, Mock M. Protective immunity induced by Bacillus anthracis toxin-deficient strains. Infect Immun 1995;63(4):1369-72.
6. Chvyrkova I, Zhang XC, Terzyan S. Lethal factor of anthrax toxin binds monomeric form of protective antigen. Biochem Biophys Res Commun 2007;360(3):690-5.
7. Swain PK, Sarkar NK, Sharma M, Goel S, Singh RP, Singh Y. Cytotoxicity of anthrax lethal factor microinjected into macrophage cells through Sendai virus envelopes. Indian J Biochem Biophys 1997;34(1-2):86-91.
8. Chichester JA, Musiychuk K, de la Rosa P, et al. Immunogenicity of a subunit vaccine against Bacillus anthracis. Vaccine 2007;25(16):3111-4.
9. Arora N. Site directed mutagenesis of histidine residues in anthrax toxin lethal factor binding domain reduces toxicity. Mol Cell Biochem 1997;177(1-2):7-14.
10. Edwards KA, Clancy HA, Baeumner AJ. Bacillus anthracis: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods. Anal Bioanal Chem 2006;384(1):73-84.
11. Little SF, Novak JM, Lowe RJ, et al. Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of Bacillus anthracis using monoclonal antibodies. Microbiology 1996;142(Pt 3):707-15.
12. Flick-Smith HC, Walker NJ, Gibson P, et al. A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of Bacillus anthracis protects mice against anthrax infection. Infect Immun 2002;70(3):1653-6.
13. Milne JC, Blanke SR, Hanna PC, Collier RJ. Protective antigen-binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fused to its amino- or carboxy-terminus. Mol Microbiol 1995;15(4):661-6.
14. Kaur M, Chug H, Singh H, et al. Identification and characterization of immunodominant B-cell epitope of the C-terminus of protective antigen of Bacillus anthracis. Mol Immunol 2009;46(10):2107-15.
15. Cybulski Jr RJ, Sanz P, O'Brien AD. Anthrax vaccination strategies. Molecular Aspects of Medicine 2009;30(6): 490-502.
16. Kim J, Kim YM, Koo BS, Chae YK, Yoon MY. Production and proteolytic assay of lethal factor from Bacillus anthracis. Protein Expr Purif 2003;30(2):293-300.
17. Hepler RW, Kelly R, McNeely TB, et al. A recombinant 63-kDa form of Bacillus anthracis protective antigen produced in the yeast Saccharomyces cerevisiae provides protection in rabbit and primate inhalational challenge models of anthrax infection. Vaccine 2006;24(10):1501-14.
18. Ivins BE, Welkos SL. Cloning and expression of the Bacillus anthracis protective antigen gene in Bacillus subtilis. Infect Immun 1986;54(2):537-42.
19. Koehler TM. Bacillus anthracis physiology and genetics. Mol Aspects Med 2009;30(6):386-96.
20. Turnbull PC, Broster MG, Carman JA, Manchee RI, Melling J. Development of antibodies to protective antigen and lethal factor components of anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. Infect Immun 1986;52(2):356-63.
21. Phillips AP, Campbell AM, Quinn R. Monoclonal antibodies against spore antigens of Bacillus anthracis. FEMS Microbiol Immunol 1988;1(3):169-78.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.5.1.8]

22. Laird MW, Zukauskas D, Johnson Ket al. Production and purification of Bacillus anthracis protective antigen from Escherichia coli. Protein Expr Purif 2004;38(1):145-52.
23. Moayeri M, Leppla SH. The roles of anthrax toxins in pathogenesis. Curr Opin Microbiol 2004;7(1):19-24.
24. Cybulski RJ, Sanz P, Mc Daniel D, Darnell S, Bull RL, O'Brien AD. Recombinant bacillus anthracis spore proteins enhance protection of mice primed with suboptimal amounts of protective antigen. Vaccine 2008;26(38):4927-39.
25. Cote CK, Rossi CA, Kang AS, Morrow PR, Lee JS, Welkos LS. Detection of protective antigen (PA) associated with spores of Bacillus anthracis and the effects of anti-PA antibodies on spore germination and macrophage interactions. Microb Pathog 2005;38(5-6):209-25.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.5.1.8]