مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۲، بهمن ۱۳۹۵، صفحه ۲۵-۲۰

کلونینگ و بیان فرم جهش یافته و غیرفعال توکسین بوردتلا پرتوسیس سویه بومی ایران

بهرام کحالی (MSc)[۱]، وجیهه سادات نیک بین (MSc)[۱]، فرشته شاهچراغی (PhD)[۱]، فائقه کاظمی (MSc)[۱]
مریم رفیع پور (MSc)[۱]، ملیحه کرامتی (Pharm.D, PhD)[۲*]

۱-بخش میکروب شناسی، انستیتوپاستور ایران
۲- بخش نانو بیوتکنولوژی، انستیتوپاستور ایران

دریافت: ۹۵/۵/۳، اصلاح: ۹۵/۹/۶، پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶

خلاصه

سابقه و هدف: سیاه سرفه بیماری حاد و مسری دستگاه تنفسی به ویژه در نوزادان و کودکان و یکی از ده عامل عمده مرگ ناشی از بیماری های عفونی است. علیرغم کاهش ابتلا به دلیل واکسیناسیون با باکتری کشته شده عامل بیماریزا (*Bordetella pertussis*)، افزایش بیماری در دهه اخیر بیانگر باز پدیدی ناشی از تنوع ژنتیکی باکتری و ناکارمدی واکسن های کنونی است. بنابراین طراحی واکسنهای جدید و موثر بر پایه سویه های شایع هر جمعیت امری ضروری است. در این مطالعه پروتئین نوترکیب عیر فعال مهمترین آنتی ژن باکتریایی (توکسین پرتوسیس،PTX) سویه شایع بیماریزا در ایران بر پایه نسل جدید واکسنهای غیر سلولی تولید شد.

مواد و روش‌ها: سویه باکتری مورد استفاده در این مطالعه جهت استخراج ژنوم و تکثیر ژن، از بین سویه های بیماریزای جدا شده از بیماران ایرانی از آزمایشگاه مرجع سیاه سرفه بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران انتخاب شده است. پس از کشت باکتری و استخراج DNA ژنومیک، قطعه *ptx-s1* (ناحیه فعال آنزیمیPTX) تکثیر و در pUC۱۸ کلون و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، جهش زایی هدفمند آرژنین ۹ به لیزین و گلوتامیک اسید ۱۲۹ به گلیسین انجام و با تعیین توالی ارزیابی شد. قطعه جهش یافته در سیستم *E.coli* BL21– pET15b و جایگاههای *Bam*HI/*Nde*I با ۰/۵ mM IPTG القا و بیان شد. سپس توسط SDS-PAGE و ایمونوبلات ارزیابی شد. خالص سازی با کروماتوگرافی تمایلی انجام و غلظت پروتئین مشخص شد..

یافته‌ها: جهش های Glu129Lys, Arg9Gly با تعیین توالی تایید شد. وجود باند 28kDa در ژل و ایمونوبلات با استفاده از آنتی بادی Anti-His بیان پروتئین تایید کرد. پروتئین به مقدار۳۶/۰ mg/ml خالص سازی شد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه فرم غیر فعال و ایمونوژن PTX سویه غالب بیماریزا در ایران می تواند به تنهایی و یا در ترکیبی با سایر آنتی ژنها جهت طراحی واکسن های بدون سلولی مورد استفاده قرارگیرد.

واژه‌های کلیدی: بوردتلا پرتوسیس، توکسین، واکسن غیر سلولی، جهش زایی هدفمند.

مقدمه

سیاه سرفه بیماری حاد، به شدت مسری و مزمن سیستم تنفسی انسان است که عامل آن باکتری گرم منفی پاتوژن بوردتلا پرتوسیس *Bordetella pertussis* می باشد (۱). تمام گروه های سنی مستعد ابتلای به این بیماری هستند با این حال در نوزادان شیوع بیشتری دارد(۲). تا قبل از سال ۱۹۵۰ و انجام واکسیناسیون، سیاه سرفه یکی از عوامل عمده مرگ و میر در نوزادان بود، اما با واکسیناسیون جهانی میزان مرگ و میر ناشی از بیماری به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافت(۳). پس از شناسایی *B. pertussis*، واکسن سلولی آن تحت عنوان Whole Cell شامل باکتری کشته شده یا سم زدایی شده با روش های مختلفی مثل تیمار با گلوتارآلدئید یا فرمالدئید جهت کنترل بیماری طراحی و ساخته شد(۴). واکسن سلولی عوارض جانبی مانند تب، تشنج و آنسفالوپاتی را در پی دارد (۵و۱) که این موضوع باعث کاهش اعتماد عمومی و عدم استفاده از آن در برخی از کشورها شده است از این‌رو نسل جدیدی از واکسنها تحت عنوان واکسن‌های غیرسلولی Acellular vaccine معرفی شدند(۶). این نوع واکسنها دارای اثرات جانبی به مراتب کمتر، کارایی بسیار بالا و پروفایل ایمنی موثرتری می باشند و در بسیاری از کشورهای توسعه یافته در برنامه واکسیناسیون جایگزین واکسنهای سلولی شده است(۸و۷). واکسنهای غیر سلولی رایج حاوی یک یا چند فاکتور بیماریزا *B. pertussis* مانند توکسین پرتوسیس Pertussis toxin(PTX)، هماگلوتینین رشته ای Filamentus Haemaglutinin(FHA)، پرتاکتین Pertactin (PRN) و فیمبریه Fimbriae(fim) است(۵و۳). در حال حاضر بیش از ده نوع واکسن غیر سلولی در سراسر جهان تولید شده است که در تعداد و نوع آنتی ژن های فرموله شده متفاوتند(۷). اغلب این واکسنها حاوی ۱ تا ۵ نوع مختلف از آنتی ژنهای بوردتلا پرتوسیس می باشند ولی PTX جزئ ثابت آنهاست که با شیوه های مختلفی غیرفعال شده است(۷و۳). PTX اگزوتوکسین پیچیده kDa۱۰۵ و عضو خانواده توکسینهای دو جزئی AB می باشد. این توکسین از 5 زیر واحد به ترتیب S1-S5 تشکیل شده، زیر واحد آنزیماتیک و سمی آن PTX- S1 دارای فعالیت ADP ریبوزیل ترانسفرازی می باشد(۹). در تحقیقات اخیر با ایجاد جهش در

این مقاله حاصل و طرح تحقیقاتی به شماره ۶۶۸ بخش میکروب شناسی انستیتوپاستور ایران می باشد.
*مسئول مقاله: دکتر ملیحه کرامتی
آدرس: تهران، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتوپاستورایران، بخش نانوبیوتکنولوژی. تلفن: ۶۴۱۱۲۱۶۸-۰۲۱
E-mail: mlh_keramati@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.3.2]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.20]

جایگاه فعال توکسین پرتوسیس، ساب یونیت یک توکسین (PTX- S1) غیر فعال و در عین حال با حفظ خواص ایمنوژنیسیته تولید شده است(۱۱و۱۰). توکسین پرتوسیس توسط ژن *ptx* کد می شود. تغییرات ژنتیکی این ژن عامل بیماریزایی موجب پیدایش آللهای متعددی شده است و این ژن دارای 11 ال است که دو ال *ptxP1* و *ptxP3* فراوانی بیشتری در بین سویه های بیماریزا دارد (۱۲). مطالعات نشان داده است که شیفت آللیک (پلی مورفیسم) سویه های *B. pertussis* موجب گریز باکتری از سیستم ایمنی و مقاومت باکتری نسبت به ایمنی ناشی از واکسیناسیون می شود(۱۴و۱۳). به نظر می رسد پلی مورفیسم ارتباط مستقیمی با بازپدیدی بیماری سیاه سرفه در جهان دارد(۱۵و۱۳و۸). براساس گزارشات ارائه شده در سال های اخیر با وجود پوشش واکسیناسیون حدود ۹۹٪ در ایران، ابتلا به بیماری افزایش یافته است(۱۷و۱۶). در کشور ما سالهاست که واکسن سلولی برپایه سویه استاندارد تولید و مورد استفاده قرار می گیرد.

افزایش گزارشات بیماری موید کاهش مصونیت زایی واکسن در برابر سویه‌های در گردش کنونی جمعیت ایران می باشد بنابراین نیاز به طراحی و تولید واکسنهایی موثر و بر اساس سویه های غالب امری ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه با استفاده از اطلاعات اپیدمیولوژیک ناشی از سویه های ارسالی به آزمایشگاه مرجع سیاه سرفه، سویه بومی دارای آلل غالب شناسایی و توکسین پرتوسیس غیر فعال نوترکیب آن تولید و تایید شد.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری و استخراج محتوی ژنومی: سویه باکتری مورد استفاده در این مطالعه جهت استخراج ژنوم و تکثیر ژن، از بین سویه های بیماریزای جدا شده از بیماران ایرانی و بر اساس تحقیقات انجام شده در مورد پلی مورفیسم شایع آنتی ژنهای باکتریایی (اطلاعات منتشر نشده) آزمایشگاه مرجع سیاه سرفه بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران انتخاب شده است. ابتدا از ذخیره گلیسرولی باکتری در محیط کشت رگان لو به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه کشت انجام شد(۱۸). محتوی ژنومی با استفاده از Bacterial Genomic DNA extraction kit (Roche) استخراج وکیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با الکتروفورز ژل آگارز ۱٪و اسپکتروفتومتری ارزیابی شد.

تکثیر و کلون ناحیه فعال آنزیمی توکسین پرتوسیس (*ptx-s1*): تکثیر *ptx-s1* که بخش فعال آنزیمی توکسین است با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و آنزیم *Pfu* انجام شد(جدول ۱). در پرایمر Forward جایگاه برش آنزیمهای *Kpn*I (جهت کلون در وکتور pUC18) و جایگاه آنزیم *Nde*I (جهت کلون قطعه در وکتور بیانی pET15b) و جایگاه برش آنزیم *Bam*HI در پرایمر Reverse به صورت پر رنگ تر مشخص شده است.

کلونینگ *ptx-s1* در وکتور pUC18: قطعه تکثیر شده با کیت high pure (Roche Diagnostic, Germany) PCR product purification kit خالص سازی شد و بعد از هضم آنزیمی در جایگاههای اختصاصی *KpnI/Bam*HI وکتور pUC18 با واکنش لیگاسیون با آنزیم T4 DNA لیگاز در ۴°C کلون شد و سپس به competent cell *E.coli DH5a* با روش شیمیایی ترانسفرم شدند. از کلونهای رشد یافته در LB agar حاوی ۰/۱ Ampicillin mg/ml به صورت تصادفی چند کلون انتخاب و Clony-PCR انجام شد. کلونهای مثبت حاوی (pUC*ptx-s1*) کشت و استخراج پلاسمید انجام و با هضم آنزیمی تایید شدند.

ایجاد جهش های هدفمند در*ptx-s1*: طراحی پرایمر بر اساس تغییر اسید آمینه آرژنین ۹ به لیزین (R9K) و گلوتامیک اسید ۱۲۹ به گلیسین (E129G) با استفاده از نرم افزار GeneArt® انجام و سپس با نرم افزارهای ۳/۰۵ Gene Runner، Primer premier ساختارهای ثانویه و دماهای مناسب جهت انجام تکثیر بررسی شد (جدول۲).

نوکلئوتیدی های تغییر یافته پر رنگتر نشان داده شده است. پلاسمید pUCptx-s1 به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت در دور اول با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهش R9K انجام و پلاسمید به E.coli DH5a ترانسفرم شد پس از تایید این پلاسمید برای ایجاد دومین جهش با استفاده از پرایمرهای E129G به عنوان الگو وارد واکنش تکثیر و سپس به باکتری ترانسفرم شد. غربالگری کلونهای حاوی pUCmptx-s1 با هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام شد.

جدول۱. توالی پرایمرها، غلظت مواد و برنامه دمایی واکنشهای زنجیره ای پلیمراز جهت تکثیر ptx-s۱

توالی	پرایمر
5 TTGGTACCACATATGCGTTGCACTCGGGC 3	forward PTX-S1-FKN (KpnI,NdeI)
5 CCGGATCCTAGAACGAATACGCGATGCTTTC 3	Reverse : PTX-S1-RB (BamHI)

برنامه دمایی انجام واکنشهای زنجیره ای پلی مراز			مقادیر جهت انجام واکنشهای زنجیره ای پلی مراز	
زمان	دما	مرحله	مقدار ماده مورد نیاز	نام ماده
۷ دقیقه	۹۵°c	Initial denaturation	۲/۵µl	10X Buffer
۱ دقیقه	۹۵°c	Denaturation	۲µl	dNTP (20mM)
۱ دقیقه	۱/۶۸°c	Annealing	۰/۶µl	Primer F (10pmol)
۱ دقیقه	۷۲°c	Extension	۰/۶µl	Primer R(10pmol)
۱۰ دقیقه	۷۲°c	Final extension	۱µl	DNA Template
Total cycle : ۳۰			۱µl	Pfu Polymerase (2.5U/µl)
			Up to µl ۲۵	purified Water

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.3.2]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.20]

جدول ۲. توالی پرایمرهای دارای جهش، غلظت مواد و برنامه دمایی واکنشهای زنجیره ای پلیمراز جهت تکثیر و ایجاد pUC*mptx-s1*

پرایمر های جهش زا	توالی نوکلئوتیدی
PTX-S1F: R9K	5´ CCGCCACCGTATACAAGTATGACTCCCGCCC3
PTX-S1 R: R9K	5´GGGCGGGAGTCATACTTGTATACGGTGGCGG3´
PTX-S1F: E129G	5´ CCACCTACCAGAGCGGG TATCTGGCACACCGG3
PTX-S1R: E129G	5´ CCGGTGTGCCAGATACCCGCTCTGGTAGGTGG3

مقادیر جهت انجام واکنشهای زنجیره ای پلی مراز		برنامه دمایی انجام واکنشهای زنجیره ای پلی مراز		
نام ماده	مقدار ماده مورد نیاز	مرحله	دما	زمان
10X Buffer	۲/۵µl	Ptx-primer 9	دما	زمان
dNTP	۲µl	Initial denaturation	۹۵°c	۷ دقیقه
Primer F (10pmol)	۱µl	Denaturation	۹۵°c	۱ دقیقه
Primer R(10pmol)	۱µl	Annealing	۱/۶۸°c	۱ دقیقه
DNA Template	۱/۵µl	Extension	۷۲°c	۱ دقیقه
Pfu Polymerase(2.5U/µl)	۱µl	Final extension	۷۲°c	۱۰ دقیقه
Purified water	Up to µl ۲۵	Total cycle :۳۰		

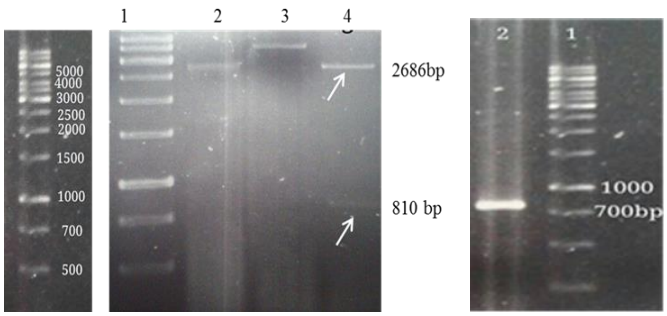
کلونینگ قطعه mptx-s1 در وکتور بیانی pET15b: با هضم آنزیمی *NdeI/BamHI* پلاسمید تایید شده (pUC*mptx-s1*) قطعه دارای جهش از پلاسمید خارج و پس از استخراج از ژل در جایگاه های برش آنزیمی *NdeI/BamHI* وکتور بیانی pET15b (N-terminal His-tag ۵۷۰۸ جفت باز) کلون شد. بررسی صحت کلونینگ با هضم آنزیمی وتکثیر انجام شد.

بیان mptx-s1 تایید و تخلیص پروتئین نوترکیب: بیان پروتئین مورد نظر با القا باکتری در حجم ۵ میلی لیتر در غلظت ۰/۵ میلی مولار IPTG در دانسیته نوری ۷/۵–۸ در °C ۳۷ و دور ۱۸۰در محیط کشت TY2x انجام شد. پنج ساعت پس از القا سلولها جمع آوری و بررسی بیان پروتئین با SDS-PAGE و ایمونوبلات با استفاده از Anti His Antibody به عنوان آنتی بادی اولیه و از HRP-conjugated antibody و سوبسترا 3'- Diaminobenzidine (DAB) انجام شد. خالص سازی بر اساس کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA (Qiagene) و جذب پروتئین نوترکیب توسط یونهای نیکل و با استفاده از اوره 8M و گرادیانت pH (pH۸ محلول لیز اولیه، pH ۶/۵ محلول شستشو و pH ۵/۵ محلول نهایی) صورت گرفت و در نهایت با اسپکتروفتومتری تعیین غلظت شد. کلیه مراحل کلون و بیان، بررسی بیان و خالص سازی طبق دستورالعملهای منتشر شده انجام شده است(۱۹).

یافته ها

استخراج DNA از باکتری *B. pertussis* سویه بومی منجر به تهیه ۳۵۶ ng/ml محتوی ژنومی شد. قطعه *ptx-s1* شامل ۲۶۹ اسید آمینه است که تکثیرآن منجر به ایجاد قطعه ۸۱۰ جفت بازی می‌شود. در مرحله اول تکثیر قطعه و کلون آن در وکتور puc18 طبق جزییات ذکرشده در قسمت روش انجام شد. نتیجه (شکل۱) بیانگر تکثیر صحیح قطعه و تایید کلون آن در وکتور مربوطه میباشد.

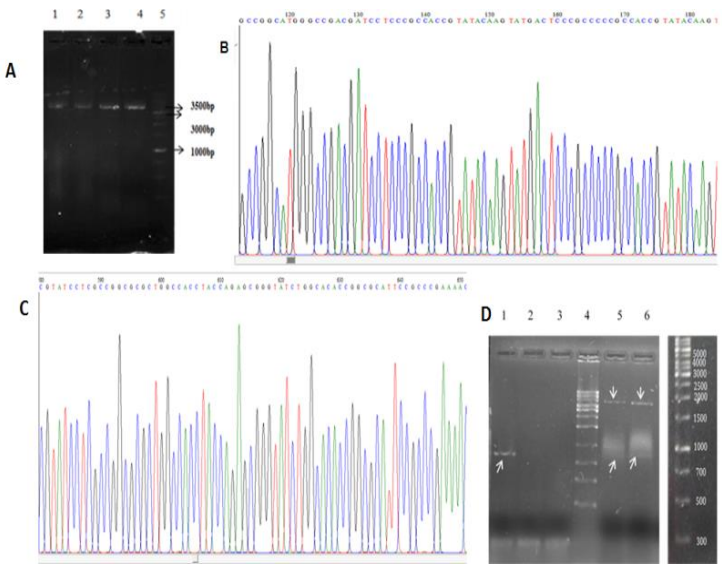
ایجاد جهش و تایید pUCmptx-s: الگو قراردادن pUC*ptx-s1* و استفاده از پرایمرهای جهش زا به منظور جهش زایی هدفمند در موقعیت های ۹ و ۱۲۹ منجر به تشکیل باندی به اندازه حدود 3500جفت باز (مجموع جفت بازهای وکتور و قطعه کلون شده در آن ۸۱۰±۲۶۸۶) شد و پلاسمید حاوی قطعه جهش یافته pUCmptx-s به دست آمد (شکل ۲ قسمت A). تعیین توالی نوکلئوتیدی صحت جهش های هدفمند را تایید نمود گرافهای ناشی از تعیین توالی با بررسی آنها با نرم افزار Chromas موید جایگزینی آرژنین(CGC) موقعیت ۹ به لیزین(R9K(AAG و گلوتامیک اسید(GAA) موقعیت ۱۲۹با گلیسین E129G (GGG) است(شکل ۲ قسمت B وC). پس از تایید جهش ها و هضم pUC*mptx-s1* با آنزیم های *BamHI* و *NdeI* در جایگاههای معادل در وکتور بیانی pET15b کلون شد. بررسی صحت کلونینگ با هضم آنزیمی *BamHI/NdeI* و خروج قطعه ۸۱۰ جفت بازی تایید کننده صحت کلونینگ می باشد(شکل ۲ قسمت D).



شکل ۱. نتیجه تکثیر قطعه *ptx-s1* و هضم آنزیمی pUC*ptx-s1*.
سمت چپ: ستون ۱ مارکر DNA و ستون ۲ باند مربوط به محصول PTX-S1 ۸۱۰جفت باز سمت راست: ستون ۱ مارکر DNA، ستون ۲ و ۳ وکتورهای pUC18 خطی شده با آنزیم *BamHI* به ترتیب فاقد قطعه (۲۶۸۶جفت باز) و دارای قطعه (۳۴۹۶ جفت باز) و ستون ۴ هضم آنزیمی با دو آنزیم *KpnI/BamHI* و خروج قطعه کلون شده. محلهای قرارگیری با فلش مشخص شده است.

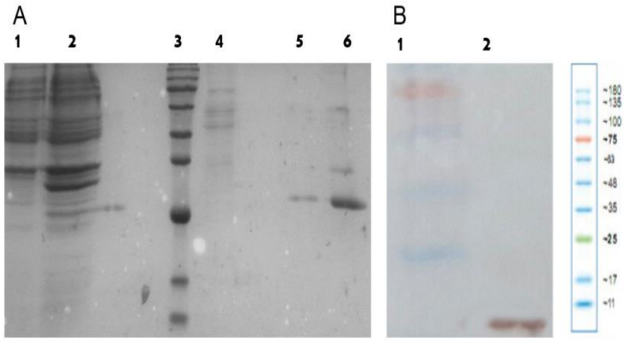
بیان پروتئین نوترکیب MPTX-S1: پس از تایید کلونینگ MPTX-S1 در وکتور بیانی، وکتور تکثیر شده پس از استخراج و خالص سازی از باکتری تکثیر دهنده *E.coli DH5a* به میزبان بیانی *E.coli BL21* ترانسفرم شد. بررسی بیان در غلظت های مختلف IPTG و محیط کشت نشان داد که IPTG با غلظت ۰/۵ میلی مولار و القا در دانسیته نوری ۷/۵–۸ و نگهداری سلولها به مدت سه تا چهار ساعت در محیط کشت TY2x بیان بهینه پروتئین مورد نظر را با وزن مولکولی ۲۸ در پی خواهد داشت (شکل۳).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.3.2]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.20]



شکل۲. ایجاد جهش و تایید pUCmptx-s و تایید وکتور بیانی pETmptx-s1.

قسمت A: نتایج تکثیر وکتور pUC*ptx-s1* *با استفاده از* جفت پرایمر R9K ستونهای شماره ۱و ۲ مرحله اول و ستونهای شماره ۳و ۴ نتایج تکثیر با جفت پرایمر E129Gدر مرحله دوم که در هر دو مرحله قطعه حدود ۳۵۰۰ جفت بازی مشاهده می شود ، ستون شماره ۵ 1Kb DNA. قسمت B: تایید ایجاد جهش آرژنین(CGC) موقعیت ۹ به لیزین (AAG)R9K نوکلئوتیدهای ۱۵۳–۱۵۰. قسمت C: تایید جهش موقعیت ۱۲۹ گلوتامیک اسید(GAA) با گلیسین E129G (GGG) نوکلئوتیدهای۶۱۶–۶۱۸. قسمت D : تاییدpETmptx-s1 . ستون ۱نتیجه نکثیر ژن با الگو قرار دادن وکتورpETmptx-s1 و ایجاد قطعه ۸۱۰ جفت باز، ستونهای ۲و۳ کنترل منفی، ستون ۴ DNA 1Kb ، ستونهای ۵و۶ نتیجه هضم آنزیمی همزمان وکتور حاوی قطعه pETptx-s1 با آنزیم های *Nde*I/*Bam*HI و مشاهده قطعه ۸۱۰ و ۵۷۰۸ جفت بازی مربوط به قطعه و وکتور است. محلهای قرارگیری با فلش مشخص شده است.



شکل ۳. ارزیابی بیان و خالص سازی mPTX-S1 و تایید آن به روش ایمونوبلات

قسمت A ستون۱: محتوی پروتئینی باکتری قبل از القا، ستون ۲: محتوی پروتئینی باکتری بعد از القا ستون ۳: مارکر پروتئینی ستون ۴: محتوی پروتئینی محلول شستشو در مرحله خالص سازی که فاقد باند مربوطMPTX-S1 می باشد. ستون ۵ و ۶ باند مربوط به MPTX-S1 با وزن مولکولی kDa ۲۸ قسمت B: شناسایی و تایید پروتئین نوترکیب و جهش یافته MPTX-S1 با روش ایمونوبلات: ستون۱ مارکر پروتئینی ۱۰ تا ۱۷۰ کیلودالتون. ستون۲: باند ۲۸kDaمربوط به پروتئین MPTX-S1

بحث و نتی÷جه گیری

در این تحقیق به طور موفقیت آمیزی ساخت سازه ژنی فرم غیر فعال توکسین باکتری*B. pertussis* ساخته شد. بررسی توالی های نوکلئوتیدی نشان دهنده صحت جهش‌های مدنظر در جایگاه فعال آنزیمی توکسین می باشد. بیان پروتئین در سیستم *E.coli* BL21-pET15b نشان دهنده انتخاب مناسب سیستم بیانی است و سازه های بیانی جهش یافته و میزبان نوترکیب قابلیت نگهداری و تولید انبوه توکسین در سیستم پروکاریوتی را در مطالعات آتی فراهم می‌آورد. بهینه سازی روش تخلیص امکان خالص سازی اولیه را براساس کروماتوگرافی تمایلی فراهم آورده است. واکسیناسیون علیه سیاه سرفه تاریخچه ای قدیمی دارد با این حال مطالعات حاکی از روند افزایشی ابتلا بخصوص در جمعیت های زیر ۶ ماه و بیش از ۱۰ سال است و دلایلی مانند کاهش ایمنی بدن پس از واکسیناسیون با گذشت زمان، نقص در انجام کامل واکسیناسیون وسازگاری پاتوژنها مطرح است(۲۰). در مورد سازگاری پاتوژنها بهترین مثال شناخته شده، پیدایش گونه های مقاوم بعد از مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک هاست و نمونه کمتر شناخته شده سازگاری پاتوژنها به واکسیناسیون می باشد(۲۰و۱۳). بعبارت دیگر به دلیل تغییرات آنتی ژنی، پاسخهای ایمنی قابلیت کنترل و دفع میکروارگانیسم متفاوت را نخواهند داشت (۲۱و۱۵).

در مورد بوردتلا پرتوسیس تغییرات ژنتیکی در فاکتورهای بیماریزایی باکتری از جمله *fha*، *ptx*، prn، *fim* باعث پیدایش آللهای متعددی از این ژنها شده است (۶). مطالعات متعدد ارتباط مستقیم بین پلی مورفیسم و بازپدیدی بیماری سیاه سرفه در نقاط مختلف جهان را نشان داده است(۱۵و۴). در ایران نیز طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی WHO میزان بروز سیاه سرفه در سال ۲۰۰۴، ۹۸ مورد و در سال ۲۰۰۵، ۱۲۵۰ و در سال ۲۰۱۱، ۶۵۰ مورد گزارش شده است(۱۷و۱۶). واکسیناسیون علیه این بیماری در ایران از۱۹۵۰ با استفاده از واکسن کشته شده بر اساس سویه استاندارد تهیه شده توسط موسسه رازی (Razi-dtwp) انجام شده است و سالها موجب کاهش سیر ابتلا به بیماری شده است. اما طی چند سال اخیر در ایران نیز مانند کشورهای دیگر، بروز مجدد بیماری سیاه سرفه مشاهده می شود که یکی از دلایل اصلی می تواند تغییر ژنتیکی سویه های در گردش باشد. بررسی های انجام شده توسط آزمایشگاه مرجع سیاه سرفه در بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور تایید کننده این موضوع می باشد(۱۶).

در واقع بکارگیری یک سویه استاندارد غیر بومی برای بیش از نیم قرن موجب ناکارامدی برنامه واکسیناسیون علیه سیاه سرفه شده است و جمعیت تحت واکسیناسیون علیرغم تحمل عوارض جانبی از مصونیت کامل نیز برخودار نمی باشند. نسل جدید واکسنها در کنترل سیاه سرفه شامل یک یا دو و گاهی ترکیبی از آنتی ژنهای مهم بوردتلا پرتوسیس از جمله PTX و FHA و PRN است که انواعی از آن در برخی کشور های در حال توسعه جایگزین واکسنهای سلولی شده است(۶). در این تحقیق با استفاده از سویه بومی ایران انتخاب شده بر اساس اطلاعات اپیدمیولوژی و بررسی های مولکولی؛ طراحی نسل جدید واکسنهای نوترکیب وغیر سلولی بر پایه مهمترین توکسین پرتوسیس انجام شده است. بررسی ها نشان میدهد توکسین غیرفعال پرتوسیس به تنهایی نیز قادر به ایجاد ایمنی موثر در برابر باکتری می باشد. سازه های بیانی طراحی و تایید شده می تواند به عنوان ابزاری جهت تولید مهمترین آنتی ژن واکسن غیر سلولی بکار برده شود. از آنجاکه سویه بومی ایران در این تحقیق به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفته است بنابراین سازه های بیانی و پروتئین نوترکیب بدست آمده در این تحقیق، امکان طراحی واکسنهای غیرسلولی را بر اساس آنتی ژنهای مهم سویه شایع ایران در مطالعات بعدی فراهم کرده است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مدیریت بخش میکروب شناسی انستیتوپاستور ایران جهت حمایت از این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.3.2]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.20]

Cloning and Expression of Mutant and Inactive Form of Bordetella Pertussis Toxin from Iranian Native Strain

B. Kahali (MSc)[1], V.S. Nikbin (MSc)[1], F. Shahcheraghi (PhD)[1], F. Kazemi (MSc)[1], M. Rafipour (MSc)[1], M. Keramati (Pharm.D, PhD) *[2]

1.Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R.Iran

2.Nano-Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(2); Feb 2017; PP: 20-25

Received: Jul 24th 2016, Revised: Nov 26th 2016, Accepted: Jan 15th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Whooping cough is an acute contagious human respiratory disease especially in infants and children and is one of the ten major causes of death from infectious diseases. Despite reducing the risk due to vaccination with killed bacteria pathogen (Bordetella pertussis), increased disease emerged in recent decades indicates re-emerging due caused by genetic diversity of bacteria and the insufficiency of current vaccines. Therefore, the design of new and effective vaccines based on common strains of the population is essential. In this study the prevalent strain Iranian *B.pertussis* strains has been selected for gene amplification of pertussis toxin (PTX), the most important antigen of bacteria. The toxicity of the PTX related to its enzymatic activity therefore by site directed mutagenesis, the effective residues in the active site of the enzyme has been changed and the inactive and safe recombinant was produced.

METHODS: Bacterial strain used in this study to determine the genome and gene amplification was selected from pathogenic strains isolated from Iranian patients from the pertussis reference laboratory of Microbiology of the Pasteur Institute of Iran. Genomic DNA was extracted by kit, *ptx- s1*(the enzymatic fragment of PTX) fragments amplified and inserted in pUC18. Site directed mutagenic primers were used for substitution of Arg 9 by Lys and Glu129 by Gly. The confirmed mutant *ptx- s1* (*mptx-s1*) was sub-cloned into expression vector pET15b. The expression of recombinant protein in *E.coli BL21* was induced by 0.5mM IPTG. The expression was analyzed by SDS-PAGE and immuno-blotting. The protein was puifird by Ni-NTA affinity chromatography under denature condition.

FINDINGS: Sequencing data and restriction enzyme analysis confirmed the gene constructing and mutations. The presence of a 28 kDa band in SDS-PAGE and immunoblot showed the expression of mutant PTX. The concentration of recombinant protein was 0.36 mg/ml.

CONCLUSION: The Recombinant protein which was obtained in this study provided the possibility of designing acellular vaccines on the basis of important antigens of prevalent strain of *B.pertussis* in Iran.

KEY WORDS: *B .Pertussis, Toxin, Acellular Vaccine, Site-Directed Mutagenesis.*

Please cite this article as follows:

Kahali B, Nikbin VS, Shahcheraghi F, Kazemi F, Rafipour M, Keramati M. Cloning and Expression of Mutant and Inactive Form of Bordetella Pertussis Toxin from Iranian Native Strain. J Babol Univ Med Sci. 2017; 19(2):20-25.

* **Corresponding author: M. Keramati (Pharm.D, PhD)**
Address: Pasteur Institute of Iran (IPI), No. 69, 12th Farwardin Ave, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 64112168
E-mail: mlh_keramati@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.3.2]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.20]

References

1.Guiso N. Bordetella pertussis and pertussis vaccines. Clin Infec Dis. 2009;49(10):1565-9.
2.Rodríguez ME, Hellwig SM, Vidakovics MLP, Berbers GA, Van De Winkel JG. Bordetella pertussis attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. FEMS ImmunolMed Microbiol. 2006;46(1):39-47.
3.Tozzi AE, Celentano LP, degli Atti MLC, Salmaso S. Diagnosis and management of pertussis. Canad Med Associa J. 2005;172(4):509-15.
4.Berbers GA, de Greeff SC, Mooi FR. Improving pertussis vaccination. Human Vaccine. 2009;5(7):497-503.
5.Marzouqi I, Richmond P, Fry S, Wetherall J, Mukkur T. Development of improved vaccines against whooping cough: current status. Hum vaccin. 2010;6(7):543-53.
6.Keitel WA. Cellular and acellular pertussis vaccines in adults. Clin Infect Dis. 1999;28 Suppl 2:S118-23.
7.Locht C. A common vaccination strategy to solve unsolved problems of tuberculosis and pertussis?. Microb Infect. 2008;10(9):1051-6.
8.Cherry J, The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of Bordetella pertussis infection. Pediatrics. 2005 May;115(5):1422-7.
9.Locht C, Coutte L, Mielcarek N. The ins and outs of pertussis toxin. FEBS J. 2011;278(23):4668-82.
10.Hijnen M, Mooi FR, van Gageldonk PG, Hoogerhout P, King AJ, Berbers GA. Epitope structure of the Bordetella pertussis protein P. 69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. Infect Immunit. 2004;72(7):3716-23.
11.Stein PE, Boodhoo A, Armstrong GD, Cockle SA, Klein MH, Read RJ. The crystal structure of pertussis toxin. Structure. 1994;2(1):45-57.
12.Willems RJ, Mooi FR. From whole cell to acellular pertussis vaccines. Rev Med Microbiol. 1996;7(1):13-22.
13.Mooi FR, Van Loo I, Gent Mv, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, et al. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. 2009;15(8):
14.He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. Future Microbiol. 2008;3(3):329-39.
15.Mooi F, Van Der Maas N, De Melker H. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation–two sides of the same coin. Epidemiol Infect. 2014;142(04):685-94.
16.Shahcheraghi F, Lotfi MN, Parzadeh M, Nikbin VS, Shouraj F, Zahraei SM. Isolation of bordetella Pertussis and bordetella parapertussis of clinical specimens from different provinces of Iran. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012;22(88):2-8.[In Persian].
17.Izadi M, Afsharpaiman S, Jafari NJ, Ranjbar R, Gooya MM, Sarpooshi JR, et al. Immunization status of Iranian military recruits against Bordetella pertussis infection (whooping cough). J Infect Dev Count. 2011;5(03):224-6.
18.Levinson W, Jawetz E. Medical microbiology and immunology: examination and board review: Appleton & Lange; 1996.Availabe from: http://trove.nla.gov.au/work/6754015
19.Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual: Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY; 1982.
20.Cardeñosa N, Romero M, Quesada M, Oviedo M, Carmona G, Codina G, et al. Is the vaccination coverage established enough to control pertussis, or it is a re-emerging disease?. Vaccine. 2009;27(25):3489-91.
21.Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, Gross R. Evolutionary trends in the genus Bordetella. Microbes and Infection. 2001;3(1):61-72.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.3.2]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.20]