مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۳
صفحه: ۱۷۱۱-۱۷۰۲

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No.6, Jan-Feb 2015
Pages: 1702-1711

همسانه‌سازی و بیان ژن‌های ممزوجی دومن a -۱ آنتی‌ژن حفاظتی با سیلوس آنتراسیس و زیرواحد B سم شیگلا در باکتری E. coli

امیر حسین احمدی[۱]، حسین هنری*[۲]، محمد ابراهیم مینایی[۳]

چکیده:

مقدمه: یکی از فاکتورهای بیماری‌زای اصلی در شیگلا دیسانتری تیپ ۱ و E. coli O157:H7، انتروتوکسین شیگلایا (StxB) بوده که خاصیت ایمنی زایی، اجوانتی و دلیوری آن به اثبات رسیده است. سیاه‌زخم (آنتراکس) یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده و آنتی‌بادی دومن a -۱ آنتی‌ژن حفاظت‌کننده باسیلوس آنتراسیس ۶۲ درصد آنتی‌ژن‌های مربوط به آنتی‌ژن حفاظت‌کننده (PA) باکتری باسیلوس آنتراسیس را شناسایی می‌کند. هدف ایـن مطالعه بیان ممـزوجی دومن a -۱ آنتی‌ژن حفاظتی باسیلوس آنتراسیس (PA20) با زیرواحد B سم شیگلا (STxB) در باکتری E. coli می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، طراحی پرایمر برای ژن pa20 به منظور جایگزینی آن در کاست ژنی ipaD-stxB صورت گرفت. واکنش PCR برای تکثیر این قطعه انجام و قطعه تکثیر شده به درون pGEM-Teasy vector همسانه سازی شد. ژن pa20 توسط آنزیم‌های محدودالاثر NdeI و SalI برش خورده و در نهایت ژن pa20 با ژن stxB ممزوج شد. وکتور pET28a(+) حاوی کاست ژنی pa20-stxB ساخته شده به باکتری E. coli سویه BL21(DE3) تراریخت و بررسی بیان کاست ژنی انجام شد.

نتایج: ژن‌های ممزوجی pa20-stxB در وکتور بیانی pET28a(+) توسط PCR، هضم آنزیمی و با توالی یابی تأیید شد. همچنین پروتئین نوترکیب تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن تایید گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به شناسایی آنتی ژن (PA) به وسیله آنتی‌بادی PA20 و پایداری بالای آن در واکسن‌های AVA و خاصیت القای آپاپتوز آن و خاصیت ایمنی‌زایی، اجوانتی و دلیوری پروتئین STxB و بیان زیاد Gb3 در سطح سلول‌های سرطانی انسان این آنتی‌ژن به عنوان یک آنتی‌سرطان و کاندید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا، اشریشیاکلی و باسیلوس آنتراسیس می‌تواند مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس آنتراسیس، شیگلا دیسانتری تیپ ۱، آنتی ژن حفاظتی، زیر واحد B سم شیگا

۱- کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲- دانشیار گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷، پست الکترونیکی: honari.hosein@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۲۲

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

سیاه‌زخم یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام بوده و پتانسیل استفاده در جنگ‌های بیولوژیک را دارا می‌باشد. بیماری سیاه‌زخم در انسان در نتیجه تماس مستقیم با حیوانات بیمار و یا فرآورده‌های حیوانات مانند پوست، مو و پشم ایجاد می‌شود(۱). باسیلوس آنتراسیس علاوه بر یک DNA حلقوی به اندازه ۴/۵ مگاباز، دارای دو پلاسمید بزرگ pXO1 (شامل ژن‌های توکسیک) و pXO2 (شامل ژن‌های مولد کپسول) می‌باشد. توکسین با واسطه یک پلاسمید به نام PBA1 یا pXO1 ایجاد می‌شود، که ۳ پروتئین یا فاکتور مولد ادم Edema Factor (EF)، آنتی‌ژن محافظت‌کننده (PA: Protective Antigen) و فاکتور مولد مرگ سلولی (LF: Lethal Factor) را کد می‌کند(۳،۲). پروتئین PA برای سمیت سلول میزبان در ترکیب با LF یا EF ضروری است که به ترتیب توکسین کشنده یا توکسین تورم‌زا تولید کرده(۴) و دارای ناحیه اتصال به گیرنده سلول میزبان بوده و ورود کمپلکس‌های توکسین را به درون سلول میزبان تسهیل می‌نماید(۵). PA به وسیله ژن pag کد شده و غنی از A/T (۶۹ درصد)، فاقد سیستئین، وزن مولکولی ۸۳kDa، دارای ۷۳۵ اسیدآمینه و پروتئینی مسطح و بلند می‌باشد. ساختار کریستالی از PA طبیعی نشان داده که PA شامل ۴ دومن مجزا و از نظر عملکردی غیروابسته به هم می‌باشند و دومن ۱ به دومن‌های 1a و 1b تقسیم می‌شود(۶).

پروتئین PA کامل موقعی که به گیرنده خود در سطح سلول میزبان متصل شد. توسط پروتئازی به نام Furin-Like Protease برش می‌خورد و یک قسمت ۶۳kDa و یک قسمت kDa20 به نام دومن a-۱ از PA جدا می‌شود. PA20kDa و PA63kDa در خون میزبان آلوده به باکتری یافت می‌شود از این رو می‌توان برای تشخیص سریع از آنها استفاده کرد(۷). به علاوه تأثیر PA20 بر سلول‌های PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells افزایش فعالیت آنزیمی caspase3 و القای آپاپتوز است. با بررسی‌های انجام شده بر روی آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضدPA کامل مشخص شده است که ۶۲ درصد این آنتی‌بادی‌ها به صورت اختصاصی اپی‌توپ‌های PA20 را شناسایی می‌کنند(۸). با مطالعه بر روی اجزاء تشکیل‌دهنده واکسن‌های تضعیف شده (AVP: Anthrax Vaccine Precipitated) با چند سال قدمت مشخص گردید که بالاترین حضور اولیگوپپتیدها مربوط به PA20 می‌باشد(۹). بنابراین از PA20 به عنوان کاندید واکسن و همچنین برای درمان سلول‌های سرطانی با القای آپوپتوز می‌توان استفاده کرد.

بیماری‌های اسهالی ۳/۱ میلیون مرگ و میر را در سال به خود اختصاص می‌دهند. اغلب اسهال‌های خونی با عامل شیگلا در بیشتر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان به موقع به مرگ می‌انجامد. سهم شیگلوزیس از این مرگ و میر در حدود۶۰۰ هزار تا یک میلیون مرگ در سال است. شیگلوزیس همیشه به عنوان یک اسهال خونی باسیلی حاد شناخته می‌شود که با مدفوع آبکی همراه با خون و موکوس توأم با علایم بالینی چون تب، کرامپ‌های شکمی مشخص می‌گردد که ممکن است به همراه سندروم اورمیک همولیتیک باشد(۱۰).

سم شیگا (STx) توسط باکتری شیگلا دیسانتری تولید می‌شود. سموم شیگا، شامل گروهی از پروتئین‌های سمی می‌باشند که توسط گونه‌های خاصی از باکتری شیگلا و اشرشیاکلی ترشح می‌شوند(۱۱). یکی از مهمترین فاکتورهای بیماری‌زای اصلی در شیگلا دیسانتری تیپ ۱، پروتئین STx می‌باشدکه از یک زیرواحد سمی آنزیماتیک به نام STxA و یک زیرواحد پنتامریک متصل شونده به گیرنده به نام زیرواحد B یا STxB تشکیل شده است. زیرواحد STxB مسئول اتصال زیر واحد سمی به گیرنده سطح سلولیGb3 بوده و در نهایت باعث ورود سم به درون سلول و اثرات آن می‌شود. پروتئین Gb3 روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود با این حال مطالعات نشان داده است که بیان Gb3 در سطح سلول‌های سرطانی انسان فراوانی بسیار زیادی دارد(۱۴-۱۲).

ادجوانت‌ها ترکیباتی هستند که پاسخ ایمنی را تحریک می‌کنند(۱۵). امروزه، سیستم‌های تحویل‌دهنده مخاطی خاص که پروتئین یا DNA پلازمیدی(pDNA) کدکننده آنتی‌ژن‌ها را

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

پوشش می‌دهند، به طور گسترده‌ای در حال گسترش هستند. این امر به خاطر توانایی آنها در تحریک سیستم ایمنی است. نمونه‌های بسیاری از این قبیل ناقلین و ادجوانت‌ها وجود دارند که یکی از ژن‌های انتقال دهنده، ژن مولد پروتئین STxB است(۱۶).

نتایج تحقیقات انجام شده نقش ایمنی‌زایی، دلیوری و ادجوانتی پروتئین STxB را اثبات کرده‌اند. از این رو با ممزوج کردن ژن stxB و ژن pa20 می‌توان پیش‌بینی کرد که اولاً با استفاده از خاصیت ایمنی‌زایی بالای PA20، میزان ایمنی‌زایی علیه STxB افزایش می‌یابد، ثانیاً می‌توان از STxB به عنوان یک دلیور برای رساندن PA20 به سطح سلول‌های سرطانی و القای آپاپتوز استفاده کرد. هدف این مطالعه بیان ژن‌های ممزوجی دومن a -۱ آنتی‌ژن حفاظتی باسیلوس آنتراسیس (PA20) با زیرواحد B سم شیگلا (STxB) در باکتری E. coli بود که با موفقیت انجام شد.

روش بررسی

وکتور بیانی pET28a(+)-ipaD-Linker-stxB از گروه زیست شناسی دانشگاه امام حسین(ع) تهیه گردید(۱۷). توالی کامل ژن PA20 از بانک ژن (NCBI با شماره :Accession No M29081) استخراج و پرایمرها طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد. پرایمر بالادست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر NdeI و پرایمر پایین‌دست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر SalI است که به وسیله نرم‌افزار تحت شبکه BIOLABS_NEB-cutter تعیین شدند.

توالی پرایمر رفت با جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر NdeI:

5'-TAcatatgGGCGGTCATGGTGATGTAG-3'

توالی پرایمر برگشت با جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر SalI:

5'-CGgtcgacTAGATTTATTTCTTGTTCGTTAAAT-3'

باکتری باسیلوس آنتراسیس از بخش هوازی موسسه رازی تهیه شد. پلاسمیدهای باکتری با استفاده از روش فنل‌کلروفرم استخراج و با استفاده از اسپکتروفتومتری تعیین غلظت گردید و به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر ژن PA20 ابتدا با آنزیم Taq پلی‌مراز (سیناژن- ایران) در غلظت ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs و در دمای اتصال ۶۱ درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی شد. به منظور جلوگیری از جهش‌های ناخواسته تکثیر نهایی ژن با استفاده از آنزیم Pfu پلی‌مراز (Fermentas) در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. هر واکنش PCR شامل ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۲۵ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Pfu، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10XPCR و $MgSO_4$ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار و ۵۰ نانوگرم از پلاسمیدهای استخراج شده باسیلوس آنتراسیس بود. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۶۰ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

محصول PCR به کمک مارکر اسید نوکلئیک (#SM0313) روی ژل آگارز بررسی شد. سپس روی ژل آگارز با غلظت ۱ درصد (سیناژن- ایران) منتقل‌شده و از ژل تخلیص و به انتهای آن‌ها نوکلوتید A اضافه شد. برای همسانه‌سازی و تراریخت کردن از وکتور کلونینگ pEGM-T Easy Vector(Promega) و سلول‌های مستعد E. coli سویه DH5α استفاده شد.

لازم به ذکر است وقتی که قطعه مورد نظر با آنزیم Pfu تکثیر می‌شود این آنزیم توانایی تکثیر نوکلئوتید بدون الگو را ندارد. این عمل به صورت جداگانه به وسیله آنزیم Tag پلیمراز انجام می‌شود تا در وکتور pEGM-T Easy Vector(Promega) همسانه سازی شود که عمل PCRیک سیکلی بوده و به جای dNTP از dATP استفاده می‌شود.

وکتور بیانی pET28a(+)-ipaD-Linker-stxB و ژن pa20 از وکتور کلونینگ با آنزیم‌های برشی محدودالاثر SalI و NdeI هضم و وکتور بیانی pET28a(+)-Linker-stxB و ژن pa20 از روی ژل آگارز تخلیص و جداسازی شدند. سپس قطعه ژنی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

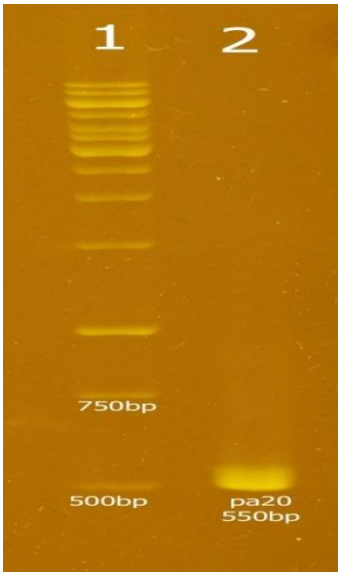
pa20 و pET28a(+)-Linker-stxB با آنزیم T4 Ligase (Fermentas) به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد ممزوج شد. در نهایت پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-pa20-Linker-stxB در میزبان بیانی E.coliBL21 (DE3) که یک سویه بسیار قوی برای بیان ژن‌های نوترکیب می‌باشد، تراریخت گردید.

کلنی نوترکیب انتخاب شده در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از اینکه میزان جذب (OD) به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسید (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری) بیان با محلول ۱ میلی‌مولار ایزوپروپیل تیو-β- D– گالاکتوزید (IPTG) القاء گردید و به مدت ۵ ساعت در ۳۷ درجه با شیک ۱۱۰ دور بر دقیقه انکوبه گردید. پس از انکوباسیون باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ جمع شدند. دیواره پلاک سلولی توسط بافر لیزکننده شکسته و سپس سونیکیت گردید. سلول‌های لیزشده با سانتریفیوژ در rpm۱۳۵۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه جمع شدند. میزان بیان و وزن مولکولی پروتئین نوترکیب PA20-L-STxB به کمک الکتروفورز روی ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی‌اکریل‌امید ۱۲ درصد(SDS-PAGE) همراه با مارکر پروتئینی (Vivantis)(#PR0602-S) تحت شرایط دناتوره مورد بررسی قرار گرفت. سپس تمام پروتئین‌های نوترکیب به کمک توالی His- tag در انتهای N ترمینال خود توسط ستون کروماتوگرافی با رزین Ni-NTA تخلیص و توسط SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند.

برای تأیید پروتئین نوترکیب بیان‌شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد PA کامل استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳ روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی‌مولار، KCl ۲/۷ میلی‌مولار، $Na_2HPO_4.7H_2O$ ۴/۳ میلی‌مولار، توین ۲۰ درصد و pH: ۷/۲ حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شستشو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۴۰۰ آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد PA کامل در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. نمونه پس از شستشو مجدد با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۵۰۰ از آنتی‌بادی کانژوگه موشی (Dako) در بافر PBST در دمای اتاق قرار گرفت و در نهایت پس از سه بار شستشو با بافر PBST، برای آشکارسازی از بافر تریس ۵۰mM pH:۷/۸ حاوی DAB۶mg، ۱۰ میکرولیتر H_2O_2 استفاده شد. واکنش با استفاده از H2O متوقف گردید.

نتایج

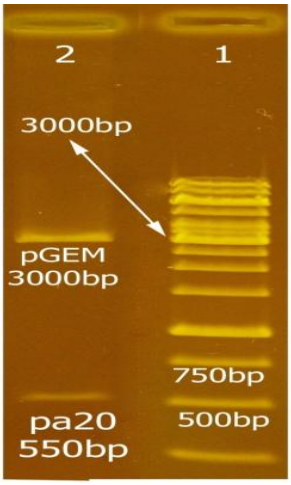
پس از تکثیر ژن pa20 به روش PCR، محصول روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف همخوانی داشت (۵۵۰ جفت باز).



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن pa20 روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ مارکر اسید نوکلئیک (#SM0313) و چاهک۲ محصول PCR ژن pa20

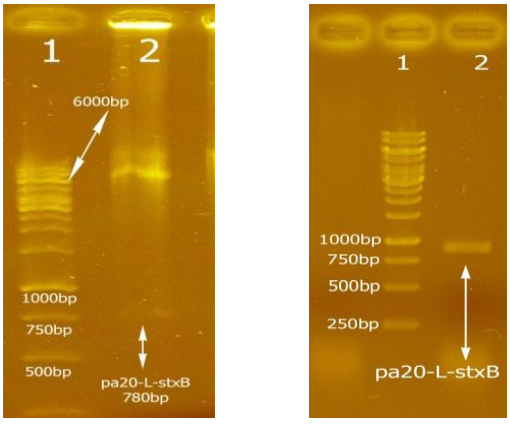
پس از تخلیص پلاسمید و تأیید آنها روی ژل آگارز، برای تأیید بیشتر از پلاسمیدها به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید، از طرفی با دو آنزیم NdeI و SalI هضم و سپس به کمک مارکر اسیدنوکلئیک، اندازه قطعه خارج شده از وکتور تأیید شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



شکل ۲: الکتروفورز محصول هضم آنزیمی به منظور تایید همسانه‌سازی ژن هدف بر روی ژل آگارز ۱ درصد.
چاهک۱مارکر اسیدنوکلئیک (#SM0313) و چاهک ۲ برش آنزیمی روی pGEM-Teasy vector

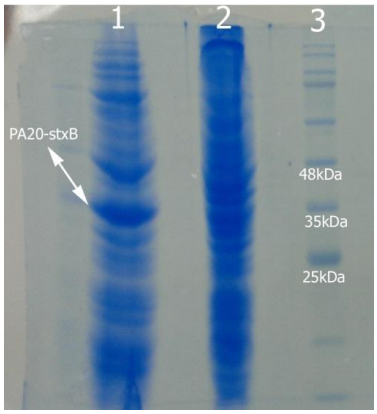
قطعه ژنی pa20 و pET28a(+)-Linker-stxB با آنزیم T4 Ligase(Fermentas) ممزوج و در نهایت پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-PA20-Linker-stxB در میزبان بیانی E.coliBL21 (DE3) ترانسفورم گردید. برای تأیید ممزوج وکتور نوترکیب پس از استخراج پلازمید PCR و سپس با آنزیم‌های برشی محدودالاثر XhoI و NdeI برش زده شد و مشاهده قطعه‌ای در حدود ۷۸۰ bp گواهی بر آن بود.



(ب) (الف)

شکل۳: برش آنزیمی وکتور نوترکیب pET28a(+)-pa20-Linker-stxB
الف) چاهک۱ مارکر اسید نوکلئیک(#SM0313) و چاهک ۲ محصول PCR. ب) چاهک۱ مارکر اسید نوکلئیک(#SM0313) و چاهک ۲ محصول برش آنزیمی

بیان ژن نوترکیب در وکتور pET28a(+): کلنی انتخاب شده، در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از رسیدن به رشد کافی به منظور بیان پروتئین توسط IPTG ۱ میلی‌مولار القاء گردید و برای بررسی بیان و کیفیت آن روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد برده شد. باند پروتئینی مدنظر در جایگاه حدود ۳۵ کیلودالتونی قرار گرفت در حالی که در کنترل هیچ باندی دیده نشد.



شکل ۴: الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE به منظور بررسی بیان پروتئین مورد نظر.
ردیف ۱: نمونه القاء شده با ماده IPTG ردیف ۲: نمونه بدون القاء با ماده IPTG ردیف ۳: مارکر پروتئینی(#PR0602-S)(Vivantis) .

به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک Western Blotting استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد PA کامل استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونهٔ القا شده با IPTG است یک باند در نزدیکی ۳۵kDa مشاهده می‌شود. در ستون شاهدکه تحت القای IPTG نبوده، مشاهده نمی‌شود.

شکل ۵: لکه‌گذاری وسترن. ردیف ۱ مارکر پروتئینی(#PR0602-S) (Vivantis)، ردیف ۲ نمونه شاهد القا نشده، ردیف ۳ نمونه تست القا شده با IPTG.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نقش ایمنی زایی آنتی ژن محافظتی (PA) و همچنین نقش ایمنی زایی، اجوانتی و دلیوری پروتئین STxB، تولید پروتئین نوترکیب و ممزوج STxB-PA کمک زیادی به ایمنی‌زایی در برابر بیماری سیاه زخم و شیگلا می‌کند و روزنه‌ای برای تولید کاندید واکسن کایمریک ایجاد می‌کند. این موضوع مستلزم روش صحیح همسانه‌سازی و بیان مناسب پروتئین نوترکیب می‌باشد. سیاه‌زخم از کشنده‌ترین بیماری‌های انسانی و دامی بوده و بهترین راه مقابله با آن استفاده از واکسن می‌باشد. تعدادی از آنتی‌ژن‌های باسیلوس آنتراسیس به منظور بررسی توانایی‌شان برای القای ایمنی حمایتی علیه بیماری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از شناخته‌ترین این آنتی‌ژن‌ها می‌توان کپسول، لایه S، پلی‌ساکاریدهای سطحی و پروتئین‌های دیگر را نام برد. تنها پروتئین‌هایی که با یکدیگر توکسین سیاه‌زخم را می‌سازند، باعث تولید آنتی‌بادی‌های قابل شناسایی می‌شوند(۲۰-۱۸).

PA یکی از آنتی‌ژن‌های شناخته شده باسیلوس آنتراسیس بوده و بدون LF, EF غیر سمی می‌باشد. سمیت سلولی زمانی اتفاق می‌افتد که کل طول PA (PA۸۳) به گیرنده سطح سلولی، به واسطه دومن ۴ که شامل ناحیه اتصال به گیرنده سلول میزبان می‌باشد، متصل شود(۲۱). هنگام اتصال به رسپتور سلول میزبان اسیدهای آمینه N ترمینال ۱تا ۱۶۷ دومن 1a از دومن ۱ که شامل یک ناحیه شکست پروتئاز فورین است(۲۲)، شکسته می‌شود و ناحیه اتصال EF یا LF را در دومن 1b در معرض و نزدیکی دومن ۳ قرار می‌دهد(۲۳). دومن‌های ۲ و ۳، قسمتی از یک منفذ هپتامری بر روی سطح سلولی هستند(۶)، LF یا EF بر روی گیرنده‌اش متصل می‌شوند و درون سیتوزول سلول، جایی که اثر سمیت را نشان می‌دهد، جابه جا می‌شود(۲۵). بنابراین جدا شدن دومن PA20 برای تشکیل و ورود کمپلکس توکسین مخصوصاً توکسین کشنده به درون سلول میزبان ضروری است که با آلوده شدن بیمار هر دو قطعه ۶۳ و ۲۰ کیلودالتونی PA قابل شناسایی است ولی نقش پروتئین PA20 در بیماری‌زایی مشخص نیست(۷).

واکسن‌های موجود علیه بیماری سیاه زخم نظیر (AVA: Anthrax Vaccine Adsorbed) و AVP حاوی مقادیر متغیر از PA و همچنین مقادیر کمتر از EF، LF و دیگر پروتئین‌های ترشحی می‌باشند(۲۵). ارزش حفاظتی این دو واکسن و واکسن‌های مشابه به خاطر محتوای PA آنها می‌باشد. اولیگوپپتیدهای زیرواحد PA 1-a در واکسن‌های ذخیره شده در کشور انگلستان مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج نشان داده بالاترین درصد اولیگوپپتیدهای PA مربوط به اولیگوپپتیدهای PA20 می‌باشد(۹). استنباط می‌شود آنتی‌ژن PA20 یک پپتید پایدار در برابر پروتئازها مقاوم بوده که با مخلوط آنتی ژن‌های PA20، PA۶۳، LF D1 و غیره میزان تیتر آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی را در حیوانات مدل می‌توان افزایش داد(۲۶).

امروزه نقش القای آپوپتوزی PA20 و حضور اولیگو پپتیدهای آن بر روی اجزاء تشکیل‌دهنده واکسن‌های تضعیف شده (AVP) به اثبات رسیده است(۷،۹). بنابراین PA20 می‌تواند به عنوان یک آنتی سرطان و کاندید واکسن نوترکیب کمکی علیه باسیلوس آنتراسیس مطرح باشد.

توکسین STx می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروتوکسیک خطرناکی را ایجاد نماید. زیرواحد STxB به عنوان یکی از کاندیداهای مهم ساخت واکسن علیه شیگلا دیسانتری و شیگا توکسین اشرشیاکلی O157 مطرح است. با تولید آنتی بادی علیه این زیر واحد (STxB) می‌توان با جلوگیری از اتصال سم شیگا توکسین مانع از ورود قسمت سمی (STxA) به درون سلول و مانع اثرات مخرب آن شد. در تحقیقات انجام شده به علت شباهت ساختاری زیرواحد سمی STx با همتای آن در باکتری اشرشیاکلی(EHEC) یعنی (SLT: Shiga Like Toxin) یک هدف مشترک از این همسانه سازی‌ها در نظر محققین دنبال می‌شود و آن هدف ایمنی زایی مؤثر علیه هر دو عامل شیگلا و اشرشیاکلی می‌باشد(۱۱).

به منظور تقویت اثر واکسن‌ها دانشمندان توجه خاصی به ادجوانت‌ها یا یاورها و نانوواکسن‌ها دارند. امروزه ادجوانت‌های زیادی کشف شده است که معروف‌ترین آنها می‌توان به ادجوانت کامل فروند و ادجوانت ناقص فروند و هیدروکسید

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

آلومینیوم، PLGA، MCM، کایتوزان و غیره اشاره کرد. تقویت ایمنی و ویژگی‌های ادجوانتی زیرواحدهای B بعضی از توکسین‌ها مثل CTB، LTB، RTB وSTB که زیرواحد B انتروتوکسین شیگلا می‌باشد به طور گسترده در مطالعات اخیر گزارش شده است(۲۷).

در این تحقیق، با توجه به شناسایی آنتی‌ژن (PA) به وسیله آنتی‌بادی PA20 و خاصیت القای آپاپتوز آن و همچنین خاصیت ایمنی‌زایی، اجوانتی و دلیوری پروتئین STxB و بیان زیاد Gb3 در سطح سلول‌های سرطانی انسان، تلاش شد تا پروتئین نوترکیبی با ممزوج کردن ژن‌های pa20 و stxB تولید شود. پروتئین ساخته شده می‌تواند به عنوان یک آنتی سرطان و کاندید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا، اشریشیاکلی و باسیلوس آنتراسیس مطرح باشد.

سپاسگزاری

از تمامی اساتید، پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین(ع)، که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

References:

1- Brey RN. ***Molecular basis for improved anthrax vaccines.*** Adv Drug Deliv Rev 2005; 57(9); 1266-92.

2- Bragg TS, Robertson DL. ***Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (lef) from Bacillus anthracis.*** Gene 1989; 81(1): 45-54.

3- Okinaka R, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster A, Hill K, Keim P, et al. ***Sequence assembly and analysis of pXO1 and pXO2.*** J Appl Microbial 1999; 87(2): 261-2.

4- Ezzell JW, Ivins BE, Leppla SH. ***Immunoelectrophoretic analysis, toxicity, and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of Bacillus anthracis toxin.*** Infect Immun 1984; 45(3): 761-67.

5- Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renatus M, Petosa C, Bienkowska J, et al. ***Crystal structure of the anthrax lethal factor.*** Nature 2001; 414(6860): 229-33.

6- Milane JC, Furlong D, Hanna PC, Wall JS, Collier RL. ***Anthrax protective antigene forms oligomers during intoxication of mammalian cells.*** J Biol Chem 1994; 269(32): 20607-12.

7- Hammamieh R, Ribot WJ, Abshire TG, Jett M, Ezzell J. ***Activity of the Bacillus anthracis 20 kDa protective antigen Component,*** BMC Infect Dis 2008, 8: 124.

8- Reasona DC, Ullal A, Liberatoa J, Sun J, Keitel W, Zhou J. ***Domain specificity of the human antibody response to Bacillus anthracis protective antigen***. Vaccine 2008; 26(32): 4041-7

9- Whiting G, Wheeler JX, Rijpkema S. ***Identification of peptide sequences as a measure of Anthrax vaccine stability during storage.*** Human Vaccin Immunother 2014; 10(6): 1669-81.

10- Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya SK. ***Shigellosis:challenges& management issues.*** Indian J Med Res 2004; 120(5): 454-62.

11- Johannes L, Römer W. ***Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications.*** Nat Rev Microbiol 2010;

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

8(2): 105-16.

12- Madanchi H, Honari H, Sadraeian M, Hesaraki M. ***Fusion of CtxB with StxB, Cloning and Expression in E. coli: a challenge for improvement of immune response against StxB.*** Iran J Pharmaceutical Sci 2011; 7(3): 185-90

13- Islam D, Veress B, Bardhan PK, Lindberg AA, Christensson B. ***In situ characterization of inflammatory responses in the rectal mucosae of patients with shigellosis.*** Infect Immun 1997; 65(2): 739-49.

14- Sansonetti PJ. ***Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by Shigella species.*** Rev Infect Dis 1991; 13(Suppl 4): 285- 92.

15- Woffenden BJ, Nopo LH, Cramer CL, Dolan MC, Medina-Bolivar F. ***Expression of a ricin B:F1:V fusion protein in tobacco hairy roots: steps toward a novel pneumonic plague vaccine.*** Electr J Integrative Biosci 2008; 3(1): 10-19.

16- Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, van Effenterre D. ***Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites.*** Biol Cell 2008; 100(12): 717-25.

17- Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaee S. ***Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein.*** Arak Univ Med Sci J (AMUJ) 2013; 16(73): 83-93. [Persian]

18- Hambleton P, Turnbull PCB. ***Anthrax vaccine development: a continuing story***. Adv Biotechnol Processes 1990; 13: 105-22.

19- Singh Y, Ivins B, Leppla SH. ***Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of Bacillus anthracis.*** Infect Immun 1998; 66(7): 3447-48.

20- Flick-Smith H, Walker NJ, Gibson P, Bullifent H, Hayward S, Miller J, et al. ***A recombinant carboxyl-terminal domain of the protective 113 antigen of Bacillus anthracis protects mice against anthrax infection.*** Infect Immun 2002; 70(3): 1653-56.

21- Little SF, Novak JM, Lowe JR, Leppla SH, Singh Y, Klimpel KR, 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): 707-715.

22- Klimpel KR, Molloy SS, Thomas G, Leppla SH. ***Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin***. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(21): 10277-81.

23- Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, Leppla SH, Liddington RC. ***Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen.*** Nature 1997; 385(9916): 833-38.

24- Friedlander AM. ***Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process.*** J Biol Chem 1986; 261(16): 7123-26.

25- Kudva IT, Griffin RW, Garren JM, Calderwood SB, John M. ***Identification of a protein subset of the***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

anthrax spore immunome in humans immunized with the anthrax vaccine adsorbed preparation. Infect Immun 2005; 73(9): 5685-96.

26- Casadevall A, Pirofski LA. ***The potential of antibody-mediated immunity in the defence against biological weapons.*** Expert Opin Biol Ther 2005; 5(10): 1359-72.

27- Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, et al. ***A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2.*** Vaccine 2008; 26(17): 2092-9.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

Cloning and Expression of Fusion Genes of Domain A-1 Protective Antigen of Bacillus Anthracis and Shigella Enterotoxin B Subunit (Stxb) In E. Coil

Ahmadi AH(MSc)[1], Honari H(PhD)[*2], Minaei ME(PhD Student)[3]

[1,2]Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran, Iran
[3]Department of Nanobiotechnology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran, Iran

Received: 5 Jun 2014 ***Accepted:*** 13 Nov 2014

Abstract

Introduction: Shigella enterotoxin(STxB) is one of the major virulent factors in Shigella dysenteriae type 1 and E. coli O157:H7, which its immunogenicity, adjuvant and delivery characteristic have been proven. Anthrax is a common disease in humans and animals and identifies domain a-1 antibodies of protective antigen(PA) which is 62% of the PA antigens of Bacillus anthracis. Therefore, the purpose of this study was to investigate the expression of recombinant protein domain a-1 protective antigen(PA20) of Bacillus anthracis with Shigella enterotoxin B subunit(STxB) in E. coli.

Methods: In this experimental study, primers of pa 20 gene were designed for replacement in stxB-ipaD gene cassette. PCR was performed in order to amplify the fragment and the amplified fragments were cloned into pGEM-Teasy vector. NdeI and SalI restriction enzymes cut pa20 genes and finally the genes pa20 were fused with genes stxB. PET28a (+) Vector containing the gene cassette pa20-stxB was transformed into E. coli strain BL21(DE3) and expression of gene cassette was studied.

Results: pa20-stxB fused genes were confirmed in the expression vector pET28a(+) by PCR, enzyme digestion and Sequencing. The produced recombinant proteins were confirmed by SDS-PAGE and Western blotting.

Conclusion: The findings of the current study revealed that this antigen can be raised as an anti-cancer and recombinant vaccine candidate against types of Shigella, Escherichia coli and Bacillus anthracis which can be due to such factors as identification of antigen(PA) by antibody PA20, its apoptosis induction properties, property of immunogenicity, adjuvant and delivery of STxB protein and high expression levels of Gb3 in human cancer cells.

Keywords: Bacillus anthracis; Protective antigen(PA20); Shigella dysenteriae type 1; Shigella enterotoxin B subunit(STxB)

This paper should be cited as:
Ahmadi AH, Honari H, Minaei ME. ***Cloning and expression of fusion genes of domain a-1 protective antigen of bacillus anthracis and shigella enterotoxin b subunit (Stxb) in E. coil***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 22(6): 1702-11.

Corresponding author: Tel: +98 9123848187, Email: honari.hosein@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]