مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره۱۲، اسفند ۱۳۹۵
صفحه: ۱۰۳۳-۱۰۲۴

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.12, Feb-Mar 2017
Pages:1024-1033

زیرهمسانه‌سازی و بیان ژن SO6 گیاه غاسول صابونی در باکتری *E.coli* و بررسی تیتر آنتی‌بادی آن در رَت آزمایشگاهی

مسعود عبدالهی[۱]، حسین هنری[*۲]، شهرام نظریان[۳]، مهدی مسعودی کرهرودی[۴]

چکیده

مقدمه: پروتئین‌های غیرفعال‌کننده گیاهی (RIP) به عنوان آنزیم‌های N-glycosidase عمل می‌کنند و به وسیله چندین عضو از خانواده Caryophyllaceae مانند *Saponaria Officinalis* تولید می‌شوند. ایزوفرم‌های مختلفی از RIPها به وسیله *Saponaria Officinalis* بیان می‌شوند. ایزوفرم SO6، آدنین 4324 را در توالی حفاظت‌شده GAGA در چهار لوپ 28SrRNA را دپورینه کرده و سنتز پروتئین را مختل می‌کند. هدف این مطالعه بیان ایزوفرم SO6 در باکتری *E.coli* و بررسی تیترآنتی‌بادی آن در رت‌های آزمایشگاهی است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ژن *SO6* سنتز شده از پلاسمید pUC57-SO6 نوترکیب به وسیله آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و *Sal*I جدا و در وکتور بیانی pET28a(+) زیرهمسانه‌سازی شد. بیان پروتئین نوترکیب با IPTG القا گردید. پروتئین SO6 نوترکیب به وسیله کروماتوگرافی تمایلی نیکل تخلیص گردید. به منظور تایید پروتئین نوترکیب western blotting انجام گرفت. رَت‌ها به صورت صفاقی با پروتئین تخلیص شده واکسینه شدند و تیتر IgG سرم به روش ELISA مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: واکنش PCR و هضم آنزیمی، زیرهمسانه‌سازی ژن *SO6* را در وکتور بیانی pET28a(+) تائید کرد. یک باند پروتئینی 29.5kDa در SDS-PAGE بیان بالای پروتئین نوترکیب را نشان داد. آنتی‌بادی پلی کلونال، SO6 را شناسایی کرد. تست ELISA تیتر آنتی‌بادی قابل‌توجهی را بعد از تزریق پروتئین در گروه‌های تست در مقایسه با گروه‌های کنترل تائید کرد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که آنتی‌ژن SO6 نوترکیب تخلیص شده ایمونوژن است، این آنتی‌ژن می‌تواند برای تحقیقات ضد سرطانی و کاندید واکسن استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: N-glycosidase، غاسول صابونی، غیرفعال‌کننده ریبوزوم، SO6

۴،۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران
۲- دانشیار ژنتیک، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران
۳- استادیار بیوتکنولوژی میکروبی ، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷، پست الکترونیکی:honari.hosein@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

مقدمه

گیاهان مجموعه‌ای از مکانیسم‌های دفاعی القایی و ساختمانی برای حفاظت در مقابل بیماری‌زایی ویروسی، باکتریایی و قارچی را در طول دوره تکامل کسب کرده‌اند. یکی از این سازوکارهای دفاعی، به‌کارگیری مواد شیمیایی است که ماهیت پروتئینی با وزن مولکولی کم داشته و پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم (Proteins Ribosome Inactivating) RIPs نامیده می‌شوند. این پروتئین‌ها می‌توانند به میزان زیاد و در پاسخ به آلودگی‌ها و دیگر تنش‌ها در گیاهان جمع شوند و با غیرفعال کردن ریبوزوم‌ها فرآیند پروتئین‌سازی را متوقف کنند. پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم اولین بار در سال ۱۹۸۳ شناسایی و جداسازی شدند. این ترکیب‌ها دارای گروه‌های متنوعی هستند و از منابع مختلف گیاهی، باکتریایی و قارچ سنتز می‌شوند.RIPهای نوعI پروتئین‌های مونومری با وزن مولکولی تقریباً ۳۰kDa هستند که دارای فعالیت آنزیمی RNA N-glycosidas می‌باشند. در مقابل، ترکیب‌های دسته دوم هستند که شامل پروتئین‌های مشتق شده از ۲ رشته شامل زنجیر A با فعالیت آنزیمی RNA N-glycosidas و یک یا چند زنجیر B که این زنجیر سبب ورود راحت‌تر این پلی‌پپتید به سیتوپلاسم می‌شود. وزن مولکولی این نوع از پلی‌پپتیدها تقریباً ۳۵kDa می‌باشند. معمولاً زنجیرهای B از پپتیدهای شبه لکتین تشکیل شده‌اند. یکی از این پروتئین‌ها، saporin-S6 است که جز خانواده نوع I بوده و بیشتر از دانه گیاه *Saponaria Officinalis* استخراج می‌شود. نحوه ذخیره‌سازی آن برای مدت‌های طولانی در دمای ۲۰- درجه و برای مدت کوتاه در ۴ درجه است(۱). ساختار کریستال 2Å غیرفعال کننده ریبوزوم (ساپورین) folding حفظ شده‌ای را با وجود برخی اختلافات در ناحیه لوپ نشان می‌دهد. این پروتئین واجد ۲ دومین است: یک دومین β-strand در ناحیه N-terminal و یک ناحیه غنی از α-helix در دومین *C*-terminal. دومین *N*-terminal شباهت زیادی به دیگر RIPها دارد. ناحیه *C*-terminal شامل دو رشته ناموازی است که به وسیله لوپ بین رشته β8 و β7 در ناحیه C-terminal به همدیگر متصل می‌شوند. این موتیف کوچک‌تر از RIPهای دیگر است و با وجود گستردگی در شیار جایگاه فعال، در ساپورین کوچک‌تر ظاهر می‌شود و این موضوع به این اشاره دارد که دسترسی به این محل به آسانی ممکن خواهد بود (۲, ۳). در مورد ساپورین خانواده چند ژنی وجود دارد که حداقل ۱۰ ایزوفرم پروتئینی متفاوت از بخش‌های مختلف گیاه، مانند دانه، برگ، ریشه استخراج شده است (۴). سمی‌ترین ایزوفرم‌های ساپورین ایزوفرم ۵، ۶ و ۹ است. نتایج تطبیق توالی ایزوفرم‌ها به صورت: ایزوفرم ۱: ۹۵٪، ایزوفرم ۲: ۹۵٪، ایزوفرم ۳: ۹۰٪، ایزوفرم ۴: ۹۸٪، ایزوفرم ۵: ۹۸٪، ایزوفرم ۶: ۱۰۰٪، ایزوفرم ۷: ۹۸٪، ایزوفرم ۸: ۹۸٪ و ایزوفرم ۹: ۹۱٪ بوده و بیشترین افتراق با ایزوفرم ۶ مربوط به ایزوفرم ۹ است. پروتئین بالغ saporin-S6 ۲۵۳ اسیدآمینه است. توالی کامل saporin-S6 در سال ۱۹۹۰ شناسایی شد و تقریباً ۱۰٪ اسیدهای آمینه را در saporin-S6 اسیدآمینه لیزین تشکیل داده است (۵). ساپورین به واسطه کلاترین اندوسیتوز و به سیستم انتقال اندوزومی ترشح می‌گردد (۶-۸). چندین روش برای مرگ سلولی با پروتئین saporin-S6 وجود دارد. سازوکار مرگ سلولی به گونه‌ای است که زمانی که saporin-S6 به سیتوپلاسم یا شبکه آندوپلاسمی یا هسته رسید می‌تواند سبب فعال شدن apoptosis (به هر دو شکل وابسته و غیر وابسته به کاسپاز)، اتوفاژی، نکروزیس و استرس اکسیداتیو شده و سنتز پروتئین را مهار کند (۹, ۱۰). پروتئین‌های این گیاه علاوه بر فعالیت ضدویروسی و ضدقارچی (۱۱, ۱۲)، توانایی از بین بردن سلول‌ها را از طریق اختلال در سنتز پروتئین‌ها دارند و از همین رو می‌توانند به عنوان عوامل فعال بیولوژیک و ضد سرطان استفاده شوند. هدف این مطالعه بیان ژن *SO6* در *E.coli* و بررسی ایمنی‌زایی در رَت آزمایشگاهی بود که با موفقیت حاصل گردید.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی توالی کامل ژن *SO6* گیاه غاسول صابونی (*Saponaria Officinalis*) از بانک ژن (NCBI با شماره

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

(Accession No: X15655.1) استخراج گردید. توالی ژن صناعی مورد نظر به منظور بهینه‌سازی، استفاده صحیح از کدون‌ها برای میزبان مورد نظر، تصحیح مقدار محتوای GC، ایجاد ساختمان ثانویه صحیح برای mRNA، تصحیح نواحی پیرایشی و تعدیل جایگاه‌های برش به منظور جلوگیری از تداخل در کلونینگ بررسی شد و با در نظر گرفتن جایگاه‌های برش آنزیمی *Bam*HI و *Sal*I در وکتور pUC57 جهت سنتز به شرکت ندای فن سفارش داده شد.

سلول‌های مستعد ***E.coli*** سویه DH5α از آزمایشگاه باکتریولوژی دانشگاه امام حسین با روش کلرید کلسیم تهیه و ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید واجد ژن با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد تراریخت گردید. سلول‌های واجد پلاسمید نوترکیب بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غربال‌گری شد(۱۳).

برای انجام زیرهمسانه‌سازی واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و *Sal*I بر روی پلاسمید pUC57 و وکتور بیانی pET-28a(+) انجام گرفت. قطعه ژنی *SO6* و pET-28a(+) برش خورده از روی ژل آگاروز به وسیله کیت استخراج DNA تخلیص گردید(۱۳).

ژن *SO6* که توسط آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و *Sal*I برش خورده و به وکتور بیانی pET-28a(+) که با همین آنزیم‌ها برش خورده و استخراج شده بود، الحاق گردید. واکنش الحاق ژن SO6 و وکتور بیانی pET-28a(+) به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد توسط آنزیم T4 DNA Ligase (شرکت فرمنتاز) صورت گرفت. محصول الحاق، با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E.coli* BL21 (DE3) تراریخت گردید(۱۳). کلونی‌های نوترکیب با آنتی‌بیوتیک کانامایسین غربال شده و حضور پلاسمید حاوی ژن *SO6* با PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت.

برای بیان ژن *SO6* از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح و پس از رسیدن OD (Optical density) به ۰/۶ در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر، ماده القاکننده (IPTG: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد(۱۴).

سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده B حاوی اوره ۸ مولار یکنواخت و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با سمپلر بافر دارای غلظت 5x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. در نهایت نمونه‌های تیمار شده توسط ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) ۱۲٪ از لحاظ بیان پروتئین بررسی شدند (۱۴). نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. (غلظت ژل ۱۲٪، جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر، ولتاژ ۳۰۰ ولت). برای مشاهده باندهای پروتئین، از روش رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو (R-۲۵۰) استفاده شد(۱۴).

پروتئین‌های نوترکیب به کمک توالی His-tag در انتهای N-terminal خود به وسیله ستون کروماتوگرافی با رزین Ni-NTA تخلیص و توسط SDS-PAGE بررسی شدند.

برای تائید پروتئین نوترکیب و پروتئین طبیعی تخلیص شده از گیاه، از تکنیک وسترن بلات (Western Blotting) استفاده شد. بلاتینگ نمونه‌ها، روی کاغذ نیتروسلولز انجام شد. ۲۰ میکروگرم از پروتئین در الکتروفورز پلی آکریل آمید ۱۲٪ لود شد و از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA: bovine serum albumin) (سیناژن) به همان مقدار پروتئین هدف به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس ژل از کاست الکتروفورز جدا شده و در بافر بلاتینگ شامل تریس ۲۵ میلی مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی مولار و اتانول ۲۰ درصد شستشو داده شد. پس از شستشو، ژل در ساندویچ وسترن بلات بسته‌بندی و در تانک وسترن قرار داده شد. فرآیند بلاتینگ در آمپر ۱۲۰ و ولتاژ ۷۰ ولت به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. به منظور پر کردن جایگاه‌های خالی، کاغذ نیتروسلولز پس از اتمام عمل بلاتینگ

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

به مدت یک شب در محلول ۳ درصد شیرخشک در PBST (Phosphat-Buffered Salin- Tween) در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سه مرتبه با PBST شستشو داده شد. کاغذ با آنتی‌بادی پلی‌کلونال رت با رقت ۱:۵۰۰۰ در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت گرماگذاری شد. فرآیند شستشو با PBST سه بار انجام گرفت. کونژوگه رَت با رقت ۱:۲۰۰۰ به عنوان آنتی‌بادی ثانویه تشخیص دهنده بکار رفت. همانند مرحله قبل گرماگذاری انجام شد. فرایند شستشو نیز همانند مراحل قبلی انجام شد. نهایتاً، کاغذ نیتروسلولز در محلول سوبسترای رنگ‌زای DAB (Diaminobenzidine)(۶۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۸) تا ظهور باند پروتئینی، قرار داده شد. برای توقف واکنش، آب مقطر اضافه شد (۱۴). غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفورد (Bradford) و با استفاده از BSA به عنوان استاندارد تعیین شد.

به منظور بررسی پاسخ ایمنی، با توجه به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات، از ۶ عدد رَت (جنس ماده با وزن ۱۷۵ گرم از پژوهشگاه علوم پزشکی دانشگاه بقیه‌الله) به عنوان تست و ۴ عدد به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر رَت، ۵۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده با PBS استریل به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. جهت آماده‌سازی نمونه‌ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوانت روغن در آب (oil in water) اضافه گردید (حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر) و سپس محتویات همگن گردید. در پایان، به هر رَت تست ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده که حاوی ۵۰ میکروگرم آنتی ژن مورد نظر بود، به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

تعیین تیتر آنتی‌بادی به روش الایزای غیرمستقیم: الف) تثبیت پروتئین به عنوان آنتی ژن در کف میکروپلیت: مقدار ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب محلول در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ (Cotting Buffer) داخل هر یک از چاهک‌های الایزا ریخته و دو چاهک جهت کنترل در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه قرارداده شد. ب) شستشوی چاهک‌ها با PBST: این عمل پس از هر مرحله اصلی آزمایش الایزا و پس از تخلیه مواد هر مرحله انجام و سپس با ضربه زدن بر روی تنظیف پارچه‌ای، خشک گردید. ج) مسدود کردن محل‌های خالی از آنتی‌ژن در کف چاهک‌ها: محلول ۵٪ شیر خشک در PBST به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. این عمل جهت جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته سرم و کانژوگه با میکروپلیت صورت گرفت. د) تهیه سریال رقت از سرم حیوانات تست و کنترل: جهت تهیه سریال رقت از سرم حیوانات، ابتدا از هر سرم موش ۳ میکرولیتر برداشته و در ۳۰۰ میکرولیتر بافر PBST ریخته و به خوبی پیپت گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به درون چاهک اول (A) و دوم (A) منتقل شد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBST نیز به درون چاهک‌های دوم (B) تا ششم (F) ریخته شد. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر سرم رقیق شده از درون چاهک دوم به چاهک سوم منتقل شد و به کمک سمپلر با پیپت کردن کاملاً مخلوط گردید (حدود ۸ بار پیپت شود). بدین ترتیب چاهک دوم نسبت به چاهک اول ۱/۲ رقیق شد و این عمل تا چاهک ششم ادامه پیدا کرد و هر چاهک نسبت به چاهک قبل از خود به میزان ۱/۲ رقیق گردید. به چاهک کنترل حاوی آنتی ژن، ۱۰۰ میکرولیتر PBST و به چاهک کنترل حاوی آنتی‌بادی، ۱۰۰ میکرولیتر از سرم با رقت چاهک اول افزوده شد. سپس، میکروپلیت به مدت ۱ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ح) افزودن کانژوگه: رقت ۱:۱۵۰۰ از کانژوگه رت در PBST تهیه و از آن به میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون هر چاهک ریخته شد. به منظور کنترل اجزاء واکنش، در دو چاهک کنترل (فاقد آنتی‌ژن و فاقد آنتی‌سرم) نیز کانژوگه اضافه شد تا واکنش با آنتی‌ژن و نیز کانژوگه با آنتی‌بادی مشخص گردد، سپس پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید) و افزودن سوبسترا و توقف آزمایش: سوبسترا حاوی محلول OPD (O-phenilenediamine) حاوی ۳ میلی‌گرم OPD، ۵ میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات و ۳ میکرولیتر H_2O_2 بود که به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به هر چاهک اضافه و میکروپلیت به محل تاریکی منتقل شد تا واکنش انجام گیرد. به محض

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

ظهور رنگ در نمونه‌های کنترل، واکنش با اسید سولفوریک ۲/۵ مولار متوقف و جذب نوری چاهک‌ها در طول‌موج ۴۹۵ نانومتر خوانده شد (۱۴).

ضمنا نویسندگان تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی را رعایت نموده اند و چک لیست آن را در اختیار مجله قرار دادند.

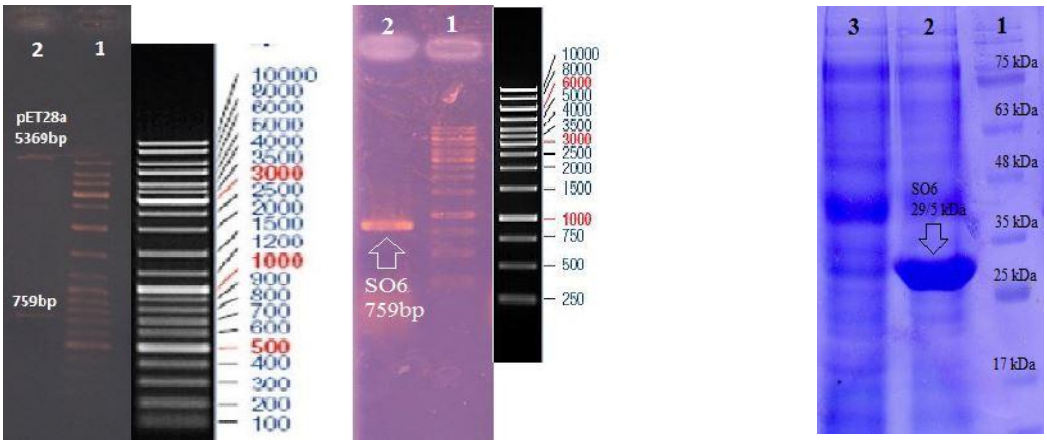
نتایج

برای بیان قطعه ژنی موجود در وکتور pUC57، قطعه ژنی SO6 به پلاسمید بیانی pET-28a(+) منتقل گردید.

به منظور زیرهمسانه‌سازی، قطعه مورد نظر در وکتور pUC57 با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده *Sal*I و *Bam*HI تحت هضم آنزیمی دوگانه قرار گرفت و ژن مورد نظر با طول توالی ۷۵۹ جفت باز از وکتور خارج گردید. برای قرار دادن قطعه ژنی SO6 در وکتور pET-28a(+)، پلاسمید با آنزیم‌های محدود کننده *Sal*I و *Bam*HI خطی شد. بعد از برش آنزیمی، پلاسمید با استفاده از کیت، تخلیص شد. پلاسمید تک باند شده در جریان الکتروفورز در راستای باند ۵۳۶۹ جفت بازی ایستاد.

برای قرار دادن قطعه ژنی *SO6* در پلاسمید pET-28a(+) واکنش اتصال با کمک آنزیم T4 لیگاز انجام شد. پس از الحاق ژن و وکتور، وکتور واجد ژن مورد نظر(SO6) به سلول‌های *E.coli* BL21(DE3) تراریخت شد.

برای تایید زیرهمسانه‌سازی PCR و برش هضم آنزیمی انجام گرفت. پس از تکثیر ژن SO6 به روش PCR، محصول روی ژل ۱٪ آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعه مورد نظر (۷۵۹bp) از لحاظ اندازه با ژن هدف ما همخوانی داشت (شکل ۱- الف). همچنین پلاسمیدها با دو آنزیم محدودکننده *Bam*HI و *Sal*I هضم شدند که نتایج به دست آمده مورد تایید بود (شکل ۱-ب).



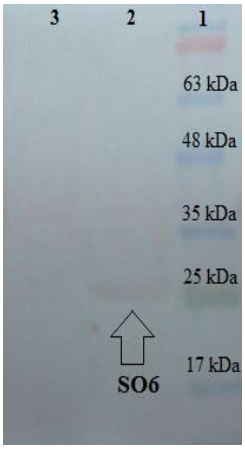
الف ب

شکل ۱: تأیید زیرهمسانه‌سازی ژن هدف در pET-28a(+) :
الف) PCR ژن مورد نظر: ستون ۱) نشانگر DNA ستون ۲) محصول PCR ژن SO6
ب) هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب: ستون ۱) نشانگر DNA ستون ۲) پلاسمید نوترکیب برش خورده

پس از تایید زیرهمسانه‌سازی، بیان سلول‌های مورد تایید انجام گرفت و بررسی بیان بر روی ژل 12٪ SDS-PAGE اعمال شد. پس از رنگ‌آمیزی، باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۹/۵kDa مشاهده گردید (شکل ۲- الف).

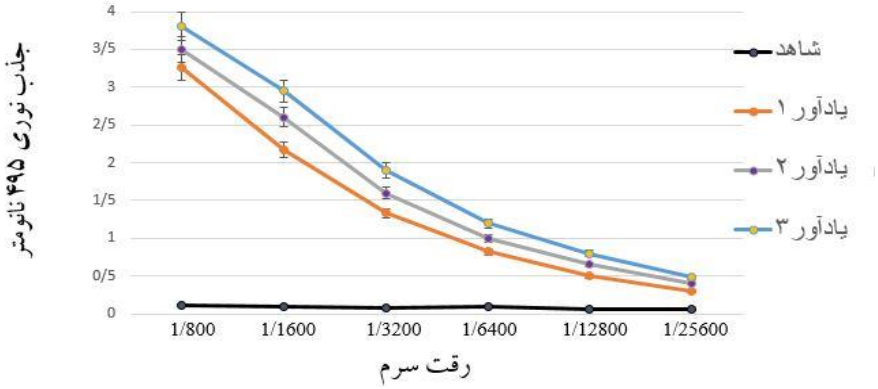
پس از تایید بیان، پروتئین نوترکیب مورد نظر با استفاده از ستون Ni-NTA تخلیص و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE الکتروفورز شد که پروتئین تک باند حاصل در راستای ۲۹/۵kDa قرار داشت و تخلیص پروتئین نوترکیب مورد تایید بود (شکل ۲- ب).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]



شکل ۲: بیان پروتئین مورد نظر و تخلیص آن
الف) بیان پروتئین مورد نظر: ستون ۱) نشانگر پروتئین ستون ۲) سلول تحت القا IPTG ستون ۳) نمونه شاهد، سلول بدون القا با IPTG
ب) تخلیص پروتئین مورد نظر: ستون ۱) نشانگر پروتئین ستون ۲) پروتئین نوترکیب تخلیص شده از ستون

به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک Western Blotting استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی پلی‌کلونال استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونهٔ القاشده با IPTG است یک باند در نزدیکی ۲۹/۵kDaمشاهده شد. در ستون شاهد که تحت القای IPTG نبود، باندی مشاهده نشد (شکل ۳).



نمودار ۱: بررسی ایمنی‌زایی به روش الایزا

برای پروتئین طبیعی تخلیص شده از کالوس گیاه نیز وسترن انجام شد و در راستای ۲۹/۵kDa، باند پروتئینی مشاهده گردید.

برای بررسی تیتر آنتی‌بادی، پس از خون‌گیری از حیوانات ایمن شده و شاهد، الایزا برای بررسی تیتر آنتی‌بادی انجام شد. نمودار ایمن‌سازی پس از هر بار خون‌گیری رسم گردید. آنتی‌ژن باعث تحریک ایمنی هومورال شده و افزایش تیتر آنتی‌بادی به ازای هر بار تزریق مشاهده شد (نمودار ۱).

بحث

گیاه غاسول صابونی با نام علمی *Saponaria officinalis*، یکی از گیاهان کمیاب ایران است که در مناطق معتدل و مرطوب خزری، درکنار جاده‌ها و رودخانه‌ها می‌روید. در واقع از این‌رو به آن صابونی می‌گویند که برگ‌های آن دارای ماده ساپونینی (Saponin) است و مانند صابون در آب کف می‌کند. ساپونین یکی از ترکیبات فعال زیستی تولید شده توسط این گیاه است و کاربردهای متعددی در حوزه پزشکی (شیمی درمانی)، کشاورزی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

(تولید سم) و بهداشت (تولید مواد شوینده و پاک‌کننده) دارد. این گیاه در دسته غیرفعال کننده‌های ریبوزومی (RIP) قرار دارد. ۲ نوع مختلف از RIPها وجود دارد: نوع I، یک پروتئین تک‌رشته (رشته A) است، در حالی که نوع II، از دو رشته پروتئینی (رشته A و رشته B) تشکیل شده است که این دو رشته توسط پل دی سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند. رشته A دارای فعالیت آنزیمی است و رشته B دارای خواص لکتینی است که این پروتئین را قادر می‌سازد تا به ریشه‌های گالاکتوز در سطح سلول اتصال یابد. ساپورین را می‌توان از ریشه، برگ، کالوس و بذرگیاه غاسول صابونی استخراج کرد (۴). ساپورین دارای حداقل ۱۰ ایزومر است و ایزومر ۶ آن یکی از سمی‌ترین ایزوفرم هاست. ایزوفرم‌های ۳، ۴ و ۶ از دانه جدا شده است. پروتئین ساپورین SO6 خانواده‌ای از این آنزیم‌های سمی با ماهیت پروتئینی است که در یوکاریوت‌ها با اخلال در کار ریبوزوم‌ها و دیگر اندام‌های سیتوپلاسمی در تولید پروتئین‌ها وقفه ایجاد می‌کنند و در نهایت موجب مرگ سلول می‌شوند (۱۵). RIP ها با فعالیت N-glycosidases، پیوند بین آدنین و گوانین درتوالی حفاظت‌شده GAGA واقع در حلقه آلفا-سارسین/ ریسین (sarcin-ricin loop(S/R)) زیر واحد 28SrRNA را جدا می‌کنند (دپورینه می‌کنند). این جدا کردن یا دپوریناسیون آدنین (Deadenilation)، از حلقه S/R از ایجاد فاکتور شماره ۲ طویل شدن در ریبوزوم (یعنی اتصال GTP به EF-2) و ادامه طویل شدن رشته پروتئینی جلوگیری کرده و باعث توقف سنتز پروتئین می‌شوند (۱۶). غلظت مهارکنندگی (inhibitory concentration) در ایزوفرم‌های مختلف متفاوت است. ایزوفرم‌های ۵، ۶ و ۹ جز قوی‌ترین ایزوفرم‌ها می‌باشند، به صورتی که این غلظت برای سه ایزوفرم نامبرده شده به ترتیب ۰/۰۵ نانو مولار، ۰/۰۶ نانو مولار و ۰/۰۳۷ نانو مولار است (۱۷). Saporin-S6 0.04٪ از وزن دانه یا ۷٪ از کل پروتئین‌های دانه را تشکیل می‌دهد (۱۸). مقایسه عملکرد دو ایزوفرم از دانه ساپورین (ایزوفرم ۵ و ۶) نشان می‌دهد که ایزوفرم ۶، خاصیت آنزیمی و فعالیت سمی بیشتری نسبت به ایزوفرم ۵ دارد (۱۹). شروع اثر سمیت Saporin-S6 توسط مهار سنتز پروتئین شروع اما مشاهده غیر فعال‌کنندگی ریبوزوم با دپورینه کردن DNA و دیگر نوکلئیک اسیدهایی است که از یکدیگر واسرشت شده‌اند آغاز می‌گردد. اولین توصیفی که از Saporin-S6 می‌توان گفت توانایی کشتن سلول‌ها با اپوپتوز است که در سال ۱۹۹۶ کشف گردید. برخی از ویژگی‌های اپوپتوز مانند قطعه قطعه شدن کروماتین، اجسام اپوپتوتیک، سلول‌های هیپودیپلوئید در لنفوسیت‌ها و بسیاری از رده‌های سلولی سرطان خون پیدا شده‌اند (۲۰, ۲۱). Saporin-S6 مانند ورود مایعات به صورت غیرفعال و به شکل پینوسیتوز (۸) و یا از طریق گیرنده‌های (۲۲) α_2-macroglobulin وارد شده و در نتیجه سمیت نسبتاً پایین‌تری نسبت به نوع ۲ غیرفعال کننده‌ها دارند. با این حال، اگر آن‌ها را وارد لیپوزوم‌ها کنیم (۲۳) و یا در بطن گلبول‌های قرمزی که می‌توانند به سلول‌های دیگر اتصال یابند (۲۴) وارد کنیم، خاصیت سمی غیرفعال کننده‌های نوع I، قوی‌تر از نوع II می‌شوند. ورود RIPها به سلول‌ها را می‌توان توسط پالس‌های الکتریکی (۲۵)، امواج (۲۶) و یا ورود فتوشیمیایی (۲۷) تسهیل کرد. RIPها علاوه بر فعالیت *N*-glycosidase دارای چندین فعالیت آنزیمی دیگر مانند فعالیت کیتینازی، سوپراکسید دیسموتازی، Dnase و لیپازی می‌باشند (۱۷). از آنجایی که این ترکیبات بسیار پایدار بوده و فعالیت آنزیمی قوی از خود نشان می‌دهند توانایی از بین بردن سلول‌ها از طریق اختلال در سنتز پروتئین‌ها را دارند و از آنتی‌بادی این ترکیبات به عنوان کیت تشخیصی عامل بیوتروریستی سم گیاهی غاسول صابونی در جنگ‌های بیولوژیک و همچنین به عنوان یک ترکیب ضد سرطان قوی می‌توان استفاده کرد (۲۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه ساپورین توانایی غیرفعال کردن ریبوزوم‌ها را دارد و همچنین با توجه به تولید آنتی‌بادی در رت می‌توان از آن به عنوان کاندید واکسن و همچنین در درمان تومورهای سرطانی استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع)، جهت مساعدت در اجرای پروژه سپاسگزاری می‌گردد

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

References:

1- Stirpe F, Battelli M. ***Ribosome-inactivating proteins: progress and problems.*** Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 2006; (16): 63-66.

2- Savino C, Federici L, Ippoliti R, Lendaro E, Tsernoglou D. ***The crystal structure of saporin SO6 from Saponaria officinalis and its interaction with the ribosome.*** FEBS letters 2000;470(3): 39-43.

3- Savino C, Federici L, Brancaccio A, Ippoliti R, Lendaro E, Tsernoglou D. ***Crystallization and preliminary X-ray study of saporin, a ribosome-inactivating protein from Saponaria officinalis.*** Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 1998; 54(4): 636-638.

4- Ferreras J, Barbieri L, Girbés T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ, et al. ***Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant Saponaria officinalis L.(Caryophyllaceae).*** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression 1993; 1216(1): 31-42.

5- Maras B, Ippoliti R, De Luca E, Lendaro E, Bellelli A, Barra D, et al. ***The amino acid sequence of a ribosome-inactivating protein from Saponaria officinalis seeds.*** Biochemistry international 1990; 21(5): 831-838.

6- Battelli MG, Montacuti V, Stirpe F. ***High sensitivity of cultured human trophoblasts to ribosome-inactivating proteins.*** Experimental cell research 1992; 201(1): 109-112.

7- Polito L, Bortolotti M, Farini V, Pedrazzi M, Tazzari PL, Bolognesi A. ***ATG-saporin-S6 immunotoxin: a new potent and selective drug to eliminate activated lymphocytes and lymphoma cells.*** British journal of haematology 2009; 147(5): 710-718.

8- Colaço M, Bapat M, Misquith S, Jadot M, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R. ***Uptake and intracellular fate of gelonin, a ribosome-inactivating protein, in rat liver.*** Biochemical and biophysical research communications 2002; 296(5): 1180-1185.

9- Daniels-Wells TR, Helguera G, Rodríguez JA, Leoh LS, Erb MA, Diamante G, et al. ***Insights into the mechanism of cell death induced by saporin delivered into cancer cells by an antibody fusion protein targeting the transferrin receptor 1.*** Toxicology in Vitro 2013; 27(1): 220-231.

10- Kroemer G, Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC. ***To die or not to die: that is the autophagic question.*** Current molecular medicine 2008; 8(2): 78-91.

11- Duggar BM, Armstrong JK. ***The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants.*** Annals of the Missouri Botanical Garden 1925; 12(4): 359-366.

12- Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J. ***Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties.*** Journal of Biological Chemistry 1991; 266(3): 1564-1573.

13- Sambrook J, Russell DW. ***Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition.*** Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK 2001.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

14- Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. ***Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: cloning, expression, purification, and proteolytic activity.*** Protein expression and purification 1999; 15(2): 221-227.

15- Puri M, Kaur I, Perugini MA, Gupta RC. ***Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications.*** Drug discovery today 2012; 17(13): 774-783.

16- Walsh MJ, Dodd JE, Hautbergue GM. ***Ribosome-inactivating proteins: Potent poisons and molecular tools.*** Virulence 2013; 4(8): 774-784.

17- Schrot J, Weng A, Melzig MF. *Ribosome-inactivating and related proteins.* Toxins 2015; 7(5): 1556-1615.

18- Stirpe F, Gasperi-Campani A, Barbieri L, Falasca A, Abbondanza A, Stevens W. ***Ribosome-inactivating proteins from the seeds of Saponaria officinalis L.(soapwort), of Agrostemma githago L.(corn cockle) and of Asparagus officinalis L.(asparagus), and from the latex of Hura crepitans L.(sandbox tree).*** Biochemical Journal 1983; 216(3): 617-625.

19- Bagga S, Hosur M, Batra JK. ***Cytotoxicity of ribosome-inactivating protein saporin is not mediated through α2-macroglobulin receptor.*** FEBS letters 2003; 541(1-3): 16-20.

20- Bergamaschi G, Perfetti V, Tonon L, Novella A, Lucotti C, Danova M, et al. ***Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis.*** British journal of haematology 1996; 93(4): 789-794.

21- Bolognesi A, Tazzari PL, Olivieri F, Polito L, Falini B, Stirpe F. ***Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins.*** International Journal of Cancer 1996: 349-355.

22- Cavallaro U, Nykjaer A, Nielsen M, Soria MR. ***α2-Macroglobulin Receptor Mediates Binding and Cytotoxicity of Plant Ribosome-Inactivating Proteins.*** European journal of biochemistry 1995; 232(1): 165-171.

23- McIntosh DP, Heath TD. ***Liposome-mediated delivery of ribosome inactivating proteins to cells in vitro.*** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1982; 690(2): 224-230.

24- Foxwell B, Long J, Stirpe F. ***Cytoxicity of erythrocyte ghosts loaded with ribosome-inactivating proteins following fusion with CHO cells.*** Biochemistry international 1984; 8(6): 811-819.

25- Mir LM, Banoun H, Paoletti C. ***Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization: direct access to the cytosol.*** Experimental cell research 1988; 175(1): 15-25.

26- Kodama T, Doukas AG, Hamblin MR. ***Delivery of ribosome-inactivating protein toxin into cancer cells with shock waves.*** Cancer letters 2003; 189(1): 69-75.

27- Selbo P, Kristian al, Høgset A, Prasmickaite L, Berg K. ***Photochemical internalisation: a novel drug delivery system.*** Tumor biology 2002; 23(2): 103-112.

28- Stirpe F. ***Ribosome-inactivating proteins.*** Toxicon. 2004; 44(4): 371-383.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

Subcloning and expression of *SO6* gene, *Saponaria Officinalis* plant in *E.coli* and investigation of antibody titer in rats

Masoud Abdollahi [1], Hossien Honari [*2], Shahram Nazarian [3], Mehdi Masoudi Kerahroudi [4]

[1, 4] Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
[2] Biological Research Center, Imam Hossein comprehensive University, Tehran, Iran
[3] Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

Received: 1 Oct 2016 **Accepted: 18 Feb 2017**

Abstract

Introduction: Plant ribosome inactivating proteins act as N-glycosidase enzyme and produce by several family of Caryophyllaceae such as *Saponaria Officinalis*. Different Isoforms of RIPs expressed by *Saponaria Officinalis*. SO6 isoform depurinate Adenine 4324 in the conserved GAGA loop of 28SrRNA and disrupts protein synthesis. The aim of this study was expression of SO6 isoform in *E.coli* and investigation of antibody titer in rats.

Methods: In this experimental study, SO6 synthetic gene was excised from recombinant pUC57- SO6 plasmid with *Bam*HI and *Sal*I restriction enzymes and subcloned into pET28a (+) expression vector. The expression of recombinant protein was induced by IPTG. Recombinant SO6 was purified by nickel affinity chromatography. Western blotting was performed to confirm the recombinant protein. Rats were immunized intraperitoneal with purified protein and IgG serum titer was assayed by ELISA.

Results: PCR reaction and enzyme digestion confirmed subcloning of SO6 gene into pET28a (+) expression vector. A 29.5kDa protein band on SDS-PAGE showed a high level of recombinant protein expression. Polyclonal antibodies recognized SO6. ELISA confirmed significant antibody titer after injection of protein in test group compared with the control group.

Conclusion: The recombinant purified SO6 antigen can be used for anti-cancer and vaccine candidate research.

Keywords: N-glycosidase; Saponaria Officinalis; RIP; SO6

This paper should be cited as:

Abdollahi M, Honari H, Nazarian SH, Masoudi Kerahroudi M. **Subcloning and expression of *SO6* gene, *Saponaria Officinalis* plant in *E. coli* and investigation of antibody titer in laboratory rat.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 24(12): 1024-1033.

***Corresponding author: Tel: 09123848187, email: honari.hosein@gmail.com**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]