مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۱۱ بهمن ۱۳۹۵
صفحه: ۸۸۶-۸۷۶

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.11, Jan- Feb 2017
Pages: 876-886

بیان کاست ژنی blf1-stxB در باکتری E. coli و بررسی تیتر آنتی‌بادی در موش

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

چکیده

مقدمه: یکی از راه‌های تقویت اثر واکسن‌ها استفاده از یاورها می‌باشد. STxB شیگلا دارای نقش یاوری و حاملی بوده و می‌توان با ممزوج کردن آنتی‌ژن‌های کاندیدای واکسن با این ادجوانت به تولید واکسن مناسب پرداخت. BLF1 نقش مهمی در بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط بورخولدریا سودومالئی دارد. هدف این مطالعه، بیان ژن blf1-stxB در باکتری E. coli و بررسی تیتر آنتی‌بادی آن در موش است.

روش بررسی: در این مطالعه، پلاسمید pUC57 حاوی ژن blf1 با جایگاه‌های آنزیمی BamHI و SalI در وکتور بیانی pET28a(+)-stxB زیرهمسانه‌سازی گردید و به باکتری E. coli سویه BL21(DE3) تراریخت (ترانسفورم) شد. بیان کاست ژنی blf1-StxB تحت القای IPTG انجام گردید. بعد از تخلیص پروتئین نوترکیب با ستون کروماتوگرافی، چهار نوبت متوالی به موش سوری تزریق شد.

نتایج: در این مطالعه ژن blf1-stxB کلون شده در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله PCR و آنالیز آنزیمی تأیید گردید. همچنین پروتئین نوترکیب تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن تأیید شد. سپس آنتی‌بادی تولید شده از سرم موش جداسازی و توسط تست الایزا تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه پروتئین BLF1 توانایی توقف پروتئین‌سازی و STxB دارای نقش یاوری است. این پروتئین نوترکیب می‌تواند به عنوان کاندیدای واکسن علیه بورخولدریا سودومالئی و شیگلا دیسانتری مورد استفاده واقع شود.

واژه‌های کلیدی: بورخولدریا سودومالئی، میلوئیدوزیس، شیگلا، فاکتور A ۴ شروع کننده رونویسی

۳،۱- دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران
۲- دانشیارگروه ژنتیک، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷، پست الکترونیکی: honari.hosein@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۳۰

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

مقدمه

بورخولدریا سودومالئی(Burkholderia Pseudomallei) یکی از باکتری‌های خطرناک است که در حال حاضر هیچ واکسنی برای آن وجود ندارد. بورخولدریا سودومالئی یک باسیل گرم منفی کوچک، هوازی و متحرک است که عامل بیماری میلوئیدوزیس در انسان است. این باکتری در سال ۱۹۱۱ توسط یک افسر انگلیسی از آبسه معتادان مرده به مواد مخدر در کشور برمه جداسازی شده است. بورخولدریا سودومالئی یک ساپروفیت بیماری زا طبیعی است که از راه خوراکی، استنشاقی و یا از طریق خراش پوستی به بدن بیماران منتقل می‌شود(۱)، این باکتری در طبقه‌بندی CDC جزء عوامل بیوتروریسم رده B قرار دارد(۲). بورخولدریا سودومالئی در مناطق گرمسیری و همچنین در هوای سرد نیز می‌تواند رشد کند و همچنین توانایی آلوده کردن گیاه گوجه فرنگی را دارد، علاوه بر این باکتری در آب مقطر می‌تواند تا ۱۰ سال زنده بماند(۳،۲). باکتری بورخولدریا سودومالئی توانایی زنده ماندن در تمام اندام‌های بدن به طور نهفته را دارد و عواملی مثل مصرف الکل، گزش سگ، دیابت که باعث تضعیف سیستم ایمنی می‌شوند، باعث فعال شدن این باکتری در اندام‌های مختلف میزبان می‌شود(۵،۴). علاوه بر این، بورخولدریا سودومالئی در خاک، آب و در شرایط نامساعد محیطی مانند سطح مواد غذایی کم، pH پایین و دمای بالا قابلیت زنده ماندن را دارد(۶).

توالی یابی ژنوم بورخولدریا سودومالئی در سال ۲۰۰۴ کامل شد که شامل دو کروموزوم حلقوی با منشأ تکاملی مجزا را نشان می‌دهد(۷). در سال ۲۰۱۲ پروتئین BLF1(Burkholderia lethal factor1) شناسایی شده است که این پروتئین به طور اختصاصی باعث دآمیناسیون گلوتاتیون ۳۳۹ از eIF4A (eukaryotic initiation factor 4A) می‌شود. این تغییر فعالیت RNA هلیکاز مورد نیاز برای باز کردن ساختار دوم mRNA در طول شروع ترجمه را غیرفعال می‌کند، اما فعالیت ATPase را از eIF4A تحت تأثیر قرار نمی‌دهد(۸). دآمیناسیون گلوتاتیون ۳۳۹ باعث توقف پروتئین‌سازی در سلول‌های انسان می‌شود.

باکتری شیگلا اولین بار توسط آقای کیوشی شیگا در سال ۱۸۹۸ در ژاپن از افراد مبتلا به دیسانتری جداسازی و به افتخار ایشان "باسیل شیگا" نامیده شد. شیگلا برای انسان بیماری‌زا است. شیگلا یک باکتری دراز، بدون کپسول، غیر متحرک، فاقد اسپور و تاژک است(۹). توکسین شیگا (STx) یک پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلودالتون بوده که از یک زیرواحد منومریک سمی و آنزیماتیک به نام STxA و از یک زیر واحد متصل شونده به رسپتور هموپنتامریک به نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیر سمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری است(۱۰).

STxB ساختار هموپنتامریک دارد که هر منومر آن از ۲۰۷ نوکلئوتید و ۶۹ اسیدآمینه تشکیل شده و وزن مولکولی حدود ۷/۷ کیلو دالتون دارد. هر منومر از یک مارپیچ آلفا (α helix) و ۶ صفحه β (β sheet) تشکیل شده است(۱۱). STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb3 متصل می‌گردد که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود Gb3 یک گلیکواسفنگولیپید است که در برخی از مقالات از آن تحت عنوان CD77 نامبرده شده است(۹). مطالعات نشان داده است که بیان Gb3 در سطح سلول‌های سرطانی انسان فراوانی بسیار زیادی دارد. Gb3 بیان زیادی در سطح سلول‌های سرطانی مثل لنفوما، کارسینوماهای تخمدان، سینه و کلون دارد(۱۱). هدف این مطالعه بیان ژن blf1-stxB در E. coli و تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین BLF1 و STxB به عنوان کاندیدای واکسن علیه بورخولدریا سودومالئی و شیگلا دیسانتری بود که آنتی‌بادی IgG علیه پروتئین نوترکیب در موش سوری تولید شد.

روش بررسی

در این مطالعه جهت طراحی کاست ژنی blf1-stxB توالی کامل ژن blf1 باکتری بورخولدریا سودومالئی از بانک ژن NCBI (با شماره Accession No: NC_006350.1) استخراج گردید و ژن stxB در pET-28a(+) از آزمایشگاه مولکولی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه شد(۱۲). ژن blf1 با در نظر گرفتن جایگاه‌های برش آنزیمی BamHI و SalI در وکتور

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

pUC57 جهت سنتز به شرکت ندای فن سفارش داده شد. لازم به ذکر است که پیش از ثبت سفارش، 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 به سایت www.genscript.com ارجاع داده شد. ژن blf1 سنتز و بر در وکتور pUC57 کلون شد و پلاسمید سنتز شده به صورت خشک دریافت شد. تعیین میزان پایداری و نیمه عمر پروتئین BLF1-StXB توسط سایت ProtParam مورد بررسی قرار گرفت و تعیین ساختار دوم و سوم پروتئین BLF1-StXB به وسیله نرم‌افزارهای psipred و I-TASSER پیش‌بینی گردید(۱۳).

آماده‌سازی محصول برش آنزیمی و پلاسمیدی: برای ساخت کاست ژنی ابتدا واکنش هضم آنزیمی با آنزیم BamHI و SalI بر روی پلاسمید pUC57 انجام گرفت و وکتور بیانی pET-28a(+)-StxB نیز به منظور ساخت کاست ژنی با آنزیم‌های BamHI و SalI برش خورده شد(۱۲). پس از هضم آنزیمی قطعه ژنی blf1 و pET-28a(+)-StxB برش خورده از روی ژل آگارز به وسیله کیت استخراج DNA تخلیص گردید(۱۴).

الحاق و ترانسفورماسیون: ژن blf1 که توسط آنزیم‌های با اثر محدود BamHI و SalI برش خورده به وکتور بیانی pET-28a(+)-stxB که با همین آنزیم‌ها برش خورده و استخراج شده بود، الحاق گردید. واکنش الحاق به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد توسط آنزیم T4 DNA Ligase شرکت فرمنتاز صورت گرفت. محصول الحاق، با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد (تهیه شده به روش شیمیایی) E. coli BL21 سویه DE3 تراریخت گردید. کلنی‌های نوترکیب با غربالگری آنتی‌بیوتیکی کانامایسین جدا شدند و کاست ژنی blf1-stxB با PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت(۱۴).

بیان کاست ژنی BLF1-STxB: برای بیان کاست ژنی BLF1-STxB از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح و پس از رسیدن OD در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر(برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتر (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد(۱۵).

الکتروفورز SDS-PAGE: سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده B مخلوط و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با نسبت یک (بافر نمونه) به پنج (نمونه) با سمپل 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) از لحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب بررسی شدند(۱۵). نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲٪ با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بود. برای مشاهده باند پروتئینی مورد نظر، از رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو استفاده شد(۱۵).

تأیید پروتئین نوترکیب: برای تأیید پروتئین نوترکیب، از تکنیک وسترن بلات (Western Blotting) 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، SDS۰/۱٪ و متانول ۲۰٪ و pH=۸/۳) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. به منظور پرکردن جایگاه‌های خالی (بلاکینگ)، کاغذ 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 آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موشی با رقت ۱:۲۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. فرآیند شستشو با PBST سه بار انجام گرفت. کونژوگه موشی با رقت ۱:۵۰۰۰ به عنوان آنتی‌بادی تشخیص‌دهنده بکار رفت. همانند مرحله قبل

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

گرماگذاری انجام شد. فرایند شستشو نیز همانند مراحل قبلی انجام شد. نهایتاً، کاغذ نیتروسلولز در محلول سوبسترای رنگ‌زای DAB(Diaminobenzidine) (۶۰ میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸) تا ظهور باند پروتئینی، قرار گرفت. برای توقف واکنش، کاغذ در آب مقطر قرار داده شد(۱۵).

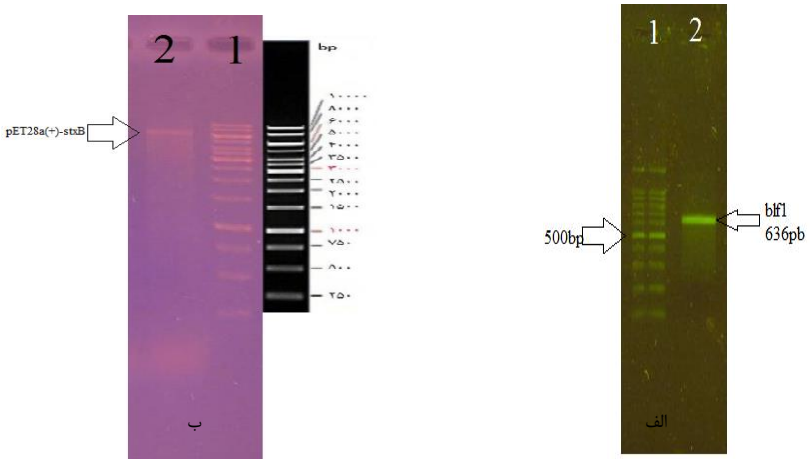
تخلیص پروتئین نوترکیب: پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NAT جداسازی و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد.

تعیین غلظت پروتئین نوترکیب: غلظت پروتئین بیان شده به کمک برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد انجام گرفت.

تولید آنتی‌بادی علیه BLF1-STxB: در این مطالعه از موش‌های سوری ماده، سه تا چهارهفته‌ای با وزن تقریبی ۲۰ الی ۲۵ گرم که از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه و در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی بخش زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (ع) نگهداری می‌شدند استفاده شد که در شرایط استاندارد با سیکل نوری، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. آب و غذا به صورت آزاد در دسترس تمامی گروه‌ها بود. به منظور بررسی تیتر آنتی‌بادی، با توجه به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات از ۵ عدد موش سوری ماده به عنوان تست و ۴ عدد به عنوان نمونه کنترل استفاده گردید. برای هر موش از گروه تست، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده BLF1-STxB با ادجوانت روغن در آب(oil in water) به صورت داخل صفاقی در ۴ نوبت با فاصله زمانی ۱۴ روز تزریق گردید. در کنار هر مرحله تزریق به حیوانات تست، به موش‌های کنترل فقط مخلوط ادجوانت و PBS استریل همگن‌شده تزریق گردید. تیتر آنتی‌بادی آن‌ها توسط آزمایش الایزا اندازه‌گیری شد.

نتایج

به منظور ساخت کاست ژنی blf1-stxB، قطعه blf1 در وکتور pUC57 با هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم‌های محدودالأثر SalI و BamHI استفاده شد که ژن مورد نظر با طول توالی ۶۳۶ جفت باز از وکتور خارج و تخلیص گردید(شکل ۱-الف). برای قرار دادن قطعه ژنی blf1 در وکتور pET-28a(+)-stxBابتدا این پلاسمید با آنزیم‌های محدودالاثر SalI و BamHI خطی شد. بعد از برش آنزیمی، پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص شد. پلاسمید تک باند شده در جریان الکتروفورز در راستای باند حدود ۵۶۰۹ جفت بازی ایستاد(شکل ۱-ب).



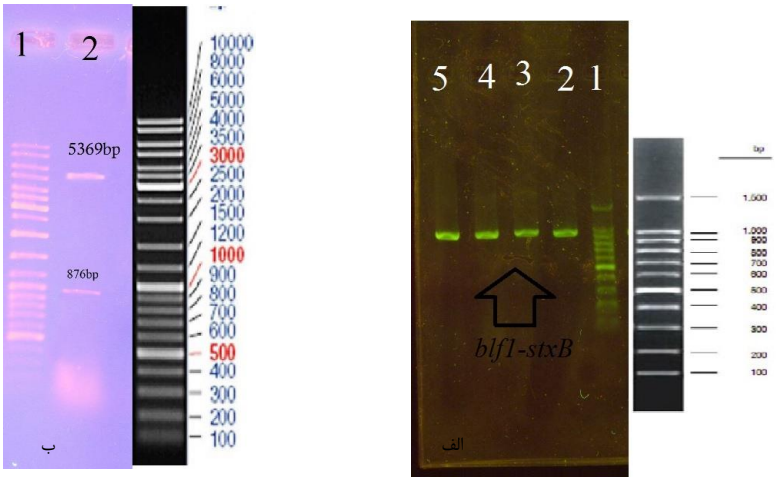
شکل ۱: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی وکتور pUC57 و هضم دوگانه پلاسمید pET-28a(+)

الف: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی وکتور pUC57 بر روی ژل آگارز ۱ درصد. **چاهک ۱:** نشانگر اسید نوکلئیک، **چاهک ۲:** پلاسمید برش خورده

ب: هضم دوگانه پلاسمید pET-28a(+)-stxB. **چاهک ۱:** نشانگر اسید نوکلئیک. **چاهک ۲:** محصول برش آنزیمی pET-28a(+)-stxB.

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

برای تأیید زیرهمسانه‌سازی، برای پلاسمیدها PCR و برش هضم آنزیمی گذاشته شد. پس از تکثیر ژن blf1-stxB به روش PCR، محصول روی ژل ۱٪ آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعه مورد نظر(۸۷۶ جفت باز) از لحاظ اندازه با ژن هدف ما همخوانی داشت(شکل ۲- الف). همچنین پلاسمیدها با دو آنزیم‌های محدود الاثر BamHI و XhoI هضم شدند سپس به کمک نشانگر، اندازه قطعه خارج شده از وکتور تایید شد. (شکل ۲- ب).

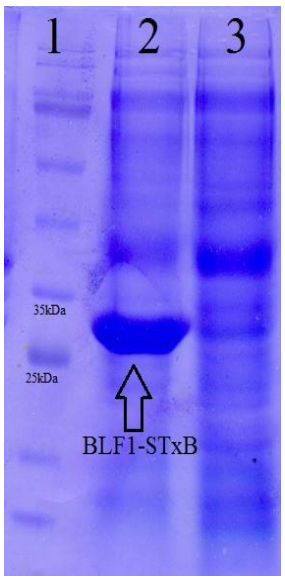


شکل ۲: تأیید زیرهمسانه‌سازی ژن هدف در(+)pET-28a

الف: چاهک ۱: نشانگر اسید نوکلئیک و چاهک ۲، ۳، ۴ و ۵: محصول PCR روی پلاسمید pET-28a(+)-blf1-stxB

ب: چاهک ۱: نشانگر اسید نوکلئیک و چاهک ۲: محصول برش آنزیمی روی pET-28a(+)-blf1-stxB

برای بررسی بیان ژن BLF1-STxB در وکتور pET28a(+) پس از کشت سلول‌ها و القاء با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت و پس از تیمار خام بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب از ژل ۱۲٪ استفاده شد(شکل ۳). با توجه به شکل باند پروتئینی مورد نظر در محدوده ۳۴/۰۱kDa مشاهده شد.

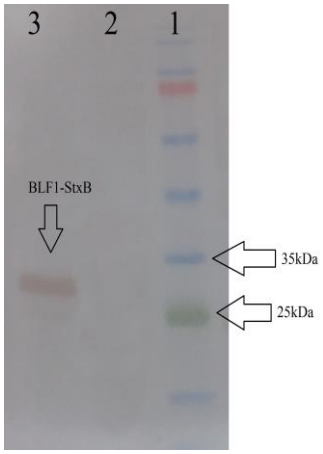


شکل ۳) الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE به منظور بررسی بیان پروتئین مورد نظر

ردیف ۱: مارکر پروتئینی ۳۱۰۰۰۳، ردیف ۲: محتوی پروتئینی باکتری‌هایی که پس از رسیدن جذب نوری آن‌ها به ۰/۶ در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القاشده‌اند (بافر لیزکننده B). ردیف ۳: کنترل منفی که در آن باکتری‌ها پس از رسیدن جذب نوری به ۰/۶ در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا نشده‌اند (بافر لیزکننده B).

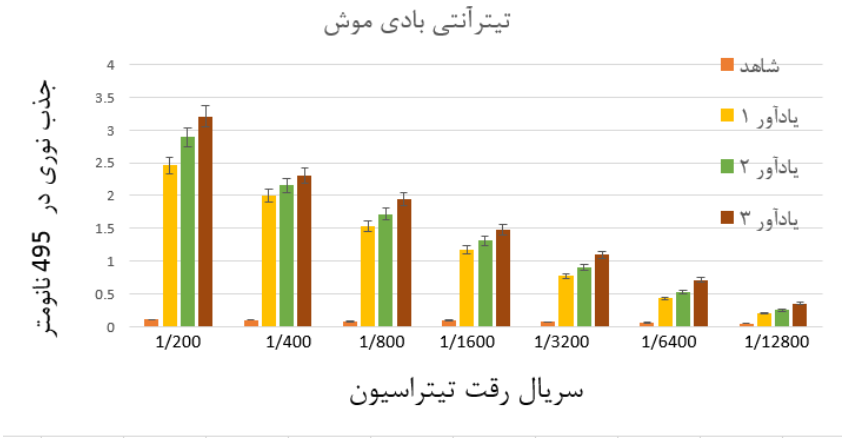
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک Western Blotting استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونه القاشده با IPTG است، یک باند در ۳۴/۰۱kDa مشاهده شد. در ستون شاهد که تحت القای IPTG نبوده باندی مشاهده نشد(شکل۴).



شکل ۴: تایید پروتئین نوترکیب بیان شده با استفاده از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی پلی کلونال.
ردیف۱: مارکر پروتئینی ۳۱۰۰۰۳، ردیف۲: کنترل بدون القای IPTG، ردیف۳: نمونه القاء شده با IPTG

به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر بار تزریق (به استثنای تزریق اول) از موش‌های تست و شاهد خون‌گیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها، آزمایش الایزا انجام شد که نمودار میانگین تیتر آنتی‌بادی در هر مرحله در نمودار ۱ نشان داده‌شده است. با توجه به تیتر آنتی‌بادی، (IgG) سرمی مناسبی تولید کرده است و آنتی‌ژن باعث تحریک ایمنی هومورال شده است، در خون‌گیری سوم بیشترین آنتی‌بادی را علیه آنتی‌ژن داشته‌ایم.



نمودار ۱: بررسی تیتر آنتی‌بادی با استفاده از تکنیک الیزا

بحث

توسعه تولید واکسن‌های جدید بر پایه آنتی‌ژن‌های حفاظتی خالص‌شده به علت ایمنی‌زایی پایین آنتی‌ژن‌های محلول و نبودن ادجوانت مخاطی مؤثر و ایمن، دچار اختلال گردیده است. برای برطرف کردن این نقص و بالا بردن میزان

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

ایمنی‌زایی BLF1، آن را با ادجوانت همراه می‌کنند. نتایج تحقیقات انجام شده نقش حاملی (Delivery)، آنتی‌ژنی و ادجوانتی STxB را اثبات کرده است(۱۲). در این تحقیق، خاصیت ایمنی‌زایی پروتئین BLF1 و خاصیت آنتی‌ژنی و ادجوانتی STxB به طور هم‌زمان مد نظر بوده است.

سالیان زیادی است که شیگا توکسین یا STx(به افتخار آقای کیوشی شیگا نام‌گذاری شد) به عنوان یکی از عوامل ویرولانس شیگلا دیسانتری در ایجاد اسهال خونی مطرح است. اسهال خونی با عامل شیگلا در بیشتر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان به موقع به مرگ می‌انجامد(۱۷،۱۶). از این لحاظ واکسیناسیون علیه شیگلا دارای اهمیت فراوانی است. در سال ۱۹۱۱ افسر انگلیسی به نام آلفرد ویتمور یک بیماری مشابه مشمشه را در افراد لاغر و نحیف معتاد به مرفین در رانگون برمه شناسایی کرد. با این حال مورفولوژی کلنی این ارگانیسم متفاوت از بیماری مشمشه که باکتری بورخولدریا مالئی باعث ایجاد آن می‌شود بود در نتیجه باعث کشف ارگانیسم و بیماری جدیدی به نام باکتری بورخولدریا سودومالئی و میلوئیدوزیس شدند. تخمین زده می‌شود در شمال شرق تایلند میلوئیدوزیس باعث مرگ بیش از ۱۰۰۰ نفر در سال می‌شود(۱۸)؛ بنابراین شیگلوزیس و میلوئیدوزیس یک مسئله جهانی مهم برای سلامتی بشر محسوب می‌شود و تا به امروز واکسن مؤثری علیه شیگلا و بورخولدریا سودومالئی یافت نشده است. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای اصلی در شیگلا دیسانتری تیپ ۱، انتروتوکسین شیگلا یا ST است، شیگا توکسین STx که توسط شیگلا دیسانتری تولید می‌شود، در حالی که توکسین‌های شبه شیگا (Shiga like toxin) یا STx1 و STx2 توسط باکتری اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) و اشرشیا انترو توکسینوژنیک (ETEC) تولید می‌شود. STx2 تقریباً ۶۰٪ با STx شباهت دارد(۱۹). STxB یک آنتی‌ژن کاندید واکسن برای شیگلوزیس محسوب می‌شود و یکی از فاکتورهای مهم بیماری‌زایی در بورخولدریا پروتئین BLF1 است، این پروتئین در سال ۲۰۱۱ توسط گروهی از محققان بین‌المللی توسط گروه ویلسون و گروه ریس تعیین ساختار و کریستالوگرافی شد(۲۰).

در رابطه با ژن stxB در سراسر جهان مطالعات و بررسی‌های گوناگونی انجام شده، ژن stxB در موجودات مختلفی از E. coli گرفته تا انواع گیاهان مثل کاهو و... همسانه سازی شده است. در یک تحقیق در سال ۱۹۸۸ ژن stx در باکتری E. coli همسانه سازی و توالی آن با توالی‌یابی مورد تأیید قرار گرفت(۲۱). در سال ۱۹۹۳ ژن stxB در سطح بالایی در باکتری E. coli بیان شد و به خوبی به کمک ستون نیکل تخلیص و غلظت خوبی از این پروتئین فراهم گردید(۲۲). در سال ۲۰۰۵ به منظور افزایش ایمنی‌زایی مخاطی علیه STxB تلاشی انجام شد که در طی آن پروتئین تخلیص شده STxB را به کمک میکروسفرهای لیپیدی سنتتیک به صورت نازال تلقیح کردند که نتایج آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی را نشان می‌داد(۲۳). در این راستا در سال ۲۰۰۸ در یک پروژه تحقیقاتی ژن STxB در باکتری *E. coli* کلون شده و بیان آن بررسی گردید و ایمنی‌زایی آن صورت پذیرفت که البته ژن این پروتئین به صورت سنتتیک بود(۲۴).

از طرفی STxB به خاطر اتصال اختصاصی اش با گیرنده Gb3 روی اکثر سلول های سرطانی امروزه برای انتقال داروهای ضد سرطان به این سلول‌ها و کاهش اثرات سوء شیمی‌درمانی توجه دانشمندان زیادی را به خود جلب کرده است. بیان بیش از اندازه Gb3 در نمونه تومور بیماران سرطانی گزارش‌شده است. در آزمایشی مربوط به سرطان سینه، ۱۳ مورد از ۱۸ رده سلولی مورد آزمایش (۷۲ درصد) بیان Gb3 را در سطح خود نشان داده‌اند(۲۵). تولید پروتئین کایمر با ممزوج کردن ژن‌های pa20 و stxB می‌توان به عنوان یک آنتی سرطان (به علت بیان Gb3 در سطح سلول‌های سرطانی) و کاندید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا، اشریشیاکلی و باسیلوس آنتراسیس مطرح باشد(۲۶). میزان تیتر آنتی‌بادی در ممزوج STxB-IpaD نسبت به مخلوط IpaD با STxB در موش‌های سوری افزایش داشته است که نقش حاملی، آنتی‌ژنی و ادجوانتی STxB را اثبات کرده است(۲۷).

همچنین برای انتقال دارو به سلول‌های سرطانی و درمان

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

سرطان می‌توان از ترکیبات دارویی متصل شده به STB استفاده کرد. در یک تحقیق، از STB نشان‌دار در تصویربرداری تومور استفاده‌شده است. این عمل با تزریق آنتی‌ژن STB -GFP میسر شده است(۲۸).

برای درمان سرطان، مهارکننده‌های سنتز پروتئین به عنوان عوامل ضد سرطان ازجمله مهارکننده‌های eIF4A را می‌توان مورد استفاده قرار داد(۲۹). با توجه به فعالیت پروتئین BLF1 که یک مهار کننده قوی eIF4A است می‌توان به عنوان یک عامل ضد سرطان قوی مورد استفاده قرار گیرد. BLF1 باعث تغییر eIF4A می‌شود که باعث تعویض Gln339 به Glu339 می‌شود و خود یک مهار کننده قوی ترجمه است. در شرایط آزمایشگاهی یک مولکول BLF1 قادر است تقریباً ۷۰۰ مولکول eIF4A را در دقیقه غیر فعال کند، تعداد تبدیل در این محدوده به عمل N- گلیکوزیدی در A4324 از 28S RNA سم قوی ریسین شبیه است که می‌تواند ترجمه را متوقف کند. کاربردهای نوینی برای این کاست ژنی blf1-stxB پیش‌بینی می‌شود. پروتئین Gb3 (پذیرنده STB)، در سلول‌های طبیعی انسان، بیان محدودی دارد ولی در بعضی از سلول‌های سرطانی، به میزان بسیار بالایی بیان می‌شود و با توجه به عملکرد پروتئین BLF1 که مهار کننده قوی ترجمه است می‌توان با اتصال دو پروتئین BLF1-STxB به طور اختصاصی به عنوان یک عامل ضد سرطان قوی مورد استفاده قرار گیرد.

در تحقیق انجام شده نقش آنتی‌ژنی BLF1-STxB اثبات شد و آنتی‌بادی در موش سوری تولید گردید؛ بنابراین نتیجه این تحقیق بیانگر آن است که پروتئین BLF1-STxB می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن علیه بورخولدریا و شیگلا دیسانتری باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از اساتید، پژوهشگران و کارکنان مرکز و گروه زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در این پژوهش از لحاظ علمی و مالی ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌شود.

References:

1- Kanaphun P, Thirawattanasuk N, Suputtamongkol Y, Naigowit P, Dance DA, Smith MD, et al. ***Serology and carriage of Pseudomonas pseudomallei: a prospective study in 1000 hospitalized children in northeast Thailand.*** Journal of Infectious Diseases 1993; 167(1): 13-230.

2- Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M. ***Public health assessment of potential biological terrorism agents.*** Emerging infectious diseases. 2002;8(2):225.

3- Lee YH, Chen Y, Ouyang X, Gan Y-H. ***Identification of tomato plant as a novel host model for Burkholderia pseudomallei.*** BMC microbiology 2010; 10(1): 1.

4- Koponen MA, Zlock D, Palmer DL, Merlin TL. ***Melioidosis: forgotten, but not gone!*** Archives of internal medicine 1991; 151(3): 605-8.

5- Currie BJ, Fisher DA, Howard DM, Burrow JN, Selvanayagam S, Snelling PL, et al. ***The epidemiology of melioidosis in Australia and Papua New Guinea.*** Acta tropica 2000; 74(2): 121-7.

6- Lee S-H, Chong C-E, Lim B-S, Chai S-J, Sam K-K, Mohamed R, et al. ***Burkholderia pseudomallei animal and human isolates from Malaysia exhibit different phenotypic characteristics.*** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2007; 58(3): 263-70.

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

7- Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeño-Tárraga AM, Atkins T, Crossman LC, et al. ***Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, Burkholderia pseudomallei.*** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004; 101(39): 14240-5.

8- Pause A, Methot N, Svitkin Y, Merrick W, Sonenberg N. ***Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation.*** The EMBO journal 1994; 13(5): 1205.

9- Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, Effenterre D. ***Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites.*** Biology of the Cell 2008; 100(12): 717-28.

10- Pina DG, Johannes L. ***Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications.*** Toxicon 2005; 45(4): 93-308.

11- Janssen K-P, Vignjevic D, Boisgard R, Falguières T, Bousquet G, Decaudin D, et al. ***In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach.*** Cancer Research 2006; 66(14): 7230-36.

12- Honari H, Amlashi I, Minaee ME, Safaee S. ***Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein.*** Arak Medical University Journal. 2013;16(4):83-93. (Persian)

13- Honari H, Minaei HH, Ebrahim M. ***Analyzing the Various Fusions for ctxB, ipaD and stxB Genes of Shigella Dysenteriae and Vibrio Cholera by Bioinformatics Tools.*** Genetics in the 3rd Millennium 2013; 11(2): 3070-77. [Persian]

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

15- 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): 221-27.

16- Clemens J, Kotloff K, Kay BA. ***Generic protocol to estimate the burden of Shigella diarrhoea and dysenteric mortality:*** Citeseer; 1999.

17- Niyogi SK. ***Shigellosis.*** Journal of microbiology (Seoul, Korea). 2005; 43(2): 133-43.

18- Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, et al. ***Increasing incidence of human melioidosis in northeast thailand.*** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2010; 82(6): 1113-7.

19- Oloomi M, Bouzari S, Ajdary S. ***Immune responses of mice immunized with active recombinant shiga toxin and its derivatives.*** Iran J Allergy Asthma Immunol. 2008;7(2):53-60.

20- Cruz-Migoni A, Hautbergue GM, Artymiuk PJ, Baker PJ, Bokori-Brown M, Chang C-T, et al. ***A Burkholderia pseudomallei toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A.*** Science. 2011; 334(6057): 821-4.

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

21- Strockbine NA, Jackson M, Sung L, Holmes R, O'Brien AD. ***Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from Shigella dysenteriae type 1.*** Journal of Bacteriology. 1988;170(3):1116-22.

22- Su G ,Li F, Huang P, Rui X, Huang C. ***High level expression of Shiga toxin B subunit of Shigella dysenteriae serotype 1 in Escherichia coli.*** Chinese journal of biotechnology. 1992;9(1):49-55.

23- Kurohane K, Kobayashi C, Imai Y. ***Facilitated Production of Secretory IgA against Shiga Toxin B Subunits by Intranasal Application of Antigen-Coated Polystyrene Microspheres.*** Microbiology and immunology. 2005;49(2):149-54.

24- Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B, et al. ***Protection against Shiga toxin-producing Escherichia coli infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B.*** Clinical and Vaccine Immunology. 2008;15(2):359-66.

25- Johansson D, Kosovac E, Moharer J, Ljuslinder I, Brännström T, Johansson A, et al. ***Expression of verotoxin-1 receptor Gb3 in breast cancer tissue and verotoxin-1 signal transduction to apoptosis.*** BMC cancer. 2009;9(1):67.

26- Honari H, Minaei M. ***Cloning and Expression of Fusion Genes of Domain A-1 Protective Antigen of Bacillus Anthracis and Shigella Enterotoxin B Subunit (Stxb) In E. c***oil. SSU_Journals 2015; 22(6): 1702-11. [Persian]

27- Honari H, Baranvand M, Arefpour M, Hashemzadeh M, Pourhakak H, Minaei M, et al. ***Comparison of Antibody Titers against the Single, Mixed, Fused and Recombinant proteins, StxB, IpaD and StxB- IpaD.*** journal of ilam university of medical sciences. 2015;22(7):87-95. (Persian)

28- Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig K. ***Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging.*** Microbial biotechnology. 2011;4(1):32-46.

29- Malina A, Cencic R, Pelletier J. ***Targeting translation dependence in cancer.*** Oncotarget. 2011;2(1-2):76-88.

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

Expression of Blf1-Stx B Gene Cassette in E. coli and Investigation Antibody Titer in Mice

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

[1,3]Department of Molecular Cell Biology, Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

[2] Department of Genetics, Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

Received: 9 oct 2017 **Accepted:** 19 Jan 2017

Abstract

Introduction: One of the ways to strengthen the effect of vaccines is using the adjuvant. STxB has a carrier and adjuvant role that we can fuse it with vaccine candidate antigens and produce efficient vaccines. BLF1 has an important role in the pathogenesis and infection by Burkholderia pseudomallei The aim of this study was investigation of expression blf1-stxB gene Cassette in E. coli and antibody production in mice.

Methods: In this study, pUC57 plasmid containing blf1 with BamHI, SalI restriction enzyme sites was subcloned in pET28a(+)-stxB expression vector and transformed into E. coli BL21 DE3. Expression blf1-stxB gene Cassette was induced by IPTG. After extraction by affinity chromatography, the recombinant protein was injected four times to mice.

Results: In this study, blf1-StxB cloned gene in pET28a (+) expression vector was approved by PCR and enzymatic analysis. Also recombinant protein confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. Then, antibody produced from the mice serum were isolated and confirmed by ELISA.

Conclusion: Given that BLF1 protein has the ability to stop protein synthesis and STxB has a carrier and adjuvant role, it's as a vaccine candidate against *B.* pseudomallei and Shigella dysenteriae.

Keywords: Burkholderia pseudomallei, Melioidosis, Shigella, eIF4A

This paper should be cited as:

Mehdi Masoudi Kerahroudi, Hossien Honari, Masoud Abdollahi. ***Expression of blf1-stx b gene cassette in E. coli and investigation antibody titer in mice*.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 24(11): 876-86

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

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