

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

مهردی 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(+) و stxB زیرهمسانه‌سازی گردید و به باکتری E. coli 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

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران

۲- دانشیار گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران

* (نویسنده مسئول): تلفن ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷، پست الکترونیکی: honari.hosein@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۱۸ تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۳۰

مقدمه

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 بیماری را 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 کیلو Dalton بوده که از یک زیر واحد منومریک سمی و آنزیماتیک به نام STxA و از یک 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 نوکلوتید و ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی حدود ۷/۷ کیلو Dalton دارد. هر منومر از یک مارپیچ آلفا (α helix) و ۶ صفحه 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 گلیکوسفنگولیپید 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 تخمدا، سینه و کلون دارد^(۱۱). هدف این مطالعه بیان ژن BLF1 و تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین BLF1-stxB به عنوان کاندیدای واکسن علیه بورخولدريا سودومالئی و شیگلا دیسانتری بود که آنتی‌بادی IgG علیه پروتئین نوترکیب در موش سوری تولید شد.

روش برسی

در این مطالعه جهت طراحی کاست ژنی blf1-stxB کامل ژن blf1 باکتری بورخولدريا سودومالئی از بانک ژن NCBI (با شماره 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 SalII در وکتور

بورخولدريا سودومالئی (Burkholderia Pseudomallei) یکی از باکتری‌های خطرناک است که در حال حاضر هیچ واکسنی برای آن وجود ندارد. بورخولدريا سودومالئی یک باسیل گرم منفی کوچک، هوازی و متحرک است که عامل بیماری میلتوئیدوزیس در انسان است. این باکتری در سال ۱۹۱۱ توسط یک افسر انگلیسی از آبسه معتمدان مرده به مواد مخدر در کشور برمه جداسازی شده است. بورخولدريا 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 بیوتوربریسم B قرار دارد^(۲). بورخولدريا سودومالئی در مناطق گرمسیری و همچنین در هوای سرد نیز می‌تواند رشد کند و همچنین توانایی آلوود کردن گیاه گوجه فرنگی را دارد، علاوه بر این باکتری در آب مقطر می‌تواند تا ۱۰ سال زنده بماند^(۳,۴). باکتری بورخولدريا سودومالئی توانایی زنده ماندن در تمام اندام‌های بدن به طور نهفته را دارد و عواملی مثل مصرف الکل، گرش سگ، دیابت که باعث تضعیف سیستم ایمنی می‌شوند، باعث فعال شدن این باکتری در اندام‌های مختلف میزان می‌شود^(۴,۵). علاوه بر این، بورخولدريا 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 بورخولدريا سودومالئی در سال ۲۰۰۴ کامل شد که شامل دو کروموزوم حلقوی با منشأ تکاملی مجزا را نشان می‌دهد^(۷). در سال ۲۰۱۲ BLF1(Burkholderia lethal factor1) شناسایی شده است که این پروتئین به طور اختصاصی باعث دامیناسیون گلوتاتیون eIF4A (eukaryotic initiation factor 4A) از ۳۳۹ 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). دامیناسیون گلوتاتیون ۳۳۹ باعث توقف پروتئین‌سازی در سلول‌های انسان می‌شود.

کانامایسین تلچیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده الفاکننده پرومودر (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 دارای غلظت ۵× مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد 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 میلی آمپر 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 بلاط (Western Blotting) استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، ۱۰٪ SDS و متانول ۲۰٪ و pH=۸/۳ روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. به منظور پرکردن جایگاه‌های خالی (بلکینگ)، کاغذ به مدت یک شب در محلول PBST (Phosphat-Buffered Salin- ۳ درصد شیرخشک در Tween) در ۴ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد گرم‌گذاری شد. فرآیند شستشو با PBST سه بار انجام گرفت. کونزوگه موشی با رقت ۱:۵۰۰ به عنوان آنتی‌بادی تشخیص‌دهنده بکار رفت. همانند مرحله قبل

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 میزان 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 Sall بر روی پلاسمید pUC57 انجام گرفت و وکتور بیانی pET-28a(+)-StxB نیز به منظور ساخت کاست ژنی با آنزیم‌های BamHI و Sall بر روی 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).

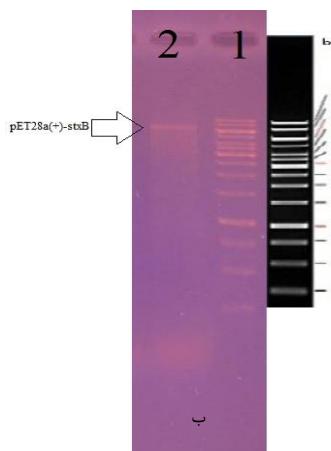
الحق و ترانسفورماسیون: ژن blf1 که توسط آنزیم‌های با اثر محدود BamHI و Sall برش خورده به وکتور بیانی pET-28a(+)-stxB که با همین آنزیم‌ها برش خورده و استخراج شده بود، الحق گردید. واکنش الحق به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد توسط آنزیم T4 DNA Ligase شرکت FermenTaz صورت گرفت. محصول الحق، با روش شوک حرارتی به E. coli BL21 سلول‌های مستعد (تهیه شده به روش شیمیایی) ترانسفورماسیون کرد. کلیه‌های نوترکیب با غربالگری سویه DE3 ترازیخت گردید. کلیه‌های نوترکیب با 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 میلی لیتر محیط LB مایع حاوی

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 همگن شده تزریق گردید. تیتر آنتیبادی آن‌ها توسط آزمایش الیزا اندازه‌گیری شد.

نتایج

به منظور ساخت کاست ژنی blf1-stxB، قطعه blf1 در وکتور pUC57 با هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیمهای محدودالاثر 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(+)-stxB ابتدا این پلاسمید با آنزیمهای محدودالاثر SalI و BamHI خطي شد. بعد از برش آنزیمی، پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص شد. پلاسمید تک باند شده در جریان الکتروفورز در راستای باند حدود ۵۶۰.۹ جفت بازی ایستاد(شکل ۱-ب).

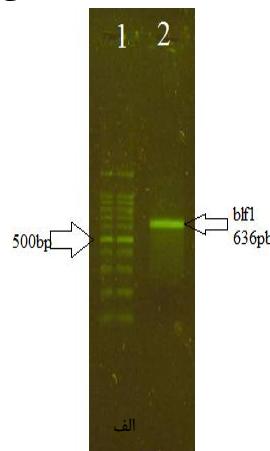


گرم‌آگذاری انجام شد. فرایند شستشو نیز همانند مراحل قبلی انجام شد. نهایتاً، کاغذ نیتروسلولز در محلول سوبسترات رنگ‌زای (DAB(Diaminobenzidine) ۶۰ میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸) تا ظهور باند پروتئینی، قرار گرفت. برای توقف واکنش، کاغذ در آب مقطر قرار داده شد(۱۵).

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 برادرافورد 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 چهار هفته‌ای 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 ۱۲ ساعت روشناهی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت نوری، ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. آب و غذا به صورت آزاد در دسترس تمامی گروه‌ها بود. به منظور بررسی

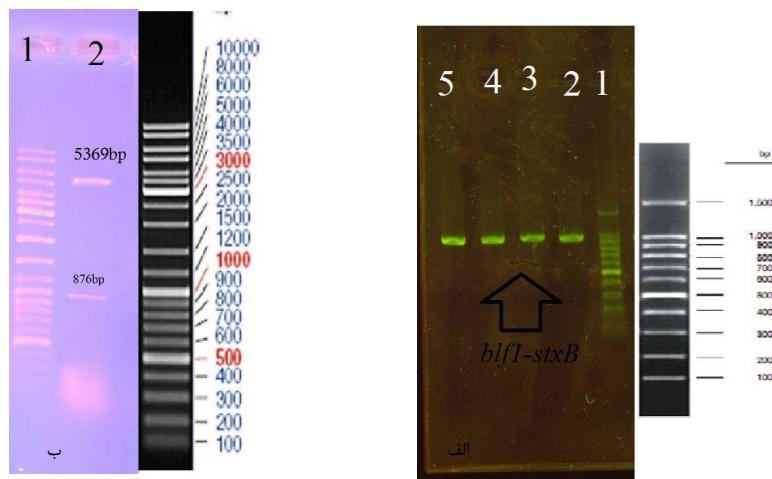


شکل ۱: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی وکتور pUC57 و هضم دوگانه پلاسمید (+) pET-28a

الف: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی وکتور pUC57 بر روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱: نشانگر اسید نوکلئیک، چاهک ۲: پلاسمید برش خورده pET-28a(+)-stxB. چاهک ۱: نشانگر اسید نوکلئیک. چاهک ۲: محصول برش آنزیمی

همخوانی داشت(شکل ۲-الف). همچنین پلاسمیدها با دو آنزیم‌های محدود الاتر BamHI و XhoI هضم شدند سپس به کمک نشانگر، اندازه قطعه خارج شده از وکتور تایید شد. (شکل ۲-ب).

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



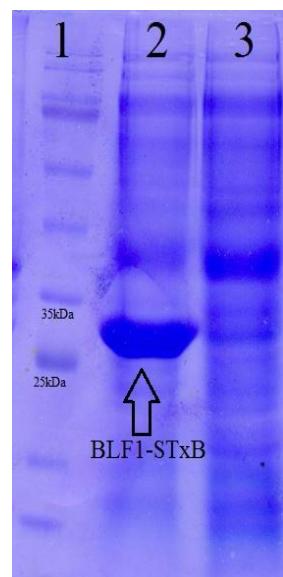
شکل ۲: تأیید زیرهمسانه‌سازی ژن هدف در pET-28a(+)

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

گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب از ۱۲٪ استفاده شد(شکل ۳). با توجه به شکل باند پروتئینی مورد نظر در محدوده ۳۴/۰-۱kDa مشاهده شد.

برای بررسی بیان ژن BLF1-STxB در وکتور (+)pET28a در وکتور (+)BLF1-STxB 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

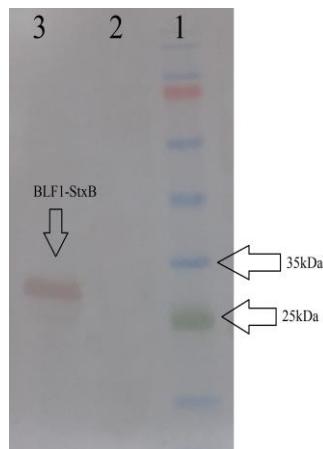


شکل ۳: الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE به منظور بررسی بیان پروتئین مورد نظر

ردیف ۱: مارکر پروتئینی ۳۱۰۰۰، ردیف ۲: محتوی پروتئینی باکتری‌هایی که پس از رسیدن جذب نوری آن‌ها به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا شده‌اند (بافر لیزکننده B). ردیف ۳: کنترل منفی که در آن باکتری‌ها پس از رسیدن جذب نوری به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا نشده‌اند (بافر لیزکننده B).

با IPTG است، یک باند در $34/0\text{ kDa}$ مشاهده شد. در ستون شاهد که تحت القای IPTG نبوده باندی مشاهده نشد(شکل ۴).

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 القاشه موشی استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونه القاشه

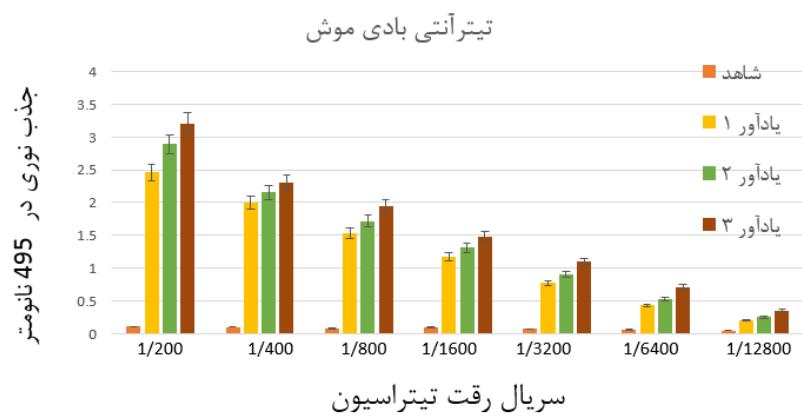


شکل ۴: تایید پروتئین نوترکیب بیان شده با استفاده از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال.

ردیف ۱: مارکر پروتئینی $31000\text{ }\mu\text{g}$. ردیف ۲: کنترل بدون القای IPTG. ردیف ۳: نمونه القاء شده با

میانگین تیتر آنتی‌بادی در هر مرحله در نمودار ۱ نشان داده شده 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.

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



نمودار ۱: بررسی تیتر آنتی‌بادی با استفاده از تکنیک الیزا

بحث

نبودن ادجوانات مخاطی مؤثر و ایمن، دچار اختلال گردیده است. برای برطرف کردن این نقص و بالا بردن میزان

توسعه تولید واکسن‌های جدید بر پایه آنتی‌ژن‌های حفاظتی خالص شده به علت ایمنی‌زایی پایین آنتی‌ژن‌های محلول و

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 توالی‌بایی 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 نازل تلقیح کردند که نتایج آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی را نشان می‌داد (۲۳). در این راستا در سال ۲۰۰۸ در یک پژوهش 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 سلول‌های 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 گزارش شده 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 STxB و pa20 می‌توان به عنوان یک آنتی سرطان (به علت بیان Gb3 در سطح سلول‌های سرطانی) و کاندید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا، اشريشیاکلی و باسیلوس آنتراسیس مطرح باشد (۲۶). میزان تیتر آنتی‌بادی در ممزوج STxB-IpaD نسبت به مخلوط STxB با IpaD 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

ایمنی‌زایی BLF1 آن را با ادجوانات 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 آفای 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 مرغین در رانگون برمه شناسایی کرد. با این حال مورفولوژی کلی 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 میلوبیوزیس شدند. تخمین زده می‌شود در شمال شرق تایلند میلوبیوزیس باعث مرگ بیش از ۱۰۰۰ نفر در سال می‌شود (۱۸)؛ بنابراین شیگلوزیس و میلوبیوزیس 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 اشريشياکلی انتروهموراژیک (EHEC) و اشريشيا انترو توکسینوژنیک (ETEC) تولید می‌شود. STx2 تقریباً ۶۰٪ با STx شbahت دارد (۱۹). 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

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

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

برای درمان سرطان، مهارکننده‌های سنتر پروتئین به عنوان عوامل ضد سرطان از جمله 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 Glu339 به 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 از 28S RNA سم قوی ریسین شبیه است که می‌تواند ترجمه را متوقف کند. کاربردهای نوینی برای این کاست زنی blf1-stxB پیش‌بینی

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.

- 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, Safaei 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, Chetchotisakk 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.

- 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, Bränström 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. coil*.* 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.

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

Mehdi Masoudi Kerahroudi¹, Hossien Honari^{*2}, Masoud Abdollahi³

^{1,3}Department of Molecular Cell Biology, Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

²Department 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