Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز ۱۳۸۸، دوره یکم، شماره دوم، صفحه ۱۳ -۹

کلونینگ ژن پروتئین A باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* درپلاسمید بیانی

بهرام کاظمی[۱و۲]*، شهرام خالقی[۳]، مژگان بنده پور[۱]، مریم جهانی ابیانه[۱]، لیلا ماغن[۱]، پرویزپاکزاد [۳]

۱- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران - ایران
۲- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران - ایران
۳- بخش ایمونولوژی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران – ایران
*نویسنده مسئول: دکتر بهرام کاظمی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، تهران ، ایران kazemi@sbmu.ac.ir

دریافت : ۸۸/۴/۶ پذیرش: ۸۸/۶/۱۸

چکیده:

زمینه و هدف: با استفاده از ایمونوگلبولینها می توانیم اطلاعات دقیقی درمورد یک آنتی ژن خاص بدست آوریم. برای جداسازی اختصاصی یک کلاس ایمونو گلبولین ازروش کروماتوگرافی جذبی استفاده می‌شود. هدف این مطالعه تهیه پروتئین A نوترکیب باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده که در کروماتوگرافی جذبی برای جداسازی IgG سرم استفاده میگردد.

روش بررسی: DNA ژنومی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استخراج گردید وبکمک پرایمرهایی که براساس ژن پروتئین A طراحی شده بودند واکنش PCR انجام گرفت ومحصول PCR در پلاسمید کلون شد. برای جدا کردن ژن فوق پلاسمید نوترکیب با انزیم های NdeI و EcoRI هضم گردید. ژن پروتئینA خالص سازی گردید و در پلاسمید بیانی ساب کلون شد.

یافته ها: ژن پروتئین A با روش PCR تکثیر شد. محصول PCR که دارای ۱۴۳۵ نوکلئوتید می باشد با موفقیت در پلاسمید بیانی کلون وتایید گردید.

نتیجه گیری: پلاسمیدنوترکیب برای بیان پروتئین نوترکیب واستفاده درستون کروماتوگرافی جذبی مخصوص جداسازی IgG سرم اماده میباشد.

واژه های کلیدی: پروتئین A- *استافیلوکوکوس اورئوس*- کلونینگ

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ایمونوگلوبولینها یاآنتی‌بادی‌ها بصورت مونوکلونال‌وپلی‌کلونال ازجمله معرفهایی هستندکه بطور وسیع درتکنیک‌های ایمونولوژیک مورداستفاده قرار می‌گیرند (۱). جداسازی این آنتی‌بادیها ازنمونه های خام سرم یا مایعات بدن ومحیط کشت به ما اجازه می‌دهد تابااستفاده ازآنها اطلاعات دقیق‌تری درموردیک آنتی‌ژن خاص به دست آوریم. برای جداسازی اختصاصی یک کلاس ایمونو گلبولین ازروشهای مختلفی استفاده می‌شود که روش کروماتوگرافی جذبی از بقیه رایج تر است. دراین مورد از پروتئین Aیا G میکربها استفاده میشود (۶-۲). Ankerst و همکاران دریافتند که ۹۵٪ IgG سرم به پروتئین A باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* متصل میشود (۷). انها پیشنهاد کردند بعلت سادگی این روش، می تواند مناسب تراز روشهایی مانند ژل فیلتراسیون و گرادیان ساکارز برای جداکردن ایمونوگلوبولین ها باشد. Mallinson, و همکاران برای جدا کردن ایمنوگلوبولین ها از سرم خانم های مشکوک به روبلا و تشخیص بیماری از پروتئین A *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کردند (۸) اتصال غیرکووالانسی بین پروتئین Aیا G باکتریایی با بخش Fc ایمونوگلوبولین G (IgG) سبب شده تا امروزبسیاری از محققین ازآین خاصیت برای جداسازی IgG استفاده نمایند . این روش جداسازی‌با استفاده ازتکنیک کروماتوگرافی جذبی یک روش خالص‌سازی سریع و یک‌مرحله‌ای است که موجب جدا شدن ایمونوگلوبولینهای کلاس IgG از محلول مورد نظر شده و بقیه ناخالصی از جمله سایر کلاسهای ایمونوگلبولین وارد واکنش نشده وخارج می‌شوند. با این تکنیک ما می‌توانیم به یک محصول هموژن از محلول ناخالص و ناهمگون اولیه دست یابیم . پروتئین A درانجام فرآیند خالص‌سازی فوق دارای نقش اساسی می‌باشد این پروتئین ازیک پلی‌پپتید 42 کیلودالتونی ساخته شده که ازدیواره سلولی *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی وتخلیص شده است به دلیل تمایل فراوان این پروتئین برای ترکیب واتصال با بخش Fc مولکول IgG بسیاری ازپستانداران، این پروتئین به عنوان یک معرف استاندارد درتکنیکهای ایمونوشیمی مورد استفاده وسیع می‌باشد. علاوه برکاربرد پروتئین A برای جداسازی IgG با روش کروماتوگرافی جذبی، درروشهای دیگرنیزمورداستفاده فراوان قرارمیگیرد، ازجمله مطالعات سطح سلول‌ها، Radioimmuno assay (RIA)، Enzymeimmunosorbent assay (EIA)، Immuno precipitations وبسیاری موارد دیگر (۹،۱، ۱۰). با توجه به اینکه امروزه به دلیل بهداشتی این پروتئین را بصورت نوترکیب تهیه میکنند هدف این تحقیق کلونینگ ژن پروتئین A باکتری *استا فیلوکوکوس اورئوس* در پلاسمید بیانی بوده است.

روش بررسی

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که از موارد بالینی جداشده بود درآزمایشگاه کشت داده شد و DNA آن استخراج گردید (۱۱). براساس توالی ژن SAU54636 یک جفت پرایمر طراحی گردید. سمت 5` پرایمر فوروارد جایگاه انزیم NdeI و سمت 5` پرایمر ریورس جایگاه شناسایی انزیم EcoRI قرار داده شد. بکمک پرایمرهای مذکور واکنشPCR انجام گرفت (۱۲). محصول PCR بصورت T/A cloning در پلاسمید Bluescript کلون شد (۱۳). محصول واکنش درون سلول پذیرا ترانسفرم گردید (۱۴) و برای غربالگری پلاسمید نوترکیب، روی پلیت اگار حاوی X-gal - IPTG پخش گردید. کلنی های سفید (حاوی پلاسمید نوترکیب) انتخاب شدند (۱۵) وبعد ازکشت انبوه، پلاسمیدانهااستخراج گردید (۱۶) و روی ژل اگارز الکتروفورز شد (۱۷). و باانزیم های محدودالاثر فوق کلونینگ ژن تایید شد. واکنش هضم انزیمی روی ژل اگارز با نقطه پایین الکتروفورز شد و ژن (قطعه DNA جدا شده از پلاسمید) از روی ژل بریده شد و با روش فنل- کلروفرم خالص سازی گردید

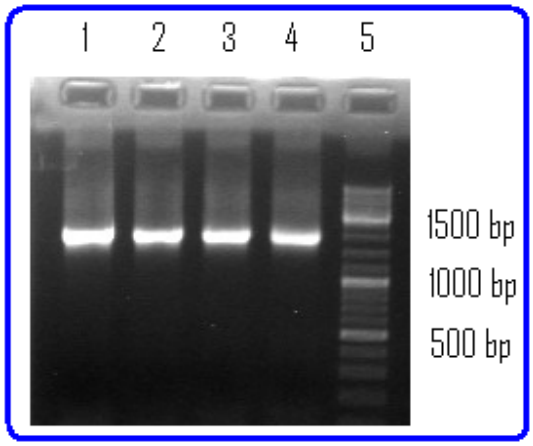
www.SID.ir

Archive of SID

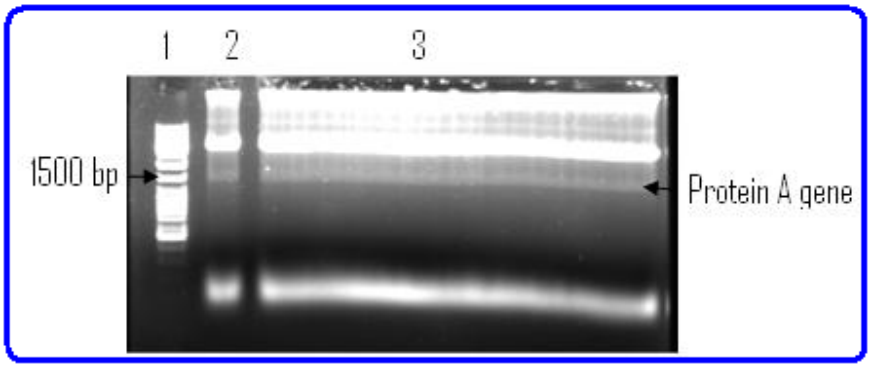
(۱۸) و در پلاسمید بیانی ساب کلون گردید.

یافته ها

DNA باکتری استخراج گردید و بکمک پرایمر های طراحی شده واکنش PCR انجام گرفت. محصول PCR روی ژل اگارز ۱ درصد الکتروفورز شد وبعد از رنگ امیزی با اتیدیوم بروماید نوارهای DNA مربوط به تکثیر ژن با دستگاه UVtransilluminator مشاهده گردید. شکل ۱ محصول PCR ژن پروتئین A رابا تعداد ۱۴۳۵ نوکلئوتید نشان میدهد. محصول PCR در پلاسمید T/vector (Bluescript) کلون شد و محصول واکنش در سلول پذیرا ترانسفرم شد و روی پلیت اگار حاوی X-gal - IPTG پخش گردید. کلنی های سفید انتخاب شدند و پلاسمید انها استخراج گردید . پلاسمید نوترکیب استخراج گردید و با انزیم های NdeI و EcoRI هضم گردید و روی ژل اگارز با نقطه ذوب پایین الکتروفورز شد و نوار DNA مربوط به ژن توسط چاقو بریده شد (شکل ۲) و با روش فنل – کلرفرم خالص سازی گردید و درپلاسمید بیانی pET21a ساب کلون شد.



شکل ۱: آگارز ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن پروتئین A



شکل ۲- هضم انزیمی پلاسمید نوترکیب، نوارDNA مربوط به ژن پروتئین A که از پلاسمید جدا شده است مشاهده میگردد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

آنتی بادیها به طورگسترده درتکنیکهای ایمونولوژیک کاربرد دارندوبرای جداسازی آنها ازنمونه های خام سرم یا مایعات بدن ومحیط کشت ازروشهای متعددی استفاده میشود که یکی از انها روش کروماتوگرافی جذبی توسط پروتئین A *استافیلوکوکوس اورئوس* میباشد (۲). بایدازقبل تمام عوامل مؤثردرتولید یک پروتئین و قبل ازآن بیان ژن آن پروتئین را شناسایی کرده باشیم تا بتوانیم از بروزعوامل بازدارنده تا حد امکان جلوگیری کنیم بنابراین کلونینگ ژن ضروری بنظر میرسد.

درسال ۱۹۹۰ Sting و همکاران اقدام به استخراج پرو تئین A از دیواره سلولی باکتری نمودند (۱۹). همچنین Guss, Mota در سال ۱۹۸۵ با کشت سویه موتانت این باکتری که این پروتئین را به شکل پروتئین خارج سلولی تولید و ترشح می کرد اقدام به استخراج این پروتئین کردند (۲۲-۲۰) . اخیرا" Hopp و همکاران با استفاده از رزین پروتئین A درون پلیت های ۹۶ خانه ای روش جدیدی برای خالص سازی انتی بادیهای مونوکلونال ابداع نمودند (۲۳).

با توجه به پاتوژن بودن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و احتمال آلودگی هم چنین با توجه به عدم خلوص محصول لذا تولید این پروتئین از طریق کلونینک ژنی در اولویت قرار گرفت. Kobayash و همکاران نشان دادند که ژن این پروتئین در نواحی جغرافیایی مختلف دارای پلی مورفیسم می باشد و براساس پلی مورفیسم در منطقه ژنی x این باکتری، ۴۲ سویه بالینی جدا نمود و این نکته بیانگر تاثیر پروتئین A در شیوع این باکتری می باشد (۲۴).

احتمالا" این موضوع بیانگر میل ترکیبی بیشتر پروتئین A سویه بومی با IgG افراد آن ناحیه میباشد که این فرآیند هم به فرار باکتری از اپسونیزاسیون کمک می کند و هم باعث افزایش پاتوژنسیته باکتری می شود .

چنانچه برای انجام تستهای تشخیصی ایمونولوژیک و موارد استفاده درمانی ، ژن پروتئین A از سویه بومی استخراج و کلون گردد . پروتئین نوترکیب حاصل با Affinity بیشتری وارد واکنش می شود و درنتیجه حساسیت تست افزایش یابد .

نکته دیگر اینکه پروتئین G نیز همانند پروتئین A قادر به اتصال به ناحیه Fcg می باشد با این تفاوت که پروتئین G با میل ترکیبی بیشتری وارد واکنش می شودوبا تمام زیر کلاسهای IgG واکنش میدهد در حالیکه پرو تئین A با IgG3 واکنش نمی دهد پروتئین G علاوه بر قسمت FC با قسمتی از Fab (ناحیه داربست) نیز واکنش میدهد که این امر باعث کاهش حساسیت تستهای تشخیصی خواهد شد و دیگر اینکه پروتئین G دارای سکانسی می باشد که به آلبومین متصل میشود و چنانچه قصد استفاده از پروتئین G برای تخلیص IgG را داریم این قسمت در پروتئین باید حذف شود . بنابراین برای رسیدن به یک پروتئین مفید پروسه طولانی تری را باید انجام داد .

Warnes و همکاران در سال ۱۹۹۳ طی فرآیند کلون کردن این پروتئین مشاهده کرد که بیان این پروتئین بصورت کامل در باکتری *E.coli* باعث تجمع این پروتئین در غشاء باکتری می شود که در نتیجه مانع تشکیل Septa می گردد و اگر ژن قطعه غشائی حذف شود این مشکل نیز برطرف خواهد شد (۲۵) .

نتیجه گیری

در این تحقیق ژن پروتئین A باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با موفقیت در پلاسمیدبیانی کلون شد. پلاسمید نوترکیب برای ابراز پروتئین اماده میباشد. پروتئین نوترکیب برای تهیه ستون کروماتوگرافی جذبی بمنظور جدا کردن IgG از سرم کاربرد دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و در مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه انجام شده است. بدینوسیله نویسندگان از مسئولین مربوطه تشکرو قدردانی می نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Ghetie V, Sjöquist J. *Separation of cells by affinity chromatography on protein A gels*. Methods Enzymol 1984;108:132-138.

2- Khalili M, Liwo A, Scheraga HA. *Kinetic studies of folding of the B- domain of Staphylococcal protein A with molecular dynamics and a united residue (UNRES) model of polypeptide chains.* J Mol Biol 2006; 355 (3): 536-547.

3- Duggleby CJ, Jones SA. *Cloning and expression of the Staphylococcus aureus protein A gene in Escherichia coli.* Nucleic Acids Res1983; 11(10): 3065- 3070.

4- Hober S, Nord K, Linhult M. *Protein A chromatography for antibody purification.*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007; 15;848(1): 40-7. Review.

5- Shuttleworth HL, Duggleby CJ, Jones SA, Atkinson T, Minton NP. *Nucleotide sequence analysis of the gene for protein A from Staphylococcus aureus Cowan 1 (NCTC 8530) and its enhanced expression in Escherichia coli*. Gene 1987; 58(2): 283- 295.

6- Butler JE, Zhao Y, Sinkora M, Wertz N, Kacskovics I. *Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development*. Dev Comp Immunol. 2009; 33(3): 321-33.

7- Ankerst J, Christensen P, Kjellén L, Kronvall G. *A rountine diagnostic test for IgA and IgM antibodies to rubella virus: absorption of IgG with Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 1974; 30(3): 268-73.

8- Mallinson H, Roberts C, Bruce White GB. *Staphylococcal protein A; its preparation and an application to rubella serology*. J clin Path 1976; 29:999-1002.

9- Kinet JP, Bensinger WI, Balland N, Saint-Remy M, Frankenne F, Hennen G, Mahieu P. *Ex vivo perfusion of plasma over protein A columns in human mammary adenocarcinoma. Role of the Fc-binding capacity of protein A in the side effects and the tumoricidal response*. Eur J Clin Invest 1986; 16(1):50-5.

10- Ghetie V, Sjoquist J. *Separation of cells by affinity chromatography on protein A gels.* Methods Enzymol 1984; 108: 132-138.

11- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press, 2001; vol.1, chapter 5, 4-14.

12- McPherson MJ. Moller, SG,Beynon, R, Howe,C. *PCR.The Basics from Background to Bench.*Bios Scientific Publishers .chapter 2 ;Understanding PCR 2000, pp :9-21

13- Hyone-Myong Eun. *Enzymology primer for recombinant DNA technology*; chapter 6, DNA polymerases 1996, pp: 345-488.

14- Hanahan D. *Studies on transformation on E. coli with plasmids*. J Mol Biol.1983; 166(4):557-80

15- Sanders PG, Easton AJ. *cDNA cloning. In Genetic manipulation, Techniques and application*. Edited by Grove J.M., Fox A and Morgan NL. Blackwell Scientific Publication 1991; PP: 129-148.

16- Feliciello I, Chinali G. *A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli*. Anal Biochem 1993; 212: 394-401.

17- Stellwagen NC. *Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution.* Electrophoresis 2009; Suppl 1:S188-195

18- Moore D, Chory J, Ribaudo RK. *Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gels.* Curr Protoc Immunol. 2001 Chapter 10:Unit 10.5. Review.

19- Sting R, Lauerman L, Blobel H. *Isolations of protein A and protein G from the bacterial surface.* Zentralbl Bakteriology. 1990; 273(3): 306-12

20- Lindmark R, Movitz J, Sjoquist J. *Extracellular protein A from a methicillin-resistant strain of Staphylococcus aureus* . Eur J biochem 1977; 74(3): 623-628.

21- Movitz J,Masuda S, Sjoquist J, *Physico- and immunochemical properties of Staphylococcal protein A extracellularly produced by a set of mutants from Staphylococcus aureus Cowan I* .Microbiol Immunol 1979; 23(2): 51-60.

22- Guss B, Leander K, Hellman U, Uhlen M, Sjoquist J, Lindberg M. *Analysis of protein A encoded by a mutated gene of Staphylococcus aureus Cowan I.* European Journalof Biochemestry 1985; 153(3): 579-85

23- Hopp J, Pritchett R, Darlucio M, Ma J, Chou JH. *Development of a high throughput protein a well-plate purification method for monoclonal antibodies.* Biotechnol Prog. 2009 Jul 27. [Epub ahead of print].

24- Kobayashi N, Urasawa S, Uehara N, watanabe N. *Analysis of genomic diversity within the Xr-region of the protein A gene in clinical isolates of Staphylococcus aureus*. Epidemiol Infect 1999; 122(2): 241-249.

25- Warnes A, Brown MR, Fooks AR, Shuttleworth H, Dowsett AB, Melling J, Stephenson. JR. *The membrane binding C-terminus of protein A from Staphylococcus aureus affects its cellular localization and causes structural deformation when expressed in Escherichia coli*. Curr Microbiol 1993; 26(6): 337-344.

www.SID.ir