مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره هفتم، صفحه ۲۲-۱۷

تولید آنتی سرم پلی کلونال monospecific ضد HBsu باکتریایی

پریناز قدم[۱]، صغری قدسی[۱] ، مژگان بنده پور[۲]، سیده مهسان بنی جمالی[۱]، رعنا صمدی [۱]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه،دانشگاه الزهرا(س) ، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران،ایران

نویسنده مسؤول: دکتر پریناز قدم، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا(س). pghadam@alzahra.ac.ir

دریافت: ۸۹/۱۰/۱۰ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین HBsu عضو خانواده پروتئین های شبه هیستونی HU در باکتری *Bacillus subtilis* می باشد. این پروتئین نقش مهمی در ساختمان و عملکرد نوکلئوئید باکتریایی ایفا می کند. با توجه به اهمیت این گروه از پروتئین ها و شباهت اعضای خانواده HU، در این تحقیق HBsu بیان شده خالص به عنوان ایمونوژن به خرگوش تزریق شد. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ایمونوژنی HBsu و تولید آنتی سرم پلی کلونال می باشد تا در تحقیقات بعدی برای شناسایی سایر اعضای خانواده HU در باکتری های دیگر استفاده شود.

روش بررسی: پروتئین HBsu بیان شده از ژن *hbs* باکتری *Bacillus subtilis* ATCC 6633 که قبلا تهیه شده بود با یک برنامه ریزی بیست روزه به دو سر خرگوش نر تزریق و به منظور تائید تهیه آنتی سرم، از ایمونو بلات استفاده شد.

یافته ها: پس از بیست روز، آنتی سرم علیه پروتئین HBsu تهیه شد و نهایتا حضور آنتی سرم به وسیله ایمونو بلات تائید گردید. همچنین برای تائید کارایی آنتی سرم تهیه شده در شناسایی پروتئین های شبه HBsu از پروتئین شبه هیستونی استخراجی از *Halobacillus karajensis* استفاده شد که جواب مثبت بود.

نتیجه گیری: روش مورد استفاده روشی سریع و با کارآیی بالا برای تولید آنتی سرم علیه پروتئین HBsu می باشد. شباهت HU *Halobacillus karajensis* با پروتئین HBsu از باکتری *Bacillus subtilis* به اندازه ای است که آنتی سرم ضد HBsu می تواند این پروتئین HU را نیز شناسایی کند.

واژه های کلیدی: پروتئین شبه هیسونی HBsu ، *Bacillus subtilis* ، آنتی سرم پلی کلونال monospecific

www.SID.ir

مقدمه

پروتئین شبه هیستون (Histon like protein HU) یک پروتئین بازی است که برای اولین بار از باکتری *E.coli* جداسازی شد. توالی آمینواسیدی آن بسیار شبیه پروتئین H2B یوکاریوتی بوده و پروتئین های شبیه آن در بسیاری از پروکاریوت ها و همچنین اندامک های یوکاریوتی یافت می شود. HU از یک بدنه ی کروی تشکیل شده است که دو بازوی حاوی نوار بتا از آن خارج شده است (۱). هر چند که این پروتئین به طور غیر ویژه به DNA متصل می شود ولی با این حال تمایل بالایی برای اتصال به DNA فراپیچ و صلیبی شکل دارد(۲).HU بدون کمک هیچ نوع کوفاکتور یا پروتئینی به اسیدهای نوکلئیک متصل می شود. اتصال تصادفی و غیر ویژه HU منجر به ایجاد خمیدگیهای بسیار در DNA و کاهش طول آن تا حدود ۵۰٪ می شود (۳).

عملکرد این پروتئین با تسهیل فعالیت ژیراز بر فراپیچ DNA و کنترل رونویسی تاثیر می گذارد. همچنین این پروتئین در آغاز همانند سازی DNA نقش مثبت دارد(۴).HU در ترمیم DNA موثر است به طوری که می تواند ترمیم DNA تخریب شده بر اثر اشعه ایکس و UV را در شرایط آزمایشگاهی القا کند در حالی که سلول های فاقد HU از این ترمیم بی بهره بوده و دارای مقادیر زیادی از شکستگیها هستند(۵).

توالی اسید آمینه ای اعضای خانواده HU در پروکاریوت های مختلف حداقل ۲۰٪ شباهت دارند(۶). این شباهت در بین سویه های مختلف یک گونه بیشتر است به طوری که در میان پروتئین های شبه هیستونی HU گونه های مختلف باسیلوس (HB) که تا بحال تعیین توالی شده اند بیش از ۸۰٪ شباهت دیده شده است(۷). *Bacillus subtilis* فقط یک HU دارد که HBsu نامیده می شود و توسط ژن ***hbs*** کد می شود (۸). این پروتئین حدود ۵۰٪ شباهت آمینواسیدی با HU باکتری *E.coli* دارد. همچنین HBsu باکتری *Bacillus subtilis* و HU باکتری *Bacillus stearothermophilis* (Bst HU) حدود ۹۰٪ با هم شباهت دارند و ساختار سه بعدی تقریبا مشابهی دارند (۷). بنابراین به منظور بررسی شباهت HU باکتری های مختلف با HBsu و همچنین تشخیص HB در باسیلوس های مختلف، تولید آنتی سرم ضد HBsu ضروری به نظر می رسد. به همین منظور در این تحقیق پروتئین HBsu که قبلا بیان شده بود (۹). برای تولید آنتی سرم، به خرگوش تزریق شد و به این ترتیب آنتی سرم پلی کلونال monospecific تهیه و کارآیی آنتی سرم بدست آمده بررسی گردید.

روش بررسی

حیوانات آزمایشگاهی: خرگوشهای نر با وزن ۲/۵ کیلوگرم از انستیتو پاستور خریداری شدند و از غذا و آب استاندارد استفاده نمودند.

سویه های باکتریایی و شرایط کشت آنها: در این مطالعه *Bacillus subtilis* ATCC 6633 از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری و بر روی محیطهای TSA (Tryptone Soya Agar) جامد و TSB (Tryptone Soya Broth) مایع کشت داده شد.

MA_2^T *Halobacillus karajenesis* از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه تهران تهیه شد و بر روی محیطهای کشت نوتینت آگار با ۱۰٪ نمک و نوترینت براث با ۱۰٪ نمک کشت داده شد.

بیان ژن *hbs*: در تحقیقات قبلی در همین آزمایشگاه این ژن بیان شده و محصول آن تخلیص و نتیجه با الکتروفورز ژل پلی آکریل آمیدحاوی SDS بررسی گردیده بود(۹).

استخراج پروتئین HBsu: بیومس باکتری در چهار برابر حجم از بافر A حل شد (بافر A شامل Tris/HCl 20mM, NH_4Cl 20 mM, pH7.8 , استات منیزیم 10mM , 2-mercaptoethanol 5mM می باشد). یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور لیزوزیم ۱۰ mg/ml انکوبه شد سپس ۳ دقیقه در ۱۸۰ W و 9KHz در ۴ درجه سانتی گراد سونیکه و در ۱۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد و بعد در ۲۶۰۰۰۰ g به مدت دو ساعت و در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. نهایتا مایع رویی جمع آوری و با آمونیم سولفات ۹۰-۶۵ ٪ پروتئین مورد نظر رسوب داده شد (۱۰).

الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمیدحاویSDS: برای بررسی پروتئین طبیعی استخراج شده و پروتئین بیان شده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ حاوی SDS مطابق روش

www.SID.ir
Archive of SID

لاملی استفاده و رنگ آمیزی با کوماسی بلو R 250 و رنگ بری با محلول متانول اسید استیک انجام شد(۱۱).

تولید آنتی سرم ضد HBsu باکتریایی در خرگوش: آنتی سرم در مقابل HBsu بیان شده و خالص باکتریایی در خرگوش تهیه شد. بدین منظور در هر تزریق داخل پوستی ۳۰۰ میکروگرم ایمونوژن در ۱۳۰۰ µl PBS حل شد. برای اولین تزریق داخل پوستی نمونه ها با حجم مساوی از ادجوانت کامل فروند و برای دو تزریق داخل پوستی دیگر نمونه ها با حجم مساوی از ادجوانت ناقص فروند امولسیون شدند. نهایتا ۱۵۰ میکروگرم پروتئین در در ۶۷۰ µl PBS حل و بطور داخل رگی و بدون ادجوانت تزریق شد. فاصله زمانی سه تزریق اول یک هفته و آخرین تزریق ده روز بود(جدول۱). پس از خونگیری، سرم جمع آوری شده در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

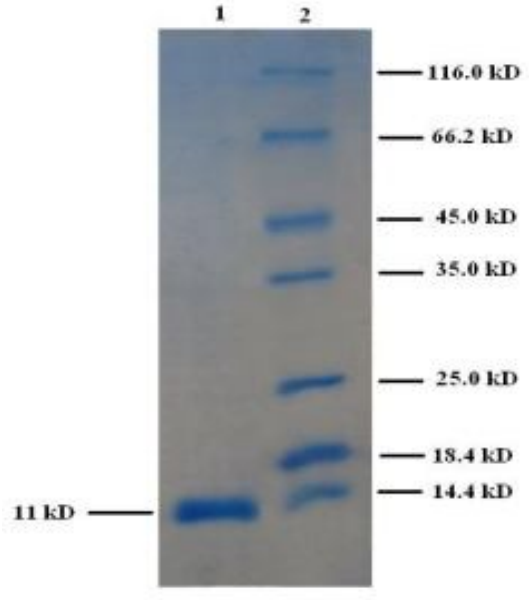
ایمونوبلات: اجزای پروتئین استخراج شده که بوسیله الکتروفورز با ژل آکریل آمید حاوی SDS جدا شده بود با ۱۰۰ ولت و به مدت یک ساعت و در ۴ درجه سانتی گراد و در حضور بافر ایمونو بلات 14.4g,methanol (Tris3g,glycine 200cc,water800cc) به غشای نایلونی(Whatman protran BA83) از شرکت سیگما منتقل و سپس ایمونوبلات شد(۱۲ و۱۳). بدین منظور غشای حاوی بندهای پروتئینی تثبیت شده بعد از دو بار شستشو در محلول TBS (10 mM Tris pH 8, 150mM NaCl) به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در BSA ۳٪ محلول در TBS (محلول بلاک کننده) انکوبه و دو بار به مدت ۱۰ دقیقه در TBST(TBS ,0.1% Tween 20) و یک بار به مدت ۱۰ دقیقه در TBS شسته شد. تمامی مراحل شستشو و انکوبه کردن روی شیکر انجام گردید. واکنش با آنتی سرم رقیق شده در TBS (رقت ۱/۵۰۰۰) در دمای اتاق و به مدت یک ساعت انجام شد و پس از دو بار شستشو با TBST به مدت ۱۰ دقیقه غشا با آنتی سرم بزی کونژوگه با پروکسیداز ضد IgG آنتی سرم خرگوشی (پژوهشکده ابن سینا) رقیق شده در محلول TBS (رقت ۱/۱۰۰۰) در دمای اتاق و به مدت یک ساعت انکوبه شد. نهایتا غشا پنج بار به مدت پنج دقیقه با TBST شسته و برای تولید رنگ، ۲۰ دقیقه غشا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محلول سوبسترا DAB 6mg ,500 mlTris 1mM,3µl H_2O_2) (از شرکت سیگما) انکوبه شد.

جدول۱. برنامه تزریق HBsu به خرگوش

زمان تزریق	نوع تزریق وخونگیری	نوع ادجوانت	غلظت
روز شروع	تزریق داخل پوستی	ادجوانت کامل فروند	۳۰۰µg /۱۳۰۰µl
یک هفته بعد	تزریق داخل پوستی	ادجوانت ناقص فروند	۳۰۰µg /۱۳۰۰µl
یک هفته بعد	تزریق داخل پوستی	ادجوانت ناقص فروند	۳۰۰µg /۱۳۰۰µl
ده روز بعد	تزریق داخل رگی	بدون ادجوانت	۱۵۰ µg/۶۷۰ µl

یافته ها

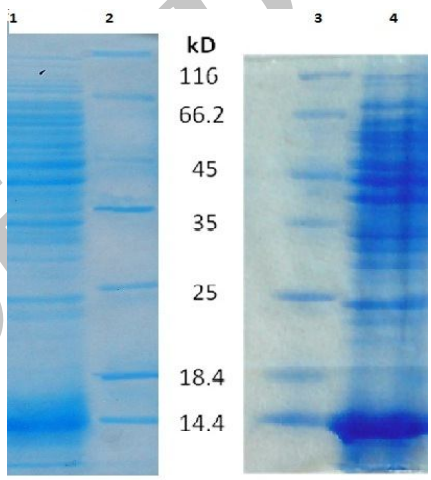
به منظور تهیه ایمونوژن، ژن *hbs* از *Bacillus subtilis* ATCC 6633 بیان و تخلیص شد(شکل ۱).



شکل ۱.الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ و رنگ آمیزی با کوماسی بلو(۹) ستون ۱ : HBsu بیان شده و خالص شده ستون ۲: سایز مارکر پروتئینی(از Fermentas)

www.SID.ir

پس از تزریق ایمونوژن تولیدی با خونگیری از خرگوش، سرم آن جمع آوری شد و به منظور تائید تولید آنتی سرم علیه HBsu و به منظور تائید کارآیی آنتی سرم به دست آمده در شناسایی پروتئین های شبه HBsu ، محصول استخراج پروتئین از *Bacillus subtilis* که با آمونیوم سولفات ۸۰٪ ترسیب شده بود و حاوی HBsu بود و محصول استخراج پروتئین از *Halobacillus karajenesis* که با آمونیوم سولفات ۶۵٪ رسوب داده شده بود و احتمالا پروتئینی شبیه HBsu داشت بر روی ژل۱۵٪ پلی آکریل آمید حاوی SDS الکتروفورز شد(شکل ۲).



شکل ۲. الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪حاوی SDS
۱: پروتئین استخراج شده از *Halobacillus karajenesis*
۲و۳: سایز مارکر پروتئینی. ۴: پروتئین استخراج شده از *Bacillus subtilis*

سپس پروتئین های فوق برروی غشای نایلونی با استفاده از آنتی سرم به دست آمده ایمونوبلات شد(شکل ۳).

شکل ۳. ایمونوبلات با اسفاده از آنتی سرم ضد پروتئین HBsu
۱: پروتئین استخراج شده از *Halobacillus karajenesis*
۲ :پروتئین استخراج شده از *Bacillus subtilis*

بحث

بیش از ۳۰ عضو از خانواده پروتئین های شبه هیستونی با حدود ۹۰ اسید آمینه و بار خالص مثبت در pH7 شناخته شده اند که یکی از آنها خانواده HU می باشد(۱۴). پروتئین HU به صورت دایمر نقش مهمی در اتصال به DNA و خم کردن و همچنین در عملکرد آن بازی می کند(۱۵). توالی اسید آمینه ای این پروتئین در سویه های مختلف یک گونه نیز تفاوتهایی دارد. در گونه های مختلف *Bacillus* پروتئینی بسیار شبیه HU وجود دارد که HB نامیده می شود(۷). در بین پروتئین های HB که تاکنون تعیین توالی شده اند بیش از ۸۰٪ شباهت به چشم می خورد(۱۶).

Bacillus subtilis توسط ژن *hbs* فقط یک پروتئین HB بیان می کند به نام HBsu و این بدین معنی است که در این باکتری این پروتئین به صورت همو دایمر عمل می کند (۷).

با توجه به اهمیت پروتئین HU در عملکرد DNA و نقش آن در کنترل رونویسی، آغاز همانند سازی و ترمیم DNA بررسی این پروتئین در باکتری های مختلف مورد توجه محققین قرار گرفته است(۵و۴). از آنجا که اولین اقدام در این بررسی اثبات حضور آن می باشد بنابراین تولید آنتی سرم علیه آن و استفاده ابزاری از آن برای تایید حضور این پروتئین لازم به نظر می رسد. به همین جهت در این مطالعه پروتئین HBsu از باکتری *Bacillus subtilis* ATCC 6633 که قبلا بیان و تخلیص شده بود به عنوان ایمونوژن به خرگوش تزریق شد. علت استفاده از پروتئین خالص تولید آنتی سرم پلی کلنال monospecific بود تا حضور ناخالصی در ایمونوژن، مشکلی در ایمن شدن حیوان ایجاد نکند. معمولا تولید آنتی سرم روشی وقت گیر است و طولانی بودن پروتکل همواره همراه خطراتی همچون از دست رفتن حیوان ایمن شده می باشد که به این ترتیب نیاز به مراقبت خاصی از حیوان است تا پروسه ایمن سازی تکمیل شود ولی در روش به کار رفته به دلیل تحریک بسیار زیاد سیستم ایمنی حیوان در کوتاه مدت و با آنتی ژن بسیار کم پاسخ گرفته شده است. مطابق با هدف این تحقیق نه تنها این آنتی سرم پروتئین طبیعی را شناخت بلکه پروتئین مشابه در *Halobacillus karajenesis* MA_2^T را نیز شناسایی کرد که این خود آغازی برای مطالعات بعدی در این باکتری می باشد.

www.SID.ir
Archive of SID

نتیجه گیری

پروتکل به کار گیری شده کارآیی بالایی برای تولید آنتی سرم پلی کلونال monospecific علیه HBsu دارد و کوتاهی زمان تولید بر مزیتش می افزاید.

References

1- Zargari A. *Iranian medicinal plants*. Tehran university press. Tehran. Iran. 1995; (4): 103- 104.
2- Baser K, Sezik E, Tumen G. *Composition of the essential oil of Ziziphora clinopodioides Lam*. J. Essential Oil. Res. 1991; 3(4): 237-239.
3- Sajadi SE, Ghasemi Dehkordi N, Baloochi M. *Volatile Constituents of Ziziphora clinopodioides Lam*. Journal of Pajoohesh va Sazandeghi. 2003; 8: 1-9.
4- Babakhanloo P, Mirza M, Sefidkan F, Barazandeh M. *Chemical components of essential oil of Ziziphora clinopodioides*. Med. Plant. Res. J. 1998; 2: 103- 114.
5- Manna A, Abalaka ME. *Preliminary screening of the various extracts of Physalis angulata (L.) for antimicrobial activities*. Spectrum J. 2000; 7(2): 119-125.
6- Shariff ZU. *Modern herbal therapy for common ailments*. Nature pharmacy series. Spectrum Books limited. United Kingdom. 2001; pp: 9- 84.
7- Salehi P, Sonboli A, Eftekhar F, Nejad- Ebrahimi S, Yousefzadi M. *Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of Ziziphora clinopodioides subsp. rigida (BOISS.) RECH. F. from Iran*. Biol. Pharm. Bull. 2005; 28: 1892-1896.
8- Babayi L, Kolo JI, Ijah UJ. *The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms*. Biochemistry. 2004; 16 (2): 106- 110.
9- Naderinasab M, Rashed T, Nazem M. *Laboratory bacteriology*. Emam Reza Press. Mashhad. Iran.1997; pp: 24- 29.
10- Inouye Sh, Takizawa T, Yamaguchi H. *Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact*. J. Antimicrob. Chemother. 2001; 47:565-573.
11- Vander DA, vlietinck Aj. In: Dey PM, Harborne JB. (Eds), *Methods in plant biochemistry: screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants*. London: Academic press; 1991; pp: 47-69.
12- Rezai M, Rasooli I. *Chemical components and biological activity of essential oils of Thymus x-prolock and Mentha longifolia*. Daneshvar. 2000; 8 (31): 1-8.
13- Ali MS, Saleem M, Akhtar F, Jahangir M, Parvez M, Ahmad VU. *Three p-cymene erivatives from Zararia multiflora*. Phytochemistry. 1999; 52 (4): 685-688.
14- Valero M, Giner MJ. *Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of Bacillus cereus INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth*. Int. J. Food Microbiol. 2006; 106 (1): 90-94.
15- *Thymus spathulifolius*. Food Control. 2004; 15: 627-634.
16- Tassou C, Koutsomanis K, Nychas GJE. *Inhibition of Salmonella entritidis and Staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil*. Food Res. Int. 2000; 33: 273-280.
17- Delgado B, Fernandez PS, Palop A, periago PM. *Effect of thymol and cymene on Bacillus cereus vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions*. Food. Microbiol. 2004; 21: 327-334.
18- Tape B, Donmez E, Vnlu M, Candan F, Daferera D, Sokmen A. *Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia cryptantha and Salvia multicaulis*. Food Chemistry. 2004; 84: 519- 525.
19- Smith P, Stewart J, Fyfe L. *The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese*. Food. Microbiol. 2001; 18: 463 - 470.
20- Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. *Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils*. Int. J. Food. Microbiol. 2002; 74: 101-109.
21- Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. *Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats*. Braz. J. Infec. Dis. 2004; 8 (3): 217-226.
22- Nazer A, Kobilinsky A, Tholozan J, Dubais-Brissonet F. *Combination of foods antimicrobials at low levels to inhibit the growth of Salmonella sv. typhimurium: a synergistic effect*? Food. Microbiol. 2005; 22: 391-398.
23- Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA. *The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic*
24- Aghajani Z, Assadian F, Masoudi Sh, Chalabian F, Esmaeili A, Tabatabaei M, Rustaiyan A. *Chemical composition and in vitro antibacterial activities of the oil of Ziziphora clinopodioides and Z. capitata from Iran.* Chemistry of Natural Compounds. 2008; 44(3): 387-389.
25- Ozturk S, Ercisli S. *The chemical composition of Essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oils and methanol extract of Ziziphora persica bunge*. J. Ehtanopharmacol. 2006; 106(3): 327- 376.
26- Ozturk, S. and Ercisli, S. *Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioides*. Food Control. 2007; 18(5): 535- 540.
27- Amiri H. *Composition and antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of Ziziphora clinopodioides Lam in preflowering stage*. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2009; 16(1): 79-86.

Archive of SID

www.SID.ir