

بهینه سازی و بیان ژن طراحی شده stxA واجد سه جهش هدفمند

(E167Q-A231D-G234E) شیگلا دیسانتری و تخلیص آن

غلامرضا اولاد^{۱*}، محمود تولایی^۲، فیروز ابراهیمی^۳، جعفر امانی^۴، علی محمد لطیفی^۵، محمدباقر صالحی^۶

۱-۵ و ۴- استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ۲- استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی دانشگاه علوم

پزشکی بقیه الله (عج) ۳ و ۶- استادیار مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

(دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۲۰، پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۰۹)

چکیده

شیگلا دیسانتری با تولید سم stx (با دو زیر واحد A و B) یکی از مهم‌ترین، باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای برای انسان است. این سم با ورود به سلول‌های اپیتلیال باعث مهار سنتز پروتئین و مرگ سلولی خواهد شد. علیرغم مطالعات فراوان جهت تولید واکسن، هنوز ضرورت تداوم مطالعه در دستیابی به پروتئین نوتریب از نوع StxA وجود دارد. هدف از این مطالعه، طراحی ژن stxA جهش یافته و تولید پروتئین بیانی آن به‌عنوان کاندید واکسن علیه شیگاتوکسین جهت بررسی ایمنی زایی آن در مطالعات بعدی می‌باشد. پس از طراحی و تهیه ژن صناعی pET28a-stxA جهش یافته (E167Q-A231D-G234E)، واکنش PCR جهت کنترل صحت حضور این ژن انجام گردید. پس از انتقال این وکتور به سلول میزبان E. coli BL21، بیان، بهینه سازی، تخلیص و در نهایت تایید پروتئین حاصل بررسی گردید. نتیجه مطالعات اولیه، منجر به طراحی ژن stxA جهش یافته گردید. نتایج واکنش PCR با استفاده از پلاسمید سنتتیک نشان از صحت ژن مورد مطالعه داشت. سپس بیان این ژن در سلول میزبان E. coli BL21، بهینه سازی گردید که در نتیجه تولید مقادیر زیادی از این پروتئین به شکل اجسام توده‌ای نشان داده شد. تخلیص اجسام توده‌ای و سپس محلول سازی پروتئین‌های آن از روش‌های تلفیقی صورت گرفت. با توجه به مکانیسم اثر شیگاتوکسین پیش‌بینی می‌شود که این پروتئین جهش یافته دارای اثر سمیت کم‌تری نسبت به سایر جهش یافته‌های قبلی کاندید واکسن داشته باشد، و در نتیجه بتواند به عنوان کاندید واکسن برتر مطرح گردد.

کلید واژه‌ها: stxA جهش یافته، واکسن نوترکیب، شیگاتوکسین، بهینه سازی بیان.

Shigella Dysentery StxA Mutant (E167Q-A231D-G234E) Gene Design and Optimization of Recombinant Protein Expression and Purification

G. R. Olad^{*}, M. Tavallaei, F. Ebrahimi, J. Amani, A. M. Latifi, M. B. Salehi

Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences

(Received: 01/10/2012, Accepted: 05/29/2012)

Abstract

Shigella dysentery producing shigatoxin (subunits A, B) is one of the most important human pathogenic intestinal bacteria. Entering to epithelial cells, the toxin inhibits protein synthesis leading to cell death. In spite of great investigation on vaccine production against S. dysentery studying to achieve significant stxA recombinant protein still remains important. The objective of this study was designing mutant stxA gene and expressing protein production as vaccine candidate against stx for further immunization studies. Three stxA mutant gene including (E167Q-A231D-G234E) were designed and the synthetic gene in pET28a plasmid was obtained and confirmed by PCR. Thereafter the plasmid was transformed into the host cell E. coli BL21 after which gene expression was optimized and protein purity assay was then performed. Preliminary studies led to mutant stop gene design after which it was confirmed by synthetic plasmid and PCR. The expression of this gene in E. coli BL21 host cell was then optimized and resulted in forming large amount of protein inclusion bodies. Purification of inclusion bodies and protein solubilization was performed with a combinatorial method. Regarding the mechanism of shigatoxin effect and simultaneous use of two different mutations in this gene, less toxicity is expected in comparison with previous mutants as vaccine candidate, posing a better vaccine candidate.

Keyword: StxA Mutant, Recombinant Vaccine, Shigatoxin, Expression Optimization.

* Corresponding Author E-mail: grolad@gmail.com

۱. مقدمه

باکتری شیگلا دیسانتری یکی از مهم‌ترین باکتری‌های مهم بیماری‌زای روده‌ای برای انسان می‌باشد [۶-۱]. علت اصلی بسیاری از همه گیری‌های اسهال ناشی از شیگلوزیس در قرن اخیر، این باکتری بوده است. مهم‌ترین فاکتور بیماری‌زا در این باکتری اگزوتوکسین stx (با دو زیر واحد A و B) است که سمیت فوق‌العاده بالا و کشنده‌ای ($LD_{50} = 8.5 \mu\text{g/Kg}$) دارد. این سم یک مولکول هگزامری با وزن ملکولی در حدود ۷۰ kD است که با اتصال به گیرنده‌های سطحی سلول‌های هدف (Gb3: α Gal (1-4) β Gal (1-4) β Glc ceramid) باعث مرگ سلول می‌گردد [۷-۹]. این سم توسط باکتری شیگلا دیسانتری نوع ۱ تولید می‌گردد. همچنین سمی مشابه با آن با نام Stx1 و Stx2 توسط E. coli O157 نیز تولید می‌گردد که حدود ۹۸ درصد بین آنها شباهت وجود دارد [۱۲-۱۰ و ۱]. حساسیت سلول‌های اندوتلیال کلیه انسان به Stx شیگلا در مقایسه با Stx1 اشریشیا کلی تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر است [۱۳] و به همین دلیل آن را عامل اصلی ایجاد کننده بیماری خون ادراری (Hemolytic Uremic Syndrome=HUS) معرفی نموده‌اند [۱۴].

سمیت و قدرت ایمنی‌زایی شیگاتوکسین بسیار بالا است. آستانه سمیت آن کمتر از یک میکرو گرم برای موش محاسبه گردیده است. این سم به دلیل قدرت آنتی ژنی بالا، دارای پتانسیل تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی بادی علیه آن در بدن میزبان می‌باشد [۷، ۸، ۱۵]. زیر واحد StxB با ۶۹ اسید آمینه و وزن مولکولی حدود ۷/۷ کیلو دالتون، به صورت پنتامر به زیر واحد StxA با ۲۹۴ اسید آمینه با وزن ملکولی در حدود ۳۲ کیلو دالتون متصل است. شیگاتوکسین ابتدا به واسطه زیر واحد B به رسپتور سطحی Gb3 مستقر در غشاء سلول اپیتلیال متصل شده و تشکیل یک کمپلکس پوشیده از مولکول کلاترین می‌دهد و طی فرآیند اندوسیتوز به صورت یک وزیکول، به داخل سلول انتقال می‌یابد [۱۶، ۱۷، ۱۸].

یک آنزیم سرین پروتئاز به نام Furin در گلژی منحصراً باعث برش پیوند پپتیدی میان دو بخش A₁ (۲۸ کیلودالتون) و A₂ (۴ کیلو دالتون) می‌گردد ولی به دلیل وجود پیوند دی سولفید از هم جدا نمی‌شوند. سپس این مجموعه با واسطه گیرنده‌های KDEL (توالی Lys-Asp-Glu-Leu) موجود در غشاء ER به شبکه آندوپلاسمی وارد شده و در نهایت ضمن احیای پیوند دی سولفیدی باقی‌مانده میان A₁ و A₂، آنها را به طور کامل از هم جدا و به صورت پروتئین خطی A₁ رها می‌سازد [۱۹، ۲۰]. در نهایت A₁ با واسطه پروتئین Sec₆₁ غشاء شبکه آندوپلاسمی به سیتوزول منتقل می‌گردد و StxB نیز به غشاء سلول بر می‌گردد. بخش A₁ در اثر فعالیت آنزیمی N-گلیکوزیداز با حذف یک باز آدنین از 28S rRNA در زیر واحد 60S ریبوزوم، موجب مهار عملکرد فاکتورهای EF-1 و EF-2 (Elongation Factor 1, 2) می‌گردد. در این فرایند با جلوگیری از طویل شدن زنجیره

پپتیدی، موجبات مهار سنتز پروتئین و مرگ سلول میزبان را فراهم می‌آورد [۲، ۱۹ و ۲۴-۲۱].

تاکنون مطالعات فراوانی جهت تولید انواع واکسن علیه این سم و به ویژه نوع نوترکیب آن انجام گردیده است. محققین همواره در پی این بوده‌اند که بدانند برای طراحی واکسن نوترکیب علیه این سم کدام یک از دو زیر واحد StxB و StxA به صورت مجزا و یا به صورت هم‌زمان مناسب‌تر هستند. مهم‌ترین اصل در طراحی واکسن نوترکیب، دست‌یابی به پروتئینی با حداقل اثر سمیت و بهترین اثر ایمنی زایی برای میزبان و در عین حال شبیه‌ترین ساختار مولکولی به پروتئین وحشی (Native) است. سم طبیعی علاوه بر دارا بودن سمیت، به صورت ذاتی خود دارای بالاترین درجه ایمنی زایی ذاتی برای میزبان نیز می‌باشد [۲۳، ۲۵]. با توجه به مکانیسم اثر سم بر سلول‌های هدف، تاکنون سه مسیر جهت طراحی پروتئین نوترکیب به‌عنوان کاندید واکسن علیه این توکسین معرفی و مورد استفاده واقع شده است که عبارتند از:

مسیر اول مبتنی بر ایجاد اختلال در روند اتصال سم به گیرنده اختصاصی آن است. بر اساس این روش، طراحی واکسن نوترکیب، علیه زیر واحد اتصال دهنده شیگاتوکسین (StxB) صورت می‌گیرد و استفاده از آن به‌عنوان ماده ایمن زا در میزبان، منجر به تولید آنتی بادی‌هایی می‌گردد که در صورت حضور سم Stx در بدن، آن را خنثی نموده و در نتیجه مانع اتصال سم به سلول هدف و در نهایت منجر به مهار و حذف سم می‌گردد. بدیهی است که این آنتی ژن فاقد هر گونه اثر سمی بر روی میزبان است، در ضمن هیچ‌گونه مصنوعیتی بر علیه زیر واحد کاتالیتیک (StxA) نیز ایجاد نمی‌نماید. تاکنون مطالعات متعددی در استفاده از این زیر واحد (StxB) به‌عنوان کاندید واکسن نوترکیب و حتی به‌عنوان واکسن نوع ژنی علیه شیگاتوکسین گزارش گردیده است [۳ و ۳۱-۲۷].

مسیر دوم مبتنی بر ایجاد اختلال در روند انتقال داخل سلولی توکسین است. در این روش از طراحی واکسن بر اساس StxA جهش یافته استفاده می‌شود. این زیر واحد نوترکیب، در ابتدا به تنهایی و در غیاب StxB، توانایی اتصال به گیرنده سطحی سلول هدف را ندارد و ثانیاً به فرض محال ورود آن به درون سلول، به دلیل عدم اتصال آن به غشاء آندوزومیک، به ناحیه‌ای که این زیر واحد را به مولکول A₁ فعال با خاصیت آنزیمی تبدیل می‌نماید، منتقل نخواهد شد. بنابراین، ایجاد جهش در این نواحی از ژن، باعث کاهش شدید اثر سمی آن می‌گردد. تاکنون جهش‌های مختلفی از آن گزارش گردیده است که در بین آنها، جهش در نواحی F226Y، A231D، G234E موجب تولید پروتئین‌های با پایداری مناسب‌تری حاصل شده است. پروتئین جهش یافته این زیر واحد در مقایسه با نوع وحشی به صورت انفرادی (A231D) یا (G234E) باعث کاهش تمایل آن به غشاء ER تا ۵۰٪ می‌گردد. استفاده هم‌زمان از این دو جهش باعث حذف کامل تمایل

در جایگاه فعال (Active Site) ژن stxA در این طراحی، ژن صنعتی جهش یافته stxA (واجد جهش نقطه‌ای در سه لوکوس E167Q, A231D, G234E)، به صورت اپتیمایز شده در وکتور بیانی pET28a از شرکت چینی (ShineGene) تهیه گردید.

صحت پلاسمید حامل ژن صنعتی، به وسیله ژل آگاروز بررسی گردید. انتقال این وکتور در سلول‌های میزبان E. coli BL21 از طریق شوک حرارتی صورت پذیرفت. کلنی‌های غربالگری شده کشت داده شد. بیان ژن stxA جهش یافته در شرایط متداول انجام شد. ارزیابی پروتئین بیانی با استفاده از ژل SDS-PAGE صورت پذیرفت. همچنین صحت حضور ژن مورد مطالعه با انجام واکنش PCR (۳۵ سیکل و دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ ثانیه برای هر بخش)، و با استفاده از وکتور تخلیص شده از این نمونه‌ها بررسی گردید. در این واکنش، از آغازگر پیشرو با ترادف 3'ATG CCA TGG 5' و آغازگر پیرو با ترادف 5'CAT TGA ATT CCC TCA ACT GCT AAT AGT TC3' (تهیه شده از شرکت سینازن) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به جهت بررسی صحت ژن جهش یافته در پلاسمید مذکور، تعیین توالی نیز صورت پذیرفت.

بررسی بیان و بهینه‌سازی جهت تولید پروتئین StxA جهش یافته در وکتور pET28a برای ۳ کمیت زمان (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ ساعت)، دما (۲۵، ۳۰، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و غلظت ماده القاء کننده (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵ میلی مولار) تکرار و مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به عدم پاسخ مناسب، از یکی از این نمونه‌ها (به صورت راندوم)، پاساژ مجدد بر روی یک پلیت محیط کشت LB جامد دارای آنتی بیوتیک انجام گردید. سپس بیان برای ۴ کلنی تک رشد یافته از پلیت اخیر با شرایط پایه (۱ IPTG میلی مولار، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سرعت ۱۵۰ rpm و زمان ۶ ساعت) اجرا گردید. سپس بهینه‌سازی بیان و تولید پروتئین مورد نظر با تغییر در ۳ کمیت زمان، دما و غلظت ماده القاء کننده (IPTG) تکرار گردید.

بررسی استخراج و تخلیص پروتئین بیانی StxA جهش یافته نشان داد که این پروتئین در فاز غیر محلول و به شکل اجسام توده‌ای (Inclusion Body) سلول قرار دارد. جهت تخلیص پروتئین بیانی از انکلوژن بادی و سایر اجزا سلول، از روش زیر استفاده گردید. ابتدا سلول‌های بیانی به وسیله سانتریفیوژ (به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰) جمع آوری شد. رسوب حاصل در بافر حاوی Tris-HCl ۵۰ میلی مولار و EDTA ۵ میلی مولار (pH=۸) حل شده و پس از شکست سلول‌ها به وسیله sonication، سانتریفیوژ گردید. به رسوب حاصل از آن بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار و سدیم داکسی کولات (Sodium salt deoxycholate) ۱ درصد اضافه گردید. پس از حل نمودن، مجدد سونیکیت و سانتریفیوژ گردید. رسوب باقی‌مانده در محلول سدیم داکسی کولات ۱ درصد به مدت ۱۲ ساعت در

زیر واحد A1 به غشاء ER و در نتیجه کاهش ۲۲۵ برابری سمیت آن نسبت به توکسین طبیعی می‌شود [۱، ۴۲ و ۳۳-۳۱].

مسیر سوم مبتنی بر ایجاد اختلال در عملکرد آنزیمی StxA است. در این روش، در جایگاه فعال (Active site) زیر واحد A جهش ایجاد می‌گردد. در این حالت زیر واحد جهش یافته در ابتدا بدون حضور StxB به تنهایی به گیرنده سطحی سلول هدف (Gb3) متصل نمی‌شود. ثاباً به فرض اتصال و طی شدن پروسه انتقال داخل سلولی و حتی به فرض تبدیل شدن به A1 فعال، به دلیل ایجاد تغییرات ساختاری ناشی از این جهش و کاهش شدید تمایل آنزیم به سوبسترای خود (28srRNA)، قادر به اتصال به آن نخواهد بود. در نتیجه، جهش در این ناحیه، علاوه بر تحریک سیستم ایمنی بدن بر علیه سم، باعث کاهش اثر سمیت آن بر سلول‌های میزبان می‌گردد [۳۴ و ۳].

Hovde و همکارانش در سال ۲۰۰۲ توانستند ضمن ایجاد جهش در جایگاه E167D (جای‌گزینی آسپارات به جای گلوتامات)، اثر سمیت پروتئین نو ترکیب stxA حاصل از آن را تا ۳۰۰ برابر نسبت به توکسین طبیعی کاهش داده و آن را در مقایسه با جهش نوع دوم (A231D-G234E) نیز مورد ارزیابی قرار دهند. در مطالعه Danbara و همکارانش در سال ۲۰۰۳، با استفاده از تکنیک site-directed Mutagenesis به روش PCR توانستند با ایجاد جهش در همین جایگاه (۱۶۷) و جایگزینی اسید آمینه‌های مختلف، اثر ایمنی زایی و کاهش سمیت این ایمونوزن‌ها را مورد بررسی قرار دهند. در این مطالعه اسید آمینه گلوتامات (E) 167 ابتدا با لیزین (K) و در نوبت دیگر با گلوتامین (Q) جایگزین گردید. نتایج حاصل از تیتر آنتی بادی در آزمون الیزا و آزمون خنثی‌سازی سم به وسیله آنتی بادی‌های حاصل از این دو گروه و نتایج چالش حیوان ایمن، نشان داد که یکی از بهترین حالات، جهش در لوکوس E167Q می‌باشد [۳۴ و ۳۵].

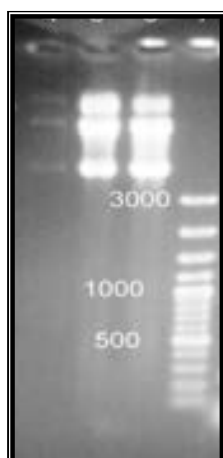
هدف از این مطالعه، ابتدا بررسی و معرفی مترادفی از ژن زیر واحد StxA است که واجد لوکوس‌های مناسب جهش با آرایش جدید باشد. سپس بیان و بهینه‌سازی ژن صنعتی آن، و در نهایت بررسی تخلیص و تولید آزمایشگاهی پروتئین نو ترکیب به عنوان کاندید واکسن علیه شیگاتوکسین می‌باشد.

۲. بخش تجربی

در این مطالعه، ابتدا جستجوی اینترنتی پیرامون مطالعات قبلی در استفاده از جهش‌های مختلف در stxA صورت پذیرفت. در نتیجه بررسی سایر مطالعات در خصوص نوع و جایگاه جهش در این زیر واحد، استفاده تلفیقی و هم‌زمان از هر دو مسیر دوم و سوم مورد توجه این مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه طراحی و تولید stxA جهش یافته در دو ناحیه ایجاد گردید: ۱- جهش در جایگاه‌هایی که منجر به اختلال در روند انتقال داخل سلولی سم می‌شود. ۲- جهش

با پاساژ مجدد فقط یکی از نمونه‌های منفی فوق، بر روی محیط جامد LB واجد کانامایسین و گرماگذاری ۱۸ ساعته آن، ابتدا ۳ کلنی رشد یافته از آن به محیط LB مایع پاساژ داده شد. در نتیجه بررسی بیان و به‌دنبال آن انجام بهینه سازی بیان، تولید پروتئین بیانی مورد مطالعه در تمام نمونه‌های حاصل مثبت می‌باشد شکل (۳).

بررسی تخلیص پروتئین بیانی StxA جهش یافته با استفاده از ستون نیکل به روش طبیعی (شیب غلظت ایمیدازول) و ژل SDS-PAGE و همچنین پروتئین سنجی به روش برادفورد، نشان از عدم تولید این پروتئین در محلول دارد. تخلیص آنکلوژن بادی حاوی پروتئین بیانی با استفاده از نمک سدیم داکسی کولات (روش Panda ۲۰۰۵)، باعث حذف نسبی بسیاری از دیگر پروتئین‌های زمینه‌ای عصاره سلولی می‌گردد (شکل ۴).



شکل ۱. بررسی پلاسمید pET28a-stxA حامل ژن جهش یافته

ستون ۱- پلاسمید استخراج شده از نمونه تاریختی
ستون ۲- پلاسمید تهیه شده از شرکت چینی
ستون ۴- مارکر وزن مولکولی DNA 100bp فرمنتاز



شکل ۲. نتایج PCR ژن StxA جهش یافته با استفاده از پلاسمید

استخراج شده از چند نمونه مثبت
ستون ۱- مارکر وزن مولکولی DNA 100bp فرمنتاز
ستون ۲- نتیجه PCR برای نمونه کنترل منفی (بدون Template)
ستون‌های ۳، ۴، ۵ ژن StxA تکثیر یافته با وزن 882bp در ۳ نمونه

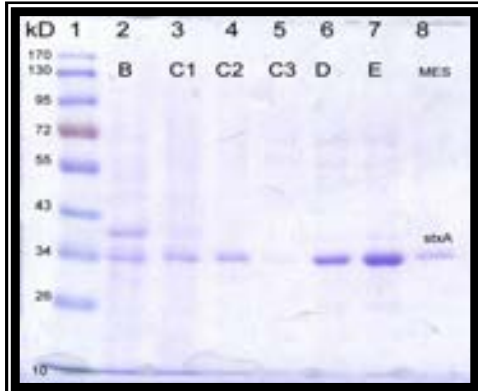
دمای اتاق تیمار شده و سپس سونیکیت و سانتریفیوژ گردید. به رسوب حاصل، بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار (pH= ۸/۵) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و سپس سانتریفیوژ گردید. در نهایت رسوب آنکلوژن بادی تخلیص شده برای ادامه مطالعات مورد استفاده قرار گرفت [۳۶].

در ادامه، تخلیص پروتئین با استفاده از ستون حاوی نیکل- نیترویلوتری استیک اسید (Ni-NTA) ساخت شرکت کبازن و روش واسرشتی ارائه شده از همین شرکت انجام گردید. بافر پایه برای ستون حاوی اوره ۸ مولار، Tris-HCl ۱۰ میلی مولار و سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار تهیه گردید. pH برای بافرهای E,D,C,B به ترتیب ۸، ۶/۳، ۵/۹ و ۴/۵ تنظیم گردید. پس از عبور نمونه و بافرهای فوق از ستون، فرآورده‌های خروجی آن جمع‌آوری و سنجش غلظت پروتئین این نمونه‌ها به روش برادفورد انجام گردید [۳۹،۳۸،۳۷].

تایید پروتئین بیانی تخلیص شده با استفاده از ژل SDS-PAGE (۱۲٪) و سپس از روش ایمونوبلات (Immunoblot) با آنتی بادی پلی کلونال ضد His-Taq بررسی گردید. این فرایند با استفاده از وسترن بلاتینگ (Western Blotting, Biorad, USA) و بافر انتقال، حاوی گلیاسین ۳۹ میلی مولار، تریس ۴۸ میلی مولار، متانول ۲۰ درصد و SDS ۳۷ درصد و پس از انتقال بر روی کاغذ نیتروسولولز انجام گردید. ابتدا کاغذ نیتروسولولز در بافر Phosphat Buffer Saline (Phosphat Buffer Saline Tween20= PBST) حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه تیمار شده و سپس سه بار با بافر PBST شستشو داده شد. پس از آن در بافر PBST حاوی آنتی بادی Anti His-Tag (فرمنتاز) با رقت ۱:۸۰۰۰ و سپس با آنتی بادی کانژوگه موشی (کبازن) و پراکسیداز با رقت ۱:۴۰۰۰ مجاورت داده شد. برای آشکار سازی از ۱۰ میلی لیتر بافر حاوی تریس ۵۰ میلی مولار، ۶ میلی گرم دی آمینو بنزئیدین و ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه استفاده شده و در پایان، توقف واکنش با آب مقطر صورت پذیرفت. [۴۰،۴۱].

۳. نتایج و بحث

پس از بررسی‌های لازم، ابتدا ژن زیر واحد A (واجد جهش نقطه‌ای در سه لوکوس E167Q, A231D, G234E طراحی گردید. سپس وکتور بیانی pET 28a حامل ژن صنعتی فوق تهیه و پلاسمید pET28a-stxA بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی گردید (شکل ۱). صحت توالی ژن جهش یافته با استفاده از تعیین توالی مورد تایید قرار گرفت. علیرغم انجام فرایند بهینه سازی، و تغییر در اندازه سه کمیت زمان، دما و میزان ماده القاء‌کننده، نتیجه‌ی بیان اولیه ژن صنعتی StxA جهش یافته، برای تمام نمونه‌های حاصل از تاریختی منفی شد. این در حالی است که نتایج واکنش PCR با استفاده از پلاسمید تخلیص شده از همین نمونه‌ها مثبت بود (شکل ۲).



شکل ۵. بررسی پروتئین StxA تخلیص شده با ستون نیکل به روش

واسرشتی و شیب pH بر روی ژل SDS-PAGE

ستون ۱- مارکر وزن مولکولی پروتئینی فرمنتاز

ستون ۲- خروجی ستون (flow): بافر B واجد اوره ۸ مولار با pH=8

ستون ۳ تا ۵- خروجی ستون (Wash سه بار) بافر C واجد اوره ۸ مولار با pH=6.3

ستون ۶- خروجی ستون (بافر جداکننده ۱): بافر D واجد اوره ۸ مولار با pH=5.9

ستون ۷- خروجی ستون (بافر جداکننده ۲): بافر E واجد اوره ۸ مولار با pH=4.5

ستون ۸- خروجی ستون با بافر MES

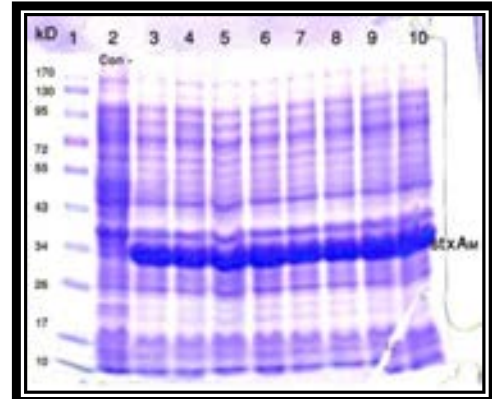


شکل ۶. وسترن بلات پروتئین تخلیص شده بیانی StxA جهش یافته با

آنتی بادی ضد 6His

۴. نتیجه گیری

تاکون گزارشات فراونی پیرامون تولید پروتئین نوترکیب با کاندید واکسن علیه شیگاتوکسین ارائه شده است. پیش از این پروتئین نوترکیب واجد جهش A231D- G234E (مسیر دوم با کاهش ۳۰۰ برابری سمیت) و در مورد دیگر واجد جهش E167Q (مسیر سوم با کاهش ۲۰۰ برابری سمیت) به عنوان کاندیدهای مناسب علیه شیگاتوکسین معرفی شده بودند. در این مطالعه طراحی ژن با هر سه جهش فوق به صورت هم‌زمان صورت گرفت و پیش‌بینی



شکل ۳. بررسی پروتئین بیانی pET28a-StxA بر روی ژل SDS-

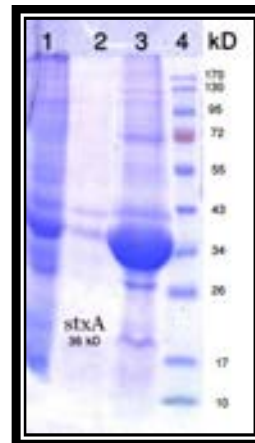
PAGE

ستون ۱- مارکر وزن مولکولی پروتئینی فرمنتاز ستون ۲- کنترل منفی (تکرار نمونه ستون ۳ بدون ماده القاء کننده IPTG) ستون ۳ تا ۱۰- بیان پروتئین stxA جهش یافته با وزن حدود ۳۶ کیلو دالتون در ۸ کلنی مثبت ترازبختی.

تبدیل درصد بالایی از این پروتئین نامحلول به پروتئین محلول با استفاده از بافر حاوی اوره ۸ مولار صورت پذیرفت.

پس از گذراندن آن از ستون نیکل به روش واسرشتی و فرآورده‌های خروجی آن جمع آوری گردید. مشاهده پروتئین بیانی حاصل بر روی ژل SDS-PAGE، نشان‌دهنده تخلیص نسبی این پروتئین می‌باشد (شکل ۵).

همچنین نتیجه‌های وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی ضد His Tag تایید کننده صحت پروتئین بیانی StxA جهش یافته واجد دنباله 6His می‌باشد (شکل ۶).



شکل ۴. بررسی حلالیت پروتئین بیانی StxA جهش یافته بر روی SDS-PAGE

ستون ۱- پروتئین تام باکتری نوترکیب بعد از القاء. ستون ۲- پروتئین تام باکتری نوترکیب بعد از سونیکیت و سانتریفیوژ (محلول رویی). ستون ۳- پروتئین تام باکتری نوترکیب بعد از سونیکیت و سانتریفیوژ (رسوب باقی‌مانده حاوی اجسام توده‌ای). ستون ۴- مارکر وزن مولکولی پروتئینی فرمنتاز

- [5] Abuhammour, M. D.; Glenn, M. F. "Shigella Infection."; *Medicine* 2002, 3, 302-308.
- [6] "Practice Guideline: Acute Diarrhea"; World Gastroenterology Organization, March 2008.
- [7] Shantini, D. G. "Shiga Toxin-Encoding Phage from *Escherichia Coli* O157:H7 Interactions with non-Pathogenic *E. Coli* and Implications for Toxin Production."; Thesis University of CinCinnati, 2004.
- [8] Ghosh, R. N.; Mallet, W. G.; McGraw, T.; Maxfield, F. R. "An Endocytosed TGN38 Chimeric Protein is Delivered to the TGN After Trafficking Through the Endocytic Recycling Compartment in CHO Cells."; *J. Cell Biology* 1998, 142, 923-936.
- [9] Goguen, J. "Listeria, Shigella, E. coli, Salmonella."; *J. Bacteriol.* 2003, 5, 220 – 228.
- [10] Hurley, B. P.; Thorpe, C. M.; Acheson, D. "Shiga Toxin Translocation Across Intestinal Epithelial Cells Is Enhanced by Neutrophil Transmigration."; *Infect Immun.* 2001, 69, 6148- 6155.
- [11] Suhan, M. L.; Hovde, J. "Disruption of an Internal Membrane- Spaning Region in Shiga Toxin 1 Reduces Cytotoxicity."; *Infect Immun.* 1998, 66, 5252- 5259.
- [12] Sandvig, K.; Deurs, B. "Transport of Protein Toxins into Cells: Pathways Used by Ricin, Cholera Toxin and Shiga Toxin."; *J. Cell Biology* 2002, 52, 49-53.
- [13] Obrig, J. T. "Shiga Toxin Mode of Action *E. coli* O157: Disease."; *J. Immunol.* 1977, 18, 775 – 779.
- [14] Kay, S. A.; Louise, C. B.; Boyd, B.; Lingwood, C. A.; Obrig, T. "Shigatoxin-Associated Hemolytic Syndrome: Interleukin-1 Beta Enhancement of Shiga Toxin Cytotoxicity Toward Human Vascular Endothelial Cells *In vitro.*"; *Infect Immun.* 1993, 61, 3886- 3891.
- [15] Jung, K. S.; Carolyn, J. "Shiga Toxin Attacks Bacterial Ribosome's as Effectively as Eukaryotic Ribosome's."; *J. Biochemistry* 1998, 37, 9394- 9398.
- [16] Brown, J. E.; Rothman, S. W.; Doctor, B. P. "Inhibition of Protein Synthesis in Intact Hela Cells by *Shigella Dysenteriae* 1 Toxin."; *Infect Immun.* 1980, 29, 98-107.
- [17] Alto, N. M.; Shao, F.; Lazar, C. S.; Brost, R. L.; Chua, G.; Mattoo, S.; McMahon, S. A.; Ghosh, P.; Hughes, T. R.; Boone, C.; Dixon, J. E. "Identification of a Bacterial Type III Effector Family with G Protein Mimicry Functions."; *Cell.* 2006, 13, 124, 133-45..
- [18] Sandvig, K. "Shiga Toxins."; *Toxicon.* 2001, 39, 1629 – 1635.
- [19] Blanco, J.; Blanco, M.; Mora, A. "Production of Toxins (Enterotoxin, Verotoxin, and Necrotoxins) and Colicins by *E. coli* Strains Isolated from Septicemic and Healthy Chickens Relationship with *In vivo* Pathogenicity."; *J. Clin Microbiol.* 1997, 35, 2953- 2957.
- [20] Gerald, T.; Jacewicz, M. "The Pathogenesis of *Shigella* Diarrhea V. Relationship of Shiga Enterotoxin, Neurotoxin, and Cytotoxin."; *J Infect Dis.* 1975, 131, S33-S39.
- [21] Lafont, F.; Nhieu, G. T.; Hanada, K.; Sansonetti, P. "Initial Steps of *Shigella* Infection Depend on the Cholesterol Sphingolipid Raft- Mediated CD44 – IpaB Interaction."; *J. EMBO.* 2002, 21, 4449- 4457.
- [22] Brown, J.; Griffin, E.; Rothman, W. "Purification and Biological Characterization of Shiga Toxin from *Shigella Dysenteriae* 1."; *Infect Immun.* 1982, 36, 996- 1005.
- [23] Min, Y. U.; David, B. H. "Shiga Toxin Is Transported from the Endoplasmic Reticulum Following Interaction with the

می‌شود، کاهش تصاعدی اثر سمیت پروتئین بیانی حاصل، توقع دور از انتظاری نباشد. که البته بررسی‌های ایمنی‌زایی آن، روشن‌کننده این فرضیه خواهد بود.

آن‌چنان که در نتایج مشاهده گردید بررسی مکرر بیان نمونه‌های حاصل از تراریختی مرحله اول برای *stxA* جهش یافته منفی گردید ولی بنا به یک روش کاملاً تجربی، ضمن پاساژ مجدد یکی از این نمونه‌ها بر روی محیط جامد، بیان برای تمام کلنی‌های تک حاصل از پلیت اخیر مثبت گردید..

علیرغم تغییر کمیت‌های سه‌گانه زمان و دما و میزان ماده القاء کننده، پروتئین بیانی *StxA* جهش یافته به‌طور کامل به‌صورت انکلوژن بادی بوده و تخلیص آن به وسیله ستون نیکل و با روش واسرشتی به‌طور نسبی خوب بود. مشاهده باند اختصاصی این پروتئین در وسترن بلات در مقایسه نمونه کنترل منفی تایید کننده صحت این پروتئین می‌باشد. علاوه بر این، ادامه مطالعه پیرامون روند بهینه‌سازی روش تخلیص و در نهایت بررسی‌های ایمنی‌زایی پروتئین حاصل در حیوان، در حال انجام است. که پس از تکمیل، نتیجه‌های حاصله در گزارش‌های بعدی ارائه خواهد شد. در این مطالعه آزمایشات فراوانی با استفاده از روش‌های متعدد جهت بیان و بهینه‌سازی و تخلیص *StxA* جهش یافته انجام گردید. اگرچه بررسی دیگر روش‌های تخلیص همچنان در حال اجراست و تداوم دارد، ولی به نظر می‌رسد انجام پیشنهاد زیر همساز سازی ژن *stxA* جهش یافته از pET28a به pET32a حصول به پروتئین بیانی در شکل محلول را نیز فراهم آورد.

۵. تشکر و قدردانی

از مشاوره‌های پروفیسور Panda. KA از دانشگاه دهلی در کشور هند، دکتر میر لطیف موسوی از دانشگاه شاهد و دکتر علی هاتف سلمانیان از پژوهشگاه ملی ژنتیک و همچنین از کمک‌ها و حمایت‌های سازمان بسیج علمی کشور تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

۶. مراجع

- [1] Kim, S. H.; Lee, S. R.; Kim, K. S.; Ko, A.; Kim, E.; Kim, Y. H.; Chang, K. T. "Shiga Toxin A Subunit Mutant Of *Escherichia Coli* O157:H7 Releases Outer Membrane Vesicles Containing The B-Pentameric Complex."; *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010, 58, 412-420.
- [2] Oludare, O.; Dequina, N.; Hiroshi, Y.; William, L." AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable."; *Toxins.* 2010, 2, 1612-1645.
- [3] Jia, C. C.; Xiao, P. L.; Miguel, R.; Juan, P.; Ballesta, N. E. "Shiga Toxin 1 is More Dependent on the P Proteins of the Ribosomal Stalk for Depurination Activity than Shiga Toxin 2."; *Biochem & Cell Biology.* 2011, 43, 1792-1801.
- [4] Clemens, J.; Kotloff, K.; Kay, B. "Generic Protocol to Estimate the Burden of *Shigella* Diarrhoea and Dysenteric Mortality."; Geneva. WHO. TextBook, 1999.

- and Its Derivatives."; Iran J. Allergy Asthma Immunology 2008, 7, 53-60.
- [32] Sharon, X.; Wen, L. D.; Teel, N.; Judge, A.; Alison, D. O. "A Plant-Based Oral Vaccine to Protect Against Systemic Intoxication by Shiga Toxin Type 2."; PNAS 2006, 103, 7082-7087
- [33] Michelle, L. S.; Carolyn, J. H. "Disruption of an Internal Membrane-Spanning Region in Shiga Toxin 1 Reduces Cytotoxicity."; Infect Immun. 1998, 66, 5252-5259
- [34] Indira, B.; Witold, A. F.; Diana, M. S.; Carolyn, J. H. "Antiviral Activity of Shiga Toxin Requires Enzymatic Activity and Is Associated with Increased Permeability of the Target Cells."; Infect Immun. 2003, 71, 327-334
- [35] Satoshi, I.; Hirofumi, D. "Protection Against Shiga Toxin1 Challenge by Immunization of Mice with Purified Mutant ShigaToxin1."; Infect Immun. 2003, 71, 3235-3239
- [36] Singh, S. M.; Panda, A. K. "Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins."; J. Biosci. Bioeng. 2005, 99, 303-310.
- [37] Thatcher, D. R.; Hitchcock, A. "Protein Folding Biotechnology in Mechanisms of Protein Folding In: PAIN, R. H. ed. Mechanism of Protein Folding, Oxford University Press, 1994, 229-261.
- [38] Wingfield, P. T.; Palmer, I.; Liang, S. M. "Folding and Purification of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from Escherichia Coli."; Current Protocols in Protein Science, 1, 6.5.1-6.5.27, 1995.
- [39] <http://www.qiagen.com/products/protein/purification/qiaexpress-protein-purification-sys>.
- [40] Crowther, J. R. "Eliza Theory and Practice."; Publication, Totowa, NJ. Country of Publication, USA, 1995.
- [41] Bollage, D. M.; Michel, D. R.; Edeststein, S. J. "Protein Method."; New York: Wiley-Liss, 45- 55, 143-160, 1996.
- [42] "Shiga Taxied Chimeric Proteins."; US Patent Application, 20090226469.
- Luminal Chaperone HEDJ/ERdj3."; Infect Immun. 2005, 73, 2524-2532.
- [24] Cherla, R. P.; Sang, Y. L.; Tesh, V. "Shiga Toxins and Apoptosis."; J. Microbiol. 2003, 228, 159 - 166.
- [25] Mari, O.; Masafumi, Y.; Chikako, T. Y.; Yuki, Y. T.; Hiroshi, K. "Nontoxic Shiga Toxin Derivatives from Escherichia Coli Possess Adjuvant Activity for the Augmentation of Antigen-Specific Immune Responses via Dendritic Cell Activation."; Infect Immun. 2005, 73, 4088-4097
- [26] Levine, M. M. "Current Status of Shigella Vaccine Development."; IVR Global Vaccine Research from University of Maryland School of Medicine, Salvador, Brazil.
- [27] Benoit, O. A.; Vingert, L. F.; Protul, S.; Yu, C. L.; Ludger, J.; Eric, T. "B Subunit of Shiga Toxin-Based Vaccines Synergize with-Galactosylceramide to Break Tolerance Against Self Antigen and Elicit Antiviral Immunity."; J. Immunol. 2007, 179, 3371-3379
- [28] Benoit, O. A.; Delphine, P.; Steffen, J.; Protul, S. "The Shiga toxin B-Subunit Targets Antigen *in vivo* to Dendritic Cells and Elicits Anti-Tumor Immunity."; Eur. J. Immunol. 2006, 36, 1124-35.
- [29] Paola, M.; Thomas, P. G.; George, L.; Mulvey, G.; Armstrong, D. "Recombinant Shiga Toxin B Subunit-Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccine Protects Mice from Shiga Toxemia."; Infect Immun. 2005, 73, 6523-6529
- [30] Creydt, V. P.; Miyakawa, M. F.; Martín, E.; Zotta, C. S.; Ibarra, C. "The Shiga Toxin 2 B Subunit Inhibits Net Fluid Absorption in Human Colon and Elicits Fluid Accumulation in Rat Colon Loops."; Infect Immun. 2004, 37, 799-808
- [31] Oloomi, M.; Bouzari, S.; Ajdary, S. "Immune Responses of Mice Immunized with Active Recombinant Shiga Toxin

Archive