**مجله میکرب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۶ شماره ۹ ، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۱۱-۷**

# کلون و بیان پروتئین نوترکیب ۲۸ کیلودالتونی غشا خارجی بروسلا ملیتنسیس

زهرا آذرنیاد[۱]، اشرف محبتی مبارز[۲]، بهمن تبرایی[۳]، نیما خرم آبادی[۲]، هانیه آقا بابا[۲]
امیر بختیاری[۱]، مهدی نجاتی[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی کرج، گروه میکروبیولوژی ۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی، ۳- انستیتو پاستور ایران، بخش واکسن سازی

زهرا آذرنیاد- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد میکروبیولوژی. دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی
leila5azimi@gmail.com

اشرف محبتی مبارز. Ph.D . میکروب شناسی پزشکی. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
mmmobarez@modares.ac.ir

بهمن تبرایی. Ph.D . . میکروبیولوژی. انستیتو پاستور ایران، بخش واکسن سازی
bahmantabaraie@yahoo.com

نیما خرم آبادی. دانشجوی دکترا باکتریولوژی. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
nima.khoramabadi@gmail.com

نیما خرم آبادی. دانشجوی دکترا باکتریولوژی. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
nima.khoramabadi@gmail.com

امیر بختیاری. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک. دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی
bakhtiyariam@yahoo.com

مهدی نجاتی. دکترای بیوتکنولوژی. انستیتو پاستور ایران، بخش واکسن سازی. mehnej@yahoo.com

نویسنده مسئول: دکتر اشرف محبتی مبارز. mmmobarez@modares.ac.ir تلفن: ۸۲۸۸۳۸۶۲ فکس: ۸۲۸۸٤٥٥٥ مقاله با همکاری همه مولفان تهیه، خوانده و تایید شده است.

**چکیده**

**زمینه و اهداف:** بروسلوز یک بیماری زئونوز بوده و در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران بعنوان بیماری بومی محسوب می شود. کنترل این بیماری وابسته به پیشگیری از موارد جدید بیماری و تشخیص بیماری می باشد. بررسی آنتی ژنهای مختلف و فاکتورهای بیماریزای سلول بروسلا، در پیشبرد اهداف پیشگیری، تشخیص و ریشه کنی این بیماری دارای اهمیت بالایی می باشد. در این تحقیق، پروتئین نوترکیب ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی (Omp28) بروسلا ملیتنسیس مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش بررسی:** ابتدا ژن ۲۸کیلودالتونی نوترکیب (Omp28) بروسلا ملیتنسیس با آنزیم پرایم استار[۲۱] تکثیر و سپس درون وکتور pJET1.2 کلون شده و تعیین توالی گردید. ژن پروتئین هدف(Omp28) از وکتور پلاسمیدی که مورد تایید قرار گرفته وبوسیله آنزیم های محدودالاثر طراحی شده، روی پرایمر ها خارج و در وکتور بیانی pET28a(+)

1. Primestar®HS DNA polymerase

Archive of SID
www.SID.ir

کلون شد. پلاسمید حاوی ژن پروتئین هدف، در سویه *اشرشیا کلای بی ال ۲۱ (دی ای ۳)*[1] ترانسفورم شد و تولید پروتئین نوترکیب با آی پی تی جی[2] القا و با روش اس دس اس – پیج[3] تایید شد.

**یافته ها**: پس از واکنش زنجیره ای پلیمراز ، ژل الکتروفورز ۱٪ تکثیر ژن پروتئین ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی(Omp28)را با سایز مناسب تایید نمود. ترانسفورماسیون وکتورهای کلون شده در دو میزبان *اشرشیا کلی دی اچ پنج آلفا و اشرشیا کلی بی ال ۲۱ (دی ای ۳)*نیز با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز از روی کلونی ها مورد تایید قرارگرفت. بیان پروتئین نوترکیب ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی(rOmp28) *بروسلا ملیتنسیس* با وزن مولکولی صحیح در میزبان *اشرشیا کلی بی ال ۲۱* انجام گرفته است. این پروتئین می تواندیک آنتی ژن مناسب برای تحقیقات واکسن و تشخیص سرولوژیک باشد.

نتیجه گیری: با تخلیص نوترکیب حاصله و ارزیابی ایمنی زایی آن می توان از آن به عنوان یک کاندید واکسن استفاده نمود

کلمات کلیدی: بروسلا ملیتنسیس، پروتئین ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی، کلونینگ، بیان

Archive of SID

2. *E. coli BL21 (DE3)*
3. IPTG
4. SDS-PAGE
5. PCR
6. *E. coli DH5α*

www.SID.ir

## مقدمه

بروسلا کوکوباسیل گرم منفی، بدون اسپور، کپسول و فاقد حرکت که درون سلولی است (۲, ٤). این باکتری توانایی بقا درون سلولهای فاگوسیت کننده میزبان را داراست و پس از ورود و فاگوسیته شدن در کبد، طحال و مغز استخوان جایگزین می شود ومی تواند بوسیله خون به سایر ارگانها مانند قلب، کلیه، مفاصل، سیستم اعصاب مرکزی و دستگاه تناسلی برده شود (۱, ٦). بروسلوز اساسا بیماری حیوانات و خصوصا دامها می باشد که تحت شرایطی به انسان منتقل می شود، بنابراین کنترل و پیشگیری از آن بدلیل ضررهای اقتصادی-اجتماعی فراوان ناشی از آن و بومی بودن در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران دارای اهمیت زیادی می باشد (۳). بنابراین، با توجه به اهمیت بروسلوز و در دسترس نبودن واکسن انسانی و نیز نیاز به طراحی و تولید واکسن های مؤثرتر دامی، شناخت و ارزیابی پروتئین ها و انواع ترکیبات آنتی ژنیک جدید ضروری می باشد.

یکی از انواع آنتی ژنهای قابل بررسی بروسلا، پروتئینهای سطحی آن ، خصوصا پروتئین های غشا خارجی است. از آنجا که پروتئین ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی( Omp28) بروسلا دارای خاصیت آنتی ژنیک می باشد، (۵) بنابراین در این تحقیق، کلون و بیان پروتئین ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی(Omp28) بروسلا ملیتنسیس در ایشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روشها

توالی ژن پروتئین ۲۸ کیلو دالتونی غشا خارجی بروسلا ملیتنسیس از بانک ژنومی استخراج و از سایت نوازن نیز، نقشه ژنتیکی وکتورهای مورد نظر جهت کلونینگ و بیان استفاده گردید. با استفاده از توالی ژن پروتئین ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی( Omp28) پرایمر طراحی و برای تکثیر قطعه ژن مورد نظر از واکنش زنجیره ای پلیمراز و آنزیم پرایم استار (تاکارا) استفاده شد. پس از آن با استفاده از کیت استخراج از ژل(بایونیر، کره) قطعه ژن پروتئین مورد نظراز روی ژل آگاروز خالص گردید. برای انجام کلونینگ، ابتدا با استفاده از کیت کلون – پی جت قطعه ژن پروتئین ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی(Omp28) درون پلاسمید pJET1.2/blunt (وکتوری با انتهای کور) کلون گردید و پس از آماده سازی باکتری *اشرشیا کلی دی اچ پنج* $\alpha$، ترانسفورماسیون درون این باکتری با استفاده از روش شوک حرارتی انجام گرفت. غربالگری کلونی های رشد کرده روی پلیت ها، پس از ترانسفورماسیون با استفاده از روش کلونی _ پی سی آر انجام شد و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید(بایونیر، کره)، پلاسمیدهای کلون شده آنها تخلیص شد. در این مرحله جهت انجام کلونینگ در وکتور بیانی (+) pET28a، برای بدست آوردن پلاسمید بیانی بصورت خطی و قطعه ژن هدف، هر دو پلاسمید (+) pET28a و pJET1.2 مورد هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم های محدودالاثر قرار گرفتند. با داشتن پلاسمید و ژن پروتئین مورد نظر، واکنش الحاق ژن پروتئین هدف به پلاسمید (+) pET28a با استفاده از آنزیم تی چهار دی ان ای لیگاز انجام شد و سپس ترانسفورماسیون محصول الحاق(پلاسمید نوترکیب جدید) درون باکتری *اشرشیاکلی* سویه بیانی بی ال ۲۱ انجام گرفت.

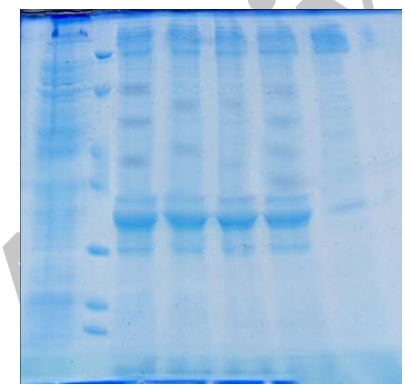
## یافته ها

در فاز بیوانفورماتیک ابتدا توالی پروتئین ۲۸ کیلودالتنی غشا خارجی بروسلا ملیتنسیس با ۷۵۳ جفت باز از بانک اطلاعات ژن استخراج شد و وکتورهای مورد نیاز جهت کلون و بیان پروتئین(وکتور کلونینگ pJET1.2 و وکتور بیانی(+) pET28a) انتخاب شدند و از نظر جایگاههای برش آنزیم های محدودالاثر بررسی شدند. طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن پروتئین هدف با استفاده از نرم افزار جین – رانر انجام گرفت. نتایج حاصل از تکثیر قطعه ژن پروتئین در دمای انیلینگ ٦۰ درجه سانتیگراد با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز و ژنوم باکتری بروسلا ملیتنسیس ١٦ ام روی ژل آگاروز ۱٪ مورد تایید قرار گرفت (شکل۱). صحت انجام کلونینگ در وکتور غیربیانی pJET1.2 و ترانسفورماسیون در باکتری *اشرشیا کلی* پلاسمیدهای حاوی قطعه ژن پروتئین هدف با انجام کلونی

Archive of SID

www.SID.ir

– پی سی آر با استفاده از پرایمر غیر اختصاصی و اختصاصی ژن پروتئین مورد نظر و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت. از طریق الکتروفورز، وکتور بیانی برش خورده و ژن پروتئین هدف جدا شده از وکتور کلونینگ از نظر اندازه قطعات تایید شدند. پس از واکنش الحاق، پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و کلونی – پی سی آر برای حضور ژن مورد نظر بررسی شدند. پس از انجام کلونینگ و ترانسفورماسیون در سویه بیانی *اشرشیا کلی* سویه های بیان کننده پروتئین ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی(Omp28) از نظر میزان بیان پروتئین هدف با روش اس دی اس مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل۲) و در نهایت، آنالیز پروتئین نو ترکیب خالص شده با روش وسترن بلات انجام گرفت (شکل۳).



شکل۱. مارکر. ۵-۲ نمونه ها

شکل۲. میزان بیان پروتئین هدف در٤ کلونی مختلف.

شکل۳. وسترن بلات

**بحث و نتیجه گیری**

بروسلوز بیماری مشترک بین انسان و دام در جهان مطرح است، اهمیت این بیماری واگیر دار در ضربه اقتصادی آن به صنعت دامپروری قابل توجه می باشد. تماس های مستقیم با حیوان آلوده یا مصرف شیر و محصولات لبنی آلوده باعث به خطر افتادن سلامت انسان می شود، بنابراین نیاز به تحقیقات بیشتر و واکسنهای جدید موثر و بی خطر در مورد بروسلوز حیوانی و انسانی وجود دارد.

بروسلا یک ارگانیسم داخل سلولی است و بقای عفونت به توانایی ارگانیسم در مقابله با مکانیسم های ایمنی میزبان و

www.SID.ir

توانایی بقا درون سلول های فاگوسیت می باشد. پروتئین های سطحی بروسلا تا حدی خاصیت ایمنی زایی دارند. تهیه پروتئین طبیعی بروسلا نیاز به کشت انبوه و خالص سازی پروتئین دارد که هم پروسه تولید بسیار مشکل و خطرآفرین است و هم میزان پروتئین های سطحی به حدی نسیت که خالص سازی فرم طبیعی آن به صرفه باشد. در اینجا برای بدست آوردن پروتئین مورد نظر از تکنیک نوترکیبی استفاده نمودیم که قادر است میزان بالایی از پروتئین را با هزینه کمتر در اختیار مابگذارد. در طراحی کلونینگ برای تخلیص پروتئین از استراتژی کروماتوگرافی با تمایل اتصال به یون نیکل استفاده شد. برای این منظور یک بخش حاوی ٦ هیستیدین در ساختار پروتئین تعبیه می شود. از آنجا که بخش C ترمینال پروتئین ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی(Omp28 ) اهمیت بیشتری در ایمنی زایی دارد، این بخش هیستیدینی که عامل اتصال با یون نیکل است در بخش انتهای آن طراحی شده است.

برای تولید پروتئین های نوترکیب وکتورهای پلاسمیدی متعددی وجود دارد که در تحقیقات مختلف که این پروتئین را به شکل نوترکیب تهیه نموده اند مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش از سیستم pET28a (+) استفاده نمودیم که ز نظر کارآمدی کلونینگ و تولید پروتئین نوترکیب سازگاری خوبی با پروتئین ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی(Omp28) داشته و از طرفی استفاده از آن در تجربیات مختلف نتایج قابل قبولی بدست آورده است. با توجه به نوترکیب بودن پروتئین مورد تحقیق و مزایای آن از نظر سهولت تولید و هزینه های پایین تر تولید نسبت به تولید پروتئین طبیعی، با استفاده از نتایج این تحقیق، به انجام بررسی ها وتحقیقات بیشتر در زمینه های مختلف از جمله بررسی توانایی تحریک پاسخ های سیستم ایمنی و انواع پاسخ های ایمنی ایجادی و ایجاد پاسخ خاطره ای وجود دارد. همچنین در صورت ایجاد پاسخ مناسب، استفاده از این پروتئین نوترکیب به همراه پروتئین های ایمنی زای دیگر و سایر ترکیبات ایمونوژن که مهمترین آنها لیپوپروتئین باکتری بروسلا می باشد می تواند در ادامه راه پژوهش ها کمک کننده باشد.

**رفرانس:**


1.Boschiroli ML, F.V., O'Callaghan D *Brucellosis: a worldwide zoonosis.* Curr Opin Microbiol, 2001. **4**: p. 58-64.

2.Corbel M J, a.M.n.I., *Brucellosis: an overview Emerg Infect Dis.* 1997 Apr-Jun. **3**(2): p. 213-21.

3.Godfroid J., K.A., *Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty - first century.* Vet. Microbio, 2002. **90**: p. 135-145.

4.Ko, J.S., G. A., *Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans.* Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(1): p. 65-78.

5.Lin J, F.T., *Protein synthesis in Brucella abortus induced during macrophage infection* Infect Immun 1995. **63**: p. 1409-14.

6.Mandell GL, B.J., Dolin R, *Brucella species.*, in *Principles and practice of infectious diseases.*, J.E.B. Gerald L. Mandell, Raphael Dolin, Editor. 2010, Natasha Andjelkovic: Churchill Livingston.


Archive of SID

www.SID.ir