مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۶ شماره ۹ ، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۱۹- ۱۲

کلون و بیان پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی بروسلا ملیتنسیس در اشریشیاکلی

لیلا عظیمی[۱] ،* اسماعیل اصلی[۱] ،اشرف محبتی مبارز[۲]، نیما خرم آبادی[۲] ناصر هرزندی[۱]
بهمن تبرایی[۱]، امیر بختیاری[۱]، هانیه آقابابا[۲]

۱.*دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
لیلا عظیمی. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد میکروبیولوژی. دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی
leila5azimi@gmail.com
اسماعیل اصلی. Ph.D. ایمونولوژی. دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی e.asli87@gmail.com
اشرف محبتی مبارز. Ph.D . میکروب شناسی پزشکی. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
mmmobarez@modares.ac.ir
نیما خرم آبادی. دانشجوی دکترا باکتریولوژی. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
nima.khoramabadi@gmail.com
ناصر هرزندی. Ph.D . میکروبیولوژی. دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی
nasharzan@yahoo.com
، بهمن تبرایی. Ph.D . . میکروبیولوژی. دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی
bahmantabaraie@yahoo.com
امیر بختیاری. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک. دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی
bakhtiyariam@yahoo.com
هانیه آقابابا. دانشجوش کارشناسی ارشد باکتریولوژی. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
h.Aghababa620@gmail.com
نویسنده مسئول: دکتر اسماعیل اصلی
Email: e.asli87@gmail.com
تلفن: ۰۹۱۲۱٤۹۷٥۹۱ – ۰۲٦۱٤٥۰۹۷۷۲ فکس:۰۲٦۱٤٥٥۲۱۹٤ نفر اول: لیلا عظیمی

مقاله با همکاری همه مولفان تهیه، خوانده و تایید شده است.

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز بیماری مشترک بین انسان و دام است که از لحاظ اقتصادی و بهداشتی دارای اهمیت می باشد. پیشگیری از موارد جدید بیماری در انسان و دام برای ریشه کنی بروسلوز لازم و ضروری است. از مهمترین روشهای پیشگیری استفاده از یک واکسن موثر و کم ضرر می باشد. برای این منظور باید اقدام به شناسایی و

Archive of SID
www.SID.ir

ارزیابی ایمونولوژیکی آنتی ژنهای مختلف سلول بروسلا نمود. هدف از این تحقیق کلون و بیان پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی[1] بروسلا ملی تنسیس می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ژن پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی بروسلا ملیتنسیس، کلون و بیان شد. ابتدا ژن مورد نظر با پرایمر های اختصاصی و آنزیم پرایم استار[2] تکثیر و در وکتور pJET1/2 کلون شد. قطعه هدف از وکتور تأیید شده بوسیله آنزیم های محدودالاثر طراحی شده روی پرایمر ها خارج و در وکتور pET28a (+) ساب کلون[3] گردید. پلاسمید حاوی ژن هدف، پس از تأیید در اشریشاکلی بی ال ۲۱(دی ای ۳)[4] ترانسفورم و تولید پروتئین نوترکیب با آی پی تی جی[5] ۱ میلی مولارالقا شد.

یافته ها: این ژن شامل ۳۲۹ اسید آمینه بود و محصول PCR نیز ۱۰۰۸ کیلو دالتون بود که نتایج اس دی اس- پیج و وسترن بلات نشان دهنده صحت کلونینگ و بیان پروتئین مورد نظر می باشد.

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

واژه های کلیدی: بروسلا ملیتنسیس، کلونینگ، پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی

1. BCSP31

2. Primestar®HS DNA polymerase

3. subclone

4. *E. coli* BL21 (DE3)

5. IPTG

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بروسلوز (تب مدیترانه ای، تب مواج) بیماری مشترک بین انسان و دام است که درسرتاسرجهان به لحاظ ضررهای اقتصادی که به جوامع وارد می کند مطرح می باشد(۱). واکسیناسیون یکی از راههای موثر و مطرح برای ریشه کنی بیماری بروسلوز می باشد، بنابراین شناسایی و ارزیابی آنتی ژنهای مختلف سلول بروسلا در پیشبرد مسیرهای جدید پیشگیری و تشخیص، نقش کلیدی دارند.

پروتئین های سطحی بروسلا همواره به عنوان آنتی ژن های مناسب جهت بررسی ایمنی زایی و تشخیص بروسلوز مطرح هستند. از این پروتئین ها به صورت نوترکیب برای بررسی ایمنی زایی در مدل موشی استفاده می شود (۳, ۸). نتایج به دست آمده از بررسی پروتئین های سطحی بروسلا تایید کننده نقش آنها در ایمنی زایی بر علیه این باکتری می باشد، در نتیجه تولید این گونه پروتئین ها به صورت نوترکیب می تواند در طراحی واکسنهای جدید حائز اهمیت باشد. بنابراین کلون و بیان این پروتئین ها به صورت نوترکیب می تواند در دست یابی به روش های نوین پیشگیری و تشخیص بروسلوز کارآمد واقع شود.

پروتئین ۳۱ کیلودالتونی سطحی (BCSP31) یک پروتئین ایمونوژن روی سطح سلول بروسلا می باشد که در تمام گونه ها و بیووارهای آن حفظ شده است (٤). در بررسی های انجام شده از پروتئین سطحی نوترکیب ۳۱ کیلودالتونی (BCSP31) برای تولید آنتی بادی های مونوکلونال استفاده شده است که این آنتی بادی ها می توانند در تشخیص گونه های بروسلا با اختصاصیت بالا استفاده شوند (٦).

هدف ما در این بررسی کلون و بیان این پروتئین در اشرشیاکلی بود.

مواد و روشها

گونه های باکتریایی، محیط کشت و شرایط رشد

بروسلا ملیتنسیس ۱٦ ام در این تحقیق استفاده شد. بروسلا بطور معمول روی محیط بروسلا آگار در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد.

ای کولای دی اچ ۵ آلفابعنوان میزبان غیر بیانی و ای. کولای بی ال ۲۱ بعنوان میزبان بیانی انتخاب شدند. گونه های ای. کولای در محیط لوریا–برتانی براث (ال بی) (لیوفیلکم) یا ال بی آگار کشت داده شدند. در مواقع لزوم آمپی سیلین به مقدار۵۰ میکرو گرم در لیتر (سیگما) و کانامایسین ،۳۰ میکرو گرم در لیتر به محیط مایع یا پلیت اضافه شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمراز

دی ان ای باکتریایی از کشت ۷۲ ساعته بروسلا ملیتینسیس ۱٦ ام استخراج شد (کیت بایونیر) منطقه ژنی کد کننده پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی بروسلا (پروتئین سطحی ۳۱ کیلو دالتونی) شامل ۹۹۰ زوج باز می باشد. پرایمرهای استفاده شده در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره۱: پرایمرهای استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمراز

پرایمر پیشرو	۵'ACTGGATCCATGAAATTCGGAAGCAAAATCC ۳'
پرایمر پیرو	۳'AATCTCGAGTTATTTCAGCACGCCCGCTTC ۵'

Archive of SID

www.SID.ir

پرایمر پیشرو دارای جایگاه برای آنزیم BamH1 و پرایمر پیرو دارای جایگاه برای آنزیم Xho1 می باشد (نوکلئوتیدهای علامت گذاری شده). طراحی پرایمرها بر اساس توالی ژن کد کننده پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی صورت گرفته است. ژن پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی با استفاده از آنزیم پرایم استار دی ان ای پلیمراز(تاکارا) تکثیر شد. ویژگی این آنزیم در قدرت غلط خوانی بالای آن می باشد. شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز انجام شده در جدول شماره ۲آورده شده است.

جدول شماره۲: شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز

۵-۳دقیقه	۹۸درجه سانتیگراد	دناتوراسیون
۱۰ ثانیه	۹۸درجه سانتیگراد	دناتوراسیون
۱۰ ثانیه	٦۰درجه سانتیگراد	آنیلینگ
۱ دقیقه	۷۲درجه سانتیگراد	طویل شدن
۱۰-۵ دقیقه	۷۲درجه سانتیگراد	طویل شدن

شرایط ذکر شده برای ۳۰ سیکل تنظیم شدند.

کلونینـــگ ژن پـــروتئین ســـطحی ۳۱ کیلودالتونی

قطعات ژنی پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی در پلاسمید pJET1/2 blont(کیت فرمنتاز) کلون شدند. ژن مورد نظر در جایگاهی از pJET1/2 blont وارد می شود که توالی eco47IR روی پلاسمید وجود دارد. این ویژگی باعث غربالگری بهتر و راحت تر پلاسمیدهای کلون شده میشود. پلاسمیدهای pJET1/2 نوترکیب حاصل با استفاده از روش شوک حرارتی وارد سلول های مستعد شده با کلرید کلسیم، *ای. کولای* دی اچ ۵ آلفا می شوند. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت (بایونیر) استخراج شده و بوسیله هضم آنزیمی و سکوانسینگ صحت کلونینگ تایید شد. ژن پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی از پلاسمید pJET1/2 خارج شده و در پلاسمید (نواژن) pET28 (+) که با آنزیم های محدود الاثر BamH1 و Xoh1 برش داده شده و به صورت خطی درآمده، کلون شد. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و واکنش زنجیره ای پلیمراز برای حضور ژن مورد نظر بررسی شدند.

بیان پروتئین ۳۱ کیلودالتنی سطحی ۳۱ در ای. کولای

پلاسمیدهای نوترکیب(+) pET28a وارد باکتری های مستعد شده ای. کولای بی ال ۲۱ ، به عنوان میزبان بیانی، شدند. بیان با استفاده از آی پی تی جی ۱ میلی مولار تحریک شد. میزان بیان هر ۱ ساعت پس از القا تا ٤ ساعت متوالی بررسی شد. سلول های القا شده با کمک ژل

Archive of SID

www.SID.ir

کوچک اس دی اس- پیج آنالیز شدند. ژل پلی آکریل آمید جدا کننده ۱۲/۵٪ استفاده شد (بایو-رد). نمونه ها بویسله بافر نمونه که حاوی ۱۰ میلی لیتر بافر ژل متراکم کننده، ۵ میلی لیتر گلیسرول، ۱ گرم اس دی اس ، ۰/۲ میلی لیتر محلول بروموفنل ۰/۵٪ در اتانل و ۱ میلی لیتر ۲-مرکاپتواتانل که با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی لیتر رسیده است، آماده شدند. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شده و نهایتا ۲۰ میکرو لیتر از هر نمونه روی ژل بررسی شد. پس از آماده شدن ژل، رنگ آمیزی با کوماسی بلو جی-۲۵۰ انجام گرفت.

آنالیز پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلات

پروتئین ها از طریق تانک الکتروبلاتینگ با استفاده از بافر تریس/گلاسیسن و ۲۰٪ متانول از ژل پلی آکریل آمید به غشای نیتروسلولز منتقل شدند. مناطق غیر اختصاصی با توین ۲۰ (۰/۱-۰/۰۵٪) بلوکه شدند. غشا ها ۳مرتبه بوسیله بافر نمکی تریس حاوی توئین۲۰ شسته شده و سپس ۱ تا ۲ ساعت در آنتی بادی (آنتی-٦-هیستگ کانجوگه با پراکسیداز) قرار گرفتند. مجددا غشاها ۳ مرتبه با بافر نمکی تریس حاوی توئین۲۰ شسته شده و سپس درون محلول دب/آب اکسیژنه (۵ میلی گرم در میلی لیتر) و پراکسیدهیدروژن ۱٪ در بافر نمکی تریس که سوبسترای آنزیم پراکسیداز می باشد، قرار داده شدند. با مشاهده نوار قهوه ای رنگ، غشای نیتروسلولز را درون آب استریل وارد کرده تا بدین وسیله واکنش آنزیمی متوقف گردد. پس از خشک شدن کامل غشای نیتروسلولزی، نتیجه واکنش که همان نوار قهوه ای رنگ است قابل مشاهده و بررسی می باشد.

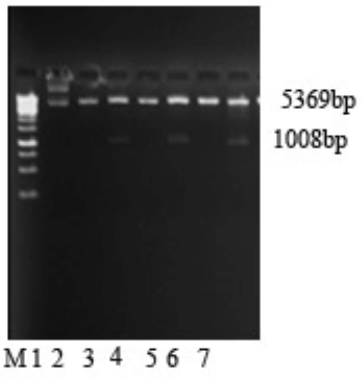
نتایج

دی ان ای ژنومی استخراج شده از بروسلا ملیتنسیس ١٦ ام بعنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلیمراز با آنزیم پرایم استاردی ان ای پلیمراز استفاده شد و نتایج با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. وجود یک تک باند با وزن مولکولی صحیح نشان دهنده صحت واکنش زنجیره ای پلیمراز بود.

کلونینگ ژن پروتئین سطحی ۳۱ بروسلا ملیتنسیس ١٦ ام و غربالگری پلاسمیدهای نوترکیب pJET1/2 با بهره گرفتن از هضم آنزیمی و سکوانسینگ انجام شد.

ژن پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی از پلاسمیدهای pJET1/2 با نتیجه مثبت غربالگری، خارج شد و در پلاسمید pET28a (+) ساب کلون گردید. صحت کلونینگ، پلاسمیدهای نوترکیب به روش هضم آنزیمی (شکل ۱) و کلنی پی سی آر صورت گرفت.

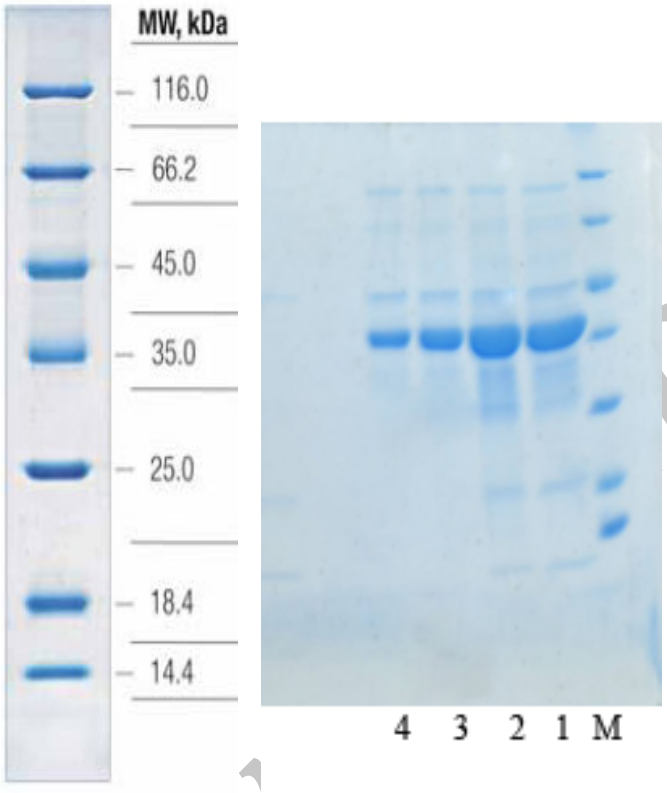
بیان پروتئین سطحی ۳۱ در ای کولای. بیان باکتری های تحریک شده با آی پی تی جی۱ میلی مولار، هر ۱ ساعت پس از القا به روش اس دی اس- پیج کنترل شد. این کار برای تا ٤ ساعت بعد از القا انجام شد (شکل ۲)و با وسترن بلات تایید گردید (شکل ۳) .



شکل ۱ . هضم تک آنزیمی و دوگانه با انزیم های محدودالاثر پلاسمید وترکیب pET28a (+). (ام: مارکر ۱کیلو زوج بازی. ۱: پلاسمید وترکیب pET28a (+) بدون هضم آنزیمی۲. ،٤و٦: پلاسمید وترکیب pET28a (+) با هضم تک آنزیمی۳. ،٥و۷: پلاسمید وترکیب pET28a (+)با هضم دو گانه)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. ام: مارکر، ۱: ساعت اول، ۲ک ساعت دوم، ۳: ساعت سوم و ٤: ساعت چهارم.

شکل۳. وسترن بلات پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

بروسلوز بیماری مشترک بین انسان و دام است که علاوه بر انسان طیف وسیعی از دام ها و نیز حیوانات وحشی را درگیر می کند. اهمیت این بیماری واگیر دار در ضربه اقتصادی آن به صنعت دامپروری است (۹).

یکی از راههای نوین پیشگیری و تشخیص بروسلوز، مطالعه آنتی ژن های مختلف بروسلا می باشد. در این راستا پروتئین های سطحی این باکتری اهمیت ویژه ای از نظر ایمنی زایی دارد. یکی از راههای تهیه این پروتئین های سطحی استفاده از فرم نوترکیب آنها می باشد.

برای تولید پروتئین های نوترکیب وکتورهای پلاسمیدی متعددی وجود در این روش از سیستم pET28a (+) استفاده نمودیم که از نظر کارآمدی کلونینگ و تولید پروتئین نوترکیب سازگاری خوبی با پروتئین ما داشته است.

در این تحقیق با کنترل بیان پروتئین ها مشاهده شد که وزن مولکولی پروتئین سطحی از ۳۱ به ۳۵ کیلودالتن تغییر کرد که به خاطر اضافه شدن نوکلئوتیدها برای جایگاه برش آنزیم های محدودالاثر به ابتدای پرایمرها می باشد. از طرفی بهترین بیان در ساعت سوم و چهارم دید شد.

در تحقیقات ان- کا- ماهاجان که پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی (BCSP31) را بصورت طبیعی استخراج شده است مقدار این پروتئین کم بوده و باند نازکی را روی پیج الکتروفورز نشان داده است (۷) ولی در این تحقیق که پروتئین بصورت نوترکیب تولید گردید، مقدار پروتئین بیشتر بوده که نتایج اس دی اس _ پیج تاید کننده این مهم می باشد.

در مطالعه این پروتئین بصورت نوترکیب از وکتور pGEX-4T-1 نیز استفاده شده است (۲) ولی طبق تحقیقات انجام شده این پروتئین با وکتور بیانی pET28a (+) سازگاری بهتری دارد که در اینجا ما از این وکتور استفاده کردیم.

در این مطالعه تولید پروتئین نوترکیب با موفقیت انجام گرفت و صحت نتایج با بهره گرفتن از اس دی اس-پیج و وسترن بلات تایید شد. این پروتئین نوترکیب، پتانسیل استفاده برای بررسی ایمنی زایی و همینطور تشخیص بروسلوز را در تحقیقات آینده دارا می باشد.

نتیجه گیری

تولید پروتئین نوترکیب با موفقیت انجام گرفت و صحت نتایج با بهره گرفتن از اس دی اس-پیج و وسترن بلات تایید شد. این پروتئین نوترکیب، پتانسیل استفاده برای بررسی قدرت ایمنی زایی و همینطور تشخیص بروسلوز را در تحقیقات آینده دارا می باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از تمامی اساتید و دوستان عزیزم در دانشگاه آزاد کرج و دانشگاه تربیت مدرس که در انجام این پروژه من را همراهی کردند.

منابع

1.Bounaadja, L., D. Albert, B. Chenais, S. Henault, M.S. Zygmunt, S. Poliak, and B. Garin-Bastuji, *Real-time PCR for identification of Brucella spp.: a comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes.* Vet Microbiol, 2009. **137**(1-2): p. 156-64.

2.CAO Xiao-an, Q.C.-q., ZHOU Ji-zhang,LIN Guo-zhen, *High-Dissolved Expression of BCSP31 Gene of Brucella abortus in E. coli* Journal of Jilin Agricultural University, 2007.

3.Cassataro, J., S.M. Estein, K.A. Pasquevich, C.A. Velikovsky, S. de la Barrera, R .Bowden, C.A. Fossati, and G.H. Giambartolomei, *Vaccination with the recombinant Brucella outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against Brucella*

Archive of SID

www.SID.ir

melitensis infection. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8079-88.
4.Goldbowm F A, V.C.A., and Baldi P C, *The 18-kDA cytoplasmic protein of Brucella species-an antigen usefull for diagnosis-is a lumazine synthease.* J Med Microbiol, 1999: p. 833-9.
5.Guilloteau, L.A., K. Laroucau, N. Vizcaino, I. Jacques, and G. Dubray, *Immunogenicity of recombinant Escherichia coli expressing the omp31 gene of Brucella melitensis in BALB/c mice.* Vaccine, 1999. **17**(4): p. 353-61.
6.J.Corbe, l.M., *Brucellosis: an overview.* . Emerg Infect Dis, 1997.
7.Mahajan, N.K., R.C. Kulshreshtha, G. Malik, and J.P. Dahiya, *Immunogenicity of major cell surface protein(s) of Brucella melitensis Rev 1.* Vet Res Commun, 2005. **29**(3): p. 189-99.
8.Tibor, A., V. Wansard, V. Bielartz, R.M. Delrue, I. Danese, P. Michel, K. Walravens, J. Godfroid, and J.J. Letesson, *Effect of omp10 or omp19 deletion on Brucella abortus outer membrane properties and virulence in mice.* Infect Immun, 2002. **70**(10): p. 5540-6.
9.Wikipedia, *Brucella* in *Brucella*۲۰۰۸

Archive of SID

www.SID.ir