Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 4 (02-2016)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Cloning, expression and purification of *Pseudomonas aeruginosa* pilin protein in the prokaryotic host

Fatemeh Korpi[1], Bahador Behrouz[2], Mohmmad Motameifar[3] and Gholamreza Irajian[1]

1. Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. Department of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Bacteriology and Virology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Article Information

Article history:
Received: 2015/07/29
Accepted: 2015/12/12
Available online:2016/01/10

Article Subject:
Microbial Biotechnology

IJMM 1394; 9(4): 55-62

Corresponding author at:
Dr Gholamreza Irajian

Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Tel:
+98 21 88058649
Email:
m.hg52@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains produce polar pili has required for motility, adhesion, and invasion. The main aims of the present study are to identify, clone, express and purify the recombinant pilin protein of *P. aeruginosa* in the prokaryotic host.

Materials and Methods: The recombinant pilin gene (*pilA*) was isolated from *P. aeruginosa* PAO1 strain by PCR and cloned into pET-22b vector. The recombinant plasmid was subsequently verified by restriction analysis, and DNA sequencing. The recombinant vector was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain, then the recombinant pilin overexpressed and affinity purified by Ni-NTA agarose-affinity chromatography.Western blot analysis was performed using anti-6His tag antibody.

Results: The PCR and enzymatic digestion results showed the accuracy of the *pilA* gene cloning. The protein electrophoresis showed that the molecular weight of recombinant pilin is about 19 kDa. Western blot analysis also confirmed the production of recombinant protein. The amount of produced protein was measured by the direct spectrophotometery method, which was 2.58 mg/mL.

Conclusions: Western blot and ELISA results along with that of sequencing ensure accurate production of recombinant pilin, retaining its partial epitopes.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa* pilin protein, Cloning, Expression.

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Korpi F, Behrouz B, Motameifar M, Irajian G. Cloning, expression and purification of Pseudomonas aeruginosa pilin protein in the prokaryotic host. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :55-62

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۹ – شماره ۴– زمستان ۱۳۹۴
Journal homepage: www.ijmm.ir

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین پیلین *سودوموناس آئروژینوزا* در میزبان پروکاریوتی

فاطمه کرپی[۱]، بهادر بهروز[۲]، محمد معتمدی فر[۳]، غلامرضا ایراجیان[۱]

۱.گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران ، تهران ، ایران.
۲.گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران ، ایران.
۳.گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت:۱۳۹۴/۰۵/۰۷
پذیرش:۱۳۹۴/۰۹/۲۱
انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۱۰/۲۰
موضوع:
بیوتکنولوژی میکروبی
IJMM 1394; 9(4): 55-62

نویسنده مسئول:
دکتر غلامرضا ایراجیان
گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران.
تلفن: ۰۲۱۸۸۰۵۸۶۴۹
پست الکترونیک:
dr.irajain@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: سویه های پاتوژن *سودوموناس آئروژینوزا* پیلی قطبی تولید می کند که برای تحرک، چسبندگی و تهاجم مورد نیاز است. هدف از این مطالعه تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب پیلین می باشد.

مواد و روش ها: ژن کد کننده پیلین (*pilA*) از سویه PAO۱ سودوموناس آئروژینوزا با بوسیله PCR جدا گردید و در وکتور بیانی pET-22b کلون شد. تایید ساختار وکتور نوترکیب به وسیله ی هضم آنزیمی دوگانه و تعیین توالی صورت گرفت. وکتور نوترکیب به داخلی باکتری E.coli BL21 (DE3) ترانسفورم شد و تخلیص پروتئین نوترکیب بوسیله کروماتوگرافی تمایلی انجام شد. آزمون وسترن بلات با استفاده از توسط آنتی بادی ضد پلی هیستیدنی انجام شد.

یافته‌ها: نتایج تعیین توالی و هضم آنزیمی صحت کلونینگ را تایید نمود. الکتروفورز پروتئین نشان داد که وزن مولکولی پروتئین نوترکیب پیلین حدود ۹۱ کیلودالتون می باشد. همچنین نتایج آزمون وسترن بلات تولید پروتین نوترکیب را تایید کرد. مقدار پروتئین تولید شده که به روش اسپکتروفتومتری مستقیم اندازه گیری شد که مقدار ان.۲/۵۸ میلی گرم به هر میلی لیتر تعیین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج وسترن بلات و الیزا به موازات نتایج تعیین توالی نشان دهنده صحت تولید پروتئین نوترکیب پیلین و حفظ ساختار نسبی آن می باشد

کلمات کلیدی:پروتئین پیلین *سودوموناس آئروژینوزا*، کلونینگ، بیان

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

سیستیک فیبروزیس (Cystic fibrosis)، سوختگی، جراحی، اختلال سیستم دفاعی، تروما، لوله‌گذاری در راه‌های هوایی، سرطان، ایدز و غیره از عوامل مستعد کننده برای عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* می باشند. آلودگی با این باکتری در میان بیماران بستری در بیمارستان بسیار شایع است و از مهم ترین عوامل مرگ و میر محسوب می شود (۱). *سودوموناس آئروژینوزا* عوامل ویرولانس متعددی از جمله توکسین ها، آنزیم ها، پیلی، فلاژل در فاز حاد عفونت به کار می گیرد (۲). *سودوموناس آئروژینوزا* پیلی قطبی تولید می‌کند که به عنوان پیلی تیپ IV یا پیلی N- متیل فنیل آلانین طبقه بندی شده است (۳). فیلامنت پیلی از هزاران زیر واحد مونومریک پروتئین *PilA* یا پیلین تشکیل شده است که توسط ژن *pilA* کد می شود (۴). *PilA* به عنوان یک پیش پیلین با یک طول کوتاه (۵۰ تا ۶۰ اسید آمینه) با بار مثبت و توالی رهبر است که در میان گونه ها به شدت محافظت شده است (۵،۶). توالی *PilA* ادامه پیدا کرده که به یک مارپیچ آلفا در قسمت N- ترمینال و یک منطقه آنتی پارالل β-strand در قسمت C- ترمینال که انتهایش بصورت یک لوپ دی سولفیدی (DSL) disulphide bonded loop ختم می شود (۷،۸). N - ترمینال پیلین مسئول میانکنش بین زیر واحدهاست در حالی که C- ترمینال در نوک پیلی ظاهر شده ومسئول اتصال به سلول میزبان

www.SID.ir

است (۰۱، ۹). پیلی به دی ساکارید های موجود در آسیالو GM۱ و GM۲ و لاکتوزسرآمید متصل می شود (۱۱, ۱۰). پیلی تیپ IV *سودوموناس آئروژینوزا* مسئول اتصال اولیه، حرکت لغزشی، تشکیل تشکیل بیوفیلم و ترشح اگروتوکسین S می باشند (۱۳، ۱۲). پیلی تیپ IV نقشی مهمی در اتصال به لوازم و تجهیزات پزشکی و عفونت های بیمارستانی مرتبط با کاتترها و ونتیلاتورها ، لنزهای تماسی دارا می باشد (۱۵، ۱۴). در مدل حیوانی پنومونی حاد و عفونت قرنیه *سودوموناس آئروژینوزا*، موتانت هایی که پیلی تولید نمی کنند دارای قدرت ویرولانس کمتری می باشند که با کاهش توانایی های این سویه ها برای استقرار در بافت میزبان همراه است (۱۷، ۱۶). مطالعات آزمایشگاهی نشان داد آنتی بادی های ضد پیلی می تواند از اتصال باکتری به سلول های اپیتلیال جلوگیری کند (۱۹، ۱۸). به نظر می رسد پروتئین پیلی یک عامل ایمونولوژیک موثر برای ایمنی در برابر عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* باشد. هدف این مطالعه ، کلون، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب پیلین می باشد.

مواد و روش ها

سویه های باکتریایی، آنزیم ها و وکتور

سویه های استاندارد PAO۱ *سودوموناس آئروژینوزا* از مرکز تحقیقات سوختگی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه و پس از کشت و احیاء با روش های متداول بیوشیمیایی تعین هویت گردید. *اشریشیا کلی* (*E. coli*) DH5α (Top/10F) و *اشریشیاکلی* *E.coli* BL21 (DE3) به عنوان میزبان های تکثیری و بیانی استفاده شد. پلاسمید pET-22b ساخت شرکت Novagen برای کلون ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم های محدود الاثر *BamHI* و *HindIII* شرکت Fermentas وT4 DNA لیگاز شرکت TaKaRa استفاده شد. از آنزیم HS DNA Polymerase PrimSTAR®شرکت TaKaRa برای تکثیر ژن هدف از ژنوم باکتری با PCR استفاده شد که قدرت تصحیح خطای بسیار بالایی دارد.

استخراج DNA ژنومی

ابتدا سویه PAO۱ در ۳ میلی لیتر محیط LB براث کشت داده شد و پس از ۲۱ ساعت انکوباسیون در ۷۳ درجه سلسیوس، سانتریفیوژ و از رسوب حاصل با استفاده از کیت استخراج ژنوم باکتری (Bioneer ,Korea) استخراج DNA صورت گرفت.

توالی ژن *pilA* سویه‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Informa-tion) اخذ و توسط نرم افزار VectorNTI ۱۱ بررسی شد. سپس با استفاده از پرایمر های اختصاصی Forward با ترداف ۵'-CTC GGATCCACTGATGATCGTGGTTGCGA-۳' و Reverse با ترداف ۵'-ACGAAGCTTCCGCAGTACGGTTCAG AGTG-۳' با Tm=۲۵. واکنش PCR انجام شد. جایگاه برش برای آنزیم *BamHI* در انتهای ۵' پرایمر ۵'-CTCGGATCCA CTGATGATCGTGGTTGCGA-۳' و جایگاه برش برای آنزیم *HindIII* در انتهای ۵' پرایمر ۵'-ACGAAGCTTCCGCAGT ACGGTTCAGAGTG-۳' طراحی شد. تکثیر ژن مورد نظر با PCR توسط آنزیمPrimSTAR® HS انجام گرفت. واکنش با برنامه دمایی شامل ۹۸ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ دوره شامل ۹۸ درجه سلسیوس (۱۰ ثانیه)، ۵۲ درجه سلسیوس (۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سلسیوس (۱ دقیقه) و در نهایت یک مرحله ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

کلونینگ

برای جداسازی و تخلیص ژن *pilA* از سایر باندهای غیراختصاصی ، محصول PCR حاصل از ۱۰ واکنش به صورت چاهک پیوسته‌ای بر روی ژل آگارز الکتروفورز و سپس باند مورد نظر با دقت از سایر باندها با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (Bioneer ,Korea)جدا وخالص شد. ژن *pilA* و وکتور pET-22b بصورت جداگانه تحت هضم آنزیمی با آنزیم های محدود الاثر *BamHI* و *HindIII* قرار گرفته سپس وارد واکنش الحاق شدند. پلاسمید های نوترکیب pET22b- *pilA* به باکتری *اشریشا کلی* (*E. coli*) DH5α (Top/10F) ترانسفورم شد و کلون های نوترکیب با از طریق PCR با پرایمرهای اختصاصی غربالگری شدند. تایید نهایی پلاسمید های نوترکیبpET-22b (+) با هضم آنزیمی و تعیین توالی صورت گرفت.

بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب پیلی

پلاسمید نوترکیب pET22b- *pilA* در سویه بیانی*E.coli* BL21 (DE3) با روش شوک حرارتی ترانسفورم شد. باکتری های حاوی پلاسمید نوترکیب pET22b- *pilA* در محیط مایع لوریا برتانی (LB) حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تلقیح و ۱۸ ساعت در انکوباتور با حرکت دورانی و دمای ۷۳ درجه سلسیوس گرماگذاری شد . از این کشت ۱۸ ساعته برای تلقیح محیط مایع جدید LB حاوی آمپی سیلین استفاده شد. محیط مذکور در انکوباتور با حرکت دورانی قرارگرفت و زمانی که کدورت محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ رسید بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از(Sigma, USA) Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ۱ میلی مولار القا شد . نمونه های زمان صفر الی ۴ ساعت از باکتری های القا شده گرفته شد و میزان بیان ژن *pilA* با روش SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) در ژل ۱۲/۵٪ و رنگ آمیزی کوماسی بلو G-250 (Coomassie blue G250) ارزیابی گردید. برای تخلیص پروتئین نوترکیب پیلین یک کشت ۱۸ ساعته از باکتری *E.coli* BL21 (DE3) به شکلی که

Archive of SID

www.SID.ir

قبلا شرح داده شد تهیه و از آن برای تلقیح یک لیتر محیط تازه LB استفاده گردید. بعد از اینکه باکتری ها به کدورت مناسب رسیدند با IPTG ۱میلی مولار القاء و به مدت ۴ ساعت بعد از آن در ۷۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از طی شدن این زمان، سلولهای باکتری با سانتریفیوژ در g × ۹۰۰۰ جمع آوری و با بافر فسفات نمکی شستشو داده شدند. رسوب سلولهای باکتری در بافر B (اوره ۸ مولار + Tris-HCl ۱۰ میلی مولار + NaH_2PO_4 ۱۰۰ میلی مولار) با pH=۸/۵ حل و در g × ۱۸۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه بمنظور جداسازی فاز محلول از اجسام سلولی نامحلول سانتریفوژ شد. سپس رزین نیکل (Ni-NTA) به فاز محلول اضافه و برای ۲ ساعت مخلوط شد. این مخلوط پس از انتقال به ستون پلی استایرنی، با بافر C (اوره ۸ مولار + Tris-Cl ۱۰ میلی مولار + NaH_2PO_4 ۱۰۰ میلی مولار) با pH=۶/۳ شستشو داده شد. حذف اوره با استفاده از بافرهای حاوی شیب کاهشی غلظت اوره (۸، ۶، ۴، ۲ و صفر مولار) انجام و در نهایت پروتئین ها با استفاده از محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار از ستون جدا و جمع آوری شدند. حذف ایمیدازول با دیالیز انجام شد. محلول حاوی پروتئینهای نوترکیب تخلیص شده در کیسه‌های دیالیز با منافذ ۱۲ کیلو دالتون ریخته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در برابر بافر فسفات با pH=۷/۴ به میزان ۱۰ حجم در هر بار و سه مرتبه تکرار در دمای یخچال توسط همزن مغناطیسی دیالیز شدند. پروتئین تغلیظ شده از کیسه دیالیز خارج و بعد از تعیین غلظت با روش اسپکتروفوتومتری در ۲۸۰ نانومتر و بررسی کمی و کیفی با روش SDS-PAGE در ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

وسترن بلات

هدف از آزمایش وسترن بلات (ایمونوبلات) تائید بیان و ارزیابی آنتی ژنیسیته و خصوصیات ایمونولوژیک پپلین نوترکیب می باشد. پروتئین نوترکیب از ژل SDS-PAGE با سیستم انتقال نیمه خشک (Bio-Rad) به کاغذ پلی وینیلیدین دی فلورید (Polyvinylidene Fluoride: PVDF) توسط دستگاه بلات Bio-Rad در شرایط نمیه خشک منتقل شد. برای کنترل انتقال پروتئین از رنگ پانسو S (Ponceau S) استفاده و غشا به صورت نوار های نازک حاوی پروتئین های منتقل شده بریده شد. مسدود سازی غشای PVDF با محلول آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) به مدت ۱ ساعت انجام شد. در مرحله بعد غشای PVDF با آنتی بادی بر علیه His-tag ۶ با رقت ۱:۱۰۰۰۰ یا سرم بیمارانی (رقت ۱:۲۰۰۰) با تشخیص عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* در بیمارستان بستری بودند به مدت ۲ ساعت مجاور شدند. شستشو با بافر تریس نمکی محتوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (Tris-Buffered Saline with Tween: TBS-T) انجام شد. سپس غشا با آنتی بادی ثانویه Goat anti-Mouse IgG و Anti-Human IgG کونژوگه با پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰۰ برای مدت ۲ ساعت مجاور شد. غشا پس از شستشو با محلول سوبسترای کمیلومینسانت (Substrate Chemiluminescent) تحت شرایط استاندارد مجاور شده و بلافاصله باندهای فلورسنت روی غشای رادیوگرافی ثبت و ظاهر شد.

انجام الیزا

میزان IgG توتال در سرم های انسانی به روش الیزای استاندارد در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (Extragen, Korea) به روش الیزا اندازه-گیری شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت g/ml ۱۰پپلین نوترکیب (۱g/well) در phosphate buffered saline (PBS)(pH=۷/۴) به هر چاهک پلیت میکروتیتر اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از ۳ بار شستشو با بافر PBS-T (بافر PBS محتوی ۰/۵٪ درصد Tween-۲۰)، با PBS-T محتوی ۵٪ Bovine serum (BSA) albumin به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس بلوکه شد و به دنبال چند بار شستشو باPBS-T ، از نمونه های سرم انسانی که شامل ۲۰ نمونه مثبت (افراد با زخم سوختگی سودوموناس آئروژینوزا) و ۲۰ نمونه منفی (افراد سالم) رقت ۱:۱۰۰ تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از ۴ بار شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی کونژوگه با پراکسیداز با رقت۱:۱۰۰۰۰ به هر چاهک اضافه و ۱/۵ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. به دنبال چند مرحله شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از معرف رنگزایH_2O_2/TMB (Razi institute, Iran) به هر چاهک اضافه، فعالیت آنزیمی به کمک اسید سولفوریک ۱ نرمال (Merck, Germany) متوقف و جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر (Pharmacia, France) قرائت شد.

یافته ها

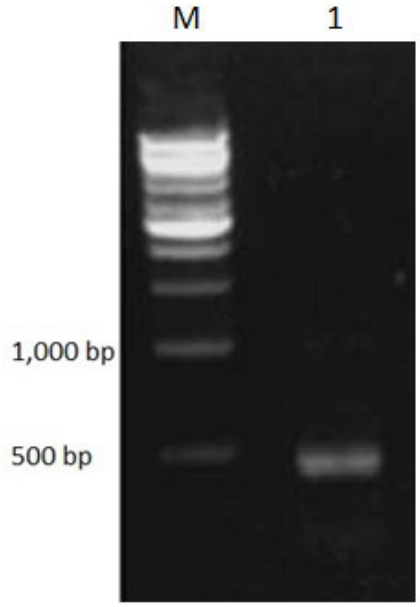
شناسایی سویه *سودوموناس آئروژینوزا* و استخراج ژن پپلین

با استفاده از یکسری از آزمون های بیوشیمیای مثل اکسیداز، حرکت، رشد در ۴۲ درجه سلسیوس، آرژینین دهیدرولاز و تولید پیوسیانین سویه های PAO۱ تعیین هویت شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از سویه PAO۱ ژنومی با دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز و UV اسپکتروفتومتری ارزیابی شد. غلظت DNA استخراج شده ۲۹۶ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن *pilA* را روی ژل آگارز باندی با طول ۴۶۲ جفت باز را نشان می‌دهد که با *pilA* از سایر سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی مطابقت دارد. در نهایت برای بدست آوردن ژن *pilA* خالص، باند bp ۴۶۲ حاصل از ۱۰ واکنش PCR از روی ژل آگارز بریده شد و مجدداً با کیت تخلیص محصول PCR بازیافت گردید (شکل ۱).

کلونینگ ژن *pilA*

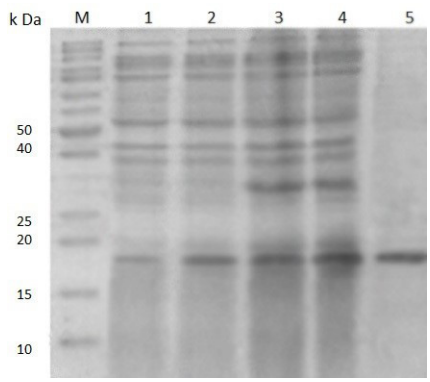
محصول PCR و وکتور pET-22b با آنزیم‌های *BamHI*

www.SID.ir

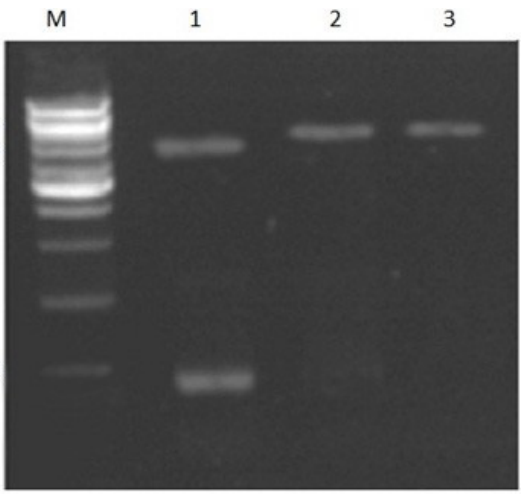


تصویر شماره‌ی ۱: چاهک ۱. ژن *pilA* خالص از سویه PAO۱، چاهک M مارکر DNA (VC ۱kb DNA Ladder)

و *HindIII* برش داده شدند و پس از تخلیص محصولات هضم شده از روی ژل آگارز، عمل الحاق بین وکتور و ژن *pilA* در محل آنزیم‌های مذکور با آنزیم T4DNA Ligase صورت گرفت. محصول الحاق به درون باکتری DH5α (Top/10F) ترانسفورم شد و پس از رشد بر روی محیط LB حاوی کانامایسین، چندین کلنی انتخاب و برای تائید حضور وکتور نوترکیب (pET22b-*pilA*) از آنها استخراج پلاسمید صورت گرفت.. همان گونه که در شکل۴ مشاهده می‌شود؛ حاصل برش تک آنزیمی وکتور نوترکیب *BamHI* پلاسمیدی خطی با طول bp ۶۴۱۸ بود (شکل ۲). در حالی که طول وکتور pET-22b فاقد قطعه bp ۵۳۶۹ می‌باشد. در هضم دو آنزیمی نیز قطعه *pilA* از وکتور نوترکیب جدا و در موقعیت خود یعنی bp ۴۶۲ قرار گرفت (شکل ۲). مقایسه نتایج



تصویر شماره‌ی ۲: SDS-PAGEپروتئین نو ترکیب تخلیص شده؛ (M) مارکر پروتئینی ؛ چاهک ۱ : لیزات باکتریایی حاصل از یک کلون نوترکیب القاء نشده (کنترل بیان) ؛ چاهک۲، ۳و ۴ : لیزات باکتریایی القاء شده با IPTG، به ترتیب ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از القاء با IPTG ؛ چاهک ۵: پروتئین نو ترکیب تخلیص شده

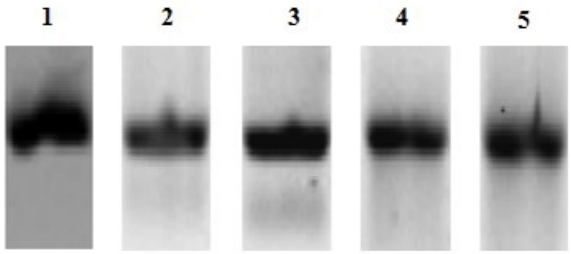


تصویر شماره‌ی ۲: شناسایی pET22b- *pilA* با هضم آنزیمی؛ چاهک ۱: وکتور نوترکیب pET22b- *pilA* هضم شد با آنزیم‌های *BamHI* و *HindIII*، چاهک ۲: وکتور نوترکیب pETb22- *pilA* ، چاهک ۳: وکتور pET22b هضم شده با آنزیم *BamHI* چاهک M: مارکر DNA(VC ۱kb DNA Ladder)

تعیین توالی ژن *pilA* نوترکیب با توالی مرجع این ژن توسط نرم افزار Sequencher version ۵ نشان داد که ژنهای مورد نظر بدون هیچ جهشی و به درستی در ناقل مورد نظر کلون شده‌اند.

بیان پروتئین نوترکیب پیلین در *E. coli*

آزمایشات مختلف بر روی مایع رویی کشت و لیزات باکتریایی ثابت کرد که بیشتر پروتئین های تولیدی به شکل انکلوژن بادی در داخل سیتوپلاسم باکتری تجمع می یابند و بهترین شرایط که منجر به بیان بالای پروتئین می گردد القاء ۴ ساعته با IPTG ۱ میلی مولار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس می باشد. پروتئین نوترکیب با روش دناتوراسیون و متعاقبا شیب کاهشی اوره بر روی ستون Ni-NTA شرکت کیاژن (Qiagen, Germany) به شکل محلول در بافر حاوی ایمیدازول از ستون جدا شدند. بررسی پروتئین خالص شده با روش SDS-PAGE نشان داد که تخلیص پروتئین نوترکیب به خوبی صورت گرفته است (شکل ۳). همان



تصویر شماره‌ی ۲: ایمونوبلاتینگ پیلین نوترکیب؛ چاهک ۱: ایمونوبلاتینگ با آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستیدینی؛ پیلین: چاهک ۲، ۳، ۴ و ۵: ایمونوبلاتینگ با آنتی سرم انسانی ضد *سودوموناس آئروژینوزا*

Archive of SID

www.SID.ir

گونه که در شکل نشان داده شد، نتایج آزمایش ایمونوبلاتینگ، حاکی از بیان پروتئین نوترکیب پیلین با وزن مولکولی تقریبی ۹۱کیلو دالتون و تشابهات آنتی ژنی این پروتئین با شکل طبیعی آن بود. همچنین واکنش پذیری پروتئین نوترکیب پیلین را با آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستیدینی و سرم بیماران با عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* تایید می کند (شکل ۴).

نتایج الیزا سرم های انسانی

میانگین جذب نوری(OD) آنتی بادی های انسانی علیه آنتی ژن نوترکیب پیلین با روش الیزا غیر مستقیم مورد ارزیابی قرار گرفت. در جدول ۱ میانگین جذب نوری برای چاهک های بلانک (چاهک های فاقد آنزیم کونژوگه)، نمونه های منفی و نمونه های مثبت ارائه شده است. سرم های انسانی با عفونت زخم سوختگی *سودوموناس آئروژینوزا* بالاترین میانگین OD در مقایسه سرم های انسانی سالم نشان می دهد که اختلافشان از نظر آماری معنی دار می باشد ($P<0/001$). برای بررسی سنجش میانکنش سرم های انسانی با پروتئین نوترکیب پیلین، میانگین تیتر نمونه منفی را با سه برابر مقدار انحراف معیار جمع نموده و آنرا به عنوان حد آستانه تشخیص یا cut of برای آزمون الیزای غیر مستقیم درنظر میگیریم. Cut off استفاده از فرمول Cut off =mean of negative serum ± ۳ Standard deviation (SD) محاسبه شد که برابر با (۰/۰۶۶-۰/۲۴۶) می باشد.

میانگین جذب نوری ± SD	
۰/۰۹۶ ±۰/۰۰۶	نمونه بلانک
۰/۱۵۶ ±۰/۰۳	نمونه منفی
۰/۷۶۳ ± ۰/۲۳	نمونه مثبت

بحث

در این مطالعه علاوه بر تکثیر موفقیت‌آمیز توالی کامل ژن پیلین (*pilA*)، دو ناحیه برش برای آنزیم‌های محدودالاثر را نیز به محصول PCR اضافه می کنند بنابراین در مقایسه با مطالعات گذشته این روش در تکثیر ژن *pilA* در جهت کلونینگ پرکاربردترمی باشد (۳, ۲۰). در سال ۱۹۸۶ Strom و همکاران، DNA سویه PAK *سودوموناس آئروژینوزا* جهت کلونینگ در معرض برش تک آنزیمی Sau3A قرار داده و در وکتور pUCI8 کلون کردند و به منظور اثبات حضور قطعه پیلین در وکتور، از تکنیک ساترن هیبریداسیون استفاده کردند (۲۰). در تحقیق حاضر برای اثبات حضور قطعات تکثیرشده *pilA*، از تکنیک ساده PCR و هضم آنزیمی استفاده گردید این دو روش نسبت به تکنیک ساترن کم‌هزینه‌تر و با صرف زمان کمتری انجام می‌پذیرند بنابراین می‌توانند در کنار این تکنیک مورد توجه باشد. در مطالعه‌ای در سال ۱۹۸۵ ژن کد کننده پیلین در وکتور pBPO10 به‌صورت مستقل از پروموتر وکتور در باکتری *E. coli* بیان شد که بازده بیان پروتئین پایین بوده و با استفاده از روش وسترن بلات تایید شد که میزان خلوص پروتئین ناچیز بود (۲۰). وکتورهای pET حاوی توالی‌هایی مجاور با سایت‌های کلونینگ‌اند که تعدادی از برچسب‌ها را کد می‌کنند این برچسب‌ها زمانی که به پروتئین هدف می‌چسبند عملکردهای متنوعی را به آن می‌دهند؛ برخی از آن‌ها باعث تسهیل در شناسایی و یا تخلیص پروتئین نوترکیب می‌شوند درحالی‌که برخی دیگر احتمال فعالیت بیولوژیک را با تأثیر بر حلالیت رد سیتوپلاسم یا ترشح به پری‌پلاسم را افزایش می‌دهند. ژن پیلین از سویه PAO۱ در وکتور pET-22b کلون و در میزبان بیانی *اشریشیا کلی* BL21 (DE3) ترانسفورم و بیان شد. در تحقیق ما ژن کامل پیلین در سطح بالایی بیان، تخلیص و خصوصیات بیولوژیک آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

حاصل بیان ژن *pilA* سویه PAO۱ پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۹ کیلودالتون بود. ازآنجایی‌که جداسازی اجسام انکلوژن فرآیندی وقت‌گیر و پرهزینه است (۲۱)، لذا در این مطالعه از اوره با غلظت ۸ مولار استفاده گردید که می‌تواند غشای باکتری‌ها و ذرات انکلوژن را کاملاً حل نماید. روش خالص‌سازی و باز تاخوردگی روی ستون به‌طور کارآمدی پروتئین نوترکیب موردنظر را بدون لخته کردن یا رسوب پروتئین باز تاخورده می‌کند. در این روش کاهش غلظت ماده دناتوره کننده باید گام‌به‌گام و تدریجی باشد تا بازده پروتئین‌های باز تاخورده افزایش یابد. در این تکنیک مواد جامد رزین یا ماتریکس تاخوردگی، ریز محیط مناسبی را فراهم می‌نماید به طوری که پروتئین‌ها روی ستون بی‌حرکت شده و قسمت‌های آب‌گریز در معرض به‌طور جزئی تاخورده می‌شوند. درنتیجه از برهم‌کنش نامناسب زنجیره‌های پلی پپتیدی ممانعت شده و بازیافت پروتئین فعال زیستی را تقویت می‌نماید. مواد ستون ممکن است نقشی شبیه چاپرون در نگهداری و حفظ پروتئین‌های تاخورده جداشده، ایفا نماید (۲۲). در این تحقیق، با استفاده از ستون Ni-NTA agarose، پروتئین نوترکیب با اتصال به رزین نیکل به واسطه داشتن دنباله هیستیدینی بی‌حرکت گردید و در واقع بدین‌وسیله از سایر پروتئین‌های موجود در محلول اولیه حاصل از دناتوراسیون با اوره ۸ مولار جدا شد. جهت حذف عامل دناتوره کننده (اوره) و به دست آوردن پروتئین محلول، بافرهای حاوی شیب کاهشی غلظت اوره (کاهش غلظت اوره تا صفر) در مرحله محلول سازی پروتئین بکار برده شد. حذف تدریجی اوره این فرصت را مهیا می‌سازد تاپیوندهای هیدروژنی درون ساختاری پروتئین‌ها تشکیل شود. در مورد پروتئین مورد مطالعه در این تحقیق، سرعت تاخوردگی درست پروتئین‌ها نسبت به تاخوردگی نادرست آنها و واکنش‌های نامطلوب بین پروتئینی بیشتر بوده بنابراین در ساختاری قرارگرفته‌اند که قابلیت حل شدن در محلول‌های آبی فاقد عامل دناتوره کننده را داشته‌اند. اما مشابه با روش بکار رفته در این تحقیق، مطالعات متعددی روی

www.SID.ir
Archive of SID

پروتئین‌های دیگر با بازده باز تاخوردگی بالایی انجام گردیده است که به چند مورد از آن می‌توان اشاره نمود. Udono و همکاران باز تاخوردگی تدریجی پروتئین‌های جذب‌شده به ستون را برای خالص سازی hsp۶۰ استفاده کردند و گزارش نمودند که استفاده از PBS حاوی شیب کاهشی غلظت اوره، فعالیت ATP آزی بالایی را به پروتئین مورد نظر اعطا می‌کند(۲۲). در یک مطالعه ESAT-۶ نوترکیب *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به‌طور موفقیت‌آمیزی با دیالیز گرادیان اوره به شکل طبیعی درآمد و بازده پروتئین تولیدشده ۴۸ میلی‌گرم در ۴ لیتر کشت گزارش شد (۲۳). در مطالعه دیگر که تا حدی مشابه با تحقیق حاضر می‌باشد خالص‌سازی روی ستون و باز تاخوردگی آنتاگونیست نوترکیب رسپتور اینترلوکین یک انسانی، بیشتر از ۴ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر تولید کرد (۲۴). در مطالعه حاضر، اگرچه بیان سیتوپلاسمی پروتئین نوترکیب پیلین در فرم ذرات انکلوژن صورت گرفته است، سطح بسیار بالایی از پروتئین نوترکیب بیان شده و با روش تخلیص استفاده شده، پروتئین نوترکیب به‌صورت محلول و با خلوص بالا از ستون جمع‌آوری گردیده است. نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات که با آنتی‌بادی مونوکلونال علیه توالی پلی هیستیدینی و آنتی سرم انسانی ضد *سودوموناس آئروژینوزا* نشان می‌دهد که استراتژی تولید و تخلیص بکار برده شده در این پروژه کارآمد بوده و توانسته مشکلات ناشی از تجمع پروتئین نوترکیب را مرتفع سازد. نتایج آزمون الیزا حاکی از این می‌باشد آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن پیلی *سودوموناس* در فاز حاد عفونت (عفونت زخم سوختگی) تولید می‌شود. نتایج الیزا و وسترن بلات، واکنش آنتی‌بادی‌های سرم های انسانی با پروتئین نوترکیب پیلین را تایید کرده و نشان‌دهنده‌ی این امر می‌باشند که اپی‌توپ های بیان شده مشابه با پیلی طبیعی *سودوموناس آئرژینوزا* می باشد (۲۵). در مطالعه حاضر، بازده پروتئین نوترکیب ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است. با توجه به راندمان بسیار بالای پروتئین نوترکیب که تا حد بسیار زیادی عاری از سایر پروتئین‌های آلوده‌کننده بودند شاید بتوان گفت که روش بکار برده شده در این تحقیق، روشی ساده، کارآمد و سریع برای تولید و محلول کردن پروتئین‌های نوترکیب باکتری‌ها به‌ویژه در مورد *سودوموناس آئروژینوزا* با برچسب هیستیدینی و مستقل از موقعیت این برچسب هیستیدینی (در سمت کربوکسیلی یا آمینی) در ساختمان پروتئین می‌باشد.

ماهیت طبیعی و اکتسابی *سودوموناس آئروژینوزا* در کسب مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های جدید باعث شده که محققین به دنبال روش‌های نوین جهت درمان و پیشگری از عفونت ناشی از این باکتری باشد (۲۶) . نتایج وسترن بلات و الیزا به‌موازات نتایج تعیین توالی نشان‌دهنده صحت تولید پروتئین نوترکیب پیلین و حفظ ساختار نسبی آن است، لذا در آینده قصد داریم از پیلین نوترکیب به‌عنوان کاندید واکسن در برابر عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده نمائیم.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران که حمایت مالی این طرح را با شماره ۹۴-۰۲-۱۹۸-۲۵۹۶۲ بر عهده داشت تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Reference

1. Jeschke MG, Pinto R, Kraft R, Nathens AB, Finnerty CC, Gamelli RL, et al. Morbidity and Survival Probability in Burn Patients in Modern Burn Care. Crit Care Med. 2014, 31(3):165-65

2. Gellatly SL, Hancock RE. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 2013;67(3):159-73.

3. Pasloske BL, Finlay BB, Paranchych W. Cloning and sequencing of the Pseudomonas aeruginosa PAK pilin gene. FEBS Lett. 1985;183(2):408-12.

4. Finlay BB, Pasloske BL, Paranchych W. Expression of the Pseudomonas aeruginosa PAK pilin gene in Escherichia coli. J Bacteriol. 1986;165(2):625-30.

5. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. Annu Rev Microbiol. 2002;56:289-314.

6. Watson AA, Mattick JS, Alm RA. Functional expression of heterologous type 4 fimbriae in Pseudomonas aeruginosa. Gene. 1996;175(1-2):143-50.

7. Craig L, Taylor RK, Pique ME, Adair BD, Arvai AS, Singh M, et al. Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of Vibrio cholerae toxin-coregulated pilus and Pseudomonas aeruginosa PAK pilin. Mol Cell. 2003;11(5):1139-50.

8. Craig L, Volkmann N, Arvai AS, Pique ME, Yeager M, Egelman EH, et al. Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. Mol Cell. 2006;23(5):651-62.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Hazes B, Sastry PA, Hayakawa K, Read RJ, Irvin RT. Crystal structure of Pseudomonas aeruginosa PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. J Mol Biol. 2000;299(4):1005-17.

10. Krivan HC, Ginsburg V, Roberts DD. Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas cepacia isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). Arch Biochem Biophys. 1988;260(1):493-6.

11. Baker N, Hansson GC, Leffler H, Riise G, Svanborg-Eden C. Glycosphingolipid receptors for Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun. 1990;58(7):2361-6.

12. Hayashi N, Nishizawa H, Kitao S, Deguchi S, Nakamura T, Fujimoto A, et al. Pseudomonas aeruginosa injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. FEBS Lett. 2015;589(8):890-6.

13. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Environ Microbiol. 2008;10(9):2331-43.

14. Rosenthal VD, Maki DG, Salomao R, Moreno CA, Mehta Y, Higuera F, et al. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. Ann Intern Med. 2006;145(8):582-91.

15. Giltner CL, van Schaik EJ, Audette GF, Kao D, Hodges RS, Hassett DJ, et al. The Pseudomonas aeruginosa type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. Mol Microbiol. 2006;(4):1083-96.

16. Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of Pseudomonas aeruginosa--a review. Gene. 1997;192(1):99-108.

17. Hazlett LD, Moon MM, Singh A, Berk RS, Rudner XL. Analysis of adhesion, piliation, protease production and ocular infectivity of several P. aeruginosa strains. Curr Eye Res. 1991;10(4):351-62.

18. Woods DE, Straus DC, Johanson WG, Jr., Berry VK, Bass JA. Role of pili in adherence of Pseudomonas aeruginosa to mammalian buccal epithelial cells. Infect Immun.. 1980;29(3):1146-51.

19. Ramphal R, Sadoff JC, Pyle M, Silipigni JD. Role of pili in the adherence of Pseudomonas aeruginosa to injured tracheal epithelium. Infect Immun. 1984;44(1):38-40.

20. Strom MS, Lory S. Cloning and expression of the pilin gene of Pseudomonas aeruginosa PAK in Escherichia coli. J Bacteriol. 1986;165(2):367-72.

21. Mierendorf RC, Morris BB, Hammer B, Novy RE. Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. Methods Mol Med. 1998;13:257-92.

22. Udono H, Saito T, Ogawa M, Yui Y. Hsp-antigen fusion and their use for immunization. Methods. 2004;32(1):21-4.

23. Wang BL, Xu Y, Wu CQ, Xu YM, Wang HH. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis. Protein Expr Purif. 2005;39(2):184-8.

24. Tan H, Dan G, Gong H, Cao L. On-column refolding and purification of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rHuIL-1ra) expressed as inclusion body in Escherichia coli. Biotechnol Lett. 2005;27(16):1177-82.

25. Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. Clin Lab Med. 2014; 34: 197-217.

26. Johansen HK and Gotzsche PC. Vaccines for preventing infection with Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 2013; 6: CD001399.

Archive of SID

www.SID.ir