



کلونینگ ژن InvG از باکتری سالمونلا انتریکا در حامل pET32a و بررسی بیان آن در میزبان BL21-DE3

محمدحسن جهاندار^۱، محمدرضا نصیری^{۲*}، علی اصغر اسلمی نژاد^۳، مجتبی طهمورث پور^۴، علیرضا حق پرست^۵

^۱ دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۲ استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۳ استاد، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی و دامی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۴ دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۵ استادیار، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۳

چکیده

باکتری سالمونلا یکی از عوامل ایجاد بیماریهای عفونی و به عنوان یک بیماری مشترک در انسان و حیوانات، از لحاظ بهداشتی و اقتصادی دارای اهمیت فراوان است، که تا کنون واکسن برای آن تولید نشده است. ژن InvG به سبب ساختاری و به عنوان یکی از ژن های اصلی تشکیل دهنده سیستم ترشحی نوع III و همچنین قرار گرفتن در غشاء باکتری، نقش مهمی را در اتصال اولیه باکتری به سلول میزبان دارد. هدف اصلی از پژوهش حاضر بیان پروتئین نوترکیب InvG و معرفی آن به عنوان یک ادجوانت موثر جهت DNA واکسن بود. در این پژوهش با طراحی آغازگر اختصاصی و استفاده از روش PCR، ژن InvG باکتری سالمونلا تکثیر گردید. پس از تخلیص، ژن فوق در ناقل پلاسمیدی pET32a(+) جهت بیان کلون شد. سپس پلاسمیدی نوترکیب pET32a-InvG وارد باکتری /شریشیاکلی سویه BL21- DE3 گردید. به منظور تولید پروتئین نوترکیب در سیستم بیانی، باکتری حاوی پلاسمید بیانی و ژن هدف (InvG) با استفاده از IPTG القاء شد. نتایج توالی یابی نشان داد که توالی ژن تکثیر شده در حامل بیانی pET32a کلون شده با ترادف ثبت شده برای ژن InvG در بانک ژن یکسان بود. تولید پروتئین نوترکیب با القاء IPTG به میزبان حاوی پلاسمید pET32a-InvG با موفقیت انجام گرفت. تایید بیان ژن InvG در این سیستم بیانی، توسط آنالیز SDS-PAGE و دات بلائینگ انجام گردید. پژوهش حاضر نشان داد تولید پروتئین نوترکیب InvG در میزبان /شریشیاکلی امکان پذیر است و پروتئین تولید شده، وزنی در حدود ۸۱ کیلو دالتون دارد.

کلید واژه ها: ژن InvG، سالمونلا، پروتئین نوترکیب، ناقل پلاسمیدی pET32a.

مقدمه

(SPI) واقع شده اند. ژن های مسئول حدت که در فاز روده‌ای عفونت نقش دارند، در SPI-۱ و SPI-۲ واقع شده‌اند. ناحیه SPI-۱ به طول kb ۴۳ و حاوی ۳۱ ژن و همچنین سیستم ترشحی نوع III^۶ (T3SS) می‌باشد (Tindall et al., 2005). این سیستم ترشحی که سرنگ مولکولی نیز خوانده می‌شود، مسئول ترشح وابسته به تماس یا انتقال پروتئین‌های حدت به داخل سلول میزبان است (Galan, & Collmer, 1999). اولین گام در تثبیت این باکتری اتصال به سلول های میزبان است که بواسطه سیستم ترشحی نوع III و از طریق میانکنش بین پروتئین های ترشحی صورت می‌گیرد. در این میان ژن InvG به سبب ساختاری و همچنین قرار گرفتن در غشاء باکتری و به عنوان یکی از ژن های اصلی تشکیل دهنده سیستم ترشحی، ارتباط تنگاتنگی با اتصال اولیه باکتری به سلول میزبان را دارد (Galan & Wolf- Watz, 2006). ژن InvG دارای توالی نوکلئوتیدی ۱۶۸۹ نوکلئوتید می‌باشد که پلی پپتیدی با ۵۶۳ اسید آمینه با وزن مولکولی ۶۲ کیلو دالتون را کد می‌کند. این ژن دارای توالی حفاظت شده و بدون تغییر در گونه ها و سویه های مختلف تمامی سالمونلاها بوده و یکی از آنتی ژن های اصلی است که نقش مهمی در ایجاد بیماری و همچنین زنده ماندن باکتری سالمونلا دارد (Galan & Wolf-Watz, 2006). در سال-

ماده ژنتیکی^۱ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند. نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Tohidi nejhadi et al., 2015). سالمونلوز یک بیماری مهم عفونی است که به عنوان یک بیماری مشترک در بین انسان و حیوانات، از لحاظ بهداشتی و اقتصادی دارای اهمیت فراوان است. عامل ایجاد کننده این بیماری، یک باکتری تاژکدار گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری از جنس سالمونلا و در خانواده انتروباکتریاسه بوده که بر اساس جدیدترین تقسیم بندی این جنس به دو گونه سالمونلا انتریکا^۲ و سالمونلا بنگوری^۳ تقسیم می‌شود. سالمونلا انتریکا به شش زیر گونه (I, II, IIIa, IIIb, IV, V) تقسیم شده که از بین این آنها زیر گونه I مسئول غالب عفونتهای سالمونلا در حیوانات خون گرم می‌باشد (Porwollik et al., 2004). خوشه های ژن حدت^۴ سالمونلا در ۱۲ جزیره‌ی بیماری‌زایی^۵

¹ DNA² Salmonella Enterica³ Salmonella Bangor⁴ Virulence gene clusters⁵ Salmonella pathogenicity islands⁶ Type three secretion system

سلول باکتری حاوی ناقل دستوری^۱ شده بر روی محیط کشت مایع Luria Broth (۱ درصد تریپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ کلرید سدیم) حاوی ۱۰۰ µg/ml آمپی سیلین کشت داده شد.

جداسازی و تکثیر ژن InvG

آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن InvG با توجه به همولوژی توالی ثبت شده در NCBI با استفاده از نرم افزار Primer Premier، نسخه ۵ (Lalitha, 2000)، طراحی شد. ناحیه رمزگردان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی لینکر دار رفت F:CGCGGATCCGCGGGCAGACAAAT R: GAAGACACATA و برگشت CCGCTCGAGCGGTTTAATTGCCTCCT GACCTCTAT تکثیر و جداسازی شد. جایگاه برشی *BamHI* و *XhoI* به منظور انتقال ژن InvG به حامل بیانی به ترتیب به آغازگرهای رفت و برگشت اضافه شد (جایگاه های برشی در آغازگرهای لینکر دار با خط مشخص شده اند). تکثیر ژن مورد نظر با واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر dNTP ۲۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر MgCl₂ ۵۰ میلی مولار، ۱۰ پیکومول آغازگر رفت و برگشت، ۱/۲۵ واحد آنزیم pfu و ۵۰ نانوگرم DNA الگو انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن InvG با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (T-Personal) ساخت کشور آلمان

های اخیر، انواع مختلفی از آنتی بیوتیک ها برای مقابله با باکتری *سالمونلا* استفاده شده است که با افزایش تعداد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک، استفاده از روش های جایگزین ضروری به نظر می رسد. از این رو می تواند پروتئین InvG به عنوان عامل آنتی ژنیک از این باکتری، یک کاندیدای مهم محسوب شده و همچنین کلونینگ و بیان این ناحیه ژنی و استفاده از آن به عنوان پروتئین نو ترکیب برای تحریک سیستم ایمنی میزبان جهت تولید ایمونوگلوبین اختصاصی حائز اهمیت فراوان باشد. لذا، هدف از انجام این پژوهش بررسی امکان بیان پروتئین نو ترکیب InvG از توالی طبیعی ژن مربوطه بعد از همسانه سازی در ناقل بیانی، در میزبان *اشریشیاکلی* بوده است که می تواند به عنوان ادجوانت موثر به منظور یک DNA واکسن از آن استفاده شود.

مواد و روش ها

سویه های باکتری، پلاسمید و محیط کشت

باکتری *سالمونلا* تیپی موریوم سویه (ATCC:۱۴۰۲۸) از دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد بر روی محیط کشت BHK-21 تهیه گردید. سویه های *اشریشیاکلی* DH5α و BL21(DE3) به ترتیب به عنوان میزبان کلونینگ و بیان انتخاب شدند. پلاسمیدهای pTZ57 R/T و pET32a(+) (Thermo Scientific) و (Novagen) به ترتیب به عنوان ناقل های کلونینگ و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند.

¹ Manipulation

گرفتند. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از محلول باکتری ترنسفورم شده روی پتری دیش حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۴۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) توزیع گردید و در دمای ۳۷°C به مدت ۱۴ ساعت نگهداری شدند. به منظور انتخاب کلونی های انتقال ژن شده، واکنش کلونی PCR و هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم محدودکننده *BamHI* و *XhoI* انجام گردید. برای انجام کلونی PCR، مقدار ۵۰ ماکرولیتر آب دیونیزه استریل را در میکروتیوپ ۱/۵ ریخته و با استفاده از لوپ، خطی از باکتری کلونی سفیدی که کشت خطی داده شده برداشته، در آب دیونیزه حل گردید. میکروتیوپ مذکور به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوشانده شد. سپس سانتریفیوژ در ۸۰۰۰rpm انجام شد. از سوپر ناتانت به عنوان DNA الگو برای واکنش کلونی PCR استفاده شد.

بیان پروتئین InvG

پس از تایید حضور ژن InvG از طریق واکنش کلونی PCR و هضم آنزیمی، از کلونی مورد نظر، استخراج پلاسمید صورت گرفت. برای این منظور از محیط کشت جامدی که تک پرگنه ای کشت داده شده بود، برداشته و در محیط کشت مایع ۳ میلی لیتر کشت داده شد (به مدت ۱۶ ساعت). استخراج پلاسمید / pTZ57R Miniprep T+InvG با استفاده از کیت (Thermo Scientific) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. هضم آنزیمی

به صورت زیر انجام شد. مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C برای مدت ۶ دقیقه، واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۸°C و بسط ۴۵ ثانیه در ۷۲°C برای ۳۲ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. پس از انجام PCR جهت تخلیص DNA از ژل آگارز، از کیت Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای انجام واکنش الحاق، ۱۵۰ نانوگرم ناقل pTZ57R/T، ۶ میکرولیتر بافر الحاق (5X)، ۲۰۰ نانوگرم قطعه تخلیص شده، ۲ میکرولیتر محلول پلی اتیلن گلایکول و ۴ واحد آنزیم T4 DNA لیگاز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مخلوط شد. واکنش الحاق طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. محصول الحاق به سلول های مستعد شده باکتری *اشرشیاکلی* سویه DH5α با استفاده از روش شوک حرارتی انجام شد (Sorensen et al., 2005). بدین ترتیب که تیوب حاوی باکتری و محصول الحاق به مدت ۴۰ دقیقه درون یخ قرار داده شدند. سپس برای ایجاد یک شوک حرارتی، باکتری به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲°C قرار گرفتند و بعد به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ نگهداری شدند. در مرحله بعد ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB بدون آنتی بیوتیک به میکروتیوب ها اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C درون شیکر انکوباتور قرار

سیلین اضافه و تا رسیدن به OD ۰/۶، در طول موج ۶۰۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. در این مرحله، نمونه صفر برداشته و سپس به منظور تولید پروتئین نوترکیب InvG در سیستم بیانی *E. coli* BL21 (DE3)، می‌بایست باکتری حاوی پلاسمید بیانی pET-32 و ژن هدف InvG با استفاده از IPTG القاء شوند. برای این منظور IPTG در غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار به محیط کشت اضافه شد. نمونه برداری در ساعت های ۱، ۲، ۳ و ۴ به منظور مشخص کردن بیان ژن InvG صورت گرفت. سلول ها در rpm ۸۰۰۰ سانترفیوژ و پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر بافر لاملی به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوشانده شدند. محصول در rpm ۸۰۰۰ سانترفیوژ و محلول رویی و انتهایی بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. بیان ژن InvG در این سیستم بیانی، توسط آنالیز SDS-PAGE انجام گردید. برای الکتروفورز محصول تحریک بیان ژن، از ژل پایینی ۱۲٪ و ژل بالایی ۵٪ و دستگاه الکتروفورز Mini-gel (Bio-Rad, USA) (۸cm × ۱۰cm) استفاده شد. به منظور شناسایی پروتئین نوترکیب تولید شده در سیستم بیانی و تایید آن، از روش سریع و حساس دات بلاتینگ استفاده شد. اساس علمی این روش بدین ترتیب است که یک آنتی بادی اختصاصی بر روی پروتئین هدف اضافه شده تا به اپی توپ اختصاصی خود اتصال یابد. سپس آنتی بادی دوم که معمولا حاوی آنزیم

برای پلاسمیدهای pTZ57R / T+InvG و ناقل بیانی pET32a(+) با استفاده از آنزیم های برشی *XhoI* و *BamHI* انجام شد. غلظت قطعه InvG و همچنین ناقل pET-32a(+) که هر دو در مراحل قبلی توسط جفت آنزیم مشترک *XhoI* و *BamHI* هضم و خالص سازی شدند، توسط نانودراپ تعیین شد و سپس بر اساس طول هر سازه، وزن مولی هر یک محاسبه و در نهایت قطعه و ناقل با نسبت مولی ۳ به ۱ برای انجام واکنش الحاق مورد استفاده قرار گرفت. واکنش الحاق پس از خالص سازی محصولات هضم با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز (Roche) صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب حاصل به منظور تکثیر به باکتری *شرشیاکلی* سویه DH5α وارد شد و بر روی محیط کشت LB-Agar حاوی ۱۰۰ μg/ml آمپی سیلین کشت داده شد. غربالگری و انتخاب کلونی حاوی ژن هدف با استفاده از واکنش کلونی PCR و هضم دو آنزیمی انجام شد. ناقل بیانی pET32-InvG جهت بررسی چارچوب خوانش صحیح با استفاده از آغازگرهای عمومی T7 promoter و T7 terminator جهت توالی یابی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شد. سپس ناقل بیانی نوترکیب به میزبان بیان *شرشیاکلی* BL21(DE3) منتقل شد و تک کلونی نوترکیب به مدت ۱۶ ساعت در ۳ میلی لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. یک میلی لیتر از محیط کشت تهیه شده به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی آمپی

گونیاز پلاسمید pET32-InvG به درستی به میزبان اشرشیاکلی BL21(DE3) منتقل گردید و جهت تأیید صحت الحاق و طول قطعه کلون شده، با استفاده از پلاسمید نوترکیب استخراج شده به عنوان الگو، واکنش کلونی PCR به وسیله آغازگرهای T7 promoter و T7 terminator و هضم آنزیمی با آنزیم های *BamHI* و *XhoI* انجام شد. نتیجه کلونی PCR و هضم دو آنزیمی صحت انجام واکنش الحاق را تأیید کرد (شکل ۳). الکتروفورز پروتئین های تولیدی پس از القاء و بیان، باند پروتئینی قابل توجهی را در محدوده وزنی ۸۱ کیلو دالتون نشان داد (شکل ۴). وزن مولکولی پروتئین نوترکیب با مقدار تخمین زده شده در نرم افزار 5 CLC Workbench همخوانی داشت. در سال ۱۹۹۴ وزن پروتئین نوترکیب InvG حدود ۶۲/۲۷۵ کیلو دالتون گزارش شده است (Kaniga., 1994). در سال ۱۹۹۸ قطعه ژن تخلیص شده InvG از سالمونلا تیفی موریوم SJW1103 در پلاسمید pAR3040 کلون شد، در آن گزارش تولید پروتئین نوترکیب InvG در پلاسمید PAMCG1 و در باکتری *E. coli* C41(DE3) انجام شده بود که وزن آن را ۶۲ کیلو دالتون نشان داد، در آن گزارش عنوان شده میزان پروتئین نوترکیب InvG تحت تاثیر بیان ژن InvH افزایش یافته است (Aimee et al., 1998).

گونیاز پلاسمید pET32-InvG به درستی به میزبان اشرشیاکلی BL21(DE3) منتقل گردید و جهت تأیید صحت الحاق و طول قطعه کلون شده، با استفاده از پلاسمید نوترکیب استخراج شده به عنوان الگو، واکنش کلونی PCR به وسیله آغازگرهای T7 promoter و T7 terminator و هضم آنزیمی با آنزیم های *BamHI* و *XhoI* انجام شد. نتیجه کلونی PCR و هضم دو آنزیمی صحت انجام واکنش الحاق را تأیید کرد (شکل ۳). الکتروفورز پروتئین های تولیدی پس از القاء و بیان، باند پروتئینی قابل توجهی را در محدوده وزنی ۸۱ کیلو دالتون نشان داد (شکل ۴). وزن مولکولی پروتئین نوترکیب با مقدار تخمین زده شده در نرم افزار 5 CLC Workbench همخوانی داشت. در سال ۱۹۹۴ وزن پروتئین نوترکیب InvG حدود ۶۲/۲۷۵ کیلو دالتون گزارش شده است (Kaniga., 1994). در سال ۱۹۹۸ قطعه ژن تخلیص شده InvG از سالمونلا تیفی موریوم SJW1103 در پلاسمید pAR3040 کلون شد، در آن گزارش تولید پروتئین نوترکیب InvG در پلاسمید PAMCG1 و در باکتری *E. coli* C41(DE3) انجام شده بود که وزن آن را ۶۲ کیلو دالتون نشان داد، در آن گزارش عنوان شده میزان پروتئین نوترکیب InvG تحت تاثیر بیان ژن InvH افزایش یافته است (Aimee et al., 1998).

نتایج و بحث

کلونینگ ژن InvG در ناقل pTZ57R/T

نتایج واکنش PCR، تکثیر ژن باکتری InvG سالمونلا تیفی موریوم استفاده شده در این پژوهش را تأیید کرد. برای قطعه ژنی InvG باندی به طول ۱۶۸۹ جفت باز روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۱). ناحیه کد کننده InvG روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی به طول ۱۶۸۹ جفت باز، به خوبی تکثیر شده است. حضور ژن InvG در ناقل pTZ57R/T با روش کلونی PCR و هضم دو آنزیمی تأیید گردید (شکل ۲).

بیان ژن InvG در اشرشیاکلی

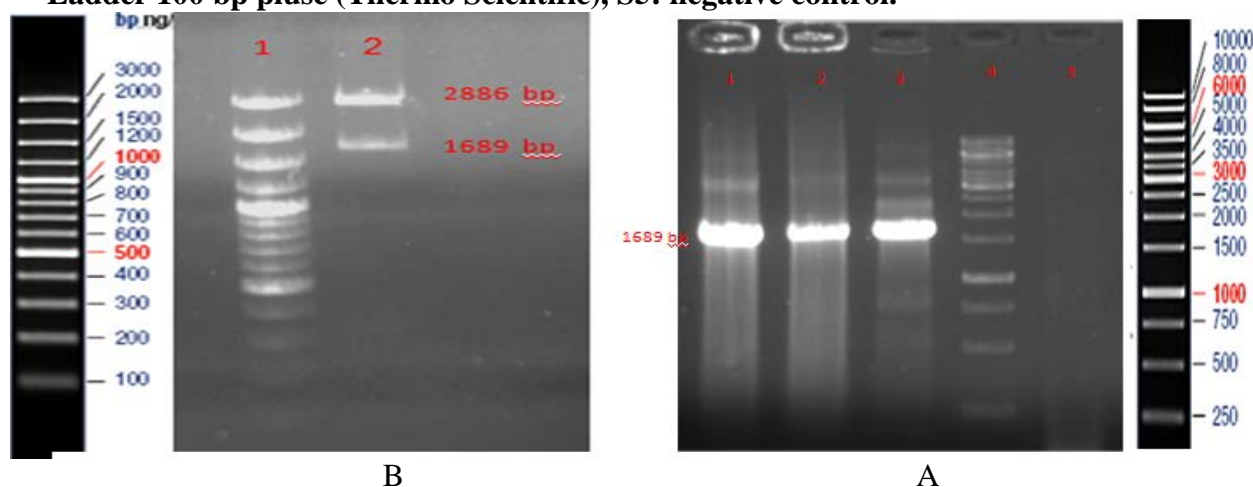
ناحیه کدکننده ژن InvG به شکل موفقیت از پلاسمید نوترکیب InvG+ pTZ57R/T توسط واکنش هضم دو آنزیمی انجام و از ژل تخلیص گردید. فرآورده خالص سازی شده، که حاوی جایگاه های برشی برای آنزیم های *BamHI* و *XhoI* بود، در جایگاه همسانه سازی ناقل pET32a(+) با موفقیت الحاق شد. محصول

¹ Horseradish Peroxidase



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی ژل آگارز (یک درصد) برای تکثیر قطعه‌ای ژنی *InvG* باکتری *سالمونلا* با آغازگرهای لینکر دار، ستون‌های ۱ و ۳ و ۴ قطعه‌ای ژنی *InvG*، ستون ۲ نشانگر 100 bp (Thermo Scientific)pluse و ستون ۵ کنترل منفی.

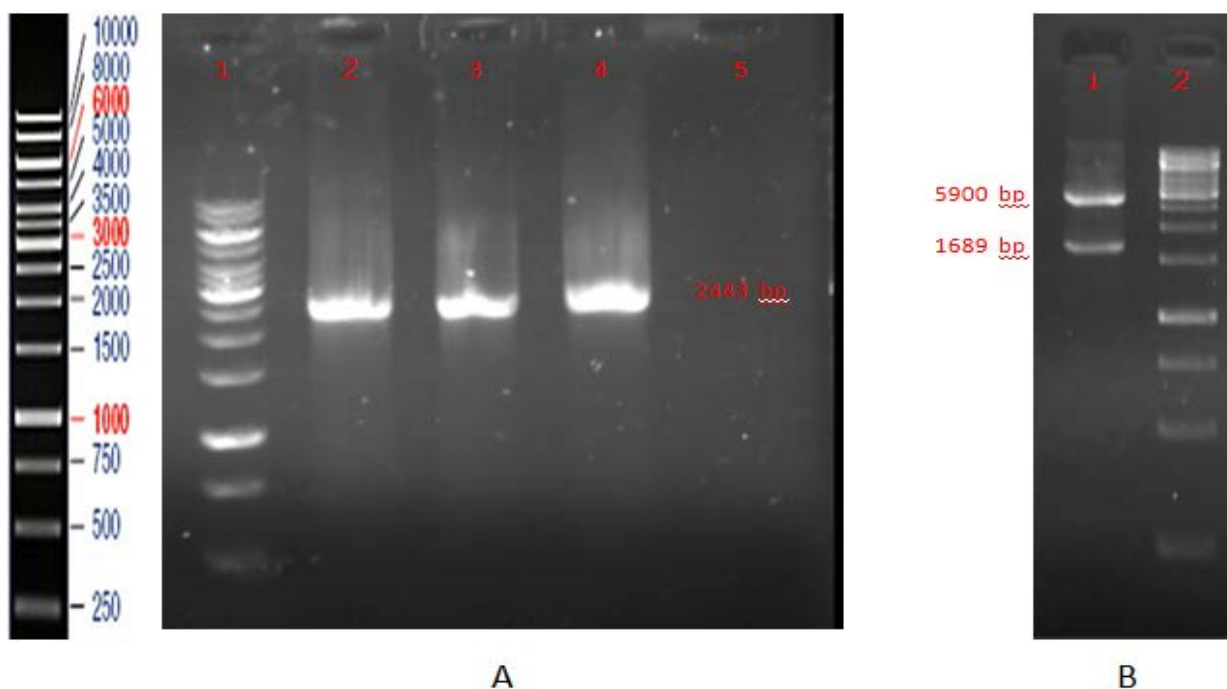
Figure 1- Agarose gel electrophoresis pattern (%1) of PCR products *InvG* gene of *Salmonella* with linker primer. The S1& S3, S4: *InvG* PCR Product (1689bp), S2: DNA Ladder 100 bp pluse (Thermo Scientific), S5: negative control.



شکل ۲- A- الگوی الکتروفورزی ژل آگارز (یک درصد) واکنش کلونی PCR، ستون ۱ و ۲ و ۳ کلونی PCR، ستون ۴ نشانگر 1kb (Thermo Scientific) 1kb- B. ستون ۱- نشانگر 100 bp (Thermo Scientific) pluse و ستون ۲: هضم دو آنزیمی *pTZ57R/TP1- InvG*.

Figure 2: Figure A- Agarose gel electrophoresis pattern (%1) of action clony PCR. The S1 & S2, S3: clony PCR, S5:negative control, S4: DNA Ladder 1kb (Thermo Scientific).

Figure B- S1: DNA Ladder 100 bp pluse (Thermo Scientific), S2: Double digest of *pTZ57R/TP1- InvG*.

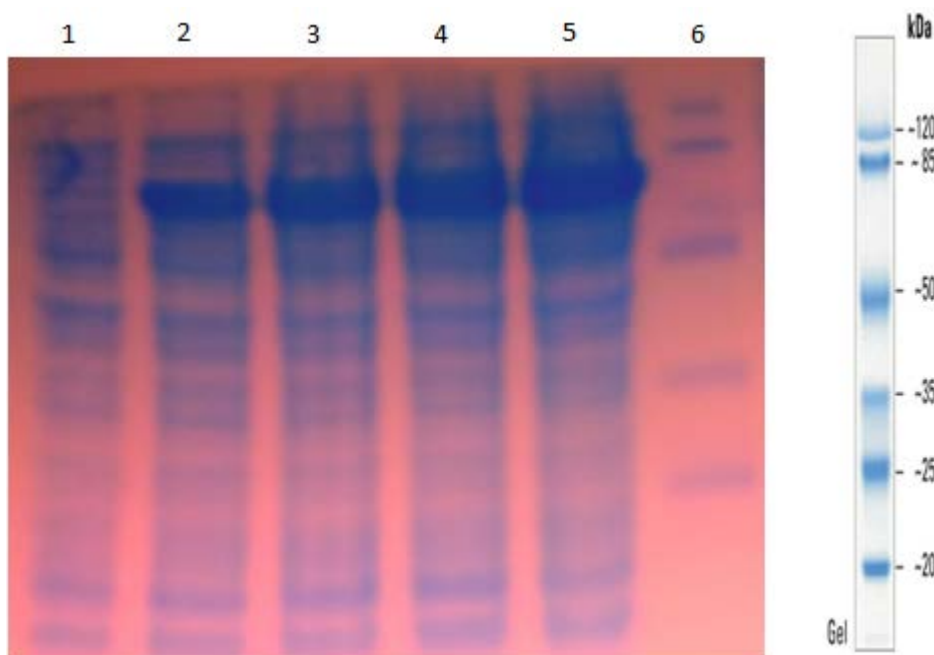


شکل ۳- الگوی الکتروفورزی ژل آگارز (یک درصد) کلونی PCR و هضم دو آنزیمی پلاسمید نوترکیب. شکل A- ستون ۱ نشانگر 1kb (Thermo Scientific)، ستون ۲ و ۳ و ۴ کلونی PCR با آغازگر اختصاصی T7 و ستون ۵ کنترل منفی. شکل B- ستون ۱ هضم دو آنزیمی، ستون ۲ نشانگر (Thermo Scientific) 1kb.

Figure 3- Agarose gel electrophoresis pattern (%1) of clony PCR and double digestion. Figure A – The S1: DNA Ladder 1kb (Thermo Scientific), S2& S3, S4: clony PCR. Figure B – S1: Double digest of pET32a-InvG, S2: DNA Ladder 1kb (Thermo Scientific).

نمونه صفر که مربوط به زمان قبل از القاء با IPTG می باشد، بیان نشده است (شکل ۴). مراحل تخلیص پروتئین نوترکیب تحت شرایط دناتوره طبق پروتکل استاندارد انجام گرفت. مقدار ۲۵ میکرولیتر از محصول هر مرحله برداشته و برای الکتروفورز SDS-PAGE روی ژل ۱۲ درصد استفاده شد.

در مرحله بعد پس از کشت باکتریها و القاء با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت. پس از شکست باکتریها، سوسپانسیون حاصله روی ژل SDS-PAGE منتقل شد و به کمک نشانگر پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب و نواحی اضافه شده به آن توسط ناقل بیانی (مجموعاً ۸۱ کیلودالتون) از ژل ۱۲ درصد استفاده شد. نتایج نشان داد که پروتئین مورد نظر در نمونه القاء شده، بیان شده، ولی در



شکل ۴- الگوی الکتروفورزی ژل SDS-PAGE پروتئین نوترکیب InvG استخراج شده از باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3). ستون ۱ تا ۵ به ترتیب مربوط به زمان های (ساعت) صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ می- باشد.

Figure 4- SDS-PAGE gel electrophoresis pattern of the recombinant protein InvG in *E. coli* BL21 (DE3). S1:Negative control, S2, S3, S4,S5 cell extracts from *E. coli* BL21 (DE3) cultured for 1, 2, 3 and 4 hours after 1 mM IPTG induction and lane S6, Molecular mass markers.

صورت حفاظت شده وجود دارد و به عنوان عامل آنتی ژنیک این باکتری، به نظر می رسد یک کاندیدای مهم برای کلونینگ و بیان این ناحیه ژنی و استفاده از آن به عنوان یک ادجوانت موثر برای تحقیقات DNA واکسن مورد استفاده قرار گیرد. تولید پاسخ قوی سیستم ایمنی و القای هر دو ایمنی هومورال و سلولی در برابر آنتی ژن واکسن، به شدت در فرمولاسیون با ادجوانت بستگی دارد (Wang et al., 2011).

جهت تایید تولید پروتئین نوترکیب در باکتری BL21(DE3) از روش دات بلائینگ استفاده شد. حضور شش اسید آمینه هیستیدین در ابتدایی ژن CagA که از ناقل بیانی به ژن هدف اضافه گردیده، به عنوان نشانگر استفاده شد. حضور نقطه های رنگ شده بر روی کاغذ نیتروسلولز تایید حضور پروتئین نوترکیب تولید شده می باشد. پروتئین InvG یک پروتئین غشاء خارجی بوده و در تمامی سویه های سالمونلا به



شکل ۵- آنالیز دات بلات پروتئین نوترکب InvG. ۱- BL21/ InvG، ۲- کنترل منفی.

Figure 5- Dot blot analysis of recombinant protein InvG. S1: BL21/ InvG, S2: negative control.

ژن و خالص سازی پروتئین حاصل، برچسب هیستدین را می توان با استفاده از پروتئاز ترومبین از انتهای آمین پروتئین هدف حذف کرد. در پژوهشی دیگر به علت بیان بهتر پروتئین نوترکب در pET-32a(+) و ویژگی های ذکر شده، از آن استفاده شده است (Arbabi *et al.*, 2012). در مطالعه ای نشان داده شده که پروتئین نوترکب CagA از هلیکوباکتر پیلوری در حامل بیانی pET-32a(+) و در میزبان اشریشیاکلی با موفقیت بیان شد. در این تحقیق ذکر گردیده که پروتئین نوترکب CagA آنتی ژنسیته خود را حفظ کرده و می تواند برای تشخیص سرولوژیک بیماری هلیکوباکتر پیلوری و تولید واکسن مورد استفاده قرار گیرد (Farjadi *et al.*, 2013). در مطالعه ای دیگر عنوان شده، بیان ژن flic از سالمونلا تیفی موریوم در پلاسمید نوترکب

بدین منظور در این پژوهش، تولید پروتئین نوترکب InvG در باکتری اشریشیاکلی به شکل نوترکب با استفاده از ناقل پلاسمیدی سیستم pET32a(+) با موفقیت آمیز انجام گرفت. حامل های بیانی متعددی در پروکاریوتها وجود دارد که از مهمترین آنها می توان به PET21a(+), PET28, a(+) و pET32a(+) اشاره کرد، که از این میان pET32a(+) به دلیل داشتن ژن Trx دو جایگاه His.Tag و یک جایگاه S.Tag و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین بسیار پر کاربرد است. ژن TrxA دارای ۱۰۹ اسید آمینه است که این ژن با اتصال به ترکیبات انکلوژن بادی باعث محلول شدن پروتئین می شود، وجود شش His.Tag در این وکتور می تواند قدرت ما را در شناسایی پروتئین مورد نظر نسبت به سایر حامل ها دو چندان کند (Kaligh *et al.*, 2012). پس از بیان

InvG از سویه BL21(DE3) به عنوان میزبان استفاده شد. می توان نتیجه گرفت بیان مناسب InvG در این میزبان به دلیل عدم حضور پروتئازهای فوق الذکر می باشد. پروتئین تولید شده در این مطالعه، وزنی در حدود ۸۱ کیلو دالتون داشت که به علت افزوده شدن برخی پروتئین های جانبی از ناقل پلاسمیدی به پروتئین نوترکیب تولید شده، می باشد. با این حال در این مطالعه برای اولین بار، ژن InvG در pET32a بیان شد و به عنوان یک نامزد ادجوانت، جهت DNA واکسن معرفی گردید.

سپاسگزاری

این پروژه در آزمایشگاههای دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفته و بدین ترتیب از مسولان مربوطه کمال تشکر را داریم.

pVAX-flic در سلول های یوکاریوتی با موفقیت انجام گردید، در این مطالعه عنوان شده که از آن می توان به عنوان ادجوانت برای تحقیقات DNA واکسن استفاده نمود (Taherkhani *et al.*, 2014). بنابراین در پژوهش حاضر از حامل بیانی pET32a(+) که قادر است به طور اختصاصی و به میزان زیاد ژن مورد نظر را بیان کند، استفاده گردید. در گزارشی دیگر آمده است که اشرفیشیالکی به عنوان میزبان برای بیان پروتئین های نوترکیب هم در تحقیق ها و هم در صنعت به طور گسترده به کار می رود (Baneyx & Mujacic, 2004). از آنجا که میزبان های بیانی با داشتن عناصر تنظیمی مناسب و موتاسیون در پروتئازهای خود، امکان بیان بیشتر پروتئین نوترکیب را فراهم می آورند، همچنین فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی از جمله OmpT, DegP و HtpR می باشند (Kamani, 2011)، در پژوهش حاضر نیز برای تولید پروتئین نوترکیب

منابع

- Aimee M, Crago AM, Koronakis V (1998). Salmonella InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Molecular Microbiology* 30: 47-56.
- Arbabi N, Behdani M, golkar M, Aghaee bakhtiari S, Khan ahmad shahreza H, MahdianR (2012). Cloning and expression of placental growth factor protein of human -1 (hPLGF-1) in Rosetta E.coli expression system. *Medical Sciences Journal of Islamic Azad Univesity - Tehran Medical Branch* 22: 32-38.
- Baneyx F, Mujacic M (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Natural Biotechnol* Nov 22 (11): 1399-408.
- Farjadi V, Abtahi H, Zolfaghari M.R, Soufian S, Hasanzadeh L (2013). Production of recombinant CagA protein of *Helicobacter pylori*. *Arak Medical University Journal* 16: 35-44.

- Galan JE, Collmer A (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322–1328.
- Galan JE, Wolf-Watz H (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444: 567–573.
- Kaligh S, Bandehpour M, Yassaee V, Parivar K, Kazemi B (2012). Cloning, Expression and Purification CEL I Endonuclease Enzyme from Celery Plants. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 2: 79-87.
- Kamani M (2011). The expression of recombinant streptodornase in *E. coli* bacteria. *Arak Medical University Journal* 14: 96-113.
- Kaniga K J, Bossio C, Galán JE (1994). The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues to the *PulD* and *AraC* family of proteins *Molec. Microbiol* 13: 555-568.
- Lalitha, S (2000). Primer premier 5. *Biotech Software & Internet Report: The Computer Software Journal for Scientist* 1: 270-272.
- Porwollik S, Boyd EF, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, McClelland M (2004). Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *Journal of Bacteriol* 186: 5883-98.
- Sorensen HP, Mortensen KK (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal Biotechnol* 115: 113-28.
- Taherkhani R, Farshadpour F, Makvandi M, Samarbafzadeh AR (2014). Cloning of *fliC* Gene From *Salmonella typhimurium* in the Expression Vector pVAX1 and Evaluation of its Expression in Eukaryotic Cells. *Jundishapur Journal Microbiol* 7: e12351.
- Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzeby JP (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 55: 521–524.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015). Comparison of different levels of *Rheb* gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Journal of Agricultural Biotechnology* 6: 35-50.
- Wang W, Manmohan S (2011). Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency. *World Journal of Vaccines* 1: 33-78.

Cloning of InvG gene from *Salmonella Enterica* in the Expression Vector pET32a and Evaluation of its Expression in hosts BL21- DE3

Jahandar M.H.¹, Nassiri M.R.^{*2,3}, Aslaminejad A.A.⁴, Tahmoorespour M.², Haghparast A.R.⁵

¹PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

² Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

³Professor, Department of Agricultural and Animal Biotechnology, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

⁴Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

⁵Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Abstract

Salmonella is one of the causes of infectious diseases as a common disease in human and animals, has important health and economic terms, which has so far of a vaccine for it not been established. The InvG gene due to structural and Type three secretion systems as one of the primary genes located in the membrane of Bacteria also play a major role in the initial binding of the Bacteria to the host cell. The main aim of the present study was to introduce recombinant protein expression InvG as an effective adjuvant and a DNA vaccine. The design makes use of specific primers and reaction PCR, InvG gene was amplified *Salmonella*. After purification, the gene in the plasmid vector pET32a(+) cloned for expression. The recombinant plasmid pET32a-InvG into *Escherichia coli* strain became BL21-DE3. To produce recombinant protein expression system, the Bacterial expression vector containing the target gene (InvG) induced using IPTG. The results of sequencing showed that the sequence of the amplified gene cloned into pET32a expression vector for gene InvG with sequences recorded in the same gene bank. Recombinant protein production with IPTG induction to vector containing the plasmid pET32a-InvG performed successfully. Confirmation of InvG gene expression in the expression system performed by SDS-PAGE and Dot blotting analysis. The present study showed that the production of InvG recombinant in *E. coli* hosts is possible and protein with a weight of about 81 kDa was produced.

Keywords: *InvG gene, Salmonella, recombinant proteins, vector pET32a(+)*.

* Corresponding Author: Nassiri M.R.

Tel: 05138795618

Email: nassiry@gmail.com