بیان نوترکیب انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* تیپ B به عنوان کاندیدای واکسن

سید امیر حسینی [۱]، فیروز ابراهیمی [۲*]، شهرام نظریان [۲]، محمود حمیدی [۳]

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس*(*Staphylococcus aureus*)، کوکسی گرم مثبتی است که می‌تواند بیماری های مختلفی چون مسمومیت‌های غذایی، شوک های مخاطره آمیز و ... را به وجود آورد. از مهم‌ترین سموم تولید شده توسط این باکتری، انتروتوکسین نوع B یکی از معمولترین و مهم‌ترین توکسین‌های یافت شده و یک سوپر آنتی ژن می باشد. هدف از انجام این تحقیق همسان سازی و بیان این پروتئین به شکل نوترکیب جهت دستیابی به یک ساختار و منبع پایدار برای تولید آن به منظور بررسی های آینده به عنوان کاندید واکسن بود.

روش بررسی: ژن *seb* به لحاظ وجود کدون‌های نادر مورد بررسی قرار گرفت و بهینه سازی ژن با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی انجام شد. واکنش هضم آنزیمی برای تایید حضور ژن نوترکیب *seb* درون وکتور بیانی(+)pET28a انجام شد. پس از تأیید همسان سازی ژن مورد نظر، بیان نوترکیب پروتئین SEB با استفاده از القاءگر مصنوعی IPTG و همچنین تخلیص تحت شرایط طبیعی(غیردناتوره) با کمک ستون کروماتوگرافی نیکل(Ni-NTA) صورت پذیرفت. آنالیز وسترن بلات نیز برای تأیید پروتئین SEB انجام شد.

یافته‌ها: شاخص سازگاری کدون(CAI) مربوط به ژن طبیعی ۰/۶۸ بود، درحالی که این شاخص برای ژن بهینه سازی شده به ۰/۸۲رسید. درصد کدون‌های با شیوع بالا در توالی بهینه شده به ۵۷ درصد افزایش یافت. هضم آنزیمی صحت همسانه سازی ژن *seb* در وکتور (+)pET28a را تائید کرد. نتایج نشان داد که همسانه سازی ژن *seb* درون وکتور (+)pET28a در یک جایگاه مناسب بین محل‌های مورد انتظار اثر آنزیم‌های برشی انجام شده بود. همچنین ژن *seb* بعد از القاء با IPTG بیان خوب و قابل توجهی داشت. میزان پروتئین بیان شده برای هر لیتر از محیط کشت حدود ۲۲ میلی‌گرم بود. وسترن بلاتینگ، واکنش پروتئین نوترکیب با آنتی بادی ضد هیستیدین را نشان داد.

نتیجه‌گیری: سازه نوترکیب پایدار محتوی ژن *seb* تولید گردید که بیان نوترکیب قابل توجهی از پروتئین را نشان داد. بنابراین پروتئین SEB را می توان در مطالعات آینده برای بررسی میزان ایمن سازی علیه سم SEB مورد بررسی قرار داد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*(*Staphylococcus aureus*)، سم SEB، بیان نوترکیب، وسترن بلاتینگ، کاندید واکسن.

۱-دانشجوی دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی.
۲- استادیار گروه علم و فناوری زیست شناسی.
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی.

۱-مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع) تهران، تهران، ایران.
۲-مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.
۳- مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع) تهران، تهران، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
فیروز ابراهیمی؛ مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۳۰۶۸۴۶۶
Email: febrhimi@ihu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۴/۳۱ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۶/۸/۴ اعلام قبولی: ۱۳۹۶/۸/۱۴

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) یکی از شایع ترین علل مسمومیت های غذایی در بسیاری از کشورها است. این باکتری دارای توکسین های مختلفی است که در بین آنها انتروتوکسین از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و مصرف مواد غذایی آلوده به این توکسین موجب بروز مسمومیت غذایی و سندرم شوک سمی می گردد(۱, ۲). تا کنون بیش از بیست ژن کد کننده انتروتوکسین های استافیلوکوکوس شناسائی شده که انتروتوکسین های A و B به عنوان شایعترین و مهمترین آنها محسوب می شوند(۲). انتروتوکسین B به علت قابلیت جذب از طریق بینی و کاربردهای بیوتروریستی آن دارای اهمیت زیادی است(۳). انتروتوکسین B استافیلوکوکی (SEB)، سوپر آنتی ژنی با وزن مولکولی ۲۸ KDa می باشد. سوپرآنتی ژن ها، با سلول های عرضه کننده آنتی ژن(APCs) و سلول های T میانکنش داده و تکثیر سلول های T را القاء می کنند. و همچنین تولید و ترشح بسیار زیاد سیتوکین ها را باعث شده که منجر به بروز تب، راش، نشتی مویرگ ها و افت فشار خون می شود که از علائم اصلی شوک سمی می باشد(۴). با توجه به نقش پروتئین SEB در بیماری زایی باکتری *S.aureus*، می توان آن را به عنوان کاندیدی مناسب برای واکسیناسیون علیه عامل مذکور در نظر گرفت. Tseng. J و همکاران در سال ۱۹۹۵، ایمنی هومورال به SEB آئروسل شده در میمون های واکسینه شده با میکروسفیرهای حاوی توکسوئید SEB را بررسی کردند(۵). Lowell GH و همکاران در سال ۱۹۹۶، ایمنی زایی و اثربخشی بر علیه چالش کشنده آئروسلی انتروتوکسین B استافیلوکوکی در موش و میمون بوسیله تحویل عضلانی و تنفسی واکسن های توکسوئید–پروتئوزوم (Proteosome-Toxoid Vaccines) را بررسی کردند (۶). BRADLEY G. STILE's و همکاران در سال ۲۰۰۱، واکسیناسیون مخاطی با انتروتوکسین B استافیلوکوکی (SEB) نوترکیب ضعیف شده و حفاظت در یک مدل موش را بررسی کردند (۷). Ross D. LeClaire و همکاران در سال ۲۰۰۲، حفاظت در برابر سوپر آنتی ژن باکتریایی انتروتوکسین B استافیلوکوکی بوسیله واکسیناسیون غیر فعال را بررسی کردند (۸). J. Daniel Coffman و همکاران در سال ۲۰۰۲، یک نامزد واکسن نوترکیب انتروتوکسین B استافیلوکوکی (rSEB)بیان شده در باکتری اشریشیاکولی تحت کنترل رونویسی با پروموتور T7 را تولید و تخلیص کردند (۹). Tiffany Kay Inskeep در سال ۲۰۱۰، فرمولاسیون واکسن های خوراکی محرک پاسخ های آنتی بادی مخاطی و سیستمی علیه SEB در مدل بچه خوک را بررسی کرد (۱۰). Laura C. Hudson و همکاران در سال ۲۰۱۳، یک مدل چالش با استفاده از دوز ناتوان کننده انتروتوکسینB استافیلوکوکی در خوک ها را برای ارزیابی حفاظت تحت ایمن سازی با یک واکسن مشتق شده از سویا بررسی کردند (۱۱). Karin E. J. Ro¨dstro¨m و همکاران در سال ۲۰۱٤، ساختار اشعه ایکس انتروتوکسین B استافیلوکوکی (SEB) در کمپلکس با گیرنده های آن، TCR و MHC class II، که تشکیل یک کمپلکس سه تایی می دهند را ارائه دادند (۱۲). تا کنون مطالعات مختلفی در رابطه با ایمنی SEB و در ارتباط با پایداری و میزان ایمونوژنیسیتی و مسیرهای ارسال آن به بدن و ... صورت پذیرفته است. همچنین آزمایش های بالینی این واکسن پروتئینی بر روی موش، خرگوش، میمون، گوسفند، خوک و ... صورت گرفته است که در برخی موارد نتایج خوبی را در ایجاد ایمنی علیه SEB نشان داده است. در این پژوهش ابتداء آنالیز بیوانفورماتیکی لازم برای توالی ژن مورد نظر انجام شد و سپس با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب، بیان نوترکیب پروتئین SEB صورت پذیرفت و پس از تخلیص با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل– نیتریلو استیک اسید (Ni-

Archive of SID

www.SID.ir

(NTA) در نهایت برای تایید پروتئین SEB نوترکیب از تکنیک لکه گذاری وسترن استفاده شد.

روش بررسی

در این مطالعه از باکتری *E. Coli* BL21DE3 برای بیان پروتئین نوترکیب استفاده شد. همچنین جهت رشد باکتری *E.coli* از محیط کشت لوریا برتونی مایع (LB Broth) و واجد آگار استفاده گردید. از آنتی‌بیوتیک کانامایسین جهت انتخابی نمودن رشد باکتری های واجد پلاسمید نوترکیب استفاده شد. از آنزیم‌های محدودالاثر *Eco*RI و *Hind*III ساخت شرکت ترموساینتیفیک به منظور تایید حضور ژن در وکتور بیانی استفاده گردید. ترکیبات شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی DNA و پروتئین از شرکت‌های مرک، سیناژن و ترموساینتیفیک تهیه شد. همچنین از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل–نیتریلو استیک اسید (Ni-NTA) از شرکت کیاژن برای تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده شد. تهیه وکتور **pET28a**(+) حاوی ژن نوترکیب ***seb***:

ابتداء با استفاده از نرم افزارهای Rare codon analyser و Gene script (۱۳)، آنالیز توالی ژنی *seb* استخراج شده از بانک ژنی پایگاه NCBI با شماره دسترسی(AccessionNo.M11118) صورت گرفت. برای بهینه‌سازی کدون‌های ژن *seb* وحشی و تبدیل آن به کدون‌های رایج *E.coli*، آنالیزهای بیوانفورماتیکی لازم و بررسی محتوای GC این ژن، وجود کدون‌های نادر، پایداری mRNA و نیز شاخص سازگاری کدون (CAI: Codon Adaptation Index) انجام گرفت. با استفاده از نرم افزار OPTIMIZER پارامترهای ذکر شده به منظور رسیدن به بیان حداکثر در باکتری *E.coli* مطابق با الگوی کدون‌های رایج این باکتری بهینه‌سازی شد. پایداری mRNA ژن بهینه‌سازی شده با استفاده از نرم‌افزار mfold انجام شد. توالی مورد نظر، بعد از بررسی شباهت با توالی آمینواسیدی، توسط نرم‌افزار NEBcutter (۱۴) مورد آنالیز قرار گرفت و از میان آنزیم‌هایی که فاقد جایگاه برش در توالی بهینه‌سازی شده بودند، دو آنزیم *Eco*RI و *Hind*III انتخاب شدند. سازه ژنی برای سنتز و همسانه سازی آن درون وکتور pET28a(+) به شرکت Biomatic کانادا ارسال شد. تراریخت نمودن سلول های میزبان بیانی توسط وکتور **pET28a**(+) حاوی ژن نوترکیب ***seb***: سلول های مستعد *E.coli* BL21(DE3) به روش شیمیایی با استفاده از نمک های $CaCl_2$ تهیه شدند. سپس ۵۰ نانو گرم از پلاسمید نوترکیب به صورت شوک حرارتی به سلول های مستعد منتقل شد. سلول های میزبان تراریخت شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین(۸۰µg/ml) کشت داده و به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند(۱۵).

تایید ترانسفورماسیون وکتور **pET28a**(+) حاوی ژن نوترکیب ***seb*** درون باکتری ***E.coli* BL21(DE3)**:

تعداد ۲ کلنی از کلن های رشد یافته بر روی محیط انتخابی LB آگار انتخاب و به محیط LB Broth حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین(۸۰µg/ml) منتقل شدند. پس از اینکه جذب نوری سلول ها در طول موج ۶۰۰nm به ۰/۸ رسید، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت(بر اساس دستورالعمل شرکت Bioneer (کره جنوبی)) صورت پذیرفت. برای تایید حضور ژن در پلاسمید از تکنیک واکنش هضم آنزیمی استفاده گردید و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد(۱۶).

بررسی بیان پروتئین **SEB** نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی:

پس از تایید حضور وکتور pET28a(+) حامل ژن *seb* درون باکتری *E.coli* BL21(DE3)، از کلن های رشد کرده در محیط کشت LB Broth به صورت شبانه، میزان

Archive of SID

www.SID.ir

۵۰ میکرولیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB براث حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین(۴۰µg/ml) منتقل گردید. نظر به اینکه بیان ژن در سویه BL21(DE3) تحت کنترل اپرون lac می باشد، پس از اینکه جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ nm به حدود ۰/۵ رسید، از ماده القاءگر مصنوعی ایزوپروپیل-β-D-۱-گالاکتوپیرانوزید(IPTG) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار، برای القای بیان ژن مورد نظر در دمای ۳۰ درجه استفاده شد. پس از مدت ۵ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و هوادهی با سرعت ۱۵۰ rpm، سلول‌ها با سانتریفیوژ در مدت زمان ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد ترسیب داده شدند. بر اساس پروتکل شرکت QIAGEN و تحت شرایط طبیعی(غیر دناتوره)، سلول‌ها با بافر لیزکننده ($50 NaH_2Po_4$ میلی مولار، ۳۰۰NaCl میلی مولار و pH=۷/۲) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه گرماگذاری شدند. سپس سلول ها از طریق سونیکاسیون(Sonication) (قدرت ۷۰ کیلوهرتز و ۶ سیکل ۲۰ ثانیه ای سونیکاسیون در حضور یخ) شکسته شدند و سلول های لیز شده در مدت ۱۵ دقیقه با

تایید پروتئین **SEB** نوترکیب توسط لکه‌گذاری وسترن:

به منظور تایید پروتئین SEB نوترکیب از روش ایمنوبلات وسترن با استفاده از آنتی آنتی بادی کانژوگه موشی علیه دنباله هیستیدینی متصل به پروتئین SEB استفاده گردید. ابتدا عصاره سلولی نمونه القاء شده قبل و بعد از ستون نیکل بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲درصد الکتروفورز شدند. سپس فرآیند لکه گذاری وسترن بر روی کاغذ نیتروسلولز با استفاده از سیستم لکه گذاری BioRad و بافر مخصوص آن (گلایسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، ۱SDS درصد و متانول ۲۰ درصد با pH= ۸/۳) صورت پذیرفت. بلاک نمودن کاغذ نیتروسلولز به صورت شبانه با استفاده از محلول بلاکینگ حاوی ۵ درصد شیر خشک انجام شد. نمونه پس از ۳ بار شستشو در بازه های زمانی ۱۰ دقیقه‌ای توسط سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و محلول رویی شفاف حاوی پروتئین جدا گردید. نتایج بیان پروتئین نوترکیب برروی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی گردید(۱۷, ۱۸).

تخلیص پروتئین نوترکیب **SEB** به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی (ستون **Ni-NTA**):

با بررسی محلول و یا غیر محلول بودن پروتئین نوترکیب **SEB** مشخص گردید که به دلیل بیان بالا، این پروتئین هم بصورت محلول و هم بصورت کنجاله های نامحلول در سلول وجود دارد. با در نظر گرفتن این شرایط، روش غیر دناتوره برای تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده گردید. پس از آماده‌سازی رزین کروماتوگرافی، ۱ میلی‌لیتر از نمونه حاوی پروتئین از ستون گذرانده شد. در هر مرحله خروجی ستون جداگانه جمع‌آوری و نگهداری گردید. در مراحل بعدی به ترتیب بافرهای ایمیدازول ۲۰، ۴۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و در نهایت بافر **MES** با غلظت ۲۰ میلی مولار از ستون عبور داده شدند(۱۹). نتایج تخلیص پروتئین نوترکیب برروی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی گردید(۱۷).

بافر PBST، کاغذ نیتروسلولز در معرض آنتی His Tag موشی کانجوگه با رقت ۱/۲۰۰۰ به مدت ۷۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فرآیند شستشو مانند قبل تکرار شد و واکنش رنگ پذیری باند مربوط به SEB با افزودن سوبسترای آنزیم کانژوگه HRP (۱۵ سی سی تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH: ۷/۸، ۹ میلی‌گرم DAB و ۱۵ میکرولیتر H_2O_2) انجام شد. در نهایت برای توقف واکنش رنگ پذیری، محلول محتوی سوبسترا از محیط با شستشوی کاغذ توسط ddH_2O حذف گردید (۱۷).

یافته‌ها

بهینه سازی ژن کد کننده ***seb***:

توالی کد کننده ژن ***seb*** از لحاظ وجود کدون های نادر و همچنین میزان نوکلئوتیدهای C و G مورد ارزیابی قرار

Archive of SID
www.SID.ir

گرفت. برای افزایش میزان بیان پروتئین نوترکیب توالی ژن مورد نظر بهینه‌سازی شد. میزان GC این ژن از ۲۸/۲٤ (در حالت وحشی) به مقدار ٤۳/۸۵ بعد از بهینه‌سازی افزایش یافته است و در نتیجهٔ آن، میزان AT از ۷۱/۷٦ در حالت وحشی به مقدار ٥٦/۱٥ در حالت بهینه‌سازی شده، کاهش یافت. شاخص سازگاری کدون ژن قبل از بهینه‌سازی از ۰/٦۸ به ۰/۸۲ بعد از بهینه‌سازی رسیده است (نمودار۱و۲). ساختار ثانویه mRNA پس از بهینه‌سازی کدون‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان حداقل انرژی ساختار mRNA نیز ۱۷۱/۳۰- کیلوکالری بر مول بود (شکل۱). همچنین ساختارهای نامناسب که بر فرایند ترجمه پروتئین موثر هستند نیز دیده نشد.

بررسی و تایید ترانسفورماسیون وکتور (+)**pET28a** حاوی ژن نوترکیب ***seb*** درون باکتری ***E.coli* BL21(DE3)**:

پس از تراریخت نمودن و انتقال کلن های تراریخت شده توسط حامل نوترکیب به محیط کشت مایع و استخراج پلاسمید، با استفاده از واکنش‌های هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم‌های محدودالاثر *Eco*RI و *Hind*III (شکل۲)، مشخص گردید که ژن با موفقیت درون وکتور همسان سازی شده بود و ترانسفورماسیون وکتور (+)pET28a حاوی ژن نوترکیب ***seb*** درون باکتری *E.coli* BL21(DE3) بخوبی صورت گرفته است.

بررسی بیان و تخلیص پروتئین **SEB** نوترکیب:

با القای بیان پروتئین تحت کنترل اپرون lac در شرایط انکوباسیون استاندارد، سلول های القاء شده و القاء نشده جمع آوری و شکسته شدند و پس از افزودن بافر نمونه حاوی SDS ۱۰ درصد بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. نتایج نشان داد که بیان پروتئین SEB در نمونه القاء شده در مقایسه با نمونه القاء نشده بسیار مناسب و چشمگیر می باشد (شکل۳).

نتایج تخلیص آنتی ژن نوترکیب با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل نیز که در شکل(٤) آمده است، بیانگر تخلیص مناسب آن در بافرهای ایمیدازول ٤۰ و ۱۰۰ میلی مولار است.

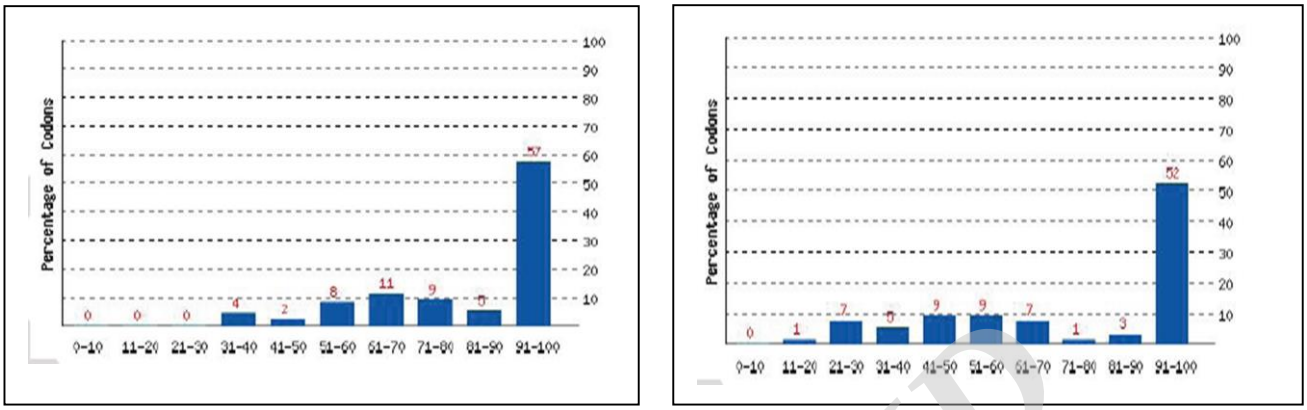
آنالیز وسترن بلاتینگ پروتئین **SEB**:

در پایان به منظور بررسی صحت پروتئین نوترکیب SEB از آنالیز وسترن بلات استفاده شد. برای این منظور باندهای رنگ گرفته مربوط به نمونه قبل و بعد از تخلیص با ستون نیکل بر روی کاغذ نیتروسلولز بررسی شد و مشخص گردید که باند رنگی مربوط به پروتئین SEB در جایگاه متناسب با وزن مولکولی مورد انتظار در مقابل باند ۲۸ کیلودالتونی نشانگر مولکولی پروتئین قرار گرفته است (شکل٥).

Archive of SID

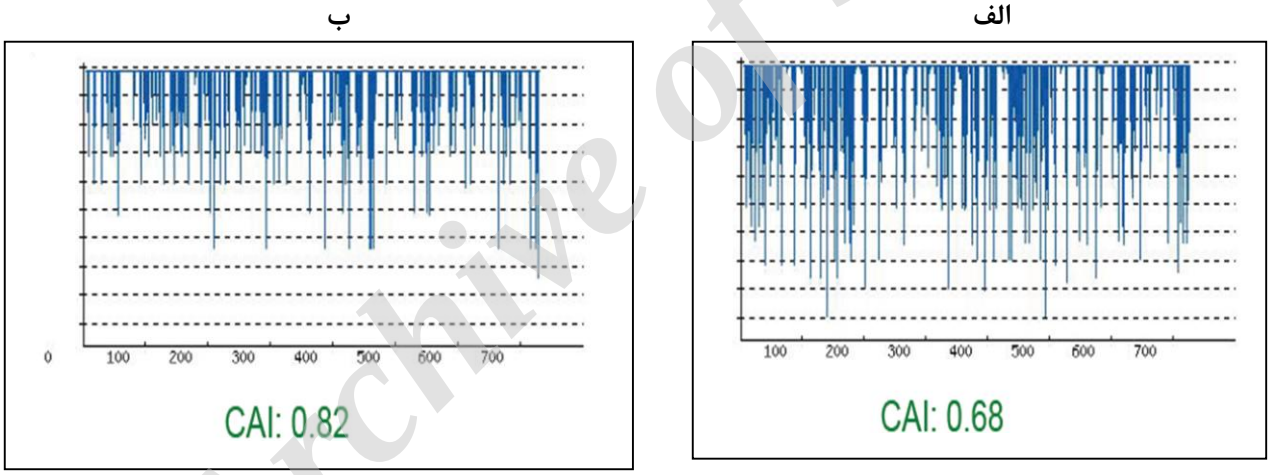
www.SID.ir

الف **ب**



نمودار ۱: درصد توزیع کدون ها مربوط به ژن وحشی *seb* (الف) و ژن بهینه سازی شده (ب). به کدون هایی که بالاترین فراوانی را دارند ارزش ۱۰۰ داده شده است.

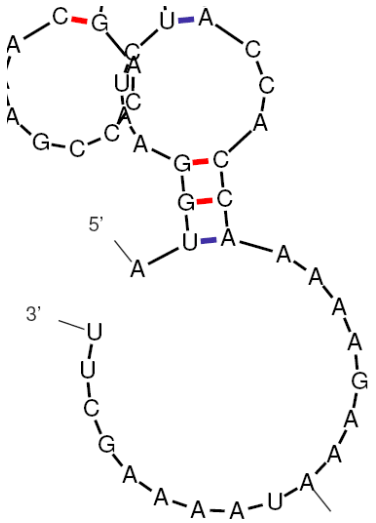
الف **ب**



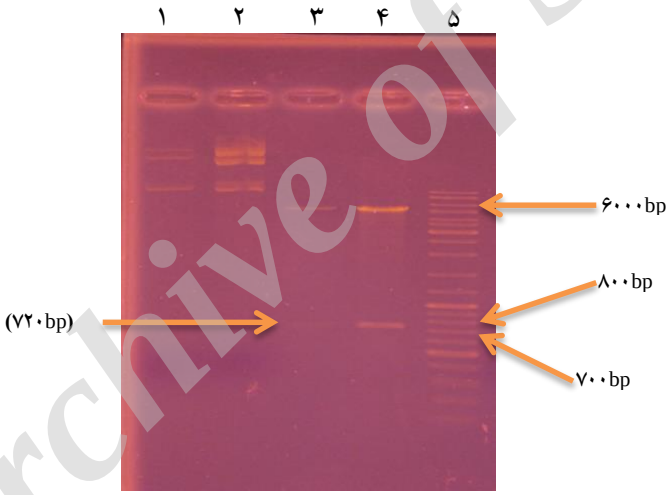
نمودار ۲: شاخص سازگاری کدون (CAI) مربوط به ژن طبیعی *seb* (الف) و ژن بهینه سازی شده *seb* (ب).

Archive of SID

www.SID.ir



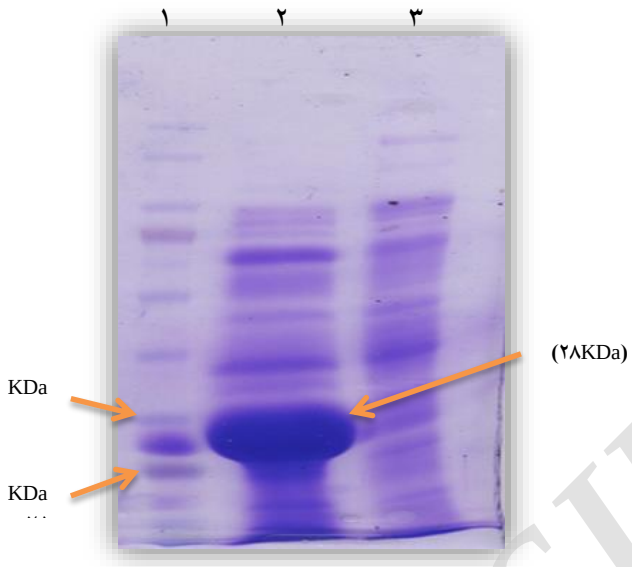
شکل ۱: پیش‌بینی ساختار ثانویه mRNA پس از بهینه‌سازی کدون های ژن *seb*. ساختار ناحیه‌ی شروع '۵ mRNA نشان داده شده است.



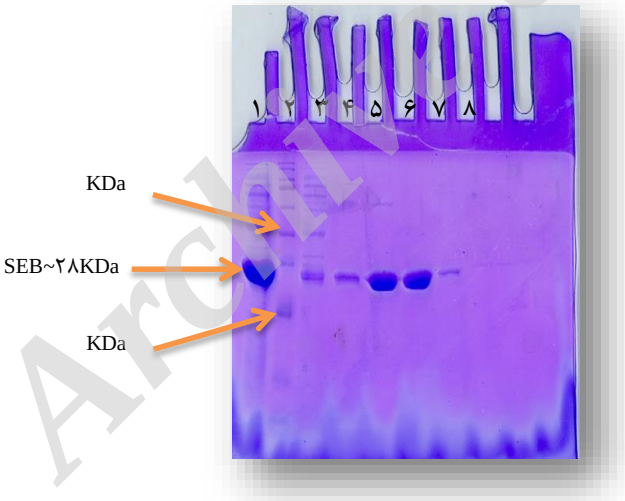
شکل۲: بررسی هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pET28a-SEB بر روی ژل آگارز ۱ درصد: ردیف۱ و ۲: وکتور pET28a-SEB برش نخورده، ردیف۳ و ۴: هضم دوگانه وکتور توسط آنزیم های *Eco*RI و *Hind*III، ردیف۵: نشانگر مولکولی DNA

Archive of SID

www.SID.ir



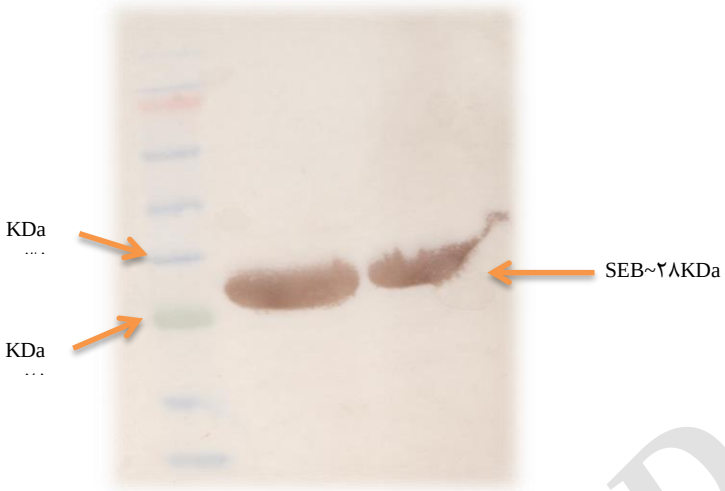
شکل۳: نتیجه بیان پروتئین SEB بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. ردیف ۱: نشانگر مولکولی پروتئین. ردیف ۲: نمونه القاء شده توسط IPTG. ردیف ۳: نمونه القاء نشده(کنترل منفی).



شکل۴: نتیجه تخلیص پروتئین SEB نوترکیب با ستون نیکل. ردیف۱: نمونه پروتئین SEB قبل از تخلیص، ردیف۲: نشانگر مولکولی پروتئین، ردیف ۳: نمونه پروتئین اولیه عبور داده شده از ستون(flow through)، ردیف۴: بافر ایمیدازول ۲۰میلی مولار، ردیف۵: بافر ایمیدازول۴۰ میلی مولار، ردیف۶: بافر ایمیدازول۱۰۰ میلی مولار، ردیف۷: بافر ایمیدازول ۲۵۰میلی مولار، ردیف۸: بافر MES

۱ ۲ ۳

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۵: نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین SEB بر روی کاغذ نیتروسلولز. ردیف ۱: نشانگر مولکولی پروتئین. ردیف ۲: نمونه القاء شده توسط IPTG قبل از تخلیص با ستون نیکل. ردیف ۳: نمونه القاء شده توسط IPTG بعد از تخلیص با ستون نیکل.

بحث و نتیجه گیری

باکتری های پاتوژن روده ای عوامل خطرناکی هستند و چنانچه تمهیداتی مناسب برای مقابله با آنها در نظر گرفته نشود می توانند عواقب جدی و جبران ناپذیری را در فرد آلوده ایجاد کنند (۲۰-۲۲). با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب می توان بخش هایی از این عوامل را که در بروز بیماریزایی به واسطه آنها نقش اساسی دارند را کلون و بیان نمود تا به عنوان کاندید واکسن میزان ایمن سازی آنها علیه آن پاتوژن مورد بررسی قرار گیرند (۲۳). *Staphylococcus aureus*نیز با تولید توکسین های مختلفی از جمله SEB که خاصیت سوپرآنتی ژنی دارد، منجر به مسمومیت های غذایی و سندرم شوک سمی (TSS) می شود (۲۴). روش‌های قدیمی تخلیص SEB بر پایه کشت انبوه باکتری و استخراج سم از آن بود. در این روش‌ها، از آنجا که امکان جداسازی SEB به صورت خالص وجود نداشت، پروتئین بدست‌آمده حاوی سایر پروتئین‌های ناخواسته بود که موجب محدودیت استفاده از آن می‌شد. در روش تولید پروتئین نوترکیب، علاوه بر کاهش خطرات ناشی از کار با عامل بیماری، پروتئین بدست آمده، خالص بوده و در ضمن تولید آن مقرون به صرفه می‌باشد به طوری که می‌توان در مدت زمان کوتاه تر و با هزینه کمتر، میزان پروتئین خالص بیشتری تولید نمود (۲۴). لذا در این مطالعه با هدف بررسی فاکتورهای دخیل در بیماری زایی پاتوژن مذکور، تلاش شد تا کاندیدی مناسب انتخاب و به شکل نوترکیب تولید شود تا در مطالعات آینده به عنوان کاندید واکسن مورد ارزیابی قرار گیرد. برای رسیدن به این هدف توالی دقیق ژن SEB از بانک ژنی اقتباس گردید و پس از آنالیز و بهینه سازی آن با نرم افزارهای ویژه، توسط شرکت Biomatic کانادا سنتز و درون وکتور pET28a(+) همسانه سازی شد. باکتری *E. Coli* یکی از اولین و وسیع‌ترین

Archive of SID
www.SID.ir

میزبان هایی است که برای تولید پروتئین های هترولوگ استفاده می شود و دارای مزایای فراوانی از جمله بیان سریع، راندمان بالای محصول و هزینه تولید کم می باشد. نظر به اینکه میزبانی که برای بیان نوترکیب پروتئین SEB مد نظر قرار گرفته بود باکتری *E. Coli* BL21 (DE3) بود لذا از وکتور pET28a(+) که با سیستم بیانی میزبان سازگار است استفاده گردید (۲۵). لازم به ذکر است که بیان پروتئین در این دسته از وکتورها تحت کنترل اپرون قوی lac می باشد که با بکار گیری آنالوگ مصنوعی آلولاکتوز (IPTG) موفق به بیان پروتئین SEB در مقدار بسیار مناسب در قیاس با نمونه القا نشده شدیم. C.Hudson L *et al* در سال۲۰۱۳ و همچنین Tiffany Kay Inskeep در سال ۲۰۱۰ نیز از همین سامانه برای همسان سازی و بیان SEB استفاده کردند و نتایج خوبی را به دست آوردند (۱۰, ۱۱). C.Hudson L *et al* در سال۲۰۱٤ نیز مطالعه ای بر روی همسانه سازی و بیان پروتئینSEB در بذور سویا داشتند که نتایخ خوبی حاصل کردند. همچنین همسان سازی و بیان فرم جهش یافته و غیر سمی پروتئینSEB در سیستم وکتور بیانی پروکاریوتی pET24b در *E. coli* BL21(DE3) توسط Coffman J.D *et al* در سال ۲۰۰۲ به شکل موفقیت آمیز انجام شده و منجر به شکل گیری ساختارهای مناسبی برای بیان پایدار آن شده است (۹). در مطالعه حاضر مقدار پروتئین بیان شده برای هر لیتر از محیط کشت مناسب و حدود ۲۲ میلی گرم بود. در پایان به منظور اطمینان از صحت پروتئین بیان شده از واکنش کیفی لکه گذاری وسترن با استفاده از آنتی His tag موشی کانژوگه علیه دنباله His tag متصل به پروتئین SEB استفاده گردید. و مشخص گردید که آنتی بادی مذکور توانست به خوبی و بدون هیچ‌گونه واکنش کراس SEB را شناسایی کند.

قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری تخصصی رشته نانوبیوتکنولوژی سید امیرحسینی می باشد که هزینه های آن توسط دانشگاه جامع امام حسین(ع) تامین گردیده است. از حوزه پژوهش و آموزش دانشگاه تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1-Tavakoli H, Jodaei A, Imani Fa, Sarshar M, Rafati H, Asadi Bab. Common Types Of Staphylococcus Aureus Enterotoxin In Meaty Foods. 2013

2-Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant and methicillin sensitive Staphylococcus aureus isolates in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(2):.9-144.

3-Norouzi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. The isolation and detection of Staphylococcus aureus enterotoxins AE and TSST-1 genes from different sources by PCR method. Qom University of Medical Sciences Journal. 2012;6(3):.85-78.

4-F. E. Non-Lethal biological toxins. IHU University of Conference of limited review by emphasizing the Non-Lethal biological threats. 2013:.16-1.

5-Tseng J, Komisar JL, Trout RN, Hunt RE, Chen J, Johnson AJ, et al. Humoral immunity to aerosolized staphylococcal enterotoxin B (SEB), a superantigen, in monkeys vaccinated with SEB toxoid-containing microspheres. Infection and immunity. 1995;63(8):.5-2880.

6-Lowell GH, Colleton C, Frost D, Kaminski RW, Hughes M, Hatch J, et al. Immunogenicity and efficacy against lethal aerosol staphylococcal enterotoxin B challenge in monkeys by intramuscular and respiratory delivery of proteosome-toxoid vaccines. Infection and immunity. 1996;64(11):.93-4686.

Archive of SID

www.SID.ir

7-Stiles BG, Garza AR, Ulrich RG, Boles JW. Mucosal vaccination with recombinantly attenuated staphylococcal enterotoxin B and protection in a murine model. Infection and immunity.2001;69(4):.6-2031.
8-LeClaire RD, Hunt RE, Bavari S. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. Infection and immunity.2002;70(5):.81-2278.
9-Coffman JD, Zhu J, Roach JM, Bavari S, Ulrich RG, Giardina SL. Production and purification of a recombinant staphylococcal enterotoxin B vaccine candidate expressed in Escherichia coli. Protein expression and purification. 2002;24(2):.12-302.
10-Inskeep TK, Stahl C, Odle J, Oakes J, Hudson L, Bost KL, et al. Oral vaccine formulations stimulate mucosal and systemic antibody responses against staphylococcal enterotoxin B in a piglet model. Clinical and Vaccine Immunology.2010;17(8):.9-1163.
11-Hudson LC, Seabolt BS, Odle J, Bost KL, Stahl CH, Piller KJ. Sublethal staphylococcal enterotoxin B challenge model in pigs to evaluate protection following immunization with a soybean-derived vaccine. Clinical and Vaccine Immunology.2013;20(1):.32-24.
12-Rödström KE, Elbing K, Lindkvist-Petersson K. Structure of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B in Complex with TCR and Peptide–MHC Demonstrates Absence of TCR–Peptide Contacts. The Journal of Immunology. 2014;193(4):.2004-1998.
13-Stothard P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences .2000.
14-Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic acids research. 2003;31(13):.91-3688.
15-Sambrook J. Russell DW: Molecular cloning: a laboratory manual. 2001. CSHL, New York3.
16-Bakhshi M ,Ebrahimi F, Zargan J, Nazarian S, Sheikhzade V. Cloning and Recombinant Expression of EspA as a Virulence Factor of E. coli O157: H۷. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2014;24(117):.20-12.
17-Bollag DM, Edelstein SJ, Rozycki MD. Proteins methods1996.
18-Rapley R. The nucleic acid protocols handbook: Springer Science & Business Media; 2000.
19-Daniel M, Rozycki M, Edelstein S. Affinity chromatography. Protein methods New York: Wiley-Liss. 1996.
20-dos Reis RS, Horn F. Enteropathogenic Escherichia coli, Samonella, Shigella and Yersinia: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. Gut pathogens. 2010;2(1):.8.
21-Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiological research. 2014;169(30-2):.12-205.
22-Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. Journal of microbiological methods. 2012;90(1):.45-36.
23-Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology advances. 2009;27(3):.306-297.
24-Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins. 2010;2(8):.97-2177.
25-Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Current opinion in biotechnology. 1999;10(5):.21-411.

Archive of SID

www.SID.ir

Recombinant Expression of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Type B as a Vaccine Candidate

Seyed Amir Hosseini[1], Firouz Ebrahimi[2*], Shahram Nazarian[2], Mahmud Hamidi[3]

1-PhD Student in Nanobiotechnology.
2-Assistant Professor of Biology.
3-MSc Student in Cellular and Molecular biology.

1-Biology Research Center, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
2-Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
3-Biology Research Center, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

**Corresponding author:*
Firouz Ebrahimi; Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
Tel: +989123068466
Email: febrhimi@ihu.ac.ir

Abstract

Background and Objective: *Staphylococcus aureus* is a gram-positive cocci that causes many diseases, such as food poisoning, risky shocks. Entrotoxins are the most important toxins of the bacteria. Among them, enterotoxin type B is the most common and important ones which is a super antigen. The aim of this study was the cloning and recombinant expression of *seb* gene in order to achieve a stable construct for the protein production and further use as a vaccine candidate in future investigations.

Subjects and Methods: *seb* gene was analyzed for rare codons and gene optimaztion was performed using bioinformatic softwares. Enzymatic digestion was performed to confirm the presence of the *seb* gene into pET28a(+) expression vector. Recombinant expression of SEB was induced by IPTG following cloning confirmation. Then, protein purification was done under non-denaturing conditions using a nickel chromatography column. Protein confirmation was performed by Western blotting analysis.

Results: Codon adaptation index (CAI) of the native gene was 0.68, while the optimized sequence had a CAI of 0.82.Percentage of codon having high frequency distribution was improved to 57%. Restriction analysis confirmed the cloning of the *seb* gene into pET28a vector. The results showed that the cloning of *seb* gene in pET28a(+) vector was performed in an appropriate position between expected restriction sites. In addition, SEB had a good and significant expression after induction by IPTG. The total yield of purified protein was 22mg/L. Western blotting showed specific reactivity of recombinant protein with anti-his tag antibody.

Conclusion: Stable recombinant construct containing *seb* gene was constructed and appropriate recombinant expression of the protein was observed. So, this protein could be used in future studies as a vaccine candidate against SEB toxin of *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, SEB toxin, Recombinant expression, Western blotting, Vaccine candidate.

►*Please cite this paper as:*
Hosseini SA, Ebrahimi F, Nazarian Sh, Hamidi M. Recombinant Expression of Staphylococcus Aureus Enterotoxin Type B as a Vaccine Candidate. Jundishapur Sci Med J 2017; 16(6):653-664..

Received: July 22, 2017 **Revised: Oct 26, 2017** **Accepted: Nov 5, 2017**

Archive of SID
www.SID.ir