مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹
صفحات: ۱۵۴-۱۴۹

Kowsar Medical Journal
Vol. 15, No. 3, Fall 2010
Pages: 149-154

# جداسازی، شناسایی و همسانه‌سازی جایگاه انتقال‌دهنده اگزوتوکسین آسودوموناس آئروژینوزا

ابراهیم بیات[۱] *MSc*، مهدی کمالی[*] *PhD*، علی زارعی محمودآبادی[۲] *PhD*، یوسف مرتضوی[۳] *PhD*، آزاده ابراهیم حبیبی[۴] *PhD*، بهرام امینی[۱] *MSc*، حمیدرضا جوادی[۵] *MSc*، نیما فرهادی[۵] *MSc*، مهدی حاج اجاق فقیهی[۶] *MSc*

[*]مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۳]گروه ژنتیک و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، زنجان، زنجان، ایران
[۴]مرکز تحقیقات متابولیسم و غدد درون‌ریز، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۵]مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۶]گروه پزشکی بالینی، بیمارستان ولی‌عصر، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

## چکیده

**اهداف:** اگزوتوکسین A *سودوموناس آئروژینوزا* از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی این باکتری است. اگزوتوکسین A از سه دومن اتصال‌دهنده، انتقال‌دهنده و کاتالیتیک تشکیل شده است. این سم از طریق ریبوزیله‌کردن فاکتور EF-2 پروتئین‌سازی باعث مهار سنتز پروتئین در سلول‌های یوکاریوت می‌شود. دومین انتقال‌دهنده نقش مهمی در انتقال سم به داخل سلول دارد. هدف از این مطالعه تولید نوترکیبی دومن انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A جهت تولید آنتی‌بادی علیه آن بود.

**مواد و روش‌ها:** باکتری از بیماران بستری دچار سوختگی بیمارستان آیت‌ا... موسوی زنجان، جدا و با آزمایشات بیوشیمیایی گونه سودوموناس شناسایی شد. DNA باکتری استخراج و وجود ژن اگزوتوکسین A روی کروموزم باکتری از طریق PCR تایید شد. دومن انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A توسط PCR تکثیر و محصول PCR روی ناقل pET28a کلون شد. کلون‌ها از طریق PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی غربالگری شدند. پروتئین نوترکیب از طریق SDS-PAGE و وسترن‌بلاتینگ با آنتی‌بادی اختصاصی مورد تایید قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج PCR و برش آنزیمی نشان‌دهنده همسانه‌سازی ژن دومن انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A بود. همچنین توالی‌یابی بازهای دومن انتقال‌دهنده با اطلاعات بانک ژنی یکسان بود. بیان پروتئین نوترکیب دومن انتقال‌دهنده در غلظت یک میلی‌مولار IPTG، مدت زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از بیان پروتئین نشان‌دهنده بیان بالای پروتئین نسبت به *سودوموناس آئروژینوزا* است و از آنجا که کل سم اگزوتوکسین A جهت تولید واکسن ضروری نیست، پروتئین نوترکیب می‌تواند جهت تولید واکسن استفاده شود.

**کلیدواژه‌ها:** *سودوموناس آئروژینوزا*، کلونینگ، اگزوتوکسین A، دومن انتقال‌دهنده

# Isolation, determination and cloning of translocation domain of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*

**Bayat E.[1] *MSc*, Kamali M.* *PhD*, Zare'ei Mahmoodabadi A.[2] *PhD*, Mortazavi Y.[3] *PhD*, Ebrahim Habibi A.[4] *PhD*, Amini B.[1] *MSc*, Javadi H. R.[5] *MSc*, Farhadi N.[5] *MSc*, Haj Ojagh Faghihi M.[6] *MSc***

*Nano-Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]Department of Biology, Faculty of Basic sciences, Sciences & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Department of Genetics & Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[4]Endocrinology & Metabolism Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5]Nano-Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6]Department of Clinical Medicine, Vali-e-Asr Hospital, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

## Abstract

**Aims:** *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A is an important virulence factor of this bacterium. Exotoxin A is made of three domains: binding domain, translocation domain and catalytic domain. Exotoxin A inhibits protein synthesis by ADP-ribosylating EF-2 factor in eukaryote cells. Translocation domain has an important function in translocation of toxin into the cell. Purpose of this study was to product recombinant domain of translocation for antibody production against it.

**Materials & Methods:** *Pseudomonas aeruginosa* samples were isolated from burnt inpatients of Moosavi Hospital in Zanjan and were identified by biochemistry tests. Bacteria genomic DNA was extracted and Exotoxin A presence was approved by PCR. Translocation domain of Exotoxin A was reproduced by PCR and PCR products were cloned in a pET28a plasmid. Clones were sequenced, screened and enzyme-digested by PCR. Recombinant protein was approved by SDS-PAGE and western blotting with its specific antibody.

**Results:** PCR and enzyme digestion results approved the cloning of translocation domain of Exotoxin A and results of Exotoxin A translocation domain sequencing was the same as the Gene Bank database. Expression of recombinant translocation domain protein was determined in IPTG 1mM concentration incubated at 37°C for 12 hours.

**Conclusion:** Expression of recombinant protein is higher than *Pseudomonas aeruginosa.* The whole toxin is not necessary for vaccine production and this recombinant protein can be used instead.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, Cloning, Exotoxin A, Translocation Domain

نویسنده مسئول: مهدی کمالی. تمام درخواست‌ها باید به نشانی mehkamali@bmsu.ac.ir فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۹/۱/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۸

Archive of SID
www.SID.ir

## مقدمه

*سودوموناس آئروژینوزا* از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های ثانویه اکتسابی از بیمارستان در بیماران دچار سوختگی است. یکی از فاکتورهای بیماری‌زا در این باکتری، اگزوتوکسین A است [۱، ۲]. اگزوتوکسین A از ۶۱۳ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۶۶ کیلودالتون تشکیل شده است که توسط باکتری به محیط پیرامون آن ترشح می‌شود [۳، ۴]. اسیدآمینه لیزین در انتهای کربوکسیل اگزوتوکسین A توسط کربوکسیل‌پپتیداز شکسته شده و باعث اتصال سم به گیرنده CD91 در سلول‌های یوکاریوت می‌شود [۵]. سپس از طریق آندوسیتوز وارد سلول شده، توسط پروتئازهای ویژه اندوزوم شکسته و از رسپتور جدا می‌شود. پیوندهای دی‌سولفیدی آن، احیا [۶] و از انتهای کربوکسیل اگزوتوکسین A، یک قطعه (۶۱۳–۲۸۰ اسیدآمینه‌ای) جدا شده و به شبکه آندوپلاسمی وارد می‌شود و در نهایت از شبکه آندوپلاسمی به سیتوزول انتقال می‌یابد [۷، ۸]. اگزوتوکسین A در سیتوزول از طریق ریبوزیله‌کردن برگشت‌ناپذیر اسیدآمینه هیستیدین فاکتور طویل‌سازی ۲ (eEF-2) باعث غیرفعال‌شدن آن می‌شود. در نتیجه سنتز پروتئین متوقف و مرگ سلول صورت می‌گیرد [۹].

اگزوتوکسین A واجد ۳ دومین است. دومین I از دو دومین Ib و Ia تشکیل شده است. دومین Ia مسئول اتصال به گیرنده سلولی است، اما نقش دومین Ib هنوز مشخص نشده است [۱۰]. دومین II باعث عبور سم از عرض غشای سلول شده [۱۱] و دومین III باعث ریبوزیله‌شدن فاکتور طویل‌سازی ۲ (eEF-2) می‌شود [۱۲، ۱۳].

ژن اگزوتوکسین A روی کروموزوم باکتری قرار داشته، به همین دلیل بیش از ۹۰٪ گونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* این سم را تولید می‌کنند [۱۴، ۱۵].

همسانه‌سازی اگزوتوکسین A و توالی‌یابی ژن اگزوتوکسین A در سال ۱۹۸۴ توسط *گرگوری* و همکاران انجام شد [۱۶]. ژن تنظیم‌کننده بیان اگزوتوکسین A در سال ۱۹۸۶ توسط *هدسترام* و همکاران مشخص شد [۱۷]. در سال ۱۹۸۷ نیز *داگلاس* و همکاران جایگاه بیان اگزوتوکسین A را تعیین کردند [۱۸]. اخیرا مطالعات زیادی روی ایمنی‌زایی و درمان تومورها از طریق این سم انجام شده است.

هدف از این مطالعه، تولید دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A به‌صورت نوترکیب برای تولید آنتی‌بادی علیه آن بود که برای اولین‌بار در ایران انجام شد.

## مواد و روش‌ها

باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* از بیماران دچار سوختگی بستری در بیمارستان آیت‌ا... موسوی زنجان جدا شدند. این نمونه‌ها با سوآپ استریل از بیماران جدا و در محیط نوترینت‌آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت کشت داده شدند. سپس باکتری توسط آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، TSI، آزمون سیترات، اندول، VP، MR و تولید پیگمان شناسایی و پس از کشت در محیط کشت LB مایع و افزودن گلیسرول (غلظت نهایی ۲۰٪) در دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

**طراحی پرایمر:** برای تشخیص وجود ژن اگزوتوکسین A روی DNA باکتری، یک جفت پرایمر و برای تکثیر دومین انتقال‌دهنده، یک جفت پرایمر دیگر واجد جایگاه‌های برش آنزیمی با توجه به اطلاعات موجود در بانک اطلاعات ژنی طراحی و سنتز شد (سیناژن، ایران). توالی‌های پرایمر بالادست و پایین‌دست تشخیص سم اگزوتوکسین A عبارت بود از:

PBF: 5′- TGC TGC ACT ACT CCA TGG TC -3′

PBR: 5′- ATC GGT ACC AGC CAG TTC AG -3′

پرایمرهای بالادست و پایین‌دست دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A با جایگاه برش آنزیم‌های برش‌دهنده محدودالاثر Eco*RI* و Hind*III* عبارت بود از:

PTF:5′- ATT TC GAATTC GCG GCA GCC TGG CCG -3′

PTR:5′- ACC AC AAGCTT GCT GGC CGC GCC GG -3′

**آماده‌سازی DNA باکتری:** سوش باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط LB مایع به‌مدت ۲۴ ساعت رشد داده شد. ژنوم کروموزومی باکتری با استفاده از کیت تخلیص ژنوم High Pure PCR (Template Preparation, Roche؛ آلمان) استخراج شده و وجود ژن اگزوتوکسین A مورد تایید قرار گرفت.

**سنتز دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A:** DNA حاصل به‌کمک واکنش PCR، تکثیر شد. واکنش PCR به‌منظور تکثیر DNA در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی‌مولار از مخلوط نوکلئوتیدهای dATP، dCTP، dGTP و dTTP و ۲/۵ واحد آنزیم DNAپلیمراز PWO، ۵ میکرولیتر بافر PCR ×۱۰، $MgSo_4$ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار و ۵۰ نانوگرم از DNA تهیه‌شده، بود. دوره‌های PCR شامل مرحله واسرشته‌شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه و ۳۵ دوره سه‌مرحله‌ای شامل واسرشته‌شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، تکثیر قطعه مورد نظر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و در پایان، مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه بود. محصول PCR روی ژل آگاروز ۲٪ به کمک مارکر مولکولی مورد تایید قرار گرفت.

**آماده‌سازی محصول PCR:** هضم آنزیمی محصول PCR با کمک آنزیم Taq*I* (فرمنتاز) نیز موید دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A بود. با استفاده از دو آنزیم Eco*RI* و Hind*III* (فرمنتاز) در



Archive of SID

www.SID.ir

واکنش هضم دوگانه با ۵ میکرولیتر بافر ×۱۰، ۳۰ میکرولیتر محصول PCR و ۲ میکرولیتر از هر آنزیم در حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت تا انتهای چسبناک در ′۳ و ′۵ ایجاد شود.

محصول برش‌خورده توسط کیت High Pure PCR Product Purification Kit ,Roche؛ آلمان) استخراج و روی ژل آگاروز ۲٪ با ولتاژ ۸۰ به‌مدت نیم ساعت الکتروفورز شد.

**آماده‌سازی پلاسمید:** باکتری حامل پلاسمید (pET28a) در محیط کشت LB مایع به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. پلاسمید آن براساس پروتکل استاندارد، استخراج و روی ژل آگاروز ۱٪ با ولتاژ ۱۰۰ به‌مدت نیم ساعت الکتروفورز شد. پلاسمید استخراج‌شده نیز مانند محصول PCR توسط دو آنزیم برش‌دهنده Hind*III* و Eco*RI* در شرایط یکسان به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد. محصول برش توسط کیت براساس دستورالعمل شرکت سازنده ( High Pure PCR Cleanup Micro kit, Roche؛ آلمان) استخراج و روی ژل آگاروز ۱٪ با ولتاژ ۱۰۰ به‌مدت نیم ساعت الکتروفورز شد.

**الحاق:** مخلوط ۱:۳ محصول PCR و پلاسمید برش‌خورده، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و بلافاصله به یخ منتقل شد و ۲ میکرولیتر آنزیم لیگاز $T_4$ و ۵ میکرولیتر بافر ×۱۰ به آن اضافه شد و به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۲-۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول الحاق در نهایت توسط کیت High pure PCR cleanup micro kit, Roche)؛ آلمان) به‌منظور تراریخت استخراج شد.

**تراریختی:** پلاسمیدهای نوترکیب با روش شوک الکتریکی به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه BL21(DE3) تراریخت شدند. برای این کار ابتدا سلول‌های مستعد از ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج و روی یخ به‌آرامی ذوب شدند. ۳۰ میکرولیتر از سلول مستعد با ۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب، مخلوط و به‌مدت یک دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس از طریق شوک الکتریکی به سلول‌های *E. coli* BL21(DE3) انتقال یافتند و روی آن محیط SOC مایع بدون آنتی‌بیوتیک اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. باکتری‌های رشدکرده با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و در محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۳۰ میکروگرم بر لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌صورت چمنی کشت شدند.

**غربالگری:** کلون‌های حاوی قطعه مورد نظر، به‌کمک PCR و هضم آنزیمی و در نهایت با توالی‌یابی تایید شدند. برای غربالگری، کلون‌های حاصل روی محیط کشت LB مایع حاوی کانامایسین (۸۰ میکروگرم بر لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ کشت شدند. پلاسمید باکتری با روش لیز قلیایی استخراج و مطابق روش قبلی، PCR انجام شد. پلاسمیدهای مثبت با روش برش آنزیمی با آنزیم‌های Eco*RI* و Hind*III* و محصول PCR با آنزیم Taq*I* مورد هضم قرار گرفتند. در نهایت توالی تراریخت‌شده توسط پرایمرهای T7 ناقل و پرایمرهای طراحی‌شده به‌منظور تکثیر دومین انتقال‌دهنده توسط مرکز تحقیقات ژنتیک یکی از دانشگاه‌های علوم پزشکی شهر تهران و شرکت سیناژن توالی‌یابی شد.

**بیان پروتئین مورد نظر:** از کشت شبانه کلون‌های جداسازی‌شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع، تلقیح شد و پس از رسیدن OD به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ایزوپروپیل B-D- تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی یک میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس نمونه‌های قبل و بعد از القا، پس از شکستن سلول‌ها به کمک سونیکاتور با توان ۷۵ به‌مدت ۱۵ ثانیه، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی جدا شده و رسوب در اوره ۸ مولار به‌مدت ۳۰ دقیقه روی یخ حل شد. محلول حاصل دوباره به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و به کمک ژل SDS-PAGE ۱۵٪ مورد آنالیز قرار گرفت. برای تایید پروتئین مورد نظر از وسترن‌بلاتینگ با آنتی‌بادی اختصاصی His-Tag استفاده شد.

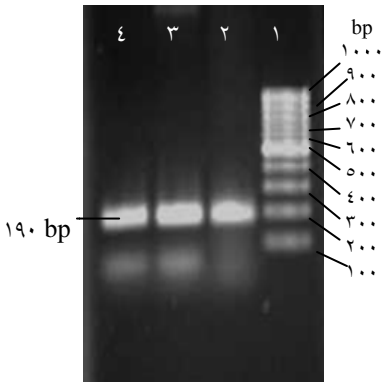
## نتایج

پس از شناسایی باکتری با روش‌های بیوشیمیایی، DNA باکتری استخراج و وجود ژن اگزوتوکسین A روی کروموزوم باکتری با روش تکثیر به‌کمک PCR و الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪ مشخص شد که در شکل ۱ مشاهده می‌شود. سپس دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A از طریق PCR، تکثیر و روی ژل آگاروز ۲٪ مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما همخوانی دارد (حدود ۳۳۶ جفت‌باز). در این تحقیق، از مارکر DNA ۱۰۰جفت‌بازی استفاده شد. در ادامه برای تایید بیشتر محصول PCR قبل از همسانه‌سازی از آنزیم Taq*I* استفاده شد. آنالیز کامپیوتری ترادف ژن در برنامه DNASIS نشان داد که در اثر هضم آنزیمی محصول PCR توسط آنزیم Taq*I*، دو قطعه به‌طول ۱۶۷جفت‌باز ایجاد می‌شود. نتیجه آزمایش با این امر کاملا مطابقت داشت که در شکل ۳ مشاهده می‌شود.

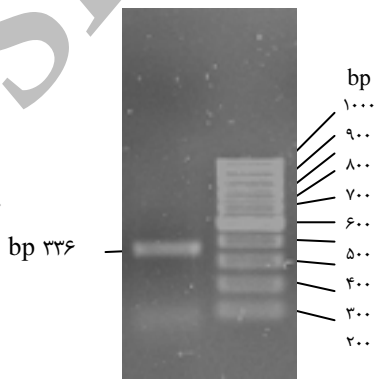
پس از الحاق قطعه مورد نظر در ناقل و تراریخت آن به داخل سلول‌های میزبان، عمل استخراج پلاسمید از کلون‌های غربال‌شده صورت گرفت و برای تایید کلون‌ها، ابتدا پلاسمیدهای نوترکیب با دو آنزیم Eco*RI* و Hind*III* که برای همسانه‌سازی مورد استفاده قرار گرفته بودند، هضم شدند و مشاهده شد که قطعه مورد نظر از پلاسمید جدا شده است که در شکل ۴ نتیجه هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب روی ژل آگاروز ۲٪ مشاهده می‌شود.



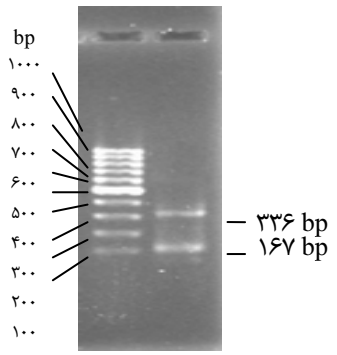
Archive of SID
www.SID.ir




**شکل ۱)** الکتروفورز محصول PCR تشخیص ژن اگزوتوکسین A روی ژل آگاروز ۲٪. ۱- نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp DNA، ۲- محصول PCR تشخیص ژن اگزوتوکسین A در باکتری شماره ۱ (قطعه ۱۹۰ bp)، ۳- محصول PCR تشخیص ژن اگزوتوکسین A در باکتری شماره ۲ (قطعه ۱۹۰ bp)، ۴- محصول PCR تشخیص ژن اگزوتوکسین A در باکتری شماره ۳ (قطعه ۱۹۰ bp)

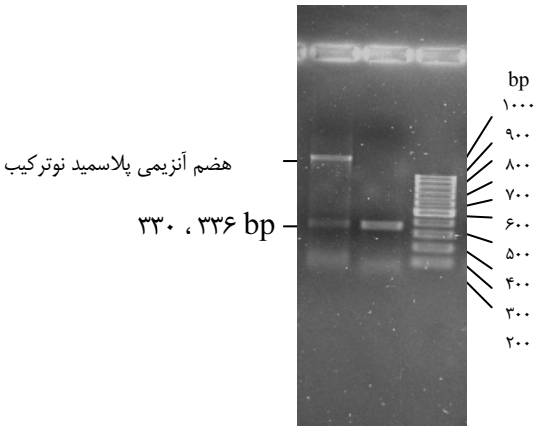



**شکل ۲)** الکتروفورز محصول PCR دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A روی ژل آگاروز ۲٪. ۱) نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp DNA، ۲) الکتروفورز محصول PCR توسط آنزیم DNAپلیمراز PWO

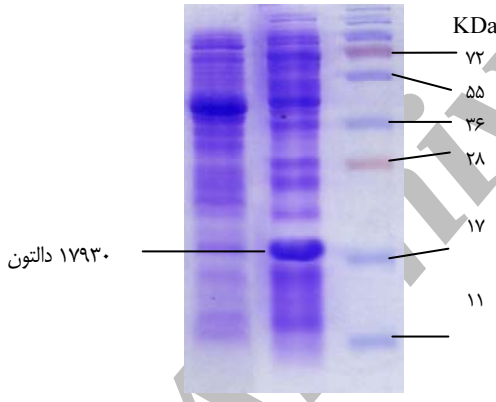



**شکل ۳)** الکتروفورز هضم آنزیمی محصول PCR روی ژل آگاروز ۲٪ ۱) هضم ناقص محصول PCR با آنزیم محدودکننده *TaqI*. تشکیل باند ۱۶۷ جفت‌بازی تاییدکننده محصول PCR است. ۲) نشانگر وزن مولکولی DNA ۱۰۰bp

همچنین برای تایید بیشتر از پلاسمیدهای استخراج‌شده، عمل PCR به کمک پرایمرهای طراحی‌شده نیز انجام پذیرفت و روی ژل آگاروز ۲٪ مورد آنالیز قرار گرفت که در شکل ۴ مشاهده می‌شود. توالی‌یابی با دو پرایمر طراحی‌شده برای دومین انتقال‌دهنده و T7 ناقل با اطلاعات بانک ژنی یکسان بود. در مرحله بیان، کلون‌های مختلف را در دو مرحله قبل و بعد از القا جمع‌آوری کرده و پس از شکستن سلول‌ها، پروتئین‌های آنها روی ژل SDS-PAGE ۱۵٪ مورد مطالعه قرار گرفت و نتیجه در شکل ۵ مشاهده می‌شود.




**شکل۴)** الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب و برش پلاسمید نوترکیب دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A سودوموناس‌آئروژینوزا بر ژل آگاروز ۲٪. ۱) نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰bp) DNA، ۲) محصول PCR دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A باند ۳۳۶ bp، ۳) برش پلاسمید نوترکیب دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A با آنزیم‌های محدودکننده Eco*RI* و Hind*III* باند ۳۳۰bp.

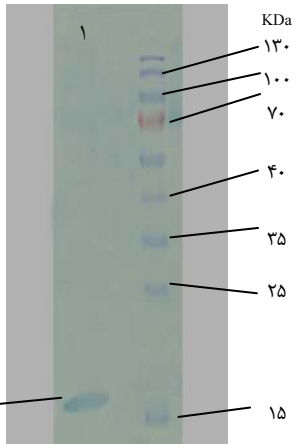



**شکل ۵ )** الکتروفورز SDS-PAGE بیان پروتئین دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A سودوموناس‌آئروژینوزا روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۵٪ . ۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ۲) کنترل مثبت بیان پروتئین با تحریک IPTG، باند ۱۷۹۳۰دالتونی نشان‌دهنده بیان پروتئین مورد نظر است. ۳) کنترل منفی بیان پروتئین بدون تحریک IPTG، عدم تشکیل باند ۱۷۹۳۰دالتونی نشان‌دهنده عدم بیان پروتئین مورد نظر است

در نمونه‌های قبل از القا در ناحیه ۱۷۹۳۰ دالتون، باندی مشاهده نشد، اما در نمونه‌های بعد از القا یک باند واضح در این ناحیه مشاهده شد که وجود مارکر، اندازه آن را تایید می‌کند. بهترین بیان پس از افزودن IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت بعد از رسیدن به جذب نوری ۰/۶٪ و انکوبه‌کردن آن به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰ دور در دقیقه به‌دست آمد.



Archive of SID
www.SID.ir




**شکل ۶)** وسترن‌بلاتینگ دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A روی کاغذ نیتروسلولزی. ۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ۲) وسترن‌بلاتینگ دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A (۱۷۹۳۰ دالتون) با آنتی His-Tag

برای تایید محصول پروتئینی از روش وسترن‌بلاتینگ نیز استفاده شد که نتیجه آن در شکل ۶ مشاهده می‌شود. در ستون آزمون که نمونه را بعد از بیان، در آن الکتروفورز کرده بودیم، یک باند واضح نزدیک به ۱۷۹۳۰ دالتون مشاهده شد. در این آزمایش در ستون قبل از القا، باندی مشاهده نشد، چون برای ظهور باندها از آنتی‌بادی ضد-His Tag متصل‌شده به یک آنزیم استفاده شده بود. میان‌کنش بسیار اختصاصی آنتی‌بادی، حضور پروتئین مورد نظر را تایید کرد.

## بحث

تا سال ۱۹۸۴ تنها منبع پروتئین اگزوتوکسین A *سودوموناس آئروژینوزا*، استخراج پروتئین از خود باکتری بود. همان‌طور که اشاره شد، *سودوموناس آئروژینوزا*، پاتوژن فرصت‌طلب و سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است. این باکتری باعث مرگ بیماران دچار سوختگی شدید و نقص سیستم ایمنی می‌شود.

سمی‌ترین پروتئین *سودوموناس آئروژینوزا*، اگزوتوکسین A است. این پروتئین اولین‌بار توسط دکتر *لو*، از *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شد [۱۹]. انتهای کربوکسیل دومین کاتالیتیک اگزوتوکسین A در *سودوموناس آئروژینوزا*، مسئول فرآیند ریبوزیل‌ترانسفرازی است. این دومین در اگزوتوکسین دیفتری در انتهای آمینی قرار دارد. هر دو سم روی eEF-2 تاثیر می‌گذارند. ولی توالی بازهای آلی و اسیدآمینه آنها با یکدیگر متفاوت است و تنها ۲۰ اسیدآمینه مشابه دارند [۲۰].

به‌علت مشکلات فراوان استخراج سم اگزوتوکسین A و همچنین ترشح پروتئازها به محیط کشت که باعث کاهش بازدهی محصول می‌شد، در ایران در سال ۱۳۸۰ در دانشکده دامپزشکی تهران، اگزوتوکسین A *سودوموناس آئروژینوزا* توسط دکتر *حسین کیوانی‌امینه* و همکاران استخراج شد. به‌علت نیاز زیاد دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A برای تولید آنتی‌بادی بر علیه آن، در این مطالعه از روش نوترکیبی به‌منظور تولید پروتئین مورد نظر استفاده شد [۲۱، ۲۲، ۲۳].

در این مطالعه باکتری از بیماران دچار سوختگی جدا و شناسایی شد. ۹۰٪ باکتری‌ها دارای سم اگزوتوکسین A بودند. ژن کدکننده دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A دارای بیشترین توالی بازی G+C (۶۸/۵٪) است. به این دلیل در هنگام طراحی پرایمر، طول پرایمرها برای کاهش دمای اتصال پرایمرها کوتاه‌تر انتخاب شد که در مطالعات دیگر که در سال ۱۹۸۴ و ۱۹۸۶ انجام شده بود نیز طول پرایمرها کوتاه‌تر انتخاب شده بود [۱۶، ۱۷]. همچنین به‌علت عدم وجود جایگاه برش روی ژنوم دومین انتقال‌دهنده باکتری، دو آنزیم Hind*III* و Eco*RI*برای برش ناقل و محصول PCR انتخاب شدند. در مطالعات دیگر در سال ۱۹۸۷ توسط *داگلاس* و همکاران نیز برای همسانه‌سازی اگزوتوکسین A از آنزیم‌های فوق استفاده شد [۴].

برای جلوگیری از شکست ژنوم باکتری در دورهای بالای سانتریفوژ، از سانتریفوژ با دور پایین استفاده شد که در مطالعات دیگر نیز از این روش استفاده شده بود یا از کیت‌هایی استفاده شده بود که فاقد مرحله سانتریفوژ بود [۱۸].

واکنش PCR با تغییر دو فاکتور اساسی غلظت منیزیوم و دمای اتصال پرایمرها به رشته الگو تنظیم شد. از پلاسمید pET28a برای همسانه‌سازی و بیان پروتئین‌های مورد نظر استفاده شد. در حالی که در مطالعات *سانج* و همکاران در سال ۲۰۰۵، از pET32a استفاده شده بود که باعث افزودن پلی‌پپتید تا ۵۰ کیلودالتون به پروتئین مورد نظر می‌شد، در حالی که در این تحقیق تنها ۵۶۱۰ دالتون به پروتئین مورد نظر اضافه شد [۱۳].

افزایش آهن محیط باعث جهش ژن *toxC* و مهار بیان اگزوتوکسین A توسط باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* می‌شود. در غلظت‌های کم آهن نیز سم تولید نمی‌شود [۲۰، ۲۱]. همچنین برخی از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* پروتئولیتیک هستند و آنزیم‌های پروتئاز ترشح‌شده به محیط کشت باعث تجزیه اگزوتوکسین A و کاهش بازدهی استخراج سم می‌شود [۲۳]. در این تحقیق با همسانه‌سازی (کلونینگ) جایگاه انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A و استخراج آن، می‌توان بر این مشکلات فایق آمد. توالی بازی دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A پس از توالی‌یابی با اطلاعات موجود در بانک ژنی مقایسه شد که قطعه مورد نظر دارای بالاترین تشابه بازی با دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A در اطلاعات بانک ژنی بود. بیان پروتئین با القای IPTG تحریک و افزایش یافت. دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A دارای وزن مولکولی ۱۷۹۳۰ دالتون بود که کمی سنگین‌تر از اندازه واقعی آن است. وزن مولکولی واقعی دومین انتقال‌دهنده خالص ۱۲۳۲۰ دالتون است که ۵۶۱۰ دالتون آن مربوط به ناقل است [۶].

اولین‌بار بیان ژن فسفولیپاز C و سایر پروتئین‌های خارج سلولی



Archive of SID
www.SID.ir

*سودوموناس آئروژینوزا* در *E. coli* توسط *لوری* و *تای* بررسی شد. آنها مشاهده کردند که اگزوتوکسین A به بیرون سلول و غشای خارجی ترشح نمی‌شود، بلکه در فضای پری‌پلاسمی باکتری تجمع می‌یابد. در این تحقیق مشاهده شد که دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A در سیتوپلاسم سلول به‌صورت انکلوژن بادی تجمع می‌یابد. در واقع تفاوت *E. coli* نسبت به *سودوموناس آئروژینوزا* عدم ترشح سم به خارج سلول است [۲۳].

تولید نوترکیب دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A برای تحقیقات بعدی به‌منظور انتقال دارو اهمیت زیادی دارد. با توجه به افزایش شیوع عفونت در بیماران دچار سوختگی و مرگ‌ومیر ناشی از آن در دسترس‌بودن پروتئین برای تولید آنتی‌بادی علیه بیماری ضروری است.

## نتیجه‌گیری

بیشتر سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، اگزوتوکسین A تولید می‌کنند. مقایسه توالی بازهای دومین انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A با اطلاعات بانک ژنی نشان‌دهنده بیشترین تشابه بازی است. همچنین بیان پروتئین مورد نظر با اطلاعات بانک ژنی یکسان است و مشخص شد که پروتئین به‌صورت انکلوژن بادی در سیتوپلاسم باکتری تجمع می‌یابد.

## منابع


1- Tredget EE, Shankowsky HA, Rennie R, Burrell RE, Logsetty S. Pseudomonas infections in the thermally injured patient. J Burns. 2004;30:3-26.

2- Aziz J, Abdolvahab A, Mehdi K, Jalil N, Masumeh H, Shohreh F. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in the south of Iran. J Burns. 2006;32:343-7.

3- Chang JH, Kwon HY. Expression of 14-3-3δ, cdc2 and cyclin B proteins related to exotoxin A-induced apoptosis in HeLa S3 cells. J Inter Immunopharmacol. 2007;7:185-91.

4- Doring G, Pier GB. Vaccines and immunotherapy against Pseudomonas aeruginosa. J Vaccine. 2008;26:1011-24.

5- Holder IA. Pseudomonas immunotherapy: A historical. J Vaccine. 2004;22:831-9.

6- Wolf P, Elsasser-Beile U. Pseudomonas exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. J Med Microbiol. 2009;299:161-76.

7- Pastrana DV, FitzGerald DJ. A nonradioactive, cell-free method for measuring protein synthesis inhibition by Pseudomonas exotoxin. J Analytical Biochem. 2006;353:266-71.

8- Wedekind1 JE, Trame1 CB, Dorywalska M. Refined crystallographic structure of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. J Mol Bio. 2001;314:823-37.

9- Yates SP, Merrill AR. A catalytic loop within Pseudomonas aeruginosa exotoxin A modulates its transferase activity. J Bio Chem. 2001;276:35029-36.

10- Hertle R, Mrsny R, Fitzgerald DJ. Dual-function vaccine for Pseudomonas aeruginosa: Characterization of chimeric exotoxin A-pilin protein. J Infec Immun. 2001;69:6962-9.

11- Mere J, Morlon-Guyot J, Bonhoure A, Chiche L, Beaumelle B. Acid-triggered membrane insertion of Pseudomonas exotoxin A involves an original mechanism based on pH-regulated tryptophan exposure. Bio Chem. 2006;280:21194-201.

12- Challa S, Barrette R, Rood D, Zinckgraf J, French R, Silbart L. Non-toxic Pseudomonas aeruginosa exotoxin A expressing the FMDV VP1 G-H loop for mucosal vaccination of swine against foot and mouth disease virus. J Vaccine. 2007;25:3328-37.

13- Song S, Xue J, Fan K, Kou G, Zhou Q, Wang H. Preparation and characterization of fusion protein truncated Pseudomonas exotoxin A (PE38KDEL) in Escherichia coli. Pro Expr and Puri. 2005;44:52-7.

14- Tramper-Stranders GA, Wolfs TFW, van der Ent CK. Detection of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. J Cystic Fibrosis. 2005;4:37-43.

15- Xiao X, Zhang J, Gong J. Rapid detection of Pseudomonas aernginosa by the fluorescence quantitative TaqMan PCR assay targeting ETA gene. Chin J Biotech. 2008;24:581-5.

16- Grayt GL, Smitht DH, Baldridget JS, Harkinst RN, Vasilt ML, Chent E, et al. Cloning, nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of the exotoxin A structural gene of Pseudomonas aeruginosa. Proc Nati Acad Sci USA. 1984;81:645-9.

17- Hedstrom RC, Funk CR, Kaper JB, Pavlovskis R, Galloway DR. Cloning of a gene involved in regulation of exotoxin A expression in Pseudomonas aeruginosa. J Infec Immun. 1986;51:37-42.

18- Douglas CM, Guidi-Rontani C, John Collier R. exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa: Active, cloned toxin is secreted into the periplasmic space of Escherichia coli. J Bacteriolo. 1987;169:962-6.

19- Yates SP, Taylor PL, Jorgensen R, Ferraris D, Zhang J, Andersen GR, et al. Structure-function analysis of water-soluble inhibitors of the catalytic domain of exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa. J Biochem. 2005;385:667-75.

20- Armstrong S, Yates SP, Merrill A. Insight into the catalytic mechanism of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. J Biolo Biochem. 2002;277:669-75.

21- Bjon MJ, Iglewskl BH, Ives SK, Sadoff JC, Vasll ML. Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of Pseudomonas aeruginosa PA-103. J Infec Immun. 1978;19:785-91.

22- Keyvani Amineh H, Ghasemian Safaei H. Purification of exotoxin A from Pseudomonas aeroginosa. J Tehran Vet Med. 2000;56:33-6. [Persian]

23- Joshi BH, Puri RK. Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and Pseudomonas exotoxin in Escherichia coli. Pro Expr Puri. 2005;39:189-98.


Archive of SID



www.SID.ir