پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات ۳۵ تا ۴۲

مقاله اصلی
(Original Article)

افزایش میزان بیان پروتئین متصل شونده به دافی در *پلاسمودیوم ویواکس* به عنوان پروتئین کاندید واکسن مرحله خونی مالاریا

لاله بابائی خو[۱]، صدیقه ذاکری*[۲]، اکرم ابوئی مهریزی[۲]، نوید دین پرست جدید[۲]

[۱] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر
[۲] گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: *منطقه II غنی از سیستئین پروتئین متصل شونده به دافی در پلاسمودیوم ویواکس (PvDBP-II) نقشی اساسی در حمله مروزوئیت‌های انگل به اریتروسیت‌های انسان ایفا می‌نماید. به همین دلیل این پروتئین به عنوان پروتئین کاندید واکسن در بررسی پاسخ‌های ایمونولوژیکی مورد نظر محققین است. هدف از این مطالعه بیان پروتئین مذکور به میزان بالا با استفاده از سیستم بیانی پروکاریوتی است.*

روش بررسی: *پس از کلونینگ PvDBP-II در وکتور pGEM T easy، ساب کلونینگ در وکتورهای بیانی pET28a، pET24d و pQE30 انجام و بیان پروتئین در سویه‌های BL21(DE3) و M15(pREP4) اشرشیا کلی که محتوی ساختارهای بیانی ذکر شده بودند، تحت شرایط متفاوت ازجمله محیط کشت، دمای انکوباسیون و زمان‌های مختلف، بیان پس از القاء مورد بررسی قرار گرفت. خالص سازی به کمک روش متال افینیتی کروماتوگرافی تحت شرایط احیاء صورت گرفت و محصول توسط روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ مورد تائید قرار گرفت. در نهایت غلظت پروتئین خالص شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد.*

یافته‌ها: *بیان rPvDBP-II ۴ ساعت پس از القاء با IPTG ۱میلی مولار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط LB2x و با استفاده از سیستم بیانی M15-pQE30 به میزان قابل قبولی صورت گرفت ولی در دو سیستم بیانی BL21-pET28a و BL21-pET24d، بیان پروتئین مورد نظر به مقدار بسیار کم ۲۰۰ مشاهده گردید. سایز پروتئین نوترکیب حاصل بر روی ژل طبق انتظار ۴۷ کیلودالتون (اسید آمینه ۵۸۸-۱۹۸) بود. وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی های anti-His و سرم افراد مبتلا به عفونت پلاسمودیوم ویواکس موید بیان PvDBP-II بود و غلظت پروتئین حاصل ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ارزیابی شد.*

نتیجه‌گیری: *در این مطالعه با استفاده از سیستم بیانی پروکاریوتی E. coli (M15/BL21) و با انجام حداقل مراحل ترانسفورمیشن موفق به افزایش چشمگیر میزان بیان و دسترسی به فرم خالص و نوترکیب PvDB-II بدون نیاز به انجام آزمایشات پیچیده و گران قیمت شدیم که این امر می‌تواند در طراحی واکسن منطقه‌ای علیه مالاریای ویواکس بسیار مفید و کارآمد باشد.*

واژگان کلیدی: *پلاسمودیوم ویواکس*، پروتئین متصل شونده به دافی، بیان، سیستم بیانی pQE30، *E. coli*.

مقدمه

در حالی که مالاریا یک مشکل بهداشتی جهانی است، *پلاسمودیوم ویواکس* حدود نیمی از موارد بالینی در کل جهان و خارج از آفریقا و حدود ۹۵ درصد از موارد مالاریا در ایران را در بر می گیرد و ناتوانی ناشی از مالاریای ویواکس بسیاری از کشورهای در حال توسعه از جمله ایران را متحمل هزینه‌های گزاف و غیرقابل ارزیابی نموده است. وجود پدیده عود، تولید گامت در مراحل اولیه انتقال قبل از بروز علایم بالینی و عفونت توام با *پلاسمودیوم فالسی پاروم* نشان دهنده لزوم انجام تحقیقات گسترده در زمینه کنترل مالاریای ویواکس می‌باشد (۲،۱).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتوپاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین صدیقه ذاکری (**e-mail:** zakeris@pasteur.ac.ir)

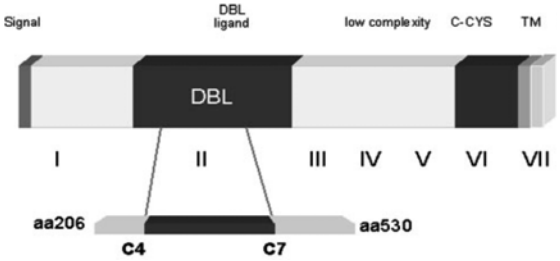
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۴/۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۱۴

Archive of SID
www.SID.ir

در حال حاضر با توجه به مشکلات موجود، کنترل *پلاسمودیوم ویواکس* از طریق طراحی واکسن موثر و کارآمد منطقی‌ترین راه به نظر می‌رسد و یکی از دغدغه‌های جامعه پزشکی به ویژه محققین طراحی واکسن علیه این گونه انگل است. جهت دستیابی به واکسن، پروتئین‌های سطحی انگل که در اتصال به سلول میزبان نقش دارند مورد هدف محققین قرار گرفته‌اند. در *پلاسمودیوم ویواکس* نیز حمله مروزوئیت‌های انگل به اریتروسیت‌ها به عنوان سلول میزبان مستلزم میان‌کنش اختصاصی گیرنده با آنتی‌ژن سطحی انگل است. این میان‌کنش بین آنتی‌ژن گروه خونی دافی به عنوان گیرنده در سطح گلبول قرمز و پروتئین متصل شونده به دافی (PvDBP) به عنوان لیگاند است (۴،۳). به علاوه، با مطالعات انجام شده در بیماران آلوده به ویواکس مشخص گردیده است که این پروتئین در توسعه سیستم ایمنی اکتسابی به طور طبیعی دخالت داشته و محرک پاسخ ایمنی هومورال و سلولار می‌باشد (۵) . هم چنین تولید آنتی‌بادی علیه این پروتئین سبب بلوکه کردن اتصال مروزوئیت به گیرنده‌های گلبول قرمز مربوطه می‌شود. بنابراین PvDBP کاندید مناسبی برای تولید واکسن علیه مرحله خونی *پلاسمودیوم ویواکس* بوده و تحقیق و مطالعه جهت استفاده از این پروتئین در طراحی واکسن چند ظرفیتی (Polyvalent vaccine) که در برگیرنده آنتی‌ژن‌های مراحل مختلف چرخه زیستی انگل می‌باشند بسیار ضروری به نظر می‌رسد (۴).

PvDBP پروتئینی غشایی با وزن مولکولی 140 KDa از خانواده پروتئین‌های متصل شونده به اریتروسیت (EBP family) است (۶). براساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که این پروتئین دارای ۷ ناحیه (نواحی I-VII) می‌باشد. ناحیه II با ۳۳۰ اسید آمینه محتوی ۱۲ سیستئین حفاظت شده بوده و ۱۸۰ اسید آمینه موجود در مرکز ناحیه II یعنی بین سیستئین ۴ و ۷، سکانس‌های اصلی و دخیل در اتصال به گیرنده بر روی رتیکولوسیت می‌باشند (شکل ۱) (۹-۷).

تغییر سریع آنتی‌ژن‌های انگل برای فرار از سیستم ایمنی که موجب بروز تنوع در بین سویه‌های انگل در مناطق مختلف می‌شود یکی از مشکلات تهیه واکسن کارآمد است و برای غلبه بر این مشکل باید تهیه واکسن منطقه‌ای بر پایه اطلاعات به دست آمده از هر ناحیه (ویژه مناطق آندمیک خاص) مورد توجه قرار گیرد. جهت دستیابی به یک واکسن موثر در ایران باید پس از بررسی پلی مورفیسم، از حفاظت بخشی فرم نوترکیب پروتئین کاندید واکسن و شناسائی آن توسط سیستم ایمنی بیماران آلوده اطمینان حاصل نمود. نخستین گام برای انجام این تحقیقات تولید مقادیر کافی از پروتئین نوترکیب یا به عبارتی بیان پروتئین مورد نظر به میزان کافی و خالص‌سازی آن در شرایط آزمایشگاه می‌باشد چرا که امکان کشت *in vitro* برای گونه *پلاسمودیوم ویواکس* به طور مداوم وجود ندارد.



شکل ۱- نمای شماتیک نواحی ساختاری PvDBP. در دومین خارج سلولی PvDBP (نواحیI-VII). ناحیه I (انتهای N) پپتید راهنما، ناحیه VII شامل نواحی غشایی (Trans Membrane) و سیتوپلاسمیک می‌باشد. نواحی II و VI نواحی غنی از سیستئین و ناحیه III-V نواحی هیدروفوب می‌باشند. در بخش مرکزی ناحیه II، بین سیستئین شماره ۴ و ۷ سایت اصلی شناسائی و اتصال لیگاند قرار دارد که نسبت به سایر نواحی PvDBP از پلی مورفیسم بیشتری برخوردار می‌باشد (۷).

یکی از موانع اصلی جهت بیان ژن پلاسمودیوم در *اشرشیا کلی* تفاوت در استفاده از کدون بین این دو میکروارگانیزم می‌باشد. در مطالعات قبلی انجام شده توسط Kailash Pandey و Yazdani و همکارانشان به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۱ و ۲۰۰۶ بیان PvDBP در سویه BL21 (DE3) با استفاده از وکتور pET28a انجام شد، میزان محصول کافی نبود (۱۰، ۱۱) و آزمایشات چند مرحله‌ای و پیچیده مانند بهینه‌سازی کدون برای تولید مقادیر بالای فرم نوترکیب پروتئین متصل شونده به دافی (rPvDBP) مورد استفاده قرار گرفت تا میزان مورد نیاز حاصل گردید (۱۲). در مطالعه قبلی انجام شده در گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین (MVRG) پلی‌مورفیسم ناحیه II پروتئین متصل شونده به دافی PvDBP-II (به عنوان منطقه اصلی اتصال لیگاند به رسپتور) در مناطق آندمیک مالاریا در شمال و جنوب ایران، به عنوان نخستین گام در طراحی واکسن علیه مالاریای ویواکس در ایران مورد بررسی قرار گرفت و فرم شایع شناسایی گردید (۱۳). در این مطالعه به منظور برداشت گام بعدی در زمینه طراحی واکسن (بررسی ایمنی‌زایی) با استفاده از PvDBP-II، اقدام به بهینه سازی و تولید فرم شایع این پروتئین به صورت نوترکیب با استفاده از سیستم‌های بیانی *اشرشیا کلی مختلف* ازجمله BL21(DE3)-pET28a, BL21(DE3)-pET24d و M15(pREP4)-pQE30 نمودیم. هدف از انجام این مطالعه، مقایسه سه سیستم بیانی پروکاریوتی مختلف در شرایط کشت و القاء متفاوت جهت

Archive of SID
www.SID.ir

دستیابی به یک سیستم بیانی پروکاریوتیک کارآمد می‌باشد که با استفاده از آن و بدون نیاز به انجام آزمایشات مهندسی ژنتیک به مقادیر کافی و خالص از پروتئین مورد نظر دست پیدا کنیم و نتایج حاصل از این تحقیق که برای نخستین بار در ایران انجام می شود می‌تواند در رساندن ما به هدف نهایی یا طراحی واکسن منطقه‌ای و چند ظرفیتی علیه مالاریا بسیار ثمربخش باشد.

مواد و روشها

تکثیر *Pv-DBP-II* و کلونینگ در وکتور pGEM-T easy

در مطالعات قبلی گروه MVRG پس از تشخیص مولکولی *پلاسمودیوم ویواکس* در نمونه‌های خون جمع آوری شده از مناطق آندمیک مالاریا در ایران (۱۶-۱۴)، تکثیر ژن *Pvdbp-II* در ۷۵ نمونه با استفاده از پرایمر های مکمل توالی در بر گیرنده منطقه II (اسید آمینه ۵۸۸-۱۹۸ طبق شماره‌گذاری سویه Sal-I, M61095) صورت گرفت و توالی اسید نوکلئیک و اسید آمینه مورد نظر با ایزوله Sal-I و سکانس‌های ثبت شده سایر ایزوله‌های *پلاسمودیوم ویواکس* مقایسه شد و فرم شایع مورد شناسائی قرار گرفت (۱۳). DNA کد کننده PvDBP-II از فرم شایع ایزوله‌های ایرانی *پلاسمودیوم ویواکس* با سکانس مشخص (فرم آللی VI، شماره دسترسی EU860433.1) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی دارای سایت‌های برش آنزیم‌های برش‌گر *BamH I&Sma I* و *Nco I&Xho I* (جدول ۱) تکثیر شد. محصولات PCR با استفاده از کیت استخراج DNA کیاژن (QIAGEN, Germany) از ژل آگارز استخراج و پس از کلونینگ در وکتور(pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA به میزبان بیانی *E. coli*-DH5α منتقل شدند. کلون‌های حاصل، از روی محیط Luria-Bertani (LB) آگار محتوی ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین، isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ۱/۵ میلی‌مولار و X-gal ۰/۰۴ درصد انتخاب شده و کلون‌های مثبت سفید رنگ پس از استخراج پلاسمید از آنها به کمک توالی یابی پلاسمید مورد تائید نهایی قرار گرفتند.

سویه های *E. coli* و شرایط کشت

سویه‌های بیانی *اشرشیا کلی* مورد استفاده در این تحقیق *E.coli*-BL21(DE3) و *E. coli*-M15(pREP4) می‌باشند که جهت بیان ژن *Pvdbp-II* در سه محیط کشت LB2x، TB و 2xYT و در سه دمای ۲۵ و ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد (به منظور انتخاب بهترین شرایط جهت بیشترین میزان بیان پروتئین نوترکیب) هوادهی شدند.

ساختارها و سیستم‌های بیانی

پس از کلون ژن *PvdbP-II* در وکتور pGEM-T easy، قطعات هدف به کمک آنزیم‌های برشگر (جدول ۱) از ساختار پلاسمیدی خارج و به درون وکتورهای بیانی pET24d, pET28a (NOVAGEN,Germany) و pQE30 (QIAGEN,Germany) منتقل شدند. مخلوط‌های حاصل از انجام واکنش آنزیم لیگاز به درون میزبان‌های بیانی *E. coli*-M15(pREP4) و *E. coli*-BL21(DE3) (بانک ژن انستیتو پاستور ایران) منتقل شده و ساختارهای pET24d-PvDBP-II, pET28a-PvDBP-II و pQE30-PvDBP-II جهت تائید مورد توالی یابی قرار گرفتند. در مورد ساختارهای pET24d-PvDBP-II و pET28a-PvDBP-II قبل از انتقال به وکتور بیانی یک مرحله ترانسفورمیشن به درون *E. coli*-DH5α صورت گرفت و پلاسمید استخراج شده از این میزبان نیز مورد توالی یابی قرار گرفت.

بیان PvDBP-II با استفاده از ساختارهای بیانی

پس از کشت شبانه میزبان‌های بیانی *E. coli*.BL2-pET28a-PvDBP-II، *E. coli*.BL21-pET24d-PvDBP-II و *E. coli*.BL21-pQE30-PvDBP-II در محیط LB broth، ۳۰۰-۲۰۰ ماکرولیتر از کشت شبانه این باکتری ها به چندین محیط مختلف از جمله TB، LB2x و2xYT تلقیح شدند. حدود ۲/۵ تا ۳ ساعت پس از رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حدود ۵-۴ ساعت پس از رشد آنها در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد کدورت محیط کشت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد تا زمانی که OD خوانده شده به حدود ۰/۶ رسیده شود و زمان القاء بیان با IPTG فرا رسد.

در این تحقیق القاء با مقادیر متفاوت IPTG در ODهای مختلف یعنی ۰/۴ تا ۰/۹ ، صورت گرفت و هم‌چنین رسوب باکتری در زمان‌های مختلف (۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت) پس از القاء آزمایش شد تا به بیشترین میزان بیان در یک OD مشخص و در یک محیط و دمای مناسب دست پیدا کنیم.

رسوبات حاصل از سانتریفیوژ محیط کشت باکتری‌ها ۱ ساعت و ۴ ساعت پس از القاء، به روش SDS-PAGE بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت وجود باند مورد نظر به روش ایمونوبلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی نشانگر هیستیدین (Penta His

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- میزبان‌ها و وکتورهای مورد استفاده جهت بیان PvDBP-II به همراه پرایمرهای طراحی شده در گروه MVRG

Restriction site	Primers*	Vector	Host
Nco I&Xho I	5' ATCT**CCATGG**CCATTATAAATCATGCTTTTC & 5' TTTGA**CTCGAG**GGCCTGAGATTTAGCAGC	pET28a	*E. coli*- BL21(DE3)
Nco I&Xho I	5' ATCT**CCATGG**CCATTATAAATCATGCTTTTC & 5' TTTGA**CTCGAG**GGCCTGAGATTTAGCAGC	pET24d	*E. coli*- BL21(DE3)
BamH I&Sma I	5'GGTA**GGATCC**GATTATGAGACATCTAGC & 5'TCCGT**CCCGGG**TTAACTATCTACAGGCTGAC	pQE30	*E. coli*- M15(PREP)

* بازهای تیره محل اثر آنزیم های برشگر

antibody, QIAGEN, Germany) و همچنین با استفاده از سرم افراد ساکن مناطق آندمیک مالاریا (گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین MVRG انستیتوپاستور ایران)، که آلودگی آنها به عفونت *پلاسمودیوم ویواکس* از طریق تست میکروسکوپی و مولکولی به اثبات رسیده است، مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش تائید بیان rPvDBP-II با روش وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی ضد هیستیدین در رقت ۱/۳۰۰۰ و رقت ۱/۲۰۰۰ آنتی‌بادی ثانویه (Peroxidase conjugated Antibodie, SIGMA, Germany) ، و با استفاده از سرم بیمار آلوده به عفونت *پلاسمودیوم ویواکس* (C^+) در رقت ۱/۵۰۰ و رقت آنتی بادی ضد انسانی ۱/۱۵۰۰۰ (Peroxidase conjugated Anti Human IgG Antibodie, SIGMA, Germany) بهینه سازی شد. از نمونه‌های سرم افرادی که خارج از منطقه آندمیک زندگی می‌کردند و از سرم افراد مبتلا به مالاریای فالسیپاروم نیزبه عنوان گروه کنترل منفی (C^-) استفاده شد.

خالص‌سازی، تعیین غلظت و تائید نهایی بیان rPvDBP-II

پس از تائید بیان rPvDBP-II و انتخاب ساختار پلاسمیدی و میزبان مناسب، پروتئین مجددا بیان شد و رسوبات حاصل در بافر دناتوره کننده (6M guanidine thiocyanate, 20mM Tris–HCl, 500mM NaCl, 20mM immidazol and 1mM PMSF, pH 7.9) حل شده و سپس سلول‌ها به روش سونیکاسیون در یخ طی ۱۰ سیکل ۲۰ پالسی و وقفه‌های ۲۰ ثانیه لیز شدند. مخلوط‌های حاصل از سونیکاسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و Xg ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شده، محلول‌های بالایی با رزین آگارز Na^{2+} نیتریلوتری استیک اسید (Ni-NTA Agarose, Qiagen, Germany) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از ۳ ساعت رزین‌ها از ستون کروماتوگرافی عبور داده شدند. پس از شستشوی رزین‌ها با محلول مربوطه (6M urea, 20mM Tris–HCl, 500mM NaCl and 30mM immidazol, pH 7.9) پروتئین های متصل شده به کمک بافر شستشو دهنده محتوی اوره ۸ مولار، Na_2HPO4 ۵۰ میلی‌مولار، NaCl ۳۰۰ میلی‌مولار و ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۹ از ماتریکس Ni-NTA جداسازی شدند. در انتها محلول حاصل به کمک ستون‌های Econo-Pac 10DG (BioRad, USA) طبق دستور شرکت سازنده نمک‌زدایی شده و توسط دستگاه تغلیظ کننده (Eppendorf, Hamburg, Germany) تغلیظ شدند. لازم به ذکر است که جهت خالص‌سازی پروتئین نوترکیب تولید شده غلظت‌های مختلف از بافر دناتوره کننده و دماهای متفاوت انکوباسیون با بافر و رزین Ni-NTA آزمایش گردید و کلیه مراحل خالص سازی تحت شرایط مختلف سونیکاسیون و سانتریفیوژ تکرار شد تا به شرایط بهینه جهت خالص‌سازی با حداقل تداخل پروتئین‌های باکتری میزبان دست پیدا نمائیم. تمامی محلول‌های محتوی پروتئین نوترکیب تحت شرائط احیاء بر روی ژل ۱۲ درصد به روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفته و غلظت پروتئین‌ها با استفاده از معرف برادفورد و دستگاه اسپکتروفوتومتر (Eppendorf, Germany) تعیین شد. بیان پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی Anti-His و سرم کنترل مثبت و کنترل منفی موجود در گروه MVRG مورد تائید نهایی قرار گرفت.

یافته‌ها

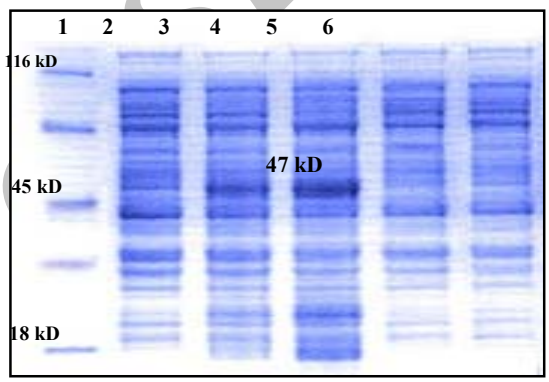
ساختارهای بیانی، بیان rPvDBP-II و تائید بیان rPvDBP-II

توالی‌یابی ساختارهای بیانی pET24d-PvDBP-II, pET28a-PvDBp-II و pQE30-PvDBP-II و جداشدن

Archive of SID

www.SID.ir

قطعه PvDBP-II توسط آنزیم‌های برشگر اختصاصی موید کلونینگ و ساب کلونینگ موفقیت‌آمیز ژن هدف در ساختارهای بیانی مورد نظر بود. بیان پروتئین در وکتورهای بیانی pET28a و pET24d و میزبان بیانی *E. coli*-BL21 و در شرایط متفاوت از قبیل محیط کشت‌های مختلف، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ درجه سانتی‌گراد و القاء بیان در ODهای مختلف نشان دهنده بیان بسیار کم پروتئین در کلیه شرایط آزمایش شده در وکتورهای مذکور بود. در نهایت بیان PvDBP-II با استفاده از سیستم بیانی M15-pQE30، در محیط LB2x و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، القاء با IPTG ۱میلی‌مولار در OD_{600}=۰/۶ و رسوب گیری ۴ ساعت پس از القاء به میزان قابل توجهی صورت گرفت (شکل ۲).

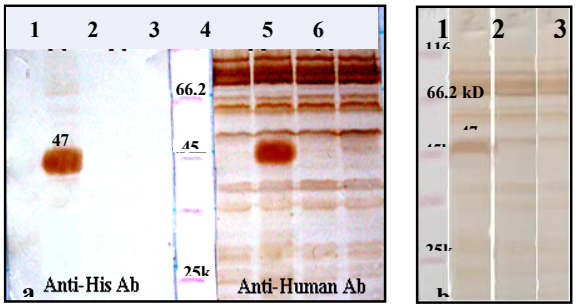


شکل ۲- SDS-PAGE رسوب باکتری E. Coli- M15 محتوی پلاسمید نوترکیب جهت بررسی بیان rPvDBP-II. چاهک ۱: مارکر پروتئینی (Fermentase) kDa(116-14.4، چاهک ۲: رسوب باکتری محتوی پلاسمید نوترکیب قبل از القاء با IPTG، چاهک ۳: رسوب باکتری محتوی پلاسمید نوترکیب ۱ ساعت پس از القاء، چاهک ۴: رسوب باکتری محتوی پلاسمید نوترکیب ۴ ساعت پس از القاء، چاهک ۵ و ۶: رسوب باکتری فاقد پلاسمید نوترکیب (به عنوان کنترل منفی) قبل از القاء و ۴ ساعت پس از القاء. میزان load: ۱۲ ماکرولیتردر هر چاهک.

نتایج حاصل از آزمایش وسترن بلاتینگ نشان دهنده شناسایی پروتئین rPvDBP-II توسط آنتی‌بادی علیه هیستیدین و آنتی‌بادی طبیعی سرم بیماران و عدم شناسایی آن توسط سرم‌های کنترل منفی بود (شکل ۳).

خالص‌سازی، تعیین غلظت و تائید نهایی پروتئین rPvDBP-II

خالص‌سازی و جداسازی پروتئین بیان شده از پروتئین‌های میزبان به کمک روش متال آفینیتی کروماتوگرافی و با استفاده از Ni-NTA agarose نشان دهنده باند پروتئینی قوی (بدون پروتئین‌های میزبان) با وزن مولکولی مطابق با PvDBP-II در ژل آکریل آمید یعنی ۴۷ کیلودالتون بود. در این روش به منظور ارزیابی مراحل کار، رسوب باکتری حاصل از سانتریفیوژ محیط و محلول‌های جمع‌آوری شده ضمن مراحل خالص‌سازی به همراه محلول‌های نهایی محتوی پروتئین نوترکیب، به روش SDS-PAGE آنالیز شدند و کم بودن میزان این پروتئین در رسوب باقی مانده نشان دهنده محصول بیشتر بود (شکل ۴).



شکل ۳- تائید بیان پروتئین rPvDBP-II با روش وسترن بلاتینگ با رقت ۱/۳۰۰۰ آنتی‌بادی اولیه علیه His (Penta His antibody, QIAGEN, Germany) و رقت ۱/۲۰۰۰ آنتی بادی ثانویه (Peroxidase conjugated Antibodie, SIGMA, Grmany)، و سرم بیمار آلوده به عفونت *پلاسمودیوم ویواکس* با رقت ۱/۵۰۰ و رقت آنتی بادی ضد انسانی (Peroxidase conjugated Anti Human IgG Antibodie, SIGMA, Germany) ۱/۱۵۰۰۰.

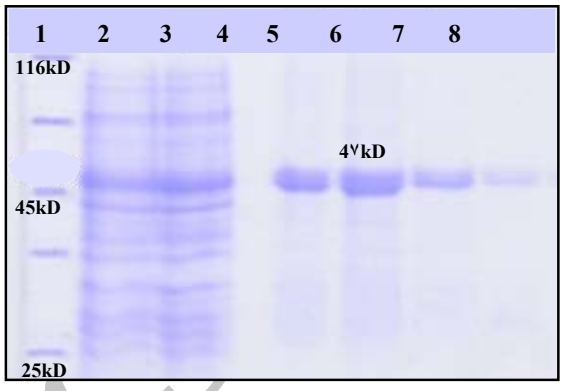
a) چاهک‌های ۴-۱ مربوط به انجام آزمایش با آنتی‌بادی علیه هیستیدین می‌باشد که چاهک‌های ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به رسوب قبل از القاء و ۴ ساعت پس از القاء باکتری‌های محتوی پلاسمید نوترکیب، و چاهک ۳ و ۴ به ترتیب مربوط به رسوب قبل از القاء و ۴ ساعت پس از القاء باکتری‌های محتوی پلاسمید بدون ژن هدف (به عنوان کنترل منفی) می‌باشد. چاهک‌های ۶ و ۷ به ترتیب مربوط به رسوب قبل از القاء و ۴ ساعت پس از القاء باکتری‌های بیان کننده پروتئین و انجام آزمایش با سرم بیمار مبتلا به مالاریای ویواکس و چاهک ۸ و ۹ به ترتیب مربوط به رسوب قبل از القاء و ۴ ساعت پس از القاء باکتری‌های محتوی پلاسمید بدون ژن هدف (به عنوان کنترل منفی) و سرم بیمار مبتلا به مالاریای ویواکس می‌باشند. چاهک ۵ مارکر پروتئینی (Fermentase) kD 116-14.4.

b) مربوط به انجام آزمایش با سرم بیماران و رسوب ۴ ساعت پس از القاء. چاهک ۱ مارکر پروتئینی (Fermentase) kD 116-14.4. چاهک ۲ و۳ و۴ رسوب ۴ ساعت پس از القاء باکتری های بیان کننده پروتئین و انجام آزمایش به ترتیب با سرم بیمار مبتلا به مالاریای ویواکس، سرم Pool بیماران مبتلا به مالاریای فالسیپاروم (کنترل منفی n=۵۰) و سرم Pool افراد سالم (کنترل منفی n=۵۰). سرم نمونه‌های کنترل منفی قادر به شناسایی پروتئین نوترکیب نبودند.

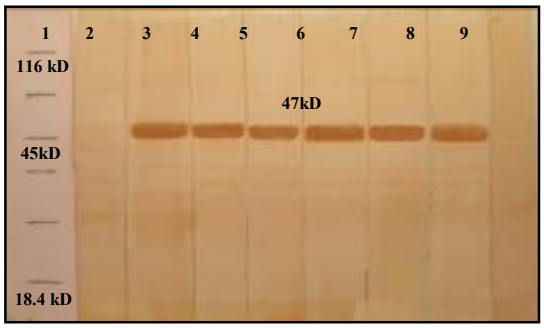
نتایج ارزیابی نهائی بیان PvDBP-II با استفاده از روش وسترن بلاتینگ و سرم‌های کنترل مثبت آلوده به *پلاسمودیوم ویواکس* و

Archive of SID
www.SID.ir

محلول PBS محتوی پروتئین نوترکیب (مرحله نمک‌زدایی) در تیوب جمع آوری شده و به ترتیب خروج از ستون، تحت عناوین dE1(desalted Elution), dE2, dE3, ... نامگذاری شدند. غلظت نهایی پروتئین حاصل از نمک‌زدایی و تغلیظ (به کمک سانتریفیوژ در خلاء) با استفاده از معرف برادفورد و دستگاه اسپکتروفتومتر (OD 280) به شرح زیر می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴. SDS-PAGE مراحل مختلف خالص سازی پروتئین نوترکیب به روش متال آفینیتی کروماتوگرافی جهت بررسی چگونگی و غلظت rPvDBP-II. چاهک ۱ مارکر پروتئینی 116-14.4 kD (Fermentase)، چاهک ۲ رسوب حاصل از سانتریفیوژ پس از سونیکاسیون، چاهک ۳ مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ پس از سونیکاسیون، چاهک ۴ محلول شستشوی عبور داده شده از ستون، چاهک‌های ۸-۵ محلول‌های حاصل از اولین تا چهارمین elution تهیه شده از رزین NiNTA-rPvDBP-II. میزان load: ۲۰ ماکرولیتر در هر چاهک.



شکل ۵- تائید پروتئین خالص‌سازی شده به روش وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم بیماران آلوده به پلاسمودیوم ویواکس (رقت ۱/۵۰۰) و آنتی‌بادی ثانویه علیه آنتی‌بادی انسانی Peroxidase conjugated Anti) Human IgG Antibodie, SIGMA, Germany) (رقت ۱/۱۵۰۰۰). چاهک ۱: مارکر پروتئین (Fermentase) 116-14.4 kD، چاهک‌های ۸-۳: وسترن بلاتینگ پروتئین خالص سازی شده با استفاده از سرم بیماران آلوده به مالاریای ویواکس، چاهک‌های ۲ و ۹: به ترتیب وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم Pool افراد سالم (n=۵۰) و افراد آلوده به مالاریای فالسیپاروم (n=۵۰) (گروه‌های کنترل منفی).

کنترل منفی موجود در گروه MVRG نشان دهنده شناسایی پروتئین نوترکیب دناتوره شده توسط آنتی‌بادی‌های طبیعی (آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه فرم طبیعی پروتئین) موجود در سرم بیماران بود و هیچ واکنشی بین سرم افراد سالم و یا سرم فرد مبتلا با عفونت *پلاسمودیوم فالسی پاروم* و پروتئین نوترکیب تولید شده (گروه های کنترل منفی) مشاهده نشد که بیانگر اختصاصی بود واکنش است (شکل ۵).

بحث

گونه *پلاسمودیوم ویواکس* عامل ۹۵ درصد از موارد بیماری مالاریا در مناطق آندمیک جنوب شرقی کشور ایران می‌باشد. با توجه به اهمیت این گونه در ایران و برنامه‌ریزی وزارت بهداشت و درمان جهت حذف آن از مناطق آندمیک تا سال ۲۰۲۰ میلادی، دستیابی به واکسن موثر در کنار روش‌های کنترلی، لازم و ضروری است زیرا تجربه انجام شده در برنامه حذف بیماری تب زرد که یک بیماری ناقل‌زاد است نشان داد که تنها با استفاده از واکسن در کنار سایر روش‌های کنترلی حذف این بیماری امکان پذیر بوده است (۱۷). با توجه به این مطلب، جهت دستیابی به واکسن علیه مالاریای ویواکس بررسی پروتئین‌های کاندید واکسن سویه‌های انگل *پلاسمودیوم ویواکس* در مرحله نخست از مراحل طراحی واکسن بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

Duffy binding protein (DBP) در *پلاسمودیوم ویواکس* نقش اساسی در تکامل انگل طی عفونت مرحله خونی و غیرجنسی دارد. مروزوئیت‌های این انگل جهت حمله به اریتروسیت‌های انسان، نیاز به وجود آنتی‌ژن گروه خونی دافی (DARC) به عنوان یک گیرنده سطحی دارد و باید از میان‌کنش DBP-DARC جهت تهاجم به سلول میزبان استفاده نماید. همین ویژگی در این انگل، DBP را به یک آنتی‌ژن کاندید واکسن مناسب جهت استفاده در طراحی واکسن علیه مالاریای ویواکس مبدل ساخته است (۱).

در مطالعه قبل که در گروه MVRG انجام شد، پس از بررسی تنوع آللی ژن PvDBP-II ایزوله های *پلاسمودیوم ویواکس* مناطق آندمیک شمال و جنوب ایران، توالی این ژن در ایزوله‌های *پلاسمودیوم ویواکس* ایران و سایر مناطق آندمیک مالاریا در جهان مورد مقایسه قرار گرفت و اطلاعات به دست آمده از این تحقیق که برای نخستین بار بر روی ایزوله‌های ایران انجام گرفته است و می‌تواند گامی در جهت طراحی واکسن منطقه‌ای و چند ظرفیتی علیه مالاریای ویواکس باشد، نشان داد که این ژن در میان ایزوله‌های *پلاسمودیوم ویواکس* مناطق آندمیک ایران و

Archive of SID
www.SID.ir

سایرمناطق آندمیک مالاریای ویواکس مانند تایلند، برزیل و کلمبیا نسبتا حفاظت شده بود و این ویژگی در ژن PvDBP-II آن را کاندید مناسبی برای استفاده در طراحی واکسن می سازد (۱۳). اما گام بعدی بررسی ایمنی‌زایی پروتئین متصل شونده به دافی به عنوان یک پروتئین کاندید واکسن می‌باشد، ولیکن از آنجایی که PvDBP مولکولی با فراوانی کم در سطح انگل می‌باشد و در ضمن امکان کشت مداوم *پلاسمودیوم ویواکس* نیز تاکنون فراهم نشده است، جهت اجرای مرحله بعدی تحقیق یعنی بررسی میزان پاسخ آنتی‌بادی بیماران آلوده به rPvDBP، بیان این پروتئین به صورت نوترکیب و به میزان بالا و خالص در شرایط آزمایشگاه ضروری و لازم الاجراء است. لازم به ذکر است که این پروتئین قبلا توسط سایر محققین در چند نقطه از جهان مانند آمریکا و هند بیان شده است (۱۱،۱۰)، ولی به دلیل عدم دسترسی به این پروتئین نوترکیب در ایران یکی از اقدامات لازم درجهت طراحی واکسن در ایران بیان PvDBP-II به صورت نوترکیب و خالص و بر اساس سویه‌های محلی بوده است.

یکی از موانع موجود در زمینه بیان ژن‌های جنس پلاسمودیوم در میزبان‌های پروکاریوتی از قبیل *E. coli* تفاوت در استفاده از کدون بین این دو میکروارگانیزم است. ناپایداری ساختارهای ثانویه در مکان‌های شروع رونویسی و فراوانی tRNAها برای کدون‌های *E. coli* نیز از دلایل اصلی تولید کم rPvDBP-II از ساختارهای بیانی پروکاریوتی است. ژن‌های جنس پلاسمودیوم حاوی تعدادی کدون می‌باشند که به میزان کم شامل سکانس‌های کد کننده *E. coli* می‌شود. عقیده بر این است که حضور کدون‌های نادر در سکانس آغازین mRNA، بیان ژن در *E. coli* را با کاهش پایداری کمپلکس‌های آغازین سنتز پروتئین تحت تاثیر قرار می دهند (۱۸).

جهت بیان Pvdbp-II در اکثر مطالعات از سیستم‌های BL21-pET28a و سیستم یوکاریوتی باکولوویروس استفاده شده است که میزان پروتئین خالص حاصل شده از این سیستم‌ها به ترتیب ۷ و ۲ میلی‌گرم در لیتر ارزیابی شده است (۱۰، ۱۱). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Yazdani و همکارانش انجام شده است از روش بهینه‌سازی کدون (در ژن PvDBP-II) جهت دست یابی به مقادیر کافی از پروتئین نوترکیب استفاده شد و این گروه با اعمال این روش، موفق به افزایش میزان بیان PvDBP-II به میزان نهایی ۱۷ میلی‌گرم در لیتر گردیدند (۱۲).

در این مطالعه پس از بررسی بیان پروتئین هدف در چندین سیستم بیانی مختلف، با استفاده از سیستم بیانی pQE30-M15 و بدون نیاز به آزمایشات چند مرحله‌ای مهندسی ژنتیک موفق به بیان PvDBP-II به میزان نسبتا بالایی از پروتئین نوترکیب نسبت به سایر سیستم‌های استفاده شده در تحقیق حاضر و تحقیقات قبلی (۱۱،۱۰) شده است. نتایج نشان داد که بدون نیاز به یک مرحله اضافی ترانسفورمیشن که در هنگام استفاده از سیستم بیانی BL21-pET (قبل از ورود ژن هدف به ناقل بیانی pET) مورد نیاز است، می‌توان به طور مستقیم ژن هدف را از ناقل کلونینگ به ناقل بیانی pQE30 منتقل و سپس جهت بیان به میزبان بیانی منتقل نماییم. در ضمن با استفاده از چنین سیستم بیانی نیاز به اجرای روش های ژنتیکی پیچیده و پرهزینه از قبیل بهینه‌سازی کدون نبوده و به سهولت و با هزینه کمتر می‌توان به مقادیر مورد نیاز از آنتی‌ژن نوترکیب جهت اجرای مقاصد بعدی تحقیق یعنی تزریق به حیوان آزمایشگاهی و تولید آنتی بادی پلی‌کلونال علیه rPvDBP-II، و بررسی شناسایی rPvDBP-II توسط آنتی‌بادی بیماران مبتلا به مالاریای ویواکس دست پیدا نمود.

به این ترتیب در این تحقیق دستیابی به مقادیر کافی از آنتی‌ژن PvDBP-II جهت اجرای اهداف بعدی یعنی بررسی آنتی‌ژنیسیته و شناسایی فرم طبیعی پروتئین توسط آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه فرم نوترکیب و پس از آن شناسایی توسط سرم افراد ساکن منطقه آندمیک مالاریا، امکان پذیر شد. در ضمن با توجه به آغاز برنامه حذف در ایران و نیاز به اطلاعات پایه‌ای در مورد sero-prevalence انگل (قبل و بعد ازآغاز برنامه حذف در منطقه آندمیک) به منظور ارزیابی برنامه‌های اجرایی نیاز به آنتی‌ژن‌های انگل است که می‌توان از پروتئین نوترکیب تهیه شده در این تحقیق جهت هدف مذکور استفاده نمود.

از آنجایی که ایران وارد برنامه حذف مالاریا از مناطق آندمیک این بیماری شده است، اطلاعات به دست آمده از این تحقیق به همراه نتایج به دست آمده از سایر آنتی‌ژن‌های کاندید واکسن (در گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین انستیتو پاستور ایران) جهت رسیدن به این مهم بسیار ضروری و سودمند می‌باشد.

تشکر و قدردانی

ضمن تشکر از بیماران ساکن مناطق آندمیک مالاریا در جنوب و جنوب شرقی ایران، از مسئولین محترم دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی زاهدان- چابهار و مرکز مدیریت بیماری‌ها سپاسگزاریم. این مقاله قسمتی از نتایج طرح تحقیقاتی (شماره ۲۶۴) سرکار خانم دکتر صدیقه ذاکری عضو هیئت علمی و دانشیار انستیتو پاستور ایران می‌باشد و از مسئولین محترم تامین کننده بودجه طرح کمال تشکر را داریم.

Archive of SID
www.SID.ir

REFERENCES

1. Herrera S, Corradin G, Are´valo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. Trends Parasitol 2007; 23: 122-28.
2. Iranian Ministry of Health. Annual report of Malaria Department of Diseases Management Center of Ministry of Health. Tehran: Iranian Ministry of Health; 2006.
3. Michon P, Woolley I, Wood EM, Kastens W, Zimmerman PA, Adams JH. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. FEBS Lett 2001; 495: 111-14.
4. Cole-Tobian J, King CL. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. Mol Biochem Parasitol 2003; 127: 121-32.
5. Michon PA, Arevalo-Herrera M, Fraser T, Herrera S, Adams JH. Serologic responses to recombinant Plasmodium vivax Duffy binding protein in a Colombian village. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 597-99.
6. Adams JH, Hudson DE, Torii M, Ward GE, Wellems TE, Aikawa M, et al. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. Cell 1990; 63: 141-53.
7. VanBuskirk KM, Sevova E, Adams JH. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 15754-59.
8. Singh SK, Singh AP, Pandey S, Yazdani SS, Chitnis CE, Sharma A. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. Biochem J 2003; 374: 193-98.
9. Tournamille C, Filipe A, Badaut C, Riottot MM, Longacre S, Cartron JP, et al. Fine mapping of the Duffy antigen binding site for the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. Mol Biochem Parasitol 2005; 144:100-103.
10. Dutta S, Daugherty JR, Ware LA, Lanar DE, Ockenhouse CF. Expression, purification and characterization of a functional region of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. Mol Biochem Parasitol 2000; 109: 179-84.
11. Singh S, Pandey K, Chattopadhayay R, Yazdani SS, Lynn A, Bharadwaj A, et al. Biochemical, biophysical, and functional characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* duffy-binding protein. J Biol Chem 2001; 276: 17111-16.
12. Yazdani SS, Shakri AR, Pattnaik P, Rizvi MM, Chitnis CE. Improvement in yield and purity of a recombinant malaria vaccine candidate based on the receptor-binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein by codon optimization. Biotechnol Lett 2006; 28: 1109-14.
13. Babaeekho L, Zakeri S, Djadid ND. Genetic mapping of the duffy binding protein (DBP) ligand domain of *Plasmodium vivax* from unstable malaria region in the Middle East. Am J Trop Med Hyg 2009; 80: 112-18.
14. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol 1993; 58: 283-92.
15. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61: 315-20.
16. Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: evidence of highly mixed infections in Chabahar district. Malar J 2002; 1: 2.
17. Roukens AH, Visser LG. Yellow fever vaccine: past, present and future. Expert Opin Biol Ther 2008; 8: 1787-95.
18. Chen GF, Inouye M. Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the Escherichia coli genes. Nucleic Acids Res 1990; 18: 1465-73.

Archive of SID

www.SID.ir