Archive of SID

فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال دوم، شماره ۶، بهار ۱۳۸۹

کلون سازی ژن توکسین باکتری کورینه باکتریوم دیفتریه

نسرین محمدی[۱*]، پرویز پاکزاد[۱]، مژگان بنده پور[۲]،فاطمه یاریان[۲]، مهسا یزدانفر[۲] و بهرام کاظمی[۳]

۱ . دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال nasrinmohammadi97@yahoo.com ۲ . مرکز تحقیقات سلولی ومولکولی دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی ۳ . گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

هدف این بررسی کلون کردن ژن توکسین کورینه باکتریوم دیفتریه به منظور تولید پروتئین نوترکیب و استفاده از این پروتئین در تحقیقات بعدی بود. ژن توکسین دیفتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و DNA باکتری کورینه باکتریوم دیفتریه، بعنوان الگو، تکثیر داده شد و در T وکتور pTZ57R کلون شد و سپس در وکتور بیان pETDuet- 1 ساب کلون گردید. ژن توکسین دیفتری با موفقیت گسترش یافت و در وکتور pTZ57R کلون گردید. قطعه DNA حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب، در وکتور pETDuet- 1 ساب کلون گردید و با روش های توالی یابی ژن، هضم آنزیمی و واکنش PCR تائید شد. در این بررسی ژن توکسین دیفتری در وکتور بیانی کلون و سپس تائید گردید و آماده ابراز پروتئین نوترکیب، بعنوان یک آنتی ژن قوی در تحریک سیستم ایمنی، شد. این ژن می تواند در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: دیفتری، ژن توکسین کورینه باکتریوم دیفتریه، پروتئین نوترکیب.

مقدمه

دیفتری، بیماری بسیار عفونت زا، توسط کورینه باکتریوم دیفتریه که یک باکتری هوازی، گرم مثبت و غیر اسپورزا است، بوجود می آید. نسبت مرگ و میر این بیماری، بین ۵ تا ۱۰ درصد بوده و درکودکان زیر ۵ سال و افراد بزرگسال، این نسبت ممکن است به بیش از ۲۰ درصد برسد، شیوع بیماری اگرچه بسیار نادر، اما هنوز هم در سراسر دنیا، حتی در کشورهای پیشرفته رخ می دهد (۱). این بیماری معمولا" از طریق قطرات تنفسی منتقل می گردد. بیماری دستگاه تنفسی فوقانی با علائمی مانند: گلو درد، تب ضعیف و یک غشای بهم چسبیده (که به پسودو ممبران یا غشای کاذب معروف است) در لوزه ها، گلو و حفرات بینی، تظاهر می کند. توکسین دیفتری،میوکاردیت (التهاب عضله قلب)، پلی نوریت (التهاب چندین عصب)، و دیگر اثرات سمی سیستمیک (بدنی) را ایجاد می کند. نوع معتدل یا خفیف بیماری دیفتری در پوست ایجاد می شود. عامل بیماری زای کورینه باکتریوم دیفتریه، توکسین دیفتری (*DT*)، پروتئینی با سمیت بسیار بالا بوده و در اثر آلودگی باکتری به کورینه فاژ خاصی که واجد tox^+ است، تولید می گردد (۲و۳). بعد از مجاورت توکسین با تریپسین و عوامل احیا کننده، توکسین (۶۲ کیلو دالتونی) به دو قطعه پلی پپتیدی گسسته می شود؛ که شامل قطعه A با وزن مولکولی ۱۴۵/۲۱ کیلو دالتون و قطعه B با وزن مولکولی ۳۸کیلو دالتون می باشند (۴و۵ و۶). قطعه A، ناحیه انتهای آمینی مولکول توکسین بوده که خاصیت آنزیمی داشته و عمل ADP - ریبوزیلاسیون (ADP-ribosilation) فاکتور طویل کننده زنجیره۲- (EF-2) را تسریع می کند که به موجب آن سنتز پروتئین در این سلول های یوکاریوتی مهار می شود و در نهایت سلول از بین می رود (۷ و۸ و۹). قطعه B، قسمت انتهایی

www.SID.ir

Archive of SID

کربوکسیل مولکول توکسین می باشد که برای اتصال به رسپتور مخصوص در غشاء پلاسمایی سلولهای یوکاریوتی حساس الزامی است. این قطعه خود از دو حوزه تاشونده ی پروتئینی مجزا تشکیل یافته است؛ حوزه R که به رسپتور واقع در سطح سلول متصل می شود و حوزه T که توان ورود به داخل غشاها را داشته و در انتقال غیر مستقیم قطعه A از عرض غشاء نقش دارد (۱۰و ۱۱و ۱۲). اتصال توکسین دیفتری به رسپتورش به روش اندوسیتوزی، توسط اندوسیتوز وابسته به کلاترین صورت می گیرد. pH اسیدی در اندوزوم ها باعث تغییر ساختاری توکسین شده و دوبل هلیکس در دومین-T وارد غشاء اندوزوم می شود. ساختار سنجاق سری (hairpin) وارد شده به غشاء به قطعه A کمک می کند تا از میان غشاء اندوزوم عبور نماید و بدنبال کم شدن پیوندهای دی سولفیدی قطعه A در سیتوزول رها می گردد (۱۳). هدف از این مطالعه کلون کردن ژن توکسین کورینه باکتریوم دیفتریه، به منظور تولید پروتئین نوترکیب و کاربرد آن در تحقیقات بعدی بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه، امکان کشت باکتری کورینه باکتریوم دیفتریه فراهم نبود، بنابراین DNA استخراج شده آن از موسسه سرم سازی و واکسن سازی رازی تهیه گردید. پلاسمید های pTZ57R و pETDuet-1 از شرکت Novagen خریداری گردید.

پرایمرها و واکنش PCR

برای ژن توکسین دیفتری، بر اساس انتهای ´۵ و ´۳ توالی آن یک جفت پرایمر:

Forward - 5`- GGA TCC ATG GGC GCT GAT GAT GTT G-3`

Reverse - 5`- GAA TTC TCA GCT TTT GAT TTC AAA AAA TAG CG-3`

طراحی و سنتز شد. روی پرایمر ها جایگاه شناسایی آنزیم های *BamHI* و *EcoRI* تعبیه شد. ژن توکسین دیفتری از طریق واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) افزایش یافت. برای انجام واکنش PCR حجم نهایی واکنش ۳۰ میکرولیتر بوده که شامل: ۱ میکرولیتر DNA باکتری (بعنوان الگو)، ۱۰پیکو مول از هر پرایمر ، ۵/۱میلی مولار $MgCl_2$، ۲/۰میلی مولار dNTP، بافر ۱x (1X PCR buffer)، ۲۵/۱ واحد آنزیم *Taq DNA polymerase*، آب دیونیزه به میزان ۲۲میکرولیتر بود. برنامه ی حرارتی مورد استفاده شامل: ۹۴درجه سانتی گراد ۵دقیقه، سپس ۳۰چرخه دمایی به ترتیب ۹۴درجه سانتی گراد ۳۰ثانیه، ۶۳درجه سانتی گراد ۱دقیقه، ۷۲درجه سانتی گراد ۱دقیقه، و یک مرحله نهایی ۷۲درجه سانتی گراد ۵دقیقه تنظیم گردید(۱۴). سپس محصول PCR در ژل آگاروز ۵/۱ درصد الکتروفورز گردید و با رنگ سایبر گرین رنگ آمیزی شد و با استفاده از نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول PCR با توالی یابی تائید گردید.

کلون کردن ژن

محصول PCR در پلاسمید pTZ57R از طریق روش کلون کردن T/A با استفاده از آنزیم *T4 DNA Ligase* کلون گردید (۱۵). محتوای واکنش به سلول پذیرای سویه *Top10* باکتری اشریشاکلی انتقال یافت (۱۶) و محصول واکنش روی پلیت آگار حاویX-gal (5-Bromo-4-choro-3-Indolyl-β-D- galactoside) و IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) و آمپی سیلین پخش گردید. استخراج پلاسمید از کلنی های سفید مشکوک به داشتن پلاسمید نوترکیب انجام گرفت (۱۷) و توسط آنزیم های محدودگر *BamHI* و *EcoRI* هضم گردید. قطعه DNA (ژن *dt*) خارج شده در وکتور بیانی pETDuet-1 هضم شده با آنزیم های *BamHI* و *EcoRI* ساب کلون شد. پلاسمید نوترکیب با واکنش PCR و روش هضم آنزیمی و توالی یابی تائید گردید.

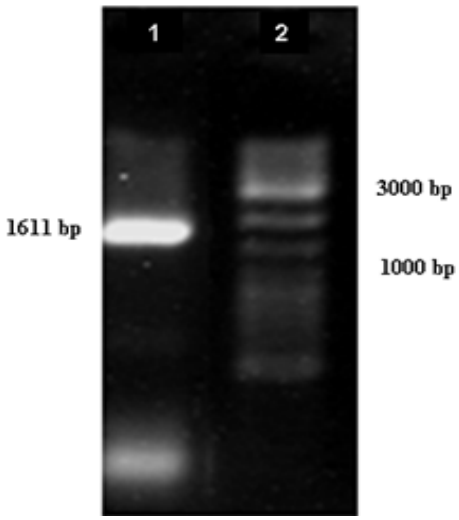
نتایج و بحث

ژن توکسین باکتری کورینه باکتریوم دیفتریه بواسطه DNA باکتری استخراج شده و با استفاده از پرایمرهای مخصوص توسعه یافت. در شکل (۱) محصول PCR ژن *dt* با طول ۱۶۱۱ جفت باز نشان داده شده است.محصول PCR به T – وکتور pTZ57R متصل گردید و به باکتری اشرشیاکلی انتقال یافت. پلاسمید نوترکیب تحت

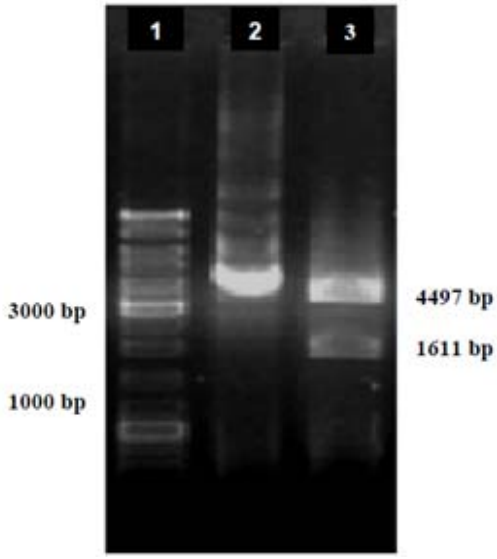
www.SID.ir

Archive of SID

اثر آنزیم های محدود گر *BamHI* و*EcoRI* هضم شد و با الکتروفورز درژل آگارز ۱٪، پلاسمید pTZ57R نوترکیب هضم نشده با وزن ملکولی bp ۴۴۹۷و همچنین قطعه خارج شده از پلاسمید نوترکیب هضم شده با وزن ملکولیbp ۱۶۱۱ مشاهده شد (شکل ۲). وجود قطعه ۱۶۱۱جفت بازی ژن توکسین دیفتری در پلاسمید فوق با روش PCR با پرایمرهای اختصاصی مورد تائید قرار گرفت .محصول هضم آنزیمی با کیت استخراج DNA از ژل خالص گردید و به وکتور بیانی pETDuet-1 با جایگاه برش آنزیمی *BamHI* و *EcoRI* ساب کلون گردید، پلاسمید pETDuet-1 نوترکیب هضم نشده با وزن ملکولی bp ۷۰۳۱ و قطعه ژنی حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pETDuet-1 نوترکیب با وزنp۱۶۱۱ مشاهده گردید (شکل ۳). وجود قطعه ی DNA با وزن ملکولی bp ۱۶۱۱در پلاسمید مورد نظر در واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *dt*، تائید گردید. در نیمه نخست قرن بیستم، دیفتری یکی از علل بسیارمهم مرگ و میر، در سراسر جهان بود (۱۸). اگزوتوکسین سویه های توکسین زای کورینه باکتریوم دیفتریه مسئول سمیت سیستمیک و موضعی می باشند که در طول مدت بیماری ایجاد می گردند (۱۹). مصونیت در برابر دیفتری اساسا" در اثر تولید آنتی بادی های IgG، بر علیه اگزوتوکسین آن تامین می شود که این توکسین یک آنتی ژن بسیار قوی محسوب می گردد (۲۰). در سال ۱۹۰۹، Smith پیشنهاد داد که مخلوطی از مواد غیر سمی توکسین دیفتری و آنتی توکسین آن به صورت مساوی جهت ایمونیزاسیون فعال در برابر دیفتری استفاده شوند (۲۱) و Roman در سال ۱۹۲۴به از بین بردن سمیت توکسین مزبور بدون تخریب خاصیت ایمونوژنیسیتی آن با استفاده از فرمالین پی برد (۲۲)، که امروزه به توکسوئید دیفتری معروف است و در واکسن های ترکیبی مانند واکسن توکسوئید تتانوس- دیفتری- پرتوسیس [DTP] یا واکسن پرتوسیس فاقد سلولی توکسوئید تتانوس – دیفتری [DTaP] برای بچه ها و واکسن توکسوئید دیفتری- تتانوس برای نوزادان [Td] جهت مصونیت در برابر بیماری دیفتری بکار می رود (۲۳).



شکل ۱. الکتروفورز در ژل اگارز ۱/۵٪، ستون ۱- محصول PCR،ستون ۲ - DNA مارکر 100 bp



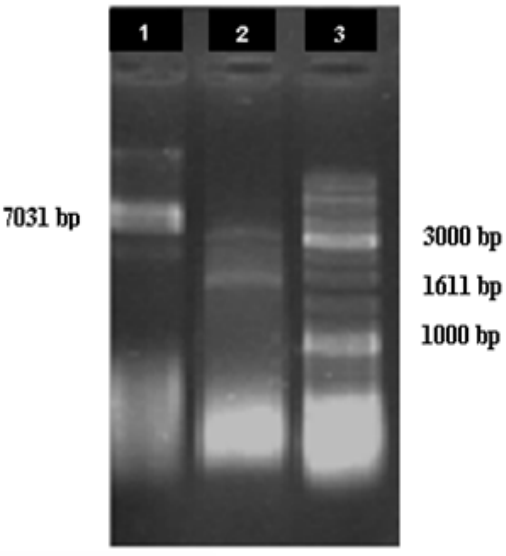
شکل ۲. الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪، تائید کلونینگ ژن در pTZ57R . ستون ۱- DNA مارکر 100 bp ، ستون ۲- pTZ57R نوترکیب هضم نشده ، ستون ۳ - pTZ57R نوترکیب هضم شده توسط *BamH1*و*EcoR1*

واکسن این بیماری به دلیل پوشش ایمنی محدود، نیازمند چندین دوز برای دستیابی به مصونیت کافی می باشد، علاوه بر این باعث ایجاد بعضی اثرات جانبی در بچه ها می باشد که شامل: واکنش های آلرژیک (کهیر یا ایجاد جوش و راش در محل تزریق)، حمله ناگهانی یا شوک می باشد. علاوه بر این توکسوئید ها با روش قدیمی

www.SID.ir

Archive of SID

توسط تغییر و تبدیل شیمیایی توکسین اصلی تهیه می شوند(۲۴)، برای مثال فرمالدئید، که یک ترکیب موتاژن و سرطان زا شناخته شده است(۲۵). اما امروزه تکنیک های مولکولی کلون کردن ژن های توکسین، روش های ژنتیکی مختلفی را برای سمیت زدایی فراهم می کنند. تکنولوژی تولید پروتئین نوترکیب شامل تولید پروتئین هایی است که به سهولت از منابع طبیعی تخلیص نمی شوند. این روش، ایجاد تعداد مشخص و محدودی از اسید آمینه های جانشین برای رفع سمیت پروتئین های اصلی را دنبال می کند (۲۶و۲۷و۲۸). توکسوئید های نوترکیب علاوه بر اینکه توانایی جایگزینی توکسوئید های کلاسیک را دارند، با استفاده از مهندسی ژنتیک وارد باکتری های زنده ضعیف شده می شوند. چنین واکسن های زنده ای برای اکثر بیماری ها تنها با توزیع یک دوز مصونیت ایجاد می نمایند (۲۹). تاکنون بعضی مطالعات اپیدمیولوژی بواسطه این آنتی ژن انجام شده است (۲۳) و در برخی، از این آنتی ژن برای تهیه واکسن استفاده شده است (۳۰)، در بررسی های دیگر این آنتی ژن برای کارهای تشخیصی بکار رفته است (۳۱و۳۲و۳۳). هدف از این مطالعه کلون کردن ژن توکسین کورینه باکتریوم دیفتریه و آماده سازی برای ابراز پروتئین نوترکیب بعنوان یک آنتی ژن قوی در تحریک سیستم ایمنی و استفاده از آن در تحقیقات بعدی بود.



شکل ۳ . الکتروفورز در ژل ۱٪، تائید کلونینگ ژن در وکتور بیانی pETDuet-1 .ستون ۱ - pETDuet-1 نوترکیب هضم نشده، ستون ۲ - pETDuet-1 نوترکیب هضم شده توسط *BamH1*و*EcoR1* ، ستون ۳ - DNA مارکر 100 bp

سپاسگزاری:

بدین وسیله از زحمات بی دریغ مسئولان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

منابع:

1. Todar K, (2008). Diphtheria. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. 1-8.
2. Bachran C; et al., (2007). Quantification of diphtheria toxin-mediated ADP-ribosylation in a solid-phase assay. Clinical Chemistry.; **53**(9): 1676-1683.
3. Brooks G.F; Carroll C.K; Butel J.S; Morse A.S, (2007). Jawetz, Melnick & Adelberg,s Medical Microbiology, edited by G.F. Brooks,. 24th edition, 154 -217
4. DeLange R.J; Drazin R.E; Collier R.J, (1976). Amino-acid sequence of fragment A, an enzymatically active fragment from diphtheria toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; **73**: 69-72.
5. Drazin R; Kandel J; and Collier J, (1971). Structure and activity of diphtheria toxin. II. Attack by trypsin at a specific site within the intact molecule. J. Biol. Chem.; **246**: 1504-1510.
6. Gill D.M; Dinius L. L,(1971). Observations on the structure of diphtheria toxin. J. Biol. Chem.; **246**: 1485-1491.
7. Collier R.J; Kandel J, (1971). Structure and activity of diphtheria toxin. I. Thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymatically active and inactive fragments. J. Biol. Chem.; **246**: 1496-1503.
8. Gill D.M; Pappenheimer A. M. JR, (1971). Structure-activity relationships in diphtheria toxin. J. Biol. Chem.; **246**: 1492-1495.
9. Honjo T; Nishizuka Y; Hayaishi O; Kato L, (1968). Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis by diphtheria toxin. J. Biol. Chem.; 243: 3553-3555.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Naglich J.G; Metherall J.E; Russell D.W; Eidels L, (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. Cell.; **69**(6): 1051–1061.
11. Ittelson T.R; Gill D. M, (1973). Diphtheria toxin: specific competition for cell receptors. Nature (London). **242**: 330-332.
12. Uchida T; Pappenheimer A. M.JR; Greany R. J, (1973). Diphtheria toxin and related proteins.I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. J. Biol. Chem.; **248**: 3838-3844.
13. Papini E; Rappuoli R; Murgia M; Montecucco C, (1993). Cell penetration of diphtheria toxin. Reduction of the interchain disulfide bridge is the rate-limiting step of translocation in the cytosol. J. Biol. Chem.; **268**(3): 1567–1574.
14. Pherson M.C; Moller M.J, (2000). The Basics from Background to Bench. Understanding PCR 1th. Oxford, UK: Bios Scientific publishers. 9-21.
15. Gaastra W; Hansen K, (1984). Ligation of DNA with T4 DNA ligase. In methods in Molecular Biology. Nucleic Acids. Ed, Walker JM. Humana press.; **2** : 225-30.
16. Hanahan D, (1983). Studies on transformation on E. coli with plasmids. J Mol Biol.; **166** (4): 557-580.
17. Feliciecello I; Chinali G, (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from E.coli. Anal Biochem. **212**(2): 394 - 401.
18. Skogen V; Danilova J.P; Koroleva V.N; Halvorsen D.S; Sjursen H, (2000) Immunity to diphtheria among childern in Northen Norway and North- Western Russia. J Vaccine.; **19**: 197-203.
19. MacGregor R.R, (1995). Corynebacterium diphtheriae, in Principles and practice of infectious diseases. Edited by Mandell G.L; Bennett J.E; Dolin R., Churchill Livingstone: New York. 1865 - 1872.
20. Bigio M; Rossi R; Nucci D; Antoni G; Rappuoli R; Ratti G, (1987). Conformational changes in diphtheria toxoids. Analysis with monoclonal antibodies. FEBS Lett. **218:** 271–276.
21. Smith T; (1909). Active immunity produced by so called balanced or neutral mixtures of diphtheria toxin and antitoxin. J. Exp.Med.; **11**: 241.
22. Ramon G; (1924). Sur la toxine et sur l' anatoxine diphtériques. Ann Inst Pasteur.; **38**: 1-10.
23. Holmes R.K, (2000). Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. Journal of Infectious Diseases.; **181**(SUPPL. 1).
24. Diphtheria vaccination, (2009). Vaccines and preventable diseases: Centers for Disease Control and Prevention. http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/diphtheria/default.htm.
25. Turosk V, (1985). Formaldehyde: Analytical Chemistry and Toxicology; Advances in Chemistry. American Chemical Society,Washington DC.
26. Barbieri J.T; Armellini D; Molkentin J; Rappuoli R, (1992). Construction of a diphtheria toxin A fragment-C180 peptide fusion prote.in which elicits a neutralizing antibody response against diphtheria toxin and pertussis toxin. Infect. Immun.; **60**:5071–5077.
27. Beachey E.H; Seyer J. M; Dale J. B; Simpson W. A; Kang A, (1981). Type specific protective immunity evoked by synthetic peptide of Streptococcus pyogenes M protein. Nature. **292**:457.
28. Fromen-Romano C; Maille`re B; Drevet P; Lajeunesse E; Ducancel F; Boulain J. C; Menez A, (1997). Transformation of a non-enzymatic toxin into a toxoid by genetic engineering. Protein Engineering; **10**: 101–108.
29. Killeen K.P; et al., (1992). Reversion of recombinant toxoids: Mutations in diphtheria toxin that partially compensate for active-site deletions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.; **89**(13): 6207-6209.
30. Lobeck K, and et al., (1998). Towards a recombinant vaccine against diphtheria

www.SID.ir

Archive of SID

toxin. Infection and Immunity.; **66**(2): 418-423.

31. Aybay C. and Yücel A, (2002). Development of a diagnostic and screening ELISA system for measuring diphtheria anti-toxin levels. Gazi Medical Journal.; **13**(4): 177-186.
32. Nakao H. and Popovic T, (1997). Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. Journal of Clinical Microbiology.; **35**(7):1651-1655.
33. Mikhailovich V.M., et al., (1995). Application of PCR for detection of toxigenic Corynebacterium diphtheriae strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. Journal of Clinical Microbiology; **33**(11): 3061-3063.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir