مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۴، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۱/ ۷۳-۶۴

مقاله پژوهشی

بهینه سازی بیان، استخراج و تخلیص ناحیه N- ترمینال ژن IpaD *شیگلا دیسانتری* با استفاده از آنالیز پروتئومیکسی

مهدی حصارکی[۱]، دکتر مجتبی سعادتی[۱،۲]*، دکتر حسین هنری[۱]، دکتر غلامرضا اولاد[۱]، محمد هیئت[۲]، مختار زارع[۱]

[۱]مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران، ایران؛ [۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱٤ اصلاح نهایی: ۹۰/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۲۸

چکیده:

زمینه و هدف: **باکتری *شیگلا دیسانتری* یکی از عوامل پاتوژن مهم است که علی‌رغم تلاش‌های چندین ساله برای تهیه واکسن علیه آن هنوز مطالعات گسترده پیرامون آن ادامه دارد. محصولات پلاسمید تهاجمی شیگلا (Ipa) نقش مهمی در تهاجم باکتری ایفا می‌کنند. پروتئین IpaD یکی از اعضای این خانواده است که به عنوان کاندید واکسن شیگلا مطرح می‌باشد. مطالعات متعدد بر روی این پروتئین نشان داده که ناحیه N- ترمینال آن نقش مهمی در فرآیند تهاجمی باکتری دارد. این مطالعه با هدف بهینه سازی بیان N- ترمینال ژن IpaD به منظور افزایش تولید پروتئین نو ترکیب انجام شد.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی باکتری *E. coli* BL21(DE3) حامل پلاسمید pET-28a که ژن ناحیه N- ترمینال IpaD در آن همسانه سازی شده بود جهت مطالعات مورد استفاده قرار گرفت. پس از کشت باکتری، تاثیر سه فاکتور زمان القا، دما و غلظت ماده القا کننده ایزو-پروپیل-تایوبتا دی گالاکتوپیرانوزید (IPTG) بر میزان بیان، با استفاده از ژل سدیم دو دسیل سولفات-پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) به صورت کیفی بررسی گردید. با استفاده از تصاویر دو بعدی تهیه شده از ژل‌ها با کمک نرم افزار آنالیز ژل‌های دو بعدی بررسی کمی بیان پروتئین صورت پذیرفت. مراحل استخراج و تخلیص پروتئین نوترکیب با کمک روش شیب اوره آغاز و با عبور نمونه‌ها از ستون کروماتوگرافی پایان یافت.**

یافته‌ها: **نتایج بر روی ژل‌های SDS-PAGE نشان داد که میزان تقریبا مشابهی از تولید پروتئین نوترکیب در زمان القا، دما و غلظت های مختلف IPTG بیان وجود دارد، اما یافته‌های نرم افزاری نشان داد بهترین شرایط بیان ناحیه N- ترمینال پروتئین IpaD در وکتور pET-28a دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۰/۷ میلی مولار IPTG و زمان ۳ ساعت بعد از القا می‌باشد.**

نتیجه‌گیری: **بر اساس نتایج این مطالعه هر پروتئین بعد از فرآیند همسانه سازی شرایط بیان مخصوص به خود را دارا می‌باشد که شرایط دمایی و طول زمان القا سلول‌ها در مقدار تولید پروتئین موثرتر می‌باشند.**

واژه‌های کلیدی: *شیگلا دیسانتری*، پلاسمید تهاجمی، پروتئین نوترکیب، پروتئومیکس.

مقدمه:

باکتری شیگلا به عنوان یکی از اعضای خانواده بزرگ انتروباکتریاسه شامل باسیل‌های گرم منفی و بدون اسپور است که بر اساس O آنتی ژن لیپوپلی ساکارید به چهار گروه دیسانتری، فلکسنری، بوئیدی و سونئی تقسیم می‌شوند. از میان این چهار گونه، *شیگلادیسانتری* به دلیل تولید توکسین از اهمیت خاصی برخوردار است. این باکتری باعث بیماری شیگلوزیس شده که در این بیماری قسمتی از روده کوچک

***نویسنده مسئول:** تهران-دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه- مرکز تحقیقات زیست شناسی- تلفن: ۷۷۱۰٤۹۳٤-۰۲۱،*

E-mail:saadati_m@yahoo.com

www.SID.ir

تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بیشتر علائم عفونی شیگلا شامل: اسهال، تب، حالت تهوع، استفراغ، گرفتگی و درد شکمی و ظهور خون، موکوس در مدفوع می‌باشد (۳،۲،۱).

طبق گزارش انتشار یافته از سوی سازمان بهداشت جهانی تا سال ۲۰۰۹، حدود ۱۶۴/۷ میلیون نفر در جهان به بیماری شیگلوزیس مبتلا شده‌اند که از این میان ۱۶۳/۲ میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه و ۱/۵ میلیون نفر درکشورهای توسعه یافته بوده اند. هر ساله زندگی ۱/۱ میلیون نفر توسط شیگلا تهدید می‌شود که از این میان ۵۸۰ هزار مورد ابتلا به شیگلوزیز طی بازگشت از کشورهای در حال توسعه گزارش شده است (۴). به علت عفونت زایی بالای این باکتری حتی در تعداد کم آن (حتی کمتر از ۱۰۰عدد از میکرو ارگانیسم)، بر اهمیت پیشگیری و درمان این عامل بیماری زا می‌افزاید. شیگلا معمولاً در مخاط روده قرار می‌گیرد و در خون و احشا داخل نمی‌شود. علامت تشخیص شیگلوزیس در بیشتر بیماران بر اساس خون موجود در مدفوع می‌باشد (۷،۶،۵). بیماری زایی شیگلا به سه فاکتور قدرت تهاجم، اندوتوکسین و اگزوتوکسین وابسته است. قدرت تهاجم این باکتری تا حد زیادی به محصولات پلاسمید تهاجمی (Ipa) این باکتری و عامل انتشار بین سلولی آن (VirG) وابسته است. خطرناکترین اگزوتوکسین شیگلا Shigatoxin (STX) می‌باشد که می‌تواند در بیماران ایجاد سندرم اورمی همولیتیک (HUS) کند (۸).

مکانیسم ورود شیگلا به سلول اپیتلیالی به یک سری از پروتئین‌های سطحی باکتری وابسته است. مهمترین پروتئین‌ها، توسط پلاسمید تهاجمی باکتری کد می‌شوند. این پروتئین‌ها شامل IpaA/B/C/D/H می‌باشند (۹). امروزه از میان این پروتئین ها، IpaB/C/D به عنوان کاندیدای واکسن شیگلا مطرح هستند. IpaD نقش مهمی در تهاجم باکتری و به سطح آمدن سایر پروتئین‌های موثر در تهاجم و بیماری زایی (IpaB/C) بازی می‌کند (۱۲،۱۱،۱۰).

پروتئین IpaD با وزن مولکولی ۳۷ کیلو دالتون، ساختار دمبلی شکل به همراه یک ناحیه درون مولکولی پیچ در پیچ (coild-coild) دارد. این پروتئین از ناحیه C- ترمینال خود به سیستم ترشحی نوع سوم باکتری (Type III secretion system) متصل است و از ناحیه N- ترمینال با محیط اطراف در تعامل مستقیم می‌باشد. مطالعات بیوشیمیایی و ساختاری که بر روی این پروتئین در سال ۲۰۰۸ در آمریکا صورت گرفت نشان داد ناحیه N- ترمینال IpaD در فرآیند تهاجمی باکتری نقش تاثیرگذاری دارد. تحقیقات بر روی نواحی سطحی اپیتوپ IpaD هم ثابت کرد که تقریباً تمام این نواحی در ناحیه N- ترمینال این پروتئین قرار دارند (۱۶-۱۳).

فرآیند مطالعاتی موثر در مقدار بیان پروتئین معمولاً با مطالعه تغییر فاکتورهای بیانی بر روی SDS-PAGE آغاز می‌شود و نتایج حاصل از آن به صورت کیفی و مشاهده مستقیم می‌باشد. مسلماً این روش مطالعه می‌تواند دارای خطا باشد. بدیهی است جهت بررسی کمی نیاز به استخراج، خالص سازی، غلظت سنجی پروتئین و نهایتاً بررسی مجدد بر روی ژل SDS-PAGE می‌باشد. اما به تازگی استفاده از روش تجهیزاتی و نرم افزاری (Melanie) گزارش گردیده است که می‌تواند ژل اولیه را به صورت دوبعدی آنالیز و ضمن سنجش کمی و کیفی تمام باندهای تفکیکی بر روی آن و همچنین تعیین دانسیته هر باند، نهایتاً میزان غلظت پروتئین بیانی نسبت به کل پروتئین‌های سلولی را ارزیابی نماید.

هدف از این مطالعه تغییر در فاکتورهای تاثیر گذار بیان و بررسی متنوع نتایج این تغییرات، جهت بهینه سازی بیان ناحیه N- ترمینال ژن IpaD به منظور افزایش تولید پروتئین نوترکیب، با استفاده از روش مستقیم تجهیزاتی- نرم افزاری می‌باشد.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی بعد از کسب اطلاعات ناشی از داده‌های کیفی به بررسی و مقایسه آن با نتایج کمی حاصل از نرم افزار پرداخته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری *E. coli* BL21(DE3) حامل پلاسمید pET-28a که ناحیه N- ترمینال ژن IpaD در آن همسانه سازی شده بود جهت مطالعات مورد استفاده قرار گرفت (۱۶). جهت بررسی بیان پروتئین نسبت به رشد باکتری اقدام گردید. به این منظور ابتدا از نمونه باکتری استوک (که در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌گردید) در محیط لوریا برتانی (LB) مایع حاوی ۸۰ میلی گرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین تلقیح و نسبت به رشد آن در شرایط ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اقدام شد. پس از رسیدن جذب نوری (OD) به ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، القا بیان ژن به وسیله Isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG) صورت گرفت. سپس باکتری در دماهای ۱۵، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت و تحت غلظت‌های مختلف عامل القایی IPTG (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۱میلی مولار) قرار گرفت. سپس نمونه‌ها در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب سلولی بعد از سونیکیت کردن (قدرت ۷۰٪ و پالس ۰/۵)، بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شدند.

از ژل‌های رنگ آمیزی شده به روش کوماسی بلو تصویر دو بعدی با دستگاه Gs-800 calibrated Denstometer تحت نرم افزار PD.Quest 7.2.2 (Bio-Rad) تهیه گردید. سپس تصاویر تهیه شده با کمک نرم افزار Melanie 7 در راستای انتخاب بهترین دما و بهترین غلظت عامل القایی مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۹،۱۸،۱۷).

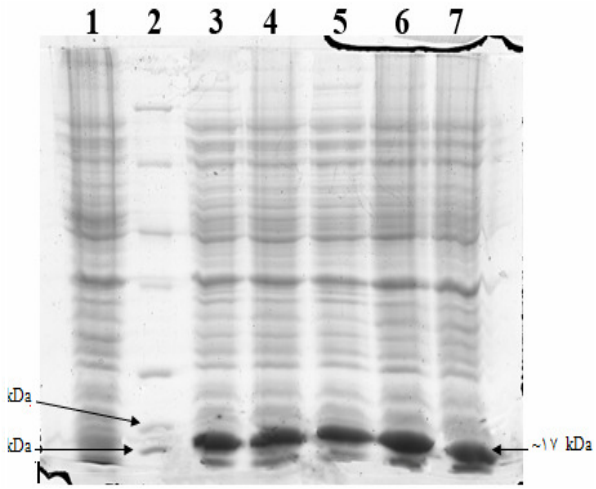
با توجه به نتایج به دست آمده و مشخص شدن بهترین دما و مناسب‌ترین غلظت عامل القایی برای تعیین مدت زمان القا مجدداً بیان دیگری در زمان و غلظت IPTG ثابت (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۰/۷ میلی مولار) و مدت زمان القا متغیر (۱،۲،۳،۴ و ۵ ساعت) گذاشته شد و سلول‌ها را بعد از رسوب دادن و سونیکیت کردن (قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۵) بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند و بعد از تهیه تصاویر دوبعدی با نرم افزار Melanie 7 همانند مراحل فوق مورد بررسی قرار گرفت (۲۰،۲۱).

به منظور محلول سازی انکلوژن بادی‌ها و پروتئین بیان شده، از روش شیب افزایشی غلظت اوره استفاده گردید. در این فرآیند، ابتدا رسوب سلولی در ۱ میلی لیتر بافر نمکی فسفات (PBS) حل و بعد از شکستن توسط دستگاه Ultra sonicatore (با قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۵)، نمونه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس فاز رویی حذف و مجدداً به رسوب حاصله ۱ میلی لیتر PBS اضافه کرده و بعد از مخلوط کردن در شرایط قبلی سانتریفوژ شد. به رسوب باقیمانده ۱ میلی لیتر PBS حاوی اوره ۲ مولار تیمار و مجدداً سانتریفوژ در شرایط قبلی صورت پذیرفت. پس از حذف مایع رویی مجدداً برای رسوب حاصل، این مرحله تکرار شد. در مرحله آخر، بعد از اضافه کردن ۱ میلی لیترPBS حاوی اوره ۸ مولار به نمونه و بعد از مخلوط کردن، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. نمونه حاصله از فرآیند شیب اوره پس از نگهداری ۴۸ ساعته در دمای ۴ درجه سانتیگراد، طبق شرایط فوق سانتریفوژ شد. فاز رویی بعد از عبور از فیلتر ۰/۴۸ میکرون، جهت تخلیص پروتئین نوترکیب در ستون کروماتوگرافی تلقیح شد. به منظور بررسی پروتئین فرآیند تخلیص نمونه‌های خارج شده در مراحل مختلف از ستون بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز گردید (۲۲،۲۳).

تعیین غلظت پروتئین تخلیص شده به کمک روش برادفورد انجام شد. در این راستا بعد از تهیه آلبومین سرم گاوی (BSA) از شرکت سیناژن براساس میزان جذب (OD) نمودار استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر رسم گردید و در مرحله بعد با استفاده از آن، نمودار غلظت پروتئین‌های نوترکیب تخلیص شده تخمین زده شد (۲۴).

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر شماره ۱: تصویر ژل SDS-PAGE، بیان پروتئین ناحیه N- ترمینال ژن IpaD در دمای ثابت 25 درجه سانتی گراد پس از ٦ ساعت القا در غلظت های متغیر عامل القایی (IPTG).

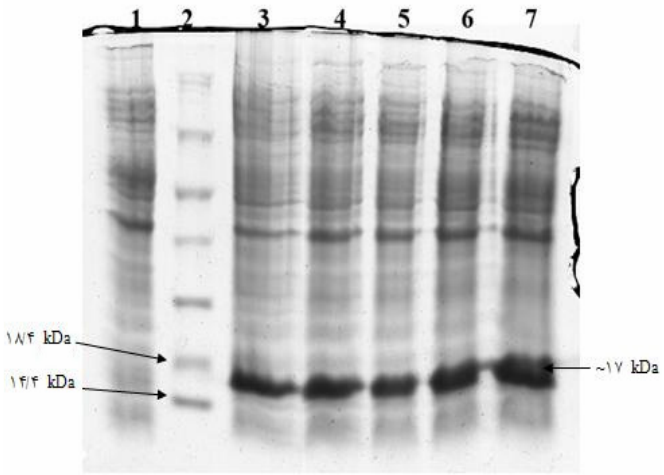
چاهک ۱: نمونه کنترل بدون عامل القایی (IPTG).

چاهک ۲: مارکر پروتئینی SM0431 فرمنتاز.

چاهک ۷-۳ به ترتیب غلظت های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی مولار غلظت IPTG

SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوبتا دی گالاکتوپیرانوزید



تصویر شماره ۲: تصویر ژل SDS-PAGE، بیان پروتئین ناحیه N- ترمینال ژن IpaD در دمای ثابت ۳۰ درجه سانتی گراد پس از ٦ ساعت القا در غلظت های متغیر عامل القایی (IPTG)

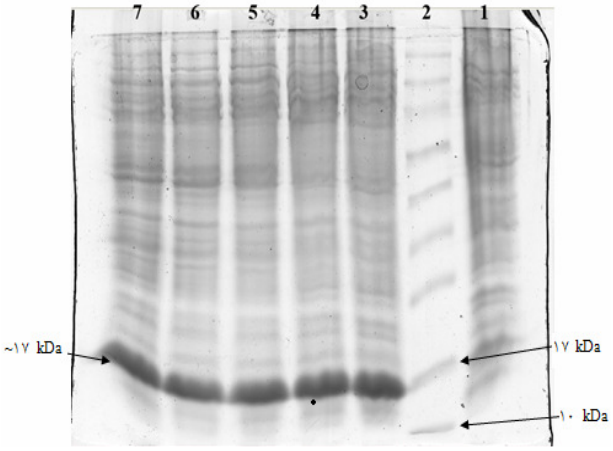
چاهک ۱: نمونه کنترل بدون عامل القایی (IPTG).

چاهک ۲: مارکر پروتئینی SM0431 فرمنتاز.

چاهک ۷-۳ به ترتیب غلظت های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی مولار غلظت IPTG

SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوبتا دی گالاکتوپیرانوزید



تصویر شماره ۳: تصویر ژل *SDS-PAGE*، بیان پروتئین ناحیه N- ترمینال ژن IpaD در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی گراد پس از ٦ ساعت القا در غلظت های متغیر عامل القایی (IPTG).

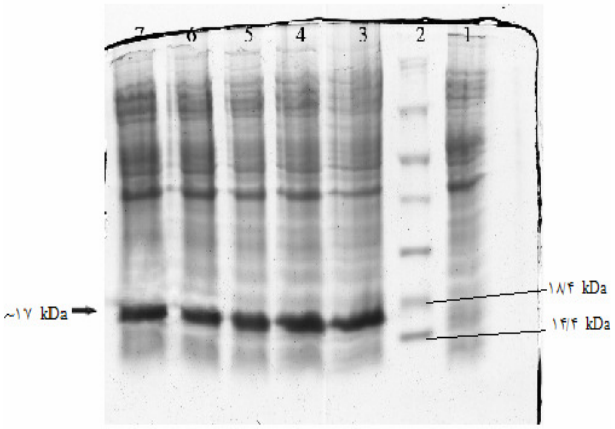
چاهک ۱: نمونه کنترل بدون عامل القایی (IPTG).

چاهک ۲: مارکر پروتئینی SM0431 فرمنتاز.

چاهک ۷-۳ به ترتیب غلظت های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی مولار غلظت IPTG

SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوبتا دی گالاکتوپیرانوزید



تصویر شماره ۴: تصویر ژل *SDS-PAGE*، بیان پروتئین ناحیه N- ترمینال ژن IpaD در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی گراد با غلظت نهایی ۰/۷ میلی مولار عامل القایی (IPTG) تا ۵ ساعت بعد از القا

چاهک ۱: نمونه کنترل بدون عامل القایی (IPTG).

چاهک ۲: مارکر پروتئینی SM0431 فرمنتاز.

چاهک۷-۳ به ترتیب ۵-۱ ساعت بعد از القا

SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوبتا دی گالاکتوپیرانوزید

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۱: نتایج تراکم سنجی به روش نرم افزاری و غلظت سنجی پروتئین بیانی به روش برادفورد در دمای ثابت (٦ ساعت)، دمای متغیر و غلظت مختلف IPTG

دمای القایی	غلظت IPTG (mM)	تراکم پروتئین (I)	سطح اشغالی (A)	سطح اشغالی /تراکم پروتئین (I/A)	غلظت کل پروتئین (mg)
۳۷	۱	٤۳٥۱	٥۷/۰۸٥٤	۷٦/۲۱۹۱	٥۳
۳۷	۰/۷	٤۲٤۳	٥٥/٥٤۲۰	۷٦/۳۹۲٦	٥۳
۳۰	۱	۳۰۱۸	٥٤/۲٦٦۰	٥٥/٦۱٤۹	٤۲
۳۰	۰/۷	۳۰٥۸	٤۲/٥۸٤٦	۷۱/۸۰۹۹	٤۲
۲٥	۱	۳٥٤۸	٤۷/۳۱۸٥	۷٤/۹۸۱۲	۳۷
۲٥	۰/۷	۳٤٥۸	٤٦/٤۸۰٦	۷٤/۹۷۷٥	۳۷

IPTG: *ایزو-پروپیل-تایوبتا دی گالاکتوپیرانوزید*

یافته‌ها:

در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد مقدار بیان و تولید پروتئین بسیار ناچیز بود، لذا سبب حذف ادامه مطالعات در این شرایط دمایی گردید. مقایسه مقدار پروتئین بیان شده در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های مختلف عامل القایی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در غلظت‌های ۰/۷ و ۱ میلی مولار IPTG بیشترین غلظت پروتئین بیانی مشاهده شد. نتایج به وضوح نشان داد که با افزایش دما (تا ۳۷ درجه سانتیگراد)، مقدار غلظت پروتئین نوترکیب افزایش یافته است. همچنین این مطالعات نشان داد که تقریباً در غلظت ۰/۷ میلی مولار از عامل القایی، پروموتور وکتور به وسیله IPTG تقریباً اشباع شده و افزایش مقدار عامل القایی نمی‌تواند در مقدار بیان پروتئین نوترکیب تاثیر مشخصی بگذارد (تصاویر شماره ۳-۱ و جدول شماره ۱).

بعد از مشخص شدن دمای بهینه بیان و غلظت عامل القایی جهت به دست آوردن مدت زمان بیان، بعد از القا نمونه‌هایی با فاصله زمانی یک ساعت از هم تهیه گردید و مشخص شد که بیشترین بیان در سه ساعت ابتدایی بوده و بعد از سه ساعت مقدار بیان کاهش پیدا کرده است (تصویر شماره ۴ و جدول شماره ۲).

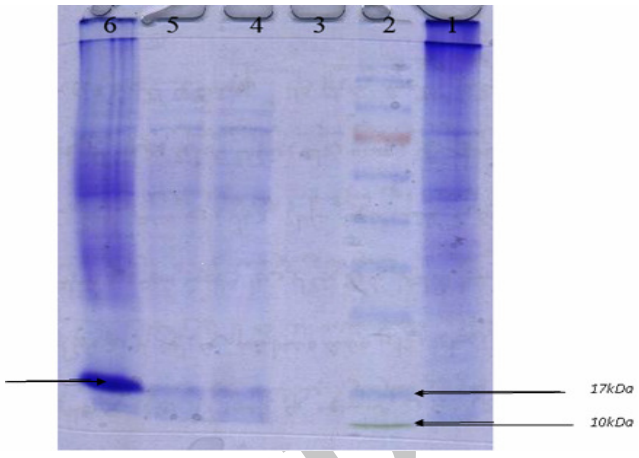
جدول شماره ۲: نتایج تراکم سنجی به روش نرم افزاری و غلظت سنجی پروتئین بیانی به روش برادفورد در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، غلظت ثابت ۰/۷ میلی مولار IPTG و زمان‌های مختلف بیان

مدت زمان القای (h)	تراکم پروتئین (I)	سطح اشغالی (A)	سطح اشغالی /تراکم پروتئین (I/A)	غلظت کل پروتئین (mg)
۱	۲۱۰٦/۰۰	۳۹/۰٥۱۸	٥۳/۹۲۸۳	۳۳
۲	۲۹٤۸/۰۰	٤۳/۸۰۹۸	٦۷/۲۹۰۸	٤۷
۳	۲۸٤۸/۰۰	۳٦/٤۰٥۱	۷۸/۲۳۰۷	٦۲
٤	۲۷۷۱/۰۰	۳٥/٥٦۲٤	۷۷/۹۱۹۳	٥۸
٥	۳۲۱۱/۰۰	٤۱/۷٦۸۱	۷٦/۸۷٦۸	٥٥

IPTG: *ایزو-پروپیل-تایوبتا دی گالاکتوپیرانوزید*

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر شماره ۵: بررسی حلالیت پروتئین نو ترکیب با استفاده از روش شیب افزایشی غلظت اوره در ژل *SDS-PAGE*

چاهک۱: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با ۱ PBS.

چاهک ۲: نشانگر پروتئینی SM0671 *فرمتاز .*

چاهک ۳: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با۲ PBS.

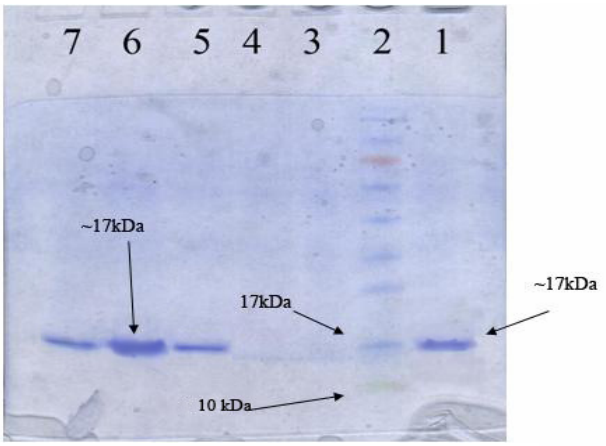
چاهک ٤: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با PBS *حاوی اوره ۲ مولار (مرحله اول).*

چاهک ٥: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با PBS *حاوی اوره ۲ مولار (مرحله دوم).*

چاهک ٦: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با PBS *حاوی اوره ۸ مولار.*

SDS-PAGE *: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید*

PBS: *بافر نمکی فسفات*



تصویر شماره ۶: ژل *SDS-PAGE*، تایید تخلیص پروتئین نو ترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی.

چاهک ۱: نمونه حاوی پروتئین قبل از ستون.

چاهک ۲: نشانگر پروتئینی SM0671 *فرمتاز.*

چاهک ۳: بافر F *بعد از عبور از ستون.*

چاهک ٤: بافر C *دناتوره.*

چاهک ٥ : بافر D *دناتوره.*

چاهک ٦: بافر E *دناتوره.*

چاهک ۷: بافر MES

SDS-PAGE *: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید*

PBS: *بافر نمکی فسفات*

پس از مشخص شدن نامحلول بودن پروتئین بیانی، برای محلول ساختن این انکلوژن بادی‌ها نیاز بود تا طی روشی این فشردگی و تراکم پروتئین بیانی از هم باز شوند. از این رو، از شیب اوره به عنوان یک روش نامتداول در استخراج پروتئین‌های نامحلول کمک گرفته شد و پروتئین در بافر B دناتوره محلول گردید (تصویر شماره ۵).

مرحله آخر تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل (کیاژن) انجام و پروتئین نو ترکیب با غلظت مناسب تخلیص گردید (تصویر شماره ۶).

بحث:

تولید پروتئین نوترکیب بعد از همسانه سازی توالی ژنی وکتورهای بیانی از اهمیت خاصی برخوردار است. این اهمیت زمانی پر رنگ‌تر می‌شود که پروتئین نوترکیب تولید شده به مقدار زیاد نیاز باشد و همچنین حفظ ساختار پروتئینی اهمیت داشته باشد. جهت مطالعات این ناحیه از پروتئین، نیاز به همسانه سازی داشت که این کار در مراحل قبلی صورت پذیرفته بود (۱۶). در ادامه نیاز به بیان این ناحیه، بهینه سازی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب بود.

هر پروتئین با توجه به مقدار بیان و ساختار و توالی آن شرایط بیانی خاص خود را دارا می‌باشد. از این رو برای دستیابی به شرایط بهینه بیان پروتئین نوترکیب، نیاز به بهینه سازی شرایط بود.

آنچه که این بررسی را از دیگر مطالعات متمایز می‌کند این است که در ابتدا نسبت به مشاهده و نتیجه‌گیری از روی ژل‌های SDS-PAGE حاصل از نمونه‌ها اقدام شد و در ادامه با استفاده از تصاویر

Archive of SID

www.SID.ir

دوبعدی و آنالیز نرم افزاری این امکان را فراهم آورد تا در انتخاب شرایط بهینه بیان، درصد خطا در انتخاب شرایط بهینه کاهش چشمگیری پیدا کند.

با توجه به نقش دما بر روی تولید پروتئین، این فاکتور مورد بررسی قرار گرفت. در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد مقدار بیان و تولید پروتئین بسیار ناچیز بود، لذا سبب حذف ادامه مطالعات در این شرایط دمایی گردید. مقایسه مقدار پروتئین بیان شده در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های مختلف عامل القایی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در غلظت‌های ۰/۷ و ۱ میلی مولار IPTG بیشترین غلظت پروتئین بیانی مشاهده شد. نتایج به وضوح نشان داد که با افزایش دما (تا ۳۷ درجه سانتیگراد)، مقدار غلظت پروتئین نوترکیب افزایش یافته است. همچنین این مطالعات نشان داد که تقریباً در غلظت ۰/۷ میلی مولار از عامل القایی، پروموتور وکتور به وسیله IPTG تقریباً اشباع شده و افزایش مقدار عامل القایی نمی‌تواند در مقدار بیان پروتئین نوترکیب تاثیر مشخصی بگذارد. طول مدت القاء به عنوان یک فاکتور مهم دیگر، عامل دیگری بود که مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت پروتئین بیانی در طول ۵ ساعت بعد از القاء مورد بررسی کمی قرار گرفت. انتخاب بیشترین مقدار بیان اگر فقط با مشاهده ژل SDS-PAGE تغییرات مدت زمان القا انجام می‌گرفت، انتخاب زمان مناسب با درصد بالایی دارای خطا می‌باشد و این عامل مهمی بود تا ادامه مطالعات به سمت مطالعات نرم افزاری هدایت شود. مقدار پروتئین زمان‌های ۱، ۲ و ۳ ساعت پس از القا رو به افزایش بود و در زمان‌های ۴ و ۵ ساعت بعد از القا به طور غیر منتظره‌ای کاهش پیدا کرد. احتمال داده می‌شود که علت این فرآیند به دلیل ورود باکتری به فاز مرگ و یا تخریب پروتئین با گذشت زمان توسط پروتئازهای سلولی باشد. در انتهای مطالعات مشخص شد که پروتئین نوترکیب (N- ترمینال IpaD) در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۰/۷ میلی مولار IPTG و ۳ ساعت بعد از القا، بیشترین بیان را دارد. در مطالعه‌ای مشابه در سال ۲۰۰۷ که پروتئین هلیکوباکترپیلوری در باکتری *E.coli* BL21(DE3) درون پلاسمید pET-28a همسانه سازی و اثر غلظت‌های متفاوتی از عامل القایی (۱-۰ میلی مولار)، مدت زمان القا (۴-۱ ساعت) و دماهای مختلف (۳۷ و ۱۸ درجه سانتیگراد) که در بیان پروتئین موثرند مطالعه شده بود و در نهایت دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، زمان ۴ ساعت و غلظت ۰/۴ میلی مولار از عامل القایی به عنوان شرایط بهینه در بیان پروتئین مورد مطالعه گزارش شد (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر Wang و همکارانش با همسانه سازی ژن HgfI (Hydrophobin from grifola frondosa) در وکتور pET28a جهت افزایش تولید پروتئین نوترکیب در باکتری *E. coli* BL21، با بهینه سازی بیان ژن توسط تغییرات فاکتورهای کلیدی بیان مقدار پروتئین تولید شده را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعات بهترین شرایط برای بیان این ژن دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۵ ساعت القا و غلظت ۰/۷ میلی مولار گزارش شده است (۲۶).

پس از مشخص شدن شرایط بهینه بیانی، جهت تخلیص پروتئین نوترکیب با افزایش حجم بیان در شرایط بهینه فرآیند مطالعات ادامه پیدا کرد. بررسی‌ها نشان داد که پروتئین بیان شده به حالت نامحلول بوده و نیاز داشت که از بافر دناتوره‌کننده B (حاوی اوره ۸ مولار) جهت فرآیند تخلیص استفاده شود. اما با اضافه کردن بافر دناتور (B) پروتئین به فاز محلول وارد نشد و این عاملی بود که باعث شد از روش نامتعارف که به روش شیب اوره معروف می‌باشد پروتئین بیان شده را که به صورت انکلوژن بادی‌های فشرده بود در فاز محلول آورده تا فرآیند تخلیص با کمک ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام و پروتئین نوترکیب با غلظت مناسبی تخلیص گردید.

نتیجه‌گیری:

می‌توان بر اساس نتایج این مطالعه و مطالعات

Archive of SID

www.SID.ir

مشابه می توان اینگونه بیان کرد کـه هـر پـروتئین بعـد از فرآیند همسانه سازی شرایط بیان مخـصوص بـه خـود را دارا می‌باشد که شرایط دمایی و طول زمان القا سـلول‌هـا در مقدار تولید پروتئین موثرتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاری آقای جواد قره چـاهی کـه در مطالعات نرم افزاری همکاری نمودند و در پیشبرد این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع:

1. Swapan Kuma N. Shigellosis. J Microbiol. 2005; 43(2): 133-43.

2. Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya SK. Shigellosis: challenge & management issues. Indian J Med Res. 2004; 120 (5): 454-62.

3. Pupo MG, Lan R, Reeves PR. Multiple independent origins of Shigella clones of *E.coli* and convergent evolution of many of their characteristics. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(19): 1056-72.

4. Shigellosis. Iarrhoeal dseases [Internet]. California daily research foundation 2008 [cited2012feb26].Available from: http: //www.who.int/vaccine_ research/ iseases/ iarrhoeal/en/index6.html

5. Ogawa M, Sasakawa C. Intracellular survival of Shigella. Cell Microbiol. 2006; 8(2): 177-4.

6. Dupont HL, Levin M, Hornick R, Formal S. Inoculum size in Shigellosis and implications for expected mode of transmission. J Infect Dis. 1989; 159(6): 1126-8.

7. Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. Nat Rev Immunol. 2004; 4(12): 953-64.

8. Capozzo A, Creydt V, Dran G, Fernandez G, Gomez S, Bentancor L, et al. Development of DNA vaccines against hemolytic-uremic syndrome in a murine model. Infect Immun. 2003; 71(7): 3971-8.

9. Gunnar N, Schroeder EH. Molecular pathogenesis of Shigella spp: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(1): 134-56.

10. Sansonetti PJ. Rupture invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella: the yin and yang of innate immunity. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2006; 17(2): 117-9.

11. Man A, Prieto G, Nicoletti C. Improving M-cell-mediated transport across mucosal barriers. Immunology. 2004; 11(3): 15-22.

12. Bahrani F, Sansonetti P, Parson C. Secretion of Ipa proteins by Shigella flexneri: inducer molecules and kinetics of activation. Infect Immun. 1997; 65(10): 4005-10.

13. Menard R, Parson C, Gounon P, Sansonetti P, Dehio C. The secreted IPA complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1996 Feb; 93(3): 1254-8.

14. Amanda T, Harrington D, Hearn L, Picking R, Barker W, William D. Structural characterization of the N-terminal of IpaD from *Shigella flexneri*. Infect Immun. 2003 Mar; 71(3): 1255-64

15. Stensrud K. Aam P. Deoxycholate Interacts with IpaD of Shigella flexneri in Inducing the Recruitment of IpaB to the Type III Secretion Apparatus Needle Tip. J Biol Chem. 2008; 283(27): 18646-54.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Heiat M, Saadati M, Nazarian S, Barati B, Honari H, Doroudian M, et al. 'Cloning and exparession of n-terminal region of IpaD from *Shigella dysenteriae* in *E.Coli*, Paramedical Sciences. 2010; 1(4): 12-7.

17. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laborator manual. 3rd ed. NewYork: CSHL Press; 2001.

18. Berth M, Moser M, Kolbe M, Bernhardt J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis image. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Oct; 76(6): 1223-43

19. Geneva Bioinformatics (GeneBio) SA, [internet] Geneva 2011 [cited 2012] Available from: http: //www. Genebio .com/ products /melanie/ faq.html.

20. Kumar Y, Uppuluri N, Babu K, Kishore P, Kumar P, Ballal S, et al. Proteomics of renal disorders: Urinary proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry'. Current Science.2002; 82(6): 655-63.

21. Grunberg K, Muller E, Otto A, Reszka R, Linder D, Kube M, et al. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in magnetospirillum gryphiswaldense. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(4): 1040-50.

22. Wingfield P, Palmer I, Liang SM. Folding & Purification of Insoluble (Inclusion - Body) Protein from *E. coli.* Curr Protoc Protein Sci. 2001 May; Chapter 6: Unit 6.5.

23. Palmer I, Wingfield PT. Preparation and extraction o f unit 6.3 insoluble (inclusion-body) proteins from escherichia coli. Curr Protoc Protein Sci. 1995; 6(3): 1-5.

24. Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May; 72: 248-54.

25. Psakis G, Nitschkowski S, Holz C, Kreb D, Maestre M, Polaczek J. et al. Expression screening of integral membrane proteins from helicobacter pylori 26695. Protein Sci. 2007 Dec; 16(12): 2667-76.

26. Wang Z, Feng S, Huang Y, Qiao M, Zhang B, Xu H. Prokaryotic expression, purification, and polyclonal antibody production of a Hydrophobin from grifola frondosa. Acta Biochim Biophys.2010; 42: 388-95.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2012 May, June; 14(2): 64-73.

Original article

Optimization of expression, extraction & purification of the N-terminal region of ipaD gene in *Shigella dysenteriae* by proteomics analysis

Hesaraki M (MSc)[1], Saadati M (PhD)[1,2]*, Honari H (PhD)[1], Olad G (PhD)[1], Heiat M (MSc)[2], Zare M (MSc)[1]

[1]Biological Sciences Research Center, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran;
[2]Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 3/Feb/2011 Revised: 9/Apr/2011 Accepted: 18/May/2011

Background and aims: *Shigella dysenteriae* is one of the most important pathogens which in spite of many attempts vaccine preparation, extended researches are still in the way, Transport and surface expression of the invasion plasmid antigens (IpaD proteins) have essential role in the pathogenicity of Shigella spp. IpaD has been one of the most important proteins for Shigella vaccine candidate. Studies have shown that N –terminal region of this protein has a key role in the pathogen city and invasion. This study was done to evaluate the optimization of N-terminal region of Ipad in order to increase the production of recombinant protein.

Methods: In this experimental labortary study, desired region of IpaD cloned in vector pET-28a (+). For confirming cloning procedure ,standard tests were performed. The effect of IPTG concentration, temperature & induction times on the level of protein expression were evaluated by SDS-PAGE, qualitatively. The gels were evaluated with 2-D gel analysis software (Melanie 7). The recombinant protein was extracted by Urea & eventually purificated with affinity chromatography column.

Results :SDS-PAGE analysis showed that approximately the same amount of recombinant protein is expressed at different times, but software analysis proved that the optimized condition for the expression of recombinant protein was in the final concentration of 0.7 mM of IPTG, 37˚C and 3 hours induction**.**

Conclusion: According to the results every protein has its own expression after the homogenization process, and the temperature and the cells induction time length are more effective in the amount of protein production.

Keywords : **Invasion plasmid, Recombinant protein, Proteomics, *Shigella dysenteriae*.**

Cite this article as: Hesaraki M, Saadati M, Honari H, Olad G, Heiat M, Zare M. [Optimization of expression, extraction & purification of the N-terminal region of ipaD gene in *Shigella dysenteriae* by proteomics analysis. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012 May, Jne; 14(2): 64-73.]Persian

* **Corresponding author:**
Biological Sciences Research Center, Basic sciences faculty, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00982177104934, E-mail:Saadati_m@yahoo.com

www.SID.ir