Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۴، شماره ۴ / مهر و آبان ۱۳۹۱/ ۴۶-۳۸

مقاله پژوهشی

همسانه‌سازی و بیان ژن ناحیه یک فاکتور کشنده‌ی (Lethal Factor) باسیلوس آنتراسیس در باکتری *Escherichia coli*

مهدی رضائی، حسین هنری*، علی محمد زند

گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۳۰ اصلاح نهایی:۹۱/۳/۱۶ تاریخ پذیرش:۹۱/۴/۱۴

چکیده:

زمینه و هدف: **سیاه‌زخم (آنتراکس) یک بیماری مشترک بین انسان و دام است. عامل ایجاد کننده بیماری باکتری باسیلوس آنتراسیس می‌باشد که آنتی‌ژن حفاظت‌کننده (PA) و ناحیه یک فاکتور کشنده (LFD1) ایمونوژن‌های قوی این باکتری بوده و همواره به عنوان کاندیدای واکسن علیه باسیلوس آنتراسیس در نظر گرفته شده‌اند. هدف این مطالعه تولید آنتی‌ژن ناحیه یک فاکتور کشنده (LFD1) در باکتری** Escherichia coli **می‌باشد.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی ژن LFD1 از پلاسمید pXO1 شناسایی و با واکنش PCR تکثیر شد. با جایگاه‌های آنزیمی BamH I و Xho I در وکتور (pGEM-T easy) همسانه‌سازی شد و بعد از جداسازی به وکتور بیانی (pET28a(+ زیرهمسانه‌سازی گردید. این وکتور به باکتری E. coli-BL21 (DE3) تراریخت (ترانسفورم) شد. بیان ژن LFD1 تحت القای ایزوپروپیل-β-D-I-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) انجام و پروتئین مورد نظر بیان شد.**

یافته‌ها: **ژن ناحیه یک فاکتور کشنده (LFD1) کلون شده در وکتور بیانی (pET28a(+ به وسیله‌ی توالی یابی، PCR و هضم به وسیله آنزیم‌های با اثر محدود تأیید گردید. همچنین پروتئین نوترکیب تولید شده به وسیله سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل (SDS-PAGE) و لکه‌گذاری وسترن تایید گردید.**

نتیجه‌گیری: **با توجه به ایمونوژن بودن پروتئین LFD1، پروتئین نوترکیب تولید شده در این تحقیق را می‌توان به‌صورت مجزا یا ترکیبی با یاورها و یا انتقال دهنده‌ها در طراحی واکسن برای بیماری سیاه‌زخم استفاده نمود.**

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس آنتراسیس*، پروتئین نوترکیب، سیاه‌زخم، ناحیه یک فاکتور کشنده.

مقدمه:

سیاه‌زخم یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام بوده و دارای پتانسیل استفاده در جنگ‌های بیولوژیک می‌باشد. بیماری سیاه‌زخم در انسان در نتیجه تماس مستقیم با حیوانات بیمار و یا فرآورده‌های حیوانات مانند پوست، مو و پشم ایجاد می‌شود. بنابراین دامپزشکان، دامداران، میکروب‌شناسان، کشاورزان، چوپانان، کارگران کشتارگاه‌ها و کارگرانی که در صنایع پوست و پشم کار می‌کنند بیشتر در معرض ابتلاء به این بیماری هستند. در حیوانات میکروب سیاه‌زخم به طور مستقیم از حیوان آلوده به حیوان سالم منتقل نمی‌شود (۱). *باسیلوس آنتراسیس* علاوه بر یک DNA حلقوی به اندازه ۴/۵ مگاباز، دارای دو پلاسمید بزرگ pXO1 (شامل ژن‌های توکسیک) و pXO2 (شامل ژن‌های مولد کپسول) می‌باشد. کپسول عامل تعیین‌کننده در بیماری‌زایی بوده و باکتری را در برابر هجوم ماکروفاژهای میزبان محافظت می‌کند. توکسین با واسطه یک پلاسمید به نام pXO1 یا PBA1 ایجاد می‌شود، که ۳ پروتئین یا فاکتور مولد ادم (Edema Factor=EF)، آنتی‌ژن محافظت‌کننده (Protective Antigen=PA) و فاکتور مولد مرگ

*نویسنده مسئول: تهران-اتوبان بابایی-دانشگاه جامع امام حسین- گروه علوم زیستی-تلفن:۷۷۱۰۷۹۳۵-۰۲۱،

E-mail:honari.hosein@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

سلولی (Lethal Factor=LF) را کد می‌کند (۳،۲).

PA برای سمیت سلول میزبان در ترکیب با LF یا EF ضروری است که به ترتیب توکسین کشنده یا توکسین تورم‌زا تولید کرده (۴) و دارای ناحیه اتصال به رسپتور سلول میزبان بوده و ورود کمپلکس‌های توکسین را به درون سلول میزبان تسهیل می‌نماید (۵). این کمپلکس‌ها از طریق آندوسیتوز وارد سیتوزول شده و با اسیدی کردن آندوزوم، دو عامل LF و EF از طریق کانال‌های پروتئینی‌ای (β-barrel چهارده رشته‌ای) که PA برای آن‌ها فراهم آورده است به درون سیتوپلاسم سلول میزبان نفوذ کرده در آنجا با کمک کلسیم، کالمودولین و روی (در مورد LF) فعالیت‌های کاتالیتیکی خود را بروز می‌دهند. LF با ایجاد برش در سمت انتهای آمینی سوبسترای اختصاصی خود یعنی Mitogen-activated Protein Kinase Kinases (MAPKKs) باعث شکستن آن می‌شود. با این عمل سیگنال‌های لازم جهت تکثیر متوقف شده و سلول به سوی مرگ پیش می‌رود (۸،۷،۶).

پروتئین LF دارای چهار ناحیه اصلی می‌باشد که ناحیه ۱ از اسیدآمینه‌ی ۱ تا ۲۶۲ امتداد می‌یابد و محل اتصال به پروتئین مصونیت‌زا می‌باشد. ناحیه ۲ از دو بخش مجزا تشکیل شده است که پس از فولدینگ در کنار هم قرار می‌گیرند و شامل اسیدآمینه‌های ۲۶۳ تا ۳۰۲ و ۳۸۳ تا ۵۵۱ می‌باشد. ناحیه ۳ از اسیدآمینه‌ی ۳۰۳ تا ۳۸۲ تشکیل شده و ناحیه ۲ و ۳ در تشکیل جایگاه فعال آنزیمی نقش دارند. ناحیه ۴ که از اسیدآمینه ۵۵۲ تا ۷۷۰ امتداد دارد، بخش کاتالیتیک پروتئین بوده و محل برهمکنش با Zn^{2+} می‌باشد (۹).

سیاه‌زخم در سه فرم پوستی، گوارشی و استنشاقی اتفاق می‌افتد (۱۰). اگر بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود، عفونت با آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شود، اما علائم همیشه به موقع ظاهر نمی‌شوند تا درمان آنتی‌بیوتیکی موثر باشد. بنابراین واکسیناسیون برای حمایت اشخاصی که در معرض خطر هستند الزامی است. از این رو تعدادی از آنتی‌ژن‌های *باسیلوس آنتراسیس* به منظور بررسی توانایی‌شان برای القای ایمنی حمایتی بر علیه بیماری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از شناخته‌ترین این آنتی‌ژن‌ها می‌توان کپسول، لایه S، پلی‌ساکاریدهای سطحی و پروتئین‌های دیگر را نام برد. تنها پروتئین‌هایی که با یکدیگر توکسین سیاه‌زخم را می‌سازند، باعث تولید آنتی‌بادی‌های قابل شناسایی می‌شوند (۱۳،۱۲،۱۱). بیشتر واکسن‌های موجود بر پایه کار بر روی PA می‌باشند. در حال حاضر واکسن سیاه-زخم مجوز گرفته در انگلستان از کشت سویه sterne *باسیلوس آنتراسیس* فیلتر شده در رسوب alum رشد یافته است و در نتیجه دارای حداکثر پروتئین PA تولیدی می‌باشد. واکسنی که در ایالات متحده آمریکا اجازه استفاده گرفت Anthrax Vaccine Adsorbed (AVA) است. اما برنامه طولانی واکسیناسیون (۶ واکسیناسیون طی ۱۸ ماه) این واکسن‌ها را محدود می‌سازد (۱۴).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که برای دستیابی به واکسنی کارآمد باید از LF استفاده شود، چون تیتر آنتی‌بادی تولیدی توسط این آنتی‌ژن بالا می‌باشد (۱۵). از طرفی طی آزمایشی مشخص شد که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده علیه LF بعد از برهمکنش با LF بیشترین برهمکنش را با LFD1 دارد که نشان دهنده اهمیت این ناحیه می‌باشد (۱۶). همچنین طی تحقیقی مشخص شد که تعداد اپی‌توپ‌های LFD1 تقریباً دو برابر هر کدام از ناحیه‌های دیگر است و بیشترین تاثیر را در تولید آنتی‌بادی را LFD1 دارد (۱۷). از آنجایی که LF یک متالوپروتئاز بوده و موجب مرگ سلولی می‌شود کار بر روی کل آن ممکن است خطرناک باشد. همچنین دست‌ورزی ژنتیکی LFD1 که توالی کوتاه‌تری از کل توالی LF دارد راحت‌تر می‌باشد (۱۸). لذا در این تحقیق به منظور تولید واکسن‌های نوترکیب مناسب، ناحیه ۱ فاکتور کشنده‌ی *باسیلوس آنتراسیس* انتخاب و همسانه‌سازی و بیان گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی:

طراحی پرایمر برای ژن LFD1 مربوط به باکتری باسیلوس آنتراسیس:

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، توالی کامل ژن lef باکتری *باسیلوس آنتراسیس* از Gene bank (Accession No: M29081 با شماره NBCI) استخراج و به کمک نرم افزارهای primer3 و Oligo و DNASIS پرایمرها طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد. پرایمر بالادست دارای جایگاه شناسایی آنزیم با اثر محدود BamH I و پرایمر پایین‌دست دارای جایگاه شناسایی آنزیم با اثر محدود Xho I است که به وسیله نرم‌افزار تحت شبکه BIOLABS_NEB-cutter تعیین شدند.

توالی پرایمر رفت با جایگاه شناسایی آنزیم با اثر محدود *Bam*H I:

5'-TAGGATCCGGCGGTCATGGTGATGTAG-3'

توالی پرایمر برگشت با جایگاه شناسایی آنزیم با اثر محدود *Xho* I:

5'-CGCTCGAGATTATCTAGATAGATTTATTT CTTGTTCGTTAAAT-3'

تکثیر ژن LFD1 با واکنش PCR: باکتری *باسیلوس آنتراسیس* سویه V770-NP1-R که فاقد پلاسمید pXO2 بوده ولی پلاسمید pXO1 را دارد و به صورت غیر فعال شده در فرمالین از بخش هوازی موسسه رازی تهیه شد. پلاسمید باکتری با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از اسپکتروفتومتری تعیین غلظت گردید و به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر ژن LFD1 ابتدا با ۰/۱۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز (سیناژن)، غلظت ۲ میلی مولار MgCl2، ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی مولار dNTPs و در دمای اتصال ۶۱ درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی شد. به منظور جلوگیری از جهش‌های ناخواسته تکثیر نهایی ژن با استفاده از آنزیم Pfu پلی‌مراز (Fermentas) در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. هر واکنش PCR شامل ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی مولار dNTPs، ۰/۲۵ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Pfu، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10XPCR و MgSO4 با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار و ۵۰ نانوگرم از پلاسمیدهای استخراج شده باسیلوس آنتراسیس بود. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۰ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود (۱۹).

همسانه‌سازی قطعه حاصل از واکنش PCR: محصول PCR به کمک مارکر اسید نوکلئیک (#SM0313) روی ژل آگارز بررسی شد. سپس روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین با غلظت ۱ درصد (سیناژن) منتقل شد. با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل آگارز (Bioneer)، محصول PCR از ژل آگارز با دمای ذوب پایین استخراج گردید و نوکلئوتید A به انتهای '۳ آن اضافه شد. واکنش الحاق محصول PCR دارای دنباله A و وکتور pEGM-T Easy Vector (Promega) که دارای دنباله T در انتهای '۳ خود است، با کمک آنزیم T4 لیگاز به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از انجام همسانه‌سازی، تراریختی وکتور نوترکیب حاصل با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E.coli* سویه DH5α انجام گرفت و سپس این باکتری‌ها بر روی پلیت LB آگار دارای Xgal-IPTG و آمپی‌سیلین با غلظت ۸۰µg/ml کشت داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان ۱۲ ساعت کلنی‌های سفید و آبی رنگ قابل مشاهده‌اند. از ویژگی های این وکتور این است که جایگاه چندگانه همسانه‌سازی در وسط ژن β-گالاکتوزیداز قرار گرفته است. ورود قطعه همسانه‌سازی شده در این وکتور با غیر

www.SID.ir

Archive of SID

فعال شدن ژن β-گالاکتوزیداز همراه است. بنابراین غربال‌گری سلول‌های حاوی DNA نوترکیب با عدم توانایی آن‌ها در ساخت آنزیم β-گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد. سویه‌های نوترکیب دارای رنگ سفید و سویه‌های فاقد وکتور نوترکیب، آبی رنگ می‌باشند (۱۹).

سپس قطعات توسط آنزیم‌های با اثر محدود BamH I و Xho I از وکتور pEGM-T Easy جداسازی و در وکتور بیانی pET28a(+) (Qiagen) که با همین آنزیم‌ها برش خورده بود، زیر همسانه‌سازی شد. وکتورهای نوترکیب حاصل به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه BL21(DE3) (Stratagen) تراریخت شدند (۱۹).

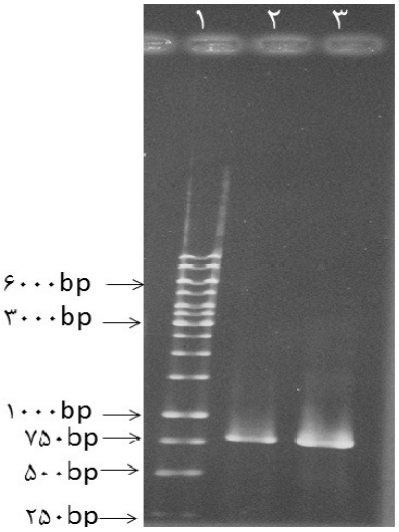
بیان ژن مورد نظر: از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین با غلظت ۸۰µg/ml تلقیح و پس از رسیدن OD به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای بدست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پرومـوتر ایزوپروپیل-β-D-۱-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) (Fermentas) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد (۱۲).

الکتروفورز ملایم دودفسیل فسفات پلی آکریل آمیدژل (SDS-PAGE): نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (Vivantis)(#PR0602-S) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بود (۱۹).

تایید پروتئین نوترکیب: برای تایید پروتئین نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی‌مولار، KCl ۲/۷ میلی‌مولار، Na2HPO4.7H2O ۴/۳ میلی‌مولار، توین ۲۰ درصد و pH: ۷/۲) حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست شو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی‌ضد His-tag (ebcam) کانژوگه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شست شو با بافر PBST، برای آشکار سازی از سوبسترا (بافر تریس ۵۰mM و pH:۷/۸ حاوی DAB ۶mg، H_2O_2 10µl) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولزی، واکنش با استفاده از H2O متوقف گردید (۱۹).

یافته‌ها:

تکثیر ناحیه ۱ ژن LF: پس از تکثیر ناحیه ۱ ژن LF به روش PCR، محصول روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت که قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما هم‌خوانی داشت (۷۷۱ جفت باز) (تصویر شماره ۱).



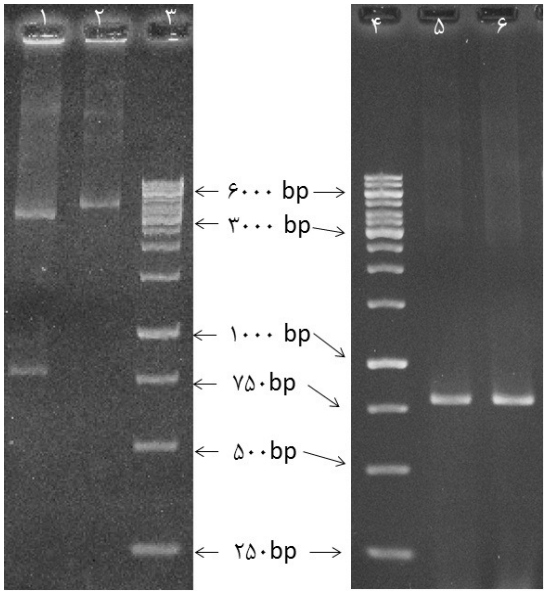
تصویر شماره ۱: PCR روی پلاسمید pXO1 و تکثیر ژن ناحیه یک فاکتور کشنده.
چاهک ۱ مارکر اسید نوکلئیک، چاهک ۲ و ۳ محصول PCR (۷۷۱bp).

www.SID.ir

Archive of SID

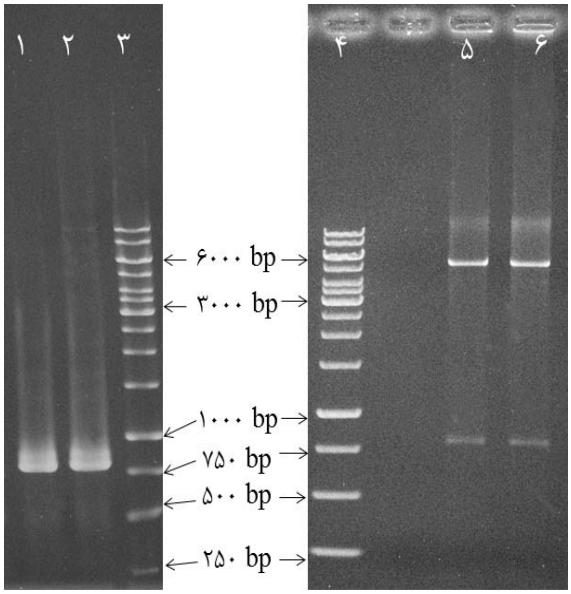
تایید همسانه‌سازی ژن هدف در وکتور pEGM-T Easy: پس از تخلیص پلاسمید و تایید آن‌ها روی ژل آگارز، برای تایید بیشتر از پلاسمیدها به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید، از طرفی با دو آنزیم BamH I و Xho I هضم شدند سپس به کمک مارکر اسید نوکلئیک، اندازه قطعه خارج شده از وکتور (۷۷۱ جفت باز) تایید شد (تصویر شماره ۲).

تایید زیر همسانه‌سازی ژن هدف در وکتور بیانی pET28a(+): پس از تخلیص پلاسمید و تأیید آن‌ها روی ژل آگارز، برای تأیید بیشتر از پلاسمیدها به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید، از طرفی با دو آنزیم BamH I و Xho I هضم گردیدند. سپس به کمک مارکر اسید نوکلئیک، اندازه قطعه خارج شده از وکتور (۷۷۱ جفت باز) تایید گردید (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۲: تایید همسانه‌سازی ژن هدف در وکتور pEGM-T Easy.

چاهک ۱: هضم آنزیمی با اثر محدود روی وکتور pEGM-T Easy *و برش ژن (۷۷۱bp)، چاهک ۲ وکتور* pEGM-T Easy *دارای ژن برش نخورده، چاهک‌های ۳ و ٤ مارکر اسید نوکلئیک، چاهک‌های ۵ و ٦ محصول PCR روی وکتور* pEGM-T Easy *(۷۷۱bp).*



تصویر شماره ۳: **تایید زیرهمسانه‌سازی ژن هدف در وکتور بیانی** pET28a(+).

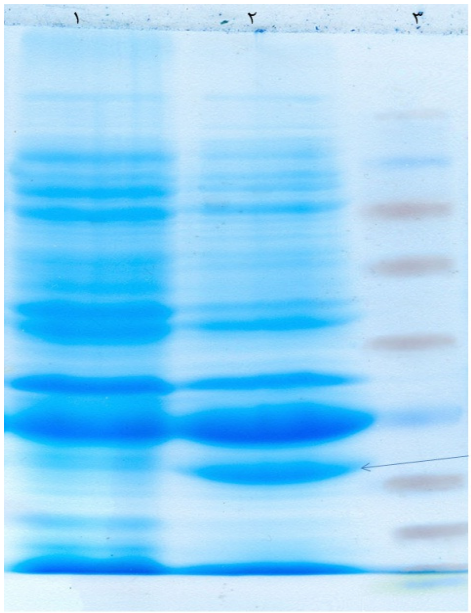
چاهک‌های ۱ و ۲ محصول PCR روی وکتور pET28a(+) (۷۷۱bp)، چاهک‌های ۳ و ٤ مارکر اسید نوکلئیک، چاهک‌های ۵ و ٦ هضم آنزیمی با اثر محدود روی وکتور pET28a(+) و برش ژن (۷۷۱bp).

بیان ژن در وکتور pET28a(+): در این مرحله پس از کشت باکتری‌ها و القا با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت. پس از شکست دیواره باکتری‌ها پروتئین‌های آن‌ها روی ژل SDS-PAGE برده شد و به کمک مارکر پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب ≈۳۲kD از ژل ۱۲ درصد استفاده شد. نتایج نشان داد که پروتئین مورد نظر در نمونه القا شده بیان شده ولی در نمونه شاهد بیان نشده است (تصویر شماره ۴).

تایید محصول پروتئینی به دست آمده با تکنیک Western Blotting: به منظور تایید محصول پروتئینی از تکنیک Western Blotting استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونهٔ القا شده با IPTG است یک باند در نزدیکی ۳۲kD مشاهده می‌شود که در ستون شاهد که تحت القای IPTG نبوده مشاهده نمی‌شود (تصویر شماره ۵).

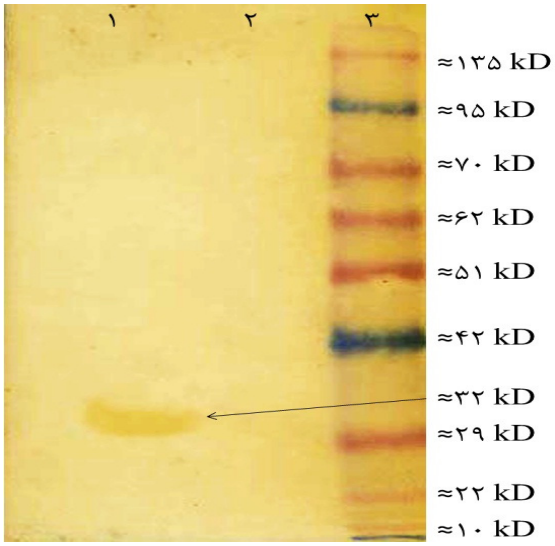
www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۴: بیان ژن ناحیه یک فاکتور کشنده و بررسی آن با الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل (SDS-PAGE)

ستون ۱ نمونه شاهد القا نشده، ستون ۲ نمونه القا شده با IPTG و مشاهده پروتئین ۳۲kD، ستون ۳ مارکر پروتئین.



تصویر شماره ۵: تایید پروتئین حاصل با Western Blotting.

ستون ۱ نمونهٔ القا شده با ایزوپروپیل 1-D-B گالاکتوز پیرانوزید و وجود باند در ناحیه ۳۲kD، ستون ۲ نمونه شاهد که تحت القای IPTG نبوده و عدم وجود باند، ستون ۳ مارکر پروتئینی

بحث:

در این مطالعه تجربی ژن LFD1 پس از شناسایی و جداسازی، با استفاده از سیستم TA cloning همسانه‌سازی و در وکتور بیانی زیر همسانه‌سازی و در *اشرشیاکلی* بیان گردید. در سال ۱۹۹۴ مهندسی و ساخت وکتورهای همسانه‌سازی خانواده T (با تعداد کپی بالا، ژن β-گالاکتوزیداز و MCS اختصاصی) منجر به سهولت همسانه‌سازی ژن‌های تکثیر یافته با پلیمرازهایی از قبیل Taq و Taq high fidelity شد. در این مطالعه تجربی نیز با توجه به ارزش چنین سیستمی مبادرت به همسانه‌سازی در وکتور pGEM-T Easy شد (۲۰). همچنین از وکتور بیانی pET28a(+) استفاده شد. امروزه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از روش‌های بیوتکنولوژی استفاده می‌شود. *اشرشیاکلی* به عنوان میزبانی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب هم در تحقیقات و هم در صنعت به طور گسترده استفاده می‌شود. در این تحقیق نیز برای تولید LFD1 نوترکیب از سویه BL21 به عنوان میزبان استفاده شد که فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی از جمله DegP، OmpT، Lon و HtpR می‌باشد (۲۱). بنابراین بیان مناسب LFD1 در این میزبان به دلیل عدم حضور این پروتئازها می‌باشد.

در سال ۲۰۰۷ مطالعات Jessica و همکاران نشان داد که پروتئین ممزوجی LFD1– Lichenase تیتر آنتی‌بادی بالایی تولید می‌کند که این آنتی‌بادی‌ها قدرت خنثی سازی سم سیاه‌زخم در in vitro را دارند (۱۵). در سال ۲۰۱۰ آقای Baillie تمامی دومین‌های LF را به صورت مجزا کلون و بیان نمود و خواص ایمنی‌زایی آن‌ها را بررسی نمود که LFD1 توان ایجاد ایمنی‌زایی را داشت. از آنجایی که بخش عملکردی LF (۷۷۶ اسید آمینه) *باسیلوس آنتراسیس* که خاصیت کشندگی دارد باعث بروز مرگ سلولی می‌شود، استفاده از این آنتی‌ژن در مطالعاتی که در این زمینه انجام می‌شود امری ضروری می‌باشد. در این مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

ناحیه LFD1 انتخاب و مورد مطالعه قرار گرفت که مطالعات Albrecht و همکاران (۱۶) و Nguyen و همکاران (۱۷) نشان‌دهنده وجود بیشترین و مؤثرترین اپی‌توپ‌های LF در ناحیه ۱ آن بوده که تایید کننده انتخاب ناحیه مناسب در این مطالعه می‌باشد.

با توجه به نیاز به تولید واکسن سیاه‌زخم در کشور و ضرورت استفاده از LF در تهیه واکسن، این تحقیق به منظور تولید پروتئین نوترکیب LFD1 انجام گرفت و نتایج حاصل از SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن مؤید بیان LFD1 در این تحقیق می‌باشد. لذا از این پروتئین نوترکیب می‌توان در مطالعات آتی به منظور تولید واکسن‌های کارآمد استفاده نمود.

نتیجه‌گیری:

ژن LFD1 پس از تکثیر در وکتور pGEM-Teasy همسانه‌سازی شد، سپس به وکتور pET28a(+) منتقل وهمسانه‌سازی گردید. تمامی شواهد مانند تعیین توالی ژن، تعیین وزن مولکولی پروتئین بیان شده و واکنش با آنتی‌بادی ضد His-tag مؤید بیان ناحیه ۱ فاکتور کشنده (LFD1) می‌باشد. لذا در مطالعات بعدی اثرات ایمنی-زایی آن به تنهایی یا به همراه سایر عوامل ایمونوژن قابل بررسی می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

از گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که حامی این تحقیق بودند کمال تشکر را داریم.

منابع:

1. Brey RN. Molecular basis for improved anthrax vaccines. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Jun; 57(9): 1266-92.

2. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. Gene. 1989 Sep; 81(1): 45-54.

3. Okinaka R. Sequence assembly and analysis of pXO1 and pXO2. J Appl Microbial. 1999; 87(2): 261-2.

4. Ezzell JW, Ivins BE, Leppla SH. Immuno electrophoretic analysis, toxicity and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of Bacillus anthracis toxin. Infect Immun. 1984 Sep; 45(3): 761-7.

5. Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renatus M, Petosa C, Bienkowska J, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. Nature. 2001 Nov; 414(6860): 229-33.

6. Elliott JL, Mogridge J, Collier RJ. A quantitative study of the interactions of *Bacillus anthracis* edema factor and lethal factor with activated protective antigen. Biochemistry. 2000 Jun; 39(22): 6706-13.

7. Abrami S, Liu P, Cosson H, Leppla S, van der Goot FG. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. J Cell Biol. 2003 Feb; 160(3): 321-8.

8. Guidi-Rontani C, Weber-Levy M, Mock M, Cabiaux V. Translocation of Bacillus anthracis lethal and edema factors across endosome membranes. Cell Microbiol. 2000 Jun; 2(3): 259-64.

9. Baillie LW. An anthrax subunit vaccine candidate based on protective region of Bacillus anthracis protective antigen and lethal factor. Vaccine. 2010 Sep; 28(41): 6740-8.

10. Bartlett J, Inglesby T, Borio L. Management of anthrax. Clin Infect Dis. 2002 Oct; 35(7): 851-8.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Alan RL. Advances in biotechnological processes. In: Mizrahi A. Bacterial vaccines. New York: Pertussis Vaccines; 1990: 105-22.

12. Singh Y, Ivins B, Leppla S. Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of B. anthracis. Infect Immun. 1998 Jul; 66(7): 3447-8.

13. Flick-Smith H, Walker N, Gibson P, Bullifent H, Hayward S, Miller J, et al. A recombinant carboxyl- terminal domain of the protective 113 antigen of Bacillus anthracis protects mice against anthrax infection. Infect Immun. 2002 Mar; 70(3): 1653-6.

14. Turnbull PC. Anthrax vaccines: past, present and future. Vaccine. 1991 Aug; 9(8): 533-9.

15. Jessica A, Chichester Konstantin M, de la Rosa P, Horsey A, Stevenson N, Ugulava N, et al. Immunogenicity of a subunit vaccine against Bacillus anthracis. Vaccine. 2007 Apr; 25(16): 3111-4.

16. Albrecht MT, Li H, Williamson ED, LeButt CS, Flick-Smith HC, Quinn CP, et al. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. Infect Immun. 2007 Nov; 75(11): 5425-33.

17. Nguyen ML, Crowe SR, Kurella S, Teryzan S, Cao B, Ballard JD, et al. Sequential B-cell epitopes of *Bacillus anthracis* lethal factor bind lethal toxin-neutralizing antibodies. Infect Immun. 2009; 77(1): 162-9.

18. Ahsaee Z, Salimian J, Nazarian SH, Khalesi R, Olad GhR, Amani J. Cloning, bioinformatics study and evaluation expression of gene of entertoxigenic Esherichia coli. CFA/Imajor subunit (CfaB). J Shahrekord Univ Med Sci. 2011; 13(5): 72-82.

19. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laborator manual. NewYork: CSHL Press. 2001.

20. Association of genomes. [Internet] 2000. [cited 2012] Available from: http://www. fermentas.com.

21. Hwang BY, Varadarajan N, Li H, Rodriguez S, Iverson BL, Georgiou G. Substrate specificity of the Escherichia coli outer membrane protease OmpP. J Bacteriol. 2007 Jan; 189(2): 522-30.

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2012 Oct, Nov; 14(4): 38-46.
Archive of SID

Original article

Molecular cloning and expression of *Bacillus anthracis* Lethal Factor domain 1 gene in *Escherichia coli*

Rezaee M (MSc), Honari H (PhD)*, Zand AM (MSc)
Biology Sciences Dept., Imam Hossein Univrsity, Tehran, I.R. Iran.
Received: 18/Feb/2012 Revised: 5/Jun/2012 Accepted: 9/Jul/2012

Background and aims: Anthrax is a common disease in human and livestock caused by *Bacillus anthracis. Bacillus anthracis* has two strong immunogen proteins: Protective antigen (PA) and lethal factor domain I (LFD1) that has been always considered as a candidate vaccine against *Bacillus anthracis.* The aim of this study was to express the lethal factor domain I in *Escherichia coli.*

Methods: In this laboratory experimental study, the gene of LFD1 was detected and amplified from pXO1 plasmid by PCR. The gene was cloned with *Bam* H I and *Xho* I restriction site in cloning vector (pGEM-T easy), after isolation was sub cloned to expression vector pET28a(+). This vector was transformed to *E. coli*-BL21 (DE3) to express LFD1 gene. The expression of LFD1 gene was induced by IPTG, and LFD1 protein was produced.

Results: The cloned LFD1 gene in pET28a(+) vector was confirmed by sequencing, PCR and enzymatic analysis. The expressed recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting.

Conclusion: According to immunogenicity of LFD1 protein, the produced recombinant protein can be used separately or in combination by adjuvants and delivers to design a vaccine against anthrax.

Keywords: **Anthrax, *Bacillus anthracis*, Lethal factor domain 1, Recombinant protein.**

Cite this article as: Rezaee M, Honari H, Zand AM. Molecular cloning and expression of *Bacillus anthracis* Lethal Factor domain 1 gene in *Escherichia coli.* J Sharekord Univ Med Sci. 2012 Oct, Nov; 14(4): 38-46.

*Corresponding author:
Biology Dept, Imam Hossein University, Babai highway, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00982177107935, E-mail: honari.hosein@gmail.com

www.SID.ir