

طراحی، ساخت، آنالیز تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیکی کاست ژنی *RTB-ipaD*: راهی نوین در جهت تولید واکسن شیگلوزیس

صادق صفایی، دکتر حسین هنری*، عقیل اسماعیلی، مهدی غفرانی، ایمان املشی، حسین رستمی

مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۶ اصلاح نهایی: ۹۱/۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲

چکیده:

زمینه و هدف: شیگلا شایع ترین عامل اسهال می باشد. آنتی ژن پلاسمیدی *IpaD* برای تهاجم باکتری به درون سلول میزبان ضروری می باشد. یکی از چالش ها در باره واکسن مخاطی علیه شیگلا بر پایه پروتئین *IpaD* قدرت پایین آن می باشد. به نظر می رسد که با متصل کردن *IpaD* به یک ناقل و ادجوانت مناسب همچون زیر واحد B سم ریسین، می توان پروتئین *IpaD* را بسیار ایمونوژنیک نمود. این مطالعه به منظور تولید وکتور بیانی نو ترکیب دارای کاست ژنی *RTB-ipaD*، آنالیز تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیکی آن انجام گرفته است. روش بررسی: در این مطالعه ژن های *RTB* و *ipaD* (163-483) در وکتور pGEM-T همسانه سازی شدند. ژن *ipaD* به روش برش آنزیمی با ژن *RTB* به همراه لینکر کد کننده GPGP در وکتور pGEM متصل شد. سپس قطعه کایمریک *RTB-ipaD* در وکتور بیانی pET28a(+) زیر همسانه سازی گردید. در پایان آنالیز تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیکی کاست ژنی انجام گرفت. یافته ها: صحت ساخت کاست ژنی *RTB-ipaD* در وکتور بیانی pET28a(+) با واکنش PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت. نتایج حاصل از تعیین توالی کاست ژنی مطابق با توالی ذخیره شده در بانک ژنی بود. مطالعات بیوانفورماتیکی بر مبنای شاخص سازگاری کدون نشان داد این کاست قابلیت بیان در گیاه ترانس ژن و برخی سویه های باکتری اشرشیاکلی را دارد. نتیجه گیری: اتصال *RTB* به عنوان ناقل و ادجوانت به آنتی ژن *IpaD* رویکردی نوین و مطلوب در جهت تولید واکسن مخاطی شیگلوزیس می باشد.

واژه های کلیدی: ادجوانت، زیر واحد B سم ریسین، *ipaD* شیگلا دیسانتری.

مقدمه:

زیستی و نبود واکسن مناسب، بر اهمیت مطالعه پاتوژن شیگلا تاکید می کند (۵-۳). شیگلا دیسانتری از طریق خوردن آب و غذای آلوده به انسان وارد می شود. بعد از عبور از معده و روده کوچک، باکتری به سلول های اپی تلیالی روده بزرگ حمله می کند. اکثر باکتری های گرم منفی از طریق استفاده از سیستم ترشحي نوع ۳ با سلول یوکاریوتی میزبان برهمکنش می دهند. TTSS (Type III secretion system) برای تهاجم و انتقال پروتئین های باکتریایی به درون سلول میزبان به کار

گرفته می شود. باکتری های شیگلا، باکتری های روده ای گرم منفی هستند که باعث ایجاد عفونت و بیماری در روده بزرگ انسان می شوند. گونه های شیگلا عامل ایجادکننده اسهال باسیلی (شیگلوزیس)، با حدود ۱۶۵ میلیون مبتلا در سال، که منجر به مرگ تقریباً ۱/۱ میلیون مرگ در سرتاسر جهان می شود، می باشد (۲۰۱). اکثریت عفونت ها در کشورهای با مراقبت بهداشتی نامناسب، مواد غذایی و ذخایر آب آلوده اتفاق می افتند. مقاومت و شیوع شیگلوزیس به ویژه افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، پتانسیل استفاده از آن به عنوان سلاح

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

می شود، عمل می کند. در رابطه با متصل کردن یک آنتی ژن به یک ادرجوانت در سراسر جهان مطالعات متعددی به عمل آمده است. Donayre-torres و همکارانش آنتی ژن P24 از ویروس HIV (Human immunodeficiency virus) را به ادرجوانت *RTB* (Ricin toxin B) متصل و در *E. coli* آن را بیان کردند. همچنین در آن مطالعه آنتی ژن P24 به تنهایی بیان شد. نتایج نشان دادند وقتی که پروتئین کایمیریک *RTB-P24* در تلقیح استفاده گردید، پاسخ های ایمنی و به ویژه تیتر آنتی بادی به شکل قابل توجهی افزایش یافتند نسبت به زمانی که پروتئین P24 به تنهایی و یا با ادرجوانت فروند در تلقیح استفاده گردید (Choi و همکارانش آنتی ژن NSP4 (Nonstructural protein rotavirus) را که فاکتوری مهم در بیماری زایی روتاویروس می باشد به *RTB* متصل کردند. تلقیح خوراکی فیورن پروتئین و ورود آن به سلول های اپی تلیال روده باعث تحریک ایمنی مخاطی و افزایش تیتر آنتی بادی IgG (Immunoglobulin G) و SIgA (Secretory IgA) گردید. نتایج به دست آمده دلالت بر مزیت های متصل کردن آنتی ژن ها با ادرجوانت *RTB* دارند (۱۵).

در این مطالعه از زیر واحد B سم ریسین (*RTB*) به عنوان ناقل و ادرجوانت واکسن های خوراکی استفاده گردید. امروزه *RTB* را به عنوان ایمونو ادرجوانت قوی در ایمنی زایی وابسته به مخاط می شناسند (۱۶، ۱۷). به همین منظور با فیورن ژن های *RTB* به *ipaD* (از نوکلئوتید ۱۶۳ تا ۴۸۳)، اولاً می توان با استفاده از خاصیت ادرجوانتی *RTB*، میزان ایمنی زایی علیه پروتئین *ipaD* را افزایش داد، ثانیاً با بکارگیری خاصیت ناقلی *RTB*، آنتی ژن *ipaD* را در بافت های لنفوئیدی همراه شده با مخاط (Mucosa-associated lymphoid tissue) به سلول های ایمنی عرضه کرد. هدف از این مطالعه، اتصال ادرجوانت و ناقل *RTB* به آنتی ژن *ipaD* با هدف انتقال آنتی ژن *ipaD* به بافت های مخاطی، ایمونژن نمودن و افزایش پاسخ های ایمنی نسبت به این آنتی ژن می باشد. بدین

می رود. در باکتری شیگلا پروتئین های IpaB و D برای تهاجم ضروری است. با استقرار پروتئین *IpaD* (invasion plasmid antigen D) در راس سیستم ترشحی نوع ۳، پروتئین های تهاجمی IpaB و IpaC بر روی سطح سلول های اپی تلیالی فراخوانی می شوند. کمپلکس تشکیل شده از سه پروتئین IpaB/C/D پس از اتصال به غشا سلول میزبان، منفذی در غشاء سلولی ایجاد می کند که نهایتاً سبب ورود باکتری شیگلا به سیتوپلاسم سلولی می گردد (۸-۶). پروتئین *IpaD* دارای ۳۳۳ اسید آمینه می باشد. مطالعات نشان داده که ناحیه بین اسید آمینه های ۷۲ تا ۱۶۱، غنی از اپی توپ بوده و با نمک های صفراوی موجود در دستگاه گوارش واکنش می دهد. این فرایند باعث عملکرد منحصر به فرد این ناحیه از پروتئین *IpaD* یعنی ترشح برخی دیگر از آنتی ژن ها (IpaB/C) می شود. هر گونه تغییر، تخریب و سرکوب این ناحیه منجر به از دست رفتن فعالیت *IpaD* و در نتیجه سرکوب فرایند ورود باکتری به درون سلول میزبان می شود (۹-۱۲). تاکنون مطالعات فراوانی بر روی انواع واکسن علیه شیگلوزیس انجام گرفته است. یکی از مهم ترین اصول در طراحی واکسن تحصیل پروتئینی نو ترکیب با بیشترین اثر ایمنی زایی برای میزبان در بافت مخاطی و تحویل آنتی ژن در این بافت (باکتری شیگلا در مخاط روده کلونیزه می شود) می باشد (۱۳). با توجه به ضرورت تولید واکسن مخاطی و رفع محدودیت این نوع واکسن (ایمنی زایی پایین آنتی ژن های محلول، هضم و تخریب ساختار واکسن در دستگاه گوارش)، جهت طراحی یک پروتئین نو ترکیب علیه شیگلوزیس به عنوان کاندیدا واکسن مسیری معرفی می شود که در آن با متصل کردن یک ناقل و ادرجوانت مناسب به یک آنتی ژنی می توان یک پروتئین کایمیریک بسیار ایمونژن را تولید کرد.

ادرجوانت ایمنولوژیک یا ایمونو ادرجوانت ماده ای است که برای سرعت بخشیدن، طولانی کردن و افزایش پاسخ های ایمنی نسبت به آنتی ژنی خاص را هنگامی که در ترکیب با آنتی ژن در واکسن خاص استفاده

(#K0702) خالص سازی و یک باز dATP (#R0141) به انتهای ۳ آن ها اضافه گردید. واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 لیگاز برای محصول PCR آذینه شده و وکتور pGEM-T به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. بعد از انجام همسانه سازی، پلاسمید های نو ترکیب حاصل به روش شوک حرارتی به درون سلول های باکتریایی مستعد شده *E.coli* سویه DH5α انتقال داده شد و باکتری ها بر روی پلیت MacConkey (1053960500) حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شدند. کلونینگ ژن با انجام واکنش PCR و سپس با هضم آنزیمی به وسیله آنزیم های Sall و HindIII مورد ارزیابی قرار گرفت.

قطعه ژنی *ipaD* از روی پلاسمید pGEM-*ipaD* که قبلا مطالعه شده بود، به عنوان الگوی واکنش تکثیر گردید (۱۸). پرایمر پیشرو این ژن دارای جایگاه برش XhoI و ترادف 3' CTCGAGAGAACAACAATCAGGCA 5' و پرایمر پیرو دارای جایگاه برش HindIII و توالی 3' TAAGCTTTTAAGTATATGAACTAACG 5' بود. واکنش PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی انجام و برای انجام همسانه سازی مراحل انجام شده برای قطعه *RTB*، برای ژن *ipaD* نیز انجام گرفت. به منظور تایید همسانه سازی، واکنش PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی و همچنین واکنش هضم با استفاده از آنزیم های XhoI و HindIII انجام گرفت. این مراحل با استفاده از روش های استاندارد انجام شد (۱۹).
اتصال ژن های *RTB* و *ipaD* در حالت یک چهارچوب خواندن (Open reading frame):

ابتدا قطعه *ipaD* با دو آنزیم XhoI و HindIII از درون وکتور pGEM-*ipaD* خارج گردید. با استفاده از کیت تخلیص DNA (شرکت فرمنتاز) قطعه *ipaD* خالص سازی شد. در گام بعدی با استفاده از دو آنزیم XhoI و HindIII وکتور pGEM-*RTB* تحت برش قرار گرفت و یک قطعه ۶ نوکلئوتیدی (دو کدون خاتمه رونویسی که در بین دو سایت برشی XhoI و

منظور ابتدا کاست ژنی *RTB-ipaD* تولید و به درون وکتور بیانی وارد گردید. سپس آنالیز و بررسی ها بر روی کاست ژنی در جهت ادامه مطالعه بیان و مطالعات ایمنی زایی به عنوان کاندید واکسن بوده است.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی، از وکتور pGEM-T (#A1360) از شرکت پرومگا- آمریکا و از باکتری *E. coli* سویه DH5α (18258-012) و BL21(DE3) (69450-3) تهیه شده از شرکت Novagen- آمریکا و آنزیم های محدودالتر HindIII (#ER0505) XhoI (#ER0693) EcoRI (#ER0645) Sall (#ER0275) و T4 لیگاز (#EL0011) تهیه شده از شرکت Fermentas- اوکراین استفاده گردید. مواد شیمیایی بکار رفته از شرکت Merck آلمان تهیه شد.

تکثیر و همسانه سازی قطعات ژنی:

ژنوم گیاه کرچک به روش CTAB/NaCl (Cetyl trimethylammonium bromide) تخلیص شد. ژن *RTB* با شماره X03179.1 در بانک ژن ثبت شده است. این ژن یوکاریوتی فاقد توالی اینترون بوده و نیازی به تهیه cDNA نمی باشد. بر اساس طراحی صورت گرفته برای ساخت کاست ژنی طراحی پرایمر انجام گرفت. پرایمر پیشرو دارای جایگاه برش آنزیم Sall و توالی ۵ نوکلئوتیدی RBS (ribosome-binding site) که به صورت زیر خط دار مشخص گردیده است، می باشد. ترادف پرایمر پیشرو 3' GTCGACGGACGGIGIATCGAICCGACCCCATAGIG 5' است. پرایمر پیرو واجد جایگاه برشی آنزیم های XhoI و HindIII (به شکل تیره نشان داده شده است) و توالی ۱۲ نوکلئوتیدی سازنده لینکر GPGP (گلیسن- پرولین- گلیسین- پرولین) (به صورت زیر خط دار مشخص گردیده است) و ترادف 3' AAGCITTATTACTCGAGIGGICCGICCAAATAATCG 5' بود. به منظور انجام کلونینگ، واکنش PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی انجام گرفت. در ادامه کار محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص DNA

شاخص سازگاری کدون (Codon Adaption Index) در میزبان *E. coli* و گیاه تنباکو انجام گرفت.

یافته ها:

زیر واحد B ریسین توکسین با استفاده از پرایمرهای پیشرو و پیرو تکثیر شد و در وکتور pGEM-T همسانه سازی گردید. برای تایید همسانه سازی ژن واکنش PCR (تصویر شماره ۱ الف) و برش آنزیمی (تصویر شماره ۱ ب) انجام گرفت. با مشاهده قطعات ژنی ۸۱۹ و ۳۰۱۸ جفت بازی حاصل از هضم سازه pGEM-RTB با آنزیم های Sall/HindIII کلونینگ ژن مورد تایید واقع شد.

قطعه *ipaD* تکثیر شده با پرایمرهای اختصاصی، پس از خالص سازی، طی واکنش الحاق به وکتور pGEM-T وارد شد و به میزبان *E. coli* سویه DH5α وارد گردید. تایید همسانه سازی با استفاده از PCR (تصویر شماره ۲ الف) و برش آنزیمی (تصویر شماره ۲ ب) انجام گرفت. با مشاهده قطعات ژنی ۳۳۶ و ۳۰۱۸ جفت بازی حاصل از هضم سازه pGEM-*ipaD* با آنزیم های XhoI/HindIII کلونینگ ژن مورد تایید واقع شد.

قطعه ژنی *ipaD* از درون وکتور pGEM با آنزیم های محدودگر XhoI و HindIII خارج گردید و به وکتور pGEM-RTB طی واکنش الحاق وارد گردید و وکتور نوترکیب pGEM-RTB-*ipaD* به سلول های میزبان *E. coli* انتقال یافت. به منظور تایید ساخت کاست ژنی واکنش PCR و Nested PCR از روی کلونی ها (تصویر شماره ۳ الف) انجام گرفت. نتایج حاصل از آنالیز هضم آنزیمی کاست ژنی در تصویر شماره ۳ ب مشاهده می شود. صحت چارچوب خواندن با آنالیز برش آنزیمی با بکارگیری آنزیم های برشی Sall و HindIII انجام گرفت. آنالیز برش کلونی ها اندازه مورد انتظار در حدود ۱۱۴۹ جفت باز و ۳ کیلو باز را ارائه داد.

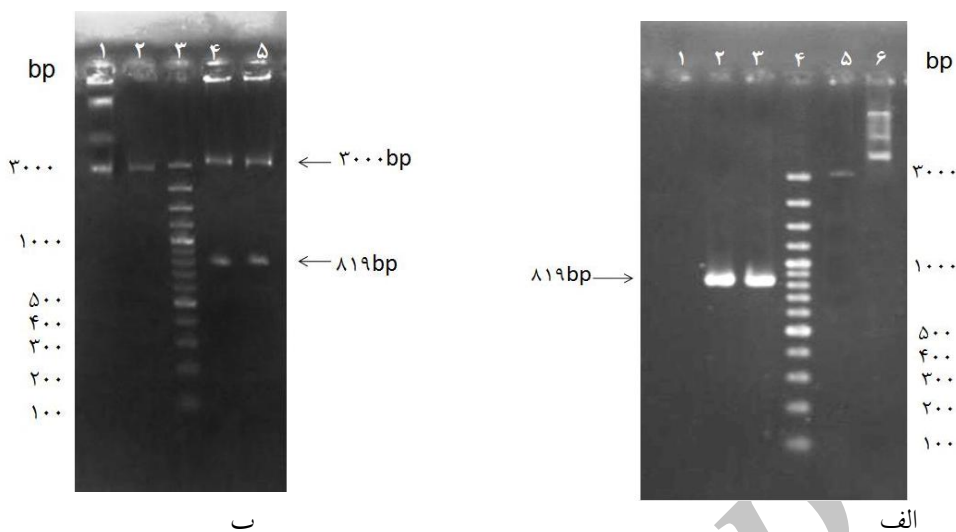
HindIII که بر روی پرایمر پیرو *RTB* قرار داشت) از آن خارج گردید. خالص سازی و حذف قطعه ۶ نوکلئوتیدی با روش ترسیب (الکل- نمک) انجام گرفت. در مرحله بعد قطعه *ipaD* طی واکنش الحاق (واکنش ۷۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد) با استفاده از T-4 لیگاز به درون وکتور pGEM-RTB وارد گردید و سپس محصول الحاق به درون سلول میزبان *E. coli* با روش شوک حرارتی انتقال یافت. به منظور کاهش برهم کنش بین پروتئین های متصل شده، هر پروتئین از پروتئین مجاورش با استفاده از توالی گلیسین و پرولین جدا شده بود به منظور تایید ساخت کاست ژنی، واکنش PCR، Nested-PCR و برش آنزیمی انجام گرفت.

زیر همسانه سازی قطعه نوترکیب *RTB-Linker-ipaD* در وکتور بیانی pET28a(+):

برای انجام زیر همسانه سازی، قطعه *RTB-Linker-ipaD* با هضم آنزیمی و وکتور نوترکیب pGEM-RTB-*ipaD* توسط آنزیم های Sall و HindIII بدست آمد و در وکتور بیانی pET28a(+) که با همین آنزیم ها برش خورده بود زیر همسانه سازی گردید. پلاسمید نوترکیب *RTB-Linker-ipaD*-pET28a(+) به منظور تکثیر به درون باکتری *E. coli*-BL21(DE3) ترانسفورم شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از پلاسمید برای تعیین توالی به آزمایشگاه ژنتیک انسانی نسل امید (تهران) فرستاده شد. تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، پیشرو *RTB* و پیرو *ipaD* انجام گرفت.

آنالیز بیوانفورماتیکی قطعه ژنی *RTB-ipaD*:

به منظور بررسی قابلیت بیان کاست ژنی در سیستم های بیانی پروکاریوتی و یوکاریوتی آنالیز بیوانفورماتیکی قطعه ژنی انجام گرفت. آنالیز کاست ژنی *RTB-ipaD* با استفاده از نرم افزارهای تحت شبکه به منظور بررسی محتوی G+C، وجود کدون های نادر و



تصویر شماره ۱: نتایج الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی ژن *RTB* بر روی ژل آگاروز ۱ درصد.

الف: نتایج PCR به منظور تایید همسانه سازی ژن *RTB* ستون شماره ۱: نتیجه PCR برای نمونه کنترل منفی بدون Template، ستون ۲ و ۳: قطعه تکثیر یافته *RTB* با وزن ۸۱۹ جفت بازی در ۲ نمونه تراریخت شده، ستون شماره ۴: نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SM 0321 ستون شماره ۵: پلاسمید pGEM-T تهیه شده از شرکت پرومگا آمریکا (#A1360)، ستون شماره ۶: پلاسمید استخراج شده از نمونه تراریختی (وکتور دارای ژن هدف).

ب: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی سازه pGEM-*RTB* ستون شماره ۱: پلاسمید نوترکیب pGEM-*RTB* بدون هضم آنزیمی (تراریخت شده). ستون ۲: پلاسمید pGEM-T تهیه شده از شرکت پرومگا آمریکا (تراریخت نشده)، ستون شماره ۳: نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SM 0321 ستون ۴ و ۵: پلاسمید های نوترکیب برش خورده با آنزیم های *Sall/HindIII* یک قطعه ۸۱۹ جفت بازی که قطعه ژنی مورد نظر می باشد و یک قطعه ۳۰۱۸ جفت بازی که پلاسمید pGEM خطی شده می باشد.

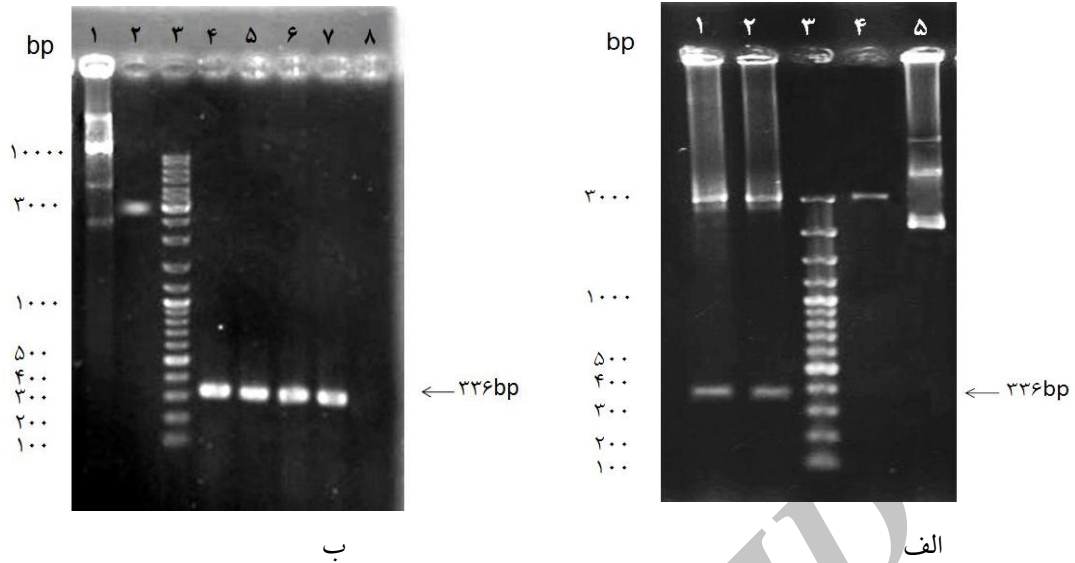
ژنی نشان داد (X03179.1). همچنین توالی *ipaD* همولوژی کامل را نشان داد (NC_007607.1). آنالیز داده های حاصل از تعیین توالی بر ساخت کاست ژنی به شکل مطلوب تاکید می کند (تصویر شماره ۵).

آنالیز بیوانفورماتیکی کاست ژنی *RTB-ipaD* نشان داد که متوسط درصد GC در حدود ۴۱ درصد می باشد (درصد مطلوب GC بین ۳۰ تا ۷۰٪ می باشد). شاخص سازگاری کدون (CAI) از عوامل مهم بررسی بیان ژن در میزبان خارجی محسوب می شود. این شاخص در مورد کاست ژنی *RTB-ipaD* در میزبان *E. coli* ۰/۶ و در گیاه تنباکو در حدود ۰/۸ می باشد.

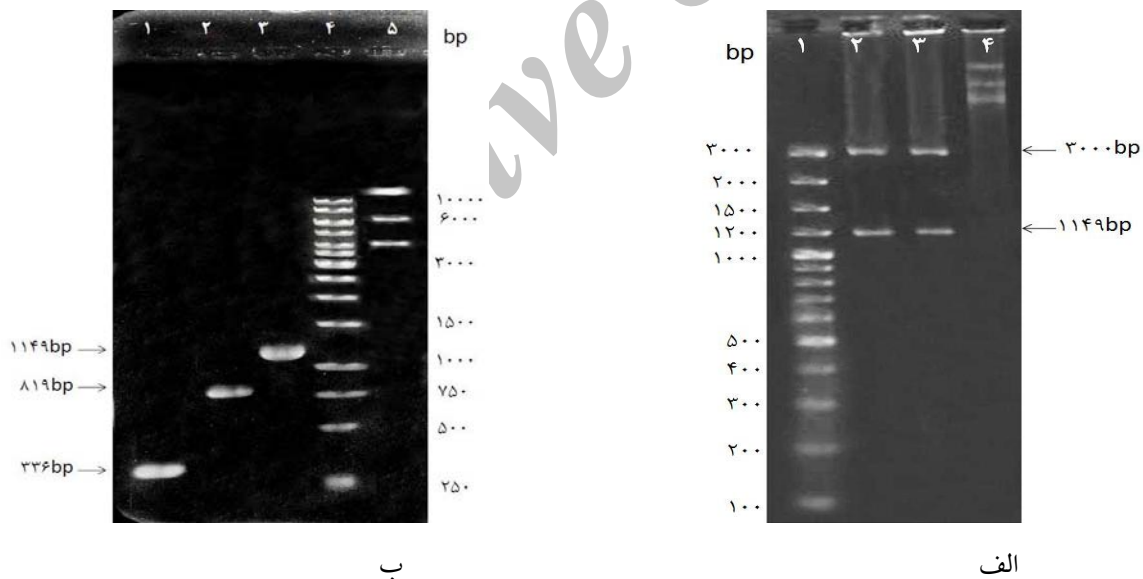
وکتور نوترکیب pGEM-*RTB-ipaD* با آنزیم های *Sall* و *HindIII* برش خورد و قطعه *RTB-ipaD* جدا گردید. سپس قطعه نامبرده در وکتور بیانی pET28a(+) زیر همسانه سازی شد و وکتور بیانی نوترکیب pET28a(+)-*RTB-ipaD* حاصل شد. وکتور اخیر به باکتری *E. coli* BL21 (DE3) ترانسفورم شد. حضور پلاسمید نوترکیب با ژل الکتروفورز و با روش های PCR مستقیم (تصویر شماره ۴ الف)، برش آنزیمی (تصویر شماره ۴ ب) تایید گردید.

ژن های متصل شده تعیین توالی شدند که ژن

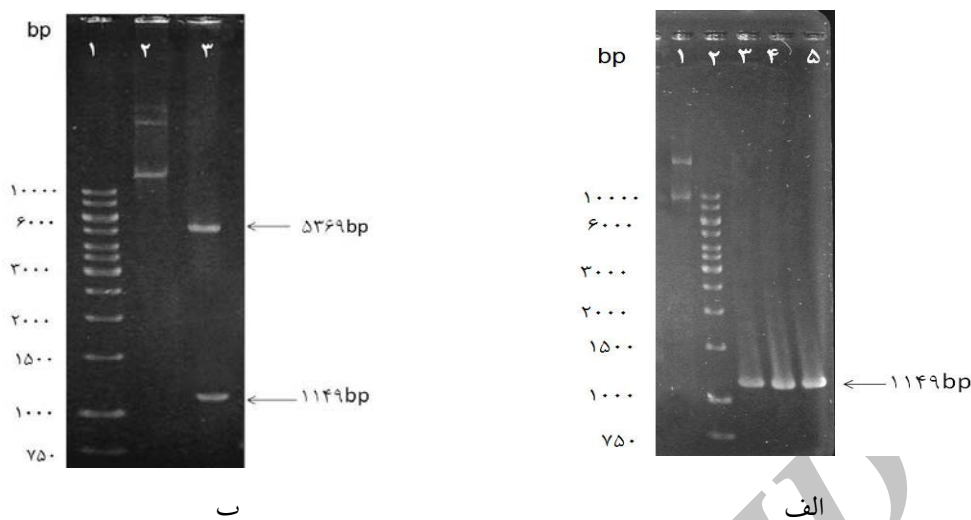
RTB همولوژی ۱۰۰ درصد با توالی ارائه شده در بانک



تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی به منظور تایید همسانه سازی ژن *ipaD* بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. الف: الکتروفورز محصول PCR ستون شماره ۱: پلاسمید نوترکیب *pGEM-ipaD* استخراج شده از نمونه تراریختی، ستون ۲: پلاسمید *pGEM-T* تهیه شده از شرکت پرومگا آمریکا ((#A1360))، ستون شماره ۳: نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SM0331 ستون ۴-۷: نتایج PCR ژن *ipaD* با وزن ۳۳۶ جفت بازی در ۴ نمونه تراریخت شده. ستون شماره ۸: نتیجه PCR برای نمونه کنترل منفی بدون Template. ب: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی سازه *pGEM-ipaD* ستون ۱ و ۲: نتایج حاصل از واکنش هضم آنزیمی سازه *pGEM-ipaD* شماره ۳: نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SM 0321 ستون شماره ۴: پلاسمید *pGEM-T* تهیه شده از شرکت پرومگا آمریکا (تراریخت نشده)، ستون ۵: وکتور دارای ژن هاف، بدون هضم آنزیمی.



تصویر شماره ۳: الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی به منظور تایید ساخت کاست ژنی *RTB-ipaD* بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. الف: الکتروفورز محصول PCR ستون ۱: محصول *Nested PCR* مربوط به کاست ژنی *RTB-ipaD* با پرایمر پیشرو و پیرو *ipaD* ستون ۲: محصول واکنش *Nested PCR* مربوط به کاست ژنی *RTB-ipaD* با استفاده از پرایمر پیشرو و پیرو *RTB* ستون ۳: محصول واکنش PCR با استفاده از پرایمر پیشرو *RTB* و پیرو *ipaD* ستون شماره ۴: نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SM0311. ستون شماره ۵: پلاسمید نوترکیب *pGEM-RTB-ipaD* استخراج شده از نمونه تراریختی. ب: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی سازه *pGEM-RTB-ipaD* ستون شماره ۱: نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SMT 0321 ستون ۲: پلاسمیدی که توسط آنزیم محدودالایر *E.coRI* تحت برش قرار گرفته است (قطعه ۱۱۴۹ جفت بازی و ۳۰۱۸ جفت بازی را نشان می دهد)، ستون ۳: پلاسمید نوترکیبی که توسط آنزیم های محدودالایر *Sall* و *HindIII* برش خورده است، یک قطعه ۱۱۴۹ جفت بازی که کاست ژنی مورد نظر می باشد و یک قطعه ۳۰۱۸ جفت بازی که پلاسمید *pGEM* خطی شده می باشد، از آن خارج شده است، ستون ۴: پلاسمید نوترکیب دارای قطعه *RTB-ipaD* بدون واکنش هضم آنزیمی.



تصویر شماره ۴: الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی به منظور تایید زیرهمسانه سازی کاست ژنی *RTB-ipaD* بر روی ژل آگاروز ۱ درصد.

الف: الکتروفورز محصول PCR ستون شماره ۱: پلاسمید نو ترکیب *pET28a(+)-RTB-ipaD* استخراج شده از نمونه تراریختی، ستون شماره ۲: نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SM0311 ستون ۳ تا ۵: نتایج PCR کاست ژنی *RTB-ipaD* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی.
 ب: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی سازه *pET28a(+)-RTB-ipaD* ستون شماره ۱: نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SM0311 ستون ۲: پلاسمید نو ترکیب بدون واکنش هضم آنزیمی، ستون ۳: پلاسمید نو ترکیب *pET28a(+)-RTB-ipaD* که توسط آنزیم‌های محدودالایتر *HindIII* و *Sall* برش خورده است.

```

1 atacagttgtggccatgcaagctctaatacagatgcaaatcagctctggactttgaaaaga
1 I Q L W P C K S N T D A N Q L W T L K R
61 gacaatactatttcgatctaatggaaagtgtttaactacttacgggtacagtcggggagtc
21 D N T I R S N G K C L T T Y G Y S P G V
121 tatgtgatgatctatgattgcaataactgctgcaactgatgccaccgctggcaaatatgg
41 Y V M I Y D C N T A A T D A T R W Q I W
181 gataatggaaaccatcataaaatcccagatctagcttagttagcagcgacatcagggaa
61 D N G T I I N P R S S L V L A A T S G N
241 agtgggtaccacacttacagtgcaaaccaacattttatgvcggttagtcaagggttgcttct
81 S G T T L T V Q T N I Y A V S Q G W L P
301 actaataatacacaaacctttgtgacaaccattgttgggcttatatggctctgtgcttcaa
101 T N N T Q P F V T T I V G L Y G L C L Q
361 gcaaatagtggaagaagatggatagaggactgttagcagtgaaaaggctgaacaacagtg
121 A N S G Q V W I E D C S S E K A E Q Q W
421 gctctttatgcagatggttcaatacgtctcagcaaaaccgagataattgccttacaagt
141 A L Y A D G S I R P Q Q N R D N C L T S
481 gattctaatatcgggaaacagttgtcaagatcctctctgtggccctgcacatcctctgg
161 D S N I R E T V V K I L S C G P A S S G
541 caacgatggatggttcaagaatgatggaaccatttttaatttgtatagtggttggtgta
181 Q R W M F K N D G T I L N L Y S G L V L
601 gatgtgagggcatcgggatccgagccttaaacaaatcattctttaccctctccatggtgac
201 D V R A S D P S L K Q I I L Y P L H G D
661 ccaaaccaaatatggttaccattatgtggaccaggaccactcgagagagaacaacaatcag
221 P N Q I W L P L F G P G P L E R T T N Q
721 gcattaagaaagatctctcacaacaaacagttgactaaaacatcgctagaagaagaatagca
241 A L K K D L S Q K T L T K T S L E E I A
781 ttacattcatctcagattagcatggatgtaaacaaatccgctcaactattggatattctt
261 L H S S Q I S M D V N K S A Q L L D I L
841 tccaagaaagaatatccaattaataaagacgcaagagaattattacattcagccccggaa
281 S K K E Y P I N K D A R E L L H S A P E
901 gaagccgagcttgatggatatacaaatgatctcacagagaactgtgggataaaaattgca
301 E A E L D G Y Q M I S H R E L W D K I A
961 aagtcaatcaataatattaatgaacagttatctgaaagtatatgaacatgccggttagttca
321 K S I N N I N E Q Y L K V Y E H A V S S
    
```

تصویر شماره ۵: توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه های مشتق شده از کاست ژنی *RTB-ipaD*.

توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای مربوط به لینکر *GPGP* در کادر خاکستری و آبی نشان داده شده است. دو اسید آمینه ای که مربوط به سایت برشی *XhoI* (سایت برشی آنزیمی که در بین دو ژن قرار دارد) می باشند به رنگ سبز مشخص گردیده است.

بحث:

وجود دارد (یوکاریوتی بودن *RTB*). با توجه به بیان کاست ژنی *RTB-P24* در میزبان *E. coli* (۱۴)، لذا بررسی بیان کاست ژنی در دو سویه از *E. coli* (Rosetta و BL21) در حال انجام است. همچنین آنالیز بررسی بیان در گیاه ترانسژنیک (با توجه به قرار گیری توالی متصل شونده به ریبوزوم (RBS) که در ابتدای کاست ژنی قرار گرفته است) نشان داد که شاخص سازگاری کدون (CAI) در حد مطلوب (۰/۸) می باشد. اختلالات ساختاری موتیف های مختلف که ممکن است بر فعالیت و پایداری فیوژن پروتئین ها تاثیر بگذارند یکی از چالش های اصلی طراحی فیوژن پروتئین، می باشد (۲۸،۲۷). بدین منظور بایستی از یک لینکر در بین قطعات پروتئینی استفاده کرد. توالی لینکر جهت کارکرد صحیح فیوژن پروتئین بسیار مهم می باشد. به منظور کاهش برهم کنش بین پروتئین *RTB* و *ipaD* لینکر GPGP که یک نوع لینکر انعطاف پذیر است و منتج به جداسازی موتیف های مختلف فیوژن پروتئین می شود در بین دو قطعه ژنی قرار گرفت. لینکر GPGP در مطالعات پیشین *RTB-NSP4* و *LTB-PrP* و GP5 and M proteins استفاده شده است (۱۵-۲۹،۳۰). در این تحقیق با بررسی نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین *RTB-P24* و *RTB-NSP4* که در آنها یک آنتی ژن به ناحیه C ترمینال/دجوانت *RTB* متصل شده بود (۱۴،۱۵)، ژن *RTB* به عنوان یک ادجوانت و ناقل مخاطی به جهت انتقال آنتی ژن متصل شده به بافت های مخاطی و افزایش جذب آن و در نتیجه افزایش پاسخ های ایمنی زایی، به ناحیه N ترمینال ژن *ipaD* به عنوان یک آنتی ژن کاندید واکسن متصل شد و کاست ژنی *RTB-ipaD* تولید گردید. کاست ژنی تولید شده به عنوان اولین گام جهت ادامه بررسی بیان و مطالعات ایمنی زایی به عنوان کاندید واکسن مخاطی علیه شیگلوزیس می باشد.

گونه های شیگلا عامل مهمی در ایجاد اسهال به ویژه در کشورهای در حال توسعه هستند. بر اساس گزارشی در تهران، شیگلا بیشترین درصد پاتوژن های اسهالی را در میان بیماران داشته است (۲۰،۲۱). در میان بیش از ۵۰ سروتایپ و زیر تایپ شیگلا، شیگلا دیسانتری تیپ ۱ بیشترین آسیب زایی را دارد. شیگلا دیسانتری تیپ ۱ یک آگزوتوکسین حساس به حرارت را تولید می کند که روده و سیستم اعصاب مرکزی را تحت تاثیر قرار می دهد (۲۲). مطالعات فراوانی را برای کنترل این عامل بیماری زا از طریق ایمن سازی افراد نموده اند. اما تاکنون هیچ واکسن پایدار نو ترکیب علیه این عامل به تایید سازمان بهداشت جهانی نرسیده است (۱). *IpaD* فاکتور آنتی ژنیک مهمی در توسعه واکسن شیگلا می باشد (۲۳،۲۴). Stensrud و همکارانش با مطالعه بر روی پروتئین *IpaD*، ناحیه N-ترمینال نزدیک به مرکز (رزیدوهای ما بین ۷۲ الی ۱۶۲) را به عنوان اصلی ترین ناحیه عملکردی معرفی نمودند (۲۵). استفاده از ناحیه N ترمینال *IpaD* در تولید واکسن علیه شیگلا می تواند مصونیت قابل توجهی را علیه سویه های مختلف شیگلا ایجاد کند (۱۱-۶). یکی از چالش ها در باره تولید واکسن شیگلا بر پایه *IpaD* عدم انتقال مناسب آن به بافت های لنفوئیدی همراه شده با مخاط و قدرت پایین می باشد. از این رو در این مطالعه، برای اولین بار زیر واحد B سم ریسین (*RTB*) که به عنوان یک ادجوانت و ناقل در واکسن های خوراکی عمل می کند به ناحیه N ترمینال *IpaD* با موفقیت متصل گردید و در وکتور بیانی (+) pET28a کلون گردید. نتایج داده های حاصل از تعیین توالی ساخت کاست ژنی به شکل مطلوب را نشان دادند. کاست ژنی در حالتی با یک چارچوب خواندن (ORF) در وکتور بیانی قرار گرفت. مطالعات بیوانفورماتیکی به منظور بیان کاست ژنی در میزبان *E. coli* نشان داد که چند کدون نادر در کاست ژنی

نتیجه گیری:

نسبت به زمانی که پروتئین *IpaD* به تنهایی استفاده می‌شود، مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از تمام اساتید و دانشجویان مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین^(ع) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماید. ضمناً بودجه پژوهشی این طرح از طرف دانشگاه جامع امام حسین^(ع) تامین شده بود.

نتایج حاصل از آنالیزهای صورت گرفته بر روی کاست ژنی، پیشنهاد تولید فیوژن پروتئین در برخی از سویه‌های *E. coli* و کلروپلاست گیاه را ارائه می‌نماید. همچنین با توجه به داده‌های حاصل از مطالعات ایمنی‌زایی بر روی ناحیه N-ترمینال *ipaD* (۲۶)، پیشنهاد می‌شود پس از تولید فیوژن پروتئین به ارزیابی آن در حیوانات مدل پرداخته شود و بررسی و مقایسه پاسخ‌های ایمنی‌زایی حاصل از پروتئین *RTB-IpaD*

منابع:

1. Von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang X, Thiem VD, et al. A Multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations and microbiology. PLoS Med. 2006 Sep; 3(9): 353.
2. Olad GhR, Tavalae M, Mohammad-Hassan Z, Ebrahimi F, Salimian, Nazarean Sh, et al. *Shigella dysentery* stxA mutant (R170L-A231D-G234E) gene design and optimization of recombinant protein expression and purification. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011; 13(5): 93-102.
3. Levine MM, Kotloff KL, Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. Nat Rev Microbiol. 2007 Jul; 5(7): 540-53.
4. Moran GJ. Threats in bioterrorism. II. CDC category B and C agents. Emerg Med Clin North Am. 2002 May; 20(2): 311-30.
5. Pickering LK. Antimicrobial resistance among enteric pathogens. Semin Pediatr Infect Dis. 2004 Apr; 15(2): 71-7.
6. Sani M, Botteaux A, Parsot C, Sansonetti P, Boekema EJ, Allaoui A. IpaD is localized at the tip of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. Biochim Biophys Acta. 2007 Feb; 1770(2): 307-11.
7. Blocker A, Gounon P, Larquet E, Niebuhr K, Cabiaux V, Parsot C, et al. The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. J Cell Biol. 1999; 147(3): 683-93.
8. Skoudy A, Mounier J, Aruffo A, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti P, et al. CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. Cell Microbiol. 2000; 2(1): 19-33.
9. Turbyfill KR, Mertz JA, Mallett CP, Oaks EV. Identification of epitope and surface-exposed domains of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigen D (*IpaD*). Infect Immun. 1998; 66(5): 1999-2006.

10. Stensrud KF, Adam PR, La Mar CD, Olive AJ, Lushington GH, Sudharsan R, et al. 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.
11. Espina M, Olive AJ, Kenjale R, Moore DS, Ausar SF, Kaminski RW, et al. IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. *Infect Immun*. 2006; 74(8): 4391-400.
12. Johnson S, Roversi P, Espina M, Olive A, Deane JE, Birket S, et al. Self-Chaperoning of the Type III secretion system needle tip proteins *IpaD* and *BipD*. *J Biol Chem*. 2007; 282(6): 4035-44.
13. Rahman MJ, Sarker P, Roy SK, Ahmad SM, Chisti J, Azim T, et al. Effects of zinc supplementation as adjunct therapy on the systemic immune responses in shigellosis. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81(2): 495-502.
14. Donayre-Torres AJ, Esquivel-Soto E, Gutierrez-Xicoténcatl Mde L, Esquivel-Guadarrama FR, Gomez-Lim MA. Production and purification of immunologically active core protein p24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in *E. coli*. *Virology*. 2009 Feb; 6: 17.
15. Choi NW, Estes MK, Langridge WH. Mucosal immunization with a ricin toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein stimulates a Th1 lymphocyte response. *J Biotechnol*. 2006; 121(2): 272-83.
16. Lord JM, Roberts LM, Robertus JD. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J*. 1994; 8(2): 201-8.
17. Carter JE, Odumosu O, Langridge WH. Expression of a ricin toxin B subunit: insulin fusion protein in edible plant tissues. *Mol Biotechnol*. 2010; 44(2): 90-100.
18. Saadati M, Heiat M, Nazarian S, Barati B, Honari H, Doroudian M, et al. Cloning and Expression of N-terminal Region of *IpaD* from *Shigella dysenteriae* in *E. coli*. *J Paramed Sci*. 2010; 1(4): 12-17.
19. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a Laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2001.
20. Ranjbar R, Soltan Dalal MM, Pourshafie MR, Aslani MM, Majdzadeh R, Khorramizadeh MR. serogroup distribution of shigella in tehran. *Iran J Publ Health*. 2004; 33(3): 32-5.
21. Ranjbar R, Haghi-Ashtiani MT, Jonaidi -Jafari N, Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. *Iranian J Publ Health*. 2009; 38(2): 134-8.
22. Cherla RP, Lee SY, Tesh VL. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Nov; 228(2): 159-66.
23. Zhang L, Wang Y, Olive AJ, Smith ND, Picking WD, De Guzman RN, et al. Identification of the MxiH needle protein residues responsible for anchoring invasion plasmid antigen D to the type III secretion needle tip. *J Biol Chem*. 2007; 282(44): 32144-51.
24. Turbyfill KR, Joseph SW, Oaks EV. Recognition of three epitopic regions on invasion plasmid antigen C by immune sera of rhesus monkeys infected with *Shigella flexneri* 2a. *Infect Immun*. 1995; 63(10): 3927-35.
25. Stensrud KF, Adam PR, La Mar CD, Olive AJ, Lushington GH, Sudharsan R, et al. 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.
26. Hesaraki M, Saadati S, Honari H, Olad G, Ranjbar R, Heiat M, et al. Induction of immune response against *ipaD* N-terminal region of *shigella dysenteriae* in guinea pigs. *Genetics in the 3rd millennium*. 2011; 9(1): 2261-6.

27. Crasto CJ, Feng JA. Linker: a program to generate linker sequences for fusion Proteins. *Protein Eng.* 2000 May; 13(5): 309-12.
28. Wriggers W, Chakravarty S, Jennings PA. Control of protein functional dynamics by peptide linkers. *Biopolymers.* 2005; 80(6): 736-46.
29. Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang PL, Chang HW, et al. The immunogenicity of DNA constructs co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus conjugated by GPGP linker in pigs. *Vet Microbiol.* 2010; 146(3-4): 189-99.
30. Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, et al. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine.* 2006; 24(15): 2815-23.

Archive of SID

Design, construction, sequence analysis and bioinformatics study of *RTB-ipaD* gene cassette: A new way in generation of *Shigellosis* vaccine

Safae S (MSc), Honari H (PhD)*, Esmaeli A (MSc), Gofrani M (MSc), Amlashi E (MSc),
Rostami H (MSc)

Biology Sciences Dept., Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran.
Received: 24/Feb/2012 Revised: 9/Apr/2012 Accepted: 22/May/2012

Background and aims: *Shigella* is the most common cause of diarrhea. Plasmid antigen *ipaD* is essential for bacterial invasion into the host cells. One of the challenges of mucosal vaccines against *Shigella* based on *ipaD* proteins is its limited potency. It seems that by linking this *ipaD* to an appropriate carrier and adjuvant such as Ricin toxin B subunit we can render it very immunogenic. This study aimed to construct an expression vector containing *RTB-ipaD* gene cassette, sequence analysis and bioinformatics study.

Methods: In this study, *RTB* and *ipaD* (163–483) genes were cloned into the pGEM-T vector. *ipaD* gene was fused to *RTB* gene with a linker encoding the GPGP in pGEM vector by restriction enzymes method. Then, the fused gene of *RTB-ipaD* was subcloned into the pET28a(+) expression vector. Finally, sequencing analysis and bioinformatics study of gene cassette was performed.

Results: Construct validity of *RTB-ipaD* gene cassette into the pET28a(+) expression vector confirmed by PCR and enzymatic digestion. The results of sequencing of gene cassette were compatible with the related deposited gene in Genbank. Bioinformatics studies base on the Codon Adaption Index showed that gene cassette is capable of expressing the transgenic plants, and some strains of *E. coli*.

Conclusion: Linking of *RTB* as a carrier and adjuvant to antigen *ipaD* is a new and desirable approach in order to generate a mucosal vaccine for shigellosis.

Keywords: Adjuvant, *IpaD*, Ricin toxin B subunit, *Shigella dysenteriae*.

Cite this article as: Safae S, Honari H, Esmaeli A, Gofrani M, Amlashi E, Rostami H.
Design, construction, sequence analysis and bioinformatics study of *RTB-ipaD* gene cassette: A new way in generation of *Shigellosis* vaccine. J Sharekord Univ Med Sci. 2013 Feb, March; 14(6): 48-59.

***Corresponding author:**

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