مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۵، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۲/ ۶۹-۶۱

مقاله پژوهشی

کلون، امتزاج و بیان نوترکیب ناحیه ۴ آنتی‌ژن حفاظت کننده *باسیلوس آنتراسیس* با زیرواحد B کلرا توکسین در باکتری *اشرشیاکلی*

بلال تقی پور، دکتر حسین هنری*، دانیال جهان تیغ، مهدی رضایی

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

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۲ اصلاح نهایی: ۹۱/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۱

چکیده:

زمینه و هدف: **ترکیب یا اتصال ژنتیکی آنتی ژن ها با زیر واحد B کلرا توکسین (ctB =cholera toxin B) پاسخ آنتی‌بادی موکوسی قوی ای را ایجاد می‌کند. هدف از این مطالعه اتصال ctB به ژن کد کننده ناحیه ٤ آنتی ژن حفاظت کننده (PaD_4=Protective antigen Domain 4) به منظور بیان پروتئین کایمریک به عنوان کاندیدا واکسن علیه بیماری سیاه زخم می باشد.**

روش بررسی: **در این تحقیق تجربی آزمایشگاهی واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژن های ctB و PaD_4 انجام شد و ژن های تکثیر شده به طور جداگانه در PGEM-T easy vector کلون شدند. سپس ژن PaD_4 به انتهای '۳ ژن ctB با روش هضم آنزیمی متصل شد و ژن امتزاج شده ctB-PaD_4 در PET28a زیر همسانه سازی گردید. سویه BL21 باکتری *E.coli* توسط وکتور نوترکیب ترانسفورم شد و بیان پروتئین کایمر تحت القای ایزوپروپیل- بتا-D-۱-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) قرار گرفت و به وسیله تکنیک SDS.PAGE و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.**

یافته ها: **ژن امتزاج شده ctB-PaD_4 ساخته شد و با تکنیک PCR و تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت. این ژن در باکتری *E.coli* سویه BL21 در دمای بهینه ۳۷ درجه سانتیگراد بیان گردید و پروتئین کایمر با موفقیت تولید شد. باند مربوط به این پروتئین با تکنیک SDS.PAGE و وسترن بلات تأیید گردید.**

نتیجه گیری: **این پروتئین نوترکیب بعد از بررسی ایمنی زایی می‌تواند به عنوان واکسن زیر واحدی کایمر جدید و موثر علیه باکتری *باسیلوس آنتراسیس* به صورت خوراکی یا استنشاقی استفاده شود.**

واژه‌های کلیدی: امتزاج، آنتی‌ژن حفاظت کننده، *باسیلوس آنتراسیس*، کلرا توکسین B، واکسن کایمر.

مقدمه:

ایمنی موکوسی از طریق دهان و بینی به خاطر کاربرد آسان و توانایی افزایش ایمنی حفاظتی مخصوصاً علیه پاتوژن های موکوسی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۲،۱). تعداد زیادی از محققین گزارش داده اند که تحویل واکسن نوترکیب از طریق دهان و بینی بدون استفاده از یک ناقل تحویل دهنده یا ادجوانت موکوسی مانند کلراتوکسین (ct) و انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) اغلب به شدت ضعیف می باشد و در بعضی مواقع با پاسخ ایمنی بسیار ضعیفی همراه می باشد. استفاده همزمان آنتی ژن های واکسن نوترکیب با یک ادجوانت موکوسی قوی به طور چشمگیری پاسخ ایمنی را افزایش می دهد. این افزایش پاسخ با واکسن های معمولی قابل مقایسه می باشد و در بعضی مواقع حتی سطح بالاتری دارد.

ایجاد خاصیت سمیت، نگرانی در مورد ایمنی استفاده از این ادجوانت ها را افزایش داده است (۳). یک دیدگاه برای حل مشکل سمیت توکسین کامل استفاده از زیر واحد B غیر توکسیک این توکسین ها می باشد که ایمنی آنها در آزمایشات پزشکی ارزیابی شده است (۴). ct یک نمونه معروف از توکسین های

نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه، مرکزتحقیقات زیست شناسی، تلفن ۰۹۱۳۸۸۶۲۱۷٤،
E-mail:honari.hosein@gmail.com

www.SID.ir

چند زیر واحدی (AB) است که به وسیله ویبریو کلرا تولید می شود. مولکول ct شامل یک زیر واحد A و پنج زیر واحد B است. زیر واحد B کلراتوکسین (ctB) متشکل از ۵ پلی پپتید مشابه است که در باکتری جمع می شوند و یک ساختار پنتامریک پایدار حلقه ای شکل را به وجود می‌آورند. ctB به صورت انتخابی به مولکول‌های گانگلیوزید GM1 که در غشای سلول های اپیتلیال روده و Mcell ها قرار دارند، متصل می شود (۵). ctB به عنوان یک مولکول انتقال دهنده موثر برای پروتئین های خارجی مانند واکسن‌های آنتی ژنی موکوسی و آنتی ژن های خودی استفاده می شود (۶). ctB مولکول انتقال دهنده بسیار موثری برای ترشح پاسخ آنتـــی بادی سیستمیک و مـــوکوسی برای آنتی ژن های کنژوگه شده به صورت شیمیایی و ژنتیکی می باشد و علیه بیماری های خود ایمنی ایجاد تحمل ایمنی موکوسی می کند (۹-۷). مقدار پروتئین کنژوگه شده برای فعال سازی سلول های T، ۱۰۰۰۰ برابر نسبت به آنتی ژن آزاد کمتر می باشد (۱۰).

اثرات انتقال کارآمد آنتی ژن به وسیله ctB برای افزایش پاسخ آنتی بادی سیستمیک و موکوسی به واکسیناسیون محدود نمی شود. سلول های دندرتیک (DC) فعال شده با ctB توانایی افزایش کمپلکس اصلی سازگاری بافتی و ترشح همزمان مولکول های ثانویه مانند CD80 و CD86 را روی سطح سلول های دندرتیک ایجاد می‌کنند و همچنین باعث ترشح سیتوکاین های پیش التهابی می‌شوند. این توانایی ممکن است که یک تکنولوژی جدید به نام واکسن های فعال شده با DC را به وجود آورد (۱۱). پروتئین‌های کنژوگه شـــده به ctB (اتصال ژنتیکی) نسبت بـــه پروتئین‌های مخلوط شده (اتصال شیمیایی) با این مولکول پاسخ ایمنی بیشتری را تولید می کنند (۱۲،۱۱).

باکتری باسیلوس آنتراسیس از سال ها قبل باعث ایجاد بیماری در گیاه خواران وحشی و خانگی شده است. اگرچه شیوع سیاه زخم طبیعی در انسان بسیار کم می باشد، ولی به خاطر پتانسیل بالای این باکتری برای استفاده به عنوان سلاح بیولوژیک، تلاش برای تولید واکسن انسانی علیه این بیماری افزایش یافته است. توکسین و کپسول باسیلوس آنتراسیس دو فاکتور اصلی بیماریزایی این باکتری می باشند (۱۵-۱۳). توکسین باکتری یک کمپلکس سه قسمتی است که به وسیله سه پروتئین مونومر غیرسمی ایجاد می شود. این سه پروتئین شامل LF، Pa و EF می باشند. LF یک متالوپروتئاز وابسته به روی است که مسیر سیگنالی پروتئین کیناز وابسته به میتوژن را غیر فعال می سازد. EF یک آدنیلات سیکلاز وابسته به کالمادولین و کلسیم است که تولید AMP حلقوی داخل سلولی را کاتالیز می کند. EF و LF در سیتوزول اثرات سمی خود را اعمال می کنند. PA یک حامل برای انتقال LF و EF از فضای خارج سلولی به سیتوزول میزبان می باشد (۱۶). کمپلکس دوتایی Pa/LF و Pa/EF به ترتیب به عنوان توکسین مرگ و توکسین ادم شناخته می شوند. آنتی بادی اختصاصی علیه Pa انتقال LF و EF با واسطه Pa به درون سلول را منع می کند و توکسین ادم و توکسین مرگ را خنثی می سازد. بنابراین Pa یک آنتی ژن اصلی در بیشتر واکسن های سیاه زخم می باشد. Pa به یک رسپتور سلولی که اخیراً کشف شده است به نام ATR متصل می شود (۱۷). این پروتئین نقش اولیه در اتصال به سلول هدف دارد و ناحیه چهار این پروتئین واسطه اتصال Pa به رسپتور سلولی می باشد. بنابراین ناحیه ۴ این پروتئین هدف جذاب و ویژه برای تولید کاندیدا واکسن می باشد.

این مطالعه با هدف کلون، امتزاج و بیان نوترکیب ناحیه ۴ آنتی‌ژن حفاظت کننده باسیلوس آنتراسیس (PaD_4) با ctB در باکتری E.coli طراحی گردید.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، ابتدا ژن ctB به ژن کد کننده PaD_4 باسیلوس آنتراسیس متصل شد. بـــرای اتصال ژنتیکی این دو ژن ابتدا هر دوی این

Archive of SID

www.SID.ir

ژن ها در وکتور کلونینگ همسانه سازی شدند و به وسیله روش هضم آنزیمی این دو ژن به هم متصل شدند. سپس در پرایمر پیشرو ژن PaD_4 را بعد از جایگاه برش BamHI توالی لینکر GPGP که یک لینکر انعطاف پذیر است، قرار دادیم. این لینکر برای ارائه اپی توپ های این دو پروتئین و عدم تداخل این دو پروتئین ضروری می باشد. پروتئین کایمر ctB-PaD_4 در باکتری *E.coli* بیان گردید و به عنوان یک کاندیدا واکسن علیه این پاتوژن در نظر گرفته شد.

در این مطالعه از DNA پلیمراز pfu (فرمنتاز، لیتوانی)، آنزیم هایSalI HindIII و BamHI (فرمنتاز، لیتوانی)، IPTG (ویوانتیس، مالزی، PC0708)، وکتور بیانی pET-28a (نواژن، ایالات متحده آمریکا، 3-69864) و وکتورکلونینگpGEM-T (پرومگا، A1360) استفاده شد. DNA ژنومیک باسیلوس آنتراسیس و ویبریوکلرا استخراج و به عنوان الگو در PCR استفاده شدنـــد. سوش های DH5α و BL-21(DE3) باکتری *E.coli* از شرکت اینویتروژن و نواژن تهیه شـــدند. وکتورهای pGEM-T و pET-28a به ترتیب به عنوان وکتورکلونینگ و وکتور بیانی مورد استفاده قرار گرفتند. باکتری ها در محیط LB براث و آگار با کانامایسین (مرک، آلمان) و بدون کانامایسین (سیگما، ایالات متحده آمریکا) کشت داده شدند.

ساخت وکتور بیانی نوترکیب باکتریایی:

DNAژنومی باکتری ویبریوکلرا O1 سوش ۵۴۷ به وسیله کیت تجاری (فرمنتاز، لیتوانی،K0721) استخراج گردید. ژن ctB به وسیله واکنش PCR و در شرایط زیر تکثیر گردید. مرحله اول (دناتوره) دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم شامل۳۰ سیکل دناتوره در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه به مدت ۳۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱دقیقه و مرحله سوم یا گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. از پرایمر های زیر برای تکثیر ctB استفاده گردید:

ForwardctB:5′GTCGACGGAGGCTTTATGAT TAAATTAAAATTTGG3′
ReversectB:5′AAGCTTATTAGGATCCCAAA TTTGCCATACTAAT3′

توالی های زیر به ترتیب شامل جایگاه های برش HindII، SalI و BamHI است. بعد از تکثیر، ژن ctB به وسیله کیت تخلیص PCR (روش، آلمان، 11732668001) تخلیص شد و در وکتور pGEM-T easy (پرومگا) همسانه سازی گردید. دو جایگاه برش در پرایمر پیرو ژن ctB طراحی شد و این دو جایگاه برش، در پرایمر پیرو و پیشرو ژن PaD_4 نیز قرار داده شد. برای فیوژ این دو ژن، ژن PaD_4 نیز در وکتور کلونینگ همسانه سازی گردید. بدین صورت که ژن PaD_4 با استفاده از DNA ژنوم باکتری باسیلوس آنتراسیس با شماره دسترسی NC00732202 در بانک ژن NCBI که از موسسه واکسن سازی و سرم سازی رازی تهیه و با شرایط زیر تکثیر شد: مرحله دناتوره دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم شامل ۳۰ سیکل: دناتوره در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱دقیقه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. *ژن* PaD_4 با پرایمر های زیر تکثیر شد:

ForwardPAD$_4$:5'GGATCCGGACCAGGACCA ATGCAAGGGAAAGACATAACCG
3′ReversePAD$_4$:5′CCCAAGCTTCATTAAAAT TTTCTTGATCCCGTT 3′

جایگاه برش این دو پرایمر به ترتیب BamHI و HindIII می باشد. توالی لینکر GPGP بعد از جایگاه برش BamHI در پرایمر پیشرو قرار گرفته است. بعد از تکثیر، قطعات تکثیر شده به وسیله کیت تخلیص و در وکتور pGEM-T easy همسانه سازی گردید. قطعه وارد شده در pGEM-PaD_4 به وسیله آنزیم های BamHI و HindIII برش داده شد. پلاسمید نوترکیب pGEM-ctB نیز به وسیله همان دو آنزیم برش داده شد و یک قطعه ۴ نوکلئوتیدی از آن خارج گردید. در طول

www.SID.ir

فرآینـد الحـاق، قطعـه PaD_4 بـه داخـل پلاسـمید pGEM-ctB بـه جـای قطعـه ۴ تـایی وارد شـد. سـازه SalI- ctB-BamHI-gpgp linker-PaD_4- HindIII بعد از فرآیند اتصال ساخته شد و به بـاکتری E.coli سـوش DH5α انتقال یافت. ژن فیوژ شـده $ctB\text{-}PaD_4$ بـه داخـل pET-28a زیر همسانه سازی شد.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب:

سوش BL-21(DE3) برای بیان ژن $ctB\text{-}PaD_4$ استفاده شد. وکتور بیانی $ctB\text{-}PaD_4$ به سوش BL-21(DE3) انتقال یافت. برای بیان این ژن تک کلونی گرفته شد و در ۱۰ml محیط LB شامل ۵۰ug/ml کانامایسین در دمای ۳۷ درجه با ۱۵۰ rpm به مدت یک شبانه روز گرماگذاری شد. در مرحله بعد کشت باکتری با نسبت ۱ به ۱۰ در محیط LB تازه شامل ۵۰ug/ml آنتی بیوتیک کانامایسین به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه با دور۱۵۰ در شیکر انکوباتور گرماگذاری شد. بیان پروتئین نوترکیب $ctB\text{-}PaD_4$ با IPTG در غلظت نهایی ۱mM القا شد. بعد از القا رشد باکتری ها در دمای ۳۷ درجه در شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰rpm به مدت ۵ ساعت ادامه یافت. سلول ها به وسیله سانتریفیوژ mi (۱۰ n –۱۴۰۰۰) جمع آوری شدند. رسوب جمع آوری شده با بافر لیزکننده (NaH2PO4, NaCl) و سونیکاسیون (۴ مرتبه به مدت۳۰ ثانیه با توان ۵۰w) لیز شد. بعد از سانتریفیوژ، دوباره رسوب (pellet) در محلول بافر لیزکننده حل شد و مجدداً با همان مشخصات سونیکیت شد. مایع رویی (سوپرناتان) شامل پروتئین های محلول در داخل سلول و رسوب (pellet) شامل پروتئین های غیر محلول در داخل سلول بود. بعد از بیان، مشاهده شد که پروتئین در قسمت نامحلول می باشد. قسمت غیر محلول پروتئین به وسیله اوره با غلظت نهایی ۶ مولار (عامل دناتوره کننده) محلول شد. اوره ۶ مولار به مقدار ۱ به ۵۰ کشت اولیه باکتری برای حل شدن قسمت غیر محلول پروتئین استفاده شده است. نمونه به مدت یک ساعت در دمای اتاق شیک شد و بعد از سانتریفیوژ محلول رویی جمع‌آوری گردید. پروتئین همراه با برچسب پروتئینی هیستیدین واقع در N ترمینال بیان گردید. این برچسب برای تخلیص پروتئین از ستون کروماتوگرافی ضروری است. بعد از محلول کردن قسمت غیر محلول با اوره ۶ مولار از میان ستون نیکل عبور داده شد. شستشوی ستون به وسیله بافر های تخلیص به روش دناتوره انجام شد و بافرهای مختلف با ژل SDS-PAGE آنالیز شدند.

وسترن بلات:

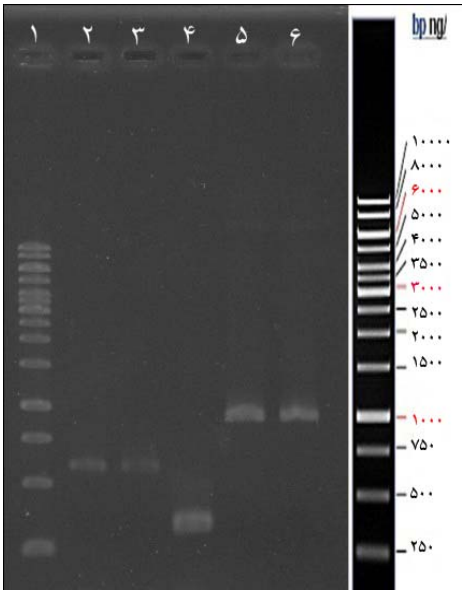
پروتئین از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد به غشای نیتروسلولز انتقال یافت و در شیر خشک (w/v) ۵ درصد به روش استاندارد بلوکه گردید. غشای نیتروسلولز ۳ مرتبه با محلول نمکی PBS-T شستشو شد و با محلول آنتی بادی پلی کلونال ضد Pa موشی رقیق شده در PBS-T با نسبت ۱ به۲۵۰۰ به مدت یک ساعت گرماگذاری شد. در این مرحله غشای نیتروسلولز دوباره ۳ مرتبه با محلول نمکی PBS-T شستشو داده شد و با محلول کنژوگه پراکسیداز آنتی IgG موشی (سیگما) رقیق شده در محلول نمکی PBS-T با نسبت ۱ به ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ ساعت گرماگذاری گردید و عمل شستشو با همان روش قبلی صورت گرفت. برای شناسایی و مشاهده باند پروتئین از محلول سوبسترای DAB که در حضور پراکسیداز ترب کوهی (HRP) واکنش لومینسانس انجام می دهد، استفاده گردید.

یافته ها:

ساخت ژن فیوژ شده ($pGEM\text{-}ctB\text{-}PaD_4$)

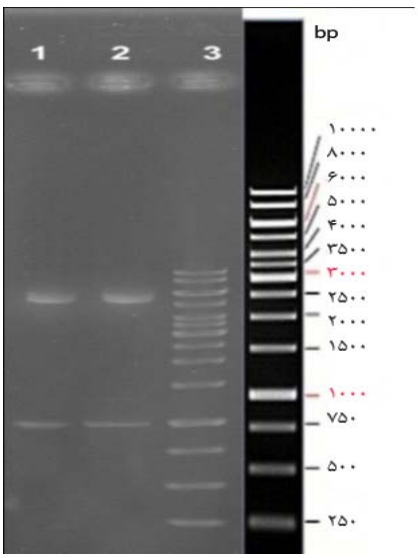
PCR به وسیله پرایمـرهای اختصاصی برای ژن‌های ctB(406bp) و PaD_4(566bp) انجام شد و در وکتور pGEM-T easy همسانه سازی گردید. ژن PaD_4 به انتهای'۳ ژن ctB به وسیله روش هضم آنزیمی امتزاج یافت. این وکتور نوترکیب به داخل سوش DH5α باکتری *E.coli* انتقال یافت. وکتور نوترکیب $ctB\text{-}PaD_4$ به وسیله PCR تأیید گردید (تصاویر شماره ۱ و ۲).

www.SID.ir



تصویر شماره۱: الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد با استفاده از $pGEM\text{-}ctB\text{-}PaD_4$ به عنوان الگو

ستون۱: مارکر DNA (فرمنتاز SM1163)، ستون ۲و۳: محصولات PCR مربوط به پرایمر پیرو و پیشرو PaD_4 (566 bp)، ستون٤: محصولات PCR مربوط به پرایمر پیرو و پیشرو ctB(406bp)، ستون ٥و٦: محصول PCR مربوط به پرایمر پیشرو ctB و پیرو PaD_4 (972 bp).



تصویر شماره ۲:الکتروفورز قطعات حاصل از برش دوگانه $PET28a\text{-}ctB\text{-}PaD_4$ بر روی ژل ۱ درصد آگاروز

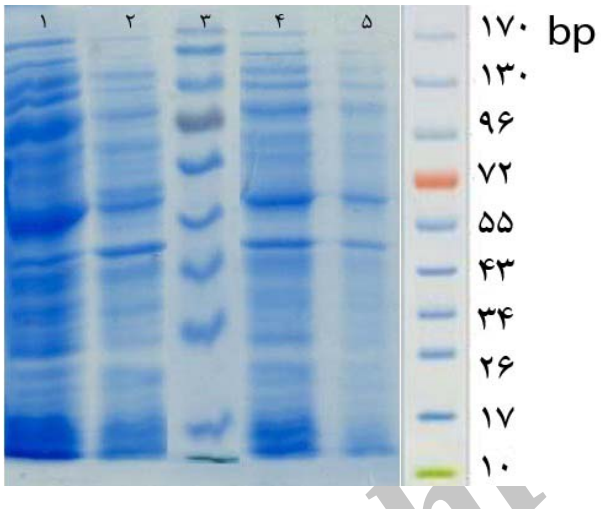
ستون ۱ و ۲: برش دوگانه وکتور طراحی شده با استفاده از آنزیم های SalI و HindIII که قطعه 972 bp از آن خارج گردید و قطعه 5369bp وکتور بیانی را نشان می دهد؛ ستون۳: مارکر DNA (فرمنتاز، SM116).

ساخت وکتور بیانی (PET28a-ctB-PaD4):

وکتور $pGEM\text{-}ctB\text{-}PaD_4$ با آنزیم های SalI و NotI برش داده شد و قطعات حاصل از برش به جایگاه مشابه در PET28a انتقال یافتند. پلاسمید نوترکیب ساخته شده با روش هضم آنزیمی شناسایی و تأیید شد.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب کایمر ctB-PaD4 :

پروتئین $ctB\text{-}PaD_4$ نوترکیب در سوش BL-21(DE3) باکتری E.coli بیان و روی ژل SDS-PAGE ران شد (تصویر شماره ۳).

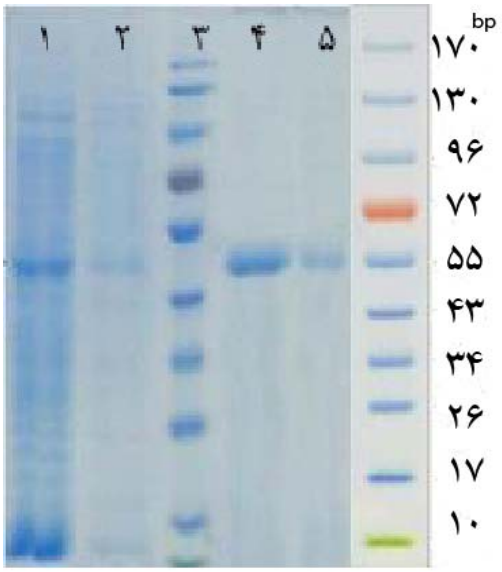


تصویر شماره ۳: بیان پروتئین *ctB-PaD4* نوترکیب در سوش BL-21(DE3) باکتری *E. coli*

ستون۱: کلون های القاء شده با IPTG، ستون۲: کلون‌های القاء نشده (کنترل منفی)، ستون ۳: نشانگر پروتئینی SM0671، ستون ٤: رسوب جدا شده بعد از سونیکاسیون حاوی پروتئین های غیر محلول سلولی، ستون ٥: مایع رویی جدا شده بعد از سونیکاسیون حاوی پروتئین های محلول سلولی.

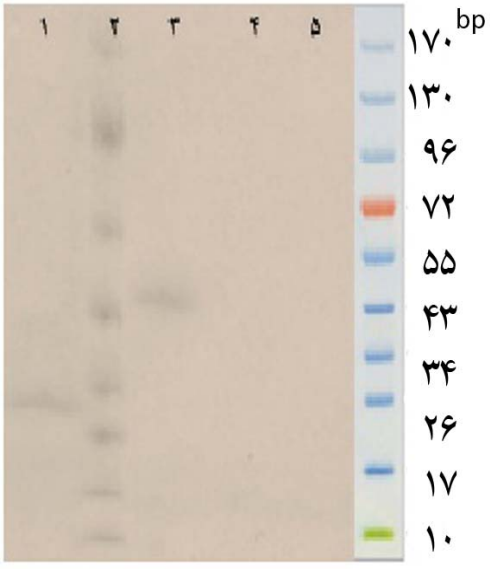
پروتئین نوترکیب بعد از محلول سازی با اوره از طریق عبور از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni2+ تخلیص گردید. پروتئین تخلیص شده $ctB\text{-}PaD_4$(45kDa) بر روی ژل SDS-PAGE ران شد. با بررسی نمونه و بافرهای عبور داده شده از ستون مشخص گردید که بافرهای E با PH=4.5 و بافر MES قادر به جدا نمودن پروتئین از ستون نیکل هستند (تصویر شماره ۴).

www.SID.ir



تصویر شماره ۴: پروتئین کایمر تخلیص شده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی+Ni2

ستون ۱: پروتئین موجود در بافر C، ستون ۲: پروتئین موجود در بافر D، ستون ۳: نشانگر پروتئینی SM0671، ستون ٤: پروتئین موجود در بافر E، ستون ۵: پروتئین موجود در بافر MES.



تصویر شماره ۵: آنالیز وسترن بلات پروتئین کایمر $CTB\text{-}PAD_4$ با ANTI-PA

ستون ۱: PAD_4 نوترکیب به عنوان کنترل مثبت، ستون ۲: نشانگر پروتئینی SM0671، ستون ۳: باند مربوط به پروتئین کایمر $ctB\text{-}PaD_4$، ستون ٤: BSA به عنوان کنترل استاندارد واکنش، ستون ۵: کلونی‌های القاء نشده با IPTG.

تأیید پروتئین با وسترن بلات:

پروتئین کایمر $ctB\text{-}PaD_4$ به وسیله آنتی بادی پلی کلونال ضد Pa در سنجش ایمنوبلات به صورت اختصاصی نشان داده شده است (تصویر شماره ۵). یک تک باند مربوط به پروتئین $ctB\text{-}PaD_4$ در ایمنوبلات مشاهده گردید، این مطلب نشان دهنده عدم تجزیه پروتئین مورد نظر است. در این آزمایش از پروتئین PaD_4 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

بحث:

آنتراکس یک بیماری باکتریایی می باشد که اوایل به حیوانات صنعتی و غیر صنعتی محدود می شد ولی در حال حاضر به دلیل استفاده از آن به عنوان عامل ترور و کشتار افراد، به یک نگرانی جدی تبدیل شده است. برای حل این مشکل به یک برنامه واکسیناسیون قوی نیازمندیم. واکسن های آنتراکس که امروزه موجود هستند نگرانی ها را در مورد اثرات جانبی و حفاظت غیر کامل آنها افزایش داده اند (۱۸). بنابراین واکسن های (Anthrax vaccine adsorbed=AVA) و (Anthrax vaccine percipittated= AVP) شامل مقدار متغیر از PA و همچنین مقادیر کمتر از LF، EF و دیگر پروتئین های ترشحی می باشند (۱۹). ارزش حفاظتی این دو واکسن و واکسن های مشابه به خاطر محتوای PA آنها می باشد. صرف نظر از روش ایمنی زایی، چگونگی تحویل آنتی ژن، نوع ادجوانت و نوع حیوان مورد استفاده در ایمنی زایی، لازمه ایمنی حفاظتی در برابر این بیماری، تولید پاسخ هومورال خنثی کننده PA به وسیله این روش ها می باشد. آنتی بادی های خنثی کننده بهترین پاسخ سیستم ایمنی برای حفاظت علیه سم هستند (۲۰). واکسن های کلاسیک بر پایه PA پاسخ هومورال اختصاصی را القا می کنند. نقش حفاظتی خنثی سازی سم آنتراکس به وسیله آنتی بادی اختصاصی علیه PA تولید شده به وسیله واکسن ها، توسط آزمایشات گوناگونی بر روی حیوانات آزمایشگاهی اثبات شده است. این آزمایشات نشان

www.SID.ir

دادند که حیوان آزمایشگاهی در برابر اسپور باکتری باسیلوس آنتراسیس بعد از تولید آنتی بادی حفاظت می شود (۲۱). بسیاری از مطالعات هماهنگ دیگر نشان دادند که آنتی بادی های مونوکلونال انسانی، میمونی و موشی علیه Pa باعث حفاظت علیه عفونت های ناشی از LTوET در حیوانات مختلف می شوند.

انتهای کربوکسیل پروتئین Pa یعنی ناحیه متصل شونده به رسپتور سلول میزبان (PaD_4) برای ورود سم به سلول میزبان ضروری است و این ناحیه شامل اپی توپ های حفاظتی غالب این پروتئین می باشد. با توجه به این نکات، ناحیه ۴ این پروتئین هدف جالب و ویژه برای کاندیدا واکسن است. واکسیناسیون موکوسی منجر به تولید آنتی بادی و حافظه ایمنولوژیک در برابر پاتوژن ها می شود. این پاسخ برای پاتوژن هایی که از طریق معده، روده و سیستم تنفسی وارد بدن می شوند، بسیار مهم است. استفاده همزمان ctB با یک آنتی ژن دیگر باعث تولید IgG در سطوح موکوسی بدن می شود. برای ایجاد این پاسخ ها در بدن، عبور ctB از سد موکوسی با اتصال به گیرنده گانگلیوزید GM1 سطح سلول برای ارائه ctB به عنوان آنتی ژن موکوسی و ایجاد خاصیت ادجوانتی ضروری و مهم است (۲۲). در این تحقیق بیان پروتئین کایمر با موفقیت انجام شد و دمای بهینه برای بیان این پروتئین دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تعیین گردید. صحت بیان این پروتئین توسط تکنیک های SDS-PAGE و وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت. این پروتئین دارای وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون است و به صورت نامحلول در این باکتری بیان می گردد. برای محلول سازی این پروتئین پارامترهای مختلف دما، زمان و مقدار IPTG تغییر داده شد ولی این پروتئین به صورت محلول بیان نشد. بررسی روی محلول سازی این پروتئین با تغییر میزبان بیانی در تحقیقات بعدی انجام خواهد شد.

نتیجه گیری:

در این مطالعه پروتئین فیوژ شده شامل ctB و PaD_4، برای افزایش جذب آنتی ژن فیوژ شده در سلول های اپیتلیال روده و دیگر سطوح موکوسی بدن و بهبود پاسخ ایمنی، در سوش BL-21 باکتری *E.coli* با موفقیت تولید شد. این پروتئین به عنوان یک کاندیدا واکسن علیه بیماری آنتراکس در مطالعات بعدی مورد بررسی ایمنی زایی قرار خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی:

این طرح در قالب طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم زیستی دانشگاه جامع امام حسین (ع) و با حمایت مالی این مرکز انجام شده است. مراتب تقدیر و تشکر از کلیه عزیزانی که در انجام این طرح پژوهشگر را یاری نمودند، ابراز می گردد.

منابع:

1. Ferro VA, Pérez O. Adjuvant strategies required for targeting mucosal tissues. Methods. 2009 Dec; 49(4): 299-300.

2. He DM, Qian KX, Shen GF, Li YN, Zhang ZF, Su ZL, et al. Stable expression of foot-and-mouth disease virus protein VP1 fused with cholera toxin B subunit in the potato (Solanum tuberosum). Colloids Surf B Biointerfaces. 2007 Apr; 55(2): 159-63.

3. Yuki Y, Kiyono H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. Expert Rev Vaccines. 2009 Aug; 8(8): 1083-97.

4. Levine MM, Kaper JB, Herrington D, Ketley J, Losonsky G, Tacket CO, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD 103 and CVD 103-HgR. Lancet. 1988 Aug; 2(8609): 467-70.

www.SID.ir

5. Dertzbaugh MT, Elson CO. Comparative effectiveness of the cholera toxin B subunit and alkaline phosphatase as carriers for oral vaccines. Infect Immun. 1993 Jan; 61(1): 48-55.

6. Sun JB, Holmgren J, Czerkinsky C. Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 Nov; 91(23): 10795-9.

7. Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solís AG, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Martínez-González L, Herrera-Díaz A, et al. Expression of an Escherichia coli antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. Plant J. 2009 Jan; 57(1): 45-54.

8. Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell H. Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts--oral administration protects against development of insulitis in non-obese diabetic mice. Plant Biotechnol J. 2007 Jul; 5(4): 495-510.

9. Sharma MK, Singh NK, Jani D, Sisodia R, Thungapathra M, Gautam JK, et al. Expression of toxin co-regulated pilus subunit A (TCPA) of Vibrio cholerae and its immunogenic epitopes fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (Solanum lycopersicum). Plant Cell Rep. 2008 Feb; 27(2): 307-18.

10. George-Chandy A, Eriksson K, Lebens M, Nordström I, Schön E, Holmgren J. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells. Infect Immun. 2001 Sep; 69(9): 5716-25.

11. Eriksson K, Fredriksson M, Nordström I, Holmgren J. Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. Infect Immun. 2003 Apr; 71(4): 1740-7.

12. Eriksson K, Sun JB, Nordström I, Fredriksson M, Lindblad M, Li BL, et al. Coupling of antigen to cholera toxin for dendritic cell vaccination promotes the induction of MHC class I-restricted cytotoxic T cells and the rejection of a cognate antigen-expressing model tumor. Eur J Immunol. 2004 May; 34(5): 1272-81.

13. Smith H. Discovery of the anthrax toxin: the beginning of in vivo studies on pathogenic bacteria. Trends Microbiol. 2000 May; 8(5): 199-200.

14. Aulinger BA, Roehrl MH, Mekalanos JJ, Collier RJ, Wang JY. Combining anthrax vaccine and therapy: a dominant-negative inhibitor of anthrax toxin is also a potent and safe immunogen for vaccines. Infect Immun. 2005 Jun; 73(6): 3408-14.

15. Rhie GE, Roehrl MH, Mourez M, Collier RJ, Mekalanos JJ, Wang JY. A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Sep; 100(19): 10925-30.

16. Collier RJ, Young JA. Anthrax toxin. Annu Rev Cell Dev Biol. 2003; 19: 45-70.

17. Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. Nature. 2001 Nov; 414(6860): 225-9.

18. Pittman PR. Aluminum-containing vaccine associated adverse events: role of route of administration and gender. Vaccine. 2002 May; 20(Suppl 3): 48-50.

19. Kudva IT, Griffin RW, Garren JM, Calderwood SB, John M. Identification of a protein subset of the anthrax spore immunome in humans immunized with the anthrax vaccine adsorbed preparation. Infect Immun. 2005 Sep; 73(9): 5685-96.

20. Casadevall A, Pirofski LA. The potential of antibody-mediated immunity in the defence against biological weapons. Expert Opin Biol Ther. 2005 Oct; 5(10): 1359-72.

21. Welkos SL, Friedlander AM. Comparative safety and efficacy against Bacillus anthracis of protective antigen and live vaccines in mice. Microb Pathog. 1988 Aug; 5(2): 127-39.

22. Kawamura YI, Kawashima R, Shirai Y, Kato R, Hamabata T, Yamamoto M, et al. Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NF-kappaB translocation. Eur J Immunol. 2003 Nov; 33(11): 3205-12.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2013 June, July; 15(2): 61-69.

Original article

Cloning, fusion and expression of recombinant Bacillus anthracis protective antigen domain 4 with cholera toxin B-subunit in *E. coli*

Taghipour B (MSc), Honari H (PhD)*, Jahantigh D (MSc), Rezai M (MSc)
Biology Sciences Dept., Imam Hussein University, Tehran, I.R. Iran.
Received: 13/Nov/2011 Revised: 13/Apr/2012 Accepted: 2/July/2012

Background and aims: The combination or genetic connection of the antigens with cholera toxin B (ctB) subunit creates a strong mucosal antibody response. The aim of this study was to connect ctB to protein in domain 4 encoding gene of Protein arginine Domainases (PaD4) to express chimeric protein as a candidate vaccine against anthrax.
Methods: In this experimental study, polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for genes ctB and PaD4 was performed and amplified genes were cloned separately in PGEM-T easy vector. Then, PaD4 gene was connected to the 3' end of ctB by the enzymatic digestion method and then, ctB-PaD4 fusion genes were sub-cloned into the pET28a. The strain BL21 of E. coli bacteria was transformed by the recombinant vector. The expressed chimeric protein was induced by Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside and evaluated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot techniques.
Results: CtB-PaD_4 fusion gene was constructed, confirmed by PCR techniques, and sequencing. This gene was expressed in the *E. coli* bacteria of strain BL21 at optimum temperature of 37°C, and the chimeric protein was produced successfully. The bond in this protein was confirmed by Western blot technique and SDS.PAGE.
Conclusion: After immunogenicity assay, this recombinant protein can be used as a new and effective chimeric subunit vaccine against *Bacillus anthraces* for oral or nasal consumption in future studies.

***Keywords: Bacillus anthraces,* Cholera toxin B, Chimeric vaccine, Fusion, Protective antigen.**

Archive

Cite this article as: Taghipour B, Honari H, Jahantigh D, Rezai M. Cloning, fusion and expresion of recombinant bacillus anthracis protective antigen domain 4 with cholera toxin B-subunit in *E. coli.* J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 June, July; 15(2): 61-69.

*Corresponding author:
Biology Sciences Dept., Imam Hussein University, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00989138862174, E-mail: honari.hosein@gmail.com

www.SID.ir