Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۲۰، شماره ۴/ مهر و آبان ۱۳۹۷/ ۲۴-۱۲

مقاله پژوهشی

طراحی و بیان پروتئین نوترکیب از ژن *tcpA ویبریوکلرا* در وکتور pET32a(+)

میلاد عامریان [۱]، شهرام نظریان [۲*]، حسین هنری [۲]، محمد ابراهیم مینایی [۲]

[۱]دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۲۳

چکیده:

زمینه و هدف: *ویبریوکلرا* یک باکتری پاتوژن گرم منفی است که عامل بیماری اسهال است. یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی باکتری *ویبریوکلرا* است؛ پیلی هم تنظیم شونده با توکسین است که برای کلونیزاسیون باکتری در روده لازم است. هدف از این تحقیق بررسی بیوانفورماتیکی و بیان پروتئین نوترکیب TcpA بود.

روش بررسی: ژن *tcpA* به لحاظ وجود کدون های نادر بررسی و بهینه‌سازی ژن با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی انجام شد. طراحی پرایمر جهت تکثیر ژن سنتزی *tcpA* انجام گرفت. ژن سنتزی در وکتور pET32a(+) همسانه سازی شد. پلاسمید نوترکیب pET32a(+)-*tcpA* در باکتری *E.coli* سویه BL21(DE3) تراریخت شد. بیان ژن *tcpA* تحت القای IPTG ۱ میلی مولار انجام گردید. بیان پروتئین نوترکیب با روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ بررسی شد. جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA استفاده شد.

یافته‌ها: ژن طبیعی *tcpA* دارای شاخص انطباق‌پذیری ۰/۶ بود، در حالی که ژن بهینه‌سازی شده دارای شاخص انطباق‌پذیری ۰/۹ بود. با بهینه‌سازی ژنی درصد کدون های با ترجیح بالا به ۷۵٪ افزایش یافت. آنالیز آنزیمی همسانه سازی ژن *tcpA* کلون شده در وکتور pET32a(+) را تأیید کرد. پروتئینی با وزن مولکولی ۳۸/۶ کیلو دالتون در SDS-PAGE دیده‌شده و واکنش آن با آنتی‌بادی ضد هیستیدین در وسترن بلات تأیید گردید. میزان پروتئین خالص‌شده ۱۱/۵۳۳ میلی‌گرم در لیتر بود.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی ژنی منجر به بیان بالای پروتئین نوترکیب TcpA شد. با توجه به خاصیت آنتی ژنیسیته *tcpA*، این پروتئین می‌تواند کاندیدای مناسبی به‌منظور توسعه ایمنی علیه وبا باشد.

واژه‌های کلیدی: *ویبریوکلرا*، پیلی هم تنظیم شونده با توکسین، بهینه‌سازی کدونی، پروتئین نوترکیب.

مقدمه:

عفونت‌های اسهالی (Diarrheal infections) دومین علت اصلی مرگ‌ومیر در کودکان زیر ۵ سال سن بوده و سبب کشته شدن حدود ۷۶۰۰۰۰ کودک در سال می‌شود. کودکانی که دچار سوء تغذیه بوده و یا سیستم ایمنی ضعیفی دارند، بیشتر در معرض خطرات ناشی از اسهال می‌باشند. بسیاری از این گروه مبتلا در اثر از دست دادن شدید آب و الکترولیت‌ها می‌میرند. عفونت‌های اسهالی یکی از مهم‌ترین مسائل و معضلات بهداشتی درمانی جوامع بشری، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه را تشکیل می‌دهد (۲،۱).

اسهال معمولاً ناشی از عفونت در دستگاه گوارش می‌باشد که در آن انواع ارگانیسم‌ها، باکتری، ویروس و انگل نقش دارند. اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده، حمله به سلول‌های اپیتلیال و اپیتلیوم و تولید توکسین ها از سازوکارهای مهم در بروز بیماری‌های روده‌ای می‌باشد. یکی از این عوامل ایجادکننده عفونت‌های اسهالی باکتری *ویبریوکلرا* بوده که عامل بیماری وبا می‌باشد (۳). گونه‌های ویبریو جزء شایع‌ترین ارگانیسم‌های موجود در آب می‌باشند. در این میان، *ویبریوکلرا* عامل بیماری مهلک وبا است که اغلب

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه جامع امام حسین (ع)- مرکز تحقیقات زیست شناسی- تلفن: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۴، E-mail: nazarian56@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

کشورهای جهان سوم را درگیر می‌نماید و با مرگ‌ومیر بالایی نیز همراه است (۴).

مطالعات نشان می‌دهد که این بیماری به‌عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و ایجاد عوارض چشمگیر در بسیاری از کشورهای در حال توسعه نقش داشته است (۶،۵). این باکتری از طریق آب و غذای آلوده منتقل شده و به‌واسطه فلاژل قطبی قادر است خود را به دستگاه گوارش انسان رسانده و توسط عوامل چسبندگی خود در اپی تلیوم مخاط روده میزبان مستقر گردد (۷-۵). سپس این باکتری بر روی مخاط دستگاه گوارش انسان تأثیر گذاشته و دفع مایع و الکترولیت‌ها را از راه مدفوع افزایش می‌دهد.

مهم‌ترین نشانه این بیماری استفراغ و اسهال آبکی فراوان می‌باشد. از فاکتورهای بیماری‌زایی مهم این باکتری می‌توان به پیلی هم تنظیم شونده با توکسین *tcpA* (toxin-coregulated pili A) اشاره کرد (۸). بعد از خوردن غذا یا آب آلوده باکتری در داخل روده کوچک کلونیزه می‌شود که برای این کلونیزاسیون نیاز به پیلی نوع چهارم دارد. ساختار پیلی *ویبریوکلرا* به‌طور عمده از ژن *tcpA* بوده و دومین فاکتور ویرولانس در این باکتری می‌باشد. پیلی از نوع چهارم معمولاً ۴-۱ میکرومتر طول، قطر ۸۰-۵۰ درجه، رشته انعطاف‌پذیر است. این پیلی‌ها دارای حدود ۲۰۰-۱۴۰ اسیدهای آمینه در توالی پروتئین خود هستند (۱۱-۹). پیلی هم تنظیم شونده با توکسین *tcpA* به‌عنوان یک پروتئین پیشرو در قسمت سیتوپلاسمیک غشاء داخلی *ویبریوکلرا* به‌وسیله یک پروتئاز، مورد پردازش قرار گرفته و با توجه به محل قرارگیری *tcpA* در سطح باکتری این پروتئین به‌راحتی تحت تأثیر سیستم ایمنی می‌تواند قرار می‌گیرد (۱۲).

پروتئین *TcpA* (Toxin-coregulated pili A) دارای نقش مهمی در تشکیل گیرنده برای باکتریوفاژ می‌باشد و نحوه قرارگیری این پروتئین در معرض آنتی‌بادی‌ها باعث شده تا کاندیدای مناسبی به‌منظور توسعه ایمنی ضد کلونیزاسیون علیه بیماری وبا باشد. تولید پیلی و عامل ویرولانس ترشحی به نام *tcpF* تشکیل میکروکلونی را تسهیل و برای کلونیزاسیون سلول‌های اپتلیال روده‌ای مورد نیاز هستند (۸،۱۲). پروتئین TcP پلیمری از واحدهای تکراری است که در میان جزیره بیماری‌زای ویبریو VPI (*V.cholera* pathogenicity Island) یافت می‌شود (۱۳).

پروتئین TcpA با وزن حدود ۳۸/۶ کیلو دالتون یکی از اجزاء مهم *ویبریوکلرا* است. ژن کدکننده این پروتئین دارای ۵۴۳ جفت باز است (۱۴). در سال‌های اخیر، خواص ایمونولوژیکی *tcpA* بسیار مورد توجه بوده است و به همین جهت تولید پروتئین نوترکیب TcpA می‌تواند کاربردهای فراوانی در تهیه واکسن‌های خوراکی داشته باشد. روش‌های قدیمی تخلیص TcpA بر پایه کشت انبوه باکتری *ویبریوکلرا* و سپس جمع‌آوری محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته بود. در این روش علاوه بر اینکه امکان جداسازی TcpA به‌صورت خالص وجود نداشت، پروتئین به دست آمده حاوی مقادیری پروتئین‌های پیش‌بینی نشده بوده که موجب محدودیت استفاده از آن می‌شد.

در روش تولید پروتئین نوترکیب، علاوه بر کاهش خطرات ناشی از کار با عامل بیماری، پروتئین به‌دست‌آمده خالص و تولید آن مقرون‌به‌صرفه می‌باشد؛ به‌طوری‌که می‌توان در مدت زمان و با هزینه کمتر، میزان پروتئین خالص بیشتری تولید نمود. پروتئین TcpA دارای نقش مهمی در تشکیل گیرنده برای باکتریوفاژ می‌باشد و نحوه قرارگیری این پروتئین در معرض آنتی‌بادی‌ها باعث شده تا کاندیدای مناسبی به‌منظور توسعه ایمنی ضد کلونیزاسیون علیه بیماری وبا باشد. از این رو در این مطالعه، بررسی بیوانفورماتیکی و بهینه‌سازی کدونی ژن *tcpA* به‌منظور به حداقل رساندن کدون های نادر و درنتیجه بیان پروتئین نوترکیب TcpA در باکتری *E. coli* مدنظر قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی:

در این مطالعه از باکتری‌های *اشریشیاکلی* سویه DH5α (جهت تکثیر ژن مورد نظر) و سویه BL21 (DE3) تهیه شده از دانشگاه جامع امام حسین (ع) جهت بیان پروتئین استفاده شد. از محیط‌های کشت لوریا برتونی مایع (Luria-Bertani یا LB Broth) شرکت سیگما (کانادا) و آگار جهت رشد باکتری *E. coli* استفاده گردید. جهت انتخابی نمودن رشد باکتری از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین شرکت فرمنتاز (اوکراین) استفاده شد. به‌منظور تأیید همسانه سازی ژن در وکتور بیانی، از آنزیم‌های محدودالاثر *HindIII* و *XhoI* ساخت شرکت فرمنتاز استفاده گردید. آنتی‌بادی اختصاصی تهیه‌شده علیه دنباله هیستیدین (Anti-6XHis tag) از شرکت Abcam (آمریکا) تهیه شد. غشای نیترو سلولز از شرکت Roche (آلمان) و پلیت الایزا از شرکت Nunck (آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. کیت‌های تخلیص شامل: کیت های PCR Product Purification و Plasmid Extraction و PCR Clean-up Gel Extraction از شرکت Bioneer (کره جنوبی) تهیه شد. ستون Ni-NTA agarose resin جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از شرکت Qiagene (آمریکا) خریداری گردید. برای تخلیص پروتئین نوترکیب TcpA از ستون کروماتوگرافی جهت کلونینگ و تولید پروتئین TcpA از وکتور pET32a(+) استفاده شد.

بررسی بیوانفورماتیکی:

توالی کامل ژن *tcpA* باکتری *Vibrio cholerae* از پایگاه داده بیوانفورماتیکی (GeneBank با شماره Accession No: AB699248.1) استخراج گردید. به‌منظور بهینه‌سازی کدون های ژن *tcpA* طبیعی و تبدیل آن به کدون‌های رایج *E. coli* آنالیزهای بیوانفورماتیکی لازم با استفاده از نرم‌افزارهای تحت شبکه به‌منظور بررسی محتوای GC ژن *tcpA*، وجود کدون های نادر و همچنین بررسی شاخص سازگاری کدون CAI یا Codon Adaptation index انجام گرفت. با در نظر گرفتن جایگاه‌های برش آنزیمی *HindIII* و *XohI* در وکتور pET32a(+) و شباهت توالی مورد نظر با توالی آمینو اسیدی، توسط نرم‌افزار وب کاتر ویراست دوم مورد آنالیز قرار گرفت و از میان آنزیم‌هایی که فاقد جایگاه برش در توالی بهینه‌سازی شده بودند، دو آنزیم *HindIII* و *XohI* انتخاب و جهت سنتز به شرکت Biomatik کانادا سفارش داده شد. توالی ژن صناعی مورد نظر به‌منظور بهینه‌سازی، استفاده صحیح از کدون ها برای میزبان مورد نظر، تصحیح مقدار محتوای GC، ایجاد ساختمان ثانویه صحیح برای mRNA، تصحیح نواحی پیرایشی و تعدیل جایگاه های برش به‌منظور جلوگیری از تداخل در کلونینگ به سایت OPTIMIZER ارجاع داده شد (۱۵).

همسانه سازی و بیان پروتئین نوترکیب:

سازه ژنی دارای توالی *HindIII* در ابتدا و توالی *XohI* در انتها و به‌صورت لیوفیلیزشده از شرکت Biomatik (کانادا) دریافت شد. سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α بر اساس پروتکل استاندارد روش کلرید کلسیم تهیه شدند. پلاسمید سفارش داده شده با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد منتقل شد. سلول‌ها بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌صورت چمنی کشت داده شدند. تعدادی کلونی انتخاب و به‌طور جداگانه در محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین به مدت یک شبانه‌روز در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ rpm کشت داده شدند. پس از جمع‌آوری سلول‌ها، با روش لیز قلیایی پلاسمید استخراج گردید. با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر *HindIII* و *XohI* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده، هضم آنزیمی صورت گرفت و وجود ژن *tcpA* در کنار نشانگر مولکولی توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. در گام بعدی برای ژن *tcpA* طراحی پرایمر صورت گرفت و سپس

www.SID.ir

Archive of SID

جهت تکثیر ژن *tcpA* با استفاده از ترادف ژنی دارای پرایمرهای رفت (Forward) و برگشت (Reverse) PCR انجام شد:

Forward: 5'-AGTTAAGCTTGCATGACATTACTCGAAGT-3
Reverse: 5'-AATACTCGAGTTAGCTGTTACCAAATGC-3

برای انجام همسانه سازی ابتدا واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *XhoI* و *HindIII* بر روی محصول PCR ژن *tcpA* انجام و در مرحله بعد به‌منظور همسانه سازی، هضم آنزیمی بر روی وکتور pET32a(+) با همان آنزیم‌های محدود الاثر *XhoI* و *HindIII* انجام گرفت. پس از هضم آنزیمی قطعه ژنی *tcpA* و pET32a(+) برش خورده از روی ژل آگارز به‌وسیله کیت استخراج DNA تخلیص گردید. ژن *tcpA* که توسط آنزیم‌های با اثر محدود *HindIII* و *XhoI* برش خورده و به وکتور بیانی pET32a(+) که با همین آنزیم‌ها برش خورده و استخراج شده بود، الحاق گردید. عمل اتصال ژن *tcpA* در این پلاسمید با استفاده از آنزیم *T4DNAligase* در حرارت ۱۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز انجام گرفت. محصول الحاق، با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد (تهیه‌شده به روش شیمیایی) سویه *E. coli* DE3 BL21 نوترکیب گردید.

کلنی‌های نوترکیب با غربالگری آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین جدا شدند و حضور پلاسمید حاوی ژن *tcpA* با PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت. برای بیان ژن *tcpA* از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین تلقیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتور (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز واجد اوره ۸ میلی مولار مخلوط و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با نسبت ۱ (بافر نمونه) به ۵ (نمونه) با بافر نمونه دارای غلظت 5x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. درنهایت نمونه‌های تیمار شده توسط ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) ازلحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب بررسی شدند. برای تهیه محلول ژل SDS-PAGE از آکریل آمید و بیس آکریل آمید استفاده شد. با توجه به اینکه پروتئین بیان شده در حدود ۳۸/۶ کیلودالتون وزن داشت، لذا از ژل ۱۲٪ استفاده شد. نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG ۱ میلی مولار، همراه با مارکرپروتئینی تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند.

تخلیص پروتئین نوترکیب و تأیید آن به روش وسترن بلاتینگ

برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون نیکل- نیتریلو استیک اسید (Ni-NTA) استفاده و با توجه به اینکه پروتئین نوترکیب به‌دست‌آمده به‌صورت محلول بوده از بافرهای ایمیدازول فاقد اوره برای شستشوی ستون استفاده شد. پروتئین مورد نظر با انواع بافرهای واجد ایمیدازول ۲۰، ۴۰، ۱۰۰، ۱۷۰، ۲۵۰ میلی مولار در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تخلیص که پروتئین مدنظر ما در بافر واجد ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار از ستون تخلیص گردید. لازم به ذکر می‌باشد که سنجش غلظت پروتئین با روش برادفورد انجام و پپتید نوترکیب در حدود ۱۱/۵۳۳ میلی‌گرم در لیتر بیان شد. در گام بعدی جهت تأیید پروتئین نوترکیب TcpA، بیان ژن *tcpA* در باکتری *E. coli Bl21* با وسترن بلات بررسی شد. به این منظور از آنتی‌بادی اختصاصی ضد دنباله هیستیدین استفاده و بیان پروتئین نوترکیب با توجه به باندهای ظاهرشده تأیید گردید. رعایت اصول اخلاقی تحقیق با شماره تأیید ۴۷۲-۳۲-۱۸۰/ س از دانشگاه جامع امام حسین(ع) می‌باشد.

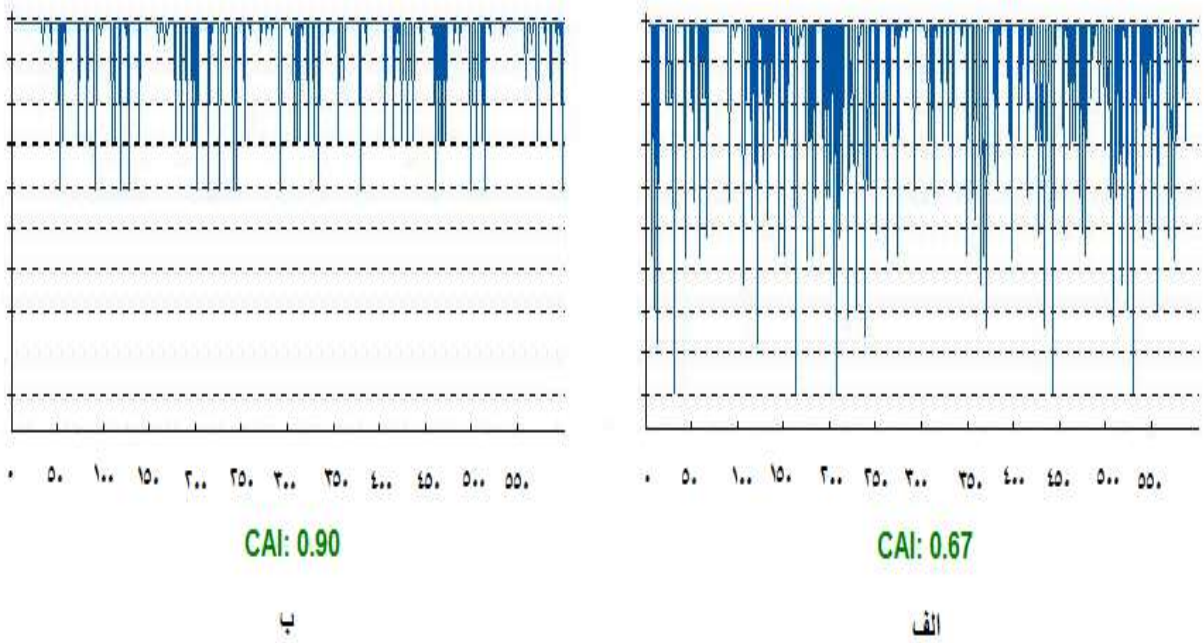
www.SID.ir

Archive of SID

یافته ها:

آماده‌سازی سازه ژنی بر پایه داده‌های بیوانفورماتیکی

بهینه‌سازی در ۴ بخش قابل بررسی بود که دربردارنده انعطاف‌پذیری ساختار پروتئین، تنظیم ترجیحی کدون ها، حلالیت و افزایش درصد فراوانی بازهای آلی نیتروژن دار سیتوزین وگوانین می‌شد. افزایش شاخص Codon Adaptation Index (CAI) (شاخص انطباق‌پذیری کدونی) به سمت ۱۰۰٪ نشان‌دهنده میزان انعطاف‌پذیری و افزایش کدون های مورد استفاده برای بیان ژن در باکتری *اشریشیاکلی* می‌باشد. مزیت نسبی در بهینه‌سازی سازه ژنی الگوی کدونی مناسب برای افزایش کارایی الگوی انتخابی در متابولیسم باکتری *اشریشیاکلی* می‌باشد. شاخص انطباق‌پذیری کدونی از ۰/۶۷ به ۰/۹ تغییر کرد (نمودار شماره ۱).



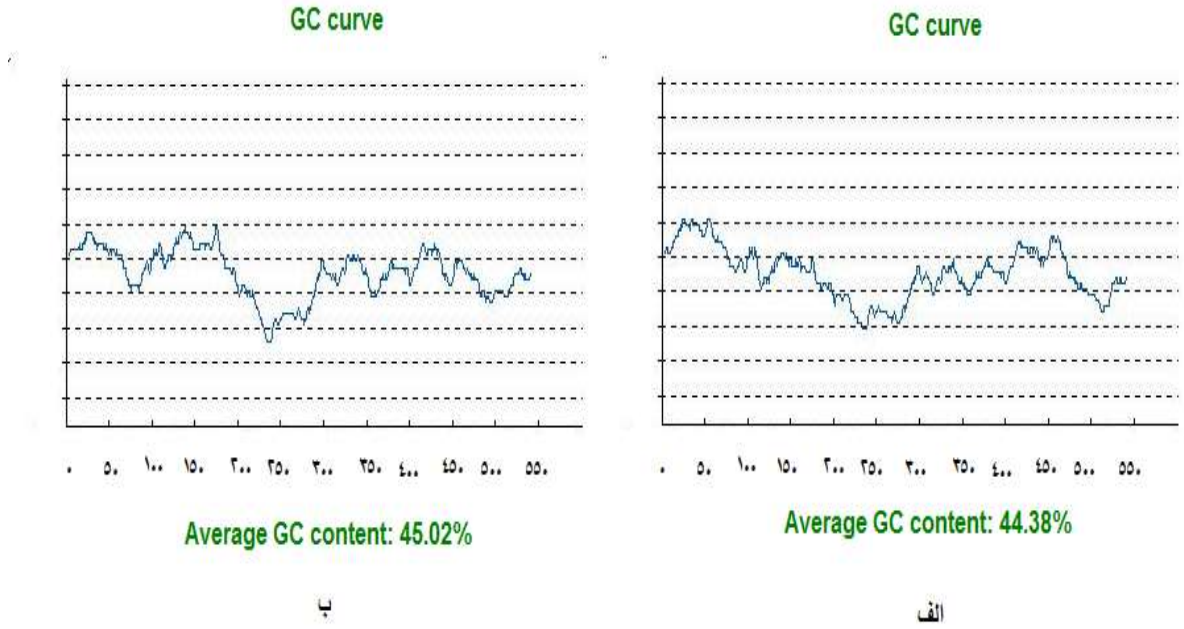
نمودار شماره ۱: شاخص سازگاری کدون (CAI) مربوط به ژن طبیعی ***tcpA*** (الف) و ژن بهینه‌سازی شده ***tcpA*** (ب)

به همراه بهینه‌سازی کدونی، شاخص سازگاری کدون نیز حدود ۲۳٪ ارتقاء یافت.

انتخاب و تغییر کدون مناسب به نحوی بود که محتوای سیتوزین و گوانین از ۴۴/۳۸٪ به ۴۵/۰۲٪ افزایش یافت (نمودار شماره ۲). تعداد کدون هایی که از کیفیت مناسبی برای افزایش بیان پروتئین برخوردار هستند از ۴۴٪ به ۷۵٪ تغییر پیدا کرد (نمودار شماره ۳). نتایج حاصل از آنالیز توالی کایمر با نرم‌افزار Blast-x تأیید نمود که اعمال تغییرات روی ژن و بهینه‌سازی توالی آن بدون هیچگونه تغییری بر روی ردیف اسیدهای آمینه در پروتئین هدف بوده است. پیش‌بینی ساختار RNA یکی از حوزه‌های مهم بیوانفورماتیک می‌باشد و روش‌های مختلفی برای آسان‌تر کردن تعیین ساختار RNA ارائه شده است.

www.SID.ir

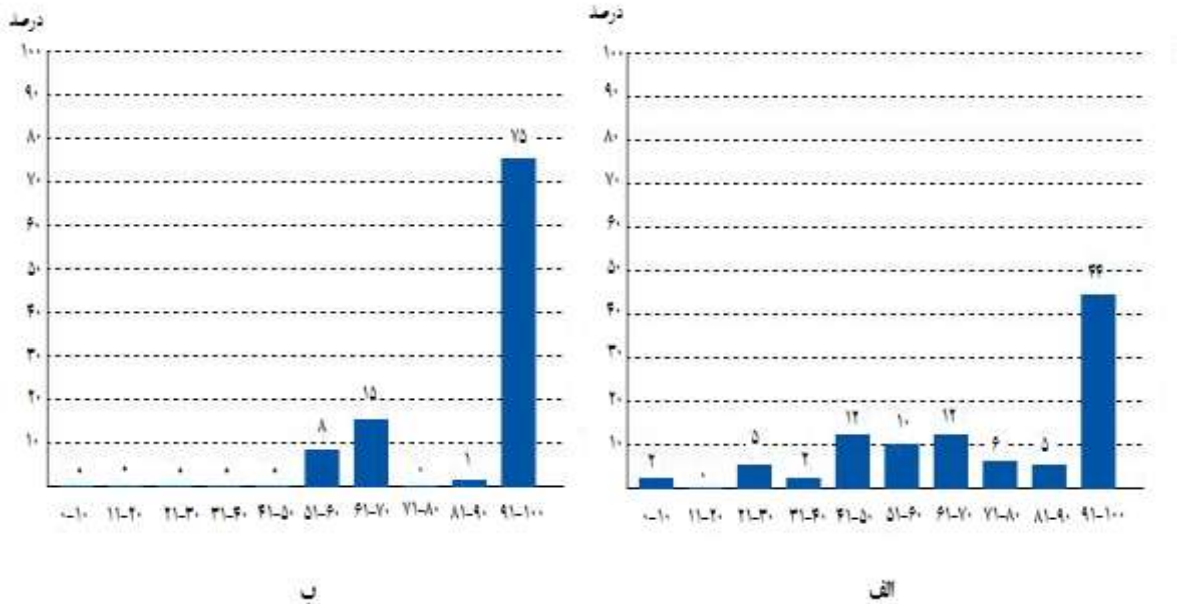
Archive of SID



ب الف

نمودار شماره ۲: متوسط درصد بازهای GC مربوط به ژن طبیعی ***tcpA*** (الف) و ژن بهینه‌سازی شده ***tcpA*** (ب)

تغییر کدونی منجر به افزایش میزان بازهای گوانین و سیتوزین گردید.



ب الف

نمودار شماره ۳: درصد توزیع کدون ها مربوط به ژن طبیعی ***tcpA*** (الف) و ژن بهینه‌سازی شده ***tcpA*** (ب)

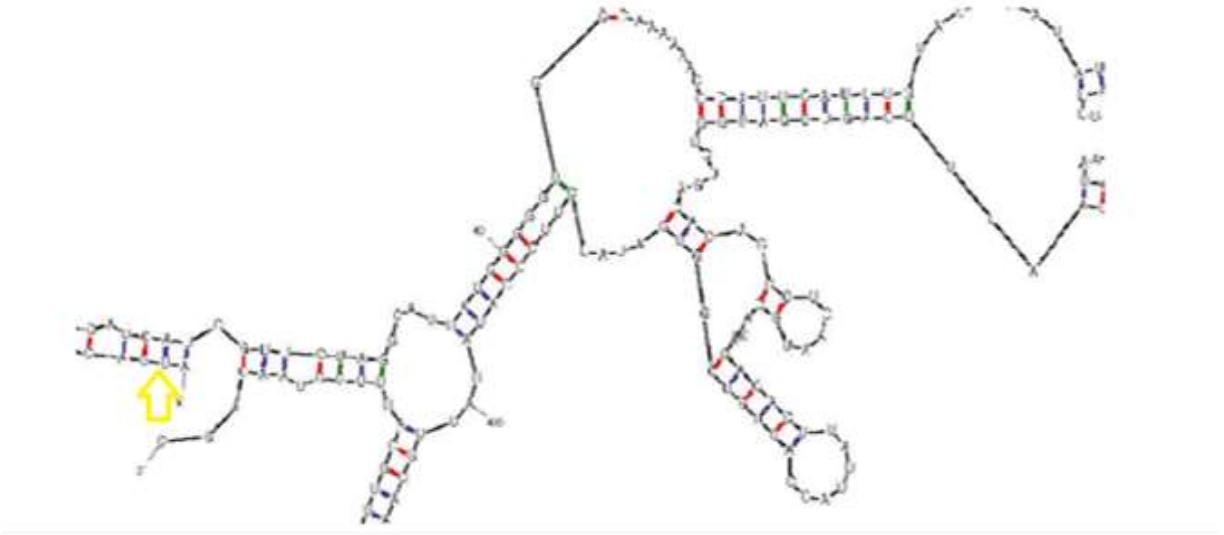
به کدون هایی که بالاترین فراوانی را دارند، ارزش ۱۰۰ داده شده است. پس از بهینه‌سازی درصد کدون های با شانس بیان بالا، افزایش یافت.

در این تحقیق با استفاده از برنامه Mfold ساختار ثانویه mRNA پس از بهینه‌سازی کدون ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶). ساختار پیش بینی شده ناحیه شروع mRNA ′۵ کدون های ژن *tcpA* قبل و بعد از

www.SID.ir

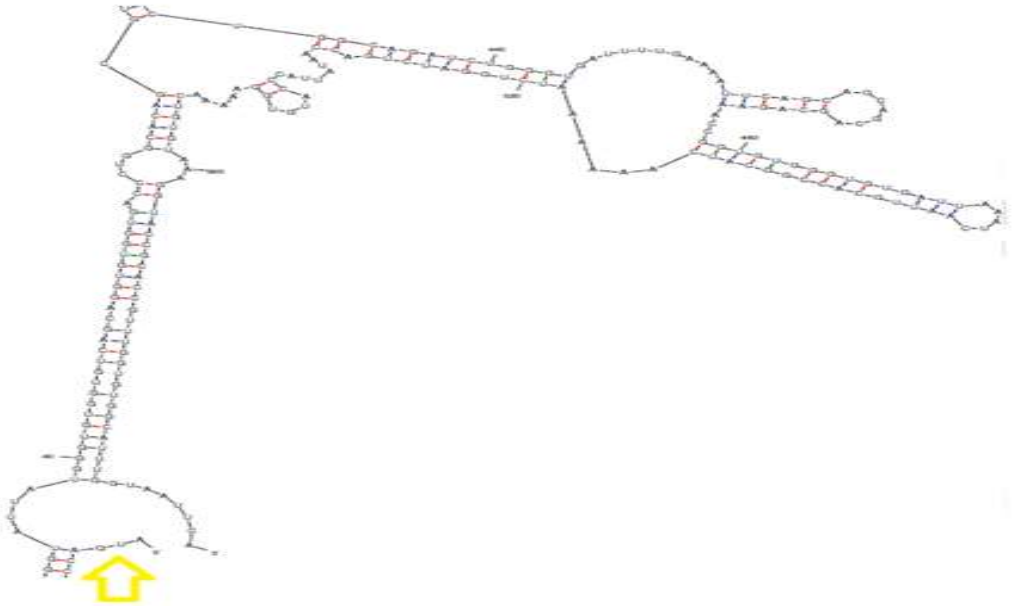
Archive of SID

بهینه‌سازی در تصویر شماره ۱- الف و ب مشاهده بوده و میزان حداقل انرژی برای ساختار قبل از بهینه‌سازی ۱۷۱/۷۰- کیلوکالری و بعد از بهینه‌سازی به ۱۹۷/۹۰- کالری رسید.



تصویر شماره ۱: الف) ساختار RNA قبل از بهینه‌سازی بیوانفورماتیکی

(حداقل انرژی آزاد ۱۷۱/۷۰-) فلش نواحی ابتدایی mRNA ́۵ می‌باشد.



تصویر شماره ۱: (ب) ساختار دوم RNA بعد از بهینه‌سازی بیوانفورماتیکی

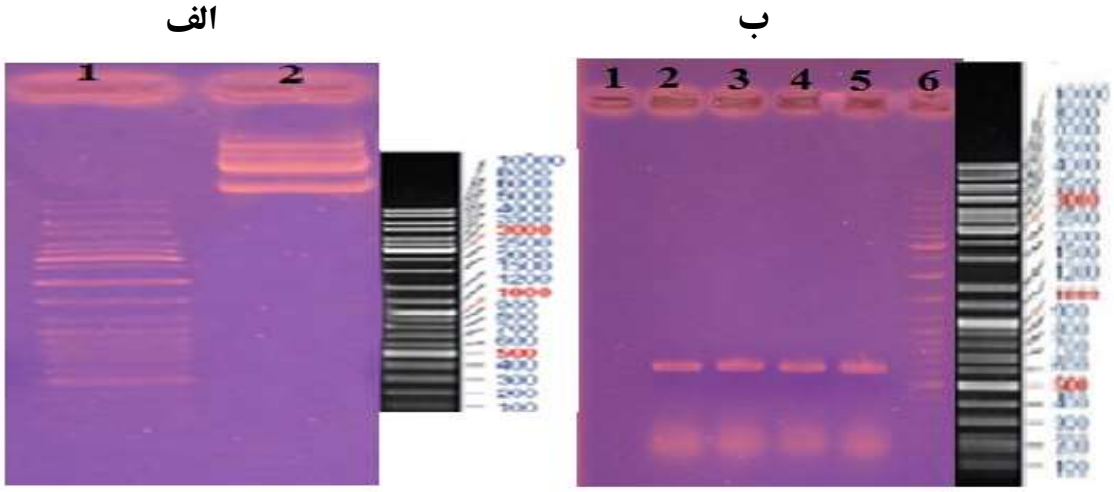
(حداقل انرژی آزاد ۱۹۷/۹۰-) ناحیه mRNA ́۵ فاقد لوپ یا گره‌های بلند می‌باشد.

همسانه سازی ژن *tcpA* در وکتور pET32a(+)

تخلیص پلاسمید pET32a(+) فاقد RNA و دارای ۳ باند حلقوی با اندازه تقریبی ۵۹۰۰ جفت بازی انجام پذیرفت (تصویر شماره ۲- الف). با انجام PCR قطعه ژنی *tcpA* با اندازه ۵۶۳ جفت بازی بدون ناخالصی و به‌صورت تک باند مشاهده شد (تصویر شماره ۲- ب).

www.SID.ir

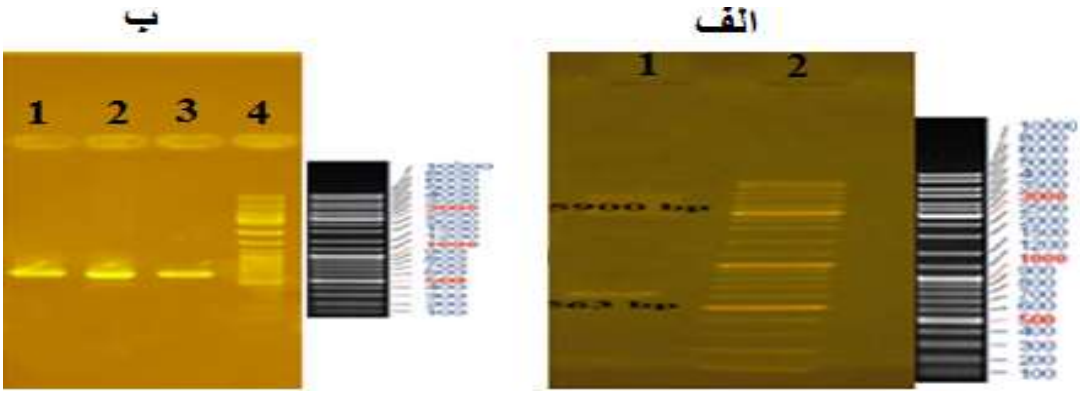
Archive of SID



تصویر شماره ۲: الگوی الکتروفورز تخلیص پلاسمید وکتور (+)pET32a و محصول PCR ژن *tcpA*
(ژل الکتروفورز ۱٪)

الف: تخلیص پلاسمید وکتور (+)pET32a، چاهک ۱) تخلیص پلاسمید (+)pET32a با اندازه تقریبی ۵۹۰۰ جفت بازی، چاهک ۲) نشانگر DNA ۱۰۰۰۰ جفت بازی؛ ب: الکتروفورز محصول PCR ژن tcpA با استفاده از سازه ژنی چاهک ۱،۲،۳،۴) باند ظاهرشده محصولات PCR ژن tcpA با اندازه تقریبی ۵۶۳ جفت بازی، چاهک ۵) نشانگر DNA ۱۰۰۰۰ جفت بازی.

بررسی صحت پلاسمید حاوی ژن *tcpA* با روش‌های هضم آنزیمی و PCR مستقیم انجام پذیرفت. در روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر *HindIII* و *XhoI* قطعه ۵۶۳ جفت بازی از بدنه وکتور جدا که حضور ژن *tcpA* در وکتور pET32a(+) را تأیید کرد (تصویر شماره ۳- الف). در روش PCR مستقیم از کلونی‌های حاصل از همسانه سازی ژن *tcpA* در وکتور pET32a(+) قطعه‌ای با اندازه ۵۶۳ جفت بازی تکثیر و صحت سازه ژنی تأیید شد (تصویر شماره ۳- ب).



تصویر شماره ۳: تأیید همسانه سازی وکتور نوترکیب *tcpA*-pET32a(+) (ژل آگارز ۱٪)

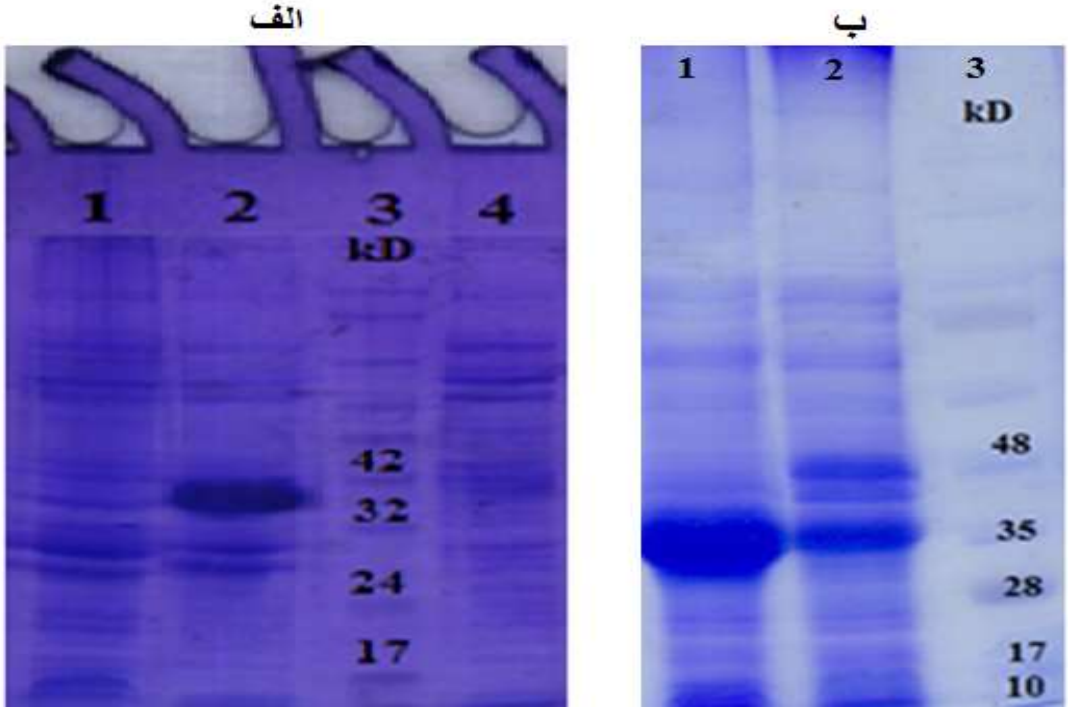
الف: واکنش هضم آنزیمی به‌منظور تأیید همسانه سازی ژن tcpA در وکتور (+)pET32a، چاهک ۱) باند ژن tcpA در راستای ۵۴۳ جفت بازی، وکتور (+)pET32a در راستای ۵۹۰۰ جفت بازی، چاهک ۲) نشانگر DNA ۱۰۰۰۰ جفت بازی؛ ب: محصول PCR مستقیم از روی کلون‌ها به‌منظور تأیید همسانه سازی در وکتور (+)pET32، چاهک ۱،۲،۳) کلونی‌های مثبت با اندازه تقریبی ۵۶۳ جفت باز، چاهک ۲) نشانگر DNA ۱۰۰۰۰ جفت بازی.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی بیان پروتئین کایمر نوترکیب

بررسی بیان ژن *tcpA* در وکتور pET32a(+) پس از کشت سلول‌ها و القاء با IPTG ۱ میلی مولار در بافرهای واجد PBS و بافر لیز واجد اوره ۸ میلی مولار انجام و با توجه به نتایج آزمایش مشخص شد که پروتئین TcpA به‌صورت محلول و با اندازه ۳۸/۶ کیلو دالتون در بافر PBS فاقد اوره بیان شد (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۴: الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ با رنگ آمیزی کوماسی بلو حاصل از بیان پروتئین نوترکیب TcpA

الف: مقایسه بیان پروتئین نوترکیب TcpA در وکتور pET32a(+) در بافرهای واجد PBS و بافر لیز واجد اوره ۸ مولار، ستون ۱: نمونه پروتئین TcpA با القای IPTG ۱ میلی مولار در بافر محلول لیز واجد اوره ۸ مولار، ستون ۲: نمونه پروتئین TcpA با القای IPTG ۱ میلی مولار در بافر واجد PBS (پروتئین ۳۸/۶ کیلودالتون)، ستون ۳: نشانگر پروتئینی، ستون ۴: نمونه پروتئین TcpA با القای IPTG ۱ میلی مولار در رسوب بافر لیز واجد اوره ۸ مولار، ستون ۵: نمونه پروتئین TcpA بدون القای IPTG ۱ میلی مولار در بافر لیز واجد اوره ۸ مولار؛ ب: بیان پروتئین نوترکیب TcpA در وکتور pET32a(+) به‌صورت محلول، ستون ۱: نمونه پروتئین TcpA با القای IPTG ۱ میلی مولار در بافر واجد PBS (پروتئین ۳۸/۶ کیلودالتون)، ستون ۲: نمونه پروتئین TcpA بدون القای IPTG ۱ میلی مولار، ستون ۳: نشانگر پروتئینی.

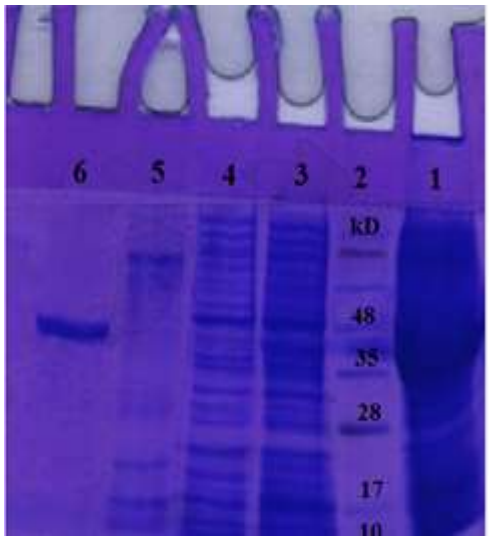
بررسی خلوص پروتئین نوترکیب TcpA در وکتور pET32a(+) و آنالیز وسترن بلاتینگ

تخلیص پروتئین TcpA با بافر واجد ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار بدون اوره انجام پذیرفت (تصویر شماره ۵). میزان پروتئین تخلیص شده ۱۱/۵۳۳ میلی‌گرم در لیتر بود. پروتئین TcpA حاوی یک دنباله هیستیدینی در انتهای آمین بود، لذا برای انجام فرایند لکه‌گذاری وسترن از آنتی‌بادی ضد دنباله هیستیدین برای تأیید آن استفاده شد. پس از انجام این آزمون، رنگ‌پذیری کاغذ نیترو سلولز در

www.SID.ir

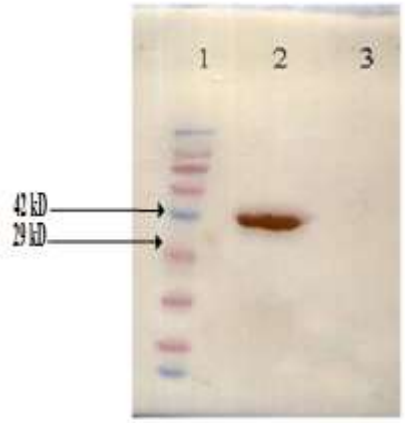
Archive of SID

مقابل باند ۳۸/۶ کیلو دالتونی نشانگر مولکولی پروتئین را نشان داد (تصویر شماره ۶).



تصویر شماره ۵: الکتروفورز روی ژل SDS PAGE ۱۲٪ با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو جهت بررسی خلوص پروتئین نوترکیب TcpA در وکتور pET32a(+)

آماده‌سازی پروتئین نوترکیب TcpA برای عبور از ستون کروماتوگرافی Ni.NTA، ستون ۱: محلول پروتئینی قبل از ستون، ستون ۲: مارکر پروتئینی، ستون ۳: محلول پروتئینی خارج شده از ستون، ستون ۴: بافر ایمیدازول ۴۰ میلی مولار، ستون ۵: بافر ایمیدازول ۱۷۰ میلی مولار، ستون ۶: بافر ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار.



تصویر شماره ۶: تأیید پروتئین نوترکیب بیان شده با استفاده از روش وسترن بلات با استفاده از anti His-Taq

ستون ۱: مارکر پروتئینی ۳۱۰۰۰۳، ستون ۲: نمونه پروتئین TCPA القاء شده با IPTG، ستون ۳: BSA.

بحث:

باکتری‌های پاتوژن روده‌ای عوامل خطرناکی هستند و چنانچه تمهیداتی مناسب برای مقابله با آن‌ها در نظر گرفته نشود، می‌توانند عواقب جدی و جبران‌ناپذیری را در فرد آلوده ایجاد کنند (۱۸،۱۷). نتایج بیوانفورماتیکی با توجه به اهداف تحقیق ما که طراحی و بیان پروتئین نوترکیب TcpA از باکتری *ویبریوکلرا* به‌عنوان کاندیدای واکسن بود، مطلوب بود. ازآنجاکه توالی ژن *tcpA* دارای کدون نادر هست، تمامی توالی‌های نوکلئوتیدی تولیدکننده پروتئین مذکور با نرم‌افزار آنلاین جهت بیان بالا در میزبان *E. coli* بهینه‌سازی گردید.

CAI ژن *tcpA* قبل از بهینه‌سازی ۰/۶۷ و بعد از بهینه‌سازی به ۰/۹ افزایش یافت که این نشانگر انتخاب کدون هایی هست که tRNA بیشتری برای آن وجود داشته که باعث افزایش بیان در میزبان *E. coli* می‌شود. همچنین به‌منظور بررسی پایداری ساختار RNA میزان ΔG، وجود ساختارهایی از قبیل لوپ های کاذب ارزیابی شد. حداقل انرژی آزاد (ΔG) که نشان‌دهنده‌ی پیشرفت خود به خودی واکنش بوده که قبل از بهینه‌سازی ۱۷۱/۷۰– کیلوکالری و بعد از بهینه‌سازی به ۱۹۷/۹۰– کیلوکالری بود. این تغییر نشان می‌دهد ساختار ژن انتخاب‌شده ما پایدار بوده است. در این تحقیق از سیستم بیان پروتئین در *E. coli* استفاده شد. مهم‌ترین ویژگی بیان پروتئین در *E. coli* میزان بالای تولید پروتئین، بی‌خطر بودن و مقرون‌به‌صرفه بودن آن می‌باشد.

اثبات بیماری‌زایی پروتئین TcP طی مطالعه ای توسط Herrington و همکاران انجام شد. آن‌ها ثابت کردند در سویه‌های *ویبریو کلرایی* که ژن پیلی هم تنظیم شونده با توکسین آن‌ها دچار موتاسیون شده باشد این باکتری‌ها قادر به ایجاد کلونیزاسیون در روده کوچک انسان و موش نمی‌باشند (۱۹). Kundu و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران همسانه سازی ژن *tcpA* را در وکتور pTZ57R/T با بررسی آنالیزهای ژنتیکی توسط نرم‌افزار ABI PRISM 310 Genetic و با توجه به جایگاه آنزیمی BamHI در وکتور pET-14b بررسی کردند. آن‌ها با قرار دادن موتیفی از آمینواسیدها، His tag (۶ آمینواسید هیستیدین) در پایین‌دست توالی وکتور طراحی‌شده، ژن *tcpA* را کلون و سپس بیان پروتئین TcpA در شرایط القایی IPTG ۱ میلی مولار در میزبان *E. coli* را بررسی کردند (۲۰).

نتایج پژوهش کیایی و همکاران با عنوان بررسی پروتئین نوترکیب زیر واحد A پیلی *ویبریوکلرا* در *اشریشیاکلی* نشان داد، با توجه به تشابه آنتی ژنیک بین فرم طبیعی و نوترکیب تولیدشده می‌توان از پروتئین‌های نوترکیب برای بررسی روند عفونت‌های ناشی از *ویبریوکلرا* استفاده نمود و با بررسی کردن خاصیت ایمونوژنیسیته گامی موثر در جهت معرفی پروتئین TcpA به‌عنوان کاندید واکسن علیه باکتری *ویبریوکلرا* اقدام نمود که در راستای اهداف پژوهش ما نیز بود (۲۱).

در این مطالعه سعی بر این شد تا با تولید این پروتئین به‌صورت نوترکیب زمینه‌ای را در جهت بیان موثر این پروتئین، با صرف هزینه‌های کمتر فراهم کنیم. در مطالعه حاضر، پروتئین TcpA در باکتری *اشریشیاکلی* سویه BL21 بیان شد. با توجه به اهمیت و ضرورت عملکرد *tcpA* در بیماری‌زایی *ویبریوکلرا* بر آن شدیم که بتوانیم با تولید این پروتئین گامی موثر درزمینه ایمونوژنیسیته و طراحی واکسن نوترکیب در مطالعات بعدی برداریم.

نتیجه‌گیری:

پروتئین TcpA به‌عنوان زیر واحد بزرگ پیلی با توجه به محل قرارگیری *tcpA* در سطح باکتری دارای نقش مهمی در کلونیزاسیون باکتری *ویبریوکلرا* دارد. بهینه‌سازی ژنی منجر به بیان بالای پروتئین نوترکیب TcpA شد. با توجه به خاصیت آنتی ژنیسیته و محل قرارگیری *tcpA* در سطح باکتری، این پروتئین کاندیدای مناسبی به‌منظور توسعه ایمنی علیه بیماری وبا باشد.

تشکر و قدردانی:

طرح دانشجویی با کد ۱۱۶۸ با نام طراحی و بیان پروتئین نوترکیب از ژن *tcpA* *ویبریوکلرا* در وکتور(+)pET32a از دانشگاه جامع امام حسین (ع) می‌باشد. بدین‌وسیله از مدیریت محترم مرکز علم و فناوری زیستی دانشگاه جامع امام حسین (ع) جهت همکاری در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع:

1. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. The Lancet. 2012; 379(9832): 2151-61.

2. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE, et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: A systematic review. PloS one. 2013; 8(9): e72788.

3. Nazarian S, Amani J. Pathogenesis and vaccines against enterotoxigenic Escherichia Coli. J Babol Univ Med Sci, 2017. 19(6): 13-21.

4. Charles RC, Ryan ET. Cholera in the 21st century. Curr Opin Infect Dis. 2011; 24(5): 472-7.

5. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (The Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. Lancet. 2013; 382(9888): 209-22.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Moisi M, Jenul C, Butler SM, New A, Tutz S, Reidl J, et al. A novel regulatory protein involved in motility of *Vibrio cholerae*. J Bacteriol. 2009; 191(22): 7027-38.
7. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(2): e0004330.
8. Almagro-Moreno S, Pruss K, Taylor RK. Intestinal colonization dynamics of *Vibrio cholerae*. PLoS Pathog. 2015; 11(5): e1004787.
9. Krebs SJ, Taylor RK. Protection and attachment of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model. J Bacteriol. 2011; 193(19): 5260-70.
10. Maier B, Wong GCL. How bacteria use type IV pili machinery on surfaces. Trends Microbiol. 2015; 23(12): 775-88.
11. Boyd EF, Waldor MK. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 serogroup isolates. Microbiology. 2002; 148(Pt 6): 1655-66.
12. LaPointe CF, Taylor RK. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. J Biol Chem. 2000; 275(2): 1502-10.
13. Chaparro AP, Ali SK, Klose KE. The ToxT-dependent methyl-accepting chemoreceptors AcfB and TcpI contribute to *Vibrio cholerae* intestinal colonization. FEMS Microbiol Lett. 2010; 302(2): 99-105.
14. Rhine JA, Taylor RK. TcpA pilin sequences and colonization requirements for O1 and O139 *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol. 1994; 13(6): 1013-20.
15. Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. Nucleic Acids Res. 2007; 35(3): W126-31.
16. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res. 2003; 31(13): 3406-15.
17. Reis RS, Horn F. Enteropathogenic Escherichia coli, Samonella, Shigella and Yersinia: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. Gut Pathog. 2010; 2(1): 8.
18. Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. J Microbiol Methods. 2012; 90(1): 36-45.
19. Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor RK, Levine MM. Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. J Exp Med. 1988; 168(4): 1487-92.
20. Kundu J, Mazumder R, Srivastava R, Srivastava BS. Intranasal immunization with recombinant toxin-coregulated pilus and cholera toxin B subunit protects rabbits against *Vibrio cholerae* O1 challenge. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 56(2): 179-84.
21. Kiaie S, Abtahi H, Mosayebi G, Alikhani M, Pakzad I. Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. Iran J Microbiol. 2014; 6(2): 68-73.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2018; 20(4): 12-24.

Original article

Design and expression recombinant protein of *tcpA* gene *vibrio cholera* in pET32a(+) vector

Amerian M[1], Nazarian S[2*], Honari H[2], Minaie ME[2]
[1]Student, Biology Dept., Imam Hossain University, Tehran, I.R. Iran; [2]Biology Research Center, Imam Hossain University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 11/July/2017 Accepted: 15/Oct/2017

Background and aims: *Vibrio cholerae* is a gram-negative bacterial pathogen that causes diarrheal disease. One of the most important factors in the pathogenesis is *Vibrio cholera*. Pili also is co-regulated with toxin, which is necessary for bacterial colonization in intestine. The aim of this study was to examine recombinant protein expression and TcpA bioinformatics.
Methods: *TcpA* gene was studied for rare Codons existence and gene optimization conducted using bioinformatics software. Primers designed for amplification of synthetic *tcpA* gene. Synthetic gene was cloned in vector pET32a (+). The recombinant plasmid pET32a (+)-*tcpA* was transformed to *E.coli* strain BL21 (DE3). *TcpA* gene expression was induced by IPTG 1mM. Recombinant protein expression was evaluated using SDS PAGE and Western blotting. Ni-NTA affinity chromatography was used for purification of recombinant protein.
Results: Codon adaptability index of naive *tcpA* gene was 0.6, while optimized gene had Codon adaptability index of 0.9. The prevalence ratio Codons increased to 75 percent through Codon optimization. Enzyme analysis approved *tcpA* gene cloning in pET32a (+) expression vector. A protein with a molecular weight of 38.6 kD was seen on SDS-PAGE and its reaction with the antihistidine antibodies was confirmed by Western blot. The purified protein amount was 11.533milligram per liter.
Conclusion: Optimization led to the expression of recombinant tcpA. Regarding *tcpA* antigenicity, this protein is a good candidate to develop immunity against cholera gene.

***Keywords: Vibrio cholerae, tcpA*, Codon optimization, Recombinant protein.**

Cite this article as: Amerian M, Nazarian S, Honari H, Minaie ME. Design and expression recombinant protein of *tcpA* gene *Vibrio cholera* in pET32a(+) vector. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 20(4): 12-24.

[*]**Corresponding author:**
Biology Research Center, Imam Hossain University, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00982177104934, E-mail: nazarian56@gmail.com

www.SID.ir