مجلـــه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۰، شماره‌ی ۸۰ مرداد و شهریور ۱۳۹۱، صفحات ۱ تا ۱۱

کلونینگ و بیان دومین انتهای آمینی فلاژلین پسودوموناس آئروژینوزا و ارزیابی آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه آن در مهار حرکت پسودوموناس آئروژینوزا

فریده دکترزاده[۱]، دکتر اشرف محبتی مبارز[۱]، دکتر مهریار حبیبی رودکنار[۲]، دکتر مهدی فروزنده مقدم[۳]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی پزشکی، گروه باکتری شناسی mmmobarez@modares.ac.ir

دریافت: ۹۰/۱۰/۲۵ پذیرش: ۹۱/۱/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: *پسودوموناس آئروژینوزا یک باکتری بیماری‌زای فرصت طلب است. این باکتری عفونت‌های شدید و کشنده در افرادی که ایمنی سرکوب شده دارند، ایجاد می‌کند. باکتری دارای یک فلاژل قطبی است. فلاژل و فلاژلین، زیر واحد ساختاری فلاژل، نقش مهمی در بیماری‌زایی پسودوموناس آئروژینوزا بازی می‌کند. فلاژلین از راه میانکنش دومین‌های انتهای آمینی خود با TLR-5، پاسخ‌های ایمنی را بر می‌انگیزد. هدف ما در این مطالعه کلونینگ و بیان انتهای آمینی فلاژلین پسودوموناس آئروژینوزا و ارزیابی آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه آن در مهار حرکت پسودوموناس آئروژینوزا بود.*

روش بررسی: *ناحیه‌ی کد کننده‌ی اسید آمینه‌های ۱-۱۶۱ فلاژلین با PCR تکثیر و در وکتور pET28a کلون شد. پروتئین نوترکیب در میزبان بیانی BL21(DE3) بیان و با استفاده از ستون Ni^{2+}-NTA خالص گردید. واکنش ایمنی پروتئین نوترکیب با آزمون وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین انتهای آمینی فلاژلین به خرگوش تزریق و از آنتی سرم تولید شده در بدن خرگوش برای مهار حرکت پسودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M استفاده شد.*

یافته‌ها: *انتهای آمینی فلاژلین به خوبی در میزبان بیانی اشریشیاکلی BL21(DE3) بیان شد. آنتی‌بادی‌های ضد فلاژلین و انتهای آمینی فلاژلین با پروتئین نوترکیب واکنش نشان دادند. آزمون مهار حرکت باکتری ثابت کرد که آنتی بادی‌های پلی کلونال برعلیه انتهای آمینی فلاژلین قادرند حرکت پسودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M را مهار کنند.*

نتیجه‌گیری: *دومین‌های انتهای آمینی فلاژلین ممکن است در طراحی واکسن‌های نوترکیب بر علیه عفونت‌های پسودوموناس آئروژینوزا مورد استفاده قرار گیرند.*

واژگان کلیدی: انتهای آمینی فلاژلین، پسودوموناس آئروژینوزا، کلونینگ، مهار حرکت.

۱- دانشجوی دکترای باکتری شناسی، گروه باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۳- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس، تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

پسودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی محیطی است که باعث عفونت‌های متنوع خصوصاً در بیماران سیستیک فیبروزیس، قربانیان سوختگی و افرادی می‌شود که سیستم ایمنی سرکوب شده دارند (۱). *پسودوموناس آئروژینوزا* عامل مهمی در عفونت‌های بیمارستانی و مسؤول ۱۰ درصد کل عفونت‌های کسب شده از بیمارستان می‌باشد. حساسیت کاهش یافته به عوامل ضد میکروبی و میزان بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در طول درمان، عفونت‌های پسودوموناس آئروژینوزا را تبدیل به عفونت‌های شدید و تهدید کننده‌ی زندگی می‌کنند (۳و۲). مشکل مقاومت آنتی‌بیوتیکی پسودوموناس آئروژینوزا در حال افزایش است. افزایش مقاومت بعد از مواجه با آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت متقاطع بین عوامل ممکن است باعث بروز سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای با مقاومت چندگانه (MDR) شود (۳). ظهور این سویه‌های با مقاومت چندگانه، دلیلی بر اهمیت روش‌های جایگزین درمان آنتی‌بیوتیکی همانند واکسن‌های نوترکیب است. امروزه تکنولوژی واکسن‌های نوترکیب در حال پیشرفت و تکامل است زیرا با این روش مقادیر زیادی از آنتی ژن به صورت ارزان می‌تواند تولید شود و دستکاری ژنتیکی آنتی‌ژن امکان‌پذیر است. برای مثال، بخش‌های ایمونولوژیک آنتی‌ژن‌ها می‌توانند انتخاب و به عنوان آنتی‌ژن‌های کوتاه شده برای تحریک سیستم ایمنی استفاده شوند و یا می‌توانند به صورت کونژوگه با دیگر آنتی‌ژن‌ها در ساختار فیوژن پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۵و٤).

فلاژل *پسودوموناس آئروژینوزا* در کلونیزاسیون و تهاجم در طول فاز ابتدایی عفونت نقش دارد و بنابراین به‌عنوان فاکتور ویرولانس مهمی در عفونت پسودوموناس آئروژینوزا شناخته شده است (۶). فلاژل از زیر واحدهای فلاژلین ساخته شده است. فلاژلین به‌عنوان کاندید واکسن شناخته شده است (۹-۷). فلاژلین با اتصال به TLR-5 آن را فعال کرده و در نتیجه باعث افزایش نسخه برداری از ژن‌های پاسخ ایمنی می‌شود (۱۱و۱۰). مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که ناحیه‌ای کوتاه به طول ۱۰ اسید آمینه (اسید آمینه‌های ۸۸-۹۷؛ LQRIRDLALQ) در انتهای آمینی فلاژلین ممکن است دومین اتصال یابنده مهم به TLR-5 باشد (۱۲). بنابراین، به نظر می‌رسد که دومین‌های انتهای آمینی فلاژلین برخی از خصوصیات کل پروتئین را در خود داشته باشند. برای اثبات این نظر، کلونینگ و بیان دومین‌های انتهای آمینی فلاژلین تایپ b *پسودوموناس آئروژینوزا* توسط Neville و همکاران گزارش شده است. این محققین گزارش کرده‌اند که آنتی‌بادی‌های تولید شده برعلیه دومین‌های انتهای آمینی (اسید آمینه‌های ۱-۱۵۶) فلاژلین تیپ b به میزان زیادی باعث زنده ماندن حیوانات در دو مدل موش سوخته شده است (۴). با این وجود، گزارشی از کلونینگ و بیان دومین‌های انتهای آمینی فلاژلین تیپ a *پسودوموناس آئروژینوزا* وجود ندارد. بنابراین هدف از این پژوهش تولید پروتئین نوترکیب انتهای آمینی فلاژلین تیپ a (اسیدهای آمینه ۱-۱۶۱) (فلاژلین (۱-۱۶۱)) و ارزیابی فعالیت بیولوژیک این پروتئین با بررسی اثر آنتی‌بادی‌های تولید شده برعلیه آن در مهار حرکت *پسودوموناس آئروژینوزا* بود.

روش بررسی

سویه‌های باکتریایی، وکتور و محیط کشت: *پسودوموناس آئروژینوزا* M ۸۸۲۱ از بانک میکروبی دانشگاه تربیت مدرس فراهم شد. *اشریشیاکلی* سویه‌های DH5α و L-21 (DE3) از شرکت اینویتروژن (Carlsbad, USA) و نووازن (Madison, USA) خریداری گردید. وکتور بیانی pET28a از شرکت نووازن تهیه شد. آنتی‌بادی برعلیه فلاژلین طبیعی توسط مرحوم دکتر مرتضی ستاری (دانشگاه تربیت مدرس) در اختیار ما قرار گرفت. باکتری‌ها روی محیط لوریا برتانی آگار (LB) و براث (Merck, Germany) حاوی

Archive of SID

www.SID.ir

۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین (Sigma, USA) کشت داده شدند.

جداسازی ژن *فلاژلین (۱-۱۶۱)* **و تولید پلاسمید *فلاژلین (۱-۱۶۱)-pET28a*:** ناحیه‌ی کد کننده‌ی اسید آمینه‌های ۱-۱۶۱ فلاژلین تایپ a *پسودوموناس آئروژینوزا*، با PCR از DNA ژنومیک سویه M ۸۸۲۱ با استفاده از پرایمر بالادست 5'AATCCATGGCCTTGACCGTCAACACC3' و پرایمر پایین دست 5'ATAAAGCTTGATGCCGACGCTGATG3' که به‌ترتیب حاوی جایگاه‌های برش آنزیمی *NcoI* و *HindIII* می‌باشند، تکثیر شد. شرایط واکنش از این قرار بود: تقلیب اولیه در ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل از تقلیب در ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و طویل سازی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، در نهایت طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه محصول PCR با الکتروفورز بررسی شد و قطعه‌ی ژنی با استفاده از کیت خالص سازی با خلوص بالا (Roche, Germany) خالص سازی شد. محصول خالص شده و وکتور pET28a با استفاده از آنزیم‌های *NcoI* و *HindIII* برش داده شدند و با استفاده از آنزیم لیگاز دو قطعه به هم اتصال یافتند. سلول‌های مستعد *اشریشیاکلی* DH5α با محصول اتصال یافته ترانسفرم و باکتری‌های ترانسفرم شده بر روی پلیت‌های LB آگار حاوی کانامایسین (۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) انتخاب شدند. کلون‌های نوترکیب با روش‌های کلونی PCR و هضم دو آنزیمی مورد تأیید قرار گرفتند (۱۳). کلون‌های مثبت برای تأیید بیشتر تعیین توالی شدند (Miaagene, France).

بیان در اشریشیاکلی: اشریشیاکلی BL-21(DE3) با وکتور نوترکیب فلاژلین (۱-۱۶۱)-pET28a ترانسفرم شد. برای بهینه کردن بیان، میزان بیان پروتئین نوترکیب در شرایط مختلف شامل زمان (۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت)، محیط کشت (LB و 2XYT)، و غلظت IPTG (۰/۲، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۱/۳، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار) مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال تعیین شرایط بهینه، یک کلنی تک به صورت شبانه در محیط 2XYT کشت و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. روز بعد، محیط حاوی باکتری‌های رشد یافته به نسبت ۱ به ۱۰۰ با محیط 2XYT رقیق شد و انکوباسیون تا رسیدن جذب نوری سوسپانسیون باکتری به ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر ادامه پیدا کرد. سپس محلول IPTG با غلظت نهایی ۰/۴ میلی‌مولار به محیط اضافه و انکوباسیون برای ۱ ساعت بیشتر ادامه پیدا کرد. در پایان، سلول‌ها با سانتریفوژ جمع‌آوری و بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از آزمون SDS-PAGE ارزیابی شد (۱۳).

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب: خالص سازی با روش هایبرید اینویتروژن (طبق دستور العمل شرکت) با کمی تغییرات انجام شد. به طور خلاصه سلول‌ها در بافر لیز/اتصال (اوره ۸ مولار، فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی‌مولار، pH ۷/۸) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق لیز شدند. سوسپانسیون حاصل سانتریفوژ و سوپرناتانت به ستون حاوی رزین انتقال داده شد. پس از ۱ ساعت مخلوط شدن سوپرناتانت با رزین، رزین دو بار با بافر شستشوی دناتوره کننده (اوره ۸ مولار، فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی‌مولار، pH ۶) و سپس دو بار با بافر شستشو طبیعی (فسفات سدیم ۲۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۲۰ میلی مولار، pH ۸) شستشو داده شد. در نهایت، پروتئین نوترکیب با بافر Native Elution (فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار، pH ۸) از ستون خارج و برای حذف ایمیدازول، در برابر بافر فسفات نمکی (PBS) ۷/۴ pH دیالیز شد. پروتئین نوترکیب با SDS-PAGE ۱۵ درصد بررسی و غلظت آن با روش بردفورد در

Archive of SID

www.SID.ir

کنار استاندارد آلبومین (Bio-Rad, USA) تعیین گردید.
آزمون وسترن بلات: پروتئین‌های جدا شده با SDS-PAGE ۱۵ درصد با استفاده از دستگاه بلات کننده‌ی نیمه خشک (Peqlab, Germany) به کاغذ پلی وینیلیدین دیفلوراید (Roche, Germany) (PVDF) منتقل شدند. غشا با شیر خشک ۳ درصد در بافر PBS بلوکه و سپس ۳ بار و به مدت ۳۰ دقیقه با محلول PBST (توئین ۰/۱ درصد) شستشو داده شد. غشا با رقت ۱ به ۱۰۰۰ از آنتی‌بادی‌های پلی کلونال خرگوشی ضد فلاژلین طبیعی و آنتی‌بادی‌های پلی کلونال ضد فلاژلین (۱-۱۶۱) رقیق شده در PBST به مدت ۱/۵ انکوبه گردید. غشا سه بار برای ۳۰ دقیقه با PBST شستشو داده شد. سپس به مدت ۱ ساعت با رقت ۱ به ۵۰۰۰ از آنتی‌بادی IgG ضد خرگوشی کونژوگه با آنزیم HRP (Abcam, UK) در PBST انکوبه گردید. شستشو همانند بالا انجام شد و آنگاه از معرف دی آمینوبنزیدین (Roche, Germany) (DAB) برای ظهور باندهای پروتئینی استفاده گردید.
تولید آنتی‌بادی: خرگوش‌های سفید نیوزیلندی عاری از عوامل بیماری‌زا با سن ۲تا۳ ماه و وزن ۱/۸تا۲ کیلوگرم (انستیتو پاستور ایران) به صورت زیر جلدی با حجم نهایی ۱ میلی لیتر؛ حاوی ۱۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب فلاژلین (۱-۱۶۱) و حجم برابر از ادجوانت کامل فروند (Sigma, USA) ایمونیزه شدند. تزریق های یادآور دو بار با همان مقدار از آنتی ژن و با حجم برابر از ادجوانت ناقص فروند در هفته‌های سوم و ششم انجام شد. بعد از دو هفته از آخرین تزریق، از خرگوش‌ها، تحت بیهوشی، خونگیری از قلب به عمل آمد و سرم‌ها جمع آوری و در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.
آزمون مهار حرکت: به منظور بررسی فعالیت بیولوژیک آنتی‌بادی پلی کلونال نوترکیب، دو پتری دیش (با قطر ۱۰ سانتی‌متر) با محیط LB حاوی ۰/۳ درصد آگار که از قبل با آنتی بادی پلی کلونال نوترکیب و سرم خرگوش غیر ایمن به صورت جداگانه به نسبت ۱ به ۲۰ مخلوط شده بودند، پر شدند. سوسپانسیون سلولی *پسودوموناس آئروژینوزا* ۸۸۲۱M (جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر = ۰/۲) در PBS تهیه و ۲۰ میکرولیتر از آن به مرکز هر پلیت اضافه شد. پلیت‌ها به‌مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از طی این زمان از نظر قطر هاله رشد با یگدیگر مقایسه شدند. برای هر نمونه سرمی از سه پلیت استفاده شد (۱۴و ۹).

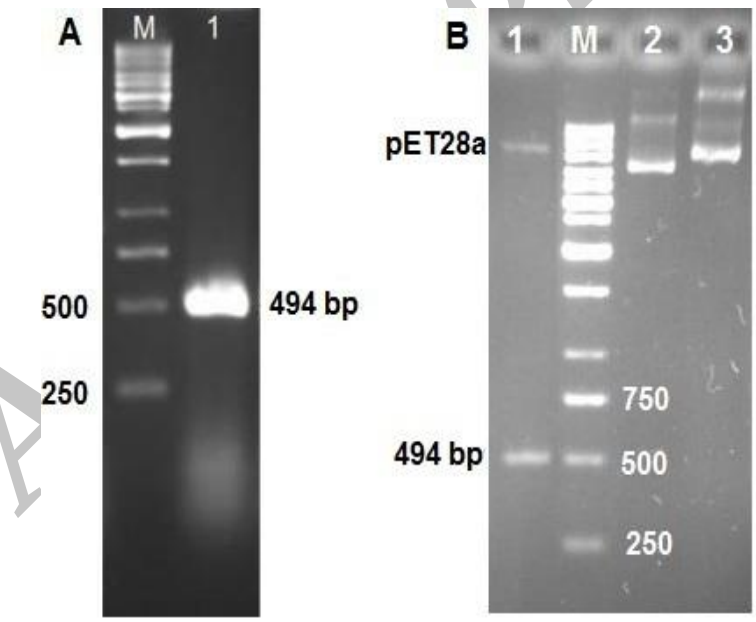
یافته‌ها

جداسازی و کلونینگ فلاژلین (۱-۱۶۱): بر اساس ژنوم *پسودوموناس آئروژینوزا* ۸۸۲۱M (GenBank Accession No: GU060499)، پرایمرهای اختصاصی طراحی و قطعه ژنی کد کننده‌ی فلاژلین (۱-۱۶۱) (GenBank Accession No: JF523355) تکثیر شد. اندازه‌ی مورد انتظار محصول PCR، تقریباً ۴۹۴ bp، با آزمون PCR به‌دست آمد (شکل A ۱). سپس، ترانسفرم پلاسمید نوترکیب فلاژلین (۱-۱۶۱)-pET28a در میزبان کلونینگ DH5α انجام شد و به منظور تأیید کلون‌های مثبت، از هضم دو آنزیمی با آنزیم‌های *NcoI* و *HindIII* استفاده شد (شکل B ۱). در نهایت، ماهیت درست فلاژلین (۱-۱۶۱) با تعیین توالی DNA به‌دست آمد (اطلاعات نشان داده نشده است).
بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب: فلاژلین (۱-۱۶۱) نوترکیب در سوش بیانی BL-21(DE3) بیان شد. بیان پروتئین در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت. LB و 2XYT به عنوان محیط کشت برای رشد میزبان بیانی نوترکیب مورد استفاده قرار گرفتند. میزان بیان پروتئین در محیط 2XYT تقریباً ۲ برابر محیط LB بود (اطلاعات نشان داده نشده است). نمونه‌ها ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از القای جمع‌آوری شدند، اما تفاوتی در سطح بیان در این ساعت‌ها دیده نشد (شکل ۲). اثر غلظت‌های مختلف IPTG نیز با

www.SID.ir
Archive of SID

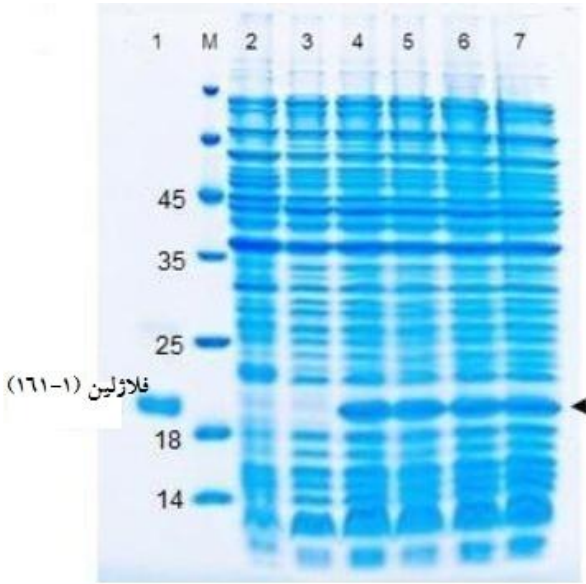
استفاده از غلظت‌های ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۱/۳، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که تفاوتی در میزان بیان پروتئین بین غلظت‌های مختلف IPTG دیده نمی‌شود. بنابراین بیان پروتئین نوترکیب در شرایط کشت باکتری‌های نوترکیب بیانی در محیط 2XYT حاوی کانامایسین، IPTG با غلظت نهایی ۰/۴ میلی‌مولار و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ادامه پیدا کرد. پروتئین نوترکیب تولید شده در باکتری با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی روی ستون Ni^{2+}-NTA بدون هیچ‌گونه رسوب پروتئینی تخلیص و ریفولد شد (شکل ۲). مقدار پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از روش بردفورد ۱۲ میلی‌گرم به ازای هر لیتر کشت تخمین زده شد. در نهایت، در آزمون وسترن بلاتینگ، فلاژلین (۱-۱۶۱) نوترکیب به طور قوی و اختصاصی با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد فلاژلین طبیعی و فلاژلین (۱-۱۶۱) خرگوشی واکنش نشان داد که این خود نشان دهنده‌ی حفظ ایمنی‌زایی در پروتئین نوترکیب است (شکل ۳).

مهار حرکت: برای شناسایی فعالیت عملکردی آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه فلاژلین (۱-۱۶۱) نوترکیب، از آزمون مهار حرکت استفاده شد. سرم خرگوشی پلی کلونال ضد پروتئین نوترکیب توانست حرکت *پسودوموناس آئروژینوزا* M ۸۸۲۱ را، در مقایسه با سرم خرگوش غیر ایمن به عنوان کنترل منفی، در آگار مهار کند (شکل ۴). مهار حرکت و انتشار باکتری نشان می‌دهد که آنتی‌بادی‌های ضد فلاژلین (۱-۱۶۱) از نظر بیولوژیک فعال می‌باشند.

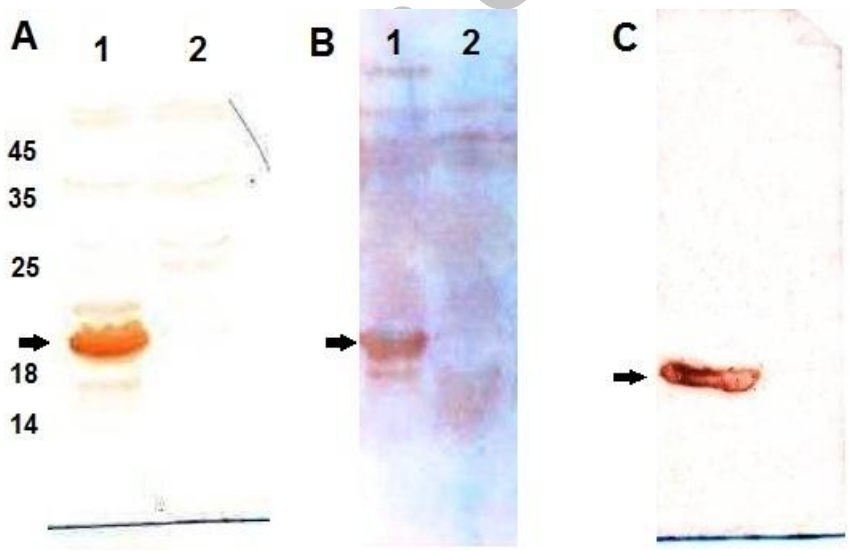


شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز. A: جداسازی توالی کد کننده‌ی فلاژلین (۱-۱۶۱) با PCR. ردیف ۱: باند ژن فلاژلین (۱-۱۶۱)؛ ردیف M: مارکر وزن مولکولی kb DNA ۱. B: هضم آنزیمی وکتور نوترکیب. ردیف ۱: وکتور نوترکیب، فلاژلین (۱-۱۶۱)-pET28a هضم شده با آنزیم های NcoI و HindIII. ردیف M: مارکر وزن مولکولی kb DNA ۱. ردیف ۲: وکتور pET28a ردیف ۳: وکتور نوترکیب هضم نشده.

Archive of SID
www.SID.ir



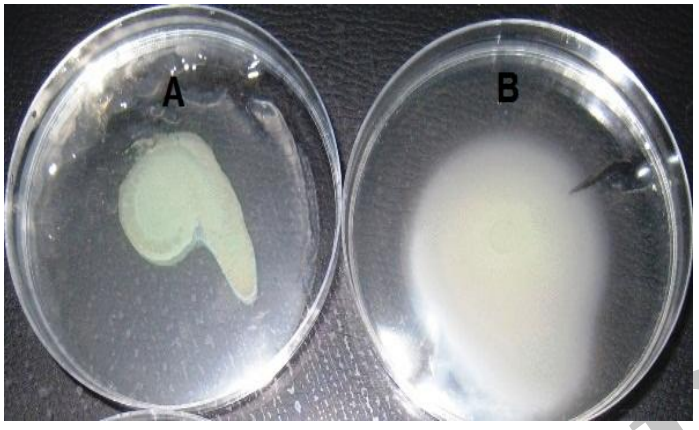
شکل ۲: شناسایی فلاژلین (۱-۱۶۱) بیانی و خالص شده با SDS-PAGE ۱۵ درصد ردیف ۱: فلاژلین (۱-۱۶۱) خالص شده؛ ردیف M: استاندارد وزن مولکولی پروتئین (کیلو دالتون)؛ ردیف ۲: باکتری ترانسفرم شده با pET28a؛ ردیف ۳: باکتری القا نشده؛ ردیف ۴ تا ۷: باکتری‌ها بعد از ۱، ۲، ۳و ۴ ساعت القا با IPTG.



شکل ۳: A: وسترن بلاتینگ فلاژلین (۱-۱۶۱) و ایمونوژنیسیتی آن بعد از واکنش با آنتی‌بادی‌های پلی کلونال طبیعی. ردیف ۱: باکتری‌های القا شده با IPTG، ردیف ۲: باکتری‌های القا نشده. B: وسترن بلاتینگ فلاژلین (۱-۱۶۱) و ایمونوژنیسیتی آن بعد از واکنش با آنتی‌بادی‌های پلی کلونال بر علیه فلاژلین (۱-۱۶۱). ردیف ۱: باکتری‌های القا شده با IPTG، ردیف ۲: باکتری‌های القا نشده. C: وسترن بلاتینگ فلاژلین (۱-۱۶۱) خالص شده و ایمونوژنیسیتی آن بعد از واکنش با آنتی‌بادی‌های پلی کلونال طبیعی.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴: آزمون مهار حرکت مهار حرکت پسودوموناس آئروژینوزای M ۸۸۲۱ با سرم پلی کلونال خرگوشی بر علیه فلاژلین (A) در مقایسه با سرم خرگوش غیر ایمن (B) در LB حاوی ۰/۳ درصد آگار (۱-۱۶۱)

بحث

در این مطالعه، ما کلونینگ و بیان ژن فلاژلین (۱-۱۶۱) را گزارش کردیم. همچنین ثابت کردیم که آنتی‌بادی‌های تولید شده برعلیه این پروتئین نوترکیب از نظر بیولوژیک فعالند و می‌توانند حرکت *پسودوموناس آئروژینوزا* را مهار نمایند. فلاژلین *پسودوموناس آئروژینوزا* برای عفونت‌هایی که توسط این باکتری ایجاد می‌شوند، کاندید واکسن است (۷-۹). در مطالعات مختلف تلاش شده است تا فلاژلین از باکتری خالص شود، با این وجود، خالص سازی پروتئین طبیعی از باکتری بسیار وقت‌گیر، پر زحمت و مشکل است و نیاز به حجم زیادی از باکتری دارد و در نهایت میزان پروتئینی که به این روش به دست می‌آید ناچیز است (۱۵). تکنولوژی DNA نوترکیب براین مشکلات فایق آمده است و با آن می‌توان پروتئین‌ها را به‌صورت خالص، به‌میزان زیاد و به‌صورت ارزان تولید کرد. از طرف دیگر، اخیرا تولید پروتئین‌های نوترکیب کوتاه شده در حال افزایش است. این موضوع ریشه در آن دارد که می‌توان دومین‌های بیشتر حفاظت شده، دومین‌های ایمونولوژیک پروتئین و یا دومین‌هایی با عملکرد خاص را انتخاب کرد (۱۶ و ۵). مطالعه بر روی توالی اسید آمینه‌ای فلاژلین باکتری‌های گرم منفی ثابت کرده است که دومین‌های انتهای آمینی (اسید آمینه‌های ۱-۱۷۰) و کربوکسی (اسید آمینه‌های ۴۴۰-۵۱۰) بسیار حفاظت شده هستند و این خود نشان دهنده‌ی نقش مهم آن‌ها در فعالیت بیولوژیک این پروتئین است (۱۷). جاکچیری و همکاران پیشنهاد کردند که جایگاه اتصال به TLR-5 در ناحیه‌ی آمینی فلاژلین در ریشه‌های ۸۸-۹۷ قرار گرفته است (۱۸). بر اساس این یافته‌ها، Lee و همکاران فلاژلین کوتاه شده‌ی *کمپیلوباکتر ژژونی* را تولید کردند. این محققین، پروتئین اتصال یابنده به مالتوز *اشریشیاکلی* را به اسید آمینه‌های ۵ تا ۳۳۷ فلاژلین *کمپیلوباکتر ژژونی* فیوز کردند و فعالیت ایمونولوژیک و محافظتی آن را در مدل حیوانی به اثبات رساندند (۵). در مطالعه‌ی دیگری نویل و همکاران، توالی کد کننده‌ی اسید آمینه‌های ۱-۱۵۶ فلاژلین تیپ b *پسودوموناس آئروژینوزا* سویه PaO1 را در وکتور بیانی pET30a کلون و دومین انتهای آمینی فلاژلین تیپ b را در باکتری *اشریشیاکلی* BL-21(DE3) بیان کردند. این محققیق ثابت کردند که آنتی‌بادی‌های تولید شده برعلیه فلاژلین (۱-۱۵۶) می‌تواند محافظت خوبی را در مدل‌های کشنده عفونت

Archive of SID

www.SID.ir

پسودوموناس آئروژینوزا نشان دهد (۴). در مطالعه‌ی حاضر، ما برای اولین بار بیان بالایی (۱۲ میلی‌گرم به ازای هر لیتر کشت القا شده) از دومین‌های انتهای آمینی فلاژلین تیپ a *پسودوموناس آئروژینوزا* را در اشریشیاکلی گزارش کردیم. به منظور حفظ فعالیت پروتئین بعد از خالص سازی، ما از روش هیبرید با کمی تغییرات استفاده کردیم. یونیدز و همکاران از روش هیبرید برای خالص سازی کلاژناز *استرپتوکوک موتانس* استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند که خالص سازی کلاژناز در این شرایط فعالیت آنزیم را حفظ می‌کند و آنزیم تولیدی می‌تواند کلاژن و ژلاتین را هضم کند (۱۹). در این روش خالص سازی، ما در بافر لیز کننده از اوره ۸ مولار به جای گوانیدیوم هیدروکلراید استفاده کردیم. کیفیت لیز با اوره همانند گوانیدیوم هیدروکلراید بود و از آن جا که در این حالت بافر لیز کننده و اتصال دهنده یکسان می‌شوند یک مرحله از فرایند خالص‌سازی کم می‌شود. علاوه براین، اوره ۸ مولار دیواره باکتری و انکلوزیون بادی‌ها هر دو را حل می‌کند. بنابراین ما در روش خود، انکوزیون بادی‌ها را جدا سازی نکردیم که خود فرایندی وقت‌گیر و پرزحمت است (۲۰). ما باکتری را بعد از لیز با اوره سونیکه نکردیم زیرا میزان پروتئین نوترکیب تولید شده با و بدون سونیکاسیون تفاوتی نداشت. به طور کلی، ما در اینجا روشی ساده، سریع و ارزان برای خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب ارایه کنیم که ممکن است فعالیت بیولوژیک آن‌ها را حفظ کند. در نهایت ما ثابت کردیم که آنتی‌بادی‌های تولید شده برعلیه فلاژلین (۱-۱۶۱) می‌توانند حرکت *پسودوموناس آئروژینوزا* M۸۸۲۱ را در invitro مهار کند. مکانیسم مهار حرکت باکتری به خوبی شناخته شده نیست. با این وجود، مطالعات گذشته پیشنهاد می‌کنند که اتصال ایمونوگلوبولین به فیلامنت فلاژل باعث اختلال در حرکت دایره‌ای آن و آگلوتینه شدن باکتری می‌شوند و در نهایت انتشار کلونی در پلیت مهار می‌شود (۱۴). از آنجا که حرکت فاکتور بیماری‌زایی مهمی است (۹و۶)، اختلال در این عملکرد با آنتی‌بادی‌های مهار کننده‌ی حرکت در Invivo ممکن است معیار مناسبی از اثر پیش‌گیرندگی در برابر باکتری باشد. در آزمون وسترن بلاتینگ، واکنش سرم خرگوشی ضد فلاژلین طبیعی و فلاژلین (۱-۱۶۱) با فلاژلین (۱-۱۶۱) نوترکیب وجود اپی‌توپ‌های مشترک بین پروتئین‌های طبیعی و نوترکیب را به اثبات می‌رساند. امروزه استفاده از پروتئین‌های فیوژن ژنتیکی برای تحریک پاسخ‌های ایمنی روش موثری برای مبارزه با بیماری‌های عفونی است (۲۱و۵). همان‌گونه که قبلاً گفته شد، به‌خوبی ثابت شده است که فلاژلین تحریک کننده‌ی موثر پاسخ‌های ایمنی است. از آنجا که بیان پروتئین‌های بزرگ مشکل است، ما استفاده از فلاژلین (۱-۱۶۱)، تقریباً ۲۰ کیلودالتون، را به جای فلاژلین، تقریباً ۶۰ کیلودالتون، پیشنهاد می‌کنیم که مولکولی کوچکتر است و حاوی اپی‌توپ‌های حفاظت شده و حیاتی فلاژلین در تحریک ایمنی می‌باشد و با این خصوصیت می‌تواند در ساختار فیوژن پروتئین‌ها به‌کار رود.

نتیجه‌گیری

به طورکلی، یافته‌های ما نشان می‌دهند که فلاژلین (۱-۱۶۱) حاوی اپی‌توپ‌های حفاظت شده و حیاتی برای فعالیت بیولوژیک این پروتئین می‌باشد. بنابراین استفاده از این پروتئین نوترکیب برای تحریک پاسخ‌های ایمنی بر علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* خصوصاً به صورت فیوژن پروتئین با دیگر پروتئین‌های مهم در بیماری‌زایی این باکتری ممکن است راه امید بخشی برای مبارزه با عفونت‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است. ایده‌ی ابتدایی این پژوهش از شادروان دکتر مرتضی ستاری بوده است

Archive of SID

www.SID.ir

که در مراحل ابتدایی پژوهش به دیدار حق شتافت.

برای روحشان شادی آرزو داریم.

References

1- Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet.* 2003; 361: 2068-77.

2- Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 1379-82.

3- Fridkin SK. Increasing prevalence of antimicrobial resistance in intensive care units. *Crit Care Med.* 2001; 29: N64-68.

4- Neville LF, Barnea Y, Hammer-Munz O, et al. Antibodies raised against N'-terminal *Pseudomonas aeruginosa* flagellin prevent mortality in lethal murine models of infection. *Int J Mol Med*. 2005; 16: 165-71.

5- Lee LH, Burg E, Baqar S, et al. Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 1999; 67: 5799-805.

6- Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* 2004; 12: 509-17.

7- Faezi S, Sattari M, Mahdavi M, Roudkenar MH. Passive immunisation against *Pseudomonas aeruginosa* recombinant flagellin in an experimental model of burn wound sepsis. *Burns.* 2011; 37: 865-72.

8- Barnea Y, Carmeli Y, Neville LF, et al. Therapy with anti-flagellin A monoclonal antibody limits *Pseudomonas aeruginosa* invasiveness in a mouse burn wound sepsis model. *Burns.* 2009; 35: 390-6.

9- Campodónico VL, Llosa NJ, Grout M, Döring G, Maira-Litrán T, Pier GB. Evaluation of Flagella and Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as Vaccines. *Infect Immun.* 2010; 78: 746-55.

10- Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol.* 2003; 4: 1247-53.

11- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001; 410: 1099-103.

12- Verma A, Arora SK, Kuravi SK, Ramphal R. Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infect Immun.* 2005; 73: 8237-46.

13- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

14- Brett PJ, Mah DCW, Woods DE. Isolation and characterization of *Pseudomonas*

Archive of SID

www.SID.ir

pseudomallei flagellin proteins. *Infect Immun.* 1994; 62: 1914-9.

15- Montie TC, Craven RC, Holder IA. Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: isolation and characterization. *Infect Immun.* 1982; 35: 281-8.

16- Poggio TV, La Torre JL, Scodeller EA. Intranasal immunization with a recombinant truncated FimH adhesin adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides protects mice against uropathogenic *Escherichia coli* challenge. *Can J Microbiol.* 2006; 52: 1093-02.

17- Wilson DR, Beveridge TJ. Bacterial flagellar filaments and their component flagellins. *Can J Microbiol.* 1993; 39: 451-72.

18- Jacchieri SG, Torquato R, Brentani RR. Structural study of binding of flagellin by Toll-like receptor 5. *J Bacteriol.* 2003; 185: 4243-7.

19- Ioannides M. Detection, cloning, and analysis of a u32 collagenase in *Streptococcus mutans* gs-5. [Dissertation]. Florida: University of South Florida; 2004.

20- Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng.* 2005; 99: 303-10.

21- Weimer ET, Lu H, Kock ND, Wozniak DJ, Mizel SB. A fusion protein vaccine containing OprF epitope 8, OprI, and type A and B flagellins promotes enhanced clearance of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 2009; 77: 2356-66.

Archive of SID

www.SID.ir

Cloning and Expression of N-teminal Domain of Pseudomonas aeruginosa Flagellin and Evaluation of Antibodies Raised against it on Motility Inhibition of Pseudomonas aeruginosa

Dakterzada F[1], Mohabati Mobarez A[1], Habibi Roudkenar M[2], Forouzandeh M[3]

[1]Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Research Center, Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran

[3]Dept. of Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Mohabati Mobarez A, Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

E_mail: mmmobarez@modares.ac.ir.

Received: 15 Jan 2012 **Accepted:** 7 Apr 2012

Background and Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes severe and lethal infections in immunocompromised individuals. This bacterium possesses a single polar flagellum. Flagellum and its subunit Flagellin play important roles in the pathogenesis of *P. aeruginosa*. Flagellin induces immune responses by interaction of its N-terminal domain with TLR-5. Our main aims of this study were cloning and expression of N-terminal domains of flagellin and evaluation of antibodies raised against it on motility inhibition of *P. aeruginosa*.

Material and Methods: The DNA sequence coding for the first 161 amino acids of flagellin was PCR amplified and cloned into a pET-28a expression vector. Recombinant protein was over expressed in BL-21(DE3), and purified by Ni-NTA resin. The immune reactivity of recombinant truncated flagellin was evaluated by Western blotting. The recombinant protein was injected into a rabbit and antibodies raised against it were evaluated for the cell motility inhibition of *P. aeruginosa* 8821M.

Results: The N-terminal domain of Flagellin was successfully overexpressed in *Escherichia coli* BL-21(DE3) host strain. Anti-native and anti-N-terminal flagellin antibodies reacted with the recombinant protein. Motility inhibition assay demonstrated that polyclonal antiserum against N-teminal flagellin is able to inhibit the motility of *P. aeruginosa* 8821M.

Conclusion: The N-terminal domain of flagellin may be used for development of a new recombinant vaccine against *P. aeruginosa* infections.

Keywords: Cloning, Motility inhibition, N-terminal domains of flagellin, Pseudomonas aeruginosa

Archive of SID

www.SID.ir