Archive of SID

بیان پروتئین نو ترکیب P39 بروسلا آبورتوس در باکتری اشریشیا کلی

دکترحمید ابطحی[1] ، دکتر علی هاتف سلمانیان[2] ، دکتر سیما رافتی[3] ، دکتر قربان بهزادیان نژاد[4]

چکیده

مقدمه: بروسلوز از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوتیک است که باعث سقط جنین و نازائی در دام‌ها و بروز تب مواج در انسان می‌گردد. استفاده از واکسن رایج یعنی سویه S19 بروسلا آبورتوس عوارض متعددی برای دام‌ها دارد. پروتئین P39 بروسلا از جمله پروتئین‌های فضای پری پلاسمیک است که به عنوان یکی از شاخص‌های مهم ایمنی زا مطرح است. با تولید پروتئین نو ترکیب P39 می‌توان مطالعات بیشتری در زمینه توانایی این پروتئین در تحریک پاسخ‌های ایمنی‌زا بر علیه بروسلا انجام داد. لذا در این تحقیق تولید و تخلیص این پروتئین در باکتری اشریشیا[5] کلی بصورت نو ترکیب انجام گرفته است.

روش کار: در این تحقیق تجربی با استفاده ازواکنش زنجیره‌ای پلیمراز[6]، ژن P39 از باکتری بروسلا آبورتوس تکثیر گردید. پس از تخلیص ژن P39 ، در ناقلین پلاسمیدی pSK^+و pGEX4T1 کلون گردید. بنابر این ساختارهای pSK^+-P39 و pGEX4T1-P39 تهیه گردید. برای تولید پروتئین نوترکیب P39 ابتدا ساختار پلاسمیدی pGEX4T1-P39 وارد باکتری اشریشیا کلی سویه BL21 شد. سپس تولید پروتئین با القا پلاسمید pGEX4T1-P39 توسطIPTG[7] صورت گرفت. پروتئین تولید شده با استفاده از کیت تخلیص پروتئین گلوتاتیون اس ترانسفرآز سفارز[8] خالص گردید. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش براد فورد اندازه‌گیری شد.

نتایج: ترادف نوکلئوتیدی ژن تکثیر شده توسط PCR کلون شده در ناقل پلاسمیدیpSK^+ کاملا با ژن P39 بروسلا آبورتوس یکسان بود. تولید پروتئین P39 با القا پلاسمید pGEX4T1-P39 انجام گردید. میزان پروتئین خالص شده برابر ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد.

نتیجه گیری: تولید پروتئین نو ترکیب P39 بروسلا آبورتوس که در سیتوپلاسم باکتری اشریشیا کلی ناپایدار است، با استفاده از ناقلین دارای پروتئین الحاقی[9] نظیر pGEX4T1 در میزبان اشریشیا کلی سویه BL21 امکان‌پذیر است.

واژگان کلیدی: بروسلا آبورتوس، ژن P39 ، پروتئین P39 ، بیان ژن، نو ترکیب، اشریشیا کلی

۱- استادیار گروه میکروب شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی اراک.
۲ - استادیار مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی.
۳ - دانشیار گروه ایمنولوژی، انستیتو پاستور ایران.
۴ - دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه تربیت مدرس.

5 - E. Coli
6- PCR: Polymerase Chain Reaction.
7 - IPTG: Isopropyl - β - D - thiogalactopyranoside.
8- GST Sepharose: Glutathione S Transferase Sepharase.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بروسلا باکتری گرم منفی و داخل سلولی اختیاری می‌باشد که باعث بروز بروسلوز در انسان وحیوانات می‌شود. با اینکه بروسلوز در محدوده جغرافیایی خاصی گسترش دارد ولی در بسیاری از مناطق از جمله نواحی مدیترانه‌ای،آسیای غربی و بخش‌هایی از آفریقا و آمریکای لاتین هنوز از مشکلات اصلی بهداشتی بشمار می‌آید(۱). شیوع واقعی بروسلوز در انسان کاملا مشخص نیست. گزارشات به دست آمده از مناطق آندمیک بسیار متغیراست. کنترل بروسلوز بر اساس شناسایی و حذف حیوانات آلوده، پاستوریزاسیون محصولات لبنی و واکسیناسیون حیوانات اهلی است. اولین واکسن موثر بروسلا سویه زنده ضعیف شده بروسلا آبورتوس S19 بود.گرچه این واکسن باعث حفاظت دام در برابر بروسلا آبورتوس می گردد ولی عوارض ناشی از آن باعث شده است تا استفاده آنها در دام‌ها با احتیاط انجام گردد و در عین حال تجویز آن در انسان ممنوع باشد(۳،۲). بنابر این تحقیق برای ساخت واکسن‌های سالم‌تر و موثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری بنظر می‌رسد. دستیابی به این هدف یعنی واکسن‌های جدید بروسلوز نیازمند بررسی شاخص‌های اصلی آنتی ژنیک بروسلا است(٤).

پروتئین P39 با وزن حدود ٤١ کیلودالتون یکی از اجزاء مهم بروسلرژن[1] است. ژن سازنده این پروتئین با ۱۲۰۵ باز اولین بار توسط دنوئل[2] شناخته وترادف آن تعیین گردید. پروتئین P39 درواقع درفضای پری پلاسمیک قرار گرفته است(٥). این پروتئین از عوامل مهم ایمنی زا برعلیه بروسلا به شمار می‌آید. تاکنون تلاش زیادی برای تولید پروتئین P39 نوترکیب با استفاده از باکتری E.Coli انجام گرفته است. ناپایداری این پروتئین در فضای سیتوپلاسمیک E.coli باعث شده است تا مقدار ناچیزی از این پروتئین تولید گردد(٦).

در این تحقیق برای بیان این پروتئین از ناقلین بیان کننده با یک پروتئین الحاقی استفاده شده است. این امر باعث پایداری پروتئین در سلول شده و آن را از تخریب داخل سلولی حفظ می‌کند. ناقل پلاسمیدی pGEX4T1 با همراه داشتن ترادف نوکلئوتیدی گلوتاتیون اس ترانسفرآز و اتصال آن به پروتئین P39 باعث پایداری این پروتئین در فضای سیتوپلاسمی باکتری E.coli می‌گردد. در این تحقیق برای افزایش تولید پروتئین و جلوگیری از تخریب آنزیمی آن در سلول میزبان E.coli از سویه BL21 استفاده شده است. سویه BL21 دارای حداقل پروتئازهای سیتوپلاسمی بوده بنابر این تخریب پروتئین‌های نوترکیب در آن صورت نمی پذیرد.

تولید پروتئین P39 به صورت نوترکیب باعث می‌گردد تا مطالعات بیشتری در زمینه ایمنی زایی آن انجام شود. این مطالعات را می توان با تلقیح پروتئین نوترکیب P39 به تنهایی و یا به همراه سایر عوامل ایمنی‌زا بروسلا نظیر آندوتوکسین این باکتری انجام داد.

روش کار

تولید پروتئین نوترکیب P39 یک مطالعه تجربی است.

1 - Brucellergene.
2 - Denoel.

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل: بروسلا آبورتوس سویه S19 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، E.Coli سویه DH5α و E.Coli سویه BL21 (تهیه شده از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی) می‌باشند. برای کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه از پلاسمید $^{+}$pSK و جهت تولید پروتئین P39 از پلاسمید pGEX4T1 استفاده شده است. (پلاسمیدهای ذکر شده از مرکز ملی مهندسی ژنتیک وتکنولوژی زیستی تهیه شده است.)

تخلیص کروموزوم بروسلا آبورتوس بر اساس روش CTAB/NaCl[1] انجام گرفته است. در این روش ابتدا بروسلا آبورتوس در محیط تریپتی کیس سوی برات در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد گاز دی اکسید کربن کشت داده شد. رسوب بدست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری را در بافر TE[2] حل نموده و سلول باکتریها توسط SDS و آنزیم پروتئیناز K لیز گردید. کروموزوم باکتری بااستفاده از محلول CTAB/NaCl[3] استخراج گردید. پروتئین‌ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل /کلروفرم / ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵/۲۴/۱ برداشت گردید. DNA بدست آمده با استفاده از ایزوپروپانول الکل رسوب داده شد و سپس توسط اتانول ۷۰درصد شستشو گردید. کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز آن در ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE[4] بررسی گردید. مقدار DNA تخلیص شده نیز با اندازه گیری جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بدست آمد.

با استفاده از ترادف ژن P39 ، طراحی پرایمرهای جلو و عقب انجام شد.[5]

پرایمر جلو دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر عقب دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم XhoI می‌باشد.

تکثیر ژن P39 با استفاده از PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شده است. غلظت عوامل PCR به قرار ۵۰۰ نانو گرم از DNA الگو، یک میلی مو لار از هر پرایمر، ۳ میلی مولار از یون منیزیوم، ۲۰۰ میلی مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، ۲/۵واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر مربوط به آن است. برنامه استفاده شده برای PCR شامل مرحله اول حرارت اولیه در۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه (یک سیکل) و مرحله دوم متشکل از سی سیکل که هر یک شامل سه قسمت، قسمت اول دناتوراسیون (۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم اتصال پرایمرها به DNA الگو (۶۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه) بود. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. بررسی نهایی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر تریس- اسید بوریک- EDTA انجام گرفت. بررسی

1- CTAB: Cetyl trimethyl ammonium bromide.
2 -TE: Tris 10mM , EDTA 1 mM , pH 8.
3 -CTAB 10% , NaCl 0.7 M.
4 -TBE: Tris – base890 mM. Boric acid 890mM , EDTA 25mM.

5-Forward: 5’ GCC GGA TCC ATG GGC GCC TGT TGC CAA 3’
Reverse: 5’ C CGC CTC GAG TTA TTT TGC GGC TTC AA 3’

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید ومشاهده آن با دستگاه ترانس‌لومیناتور ماوراء بنفش انجام گرفت. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت رش[1] بر اساس دستور العمل آن انجام گرفت.

برای کلون سازی ژن P39 در دو پلاسمید pSK و pGEX4T1 به ترتیب زیر عمل گردید. ابتدا محصول PCR با آنزیم‌های BamHI و XhoI برش داده وسپس در ناقلین ذکر شده وارد شد. لازم به ذکر است که پلاسمیدهای فوق نیز با آنزیم‌های BamHI و XhoI برش داده شد. عمل اتصال ژن P39 در این پلاسمیدها با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در حرارت ۱۶ درجه سانتیگراد به مدت یک شب انجام گرفت. پلاسمیدهای pSK$^+$-P39 و pGEX4T1-P39 به ترتیب در سلول‌های مستعد اشریشیا کلی سویه DH5α و سویه BL21 وارد شد.

برای تائید صحت ترادف نوکلئوتید، ژن به دست آمده از محصول PCR ساختار پلاسمیدی pSK$^+$-P39 به شرکت ام دبلیوجی[2] در آلمان ارسال گردید. ترادف نوکلوتیدی محصول PCR با استفاده از روش سنگر[3] بدست می‌آید.

برای تولید پروتئین P39 باکتری‌های اشریشیا کلی تراریخت شده با پلاسمید-pGEX4T1 P39 را در محیط نوترین برات کشت داده و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی شیکر با حداقل ۱۷۰ دور قرار دادیم. پس از اینکه تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید (با جذب نوری[4] ۰/۶)، از محلول یک مو لار IPTG به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی آن به یک میلی مولار برسد.چهار ساعت پس از افزودن IPTG، رسوب باکتری‌ها با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت بدست آورده شد. برای بررسی نتیجه القا، از الکتروفورز رسوب باکتری بر روی ژل ۱۵درصد SDS-PAGE استفاده گردید.

تخلیص پروتئین با استفاده از کیت GST سفارز بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (فارماسیا) انجام گرفت. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری گردید و کیفیت آن نیز با استفاده از الکتروفورز پروتئین بر روی ژل ۱۵درصد SDS-PAGE[5] بررسی گردید.

نتایج

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری بروسلا آبورتوس برابر ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برآورد گردید. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن P39 استفاده گردید. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر۱۰۰جفت بازی برابر ۱۲۰۵ جفت بازبود(شکل ۱).

نتیجه ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pSK کلون گردیده بود، با ترادف ژن P39 بروسلاآبورتوس یکسان بود.

پروتئین P39 پس از ٤ ساعت از القا با IPTG تولید گردید. وزن پروتئین تولید شده در حدود ٦٤ کیلو دالتون بود. نتیجه القای پروتئین P39

1-Roche.
2 - MWG.
3 -Sanger.

4 -OD: Optimal density.
5 -SDS– PAGE: SDS- Poly Acrylamide gel electrophoresis.

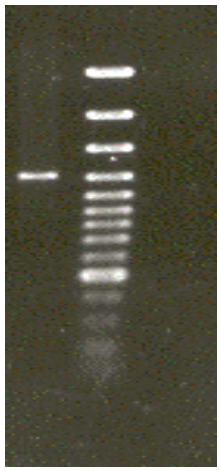
www.SID.ir

Archive of SID

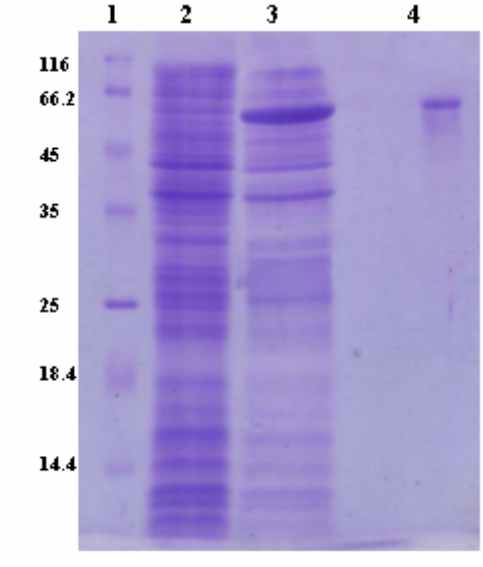
در شکل ۲ آمده است. مقدار پروتئین موجود در محلول برابر ۲۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر بود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. ستون اول: با ند ۱۲۰۵ bp مربوط به ژنP39 ، ستون دوم: مار کر ۱۰۰ bp



شکل ۲. تخليص پروتئينP39 . ستون ۱: پروتئين ماركر، ستون ۲ : نمونه قبل از القا، ستون ۳ : نمونه بعد از القا ، ستون ٤: پروتئين خالص شده GST-P39

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

بروسلا پارازیت داخل سلولی در انسان و حیوانات بوده که باعث بروز عفونت بخصوص در سیستم‌های رتیکولواندوتلیال و دستگاه تناسلی می‌گردد. بروسلوز بیماری تب داری است که در فواصل نسبتاً منظم تسکین می‌یابد. این بیماری از زمان بقراط در مدیترانه شناخته شده بود و اسامی متعددی بر حسب مناطق شایع از جمله تب مالت[13] ، تب مدیترانه‌ای[14] و تب مواج[15] گرفته است (۷).

گسترش جهانی بروسلوز ، این بیماری را هنوز از معضلات جدی سلامتی در انسان و حیوانات اهلی بشمار می‌آورد. اگرچه آمار انتشار یافته از شیوع این بیماری در کشورهای مختلف متفاوت است. شیوع دقیق بروسلوز انسانی مشخص نیست اما آمار انتشار یافته بین۰/۰۱ تا۲۰۰ مورد و در ایران ۱۳۲/٤در۱۰۰۰۰۰ جمعیت است(٤). لذا کنترل بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است. در حال حاضر برای ایمن کردن حیوانات از سویه‌های زنده ضعیف شده S19 از بروسلا آبورتوس و Rev1 از بروسلا ملی تنسیس استفاده می‌شود. اما این واکسن‌ها دارای مشکلاتی از جمله:

۱) بروز سقط جنین در دام‌های آبستن

۲) بیماری‌زایی برای انسان

۳) تولید آنتی بادی‌هایی که تشخیص حیوانات بیمار را از حیوانات واکسینه با مشکل روبرو میسازد.

بنابر این تحقیق برای ساخت واکسن‌های سالم‌تر و موثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری بنظر میرسد(۸).

در بین این تحقیقات واکسن‌های تشکیل یافته از زیر واحدهای سلولی بروسلا که توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی‌زای سلولی از نوع Th1 را داشته باشند، همواره مورد نظر بوده‌اند. تعدادی از آنتی ژن‌های پروتئینی بروسلا در حیوانات آزمایشگاهی توانایی ایجاد پاسخ‌های هومورال و سلولی بر علیه بروسلوز را دارند. از جمله این آنتی ژن‌ها می‌توان پروتئین‌های L7/L12 ، P39 و برخی از شاخص‌های آنتی ژنیک آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز را نام برد. مطالعات نشان می‌دهند که این عوامل توانایی ایجاد ایمنی حفاظت کننده در حیوانات آزمایشگاهی در برابر بروسلوز را دارند (٤).

پروتئین P39 با وزن حدود ٤۱ کیلودالتون یکی از اجزاء مهم بروسلژن است. ژن سازنده این پروتئین با ۱۲۰۵ باز اولین بار توسط دنوئل شناخته و ترادف آن تعیین گردید. پروتئین P39 در واقع در فضای پری پلاسمیک قرار گرفته است. وظایف متعددی را برای این پروتئین ذکر نموده‌اند. P39 بعنوان یک عامل اتصال شونده به سوبسترا در فضای پری پلاسمیک و انتقال سوبسترا به سلول شناخته شده است. علاوه بر آن این پروتئین دارای فعالیت‌های شیمیوتاکسی، حفاظت سلول از استرس‌های پری پلاسمیک و دخالت در شکل دهی برخی پروتئین‌ها است (۵).

13 - Malta fever.
14 - Mediterranean fever.
15 - Undulant fever.

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات و تحقیقات متعددی در مورد آنتی ژنیسیته و ایمنی زایی این پروتئین انجام گرفته است. در واقع P39 ازجمله عوامل اصلی ایمنی در بروسلرژن محسوب می‌گردد. این پروتئین قادر به تحریک واکنش‌های حساسیت تاخیری و همچنین افزایش تولید انترفرون گاما است (۸).

تحقیقات انجام شده برای تولید پروتئین P39 با استفاده از ناقلین بیان کننده نظیر پلاسمیدهای pET نشان می‌دهند که پروتئین‌های تولید شده در این سیستم پایداری زیادی را در سیتوپلاسم سلولی ندارند. در نتیجه مقدار اندکی از پروتئین تولید می‌گردد (٦). یکی از دلایل مهم تخریب پروتئین‌های نو ترکیب تخریب آنها توسط پروتئازهای سلول میزبان است. از راه حل‌های توصیه شده برای جلوگیری از تخریب این پروتئین‌ها استفاده از پلاسمیدهایی است که توالی لازم برای تولید یک پروتئین الحاقی را داشته باشند. اتصال این پروتئین به پروتئین مورد نظر باعث پایداری آن در برابر پروتئازهای داخل سلول میزبان می شود (۹). از جمله این ناقلین استفاده از ناقلین بیان کنندهpGEX می‌باشد. خصوصیات این پلاسمید به قرار زیر است:

الف: این ناقل دارای پروموتور تریپتوفان است که تحت کنترل اپراتور Lac می باشد.

ب: در این ناقل برای افزایش میزان ترجمه، جایگاه مناسب از نظر ترادف و فاصله تا کدون آغازین و برای اتصال به ریبوزوم تعبیه شده است.

ج: ترادف ویژه مربوط به آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفرآز که در ناحیه ۵ مکان کلونینگ ژن قرار گرفته است. از این ناحیه برای تخلیص پروتئین تولید شده استفاده می‌گردد.

وزن مولکولی گلوتاتیون اس ترانسفرآز در حدود ۲۰ کیلو دالتون می باشد . بنابر این پروتئین تولید شده در این سیستم ۲۰ کیلو دالتون بیش از وزن ملکول پروتئین طبیعی آن وزن دارد. یکی از اعضاء این پلاسمیدها pGEX4T1 است که در این تحقیق برای تولید پروتئین نوترکیب P39 استفاده گردید. بنابر این وزن پروتئین تولید شده در حدود ٦٣ کیلو دالتون است. همانطور که در نتایج این تحقیق دیده می شود ، علاوه بر اینکه پروتئین P39 تحت کنترل اپراتورLac تولید شده است، پایداری خود را نیز در فضای سیتوپلاسمی باکتری E.coli حفظ کرده است. حفظ پایداری این پروتئین به واسطه اتصال آن با پروتئین گلوتاتیون اس ترانسفرآز است. اتصال این دو پروتئین به یکدیگر مانع از تخریب P39 توسط پروتئازهای داخل سلولی E.coli می‌شود.

منابع

1.Collier L, Balows A, Susana M. Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. vol:2. London: Arnold pub; 1998. p. 250-275.
2. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the near east region. Vet Microb 2000; 90: 81 –111.
3. Corbel MG. Brocellosis: an overview emerging. Infect Dis 1997 ; 3: 213 –221.
4. Schuring GG, Sriragana N, Corbel MG. Brucellosis Vaccines: past , present and future. Vet Microb2002; 90: 479 – 496.

www.SID.ir

Archive of SID

5.Denoel PA, et al. Charactization , occurrence and molecular cloning of a 39 kilodalton brucella abortus cytoplasmic protein immunodominant in cattle. Infect Immune 1997; 65(2): 495-502.

٦. ابطحی ، ح . بررسی ایمنی زایی ژنهای L7/L12 و P39 بروسلا آبورتوس در موش Balb/c . پایان نامه دکترا. دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۲.

7.Collier L, Balows A, Susana M. Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. vol: 3. London: Arnold pub; 1998. p. 165-210.

8.Tibor A, Jacques I,Guilloteau L,et al. Effect of P39 Gene deletion in live Brucella vaccine strain on residual virulence and protective activity in mice. Infect Immune 1998; 66(11):5561-5564.

9.Kreuzer H, Massey A. Recombinant DNA and Biotechnology. Second ed. Washington: ASM press; 2001.p. 369-410.

www.SID.ir