

Antigenic characteristics of recombinant hyaluronidase A of *Streptococcus pyogenes* expressed in *E. coli*

Moradkhani A¹, Abtahi H², Pakzad I^{3*}, Karimi M²

1- Sciences and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Microbiology and Immunology, Medical and Molecular Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Microbiology, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

Received 19 Jul 2010, Accepted 31 Aug 2010

Abstract

Background: Hyaluronidase A is an antigenic protein that is secreted by *Streptococcus pyogenes*. Nowadays, streptococcal infections are diagnosed by tracking down anti-hyaluronidase A antibodies. In this study, the attempt was made to generate recombinant hyaluronidase A in *E. coli*.

Materials and Methods: In this experimental study, through designing specific primers and polymerase chain reaction (PCR), hyaluronidase A gene was amplified and after purification, it was sub-cloned in plasmid expression vector pET32a. Then pET32a-hylA was transferred to *E. coli* BL21-DE3-plySs. Protein generation induced by IPTG. The recombinant protein was purified by Ni-NTA kit and its concentration was assayed by Bradford method. Western-Blot analysis was run for verifying the recombinant hyaluronidase A.

Results: The nucleotide sequencing of the gene amplified by PCR was the same as hyaluronidase A gene from *Streptococcus pyogenes*. Production of the recombinant hyaluronidase A via induction by pET32a-hylA plasmid was done through IPTG. The expressed protein was purified by affinity chromatography by Ni-NTA resin. The concentration of purified protein was 500µg/ml. analysis using a mouse anti-hyaluronidase A serum was reacted with the generated protein using Western-Blot analysis.

Conclusion: Recombinant HylA protein can be generated in *E. coli* and the resulting protein maintains its antigenic properties desirably.

Keywords: *E. coli*, Gene Expression, Hyaluronidase A Gene, *Streptococcus pyogenes*

*Corresponding author:

Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

Email: pakzad_i2006@yahoo.com

بررسی خواص آنتی ژنیک پروتئین نو ترکیب هیالورونیداز A استرپتوکوک پیوژنز بیان شده در باکتری اشیریشیا کلی

آذر مرادخانی¹، حمید ابطحی²، ایرج پاکزاد^{3*}، مسعوده کریمی⁴

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- 2- استادیار، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 3- استادیار، گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
- 4- کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت 89/4/28، تاریخ پذیرش 89/6/9

چکیده

زمینه و هدف: هیالورونیداز A از جمله پروتئین‌های ترشحی استرپتوکوک پیوژنز بوده که دارای قدرت آنتی ژنیک می‌باشد. امروزه با ردیابی آنتی بادی‌های ضد این پروتئین روند عفونت ناشی از این باکتری پی‌گیری می‌شود. در این تحقیق سعی گردیده تا تولید پروتئین نو ترکیب هیالورونیداز A در باکتری اشیریشیا کلی انجام گیرد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی با طراحی پرایمر اختصاصی و استفاده از روش PCR، ژن هیالورونیداز A از استرپتوکوک پیوژنز تکثیر گردید. پس از تخلیص، ژن فوق در ناقل پلاسمیدی pET32a جهت بیان کلون گردید. سپس ساختار پلاسمیدی pET32a-hylA وارد باکتری اشیریشیا کلی سویه BL21-DE3-plySs شد. تولید پروتئین با القاء توسط IPTG صورت گرفت. پروتئین نو ترکیب با استفاده از کیت Ni-NTA خالص و میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری شد. آزمایش وسترن بلات برای تایید پروتئین نو ترکیب انجام شد.

یافته‌ها: ترادف نوکلئوتیدی ژن تکثیر شده توسط روش PCR با ژن هیالورونیداز A استرپتوکوک پیوژنز یکسان بود. تولید پروتئین نو ترکیب هیالورونیداز A با القاء پلاسمید pET32a-hylA توسط IPTG انجام گردید. تخلیص پروتئین با روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از کیت Ni-NTA صورت گرفت. میزان پروتئین خالص شده برابر 500 میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. سرم موش واجد آنتی هیالورونیداز A در روش وسترن بلات با پروتئین تولید شده واکنش داد.

نتیجه گیری: تولید پروتئین نو ترکیب هیالورونیداز A در میزبان اشیریشیا کلی نیز امکان پذیر است. پروتئین تولید شده خاصیت آنتی ژنیک خود را به خوبی حفظ می‌کند.

واژگان کلیدی: استرپتوکوک پیوژنز، اشیریشیا کلی، بیان ژن، ژن هیالورونیداز A

* نویسنده مسئول: ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی پزشکی

Email: pakzad_i2006@yahoo.com

مقدمه

دهندگی، تومورهای مقاوم نسبت به درمان های شیمی درمانی را نسبت به درمان حساس تر می کند (11). کاربرد دیگر هیالورونیداز در تشخیص عفونت می باشد؛ این آنزیم به وسیله یک مهارکننده اختصاصی (آنتی هیالورونیداز) که یک آنتی بادی واقعی است در سرم انسان مهار می شود. این آنتی بادی چندین هفته بعد از آغاز عفونت استرپتوکوکی گسترش می یابد، بعد از فروکش کردن التهاب همچنان باقی می ماند، در بخش گاما-گلوبولین سرم پدیدار می شود و به طور اختصاصی هیالورونیداز استرپتوکوک های گروه A را خنثی می کند (12).

در تب روماتیسمی گاهی سطح سرمی آنتی هیالورونیداز زودتر از آنتی استرپتولیزین O سرم بالا می رود و حتی بعد از به سطح نرمال برگشتن آنتی استرپتولیزین O سرم، برای مدت طولانی در سطح بالا باقی می ماند (13).

بر اساس بررسی های انجام شده بر روی بیماران مبتلا به نکروز فاسیا مشخص شد که عفونت ناشی از استرپتوکوک پیوژنز را می توان با تعیین سطح آنتی بادی ضد هیالورونیداز تشخیص داد (14).

هدف از این تحقیق، بیان ژن هیالورونیداز خارج سلولی (hyla) استرپتوکوک پیوژنز با استفاده از ناقل پلاسمیدی pET32a در اشریشیا کلی (E.coli)، تخلیص پروتئین نو ترکیب حاصل و بررسی آنتی ژنیسته آن می باشد.

مواد و روش ها

باکتری های استفاده شده در این مطالعه تجربی شامل استرپتوکوک پیوژنز سویه PTCC 1447 (تهیه شده از آزمایشگاه فرانس)، اشریشیا کلی سویه DH5 α و اشریشیا کلی سویه BL21- DE3-plySs (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران، ایران) بودند. برای کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه از پلاسمید pTz57R/T (شرکت فرمتاس، لیتوانی) و جهت تولید هیالورونیداز A از پلاسمید pET32a (شرکت نواژن، آمریکا) استفاده شد. این پلاسمیدها از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه

باکتری استرپتوکوک پیوژنز یکی از رایج ترین پاتوژن های انسانی است و باعث ایجاد عفونت های وسیعی از جمله سلولیت، زرد زخم، تب روماتیسمی و بیماری روماتیسم قلبی می شود که شایع ترین آنها گلودرد استرپتوکوکی است (1، 2). تشخیص اصلی در عفونت های ناشی از این باکتری بر اساس جدا سازی آن از بافت یا اندام آلوده است (3) ولی در مورد تشخیص عفونت های غیر چرکی استرپتوکوکی مثل تب روماتیسمی حاد یا گلو مرونفریت استرپتوکوکی، همیشه امکان به دست آوردن پیشینه بالینی در حد کافی از ارگانسیم وجود ندارد. در این قبیل موارد وجود پاسخ ایمنی از سوی میزبان تنها مدرک از عفونت اخیر است که باقی مانده است، بنابراین اندازه گیری آنتی بادی ها که ویژه آنتی ژن های استرپتوکوکی است برای تایید تشخیص عفونت استرپتوکوک های گروه A که از پیش وجود داشته ضروری است (4).

استرپتوکوک پیوژن ها شمار بزرگی از فاکتورهای بیماریزا با خاصیت آنتی ژنی تولید می کنند که بعضی از آنها تحت عنوان فاکتورهای انتشار نام دارند. از جمله این فاکتورها هیالورونات لیاز خارج سلولی می باشد (5). هیالورونیداز موجب شکست اسید هیالورونیک می شود. اسید هیالورونیک جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی مهره داران می باشد و به طور وسیعی در بافت های مختلفی از قبیل مایع زجاجیه چشم، آئورت، خون، کبد، مایع سینوویال، بافت همبند سست و پوست پراکنده است (6) همچنین ترکیب اصلی کپسول بعضی باکتری ها است (7). دارا بودن خاصیت شکنندگی هیالورونیک اسید کپسول، اتصال و کولونی زایی باکتری را تسهیل می کند (8). در سال 1928 به اولین استفاده درمانی این آنزیم به عنوان فاکتور انتشار دهنده اشاره شد، به این صورت که نفوذ زیر جلدی واکسن ها و توکسین های به کار برده شده را تسهیل می کرد. از لحاظ درمانی این آنزیم همراه با داروهای بیهوش کننده موضعی و داروهای تسکین دهنده درد استفاده می شود (9، 10). همچنین هیالورونیداز به وسیله تشدید نفوذ داروهای ضد سرطان، با استفاده از فعالیت انتشار

تکنیک ژن هیالورونیداز A با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در حجم 25 میکرولیتر و با استفاده از 500 نانو گرم DNA الگو، یک میلی مولار از هر پرایمر، 1/5 میلی مولار از یون منیزیم، 200 میلی مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5 واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر (Polymerase Chain Reaction) با غلظت 1X انجام شد. برنامه PCR در دو مرحله انجام شد که مرحله اول شامل حرارت اولیه در 95 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه (یک چرخه) و مرحله دوم PCR متشکل از 30 چرخه که هر یک شامل سه قسمت بود؛ قسمت اول دناتور کردن (95 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (50 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (72 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و 30 ثانیه)؛ در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه و برای یک چرخه انجام شد. بررسی نهایی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز 1 درصد در بافر تریس - اسید بوریک - EDTA (TBE با pH=8) انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام شد و تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت روش (Roche) بر اساس دستور العمل آن انجام گرفت.

برای کلون سازی ژن هیالورونیداز A در دو پلاسمید pTz57R/T و pET32a ابتدا محصول PCR با آنزیم های BamHI و EcoRI برش داده سپس در ناقلین مورد نظر که با همان آنزیم ها بریده شده بودند، وارد شد. عمل اتصال ژن هیالورونیداز A در این پلاسمیدها با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در حرارت 22 درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انجام گرفت. پلاسمیدهای pTz57R/T-hylA و pET32a-hylA به ترتیب در سلول های مستعد اشریشیا کلی سویه DH5α و سویه BL21- DE3-plySs وارد شدند. برای تایید کلونینگ ژن

گردید. در این تحقیق از آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و کلرامفنیکل استفاده شد. آنزیم های استفاده شده از شرکت سیناژن تهیه گردید.

تخلیص کروموزوم استرپتوکوک پیوژن بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا استرپتوکوک پیوژن در محیط تریپتی کیس سوی برات (Trypticase Soy Broth) در دمای 37 درجه سانتی گراد کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE (pH معادل برابر 8، EDTA 1 میلی مولار 10 Tris میلی مولار) حل گردید و با استفاده از آنزیم لیزوزیم و سپس با اثر SDS (sodium dodecyl sulfate) و آنزیم پروتیناز K لیز شد. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول 10% CTAB/NaCl و (NaCl 0.7 M) استخراج گردید. پروتئین ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل /کلروفرم /ایزوامیل الکل به نسبت 25/24/1 و سانتریفیوژ (13000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه) حذف گردید. DNA به دست آمده با استفاده از یک حجم ایزوپروپانول رسوب داده شد و سپس توسط اتانول 70 درصد شستشو گردید. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز آن در ژل آگارز 0/8 درصد در بافر TBE بررسی گردید. مقدار DNA تخلیص شده نیز با اندازه گیری جذب نور در طول موج های 260 و 280 نانومتر به دست آمد.

با استفاده از مترادف استاندارد ژن هیالورونیداز A (AF218838.1) طراحی پرایمرهای رفت (Forward) و برگشت (Reverse) انجام شد.

Forward:
5' ATGGATCCGTAATACTTATTTTGG 3'
Reverse:
5' AAGAATTCCTAAATCCTTAAGTCTT 3'

پرایمر رفت دارای مترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر برگشت دارای مترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم EcoRI می باشد

درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. به ازاء هر 4 میلی لیتر محلول رویی مرحله قبل، یک میلی لیتر رزین NitriloTriacetic Acid Ni- آگارز اضافه شد. سپس به مدت یک ساعت بر روی راکر در حرارت اتاق قرار گرفت. با سانتریفیوژ کوتاه مدت (2000 دور در دقیقه برای 3 دقیقه) رزین رسوب داده شد و محلول رویی آن خالی شد. سپس سه بار و هر بار با 5 میلی لیتر بافر 2 (Tris HCl, Urea 8M, NaH₂ PO₄ 100 mM, pH 6.3) شستشوی بافر انجام گرفت. جدا سازی پروتئین از رزین با استفاده از بافر 3 و 4 انجام گرفت. حدود 1 میلی لیتر بافر 3 (Tris HCl 10mM, NaH₂ PO₄ 100 mM, pH 5.9) (Urea 8M) به رزین اضافه شد. با سانتریفیوژ کوتاه مدت مایع رویی حاوی پروتئین جدا گردید. رسوب باقیمانده از مرحله قبل با 1 میلی لیتر بافر 4 (Tris HCl 10mM, Urea 8M, NaH₂ PO₄ 100 mM, pH 4.5) شستشو داده شد و به مدت نیم ساعت بر روی راکر در حرارت اتاق قرار گرفت. سپس با سانتریفیوژ کوتاه مدت مایع رویی حاوی پروتئین جدا گردید. برای اطمینان از وجود پروتئین تخلیص شده، محلول های رویی با استفاده از الکتروفورز SDS PAGE در روی ژل الکتروفورز بررسی شد. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری گردید و برای تأیید صحت پروتئین تولید شده و تعیین ویژگی آنتی ژنیک آن از آزمون وسترن بلات استفاده شد. ابتدا به یک عدد موش در دو نوبت به فاصله یک هفته به صورت زیر جلدی و درون صفاقی عصاره محیط کشت حاوی استرپتوکوکوس پیورنز به همراه آدجوانت فروند تزریق گردید و پس از بالا رفتن تیتراژ آنتی بادی بر علیه این پروتئین سرم حیوان تهیه شد. آزمون وسترن بلات بدین شکل انجام شد که پس از الکتروفورز پروتئین های حاصل از رسوب باکتری های القاء یافته بر روی ژل SDS-PAGE 12 درصد، باندهای پروتئینی به دست آمده به کاغذ PVDF منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری 25 میلی مولار تریس، 192 میلی مولار گلیسین و 20 درصد متانول به

hyla، از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن و برش آنزیمی استفاده شد. برای انجام واکنش برش آنزیمی پس از مخلوط کردن بافر R، DNA پلاسمیدی و آنزیم های BamHI و EcoRI به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از اتمام این زمان برای اطمینان از عمل هضم 5 میکرولیتر از مخلوط در کنار مارکر با استفاده از ژل آگارز، الکتروفورز شد.

برای تأیید صحت مترادف نوکلئوتیدی، ژن پلاسمید به شرکت MWG آلمان ارسال شد. مترادف نوکلئوتیدی محصول PCR با استفاده از روش سنگر (Sanger) تعیین گردید.

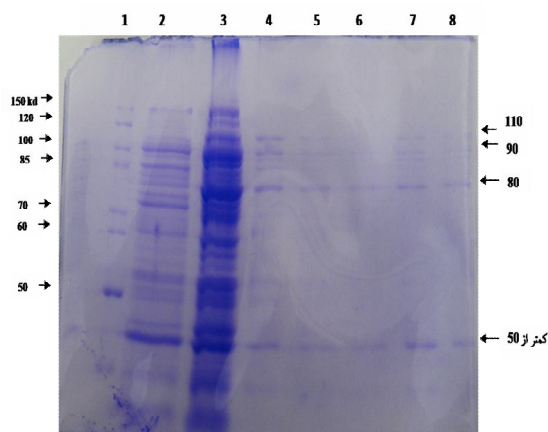
جهت تولید پروتئین Hyla، باکتری های اشریشیاکلی تراریخت شده با پلاسمید hyla-pET32a در محیط نوترین برات کشت داده و در حرارت 37 درجه سانتی گراد بر روی شیکر با حداقل 170 دور در دقیقه قرار داده شد. پس از این که تعداد باکتری ها به حد مناسب رسید (Optical Density=0/6)، از محلول یک مولار Isopropyle-Beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) به سوپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی IPTG به یک میلی مولار برسد. چهار ساعت پس از افزودن IPTG، رسوب باکتری ها با سانتریفیوژ در 4000 دور در دقیقه به مدت نیم ساعت جمع آوری شد. برای بررسی نتیجه القاء از روش الکتروفورز پروتئین های حاصل از رسوب باکتری بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE استفاده گردید.

تخلیص پروتئین با استفاده از کیت Ni-NTA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن، آمریکا) به صورت زیر انجام گرفت. رسوب سلولی حاصل از 250 میلی لیتر کشت باکتری پس از مرحله القاء، در 5 میلی لیتر بافر 1 (Tris HCl 10mM, NaH₂ PO₄ 100 mM, pH 8) حل شد. پس از ورتکس، به مدت یک ساعت بر روی راکر در حرارت اتاق قرار گرفت. سپس نمونه در یخ قرار داده شد و سونیکه گردید. پس از شفاف شدن، به مدت 20 دقیقه با 12000 دور در دقیقه در دمای 4

نتیجه مقایسه انجام شده بین ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pTz57R/T کلون گردیده بود، با ترادف ارایه شده برای ژن هیالورونیداز A که در بانک ژن ثبت شده است، یکسان بود.

پروتئین نو ترکیب هیالورونیداز A پس از 4 ساعت از القاء با IPTG تولید گردید. وزن پروتئین تولید شده در حدود 120 کیلو دالتون بود.

خالص سازی پروتئین HylA با استفاده از کیت Ni-NTA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد سنجیده شد. مقدار پروتئین موجود در محلول برابر 500 میکروگرم در میلی لیتر بود (شکل 2).



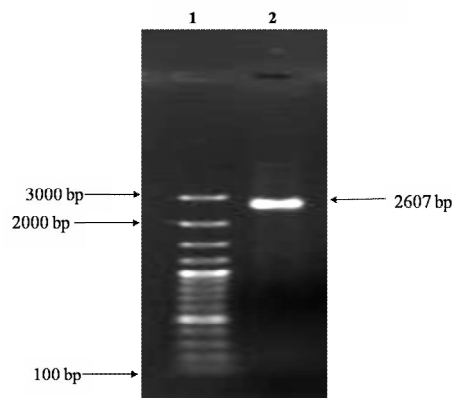
شکل 2. تخلیص پروتئین HylA: پروتئین مارکر (ستون 1)، نمونه قبل از القاء (ستون 2)، نمونه بعد از القاء (ستون 3)، پروتئین خالص شده (ستون 4-8)

نتایج مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در آزمون وسترن بلات در شکل 3 نمایش داده است. بر اساس نتایج به دست آمده، در نمونه سرمی موش تلقیح شده باندهایی مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ PVDF مشاهده شد؛ در عین حال هیچ بانندی دال بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه سرم موش نرمال دیده نشد.

مدت یک و نیم ساعت و در شدت جریان 90 ولت انجام گرفت. مرحله مسدود سازی کاغذ PVDF با قرار دادن کاغذ در بافر بلوکه کننده به مدت یک ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدود سازی، کاغذ PVDF به مدت دو ساعت در مجاورت سرم موش تلقیح شده با هیالورونیداز A تجارتي (1/100) و یک نمونه سرم موش تلقیح نشده (کنترل منفی) قرار داده شد. پس از انکوباسیون دو ساعته با نمونه های سرم، نوارهای کاغذ PVDF سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل NaCl 15 میلی مولار، Tris-HCl pH 7.4 10 میلی مولار، 0/1 tween20 در صد) شستشو شده و به مدت یک و نیم ساعت با آنتی بادی ضد موش متصل با پراکسیداز با رقت 1/500 انکوبه گردید؛ در نهایت پس از شستشوی نمونه ها با بافر TBS-T، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ PVDF، کاغذ مزبور در محلول دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت.

یافته ها

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری استرپتوکوک پیوژن برابر 500 میکروگرم در میلی لیتر برآورد شد. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن هیالورونیداز A استفاده گردید. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر 100 جفت بازی حدود 2607 جفت باز بود (شکل 1).



شکل 1. ستون اول مارکر 100 bp، ستون دوم باند 2607 bp مربوط به ژن hylA (با 1/5 میلی مولار منیزیم)

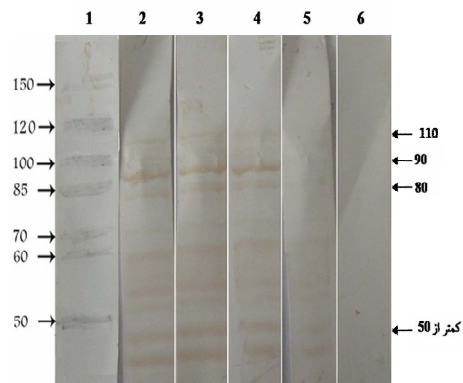
پروتئین، افزوده شدن برخی پروتئین‌های مربوط به ناقل پلاسمیدی از جمله پروتئین تیرو دوکسین است.

در ژل SDS-PAGE و سترن بلات علاوه بر باند اصلی یعنی 120 کیلو دالتون، باندهای کوچک‌تر نیز مشاهده شد (شکل 3). با توجه به وجود این باندها این احتمال وجود دارد که پروتئین شکسته شود و شکسته شدن این پروتئین احتمالاً ناشی از سنگینی وزن باشد. شکسته شدن این پروتئین در مطالعات دیگر نیز دیده شده است (4) و یا ممکن است قطعات ترجمه آغازین متفاوتی را نشان دهند و ترجمه از جایگاه‌های آغازین بعدی نظیر متیونین دوم، سوم انجام شده باشد، بنابراین پروتئین فاقد آمینواسیدهای ابتدایی ناحیه N-ترمینال باشد و در اندازه‌های کوچک‌تر تشکیل شود.

هیالورونیداز استخراج شده از استرپتوکوک پنومنی دارای وزنی حدود 107 کیلو دالتون است. مطالعات نشان می‌دهد، در تولید فرم نو ترکیب در E.coli، قطعاتی با اندازه‌های 107، 94، 91 و 83 کیلو دالتون وجود دارد، که نشان‌دهنده خرد شدن آن در حین تولید است. از بین این قطعات تنها شکل 83 کیلو دالتونی پروتئین دارای فعالیت آنزیمی می‌باشد (16-18). بنابراین میزان کل پروتئین تولید شده در این تحقیق (500 میکروگرم در میلی لیتر) مربوط به همه اشکال تولید شده پروتئین است. هینز و همکاران نیز وزن‌های مولکولی متفاوتی از هیالورونیداز را بسته به روش تخلیص بدست آوردند، با روش ژل فیلتراسیون وزنی برابر با 70 کیلو دالتون و با استفاده از الکتروفورز SDS-آکریلامید وزنی حدود 50 کیلو دالتون بود (5).

برای جلوگیری از شکسته شدن پروتئین تحقیقات دیگری نیز باید انجام شود. با تغییر شرایط از جمله دما، محیط کشت، طول مدت القاء و تغییر پلاسمید می‌توان شرایط مناسب پایداری پروتئین را تعیین کرد تا از شکست آن تا حد امکان جلوگیری شود. همچنین برای شناسایی خاصیت آنتی ژنیک و فعالیت آنزیمی هر یک از این قطعات، نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد.

با توجه به تولید ناچیز آنزیم در استرپتوکوک پیوژنز و خطرات احتمالی انتقال عفونت که در حین تولید



شکل 3. آزمون ایموبلوت با سرم موشی تلقیح شده با هیالورونیداز A (ستون 2-5)، موش طبیعی (ستون 6) و پروتئین مارکر (ستون 1)

بحث

تولید پروتئین نو ترکیب هیالورونیداز در سیستم‌های پروکاریوت و یوکاریوت قبلاً گزارش نشده و تعداد منابع و تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده بسیار محدود می‌باشد. این تحقیق اولین گزارش از کلونینگ، بیان و تخلیص هیالورونیداز خارج سلولی استرپتوکوک پیوژنز در E.coli می‌باشد. در این تحقیق از ناقل پلاسمیدی pET32a استفاده شد. سیستم pET از جمله قوی‌ترین سیستم‌ها برای بیان ژن و تولید پروتئین‌های نو ترکیب در باکتری اشریشیا کلی می‌باشد. در این سیستم ژن هدف تحت کنترل پروموتور قوی T7 بوده و در ژنوم میزبان (سویه BL21-pLysS اشریشیا کلی) رونویسی از ژن تحت کنترل این پروموتور توسط RNA پلیمرآز فاژ T7 که در سلول باکتری کلون شده است، انجام پذیرفت. بنابراین به علت استقلال سیستم رونویسی ژن از سلول میزبان، تولید mRNA و در نهایت تولید پروتئین در این سیستم متأثر از عوامل سلولی دخیل در سنتز پروتئین نمی‌باشد، به همین علت تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم‌هایی است که رونویسی وابسته به پلیمرآزهای سلول میزبان است (15)؛ چنانچه در این تحقیق میزان پروتئین تا حدود 500 میکروگرم در میلی لیتر برآورد شد.

پروتئین هیالورونیداز استرپتوکوک پیوژنز دارای وزنی برابر 99636 دالتون می‌باشد (5). همان طور که در شکل 2 دیده می‌شود پروتئین تولید شده دارای وزن حدود 120 کیلو دالتون است؛ علت اختلاف وزنی مشاهده شده در

منابع

- Ikebe T, Endo M, Ueda Y, Okada K, Suzuki R, Minami T, et al. The genetic properties of *Streptococcus pyogenes* emm49 genotype strains recently emerged among severe invasive infections in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2004 Aug;57(4):187-8.
- Morosini M, Canton R, Loza E, Del Campo R, Almaraz F, Baquero F. *Streptococcus pyogenes* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms in Spain: in vitro activities of telithromycin and cethromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2003;52(1):50.
- Forbes B, Sahn D, Weissfeld A. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 11th ed. St Louis: Mosby; 2002.
- Karmarkar M, Venugopal V, Joshi L, Kamboj R. Evaluation & reevaluation of upper limits of normal values of anti-streptolysin O & anti-deoxyribonuclease B in Mumbai. *Indian J Med Res.* 2004 May;119 Suppl:26-8.
- Hynes W, Dixon A, Walton S, Aridgides L. The extracellular hyaluronidase gene (*hyla*) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Mar;184(1):109-12.
- Butler L, Rainger G, Nash G. A role for the endothelial glycosaminoglycan hyaluronan in neutrophil recruitment by endothelial cells cultured for prolonged periods. *Exp Cell Res.* 2009 Nov;315(19):3433-41.
- Starr C, Engleberg N. Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus. *Infect Immun.* 2006 Jan;74(1):40-8.
- Pecharki D, Petersen F, Scheie A. Role of hyaluronidase in *Streptococcus intermedius* biofilm. *Microbiology.* 2008 Mar;154(Pt 3):932-8.
- Schulze C, Bittorf T, Walzel H, Kundt G, Bader R, Mittelmeier W. Experimental evaluation of hyaluronidase activity in combination with specific drugs applied in clinical techniques of interventional pain management and local anaesthesia. *Pain Physician.* 2008 Nov-Dec;11(6):877-83.
- Stern R, Jedrzejewski M. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006 Mar;106(3):818-39.

آنزیم از این باکتری وجود دارد، تولید این آنزیم باید با روش‌های نو ترکیب و در باکتری‌های دیگر نظیر *E.coli* صورت پذیرد.

نظر به واکنش هیالورونیداز A نو ترکیب به دست آمده با آنتی بادی ضد هیالورونیداز A می‌توان از این پروتئین برای تشخیص عفونت ناشی از استرپتوکوک پیوژن بهره برد. با استفاده از روش‌های تشخیصی کمی نظیر الیزا می‌توان میزان آنتی بادی ضد این پروتئین را نیز تعیین نمود. نیاز به مطالعات بیشتر در این خصوص به خوبی احساس می‌گردد.

نتیجه گیری

ژن کلون شده در این تحقیق از نظر سکانس با ژن هیالورونیداز A، 100 درصد همولوژی را نشان داد. تولید این پروتئین با استفاده از ناقل pET32a انجام شد. این پروتئین خاصیت آنتی ژنیک مشابه با هیالورونیداز داشته و می‌توان از آن جهت تشخیص آنتی بادی ضد هیالورونیداز A در افراد مبتلا نیز استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایلام تحت عنوان "تولید هیالورونیداز نو ترکیب در *E.coli* و بررسی آنتی ژنیسیته آن" همچنین قسمتی از پایان نامه دانشجویی خانم آذر مرادخانی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد می‌باشد؛ لذا بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام تشکر و قدردانی بعمل می‌آید. همچنین از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی تجهیزات و امکانات و از کلیه همکارانی که که ما را در این پژوهش یاری نموده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

11. Stern R. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathol Biol (Paris)*. 2005 Sep;53(7):372-82.
12. Steer A, Vidmar S, Ritika R, Kado J, Batzloff M, Jenney A, et al. Normal ranges of streptococcal antibody titers are similar whether streptococci are endemic to the setting or not. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Feb;16(2):172-5.
13. Hahn R, Knox L, Forman T. Evaluation of poststreptococcal illness. *Am Fam Physician*. 2005 May;71(10):1949-54.
14. Lindbaek M, Høiby E, Lermark G, Steinsholt I, Hjortdahl P. Which is the best method to trace group A streptococci in sore throat patients: culture or GAS antigen test? *Scand J Prim Health Care*. 2004 Dec;22(4):233-8.
15. Sambrook J, Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
16. Akhtar M, Bhakuni V. Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase: An overview. *Current Science*. 2004;86(2):285-95.
17. Ponnuraj K, Jedrzejewski M. Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol*. 2000 Jun;299(4):885-95.
18. Li S, Kelly S, Lamani E, Ferraroni M, Jedrzejewski M. Structural basis of hyaluronan degradation by Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase. *EMBO J*. 2000 Mar; 19(6): 1228-40.