مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 7 (شماره پیاپی 66)، آذر 1391، 71-63

بررسی پروتئین نوترکیب زیر واحد A پیلی ویبریو کلرا در اشرشیاکلی

سمیه کیایی[1]، حمید ابطحی[2*]، محمد یوسف علیخانی[3]، قاسم مسیبی[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
2- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
3- دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
4- دانشیار، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی ، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 90/10/5 تاریخ پذیرش: 91/1/23

چکیده

زمینه و هدف: ویبریوکلرا یک باکتری پاتوژن گرم منفی است که عامل بیماری اسهال است. یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای باکتری، پیلی هم تنظیم شونده با توکسین است. این پیلی به عنوان اولین عامل در کلونیزاسیون و تداوم باکتری‌ها در روده کوچک مورد نیاز است.

مواد وروش‌ها: در این تحقیق با استفاده از روش PCR، ژن پیلی هم تنظیم شونده با توکسین ویبریوکلرا تکثیر گردید. پس از تخلیص، ژن‌های فوق در پلاسمید pGEX4T1 جهت بیان کلون شد. سپس ساختار پلاسمیدی نوترکیب وارد باکتری اشریشیاکلی شد. تولید پروتئین‌ها توسط IPTG القاء و بهینه سازی شرایط محیط کشت صورت گرفت. پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از کیت گلوتاتیون S سفاروز خالص و آزمایش وسترن بلات برای تایید پروتئین نوترکیب انجام گرفت. میزان پروتئین‌ها با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج تحقیق حاضر بیان موفقیت آمیز پروتئین‌های نوترکیب در سلول اشرشیاکلی را ثابت کرد. پروتئین نوترکیب به وسیله کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد. الگوی واکنش این پروتئین‌ها با آنتی‌بادی‌های ضد آنها، نشان داد که این پروتئین‌ها خاصیت آنتی‌ژنیک دارند.

نتیجه‌گیری: از آنجا که در این مطالعه نشان داده شد، این پروتئین‌ها دارای خاصیت آنتی ژنیسیته هستند، ممکن است به عنوان یک آنتی ژن مناسب برای واکسیناسیون باکتری ویبریوکلرا استفاده شود.

واژگان کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، ژن پیلی هم تنظیم شونده با توکسین A، ویبریو کلرا

***نویسنده مسئول:** اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و ملکولی

Email: Abtahi@arakmu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کلرا (وبا) یک بیماری اسهالی است که به وسیله باکتری گرم منفی به نام ویبریوکلرا ایجاد می‌شود(1). ویبریوکلرا عضوی از خانواده ویبریوناسه و جنس ویبریو است که در آب‌های شور و شیرین به صورت بی‌هوازی زندگی می‌کند(2). این باکتری توانایی ایجاد تخمیر را دارد(2، 3) و مهم‌ترین نشانه این بیماری استفراغ و اسهال آبکی فراوان می‌باشد. انتقال آلودگی، بیشتر از طریق غذا یا آب آلوده اتفاق می‌افتد. نتیجه این بیماری منجر به دهیدراته شدن و عدم تعادل الکترولیتی می‌گردد(4، 5). در حدود 200 سروتیپ از ویبریوکلرا شناخته شده که تنها دو سروتیپ o1 و o139 با وبای اپیدمیک ارتباط دارد(6). بیان ژن‌های ویبریوکلرا به محض ایجاد تغییرات در تحریکات محیطی مثل نمک، pH و دما اتفاق می‌افتد. این انتقال محیطی به محض هضم غذا یا آب آلوده روی می‌دهد(7، 8). بعد از خوردن غذا یا آب آلوده باکتری در داخل روده کوچک کلونیزه می‌شود، برای این کلونیزاسیون نیاز به پیلی نوع چهارم دارد. پیلی هم تنظیم شونده با توکسین *tcp* (toxin co regulated of pilus) است که این پروتئین جزء دسته 4B قرار دارد(9). تولید پیلی و عامل ویرولانس ترشحی به نام *tcpF* تشکیل میکروکلونی را تسهیل و برای کلونیزاسیون سلول‌های اپتلیال روده‌ای مورد نیاز هستند(10، 11). نقش پیلی در بیماری‌زایی ویبریوکلرا بسیار پیچیده و ضروری است و شکل‌های جهش یافته این پروتئین قادر به ایجاد کلونیزاسیون در روده کوچک انسان و موش نمی‌باشند(12). پروتئین TCPA به صورت یک پیلی رشته‌ای نازک است و دسته مشخصی را در سطح باکتری ویبریوکلرا ایجاد می‌کند. بیان ژن‌های کاست ویرولانس پیلی هم تنظیم شونده با توکسین، توسط *toxR* کنترل می‌شود که یک پروتئین غشایی است. هنگامی که این باکتری تحت شرایط بالای بیان توکسین کشت داده می‌شود این تنظیم یک حالتی از وابستگی دو موقعیت *tcp* و توکسین را در رگولون *toxR* نشان می‌دهد(13). پیلی به شکل فیبری است که از پلی مرهای یکسانی از *tcpA* تشکیل یافته است(14). TcPA، به عنوان یک پروتئین پیشرو در قسمت سیتوپلاسمیک غشاء داخلی ویبریوکلرا به وسیله یک پروتئاز، مورد پردازش قرار می‌گیرد. *tcpJ* نقش این پپتیداز را به عهده دارد(15). زیر واحدهای *tcpA* بالغ به همراه سایر ضمائم خود به *tcp* بالغ تبدیل می‌شود. تصور می‌شود این پروتئین‌ها توانایی تشکیل داربستی را دارند که با همکاری همدیگر، توانایی ایجاد پیلی هم تنظیم شونده با توکسین عمل می‌کنند(8). پروتئین TcPA به عنوان زیر واحد بزرگ این پیلی در نظر گرفته شده است، با توجه به محل قرار گیری *tcpA* در سطح باکتری این پروتئین به راحتی تحت تاثیر سیستم ایمنی می‌تواند قرار گیرد. پروتئین TcP پلی مری از واحدهای تکراری است که در میان جزیره بیماری‌زای ویبریو VPI (V.cholera pathogenicity Island) یافت می‌شود(16، 17). سکانس‌های DNA *tcp* مربوط به گونه‌های التور o1 و o139 شباهت‌های زیادی با یکدیگر دارند(18). بنابراین سرم تشکیل شده در برابر این پروتئین باعث ایجاد ایمنی در برابر این گونه‌ها می‌شود. پروتئین TcPA دارای نقش مهمی در تشکیل گیرنده برای باکتریوفاژ می‌باشد و نحوه قرارگیری این پروتئین در معرض آنتی بادی‌ها باعث شده تا کاندیدای مناسبی به منظور توسعه ایمنی ضد کلونیزاسیون علیه بیماری وبا باشد. پروتئین TCPA با وزن حدود 45/5 کیلودالتون یکی از اجزاء مهم ویبریوکلرا است. ژن سازنده این پروتئین دارای 598 جفت باز است.

در این مطالعه به منظور تولید این پروتئین از سویه(BL21(DE3 اشرشیاکلی استفاده شده است. تولید پروتئین TcPA به صورت نوترکیب باعث می‌گردد تا مطالعات بیشتری در زمینه ایمنی‌زایی آن انجام شود.

مواد و روش‌ها

تولید پروتئین نوترکیب TcPA یک مطالعه بنیادی -کاربردی است. باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل ویبریوکلرای سویه اینابا تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، اشریشیاکلی سویه *DH5α* و اشریشیاکلی سویه *E.coli,BL21(DE3)* از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی بود. جهت کلونینگ و تولید پروتئین TcPA از پلاسمید pGEX4T1 استفاده شد. پلاسمید ذکر شده از مرکز ملی مهندسی ژنتیک وتکنولوژی زیستی تهیه

Archive of SID
www.SID.ir

گشت. تخلیص کروموزوم ویبریو کلرا بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا ویبریوکلرا در محیط نوترینت براث در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE (EDTA 1 میلی‌مولار، Tris.HCl 10 میلی‌مولار، pH=8) حل شد و سلول باکتری‌ها توسط سدیم دو دسیل سولفات و آنزیم پروتئیناز K لیز گردید. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/NaCl (CTAB 10 درصد، NaCl 0/7 درصد) استخراج شد. پروتئین‌ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل/کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به نسبت 25/24/1 برداشت گردید. DNA به دست آمده با استفاده از ایزوپروپانول الکل رسوب داده شد و سپس توسط اتانول 70 درصد شستشو گردید. کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز 0/8 درصد در بافر TBE مورد بررسی قرار گرفت. مقدار DNA تخلیص شده با اندازه‌گیری جذب نور در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر به دست آمد.

با استفاده از ترادف ژن *tcpA* طراحی پرایمرهای رفت(Forward) و برگشت(Reverse) انجام شد:

Forward: 5'-AGGGATCCATGACATTACTCGAAG-'3

Reverse: 5'-AACTCGAGGCTGTTACCAAATGC-'3

پرایمر رفت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر برگشت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم XhoI است.

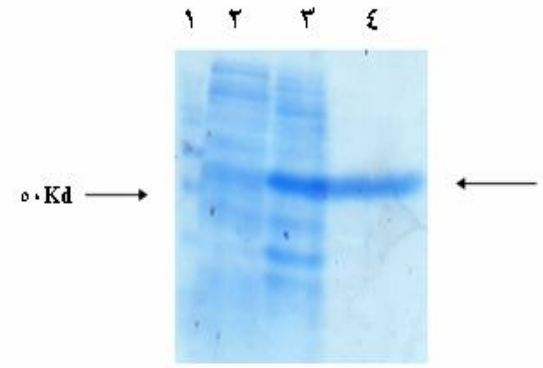
تکثیر ژن *tcpA* با استفاده از PCR در حجم 50 میکرولیتر انجام گرفت. غلظت عوامل PCR شامل 500 نانو گرم/ میلی‌لیتر از DNA الگو، 1 میلی‌مولار از هر پرایمر، 3 میلی‌مولار از یون منیزیوم، 200 میلی‌مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر PCR 10X است. برنامه استفاده شده برای PCR به صورت حرارت اولیه در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه (یک سیکل)، مرحله دوم PCR متشکل از سی سیکل که هر سیکل شامل مرحله واسرشت(94 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، اتصال پرایمرها به DNA الگو (64 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، تکثیر ژن هدف (72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) بود. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه صورت پذیرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت رش (Roche) بر اساس دستور العمل آن انجام گرفت. برای کلون سازی ژن *tcpA* در پلاسمیدpGEX4T1 به ترتیب زیر عمل گردید. ابتدا محصول PCR با آنزیم‌های BamHI و XhoI برش داده شد و سپس در ناقل ذکر شده وارد گردید. پلاسمید فوق نیز با همین آنزیم‌ها برش داده شد. عمل اتصال ژن *tcpA* در این پلاسمید با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در حرارت 16 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب شبانه روز انجام گرفت. پلاسمید *tcpA* pGEX4T1 به ترتیب در سلول‌های مستعد اشریشیاکلی سویه DH5α و سویه BL21 وارد شد. برای تائید صحت ترادف نوکلئوتید ژن به دست آمده از محصول PCR ساختار پلاسمیدی*tcpA* pGEX4T1 به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید. به منظور تولید پروتئین TCPA ، پلاسمید *tcpA* -pGEX4T-1 در سویه BL21 اشرشیاکلی به وسیله شوک حرارتی وارد شد و بر روی محیط نوترینت آگارحاوی آمپی سیلین در غلظت 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کشت داده شد و در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد به صورت یک شبانه روز آنکوبه گردید. کلنی‌های رشد یافته بر روی این محیط در محیط نوترینت براث حاوی آمپی‌سیلین 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت یک شبانه روز کشت داده شد. سپس به منظور القاء پروتئین TCPA، حدود 500 میکرولیتر از باکتری‌های کشت داده شده به محیط القاء منتقل شد و در انکوباتور شیکر دار با دور rpm 24 قرار گرفت. پس از این که تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید (جذب نوری 0/6) از محلول یک میلی‌مولار IPTG به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. دو و چهار ساعت پس از افزودن IPTG رسوب باکتری‌ها با سانتریفیوژ در rpm 4000 به مدت 8 دقیقه به دست آورده شد. برای

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی نتیجه القاء از رسوب باکتری بر روی ژل 12 درصد SDS-PAGE الکتروفورز گردید. تخلیص پروتئین با استفاده از کیت گلوتاتیون S سفاروز بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن) 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 12 درصد SDS-PAGE بررسی شد. جهت تایید پروتئین TCPA از روش وسترن بلات استفاده شد. در این مطالعه از سرم خرگوش، موش و هم‌چنین سرم فرد وبایی استفاده گردید(18).

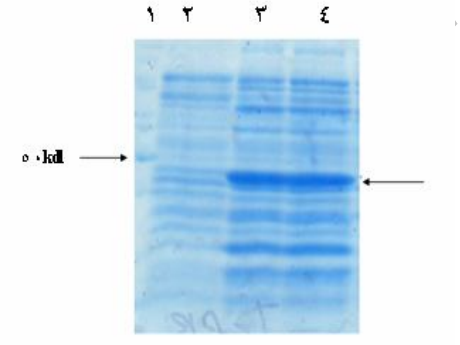
یافته‌ها

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری ویبریو کلرا برابر 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد گردید. کروموزوم از باکتری ویبریوکلرا تخلیص شد و به عنوان الگو برای تکثیر ژن *tcpA* مورد استفاده قرار گرفت. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر برابر 598 جفت باز بود. به منظور تایید ژن تکثیر یافته و نیز بررسی پرایمرهای طراحی شده، پلاسمید حاوی ژن مورد نظر به شرکت ارسال گردید. نتایج نشان داد که محصول PCR همولوژی با ژن مربوطه داشت. در این مطالعه با استفاده از باکتری(E.coli,BL21(DE3 پروتئین TCPA در محیط های القاء مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل 1).



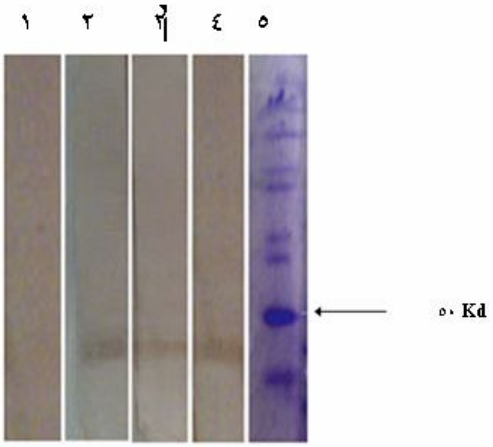
شکل 1. تصویر ژل القاءپروتئین
ستون شماره 1: مارکر، ستون شماره 2: نمونه پروتئین قبل از القاء در محیط نوترینت براث با گلوکز، ستون شماره 4 و 3: نمونه پروتئین بعد از القاءدر محیط نوترینت براث با گلوکز

پروتئین TCPA با وزن مولکولی 45/5 کیلو دالتون در محیط القاء مناسب، به وسیله کیت گلوتاتیون S ترانسفرازG.S.T تخلیص شد(شکل 2). جهت تعیین خاصیت آنتی ژنیسیته پروتئین مورد نظر و تایید نهایی پروتئین نوترکیب از وسترن بلات استفاده شد(شکل 3). باکتری E.coli,BL21(DE3) به علت نداشتن برخی از آنزیم‌های پروتئاز قادر است که میزان بالایی از پروتئین را بیان کند. با به کارگیری سیستم pGEX4T1 به عنوان یکی از قدرتمندترین وکتورهای بیان پروتئین، TcPA تولید گردید. وکتور بیان pGEX4T1 دارای یک منشاء همانند سازی F1 و پروموتور تریپتوفان است که با به کارگیری IPTG، پروتئین مربوطه القاء شد. وکتور بیان pGEX 4T1 دارای توالی پروتئینی ویژه‌ای به نام گلوتاتیون S ترانسفراز است که وزن مولکولی در حدود23 کیلو دالتون را به پروتین مورد نظر اضافه می‌کند. وزن خالص مولکولی پروتئین tcpA در حدود 21 کیلو دالتون است. پروتئین نوترکیب TCPA به نظر می‌رسد یک آنتی ژن مهم برای روش‌های سرولوژیکی در تشخیص بیماری وبا است.



شکل 2. تصویر تخلیص پروتئین
ستون شماره 1: مارکر، ستون شماره2: نمونه پروتئین قبل از القاء در محیط نوترینت براث با گلوکز، ستون شماره3: نمونه پروتئین بعد از القاء در محیط نوترینت براث با گلوکز، جایگاه شماره4: نمونه پروتئین تخلیص شده 50KD

www.SID.ir



شکل3:وسترن بلات پروتئین نوترکیب tcpA ویبریو کلره ستون1: کنترل منفی، ستون 2: وسترن بلات پروتئین نوترکیب با سرم موش ایمن شده، ستون 3: وسترن بلات پروتئین نوترکیب با سرم خرگوش ایمن شده، ستون 4: وسترن بلات پروتئین نوترکیب با سرم انسان ایمن شده، ستون 5: مارکر

بحث

در این مطالعه ژن پیلی A به وسیله PCR جدا شد. با به کارگیری وکتور بیان pGEX4T1 پروتئن TcPA با وزن مولکولی 45 کیلو دالتون تخلیص گردید. تخلیص پروتئین مربوطه در محیط‌های القاء گلوکز انجام گرفت. پروتئین TcPA به عنوان زیر واحد بزرگ پیلی هم تنظیم شونده با توکسین ویبریو کلرا در نظر گرفته شده است و شباهت زیادی به پیلی‌های تیپ 4 دارد(9). این زیر واحد پس از پردازش توسط پپتیداز *tcpJ* که در غشاء داخلی قرار دارد، توسط یک سری پروتئین‌های انتقالی به فضای پری پلاسمیک حرکت کرده و سپس توسط یک کانال ویژه‌ای به غشاء خارجی راه می‌یابند و *tcpA* تشکیل پیلی مشخصی در سطح باکتری می‌دهد(19). از بین پروتئین‌هایی که در تشکیل پیلی هم تنظیم شونده با توکسین شرکت دارند تنها تعدادی از آنها که در محدوده غشاء سلول باکتری قرار ندارند قادر به عکس العمل با آنتی بادی‌ها هستند که می‌توانند نقش حفاظتی را داشته باشند. به طوری که پروتئین‌های TcPA، TcPB و هم‌چنین TcP F، می‌توانند در معرض آنتی‌بادی‌ها قرار بگیرند(8). به نظر می‌آید اثرات حفاظتی آنتی‌بادی‌ها علیه *tcpA* از طریق کاهش میزان کلونیزاسیون ویبریوکلرا موثر باشد. طی مطالعاتی که بر روی مدل سنتتیک این پروتئین انجام گرفته است، نشان داده شده که پپتیدهای ساختگی از برخی مناطق TcPA، آنتی بادی‌های حفاظتی را در موش‌ها القاء می‌کند، این آنتی‌بادی‌ها به دانسیته بالایی از فیبرهای *tcp* متصل گشت(20). در مطالعه دیگری آنتی‌بادی‌های ضد *tcp* در خرگوش تولید گردید. تجویز این سرم در موش‌های آلوده به ویبریوکلرا نشان داد که تنها آنتی سرمی که حفاظتی بود، سرم ضد TcP A15 بوده است که با دانسیته بالا به TcP متصل می‌شود(5). در مطالعه تیلورو همکاران مشاهده شد که با ایجاد کردن نقص در پروتئین TcPA در حدود 50 درصد دوز کشنده این باکتری افزایش می‌یابد(21). در مطالعه دیگری ناحیه‌ای از پروتئین TcPA را شناسایی کردند که این نواحی دارای خاصیت حفاظتی موثری در موش‌های نوزاد بوده و به عنوان ترکیباتی در واکسن کشته شده پیشنهاد شده‌اند. این نواحی دارای خاصیت هیدروفیل هستند، به طوری که میزان تیتر آنتی بادی IgA در پاسخ‌های موکوسی بعد از 7 روز از مایع ژژونال قابل اندازه‌گیری است(22). بهترین پاسخ‌های ایمنی مطالعه شده پاسخ‌های ایمنی هومورال هستند و پاسخ‌های آنتی‌بادی عمومی و موکوسی می‌توانند مربوط به حفاظت باشند(25-23). پاسخ‌های سرولوژیکی مثل پاسخ آنتی‌بادی ویبریوسیدال وابسته به کمپلمان، پاسخ‌های آنتی‌بادی مربوط به لیپوپلی ساکارید (LPS) ویبریو، توکسین کلرا و پاسخ به پیلی هم تنظیم شونده با توکسین (*tcp*)، عامل کلونیزاسیون وآنتی ژن حفاظتی بالقوه، سبب افزایش پاسخ سلول ترشح کننده آنتی بادی (ASC)، مدفوعی و هم‌چنین آنتی‌بادی‌های پلاسما در بیماران می‌شود. پاتوژن ویبریو کلرا توانایی القاء پاسخ‌های ایمنی ضد باکتریایی و پاسخ‌های آنتی توکسیک عمومی و موکوسی را در بیماران دارد(26، 27) به طوری که واکسن‌های موثر باید چنین پاسخ‌هایی را القاء کنند. ایمنی در مقابل این بیماری به تحریک سیستم ایمنی موکوسی و نیز تولید IgA ترشحی (SIgA) در بافت لنفوئیدی مربوط به

Archive of SID

www.SID.ir

روده بستگی دارد به طوری که آنتی‌بادی‌ها بر روی سطوح موکوسی روده قرار گرفته و سلول‌های B یادگار فرد را از قرار گرفتن در برابر حمله بعدی محافظت خواهند کرد(28). آنتی‌بادی‌های IgA ترشحی در ترشحات موکوسی بیماران در برابرآنتی ژن‌های حفاظتی بزرگ مورد بررسی قرار گرفته‌اند(13). اثبات بیماری‌زایی پروتئین TcP طی مطالعاتی توسط هرینگتون 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(13). بنا بر نحوه آرایش پروتئین‌های تشکیل دهنده tcp، با توجه به احتمال در معرض قرارگیری این پروتئین‌ها از جمله TcPA و TcPB با مولکول‌های آنتی‌بادی، ما را وادار به انجام کلون کردن و بیان پروتئین مورد نظر کرد. در مطالعات انجام گرفته بر روی *tcpA* تاکنون توانسته‌اند این پروتئین را به صورت سنتتیک و یا به شکل مستقیم آن را از باکتری ویبریوکلرا جدا کنند. با توجه به اهمیت و ضرورت عملکرد *tcpA* در بیماری‌زایی ویبریو کلرا بر آن شدیم که بتوانیم با تولید این پروتین گامی موثر در زمینه ایمونوژنیسیته و طراحی واکسن در مطالعات بعدی برداریم. در این مطالعه سعی بر این شد تا با تولید این پروتئین به صورت نوترکیب زمینه‌ای را در جهت بیان موثر این پروتئین، با صرف هزینه‌های کمتر فراهم کنیم. در مطالعه حاضر، پروتین TcPA در باکتری اشرشیاکلی سویه BL21 بیان شد. وزن مولکولی پروتئین الحاقی G.S.T گلوتاتیون S ترانسفرازدر حدود 20 کیلو دالتون است که این توالی پروتئینی در پلاسمید pGEX4T1 که در این تحقیق برای تولید پروتئین نوترکیب TcPA استفاده گردیده است به ابتدای این پروتین اضافه شد. بنابراین وزن پروتئین تولید شده در حدود 40/5 کیلو دالتون است. پروتئین TcPA تحت کنترل اپراتور Trp تولید شد، این پروتئین توانست پایداری خود را در فضای سیتوپلاسمی باکتری E.coli به واسطه پروتئین‌های الحاقی حفظ کند. اتصال این دو پروتئین به یکدیگر مانع از تخریب پروتئین نوترکیب TcPA، توسط پروتئازهای داخل سلولی باکتری E.coli شد. هدف از این کار بررسی کردن خاصیت آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب TcPA بود و در نهایت تولید کردن واکسن‌های کاملاً موثر با توجه به اهمیت بیماری‌زایی پروتین مورد نظر (TcPA) می‌باشد و نیز فراهم آوردن یک ایمنی مناسب در برابر کلونیزاسیون ویبریو کلرا در روده است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد با به کارگیری میزبان‌های مناسبی مانند E.Coli Bl21 که فاقد آنزیم‌های پروتئازی هستند و هم‌چنین با به کار بردن وکتورهایی مثل pGEX 4T1 به علت دارا بودن پروتئین‌های الحاقی با وزن مولکولی پایین، پروتئین نوترکیب بدون تاثیر در عملکرد آن در داخل باکتری E-coli حفظ می‌شود. این تحقیق نشان داد با توجه به تشابه آنتی‌ژنیک بین فرم طبیعی و نوترکیب تولید شده می‌توان از پروتئین‌های نوترکیب برای بررسی روند عفونت‌های ناشی از ویبریوکلره استفاده نمود و با بررسی کردن خاصیت ایمونوژنیسیته گامی موثر در جهت تولید و طراحی واکسن بر علیه بیماری وبا بر داشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از ریاست محترم مرکز تحقیقات و معاونت آموزش و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک به لحاظ تامین اعتبار این طرح قدردانی می‌شود.

منابع

1. Nguyen DT, Ngo TC, Tran HH, Le TH, Nguyen HT, Nguyen BM, et al. Characterization of Vibrio cholerae O139 of an Aquatic Isolate in Northern Vietnam. The open microbiology journal. 2012; 6:14.
2. Janda J, Powers C, Bryant R, Abbott S. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant Vibrio spp. Clinical Microbiology Reviews. 1988; 1(3): 245-67.
3. Butler SM, Camilli A. Going against the grain: chemotaxis and infection in Vibrio

Archive of SID
www.SID.ir

cholerae. Nature Reviews Microbiology. 2005;3(8):611-20.
4. Ehara M, Ishibashi M, Ichinose Y, Iwanaga M, Shimotori S, Naito T. Purification and partial characterization of fimbriae of Vibrio cholerae O1. Vaccine. 1987;5(4):283-8.
5. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1987; 84(9): 2833-7.
6. Ramamurthy T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Vibrio cholerae O139 Bengal: odyssey of a fortuitous variant. Microbes and infection. 2003; 5(4): 329-44.
7. Kaper JB, Glenn JR, and Levine MM. Cholera. Clin Microb. 1995;8(1):48–86.
8. Taylor RK, Kirn TJ, Bose N, Stonehouse E, Tripathi SA, Kováč P, et al. Progress towards development of a cholera subunit vaccine. Chemistry & biodiversity. 2004;1(7):1036-57.
9. Chen LY, Chen DY, Miaw J, Hu NT. XpsD, an outer sequence and comparison of predicated protein structural features to those of type 4 pilins. Infect. Immun.1996, 58:3042-9.
10. West PA, Colwell RR. Identification and classification of Vibrionaceae-an overview. Vibrios in the Environment. 1984:285-363.
11. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 1996; 272(5270):1910-4.
12. Pal B, Khuntia H, Samal S, Kar S, Patnaik B. Epidemics of severe cholera caused by El Tor Vibrio cholerae O1 Ogawa possessing the ctx B gene of the classical biotype in Orissa, India. International Journal of Infectious Diseases. 2010; 14(5):e384-e9.
13. Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor R, Levine MM. Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR regulon are essential for Vibrio cholerae pathogenesis in humans. The Journal of experimental medicine. 1988;168(4):1487-92.
14. Strom M, Lory S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. Annual Reviews in Microbiology. 1993;47(1):565-96.
15. LaPointe CF, Taylor RK. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. Journal of Biological Chemistry. 2000; 275(2):1502-10.
16. Chaparro AP, Ali SK, Klose KE. The ToxT-dependent methyl-accepting chemoreceptors AcfB and TcpI contribute to Vibrio cholerae intestinal colonization. FEMS microbiology letters. 2010; 302(2):99-105.
17. Sarkar A, Nandy RK, Nair GB, Ghose AC. Vibrio pathogenicity island and cholera toxin genetic element-associated virulence genes and their expression in non-O1 non-O139 strains of Vibrio cholerae. Infection and immunity. 2002; 70(8):4735-42.
18. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual: CSHL press; 2001.
19. Martin PR, Watson AA, McCaul TF, Mattick JS. Characterization of a five-cluster required for the biogenesis of type 4 fimbriae in Pseudomonas aeruginosa. Molecular microbiology. 1995; 16(3):497-508.
20. Taylor RK, Kirn TJ, Meeks MD, Wade TK, Wade WF. A Vibrio cholerae classical TcpA amino acid sequence induces protective antibody that binds an area hypothesized to be important for toxin-coregulated pilus structure. Infection and immunity. 2004;72(10):6050-60.
21. Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1981;78(6):3824-8.
22. Jertborn M, Svennerholm AM, Holmgren J. Intestinal and systemic immune responses in humans after oral immunization with a bivalent B subunit-O1/O139 whole cell cholera vaccine. Vaccine. 1996;14(15):1459-65.
23. Svennerholm AM, Gothefors L, Sack DA, Bardhan P, Holmgren J. Local and systemic antibody responses and immunological memory in humans after immunization with cholera B subunit by different routes. Bulletin of the World Health Organization. 1984;62(6):909-18.
24. Svennerholm AM, Jertborn M, Gothefors I, Karim A, Sack DA, Holmgren J. Mucosal antitoxic and antibacterial immunity after cholera disease and after immunization with a

Archive of SID

www.SID.ir

combined B subunit-whole cell vaccine. Journal of Infectious Diseases. 1984; 149(6):884-93.
25. Qadri F, Khan AI, Faruque A, Begum YA, Chowdhury F, Nair GB, et al. Enterotoxigenic Escherichia coli and Vibrio cholerae diarrhea, Bangladesh, 2004. Emerg Infect Dis. 2005; 11(7):1104-7.
26. Walker RI, Van De Verg LL, Hall RH, Schmitt CK, Woo K, Hale V. Enteric vaccines for pediatric use: Workshop summary. Vaccine. 2005; 23(46):5432-9.
27. Jertborn M, Svennerholm A, Holmgren J. Saliva, breast milk, and serum antibody responses as indirect measures of intestinal immunity after oral cholera vaccination or natural disease. Journal of clinical microbiology. 1986;24(2):203-9.
28. Lycke N, Holmgren J. Intestinal mucosal memory and presence of memory cells in lamina propria and Peyer's patches in mice 2 years after oral immunization with cholera toxin. Scandinavian journal of immunology. 1986; 23(5):611-6.

Archive of SID

www.SID.ir