مقاله اصیل

کلون، بیان و تخلیص مایکولیل ترانسفراز C مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در میزبان پروکاریوتی

هانیه آقابابا[1]، اشرف محبتی‌مبارز[2*]، مهرداد بهمنش[3]، نیما خرم‌آبادی[4]، مهدی نجاتی[5]

۱- کارشناس ارشد، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- سرپرست بخش واکسن‌های باکتریایی، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور، انستیتو پاستور ایران، البرز، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، گروه باکتری‌شناسی
Email:mmmobarez@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۰۳/۰۴ پذیرش مقاله: ۹۰/۰۹/۱۶

چکیده

هدف: کمپلکس آنتی‌ژن ۸۵ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل سه پروتئین ترشحی است که خاصیت ایمنی‌زایی دارند. این پروتئین‌ها کاندیداهای مهمی در طراحی واکسن سل هستند. برای استفاده از این پروتئین‌ها به‌عنوان واکسن‌های زیرواحدی یا به‌عنوان یادآور برای BCG نوترکیب یا واکسن‌های DNA، تولید آنتی‌ژن‌های پروتئینی به شکل نوترکیب الزامی است. پروتئین‌های مایکوباکتریوم که در دیواره هستند نسبتاً غیرقطبی است و تولید آن‌ها به شکل نوترکیب در سویه بیانی اشریشیا کلی با پروتئین‌های دیگر متفاوت است. هدف از این مطالعه تولید و تخلیص آنتی‌ژن نوترکیب 85C به‌عنوان یک ایمنوژن است.

مواد و روش‌ها: آنتی‌ژن 85C در حامل پلاسمیدی pJET1.2 و در نهایت در pET32a(+) کلون و در هر دو پلاسمید تعیین توالی شد. القای تولید پروتئین با IPTG صورت گرفت و تخلیص با حل کردن اجسام توده‌ای داخل سلولی در اوره، جذب با رزین نیکل، حذف اوره با شیب کاهشی اوره در محلول‌های شستشو و در نهایت جمع‌آوری پروتئین نوترکیب به شکل محلول انجام شد. تأیید آنتی‌ژنیک پروتئین نوترکیب با وسترن بلات و توسط آنتی‌بادی ضد پلی‌هیستیدین، آنتی سرم پلی‌کلونال خرگوشی ضد مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و سرم بیمار سلی بستری انجام شد.

نتایج: ژن آنتی‌ژن 85C با موفقیت کلون و با تعیین توالی تأیید شد. آنتی‌ژن 85C در میزبان اشریشیا کلی بیان و تخلیص شد.

نتیجه‌گیری: نتایج وسترن بلات به موازات نتایج تعیین توالی نشان دهنده درستی تولید پروتئین آنتی‌ژن 85C نوترکیب و حفظ نسبی ساختار اپی‌توپی آن است.

کلیدواژگان: کمپلکس آنتی‌ژن ۸۵، آنتی‌ژن 85C، واکسن سل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۱-۱۲

مقدمه

توبرکلوزیس (Tuberculosis) یک بیماری قدیمی است که به‌عنوان یک معضل بهداشتی در سراسر جهان به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه مطرح است. ۱/۳ میلیارد نفر از جمعیت جهان با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis*) آلوده هستند و سالانه منجر به مرگ حدود ۲ میلیون نفر می‌شود [۱]. در ۹۰ درصد از افراد، عفونت به‌صورت نهفته باقی مانده و در ۱۰ درصد باقی

Archive of SID
www.SID.ir

بیماری به فرم فعال بروز می‌کند. هرچند کـه بیـشتر آلـودگی و مرگ و میر سل مربوط به کشورهای توسـعه نیافتـه و در حـال توسعه است، اما در سال‌های اخیر با شیوع بیمـاری‌هـای تـضعیف کنندهٔ سیستم ایمنی مثل ایدز (Acquired Immunedeficiency Syndrome: AIDS)، پیـدایش سـویه‌هـای مایکوبـاکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به آنتی‌بیوتیک و عدم کارایی واکسن BCG در بزرگسالان، این بیمـاری در کـشورهای پیـشرفته نیـز رشـد داشته است. بنابراین تلاش برای دستیابی و گـسترش ابزارهـای پیشگیری و درمان سل یک ضرورت جهـانی اسـت. مـؤثرترین گام در طراحی استراتژی نوین پیشگیری از این بیمـاری، انجـام مطالعات در راستای طراحی واکسن‌های مناسب است که بـرای این منظور شناسایی و بررسی انواع آنتی‌ژن‌های باکتری از نظـر قدرت ایمنی‌زایی ضروری است [۲].

یکی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌هـای ایـن بـاکتری پـروتئین هـای کمپلکس ۸۵ است. این مجموعه از سه پروتئین ترشحی مـشابه با نام‌های آنتی‌ژن 85A، 85B، 85C تـشکیل شـده و عملکـرد مایکولیل ترانـسفرازی (Mycolyl Transferase) داشـته و در سنتز دیواره باکتری نقش اساسی ایفا می‌نماید. این آنـزیم اسـید مایکولیـک (Mycolic Acids) را از یـک تـری‌هـالوز ٦- مونومایکولات (Trehalose-6-monomycolate) به دیگـری انتقال داده و منجر به تـشکیل تـری‌هـالوز ٦-´٦-دی‌میکـولات (Trehalose 6,6'-dimycolate) یـا همـان فـاکتور طنـابی می‌شود [۳، ٤]. این پروتئین‌ها به‌وسیله ۳ ژن جداگانه کد شـده و از لحاظ توالی (٦٨-٩٧ درصد) شباهت دارند. ایـن آنـزیم‌هـا جـزو فـراوان‌تـرین پـروتئین‌هـای ترشـحی مایکوبـاکتریوم توبرکلوزیس است که در مرحله اولیه بیماری ترشح می‌شـود و به فراوانی در ماکروفاژهای آلوده به این باکتری یافت مـی‌شـود [٥]. این مطلب تأیید می‌کند که این پروتئین‌ها نقش حیـاتی در فیزیولوژی و بیماری‌زایی مایکوباکتریوم توبرکلـوزیس دارد. بـه تازگی مشخص شده است که پروتئین C از ایـن کمـپلکس در اتـصال کـووالانتی اسـید مایکولیـک بـه آرابینوگالاکتـان (Arabinogalactan) نقـش مهمـی دارد [۳، ٦، ۷]. توانـایی ایجاد ایمنی حفاظت کننـده، ایـن آنتـی‌ژن‌هـا را بـه کاندیـدای مناسب برای تولید واکسن بر علیـه بیمـاری سـل تبـدیل کـرده است [۸، ۹]. همچنین این پروتئین‌ها به‌عنوان هدف در طراحـی داروهای ضد مایکوباکتریومی بسیار مورد توجه محققـین قـرار گرفته است [۱۰-۱۲]. از آن‌جایی که برای پیشگیری یـا درمـان بیماری سل، عامل ایمنـی‌زا بایـد توانـایی تحریـک پاسـخ‌هـای سـلولی را داشـته باشـد [۱۳]، از ایـن پـروتئین در تولیـد واکسن‌های DNAی نوترکیب و نیز سویه‌های نوترکیب BCG استفاده شده و تولید خود پروتئین در مقیاس بالا مطـرح نبـوده اسـت. نتـایج تحقیقـات اخیـر بـر اسـتفاده از سـویه BCG یـا سویه‌های نوترکیـب BCG بـه‌عنـوان واکـسن اولیـه و تزریـق آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم به‌عنوان یـادآور تأکیـد دارد [١٤]. از طرفی استفاده از خود آنتی‌ژن‌هـای نوترکیـب بـه‌عنـوان عامـل ایمنی‌زایی مطرح است. از این رو تولید آنتی‌ژن‌هـای پروتئینـی به‌صورت نوترکیب بـرای اسـتفاده در فرآینـدهای ایمـن‌سـازی مورد توجه قرار گرفته است [۱٥، ١٦].

جایگاه سلولی آنتی‌ژن 85C در دیواره مایکوباکتریوم است که محیطی به شدت آب‌گریز است. آنتی‌ژن 85C همانند سـایر ترکیبات موجود در دیواره، خصوصیاتی غیرقطبی از خود نشان می‌دهد که بررسی‌های آزمایشگاهی و نیز بیواینفورماتیکی ایـن مطلب را تأیید می‌نماید [٤، ۱۷]. تولید پـروتئین‌هـای آب‌گریـز به‌صورت نوترکیـب و اسـتخراج و تخلـیص متعاقـب آن‌هـا از زمینه‌های چالش برانگیز است و تفاوت‌های بسیاری با تخلیص انواع پروتئین‌هـای محلـول دارد. از ایـن‌رو، تولیـد و تخلـیص پروتئین‌هایی از این دست به ابداع استراتژی‌های خاصی هم در سطح طراحی و هم در مورد خالص‌سازی نیاز دارنـد. تولیـد و تخلیص آنتی‌ژن 85Cی مایکوباکتریوم توبرکولـوزیس پـیش از این گزارش نشده ولی در مورد آنتـی‌ژن 85A و آنتـی‌ژن 85B گزارش‌هایی وجود دارد [۱۸-۲۰].

هدف ایـن مطالعـه، کلـون ژن آنتـی‌ژن 85C از کمـپلکس پروتئینی آنتی‌ژن ۸۵ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ساخت یـک پلاسمید نوترکیب با توانـایی بیـان پـروتئین 85C، تولیـد و در

Archive of SID

www.SID.ir

نهایت تخلیص این پروتئین نوترکیب است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، ناقل‌ها و آنزیم‌ها

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) GM2163 و اشریشیا کلی Rosetta gami به‌ترتیب به‌عنوان میزبان‌های تکثیری و بیانی استفاده شد. پلاسمید pJET1.2 از کیت CloneJET™ ساخت شرکت Fermentas و پلاسمید pET32a(+) (Novagen) برای کلون ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم‌های محدودالاثر *Sac*I و *Hind*III شرکت Fermentas و T4 DNA لیگاز شرکت TaKaRa استفاده شد. از آنزیم PrimSTAR®HS DNA Polymerase شرکت TaKaRa برای تکثیر قطعه ژن هدف از ژنوم باکتری با PCR استفاده شد که قدرت تصحیح خطای بسیار بالایی دارد.

استخراج DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

چند کلونی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس سویه H37Rv در یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) وارد و پس از افزودن مقداری پارافین مایع (برای جلوگیری از آئروسل (Aerocol) شدن باکتری) باکتری‌ها با حرارت غیرفعال شدند. مخلوط حاصل سانتریفوژ و رسوب حاصل دو بار با PBS شستشو داده شد. جسم سلولی باکتری‌ها در ۲۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl ۰/۱ مولار با pH: ۸ به شکل سوسپانسیون در آمد. سوسپانسیون باسیل سل ٤ مرتبه با استفاده از نیتروژن مایع و حمام آب گرم (٥٦ درجه سانتی‌گراد) منجمد و ذوب شد. برای جدا کردن پارافین و نیز ترکیبات آب‌گریز دیواره باکتری، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه و پس از ورتکس (Vortex)، در دور g× ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز آلی که حاوی کلروفرم و بخشی از چربی‌های دیواره سلول است با دقت خارج و این عمل دو نوبت دیگر تکرار شد. در انتها، میکروتیوب در ٦۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا باقی مانده کلروفرم نیز خارج شود. ۵ میلی‌گرم لیزوزیم به محتوای درون میکروتیوب اضافه و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٦ ساعت قرار داده شد. سپس ۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر آنزیم پروتئیناز K افزوده و ۵ ساعت در ٥٦ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شد. پس از تیمار پروتئیناز K، استخراج ژنوم با استفاده از کیت Genome AccPure kit (Bioneer) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

آغازگرها (Primers) و شرایط PCR

توالی‌های ثبت شده ژن آنتی‌ژن 85C مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در بانک ژنی، از پایگاه NCBI (National Center for Biotechnology Information) اخذ و توسط نرم‌افزار VectorNTI 11 بررسی شد. یک جفت آغازگر برای تکثیر کل ناحیهٔ کد کننده این ژن بر اساس پلاسمید بیانی pET32a(+) (شکل ۱) طراحی شد که عبارتند از:

آغازگر بالادست:

H85CF:
5’AAA**GAGCTC**ATGACGTTCTTCGAACAGGTGCG3’

و آغازگر پایین‌دست:

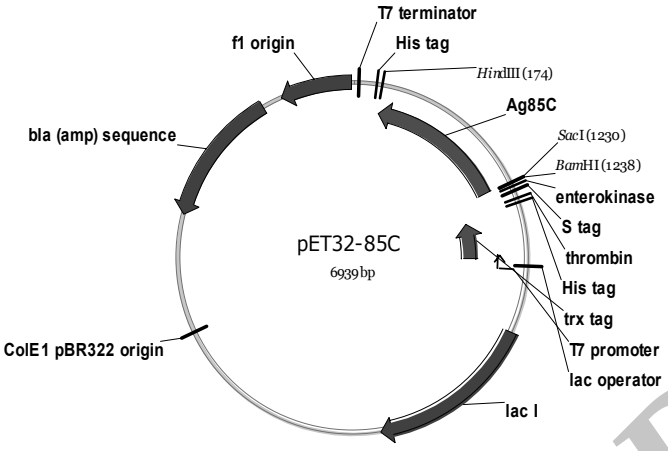
H85CR:
5’AAA**AAGCTT**TGCTGCCGATGCTGGCTTGCTGGCTC3’

جایگاه برش برای آنزیم sacI در انتهای ’5 آغازگر بالادست و جایگاه برش برای آنزیم *Hind*III در انتهای ’5 آغازگر پایین‌دست طراحی شد (حروف پررنگ).

تکثیر ژن مورد نظر با PCR توسط آنزیم PrimSTAR®HS انجام گرفت. واکنش با برنامه دمایی شامل ۹۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۵ دوره شامل ۹۸ درجه سانتی‌گراد (۱۰ ثانیه)، ٦۱ درجه سانتی‌گراد (۱۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱ دقیقه) و در نهایت یک مرحله ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱ نقشه پلاسمید pET32a-85C

کلون آنتی‌ژن 85C

محصول تکثیر ژن پروتئین 85C (۱۰۲۳ جفت‌باز) بعد از تکثیر با آنزیم PrimSTAR®HS و خالص‌سازی از روی ژل آگارز، در پلاسمید pJET1.2 طبق دستور کیت CloneJET™ الحاق و محصول واکنش الحاق به باکتری اشریشیا کلی GM2163 انتقال داده شد. غربالگری پلاسمیدهای حاوی ژن مورد نظر تحقیق حاضر با روش کلونی PCR و با استفاده از آغازگرهای عمومی pJET1.2 و در نهایت آغازگرهای اختصاصی آنتی‌ژن 85C. با هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب، کلون شدن ژن آنتی‌ژن 85C در پلاسمید pJET1.2 تأیید شد. تأیید نهایی پلاسمیدهای نوترکیب، با تعیین توالی انجام گرفت. نتایج تعیین توالی آن‌ها با نرم‌افزار Vector NTI Advanced™ 11.0 (Invitrogen) بررسی و با توالی‌های مرجع مقایسه شد.

قطعه ژن آنتی‌ژن 85C با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Sac*I و *Hind*III از pJET1.2 خارج و بعد از خالص‌سازی داخل pET32a(+) که توسط همین دو آنزیم بریده و سپس خالص شده بود، مجدداً با واکنش الحاق وارد شد. پلاسمیدهای نوترکیب (pET32a-85C) به باکتری اشریشیا کلی GM2163 منتقل و کلون‌های نوترکیب از طریق PCR روی کلونی با آغازگرهای اختصاصی آنتی‌ژن 85C غربالگری شد. تأیید نهایی پلاسمیدهای نوترکیب pET32a(+) با هضم آنزیمی و تعیین توالی مجدد (همان‌طور که قبلاً شرح داده شد) انجام گرفت.

بیان وخالص‌سازی پروتئین نوترکیب آنتی‌ژن 85C (rAg85C)

پلاسمید نوترکیب pET32a-85C به میزبان بیانی اشریشیا کلی Rosetta Gami انتقال داده شد. باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (RG-85C) در محیط مایع 2XYT حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین (Ampicillin)، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین (Kanamycin)، ۳٤ میکروگرم در میلی‌لیتر کلرآمفنیکل (Chloramphenicol) و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تتراسایکلین (Tetracycline) تلقیح و یک شب (حدود ۱۸ ساعت) در انکوباتور با حرکت دورانی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. از این کشت شبانه برای تلقیح محیط مایع 2XYT حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین استفاده شد. محیط مذکور در انکوباتور با حرکت دورانی قرار گرفت و زمانی که کدورت محیط در طول موج ٦۰۰ نانومتر به حدود ۰/٦ رسید، پلاسمیدهای نوترکیب با ۱ میلی‌مولار ایزوپروپیل- بتا- دی- تیوگالاکتوپیرانوزید (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside: IPTG) القا شد. سه نمونه در زمان‌های صفر تا سه از باکتری‌های القا شده گرفته و برای بررسی

Archive of SID
www.SID.ir

میزان بیان پروتئین در زمان‌های مختلف با SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) در ژل ۱۲/۵ درصد و رنگ‌آمیزی شده با کوماسی G-250 (Coomassie blue G250) ارزیابی شد.

سلول‌های کشت RG-85C در ساعت‌های یک تا سه پس از القا جمع‌آوری و رسوب داده شدند. رسوب باکتری‌های مذکور بعد از شستشو با بافر فسفات نمکی، در بافر تخریب (۵۰ میلی‌مول NaH_2PO_4، ۳۰۰ میلی‌مول NaCl، ۱۰ میلی‌مول ایمیدازول (Imidazole) و PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride) با pH: ۸) به شکل سوسپانسیون در آمد و در سه نوبت 5 دقیقه‌ای با فرکانس ۰/٦ ثانیه تحت اثر امواج فراصوت قرار گرفت تا سلول‌ها به‌طور کامل متلاشی شوند. در مرحله بعد، برای جداسازی اجسام جامد از فاز مایع، لیزات سلولی در g ۱۸۰۰۰ برای مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. یک نمونه از مایع رویی و یک نمونه از رسوب حاصل برای ردیابی پروتئین نوترکیب به‌وسیله SDS-PAGE بررسی شد.

برای تولید پروتئین نوترکیب rAg85C، یک کشت شبانه از باکتری RG-85C به شکلی که قبلاً شرح داده شد تهیه و از آن برای تلقیح ۱ لیتر محیط تازه 2XYT استفاده شد. بعد از اینکه باکتری‌ها به کدورت مناسب رسیدند با ۱ میلی‌مول IPTG القا و سه ساعت پس از آن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از طی شدن این زمان، سلول‌های باکتری با سانتریفوژ در g ۹۰۰۰ جمع‌آوری و با بافر فسفات نمکی شستشو داده شدند. سلول‌های باکتری در بافر B (۱۰۰ میلی‌مول NaH_2PO_4، ۱۰ میلی‌مول Tris-Cl و ۸ مول اوره؛ pH: ۸/۵) حل و پس از انتقال به ستون، با بافر C (۱۰۰ میلی‌مول NaH_2PO_4، ۱۰ میلی‌مول Tris-Cl و ۸ مول اوره؛ pH: ۸/۵) شستشو داده شدند. حذف اوره با استفاده از بافرهای حاوی شیب کاهشی غلظت اوره (۸، ٦، ٤، ۲، ۱ و ۰ مولار اوره) انجام و در نهایت پروتئین‌ها با استفاده از محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار از ستون جدا و جمع‌آوری شدند. برای حذف ایمیدازول، محلول پروتئینی در برابر بافر فسفات نمکی (pH: ۷/٤) به‌مدت یک شب دیالیز شد. میزان پروتئین با روش اسپکتروفوتومتری تعیین و مقدار کل پروتئین محلول خالص شده از یک لیتر کشت باکتری محاسبه شد.

وسترن بلات (Western Blot)

پروتئین نوترکیب از ژل SDS-PAGE با سیستم انتقال نیمه خشک (Bio-Rad) به کاغذ پلی‌وینیلیدین دی‌فلورید (Polyvinylidene Fluoride: PVDF) توسط دستگاه بلات Bio-Rad در شرایط نیمه خشک منتقل شد. برای کنترل انتقال پروتئین از رنگ پانسو S (Ponceau S) استفاده و غشا به‌صورت نوارهای نازک حاوی پروتئین منتقل شده بریده شد. مسدودسازی غشای PVDF با محلول آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) ۵ درصد به‌مدت ۱ ساعت انجام گرفت. در مرحله بعد سه غشای جداگانه با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال (Polyclonal Antibodies) خرگوشی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس H37Rv (۱:۵۰۰۰)، آنتی‌بادی بر علیه 6His-tag (۱:۱۰۰۰۰) و سرم بیمار بستری (۱:۲۰۰۰) مبتلا به سل به‌مدت ۲ ساعت مجاور شدند. شستشو با بافر تریس نمکی محتوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (Tris-Buffered Saline with Tween: TBS-T) انجام شد غشاها با آنتی‌بادی‌های ثانویه (موش ۱:۱۰۰۰۰، خرگوش ۱:۱۰۰۰۰ و انسان ۱:۵۰۰۰) برای مدت ۲ ساعت مجاور شدند. غشاها پس از شستشو با محلول سوبسترای کمیلومینسانت (Chemiluminescent Substrate) تحت شرایط استاندارد مجاور شده و بلافاصله باندهای فلورسنت روی غشاهای رادیوگرافی ثبت و ظاهر شد.

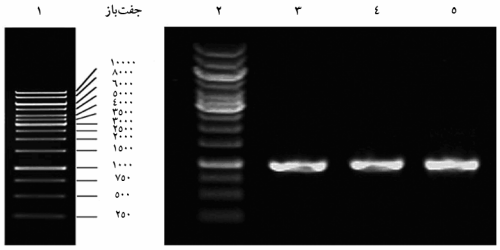
نتایج

کلون‌سازی و تعیین توالی آنتی‌ژن 85C

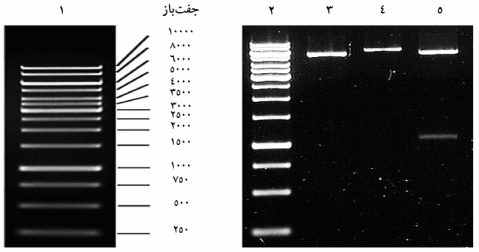
برای جلوگیری از هر گونه تغییر، ژن پروتئین 85C با ۱۰۲۳ جفت‌باز به‌وسیله آنزیم PrimSTAR® HS DNA

Archive of SID
www.SID.ir

Polymerase که دارای قدرت تصحیح خطای بسیار بالایی است تکثیر شد (شکل ۲). به دلیل اضافه شدن توالی‌های شناسایی کننده آنزیم‌های *Sac*I و *Hind*III و سه نوکلئوتید اضافی به‌عنوان دستگیره آنزیمی در دو طرف (جهت کمک به هضم آنزیمی مستقیم در صورت نیاز)، اندازه محصول PCR ۱۰۴۱ جفت‌باز است.



شکل ۲ تکثیر ژن مایکولیل ترانسفراز C با آنزیم PrimSTAR® HS DNA polymerase؛ ۱) تصویر استاندارد راهنمای اندازه DNA، ۲) راهنمای اندازه DNA، ۳، ٤، ٥) محصول تکثیر ژن مایکولیل ترانسفراز C

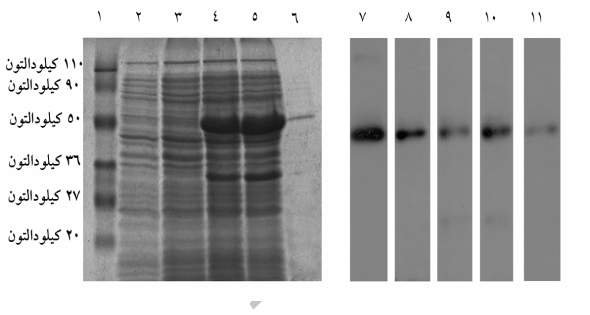


شکل ۳) نتیجه هضم آنزیمی حامل بیانی pET32a-85C؛ ۱) تصویر استاندارد راهنمای اندازه DNA، ۲) راهنمای اندازه DNA، ۳) هضم تک آنزیمی پلاسمید pET32a(+) با آنزیم *Hind*III، ٤) هضم تک آنزیمی پلاسمید pET32a-85C با آنزیم *Hind*III که حدود ۱ کیلوباز سنگین‌تر از پلاسمید خالی است. ٥) هضم دو آنزیمی پلاسمید pET32a-85C با آنزیم *Hind*III و *Sac*I که خروج قطعه ۱ کیلوبازی را نشان می‌دهد.

محصول PCR با موفقیت در پلاسمید pJET1.2 کلون شد. هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pJET-85C و تعیین توالی درستی کلون شدن ژن پروتئین 85C را تأیید می‌نماید. مقایسه نتایج تعیین توالی با توالی‌های مرجع نشان داد که هیچ‌گونه تغییر و جهشی در این قطعه ژن کلون شده روی نداده است. کلون ژن آنتی‌ژن 85C در pET32a(+) نیز با موفقیت کلون شد. هضم آنزیمی الحاق ژن آنتی‌ژن 85C در این پلاسمید را تأیید و تعیین توالی نیز درستی آن را تأیید نمود (شکل ۳).

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب آنتی‌ژن 85C

نتایج SDS-PAGE، بیان یک پروتئین در محدوده باند ۵۰ کیلودالتونی راهنمای وزنی را نشان می‌دهد که با وزن مولکولی حدود ۵۵ کیلودالتون پیش‌بینی شده همخوانی دارد (شکل ۱). وزن خود پروتئین آنتی‌ژن 85C حدود ۳۵ کیلودالتون است و اضافه شدن تایوردوکسین (Thioredoxin) به ابتدای آن توسط pET32a(+) موجب افزایش ۱۹ کیلودالتونی آن شده است. میزان بیان پروتئین‌ها بین ساعت اول و سوم تفاوت قابل ملاحظه‌ای نشان نمی‌دهد. با بررسی مایع رویی و رسوب حاصل از تخریب سلول‌ها با روش فراصوت باکتری‌ها با SDS-PAGE مشخص شد که بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب به‌صورت ذرات جامد غیرمحلول (اینکلوژن: Inclusion) در فاز رسوبی قرار دارد. بررسی الکتروفورتیک نتایج تخلیص rAg85C نشانگر خلوص قابل توجه این پروتئین است (شکل ٤).



شکل ٤ نتایج بیان، تخلیص پروتئین و وسترن بلات آنتی‌ژن 85C؛ **چاهک ۱)** راهنمای وزنی پروتئین، **چاهک ۲)** سویه اشریشیا کلی Rosetta gami حاوی پلاسمید pET32a(+) القا نشده، **چاهک ۳)** سویه اشریشیا کلی RG القا نشده ساعت صفر، **چاهک ٤)** سویه اشریشیا کلی RG القا شده ساعت اول، **چاهک ٥)** سویه اشریشیا کلی RG القا شده ساعت سوم، **چاهک ٦)** ۲۰ میکروگرم از پروتئین تخلیص شده نهایی، **چاهک ۷)** وسترن بلات با آنتی‌بادی ضد ساختار پلی‌هیستیدین، **چاهک ۸)** وسترن بلات با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی، **چاهک ۹، ۱۰، ۱۱)** وسترن بلات با آنتی‌بادی سه بیمار مبتلا به سل

www.SID.ir

براساس اندازه‌گیری با روش اسپکتروفتومتری، به‌دست آوردن پروتئین محلول از یک لیتر کشت باکتری میزبان ٦/٥ میلی‌گرم تعیین شد.

نتایج وسترن بلات نشان می‌دهد rAg85B توسط آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی، آنتی‌بادی علیه بخش پلی‌هیستیدین و سرم بیمار قابل شناسایی است (شکل ٤). جمع بین نتایج آزمون وسترن و تعیین توالی ژن آنتی‌ژن 85C تأیید کننده کل فرآیند است.

بحث

بیماری سل و عامل ایجاد کننده آن، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، به‌عنوان یکی از معضلات پیچیده سلامت، محققین را وادار به انجام تحقیقات گسترده‌ای در زمینه پیشگیری و درمان این بیماری کرده است [٢١، ٢٢]. ایمنی‌زایی تعداد زیادی از ترکیبات سلولی باسیل سل به‌عنوان کاندیدای واکسیناسیون علیه آن مورد بررسی قرار گرفته و مطالعات گسترده‌ای در زمینهٔ DNA واکسن‌ها و BCG نوترکیب و واکسن‌های زیرواحدی انجام شده است [١٦]. یافته‌های اخیر نشان داده است که استفاده از DNA واکسن‌ها یا BCG نوترکیب به همراه یک یادآور پروتئینی به‌طور موفقیت‌آمیزی می‌تواند سبب تحریک سیستم ایمنی شود. از سوی دیگر، توانایی برخی آنتی‌ژن‌های پروتئینی به شکل نوترکیب، به تنهایی یا در ترکیب با پروتئین‌های دیگر و ادجوانت‌های (adjuvants) مختلف در ایجاد پاسخ‌های ایمنی حفاظتی گزارش شده است [١٦، ٢٣-٢٥]. استفاده از ترکیبات پروتئینی به‌عنوان عامل ایمنی‌زا یا یادآور مستلزم تولید آنتی‌ژن‌های پروتئینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به‌صورت نوترکیب است. پروتئین‌های کمپلکس آنتی‌ژن‌های ٨٥ کیلودالتونی، فراوان‌ترین پروتئین‌های ترشحی از این باکتری است که در سنتز دیواره نقش مهمی دارد و خاصیت ایمنی‌زایی آن‌ها در خوکچه هندی گزارش شده است. این سه پروتئین (آنتی‌ژن 85A، آنتی‌ژن 85B، آنتی‌ژن 85C) کاندیدای خوبی برای طراحی واکسن، تشخیص و درمان بیماری سل هستند [٢٦-٣٠].

مایکوباکتریوم‌ها به‌طور کلی از نظر ساختار دیواره سلولی تفاوت زیادی با سایر باکتری‌ها دارند. آب‌گریزی شدید ترکیبات موجود در دیواره آن‌ها موجب بروز خواص شاخص مایکوباکتریوم‌هاست که آن‌ها را از سایر ارگانیسم‌های پروکاریوت متمایز می‌سازد [٣١]. جایگاه پروتئین‌های کمپلکس آنتی‌ژن‌های 85 کیلودالتونی، دیواره مایکوباکتریوم‌ها است و در ساخت آن نقش دارد؛ بنابراین متناسب با محیط سلولی خود، غیرقطبی است [٣، ٦، ٧]. بخش‌های ساختاری غیرقطبی پروتئین و عدم شکل‌گیری تاخوردگی طبیعی آن در یک میزبان پروکاریوتی دیگر مثل اشریشیا کلی موجب نامحلول شدن شدید آن حین تولید به شکل نوترکیب می‌شود. عدم محلولیت ممکن است یک دلیل برای اقبال کم محققین به تولید این گروه از پروتئین‌ها به‌صورت نوترکیب باشد کما این‌که گزارشی از تولید آنتی‌ژن 85C به‌صورت نوترکیب در دست نیست.

برای به‌دست آوردن یک پروتئین نوترکیب که به‌طور ذاتی غیرقطبی است، یک راه حل استفاده از حامل‌های پلاسمیدی است که بخش‌هایی را برای افزایش محلولیت محصول پروتئینی به آن‌ها اضافه می‌کنند. میزان آب‌گریزی یک پروتئین نسبت عکس با مقدار تأثیرگذاری این بخش‌ها دارد. یکی از کاراترین حامل‌های پلاسمیدی که برای چنین منظوری استفاده می‌شود، pET32a(+) است که یک پروتئین به نام تایورودوکسین را در بخش ابتدایی مولکول پروتئین مورد نظر اضافه می‌کند (Trx-tag). تایورودوکسین از پروتئین‌های بسیار محلول است و تولید آن در اشریشیا کلی به سهولت انجام می‌شود. افزوده شدن تایورودوکسین به یک پروتئین غیرقطبی باعث ایجاد نوعی قطبیت نسبی و افزایش حلالیت کل محصول در محیط آبی می‌گردد. نکته قابل توجه در این‌جا نوع پاسخ ایمنی است که از این پروتئین انتظار می‌رود. در مسیر عرضه آنتی‌ژن، پروتئین توسط سلول‌های عرضه کننده در بدن میزبان به قطعات بسیار کوچک پپتیدی شکسته و به سلول‌های سیستم ایمنی ارایه می‌شود. از این رو شکل فیزیکی و تاخوردگی پروتئین نقش زیادی در عرضه این پپتیدها و در نهایت پاسخ به

Archive of SID
www.SID.ir

آن‌ها ندارد و به‌نظر می‌رسد بتوان از این ترکیب پروتئینی برای مقاصد ایمنی‌زایی استفاده کرد. در این مطالعه نیز تولید پروتئین آنتی‌ژن 85C در پلاسمید pET32a(+) انجام گرفته و یک بخش پروتئینی با جرم حدودی ۱۸ کیلودالتون به ابتدای آن افزوده شده است. میزان بیان پروتئین نوترکیب در میزبان باکتریایی بسیار قابل توجه است و بررسی‌ها با SDS-PAGE حضور پروتئینی با وزن تقریبی ۵۵ کیلودالتون را تأیید می‌نماید.

در تولید آنتی‌ژن 85C به شکل نوترکیب در اشریشیا کلی بیشتر پروتئین تولید شده به شکل جسم توده‌ای داخل سلولی است و این به علت عدم تاخوردگی کامل پروتئین مایکوباکتریوم در این میزبان است. راه‌کار مورد استفاده در مورد پروتئین‌هایی که به شکل جسم توده‌ای در داخل سلول میزبان تجمع می‌یابد، به‌کارگیری مواد شیمیایی با خاصیت واسرشته کنندگی مانند اوره و گوانیدیوم هیدروکلراید (Guanidinium Hydrochloride) است. مواد واسرشته کننده با باز کردن پیوندهای هیدروژنی سبب حل شدن اجسام توده‌ای می‌شود و امکان جذب آن‌ها توسط رزین نیکل را فراهم می‌آورد. اما حضور ماده واسرشته کننده استفاده آن را محدود می‌کند. برای حذف این مواد روش‌های متعددی پیشنهاد شده که در مورد پروتئین‌های مختلف، نتایج متفاوتی را در برداشته است. در این مطالعه برای حل کردن اجسام توده‌ای حاوی پروتئین آنتی‌ژن 85C از اوره ۸ مولار استفاده شد. حذف ابتدایی اوره با دیالیز نتایج خوبی در بر نداشت (اطلاعات در این‌جا ذکر نشده) و موجب لخته شدن پروتئین شد. برای به‌دست آوردن پروتئین محلول، روش‌های متعددی استفاده شد و در نهایت با استفاده از محلول‌های شستشو با شیب کاهشی اوره انجام گرفت. با استفاده از این روش در حین این‌که پروتئین به رزین نیکل متصل است، اوره حذف می‌شود و امکان ارتباط پروتئین‌ها با هم و تجمع و ایجاد لخته را نمی‌دهد و از این لحاظ برتری خوبی به روش‌های دیگر دارد. میزان پروتئین نوترکیب محلول که نتیجه نهایی این روش است نیز نسبت به نتایج روش‌های تخلیص برای پروتئین‌های دیگر کمپلکس ۸۵ قابل توجه است [۱۸-۲۰].

نتایج وسترن با آنتی‌بادی ضد ساختار پلی‌هیستیدین تأیید کننده تولید پروتئین در حامل پلاسمیدی pET32a(+) است که با نتایج تعیین توالی سازگاری دارد. نتایج وسترن با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی از یک طرف تأیید کننده تولید پروتئینی با خصوصیات یک پروتئین مایکوباکتریومی است که به موازات نتایج تعیین توالی تولید آنتی‌ژن 85C را تأیید می‌کند و از طرف دیگر نشان دهنده این مطلب است که پروتئین نوترکیب تولید شده حداقل به‌طور نسبی اپی‌توپ‌های طبیعی خود را حفظ کرده است. از این رو می‌توان ادعا کرد که روش تخلیصی که استفاده شد تا حد قابل قبولی می‌تواند ساختار پروتئین‌های نوترکیب را حفظ نماید. شناسایی آنتی‌ژن 85C نوترکیب توسط سرم بیماران مبتلا به سل که در بیمارستان بستری هستند نشان‌گر این است که پروتئین نوترکیب تولید شده در این پروژه با پروتئینی که باسیل سل حین بیماری تولید می‌نماید و بدن نسبت به آن واکنش نشان می‌دهد، مشابهت دارد. بنابراین از پروتئینی که با این روش تولید و تخلیص شده می‌توان در زمینه‌های مختلف از جمله تشخیص سرولوژی نیز استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته باکتری‌شناسی بوده و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

[1] Thaiss CA, Kaufmann SH. Toward novel vaccines against tuberculosis: current hopes and obstacles. Yale J Biol Med2010; 83(4): 209-15.

Archive of SID
www.SID.ir

[2] Barker LF, Brennan MJ, Rosenstein PK, Sadoff JC. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. Curr Opin Immunol 2009; 21(3): 331-8.

[3] Dheenadhayalan V, Shin KS, Chang CF, Chang CD, Wang SJ, McDonough S, McDonough P, Stehman S, Shin S, Torres A, Chang YF. Cloning and characterization of the genes coding for antigen 85A, 85B and 85C of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. DNA Seq 2002; 13(5): 287-94.

[4] Ronning DR, Vissa V, Besra GS, Belisle JT, Sacchettini JC. *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and 85C structures confirm binding orientation and conserved substrate specificity. J Biol Chem 2004; 279(35): 36771-7.

[5] Anderson DH, Harth G, Horwitz MA, Eisenberg D. An interfacial mechanism and a class of inhibitors inferred from two crystal structures of the *Mycobacterium tuberculosis* 30 kDa major secretory protein (Antigen 85B), a mycolyl transferase. J Mol Biol 2001; 307(2): 671-81.

[6] Jackson M, Raynaud C, Lanéelle MA, Guilhot C, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Gicquel B, Daffé M. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. Mol Microbiol 1999; 31(5): 1573-87.

[7] Sanki AK, Boucau J, Ronning DR, Sucheck SJ. Antigen 85C-mediated acyl-transfer between synthetic acyl donors and fragments of the arabinan. Glycoconj J 2009; 26(5): 589-96.

[8] Harth G, Lee BY, Wang J, Clemens DL, Horwitz MA. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun1996; 64(8): 3038-47.

[9] D'Souza S, Rosseels V, Romano M, Tanghe A, Denis O, Jurion F, Castiglione N, Vanonckelen A, Palfliet K, Huygen K. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 2003; 71(1): 483-93.

[10] Gobec S, Plantan I, Mravljak J, Svajger U, Wilson RA, Besra GS, Soares SL, Appelberg R, Kikelj D. Design, synthesis, biochemical evaluation and antimycobacterial action of phosphonate inhibitors of antigen 85C, a crucial enzyme involved in biosynthesis of the mycobacterial cell wall. Eur J Med Chem 2007; 42(1): 54-63.

[11] Ronning DR, Klabunde T, Besra GS, Vissa VD, Belisle JT, Sacchettini JC. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. Nat Struct Biol 2000; 7(2): 141-6.

[12] Gobec S, Plantan I, Mravljak J, Wilson RA, Besra GS, Kikelj D. Phosphonate inhibitors of antigen 85C, a crucial enzyme involved in the biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall. Bioorg Med Chem Lett 2004; 14(13): 3559-62.

[13] Almeida AS, Lago PM, Boechat N, Huard RC, Lazzarini LC, Santos AR, Nociari M, Zhu H, Perez-Sweeney BM, Bang H, Ni Q, Huang J, Gibson AL, Flores VC, Pecanha LR, Kritski

Archive of SID

www.SID.ir

AL, Lapa e Silva JR, Ho JL. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. J Immunol 2009; 183(1): 718-31.

[14] Parida SK, Kaufmann SH. Novel tuberculosis vaccines on the horizon. Curr Opin Immunol 2010; 22(3): 374-84.

[15] Macedo GC, Bozzi A, Weinreich HR, Bafica A, Teixeira HC, Oliveira SC. Human T cell and antibody-mediated responses to the *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 85A, 85B, and ESAT-6 antigens. Clin Dev Immunol 2011; 351573.

[16] Martin Montanes C, Gicquel B. New tuberculosis vaccines. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011; 29 Suppl 1: 57-62.

[17] Sacchettini JC, Ronning DR. The mycobacterial antigens 85 complex--from structure to function: response. Trends Microbiol 2000; 8(10): 441.

[18] Mullerad J, Michal I, Fishman Y, Hovav AH, Barletta RG, Bercovier H. The immunogenicity of *Mycobacterium para-tuberculosis* 85B antigen. Med Microbiol Immunol 2002; 190(4): 179-87.

[19] Salim K, Haedens V, Content J, Leblon G, Huygen K. Heterologous expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding antigen 85A in Corynebacterium glutamicum. Appl Environ Microbiol 1997; 63(11): 4392-400.

[20] Xie Y, Bao L, Hu C, Zhang W, Chen W. [Molecular cloning and expression of the immunodominant protein Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain]. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao 2002; 33(2): 172-4, 195.

[21] Jassal MS, Bishai WR. Epidemiology and challenges to the elimination of global tuberculosis. Clin Infect Dis 2010; 50 Suppl 3: S156-64.

[22] Mori T, Leung CC. Tuberculosis in the global aging population. Infect Dis Clin North Am 2010; 24(3): 751-68.

[23] Brooks JV, Frank AA, Keen MA, Bellisle JT, Orme IM. Boosting vaccine for tuberculosis. Infect Immun 2001; 69(4): 2714-7.

[24] Kolibab K, Yang A, Derrick SC, Waldmann TA, Perera LP, Morris SL. Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant. Clin Vaccine Immunol 2010; 17(5): 793-801.

[25] Lu J, Wang C, Zhou Z, Zhang Y, Cao T, Shi C, Chen Z, Chen L, Cai C, Fan X. Immunogenicity and protective efficacy against murine tuberculosis of a prime-boost regimen with BCG and a DNA vaccine expressing ESAT-6 and Ag85A fusion protein. Clin Dev Immunol 2011; 617892.

[26] Montgomery DL, Huygen K, Yawman AM, Deck RR, Dewitt CM, Content J, Liu MA, Ulmer JB. Induction of humoral and cellular immune responses by vaccination with M. tuberculosis antigen 85 DNA. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 1997; 43(3): 285-92.

[27] Pardini M, Giannoni F, Palma C, Iona E, Cafaro A, Brunori L, Rinaldi M, Fazio VM, Laguardia ME, Carbonella DC, Magnani M, Ensoli B, Fattorini L, Cassone A. Immune response and protection by DNA vaccines

Archive of SID

www.SID.ir

expressing antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 2006; 262(2): 210-5.

[28] Hajizadeh R, Sato H, Carlisle J, Nadaf MT, Evans W, Shepherd BE, Miller RF, Kalams SA, Drake WP. *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85A induces Th-1 immune responses in systemic sarcoidosis. J Clin Immunol 2007; 27(4): 445-54.

[29] Shi C, Wang X, Zhang H, Xu Z, Li Y, Yuan L. Immune responses and protective efficacy induced by 85B antigen and early secreted antigenic target-6 kDa antigen fusion protein secreted by recombinant bacille Calmette-Guérin. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2007; 39(4): 290-6.

[30] Dou J, Tang Q, Zhao F, Chu L, Chen J, Cao M, Liu C, Wang Y, Li Y, Li JL. Comparison of immune responses induced in mice by vaccination with DNA vaccine constructs expressing mycobacterial antigen 85A and interleukin-21 and *Bacillus Galmette-Guérin*. Immunol Invest 2008; 37(2): 113-27.

Alderwick LJ, Birch HL, Mishra AK, Eggeling L, Besra GS. Structure, function and biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. Biochem Soc Trans 2007; 35(Pt 5): 1325-8.

Archive of SID

www.SID.ir