

همسانه سازی و بیان آنتی ژن حفاظتی تغییر یافته باسیلوس آنتراسیس در باکتری E. coli

سید مسیح اعتماد ایوبی^۱، حسین هنری^۲

^۱ دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، مرکز و گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران.

^۲ دانشیار گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران.

* نشانی نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه امام حسین(ع)، گروه علوم زیستی، حسین هنری

E-mail: honari.hosein@gmail.com

وصول: ۹۴/۸/۱۲، اصلاح: ۹۴/۱۰/۲، پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: سیاه زخم یک بیماری مشترک بین انسان و دام است. عامل این بیماری باکتری باسیلوس آنتراسیس می باشد. آنتی ژن حفاظتی تغییر یافته باسیلوس آنتراسیس برای درمان و واکسن قابل استفاده می باشد. هدف این مطالعه بیان آنتی ژن حفاظتی تغییر یافته باسیلوس آنتراسیس در باکتری E. coli می باشد.

مواد و روش ها: قطعات ژنی مورد نظر از پلاسمید pXOI تکثیر و با عمل SOEiong PCR قطعه بدست آمده در کلونینگ وکتور همسانه سازی گردید و بعد از جداسازی به وکتور pET28a(+) زیرهمسانه سازی و به باکتری E.coli سویه BL21(DE3) تراریخت شد. بیان آنتی ژن حفاظتی تغییر یافته باسیلوس آنتراسیس تحت القای IPTG انجام و بعد از تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی، آنتی ژن حاصل در چهار نوبت به موش های سوری تزریق شد. آنتی بادی پلی کلونال تولید شده در سرم موش ها اندازه گیری گردید.

یافته ها: آنتی ژن حفاظتی تغییر یافته باسیلوس آنتراسیس کلون شده در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله ی PCR، آنالیز آنزیمی و توالی یابی تأیید گردید. پروتئین نوترکیب تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه گذاری وسترن تأیید شد. سرم از خون موش جداسازی شد و تیتراژ آنتی بادی علیه PA تغییر یافته از طریق الایزای غیر مستقیم ارزیابی گردید.

نتیجه گیری: پروتئین تولیدی دارای خاصیت مهار کنندگی بالایی برای فاکتورهای بیماریزای LF و EF می باشد. با توجه به شناسایی آنتی ژن PA بوسیله آنتی بادی آنتی ژن حفاظتی تغییر یافته باسیلوس آنتراسیس، می توان به صورت مجزا، یا ترکیبی با سایر دو من های PA در طراحی واکسن و بعنوان دارو برای درمان و پیشگیری بیماری سیاه زخم استفاده نمود.

کلید واژه: آنتی ژن حفاظتی تغییر یافته، باسیلوس آنتراسیس، پروتئین نوترکیب.

مقدمه

Bacillus anthracis ایجاد می شود (۱، ۲). باکتری

باسیلوس آنتراسیس یکی از بزرگ ترین و مهم ترین عوامل بیولوژیک به شمار می رود و پتانسیل استفاده در جنگ های

سیاه زخم (Anthrax) یک بیماری مشترک بین

انسان و دام است که به وسیله باکتری باسیلوس آنتراسیس

مواد و روش‌ها

طراحی پرایمر برای آنتی ژن حفاظتی مربوط به باکتری باسیلوس آنتراسیس: توالی کامل ژن PA باکتری باسیلوس آنتراسیس از بانک ژن (NCBI) با شماره (Accession No: M29081) استخراج و طراحی پرایمرها انجام و توسط شرکت سینا ژن سنتز شد. توالی پرایمر رفت با جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایتر BamHI (فرمتناز):

```
For5'
GAGGATCCACAAGTGCTGGACCTACGGT3'
For5'
AATGCACAAGACGATGGCAGTTCTACTCCA
ATTACAATGA3' SOEing PCR
```

توالی پرایمر برگشت با جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایتر XhoI (فرمتناز):

```
Rev5'CTGGCATCGTCTTGTCATTTAATGC3'
SOEing PCR
Rev5'GGCTCGAGTTATCCTATCTCATAGCCT
TTT3'
```

تکثیر قطعات ژن PA با واکنش PCR: باکتری باسیلوس آنتراسیس از بخش هوازی موسسه رازی تهیه شد. پلاسمیدهای باکتری با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج و به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر قطعات ژن PA ابتدا با آنزیم Taq پلی‌مراز (سینا ژن) بهینه‌سازی شد. به‌منظور جلوگیری از موتاسیون‌های ناخواسته تکثیر نهایی ژن با استفاده از آنزیم Pfu پلی‌مراز (فرمتناز) صورت گرفت. با عمل SOEing PCR دو قطعه به یک قطعه تبدیل شد (۷،۳،۱).

همساز سازی و زیرهمساز سازی (قطعه حاصل از PCR) به وکتورها: محصول PCR به کمک مارکر اسید-نوکلئیک (#SM0313) (فرمتناز) روی ژل آگارز (مرک) بررسی و سپس از روی ژل تخلیص و به انتهای آن‌ها نوکلئوتید A اضافه شد. برای همساز سازی و تراریخت-کردن از وکتور (Promega) pEGM-T Easy Vector و سلول‌های مستعد E. coli سویه DH5 α (نوا ژن) استفاده شد. سپس قطعات توسط آنزیم‌های محدودالایتر BamHI و XhoI از ناقل TA کلونینگ جداسازی و در وکتور بیانی

بیولوژیک را دارا هست (۱). باسیلوس آنتراسیس علاوه بر یک DNA حلقوی به‌اندازه ۴/۵ مگاباز، دارای دو پلاسمید بزرگ pXO1 (شامل ژن‌های توکسیک) و pXO2 (شامل ژن‌های مولد کپسول) هست. توکسین با واسطه یک پلاسمید به نام PBA1 یا pXO1 ایجاد می‌شود که ۳ پروتئین یا فاکتور مولد ادم (Edema Factor) (EF)، آنتی-ژن محافظت‌کننده (PA) (protective antigen) و فاکتور مولد مرگ سلولی (Lethal Factor) (LF) را کد می‌کند (۴،۳). پروتئین ژن PA به‌طور اختصاصی به گیرنده‌های سطح سلول می‌چسبد. سپس PA توسط پروتئین‌های شبیه به فورین شکسته می‌شود و دو قطعه PA20 و PA63 ایجاد می‌گردد که قطعه PA63 در سطح سلول باقی‌مانده و برای اتصال LF و EF آماده‌شده و تشکیل ساختار هپتامری، ایجاد منفذ و ترانسلوکاسیون به داخل سلول انجام می‌گیرد (۵). آنتی ژن محافظت‌کننده (PA) کامل و فاقد قطعه ۲۰ کیلودالتونی (بعد از ورود آنتی ژن محافظت-کننده (PA) کامل با طول ۶۳ کیلودالتون به داخل بدن، یک قطعه ۲۰ کیلودالتونی از آن جدا می‌شود و قطعه‌ای به طول ۶۳ کیلودالتون باقی می‌ماند) با یک و یا دو اسیدآمینو تغییر یافته در نواحی ۴۲۷ یا ۳۹۶ و ۴۲۵ دارای خاصیت مهارکنندگی برای فاکتورهای بیماری‌زای LF و EF هست (۶،۳). امروزه سیستم‌های بیانی بسیار متنوعی وجود دارد و در اشل صنعتی از باکتری، مخمر، گیاه، سلول حیوانی استفاده می‌شود. با توجه به کاربردی بودن این سیستم در آزمایشگاه‌ها و کم‌هزینه بودن آن، در این پژوهش از سیستم بیانی باکتری استفاده شده است. در ادامه به منظور تولید کاندید واکسن و داروی نوترکیب، آنتی ژن محافظت‌کننده (PA) ۶۳ کیلودالتونی با یک اسیدآمینو تغییر یافته باسیلوس آنتراسیس (mPA) همساز سازی، بیان و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال در موش سوری انجام شد تا در آینده نقش آن در طراحی واکسن یا دارو با سایر دومن‌های LF، EF و PA مورد مطالعه قرار گیرد.

روش PCR، محصول روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱) و قطعه موردنظر از لحاظ اندازه با ژن هدف هم‌خوانی داشت (۱۷۱۶ جفت باز).

تأیید همسانه‌سازی ژن هدف در وکتور pEGM-T Easy Vector: پس از تخلیص پلاسمید و تأیید آن‌ها روی ژل آگارز، برای تأیید بیشتر از پلاسمیدها به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید، از طرفی با دو آنزیم BamHI و XhoI هضم شدند سپس به کمک مارکر اسید نوکلئیک، اندازه قطعه خارج‌شده از وکتور تأیید شد (شکل ۲).

تأیید همسانه‌سازی ژن هدف در وکتور بیانی pET28a(+): پس از تخلیص پلاسمید و تأیید آن‌ها روی ژل آگارز، برای تأیید بیشتر از پلاسمیدها به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید، از طرفی با دو آنزیم BamHI و XhoI هضم گردیدند. سپس به کمک مارکر اسید نوکلئیک، اندازه قطعه خارج‌شده از وکتور (۱۷۱۶ جفت باز) تأیید گردید (شکل ۳).

بیان ژن در وکتور pET28a(+): در این مرحله پس از کشت سلول‌ها و القا با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت و پس از تیمار خام بر روی ژل SDS-PAGE و به کمک مارکر پروتئینی موردبررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب (۶۳ kDa) از ژل ۱۵ درصد استفاده شد (شکل ۴).

پس از این که از القاء بیان ژن اطمینان حاصل شد، بیان با کشت کلون‌ها در محیط LB مایع حاوی $40 \mu\text{g/ml}$ کانامایسین، پس از رسیدن OD محیط کشت به 0.6 در طول موج 600 نانومتر، با افزودن IPTG با غلظت 1mM به محیط و انکوبه نمودن آن در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکر دار با سرعت 150rpm به مدت 5 ساعت به دست آمد.

تأیید محصول پروتئینی به دست آمده با تکنیک Western Blotting: به‌منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک Western Blotting استفاده شد. در این روش از

pET28a(+)(کیاژن) زیرهمسانه‌سازی و در سلول‌های مستعد E. coli سویه BL21(DE3)(stratagen) تراریخت و قطعه ژنی به وسیله PCR، آنزیم برشی و تعیین توالی تأیید شد (۷،۳).

بیان ژن موردنظر: بیان ژن مورد نظر توسط القاء کننده پروموتور (IPTG)(فرمتاز) با غلظت 1 میلی‌مولار و به مدت 5 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انجام شد (۸،۳).

الکتروفورز SDS-PAGE: نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی #PR0602-S (Vivantis) تحت شرایط دناتور، الکتروفورز شدند. غلظت ژل 15 درصد با جریان ثابت 25 میلی‌آمپر بود (۹). تخلیص با ستون نیکل: پروتئین حاصل تحت شرایط دناتور و با استفاده از ستون Ni-NTA (کیاژن) جداسازی و تخلیص شد.

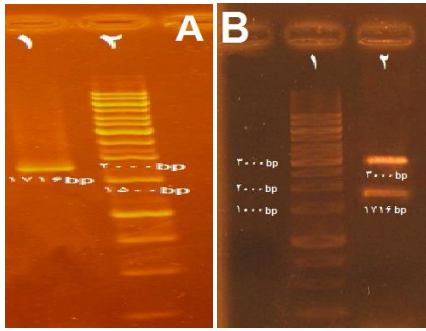
تولید آنتی‌بادی علیه PA: پروتئین PA در چهار نوبت، به میزان $20 \mu\text{g}$ بار اول همراه با ادجوانت کامل (رازی) و در نوبت‌های بعدی $15 \mu\text{g}$ با ادجوانت ناقص فروند به موش سوری تزریق و در نهایت از موش‌ها خون‌گیری و توسط آزمایش الیزا تیتراژ آنتی‌بادی آن اندازه‌گیری شد.

تأیید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات: برای تأیید پروتئین نوترکیب بیان‌شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد PA کامل (تولیدی دانشگاه جامع امام حسین (ع)) استفاده شد (۱۰،۹).

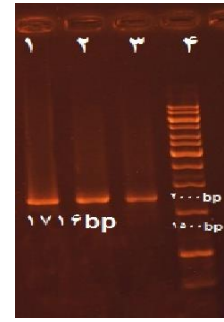
ارزیابی تیتراژ آنتی‌بادی ضد پروتئین نوترکیب به روش الیزای غیرمستقیم: مقدار 20 میکروگرم از پروتئین نوترکیب PA در چهار نوبت، به موش‌های سوری تزریق و در نهایت از آن‌ها خون‌گیری و توسط آزمایش الیزا غیرمستقیم تیتراژ آنتی‌بادی اندازه‌گیری شد (۱۰،۳).

یافته‌ها

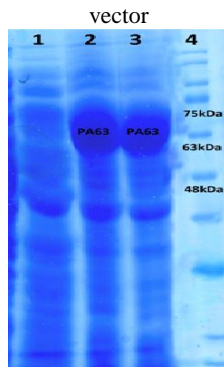
تکثیر ژن PA: پس از تکثیر ژن تغییر یافته PA به



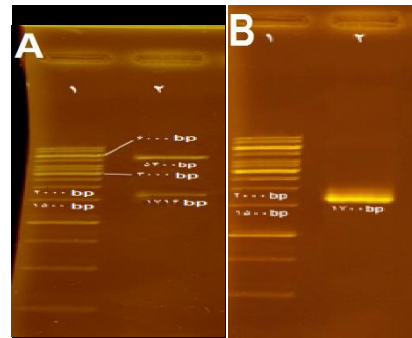
شکل ۲: A) چاهک ۱ محصول PCR وکتور (+) pET28a و چاهک ۲ نشانگر مولکولی اسید نوکلئیک B) چاهک ۱ نشانگر مولکولی اسید نوکلئیک و چاهک ۲ محصول برش آنزیمی روی pGEM-Teasy



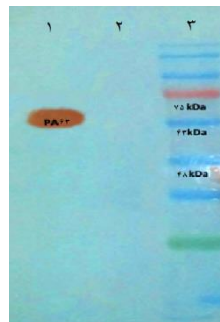
شکل ۱: محصول PCR از قطعات ممزوج شده، چاهک ۱، ۲ و ۳ محصول PCR و چاهک ۴ نشانگر مولکولی اسید نوکلئیک.



شکل ۴: بیان پروتئین PA. چاهک ۱ نمونه کنترل بدون IPTG، چاهک ۲ و ۳ بیان پروتئین PA دارای وزن مولکولی حدود ۶۷ kDa با IPTG، چاهک ۴ مارکر پروتئینی.



شکل ۳: A) چاهک ۱ نشانگر مولکولی اسید نوکلئیک چاهک ۲ برش آنزیمی وکتور (+) pET28a B) چاهک ۱ محصول PCR وکتور (+) pET28a چاهک ۲ نشانگر مولکولی اسید نوکلئیک.



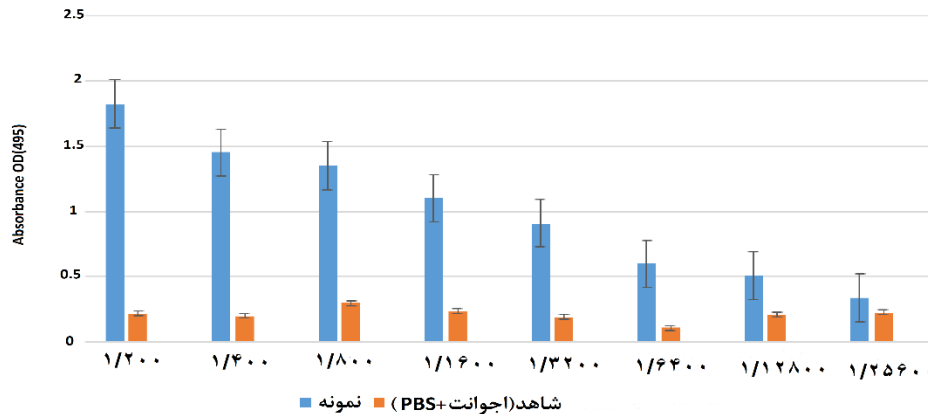
شکل ۵: آزمایش لکه گذاری وسترن. چاهک ۱ نمونه بیانی PA، چاهک ۲ نمونه کنترل واکنش وسترن (PBS)، چاهک ۳ مارکر پروتئینی.

حیوانات ایمن شده مورد استفاده قرار گرفت. نمودار زیر بیانگر تیتراژ سرم در حیوانات مورد استفاده است. بررسی نمودار فوق، نتایج حاصل از آزمایش الایزا با پروتئین نوترکیب را نشان می دهد که پس از تزریق افزایش تیتراژ آنتی بادی در مقایسه با کنترل قابل توجه است. بالاترین OD به دست آمده از تست در مقایسه با کنترل تفاوت فراوانی دارد. نتایج نشان داده که این پروتئین قدرت تولید آنتی بادی به میزان لازم را داشته و تولید آنتی بادی در حیوان با ایمنی زایی همبستگی مثبت دارد.

آنتی بادی پلی کلونال ضد PA کامل استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونه القاشده با IPTG است یک باند در نزدیکی ۶۷ kDa مشاهده می شود که در ستون کنترل واکنش وسترن (PBS) مشاهده نمی شود (شکل ۵). بررسی تولید آنتی بادی IgG علیه آنتی ژن PA در موش سوری:

روش الایزا برای تعیین تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین نوترکیب به منظور ارزیابی محصول در طول فرایند تخلیص و همچنین تعیین تیتراژ خنثی سازی در سرم

بررسی تیتر آنتی بادی



نمودار ۱: بررسی تیتر آنتی بادی IgG تولیدشده درموش سوروی علیه آنتی ژن PA13 بر پایه اجوانت فروند

بحث

برای مقابله با سیاه زخم سه راه وجود دارد، واکسیناسیون برای پیشگیری در مرحله اول، آنتی بیوتیکها برای درمان عفونت و درمانهای ضد سم برای جلوگیری از اثرات سمی باکتری در اواخر مرحله عفونت (۱۱). تنها اجزا پروتئینهای سمی باسیلوس آنتراسیس دارای خاصیت آنتی ژنیک بسیار قوی بوده که زیر واحد PA به عنوان کاندید اصلی واکسن این عامل مطرح هست و ایمنی حمایتی، علیه بیماری ایجاد می کنند. این ایمنی در نتیجه خنثی سازی فعالیت توکسین آنتراکس اتفاق می افتد (۱۲،۶). PA یک جزء بسیار مهم از توکسین آنتراکس است. این پروتئین در ایمنی علیه آنتراکس نقش اصلی را هم بعد از ایمن سازی و هم در جریان عفونت بازی می کند و دارای خاصیت مهارکنندگی برای فاکتورهای بیماری زای LF و EF هست (۶،۳). با توجه به نقش آن، PA به طور گسترده ای به عنوان یکی از کاندیدهای واکسن مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۲،۱۳،۱۴). برای مطالعه خصوصیات یک آنتی ژن به عنوان واکسن ضرورت دارد که پروتئین نوترکیب در یکی از میزبانها تولید شود. یکی از میزبانهای کم هزینه برای تولید پروتئینهای نوترکیب باکتری اکلوی هست که در آزمایشگاه مرکز زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) از این میزبان به وفور استفاده می شود. نتایج به دست آمده نشان می دهد که این ژن در وکتور PET28 بیان بسیار بالایی را از خود

نشان داده است. آنتی ژن PA تغییر یافته به عنوان دارو برای باسیلوس آنتراسیس مطرح بوده که پروتئین نوترکیب آن در میزبان اکلوی با موفقیت تولید شده است. پاسخ آنتی بادی به تولید درون سلولی EF, LF, PA در موشهای ایمن شده با اسپورهایی از سویه های تولیدکننده این پروتئینها مورد بررسی قرار گرفت و بالاترین تیتر آنتی بادی به PA، بعد از اینکه ایمن سازی با همه سویه های تولیدکننده PA انجام شده، مشاهده شد (۱۵). در مطالعه ای دیگر ایمنی زایی دو من ۴-۲ و دومن های دیگر PA در ۴ سویه متفاوت موش بررسی گردید. ژن بیان شده خاصیت ایمنوژنیسیته و ادجوانتی خوبی را نشان داد (۷). همه این شواهد، PA را به عنوان یک ایمنوژنومیننت غالب شناسایی می کند که می تواند در طراحی یک واکسن مهندسی شده استفاده شود (۳). همچنین نتایج به دست آمده در پژوهش ما نتایج بالا را تأیید می کند و تیتر آنتی بادی تولیدی در موش که در قسمت نتایج نشان داده شده است بیانگر این موضوع هست. آنتی بادی های علیه PA می توانند تأثیر توکسین آنتراکس بر روی میزبان را متوقف کنند (۱۲،۶،۳). با تغییر آنتی ژن محافظت کننده (PA) کامل و فاقد ۲۰ کیلو دالتونی با یک و یا دو اسید آمینه تغییر یافته در نواحی ۴۲۷ یا ۳۹۶ و ۴۲۵ دارای خاصیت مهارکنندگی برای فاکتورهای بیماری زای LF و EF بوده که ساختار هپتامری تشکیل شده ولی عمل انتقال به داخل سلول صورت نخواهد گرفت.

سرتاسر غشا به داخل سیتوزول سلول‌های مدل می‌شود. موتاسیون یافته‌های F427G، F427R و F427D باعث اختلال در تشکیل منفذ می‌شوند که این اثر با توجه به توانایی‌شان متفاوت است (۱۸). در مثال‌های زیر تأثیر انواع موتاسیون یافته‌های اسید آمینه فنیل آلانین ۴۲۷ در سمیت سلولی و درصد تشکیل منفذ مشخص شده است. در مورد موتاسیون یافته‌های F427S، F427T و F427H تشکیل منفذ ۱۰۰ درصد می‌باشد و سمیت سلولی مشاهده نشده، در حالت F427D تشکیل منفذ ۲۵ درصد است و سمیت سلولی نیز ایجاد نمی‌شود و اما در مورد موتاسیون یافته F427G که مورد توجه و استفاده در این پژوهش نیز است منفذی تشکیل نمی‌شود و سمیت سلولی نیز ایجاد نمی‌شود (۱۹).

تغییر یافتگی اسید آمینه ۴۲۷ ژن PA به گلیسین باعث می‌شود که عمل انتقال صورت نگیرد و حبس EF یا LF در داخل هپتامر یا اکتامر انجام گیرد. از این ویژگی می‌توان برای ساخت یک دارو علیه سیاه‌زخم استفاده کرد (۱۹، ۲۰). بر اساس نتایج این پژوهش نقش آنتی ژن حفاظتی تغییر یافته PA63 در ایجاد آنتی‌بادی علیه آن به اثبات رسید. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و بررسی مطالعات انجام شده این پروتئین را می‌توان به عنوان یک ایمونوژن برای طراحی یک واکسن و داروی مهندسی شده نو ترکیب پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

در پایان از زحمات اساتید، پژوهشگران محترم مرکز و گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران که در به نتیجه رسیدن این پژوهش ما را حمایت معنوی و مالی نمودند سپاسگزاری می‌شود.

این پروتئین دارای خاصیت درمانی و ایمنی‌زایی است که از نظر تهیه دارو و واکسن بسیار مهم خواهد بود (۱۶، ۱۷). موتاسیون‌هایی که عملکرد انتقال PA را مهار می‌کنند یا از طریق اختلال در انتقال توکسین و یا در باز آرایه کانفورماسیونی دومن دو برای تشکیل منفذ، اثرگذار هستند. دو کلاس از این موتاسیونها در دومن دو طبقه بندی شده‌اند: آن‌هایی که تبدیل پیش منفذ به منفذ را بلوکه می‌کنند و آن‌هایی که اجازه تشکیل منفذ را می‌دهند ولی توانایی منفذ در ترانسلوکاسیون را از بین می‌برند (۸). از این ویژگی می‌توان به عنوان دارو برای دام اندازی سم باکتری سیاه‌زخم استفاده کرد. با توجه به نتایج پژوهش ما این عملکرد در پژوهش‌های آینده می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد. اسید آمینه ۴۲۷ PA که فنیل آلانین است نقش زیادی در انتقال PA دارد، زیرا هم برای تشکیل منفذ و انتقال پروتئین مهم است. از طرفی ثابت شده است برخی از موتاسیون‌های اسید آمینه ۴۲۷ در داخل بدن دارای فعالیت‌های درمانی می‌باشند (۱۷).

در موش موتاسیون فنیل آلانین موقعیت ۴۲۷ به آسپارتیک اسید اثرات مهار قوی تری از موتاسیون فنیل آلانین به آسپارژین نشان می‌دهد؛ بنابراین، می‌توان از پتانسیل درمانی PA موتاسیون یافته برای درمان آنتراکس در صورتی که زود و قبل از ورود باکتری به بدن و یا در مراحل اولیه عفونت که تعداد باکتری کم است و ترشح سم به میزان کم است تزریق شود. در این حالت می‌توان از PA موتاسیون یافته به عنوان دارو برای درمان استفاده کرد (۱۸). از آنجایی که ارتباط مثبتی بین موتاسیون اسید آمینه فنیل آلانین ۴۲۷ بر روی سمیت سلولی وجود دارد. این اثر در نتیجه ایجاد اختلال در تشکیل منفذ و فرایند عبور از غشا رخ می‌دهد (۱۹، ۲۰). موتاسیون یافته‌های F427W، F427L و F427Y در واسطه‌گری در سمیت سلولی بسیار فعال هستند و موجب انتقال مؤثر در

References

- Ahmadi AH, Honari H, Ebrahim Minaei M. Cloning, fusion and expression of domain a-1 protective antigen (PA20) of Bacillus anthracis and N-Terminal ipaD gene of Shigella in E. coli. Qom Univ Med Sci 2015; 9(4): 20-29. (Persian)

2. Koehler TM. Bacillus anthracis physiology and genetics. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(6): 386-396.
3. Honari H, Mehrzain H, Saadati M, Minaie ME. Production of polyclonal antibody against domain 2-4 of protective antigen of Bacillus anthracis in laboratory animal. *J ShahrekordUni Med Sci* 2014; 15(6): 35-43. (Persian)
4. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (lef) from Bacillus anthracis. *Gene.* 1989; 81(1): 45-54.
5. Benson E, Huynh P, Finklestein A, Collier R. Identification of residues lining the anthrax protective antigen channel. *Biochemistry.* 1998; 37(11): 3941-8.
6. Turnbull Panthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine.* 1991; 9: 533-539.
7. Abboud N, Casadevall A. Immunogenicity of Bacillus anthracis Protective Antigen Domains and Efficacy of Elicited Antibody Responses Depend on Host Genetic Background. *Clinical and vaccine immunology,* 2008; p: 1115–1123.
8. P13423(PAG_BACAN), Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot. [Last modified October 5, 2010; Version 109].
9. Honari H, Baranvand M, EbrahimMinaei M. Immunogenicity Investigation of recombinant proteins (StxB) of Shigelladysenteriae type 1 in mice. *Quarterly J of SabzevarUni of Med Sci.* 2015; 21(6):1111. (Persian)
10. Little SF, Webster WM, Norris SLW, Andrews GP. Evaluation of an anti-rPAIgG ELISA for measuring the antibody response in mice. *Biologicals.* 2004; 32(2): 62-9.
11. Friedlander A. M. Tackling anthrax. *Nature.* 2001; 414:160–161.
12. Singh, Y. B. E. Ivins, and S. H. Leppla. Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of Bacillus anthracis. *Infect Immun.* 1998; 66:3447–3448.
13. Grabenstein J D. Vaccines: countering antrax: vaccines and immunoglobulins. *Clin Infect Dis.* 2008; 46:129–136.
14. Sloat, B. R. and Z. Cui. Nasal immunization with anthrax protective antigen protein adjuvanted with polyriboinosinic-polyribocytidylic acid induced strong mucosal and systemic immunities. *Pharm Res.* 2006; 23:1217–1226.
15. Pezard C, Sirard JC and Mock M. Protective immunity induced by Bacillus anthracis toxin mutant strains. *AdvExp Med Biol.* 1996; 397: 69–72.
16. Ivins B, Welkos S. Recent advances in the development of an improved human anthrax vaccine. *Eur J Epidemiol.* 1988; 4(1): 12-9.
17. Mourez, M. M. Yan, D. B. Lacy, L. Dillon, L. Bentsen, A. Marpoe, C. Maurin, E. Hotze, D. Wigelsworth, R. A. Pimental, J. D. Ballard, R. J. Collier, and R. K. Tweten. Mapping dominant-negative mutations of anthrax protective antigen by scanning mutagenesis. *ProcNatAcadSci USA.* 2003; 100:13803–13808.
18. Yan M, Roehrl M H, Basar E, Wang J Y. Selection and evaluation of the immunogenicity of protective antigen mutants as anthrax vaccine candidates. *Vaccine.* 2008; 26: 947–955.
19. Sun J, E Lang A, Aktories K, Collier R J. Phenylalanine-427 of anthrax protective antigen functions in both pore formation and protein translocation. 2008; 105(11): 4346-4351.
20. Cao S, Guo A, Liu Z, Tan Y, Wu G, Zhang Ch, Zhao Y, Chen H. Investigation of New Dominant-Negative Inhibitors of Anthrax Protective Antigen Mutants for Use in Therapy and Vaccination. *American Society for Microbiology.* 2009; 77(10): 4679–4687.

Cloning and Recombinant Expression modified protective antigen from *Bacillus anthracis* In *E. coli*

Seyed Masih E'temad Aubi

PhD Student of nanobiotechnology, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran

*Hossein Honari

PhD in molecular genetics, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran

Received:03/11/2015, Revised:23/12/2015, Accepted:31/01/2016

Corresponding author:

Hossein honari,
Imam Hosein University, Tehran
E-mail: honari.hosein@gmail.com

Abstract

Background: Anthrax is a common illness between human and animal which the agent of that is *Bacillus anthracis*. The modified protective antigen can be used in treatment and vaccination. The aim of this study is the recombinant expression of modified protective antigen in *E. coli*.

Material and Methods: Gene fragments were amplified with PCR from pXOI and fusion gene from SOEing PCR was cloned in a cloning vector and finally sub cloned in pET28a(+) vector and transferred to *E. coli* BL21(DE3) competent cells. Recombinant expression of modified PA was induced by IPTG and after protein purification with affinity chromatography, resulted antigen was injected to mice in 4 repeats. Polyclonal antibodies produced in mice serum was accessed.

Results: The modified protective antigen cloned in expression vector pET28a(+) was confirmed by PCR, enzymatic digestion and sequencing. Recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and western blot. Serum was separated from mice blood and titre of antibody against modified PA was assessed by indirect ELISA.

Conclusion: resulted protein has high inhibitory property for LF and EF virulence factors. By consideration in PA detection by polyclonal antibody against modified PA from *Bacillus anthracis*, it can be used in for treatment and prophylaxis against anthrax in individual or combination forms with other PA domains.

Keywords: *protective antigen, Bacillus anthracis, recombinant protein*