مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۴، شماره ۲، تابستان ۹۳، صفحات ۹۵ تا ۱۰۲

Original Article

تعیین نواحی آنتی ژنیک ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل ادهزین Haps هموفیلوس *آنفلوانزای* بدون کپسول

اکرم طباطبایی[۱]، سید داور سیادت[۲]، سید فضل الله موسوی[۳]، محمدرضا آقاصادقی[۴]

[۱] دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] دانشیار، دکتری میکروبیولوژی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۳] استادیار، دکتری میکروبیولوژی و ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۴] دانشیار، دکتری فراورده های بیولوژیک، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: *پروتئین Haps در تداخل اولیه هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول با سلول‌های اپیتلیال دستگاه تنفس انسان نقش کلیدی را بازی می‌کند. در حالی که دیگر پروتئین‌های خارج سلولی هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول از نظر ژنتیکی بسیار متغیر می باشند، Haps به میزان قابل توجهی در میان سویه‌های هموفیلوس آنفلوانزا حفظ شده است. در مطالعات اخیر اثبات شده است که فعالیت اتصالی Haps، در ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل (C-Haps) آن قرار دارد و همچنین نشان داده شده است که C-Haps قادر به القاء پاسخ ایمنی محافظت کننده در مقابل استقرار هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول می‌باشد.*

روش بررسی: *سازه pET24a-chaps حامل سکانس C-Haps هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول ۱۷۶۶ PTCC ساخته شد. سکانس آمینواسیدی C-Haps این مطالعه با سکانس ۳ C-Haps سویه دیگر هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول (N187، TN106، P860295) مقایسه و نواحی آنتی ژنیک آن توسط نرم افزار بیوانفورماتیک تعیین شدند. سازه نوترکیب pET24a-chaps در میزبان اشرشیاکلی سویه BL21(D3E) بیان شد و توسط تکنیکهای SDS-PAGE و وسترن بلات مورد تائید قرار گرفت. پروتئین نوترکیب C-Haps توسط تکنیک کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد.*

یافته‌ها: *مقایسه توالی آمینواسیدی rC-Haps مورد مطالعه با سکانس های آمینواسیدی C-Haps موجود در بانک ژن، بیش از ۹۷٪ همسانی را نشان داد و نمودار آنتی ژنیسیته، ۹ جایگاه آنتی ژنیک مشترک و قوی را تعیین کرد که دقیقا در مناطق حفظ شده بین سویه های مختلف هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول مطالعه شده قرار داشت.*

نتیجه‌گیری: *به دلیل حضور جایگاه‌های آنتی ژنیک مشترک بین هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول ۱۷۶۶ PTCC و دیگر سویه‌های مطالعه شده، بنابراین C-Haps به دست آمده در این مطالعه از نظر تئوری می‌تواند به عنوان کاندیدای واکسن علیه سویه‌های مختلف هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول سایر نواحی جغرافیائی نیز به کار رود.*

واژگان کلیدی: *هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول، نواحی آنتی ژنیک، C-Haps.*

مقدمه

*هموفیلوس آنفلوانزا*های بدون کپسول یا هموفیلوس آنفلوانزاهای غیرقابل طبقه بندی، کوکوباسیل‌های گرم منفی می‌باشند که ارگانیسم کامنسال مشترک بین کودکان و افراد بالغ سالم محسوب می‌شوند. کودکان به طور هم زمان ناقل چندین سویه از *هموفیلوس آنفلوانزا* می‌باشند، درحالی که بالغین تنها حامل یک سویه از آن هستند. این دسته از باکتری‌ها ابتدا در نازوفارنکس مستقر می‌شوند و در صورت مشکل دار بودن سیستم دفاعی میزبان به نواحی مجاور گسترش می یابند (۲،۱). *هموفیلوس*

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دکتر اکرم طباطبائی
(**email**: akram_tabatabaee@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۷/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۹/۲٤

Archive of SID
www.SID.ir

*آنفلوانزا*های بدون کپسول قادرند انواع بیماری‌های حاد و مزمن دستگاه تنفسی از جمله عفونت گوش میانی، سینوزیت، برونشیت، ذات الریه و عفونت بافت ملتحمه چشم را ایجاد کنند (۳، ۴). همچنین *هموفیلوس آنفلوانزا*های بدون کپسول، از زمان ابداع واکسن‌های کنژوگه پنوموککی به عنوان یک علت عمده پنومونی اکتسابی از جامعه محسوب می‌شوند (۵).

از آنجا که پاتوژنز *هموفیلوس آنفلوانزا* با استقرار در نازوفارنکس آغاز می‌شود و به دنبال آن ارگانیسم به قسمت‌های دیگر دستگاه تنفس از جمله گوش میانی، سینوس‌ها و...منتشر می‌شود، بنابرین می‌توان با جلوگیری از اتصال اولیه باکتری با سطح سلول میزبان، مانع بروز عفونت موضعی و در نهایت انتشار آن به سایر قسمت-های دیگر بدن شد. بر اساس مطالعات روی حیوانات و مطالعات *in vitro*، مشخص شده که تعدادی از فاکتورهای باکتریایی در فرآیند استقرار تاثیر دارند. یکی از این فاکتورها پروتئین‌های ادهزین می‌باشند که Hap یکی از مهم‌ترین آنها است که در اتصال اولیه باکتری با سلول‌های اپیتلیال تنفسی انسان و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و همچنین درتشکیل توده-های باکتریایی و میکروکلنی نقش دارد (۶). این پروتئین برخلاف سایر ادهزین‌های *هموفیلوس آنفلوانزا*، در میان تمامی سویه‌های کپسول‌دار و فاقد کپسول از همسانی بسیار بالایی برخوردار است (۷).

پروتئین Hap به صورت یک پروتئین پیش ساز ۱۵۵ کیلودالتونی سنتز می‌شود که دربرگیرنده سه ناحیه توالی راهنما، ناحیه سرین پروتئازی ۱۱۰ کیلودالتونی داخلی (HapS) و یک پروتئین ۴۵ کیلودالتونی غشاء خارجی (Hapβ) در ناحیه کربوکسیل می‌باشد (۸). ناحیه جابجاشونده پروتئین Hap دربرگیرنده جایگاه اتصال می‌باشد که اتصال به سلول‌های اپیتلیال انسانی، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و باکتری‌های مجاور بیان کننده Hap را افزایش می‌دهد. بررسی‌ها نشان داد که ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps (C-Haps) تداخل بین سلول‌های باکتری با سلول‌های میزبان را به عهده دارد که همان ناحیه متصل شونده Haps به سلول میزبان می‌باشد (۶،۹). مقایسه توالی‌های آمینواسیدی *C-haps* سه سویه مختلف *هموفیلوس آنفلوانزا* (N187، P860295، TN106) نشان داد که بیش از ۹۷/۱٪ شباهت بین آنها وجود دارد. همچنین مطالعات نشان دادند که ایمنی‌زایی داخل بینی (intranasal immunization) با CHaps نوترکیب منجر به القاء پاسخ‌های آنتی بادی می‌شود که Haps طبیعی را نیز خنثی می‌کند. در مجموع ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps (CHaps) به عنوان کاندیدای واکسن علیه سویه‌های مختلف *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول معرفی شد (۱۰). با توجه به اهمیت ذکر شده برای این قطعه پروتئینی (C-Haps) و همچنین وجود شواهدی از حضور پاسخ ایمنی علیه آن و کارایی احتمالی آن به عنوان پروتئین حامل در واکسن‌های زیرواحدی علیه *هموفیلوس آنفلوانزای* تیپ b تولید فرم نوترکیب آن و بررسی جایگاه اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک آن از اهداف این تحقیق قرار گرفتند.

مواد و روشها

سویه‌های باکتریایی، پلاسمید و مواد مورد استفاده

هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول PTCC 1766 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید و در محیط کشت عصاره قلب و مغز (Brain Heart Infusion) broth غنی شده با Hemin-L-Histidine و NAD در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد (۱۱،۱۲). سویه‌های باکتریائی اشرشیاکلی (*E.coli*) DH5 α و (DE3) BL21 و پلاسمید pET24a از بانک ملی ژن انستیتوپاستور ایران تهیه شد.

تکثیر ژن *c-haps*

پس از استخراج و تخلیص ژنوم سویه باکتریایی *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول PTCC 1766 با استفاده از تکنیک فنل-کلروفرم (مطابق با روش سمبروک و همکارانش)(۱۳)، این ژنوم به عنوان الگو جهت تکثیر قطعه ژنی تولید کننده ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوسیل پروتئین Haps (۱۰۰۰ جفت باز) با استفاده از تکنیک PCR مورد استفاده قرار گرفت.

بدین منظور توالی 5´-TAAGAAGCTTCGCGTTCAGATTGGACAGG-3´ به عنوان پرایمر پیشرو با جایگاه برش آنزیمی برای *Hind*III وتوالی 5´-ATACTCGAGCAGGCTTTGATCAGGCAGG-3´ به عنوان پرایمر معکوس با جایگاه برش برای آنزیم *Xho*I توسط نرم افزار Gene runner طراحی وجهت سنتز به شرکت Bioneer سفارش داده شد.

واکنش PCR با حجم نهائی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱.۲۵ واحد آنزیم *Pfu* پلیمراز (Thermo,USA) ، بافر *Pfu* حاوی MgCl2 (۱X)، ۱ میلی مولار dNTPs ، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو انجام بود. فرایند PCR مطابق با شرایط ذکر شده در جدول ۱ صورت گرفت.

پس از انجام واکنش PCR ، محصول نهایی روی ژل آگارز برده شد و سپس قطعات ژنی موردنظر توسط کیت استخراج DNA Extraction Kit, Fermentas, Germany) (GeneJET™ Gel تخلیص شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱. برنامه PCR جهت تکثیر قطعه ژنی *c-haps*

دما (°C)	مدت زمان	مراحل PCR
۹۴	۷ دقیقه	دناتوراسیون آغازی DNA الگو
۹۴	۱ دقیقه	دناتوراسیون DNA الگو
۶۰	۴۵ ثانیه	اتصال پرایمرها
۷۲	۱ دقیقه	پلیمریزاسیون
۷۲	۱۰ دقیقه	پلیمریزاسیون نهائی

کلونینگ قطعه ژنی ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل پروتئین Haps

با توجه به جایگاه‌های آنزیمی تعبیه شده در پرایمرها و وجود آنها بر روی پلاسمید موردنظر، محصول PCR (*c-haps*) و پلاسمید pET24a توسط دو آنزیم *Hind*III و *Xho*I (Bobizz, Korea) برش داده شدند و سپس طی فرایند الحاق در حضور آنزیم T4 لیگاز (Fermentas, Germany) به یکدیگر متصل شدند، به طوری که انتهای کربوکسیل پروتئین نوترکیب دربرگیرنده دنباله هیستیدینی بود. سپس ناقل‌های حاصل از طریق فرایند ترانسفورماسیون (Transformation) به میزبان کلونینگ (*E.coli* DH5α) مستعد شده منتقل شدند. تائید صحت فرایند الحاق و تمامیت سازه ژنی pET24a-*chaps* توسط روش‌های Colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی ژن موردنظر صورت گرفت.

بیان و تخلیص ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل پروتئین Haps (C-Haps)

به منظور بیان ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل پروتئین Haps (C-Haps)، سازه نوترکیب pET24a-*chaps* به میزبان بیانی *E.Coli* BL21(DE3) مستعد شده ترانسفورم شد. سپس چند کلونی برای آنالیز بیان پروتئین در محیط کشت 2xTY حاوی ۵۰ µg/ml کانامایسین کشت داده شد تا زمانی که در طول موج ۶۰۰ نانومتر به جذب نوری ۰/۶ برسد. در این زمان، محلول کشت با ۱mM IPTG القاء شده و آنالیز بیان پروتئین، ۵ ساعت پس از القاء انجام گرفت. همچنین از کشت باکتریایی قبل از القاء به عنوان کنترل منفی نمونه برداری شد. در نهایت محتوای لیز شده سلول های باکتریایی از نظر بیان پروتئین توسط تکنیک SDS-PAGE مورد تائید اولیه قرار گرفت و میزان بیان پروتئین توسط روش دنسیتومتری با نرم افزار Quantity One version 4.4.1 (BioRad) تعیین گردید. در مرحله بعد پروتئین موردنظر به علت وجود دنباله هیستیدینی توسط رزین نیکل (Qiagen, Germany) و کروماتوگرافی تمایلی طبق شیوه نامه شرکت سازنده تخلیص شد.

تایید نهایی بیان قطعه پروتئینی CHapS توسط تکنیک وسترن بلات

پس از به دست آوردن پروتئین CHapS تخلیص شده، برای تائید صحت پروتئین مورد نظر، از روش وسترن بلات استفاده گردید. در این مرحله پس از SDS- PAGE پروتئین و انتقال آن به غشاء نیتروسلولزی، پروتئین CHapS با آنتی بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی، Anti-6xHis rabbit antibody (Qiagen Hilden, Germany) مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین توالی سازه ژنی

به منظور تائید سازه ژنی pET24a- *chapS*، پلاسمید استخراج شده برای تعیین توالی به آزمایشگاه تعیین توالی انستیتو پاستور ایران فرستاده شد. تعیین توالی با استفاده از پرایمرپیشرو و معکوس عمومی T7 و به صورت دو طرفه صورت گرفت.

آنالیز توالی پروتئینی CHapS

به منظور دستیابی به درصد تشابه و همسانی توالی پروتئین C-HapS تولید شده در این مطالعه با توالی پروتئین C-HapS سایر سویه های هموفیلوس آنفلوانزا ، توالی اسید آمینه ای C-HapS سه سویه مختلف *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول (N187، P860295، TN106) موجود در بانک ژن همراه با توالی پروتئین نوترکیب مطالعه حاضر توسط نرم افزار Jalview، مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین الگوی آنتی ژنیسیته پروتئین C-HapS نوترکیب با استفاده از روش Kolaskar و Tongaonkar (۱۹۹۰) و نرم افزار MIFBioinformatic مورد بررسی قرار گرفت و جایگاه‌های آنتی‌ژنیک آن تعیین شد.

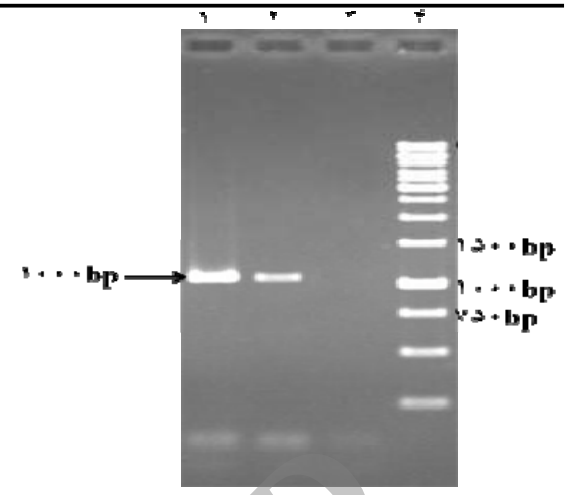
یافته‌ها

ساخت سازه نوترکیب pET24a- *chaps*

ناحیه کربوکسیل پروتئین Haps که مسوول اتصال اولیه باکتری به سلول های میزبان می‌باشد، توسط پرایمرهای اختصاصی و تکنیک PCR تکثیر یافت و الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز، یک باند با اندازه حدود ۱۰۰۰ نوکلئوتید را آشکار ساخت که نشان دهنده تکثیر موفق ژن *c-hapS* از ژنوم سویه باکتریائی موردنظر می‌باشد (شکل ۱).

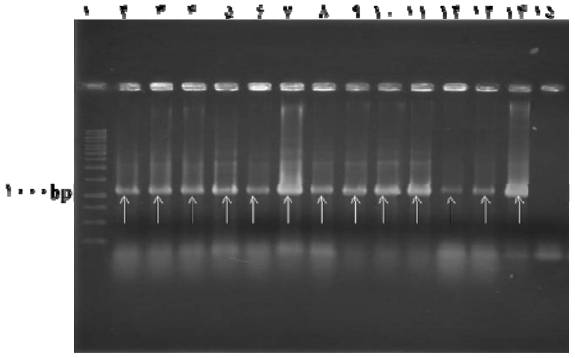
Archive of SID

www.SID.ir



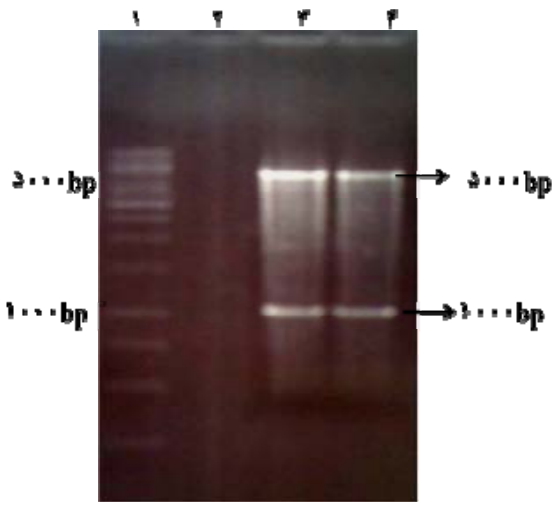
شکل ۱. تکثیر ژن *c-hapS* با آنزیم *Pfu* پلیمراز. چاهک ۱ و ۲: محصول تکثیر ژن*c-hapS* (با فلش نشان داده شده است)؛ چاهک ۳: کنترل منفی چاهک؛ ۴: سایز مارکر۱kb (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)

پس از هضم آنزیمی وکتور و قطعه ژنی، واکنش الحاق صورت پذیرفت و محصول این مرحله به باکتری های مستعد ترانسفورم شد. کشت این باکتری‌ها روی محیط دارای آنتی بیوتیک کانامایسین، چندین کلونی ایجاد کرد. سپس کلونی‌ها از لحاظ دارا بودن قطعه ژنی با اندازه صحیح توسط تکنیک Colony PCR بررسی شدند (شکل ۲).



شکل ۲. بررسی کلونی‌ها از نظر دارا بودن قطعه ژنی با اندازه صحیح توسط تکنیک Colony PCR. چاهک ۱: سایز مارکر kb ۱ (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)؛ چاهک ۲ تا ۱۴: محصول PCR کلونی های ترنسفورم شده با سازه ژنی pET24a-*chapS* (با فلش نشان داده شده است)؛ چاهک ۱۵: کنترل منفی (کلنی ترنسفورم شده پلاسمید pET24a)

ورود صحیح قطعه ژنی درون وکتور موردنظر با هضم آنزیمی سازه pET24a- *chaps* با دو آنزیم تحدیدی *Hind*III و *Xho*I به صورت توام اثبات گردید که منجر به خروج قطعه ژنی با اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز و ایجاد پلاسمید خطی در محدوده ۵۳۰۰ جفت بازی شد (شکل ۳).



شکل ۳. نتیجه هضم آنزیمی سازه نوترکیب pET24a- chaps. چاهک ۱: سایز مارکر۱kb (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)؛ چاهک ۳ و ۴: هضم دو آنزیمی سازه نوترکیب pET24a- chaps با دو آنزیم تحدیدی HindIII و XhoI (محصولات حاصل از هضم آنزیمی با فلش نشان داده شده است)

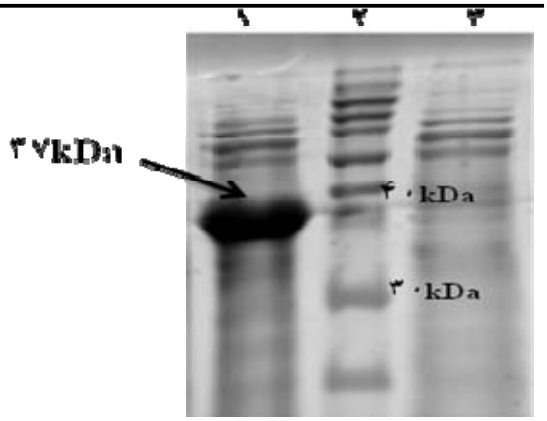
تائید صحت واکنش الحاق ژن در وکتور با روش تعیین توالی

پلاسمید نوترکیب با استفاده از پرایمر T7 promoter و T7 terminator تعیین توالی شد. نتایج تعیین توالی، صحت سازه ژنی از لحاظ ورود ژن، جهت صحیح ورود ژن و عدم وجود جهش در توالی ژن را مورد تائید قرار داد.

آنالیز بیان سازه نوترکیب pET24a-*chaps*

بیان ژن‌های متصل به پروموترهای T7 در سلول‌های *E.Coli* BL21(DE3) به وسیله IPTG القاء می‌شود. بنابراین پروتئین‌های بیان شده در این سلول‌ها همراه با سلول‌های القاء نشده، توسط تکنیک SDS-PAGE از یکدیگر مجزاء شدند. پس از رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها توسط کوماسی بریلیانت بلو (R-250) و رنگ‌بری، ظهور یک باند با اندازه حدود ۳۷ کیلودالتون همراه با باندهای دیگر و عدم ظهور آن در نمونه‌های القاء نشده مشاهده شد که انتظار می‌رود نشان دهنده بیان پروتئین موردنظر باشد (شکل ۴).

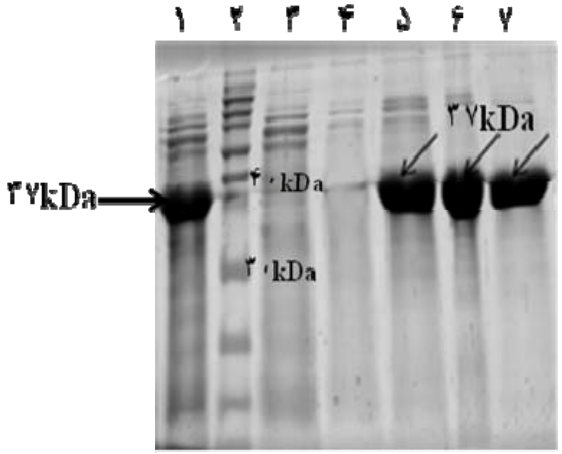
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴. نتیجه بیان سازه نوترکیب pET24a- *chaps*. چاهک ۱: نمونه القاء شده با IPTG؛ چاهک ۲: راهنمای وزنی پروتئین (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)؛ چاهک ۳: نمونه القاء نشده با IPTG. (باند پروتئین موردنظر با فلش نشان داده شده است)

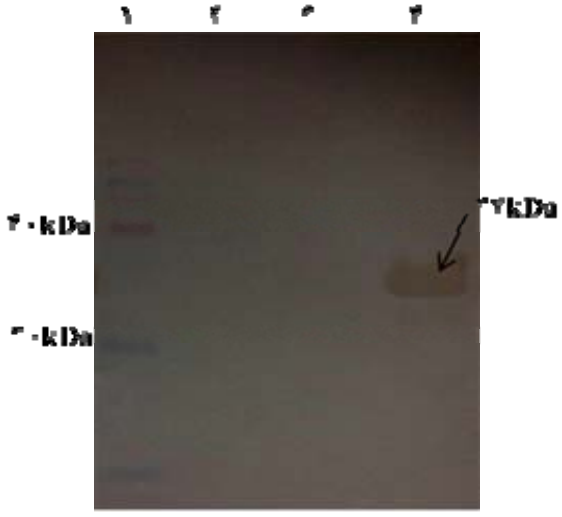
تخلیص و تائید پروتئین C-HapS نوترکیب

پس از القای بیان پروتئین در وکتور pET24a در میزبان بیانی *E.coli* BL21(D3E)، مایع رویی کشت و رسوب حاصل از تخریب سلول ها از نظر وجود پروتئین نوترکیب توسط تکنیک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند و بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب در محلول رویی نشان داده شد. پروتئین نوترکیب موردنظر تحت شرایط دناتوره کننده توسط تکنیک کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA تخلیص گردید. به صورت تئوری توسط نرم افزار Gene Runner وزن مولکولی پروتئین نوترکیب ۳۷ کیلودالتون تخمین زده شد (شکل ۵).



شکل ۵. تخلیص پروتئین نوترکیب C-HapS. چاهک ۱: عصاره سلولی؛ چاهک ۲: راهنمای راهنمای وزنی پروتئین (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)؛ چاهک ۳ و ۴: نمونه حاصل از مرحله شستشو(Washing)؛ چاهک ۵ تا ۷: نمونه حاصل از جدا سازی پروتئین موردنظر(Elution) از ستون. (باند پروتئین موردنظر با فلش نشان داده شده است).

باند پروتئینی ۳۷ کیلودالتونی توسط روش SDS-PAGE مشاهده شد و به عنوان پروتئین C-HapS توسط روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی تائید نهایی گردید (شکل ۶). میزان بیان پروتئین نوترکیب C-HapS در حدود ۶۲٪ نسبت به کل پروتئین‌های باکتریایی بود.



شکل ۶. بررسی تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب با C-HapS با تکنیک وسترن بلات. چاهک ۱: راهنمای وزنی پروتئین؛ چاهک ۲: عصاره باکتری حاوی وکتور pET24 بدون ژن *chapS*؛ چاهک ۳: عصاره باکتری دارای سازه pET24a- *chaps* قبل از القاء با IPTG؛ چاهک ۴: عصاره باکتری دارای سازه pET24a- *chaps* پس از القاء (فلش باند پروتئین مورد نظر با وزن مولکولی ۳۷ (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) را نشان می دهد).

تخلیص و تائید پروتئین C-HapS نوترکیب

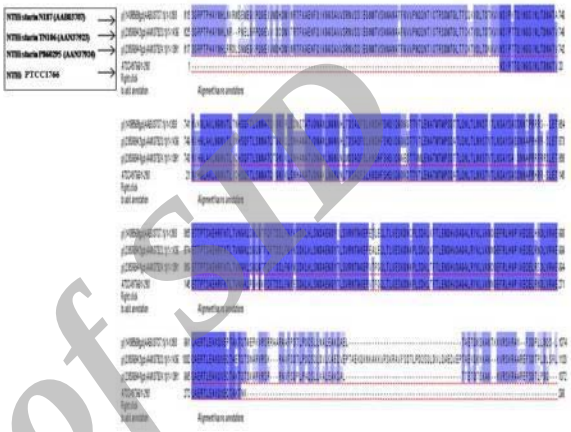
پس از القای بیان پروتئین در وکتور pET24a در میزبان بیانی *E.coli* BL21(D3E)، مایع رویی کشت و رسوب حاصل از تخریب سلول ها از نظر وجود پروتئین نوترکیب توسط تکنیک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند و بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب در محلول رویی نشان داده شد. پروتئین نوترکیب موردنظر تحت شرایط دناتوره کننده توسط تکنیک کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA تخلیص گردید. به صورت تئوری توسط نرم افزار Gene Runner وزن مولکولی پروتئین نوترکیب ۳۷ کیلودالتون تخمین زده شد (شکل ۵). باند پروتئینی ۳۷ کیلودالتونی توسط روش SDS-PAGE مشاهده شد و به عنوان پروتئین C-HapS توسط روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی تایید نهایی گردید (شکل ۶). میزان بیان

Archive of SID
www.SID.ir

پروتئین نوترکیب C-HapS در حدود ۶۲٪ نسبت به کل پروتئین‌های باکتریایی بود.

نتایج آنالیز توالی پروتئینی

همتاسازی توالی پروتئینی C-HapS به دست آمده در این مطالعه با توالی پروتئینی C-HapS سه سویه N187, TN106, P860295 *هموفیلوس آنفلوانزای* غیرقابل طبقه بندی نشان داد که بیش از ۹۷ درصد همسانی بین توالی‌ها وجود دارد (شکل ۷).



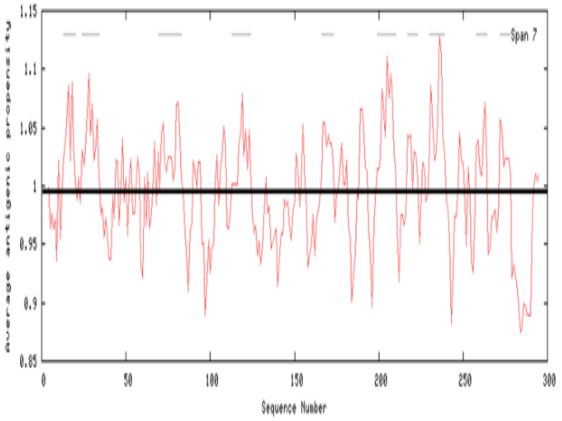
شکل ۷. همتاسازی توالی پروتئینی CHapS به دست آمده در این مطالعه با توالی پروتئینی CHapS سه سویه N187, TN106, P860295 *هموفیلوس آنفلوانزای* غیرقابل طبقه بندی (NCBI GeneBank database cession numbers در شکل نشان داده شده است)

همچنین نمودار آنتی ژنیسیته مربوط به توالی پروتئینی C-HapS تولید شده در این مطالعه، ۹ جایگاه آنتی‌ژنیک (اپی توپ) را مشخص کرد (جدول ۲).

جدول ۲. جایگاه‌های آنتی‌ژنیک (اپی‌توپ) موجود در قطعه پروتئینی CHapS

n	Start Position	Sequence	End Position
1	13	TVNIHGLA	20
2	24	GNVTLIDHSQF	34
3	69	DSAQFSLKNSHFSHQ	83
4	113	NNSTVTLNSAYS	124
5	166	QFTSSLFG	173
6	199	EPVTFGQLTLVE	210
7	217	LSDKLTF	223
8	230	VDAGALRYKL	239
9	258	RNDLVRA	264
10	272	EAKQVEQ	278

در این نمودار، ناحیه بالای نمودار که به صورت اعداد مثبت نشان داده شده است مناطق با آنتی ژنیسیته بالا می‌باشند و نواحی کمتر آنتی‌ژنیک، در زیر نمودار که با اعداد منفی نشان داده شده‌اند هستند. این نمودار براساس الگوریتم روش Kolaskar و Tongaonkar که یکی از روش‌های مناسب برای پیش بینی ویژگی آنتی‌ژنیسیته پروتئین‌ها می‌باشد، رسم گردید (شکل ۸).



شکل ۸. نمودار آنتی ژنیسیته پروتئینی CHapS به دست آمده در این مطالعه براساس الگوریتم روش Kolaskar و Tongaonkar. قسمت بالای نمودار که با اعداد مثبت نشان داده شده است، مناطق هیدروفیلیک یا آنتی ژنیک پروتئین می‌باشد.

بحث

در میان پروتئین‌های اتوترنسپورتر *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول، به نظر می‌رسد که ادهزین Hap نقش کلیدی را در اتصال اولیه باکتری به سلول‌های میزبان بازی می‌کند. مطالعات روی ساختار و عملکرد آن آشکار کرد که این پروتئین دارای فعالیت اتصالی می‌باشد و تداخل با سلول‌های میزبان و همچنین تشکیل میکروکلنی را تا هنگامی که به سطح سلول باکتری متصل است میانجیگری می‌کند (۷،۱۴،۱۵). مطالعات اخیر نشان دادند توالی آمینواسیدی بسیاری از پروتئین‌های سطحی *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول در میان سویه‌های مختلف آن حفظ شده نمی‌باشد و به میزان قابل توجهی متنوع است. درصورتی که مطالعات Cutter و همکارانش نشان دادند ناحیه جابجا شونده ادهزین Hap (Haps) با وجود آن که در سطح سلول باکتری بیان می‌شود، برخلاف سایر ادهزین‌های *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول، توالی آن در سویه‌های مختلف به میزان زیادی حفظ شده است و ایمنی‌زایی با آن از استقرار *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول در مدل حیوانی و در نهایت عفونت متعاقب آن جلوگیری می‌کند (۱۶).

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی‌های بعدی نشان داد که بخشی از پروتئین Haps، ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps، تداخل بین سلول-های باکتری با سلول‌های میزبان را به عهده دارد که همان ناحیه متصل شونده Haps به سلول میزبان (C-Haps) می‌باشد (۱۷). مقایسه توالی‌های آمینواسیدی C-Haps سه سویه مختلف *هموفیلوس آنفلوانزا* (N187، P860295، TN106) نشان داد که بیش از ۹۷/۱٪ شباهت بین آنها وجود دارد. همچنین مطالعات نشان دادند که ایمنی زایی داخل بینی (Intranasal immunization) با C-Haps نوترکیب منجر به القاء پاسخ‌های آنتی‌بادی می‌شود که Haps طبیعی را نیز خنثی می کند. در مجموع ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps به عنوان کاندیدای واکسن علیه سویه‌های مختلف *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول معرفی شد (۱۸). یافته های به دست آمده مربوط به این پروتئین (C-Haps) و همچنین وجود شواهدی از حضور پاسخ ایمنی علیه آن موجب شد در مطالعه حاضر نیز ویژگی ایمونوژنیسیته C-Haps سویه دیگری از *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول و همچنین تشابه و همسانی توالی آن با C-Haps سایر سویه‌ها مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول PTCC ۱۷۶۶ به صورت نوترکیب تولید شد.

در این تحقیق، سازه pET24a-chaps حامل قطعه ژنی *c-haps* مربوط به ناحیه کربوکسیل پروتئین Haps (C-Haps) *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول PTCC ۱۷۶۶ ساخته شد و صحت آن توسط روش‌های بیولوژی مولکولی و تعیین توالی تایید گردید. مقایسه سکانس آمینواسیدی C-Haps به دست آمده در این تحقیق با سکانس آمینواسیدی C-Hapsهای ثبت شده در بانک ژن (N187، P860295، TN106) ۹۷درصد همسانی را نشان دادند و همچنین بر اساس نمودار آنتی ژنیسیته پروتئین C-Haps که توسط الگوریتم Kolaskar وTongaonkar و برنامه Antigen peptide prediction (http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl) به دست آمده است، مشخص شد که این پروتئین دارای ۹ جایگاه آنتی ژنیک مشترک با C-Haps سایر سویه های *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول بوده و قابل توجه این که جایگاه‌های آنتی‌ژنیک دقیقا در مناطق حفظ شده بین این ۴ سویه قرار دارد. همان طور که در مطالعات پیشین مشخص شد و در یافته‌های مطالعه کنونی نیز نشان داده شد، ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps در میان سویه‌های مختلف *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول به میزان قابل توجهی حفظ شده است. همچنین در این تحقیق، سازه pET24a-chaps به سلول‌های *E. coli* BL21(DE3) منتقل شد و قطعه پروتئین موردنظردر نتیجه رشد سلول‌ها در محیط کشت 2xTY، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و القاء توسط IPTG ۱ mM در OD600 معادل ۰/۶ بیان گردید. نتایج مربوط به بررسی میزان بیان پروتئین توسط روش دنسیتومتری نشان داده که نسبت چگالی باند پروتئینی موردنظر نسبت به کل باندهای پروتئینی باکتری القاء شده ۶۲٪ می‌باشد، در صورتی که در مطالعه قبلی بالاترین میزان بیان ۴۲ ٪ گزارش شده است. البته شرایط بیان پروتئین در مطالعه ذکر شده به این صورت بود که ژن *c-haps* ۳ سویه N187، P860295، TN106 به طور جداگانه تحت کنترل پروموتر T7 وکتور pET17b قرار داده شده و پس از ورود سازه موردنظر به میزبان بیانی *E. coli* BL21(DE3) pLysS/، سلول‌های باکتریایی در محیط کشت SOB غنی شده با ۱٪ گلوکز رشد داده شدند و القاء سلول ها با ۱mM IPTG در OD600 معادل ۱/۵-۱ صورت گرفت (۱۹). به طور کلی مقایسه نتایج نشان می‌دهد که مقدار بیان C-Haps در مطالعه کنونی حدودا ۲ برابر بالاتر از مقدار بیان آن در مطالعه قبلی می‌باشد.

به دلیل حضور اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک بسیار حفظ شده میان C-Haps *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول PTCC ۱۷۶۶ و سایر سویه‌های *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول، پیش بینی می‌شود که پاسخ ایمنی علیه C-Haps به دست آمده در این تحقیق علیه سویه‌های مختلف *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول نیز محافظت کننده باشد و بتوان از آن به عنوان یک گزینه مطلوب در تحقیقات واکسنی استفاده کرد. همچنین شرایط به کار گرفته شده در این مطالعه که منجر به بیان بالای پروتئین مورد نظر شد بتواند راه را برای توسعه واکسن‌های در برگیرنده C-Haps علیه سویه‌های مختلف *هموفیلوس آنفلوانزای* بدون کپسول هموار سازد. لازم به ذکر است که هم اکنون بررسی ویژگی ایمونولوژیسیته پروتئین مورد نظر در مدل حیوانی در حال انجام می‌باشد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از همکاران بخش باکتری شناسی و هپاتیت و ایدز انستیتوپاستور ایران که در انجام این تحقیق همکاری نمودند.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

1. Howard AJ, Dunkin KT, Millar GW. Nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in healthy children. J Epidemiol Infect 1988; 100:193-203.
2. Kuklinska D, Kilian M .1984. Relative proportions of Haemophilus species in the throat of healthy children and adults. Eur J Clin Microbiol 1984; 3**:**249-252.
3. Giebink GS. The microbiology of otitis media. J Pediatr Infect Dis 1989; 8:S18-20.
4. Hallstrom T, Singh B, Resman F, Blom A. *Haemophilus influenza* Protein E Binds to the Extracellular Matrix b Concurrently Interacting With Laminin and Vitronectin. The J Infectious 2011; 204:1065–74.
5. Wiertsema SP, Kirkham LA, Corscadden KJ, Mowe EN, Bowman JM, Jacoby P, et al. Predominance of nontypeable *Haemophilus influenzae* in children with otitis media following introduction of a pneumococcal conjugate vaccine schedule. Vaccine 2011; 29:5163-70.
6. Doran L, Fink DL, Buscher AZ, Green B, Fernsten Ph, St. Geme JW. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epitheliel cells and extracellular matrix via binding in the C-terminal end of the passenger domain. Cell Microbiol 2003; 5:175-86.
7. Cutter D, Mason K, Howell A, Fink D, Green B, Geme J. Immunization with *Haemophilus influenzae* Hap adhesin protects against nasopharyngeal colonization in experimental mice. J Infect Dis 2002; 186:1115-21.
8. Hardy GG, Tudor SM, St Geme JW III. The pathogenesis of disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae.* In: Herbert MA, Hood DW, Moxon ER, Editors. *Haemophilus influenzae* protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2003. P.1–28.
9. Dubendorff JW, Studier FW. Controlling basal expression in an inducible T7expression cystem by bloking the target T7 promoter with Lac repressor. J Mol Biol 1991;219:45-59.
10. Adhikari P, Kirby SD, Nowalk AJ, Veraldi KL, Schryvers AB, Mietzner TA. Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. J Biol Chem 1995; 270:25142-49.
11. West-Barnette S, Rockel A, Edward W. Biofilm growth increases phosphorylcholine content and decreases potency of nontypeable *Haemophilus influenzae* endotoxins. J Infect Immun Swords 2006; 74: 1828.
12. Hannah N, Dayle A. Jarisch J. Chemically defined media for growth of *Haemophilus influenzae* strains. J Clin Microbiol 2003; 41:4408.
13. Sambrook J, Russell DW. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: Janssen K, Editor. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001. P.213-26.
14. Hendrixon DR, St Geme JW 3rd. The *Haemophilus influenzae* Hap serin protease promotes adherence and microcolony formation potentiated by a soluble host protein. Mol Cell 1998; 2: 841-50.
15. St Geme JW 3rd. Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenza*e adherence and invasion. J Cell Microbiol 2002; 4:191-200.
16. Murphy TF, Sethi S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. J Am Rev Respir Dis 1992; 146: 1067-83.
17. Fink DL, Green B, St Geme JW 3rd. The *Haemophilus influenzae* hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. J Infect Immun 2002; 70:4902-907.
18. Liu DF, Mason KW, Mastri M, Pazirandeh M, Cutter D, Fink DL, et al. The C-terminal fragment of the internal 110-kilodalton passenger domain of the Hap protein of nontypeable *Haemophilus influenza* is a potential vaccine candidate. J Infect Immun 2004:72:6961-68.
19. Odolf DF, Mason KW, Mastri M, Paziranseh M, Cutter D, St Geme JW 3rd. The C-terminal fragment of the internal 110- kilodalton passenger domain of tha Hap protein of nontypeable *Haemophilus influenza* is a potential vaccine candidate. J Inf Immun 2004; 29: 6961–68.

Archive of SID

www.SID.ir