Archive of SID

مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۸، شماره‌ی ۷۱، تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۲۴ تا ۳۳

همسانه سازی جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A *سودوموناس آیروژینوزا*

بهرام امینی[۱]، دکترمهدی کمالی[۲]، دکترعلی زارعی محمودآبادی[۳]، دکتر یوسف مرتضوی[۴]، دکترآزاده ابراهیم حبیبی[۵]، ابراهیم بیات[۶]، نیما فرهادی[۷]، حمیدرضا جوادی[۸]، امیرهمایون کیهان[۹]

نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی mehkamali@bmsu.ac.ir

دریافت: ۸۸/۱۰/۲۷ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: *آنتی بادی بر علیه اگزوتوکسین A سودوموناس آیروژینوزا می‌تواند در ایمونوتراپی همراه با درمان آنتی بیوتیکی در بیماران دچار سوختگی شدید استفاده گردد. اگزوتوکسین A یکی از فاکتورهای بیماریزای سودوموناس آیروژینوزا است که از سه جایگاه اتصال دهنده، انتقال دهنده و کاتالیتیک تشکیل شده است. هدف از این مطالعه تولید نوترکیب جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A این میکرواورگانیسم، جهت تولید آنتی‌بادی بر علیه آن می‌باشد.*

روش بررسی: *نمونه‌های سودوموناس آیروژینوزا از بیماران دچار سوختگی نوع دو و سه بستری در بیمارستان آیت الله موسوی زنجان، جدا و با روش‌های کشت و انجام آزمایشات بیوشیمیایی شناسایی گردید. DNA باکتری استخراج و وجود ژن اگزوتوکسین A روی کروموزوم باکتری از طریق PCR تایید گردید. جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A توسط PCR تکثیر و محصول PCR و پلاسمید توسط آنزیم‌های برش دهنده محدودالاثر، برش داده شدند. محصول PCR و پلاسمید پس از الحاق به باکتری میزبان E. coli BL21(DE3) تراریخت گردید. کلون‌ها با واکنش PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی غربالگری و تایید گردیدند.*

یافته‌ها: *توالی بازهای منطقه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین A با اطلاعات بانک ژنی مقایسه و میزان تشابه آن‌ها ارزیابی گردید. نتایج بیانگر عدم وجود تغییر در ژنوم آن در سوش‌های مورد مطالعه در کشور بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این مطالعه نشان داد که ۹۰ درصد باکتری‌های جدا شده دارای سم اگزوتوکسین A بوده و سوش‌های جدا شده از ایران نیز با توالی‌های گزارش شده در بانک ژن بین المللی مشابه بودند.*

واژگان کلیدی: سودوموناس آیروژینوزا، کلونینگ، اگزوتوکسین آ، جایگاه کاتالیتیک

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
۲- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، تهران
۳- دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، تهران
۴- دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی، زنجان
۵- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی، تهران
۶- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
۷- کارشناس ارشد سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، تهران
۸- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، تهران
۹- کارشناس ارشد سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... تهران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سودوموناس آیروژینوزا از مهمترین عفونت‌های ثانویه بیمارستانی در بیماران دچار سوختگی می‌باشد. یکی از فاکتورهای بیماری‌زا در این باکتری اگزوتوکسین A است (۲و۱). اگزوتوکسین A از ۶۱۳ اسید آمینه با وزن ملکولی ۶۶ کیلودالتون تشکیل شده است و توسط باکتری به محیط پیرامون آن ترشح می‌شود (۴و۳). اسید آمینه‌ی لیزین در انتهای کربوکسیل اگزوتوکسین A توسط کربوکسیل پپتیداز شکسته شده، باعث اتصال سم به گیرنده‌ی α_2 - ماکروگلبولین سلول‌های یوکاریوت می‌شود (۵) و از طریق آندوسیتوز وابسته به گیرنده‌ی اگزوتوکسین A وارد سلول می‌شود. اگزوتوکسین A در داخل سلول توسط پروتئازهای ویژه اندوزوم شکسته شده و از رسپتور جدا و پیوندهای دی‌سولفیدی آن احیا می‌شود (۶). از انتهای کربوکسیل اگزوتوکسین A یک قطعه (۶۱۳-۲۸۰ اسید آمینه‌ای) جدا و به شبکه‌ی آندوپلاسمی وارد و از شبکه آندوپلاسمی به سیتوزول منتقل می‌شود (۸و۷). اگزوتوکسین A در سیتوزول از طریق ریبوزیله کردن برگشت ناپذیر اسیدآمینه هیستیدین فاکتور طویل‌سازی ۲ (eEF-2)، باعث غیر فعال شدن آن می‌گردد. در نتیجه سنتز پروتئین متوقف و مرگ سلول صورت می‌گیرد. (۹) اگزوتوکسین A واجد سه جایگاه (Domain) می‌باشد. جایگاه I از دو جایگاه (aa ٤٠٤-٣٦٥ Ib و Ia۱-۲۵۲aa) تشکیل شده است. جایگاه Ia مسئول اتصال به گیرنده‌ی سلولی است. حذف و جهش در اسید آمینه موقعیت ۵۷ دامنه‌ی Ia باعث غیرفعال شدن اگزوتوکسین A و مهار اتصال سم به سلول می‌گردد. نقش جایگاه Ib هنوز مشخص نشده است. حذف بخشی از دامنه‌ی Ib (aa ۳۸۰-۳٦۵) هیچ تاثیری بر روی سمیت اگزوتوکسین A ندارد (۱۰). جایگاه II (aa ۳۶۴ -۲۵۳) باعث عبور سم از عرض غشای سلول می‌شود (۱۱). جایگاه III (aa ۶۱۳-۴۰۵) از طریق پنج اسیدآمینه‌ی انتهای کربوکسیل باعث ریبوزیله شدن فاکتور طویل سازی ۲ (eEF-2) می‌گردد (۱۳و۱۲). ژن اگزوتوکسین A بر روی کروموزوم باکتری قرار داشته به همین دلیل بیش از ۹۰ درصد گونه‌های *سودوموناس آیروژینوزا* این سم را تولید می‌کنند (۱۵و۱۴). همسانه سازی اگزوتوکسین A و توالی یابی ژن اگزوتوکسین A در سال ۱۹۸۴ توسط گرگوری (Gregory) و همکاران انجام شد. ژن تنظیم کننده بیان اگزوتوکسین A در سال ۱۹۸۶ توسط هداستروم (Hedstrom) و همکاران مشخص گردید. در سال ۱۹۸۷ توسط کامرون (Cameron) و همکاران جایگاه بیان اگزوتوکسین A تعیین گردید. اخیراً مطالعات زیادی روی ایمنی‌زایی و درمان تومورها از طریق این سم انجام شده است. تولید دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین A به صورت نوترکیب در این مطالعه برای اولین بار در ایران انجام گردید.

روش بررسی

تشخیص *سودوموناس آیروژینوزا*: *سودوموناس آیروژینوزا* از بیماران دچار سوختگی نوع دو و سه بستری در بیمارستان آیت الله موسوی زنجان جدا شدند. این نمونه‌ها با سوآپ استریل از بیماران جدا و در محیط نوترینت آگار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شدند. سپس باکتری توسط تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، TSI، تست سیترات، اندول، VP، MR و تولید پیگمان شناسایی و پس از کشت در محیط کشت LB مایع و افزودن گلیسرول (غلظت نهایی ۲۰ درصد) در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره گردیدند.

طراحی پرایمر: جهت تشخیص وجود ژن اگزوتوکسین A بر روی DNA باکتری یک جفت پرایمر، و نیز جهت تکثیر جایگاه کاتالیتیک یک جفت پرایمر دیگر واجد جایگاه‌های برش آنزیمی با توجه به اطلاعات موجود در بانک اطلاعات ژنی طراحی و سنتز گردید (سیناژن، ایران). توالی‌های پرایمر

www.SID.ir

Archive of SID

بالا دست و پایین دست تشخیص سم اگزوتوکسین A عبارت بود از:

PBF: 5′- TGC TGC ACT ACT CCA TGG TC -3′
PBR: 5′- ATC GGT ACC AGC CAG TTC AG -3′

پرایمرهای بالا و پایین دست جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A با جایگاه برش آنزیم‌های برش دهنده محدودالاثر EcoRI و HindIII عبارت بود از:

PCF:5′- GGC GAATTC GGC GAC GTC AGC TTC A -3′
PCR:5′- CGG AAGCTT CTT CAA GTC CTC GCG C -3′

آماده سازی DNA باکتری: سوش باکتری *سودوموناس آیروژینوزا* درمحیط LB-broth به مدت ۱۲ ساعت رشد داده شد. ژنوم کروموزومی باکتری با استفاده از کیت تخلیص ژنوم (High Pure PCR Template Preparation, Roche)، استخراج و مطابق جدول ۱ وجود ژن اگزوتوکسین A تأیید گردید.

جدول ۱: غلظت‌های عوامل واکنش PCR

Reaction	Concentration	Reagent
۱ µl	۲۰۰ ng/µl	Template DNA
۵ µl	۱۰ X	PCR buffer
۱ µl	۵۰ mM	$MgCl_2$
۴ µl	۲/۵ mM	dNTPs
۲ µl	۱۰ pmol/ µl	Forward primer
۲ µl	۱۰ pmol/ µl	Reverse primer
۰/۵ µl	۵ uite/ µl	Taq.DNA pol.
۳۴/۵ µl	-	D.D.W.
۵۰ µl	-	Total volume

جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A پس از مشخص شدن ژن اگزوتوکسین A از طریق PCR در شرایط زیر در حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر تکثیر گردید. (۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۲ میکرولیتر $MgSo_4$ (۲۵ mM)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ mM)، ۲ میکرولیتر DNA و نیم میکرولیتر آنزیم PWO پلیمراز). واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سه مرحله تکراری ۳۵ چرخه‌ای شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه انجام گرفت. پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول واکنش PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز گردید.

آماده سازی محصول PCR: محصول واکنش PCR توسط دو آنزیم برش دهنده HindIII وEcoRI، با ۲ میکرولیتر از هر آنزیم محدود کننده، ۳۰ میکرولیتر محصول PCR و ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X در حجم واکنش ۵۰ میکرولیتری بر اساس پروتکل شرکت سازنده‌ی آنزیم (Fermentase) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برش داده شد. محصولات برش زده شده توسط کیت (High Pure PCR Product Purification Kit ,Roche) استخراج و روی ژل آگاروز ۲ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

آماده سازی پلاسمید: باکتری حامل پلاسمید (pET28a) در محیط کشت LB مایع به مدت ۱۲ساعت کشت گردید. پلاسمید آن بر اساس پروتکل استاندارد استخراج و روی ژل آگاروز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز شد. پلاسمید استخراج شده نیز مانند محصول PCR توسط دو آنزیم برش دهنده HindIII و EcoRI در شرایط یکسان به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برش داده شد. محصول برش توسط کیت بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Roche) استخراج و روی ژل آگاروز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز شد.

الحاق: مخلوط ۱به ۳ محصول PCR و پلاسمید برش خورده را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد و بلافاصله به یخ منتقل گردید. ۲ میکرولیتر آنزیم T_4 Ligase و ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X به آن اضافه گردید. به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۰تا۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. محصول الحاق در نهایت توسط کیت (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Roche) جهت تراریخت استخراج گردید.

تراریخت: سلول‌های صلاحیت‌دار (Competent) بر اساس پروتوکل استاندارد با گلیسرول ۱۰ درصد در دمای ۴+ درجه‌ی سانتی‌گراد تهیه و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره گردید. ۵ میکرولیتر از محصول الحاق و ۲۰ میکرولیتر از سلول‌های صلاحیت دار با هم مخلوط و به مدت ۱ دقیقه در داخل یخ قرارداده شد. توسط دستگاه Gen Pulser با ولتاژ ۲۵۰۰ محصول الحاق به*E. coli BL21(DE3)* منتقل و به مدت یک ساعت در محیط SOC کشت داده شد. رسوب باکتری‌های محیط کشت SOC پس از سانتریفوژ (۴۰۰۰ g) در محیط کشت LB جامد دارای کانامایسین (۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به صورت چمنی کشت داده شد.

غربالگری کلنی‌ها: کلنی‌های محتوی پلاسمید بر اساس پروتکل استاندارد استخراج شدند. وجود ژنوم نوترکیب از طریق PCR، برش آنزیمی و توالی‌یابی ارزیابی گردید. PCR مطابق شرایط انجام گرفته در همسانه سازی صورت گرفت. برش آنزیمی پلاسمید با آنزیم‌های HindIII، EcoRI و BamHI بر اساس پروتکل شرکت سازنده‌ی آنزیم (Fermentas) انجام گرفت. توالی یابی نیز توسط مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... انجام شد.

به منظور بیان پروتیین، باکتری نوترکیب در دو لوله‌ی فالکون ۱۵ میلی‌لیتری دارای محیط کشت LB مایع کانامایسین دار (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت گردید. در OD=۰/۶ به یکی از لوله‌ها IPTG با غلظت نهایی یک میلی مولار افزوده شد. لوله‌ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد القا و سپس رسوب هر لوله‌ی فالکون جمع‌آوری و با دستگاه سونیکاتور در محلول PBS شکسته شد. بیان پروتیین نوترکیب توسط الکتروفورز SDS-PAGE ۱۵ درصد با ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه و رنگ آمیزی کوماسی بلو جستجو گردید. همچنین توسط وسترن بلاتینگ صحت بیان تایید گردید.

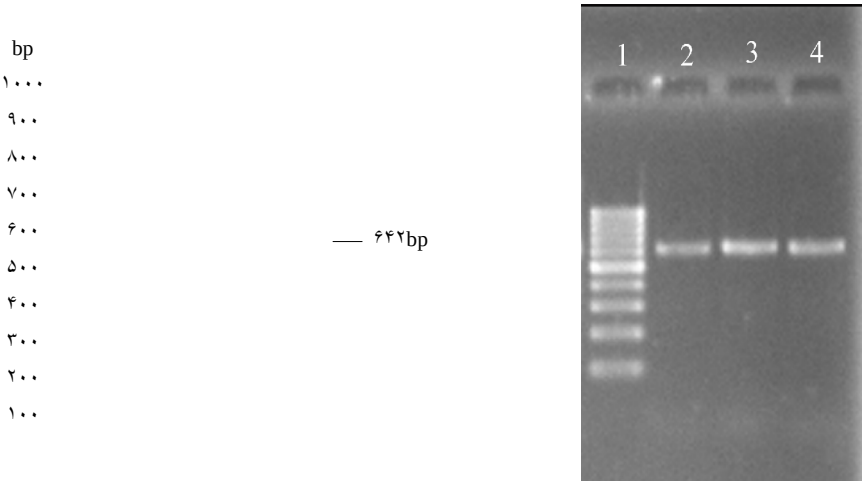
یافته‌ها

در این مطالعه در مجموع ۱۰ نمونه *سودوموناس آیروژینوزا* از بیماران دچار سوختگی جدا گردید. تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، سیترات و TSI در این باکتری مثبت و تست‌های اندول،VP و MR در این باکتری منفی بود. پس از استخراج DNA، PCR جهت تشخیص ژن اگزوتوکسین A، با استفاده از کروموزوم باکتری، انجام گرفت و روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردید. تشکیل باند ۱۹۰ جفت بازی مربوط به این توکسین، تاییدکننده‌ی ژن اگزوتوکسین A بود. سپس محصول PCR سنتز جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد. نتیجه‌ی آزمایش با این امر کاملا مطابقت

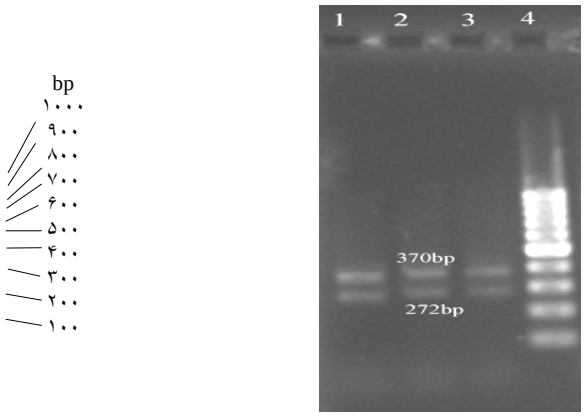
www.SID.ir

Archive of SID

داشت و در تصویر ۱ مشاهده می‌شود. نتیجه‌ی تراریخت همسانه سازی انجام گرفته رشد بیش از ۲۰۰ کلونی روی پلیت بود. نتایج غربالگری کلنی‌ها از طریق PCR در تصویر ۲ مشاهده می‌شود. غربالگری پلاسمید با آنزیم‌های محدود کننده‌ی HindIII و EcoRI ، یک قطعه ۶۳۰ جفت بازی را تایید کرد که در تصویز ۳ مشاهده می‌شود. در پایان نتیجه‌ی همسانه‌سازی توسط توالی‌یابی تایید گردید و توسط نرم افزار NCBI Blast مورد آنالیز قرار گرفت که ۹۹/۵ درصد تشابه را با اطلاعات بانک ژنی نشان داد. پروتئین به‌صورت نامحلول در سیتوپلاسم بیان و تجمع یافت. بیان پروتیین توسط الکتروفورز SDS-PEG و رنگ آمیزی کوماسی بلو مشخص گردید. تشکیل باند ۲۸۷۱۰ دالتونی تایید کننده‌ی پروتئین مورد نظر بود که در تصویر ۴ مشاهده می‌شود. در انتهای N و C ترمینال پروتئین شش اسید آمینه‌ی هیستیدین وجود داشت که در تایید نهایی بیان پروتئین توسط وسترن بلاتینگ با آنتی بادی His-Tag مورد استفاده قرار گرفت.



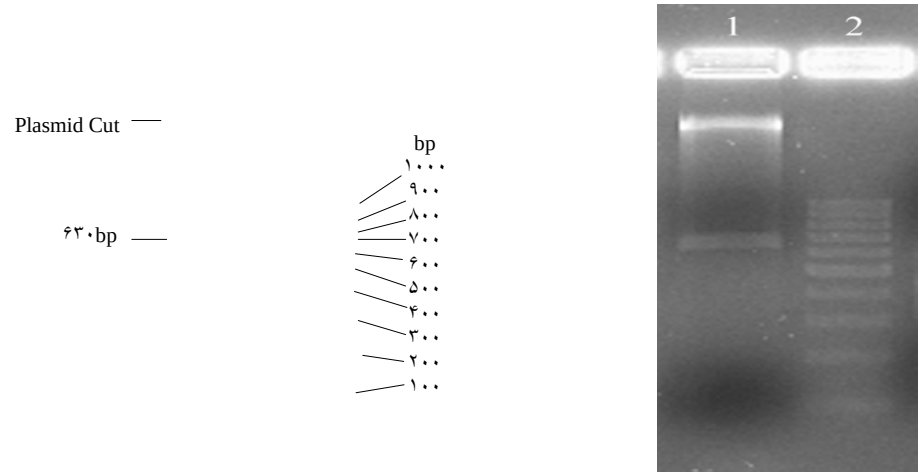
شکل۱: *الکتروفورز محصول PCR دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آیروژینوزا در ژل آگاروز ۲ درصد. ۱)- نشان‌گر وزن ملکولی DNA (۱۰۰bp)، ۲،۳،۴- باند ۶۴۲bp محصول PCR دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آیروژینوزا به ترتیب سوش‌های شماره۱،۲و۳*



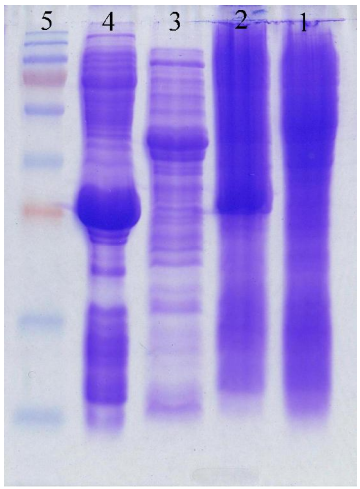
شکل ۲: *الکتروفورز برش محصول PCR دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آیروژینوزا روی ژل آگاروز ۲ درصد. ۱،۲و۳)- دو باند bp ۳۷۰ و۲۷۲ برش محصول PCR با آنزیم محدود کننده‌ی BamHI ۴)- نشان‌گر وزن ملکولی (۱۰۰bp) DNA*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳: *الکتروفورز برش پلاسمید نوترکیب دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آیروژینوزا روی ژل آگاروز ۲ درصد. ۱)- باند ۶۳۰ bp برش پلاسمید نوترکیب دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ با آنزیم‌های محدود کننده‌ی E.coRI, HindIII ۲)- نشان‌گر وزن ملکولی (۱۰۰bp) DNA*



شکل ۴: *الکتروفورز SDS-PAGE بیان پروتیین دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آیروژینوزا روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد. ۱)- کنترول منفی بیان پروتئین بدون تحریک IPTG ۲)- پلیت باکتری لیز شده با سونیکاتور در محلول PBS و تحریک شده با IPTG ۳)- سوپ رویی سانتریفوژ پروتئین تحریک شده با IPTG ۴)- پروتئین حل شده در اوره ۸ مولار (۲۸۷۱۰ دالتون)، تحریک شده با IPTG ۵)- نشانگر وزن ملکولی پروتئین*

بحث

سودوموناس آیروژینوزا پاتوژن فرصت طلب و سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است. این باکتری باعث مرگ بیماران دچار سوختگی شدید می‌شود. سمی‌ترین پروتیین *سودوموناس آیروژینوزا* اگزوتوکسین A است. این پروتئین اولین بار توسط دکتر لو از *سودوموناس آیروژینوزا* جدا گردید (۱۶). انتهای کربوکسیل جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A در سودوموناس آیروژینوزا مسئول فرآیند ریبوزیل ترانسفرازی است. این جایگاه در اگزوتوکسین دیفتری در انتهای آمینی قرار دارد. هر دو سم روی eEF-2 تاثیر می‌گذارند. ولی توالی بازهای آلی و اسیدآمینه آنها با یکدیگر متفاوت و تنها ۲۰ اسید آمینه مشابه دارند (۱۱). در

www.SID.ir

Archive of SID

این مطالعه باکتری از بیماران دچار سوختگی جدا و شناسایی شد. ۹۰ درصد باکتری‌ها دارای سم اگزوتوکسین A بودند. ژن کدکننده‌ی اگزوتوکسین A و همچنین جایگاه کاتالیتیک آن دارای بیشترین توالی بازی G + C (۶۸/۵ درصد) است، به این دلیل در هنگام طراحی پرایمر طول پرایمرها جهت کاهش دمای اتصال پرایمرها کوتاه‌تر انتخاب گردیدند و به علت عدم وجود جایگاه برش روی ژنوم دامنه‌ی کاتالیتیک باکتری دو آنزیم HindIII و EcoRI جهت برش وکتور و محصول PCR انتخاب گردیدند. پس از طراحی پلاسمید ژنوم باکتری استخراج گردید. به علت اینکه در دورهای بالای سانتریفوژ، ژنوم باکتری می‌شکست از سانتریفوژ با دور پایین استفاده گردید. واکنش PCR با تغییر دو فاکتور اساسی غلظت منیزیوم و دمای اتصال پرایمرها به رشته‌ی الگو تنظیم گردید. تولید اگزوتوکسین A از *سودوموناس آیروژینوزا* پیچیده است و تحت کنترول ژنتیکی باکتری است. تولید سم توسط محرک های محیطی مثل غلظت آهن، حرارت، میزان اکسیژن و ترکیبات محیط القا می‌شود. غلظت معین آهن در محیط کشت تولید اگزوتوکسین A توسط سودوموناس آیروژینوزا را تنظیم می‌کند. افزایش آهن محیط باعث جهش ژن Tox C و مهار بیان اگزوتوکسین A توسط باکتری می‌شود. در غلظت‌های کم آهن نیز سم تولید نمی‌شود (۱۸و۱۷). همچنین برخی از سویه‌های *سودوموناس آیروژینوزا* پروتئولیتیک هستند و آنزیم‌های پروتئاز به محیط کشت ترشح و باعث تجزیه‌ی اگزوتوکسین A و کاهش بازدهی استخراج سم می‌شود (۱۹). یکی دیگر از مشکلات استخراج اگزوتوکسین A از *سودوموناس آیروژینوزا* ترشح سایر پروتئین‌های باکتری به محیط کشت است، این حالت استخراج سم از مخلوط پروتئینی را مشکل می‌سازد (۱۱). در این تحقیق با همسانه سازی (کلونینگ) جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A و استخراج آن می‌توان بر این مشکلات فایق آمد. توالی بازی جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A پس از توالی‌یابی با اطلاعات موجود در بانک ژنی مقایسه شد که قطعه‌ی مورد نظر دارای بالاترین تشابه بازی با جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A در اطلاعات بانک ژنی بود. بیان پروتئین با القای IPTG تحریک و افزایش یافت. جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A دارای وزن مولکولی ۲۸۷۱۰ دالتون بود که کمی سنگین‌تر از اندازه‌ی واقعی آن است. وزن مولکولی واقعی جایگاه کاتالیتیک خالص ۲۳۱۰۰ دالتون است که ۵۶۱۰ دالتون آن مربوط به وکتور است (۶). اولین بار بیان ژن فسفولیپاز C و سایر پروتئین‌های خارج سلولی *سودوموناس آیروژینوزا* در *E. coli* توسط لوری و تای بررسی گردید. آن‌ها مشاهده کردند، اگزوتوکسین A به بیرون سلول و غشای خارجی ترشح نمی‌شود، بلکه در فضای پری پلاسمی باکتری تجمع می‌یابد. در این تحقیق مشاهده شد، جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A در سیتوپلاسم سلول به صورت انکلوژن بادی تجمع می‌یابد. در واقع تفاوت *E. coli* نسبت به *سودوموناس آیروژینوزا* عدم ترشح سم به خارج سلول است (۲۰). تولید نوترکیب جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A جهت تحقیقات بعدی اهمیت فراوانی دارد. در ایران تاکنون کلونینگ جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A انجام نشده بود. در این مطالعه برای اولین بار جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A کلون و بیان گردید. با توجه به افزایش شیوع عفونت در بیماران دچار سوختگی و مرگ و میر ناشی از آن در دسترس بودن پروتئین جهت تولید آنتی‌بادی علیه بیماری ضروری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد بیشتر سویه‌های *سودوموناس آیروژینوزا* اگزوتوکسین A تولید می‌کنند. توالی بازهای جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A با اطلاعات بانک ژنی مقایسه گردید و مشخص شد که دارای بیشترین تشابه بازی (۹۹/۵ درصد) است. با توجه به افزایش شیوع عفونت‌های *سودوموناس آیروژینوزا* در بیمارستان‌ها تولید نوترکیب

www.SID.ir

Archive of SID

جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A اولین قدم جهت تولید آنتی‌بادی و کنترل عفونت همراه با درمان آنتی‌بیوتیک است

References

1- Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad SH. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the south of Iran. *Burns*. 2006; 32: 343-7.

2- Tredget EE, Shankowsky HA, Rennie R, Burrell RE, Logsetty S. *Pseudomonas* infections in the thermally injured patient. *J Burns*. 2004; 30: 3-26.

3- Chang JH, Kwon HY. Expression of 14-3-3δ, cdc2 and cyclin B proteins related to exotoxin A-induced apoptosis in HeLa S3 cells. *J Inter Immunopharmacolo*. 2007; 7: 1185-91.

4- Doring G, Pier GB. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Vaccine*. 2008; 26: 1011-24.

5- Holder IA. *Pseudomonas* immunotherapy a historical. *J Vaccine*. 2004; 22: 831-9.

6- Wolf P, Elsasser-Beile U. *Pseudomonas* exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. *J Med Microbiol*. 2009; 299: 161-76.

7- Pastrana DV, FitzGerald DJ. A nonradioactive, cell-free method for measuring protein synthesis inhibition by *Pseudomonas* exotoxin. *J Analytical Biochem*. 2006; 353: 266-71.

8- Wedekind1 JE, Trame1 CB, Dorywalska M, et al. Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *J Mol Bio*. 2001; 314: 823-37.

9- Yates SP, Merrill AR. A catalytic loop within *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A modulates its transferase activity. *J Bio Chem*. 2001; 276: 35029-36.

10- Hertle R, Mrsny R, Fitzgerald DJ. Dual-function vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of chimeric exotoxin a-pilin protein. *J Infec and Immun*. 2001; 69: 6962-9.

11- Mere J, Morlon-Guyot J, Bonhoure A, Chiche L, Beaumelle B. Acid-triggered membrane insertion of *Pseudomonas* exotoxin A involves an original mechanism based on pH-regulated tryptophan exposure. *Bio Chem*. 2006; 280: 21194-201.

12- Challa S, Barrette R, Rood D, Zinckgraf J, French R, Silbart L. Non-toxic *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A expressing the FMDV VP1 G-H loop for mucosal vaccination of swine against foot and mouth disease virus. *J Vaccine*. 2007; 25: 3328-37.

13- Song S, Xue J, Fan K, et al. Preparation and characterization of fusion protein truncated *Pseudomonas* exotoxin A (PE38KDEL) in *Escherichia coli*. *Pro Expr and Puri*. 2005; 44: 52-7.

14- Tramper-Stranders GA, Wolfs TFW, van der Ent CK. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in

www.SID.ir

Archive of SID

patients with cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis*. 2005; 4: 37-43.

15- Xiao X, Zhang J, Gong J, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by the fluorescence quantitative TaqMan PCR assay targeting ETA gene. *Chin J Biotech*. 2008, 24: 581-5.

16- Yates SP, Taylor PL, Jorgensen R, et al. Structure–function analysis of water-soluble inhibitors of the catalytic domain of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa. J Biochem*.2005; 385: 667-75.

17- Armstrong S, Yates SP, Merrill A. Insight into the catalytic mechanism of *Pseudomonas* aeruginosa exotoxin A. *J biolo Biochem*. 2002; 277: 46669-75.

18- Bjon MJ, Iglewskl BH, Ives SK, Sadoff JC, Vasll ML. Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA-103. *J Infec Immun*. 1978; 19: 785-91.

19- Keyvani Amineh H, Ghasemian Safaei H. Purification of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa J Tehran Vet Med*. 2000; 56:33-6.

20- Joshi BH, Puri RK. Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and *Pseudomonas* exotoxin in *Escherichia coli*. *Pro Expr and Puri*. 2005; 39: 189-98.

www.SID.ir

Archive of SID

Cloning of Catalytic Domain of Exotoxin A from Pseudomonas Aeruginosa

Amini B[1], Kamali M[2], Zarei Mahmod abadi A[3], Mortazavi Y[4], Ebrahim habibi A[5], Bayat E[1], Farhadi N[2], Javadi HR[2], kyhan AH[2]

[1]Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Nanobiotechnology Research Center, Baqyiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Dept. of Biochemistry, Baqyiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Dept. of Molecular Medicine and Genetics, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[5]Dept. of Endocrinology and Metabolism Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Kamali M, Nanobiotechnology Research Center, Baqyiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: mehkamali@bmsu.ac.ir

Received: 17 Jan 2010 **Accepted:** 8 Mar 2010

Background and Objective: Antibody against *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A can be used in immunotherapy together with antibiotics to treat acute burn patients. Exotoxin A is one of the virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* that comprises of three domains, binding domain, translocation and catalytic domain. The purpose of this study was to construct the recombinant domain of the catalytic part of this microorganism in order to produce antibody against it.

Methods and Materials: *Pseudomonas aeruginosa* samples were isolated from burn patients hospitalized in Mousavi Hospital, Zanjan, Iran and its species was identified by Biochemical tests. Bacteria genomic DNA and also the catalytic domain of exotoxin A was amplified by PCR. PCR products and plasmid extracts was digested by restriction enzymes. Subsequently PCR products and plasmids transformed into *E. coli BL21 (DE3)*. Clones containing gene of interest was determined by restriction enzyme digestion and sequencing.

Results: The sequence homology of the catalytic domain of exotoxin A was compared with that of the published gene data banks. The results showed a complete homology between our gene species and the published genome in data banks.

Conclusion: The results of this study showed that about 90% of the isolated bacteria contained exotoxin A and there was a sequence homology between our species and published gene data banks.

Key word: Pseudomonas aeruginosa, Cloning, Exotoxin A, Catalytic domain

www.SID.ir