Archive of SID

کومش- جلد ۱۹، شماره ۱ (پیاپی ۶۵)، زمستان ۱۳۹۵

طراحی و ساخت کلونینگ حامل حاوی قطعه فیوژنی ژن hspX و tb 10.4 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

عطیه یعقوبی [۱](M.Sc)، احسان آریان [۲](Ph.D)، محمد درخشان [۳](Ph.D)، زهرا مشکات [*۲](Ph.D)

مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

هدف: سل از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی و از شایع‌ترین علل مرگ و میر در دنیا خصوصاً در کشورهای در حال توسعه می‌باشد که توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد می‌شود. طراحی واکسن های جدید بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تنها امید موثر در پیشگیری و کنترل آن می‌باشد. هدف از این مطالعه طراحی و ساخت کلونینگ حامل استفاده از فیوژن ژنهای دو ژن hspX و tb10.4 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا قطعه tb10.4 با روش PCR تکثیر، با استفاده از آنزیم‌های هضم و در پلاسمید pcDNA3.1 کلون شد. سپس قطعه hspX با PCR تکثیر با آنزیم‌های هضم و دالاتور HindIII و BamHI هضم شد. پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1+/tb10.4 نیز با آنزیم‌های هضم و قطعه hspX در hspX وکتور نوترکیب کلون شد و در باکتری E.coli سویه TOP 10 ترانسفورم شد. تایید کلونی‌های نوترکیب با کلونی-PCR هضم آنزیمی و توالی صورت گرفت.

یافته‌ها: حضور PCR و هضم آنزیمی روی ژل آگارز تایید شد که وجود قطعات tb10.4 و hspX را به اندازه bp 291 و bp 435 به ترتیب نشان داد. نتایج تعیین توالی ۱۰۰٪ همولوژی با توالی‌های ژن‌های hspX و tb10.4 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه شکور H37Rv ثبت شده در بانک ژنی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: کلونینگ دو ژن hspX و tb10.4 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در وکتور pcDNA3.1 به درستی انجام شد. این وکتور می‌تواند در آینده پس از تایید بیان آنتی ژن در سلول‌های یوکاریوتی، به عنوان کاندید DNA واکسن DNA واکسن علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مدل‌های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، کلونینگ، tb10.4، hspX، واکسن DNA

مقدمه

سل از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی و یکی از شایع‌ترین علل مرگ ومیر در دنیا خصوصاً در کشورهای در حال توسعه می‌باشد که به واسطه عفونت با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد می‌شود [۲،۱]. کارشناسان معتقدند که یک سوم از جمعیت جهان مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند [۴،۳] و در هر ثانیه یک نفر به این تعداد افزوده می‌شود. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی هر ساله حدود ۹ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند که از میان آن‌ها ۱/۱،۵میلیون نفر جان خود را از دست می‌دهند. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۹ میزان شیوع این بیماری در ایران ۲۴ نفر در هر صد هزار نفر بوده است و این درحالی است که حدود ۴٪ این موارد HIV مثبت بوده‌اند [۶،۵].

تنها واکسنی که در حال حاضر برای درمان سل در

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱-۳۸۰۱۲۴۵۳

Email: meshkatz@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۴

www.SID.ir

Archive of SID

دسترس است Calmette-Guerin (BCG) Bacillus می‌باشد و در ۴ دهه‌ی اخیر، برای ۳ میلیارد نفر مورد استفاده قرار گرفته است [۸،۷]. میزان کارایی این واکسن در نقاط مختلف جهان متفاوت است، به طوری‌که کارایی آن در مطالعات انجام شده از صفر تا ۸۰٪ گزارش شده است [۹].

در حال حاضر جستجو برای ایجاد یک استراتژی واکسیناسیون موثر علیه TB به اولویت اول تحقیقات جهانی تبدیل شده است. در دو دهه اخیر پیشرفت‌های بسیاری در مورد تولید واکسن سل انجام شده است، واکسن‌هایی نظیر وکتورهای ویروسی، DNA واکسن‌ها، واکسن‌های زیرواحدی (fusion protein) و BCG نوترکیب از جمله مهم‌ترین واکسن‌های جدید مورد مطالعه طی بیست سال اخیر به شمار می‌روند [۱۰].

hspX یک پروتئین شوک حرارتی است که در بقاء طولانی مدت باکتری در مرحله نهفته (latent)، در مراحل اولیه سازگاری با محیط داخل سلولی، عفونت بدون علامت (asymptomatic infection)، زنده ماندن در داخل گرانولوم و ماکروفاژ تحت شرایط محدودیت منابع انرژی و محرومیت از اکسیژن نقش دارد [۱۲،۱۱]. این آنتی‌ژن موجب تحریک سلول‌های $T\ CD4^+$ و $TCD8^+$ می‌شود و قادر به القاء تولید TNF-α , IL-2, IFN-γ است [۱۳].

خانواده ژنی ESAT-6 چندین مولکول غالب ایمنی را کد می‌کند و به طور قوی توسط سیستم ایمنی در مدل‌های حیوانی مختلف و هم‌چنین توسط سلول‌های T انسان‌های مبتلا به توبرکلوزیس شناسایی می‌شوند tb10.4 متعلق به یک زیرخانواده از خانواده ژنی ESAT-6 است، که باعث برانگیخته شدن پاسخ ایمنی می‌شود و به طور قوی توسط افراد واکسینه شده با واکسن BCG و افراد مبتلا به توبرکلوزیس شناسایی می‌شود؛ بنابراین می‌تواند کاندید خوبی برای تولید واکسن باشد [۱۵،۱۴].

در مطالعه حاضر کلونینگ دو ژن hspX و tb10.4 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در وکتور pcDNA3.1+ به درستی انجام شد. این وکتور پس از تایید بیان آن در سلول‌های یوکاریوتی، می‌تواند در آینده به عنوان کاندید DNA واکسن در القای سیستم ایمنی در مدل‌های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

۱- انجام PCR به منظور تکثیر قطعات hspX و b10.4

در این مطالعه ابتدا ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv را به روش Boiling استخراج کردیم همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد [۱۶]. سپس برای جدا کردن ژن‌های tb10.4 و hspX پرایمرآغازگرهای اختصاصی طراحی شد (جدول ۱و۲) و برای تکثیر این ژن‌ها از روش PCR استفاده شد.

جدول۱. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده جهت تکثیر قطعه tb10.4 (محصول PCR با اندازه۲۹۱ جفت باز)

توضیحات	توالی
آغازگر بالادست. واجد جایگاه برش آنزیم محدود کننده BamHI	5-AATAACGGATCCTCGCAAA TCATGTACAACTAC -3
آغاز گر پایین دست. واجد جایگاه برش آنزیم محدود کننده XbaI	5- ATACTTTCTAGACTAGCC GCCCCATTTG-3

جدول۲. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده جهت تکثیر قطعه hspX (محصول PCR با اندازه ۴۳۵ جفت باز)

توضیحات	توالی
آغازگر بالادست. واجد جایگاه برش آنزیم محدود کننده HindIII	5- TTATATAAGCTTACCATGGGAGC CACCACCCTTCCCGTTCAG-3
آغازگر پایین دست. واجد جایگاه برش آنزیم محدود کننده BamHI	5- AGAACTGGATCCGTTGGTGG ACCGGATCTGAATG-3

www.SID.ir

Archive of SID

مواد مورد استفاده جهت انجام PCR برای تکثیر قطعات tb10.4 و hspX مطابق با مواد و مقادیر ذکر شده می‌باشد:

۱۰۰نانوگرم از نمونه DNA استخراج شده به روش Boiling، ۲۰۰ میکرومولار از dNTP، ۱/۵ میلی‌مولار از MgCl2، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگرپرایمر، ۱ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase و بافر مربوط به آن. حجم نهایی واکنش PCR 25 میکرولیتر می‌باشد.

برنامه PCR به منظور تکثیر قطعات tb10.4 و hspX طبق برنامه زمانی از قبل داده شده به دستگاه ترموسایکلر، به تعداد ۳۵ سیکل راه‌اندازی شد (جدول ۳). پس از انجام واکنش محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند.

جدول۳. برنامه PCR استفاده شده در این مطالعه

برنامه PCR	دما (°C)	زمان (دقیقه)
Primary Denaturation (واسرشتگی)	۹۵	۴
Secondary Denaturation	۹۴	۱
Annealing (اتصال آغازگر)	۵۹	۱
Extention (گسترش)	۷۲	۱
Final Extention	۷۲	۱

۲- کلونیزه کردن قطعات **hspX** و **tb10.4** در وکتور **pcDNA3.1 (+)** ابتدا قطعه tb10.4 توسط واکنش PCR تکثیر شده و با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر BamHI و XbaI (Fermentas فرمنتاز ،آلمان) هضم آنزیمی شده و در پلاسمید pcDNA3.1+ کلون شد. در مرحله بعد، قطعه hspX با روش PCR تکثیر شده و با آنزیم‌های محدودالاثر HindIII و BamHI هضم آنزیمی شد. جهت خالص‌سازی محصولات هضم آنزیمی، از ژل آگاروز ۰/۰،۸٪ و از کیت استخراج از ژل (Bioneer، کره جنوبی) استفاده گردید. برای انتقال قطعه hspXبه پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1+/tb10.4 از آنزیم T4لیگاز (Vivantis)، مالزی استفاده شد. سپس این مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۶درجه سانتی‌گراد °C قرار گرفت. مخلوط لایگیشن حاوی مواد زیر استفاده شد:

۱۴/۵ میکرولیتر از وکتور نوترکیب pcDNA3.1+/tb10.4 که با آنزیم‌های محدودالاثر مناسب برش خورده است، ۸ میکرولیتر از hspX که با آنزیم‌های محدودالاثر مشابه وکتور برش خورده است، ۲/۵ میکرولیتر از بافر T4 DNA لیگاز، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم T4 لیگاز (ویوانتیس،مالزی) و ۲ میکرولیتر از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) (ترموساینتیفیک، آمریکا).

سپس مخلوط فوق به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۶° C قرار گرفت. در مرحله بعد وکتور نوترکیب حاوی ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی به درون باکتری مستعد E.coli سویه TOP10 ترنسفورم شد [۱۶]. این وکتور نوترکیب به دلیل داشتن ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی توانایی رشد بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ mg/ml ۱۰۰ ml ۱۰۰میکروگرم بر میکرولیتر) را دارد. تایید کلنی‌ها ابتدا با استفاده از مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سپس باکلنی-PCR (با استفاده از آغازگر پرایمرهای اختصاصی قطعات hspX و tb10.4 و هضم آنزیمی صورت گرفت و در نهایت توالی آن‌ها با روش تعیین توالی (Macro Gen ماکروژن، کره جنوبی) تایید نهایی شدند.

نتایج

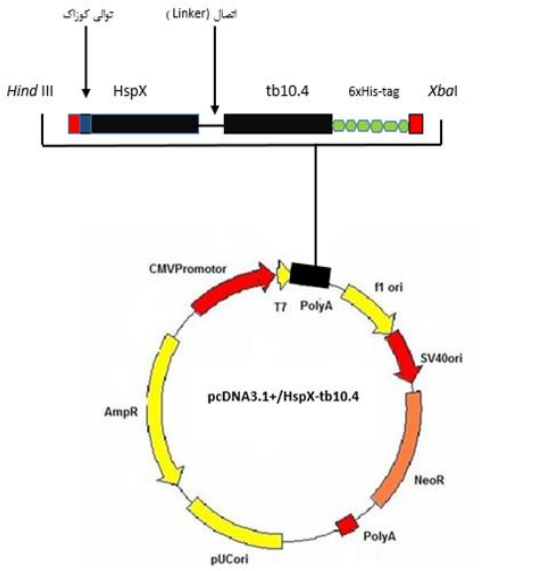
در این مطالعه، قطعات hspX و tb10.4 به روش PCR و با استفاده از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv تکثیر شدند.

وجود قطعات tb10.4 و hspX با اندازه‌ی bp۲۹۱ و bp۴۳۵ به ترتیب مشاهده و تایید شدند (شکل۱و۲). قطعات با آنزیم‌های محدودالاثر مناسب برش خوردند، سپس قطعه tb10.4 با آنزیم‌های BamHI و XbaI برش خورد و برای هضم آنزیمی قطعه hspX از آنزیم‌های محدودالاثر HindIII و BamHI استفاده شد. در مرحله بعد قطعه hspX درون پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1+/tb10.4 که با همین آنزیم‌ها هضم شده بود، ساب کلون شد. قطعه ادغام دو ژن hspX و tb10.4 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در پلاسمید

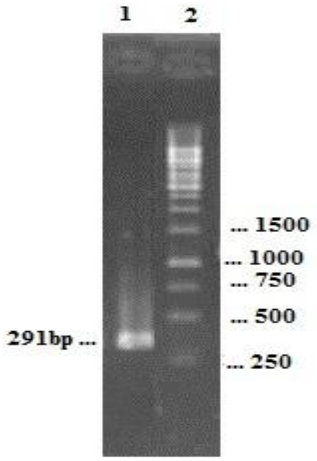
www.SID.ir

Archive of SID

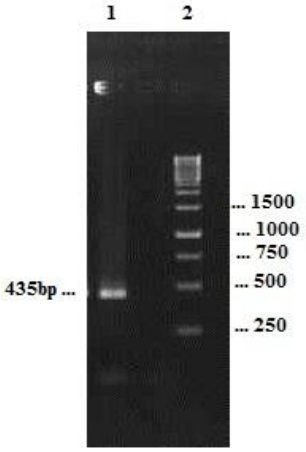
pcDNA3.1+ بین جایگاه دو آنزیم محدودکننده HindIII و XbaI در پایین دست پروموتر CMV طراحی شده است (شکل۳). به منظور اطمینان از ورود hspX به دورن وکتور نوترکیب از کلونی–PCR با آغازگر پرایمرهای اختصاصی و هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودالاثر مناسب استفاده شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز الکتروفورز شدند که وجود قطعات tb10.4 و hspX با اندازه‌ی 291 bp جفت باز و bp435 جفت باز ۲۹۱bp و ۴۳۵bp به ترتیب مشاهده و تایید شدند. نتایج تعیین توالی ۱۰۰٪ همولوژی با توالی‌های ژن‌های مذکور H37Rv ثبت شده در بانک ژنی را نشان دادند.



شکل۳ :تصویر شماتیک از پلاسمیدHtb (pcDNA3.1+/HspX-tb10.4). قطعه ادغام دوژن hspX و tb10.4 در پلاسمید+pcDNA3.1 بین جایگاه دو آنزیم محدود کننده HindIII وXbaI در پایین دست پروموترCMV طراحی شده است.



شکل ۱. نتیجه PCR قطعه *tb10.4*. ردیف (۱) باند ۲۹۱bp مربوط به محصول PCR قطعه *tb10.4*. ردیف (۲) نشانگر وزن ملکولی 1kb DNA



شکل۲: نتیجه PCR قطعه hspX. ردیف (۱) باند ۴۳۵bp مربوط به محصول PCR قطعه hspX. ردیف (۲) نشانگر وزن ملکولی 1kb DNA

بحث و نتیجه‌گیری

TB یکی از دلایل عمده مرگ و میر است، که سالانه حدود ۳ میلیون نفر جان خود را به علت این بیماری از دست می‌دهند [۱۷–۱۹] و تقریباً ۹۰٪ این موارد در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد. عفونت با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در کنار مالاریا و ایدز، بیش‌ترین میزان مرگ و میر ناشی از عوامل عفونی را به خود اختصاص داده است. عفونت با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از طریق تنفس آئروسل‌های عفونی حاوی باکتری از یک فرد آلوده صورت می‌گیرد. به‌طوری‌که؛ میزان آلوده شدن افراد به عواملی نظیر: طول تماس، میزان فاصله با منبع عفونی و میزان عفونی بودن منبع بستگی دارد. هم‌اکنون، تقریباً یک سوم (۲میلیارد نفر) از مردم دنیا به صورت نهفته (Latent) با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده هستند، امّا تنها حدود ۱۰٪–۵ از افراد آلوده، در طول حیات خود به فرم سل فعال مبتلا می‌شوند [۲۰].

در حالی که BCG به عنوان یک واکسن تایید شده است، اما قادر به جلوگیری از عفونت سل نهفته نمی‌باشد. یکی از دلایل عدم استفاده از واکسن این است که باعث بروز پاسخ

www.SID.ir

Archive of SID

مثبت کاذب در تست پوستی می‌شود، که این آزمون را برای غربالگری این بیماری بی‌فایده می‌نماید [۲۱].

از جمله دلایل تاثیرات متغیر واکسن BCG در حفاظت بالغین علیه توبرکلوزیس ریوی می‌توان به: استفاده از سویه‌های گوناگون BCG با تفاوت‌های ژنومیکی، تداخل با پاسخ ایمنی به دلیل برخورد قبلی با مایکوباکتریوم‌های محیطی، حذف آنتی‌ژن‌های حفاظت‌کننده، و شکست در تحریک کافی پاسخ سلول‌های +TCD4 و +TCD8 اشاره کرد [۲۳،۲۲].

در مطالعات متعددی نیز به‌طور آشکار نشان داده شده است که، BCG تنها در کودکان، علیه منتژیت سلی و سل منتشر محافظت می‌دهد. هم‌چنین شکست واکسن BCG در حفاظت علیه سل ریوی در بزرگسالان و تاثیر ناچیز آن در اپیدمی جهانی سل ضرورت یافتن یک واکسن جدید موثر را تاکید می‌کند [۲۴].

به منظور رسیدن به واکسن‌هایی علیه توبرکلوزیس، چندین راه‌کار وجود دارد: ۱. طراحی واکسن‌های نوترکیب BCG، ۲. استفاده از سویه‌های مایکوباکتریوم آتیپیک، ۳. DNA واکسن‌ها. به‌طور کلی؛ همگی را می‌توان در دو گروه کلی تقسیم‌بندی کرد: الف) بهبود عمل‌کرد واکسن BCG موجود و ب) واکسن BCG موجود را با واکسن‌هایی با کارآیی بیش‌تر جایگزین کرد [۱۰].

در تحقیقات نشان داده شده است که DNA واکسن‌های حاوی آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریایی موجب ایجاد محافظت علیه عفونت اولیه سل می‌شود هم‌چنین استفاده از آن به عنوان یادآور بعد از تزریق واکسن BCG پاسخ ایمنی ایجاد شده را افزایش می‌داد.

به علاوه DNA واکسن‌ها به علت قابلیت تولید در حجم بالا مورد توجه قرار گرفته‌اند، این واکسن‌ها در محیط خشک قابل ذخیره شدن است و نیاز به ادجوانت ندارند [۲۱،۱۰].

در مطالعه حاضر به منظور یافتن کاندید مناسبی جهت تهیه DNA واکسن بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، طراحی و ساخت کلونینگ وکتور با استفاده از ادغام فیوژن دو ژن hspX و tb10.4 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در وکتور pcDNA3.1+ انجام شد که این وکتور پس از تایید بیان در سلول‌های یوکاریوتی می‌تواند در آینده به عنوان DNA واکسن در القای سیستم ایمنی در مدل‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد.

hspX یک پروتئین شوک حرارتی است که در غشاء داخلی مایکوباکتریوم واقع شده. هم‌چنین به عنوان آلفا کریستالی (α-crystalline) شناخته می‌شود، که در طول فاز تاخیری رشد مایکوباکتریوم بیان می‌شود [۲۶،۲۵]. این آنتی‌ژن موجب تحریک سلول‌های T CD4+ و T CD8+ می‌شود و قادر به القاء تولید TNF-α, IL-2, IFN-ɣ است [۱۳].

گروهی از محققان در مطالعه‌ای ظرفیت BCG همراه با hspX و ESAT-6 را در تحریک دندرتیک سل‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. تعامل دندرتیک سل‌ها با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا موجب تولید سایتوکاین‌های مختلف می‌شود، از این رو بعد از گذشت ۲۴ ساعت از درمان، کشت انجام شده و ترشح سایتوکاین‌ها با استفاده از تست الایزا مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه مشاهدات دریافتند که BCG در القاء سایتوکاین‌ها ضعیف است، در حالی که BCG همراه با hspX و ESAT-6 می‌تواند پاسخ دندرتیک سل‌های انسان را افزایش دهد و در نتیجه این تحریک دندرتیک سل‌ها، میزان ترشح IL-12, IL-1b, IL-23, IL-6, TNF-α را افزایش می‌دهند در مقایسه با دندرتیک سل‌هایی که تنها با BCG تحریک شده‌اند. علاوه بر این، دندرتیک سل‌هایی که با BCG, hspX و ESAT-6 تحت درمان قرار گرفته‌اند در مقایسه با دندریتک سل‌هایی که فقط با BCG تحریک شده‌اند میزان ترشح CD8, CD86 و HLA-DR را افزایش می‌دهند. هم‌چنین مشاهده شد که در درمان با BCG همراه با hspX و ESAT-6 دندرتیک سل‌ها توانایی القاء پاسخ Th-1 و یا Th-17 را دارند. در این مطالعه دندرتیک سل‌های تحریک شده با BCG, hspX, ESAT-6 از نظر توانایی القاء خاطره در لنفوسیت‌های T بکر (Naive T

www.SID.ir

Archive of SID

Lymphocytes) مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور ایزوله CD4 T cells (CD45RA/CD45RO2) را تهیه کرده و همراه با دندرتیک سل‌هایی که فقط با BCG تحریک شده به عنوان کنترل منفی و دندرتیک سل‌های تحریک شده با BCG همراه با hspX و ESAT-6 به عنوان کنترل مثبت کشت دادند و در نهایت مشاهده شد که hspX و ESAT-6 توانایی ایجاد خاطره در T CD4+ را دارند. علاوه بر این‌ها نتایج حاکی از آن بود که hspX و ESAT-6 توانایی افزایش و تقویت فعالیت NK cell را به واسطه افزایش آزادسازی IL-12 از دندرتیک سل‌های تحت درمان با BCG را دارند.

نتایج حاصله نشان داد که این واکسن زیر واحدی به واسطه القاء لنفوسیت T و NKcell و افزایش IL-12 و TLR-2 امکان درمان را فراهم کرده و موجب بهبوده اثر واکسیناسیون با BCG شده در نتیجه می‌توانند کاندید مناسبی برای واکسن علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باشند [۲۷].

در مطالعه‌ای Hoang و همکارانش، سیستم Esx را مورد بررسی قرار دادند. این سیستم در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مسئول ترشح پروتئین‌های بسیار ایمونوژنیک است، که در بقاء و رشد باکتری نقش دارند. دو پروتئین اصلی (EsxA) ESAT-6 from ESX-1) و (EsxH from ESX-3) tb10.4، که ویژگی‌های زیادی را با توجه به ساختار ژنوم، اندازه، خواص آنتی‌ژنی و واکسن بالقوه به اشتراک می‌گذارند، اما این واضح است که دو ملکول از نظر فیزیولوژی نقش‌های متفاوتی دارند. برای بررسی بیش‌تر نقش ESAT-6 و tb10.4 و tb10.4 به عنوان پیش‌گیرنده و واکسن علیه توبرکلوزیس اثر آن‌ها را با چهار واکسن H1, H4, H56 و H28 مقایسه کردند. نتایج نشان داد که تمام این واکسن‌ها موجب افزایش حفاظت در مدل موشی واکسینه شده می‌شوند. در مقابل، هنگامی که مدل موشی در معرض واکسنی که تنها حاوی ESAT-6 بود قرار گرفت، مشاهده شد که میزان حفاظت در برابر فعال شدن مجدد افزایش یافته. هم‌چنین مشاهده شد که سلول‌های TCD4 در پاسخ به tb10.4 حدود ۳۵ تا ۵۰٪ میزان ترشح IFN-γ TNF-α, IL-2 را افزایش می‌دهد. در نتیجه این مطالعه ESAT-6 و tb10.4 را به عنوان واکسن احتمالی بر علیه توبرکلوزیس پیشنهاد دادند [۲۸].

به دلیل این‌که تست پوستی در شناسایی سل در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید کارآمد نبوده، Souza Silva و همکارانش در مطالعه‌ای میزان پاسخ ایمنی سلولی را در برابر GlcB و hspX در مبتلایان به آرتریت روماتوئید (RA) مورد بررسی قرار دادند. به منظور بررسی پاسخ‌های ایمنی بدن به GlcB و hspX، نمونه خون گرفته شده از، بیماران مبتلا به RA و بیماران مبتلا به TB را آنالیز کردند. سل نهفته در بیماران مبتلا به RA، فرد را وادار به افزایش تکثیر سلول‌های وابسته به Th1 در برابر rGlcB و rHspX می‌کند. به‌علاوه میزان IL-10 سلول‌های Treg در بیماران TB-RA افزایش می‌یابد که چنین اتفاقی در بیماران مبتلا به سل فعال مشاهده نشده. این نتایج نشان دادند که می‌توان از بروز پاسخ ایمنی در برابر GlcB و hspX به عنوان آزمون تشخیصی برای شناسایی بیماران آرتریت روماتوئید مبتلا به سل نهفته استفاده کرد [۹].

Taylor و همکارانش در مطالعه‌ای hspX را از نظر القاء مصونیت طولانی‌مدت و کوتاه‌مدت مورد بررسی قرار دادند. مطالعات نشان داد که hspX هر دو مصونیت طولانی و کوتاه‌مدت را موجب می‌شود، hspX در ۳۰ روز اول عفونت مصونیت می‌دهد. در این تحقیق hspX را به عنوان یک پروتئین نوترکیب در باکتری E.coli کلون و بیان کردند. مشاهده شد که میزان تولید IFN-γ در سلول‌های موش واکسینه شده با hspX به طور قابل توجهی بیش‌تر از میزان تولید IFN-γ در موش‌هایی است که با BCG واکسینه شده‌اند.

در این مطالعه، hspX را از نظر توانایی تحریک سلول‌های T CD4+ نیز مورد بررسی قرار دادند. برای این منظور، سلول‌های طحال موش را ۶ ماه بعد از آخرین واکسیناسیون، از نظر میزان T CD4+ و سایتوکاین‌ها TNF-α, IL-2, IFN-γ مورد بررسی قرار دادند. مشاهده شد که نتایج نشان‌دهنده افزایش میزان T CD4+ تحریک شده این سلول‌ها در موش‌های واکسینه شده با hspX به طور قابل توجهی بیش‌تر از میزان آن بود در مقایسه با موش‌های واکسینه شده با BCG

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد. با این حال hspX نوترکیب به تنهایی و به‌طور مداوم قادر به ایجاد مصونیت در برابر آئروسل‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است [۱۳].

در این مطالعه به منظور یافتن کاندید مناسبی جهت تهیه DNA واکسن بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، به طراحی و ساخت کلونینگ وکتور با استفاده از فیوژن دو ژن hspX و tb10.4 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در وکتور pcDNA3.1+ پرداختیم. برای این منظور دو قطعه hspX و tb10.4 با استفاده از روش PCR تکثیر شدند و پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودالاثر مناسب در وکتور pcDNA3.1+ ساب‌کلون شدند. وجود قطعات مورد نظر در کلون‌های نوترکیب با کلونی-PCR، هضم آنزیمی و تایین توالی تایید نهایی شدند. این وکتور نوترکیب پس از تایید بیان در سلول‌های یوکاریوتی می‌تواند، به عنوان DNA واکسن در القای سیستم ایمنی در مدل‌های آزمایشگاهی در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

در این مطالعه قطعات hspX و tb10.4 به روش PCR و با استفاده از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv تکثیر شدند و کلونینگ وکتور حاوی قطعات قطعه فیوژن ادغام دو ژن tb10.4 و hspX مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ساخته شد. در مطالعات قبلی هر یک از این ژن‌ها به تنهایی مورد استفاده قرار گرفته بودند، که در مطالعه حاضر کلونینگ وکتور حاوی ادغام دو قطعه با موفقیت ساخته شد، که این وکتور نوترکیب جدید می‌تواند در طرح‌های بعدی به منظور تایید بیان یوکاریوتی و تعیین تاثیر واکسن بر روی حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. از کاستی‌های موجود در این مطالعه می‌توان به عدم بررسی بیان یوکاریوتی و ایمنی‌زایی در حیوانات آزمایشگاهی اشاره که در تحقیقات بعدی انجام خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی و طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد به شماره طرح ۹۳۰۵۸۸ در سال ۱۳۹۳ است که بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

[1] Akhavan R, Meshkat Z, Jamehdar S. Comparing the frequency of mycobacterium tuberculosis with direct microscopy and culture methods. Jundishapur J Microbiol 2012; 6: 95-96. (Persian).

[2] Gholoobi A, Masoudi-Kazemabad A, Meshkat M, Meshkat Z. Comparison of culture and PCR methods for diagnosis of mycobacterium tuberculosis in different clinical specimens. Jundishapur J Microbiol 2014; 7: e8939. (Persian).

[3] Mohammadbeigi A, Dalirian S, Mokhtari M, Jadidi R. Delay in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis and its association with some social and personal characteristics in Markazi Province (2008-2014). Koomesh 2015; 4: 966-973. (Persian).

[4] Nabavinia MS, Meshkat Z, Derakhshan M, Khaje-Karamadini M. Construction of an expression vector containing Mtb72F of mycobacterium tuberculosis. Cell J (Yakhteh) 2012; 14: 61. (Persian).

[5] Kaufmann SH. Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. Lancet Infect Dis 2011; 11: 633-640.

[6] Baghani A, Youssefi M, Safdari H, Teimourpour R, Meshkat Z. Designing and construction pcdna3. 1 vector encoding Cfp10 gene of mycobacterium tuberculosis. Jundishapur J Microbiol 2015; 8. (Persian).

[7] Gupta UD, Katoch VM, McMurray DN. Current status of TB vaccines. Vaccine 2007; 25: 3742-3751.

[8] Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosismeta-analysis of the published literature. Jama 1994; 271: 698-702.

[9] Hoang T, Aagaard C, Dietrich J, Cassidy JP, Dolganov G, Schoolnik GK, et al. ESAT-6 (EsxA) and TB10. 4 (EsxH) based vaccines for pre-and post-exposure tuberculosis vaccination. PloS One 2013; 8: e80579.

[10] Barker LF, Brennan MJ, Rosenstein PK, Sadoff JC. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. Curr Opin Immunol 2009; 21: 331-338.

[11] Britton WJ, Palendira U. Improving vaccines against tuberculosis. Immunol Cell Biol 2003; 81: 34-45.

[12] Wieczorek AE, Troudt JL, Knabenbauer P, Taylor J, Pavlicek RL, Karls R, et al. HspX vaccination and role in virulence in the guinea pig model of tuberculosis. Pathog Dis 2014; 71: 315-325.

[13] Taylor JL, Wieczorek A, Keyser AR, Grover A, Flinkstrom R, Karls RK, et al. HspX-mediated protection against tuberculosis depends on its chaperoning of a mycobacterial molecule. Immunol Cell Biol 2012; 90: 945-954.

[14] Skjøt RL, Oettinger T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from mycobacterium tuberculosis identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-Cell antigens. Infect Immun 2000; 68: 214-220.

[15] Dietrich J, Aagaard C, Leah R, Olsen AW, Stryhn A, Doherty TM. Exchanging ESAT6 with TB10. 4 in an

www.SID.ir

Archive of SID

Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. J Immunol 2005; 174: 6332-6339.

[16] Baghani A, Youssefi M, Safdari H, Teimourpour R, Meshkat Z. Designing and construction pcdna3. 1 vector encoding Cfp10 gene of mycobacterium tuberculosis. Jundishapur J Microbiol 2015; 8. (Persian).

[17] Tajeddin E, Kargar M, Noroozi J, Ahmadi M, Kazempour M. Identification of mycobacterium tuberculosis beijing genotype using three different molecular methods. Koomesh 2009; 1: 7-14. (Persian).

[18] D'Souza S, Denis O, Scorza T, Nzabintwali F, Verschueren H, Huygen K. CD4+ T cells contain Mycobacterium tuberculosis infection in the absence of CD8+ T cells in mice vaccinated with DNA encoding Ag85A. Eur J Immunol 2000; 30: 2455-2459.

[19] Tanghe A, Lefèvre P, Denis O, D'Souza S, Braibant M, Lozes E, et al. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors. J Immunol 1999; 162: 1113-1119.

[20] Radošević K, Wieland CW, Rodriguez A, Weverling GJ, Mintardjo R, Gillissen G, et al. Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of gamma interferon. Infect Immun 2007; 75: 4105-4115.

[21] Wieczorek AE, Troudt JL, Knabenbauer P, Taylor J, Pavlicek RL, Karls R, et al. HspX vaccination and role in virulence in the guinea pig model of tuberculosis. Pathog Dis 2014; 71: 315-325.

[22] Kamath A, Woodworth JS, Behar SM. Antigen-specific CD8+ T cells and the development of central memory during Mycobacterium tuberculosis infection. J Immunol 2006; 177: 6361-6369.

[23] Sun R, Skeiky YA, Izzo A, Dheenadhayalan V, Imam Z, Penn E, et al. Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with Mycobacterium tuberculosis. Vaccine 2009; 27: 4412-4423.

[24] Romano M, Aryan E, Korf H, Bruffaerts N, Franken C, Ottenhoff T. Potential of mycobacterium tuberculosis resuscitation-promoting factors as antigens in novel tuberculosis sub-unit vaccines. Microbes Infect 2012; 14: 86-95.

[25] Soleimanpour S, Farsiani H, Mosavat A, Ghazvini K, Eydgahi MR, Sankian M, et al. APC targeting enhances immunogenicity of a novel multistage Fc-fusion tuberculosis vaccine in mice. Appl Microbiol Biotechnol 2015; 99: 10467-10480.

[26] Xin Q, Niu H, Li Z, Zhang G, Hu L, Wang B, et al. Subunit vaccine consisting of multi-stage antigens has high protective efficacy against mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. PloS One 2013; 8: e72745.

[27] Marongiu L, Donini M, Toffali L, Zenaro E, Dusi S. ESAT-6 and HspX improve the effectiveness of BCG to induce human dendritic cells-dependent Th1 and NK cells activation. PloS One 2013; 8: e75684.

[28] Niu H, Hu L, Li Q, Da Z, Wang B, Tang K, et al. Construction and evaluation of a multistage Mycobacterium tuberculosis subunit vaccine candidate Mtb10. 4–HspX. Vaccine 2011; 29: 9451-9458.

www.SID.ir

Archive of SID

Design and construction of fusion genes hspX and tb10.4 from Mycobacterium tuberculosis in a cloning vector

Atieh Yaghoubi (M.Sc student), Ehsan Aryan (Ph.D), Mohammad Derakhshan (Ph.D), Zahra Meshkat (PhD)*

Antimicrobial Resistance Research Center, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received: 7 Jan 2016; Accepted: 4 Sep 2016)

Introduction*:* Tuberculosis (TB) is the most important infectious disease and is one of the most common causes of death in the world especially in developing countries. TB is caused by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Designing and construction new vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* are the only effective way to prevent and control the disease. The aim of this study was to design and construct a cloning vector encoding *hspX* and *tb10.4* fusion genes of *Mycobacterium tuberculosis*.

Materials and Methods*:* At first, *tb10.4* fragment was amplified by PCR method and it was digested with restriction enzymes and was cloned into the plasmid pcDNA3.1 +. Then, *hspX* fragment was amplified by PCR method and it was digested by *Hind*III and *Bam*HI restriction enzymes. The recombinant plasmid pcDNA3.1 + / *tb10.4* also digested with the same enzymes and *hspX* was subcloned into the recombinant vector. This construct was transformed into the *Escherichia coli* strain TOP10. The confirming the clones were performed by colony PCR, restriction enzyme digestion and sequencing methods.

Results*:* PCR and enzymatic digestion products were run on the agarose gel and *tb10.4* and *hspX* genes were observed 291bp and 435bp, respectively. In addition, results of DNA sequencing showed 100% homology with *hspX* and *tb10.4* genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain recorded in GenBank.

Conclusion*:* In this study, *hspX* and *tb10.4* genes of *Mycobacterium tuberculosis* were cloned into pcDNA3.1 + vector correctly. This vector can use as a DNA vaccine to induce immune system responses in animal models in future studies.

Keywords*: Mycobacterium tuberculosis*, cloning, *tb10.4*, *hspX*, DNA vaccine

* Corresponding author. Tel: +98 51 38012453

meshkatz@mums.ac.ir

www.SID.ir