Archive of SID



# تولید سازه نوترکیب با همسانه سازی ژن دومین ٤ آنتی ژن حفاظتی و هم جوشی آن با ژن دومین ۱ فاکتور کشنده باسیلوس آنتراسیس در اشرشیاکلی

محمد نجاراصل[۱]، محمدصادق هاشم زاده[۲]، حسین هنری*[۱]، سیدجعفر موسوی[۱]، فیروز ابراهیمی[۱]، حسین پورحکاک[۱]

۱) گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

۲) مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/٤/۹

**چکیده**

***مقدمه:*** سیاه زخم یک بیماری مشترک بین انسان و دام است. عامل ایجاد کننده این بیماری مهلک باکتری باسیلوس آنتراسیس می باشد. در حال حاضر آنتی ژن حفاظتی(PA) به عنوان واکسن موثر سیاه زخم مورد استفاده قرار می‌گیرد. دومین ۴ این آنتی ژن به همراه دومین ۱ فاکتور کشنده(LF)، ایمونوژن های قوی این باکتری بوده و به عنوان کاندید مناسب واکسن علیه آن مطرح می باشند. هدف ما در این تحقیق، همسانه سازی ژن دومین ۴ آنتی ژن حفاظتی(PAD4) و هم جوشی آن با ژن دومین ۱ فاکتور کشنده(LFD1) باکتری، به منظور بررسی توانایی آن ها در القاء ایمنی حفاظتی می باشد.

***مواد و روش ها:*** در این مطالعه تجربی، از یک وکتور pGEM-T easy نوترکیب حاوی ژن LFD1 استفاده شد. سپس ژن PAD4 با واکنش آنزیمی PCR تکثیر و جداسازی شده و به طور جداگانه در وکتور pGEM-T easy دیگری همسانه سازی گردید. بعد از آن واکنش الحاق ژن PAD4 به ژن LFD1 در وکتور فوق با تعیین جهت گیری LFD1 و توسط جایگاه های آنزیمی PstI و XbaI انجام پذیرفت. سازه نوترکیب حاصل از دو ژن فوق در ناقل بیانی pET28a به کمک آنزیم های محدود الاثر BamHI و XhoI زیر همسانه سازی گردید و پس از تعیین جهت گیری ژن ها، میزبان بیانی BL21 توسط این ناقل نوترکیب تراریخت گردید.

***یافته های پژوهش:*** همسانه سازی اولیه و هم جوشی قطعات ژنی PAD4 و LFD1 در ناقل pGEM-T easy با موفقیت انجام شد و پس از تایید فرآیند فوق با دو روش برش آنزیمی و PCR، سازه نوترکیب حاصل با موفقیت در pET28a زیر همسانه سازی شد.

***بحث و نتیجه گیری:*** با توجه به ایمونوژن بودن نواحی PAD4 و LFD1، بیان پروتیئن این سازه نوترکیب حاصل از نواحی ژنی الحاق شده فوق، می تواند برای القاء ایمنی محافظتی، به عنوان کاندید مناسب واکسن سیاه زخم مطرح باشد.

**واژه های کلیدی:** باسیلوس آنتراسیس، آنتی ژن حفاظتی(PA)، فاکتور کشنده(LF)، هم جوشی، کاندید واکسن

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

*Email: msh.biotechnology@gmail.com*



www.SID.ir

Archive of SID



## مقدمه

سیاه زخم(Anthrax) در واقع یک بیماری مشترک دامی–انسانی است که به وسیله باکتری باسیلوس آنتراسیس(Bacillus anthracis) ایجاد می شود. این باکتری جزء خانواده Bacillaceae می باشد. باسیلوس ها اهمیت فراوانی از لحاظ پزشکی و اقتصادی دارند و باسیلوس آنتراسیس از جمله مهم ترین آن ها می باشد که در انسان و دام باعث بروز بیماری مهلک سیاه زخم می گردد(۱). سویه غیر بیماری زای این باکتری فاقد کپسول بوده و دو نوع سم ترشح می کند، که از سه جزء آنتی ژنی پروتیئنی متشکل از عامل محافظتی Protective Antigen (PA)(۸۳KD)، فاکتور کشنده(LF) lethal factor (۸۵KD) و فاکتور ادم(EF) Edema factor (۸۹KD) تشکیل شده است(۲). این پروتیئن ها به ترتیب به وسیله ژن های cya, lef, pag رمز دهی می گردند(۳،۴)، که این ژن ها بر روی پلاسمید pXOI (۱۸۵kb) قرار دارند(۵). هر کدام از دو فاکتور LF و EF همراه با PA اثر خود را اعمال می کنند. توکسین مرگ آور یعنی مخلوط PA و LF باعث مرگ حیوانات آزمایشگاهی بعد از تزریق درون رگی می شود. توکسین خیز دهنده یعنی ترکیب PA و EF تشکیل خیز را در محل تزریق القاء می کند. PA عامل اتصال EF و LF به آنزیم های درون سلولی می باشد که موجب از بین رفتن سلول ها می شود(۳). مولکول PA از ۴ ناحیه تشکیل شده است که از طریق انتهای کربوکسیلی خود در ناحیه ۴ به گیرنده سلولی متصل و باعث اتصال به سلول شده و از این طریق سبب ورود EF و LF به درون سلول می گردد(۶). PA به تنهایی سمی نیست و یک پاسخ ایمنی القاء می کند. مولکول LF نیز از ۵ ناحیه تشکیل شده است، که ناحیه ۱ محل اتصال پروتیئن مصونیت زا است. مطالعات اخیر نشان می دهد که برای دستیابی به واکسنی کار آمد استفاده از LF امری ضروری می نماید، چون تیتر آنتی بادی تولید شده(القاء شده) توسط این آنتی ژن بالا می باشد(۷). از طرفی مشخص شده است که آنتی بادی های مونوکلونال تولید شده بر علیه LF بیشترین برهم کنش را با LFD1 دارند که این نشان دهنده اهمیت این ناحیه است(۸). هم چنین مشخص شده است که اپی توپ های LDF1 تقریباً دو برابر هر کدام از نواحی دیگر در تولید آنتی بادی نقش دارند(۹). ابتلاء به سیاه زخم در سه حالت استنشاقی، پوستی و گوارشی اتفاق می افتد(۱۰). اگر بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود، می تواند با آنتی بیوتیک درمان شود. اما علائم همیشه به موقع ظاهر نمی شود که درمان آنتی بیوتیک موثر باشد. بنا بر این اهمیت واکیسناسیون از هر زمان بیشتر می نماید. واکسن کنونی ضد سیاه زخم انسانی در بریتانیا و ایالات متحده بر اساس رسوب عصاره سلولی B.antheracis می باشد. واکسن آمریکایی VT 10-NP1R نوع سلولی صاف شده است که بر روی ژل هیدروکسید آلومینیوم جذب شده است و واکسن موجود در بریتانیا عصاره سلولی سویه استرن 34F2 رسوب داده شده با آلوم(زاج) می باشد(۱۱). از آن جا که سویه استرن در گروه بندی باکتری ها از نظر بیماری زایی جزو گروه سوم باکتری های بیماری زا می باشد، کار با آن جهت تولید واکسن نیازمند استفاده از تجهیزات خاص و گران قیمت می باشد. هم چنین علاوه بر PA این واکسن دارای مقادیر جزیی از EF و LF می باشد که ممکن است اثرات جانبی در برخی از افراد ایجاد کند(۷). از آن جایی که LF یک متالوپروتئین است کار با آن بسیار خطرناک است. بنا بر این دست ورزی LFD1 که توالی کوتاه تری است آسان تر می باشد(۱۲). لذا هدف ما در این تحقیق تولید یک سازه نوترکیب با همسانه سازی ژن دومین ۴ آنتی ژن حفاظتی(PAD4) و امتزاج و هم جوشی آن با دومین ۱ فاکتور کشنده(LFD1) می باشد. با توجه به ایمونوژن بودن نواحی PAD4 و LFD1، محصول بیانی سازه نوترکیب حاصل از نواحی ژنی الحاق شده فوق، می تواند برای القاء ایمنی محافظتی، به عنوان کاندید مناسب واکسن علیه سیاه زخم مطرح باشد.

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، توالی کامل ژن pag از بانک ژنی(با شماره دسترسی NC_003980.1) استخراج و به کمک نرم افزار primer 3 و oligo یک جفت آغازگر مناسب برای تکثیر اختصاصی قطعه ژنی مربوط به دومین PAD4 طراحی شد. پس از تخلیص



www.SID.ir

Archive of SID



پلاسمید pXOI از باکتری، برای تکثیر و جداسازی قطعه فوق، از آنزیم pfu DNA Polymerase ( life technologies, USA) که دارای خاصیت اصلاح خطا است، استفاده شد و نتیجه آن توسط الکتروفورز آگاروز ۲ درصد بررسی شد. ترادف آغازگر اختصاصی استفاده شده برای جداسازی قطعه فوق در جدول شماره ۱ آمده است. محل اثر آنزیم های محدود الاثر HindIII و XbaI به ترتیب در آغازگرهای رفت و برگشت در نظر گرفته شده است.

**جدول شماره ۱. آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر مربوط به دومین PAD4**

| نام آغازگر | توالی |
|---|---|
| PAD4-R | 5’ ctctagaagcgccagcgccagtgatcttataaaaaaggtaacaa 3' |
| PAD4-F | 5' tcaagcttccttatcctatctcatagcct 3' |

*همسانه سازی ژن PAD4 در ناقل کلونینگ:* در این مرحله، قطعه تکثیر یافته از مرحله قبل در ناقل pGEM T-easy (Fermtas) همسانه سازی شد. بدین منظور ابتدا دومین کامل PAD4 تکثیر یافته، با استفاده از کیت استخراج محصول PCR از ژل(Fermtas)، استخراج شد و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت واکنش الحاق(پرومگا–آمریکا) با ناقل خطی شده توسط آنزیم T4 DNA Ligase و بافرهای مخصوص واکنش اتصال انجام و انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد برای انجام واکنش فوق صورت گرفت. با مستعد کردن باکـــتری E.coli DH5α با استفاده از CaCl2 سرد، باکتری میزبان با محصول واکنش الحاق ترانسفورم شد. پس از کشت ۱ ساعته در محیط LB براث فاقد آنتی بیوتیک و بیان ژن مقاومت در برابر آمپی سیلین، باکتری ترانسفورم شده روی محیط LB آگار( Luria Bertani Agar, LIOFILCHEM, Italia)، حاوی ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین کشت داده شد.

*الحاق ژن PAD4 به ژن LFD1 در ناقل کلونینگ:* توالی قطعه ژنی LFD1 که قبلاً در مطالعه دیگر همسانه سازی شده بود(۱۳) در این مرحله از تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. به منظور الحاق ژن PAD4 به ژن LFD1 در ناقل کلونینگ pGEM T-easy، سازه نوترکیب حاوی قطعه PAD4 حاصل از مرحله قبل و سازه pGEM T-easy نوترکیب حاوی LFD1 با استفاده از آنزیم های PstI و XbaI برش داده شدند و محصولات برش از روی ژل آگارز ۲ درصد با دمای ذوب پایین جدا شده و با کیت استخراج از ژل(Fermtas)، استخراج گردیدند و واکنش الحاق بین قطعه ژنی PAD4 تخلیص شده و ناقل خطی شده حاوی LFD1 با آنزیم های فوق، مطابق دستورالعمل استاندارد به کمک آنزیم T4 DNA Ligase و بافرهای مخصوص انجام و انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد برای انجام واکنش فوق صورت گرفت.

*زیر همسانه سازی ژن های امتزاج یافته(جوش خورده) در وکتور بیانی pET28a:* مرحله بعد جاگذاری ژن های امتزاج یافته هدف در پلاسمید pET28a و در جلوی پروموتور T7 بود. برای این منظور سازه نوترکیب pGEM T-easy حاوی نواحی عملکردی (دومین های) فیوژ شده PAD4 و LFD1 و هم چنین وکتور بیانی pET28a به کمک آنزیم های محدودالاثر BamHI و XhoI هضم شدند، تا دو انتهای قطعه حاوی ژن های فیوژ شده هدف و وکتور بیانی خطی ایجاد شده، مکمل هم شوند. قطعه حاوی ژن های فیوژ شده هدف از ژل آگاروز با دمای ذوب پایین استخراج گردید و برای اتصال به وکتور بیانی برش خورده و تخلیص شده، مطابق روش قبلی عمل شد و نمونه ها به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس محصول واکنش الحاق به باکتری E.coli BL21 انتقال یافته و در محیط LB دارای آنتی بیوتیک کشت داده شد. تولید سازه نوترکیب pET28a حاوی ژن های امتزاج یافته هدف، با PCR و هضم آنزیمی تایید شد.



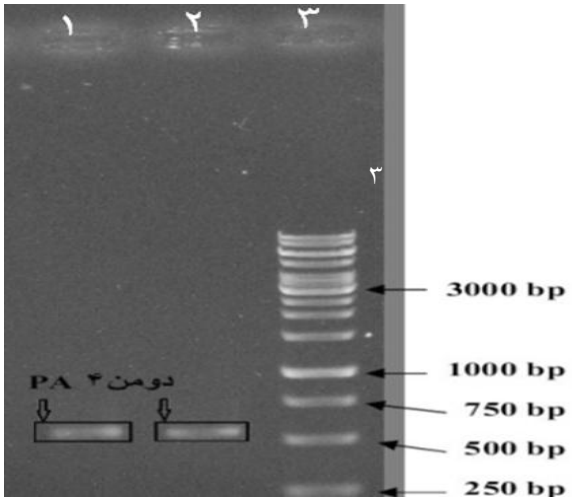
www.SID.ir

Archive of SID



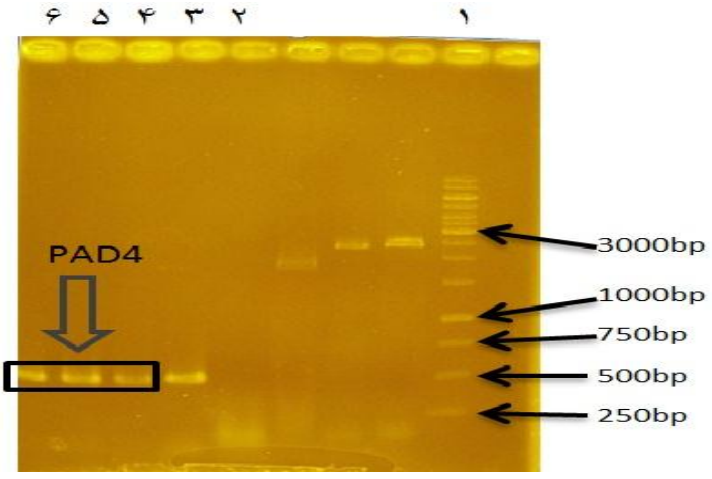
## یافته های پژوهش

*تکثیر و جداسازی قطعه ژنی PAD4*: نتایج تکثیر اولیه ژن PAD4 با PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ۵۱۷ جفت بازی مورد انتظار را بر روی ژل آگاروز ۲ درصد نشان داد که در تصویر شماره ۱ آورده شده است:




**تصویر شماره ۱. الگوی الکتروفورز محصول PCR اولیه ژن PAD4 بر روی ژل آگارز دو درصد. ستون های ۱ و ۲: نمونه PCR شده حاوی قطعه ۵۱۷ جفت بازی که با فلش مشخص شده است، ستون ۳: مارکر 10000 bp DNA Ladder (فرمنتاز)**

*همسانه سازی ژن PAD4 در ناقل کلونینگ pGEM T-easy و تایید آن:* پس از اضافه نمودن نوکلئوتید dATP به دو انتهای '۳ قطعات تکثیر شده(آدنیلاسیون) توسط PCR، واکنش الحاق با استفاده از آنزیم لیگاز طبق دستورالعمل استاندارد انجام شد و سازه نوترکیب pGEM–PAD4 ایجاد گردید. تایید همسانه سازی بر روی کلونی های نوترکیب احتمالی حاصل شده، با روش PCR، نشان دهنده تولید سازه نوترکیب فوق با موفقیت بود(تصویر شماره ۲).




**تصویر شماره ۲. الگوی الکتروفورز محصول PCR ژن PAD4 بر روی ژل آگارز ۲ درصد به منظور تایید فرآیند همسانه سازی در وکتور pGEM T-easy . ستون ۱: مارکر 10000 bp DNA Ladder (فرمنتاز)، ستون های۳ تا ٦: نتایج PCR بر روی کلنی های نوترکیب حاصل شده نشان دهنده وجود قطعه PAD4 با سایز ۵۱۷ جفت باز و انجام موفق فرآیند همسانه سازی می باشد.**



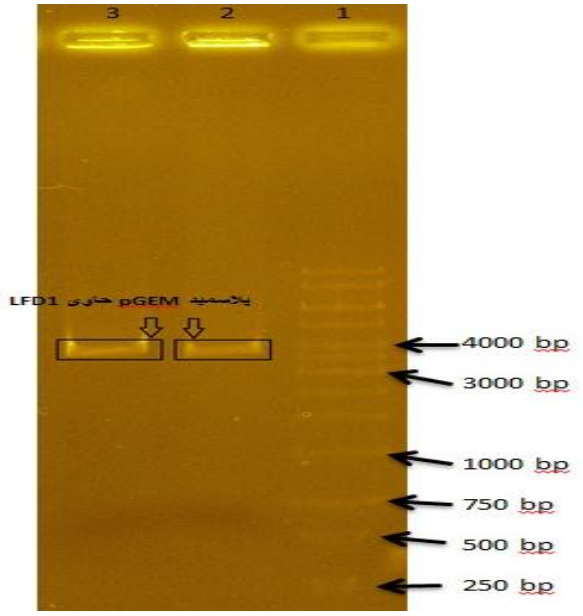
www.SID.ir

Archive of SID



الحاق ژن PAD4 به ژن LFD1 در ناقل کلونینگ

*الف) تعیین ابتدا و انتهای(جهت گیری) قطعه ژنی LFD1 در پلاسمید pGEM-T Easy Vector و ایجاد دو انتهای چسبنده:* برای این کار در ابتدا آنزیمی که در انتهای ژن LFD1 طراحی شده بود و یک آنزیم از آنزیم های ابتدای پلاسمید pGEM انتخاب گردید و واکنش برشی با این آنزیم ها طراحی شد. از آن جا که پس از انجام واکنش هضم آنزیمی هیچ قطعه ای آزاد نشد و بر روی ژل قطعه مورد نظر مشاهده نشد و تنها وکتور به شکل خطی در آمد، متوجه شدیم که قطعه LFD1 برخلاف راستای پلاسمید pGEM و با جهت گیری غیرمستقیم قرار گرفته است. این هضم آنزیمی به وسیله آنزیم های XbaI و PstI انجام شد که نتیجه آن در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است. پلاسمید خطی حاصل شده حاوی LFD1 و دارای دو انتهای چسبنده توسط آنزیم های فوق بوده که با تخلیص از روی ژل آگارز با دمای پایین، برای انجام واکنش امتزاج ژنی با PAD4 آماده شد.




**تصویر شماره ۳. الگوی الکتروفورز هضم آنزیمی pGEM حاوی قطعه LFD1 به وسیله آنزیم های XbaI و PstI بر روی ژل آگارز (دو درصد) ستون ۱: مارکر 10000 bp DNA Ladder (فرمنتاز)، ستون های ۲ و ۳: پلاسمیدهای هضم شده و خطی شده حاوی LFD1 (حدود ۳۸۰۰ جفت باز) که با فلش مشخص شده اند.**

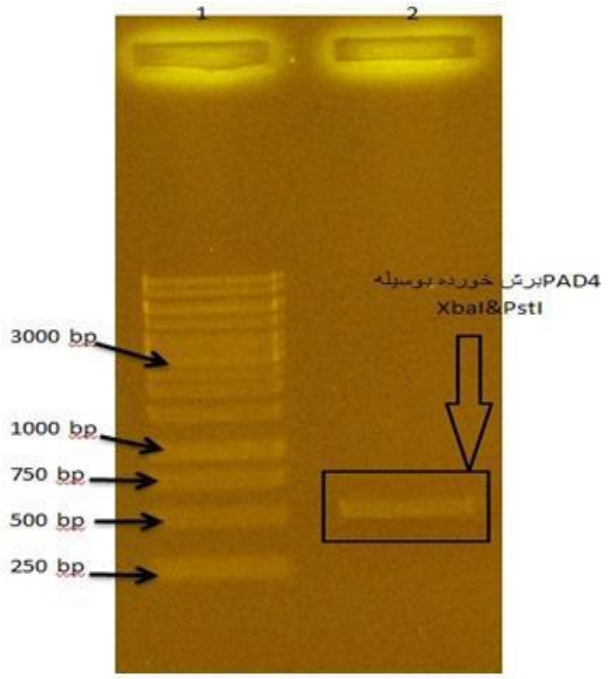
*ب) خارج ساختن قطعه ژنی PAD4 کلون شده از درون وکتور pGEM با آنزیم های محدودگر PstI و XbaI و تخلیص آن از روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین:* همان طور که قبلاً هم گفته شد، سایت برشی این دو آنزیم در توالی آغازگرهای فرادست و فرودست ژن PAD4 قرار دارد و با انجام این واکنش هضم آنزیمی قطعه مورد نظر ما(۵۱۷ جفت باز) خارج می گردد. این عمل با موفقیت انجام شد و کل محصول برش بر روی ژل آگارز ۲ درصد با دمای ذوب پایین برده شد و قطعه ژنی خارج شده، از ژل جداسازی گردید که نتیجه تخلیص قطعه فوق از ژل در تصویر شماره ۴ آورده شده است:



www.SID.ir

Archive of SID






**تصویر شماره ٤. محصول تخلیص شده قطعه PAD4 برش خورده و جدا شده از وکتور pGEM (۵۱۷ جفت باز) به وسیله آنزیم های XbaI و PstI بر روی ژل آگارز (دو درصد): ستون ۱: مارکر 10000 bp DNA Ladder (فرمنتاز)، ستون ۲: محصول تخلیص شده PAD4 برش خورده با دو آنزیم فوق که با فلش مشخص شده است.**

*ج) الحاق قطعه ژنی PAD4 به وکتور pGEM حاوی قطعه LFD1 و امتزاج(هم جوشی) دو قطعه ژنی:* همان طور که قبلاً هم عنوان شد، برای قرار دادن قطعه ژنی PA در وکتور pGEM حاوی قطعه LFD1، واکنش الحاق با کمک آنزیم T4 DNA لیگاز انجام شد و محصول الحاق به داخل باکتری مستعد E.coli DH5α منتقل شد. نتایج تاییدی نشان داد که امتزاج دو قطعه ژنی فوق با موفقیت انجام شده است.

*–تکثیر ژن کایمریک LFD1-PAD4 با روش PCR به منظور تایید زیر همسانه سازی:* واکنش تاییدی PCR با کمک آغازگرهای پیشرو LFD1 و پیرو PAD4 بر روی پلاسمید pGEM-T Easy Vector نوترکیب انجام شد. مشاهده قطعه مورد انتظار ۱۳۰۰ جفت بازی بر روی ژل آگارز ۲ درصد صحت فرآیند امتزاج ژنی را تایید کرد که در تصویر شماره ۵–الف نشان داده شده است:

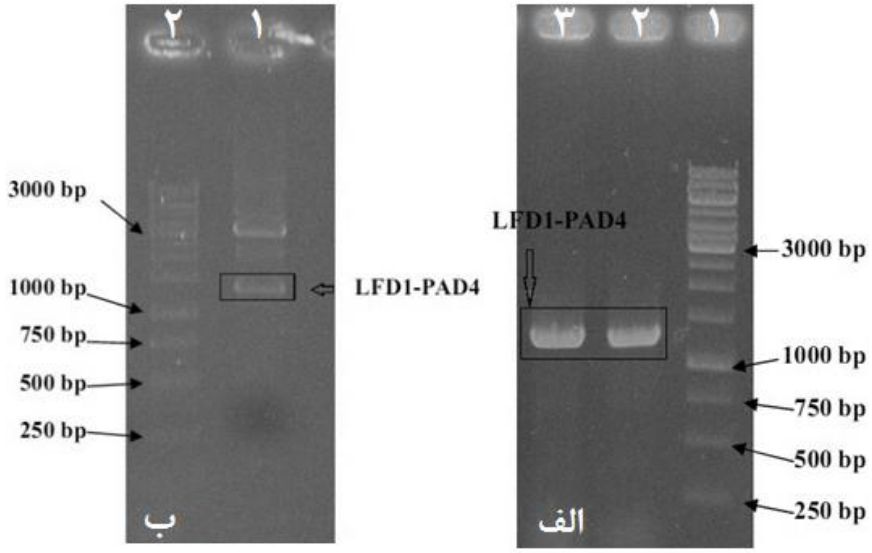
*–هضم آنزیمی ژن کایمریک LFD1-PAD4 به منظور تایید زیر همسانه سازی:* واکنش تاییدی هضم آنزیمی ژن کایمریک LFD1-PAD4 نیز با دو آنزیم XhoI و BamHI انجام شد. در این جا نیز مشاهده قطعه آزاد شده مورد انتظار ۱۳۰۰ جفت بازی بر روی ژل آگارز ۲ درصد، صحت فرآیند امتزاج ژنی را تایید کرد که در تصویر شماره ۵–ب نشان داده شده است:



www.SID.ir

Archive of SID






**تصویر شماره ۵- الف: الگوی الکتروفورز محصول PCR ژن کایمریک LFD1-PAD4 بر روی ژل آگارز ۲ درصد: ستون ۱: مارکر 10000 bp DNA Ladder (فرمنتاز)، ستون های ۲ و ۳: وجود قطعه ۱۳۰۰ جفت بازی، صحت فرآیند امتزاج ژنی را بر روی وکتور pGEM T easy تایید می کند. ب) الگوی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی وکتور pGEM T easy بر روی ژل آگارز ۲ درصد: ستون ۱: پلاسمید pGEM حاوی قطعه 1300bp برش خورده با آنزیم های BamHI و XhoI نشان دهنده وجود ژن کایمریک LFD1-PAD4 و صحت فرآیند امتزاج ژنی می باشد. ستون ۲: مارکر 10000 bp DNA Ladder(فرمنتاز).**

*زیر همسانه سازی ژن های امتزاج یافته در وکتور بیانی pET28a*: پس از تایید صحت فرآیند امتزاج ژنی، در ادامه ناقل نوترکیب فوق به عنوان الگو استفاده شد و قطعه فیوژ شده و خارج شده به وسیله هضم آنزیمی، در وکتور بیانی PET28a+ مطابق آن چه در بخش روش ها گفته شد، زیر همسانه سازی شد و وکتور نوترکیب حاصل با PCR و در نهایت هضم آنزیمی، مشابه نتایج به دست آمده در تصویر شماره ۵ مورد تایید قرار گرفت(از تکرار نتایج مشابه صرف نظر کردیم).

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه ژن LFD1 که از قبل(در یک مطالعه پیشین) در ناقل TA cloning همسانه سازی شده بود، در اختیار ما قرار گرفت(۱۳). ژن PAD4 نیز پس از شناسایی و جداسازی با استفاده از سیستم TA cloning همسانه سازی شد و سپس به ناقل حاوی ژن LDF1 الحاق شد. سپس مجموع دو ژن فوق در وکتور بیانی زیر همسانه سازی شد. در سال ۱۹۹۴ مهندسی و ساخت وکتورهای همسانه سازی خانواده T منجر به سهولت همسانه سازی ژن های تکثیر یافته شد. در این مطالعه تجربی با توجه به سهولت چنین سیستمی مبادرت به همسانه سازی در وکتور pGEM-T Easy شد(۱۴). هم چنین در این تحقیق، از وکتور بیانی pET28a(+) استفاده شد. امروزه برای تولید پروتیئن نوترکیب از روش های بیوتکنولوژی استفاده می شود. اشرشیاکلی به عنوان میزبانی برای بیان پروتیئن های نوترکیب هم در تحقیقات و هم در صنعت به طور گسترده استفاده می‌شود. در این تحقیق برای تولید پروتئین نوترکیب PD4 و LFD1 به صورت فیوژن از سویه نوترکیب BL21 به عنوان میزبان استفاده شد؛ که فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی می باشد(۱۵)، بنا بر این برای بیان این ژن های فیوژ شده مناسب به نظر می رسد. در سال ۲۰۰۷، مطالعات Jessica و همکاران نشان داد که LFD1 تیتر بالایی



www.SID.ir

Archive of SID



از آنتی بادی تولید می کند، که قدرت خنثی سازی سم سیاه زخم را دارد(۱۶،۱۷). در سال ۲۰۱۰، Baillie تمام دومین های LF را کلون نمود که مشخص شد LFD1 توان ایمنی زایی را دارد. از آن جایی که بخش عملکردی LF (۷۷۶ اسید آمینه) خاصیت کشندگی دارد و باعث بروز مرگ سلولی می شود(۸). PA یک جزء بسیار مهم توکسین سیاه زخم است، که در ایمن سازی نقش مهمی دارد. تا کنون PA در میزبان های مختلفی بیان شده و یک پاسخ القاء ایمنی بالا ایجاد کرده است و دومین ۴ این آنتی ژن به همراه دومین ۱ فاکتور کشنده(LF)، ایمونوژن های قوی این باکتری می باشند(۸). در این مطالعه قطعات ژنی دومین های PAD4 و LFD1 به صورت فیوژن در کنار هم قرار گرفتند، چرا که پروتئین حاصل از بیان آن ها می تواند باعث تحریک مناسب سیستم ایمنی شود. با توجه به نیاز تولید واکسن سیاه زخم در کشور، ضرورت استفاده از ناحیه مناسب برای تولید واکسن امری ضروری می نماید.

با توجه به ایمونوژن بودن نواحی PAD4 و LFD1، بیان کایمریک پروتیئن سازه نوترکیب حاصل از نواحی ژنی الحاق شده و جوش خورده فوق، میتواند برای القاء ایمنی محافظتی، به عنوان کاندید مناسب واکسن علیه سیاه زخم مطرح باشد.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه اساتید محترم و دانشجویان گرامی در گروه زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع) که در انجام این پایان نامه مساعدت نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

*References*

1. Koehler TM. Bacillus anthracis physiology and genetics. Mol Asp Med 2009; 30: 386-96.
2. Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, et al. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. Science 1998; 280: 734-7.
3. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene from Bacillus anthracis. Gene 1989; 81: 45-54.
4. Hutt JA, Lovchik JA, Drysdale M, Sherwood RL, Brasel T, Lipscomb MF, et al. Lethal factor, but not edema factor, is required to cause fatal anthrax in cynomolgus macaques after pulmonary spore challenge. Am J Pathol 2014;184:3205-16.
5. Friedlander AM, Welkos SL, Pitt ML, Ezzell JW, Worsham PL, Rose KJ, et al. Postexposure prophylaxis against experimental inhalation anthrax. J Infect Dis 1993; 167: 1239-42.
6. Okinaka R, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster A, Hill K, Keim P, et al. Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes. J Bacteriol 1999; 181: 6509-15.
7. Chichester JA, Musiychuk K, de la Rosa P, Horsey A, Stevenson N, Ugulava N, et al. Immunogenicity of a subunit vaccine against Bacillus anthracis. Vaccine 2007; 25: 3111-4.
8. Albrecht MT, Li H, Williamson ED, LeButt CS, Flicksmith HC, Quinn CP, et al. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against Bacillus anthracis infection and enhance endogenous immunity to anthrax. Infect Immun 2007; 75: 5425-33.
9. Nguyen ML, Crowe SR, Kurella S, Teryzan S, Cao B, Ballard JD, et al. Sequential B-cell epitopes of Bacillus anthracis lethal factor bind lethal toxin-neutralizing antibodies. Infect Immun 2009; 77: 162-9.
10. Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Friedlander AM, et al. Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Jama 1999; 281: 1735-45.
11. Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renatus M, Petosa C, Bienkowska J, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. Nature 2001; 414: 229-33.
12. Ahsaee Z, Salimian J, Nazarian S, Khalesi R, Olad GR, Amani J. Cloning, bioinformatics study and evaluation expression of gene of enterotoxigenic



www.SID.ir

Archive of SID



Escherichia Coli CFA/I major subunit (CFAB). JSKUMS 2011; 13: 72-82.
13. Rezaee M, Honari H, Zand A. Molecular cloning and expression of Bacillus Anthracis lethal factor domain 1 gene in Escherichia Coli. JSKUMS 2012; 14: 38-46.
14. Urbański DF, Małolepszy A, Stougaard J, Andersen SU. Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in Lotus japonicus. Plant J 2012; 69: 731-41.
15. Korhonen TK, Haiko J, Laakkonen L, Järvinen HM, Westerlund-Wikström B. Fibrinolytic and coagulative activities of Yersinia pestis. Front Cell Infect Microbiol 2013; 3: 35.
16. Chichester JA, Yusibov V. Plants as alternative systems for production of vaccines. Hum Vaccin 2007; 3: 146-8.
17. Walz A, Mujer CV, Connolly JP, Alefantis T, Chafin R, Dake C, et al. Bacillus anthracis secretome time course under host-simulated conditions and identification of immunogenic proteins. Proteome Sci 2007; 5: 11.



www.SID.ir

Archive of SID



# Production of Recombinant Construct by Cloning of Protective Antigen Domain 4 Gene and Fusion of it with Lethal Factor Domain 1 Gene of Bacillus anthracis in E.coli

*Najarasl M[1], Hashemzadeh MS[2], Honari H[1*], Mousavy SJ[1], Ebrahimi F[1], Pourhakkak H[1]*

**(Received: May 17, 2015 Accepted: June 30, 2015)**

## Abstract

*Introduction:* Anthrax is a zoonotic disease. Bacterium Bacillus anthracis is the causative agent of the fatal disease. At present, the protective antigen (PA) is used as an effective vaccine against anthrax. Domain 4 of this antigen together with domain 1 of lethal factor (LF) are the potent immunogens of this bacteria and are as suitable candidates of vaccine against it. Our aim in this study is the cloning of protective antigen domain 4 (PAD4) genes and fusion of it with lethal factor domain 1 (LFD1) gene of the bacteria to evaluate their capability in protective immunity induction.

*Materials & methods:* In this experimental study, we used a recombinant pGEM-T easy vector containing LFD1 gene. Then PAD4 gene was amplified and isolated by PCR and cloned into another pGEM-T easy vector, separately. After that, ligation of PAD4 gene and LFD1 gene was done in mentioned vector with determination of LFD1 orientation and by PstI/XbaI restriction sites. The recombinant construct, resulted from these genes was sub-cloned into pET28a expression vector using BamHI/ XhoI restriction enzymes and after determination of genes orientation, the expression host BL21 was transformed by this recombinant vector.

*Findings:* First cloning and fusion of PAD4 and LFD1 gene fragments were successfully carried out in pGEM-T easy vector and after the confirmation of mentioned process by both of enzymatic digestion and PCR methods, the result recombinant construct was sub-cloned into pET28a.

*Discussion & Conclusions:* Since PAD4 and LFD1 are immunogenic regions, expression of the recombinant construct resulted from these ligated genes can be proposed as proper candidate of anthrax vaccine for induction of protective immunity.

*Keywords:* Bacillus anthracis, Protective antigen (PA), Lethal factor (LF), Fusion, Vaccine candidate

*1. Depart of Biology, Comprehensive University of Imam Hossein, Tehran, Iran*
*2. Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
** Correspondin author Email: msh.biotechnology@gmail.com*



www.SID.ir