

## **A study of recombinant *Vibrio cholera* toxin-coregulated pili A (TCPA) from *E.coli***

Kiaie S(MSc)<sup>1</sup>, Abtahi H(PhD)<sup>2\*</sup>, Alikhani MY(PhD)<sup>3</sup>, Mosayebi G(PhD)<sup>2</sup>

1- Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Microbiology, School of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

Received: 25 Dec 2011, Accepted: 11 Apr 2012

### **Abstract**

**Background:** *Vibrio cholerae* is a gram-negative bacterial pathogen that causes diarrheal disease cholera. One of the most pathogenic factors of *Vibrio cholera* is pili. Pili plays an important role in colonization and persistence of bacteria in small intestine.

**Materials and Methods:** In this study, pili A (*tcpA*) gene was amplified by Polymerase chain reaction (PCR) method and sub-cloned into expression vectors such as pGEX4T-1. *Escherichia coli* competent cells were transformed by recombinant plasmids and the expression of protein with IPTG. The recombinant proteins were purified by affinity chromatography (GST) and immunoblot analysis was used for evaluation of new recombinant proteins antigenicity. The concentration of recombinant proteins was measured according to Bradford assay.

**Results:** The results of this study indicated that recombinant proteins were expressed successfully in competent cell of *E. coli*, such as *E. coli* BL21 (DH3). The recombinant protein was purified by affinity chromatography (GST). The immunoreactivity pattern of anti-Tcp antibody with recombinant proteins of TcPA showed that the recombinant proteins had antigenic properties.

**Conclusion:** Because these recombinant proteins are antigenic, these proteins may be considered as tentative candidates for designing cholera vaccine.

**Keywords:** Polymerase chain reaction (PCR), Toxin-coregulated pili (*tcpA*), *Vibrio cholera*

\*Corresponding author:

Address: Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: abtahi@arakmu.ac.ir

## بررسی پروتئین نو ترکیب زیر واحد A پپلی ویبریو کلرا در اشرشیاکلی

سمیه کیایی<sup>1</sup>، حمید ابطحی<sup>2\*</sup>، محمد یوسف علیخانی<sup>3</sup>، قاسم مسیبی<sup>4</sup>

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 2- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 3- دانشیار، گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
- 4- دانشیار، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 90/10/5 تاریخ پذیرش: 91/1/23

### چکیده

**زمینه و هدف:** ویبریوکلرا یک باکتری پاتوژن گرم منفی است که عامل بیماری اسهال است. یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای باکتری، پپلی هم تنظیم شونده با توکسین است. این پپلی به عنوان اولین عامل در کلونیزاسیون و تداوم باکتری‌ها در روده کوچک مورد نیاز است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق با استفاده از روش PCR، ژن پپلی هم تنظیم شونده با توکسین ویبریوکلرا تکثیر گردید. پس از تخلیص، ژن‌های فوق در پلاسמיד pGEX4T1 جهت بیان کلون شد. سپس ساختار پلاسمیدی نو ترکیب وارد باکتری اشرشیاکلی شد. تولید پروتئین‌ها توسط IPTG القاء و بهینه سازی شرایط محیط کشت صورت گرفت. پروتئین‌های نو ترکیب با استفاده از کیت گلو تاتیون S سفاروز خالص و آزمایش وسترن بلات برای تایید پروتئین نو ترکیب انجام گرفت. میزان پروتئین‌ها با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج تحقیق حاضر بیان موفقیت آمیز پروتئین‌های نو ترکیب در سلول اشرشیاکلی را ثابت کرد. پروتئین نو ترکیب به وسیله کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد. الگوی واکنش این پروتئین‌ها با آنتی‌بادی‌های ضد آنها، نشان داد که این پروتئین‌ها خاصیت آنتی‌ژنیک دارند.

**نتیجه‌گیری:** از آنجا که در این مطالعه نشان داده شد، این پروتئین‌ها دارای خاصیت آنتی ژنیسیته هستند، ممکن است به عنوان یک آنتی ژن مناسب برای واکسیناسیون باکتری ویبریوکلرا استفاده شود.

**واژگان کلیدی:** واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، ژن پپلی هم تنظیم شونده با توکسین A، ویبریو کلرا

\*نویسنده مسئول: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و ملکولی

Email: Abtahi@arakmu.ac.ir

## مقدمه

کلرا (ویبا) یک بیماری اسهالی است که به وسیله باکتری گرم منفی به نام ویبریوکلرا ایجاد می‌شود (1). ویبریوکلرا عضوی از خانواده ویبریوناسه و جنس ویبریو است که در آب‌های شور و شیرین به صورت بی‌هوای زندگی می‌کند (2). این باکتری توانایی ایجاد تخمیر را دارد (2، 3) و مهم‌ترین نشانه این بیماری استفراغ و اسهال آبکی فراوان می‌باشد. انتقال آلودگی، بیشتر از طریق غذا یا آب آلوده اتفاق می‌افتد. نتیجه این بیماری منجر به دهیدراته شدن و عدم تعادل الکترولیتی می‌گردد (4، 5). در حدود 200 سروتیپ از ویبریوکلرا شناخته شده که تنها دو سروتیپ O1 و O139 با وبای اپیدمی‌ک ارتباط دارد (6). بیان ژن‌های ویبریوکلرا به محض ایجاد تغییرات در تحریکات محیطی مثل نمک، pH و دما اتفاق می‌افتد. این انتقال محیطی به محض هضم غذا یا آب آلوده روی می‌دهد (7، 8). بعد از خوردن غذا یا آب آلوده باکتری در داخل روده کوچک کلونیزه می‌شود، برای این کلونیزاسیون نیاز به پیلی نوع چهارم دارد. پیلی هم تنظیم شونده با توکسین *tcp* (toxin co regulated of pilus) است که این پروتئین جزء دسته 4B قرار دارد (9). تولید پیلی و عامل ویرولانسی ترش‌چی به نام *tcpF* تشکیل میکروکلونی را تسهیل و برای کلونیزاسیون سلول‌های اپیتلیال روده‌ای مورد نیاز هستند (10، 11). نقش پیلی در بیماری‌زایی ویبریوکلرا بسیار پیچیده و ضروری است و شکل‌های جهش یافته این پروتئین قادر به ایجاد کلونیزاسیون در روده کوچک انسان و موش نمی‌باشند (12). پروتئین TCPA به صورت یک پیلی رشته‌ای نازک است و دسته مشخصی را در سطح باکتری ویبریوکلرا ایجاد می‌کند. بیان ژن‌های کاست ویرولانسی پیلی هم تنظیم شونده با توکسین، توسط *toxR* کنترل می‌شود که یک پروتئین غشایی است. هنگامی که این باکتری تحت شرایط بالای بیان توکسین کشت داده می‌شود این تنظیم یک حالتی از وابستگی دو موقعیت *tcp* و توکسین را در رگولون *toxR* نشان می‌دهد (13). پیلی به شکل فیبری است که از پلی مرهای یکسانی از *tcpA* تشکیل یافته است (14). TCPA، به عنوان یک پروتئین پیشرو در قسمت سیتوپلاسمیک غشاء

داخلی ویبریوکلرا به وسیله یک پروتئاز، مورد پردازش قرار می‌گیرد. *tcpJ* نقش این پپتیداز را به عهده دارد (15). زیر واحدهای *tcpA* بالغ به همراه سایر ضمامن خود به *tcp* بالغ تبدیل می‌شود. تصور می‌شود این پروتئین‌ها توانایی تشکیل داربستی را دارند که با همکاری همدیگر، توانایی ایجاد پیلی هم تنظیم شونده با توکسین عمل می‌کنند (8). پروتئین TCPA به عنوان زیر واحد بزرگ این پیلی در نظر گرفته شده است، با توجه به محل قرار گیری *tcpA* در سطح باکتری این پروتئین به راحتی تحت تاثیر سیستم ایمنی می‌تواند قرار گیرد. پروتئین TcP پلی مری از واحدهای تکراری است که در میان جزیره بیماری‌زای ویبریو VPI (V.cholera pathogenicity Island) یافت می‌شود (16). سکانس‌های *tcp DNA* مربوط به گونه‌های التور O1 و O139 شباهت‌های زیادی با یکدیگر دارند (18). بنابراین سرم تشکیل شده در برابر این پروتئین باعث ایجاد ایمنی در برابر این گونه‌ها می‌شود. پروتئین TCPA دارای نقش مهمی در تشکیل گیرنده برای باکتریوفاژ می‌باشد و نحوه قرارگیری این پروتئین در معرض آنتی بادی‌ها باعث شده تا کاندیدای مناسبی به منظور توسعه ایمنی ضد کلونیزاسیون علیه بیماری ویبا باشد. پروتئین TCPA با وزن حدود 45/5 کیلودالتون یکی از اجزاء مهم ویبریوکلرا است. ژن سازنده این پروتئین دارای 598 جفت باز است.

در این مطالعه به منظور تولید این پروتئین از سویه BL21(DE3) اشریشیاکلی استفاده شده است. تولید پروتئین TCPA به صورت نوترکیب باعث می‌گردد تا مطالعات بیشتری در زمینه ایمنی‌زایی آن انجام شود.

## مواد و روش‌ها

تولید پروتئین نوترکیب TCPA یک مطالعه بنیادی - کاربردی است. باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل ویبریوکلرای سویه اینابا تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، اشریشیاکلی سویه *DH5α* و اشریشیاکلی سویه *E. coli, BL21(DE3)* از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی بود. جهت کلونینگ و تولید پروتئین TCPA از پلاسمید pGEX4T1 استفاده شد. پلاسمید ذکر شده از مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه

الگو (64 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه)، تکثیر ژن هدف (72 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه) بود. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه صورت پذیرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت رش (Roche) بر اساس دستور العمل آن انجام گرفت. برای کلون سازی ژن *tcpA* در پلاسمید pGEX4T1 به ترتیب زیر عمل گردید. ابتدا محصول PCR با آنزیم های BamHI و XhoI برش داده شد و سپس در ناقل ذکر شده وارد گردید. پلاسمید فوق نیز با همین آنزیم ها برش داده شد. عمل اتصال ژن *tcpA* در این پلاسمید با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در حرارت 16 درجه سانتی گراد به مدت یک شب شبانه روز انجام گرفت. پلاسمید *tcpA* pGEX4T1 به ترتیب در سلول های مستعد اشریشیاکلی سویه DH5 $\alpha$  و سویه BL21 وارد شد. برای تأیید صحت ترادف نوکلئوتید ژن به دست آمده از محصول PCR ساختار پلاسمیدی *tcpA* pGEX4T1 به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید. به منظور تولید پروتئین TCPA، پلاسمید *tcpA* pGEX4T1-1 در سویه BL21 اشریشیاکلی به وسیله شوک حرارتی وارد شد و بر روی محیط نوترینت آگار حاوی آمپی سیلین در غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر کشت داده شد و در حرارت 37 درجه سانتی گراد به صورت یک شبانه روز آنکوبه گردید. کلنی های رشد یافته بر روی این محیط در محیط نوترینت برات حاوی آمپی سیلین 100 میلی گرم بر میلی لیتر به صورت یک شبانه روز کشت داده شد. سپس به منظور القاء پروتئین TCPA، حدود 500 میکرو لیتر از باکتری های کشت داده شده به محیط القاء منتقل شد و در انکوباتور شیکر دار با دور rpm 24 قرار گرفت. پس از این که تعداد باکتری ها به حد مناسب رسید (جذب نوری 0/6) از محلول یک میلی مولار IPTG به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. دو و چهار ساعت پس از افزودن IPTG رسوب باکتری ها با سانتریفیوژ در rpm 4000 به مدت 8 دقیقه به دست آورده شد. برای

گشت. تخلیص کروموزوم ویبریو کلرا بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا ویبریو کلرا در محیط نوترینت برات در دمای 37 درجه سانتی گراد کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE (1 میلی مولار، 10 Tris.HCl، 10 میلی مولار، pH=8) حل شد و سلول باکتری ها توسط سدیم دو سیل سولفات و آنزیم پروتئیناز K لیز گردید. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/NaCl (10 درصد، NaCl 0/7 درصد) استخراج شد. پروتئین ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل/کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به نسبت 25/24/1 برداشت گردید. DNA به دست آمده با استفاده از ایزوپروپانول الکل رسوب داده شد و سپس توسط اتانول 70 درصد شستشو گردید. کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز 0/8 درصد در بافر TBE مورد بررسی قرار گرفت. مقدار DNA تخلیص شده با اندازه گیری جذب نور در طول موج های 260 و 280 نانومتر به دست آمد.

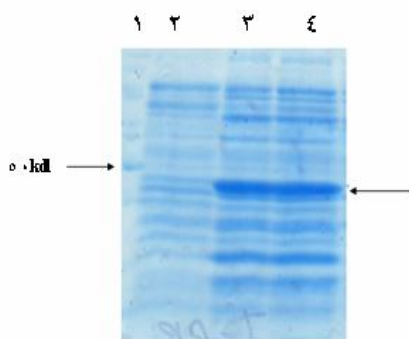
با استفاده از ترادف ژن *tcpA* طراحی پرایمرهای رفت (Forward) و برگشت (Reverse) انجام شد:

Forward: 5'-AGGGATCCATGACATTACTCGAAG-3'  
Reverse: 5'-AACTCGAGGCTGTTACCAAATGC-3'

پرایمر رفت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر برگشت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم XhoI است.

تکثیر ژن *tcpA* با استفاده از PCR در حجم 50 میکرو لیتر انجام گرفت. غلظت عوامل PCR شامل 500 نانو گرم/ میلی لیتر از DNA الگو، 1 میلی مولار از هر پرایمر، 3 میلی مولار از یون منیزیم، 200 میلی مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5 واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر 10X PCR است. برنامه استفاده شده برای PCR به صورت حرارت اولیه در 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه (یک سیکل)، مرحله دوم PCR متشکل از سی سیکل که هر سیکل شامل مرحله واسرشت (94 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه)، اتصال پرایمرها به DNA

پروتئین TCPA با وزن مولکولی 45/5 کیلو دالتون در محیط القاء مناسب، به وسیله کیت گلوکاتایون S ترانسفراز G.S.T تخلیص شد (شکل 2). جهت تعیین خاصیت آنتی ژنیسیته پروتئین مورد نظر و تایید نهایی پروتئین نو ترکیب از وسترن بلات استفاده شد (شکل 3). باکتری *E.coli*, BL21(DE3) به علت نداشتن برخی از آنزیم‌های پروتئاز قادر است که میزان بالایی از پروتئین را بیان کند. با به کارگیری سیستم pGEX4T1 به عنوان یکی از قدرتمندترین وکتورهای بیان پروتئین، TcPA تولید گردید. وکتور بیان pGEX4T1 دارای یک منشاء همانند سازی F1 و پروموتور تریتوفان است که با به کارگیری IPTG، پروتئین مربوطه القاء شد. وکتور بیان pGEX 4T1 دارای توالی پروتئینی ویژه‌ای به نام گلوکاتایون S ترانسفراز است که وزن مولکولی در حدود 23 کیلو دالتون را به پروتئین مورد نظر اضافه می‌کند. وزن خالص مولکولی پروتئین tcpA در حدود 21 کیلو دالتون است. پروتئین نو ترکیب TCPA به نظر می‌رسد یک آنتی ژن مهم برای روش‌های سرولوژیکی در تشخیص بیماری وبا است.



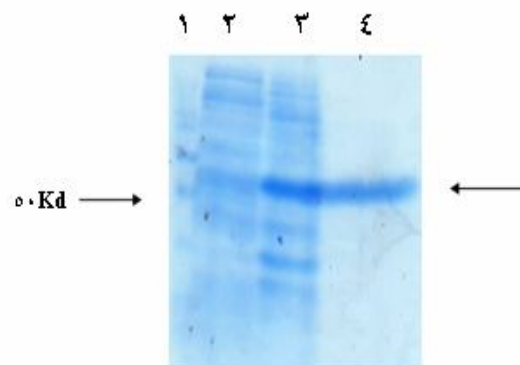
شکل 2. تصویر تخلیص پروتئین

ستون شماره 1: مارکر، ستون شماره 2: نمونه پروتئین قبل از القاء در محیط نوترینت برات با گلوکز، ستون شماره 3: نمونه پروتئین بعد از القاء در محیط نوترینت برات با گلوکز، جایگاه شماره 4: نمونه پروتئین تخلیص شده 50KD

بررسی نتیجه القاء از رسوب باکتری بر روی ژل 12 درصد SDS-PAGE الکتروفورز گردید. تخلیص پروتئین با استفاده از کیت گلوکاتایون S سفاروز بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیازن) انجام گرفت. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری گردید و کیفیت آن نیز با استفاده از الکتروفورز پروتئین بر روی ژل 12 درصد SDS-PAGE بررسی شد. جهت تایید پروتئین TCPA از روش وسترن بلات استفاده شد. در این مطالعه از سرم خرگوش، موش و هم‌چنین سرم فرد وبایی استفاده گردید (18).

### یافته‌ها

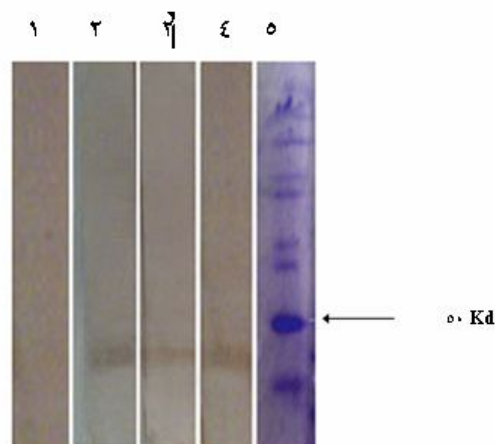
غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری ویبریکلر برابر 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد گردید. کروموزوم از باکتری ویبریکلر تخلیص شد و به عنوان الگو برای تکثیر ژن *tcpA* مورد استفاده قرار گرفت. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر برابر 598 جفت باز بود. به منظور تایید ژن تکثیر یافته و نیز بررسی پرایمرهای طراحی شده، پلاسمید حاوی ژن مورد نظر به شرکت ارسال گردید. نتایج نشان داد که محصول PCR همولوژی با ژن مربوطه داشت. در این مطالعه با استفاده از باکتری *E.coli*, BL21(DE3) پروتئین TCPA در محیط‌های القاء مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل 1).



شکل 1. تصویر ژل القاء پروتئین

ستون شماره 1: مارکر، ستون شماره 2: نمونه پروتئین قبل از القاء در محیط نوترینت برات با گلوکز، ستون شماره 3 و 4: نمونه پروتئین بعد از القاء در محیط نوترینت برات با گلوکز

کلونیزاسیون ویبریوکلرا موثر باشد. طی مطالعاتی که بر روی مدل سنتتیک این پروتئین انجام گرفته است، نشان داده شده که پپتیدهای ساختگی از برخی مناطق TcPA، آنتی بادی‌های حفاظتی را در موش‌ها القاء می‌کند، این آنتی‌بادی‌ها به دانسیته بالایی از فیبرهای *tcp* متصل گشت (20). در مطالعه دیگری آنتی‌بادی‌های ضد *tcp* در خرگوش تولید گردید. تجویز این سرم در موش‌های آلوده به ویبریوکلرا نشان داد که تنها آنتی‌سرمی که حفاظتی بود، سرم ضد TcP A15 بوده است که با دانسیته بالا به TcP متصل می‌شود (5). در مطالعه تیلورو همکاران مشاهده شد که با ایجاد کردن نقص در پروتئین TcPA در حدود 50 درصد دوز کشنده این باکتری افزایش می‌یابد (21). در مطالعه دیگری ناحیه‌ای از پروتئین TcPA را شناسایی کردند که این نواحی دارای خاصیت حفاظتی موثری در موش‌های نوزاد بوده و به عنوان ترکیباتی در واکنش کشته شده پیشنهاد شده‌اند. این نواحی دارای خاصیت هیدروفیل هستند، به طوری که میزان تیر آنتی‌بادی IgA در پاسخ‌های موکوسی بعد از 7 روز از مایع ژروناال قابل اندازه‌گیری است (22). بهترین پاسخ‌های ایمنی مطالعه شده پاسخ‌های ایمنی همورال هستند و پاسخ‌های آنتی‌بادی عمومی و موکوسی می‌توانند مربوط به حفاظت باشند (23-25). پاسخ‌های سرولوژیکی مثل پاسخ آنتی‌بادی ویبریوسیدال وابسته به کمپلمان، پاسخ‌های آنتی‌بادی مربوط به لیپوبلی ساکارید (LPS) ویبریو، توکسین کلرا و پاسخ به پیلی هم تنظیم شونده با توکسین (*tcp*)، عامل کلونیزاسیون و آنتی ژن حفاظتی بالقوه، سبب افزایش پاسخ سلول ترشح کننده آنتی بادی (ASC)، مدفوعی و هم چنین آنتی‌بادی‌های پلاسما در بیماران می‌شود. پاتوژن ویبریو کلرا توانایی القاء پاسخ‌های ایمنی ضد باکتریایی و پاسخ‌های آنتی توکسیک عمومی و موکوسی را در بیماران دارد (26، 27) به طوری که واکنش‌های موثر باید چنین پاسخ‌هایی را القاء کنند. ایمنی در مقابل این بیماری به تحریک سیستم ایمنی موکوسی و نیز تولید IgA ترشحي (SIgA) در بافت لنفوئیدی مربوط به



شکل 3: وسترن بلات پروتئین نوترکیب *tcpA* ویبریو کلره ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: وسترن بلات پروتئین نوترکیب با سرم موش ایمن شده، ستون 3: وسترن بلات پروتئین نوترکیب با سرم خرگوش ایمن شده، ستون 4: وسترن بلات پروتئین نوترکیب با سرم انسان ایمن شده، ستون 5: مارکر

### بحث

در این مطالعه ژن پیلی A به وسیله PCR جدا شد. با به کارگیری وکتور بیان pGEX4T1 پروتئین TcPA با وزن مولکولی 45 کیلو دالتون تخلیص گردید. تخلیص پروتئین مربوطه در محیط‌های القاء گلوکز انجام گرفت. پروتئین TcPA به عنوان زیر واحد بزرگ پیلی هم تنظیم شونده با توکسین ویبریو کلرا در نظر گرفته شده است و شباهت زیادی به پیلی‌های تیپ 4 دارد (9). این زیر واحد پس از پردازش توسط پپتیداز *tcpJ* که در غشاء داخلی قرار دارد، توسط یک سری پروتئین‌های انتقالی به فضای پری پلاسمیک حرکت کرده و سپس توسط یک کانال ویژه‌ای به غشاء خارجی راه می‌یابد و *tcpA* تشکیل پیلی مشخصی در سطح باکتری می‌دهد (19). از بین پروتئین‌هایی که در تشکیل پیلی هم تنظیم شونده با توکسین شرکت دارند تنها تعدادی از آنها که در محدوده غشاء سلول باکتری قرار ندارند قادر به عکس العمل با آنتی‌بادی‌ها هستند که می‌توانند نقش حفاظتی را داشته باشند. به طوری که پروتئین‌های TcPA، TcPB، و هم چنین TcP F، می‌توانند در معرض آنتی‌بادی‌ها قرار بگیرند (8). به نظر می‌آید اثرات حفاظتی آنتی‌بادی‌ها علیه *tcpA* از طریق کاهش میزان

پروتئین‌های داخل سلولی باکتری *E. coli* شد. هدف از این کار بررسی کردن خاصیت آنتی ژنیسته پروتئین نوترکیب TcPA بود و در نهایت تولید کردن واکسن‌های کاملاً موثر با توجه به اهمیت بیماری‌زایی پروتئین مورد نظر (TcPA) می‌باشد و نیز فراهم آوردن یک ایمنی مناسب در برابر کلونیزاسیون ویبریو کلرا در روده است.

### نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد با به کارگیری میزبان‌های مناسبی مانند *E. coli* BL21 که فاقد آنزیم‌های پروتئاز هستند و همچنین با به کار بردن وکتورهای مثل pGEX 4T1 به علت دارا بودن پروتئین‌های الحاقی با وزن مولکولی پایین، پروتئین نوترکیب بدون تاثیر در عملکرد آن در داخل باکتری *E. coli* حفظ می‌شود. این تحقیق نشان داد با توجه به تشابه آنتی ژنیک بین فرم طبیعی و نوترکیب تولید شده می‌توان از پروتئین‌های نوترکیب برای بررسی روند عفونت‌های ناشی از ویبریوکلر استفاده نمود و با بررسی کردن خاصیت ایمنوژنیسته گامی موثر در جهت تولید و طراحی واکسن بر علیه بیماری وبا برداشت.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از ریاست محترم مرکز تحقیقات و معاونت آموزش و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک به لحاظ تامین اعتبار این طرح قدردانی می‌شود.

### منابع

1. Nguyen DT, Ngo TC, Tran HH, Le TH, Nguyen HT, Nguyen BM, et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O139 of an Aquatic Isolate in Northern Vietnam. The open microbiology journal. 2012; 6:14.
2. Janda J, Powers C, Bryant R, Abbott S. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 1988; 1(3): 245-67.
3. Butler SM, Camilli A. Going against the grain: chemotaxis and infection in *Vibrio*

روده بستگی دارد به طوری که آنتی‌بادی‌ها بر روی سطوح موکوسی روده قرار گرفته و سلول‌های B یادگار فرد را از قرار گرفتن در برابر حمله بعدی محافظت خواهند کرد (28). آنتی‌بادی‌های IgA ترشحات موکوسی بیماران در برابر آنتی ژن‌های حفاظتی بزرگ مورد بررسی قرار گرفته‌اند (13). اثبات بیماری‌زایی پروتئین TcP طی مطالعاتی توسط هرینگتون و همکاران انجام شد. آنها ثابت کردند در سوبه‌های ویبریو کلرای که ژن پلی هم تنظیم شونده با توکسین آنها دچار موتاسیون شده باشد این باکتری‌ها قادر به ایجاد کلونیزاسیون در روده کوچک انسان و موش نمی‌باشند (13). بنا بر نحوه آرایش پروتئین‌های تشکیل دهنده tcp، با توجه به احتمال در معرض قرارگیری این پروتئین‌ها از جمله TcPA و TcPB با مولکول‌های آنتی‌بادی، ما را وادار به انجام کلون کردن و بیان پروتئین مورد نظر کرد. در مطالعات انجام گرفته بر روی *tcpA* تاکنون توانسته‌اند این پروتئین را به صورت سنتتیک و یا به شکل مستقیم آن را از باکتری ویبریوکلرا جدا کنند. با توجه به اهمیت و ضرورت عملکرد *tcpA* در بیماری‌زایی ویبریو کلرا بر آن شدیم که بتوانیم با تولید این پروتئین گامی موثر در زمینه ایمنوژنیسته و طراحی واکسن در مطالعات بعدی برداریم. در این مطالعه سعی بر این شد تا با تولید این پروتئین به صورت نوترکیب زمینه‌ای را در جهت بیان موثر این پروتئین، با صرف هزینه‌های کمتر فراهم کنیم. در مطالعه حاضر، پروتئین TcPA در باکتری اشرشیاکلی سوبه BL21 بیان شد. وزن مولکولی پروتئین الحاقی G.S.T گلوکوتاتین S ترانسفراز در حدود 20 کیلو دالتون است که این توالی پروتئینی در پلاسمید pGEX4T1 که در این تحقیق برای تولید پروتئین نوترکیب TcPA استفاده گردیده است به ابتدای این پروتئین اضافه شد. بنابراین وزن پروتئین تولید شده در حدود 40/5 کیلو دالتون است. پروتئین TcPA تحت کنترل اپراتور Trp تولید شد، این پروتئین توانست پایداری خود را در فضای سیتوپلاسمی باکتری *E. coli* به واسطه پروتئین‌های الحاقی حفظ کند. اتصال این دو پروتئین به یکدیگر مانع از تخریب پروتئین نوترکیب TcPA، توسط

- cholerae. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(8):611-20.
4. Ehara M, Ishibashi M, Ichinose Y, Iwanaga M, Shimotori S, Naito T. Purification and partial characterization of fimbriae of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine*. 1987;5(4):283-8.
  5. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987; 84(9): 2833-7.
  6. Ramamurthy T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. *Vibrio cholerae* O139 Bengal: odyssey of a fortuitous variant. *Microbes and infection*. 2003; 5(4): 329-44.
  7. Kaper JB, Glenn JR, and Levine MM. Cholera. *Clin Microb*. 1995;8(1):48-86.
  8. Taylor RK, Kim TJ, Bose N, Stonehouse E, Tripathi SA, Kováč P, et al. Progress towards development of a cholera subunit vaccine. *Chemistry & biodiversity*. 2004;1(7):1036-57.
  9. Chen LY, Chen DY, Miaw J, Hu NT. XpsD, an outer sequence and comparison of predicated protein structural features to those of type 4 pilins. *Infect. Immun*. 1996, 58:3042-9.
  10. West PA, Colwell RR. Identification and classification of *Vibrionaceae*-an overview. *Vibrios in the Environment*. 1984:285-363.
  11. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996; 272(5270):1910-4.
  12. Pal B, Khuntia H, Samal S, Kar S, Patnaik B. Epidemics of severe cholera caused by El Tor *Vibrio cholerae* O1 Ogawa possessing the *ctx B* gene of the classical biotype in Orissa, India. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14(5):e384-e9.
  13. Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor R, Levine MM. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *The Journal of experimental medicine*. 1988;168(4):1487-92.
  14. Strom M, Lory S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annual Reviews in Microbiology*. 1993;47(1):565-96.
  15. LaPointe CF, Taylor RK. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(2):1502-10.
  16. Chaparro AP, Ali SK, Klose KE. The ToxT-dependent methyl-accepting chemoreceptors *AcfB* and *TcpI* contribute to *Vibrio cholerae* intestinal colonization. *FEMS microbiology letters*. 2010; 302(2):99-105.
  17. Sarkar A, Nandy RK, Nair GB, Ghose AC. *Vibrio* pathogenicity island and cholera toxin genetic element-associated virulence genes and their expression in non-O1 non-O139 strains of *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity*. 2002; 70(8):4735-42.
  18. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*: CSHL press; 2001.
  19. Martin PR, Watson AA, McCaul TF, Mattick JS. Characterization of a five-cluster required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*. 1995; 16(3):497-508.
  20. Taylor RK, Kim TJ, Meeks MD, Wade TK, Wade WF. A *Vibrio cholerae* classical *TcpA* amino acid sequence induces protective antibody that binds an area hypothesized to be important for toxin-coregulated pilus structure. *Infection and immunity*. 2004;72(10):6050-60.
  21. Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(6):3824-8.
  22. Jertborn M, Svennerholm AM, Holmgren J. Intestinal and systemic immune responses in humans after oral immunization with a bivalent B subunit-O1/O139 whole cell cholera vaccine. *Vaccine*. 1996;14(15):1459-65.
  23. Svennerholm AM, Gothefors L, Sack DA, Bardhan P, Holmgren J. Local and systemic antibody responses and immunological memory in humans after immunization with cholera B subunit by different routes. *Bulletin of the World Health Organization*. 1984;62(6):909-18.
  24. Svennerholm AM, Jertborn M, Gothefors I, Karim A, Sack DA, Holmgren J. Mucosal antitoxic and antibacterial immunity after cholera disease and after immunization with a



- combined B subunit-whole cell vaccine. *Journal of Infectious Diseases*. 1984; 149(6):884-93.
25. Qadri F, Khan AI, Faruque A, Begum YA, Chowdhury F, Nair GB, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* diarrhea, Bangladesh, 2004. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(7):1104-7.
26. Walker RI, Van De Verg LL, Hall RH, Schmitt CK, Woo K, Hale V. Enteric vaccines for pediatric use: Workshop summary. *Vaccine*. 2005; 23(46):5432-9.
27. Jertborn M, Svennerholm A, Holmgren J. Saliva, breast milk, and serum antibody responses as indirect measures of intestinal immunity after oral cholera vaccination or natural disease. *Journal of clinical microbiology*. 1986;24(2):203-9.
28. Lycke N, Holmgren J. Intestinal mucosal memory and presence of memory cells in lamina propria and Peyer's patches in mice 2 years after oral immunization with cholera toxin. *Scandinavian journal of immunology*. 1986; 23(5):611-6.