Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 15(68): 51-60

Recombinant expression and purification of *Bacillus anthracis* lethal factor domain 1 in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibody against it in mice

Rezaee M(M.Sc)[1], Honari H(Ph.D)[1*], Zand A.M(M.Sc)[1], Pourtorabi M.A(M.Sc)[1]

1- Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, Iran

Received: 3 Jul 2012, Accepted: 19 Sep 2012

Abstract

Background: Anthrax is a common disease among human and livestock which is caused by *Bacillus anthracis. Bacillus anthracis* has two strong immunogenic proteins: Protective antigen (PA) and lethal factor domain I (LFD1) that have always been considered as vaccine candidates against *Bacillus anthracis.* The aim of this study is to express and purify the lethal factor domain I (LFD1) in *Escherichia coli* and produce polyclonal antibody against it in mice.

Materials and Methods: In this experimental study, LFD1 gene was amplified with *Bam*H I and *Xho* I restriction site by PCR. After isolation, the gene was cloned to the expression vector pET28a (+). This vector was transformed to *E. coli*-BL21 (DE3) PLysSto to express LFD1 gene. The expression of LFD1 gene was induced by IPTG. After protein purification by affinity chromatography, the produced antigen was injected into mice for four times. Then the produced polyclonal antibody in mice serum was evaluated.

Results: The cloned LFD1 gene in pET28a (+) vector was confirmed by PCR, enzymatic analysis, and sequencing. The expressed and purified recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. Finally, the isolated polyclonal antibody from mice serum was evaluated and confirmed by ELISA test.

Conclusion: Noticing the appropriate expression, easy purification of LFD1, and the titer of produced polyclonal antibody against LFD1 in mice due to its immunogenicity, it can be considered as a good vaccine candidate against anthrax.

Keywords: Anthrax, *Bacillus anthracis*, immunogen, polyclonal antibody

*Corresponding author:
Address: Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, Iran
Email: honari.hosein@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 9 (شماره پیاپی 68)، بهمن 1391، 60-51

بیان نوترکیب و تخلیص ناحیه 1 فاکتور کشنده *باسیلوس آنتراسیس* در *Escherichia coli* و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آن در موش سوری

مهدی رضائی[1]، حسین هنری[2*]، علی‌محمد زند[1]،محمدعلی عارف‌پور ترابی[1]

1- کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
2- استادیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/4/13 تاریخ پذیرش: 91/6/29

چکیده

زمینه و هدف: سیاه‌زخم یک بیماری مشترک بین انسان و دام است. عامل ایجاد کننده بیماری، باکتری *باسیلوس آنتراسیس* می‌باشد که آنتی‌ژن حفاظت‌کننده و ناحیه یک فاکتور کشنده (LFD1) ایمونوژن‌های قوی این باکتری بوده و همواره به عنوان کاندیدای واکسن علیه *باسیلوس آنتراسیس* در نظر گرفته شده‌اند. هدف این مطالعه بیان و تخلیص LFD1 در باکتری *Escherichia coli* و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آن در موش سوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ژن LFD1 با جایگاه‌های برش آنزیمی *Bam*HI و *Xho*I با واکنش PCR تکثیر و بعد از جداسازی، در وکتور بیانی pET28a(+) همسانه‌سازی گردید. به منظور بیان ژن، این وکتور به باکتری‌های صلاحیت‌دار *E.coli*-BL21(DE3)PLysS تراریخت شد. بیان ژن LFD1 تحت القای IPTG انجام و بعد از تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی، آنتی‌ژن حاصل در چهار نوبت به موش‌های سوری تزریق شد. آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده در سرم موش‌ها اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: ژن LFD1 کلون شده در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی تأیید شد. هم‌چنین پروتئین نوترکیب تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن تایید گردید. در نهایت آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده از سرم موش سوری جدا شده و به وسیله تست الایزا ارزیابی و تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به بیان مناسب، تولید آسان این آنتی‌ژن و تیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه آنتی‌ژن LFD1 به دلیل ایمونوژنیسیته آن در موش‌های سوری، می‌توان آن را به عنوان کاندید واکسن علیه سیاه‌زخم در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: سیاه‌زخم، *باسیلوس آنتراسیس*، ایمونوژن، آنتی‌بادی پلی‌کلونال

[*]**نویسنده مسئول:** تهران، لویزان، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، گروه علوم زیستی
Email: khosrowbeygi@yahoo.com

مقدمه

سیاه‌زخم یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام بوده و پتانسیل استفاده در جنگ‌های بیولوژیک را دارا است. بیماری سیاه‌زخم در انسان در نتیجه تماس مستقیم با حیوانات بیمار و یا فرآورده‌های حیوانات مانند پوست، مو و پشم ایجاد می‌شود. بنابراین دامپزشکان، دامداران، میکروب شناسان، کشاورزان، چوپانان، کارگران کشتارگاه‌ها و کارگرانی که در صنایع پوست و پشم کار می‌کنند بیشتر در معرض ابتلاء به این بیماری هستند(1).

هم‌چنین از اسپور این باکتری در حملات تروریستی در ایجاد فرم استنشاقی سیاه‌زخم استفاده شده است(2). *باسیلوس آنتراسیس* (Bacillus anthracis) علاوه بر یک DNA حلقوی به اندازه 4/5 مگاباز، دارای دو پلاسمید بزرگ pXO1 (شامل ژن‌های توکسیک) و pXO2 (شامل ژن‌های مولد کپسول) می‌باشد. کپسول عامل تعیین کننده در بیماری‌زایی بوده و باکتری را در برابر هجوم ماکروفاژهای میزبان محافظت می‌کند. توکسین با واسطه یک پلاسمید به نام PBA1 یا pXO1 ایجاد می‌شود که 3 پروتئین یا آنتی‌ژن محافظت‌کننده (Protective Antigen-PA)، عامل مولد ادم (Edema Factor-EF)و عامل مولد مرگ سلولی (Lethal Factor-LF) را کد می‌کند(3، 4).

PA برای سمیت سلول میزبان در ترکیب با LF یا EF ضروری است که به ترتیب توکسین کشنده یا توکسین تورم‌زا تولید کرده(5) و دارای ناحیه اتصال به گیرنده سلول میزبان بوده و ورود کمپلکس‌های توکسین را به درون سلول میزبان تسهیل می‌نماید(6). این کمپلکس‌ها از طریق آندوسیتوز وارد سیتوزول شده و با اسیدی کردن آندوزوم، دو عامل LF و EF از طریق کانال‌های پروتئینی (β-barrel چهارده رشته‌ای) که PA برای آنها فرآهم آورده است به درون سیتوپلاسم سلول میزبان نفوذ کرده در آنجا با کمک کلسیم، کالمودولین و Zn^{2+} (در مورد LF) فعالیت‌های کاتالیتیکی خود را بروز می‌دهند.LF با ایجاد برش در سمت انتهای آمینی سوبسترای اختصاصی خود یعنی Mitogen-activated Protein Kinase Kinases(MAPKKs) باعث شکستن آنها می‌شود. با این عمل سیگنال‌های لازم جهت تکثیر متوقف شده و سلول به سوی مرگ پیش می‌رود(9-7).

پروتئین LF دارای چهار ناحیه اصلی می‌باشد که ناحیه 1 از اسیدآمینه 1 تا 262 امتداد می‌یابد و محل اتصال به پروتئین مصونیت‌زا می‌باشد. ناحیه 2 از دو بخش مجزا تشکیل شده است که پس از فولدینگ در کنار هم قرار می‌گیرند و شامل اسیدآمینه‌های 263 تا 302 و 383 تا 551 می‌باشد. ناحیه 3 از اسیدآمینه 303 تا 382 تشکیل شده و ناحیه 2 و 3 در تشکیل جایگاه فعال آنزیمی نقش دارند. ناحیه 4 که از اسیدآمینه 552 تا 770 امتداد دارد، بخش کاتالیتیک پروتئین بوده و محل برهمکنش با Zn^{2+} می‌باشد(10).

سیاه‌زخم در سه فرم پوستی، گوارشی و استنشاقی اتفاق می‌افتد. اگر بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود، عفونت با آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شود، اما علائم همیشه به موقع ظاهر نمی‌شوند تا درمان آنتی‌بیوتیکی موثر باشد. بنابراین واکسیناسیون برای حمایت اشخاصی که در معرض خطر هستند الزامی است(11). از این روتعدادی از آنتی‌ژن‌های *باسیلوس آنتراسیس* به منظور بررسی توانایی‌شان برای القای ایمنی حمایتی علیه بیماری، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از شناخته شده‌ترین این آنتی‌ژن‌ها می‌توان کپسول، لایه S، پلی‌ساکاریدهای سطحی و پروتئین‌های دیگر را نام برد. تنها پروتئین‌هایی که با یکدیگر توکسین سیاه‌زخم را می‌سازند، باعث تولید آنتی‌بادی‌های قابل شناسایی می‌شوند(12، 13). بیشتر واکسن‌های موجود بر پایه کار بر روی PA می‌باشند. در حال حاضر واکسن سیاه‌زخم مجوز گرفته در انگلستان از کشت سویه sterne *باسیلوس آنتراسیس* فیلتر شده در رسوب آلوم (alum) رشد یافته است و در نتیجه دارای حداکثر پروتئین PA تولیدی می‌باشد (Anthrax vaccine precipitated-AVP). و واکسنی که در ایالات متحده آمریکا اجازه استفاده گرفت (Anthraxvaccine adsorbed-AVA) است. مشکل اصلی این واکسن‌ها برنامه طولانی واکسیناسیون (6 واکسیناسیون طی 18 ماه) از یک طرف و ایجاد طیف

محدود ایمنی است. بنابراین تلاش برای دستیابی به واکسنی کارآمد که بتواند به‌طور وسیع الطیف در برابر باکتری، اسپور و سم *باسیلوس آنتراسیس* حفاظت ایجاد کند هم‌چنان در حال انجام است(14).

مطالعات نشان می‌دهد که علاوه بر تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده سم که نقش مهمی در ایجاد ایمنی در موجود دارد، سلول‌های $TCD4^+$ هم نقش کلیدی در تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده، تغییر کلاس و بلوغ لنفوسیتی دارند. در آزمایشی بر روی چهار داوطلب که از قبل با واکسن AVP ایمن شده بودند، مشخص شد که در واکسن AVP به مقدار 75 درصد از PA و 25 درصد از LF استفاده شده است. در حالی که میزان پاسخ اختصاصی سلول‌های T به LF به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از پاسخ اختصاصی سلول‌های T به PA می‌باشد (18 برابر) که نشان دهنده توان بالای LF در بالا بردن پاسخ سلول‌های T است(15). از طرفی طی آزمایشی مشخص شد که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده علیه LF بعد از برهمکنش با LF بیشترین برهمکنش را با LFD1 دارد که نشان دهنده اهمیت این ناحیه می‌باشد(16). هم‌چنین طی مطالعه‌ای مشخص شد که تعداد اپی‌توپ‌های LFD1 تقریباً دو برابر هر کدام از ناحیه‌های دیگر است و بیشترین تأثیر در تولید آنتی‌بادی را LFD1 دارد(17). از آنجایی که LF یک متالوپروتئاز بوده و موجب مرگ سلولی می‌شود کار بر روی کل آن ممکن است خطرناک باشد. هم‌چنین دست‌ورزی ژنتیکی LFD1 که توالی کوتاه‌تری از کل توالی LF دارد راحت‌تر می‌باشد(18). در آزمایشی از *سالمونلا انتریکا* برای بیان PA همراه یک پپتید نشانه استفاده گردید. از آنجایی که این باکتری جزو فلور روده می‌باشد، پس از بیان PA به واسطه وجود پپتید نشانه PA را به خارج از باکتری ترشح می‌کند و PA وارد گردش خون می‌شود. اگر به جای PA در این سیستم بیانی از LF استفاده شود، با توجه به کشندگی بالای LF و استفاده از *سالمونلا انتریکا*شناسایی عامل بیماری و مقابله با آن مشکل می‌باشد(19). در آزمایشی امکان ورود LF به درون سیتوزول به طور مستقل از PA بررسی شد. به منظور پی‌گیری، از امتزاج LF به پروتئین فلورسانس سبز (GFP) استفاده شد و مشخص گردید که LF به تنهایی توانایی ورود به سیتوزول را دارد(20). بنابراین در دسترس بودن آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه LFD1 امری ضروری می‌باشد و به واسطه وجود نیمی از کل اپی‌توپ‌های LF در این ناحیه، می‌توان از آن در شناسایی سریع چنین مواردی بهره گرفت. لذا در این تحقیق ناحیه 1 عامل کشنده *باسیلوس آنتراسیس* انتخاب شد و پس از بیان، تخلیص گردید و نهایتاً به موش‌های سوری تزریق و آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آن تولید گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، توالی کامل ژن *lef* باکتری *باسیلوس آنتراسیس* از بانک ژن (NBCI با شماره بازیابی M29081) استخراج و به کمک نرم افزارهای primer3 و Oligo و DNASIS پرایمرها طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد. پرایمر بالا دست دارای جایگاه شناسایی آنزیم با اثر محدود *Bam*H I و پرایمر پایین‌دست دارای جایگاه شناسایی آنزیم با اثر محدود *Xho* I است که به وسیله نرم‌افزار تحت شبکه BIOLABS_NEB-cutter تعیین شدند.

توالی پرایمر رفت با جایگاه شناسایی آنزیم با اثر محدود *Bam*H I:

5'-TACGCGGATCCGGCGGTCATGGTGATGTAG-3'

توالی پرایمر برگشت با جایگاه شناسایی آنزیم با اثر محدود*Xho*I:

5'-CGCGCTCGAGATTATCTAGATAGATTTATTTCTTGTTCGTTAAAT-3'

باکتری *باسیلوس آنتراسیس*سویه V770-NP1-R (فاقد پلاسمید pXO2 بوده ولی پلاسمید pXO1 را دارد) به صورت غیرفعال شده در فرمالیناز بخش هوازی موسسه رازی تهیه شد. پلاسمید باکتری با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از اسپکتروفتومتری تعیین غلظت گردید و به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر ژن LFD1 ابتدا با 0/125

میکرولیتر آنزیم *Taq*پلی‌مراز(سیناژن)، غلظت 2 میلی‌مولار $MgCl_2$، 0/4 پیکومول از هر پرایمر، 0/4 میلی‌مولار dNTPs ودر دمای اتصال 61 درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی شد. به منظور جلوگیری از جهش‌های ناخواسته تکثیر نهایی ژن با استفاده از آنزیم *Pfu* پلی‌مراز (شرکت فرمنتاز) در حجم 25 میکرولیتر صورت گرفت. هر واکنش PCR شامل 0/4 پیکومول از هر پرایمر، 0/4 میلی‌مولار dNTPs، 0/25 واحد آنزیم DNA پلی‌مراز *Pfu*، 2/5 میکرولیتر بافر 10XPCR و $MgSO_4$ با غلظت نهایی 2/5میلی‌مولار و 50 نانوگرم از پلاسمیدهای استخراج شده *باسیلوس آنتراسیس* بود. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای 61 درجه سانتی‌گراد به مدت 50 ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 70 ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه بود(21).

محصول PCR به کمک مارکر اسید نوکلئیک (#SM0313)روی ژل آگارز بررسی شد. سپس روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین با غلظت 1 درصد (سیناژن) منتقل و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل آگارز(شرکت فرمنتاز)، محصول PCR از ژل آگارز با دمای ذوب پایین استخراج گردید. قطعه هدف توسط آنزیم‌های با اثر محدود *Bam*H I و *Xho* I برش خورده و به وکتور بیانی (شرکت کیاژن)pET28a(+)که با همین آنزیم‌ها برش خورده و استخراج شده بود، الحاق گردید. واکنش الحاق به مدت 70 دقیقه در دمای 22 درجه سانتی‌گراد توسط آنزیم *T4DNA لیگاز* (شرکت فرمنتاز) صورت گرفت. وکتورهای نوترکیب حاصل با مکانیسم شوک حرارتی به سلول‌های مستعد (تهیه شده به روش شیمیایی) باکتری اشرشیا کلی (E.coli) سویه BL21(DE3)PLysS(stratagen) تراریخت شدند.

به منظور بیان ژن مورد نظر، از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان 100 میکرولیتر به 5 میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین با غلظت 50 میکروگرم در میلی‌لیتر تلقیح و پس از رسیدن OD به 0/6 در طول موج 600 نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموترایزوپروپیل-β-D-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) (شرکت فرمنتاز) با غلظت نهایی 1 میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت 5 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد(21).

نمونه‌ها قبل و بعد از القای IPTG همراه با مارکر پروتئینی(#PR0602-S)(Vivantis) تحت شرایط دناتوره، به وسیله الکتروفورز SDS-PAGE بررسی شدند. غلظت ژل 12 درصد با جریان ثابت 25 میلی‌آمپر بود(21).

به منظور تخلیص پروتئین نوترکیب تحت شرایط دناتوره، کلون جداسازی شده را در حجم بالا کشت داده و پس از القای بیان با شرایط فوق الذکر، سلول‌ها رسوب داده شد. پس از شکستن سلول‌ها با سونیکاسیون و رسوب اجزای سلولی، محلول رویی که حاوی پروتئین مورد نظر بود، جدا گردید. برای جداسازی پروتئین مورد نظر که دارای دنباله His-tag است ازستونکروماتوگرافی نیکل (Ni-NTA) استفاده شد(21، 22).

برای تایید پروتئین نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد. پروتئین تخلیص شده با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین 192 میلی‌مولار، تریس 25 میلی‌مولار، SDS 0/1 درصد و متانول 20 درصد و pH: 8/3) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl 37 میلی‌مولار، 2/7KCl میلی‌مولار، Na2HPO4.7H2O 4/3 میلی‌مولار، توین20 درصد وpH: 7/2)حاوی 5 درصد شیر خشک به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست و شو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت 1/10000 آنتی بادی‌ضد His-tag(Ebcam) کونژوگه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شست شو با بافر PBST، برای آشکار سازی از سوبسترا (بافر تریس50 میلی‌مولار و pH:7/8 حاوی 6 میلی‌گرم DAB، 10 میکرولیتر H_2O_2) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین

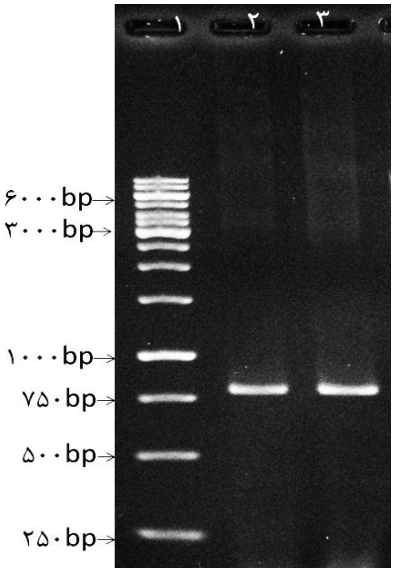
کونژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولزی، واکنش با استفاده از H_2O متوقف گردید(21، 22).

به منظور تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال، از 10 موش سوری به عنوان تست و 5 موش سوری به عنوان شاهد استفاده شد. برای تزریق اول برای هر سر موش،20 میکروگرم پروتئین تخلیص شده را با 30 میکرولیتر از PBS استریل و 50 میکرولیتر ادجوانت کامل فروند (حجم نهایی100میکرولیتر برای هر موش) با هم مخلوط و به طور کامل همگن گردید. در تزریق‌های بعدی از ادجوانت ناقص فروند استفاده شد و با فاصله زمانی 14 روز 15، 10 و 5 میکروگرم پروتئین تخلیص شده را به ترتیب فوق الذکر آماده و به صورت زیر جلدی به موش‌ها تزریق گردید. در کنار هر مرحله تزریق به حیوانات تست، به موش‌های کنترل فقط مخلوط ادجوانت و PBS استریل همگن شده تزریق گردید.

به منظور اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی تولید شده از تکنیک الایزا استفاده شد. هر یک از چاهک‌های الایزا با 2 میکروگرم از پروتئین نوترکیب در 100میکرولیتر بافر کوتینگ پوشیده شد و پلیت به مدت یک شب در دمای 4 درجه سانتی‌گراد گرما دهی شد. سپس چاهک‌ها با استفاده از PBST سه بار شستشو داده شد و خشک گردید (شستشو و خشک کردن چاهک‌ها پس از هر مرحله انجام می‌شود). برای مسدود سازی از ژلاتین 3 درصد استفاده شد و به مدت 1 ساعت در شیکر انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شد. سرم موش با رقت 1/100 به چاهک اول هر ستون اضافه و سریال رقت انجام شد و پلیت به مدت 30 دقیقه در شیکر انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس کونژوگه موشی(AP8036, RAY BioTech) با رقت 1/10000 به چاهک‌ها اضافه و 30 دقیقه در شیکر انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شد. در مرحله آخر محلول سوبسترا (حاوی بافر سیترات-فسفات، OPD و H_2O_2) به چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت واکنش با H_2SO_4 (25 درصد حجمی)متوقف گردید. با استفاده از دستگاه الایزا ریدر و در طول موج 495 نانومتر OD چاهک‌ها خوانده شد(21، 23).

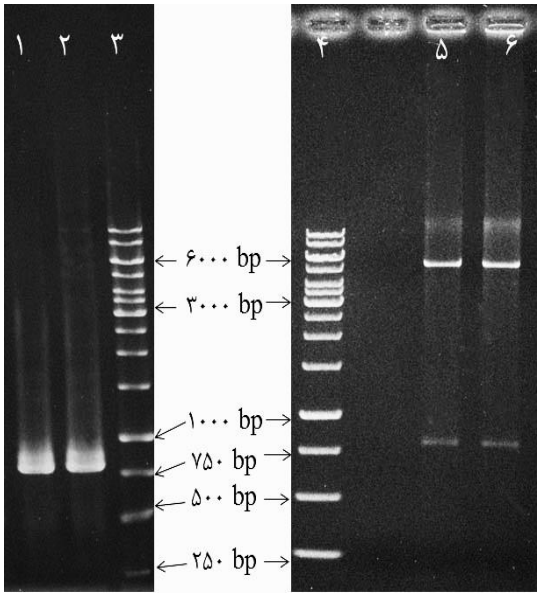
یافته‌ها

پس از جداسازی پلاسمید pXO1 از آن برای تکثیر ناحیه 1 ژن LF به روش PCR استفاده گردید. محصول روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و همان‌طور که در شکل 1 مشاهده می‌شود قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف هم‌خوانی داشت(771 جفت باز).



شکل1. PCR روی پلاسمید pXO1 و تکثیر ژن LFD1
ستون1: مارکر اسید نوکلئیک، ستون 2 و 3: محصول PCR (771bp)

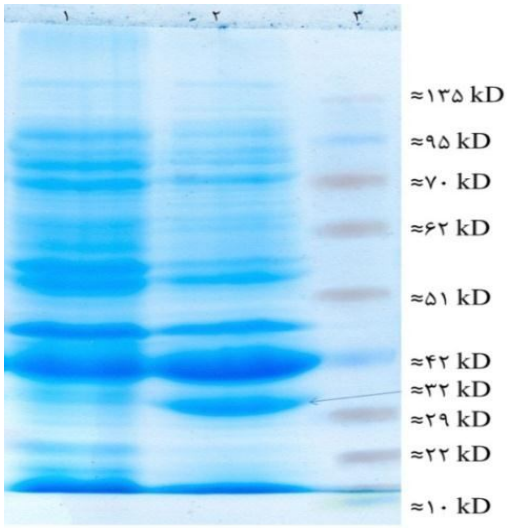
به منظور تأیید همسانه‌سازی ژن در وکتور بیانی(pET28a(+، پس از تخلیص پلاسمیدها و بررسی آنها روی ژل آگارز، برای تأیید همسانه‌سازی ژن علاوه بر توالی‌یابی، از واکنش PCR و برش آنزیمی *Bam*H I و *Xho*I استفاده گردید. سپس به کمک مارکر اسید نوکلئیک، اندازه قطعه خارج شده از وکتور (771 جفت باز) تأیید شد(شکل 2).



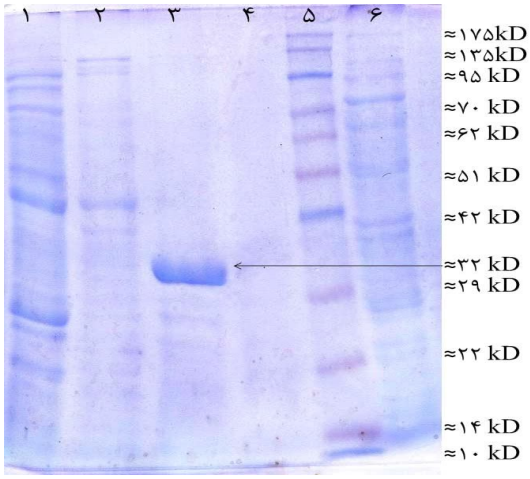
شکل2. تأیید همسانه‌سازی ژن هدف در وکتور بیانی pET28a(+)
ستون 1 و 2: محصول PCR روی وکتور pET28a(+) (771bp)، ستون 3 و4: مارکر اسید نوکلئیک، ستون 5 و 6: هضم آنزیمی با اثر محدود روی وکتور pET28a(+) و برش ژن (771bp)

در مرحله بعد پس از کشت باکتری‌ها و القاء با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت. پس از شکست باکتری‌ها، سوسپانسیون حاصله روی ژل SDS-PAGE برده شد و به کمک مارکر پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب ≈32kD از ژل 12 درصد استفاده شد. نتایج در شکل 3 نشان داد که پروتئین مورد نظر در نمونه القا شده بیان شده ولی در نمونه شاهد بیان نشده است.

مراحل تخلیص پروتئین نوترکیب تحت شرایط دناتوره طبق پروتکل استاندارد انجام گرفت. مقدار 25 میکرولیتر از محصول هر مرحله برداشته و برای الکتروفورز SDS-PAGE روی ژل 12 درصد استفاده گردید. همان طور که در شکل 4 مشخص است پروتئین مورد نظر به وسیله بافر E با pH= 4/5 از ستون جدا شد.

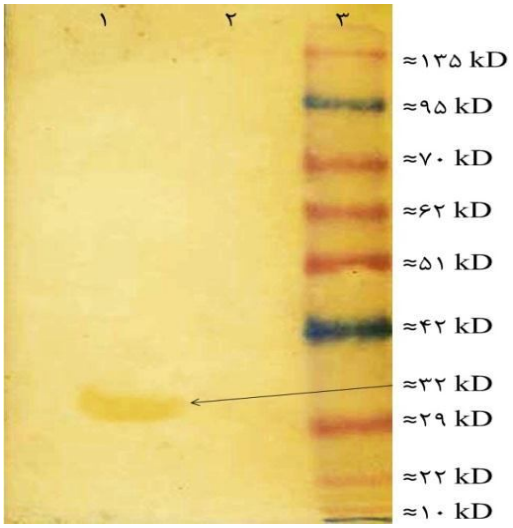


شکل3. بیان ژن LFD1 و بررسی آن با الکتروفورز SDS-PAGE
ستون 1: نمونه شاهد القا نشده، ستون 2: نمونه القا شده با IPTG و پروتئین 32kD، ستون 3: مارکر پروتئین



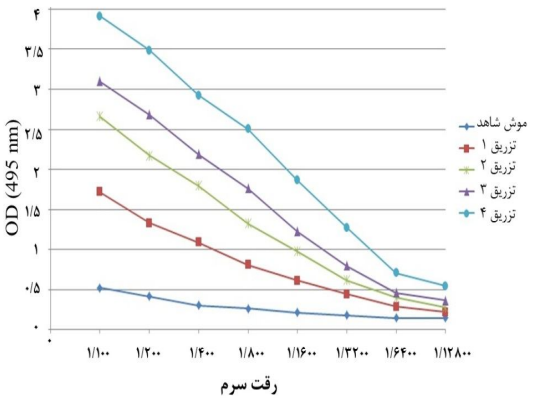
شکل4. تخلیص پروتئین از ستونNi-NTA
ستون1: بافر C جمع‌آوری شده، ستون2: بافر D جمع‌آوری شده، ستون3: بافر E جمع‌آوری شده، ستون 4: بافر MES جمع‌آوری شده، ستون5: مارکر پروتئین، ستون6: نمونه حاوی پروتئین جمع‌آوری شده از ستون (Flow)

به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد. در شکل 5 در ستون تست که مربوط به نمونهٔ القا شده با IPTG است یک باند در نزدیکی32kD مشاهده می‌شود که در ستون شاهدکه تحت القای IPTG نبوده مشاهده نمی‌شود.



شکل5. تایید پروتئین حاصل با وستر بلات.
ستون 1: نمونهٔ القا شده با IPTG و وجود باند در ناحیه 32kD، ستون 2: نمونه شاهدکه تحت القای IPTG نبوده و عدم وجود باند، ستون 3: مارکر پروتئینی

برای تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب در سرم موش روش الایزا مورد استفاده قرار گرفت. با بررسی نمودار 1، نتایج حاصل از آزمایش الایزا با پروتئین نوترکیب نشان می‌دهد که پس از هر مرحله از تزریق افزایش تیتر آنتی‌بادی در مقایسه با کنترل قابل توجه می‌باشد. بالاترین OD به دست آمده از تست در مقایسه با کنترل تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد، این نتیجه بیانگر آن است که پروتئین تولید شده قدرت تولید آنتی‌بادی به میزان لازم را دارد و در نتیجه انتظار ایمنی‌زایی آن متصور است.



نمودار 1. تعیین تیتر آنتی‌بادی تولید شده با استفاده از تکنیک الایزا

بحث

در این مطالعه تجربی ژن LFD1 در باکتری *E. coli*-BL21(DE3)PlysS بیان گردید و پروتئین آن با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی استخراج گردید. امروزه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از روش‌های بیوتکنولوژی استفاده می‌شود. اشرشیاکلی به عنوان میزبانی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب هم در تحقیقات و هم در صنعت به طور گسترده استفاده می‌شود. در این تحقیق نیز برای تولید LFD1 نوترکیب از سویه BL21 به عنوان میزبان استفاده شد که فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی از جمله DegP، OmpT، Lon و HtpR می‌باشد. بنابراین بیان مناسب LFD1 در این میزبان به دلیل عدم حضور این پروتئازها می‌باشد(18). نتایج به دست آمده در این تحقیق مانند بیان بالا و استخراج آسان پروتئین نشان دهنده مناسب بودن روش‌های مورد استفاده می‌باشد.

به منظور تعیین ایمونوژنیسیته LFD1 و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آن، این پروتئین به موش‌های سوری تزریق شده است. مطالعات اخیر به منظور تهیه واکسن سیاه‌زخم نشان دهنده اهمیت LF و ضرورت استفاده از آن در طراحی این واکسن می‌باشد.

در سال 2000 مطالعات پارک که در آن LF وحشی و LF غیرفعال (LF- E687C) در شاتل وکتور *E. coli-Bacillus* وارد و بیان شدند. این LF های تولید شده به منظور مطالعات کریستالوگرافی استفاده گردیدند(24). در سال 2001 مطالعات پرایس نشان دهنده اهمیت LF در طراحی واکسن بود که در آن ژن LF را در وکتور بیانی یوکاریوتی pCI وارد کردند. بعد از پوشاندن پلاسمیدها روی نانو ذرات طلا، به موش تزریق و مشخص شد که این نانوذرات قادر به ایجاد ایمنی در موش در برابر سم سیاه‌زخم می‌باشد(25). در سال 2007 مطالعات جسیکا نشان داد که پروتئین ممزوجی Lichenase -LFD1 تیتر آنتی‌بادی بالایی تولید می‌کند که این آنتی‌بادی‌ها قدرت خنثی سازی سم سیاه‌زخم در شرایط آزمایشگاهی را دارند(12). در سال 2010 آقای بائیلی تمامی دومین‌های LF را به صورت مجزا

کلون و بیان نمود و خواص ایمنی‌زایی آنها را بررسی نمود که فقط LFD1 توان ایجاد ایمنی‌زایی را داشت(10).

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان دهنده توان بالای LFD1 در تحریک سیستم ایمنی و ایمونوژنیسیته بالای آن می‌باشد. با توجه به این که تاکنون در کشور واکسنی برای سیاه‌زخم تولید نشده است در مطالعات آینده در این زمینه می‌توان از LFD1 استفاده نمود. از طرفی عامل اصلی در کشندگی سیاه‌زخم LF می‌باشد و بروز علائم بیماری و مرگ نیاز به عملکرد این آنتی‌ژن دارد. مطالعات کاشنر نشان می‌دهد که LF به تنهایی قدرت ورود به سیتوزول را دارد و مطالعات گارموری نشان دهنده امکان بیان ژن LF در باکتری‌های فلور روده انسان و حیوانات وجود دارد(19، 20). لذا برای شناسایی سریع بیماری استفاده از LF ضروری می‌باشد و در این تحقیق آنتی‌بادی علیه LFD1 تولید شده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به بیان مناسب و تخلیص کم هزینه آنتی‌ژن LFD1 استفاده از این آنتی‌ژن برای این مطالعه مناسب می‌باشد. تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه LFD1 نشان دهنده ایمونوژنیسیته بالای آن بوده و می‌توان از این آنتی‌بادی در شناسایی سریع سیاه‌زخم استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه آقای مهدی رضائی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی می‌باشد. لذا از گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع) که حامی این تحقیق بودند کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Brey RN. Molecular basis for improved anthrax vaccines. Advanced drug delivery reviews. 2005;57(9):1266-92.
2. Knight J. Bioweapons: Delivering death in the mail. Nature. 2001;414(6866):837-8.
3. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (lef) from Bacillus anthracis. Gene. 1989; 81(1): 45-54.
4. Okinaka R, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster A, Hill K, Keim P, et al. Sequence, assembly and analysis of pX01 and pX02. Journal of applied microbiology. 2001; 87(2): 261-2.
5. Ezzell JW, Ivins BE, Leppla SH. Immunoelectrophoretic analysis, toxicity, and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of Bacillus anthracis toxin. Infection and immunity. 1984; 45(3): 761-7.
6. Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renatus M, Petosa C, Bienkowska J, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. Nature. 2001; 414(6860):229-33.
7. Elliott JL, Mogridge J, Collier RJ. A quantitative study of the interactions of Bacillus anthracis edema factor and lethal factor with activated protective antigen. Biochemistry. 2000; 39(22):6706-13.
8. Abrami L, Liu S, Cosson P, Leppla SH, Van Der Goot FG. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. Science Signalling. 2003;160(3):321-8.
9. Guidi-Rontani C, Weber-Levy M, Mock M, Cabiaux V. Translocation of Bacillus anthracis lethal and oedema factors across endosome membranes. Cellular microbiology. 2001; 2(3): 259-64.
10. Baillie LW, Huwar TB, Moore S, Mellado-Sanchez G, Rodriguez L, Neeson BN, et al. An anthrax subunit vaccine candidate based on protective regions of Bacillus anthracis protective antigen and lethal factor. Vaccine. 2010; 28(41): 6740-8.
11. Henderson DA, Inglesby TV, O'Toole T, Bartlett JG, Borio L. Management of anthrax. Clinical infectious diseases. 2002;35(7):851-8.
12. 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(16):3111-4.
13. Flick-Smith HC, Walker NJ, Gibson P, Bullifent H, Hayward S, Miller J, et al. A

recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of Bacillus anthracis protects mice against anthrax infection. Infection and immunity. 2002;70(3):1653-6.
14. Hepburn MJ, Hugh Dyson E, Simpson AJH, Brenneman KE, Bailey N, Wilkinson L, et al. Immune response to two different dosing schedules of the anthrax vaccine precipitated (AVP) vaccine. Vaccine. 2007;25(32):6089-97.
15. Baillie L, Townend T, Walker N, Eriksson U, Williamson D. Characterization of the human immune response to the UK anthrax vaccine. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2006;42(2):267-70.
16. Albrecht MT, Li H, Williamson ED, LeButt CS, Flick-Smith 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. Infection and immunity. 2007;75(11):5425-33.
17. 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. Infection and immunity. 2009;77(1):162-9.
18. Kamani M. The expression of recombinant streptodornase in E. coli bacteria. Arak Medical University Journal. 2011;14(1):96-113.[Persian]
19. Garmory HS, Titball RW, Griffin KF, Hahn U, Böhm R, Beyer W. Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the Bacillus anthracis protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. Infection and immunity. 2003;71(7):3831-6.
20. Kushner N, Zhang D, Touzjian N, Essex M, Lieberman J, Lu Y. A fragment of anthrax lethal factor delivers proteins to the cytosol without requiring protective antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003; 100(11):6652-7.
21. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual: CSHL press; 2001.
22. Molaee N. Improvement of recombinant streptokinase production in E. coli. Arak Medical University Journal. 2011;14(4):97-103.[persian]
23. Abtahi H, Salmanian AH, Rafati S, Mossayebi G, Amouzande AR. Evaluation of the immunogenicity of Brucella abortus P39 gene in Balb/c mice. Arak Medical University Journal. 2012;14(7):1-8.[persian]
24. Park S, Leppla SH. Optimized Production and Purification of Bacillus anthracis Lethal Factor. Protein expression and purification. 2000;18(3):293-302.
25. Price BM, Liner AL, Park S, Leppla SH, Mateczun A, Galloway DR. Protection against anthrax lethal toxin challenge by genetic immunization with a plasmid encoding the lethal factor protein. Infection and immunity. 2001; 69(7):4509-15.