

Cloning, fusion and expression of *ctB* and N-terminal *ipaD* gene cassette in *E. coli*

Honari H^{1*}, Ghofrani M², saadati M³, Minaei ME¹

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

Received: 27 Oct 2013, Accepted: 5 Feb 2014

Abstract

Background: Having no effective vaccine, *Shigella dysenteriae* is of the main causes of diarrhea. IpaD protein is of the most important factors in high virulence of pathogenic shigella. Cloning of N-terminal *ipaD* genes along with *ctB* genes that possess adjuvant and carrier roles, as a recombinant vaccine, can enhance mucosal immune response.

Materials and Methods: In an experimental study, primers of *ctB* and *ipaD* genes were designed based on gene cassette construction. PCR reactions were performed to propagate the fragments. Propagated fragments, then, were cloned into pGEM-Teasy vectors. Both vectors, then, were cut by restriction enzymes of *HindIII* and *XhoI*, and finally *ipaD* and *ctB* were fused together. In the next step, the *ctB-ipaD* gene cassette and expression vector of pET28a (+) were cut by *Sall* and *HindIII* restriction enzymes. Then, *ctB-ipaD* cassette was expressed in the expression vector.

Results: In pre-study, the N terminal of *ipaD* as a vaccine candidate antigen was genetically linked to the C terminal of *ctB* which possesses carrier and adjuvant potency. Fusion of *ctB-ipaD* in the expression vector pET28a (+) was confirmed by PCR and restriction enzymes digestion. The recombinant proteins produced then was confirmed by SDS-PAGE and Western blot.

Conclusion: According to previous studies, production of *ctB-ipaD* cassette and its expression was the aim of this study. In hope for a vaccine against *Shigella*, protein expression of this gene cassette and production of an appropriate should be followed in future studies.

Keywords: Adjuvant, Cloning, *ctB* gene, Fusion gene, *ipaD* gene, Shigellosis.

*Corresponding author:

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
Email: Honari.hosein@gmail.com

همسانه سازی، امتزاج و بررسی بیان کاست ژنی *ctB* و *N* ترمینال *ipaD* در باکتری اشرشیاکلی

حسین هنری^{1*}، مهدی غفرانی ایوری²، مجتبی سعادتی³، محمد ابراهیم مینایی⁴

1. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
2. کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
3. استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
4. دانشجوی دکتری نانویوتکنولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/8/5 تاریخ پذیرش: 92/11/16

چکیده

زمینه و هدف: شیگلا دیسانتری یکی از عوامل اصلی بیماری اسهال در انسان بوده که واکنشی علیه آن وجود ندارد. یکی از مهم ترین فاکتورهای بیماری زای موجود در شیگلا، پروتئین IpaD است. همسانه سازی *N* ترمینال ژن *ipaD* به همراه ژن *ctB* که دارای نقش ادجوانتی و حاملی می باشد به شکل یک واکسن نو ترکیب می تواند سبب تقویت پاسخ ایمنی مخاطی شود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، طراحی پرایمر برای ژن های *ipaD* و *ctB* بر مبنای طراحی انجام شده به منظور ساخت کاست ژنی، صورت گرفت. واکنش PCR برای تکثیر این قطعات انجام و هر یک از قطعات تکثیر شده درون وکتور pGEM-Teasy همسانه سازی شدند. هر دو وکتور توسط آنزیم های محدودالایتر *Xho I* و *Hind III* برش خورده و در نهایت ژن *ipaD* به ژن *ctB* ملحق گردید. در ادامه کاست ژنی *ctB-ipaD* و وکتور بیانی pET28a(+) توسط آنزیم های محدودالایتر *Sall* و *HindIII* برش خورده و کاست *ctB-ipaD* در وکتور بیانی زیر همسانه سازی و بررسی بیان کاست ژنی انجام گرفت.

یافته ها: در این تحقیق، *N* ترمینال ژن *ipaD* به عنوان یک آنتی ژن کاندید واکسن ژنی به ناحیه C ترمینال ژن *ctB* که دارای نقش ادجوانتی و حاملی می باشد، متصل گردید. ژن های ممزوجی *ctB-ipaD* در وکتور بیانی pET28a(+) توسط PCR و هضم به وسیله آنزیم های با اثر محدود تأیید شد. هم چنین پروتئین نو ترکیب تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه گذاری وسترن تأیید گردید.

نتیجه گیری: با توجه به مطالعات گذشته و مشابه، ایجاد کاست ژنی *ctB-ipaD* و بررسی بیان آن، هدف مورد انتظار این تحقیق بود. امید می رود با بیان پروتئین این کاست ژنی و در صورت تولید آنتی بادی مناسب بتوان به واکسن مناسب علیه شیگلا دست یافت.

واژگان کلیدی: ادجوانت، همسانه سازی، ژن *ctB*، فیوژن، ژن *ipaD*، شیگلوز.

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

Email: Honari.hosein@gmail.com

مقدمه

باعث افزایش در سطح تولید مولکول‌های کمک محرک و سبب تنظیم فعالیت برخی از سلول‌های سیستم ایمنی می‌گردد. به عنوان مثال با افزایش تولید مولکول‌های CD80 و CD86 باعث تنظیم سلول‌های دندرتیک (Dendritic cells-DC) می‌گردد (6). سبب افزایش تیترا آنتی بادی کلاس‌های IgA در لایه‌های مخاطی و IgG به صورت سیستمیک می‌شود (7). ایمنی مخاطی را با تولید آنتی بادی ترشحی SIgA افزایش می‌دهد (8).

تقویت پاسخ ایمنی مخاطی وابسته به ژن *ctB* را می‌توان با کلون کردن ژن مورد نظر به همراه ژن *ctB* به شکل یک واکسن نو ترکیب (8، 9) یا با اضافه کردن مستقیم پروتئین CTB به همراه آنتی ژن مورد نظر و تلقیح آن دو به سلول انجام داد. اگر CTB با آنتی ژن‌های هتروژن همراه باشد نقش تقویت کننده پاسخ ایمنی و اگر با آنتی ژن خودی همراه باشد نقش القاء کننده متحمل (Tolerance) را دارد (10).

پروتئین IpaD در نوک سوزن دستگاه ترشحی نوع سوم قرار می‌گیرد. IpaD برای تهاجم باکتری به سلول میزبان ضروری است. IpaD یک پروتئین چند کاره است که ترشح و عرضه پروتئین‌های IpaB و IpaC را در حد فاصل سلول میزبان-باکتری و هم چنین نفوذ صحیح ناقل‌های پروتئینی به داخل سلول میزبان را در کنترل خود دارد (11). IpaD یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای موجود در شیگلا می‌باشد که به عنوان یک آنتی ژن اصلی توسط سیستم ایمنی بدن انسان و میمون شناسایی شده است (12، 13). مشاهدات نشان می‌دهند که تنها، پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده در میزبان، علیه IpaD، VirG و لیپوبلی ساکارید می‌تواند خاصیت ویروان و تهاجم باکتری را خنثی کند (14).

ژن *ipaD* درون یک اپرون به نام Ipa (Invasion Plasmid Antigen) در ناحیه ورود (Entry Region) و روی پلاسمید بزرگ تهاجمی قرار دارد (15). این ژن در باکتری شیگلا دیسانتری شامل 999 نوکلئوتید می‌باشد. ناحیه N ترمینال پروتئین

باکتری شیگلا دیسانتری عمده‌ترین علت اپیدمی اسهال می‌باشد و تهیه واکسن علیه بیماری‌زایی این باکتری از اهداف محققین بسیاری است. سالانه بررسی‌هایی روی انواع مختلف کاندیدهای واکسن شیگلا و امکان استفاده از آنها به صورت خوراکی انجام می‌شود. محدودیت اصلی واکسن‌ها به فرم خوراکی، عدم ارسال صحیح و سالم آن به نواحی جذب گوارشی می‌باشد. مصرف خود این واکسن‌ها به دلیل دارا بودن وزن ملکولی بالا و عدم جذب آن از روده موانع زیادی در مصرف این نوع واکسن‌ها به شکل خوراکی ایجاد می‌کند که منجر به عدم تحویل واکسن آنتی ژنی به هدف مورد نظر و عدم تحریک سیستم ایمنی بدن می‌گردد. یکی از راه‌هایی که به رفع این موانع کمک می‌کند، استفاده از آنتی ژن‌هایی است که خاصیت ادجوانتی و تحویل دهنده‌گی به سلول‌های مورد نظر را دارند (1، 2). به منظور تقویت اثر واکسن‌های خوراکی دانشمندان توجه خاصی به ادجوانت (Adjuvant) دارند. گروهی از توکسین‌های دو زیر واحدی با منشأ باکتریایی یا گیاهی مورد توجه واقع شده‌اند. البته این توکسین‌ها در اکثر موارد به عنوان انتقال دهنده به کار می‌روند به همین منظور به ژن‌های مولد آن‌ها انتقال دهنده (Deliver gene) می‌گویند که از مهم‌ترین این ادجوانت‌ها CTB، بخش اتصال دهنده سم ویبریولکرا می‌باشد. پروتئین CTB دارای ساختاری هموپنتامریک و غیر سمی است (3، 4). هر زیر واحد آن از 124 اسید آمینه تشکیل شده است. ژن *ctB* بر روی کروموزوم بزرگ باکتری ویبریولکرا قرار گرفته است. پروتئین CTB به عنوان ایمونوآدجوانت یا یاور عمل می‌کند و این عمل را به روش‌های متفاوتی انجام می‌دهد، از جمله با افزایش حلالیت آنتی ژن‌های همراه شده با CTB باعث افزایش پاسخ ایمنی می‌شود (5)، سبب افزایش تولید برخی از سایتوکاین‌ها مثل اینترفرون گاما (γ -Interferon) و IFN γ ، اینترلوکین دو (IL-2-Interleukin2) و IL6 می‌شود، باعث تقویت ایمنی سلولی مانند ایمنی سلولی وابسته به سلول‌های CD8 و سلول‌های TH1 می‌گردد (6)،

توسط تکنیک الایزا (ELISA) مورد ارزیابی قرار گرفت. سنتز مونومرهای CTB-LF و تجمع آنها به شکلی که از لحاظ بیولوژیکی فعال هستند (پنتامریک) در بافت‌های خوراکی سیب زمینی قابلیت استفاده از گیاهان را برای تولید و تحویل ادجوانت‌های همراه شده با فاکتور کشنده (LF) توکسین برای تحریک پاسخ‌های ایمنی مخاطی علیه آنتراکس نشان می‌دهد (21).

ساخت کاست ژنی *ctB-insulin* برای بررسی کنترل بیماری دیابت نوع 1 استفاده شده است. تاکنون تحقیقات زیادی برای تولید انسولین خوراکی انجام گرفته است. هدف از انجام این پژوهش‌ها بررسی روی عملکرد CTB و انتقال انسولین به سلول‌ها توسط روش‌های غیر تهاجمی و از روش خوراکی بوده است تا بتوان دیابت را از طریق تولید انسولین خوراکی کنترل نمود (16).

بهترین ایده برای طراحی واکسن علیه شیگلا به کارگیری فاکتورهایی است که پاسخ تولید شده علیه آن‌ها در مرحله اول، مانع ورود باکتری به درون سلول‌های اپیتلیال شود. با توجه به اهمیت ناحیه N ترمینال IpaD در ورود باکتری به سلول‌های میزبان، این ناحیه به عنوان کاندید واکسن مورد توجه محققین می‌باشد. توسعه تولید واکسن‌های مخاطی جدید بر پایه آنتی ژن‌های حفاظتی خالص شده برای مدت زیادی است که به علت ایمنی زایی پایین آنتی ژن‌های محلول و نبودن ادجوانت مخاطی موثر و ایمن، دچار اختلال گردیده است. نتایج تحقیقات انجام شده نقش حاملی و ادجوانتی CTB را اثبات کرده‌اند. از این رو، در این تحقیق به منظور رفع محدودیت واکسن‌های خوراکی و ضرورت استفاده از ادجوانت در تولید این نوع واکسن‌ها، این استدلال وجود دارد که با اتصال ژن *ctB* با ناحیه N ترمینال *ipaD* می‌توان به توسعه و تولید کاندید واکسن مناسبی علیه شیگلوز دسترسی پیدا کرد.

IpaD یک فاکتور لازم در ورود باکتری شیگلا به سلول‌های میزبان است. IpaD توسط ناحیه گلوبولار N- ترمینال خود در راس سوزن اتصالی با محیط اطراف باکتری در تعامل است. تحقیقات نشان دادند که پلی پپتید IpaD می‌تواند منجر به تولید آنتی‌بادی Anti-IpaD گردد و آنتی‌بادی ضد IpaD با تداخل در عملکرد IpaD که در راس سوزن اتصالی قرار گرفته است آن را بلوکه کرده و بدین ترتیب مانع انجام عملکرد IpaD می‌گردد و در نتیجه ورود باکتری به سلول‌های میزبان سرکوب می‌شود (16).

با بررسی انواع لینکرهای گزارش شده، از لینکر فورینی استفاده شد تا در سطح سلول‌های ایمنی برش بخورد و IpaD بتواند ساختار مناسب خود را به دست آورد. استفاده از لینکر فورینی به علت توانایی این لینکر در جداسازی موتیف‌های مختلف فیوژن پروتئین در سطح سلول‌های دارای گیرنده Gb3 به شکل مناسبی به سلول‌های ایمنی عرضه می‌شوند. این لینکر توالی غنی از آرژنین می‌باشد.

از اتصال ایمونوژن‌ها به C ترمینال CTB گزارشات فراوانی در دست است. اتصال قطعه pertussis toxin (PT) S1 به انتهای C ترمینال CTB ایمنی خوبی برای سیاه سرفه ایجاد نمود (17). پروتئین SREHP را از انتامبا هیستولیتیکا (*Entamoeba histolytica*) عامل اسهال آمیبی به C ترمینال CTB متصل نمودند و کاندید واکسن مناسبی برای آن تولید شد (18). در سال 2007 با اتصال VP1 به C ترمینال CTB بیان بالایی در گیاه سولانوم (*Solanum*) را مشاهده کردند و ایمنی زایی مناسبی نسبت به ویروس بیماری پا و دهان (mouth disease virus –FMDV) به دست آوردند (19). فیوژن CTB همراه با HspA انجام گردید که منتج به ایمنی زایی بالایی نسبت به باکتری هلیکوباکتر پیلوری گردید (20). فاکتور کشنده (LF) توکسین دارای نقش بارزی در ایجاد بیماری سیاه زخم دارد. کاست ژنی *ctB-LF* به گیاه سیب زمینی منتقل گردید. اتصال فیوژن پروتئین به گیرنده‌های سطح غشا سلول‌های اپی تلیال روده

مواد و روش‌ها

طراحی پرایمر برای ژن‌های *ipaD* و *ctB*

در این مطالعه تجربی، ترادف ژنی *ipaD* و *ctB* از بانک ژن استخراج و طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزارهای Oligo و DNAsise انجام گرفت و توسط

شرکت سیناژن سنتز گردید. ژن *ctB* در پرایمر رفت جایگاه برشی *Sal I* و در پرایمر برگشت جایگاه برشی *Xho* و *I* و *Hind III* را دارا بود.

5'GTCGACACTCCGCAAAATATTACTGAT3'	توالی پرایمر رفت <i>ctB</i> :
5'CAAGCTTttattaCTCGAGTTTAACGTTGAATTTT3'	توالی پرایمر برگشت <i>ctB</i> :
5'CTCGAGAGAACAACAATCAGGCA3'	توالی پرایمر رفت <i>ipaD</i> :
5'TAAGCTTTTAAGTATATGAACTAACG3'	توالی پرایمر برگشت <i>ipaD</i> :

تکثیر ژن‌ها با روش PCR

باکتری‌های اشرشیاکلی که قبلاً ژن *ipaD* و *ctB* در آن همسازیه سازی شده بود تهیه و پلاسمید آن به روش لیز قلیایی استخراج گردید و به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR به منظور تکثیر DNA با آنزیم Taq پلیمرز سیناژن در حجم 25 میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل 3 میلی‌مولار منیزیم کلراید، 0/4 پیکومول از هر پرایمر، 50 نانوگرم DNA الگو، 0/2 میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدها و 2/5 میکرولیتر بافر 10x، در دمای اتصال 60 درجه سانتی‌گراد بهینه شد. برای جلوگیری از ایجاد جهش در توالی ژن‌ها واکنش نهایی PCR با استفاده از آنزیم pfu پلیمرز سیناژن در حجم 25 میکرولیتر انجام گرفت. واکنش PCR شامل 5 میلی‌مولار MgSO₄، 0/4 پیکومول از هر پرایمر، 50 نانوگرم از DNA الگو، 0/2 میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدها و 2/5 میلی‌لیتر از بافر 10x در دمای اتصال 60 درجه سانتی‌گراد بود.

همسازیه سازی محصول PCR در pGEM- Teasy vector

به منظور واکنش الحاق در وکتور pGEM- Teasy vector آدنیلایسون محصول PCR انجام شد. در این مرحله انتهای 3' از هر رشته از محصول PCR آدنیله و آماده واکنش الحاق با وکتور کلونینگ شد. اجزای واکنش الحاق شامل 3/2 میکرولیتر محصول PCR آدنیله شده، 5

میکرولیتر بافر 2x rapid ligase، 1 میکرولیتر وکتور pGEM- Teasy و 1 میکرولیتر آنزیم T4 لیگاز در حجم 10 میکرولیتر بود که به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تواریخت

سلول‌های مستعد *DH5α* براساس پروتکل استاندارد روش کلرید کلسیم تهیه شدند. پلاسمیدهای نو ترکیب با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد انتقال داده شد. سلول‌ها بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی سیلین (غلظت 80 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به صورت چمنی کشت داده شد.

غربالگری

برای تایید همسازیه سازی ژن مورد نظر از کلنی‌های سفید رنگ، کشت داده شد و از آنها با روش لیز قلیایی استخراج پلاسمید انجام شد. برای پلاسمیدها PCR مطابق شرایط تکثیر اولیه ژن انجام گرفت و سپس برای آنها واکنش هضم آنزیمی گذاشته شد.

اتصال ژن‌های *ctB* و *ipaD* و ساخت کاست ژنی

پس از تایید همسازیه سازی قطعات ژنی، ابتدا قطعه *ipaD* با دو آنزیم *XhoI* و *HindIII* از درون وکتور pGEM-*ipaD* خارج گردید. با استفاده از کیت تخلیص DNA (شرکت فرمنتاز) قطعه *ipaD* خالص سازی شد. در گام بعدی با استفاده از دو آنزیم *XhoI* و *HindIII* و وکتور

الکتروفورز SDS-PAGE

نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (#PR0602-S)(Vivantis) تحت شرایط دنا توره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل 12 درصد با جریان ثابت 25 میلی آمپر بود.

تایید پروتئین نو ترکیب

برای تایید پروتئین نو ترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی بادی ضد His-tag استفاده شد. پروتئین تخلیص شده با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (کلاسیک 192 میلی مولار، تریس 25 میلی مولار، SDS 0/1 درصد و متانول 20 درصد و pH: 8/3) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. کاغذ نیتروسولوز با استفاده از بافر PBST (کلرید سدیم 37 میلی مولار، کلرید پتاسیم 2/7 میلی مولار، $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 4/3 میلی مولار، توین 20 درصد و pH: 7/2) حاوی 5 درصد شیر خشک به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست شو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت 1/10000 آنتی بادی ضد His-tag (Ebcam) کانژوگه دار 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 تریس 50 میلی مولار و pH: 7/8 حاوی 6 میلی گرم DAB، $10H_2O_2$ میکرولیتر) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیتروسولوزی، واکنش با استفاده از H_2O متوقف گردید.

یافته‌ها**تکثیر و الحاق ژن *ctxB* در pGEM-T Easy****Vector و انتقال سازه به باکتری اشرشیا کلی**

نتایج حاصل از جداسازی و تکثیر ژن *ctxB* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در شکل 1 الف نشان داده شده است. قطعه 391 نوکلئوتیدی حاصل از انجام PCR با آنزیم *Pfu* پلیمرز بر روی ژل آگاروز تاییدی بر شناسایی و تکثیر قطعه مورد نظر می‌باشد. قطعه ژنی تکثیر شده به

pGEM-*ctxB* تحت برش قرار گرفت و یک قطعه 6 نوکلئوتیدی (دو کدون خاتمه رونویسی که در بین دو سایت برشی *XhoI* و *HindIII* قرار داشت) از آن خارج گردید. خالص سازی و حذف قطعه 6 نوکلئوتیدی با روش ترسیب (الکل - نمک) انجام گرفت. در مرحله بعد قطعه *ipaD* طی واکنش الحاق (واکنش 70 دقیقه در دمای 22 درجه سانتی گراد) با استفاده از T4 لیگاز به درون وکتور pGEM-*ctxB* وارد گردید و سپس محصول الحاق به درون سلول میزبان اشرشیا کلی با روش شوک حرارتی انتقال یافت. به منظور کاهش برهم کنش بین پروتئین‌های متصل شده، هر پروتئین از پروتئین مجاورش با استفاده از توالی گلیسین و پرولین جدا شده بود. به منظور تایید ساخت کاست ژنی، واکنش PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی انجام گرفت.

زیر همساز سازی در وکتور pET28a

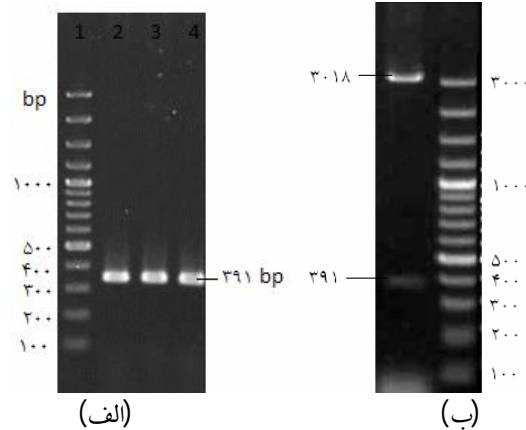
کاست ژنی هدف توسط آنزیم‌های با اثر محدود *Sal I* و *Hind III* برش خورده و به وکتور بیانی pET28a(+)(Qiagen) که با همین آنزیم‌ها برش خورده و استخراج شده بود، الحاق گردید. واکنش الحاق به مدت 70 دقیقه در دمای 22 درجه سانتی گراد توسط آنزیم T4 DNA لیگاز شرکت فرمنتاز صورت گرفت. وکتورهای نو ترکیب حاصل با مکانیسم شوک حرارتی به سلول‌های مستعد (تهیه شده به روش شیمیایی) اشرشیا کلی سویه BL21 (DE3) PLYS (stratagen) تراریخت شدند.

بیان ژن مورد نظر

از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان 100 میکرولیتر به 5 میلی لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین با غلظت 50 میکروگرم در میلی لیتر تلقیح و پس از رسیدن OD به 0/6 در طول موج 600 نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القا کننده پروموترایزوپروپیل -D-β-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) شرکت فرمنتاز با غلظت نهایی 1 میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت 5 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

391 و 3018 جفت باز حاصل از هضم سازه *pGEM-* و *ctxB* با آنزیم‌های *Sall/HindIII* همساز سازی ژن مورد تایید واقع شد.

وکتور *pGEM- T* همساز سازی شد و به میزبان اشرشیاکلی سویه *DH5α* منتقل گردید. تایید همساز سازی با استفاده از روش‌های PCR (شکل 2 الف) و برش آنزیمی (شکل 1 ب) انجام گرفت. با مشاهده قطعات ژنی

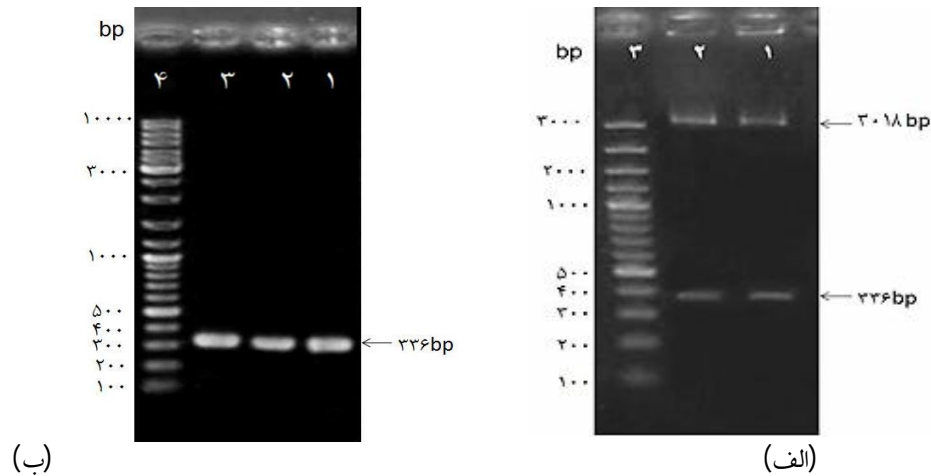


شکل 1. نتایج الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی ژن *ctxB* بر روی ژل آگاروز 1 درصد. الف. الکتروفورز محصول PCR ژن *ctxB* با آنزیم *Pfu*. ستون 1: نشانگر DNA 100 جفت بازی. ستون 2، 3 و 4: محصول PCR که در راستای باند 391 جفت بازی نشانگر DNA قرار گرفته است. ب. الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی سازه *pGEM-ctxB*. ستون 1: پلاسمیدهای نوترکیب برش خورده با آنزیم‌های *Sall/HindIII*، یک قطعه 391 جفت بازی که قطعه ژنی مورد نظر می‌باشد و یک قطعه 3018 جفت بازی که پلاسمید *pGEM* خطی شده می‌باشد.

شد و به میزبان اشرشیاکلی سویه *DH5α* وارد گردید. تایید همساز سازی با استفاده از PCR و برش آنزیمی (شکل 2 ب) انجام گرفت. با مشاهده قطعات ژنی 336 و 3018 جفت بازی حاصل از هضم سازه *pGEM-ipaD* با آنزیم‌های *XhoI/HindIII* همساز سازی ژن مورد تایید واقع شد.

تکثیر و الحاق ژن *ipaD* در *pGEM- T Easy* Vector و انتقال سازه به باکتری اشرشیاکلی

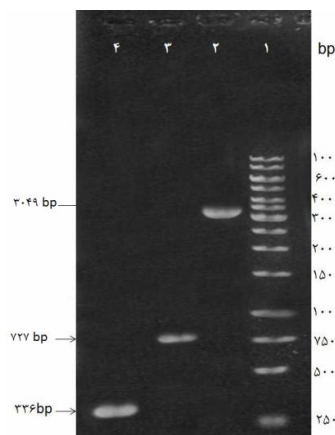
همچنین نتایج حاصل از تکثیر ژن *ipaD* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در شکل 2 الف نشان داده شده است. محصول PCR بر روی ژل با اندازه 336 جفت باز مشاهده شد. پس از خالص سازی قطعه ژنی تکثیر شده، طی واکنش الحاق قطعه *ipaD* به وکتور *pGEM-T* وارد



شکل 2. الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی به منظور تایید همسازیه سازی ژن *ipaD* بر روی ژل آگاروز 1 درصد. الف. ستون 1 تا 3: نتایج PCR ژن *ipaD* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی. ستون 4. نشانگر DNA 100 جفت بازی. ب. ستون 1 و 2: نتایج حاصل از واکنش هضم آنزیمی سازه *ipaD*-pGEM. ستون 3: نشانگر DNA 100 جفت بازی.

در ادامه قطعه ژنی *ipaD* به وکتور-pGEM در طی واکنش الحاق وارد گردید و وکتور نوترکیب *pGEM-ctxB-ipaD* به سلولهای میزبان اشرشیاکلی انتقال یافت. به منظور تایید ساخت کاست ژنی واکنش PCR و Nested PCR از روی کلنی‌ها (شکل 5) انجام گرفت.

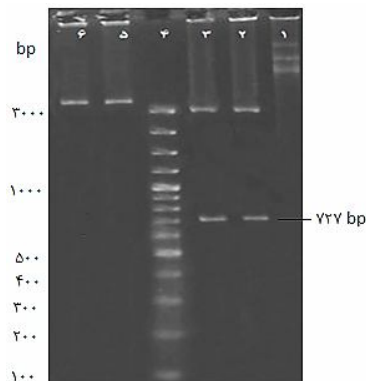
پس از خارج سازی قطعه ژنی *ipaD* کلون شده، از درون وکتور pGEM با آنزیمهای محدودگر *XhoI* و *HindIII* بر اساس طراحی انجام گرفته برای ساخت کاست ژنی قطعه 6 نوکلئوتیدی (2 کدون پایان) که در بین دو سایت برشی آنزیمهای محدودالایثر *XhoI* و *HindIII* که بر روی پرایمر پیرو *ctxB* قرار داشتند، از درون وکتور خارج شد (شکل 3).



شکل 3. الکتروفورز محصول PCR به منظور تایید ساخت کاست ژنی *ipaD-ctxB* بر روی ژل آگاروز 1 درصد. ستون 1: نشانگر DNA 250 جفت بازی. ستون 2: پلاسمید نوترکیب حاوی سازه *pGEM-ctxB-ipaD*. ستون 3: محصول واکنش Nested PCR با استفاده از پرایمر رفت *ctxB* و برگشت *ipaD* یک قطعه 727 جفت بازی را نشان می‌دهد که تاییدی بر ساخت کاست ژنی می‌باشد. ستون 4: محصول PCR مربوط به کاست ژنی *ipaD-ctxB* با پرایمر رفت و برگشت *ipaD* که در راستای باند 336 جفت بازی نشانگر DNA قرار گرفته است.

مربوط به اثر آنزیم *EcoRI* است که دارای دو جایگاه برش بر روی وکتور pGEM می باشد که قطعه برش یافته حدود 727 نوکلئوتید می باشد.

نتایج حاصل از آنالیز آنزیمی کاست ژنی در شکل 4 مشاهده می شود. ستون 2 تایید آنزیمی ساخت کاست ژنی را با اثر آنزیم های *Sall* و *HindIII* که قطعه 727 نوکلئوتیدی را تولید می کند، نشان می دهد. هم چنین ستون 3

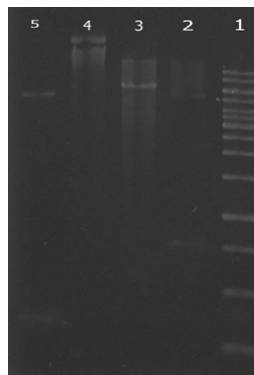


شکل 4. الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی سازه pGEM- *CTXB-ipaD* بر روی ژل آگاروز 1 درصد. ستون 1. پلاسمید نو ترکیب دارای قطعه *ctxB-ipaD* بدون واکنش هضم آنزیمی. ستون 2 و 3. پلاسمید نو ترکیبی که توسط آنزیم های محدودالتر *Sall* و *HindIII* برش خورده است. یک قطعه 727 جفت بازی که کاست ژنی مورد نظر می باشد و یک قطعه 3018 جفت بازی که پلاسمید pGEM خطی شده می باشد، از آن خارج شده است. ستون 4. نشانگر DNA 100 جفت بازی.

ipaD با 336 جفت باز متصل و کاست ژنی تولید شده با 727 جفت باز تعیین توالی گردید. آنالیز داده های حاصل از تعیین توالی بر ساخت کاست ژنی به شکل مطلوب تاکید می کند.

زیر همسازیه سازی در وکتور بیانی pET28a(+)

زیر همسازیه سازی از طریق واکنش های PCR و هضم آنزیمی (شکل 5) مورد تایید قرار گرفت. در این تحقیق قطعه ژنی *ctxB* دارای لینکر و توالی (RBS) طراحی شده بر روی پرایمر) با 391 جفت باز به ناحیه انتهای N ژن

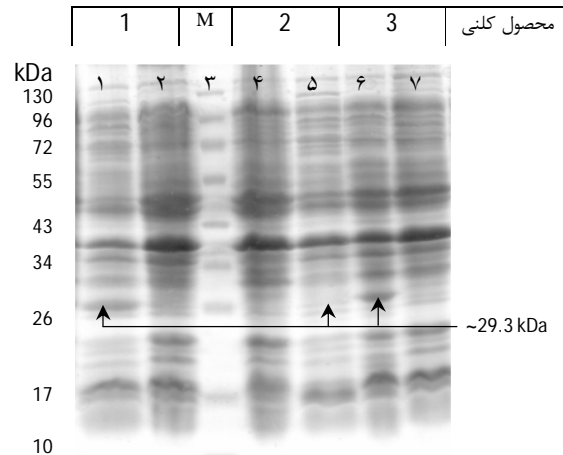


شکل 5. آنالیز کلون ها به روش هضم آنزیمی و مقایسه حرکت الکتروفورزی آن ها. ستون 1. نشانگر DNA 250 جفت بازی، ستون 2. پلاسمید نو ترکیب برش خورده با *Sall* و *NotI* که قطعه 727bp از وکتور خارج شده است، ستون 3. پلاسمید نو ترکیب برش خورده با *HindIII*، ستون 4. پلاسمید برش نخورده و ستون 5. پلاسمید برش خورده با *XhoI* که قطعه 336bp از آن خارج شده است.

انتظار می‌رفت بین باندهای 26 و 34 کیلو دالتون نشانگر پروتئینی، باندهی مربوط به پروتئین نو ترکیب در کلنی‌های 1 و 3 مشاهده ولی برای کلنی 2 بسیار ضعیف مشاهده شد (شکل 6).

بررسی بیان کاست ژنی *ctB- ipaD* در باکتری اشرشیاکلی سویه B121(DE3)

پس از القاء ژن هدف در سلول‌های اشرشیاکلی سویه B121(DE3) با استفاده از ماده IPTG (فقط در نمونه‌های تست) سلول‌ها به روش خام روی ژل SDS-PAGE 12 درصد مورد بررسی قرار گرفتند. همان طور که

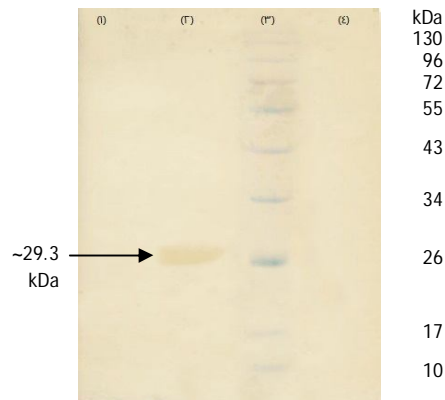


شکل 6. الکتروفورز پروتئین مورد نظر روی ژل SDS-PAGE به منظور بررسی بیان به روش خام. ستون 3. مارکر پروتئینی. ستون 2، 4 و 7. کنترل منفی که در آن باکتری‌ها پس از رسیدن جذب نوری به 0/6 در طول موج 600 نانومتر با ماده IPTG القاء نشده‌اند (سوب باکتری). ستون 1، 5 و 6: محتوی پروتئینی باکتری‌هایی که پس از رسیدن جذب نوری آن‌ها به 0/6 در طول موج 600 نانومتر با ماده IPTG القاء شده‌اند (سوب باکتری).

استفاده شد. پس از انجام مراحل واکنش از کاغذ نیتروسولوز عکس تهیه شد و در ناحیه مورد نظر ستونی که باکتری‌های واجد سازه *pET28a(+)-ctxB-ipaD* قرار گرفته بودند، باند مشاهده گردید.

تأیید پروتئین‌های مورد نظر با استفاده از روش لکه‌گذاری وسترن

به منظور تأیید بیان ناحیه کاست ژنی پروتئین‌های مورد نظر در باکتری اشرشیاکلی از روش لکه‌گذاری وسترن استفاده گردید (شکل 7). بدین منظور از Anti-His tag استفاده گردید. برای کنترل منفی، از BSA



شکل 7. لکه‌گذاری وسترن. ستون 1 نمونه شاهد القا نشده، ستون 2 نمونه تست القا شده با IPTG، ستون 3. مارکر پروتئینی، ستون BSA4.

برده شوند. این واکنش‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند از جمله این که عموماً دارای میزان ایمنی زایی کمی می‌باشند و در واقع بیشتر آنتی ژن‌های کاندید واکسن که به صورت مخاطی تجویز می‌گردند ایمونوژنیک نیستند و نیاز به یک ادجوانت مخصوص دارند که باعث تقویت و فراخوانی پاسخ‌های سیستم ایمنی شود. تحقیقات صورت گرفته مشخص کرد که مقدار آنتی ژنی که در حالت فیوژن شده با یک ادجوانت برای مصرف ضروری است، کمتر از مقداری می‌باشد که به صورت تجویز هم‌زمان (CO-Administrated) برای ایمنی زایی استفاده می‌گردد که این نشان از مزیت‌های متصل کردن آنتی ژن‌ها با ادجوانت‌های مختلف دارد (22، 23). امروزه توجه خاصی به واکنش‌هایی شده است که علاوه بر نو ترکیب بودن، از طریق فعال‌سازی ایمنی مخاطی، تأثیر آن‌ها نیز افزایش یافته است. در مورد CTB در سطح جهان و توسط افراد زیادی مطالعاتی صورت گرفته است و ژن *ctb* و سایر ژن‌های انتقالی را در موجودات مختلفی کلون کرده‌اند (24). از ژن *ctb* به عنوان ایجادکننده تحمل در درمان بیماری‌های خود ایمن نیز استفاده می‌شود. اگر ژن *ctb* همراه با ژن آنتی ژن‌های خودی (auto antigen) در قالب یک واکسن نو ترکیب به کار گرفته شود، سبب القاء تحمل ایمنی می‌شود و کاندید مناسبی برای ایجاد تحمل علیه بیماری‌های خود

بحث

در این تحقیق، با توجه به اهمیت ناحیه انتهای N ژن *ipad* در ورود باکتری به سلول‌های میزبان، این ناحیه به عنوان کاندیدای واکسن مورد توجه بوده است. از طرفی، ناحیه انتهای C ژن *ctb* که دارای نقش ادجوانتی و حاملی می‌باشد برای بالا بردن میزان ایمنی زایی پروتئین IpaD با آن همراه شده است. بنابر این، خاصیت ایمنی زایی پروتئین IpaD و خاصیت آنتی ژنی و ادجوانتی پروتئین CTB به طور هم‌زمان مد نظر بوده است. از آن جا که مصرف واکسن‌ها به فرم خوراکی به دلیل دارا بودن وزن ملکولی بالا و عدم جذب آن از روده، منجر به عدم تحویل واکسن آنتی ژنی به هدف مورد نظر و عدم تحریک سیستم ایمنی بدن می‌گردد، استفاده از آنتی ژن‌هایی که خاصیت ادجوانتی و تحویل دهنده‌گی به سلول‌های مورد نظر را دارند، به منظور تقویت اثر ایمنی زایی واکسن‌ها مورد تحقیق و بررسی قرار می‌گیرند.

از مزایای تحویل واکسن‌ها از طریق مسیر مخاطی این است که واکسن‌های مخاطی که به شکل مناسبی فرموله شده‌اند، می‌توانند همه بازوهای سیستم ایمنی را تحریک کنند. این نوع واکسن‌ها می‌توانند برای محافظت در مقابل پاتوژن‌هایی که میزبان را از طریق سطوح مخاطی و هم‌چنین پاتوژن‌هایی که از مسیرهای دیگری وارد شده‌اند، به کار

شد که این آنتی ژن‌ها در محیطی غیر التهابی و بدون حضور مولکول‌های کمک تحریکی به سلول‌های T عرضه شوند که این مسئله منتج به بی‌پاسخی (Anergy) تحمل و خوراکی خواهد شد، در حالی که آنتی ژن‌هایی که با یک ادجوانت همراه شده باشند، محیط التهابی (IL-12 و IL-18 و مولکول‌های کمک تحریکی B7) را فراهم می‌آورند که در این محیط التهابی، آنتی ژن به سلول‌های T ارائه خواهد شد که این منتج به فعال سازی و تکثیر سلول‌های T و سیستم ایمنی خواهند شد (24).

نتیجه گیری

در حال حاضر، هیچ‌گونه واکنشی برای بیماری شیگلوز در دسترس نیست. هر چند که سلول‌های T در حفاظت علیه شیگلا نقش دارند اما برای ایمن شدن ضروری نیستند. بر اساس مطالعات انجام شده، پاسخ ایمنی همورال نقش مهم‌تری در ایمنی علیه شیگلا با هر دو پاسخ سیستمیک و مخاطی علیه لیپولی ساکارید و تعدادی از پروتئین‌های کد شده توسط پلاسمید بیماری‌زا از جمله پروتئین‌های Ipa دارد. در این تحقیق، ژن *ipaD* به عنوان یک آنتی ژن کاندید واکسن ژنی به ناحیه انتهای C ژن *ctB* به عنوان یک ادجوانت و ناقل خوراکی متصل شد و کاست ژنی *ipaD-ctB* تولید گردید. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که به منظور تقویت اثر واکسن‌های خوراکی و رفع محدودیت عمده آن‌ها یعنی میزان ایمنی زایی پایین آنتی ژن‌های محلول، می‌توان از ادجوانت‌ها استفاده نمود که *ctB* به عنوان یک ادجوانت و حامل مناسب انتخاب گردید. در صورت بیان پروتئین نوترکیب IpaD-CTB، می‌توان در راستای توسعه و تولید کاندید واکسن مناسبی علیه شیگلوز پیشرفت.

تشکر و قدردانی

با تقدیر و تشکر از اساتید، پژوهشگران و کارکنان مرکز و گروه زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در این پژوهش از لحاظ علمی و مالی کمک نمودند.

ایمن می‌باشد. البته اگر *ctB* به همراه یک آنتی ژن بیگانه مثلاً آنتی ژن یک پاتوژن مثل ویروس یا باکتری استفاده شود (هترو آنتی ژن) پاسخ ایمنی را القاء خواهد کرد.

توربیفیل و همکارانش در سال 2000 با جداسازی، تشخیص و تعیین خصوصیات زیر واحدهای پروتئینی کمپلکس‌های مهاجم (IpaB, C, D) اثرات ایمنی زایی آن را بر روی موش و خوکیچه گینه‌ای مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که یک شاخص معنی داری در تولید آنتی بادی IgG, IgA در این حیوان علیه پروتئین‌های Ipa و Lps وجود دارد (25). در سال 2006 نیز دوباره توسط محققین دیگری مورد استفاده قرار گرفت با این تفاوت که این بار از ترکیب این سه پروتئین به عنوان ادجوانت مخاطی برای ترشح IgA استفاده شد. از آن جا که چندین عامل با همدیگر مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، میزان اثر بخشی IpaD و به خصوص ناحیه ویژه آن نیز شناسایی نشده است. اکثر افراد عفونی شده با شیگلا آنتی‌بادی‌هایی علیه IpaB, IpaC و به میزان کمتری IpaD و VirG تولید می‌کنند (22). مطالعات انجام گرفته نشان دادند که آنتی‌بادی‌هایی که ناحیه N-ترمینال پروتئین IpaD را شناسایی می‌کنند توانایی برهمکنش این پروتئین با نمک‌های صغراوی به ویژه دی اکسی کولات را سرکوب می‌نمایند. در این حالت باکتری قادر به انجام فعالیت ویژه خود برای فراخوانی و به کارگیری IpaB نخواهد بود. در نتیجه توان شیگلا برای ایجاد منفذ در سلول یوکاریوتی از بین رفته و فرآیند ورود باکتری به درون سلول میزبان سرکوب می‌شود. این نتایج به طور ویژه‌ای نشان می‌دهد که پروتئین IpaD و به ویژه ناحیه N ترمینال این پروتئین یک فاکتور لازم در ورود باکتری شیگلا به سلول‌های میزبان است و از این رو این پروتئین به عنوان یک آنتی ژن بالقوه در طراحی واکسن مطرح است و آنتی بادی تولید شده علیه آن می‌تواند کاندید واکسن مناسبی برای شیگلا باشد (26).

بررسی‌های صورت گرفته در رابطه با نقش و نحوه عملکرد ادجوانت‌ها نشان دادند که آنتی ژن‌هایی که بدون ادجوانت به بافت مخاطی وارد شوند، باعث خواهند

stimulates the mucosal IgA production in response to the influenza virus antigen. *The Journal of Immunology*. 2006;176(2):1122-30.

9. Paula de Mattos Arêas A, Leonor Sarno de Oliveira M, Raul Romero Ramos C, Sbrogio-Almeida ME, Raw Ia, Ho PL. Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in *Escherichia coli*. Protein expression and purification. 2002;25(3):481-7.

10. Espina M, Olive AJ, Kenjale R, Moore DS, Ausar SF, Kaminski RW, et al. IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. *Infection and immunity*. 2006;74(8):4391-400.

11. Stensrud KF, Adam PR, La Mar CD, Olive AJ, Lushington GH, Sudharsan R, et al. Deoxycholate interacts with IpaD of *Shigella flexneri* in inducing the recruitment of IpaB to the type III secretion apparatus needle tip. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(27):18646-54.

12. Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaei S. Immunogenicity in guinea pigs by IpaD –STxB recombinant protein. *Arak Medical University Journal*. 2013; 16(73): 83-93.[Persian]

13. Zhang L, Wang Y, Olive AJ, Smith ND, Picking WD, De Guzman RN, et al. Identification of the MxiH needle protein residues responsible for anchoring invasion plasmid antigen D to the type III secretion needle tip. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(44):32144-51.

14. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from *Shigella flexneri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988;85(23):9317-21.

15. Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell H. Expression of cholera toxin B–proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts–oral administration protects against

منابع

1. Greenland JR, Letvin NL. Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine*. 2007;25(19):3731-41.

2. Walker RI. Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries. *Vaccine*. 2005;23(26):3369-85.

3. He Z, Li M, Zhang W, Wu X. Cloning of the CtxB Gene of *Vibrio cholerae* and Its Expression in *E. coli*. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2000;32(2):149-52.

4. Clemens J, Kotloff K, Kay BA. Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhea and dysenteric mortality: Department of Vaccines and Other Biologicals, World Health Organization; 1999.p.149-51.

5. Harakuni T, Sugawa H, Komesu A, Tadano M, Arakawa T. Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems. *Infection and immunity*. 2005;73(9):5654-65.

6. Esmaili A, Honari H, Safaei S, Ghofrani M. Design and Construction of ctxB-gfp-stxB Gene Cassette and Investigation of Its Expression in *E. coli* B121 (DE3). *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2013;3(1):18-21.

7. Wang T, Chen JP, Li H, Zhi KQ, Zhang

L, YANG CL, et al. Co-expression and

Immunity of *Legionella pneumophila* mip Gene and Immunoadjuvant ctxB Gene. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2005;37(3):199-204.

8. Mizuno D, Ide-Kurihara M, Ichinomiya T, Kubo I, Kido H. Modified pulmonary surfactant is a potent adjuvant that

- sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica. 2000;33(3):360-4.
20. Kim T-G, Galloway DR, Langridge WH. Synthesis and assembly of anthrax lethal factor-cholera toxin B-subunit fusion protein in transgenic potato. *Molecular biotechnology*. 2004;28(3):175-83.
21. Kaminski RW, Turbyfill KR, Oaks EV. Mucosal adjuvant properties of the Shigella invasion complex. *Infection and immunity*. 2006;74(5):2856-66.
22. Bârzu S, Arondel J, Guillot S, Sansonetti PJ, Phalipon A. Immunogenicity of IpaC-hybrid proteins expressed in the Shigella flexneri 2a vaccine candidate SC602. *Infection and immunity*. 1998;66(1):77-82.
23. Gong Z, Jin H, Jin Y, Zhang Y. Expression of cholera toxin B subunit and assembly as functional oligomers in silkworm. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2005;38(6):717-24.
24. Turbyfill KR, Hartman AB, Oaks EV. Isolation and characterization of a Shigella flexneri invasion complex subunit vaccine. *Infection and immunity*. 2000;68(12):6624-32.
25. Sani M, Botteaux A, Parsot C, Sansonetti P, Boekema EJ, Allaoui A. IpaD is localized at the tip of the Shigella flexneri type III secretion apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2007;1770(2):307-11.
- development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant biotechnology journal*. 2007;5(4):495-510.
16. Lee SF, Halperin SA, Salloum DF, MacMillan A, Morris A. Mucosal immunization with a genetically engineered pertussis toxin S1 fragment-cholera toxin subunit B chimeric protein. *Infection and immunity*. 2003;71(4):2272-5.
17. Zhang T, Li E, Stanley S. Oral immunization with the dodecapeptide repeat of the serine-rich Entamoeba histolytica protein (SREHP) fused to the cholera toxin B subunit induces a mucosal and systemic anti-SREHP antibody response. *Infection and immunity*. 1995;63(4):1349-55.
18. He D-M, Qian K-X, Shen G-F, Li Y-N, Zhang Z-F, Su Z-L, et al. Stable expression of foot-and-mouth disease virus protein VP1 fused with cholera toxin B subunit in the potato (Solanum tuberosum). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007;55(2):159-63.
19. Li M, He Z, Ling Z, Wang J, Sheng X, Yang G, et al. A Candidate Oral Vaccine to Helicobacter pylori Fusion Protein of HspA and CtxB. *Sheng wu hua xue yu*