

## بیان و تخلیص پروتئین ایمنوژن نوترکیب در بردارنده فاکتورهای بیماری زای شیگلا

### دیسانتری

حسین طراحی مفرد<sup>۱،۳</sup>، شهرام نظریان<sup>۲\*</sup> و امیر میمندپور<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> ایران، اهواز، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام

<sup>۲</sup> ایران، تهران، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی

<sup>۳</sup> ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، گروه زیست‌فناوری دام و آبزیان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۰

### چکیده

باکتری شیگلا دیسانتری، از عوامل بیولوژیک بوده که سبب بروز اسهال خونی می‌باشد. با بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی، طراحی ایمنوژن موثر علیه باکتری ضروری است. فاکتورهای اتصالی، تهاجم و توکسین باکتری از مهمترین کاندیدای واکسن علیه شیگلا دیسانتری می‌باشند. بر این اساس هدف از تحقیق حاضر بیان نوترکیب ایمنوژن کایمر در بردارنده فاکتورهای ویرولانس شیگلا دیسانتری بود. بهینه‌سازی کدونی ژن کایمر با نرم افزار OPTIMIZER انجام گرفت. سازه ژنی در وکتور pET32a زیر همسانه سازی شد. پلاسمید نوترکیب به سلولهای *E. coli* BL21 DE3 منتقل و بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از IPTG القاء گردید. پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل تخلیص و با وسترن بلائینگ ارزیابی شد. شاخص سازگاری کدون (CAI) مربوط به ژن طبیعی ۰/۶۷ بود، درحالی که ژن بهینه‌سازی شده شاخص ۰/۹ را دارا شد. آنالیز آنزیمی صحت همسانه سازی ژن کایمر در وکتور را تأیید کرد. بیان پروتئین نوترکیب در میزبان *E. coli* منجر به تولید پروتئین نوترکیب با وزن ۸۰ کیلودالتون شد. وسترن بلائینگ و واکنش پروتئین نوترکیب با آنتی‌بادی ضد هیستیدین را نشان داد. میزان پروتئین خالص شده برای هر لیتر از محیط کشت ۲/۵ میلی‌گرم بود. بیان پروتئین نوترکیب کایمر با وزن ۸۰ کیلودالتون در میزبان *E. coli* و تخلیص آن با موفقیت انجام شد. پروتئین نوترکیب را می‌توان به صورت تزریقی و یا بارگذاری شده در نانوذرات به منظور بررسی ایمنی‌زایی خوراکی و تزریقی مورد استفاده قرار داد.

واژه‌های کلیدی: شیگلا دیسانتری، پروتئین نوترکیب، ایمنوژن، پروتئین کایمر

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۷۷۱۰۴۹۳۴، پست الکترونیکی: kpnazari@ihu.ac.ir

### مقدمه

روی سلولهای اپی‌تلیال روده، باعث از دست رفتن آب و الکترولیت در بیمار و در موارد مربوط به کودکان و افراد مسن منجر به مرگ می‌شود (۵). روند اصلی بیماری زایی عفونت شیگلا، تهاجم به سلولهای اپی‌تلیال موکوزی (سلول M) به وسیله القای فاگوسیتوز، فرار از لیزوزوم، تکثیر و انتشار در داخل سیتوپلاسم سلولهای اپی‌تلیال و انتقال به سلولهای مجاور است. ورمهای کوچک چرکی در دیواره

از میان بیماریهای عفونی، اسهال به عنوان سومین عامل مرگ و میر سالانه به طور تقریبی ۱/۵ میلیون مرگ در کودکان زیر ۵ سال در سرتا سر جهان را باعث می‌شود (۱). بیماری شیگلوز از مسری‌ترین بیماریهای اسهال باکتریایی است که توسط شیگلا ایجاد می‌گردد. شیگلا باکتری روده‌ای بی‌هوازی اختیاری و غیر متحرک از گروه انتروباکتریاسه می‌باشد. در این بیماری، اثر انتروتوکسین

TTSS (سیستم ترشحي نوع سوم) قرار گرفته و به همراه IpaB و MxiH، کمپلکس سه‌تایی تشکیل می‌دهند. در این زمان IpaB می‌تواند به رسپتور خود بر روی سطح سلول میزبان متصل شود و مرحله آغازین تهاجم را شروع کند که نهایتاً شیگلا را برای اتصال و تهاجم به سلول میزبان مهیا می‌سازد (۱۸). با توجه به نقش مشخص شده برای این پروتئین در فرآیند بیماری زایی، از آن می‌توان به عنوان آغاز کننده فعالیت تهاجمی شیگلا نام برد. VirG (icsA) فاکتور پر اهمیت دیگری است که در سطح خارجی باکتری قرار می‌گیرد (۲). از آنجا که محصول virG در تهاجم به سلولهای اپی‌تلیال نقش دارد، ژن virG با ایجاد یک آنتی‌ژن در سطح سلول، شرایط لازم جهت تجمع F-actin در قطبین سلول باکتری را فراهم کرده که با تبدیل F-actin به صورت فیلامنت و طولیل شدن F-actin در سلولهای اپی‌تلیال آلوده، نهایتاً سبب ایجاد نیروی حرکتی پروتئین غشای خارجی می‌گردد. مطالعات نشان داده که پاسخهای ایمنی ایجاد شده علیه Ipa، VirG می‌تواند تا حد قابل قبولی فرد را در برابر تهاجم باکتری محافظت کند (۱۵). با توجه به اینکه بیماری زایی به وسیله تهاجم به سلول میزبان و سپس ترشح توکسین صورت می‌گیرد، لذا تحقیقات توسعه واکسن علیه این عوامل باید در برگیرنده ایمنی در برابر عملکرد فاکتورهای تهاجمی باکتری و تولید توکسین آن باشد. استفاده از ادجوانتهای پروتئین در ساختار پروتئین کایمر نیز می‌تواند پاسخهای ایمنی علیه ایمنوژنها را تقویت کند. نوعی از ادجوانتهای مورد مطالعه در این پژوهش، Stx یا توکسین شبه شیگلا، پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلو دالتون بوده که از یک زیرواحد سمی و آنزیمی به نام StxA و پنج زیرواحد متصل شونده به گیرنده به نام StxB تشکیل شده است (۸). در پژوهشی هنری و همکاران بر روی بیان پروتئین نوترکیب IpaD-STxB و بررسی ایمنی‌زایی آن در موش سوری اعلام کردند که پروتئین حاصل از ترکیب ژنهای ipaD و stxB می‌تواند موش سوری را نسبت به

روده بزرگ و انتهای ایلئوم حاصل از نکروز دیواره موکوزی، زخم سطحی، خونریزی و شکل‌گیری غشای کاذب روی زخم است (۲۱). این ورمهای چرکی به واسطه فاکتورهای بیماری زا و تهاجمی شیگلا به وجود می‌آیند. فاکتورهای بیماری زای شیگلا شامل اندوتوکسینها که بعد از اتولیز، با آزادسازی لیپوپلی‌ساکارید سمی خود در التهاب دیواره روده نقش داشته و آگزوتوکسین‌های حساس به حرارت که با تأثیر بر روده و سیستم اعصاب مرکزی، همانند یک سم روده‌ای باعث اسهال می‌گردد؛ می‌باشند (۹). فاکتورهای تهاجمی بیماری زای سلولی و علائم کلینیکی شیگلوز حاصل کار مجموعه بزرگی از فاکتورهای بیماری زایی شیگلا است. قسمت اصلی مکانیسم مولکولی برای تهاجم باکتری و پایداری داخل سلولی توسط پلاسمید بزرگ ۲۰۰ کیلوبازی بیماری زای باکتری کد می‌شود. منطقه‌ای ۳۱ کیلوبازی حفاظت شده به نام محل ورود که داخل پلاسمید است حاوی ژنهای اصلی برای تهاجم و مرگ ماکروفاژها می‌باشد. با توجه به نقش فاکتورهای تهاجمی شیگلا در اتصال و کلونیزاسیون باکتری مهم‌ترین پروتئینها عبارتند از IpaB که یکی از فاکتورهای بیماری زای شیگلاست که یک پروتئین ترشحي تولید می‌کند و در سیتوپلاسم ماکروفاژ آلوده قرار می‌گیرد. IpaB جهت القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا همان اپاپتوزیز ضروری است که این کار را با اتصال مستقیم به ماشین مرگ سلولی و همچنین با کمک پروتئین IpaC به عنوان اولین پروتئین موثر برای تهاجم باکتری به سلولهای اپی‌تلیال انجام می‌دهد (۱۳). همچنین پروتئین Invasion plasmid antigen D (IpaD) به عنوان یک آنتی‌ژن اصلی توسط سیستم ایمنی بدن انسان و حیوان شناسایی شده است که یکی از حیاتی‌ترین و مهم‌ترین فاکتورهای بیماری زای موجود در انواع شیگلا می‌باشد به نحوی که سرآغاز و گذرگاه تمام فعالیتهای تهاجمی شیگلا مرهون فعالیت کلیدی IpaD می‌باشد. مکانیسم اصلی فعالیت این پروتئین بدین صورت می‌باشد که IpaD در راس سوزن

ریبوزوم، توالیهای تکراری و توالیهای ناپایدارکننده ساختار RNA که به طور تصادفی در طول ژن ایجاد شده اند، حذف گردید. ساختارهای mRNA سازه ژنی جهت بررسی پایداری در سیستم پروکاریوتی بررسی شد (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>). پس از مطالعات بیوانفورماتیکی انجام شده، سازه ژنی جهت ساخت به شرکت Biomatik سفارش داده شد.

**آماده سازی کاست ژنی، انتقال به میزبان *E. coli* و تأیید ژن کایمر سنتز شده:** پس از طراحی کایمر، توالی مورد نظر برای ساخت و سنتز در پلاسمید pET28a به شرکت Biomatik سفارش داده شد. با استفاده از روش شوک حرارتی، پلاسمید حاوی ژن به سلولهای مستعد *E. coli* BL21(DE3) منتقل گردید. در نهایت سلولهای *E. coli* نوترکیب بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت نهایی  $80 \mu\text{g/ml}$  کشت داده و مرحله انکوباسیون به صورت شبانه در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد انجام گرفت. از میان کلونهای به دست آمده، تعدادی کلنی انتخاب و به طور جداگانه در محیط LB مایع حاوی  $80 \mu\text{g/ml}$  کانامایسین به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد و سرعت  $180 \text{ rpm}$  کشت داده شدند. پس از جمع‌آوری سلولها، با روش لیز قلیایی، پلاسمید استخراج گردید. با استفاده از آنزیمهای برشی *EcoRI* و *HindIII* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده هضم آنزیمی صورت گرفت و وجود ژن در کنار نشانگر مولکولی توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد ارزیابی شد.

**زیر همسانه سازی ژن در پلاسمید pET-32a:** جهت زیر همسانه سازی ژن، سلولهای باکتری واجد پلاسمید نوترکیب pET-28a و همچنین سلولهای باکتری حاوی پلاسمید pET-32a به ترتیب در محیط LB مایع حاوی  $80 \mu\text{g/ml}$  آنتی بیوتیک کانامایسین و  $100 \mu\text{g/ml}$  آمپی سیلین به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای

شیگا-توکسین مصون نماید (۱۱). در تحقیق فوق مشخص گردید که پروتئین STxB در مدل حیوانی موش سوری موجب ایمنی‌زایی شده و پروتئین نوترکیب تولید شده می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا باشد (۲). پیشرفتهای ایجاد شده در روشهای مهندسی ژنتیک امروزه این امکان وجود دارد که بتوان ژنهای مربوط به پروتئینهای مختلف را با هم ترکیب کرده و یک ژن کایمر ایجاد کرد. از محاسن استفاده از پروتئینهای کایمر نوترکیب می‌توان به کاهش هزینه تولید آنتی‌ژنها و سهولت نگهداری یک پروتئین چندگانه در مقایسه با چند پروتئین نوترکیب مجزا که هر یک شرایط نگهداری خاصی را می‌طلبند، اشاره کرد (۱۷).

هدف از این پژوهش، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب کایمر چهار ظرفیتی حاوی زیرواحدهای تهاجمی و توکسین باکتری شیگلا بود.

## مواد و روشها

**طراحی بیوانفورماتیکی کایمر:** توالی پروتئینهای IpaD, StxB, IpaB, VirG (به عنوان ایمنوژن) پروتئین نوترکیب کایمر از وب‌گاه Uniprot و توالی ژنها از پایگاه داده ژن استخراج و با فرمت FASTA ذخیره‌سازی گردید. حالت‌های مختلف قرارگیری پروتئینها در کنار هم با توجه به میزان آنتی ژنیسیته و پایداری فیزیکی و شیمیایی توسط Vaxigen و ProtParam بررسی گردید. در میان این توالیها، رابطهای پپتیدی به عنوان توالی لینکر قرار گرفت تا از تداخل شکل فضایی هر یک از پروتئینها جلوگیری کرده و سبب حفظ ساختار پروتئین در ساختار مورد نظر و عدم تداخل در یکدیگر گردد. بهینه سازی کدونی توسط نرم افزار Genscript Optimisation Gene TM algorithm و ابزار optimizer (genomes.urv.es) بر روی این ژن انجام شد تا بیشترین بیان از این ژن نوترکیب به دست آید. در این فرآیند ارجحیت کدونی، درصد و یکنواختی GC مدنظر قرار گرفته و سکانسهای chi، توالیهای اتصال

ستون عبور داده شد. در هر مرحله خروجی ستون جداگانه جمع‌آوری و نگهداری گردید برای بررسی روند تخلیص پروتئین از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد استفاده شد.

**تأیید پروتئین نو ترکیب:** بررسی صحت پروتئین نو ترکیب بیان شده با روش وسترن بلات و با استفاده از آنتی‌بادی ضد His-tag HRP انجام شد (۴). عصاره سلولی حاصل از بیان، پس از مرحله انتقال پروتئین روی کاغذ PVDF و در حضور بافر انتقال (گلیسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و ۸/۳ pH: لکه گذاری گردید. سپس مرحله بلاکینگ در BSA ۵ درصد و با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی مولار، KCl ۲/۷ میلی مولار،  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ۴/۳ میلی مولار، تویین ۲۰ درصد و pH: ۷/۲) به مدت ۵ ساعت در دمای محیط با قرار گیری روی شیکر انجام گرفت. کاغذ PVDF با استفاده از بافر PBST، سه بار مورد شستشو قرار گرفته و به مدت ۲ ساعت در حضور آنتی بادی ضد His-tag (Sigma) کانتروگه رقیق شده در بافر PBST با نسبت ۱/۲۰۰۰، در دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت پس از سه بار شستشو با بافر PBST، برای آشکارسازی توسط سوبسترای فنول-۴-آنتی پرمیدین با واکنش گر  $\text{H}_2\text{O}_2$  برای ظهور پروتئین نو ترکیب استفاده گردید. نهایتاً واکنش با استفاده از  $\text{H}_2\text{O}$  متوقف گردید.

## نتایج

ترادف ژنی مربوط به پروتئینهای IpaD, StxB, IpaB, VirG استخراج و توالیهای تأیید شده بر اساس نتایج بررسیهای بیوانفورماتیکی پروتئین کایمر و دارای امتیاز بازینی بالا مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزارهای تحت شبکه ProtParam و Genscript اطلاعات بیوشیمیایی مربوط به پروتئین کایمر، توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی زیر واحدهای کایمر استخراج گردید. همچنین توالی ژن کایمر از لحاظ وجود کدونهای نادر و همچنین میزان نوکلئوتیدهای C و G مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱).

۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰ rpm کشت داده شدند. پس از جمع‌آوری سلولها، با روش لیز قلیایی، پلاسمیدها استخراج و با استفاده از آنزیمهای برشی *HindIII* و *EcoRI* به طور جداگانه برای هر کدام هضم برشی انجام پذیرفت. پس از الکتروفورز هردو نمونه روی ژل آگارز ۱ درصد، استخراج از روی ژل انجام و سپس توسط آنزیم T4 لیگاز، الحاق آنزیمی صورت گرفت. محصول اتصال آنزیمی توسط شوک حرارتی به درون باکتری *E. coli* BL21 انتقال یافت.

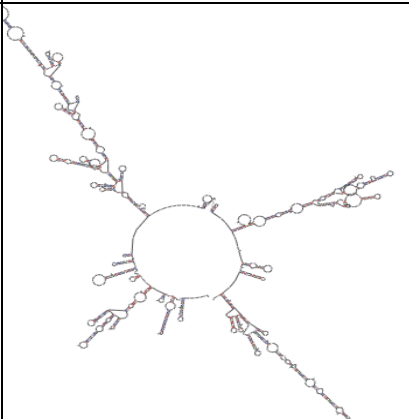
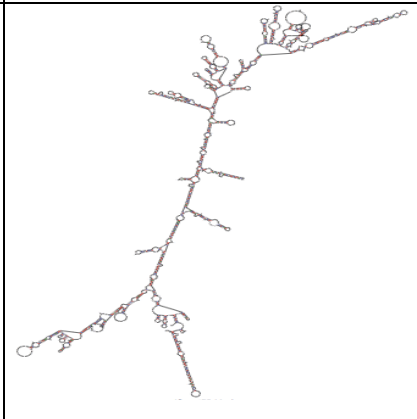
**بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب:** پس از تأیید صحت زیر همسانه سازی ژن در پلاسمید pET-32a، به روش هضم آنزیمی، بیان پروتئین نو ترکیب تحت تأثیر IPTG در *E. coli* BL21 DE3 القاء و بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی شد. با بررسی حلالیت پروتئین نو ترکیب مشخص شد که میزان بیان بالای این پروتئین در سلولها، سبب تجمع یافتن و تشکیل اینکلوزن بادی یا پروتئینهای نامحلول می‌شود. بر این اساس از روش دناتوره و بافر حاوی اوره جهت تخلیص پروتئین نو ترکیب استفاده گردید. بیان پروتئین در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین طی مدت ۴ ساعت انجام شد. ۴ میلی‌لیتر بافر B ( $\text{Tris-HCl} \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$ )؛ اوره با pH ۸) به رسوب سلولی اضافه گردید. نمونه‌ها با شرایط قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۵ به تعداد ۴ مرتبه (۴۰ ثانیه سونیکیت و ۳۰ ثانیه استراحت) سونیکه شده و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm و طی مدت ۲۰ دقیقه انجام و محلول رویی حاوی پروتئین نو ترکیب جدا گردید. محلول حاوی پروتئین جهت خالص سازی از ستون رزین گروماتوگرافی گذرانده شد. در مراحل بعدی به ترتیب بافرهای شستشوی ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )، اوره با pH ۶/۳، C ( $\text{Tris-HCl} \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$ )؛ اوره با pH ۵/۹، D، بافر استخراج ( $\text{Tris-HCl} \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$ )؛ اوره با pH ۵/۴، E و بافر ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار از

	قبل از بهینه سازی	بعد از بهینه سازی	مقدار مطلوب
CAI	0.67	0.90	0.8-1.0
GC Content	40.10%	52.21%	30%-70%
CFD	10%	0%	<30%

شکل ۱- بررسی میزان درصد GC ترادف بخش انتخاب شده پس از تغییرات انجام شده، درصد GC به ۵۲٫۲۱ افزایش داشته است.

بهینه‌سازی کدونها مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲). توسط نرم‌افزار Mfold نحوه تاخوردگی mRNA حاصل از ژن کدکننده آن نیز پیش‌بینی شد و بر اساس مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار مشخص گردید که پس از بهینه‌سازی کدونها، میزان حداقل انرژی ساختار mRNA نیز  $-521 \text{ kcal/mol}$  بود.

برای افزایش میزان بیان پروتئین نوترکیب، بهینه‌سازی کدونی توالی ژن مورد نظر توسط نرم افزار Genscript  $\text{Optimisation Gene}^{\text{TM}}$  algorithm انجام شد. شکل شماره ۱، CAI شاخص سازگاری کدون ژن *ibvd* قبل و بعد از بهینه‌سازی را نشان می‌دهد که از  $0.67/0$  به  $0.90/0$  بعد از بهینه‌سازی رسیده است. ساختار ثانویه mRNA پس از

	قبل از بهینه سازی	بعد از بهینه سازی
تعداد ساختارهای پیش‌بینی شده	23	41
دامنه تغییرات $\Delta G$	$-375.9 \text{ kcal/mol}$ _ $-357.40 \text{ kcal/mol}$	$-475.86 \text{ kcal/mol}$ _ $-452.70 \text{ kcal/mol}$
جزئیات ترمودینامیکی ساختار	$\Delta H = -4360.40 \text{ kcal/mol}$ $\Delta S = -12847 \text{ cal/(K}\cdot\text{mol)}$	$\Delta H = -5211.00 \text{ kcal/mol}$ $\Delta S = -15267.3 \text{ cal/(K}\cdot\text{mol)}$
ساختار پیش‌بینی شده		

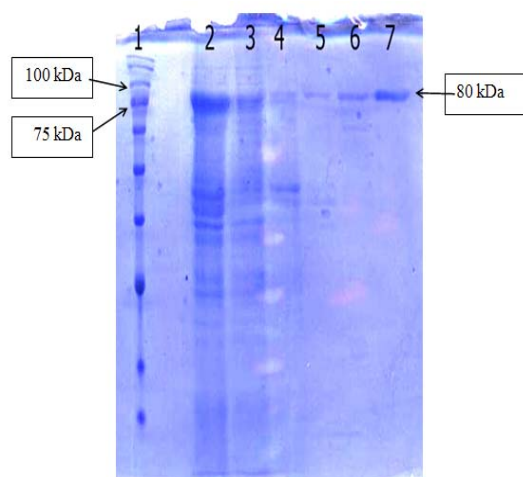
شکل ۲- پیش‌بینی ساختار ثانویه mRNA پس از بهینه‌سازی کدونهای مربوطه ژن مصنوعی مورد نظر، ناحیه مشخص و بزرگ شده نقطه شروع ۵' است که به دلیل تشکیل ساختار لوپ مانند ازاد به راحتی می‌تواند در اختیار ریبوزوم قرار بگیرد.

روی ژل الکتروفورز ۱ درصد، خروج قطعه ژنی با اندازه ۱۷۱۶ جفت بازی از پلاسمید را تأیید کرد (شکل ۳).

بیان پروتئین نوترکیب و بررسی حلالیت آن: با ایجاد شرایط مناسب و القای بیان، نتایج حاصل از بررسی SDS-PAGE، پروتئین نوترکیب با احتساب بخش الحاقی مربوط به pET-32a دارای وزن مولکولی حدود ۸۰ کیلو دالتون بیان بسیار بالا مشاهده گردید در حالی که در نمونه‌های

زیر همسانه‌سازی ژن کایمر در پلاسمید pET-32a با انتخاب وکتور بیانی pET-32a و هضم آنزیمی آن، پلاسمید برای الحاق با ژن مورد نظر آماده گردید. سپس زیرهمسانه‌سازی ژن در پلاسمید pET-32a انجام گرفت. پس از استخراج پلاسمید، هضم آنزیمی توسط آنزیمهای برشی *EcoRI* و *HindIII* صورت گرفت و بررسی محصول

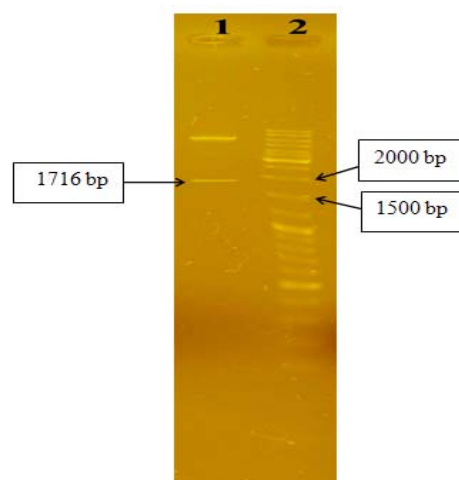
**تخلیص پروتئین نوترکیب به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی:** با محلول سازی کنگاله‌های نامحلول درون سلولهای تراریخت میزبان بیانی و آماده نمودن آنها، فرآیند عبور محلول مذکور از ستون کروماتوگرافی محتوی رزین نیکل انجام شد. با الکتروفورز نمونه‌های عبوری و شسته شده از ستون مشخص گردید تخلیص پروتئین با بافر ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار انجام شده است. (شکل ۵).



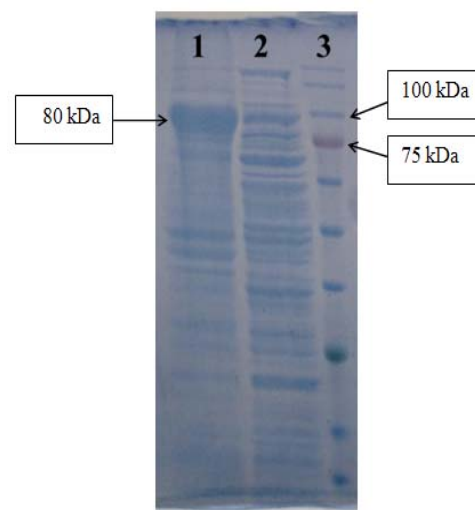
شکل ۵- الگوی الکتروفورز فرآیند تخلیص پروتئین کایمر از طریق کروماتوگرافی تمایلی با بافرهای روش دنا توره. ردیف ۱- نشانگر ملکولی پروتئین. ردیف ۲- نمونه اوره ۸ مولار حاوی کایمر پیش از عبور از ستون. ردیف ۳- نمونه اوره ۸ مولار پس از عبور از ستون. ردیف ۴- نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر C. ردیف ۵- نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر D. ردیف ۶- نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر E. ردیف ۷- نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار.

**تأیید پروتئین کایمر نوترکیب با تکنیک وسترن بلات:** نتایج حاصل از تکنیک وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی Anti His-tag HRP، پروتئین نوترکیب حاصل از القای بیان را در مقایسه با کنترل، به خوبی تأیید نمود. نتایج حاصل از تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل- سفارز، بیانگر وجود پروتئین نوترکیب در نمونه جمع‌آوری شده از مرحله آخر شستشو با درجه خلوص بالا بود (شکل ۶).

القاء نشده، پروتئین وجود نداشت. تعیین حلالیت پروتئین با استفاده از بافرهای PBS و اوره انجام شد. با الکتروفورز نمونه‌های مربوط به PBS و اوره بر روی ژل SDS-PAGE، میزان حلالیت پروتئین در سلول مشخص شد (شکل ۴). مشاهده پروتئین در نمونه حاصل از بافر PBS و وجود پروتئین در نمونه مربوط به بافر B نشان از تشکیل اجسام انکلوژنی داشت.



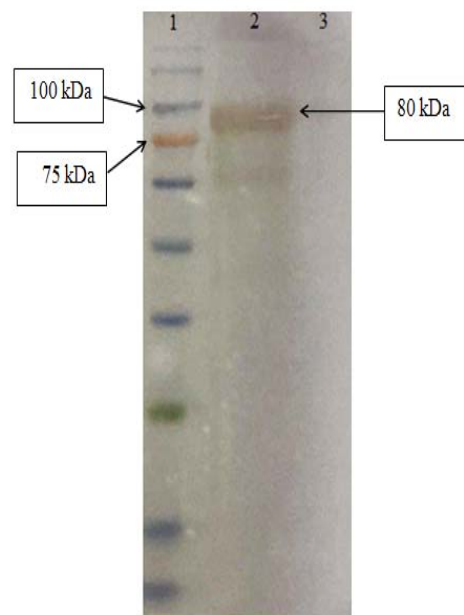
شکل ۳- تأیید زیر همسانه‌سازی ژن در پلاسمید pET32a به روش هضم آنزیمی. ستون ۱) هضم آنزیمی پلاسمیدهای تخلیص شده، ستون ۲) نشانگر اندازه DNA (DNA Ladder Mix)



شکل ۴- بررسی حلالیت پروتئین نوترکیب. ستون ۱) محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سلولهای شکسته شده در بافر اوره ۸ مولار، ستون ۲) محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سلولهای شکسته شده در PBS. ستون ۳) نشانگر اندازه پروتئین.

تکنولوژی DNA نوترکیب این امکان فراهم شد تا چهار ایمونژن هدف‌گذاری شده علیه شیگلا را به صورت یک سازه ژنی و پروتئینی نوترکیب طراحی و تهیه شود. با طراحی چنین سازه‌ای می‌توان زمینه لازم برای مقابله با اتصال باکتری در روده کوچک و نیز خنثی نمودن توکسین آن را به صورت یکجا فراهم کرد. برای دستیابی به چنین هدفی طراحی و ساخت یک ایمونژن کایمر متشکل از آنتی‌ژنهای IpaD, StxB, IpaB, VirG مدنظر قرار گرفت.

با توجه به اینکه IpaD ضروری‌ترین فاکتور در راس سیستم بیماری‌زایی شیگلا برای تهاجم باکتری به سلول میزبان محسوب می‌گردد، به عنوان یکی از آنتی‌ژنهای این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعه‌ای لونلی و همکاران، مشخص گردید غالب اپی توپهای در دسترس IpaD در ناحیه N-ترمینال نزدیک به مرکز قرار دارند چنانچه اگر فعالیت ناحیه N-ترمینال، سرکوب گردد به طور کلی منجر به سرکوب قدرت تهاجمی شیگلا می‌گردد. این نتایج به طور ویژه‌ای نشان می‌دهد که پروتئین IpaD به ویژه ناحیه N-ترمینال این پروتئین، یک فاکتور لازم در ورود باکتری شیگلا به سلولهای میزبان محسوب می‌گردد و این پروتئین به عنوان یک آنتی‌ژن بالقوه در طراحی واکسن مطرح است (۱۴). در مطالعه حصارکی و همکاران نیز چنین قطعه‌ای از IpaD به منظور بررسی ایمنی‌زایی مورد استفاده قرار گرفت (۱۰). در تحقیق حاضر نیز با بررسی بیوانفورماتیکی ۱۰۷ آمینو اسید ناحیه ابتدایی که بیشترین اپی توپ را در برداشت انتخاب گردید. بر همین اساس و با توجه به ویژگیهای عملکردی IpaB، ۲۴۲ آمینو اسید از ناحیه آمینی پروتئین انتخاب شد. در تحقیقی اقتدار دوست توالی کد کننده ۵۸۱ آمینو اسیدی را در وکتور pET22b همسانه سازی کردند. با این حال به علت محدودیت در اندازه سازه ژن کایمر در تحقیق حاضر فقط بخش واجد بیشترین اپی توپ از IpaB انتخاب گردید (۷). با توجه به اینکه زیر واحد اتصال شیگلا توکسین در مقایسه با زیر واحد عملکردی آن ایمونژن قوی تری



شکل ۶- بررسی تأیید پروتئین نوترکیب کایمر. ستون (۱) مارکر پروتئینی. ستون (۲) ظهور باند مربوط به پروتئین نوترکیب کایمر با آنتی بادی Anti His-tag HRP. ستون (۳) کنترل BSA.

## بحث و نتیجه‌گیری

روند اصلی بیماری‌زایی شیگلا، تهاجم به سلولهای اپی‌تلیال موکوزی به وسیله القاء فاگوسیتوز، فرار از لیزوزوم، تکثیر و انتشار در داخل سیتوپلاسم سلولهای اپی‌تلیال و انتقال به سلولهای مجاور است (۱). فاکتورهای تهاجمی شیگلوز حاصل فعالیت مجموعه‌ای از ژنهای کد کننده پروتئینهای اصلی برای تهاجم و مرگ ماکروفاژها می‌باشند (۱۹). در تحقیقات واکسنهای زیر واحدی و نوترکیب، رویکرد جدید استفاده از آنتی ژن چند جزئی می‌تواند با ایمنی بیشتر، پاسخ ویژه و همچنین واکنش نامطلوب کمتری در طراحی کاندید واکسن مورد استفاده باشد.

با توجه به روند بیماری‌زایی باکتری شیگلا، در تحقیق حاضر فاکتورهای بیماری‌زای IpaD, StxB, IpaB, VirG جهت تولید ایمونژن نوترکیب علیه شیگلا مورد استفاده قرار گرفت. با بهره‌گیری از روشهای بیوانفورماتیک و

توالی لینکر EAAAK می‌تواند سبب شود که هر یک از اجزای پروتئین‌های کایمر ساختار مناسب و مستقل از هم داشته باشند (۳ و ۱۶). در تحقیق انجام شده توسط خالوئی و همکاران برای طراحی پروتئین کایمر علیه سه بیماری زای روده ای /شریشاکولی انتروتوکسیژنیک، انتروهموراژیک و شیگلا از چهار تکرار این لینکر برای فاصله اندازی زیر واحدهای پروتئینی استفاده شد (۱۲). در پژوهش نظریان و همکاران جهت ایجاد فاصله بین زیر واحد های پروتئین کایمر علیه /شریشاکولی انتروتوکسیژنیک ۴ تکرار لینکر EAAAK مد نظر قرار گرفت (۱۶). در تحقیقی که توسط امانی و همکاران انجام گردید، به‌کارگیری لینکر ۴ (EAAAK) در پروتئین کایمر سبب شد که پروتئین‌های EspA، اینتیمین و Tir ساختار جداگانه داشته باشند (۳). در تحقیق حاضر نیز ۴ تکرار لینکر استفاده شد تا هر یک از اجزای پروتئینی کایمر ساختار اختصاصی خود را داشته باشند.

جهت بیان پروتئین از باکتری *E. coli* یکی از اولین و وسیع‌ترین میزبان‌هایی است که برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. از مزایای این سیستم بیانی می‌توان به بیان سریع، بازده بالا، تولید سریع در حجم انبوه و مقرون به صرفه بودن و معایب آن تولید پروتئین به شکل غیر گلیکوزیله، تولید پروتئین به همراه اندوتوکسین اشاره کرد.

به نظر می‌رسد بیان این پروتئین به صورت نوترکیب، روش مناسب، کارا و مقرون به صرفه‌ای برای تولید این پروتئین و انجام مطالعات بعدی مانند بررسی اثرات ایمنی‌زایی آن به تنهایی یا همراه با سایر عوامل باشد.

محسوب می‌شود لذا ۶۹ آمینو اسید زیر واحد اتصالی توکسین در نظر گرفته شد. هنری و همکاران نیز با انتخاب این قطعه اتصالی از توکسین شیگا، ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب STxB شیگلا دیسانتری تیپ ۱ تجویزی به موش سوری را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که موش‌های ایمن شده با پروتئین STxB به صورت تزریقی و نزال، توانستند شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 را تحمل نمایند (۱۱).

VirG پروتئین سطحی غشای خارجی با وزن ۱۱۶ کیلو دالتون در پلیمریزاسیون اکتین برای کمک به حرکت داخل سلولی باکتری دخالت دارد. پروتئین VirG از سه بخش تشکیل شده است که بخش انتهایی آن با پروتئین میزبان وارد واکنش شده و با فعال کردن کمپلکس در سیتوپلاسم، موجب چسبندگی و پلیمریزاسیون اکتین‌های گلوبولی به شکل اکتین رشته‌ای F-actin می‌شود که نتیجه آن، گسترش آلودگی در بدن میزبان است (۶). در تحقیق حاضر نیز فقط توالی ۱۳۵ اسید آمینه ای از این ناحیه که واجد اپی توپ بوده و در چسبندگی نقش دارند، انتخاب گردید.

در این پژوهش جهت طراحی پروتئین از رابط پپتیدی EAAAK (متشکل از یک اسیدآمینه گلوتامات، سه اسیدآمینه آلانین و یک اسیدآمینه لایزین) استفاده شد. به سبب ماهیت ساختاری این رابط پپتیدی (مارپیچ آلفا) و تکرارهای متوالی آن در بین زیرواحدهای موجود در کایمر جداسازی فضایی کامل هر چهار زیرواحد در ساختار سازه دور از انتظار نمی‌باشد (۱۶). در پژوهش‌های قبلی انجام‌شده، از این لینکر با تعداد ۱ تا ۵ تکرار استفاده شده است. نتایج نشان داده که به کارگیری ۴ و یا ۵ تکرار از

## منابع

یافته *virGΔ* با استفاده از سیستم *Red recombinase* λ  
مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی  
ایران). (۳) ۲۶، ۲۸۹-۳۰۵.

۱- حسینی، م. سعادت، م. نیری فسایی، ب. زهرای صالحی، ت. احمدی دانش، ح. تات، م. حسینی، ۱۳۹۲. شناسایی، همسانه سازی، تعیین توالی ژن *virG* و ایجاد سویه بومی تخفیف حدت



- 2- Agaisse, H. 2016. Molecular and Cellular Mechanisms of *Shigella flexneri* Dissemination. *Front Cell Infect Microbiol.* 6:29.
- 3-Amani, J., Salmanian, A.H., Rafati, S., Mousavi, S.L.(2010). Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157: H7. *Vaccine.* 28(42):6923-6929.
- 4- Bagheri, S., Mousavi Gargari, S.L., Rasooli, I., Nazarian, S., Alerasol, M. (2014). A CsaA, CsaB and LTB chimeric protein induces protection against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. 18(3):308-14.
- 5- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse S.A., Mietzner, T. A., (2013). Bacteriology. Chapter 15. Enteric Gram-Negative Rods (Enterobacteriaceae). in Jawetz, Melnick, & Adelberg's. *Medical Microbiology.* 149-370.
- 6- Brotcke Zumsteg, A., Goosmann, C., Brinkmann, V., Morona, R., Zychlinsky, A.(2014). IcsA is a *Shigella flexneri* adhesin regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 15(4):435-45.
- 7- Eghtedardoost, M., Saadati, M., Nazarian, S.H., Zare, M., Malaii, F., Heiat, M. (2011). Detection of IpaB in *Shigella* and cloning in pET22b. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine.* 15(49):55-61.
- 8- Gyles, C. (2007). *Shiga* toxin-producing An overview. *Journal of animal science.* 85(13):45-62.
- 9- Heine, S.J., Diaz-McNair, J., Martinez-Becerra, F.J., Choudhari, S.P., Clements, J. D., Picking W.L., Pasettia M.F. (2013). Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of orally delivered *Shigella* type III secretion system proteins IpaB and IpaD. 31(28): 2919-2929.
- 10- Hesaraki, M., Saadati, M., Honari, H., Olad, G, Heiat, M., Malaei, F., Ranjbar, R. (2013). Molecular cloning and biologically active production of IpaD N-terminal region. *Biologicals.* 41(4):269-274.
- 11- Honari, H., Amlashi, I., Minaei, M.E., Safaei, S. (2013). Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein. *Arak Medical University Journal.* 2013; 16(73): 83-93.
- 12- Khaloiee, F., Pourfarzam, P., Rasooli, I., Amani, J., Nazarian, S., Mousavi, S.L.(2013). In silico analysis of chimeric recombinant immunogen against three diarrhea causing bacteria. *Journal of Cell and Molecular Research.* 5(2):65-74.
- 13- Kueltzo, L.A., Osiecki, J., Barker, J., Picking, W.L., Ersoy, B., Picking W.D., Middaugh C.R. (2003). Structure-function analysis of invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri*. *Journal of Biological Chemistry.* *Journal of Biological Chemistry.* 278(5):2792-2798.
- 14- Lunelli, M., Lokareddy, R.K., Zychlinsky, A., Kolbe, M. (2009). IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 106(24):9661-6.
- 15- Leupold, Stefan., Petra, Büsing., Mas, P.J., Hart, D.J., Scrima, A. (2017). Structural insights into the architecture of the *Shigella flexneri* virulence factor IcsA/VirG and motifs involved in polar distribution and secretion. *Journal of Structural Biology.* 197(1):19-27.
- 16- Nazarian, S., Mousavi Gargari, S.L., Rasooli, I., Amani, J., Bagheri, S., Alerasool, M. (2012). An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. *Journal of Microbiological Methods.* 90(1):36-45.
- 17- Ranjbar, R., Dallal, MS., Pourshafie, M., Aslani. M., Majdzadeh, R. (2004). Serogroup distribution of *shigella* in Tehran. *Iranian Journal of Public Health.* 33(3):32-5.
- 18- Roehrich, A.D., Guillosoy, E., Blocker, A.J., Martinez-Argudo, I. (2001). *Shigella* IpaD has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. *Molecular Microbiol.* 87(3):690-706.
- 19- Sansonetti, P.J., (2001). III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 280(3):319-323.
- 20- Wardlaw, T., Salama, P., Brocklehurst, C., Chopra, M., Mason, E. (2010) Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *The Lancet.* 375(9718): 870-872.
- 21- Wilson, G. 2004. Rapid and Economical Method for Biochemical Screening of Stool Isolates for *Salmonella* and *Shigella* Species. *Journal Of Clinical Microbiology.* 42(10): 4821-4823.

## Expression and purification of recombinant immunogenic protein containing *Shigella dysentery* Virulence Factors

Tarrahimofrad H.,<sup>1,3</sup> nazarian Sh.<sup>2</sup> and Meimandipour A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Genetic & Animal breeding group, Animal Science and Food Technology Dept., Ramin Agriculture and Natural, Resoures University of Khouzestan, Ahwaz, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Center of Biosciences Research, Basic Sciences Dept., University of Imam Hossein (AS), Tehran, I. R. of Iran.

<sup>3</sup> Animal Biotechnology Dept., Institute of Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I. R. of Iran.

### Abstract

*Shigella dysentery* is a biological agent that causes bloody diarrhea. Making an effective immunogen against bacteria is essential by emergence of antibiotic resistance. Binding, invasive and toxin factors are one of the most important vaccine candidates against *Shigella* dysentery. Accordingly, the aim of this study was to express recombinant Immunogenic Chimeric with *Shigella Dysenteric* Virulence Factors. Chimer gene coder optimization was performed with OPTIMIZER software. The gene constructs were cloned in pET32a vector. The recombinant plasmid was transferred to *E. coli* BL21 DE3 cells and expression of the recombinant protein was induced using IPTG. The recombinant protein was purified by chromatography and was evaluated with western blotting. The codon compatibility index (CAI) for the natural gene was 0.67, while the optimized gene had an index of 0.9. The enzymatic analysis confirmed the accuracy of the chimer gene cloning in the vector. The expression of recombinant protein in *E. coli* caused the production of a recombinant protein of 80 kDa. Western blotting showed the reaction of recombinant protein with anti-histidine antibody. The amount of purified protein of the culture medium was 2.5 mg/ml. The expression of the recombinant chimeric protein with 80 kDa in *E. coli* host and its purification was successfully carried out. The recombinant chimeric protein can be injected or loaded onto nanoparticles to evaluate oral and injectable immunizations.

**Key words:** *Shigella dysentery*, recombinant protein, immunogene, chimeric protein