

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۴، شماره ۳/ مرداد و شهریور ۱۳۹۱/ ۱-۱۱

مقاله پژوهشی

بهینه سازی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب لیوپروتئین مرتبط با پتیدوگلیکان (PAL) با کتری لژیونلا پنوموفیلا

دکتر ابوالفضل قلی پور^۱، دکتر سید مجتبی موسویان^۲، دکتر حمید گله داری^۳، دکتر منوچهر مکوندی^۴، دکتر سید علی مرد^۵، دکتر حمید رجبی معماری^۶، دکتر رضا ایمانی^۷، دکتر ندا سلیمانی^۸، دکتر امیر هوشنگ الوندی^{۸*}
^۱مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲مرکز تحقیقات عفونی گرمسیری و گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران؛ ^۳گروه ژنتیک، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران؛ ^۴گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران؛ ^۵گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران؛ ^۶مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۷گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۸گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۸ اصلاح نهایی: ۹۰/۱۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۵

چکیده:

زمینه و هدف: اکثر تست های موجود برای تشخیص پنومونی لژیونلایی، با مشکلات زیادی از جمله حساسیت و ویژگی پائین و عدم توانایی در فراهم نمودن نتیجه در یک زمان کلینیکی مناسب مواجه هستند. از آنجایی که لیوپروتئین مرتبط با پتیدوگلیکان (PAL) لژیونلا پنوموفیلا در درون ادرار ترشح شده و به عنوان یک آنتی ژن در تمام سویه های آن وجود دارد. لذا برای تشخیص بیماری لژیونر از طریق ادرار مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه بهینه سازی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب PAL با کتری لژیونلا پنوموفیلا بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی بیان پروتئین PAL با تغییر در پارامترهای دانسیته سلولی، مدت زمان القاء، دمای رشد، غلظت ایزوپروپیل بتا دی تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) و نوع محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. پس از کلونینگ، عصاره پری پلاسمی تهیه و پروتئین نوترکیب PAL با استفاده از ستون رزین نیکل نیتروتری استیک اسید (NTA) تخلیص گردید. در نهایت پروتئین نوترکیب PAL با آزمایش وسترن بلاتینگ بررسی شد.

یافته ها: با استفاده از محیط کشت Terrific Broth، شروع القاء در جذب نوری ۰/۶ (طول موج ۶۰۰ نانومتر)، غلظت یک میلی مولار ماده القاء کننده IPTG، دمای رشد ۲۵ درجه سانتیگراد و مدت زمان ۱۵ ساعت پس از القاء، بهترین بیان پروتئین PAL بدست آمد. پروتئین پری پلاسمی نوترکیب PAL با استفاده از ستون رزین NTA با خلوص بیش از ۸۰٪ تخلیص گردید. نتایج آزمایش وسترن بلاتینگ نیز نشان داد که پروتئین نوترکیب PAL تخلیص شده به طور اختصاصی با آنتی بادی anti-His6-peroxidase شناسایی گردید. نتیجه گیری: با تخلیص پروتئین PAL به میزان بیش از ۸۰٪ می توان به منظور بررسی پتانسیل آن در تشخیص بیماری لژیونر و تهیه کیت تشخیصی بر اساس الیزا از آن استفاده نمود.

واژه های کلیدی: بهینه سازی، بیان، تخلیص، لیوپروتئین مرتبط با پتیدوگلیکان، لژیونلا پنوموفیلا.

مقدمه:

ضعیف شده و افراد کهنسال است (۱). تظاهرات بالینی و خصوصیات رادیوگرافی پنومونی لژیونلایی غیر اختصاصی هستند و با در نظر گرفتن علائم بالینی امکان

لژیونلا پنوموفیلا، یک باکتری گرم منفی است که باعث بیماری لژیونر می شود. این بیماری یک پنومونی بالقوه کشنده بویژه در افراد با سیستم ایمنی

تشخیص بیماری لژیونر از سایر پنومونی ها وجود ندارد (۲). میزان مرگ و میر برای بیماری لژیونر اکتسابی از بیمارستان در حدود ۵۰-۳۰ درصد است که میزان نسبتاً بالایی می باشد (۳).

برای تشخیص بیماری لژیونر تست های آزمایشگاهی متعددی وجود دارند، ولی اکثر آنها با مشکلات زیادی مواجه هستند. از جمله این مشکلات می توان به حساسیت و ویژگی پائین و عدم توانایی در فراهم نمودن نتیجه در یک زمان بالینی مناسب اشاره نمود (۴،۱). واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) اگر چه حضور DNA اختصاصی لژیونلا را در نمونه های بالینی ردیابی می کند، ولی در مورد نتایج مثبت PCR که با دیگر روش های تشخیصی تایید نشده باشند، نمی توان در باره بیماری قضاوت نهایی نمود (۵،۴،۱).

جداسازی لژیونلا از ترشحات تنفسی یا بیوپسی ریه به عنوان استاندارد طلایی تشخیص بیماری لژیونر در نظر گرفته می شوند. محدودیت عمده کشت خلط این است که ۲۵-۷۵ درصد بیماران دچار پنومونی لژیونلایی خلط دفع نمی کنند. علاوه بر این، رشد لژیونلاها آهسته بوده و ممکن است تعدادی از نمونه های حاوی لژیونلا به دلیل عدم پیگیری بعد از ۵ روز به صورت منفی کاذب گزارش شوند (۶).

تقریباً ۸۰ درصد بیماران مبتلا به عفونت با لژیونلا پنوموفیلا سرو گروه ۱، در مراحلی از دوران بیماری خویش آنتی ژن های لژیونلایی را از طریق ادرار دفع می کنند. با توجه به اینکه آزمایش جستجوی آنتی ژن ادراری در مقایسه با کشت می تواند به آسانی و بدون نیاز به مهارت های ویژه انجام شود، تشخیص آزمایشگاهی بیماری لژیونر را به کلی متحول ساخته است. به بیان دیگر این آزمایش تشخیص زود هنگام بیماری و شروع درمان آنتی بیوتیکی مناسب را امکان پذیر می نماید (۸،۷).

در زمینه تشخیص بیماری لژیونر، سه کیت تجارتي سنجش ایمنی آنزیمی (EIA) تجاری گزارش شده است

که در تعدادی از مطالعات بالینی حساسیت و ویژگی بالایی داشته اند. با این وجود، چندین محقق نشان داده اند که کیت های موجود جهت شناسایی آنتی ژن لژیونلا پنوموفیلا سرو گروه ۱ حساسیت عالی دارند ولی جهت شناسایی لژیونلا پنوموفیلاهای غیر از سرو گروه ۱ و دیگر گونه های لژیونلا حساسیت آنها متغیر است (۹،۱۰). اگر چه لژیونلا پنوموفیلا سرو گروه ۱ عامل ۷۰-۹۰ درصد از تمام موارد بیماری لژیونر در اغلب نواحی جغرافیایی می باشد، ولی با توجه به اینکه دیگر سروگروه های لژیونلا پنوموفیلا و دیگر گونه های لژیونلا نیز با وفور روزافزونی در حال شناخته شدن هستند، کاربرد گسترده این آزمایش ها مورد تردید واقع می شود (۶،۱۱).

در زمینه تست های ردیابی کننده آنتی ژن های ادراری که بتوانند عفونت ناشی از تمام گونه ها و سرو گروه های لژیونلا را تشخیص دهند، هنوز نیاز به انجام تحقیقات گسترده ای می باشد. بدین ترتیب در رابطه با تشخیص پنومونی لژیونلایی، اگر حضور یک آنتی ژن مشترک جنس لژیونلا در نمونه ادرار بیماران بتواند به عنوان هدف مورد سنجش قرار گیرد، طیف تشخیصی این آزمایش ها به طور برجسته ای افزایش خواهد یافت (۱۲،۱).

در پوشش سلولی باکتری لژیونلا پنوموفیلا آنتی ژن های مختلفی وجود دارد که در این میان پروتئین Peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) به عنوان برجسته ترین آنتی ژن سطحی باکتری مذکور محسوب می شود. اهمیت ویژه آنتی ژن PAL در این است که از یک طرف در حد بالایی بین همه گونه های لژیونلا حفظ شده است و از طرف دیگر یک آنتی ژن ادراری بوده و می تواند از طریق ادرار بیماران مبتلا به بیماری لژیونر نیز دفع شود. بنابراین بنظر می رسد این آنتی ژن بتواند جهت تشخیص بیماری ناشی از لژیونلا پنوموفیلا سرو گروه یک و سایر سرو گروه های لژیونلا پنوموفیلا و نیز دیگر گونه های لژیونلا در نظر گرفته

بعد از رشد باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط کشت LB مایع و رسیدن به جذب نوری مورد نظر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، کمیت های مذکور مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و زمان ۱ ساعت، غلظت های مختلف IPTG مورد بررسی قرار گرفت. سپس در غلظت بهینه IPTG و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، مدت زمان القاء بررسی گردید. در مرحله بعد در غلظت بهینه IPTG و زمان القاء، دماهای رشد مختلف بررسی شد و در نهایت شرایط مشابهی با استفاده از محیط کشت TB نیز بررسی شد.

پس از اینکه به کمک نتایج حاصل از ژل سدیم دو دسیل سولفات-پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) بهترین شرایط بیانی مشخص گردید، بیان پروتئین نوترکیب PAL در حجم بالا انجام شد. برای این کار حجم ۵ میلی لیتر از محیط TB دارای آنتی بیوتیک کانامیسین با یک کلنی از باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب تلقیح گردید و انکوباسیون شبانه در انکوباتور شیکردار (۲۵۰ rpm) انجام شد. در روز بعد حجم ۵۰۰ میلی لیتر از محیط TB آنتی بیوتیک دار با محیط کشت انکوبه شده تلقیح گردید و دوباره در انکوباتور شیکردار با شرایط مذکور قرار گرفت. در طی انکوباسیون حجم های اندکی از محیط کشت انکوبه شده برداشت شد و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. پس از رسیدن دانسیته سلولی به جذب نوری مورد نظر، چندین حجم از محیط کشت تحت عنوان سلول القاء نشده برداشت شد و سپس بقیه محیط کشت با غلظت بهینه IPTG القاء شد. سپس محیط کشت انکوبه شد و بعد از لحاظ نمودن دما و زمان بهینه شده در مرحله قبل، سلول ها با دور ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و به منظور تهیه عصاره پری پلاسمی برداشت شدند.

در ابتدا شرایط تهیه عصاره پری پلاسمی در مقیاس کم بهینه سازی شد و سپس عصاره پری پلاسمی در مقیاس بالا تهیه گردید. برای بدست آوردن

شود. علاوه بر این از آنجایی که آنتی ژن مذکور در همه گونه های لژیونلا وجود دارد می تواند به عنوان یک واکسن در پیشگیری از عفونت های ناشی از لژیونلاها محسوب شود (۱۴،۱۳).

با توجه به اینکه این آنتی ژن در شناسایی عفونت های لژیونلایی و نیز در تولید واکسن علیه این عفونت ها اهمیت بسیار فراوانی دارد، این مطالعه با هدف بهینه سازی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب PAL باکتری لژیونلا پنوموفیلا به منظور بررسی پتانسیل آن در تشخیص بیماری لژیونر و تهیه کیت تشخیصی بر اساس ELISA انجام شده است.

روش بررسی:

در بررسی قبلی کلونینگ و بیان اولیه پروتئین نوترکیب PAL به کمک وکتور پلاسمیدی pET26b (شرکت Invitrogen) انجام شد (۱۵). در این مطالعه تجربی ژن pal به نحوی وارد وکتور شده است که توالی پلی هیستیدین در انتهای کربوکسیلی و سیگنال peIB در ابتدای آمینی آن قرار گرفته باشد. در واقع سیگنال peIB به منظور ترشح پروتئین به فضای پری پلاسمی و در نتیجه سهولت تخلیص پروتئین در نظر گرفته شده است. پس از بیان اولیه پروتئین نوترکیب مذکور در محیط کشت Luria bertani (LB) (شرکت مرک آلمان) دارای آنتی بیوتیک کانامیسین و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، بهینه سازی بیان، بیان بالا و تخلیص تک مرحله ای پروتئین نوترکیب PAL بررسی گردید. بهینه سازی بیان و تولید پروتئین نوترکیب در وکتور pET26b برای پنج کمیت دانسیته سلولی در زمان القاء (جذب نوری ۰/۴ تا ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر)، مدت زمان القاء (۱۵،۱۲،۱۰،۸،۶،۴،۲،۱ ساعت)، دمای رشد (۳۷ و ۲۵ درجه سانتیگراد)، نوع محیط کشت LB و Terrific broth (TB) (شرکت مرک آلمان) غلظت ماده القاء کننده Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (۱/۵ تا ۱/۵ میلی مولار) ارزیابی گردید. برای این منظور

عصاره که موجب آسیب به رزین Ni-NTA می شد و هم به منظور جایگزین نمودن بافر کروماتوگرافی به جای آب انجام گردید (۱۶، ۱۷).

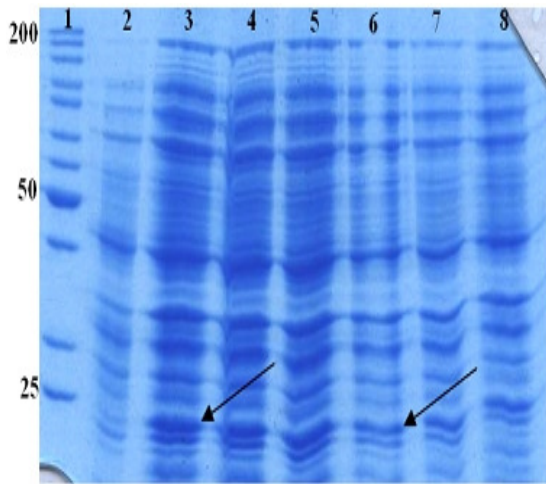
در مرحله بعد پروتئین نوترکیب به کمک ستون نیکل-نیترو تری استیک اسید (Ni-NTA) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (Qiagen) در یک مرحله تخلیص شد. بدین منظور مقدار ۵ میلی لیتر از رزین NTA به وسیله محلول کلرید نیکل ۲ درصد شارژ گردید. پس از رزین شارژ شده با ۵ میلی لیتر آب دیونیزه استریل شستشو داده شد و با حجم ۱۰ میلی لیتر بافر کروماتوگرافی به تعادل رسید. سپس پروتئین نوترکیب PAL به رزین اضافه شد و به مدت دو ساعت با سرعت ۶۰ rpm روی یخ خرد شده شیک گردید. پس از مدت زمان انکوباسیون این مجموعه به ستون تخلیص (Qiagen) منتقل گردید و با حجم ۲۰ میلی لیتر بافر کروماتوگرافی شستشو داده شد. سپس با اضافه نمودن حجم ۲۰ میلی لیتر بافر elution (بافر کروماتوگرافی حاوی ۵۰۰ میلی مولار ایمیدازول) پروتئین نوترکیب از ستون خارج شد. در طی این مرحله فراکشن هایی گرفته شد و خلوص فراکشن های خارج شده از ستون با استفاده از SDS-PAGE، رنگ آمیزی کوماسی بلو و وسترن بلائینگ (با استفاده از anti-His6 peroxidase antibodies) بررسی گردید. پس از بررسی خلوص، فراکشن های با خلوص بالا در یک لوله فالکن جمع آوری و علیه PBS دیالیز شدند.

یافته ها:

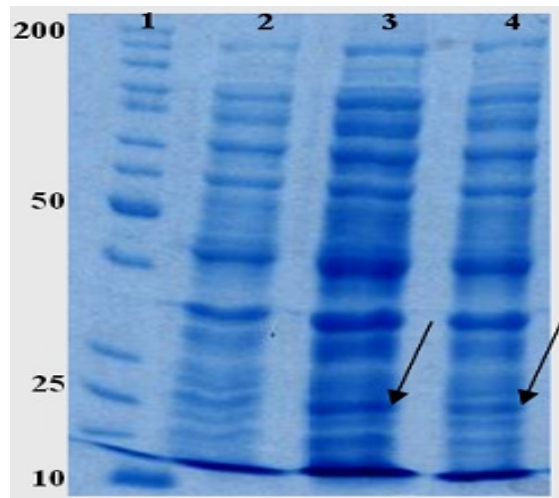
بهینه سازی شرایط بیان و بیان پروتئین نوترکیب PAL در مقیاس بالا: نتایج حاصل از بهینه سازی بیان نشان داد که بهترین بیان هنگام استفاده از محیط کشت TB، جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، مدت زمان ۱۵ ساعت پس از القاء، غلظت یک میلی مولار ماده القاء کننده IPTG و دمای رشد ۲۵ درجه سانتیگراد صورت گرفته است (تصاویر شماره های ۱-۲). پس از این که به کمک نتایج

پروتئین های پری پلاسمی لازم است دیواره خارجی باکتری تخریب گردد. به این منظور توده سلولی تهیه شده از مرحله قبل ابتدا در حجم ۵۰ میلی لیتر بافر A (0.02M Tris-HCl) شستشو داده شد. در مرحله بعد توده سلولی حاصله ابتدا در حجم ۲۵ میلی لیتر بافر A به صورت سوسپانسیون در آمد سپس به این مجموعه پودر لیزوزیم (غلظت ۱ mg/mL) (Boehringer, Germany) و یک عدد قرص Protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Germany) اضافه شد. در ادامه در حالی که به کمک یک میله شیشه ای استریل سوسپانسیون به آرامی به هم زده می شد، حجم ۲۵ میلی لیتر بافر B (سوکروز ۰/۲٪، 0.02M Tris-HCl، 0.5M EDTA) نیز به آن اضافه گردید. در مرحله بعد با قرار دادن سوسپانسیون سلولی روی شیکر، (دور ۶۰ rpm، مدت زمان ۱۵ دقیقه و دمای اتاق) محلول یکنواختی حاصل شد. سپس سلول ها با دور ۲۵۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شده، مایع بالایی برداشته و سعی شد رسوب حاصله حتی الامکان بدون مایع بالایی باشد. در مرحله بعد به رسوب حاصله حجم ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه سرد شده روی یخ اضافه شد و رسوب دوباره به شکل سوسپانسیون درآمد. سپس با قرار دادن سوسپانسیون سلولی روی شیکر، (دور ۶۰ rpm، مدت زمان ۱۵ دقیقه و روی یخ خرد شده) محلول یکنواختی حاصل شد و بعد از آن سلول ها با دور ۱۶۰۰۰ rpm، به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شده و در نهایت مایع بالایی که حاوی پروتئین های پری پلاسمی بود برداشته شد (۱۶).

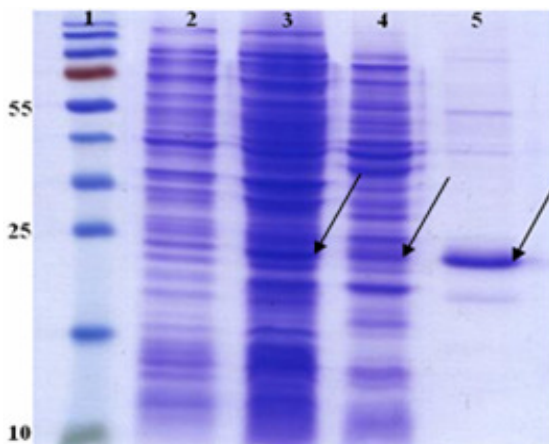
در مرحله بعد به منظور تغلیظ پروتئین نوترکیب PAL، محلول به دست آمده از مرحله قبل درون کیسه دیالیز با cut off کمتر از ۱۰ کیلو دالتون ریخته شد و به وسیله سوکروز تغلیظ گردید. قبل از تخلیص نیز، عصاره پری پلاسمی علیه بافر کروماتوگرافی (20 mM Tris-Cl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) دیالیز گردید. دیالیز هم به منظور برداشت EDTA درون



تصویر شماره ۲: بررسی بهینه سازی شرایط بیان پروتئین نو ترکیب PAL با تغییر غلظت IPTG
 ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئینی #SM0661 (بر اساس کیلو دالتون)، ستون ۲: نمونه القاء نشده، ستون های ۳، ۴ و ۵: نمونه القاء شده با شرایط اپتیمم و غلظت ۱ میلی مولار IPTG، ستون های ۶، ۷ و ۸: نمونه القاء شده با شرایط اپتیمم و غلظت های ۰/۱، ۰/۳، و ۰/۵ میلی مولار IPTG
 PAL: لیوپروتئین مرتبط با پپتیدوگلیکان
 IPTG: ایزوپروپیل بتا دی تیوگالاکتوپیرانوزید



تصویر شماره ۱: بررسی بهینه سازی شرایط بیان پروتئین نو ترکیب PAL با تغییر دمای رشد.
 ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئینی #SM0661 (بر اساس کیلو دالتون)، ستون ۲: نمونه القاء نشده، ستون ۳: نمونه القاء شده با شرایط اپتیمم و انکوبه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد، ستون ۴: نمونه القاء شده با شرایط اپتیمم و انکوبه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد
 PAL: لیوپروتئین مرتبط با پپتیدوگلیکان



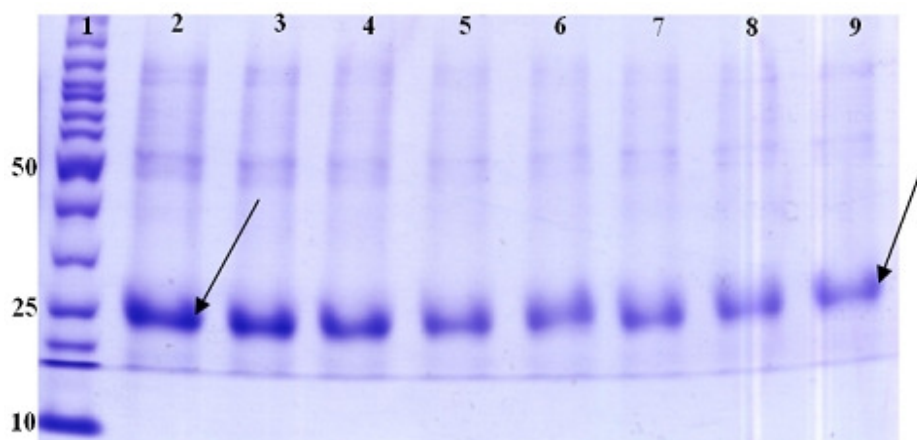
تصویر شماره ۳: آنالیز ژل سدیم دو دسیل سولفات- پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) پروتئین نو ترکیب PAL سیتوپلاسمی، پری پلاسمی و تخلیص شده
 ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئینی #SM0671 (بر اساس کیلو دالتون)، ستون ۲: نمونه القاء نشده، ستون ۳: پروتئین نو ترکیب PAL سیتوپلاسمی، ستون ۴: پروتئین نو ترکیب PAL پری پلاسمی، ستون ۵: پروتئین نو ترکیب PAL تخلیص شده
 PAL: لیوپروتئین مرتبط با پپتیدوگلیکان

حاصل از SDS-PAGE بهترین شرایط بیانی مشخص شد، بیان پروتئین نو ترکیب PAL در حجم ۵۰۰ میلی لیتر انجام شد که منجر به ایجاد توده سلولی قابل توجهی شد. رسوب سلولی مذکور به منظور تهیه عصاره پری پلاسمی برداشت گردید.
 تهیه عصاره پری پلاسمی:

با انجام SDS-PAGE، رنگ آمیزی با کوماسی بلو و مقایسه الگوی پروتئین های سیتوپلاسمی و پری پلاسمی سلول های باکتریایی حاوی پلاسمید نو ترکیب pET26b-pal قبل و بعد از القاء بوسیله ماده القاء کننده IPTG مشخص گردید که یک بانده پروتئینی با اندازه ای حدود ۲۱ کیلو دالتون، معادل با وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب PAL، در الگوی پروتئین های سیتوپلاسمی و پری پلاسمی سلول های باکتریایی القاء شده وجود داشت در حالی که بانده پروتئینی مذکور در

چک شد و نتایج حاصل نشان داد که باند پروتئین نوترکیب با وزن مذکور در عصاره پری پلاسمی تهیه شده در مقیاس بالا نیز وجود داشت. (تصویر شماره ۳). نتایج حاصل از انجام SDS-PAGE و رنگ آمیزی با کوماسی بلو با روش وسترن بلائینگ تایید شد به طوری که در ستون دوم که مربوط به نمونه قبل از القاء است هیچ بانندی مشاهده نمی شود

الگوی پروتئینی سلول های باکتریایی القاء نشده وجود نداشت (تصاویر شماره های ۱-۲). به کمک نتایج اولیه حاصل از انجام SDS-PAGE و رنگ آمیزی با کوماسی بلو بر روی عصاره پری پلاسمی تهیه شده در مقیاس کم، بهترین شرایط برای تهیه عصاره پری پلاسمی در مقیاس بالا در نظر گرفته شد. الگوی پروتئینی سلول های نوترکیب دوباره از نظر داشتن باند پروتئینی مورد نظر



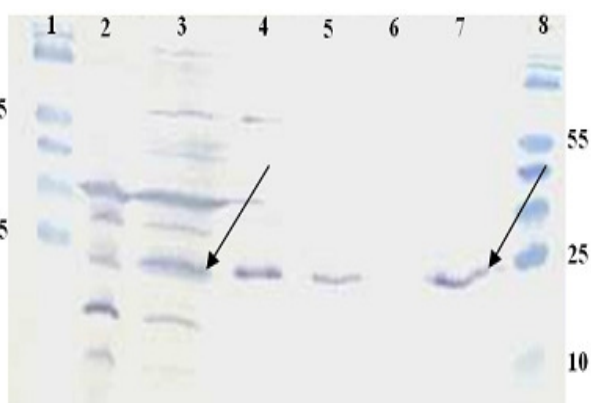
تصویر شماره ۴: آنالیز ژل سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) پروتئین نوترکیب PAL الوت شده از ستون تخلیص نیکل-نیتروتری استیک اسید Ni-NTA ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئینی #SM0661 (بر اساس کیلو دالتون)، ستون ۲-۹: فراکشن های نهایی الوت شده با بافر کروماتوگرافی حاوی ۵۰۰ میلی مولار ایمیدازول (پروتئین نوترکیب PAL تخلیص شده).

ولی در سایر ستون ها بیان پروتئین نوترکیب با وزن مذکور مشاهده گردید.

تخلیص پروتئین نوترکیب به کمک ستون نیکل-نیتروتری استیک اسید (Ni-NTA):

فرایند تخلیص شامل اتصال عصاره پری پلاسمی تغلیظ شده حاوی پروتئین نوترکیب PAL به رزین NTA شارژ شده با یون نیکل، و در نهایت شستشو با بافر elution بود. نمونه های قبل از القاء، القاء شده

سیتوپلاسمی و پری پلاسمی و فراکشن های نهایی خارج شده از ستون به روش SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از انجام SDS-PAGE و رنگ آمیزی با کوماسی بلو نشان داد که بیان پروتئین در نمونه پس از القاء به وضوح قابل مشاهده بود. اندازه باند پروتئین تخلیص شده که بدنبال افزودن دنباله



تصویر شماره ۵: آنالیز وسترن بلائینگ پروتئین نوترکیب PAL سیتوپلاسمی، پری پلاسمی و تخلیص شده: ستون ۱ و ۸: نشانگر وزن مولکولی پروتئینی #SM0671 (بر اساس کیلو دالتون)، ستون ۲: نمونه القاء نشده، ستون ۳: پروتئین نوترکیب PAL سیتوپلاسمی، ستون ۴: پروتئین نوترکیب PAL پری پلاسمی، ستون ۵ و ۷: پروتئین نوترکیب PAL تخلیص شده، ستون ۶: بدون نمونه PAL، لیوپروتئین مرتبط با پیتیدوگلیکان

بررسی هر فاکتور نتایج حاصل از ارزیابی پارامترهای قبل نیز دخالت داده شد. پارامترهایی که مورد بررسی قرار گرفتند، شامل دانسیته سلولی در زمان القاء، مدت زمان القاء، دمای رشد، غلظت ماده القاء کننده IPTG و نوع محیط کشت بود. نتایج نشان داد که بهترین بیان هنگام استفاده از محیط کشت TB و جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر اتفاق افتاد. محیط کشت TB در مقایسه با LB broth از طرفی غنی تر بوده و موجب می شود باکتری نوترکیب سریع تر به جذب نوری مورد نظر برسد و پروتئین نوترکیب به مقدار بیشتری تولید شود و از طرف دیگر نیز محیط TB ویژگی بافری بیشتری دارد که باعث می شود محصولات باکتریایی تولید شده به راحتی نتوانند pH اپتیمم محیط کشت را تغییر دهند (۲۰). در مورد غلظت IPTG، با افزایش غلظت از ۰/۱ تا یک میلی مولار، میزان بیان افزایش یافت، ولی غلظت های بالاتر از یک میلی مولار IPTG به افزایش بیان منجر نشدند که علت این امر می تواند ناشی از آن باشد که در غلظت یک میلی مولار IPTG همه پروموتورهای وکتور القاء و اشباع شده اند و غلظت های بیشتر IPTG نمی تواند در میزان بیان تاثیری داشته باشد. در خصوص مدت زمان القاء و دمای رشد مشاهده گردید که هنگامی که محیط کشت القاء شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه می شد بعد از گذشت زمان اندکی بعد از القاء (ساعت های اولیه) میزان بیان همه پروتئین ها از جمله پروتئین نوترکیب بالا بود. نظر به اینکه که تعداد پروتئین ها و نامحلول بودن آنها مرحله تخلیص پروتئین نوترکیب را با مشکل مواجه می کند، شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتیگراد و مدت زمان القای طولانی در نظر گرفته شد. در دماهای پایین تر (۲۵ درجه سانتیگراد) و انکوباسیون طولانی تر سرعت سنتز پروتئین توسط باکتری و در پی آن تشکیل اجسام انکلوژنی کاهش می یابد. در واقع با استفاده از غلظت های کمتر ماده القاء کننده، کاهش دمای رشد و بیان پروتئین به صورت فیوژن حلالیت پروتئین نوترکیب افزایش یافت

هیستیدینی بدست آمد نیز مطابق با اندازه از قبل پیش بینی شده بود و پروتئینی با همان وزن مولکولی در فراکشن های نهایی نیز مشاهده گردید (تصویر شماره ۳). بعد از این کروماتوگرافی تک مرحله ای درجه خلوص پروتئین نوترکیب PAL بالای ۸۰ درصد بود (تصویر شماره ۴). فراکشن های با خلوص بالا در یک لوله فالکن جمع آوری و عمل دیالیز علیه PBS انجام شد. به منظور استریل نمودن پروتئین نوترکیب خالص شده از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استفاده شد و با استفاده از روش براد فورد غلظت آن برابر ۵۰۰ $\mu\text{g/mL}$ تعیین گردید. در نهایت نتایج حاصل از انجام روش وسترن بلائینگ با استفاده از anti-His6 peroxidase بر روی پروتئین های سیتوپلاسمی، پری پلاسمی و پروتئین نوترکیب خالص شده سلول های باکتریایی القاء شده، نیز نشان داد که پروتئین تولید شده حاوی اپی توپ هیستیدینی می باشد و در واقع حضور پروتئین نوترکیب خالص شده PAL با وزن مورد نظر تایید گردید (تصویر شماره ۵).

بحث:

نظر به اینکه در اکثر موارد پروتئین های نوترکیب از نظر ساختاری ویژگی های پروتئین طبیعی را دارند، در خصوص اغلب باکتری ها از جمله باکتری های نسبتاً کند رشد و پر نیاز نظیر *لژیونلا پنوموفیلا* تولید پروتئین های نوترکیب بسیار مقرون به صرفه است. در این راستا به کمک تکنولوژی DNA نوترکیب می توان تولید پروتئین های نوترکیب را به میزان دلخواه افزایش داد. علاوه بر این، با اضافه نمودن برچسب هایی مثل دنباله هیستیدینی به پروتئین های نوترکیب تخلیص و شناسایی آنها نسبت به پروتئین طبیعی راحت تر انجام می شود (۱۹،۱۸).

به منظور بهینه سازی بیان پروتئین نوترکیب PAL چندین پارامتر از مجموعه پارامترهای موثر در میزان بیان پروتئین نوترکیب تغییر داده شد و در

که این نتیجه با نتایج محققین دیگر مطابقت دارد (۲۳-۲۱). علاوه بر مد نظر قرار دادن شرایط فوق، پروتئین نوترکیب PAL بصورت پری پلاسمی بیان گردید. در واقع فضای پری پلاسمی باکتری *E. coli* محیط مناسبی برای تولید انواع پروتئین های نوترکیب می باشد. بیان پری پلاسمی پروتئین دارای چندین مزیت می باشد. فضای پری پلاسم باکتری تنها ۴ درصد از کل پروتئین های سلولی را داراست و مشکل از حدود ۱۰۰ پروتئین می باشد. همچنین به علت محافظت پروتئینی در برابر پروتئازهای سیتوپلاسمی و اجتناب از ایجاد اجسام انکلوزنی ناشی از بیان پروتئین نوترکیب در سیتوپلاسم، این فضا نسبت به سیتوپلاسم جهت بیان ترجیح داده می شود (۲۴). در تحقیقی مشابه Yoon و همکاران جهت تولید پروتئین نوترکیب PAL از وکتور pGEX-KG استفاده نمودند (۱۴). در آن تحقیق پروتئین PAL به صورت سیتوپلاسمی بیان گردیده است و به وسیله فیوژن شدن با glutathione S-transferase (GST) و دو مرحله کروماتوگرافی تخلیص شده است. این در حالی است که در مطالعه حاضر پروتئین نوترکیب PAL به صورت پری پلاسمی بیان گردید و با یک مرحله کروماتوگرافی تخلیص شد. یکی از مهمترین جنبه هایی که هنگام طراحی یک سیستم بیان ژن و تهیه پروتئین نوترکیب خالص باید در نظر داشت مرحله خالص سازی آن می باشد. با توجه به اینکه هر مرحله خالص

سازی هزینه های خود را داشته و در هر مرحله بخشی از پروتئین به هدر رفته و یا غیر فعال می شود، بنابراین هر چه مراحل خالص سازی کمتر باشد به همان اندازه روش تخلیص مناسب تر خواهد بود (۲۵،۲۶).

نتیجه گیری:

از آنجایی که تهیه پروتئین طبیعی PAL باکتری لژیونلا به روش کشت انبوه و خالص سازی آن فرایند بسیار مشکلی بوده و از طرفی مقدار این پروتئین نیز به حدی است که خالص سازی فرم طبیعی آن مقرون به صرفه نیست، در این مطالعه پروتئین نوترکیب PAL و تخلیص تک مرحله ای آن پروتئین نوترکیب مذکور به صورت خالص و با غلظت بالا تهیه گردید. از آنجا که این پروتئین به عنوان یک کاندید مناسب جهت استفاده در تست های تشخیصی آزمایشگاهی می باشد در مراحل بعدی مطالعه پتانسیل تشخیصی پروتئین تخلیص شده بررسی خواهد شد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با شماره ۸۶۱۱۷ می باشد. لذا بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تشکر و قدردانی بعمل می آید.

منابع:

1. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(3): 506-26.
2. Edelstein PH. Legionnaires' disease. Clin Infect Dis. 1993 Jun; 16(6): 741-7.
3. Winn CW, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger CP. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

4. Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GF. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J Med Microbiol*. 2004; 53(3): 183-7.
5. Maiwald M, Helbig JH, Luck PC. Laboratory methods for the diagnosis of Legionella infections. *J Microbiol Methods*. 1998; 33: 59-79.
6. Waterer GW, Baselski VS, Wunderink RG. Legionella and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. *Am J Med*. 2001; 110(1): 41-8.
7. Helbig JH, Uldum SA, Bernander S, Luck PC, Wewalka G, Abraham B. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(2): 838-40.
8. Kashuba AD, Ballou CH. Legionella urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy. *Diag Microbiol Infect Dis*. 1996 Mar; 24(3): 129-39.
9. Dominguez J, Gali N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, et al. Assessment of a new test to detect Legionella urinary antigen for the diagnosis of Legionnaires' Disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 41(4): 199-203.
10. Kim MJ, Sohn JW, Park DW, Park SC, Chun BC. Characterization of a lipoprotein common to Legionella species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(7): 2974-9.
11. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A. Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis*. 2002; 186(1): 127-8.
12. Tang PW, Toma S. Broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Legionella soluble antigens. *J Clin Microbiol*. 1986 Oct; 24(4): 556-8.
13. Engleberg NC, Howe DC, Rogers JE, Arroyo J, Eisenstein BI. Characterization of a *Legionella pneumophila* gene encoding a lipoprotein antigen. *Mol Microbiol*. 1991; 5(8): 2021-9.
14. Yoon WS, Park SH, Park YK, Park SC, Sin JI, Kim MJ. Comparison of responses elicited by immunization with a Legionella species common lipoprotein delivered as naked DNA or recombinant protein. *DNA Cell Biol*. 2002; 21(2): 99-107.
15. Gholipour A, Moosavian M, Galehdari H, Makvandi M, Rajabi Memari H, Alvandi AH. Cloning and periplasmic expression of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) protein of Legionella pneumophila in *Escherichia coli*. *Jundishapur J Microbiol*. 2010; 3(1): 1-9.
16. Wilton R, Yousef MA, Saxena P, Szpunar M, Stevens FJ. Expression and purification of recombinant human receptor for advanced glycation endproducts in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2006 May; 47(1): 25-35.
17. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
18. Michel P, Torkkeli T, Karp M, Oker-Blom C. Expression and purification of polyhistidine-tagged firefly luciferase in insect cells--a potential alternative for process scale-up. *J Biotechnol*. 2001; 85(1): 49-56.
19. Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*. 1996; 19; 260(3): 289-98.
20. Vasina JA, Peterson MS, Baneyx F. Scale-up and optimization of the low-temperature inducible cspA promoter system. *Biotechnol Prog*. 1998; 14(5): 714-21.

21. Balderas Hernandez VE, Paz Maldonado LM, Medina Rivero E, Barba de la Rosa AP, Jimenez-Bremont JF, Ordonez Acevedo LG. Periplasmic expression and recovery of human interferon gamma in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2008; 59(1): 169-74.
22. Georgiou G, Valax P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 1996; 7(2): 190-7.
23. Hunke S, Betton JM. Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2003 Dec; 50(5): 1579-89.
24. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1996; 60(3): 512-38.
25. Clark ED. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol*. 2001; 12(2): 202-7.
26. Rastgar Jazii F, Karkhane AA, Yakhchali B, Fatemi SS, Deezagi A. A simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor from periplasmic space of *Escherichia coli*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 856(1-2): 214-21.

Optimization of gene expression and purification of *Legionella pneumophila* peptidoglycan associated lipoprotein recombinant protein

Gholipour A (PhD)¹, Moosavian M (PhD)², Galehdari H (PhD)³, Makvandi M (PhD)²,
Mard SA (PhD)⁴, Rajabi-Memari H (PhD)⁵, Imani R (MD)⁶, Soleimani N (MD)⁷,
Alvandi AH (PhD)^{8*}

¹Medical Plants Research Center and Microbiology Dept, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R.Iran; ²Infectious Diseases and Tropical Research Center and Microbiology Dept, Ahvaz Joundishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.Iran; ³Genetics Dept, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R.Iran; ⁴Physiology Dept., Ahvas Joundishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.Iran; ⁵Agronomy and Plant Breeding Dept., Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R.Iran; ⁶Cellular and Molecoular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R.Iran; ⁷Pathology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; ⁸Microbiology Dept., Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I.R.Iran.

Received: 28/Jan/2012

Revised: 21/Feb/2012

Accepted: 5/Mar/2012

Background and aims: There are many problems with most of the available diagnostic tests used to diagnose *Legionella* pneumonia, including inadequate sensitivity and specificity, and inability to provide a result in a clinically useful time period. *Legionella pneumophila* PAL protein has been considered as a target for detecting of Legionella infection from urine specimen, because it is conserved sequence and is secreted into the urine. The aim of this study was to optimize expression and purification of *L. pneumophila* PAL protein.

Methods: In this experimental study, optimizing of 5 parameters (cell density, induction time, growth temperature, IPTG concentration and type of medium) was performed. After expression, periplasmic extract was prepared and recombinant PAL protein purified using Ni²⁺-charged resin column. Finally, recombinant PAL protein was verified by Western blotting.

Results: In terrific broth medium, the optimum condition of r-PAL protein induction was occurred at an OD600 of 0.6, 1mM IPTG concentration and 15 hours incubation at 25°C Recombinant periplasmic PAL protein was highly purified (>80%) using Ni-NTA column. Western blotting analysis showed that recombinant PAL protein was also specifically recognized by anti-His6-peroxidase antibody.

Conclusion: By purification of recombinant PAL protein in purity greater than 80% it can be used to evaluate its capacity in diagnosis of Legionella infection and preparation of diagnostic kit.

Keywords: Optimization, Expression, Purification, Peptidoglycan associated lipoprotein, *Legionella pneumophila*.

Cite this article as: Gholipour A, Moosavian M, Galehdari H, Makvandi M, Mard SA, Rajabi-Memari H, et al. Optimization of gene expression and purification of *Legionella pneumophila* peptidoglycan associated lipoprotein recombinant protein. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012 July, Aug; 14(3): 1-11.

***Corresponding author:**

Microbiology Dept., Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I.R.Iran.
Tel: 00989188398490, E-mail:ah_alvandi@kums.ac.ir