View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۳، شماره ۵/ آذر و دی ۱۳۹۰/ ۸۲-۷۲

مقاله پژوهشی

همسانه سازی، بررسی بیوانفورماتیکی و بیان ژن زیر واحد اصلی فاکتور کلونیزاسیون I *اشرشیاکولی* انتروتوکسیژنیک (ETEC)

زهرا احصایی[۱]، جعفر سلیمیان*[۱]، شهرام نظریان[۱]، راضیه خالصی[۱]، غلامرضا اولاد[۱]، جعفر امانی[۱]

گروه علوم زیستی – دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲ اصلاح نهایی: ۸۹/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: **اشرشیاکولی انتروتوکسیژنیک (ETEC) عامل اصلی اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه و مسافران به این مناطق می‌باشد. از طریق ساختارهای سطحی به نام فاکتورهای کلونیزاسیون به سلول‌های میزبان متصل می شود. *اشرشیاکولی* انتروتوکسیژنیک در بسیاری از مناطق شیوع فاکتور کلونیزاسیون نوع یک (CFA/I) از سایر فاکتورهای کلونیزاسیون بیشتر می باشد و این ترکیب به عنوان ترکیب کلیدی در تولید واکسن محسوب می‌گردد. مولکول کد کننده زیر واحد اصلی آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون (CfaB) به عنوان زیر واحد اصلی این فیمبریه کاندیدای مناسبی برای واکسن می‌باشد. این مطالعه با هدف همسانه سازی ژن CfaB و بررسی تولید پروتئین نوترکیب انجام شد.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی اطلاعات مربوط به ژن فاکتور کلونیزاسیون CfaB از بانک ژن استخراج شد و پرایمرهای مناسب آن طراحی شدند. با استفاده از واکنش PCR، ژن مورد نظر تکثیر و سپس درون ناقل همسانه‌سازی (pTZ57R/T) و سپس در ناقل بیانی ((pET28a(+)) همسانه سازی شد و بیان ژن CfaB مورد ارزیابی قرار گرفت.**

یافته‌ها: **صحت همسانه سازی با استفاده از واکنش هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد. بیان این توالی در شرایط مختلف مانند دما، میزبان و محیط کشت های مختلف بررسی گردید اما توالی طبیعی در pET 28a بیان نداشت.**

نتیجه‌گیری: **در طول توالی ژن کد کننده زیر واحد اصلی آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون کدون های نادر پشت سرهم وجود دارد که باعث کاهش بیان این پروتئین می شود.**

واژه های کلیدی: *اشرشیاکولی* انتروتوکسیژنیک، زیر واحد اصلی فاکتور کلونیزاسیون نوع I (CfaB)، همسانه سازی.

مقدمه:

اشرشیاکولی انتروتوکسیژنیک (ETEC) اصلی ترین مشکل سلامت در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود (۱). اسهال ناشی از ETEC در میان نوزادان و مسافران، به ویژه در کشورهای جهان سوم که از امکانات بهداشتی و درمانی پایینی برخوردار بوده شیوع گسترده‌ای دارد (۲). بیماری اسهالی مربوطه سالانه ۴۰۰-۲۸۰ میلیون کودک زیر ۵ سال را در کشورهای در حال توسعه تحت تاثیر قرار می دهد. شیوع اسهال ETEC همچنین در مواقع بلایای طبیعی مثل سیل و زلزله سلامت افراد را به خطر می اندازد (۳،۲). باتوجه به اهمیت این بیماری در ایجاد تلفات انسانی و زیان های اقتصادی زیاد در جوامع، سازمان بهداشت جهانی درصدد راهکارهای تولید واکسن مناسب علیه این ارگانیسم می باشد (۱).

مرحله مهم بیماری‌زایی ETEC، توانایی چسبیدن و کلونیزه شدن این ارگانیسم به مخاط روده کوچک از طریق فاکتورهای کلونیزاسیون یا فیمبریه می باشد. این ارگانیسم با کلونیزه شدن در سطح روده

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه امام حسین (ع)- دانشکده علوم پایه-گروه علوم زیستی- تلفن: ۰۹۱۲۵۷۵۷۱۰۲، E-mail:jafarsalimyan@yahoo.com

کوچک بر مکانیسم های دفاعی روده کوچک غلبه می‌کند و سپس با ترشح انتروتوکسین های حساس به حرارت (LT) و مقاوم به حرارت (ST) منجر به تخریب مسیرهای انتقال پیام داخل سلول روده‌ای میزبان، تحریک روده و ترشح حجم زیادی از مایعات از روده و اسهال می‌شود (۵،۴). شواهد قابل توجهی وجود دارد که برای ایجاد مصونیت علیه این بیماری، فاکتورهای کلونیزاسیون می‌توانند مصونیت وسیع‌الطیف ایجاد کنند بنابراین طراحی واکسن بر اساس این فاکتورها ضروری به نظر می رسد (۶،۵).

مطالعات اپیدمیولوژیکی در نقاط مختلف جهان نشان داده است که از بین ۲۵ نوع فاکتور کلونیزاسیون شناسایی شده این ارگانیسم، فاکتور کلونیزاسیون نوع یک (CFA/I) اولین فاکتور کلونیزاسیون شناسایی شده و رایج‌ترین فاکتور کلونیزاسیون در سویه‌های ETEC محسوب می‌شود و سویه‌های بیان کننده این فاکتور در مناطق اندمیک آمریکای جنوبی و آسیا گسترده هستند (۷،۶). ژن این فیمبریه و توکسین مقاوم به حرارت بر روی پلاسمید NTP113 قرار گرفته‌است (۹،۸). بیان ۴ ژن cfaABCE دراپرون CFA/I برای مونتاژ فیمبریه ضروری است. از نظر ساختاری مولکول CFA/I یک رشته مارپیچ طویل متشکل از بیش از هزار زیر واحد اصلی CfaB متصل به یک یا چند زیر واحد رأسی فرعی ادهسیو CfaE می باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که زیر واحد CfaB به عنوان زیر واحد اصلی فیمبریه نقش مهمی در اتصال باکتری به سلول های اپی‌تلیال روده ایفا می‌کند (۱۱،۱۰). بنابراین آنتی بادی مونوکلونال علیـــه این پروتئین قادر است از اتصال سلول های بیان کننده CFA/I به سلول های روده انسان جلوگیری کند (۱۲). همچنین زیر واحد اصلی به عنوان مشخصه آنتی ژنی فیمبریه محسوب می‌شود و کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن می باشد (۶). این تحقیق با هدف تکثیر و سپس همسانه سازی و زیر همسانه سازی ژن مورد نظر در ناقل بیانی و بررسی بیان پروتئین زیر واحد اصلی جهت مطالعات بعدی در زمینه بررسی ایمنی سازی آن انجام شد.

روش بررسی:

طراحی پرایمر برای ژن CfaB و انجام واکنش پلی مریزاسیون:

برای طراحی پرایمر، توالی ژن مورد نظر از بانک ژنی NCBI (National Center for BiotechnologyInformation) استخراج و از نوکلئوتید ۷۰ تا ۵۱۳ (۶۰ نوکلئوتید ابتدای توالی مربوط به سیگنال پپتید می باشد) جهت این مطالعه انتخاب گردید. بعد از آنالیز نقشه محدودالاثر ژن CfaB با نرم افزار webcutter، جایگاه شناسایی آنزیم‌های HindIII و XhoI به ترتیب برای پرایمرهای پیشرو و پیرو در نظر گرفته شد. با کمک نرم افزارهای oligo و DNasis طراحی پرایمر صورت گرفت، سپس اختصاصیت توالی پرایمرهای طراحی شده نسبت به توالی مورد نظر با کمک نرم افزار Blast بررسی گردید. این توالی‌ها توسط شرکت بایونیر کره جنوبی سنتز گردید. (در توالی‌های زیر جایگاه شناسایی آنزیم‌ها به صورت زیر خط نشان داده شده است.)توالی پرایمر پیشرو:

5'TGTGCAGTGAGTGCTAAGCTTGTAGAG3'

توالی پرایمر پیرو:

5'AATACTCGAGTCAGGATCCCAAAGTC 3'

باکتری ETEC (تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس، بیمارستان بوعلی) ابتدا به مدت یک شب در محیط کشت Luria Bertinis (LB) مایع و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رشد داده شد. سپس ژنوم این باکتری با روش CTAB-Nacl تخلیص و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتری تعیین غلظت گردید (۱۳). ژن CfaB ابتدا با آنزیم Taq پلی‌مراز (سیناژن) طی ۳۰ سیکل تکثیر گردید. این واکنش در غلظت ۳ میلی مولار MgCl2 و ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج شده ETEC

در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتیگراد بهینه سازی گردید. سیکل های PCR شامل یک سیکل واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل مراحل واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. در نهایت محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

به منظور تکثیر ژن هدف با صحت بالا برای استفاده در واکنش همسانه سازی، آنزیم پلی مراز با خاصیت غلط گیری بالا (Highfidelity) (از شرکت فرمنتاز) (مخلوطی از آنزیم‌های Taq پلی مراز و pfu) به کار برده شد. واکنش تکثیر در شرایط غلظت ۴ میلی مولار MgCl2 و ۰/۴ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج شده ETEC در دمای اتصال ۵۷ درجه سانتیگراد بهینه سازی گردید. سیکل های PCR شامل یک مرحله واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ مرحله شامل مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در پایان، یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه بود. در نهایت محصول PCR جهت تایید به عنوان سوبسترا مورد هضم آنزیمی EcoRI قرار گرفت.

همسانه سازی ژن CfaB در ناقل pTZ57R/:

محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل آگاروز (بایونیر) خالص سازی گردید. واکنش الحاق با کمک آنزیم T4 لیگاز برای محصول PCR دارای دنباله A خالص شده و ناقل pTZ57R/T به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد انجام شد. بعد از انجام همسانه سازی، تراریختی پلاسمید نوترکیب حاصل با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E.coli* سویه DH5α انجام گرفت و سپس این باکتری‌ها بر روی پلیت LB آگار حاوی Xgal-IPTG و آمپی سیلین (غلظت ۸۰µg/ml) کشت داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان ۱۲ ساعت کلنی‌های سفید و آبی رنگ مشاهده شدند. از ویژگی های این ناقل این است که جایگاه چندگانه همسانه سازی در وسط ژن β گالاکتوزیداز قرار گرفته است. قطعه همسانه سازی شده در این ناقل، در جایگاه چندگانه همسانه سازی آن جای می_گیرد و بنابراین با غیر فعال شدن ژن β گالاکتوزیداز همراه است. بنابراین غربالگری سلول های حاوی DNA نوترکیب با عدم توانایی آنها در ساخت آنزیم β گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد. سویه های نوترکیب داری رنگ سفید و سویه های فاقد ناقل نوترکیب، آبی رنگ بودند (۱۳).

برای تایید همسانه سازی ژنCfaB، از کلنی‌های سفید موجود بر روی پلیت برداشت شده و در محیط کشت مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (غلظت µg/ml ۸۰) رشد داده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به طور مستقیم و با استفاده از کلنی، واکنش PCR انجام شد. برای این کار قسمتی از یک کلنی در ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر همگن و در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و پس از یک اسپین کوتاه، دو میکرولیتر از مایع رویی به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. از کلنی‌های مثبت، پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش لیز قلیایی تخلیص و واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های XhoI و HindIII به مدت ۶ ساعت انجام گرفت. نمونه‌ها همراه با نشانگر وزن مولکولی الکتروفورز و مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

زیر همسانه سازی ژن CfaB در ناقل بیانی pET 28a

بدین منظور ابتدا پس از تخلیص پلاسمیدهای (pTZ57R/T-cfaB) و پلاسمید بیانی pET28a با روش لیز قلیایی، واکنش هضم آنزیمی بر روی پلاسمید نوترکیب و همچنین پلاسمید بیانی، با آنزیم‌های محدودالاثر XhoI و HindIII به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه انجام گرفت. محصول PCR و ناقل pET28a برش خورده بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین (low melting)، با کمک کیت تخلیص محصول PCR (بایونیر) تخلیص شدند. واکنش الحاق در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت انجام شد و فرآورده این واکنش با روش شوک حرارتی به میزبان *E.coli* سویه BL21DE3pLysS انتقال یافت. دو نوع واکنش هضم آنزیمی برای برش پلاسمیدهای نوترکیب به منظور تایید صحت زیرهمسانه سازی طراحی گردید. یکی از واکنش‌ها با آنزیم‌هایی که محل برش آن‌ها در پرایمرها قرار داده شده بود، انجام گرفت. واکنش هضم آنزیمی دیگری با آنزیم EcoRI که دارای یک جایگاه برش بر روی ناقل pET28a و یک جایگاه برش بر روی قطعه ژنی CfaB است، صورت گرفت. در نهایت برای اطمینان از صحت ترادف ژن، پلاسمید pET28a-cfaB تخلیص و برای تعیین ترادف به شرکت شاین ژن (چین) Shine Gene China ارسال شد.

بررسی بیان سازه ژنی pET28a-CfaB

از کشت شبانه سویه‌های نوترکیب واجد پلاسمید pET28a-cfaB میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میکرولیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین (غلظت ۸۰ µg/ml) تلقیح گردید و پس از رسیدن جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ مورد القای ماده القاکننده پروموتور (IPTG) قرار گرفت.

به منظور تولید پروتئین نوترکیب، تغییر ۳ پارامتر غلظت IPTG، زمان و دما در شرایط بیان ژن هدف مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا بیان ژن مورد نظر در غلظت یک میلی مولار IPTG و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، در زمان های ۲،۳،۵،۷،۱۲،۱۸ ساعت بررسی شد. سپس بیان ژن مورد نظر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و زمان ۳ ساعت، غلظت های مختلف IPTG (۱،۰/۷۵،۰/۵،۰/۲۵) مورد بررسی قرارگرفت. بررسی بیان پروتئین نوترکیب در غلظت یک میلی مولار IPTG در دماهای (۲۵،۳۰،۳۷ درجه) صورت گرفت. همچنین با توجه به گزارش بیان ژن نوترکیب فاکتور کلونیزاسیون در محیط کشت CF اختصاصی (حاوی کازامینواسید، عصاره مخمر، MgSo4, MnCl2) و محیط کشت سوپر براث (حاوی عصاره مخمر ۲٪، کلرید سدیم ۰/۵٪، تریپتون ۳/۲٪) (۱۴) از این محیط ها برای بیان سازه ژنی pET28a-cfaB استفاده شد.

پس از انتقال پلاسمید مورد نظر به میزبان Rosetta و رشد این باکتری روی محیط انتخابی، شرایط بیان پروتئین برای این میزبان با استفاده از القاء کننده IPTG، فراهم گردید. این سویه، مشتقی از باکتری E.coli BL21DE3pLysS می باشد که دارای پلاسمیدی حاوی ژن های tRNA می باشد که می توانند اسید آمینه های مربوط به کدون های نادر را در *E.coli* تامین نماید. پس از آن باکتری‌ها با سانتریفیوژ دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه، جمع آوری و سونیکاسیون (قدرت ۷۰٪ و پالس ۰/۷۵) انجام شد.

الکتروفورز SDS PAGE

وزن مولکولی و محل قرارگیری پروتئین نوترکیب در نمونه های بعد از هر کدام از مراحل بالا و نمونه قبل از القای IPTG با استفاده از (SDS-PAGE) Sodium Dodecyl Sulphate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis، بررسی گردید. غلظت ژل ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر بود.

بررسی وجود پروتئین مورد نظر در نمونه های بیانی با استفاده از ایمونوبلات :

به دلیل همسانه سازی توالی ژن مورد نظر در ناقل بیانیpET، پروتئین نوترکیب دارای دنباله

هیستیدینی در ابتدای خود می باشد. بنابراین برای بررسی وجود پروتئین نوترکیب در نمونه های بیانی از تکنیک ایمونوبلات با استفاده از آنتی بادی ضد His tag و آنتی بادی اختصاصی CfaB تولید شده در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک ایران استفاده شد. پس از تفکیک باندهای پروتئینی با الکتروفورز SDS-PAGE، با کمک سیستم وسترن بلاتینگ (Biorad) و بافر انتقال (گلایسین ۳۹ میلی‌مولار،تریس ۴۸ میلی‌مولار، ۰/۳۷SDS درصد و متانول ۲۰٪) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (بافر PBS با ۰/۰۵٪ توئین-۲۰) حاوی ۵ درصد شیر خشک در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شستشو با بافر PBST به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی AntiHis Tag با رقت ۱/۸۰۰۰ یاآنتی‌بادی Anti-CfaB با رقت ۱/۱۰۰۰ در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد و پس از شستشو با بافر PBST برای آشکار سازی از ده میلی لیتر بافر آشکار ساز (تریس ۵۰ میلی مولار حاوی ۶ میلی گرم دی آمینوبنزئیدین و ۱۰µl آب اکسیژنه) استفاده شد. واکنش با کمک آب مقطر متوقف گردید (۱۵).

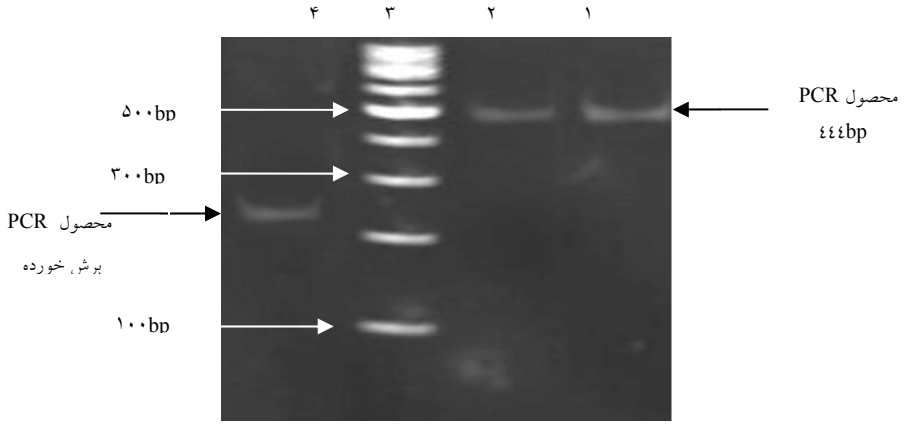
آنالیز بیوانفورماتیکی توالی CfaB:

بعد از بررسی بیان ژن مورد نظر در شرایط مختلف و عدم تولید پروتئین مورد نظر آنالیز بیوانفورماتیکی ژن مورد نظر انجام شد. آنالیزهای بیوانفورماتیکی ژن CfaB با استفاده از نرم افزارهای تحت شبکه به منظور بررسی محتوی G+C این ژن، وجود کدون های نادر، پایداری mRNA و همچنین شاخص سازگاری کدون (CAI) انجام گرفت.

یافته ها:

ژن کد کننده زیر واحد اصلی آنتی‌ژن فاکتور کلونیزاسیون (CfaB) بدون ترادف کد کننده سیگنال پپتید با کمک پرایمرهای پیشرو و پیرو تکثیر گردید. محصـــول PCR با دنبـاله A بر روی ژل با اندازه ۴۴۴ نوکلئوتید مشاهده شد. پس از هضم آنزیمی محصول با آنزیم EcoRI، قطعات ۲۱۶ و ۲۲۸ نوکلئوتید حاصل شد که به دلیل نزدیکی اندازه آنها به یکدیگر بر روی ژل به صورت یک باند مشاهده گردید (تصویر شماره ۱).

ژن مورد نظر در ناقل pTZ57R/T همسانه سازی شد و به میزبان *E.coli* DH5α انتقال یافت. برای



تصویر شماره ۱: محصول PCR ژن کد کننده زیر واحد اصلی آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون (CfaB) و تایید آن با استفاده از هضم آنزیمی (EcoRI)

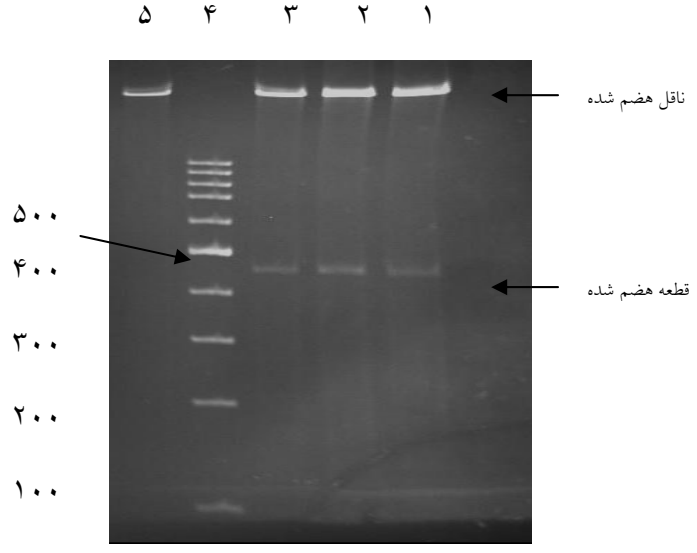
ستون۲،۱: محصول PCR (٤٤٤ bp)، ستون ۳: مارکر (100bp DNA ladder)، ستون ٤: محصول برش خورده (۲۳۰ bp)

تایید همسانه سازی ژن CfaB، با استفاده ازپرایمرهای اختصاصی، PCR مستقیم از کلنی انجام شد. برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T حاصل از الحاق، بر روی ژل الکتروفورز وجود قطعه ۴۴۴ نوکلئوتید تایید کرد (تصویر شماره ۲).

پس از تکثیر و تخلیص pTZ57R/T-CfaB و برش با آنزیم‌های HindIII و XhoI قطعه برش خورده در ناقل بیانیpET28a زیر همسانه سازی گردید و به میزبان *اشرشیا کلی* سویه BL21DE3plysS انتقال داده شد. دو نوع واکنش هضم آنزیمی برای برش پلاسمید پس از تکثیر و تخلیص pTZ57R/T-cfaB و برش با آنزیم‌های HindIII وXhoI قطعه برش خورده در ناقل بیانی pET28a زیر همسانه سازی گردید و به میزبان *اشرشیا کلی* سویه BL21DE3plysS انتقال داده شد. دو نوع واکنش هضم آنزیمی برای برش پلاسمید حاصل جهت صحت همسانه سازی طراحی گردید.

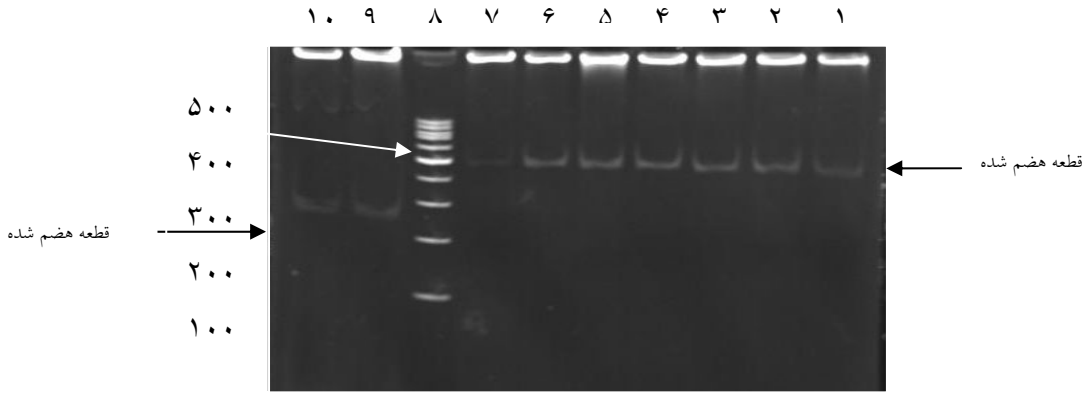
یکی از واکنش‌ها با آنزیم‌های XhoI و HindIII انجام و ژن هدف با اندازه ۴۴۴ نوکلئوتید بر روی ژل آگارز مشاهده گردید. واکنش هضم آنزیمی دیگری با آنزیم EcoRI که دارای یک جایگاه برش بر روی ناقل pET 28a و یک جایگاه برش بر روی قطعه ژنی cfaB است، انجام و قطعه‌ای با طول حدود ۲۳۰ نوکلئوتید بر روی ژل مشاهده گردید (تصویر شماره ۳). همچنین صحت ورود محصول نوترکیب در ناقل و عدم تغییرات نوکلئوتید در آن با تعیین توالی DNA تایید گردید.

به منظور بیان پروتئین نوترکیب، القای بیان پروتئین در دما و مدت زمان های مختلف و تحت تاثیر غلظت‌های متفاوت IPTG بررسی شد. همچنین بیان ژن مورد نظر در محیط کشت پیشنهاد شده برای بیان این ژن نظیر سوپر براث و محیط CF صورت گرفت و از باکتری Rossetta به منظور افزایش تولید پروتئین های نوترکیب استفاده شد. نتایج الکتروفورز SDS-PAGE



تصویر شماره ۲: آنالیز ناقل pTZ57R **حاوی قطعه مورد نظر با استفاده از هضم آنزیمی** (HindIII، XhoI)

ستون ۱،۲،۳: هضم آنزیمی ناقل دارای ژن مورد نظر (قطعه ژنی مورد نظر (۴۴۴ bp) و ناقل هضم شده)، ستون ۴: مارکر DNA (۱۰۰ bp)، ستون ۵: کنترل منفی (هضم آنزیمی ناقل بدون ژن مورد نظر)

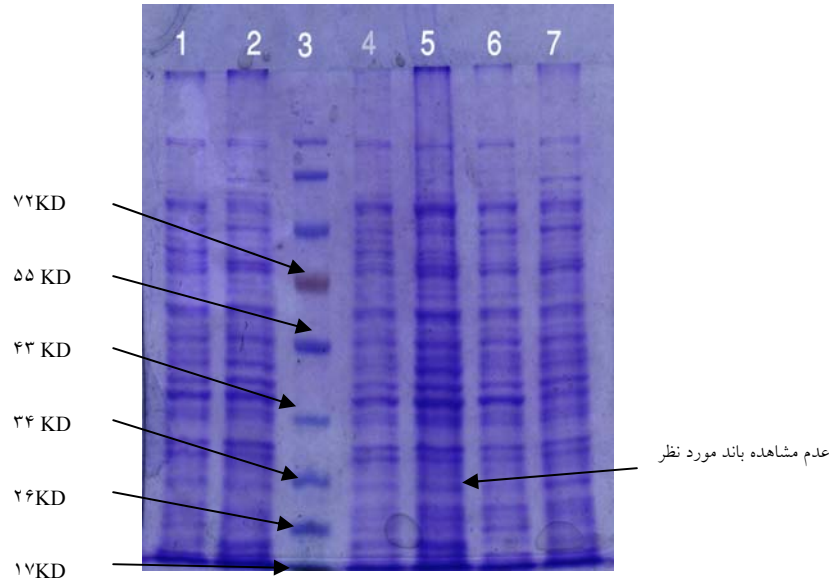


تصویر شماره ۳: آنالیز ناقل PET28a حاوی قطعه مورد نظر با استفاده از هضم آنزیمی

ستون ۷-۱:ژن هدف (٤٤٤bp) و ناقل هضم شده PET28a با آنزیم‌های HindIII و XhoI، ستون ۸: مارکر DNA (۱۰۰ bp)، ستون ۹، ۱۰ : قطعه ۲۳۰ بازی حاصل از برش با آنزیم EcoRI

حاکی از عدم بیان پروتئین نوترکیب بود (تصویر شماره ۴) واکنش ایمونوبلات با آنتی بادی اختصاصی وآنتی بادی ضد His tag عدم تولید پروتئین نوترکیب را تایید کرد.

آنالیـــز بیوانفورماتیکی ژن CfaB نشـــان داد، تکرارهای پشت سر هم از کـدون هـای نـادر در طـول تـوالی وجـود دارد و متوسـط درصـد GC تقریباً ۴۱ درصد می باشد. شـاخص سـازگاری کـدون (CAI) از عوامل مهم بررسی بیان ژن در میزبان خارجی محسوب می‌شود که در مورد ژن CfaB این شاخص حدود ۰/۶ می باشد که نشان دهنـده تناسـب کـم کـدون‌هـای ژن CfaB نسبت به میزبان می‌باشد. ایـن شـاخص در ژن هـایی که بیان بالایی دارند بین ۰/۹ تا ۱ می باشد.



تصویر شماره ۴: بررسی بیان پروتئین طبیعی نوترکیب

ستون ۱،۲،٤،٥،٦: نمونه‌های بعد از القا و عدم مشاهده باند پروتئینی مورد نظر، ستون ۷: نمونه قبل از القا، ستون ۳: نشانگر اندازه پروتئین

بحث:

به دلیل اهمیت CfaB در ایجاد مصونیت نسبت به بیماری اسهالی، در این مطالعه این ژن، در ناقل همسانه سازی و بیانی همسانه سازی گردید و بیان پروتئین نوترکیب آن مورد بررسی قرار گرفت. برای تکثیر قطعه ژنی از آنزیم پلی‌مراز با خاصیت غلط گیری بالا (مخلوطی از دو آنزیم Taq پلی‌مراز و یک آنزیم با خاصیت غلط گیری) (فرمنتاز) استفاده شد. لازم به ذکر است که این آنزیم دارای صحت (۴ برابر آنزیم Taq به تنهایی) و کارآیی زیاد می‌باشد و همچنین قطعه تکثیر شده دارای دنباله A خواهد بود که همسانه سازی مستقیم آن را در ناقل pTZ57R/T امکان پذیر می‌کند. در این تحقیق پس از طی مراحل زیرهمسانه سازی در ناقل بیانی (pET 28a) و بررسی بیان به این نتیجه دست یافتیم که تولید پروتئین نوترکیب CfaB با وارد کردن توالی طبیعی این ژن در سیستم بیانی (pET 28a) امکان پذیر نمی‌باشد. در ابتدا به منظور بیان پروتئین، از سلول میزبان BL21 DE3 pLysS، استفاده شد. این میزبان به دلیل داشتن ژن کد کننده T7 RNA polymeras و عدم وجود پروتئازهای سلولی، برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مناسب می‌باشد. اما با توجه به این‌که میزبان Rosetta (کد کننده tRNAهای مربوط به کدون‌های کمیاب) بیان پروتئین‌های دارای کدون‌های کمیاب را افزایش می‌دهد (۱۶) و توالی طبیعی ژن CfaB دارای کدون‌های کمیاب به صورت پشت سرهم می‌باشد، این احتمال وجود داشت که با انتقال ناقل نوترکیب به این میزبان، پروتئین مورد نظر بیان شود. ولی با وجود تغییرات صورت گرفته در شرایط بیان در این مطالعه، بیان این پروتئین بر روی ژل SDS تایید نگردید. به علت اهمیت دما و ترکیب محیط کشت در بهینه سازی تولید پروتئین نوترکیب، در این مطالعه به منظور بیان پروتئین نوترکیب CfaB در ناقل بیانی pET28a، بیان توالی طبیعی این ژن در چند محیط کشت مناسب (CF medium, LB, Superbroth) و دماهای مختلف و میزبان‌های مختلف (Rosetta, Bl21DE3pLysS) بررسی گردید. در مطالعه Yong-Fu Li و همکاران به منظور بیان پروتئین نوترکیب از محیط Super broth استفاده شد و به نظر می‌رسد به علت بالاتر بودن درصد تریپتون و عصاره مخمر در این محیط کشت نسبت به محیط LB، برای تولید مطلوب پروتئین‌های نوترکیب مناسب می باشد (۱۷). Favre پروتئین نوترکیب را در محیط کشت CF تولید کرد. این احتمال وجود دارد که این امر مربوط به وجود نمک در ترکیب این محیط کشت که به صورت تنظیم-کننده‌هایی برای رونویسی از ژن مزبور عمل می‌کنند، باشد و باعث بیان پروتئین نوترکیب به صورت مطلوب شده‌است (۱۴). در مطالعه‌ای CfaB در سه پلاسمد مجزا pkCMVintBL, pRE4, pkCMintPoly تحت کنترل پروموتورهای یوکاریوتی CMV (Cytomegalovirus) RSV (Rous sarcoma virus) همسانه سازی شد. در این مطالعه نشان داده شد که این ناقل‌ها به تنهایی قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی مخاطی (sIgA) نیستند (۱۸).

مطلب دیگری که مد نظر قرار گرفت نوع ناقل و پروموتور آن برای بیان این ژن در مطالعه ما بود. در سال ۲۰۰۴، مولکول CfaB (اسیدهای آمینه ۱۷۰-۲۴) در ناقل pMAL-p2، تحت کنترل پروموتور tac همسانه سازی شد. این پروتئین به صورت الحاق با Maltose binding protein (MBP) در میزبان BL21 تولید شد. با توجه به این‌که یکی از راهکارهای افزایش بیان پروتئین‌ها، الحاق ژن‌های آن‌ها با ژن‌های با بیان بالا و تولید پروتئین‌های الحاقی می‌باشد، به نظر می‌رسد الحاق شدن CfaB با MBP باعث بیان این پروتئین شده‌است (۱۹،۲۰).

در سال ۲۰۰۸، cfaB همراه با لینکر (DNKQ) به صورت الحاق با CfaE درpET24a همسانه سازی

شد و پس از تولید پروتئین به منظور بررسی ساختار، کریستالوگرافی گردید (۱۷). لازم به ذکر است بیان این ژن در ناقل pET24a گزارش شده‌است. این ناقل از نظر پروموتور و ساختار بسیار شبیه pET28a است با این تفاوت که فاصله میان ناحیه همسانه‌سازی ژن تا پروموتور pET24a در بسیار کم است که به علت عدم وجود توالی جایگاه اتصال به ریبوزوم (RBS) و توالی His Tag است (۱۶). این تفاوت‌ها این ناقل را برای رونویسی مناسب می‌سازد بدین مفهوم که ضرورت دارد برای بیان ژن در این ناقل، در توالی آن عناصر تنظیمی افزوده گردد. لذا با توجه به خصوصیات ژن و ناقل pET 24 a، به نظر می‌رسد از عناصر تنظیمی دیگر و شاید بهینه‌سازی کدون‌های نادر استفاده شده باشد که در این مقاله به آن‌ها اشاره نشده است.

مطالعات بیوانفورماتیکی ما نشـــان داد که کدون های کد کننده آمینواسید های ژن CfaB غنی از بازهای آدنین وتیمین و کدون‌های نادر می باشند و با توجه به بررسی انجام شده در این تحقیق بیان ژن، در سلول *E.coli* غیر ممکن می باشد. محققین روش های مختلفی برای حل این مسئله اتخاذ کردند، یکی از این روش ها حذف کدون های کمیاب (rare codon) و تغییر کدون ها متناسب با کدون‌های متداول در *E.coli* می باشد (۱۱). از این رو با توجه به اینکه بیان پروتئین CfaB غیرممکن می باشد، در مطالعات بعدی از بهینه سازی کدون های نادر و سنتز توالی بهینه شده CfaB به منظور افزایش تولید پروتئین نوترکیب استفاده خواهد شد.

نتیجه گیری:

در طول توالی ژن CfaB کدون های نادر پشت سرهم وجود دارد که باعث کاهش بیان این پروتئین می شود.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاری دکتر سید محمد موذنی و دکتر علی هاتف سلمانیان که در پیشبرد این تحقیق ما را یاری دادند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع:

1. Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. Expert Rev Vaccine. 2008; 7(6): 795-804.

2. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. Clin Microbial Rev. 2005; 18(3): 465-83.

3. Wenneras C, Erling V. Prevalence of entertoxigenic *Escherichia coli* associated diarrhea and carrier state in the developing world. Health Popul Nutr. 2004; 22(4): 370-82.

4. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: advances in technical and laboratory aspects of research and development of vaccines: Wkly Epidemiol Rec. 2008 Mar 7;83(10):92-5

5. Fleckenstein JM, Harwidge PR, Munson GP, Rasko A, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic Escherichia coli infection. Microb Infect. 2010; 12(2): 89-98.

6. Walker RI, Steele D, Aguado T. Ad Hoc ETEC technical expert committee. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic E. coli (ETEC) disease. Vaccine. 2007; 25(14): 2545-66.

7. Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(4): 569-84.

8. Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Inst Biomed Dep Microbiol Immun, Sweden. 2008.

9. Evans DG, Evans DJ, Clegg S, Pauley JA. Purification and characterization of the CFA: I antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1979; 25(2): 738-48.

10. MU XQ, Savarino SJ, Bullite E. The three-dimensional structure of CFA/I adhesion pili. Traveler's diarrhea bacteria hang on by a spring. J Mol Biol. 2008; 376(3): 614-20.

11. Jansson L, Tobias J, Lebens M, Svennerholm AM, Teneberg S. The major subunit, CfaB, of colonization factor antigen I from enterotoxigenic *Escherichia coli* is a glycosphingolipid binding protein. Infect Immune. 2006; 74(6): 3488-97.

12. Steinsland H, Valentiner-Branth P, Gjessing HK, Aaby P, Molbak K, Sommerfelt H. Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*: longitudinal study. Lancet. 2003; 362(9380): 286-91.

13. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laborator manual. NewYork: CSHL Press. 2001.

14. Favre D, Ludi S, Stoffel M, Frey J, Horn MP, Dietrich G. Expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors in *Vibrio cholera*. Vaccine. 2006; 24(20): 4354-68.

15. Bollage DM, Michel DR, Edesttein SJ. Protein method. NewYork: Wiley-Liss; 1996.

16. Lásaro MO, Alves AM, Guillobel HC, Almeida DF, Ferreira LC. New vaccine strategies against enterotoxigenic Escherichia coli. II: Enhanced systemic and secreted antibody responses against the CFA/I fimbriae by priming with DNA and boosting with a live recombinant Salmonella vaccine, Braz. J Med Biol Res. 1999 Feb; 32(2): 241-6.

17. Li YF, Poole S, Rasulova F, McVeigh AL, Savarino SJ, Xia D. Crystallization and x-ray diffraction analysis of several forms of the CfaB major subunit of enterotoxigenic Escherichia coli CFA/I fimbriae. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2009; 65(Pt 3): 242-7.

18. Lásaro MO, Alves AM, Guillobel HC, Almeida DF, Ferreira LC.New vaccine strategies against enterotoxigenic Escherichia coli. II: Enhanced systemic and secreted antibody responses against the CFA/I fimbriae by priming with DNA and boosting with a live recombinant Salmonella vaccine. Braz. J Med Biol Res. 1999 Feb; 32(2): 241-6.

19. Anantha RP, McVeigh AL, Lee LH, Agnew MK, Cassels FJ, Scott DA. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen I and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 2004; 72(12): 190-201.

20. Sorenson HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol. 2005; 115(2): 113-28.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2011 Dec, Jan; 13(5): 72-82.

Original article

Cloning, bioinformatics study and evaluation expression of gene of enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I major subunit (CfaB)

Ahsaee Z (MSc)[1], Salimian J (MSc)*[1], Nazarian Sh (MSc)[1], Khalesi R (MSc)[1], Olad GhR (MSc)[1], Amani J (MSc)[1]

[1]Biological Sciences Dept., Imam Hosein University, Tehran, Iran.

Received: 23/Nov/2010 Revised: 30/Jan/2011 Accepted: 30/Apr/2011

Background and aims: Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) is the main cause of diarrhea in children in developing countries and also in travelers to these areas. ETEC attaches to host cells via filamentous bacterial surface structures, known as colonization factors. Epidemiological studies suggest that the prevalence of CFA/I is higher than other colonization factors. CFA expressed by ETEC and so represents an important component of any vaccine. Investigation supposed that CfaB as a major subunit of fimbriae is an appropriate candidate for vaccine preparation. In the present study we investigated cloning and expression of CfaB.

Methods: In this descriptive study, information about CfaB gene was obtained from gene bank and appropriate primers were designed accordingly. Genomic PCR reaction was performed and its product (CfaB gene) was cloned into pTZ57R/T cloning vector and then subcloned pET28a expression vector. CfaB gene expression was evaluated.

Results: Cloning was confirmed by using restriction enzyme and sequencing. Expression of recombinant protein was determined in different conditions (time, media, and host), but native gene inserted in pET28a was not expressed.

Conclusion: Native gene employs tandem rare codon which can reduce the efficiency of expression.

Keywords: **Cloning**, **Colonization factor antigen I major subunit (CfaB), Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC).**

Cite this article as: Ahsaee Z, Salimian J, Nazarian Sh, Khalesi R, Olad GhR, Amani J. [Cloning, bioinformatics study and evaluation expression of gene of enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I major subunit (CfaB). J Sharekord Univ Med Sci. 2011 Dec, Jan; 13(5): 72-82.]Persian

[*]**Corresponding author:**

Biological Sciences Dept., Basic Sciences Faculty, Imam Hosein University, Tehran, Iran. Tel: 0098-09125757102, E-mail:jafarsalimyan@yahoo.com