جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹
صفحات: ۱۴۷-۱۴۱

Kowsar Medical Journal
Vol. 15, No. 3, Fall 2010
Pages: 141-147

بهینه‌سازی بیان ژن و تخلیص پروتئین نوترکیب LTB باکتری *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک و تولید آنتی‌بادی علیه آن

راضیه خالصی[۱] *MSc*، شهرام نظریان[*] *MSc*، زهرا احصایی[۱] *BSc*، میثم منصوری[۱] *BSc*، جعفر امانی[۲] *MSc*، جعفر سلیمیان[۱] *MSc*، سیدمحمد مؤذنی[۳] *PhD*

[*]گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
[۱]گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
[۲]مرکز بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۳]گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: ۷۰-۳۰٪ موارد اسهال ناشی از عفونت‌های باکتریایی است. شایع‌ترین باکتری به‌دست‌آمده، *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک یا ETEC است. امکان به‌وجود آمدن ایمنی حفاظتی علیه این بیماری وجود دارد و طراحی واکسن آن از اهداف سازمان جهانی بهداشت است. بیشتر سویه‌های این باکتری، مولد توکسین حساس به حرارت هستند. لذا زیرواحد B توکسین حساس به حرارت، برای تولید واکسن مطرح است. هدف مطالعه حاضر، بهینه‌سازی بیان ژن زیرواحد B توکسین حساس به حرارت به‌منظور بررسی ایمنی‌زایی بود.

مواد و روش‌ها: بهینه‌سازی بیان ژن زیرواحد B توکسین حساس به حرارت در مورد متغیرهای زمان، دما و غلظت IPTG انجام شد. پس از بیان، پروتئین مورد نظر از طریق ستون تمایلی نیکل تخلیص شد. برای تولید آنتی‌بادی، پروتئین زیرواحد B توکسین حساس به حرارت به‌صورت زیرجلدی در چهار نوبت به‌همراه ادجوان به موش‌ها تزریق شد. در فواصل تزریقات و پس از آخرین تزریق، از موش‌ها خونگیری به‌عمل آمد و واکنش الایزا انجام شد.

یافته‌ها: پس از بهینه‌سازی بیان، بهترین بیان پروتئین در زمان ۳ ساعت، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG صورت گرفت. با استفاده از ستون نیکل، پروتئین با خلوص بیش از ۹۵٪ تخلیص شد. واکنش الایزا نیز نشان‌دهنده تولید بالای آنتی‌بادی علیه این پروتئین در موش‌ها بود.

نتیجه‌گیری: پروتئین زیرواحد B توکسین حساس به حرارت می‌تواند به‌عنوان مولکول ایمونوژن، یکی از اجزای مهم در تولید واکسن علیه ETEC باشد.

کلیدواژه‌ها: *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک، زیرواحد B توکسین حساس به حرارت، بهینه‌سازی بیان ژن، آنتی‌بادی، واکسن نوترکیب

Optimization of gene expression and purification of enterotoxigenic *Escherichia coli* recombinant LTB protein and antibody production against it

Khalesi R.[1] *MSc*, Nazarian Sh.* *MSc*, Ehsaei Z.[1] *BSc*, Mansouri M.[1] *BSc*, Amani J.[2] *MSc*, Salimian J.[1] *MSc*, Moazzeni S. M.[3] *PhD*

[*]Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
[1]Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
[2]Applied Biotechnology Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: It has been estimated that gastroenteritis is caused by bacteria in 30-70% of cases. Enterotoxigenic *Escherichia coli* or ETEC is one of the most common agents causing diarrhea. Protective immunity may be induced against this disease. Designing and producing a vaccine against this disease is one of the purposes of World Health Organization. Vaccine candidate molecules have to induce protective immunity against a broad spectrum of ETEC bacteria. Most ETEC strains can produce labile toxin; therefore labile toxin may be a proper candidate for being used as a vaccine molecule. The aim of this study was to optimize Heat-labile Toxin B Subunit expression in order to investigate its immunological properties.

Materials & Methods: Optimizing of 3 parameters (IPTG concentration, time and temperature of promoter induction) was performed. Recombinant protein was purified with Ni-NTA column. Purified Heat-labile Toxin B Subunit was injected to mice subcutaneously in 4 sessions. Blood samples were taken during the interval between the injections and after last injection. Then, ELISA was performed.

Results: The optimum expression occurred at 1mM IPTG concentration, after 3 hours and at 37ºC. Recombinant protein was highly purified (>95%) with Ni-NTA column. Also, ELISA showed high titer of antibody production in mice.

Conclusion: Expressed Heat-labile Toxin B Subunit is an immunogenic protein and can be one of the important components in vaccine development against ETEC.

Keywords: Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Heat-Labile Toxin B Subunit, Expression, Recombinant Vaccine, Antibody

نویسنده مسئول: شهرام نظریان. تمام درخواست‌ها باید به نشانی nazarian56@gmail.com فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۸/۹/۱۷ پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۲۰

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

بیماری اسهال یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در سطح جهان و ایران است [۱، ۲]. امروزه اکثر تحقیقات در این زمینه، توجه خود را به بیماری اسهال در کودکان معطوف داشته‌اند [۳، ۴]. بنابر گزارشی در شهر تهران، اسهال ناشی از باکتری *اشریشیا کلی* درصد بالایی از موارد اسهالی را به خود اختصاص داده است [۵].

تخمین زده می‌شود که بین ۷۰-۳۰٪ موارد اسهال به‌خاطر عفونت‌های باکتریایی است [۶]. شایع‌ترین باکتری جداشده از بیماران، باکتری *اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک* (ETEC) است [۲]. این عامل بیماری‌زا، ایجادکننده اسهال در کودکان ۱۴-۵ساله، بالغین بالای ۱۵ سال در کشورهای در حال توسعه و مسافران به این مناطق است [۷، ۸، ۹]. این بیماری در حوادث غیرمترقبه مانند سیل و زلزله نیز شیوع بسیاری دارد [۱، ۲، ۵].

واکسنی که بتواند این بیماری را کنترل کند، تاثیر مهمی در کاهش موارد بیماری و مرگ‌ومیر خواهد داشت [۱۰، ۱۱]. شواهد نشان داده است که امکان به‌وجودآمدن ایمنی حفاظتی علیه این بیماری وجود دارد. افراد بالغ در کشورهای در حال توسعه، کمتر به این بیماری مبتلا می‌شوند و مسافرین به این مناطق نیز در صورت اقامت طولانی‌مدت به این بیماری دچار نمی‌شوند [۸، ۱۰، ۱۱].

ملکول (یا مولکول‌های) کاندیدای واکسن بایستی غیرمضر و ایمونوژن باشد و بتواند ایمنی حفاظتی علیه طیف وسیعی از سویه‌های این باکتری ایجاد نماید [۱۲].

بر این اساس، زیرواحد B توکسین حساس به حرارت را می‌توان کاندیدای واکسن دانست، زیرا:

الف) این زیرواحد غیرسمی است و نقش بسیار مهمی در حدت‌زایی و پاتوژنز باکتری ایفا می‌کند [۱۲، ۱۳].

ب) اکثریت سویه‌های این باکتری، مولد توکسین حساس به حرارت هستند [۱۱].

ج) این جزء، ایمنوژن بوده و ادجوان قوی محسوب می‌شود [۱۲].

واکسن موجود علیه این بیماری به‌نام *داک‌اورال* محصول کشور سوئد است که در ۱۵ کشور مجوز مصرف دارد. این واکسن شامل زیرواحد B نوترکیب توکسین کلرا (CTXB) به‌همراه باکتری *ویبریوکلرای* غیرفعال است که به‌شکل سه دوز خوراکی مصرف دارد. این واکسن در کارآزمایی بالینی در کشور بنگلادش در بین زنان ۸۶٪ و در بین کودکان ۶۷٪ ایمنی حفاظتی داشته است. در بین توریست‌های کشور مراکش نیز ۵۲٪ حفاظت داشته و در میان دانش آموزان مسافر به کشور مکزیک توانسته است در حدود ۵۰٪ محافظت ایجاد کند. مشکل این واکسن را می‌توان به محافظت کوتاه‌مدت آن (بین ۶-۳ ماه) نسبت داد [۴، ۱۴].

در حال حاضر گروه‌های مختلفی در جهان روی واکسن این بیماری تحقیق می‌کنند و اعتقاد بر این است که با توجه به گستردگی طیف این باکتری در جهان که به مسایلی مانند آب و هوای منطقه، عادات غذایی، فرهنگ اجتماعی و بهداشتی مربوط می‌شود، نمی‌توان به یک واکسن جهانی فکر کرد و بهتر است برای مناطق یکسان جهان از لحاظ جغرافیایی، یک نوع واکسن را مدنظر قرار داد [۴، ۱۴].

نویسندگان در مقاله قبلی بیان ژن زیرواحد B نوترکیب توکسین حساس به حرارت (rLTB) را گزارش نمودند [۱۵]. این مطالعه نیز با هدف بهینه‌سازی بیان ژن، تخلیص پروتئین و تولید آنتی‌بادی علیه آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

بهینه‌سازی بیان ژن: پس از بیان اولیه ژن LTB در پلاسمید pET28a نوترکیب و در باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21(DE3) plyss، بهینه‌سازی بیان ژن برای تولید پروتئین مورد نظر صورت گرفت [۱۶، ۱۷]. بهینه‌سازی برای سه کمیت IPTG (ایزوپروپیل B-D- تیوگالاکتوپیرانوزید)، زمان بیان و دما انجام شد. برای این منظور، پس از رشد باکتری در محیط LB مایع و رسیدن به جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، این کمیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۵ ساعت، غلظت‌های مختلف IPTG (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۵میلی‌مولار) مورد بررسی قرار گرفت. سپس در غلظت بهینه IPTG و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، زمان بیان (۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت) بررسی شد و در نهایت در غلظت بهینه IPTG و زمان، دمای مختلف (۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) بررسی شد. پس از آن باکتری‌ها با سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ rpm و به‌مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و سونیکاسیون (قدرت ۷۰٪ و پالس ۰/۷۵) انجام شد.

بررسی محلول‌بودن پروتئین بیانی یا تجمع پروتئین به‌شکل اجسام انکلوژن: استراتژی تخلیص پروتئین بیانی براساس محلول‌بودن یا تشکیل اجسام انکلوژنی متفاوت است. لذا با توجه به بیان بالای پروتئین بیانی، آزمایشی به‌منظور محلول‌بودن پروتئین در سلول باکتری انجام شد. ابتدا رسوب سلولی حاصل از بیان در بافر A (PBS) یکنواخت شد و پس از سونیکاسیون (قدرت ۷۰٪ و پالس ۰/۷۵) و شکسته‌شدن سلول‌ها، محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ جمع‌آوری شد (نمونه ۱). سپس به رسوب حاصل از مرحله قبل، بافر B (بافر حاوی اوره ۸ مولار) اضافه و پس از انکوباسیون ۴۵دقیقه‌ای در دمای اتاق و سانتریفیوژ، محلول رویی جدا شد (نمونه ۲). در ادامه، به رسوب حاصل از مرحله قبل، بافر B (بافر حاوی اوره ۸ مولار) اضافه و پس از انکوباسیون ۴۵دقیقه‌ای در دمای اتاق، سانتریفیوژ انجام و محلول رویی جدا شد (نمونه ۳). سانتریفیوژ در تمام مراحل با دور ۵۰۰۰ rpm و به‌مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت [۱۷، ۱۸]. پس از اتمام این مراحل، هر ۳ نمونه روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE الکتروفورز شدند [۱۹].

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تخلیص پروتئین از ستون نیکل- نیتریلوتری‌استیک‌اسید (Ni-NTA): برای تخلیص پروتئین، ابتدا بیان ژن در مقیاس بالاتر (۱۰۰ میلی‌لیتر) صورت گرفت. به‌ازای رسوب سلولی حاصل از هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، ۵ میلی‌لیتر بافر B اضافه و سوسپانسه شد. پس از افزودن بافر B، نمونه‌ها به فواصل ۱۰ دقیقه و به‌مدت ۱ ساعت (هر ۱۰ دقیقه ۶بار) سونیکیت (قدرت ۷۰٪ و پالس ۰/۷۵) شدند. سپس محلول سونیکیت‌شده، با دور ۵۰۰۰ rpm و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ و مایع رویی جمع‌آوری شد. تخلیص پروتئین به‌روش دناتوره و با تغییر pH صورت گرفت [۱۹]. نمونه‌های خروجی از ستون پس از سنجش پروتئین، روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE الکتروفورز شدند [۲۰].

تعیین غلظت پروتئین: غلظت پروتئین بیان‌شده به کمک روش *براد‌فورد* و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (سیناژن؛ ایران) به‌عنوان استاندارد انجام گرفت [۲۰].

بررسی پروتئین تخلیص‌شده از طریق الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE: نمونه‌ها همراه با مارکر پروتئینی (SM0431 و SM0671 فرمنتاز) تحت شرایط دناتوره روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر الکتروفورز شدند.

حذف اوره از پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده به‌منظور تزریق به حیوان مدل: برای حذف اوره از نمونه‌ها روش دیالیز به‌کارگرفته شد. پس از تخلیص پروتئین، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از ستون که حاوی پروتئین مورد نظر بودند، در کیسه دیالیز ریخته شده و دیالیز علیه ۲ لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-Hcl با pH برابر ۷/۵ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت انجام شد [۲۰].

تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین LTB در موش: به ۱۰۰ میکروگرم پروتئین تخلیص‌شده، ادجوان کامل فروند در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر اضافه شد. گروه‌های ۸تایی موش‌های آزمایشگاهی ۸-۶ هفته‌ای در شرایط مطلوب آزمایشگاهی از نظر دما، نور و غذا انتخاب شدند. در نوبت اول ۲۰۰ میکرولیتر (معادل ۲۰ میکروگرم) از آنتی‌ژن در ناحیه کمر و به‌صورت زیرجلدی به هر موش تزریق شد. در تزریق بوسترها، ادجوان ناقص فروند مورد استفاده قرار گرفت و سه نوبت بوستر به فاصله ۱۴ روز از یکدیگر تزریق شد. به یک گروه موش، به‌عنوان شاهد تنها PBS استریل تزریق شد.

خونگیری و تهیه سرم: یک هفته پس از هر تزریق و در پایان تزریقات، از موش‌ها خونگیری به‌عمل آمد. برای جداسازی سرم، سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ rpm و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و سرم‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین تیتر آنتی‌بادی به‌روش "الایزای" غیرمستقیم: در این روش کف میکروپلیت با ۱ میکروگرم از پروتئین نوترکیب (آنتی‌ژن) با استفاده از بافر کربنات- بی‌کربنات (pH=۹/۶) پوشیده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت قرار گرفت. در بین تمامی مراحل "الایزا"، شستشو با بافر PBST (۰/۰۵٪، Tween-۲۰، pH=۷/۲) انجام شد. از سرم‌های حاصل از سه نوبت خونگیری با توالی رقت از ۱/۵۰۰ تا ۱/۱۶۰۰۰ برای سرم حاصل از خونگیری اول، توالی رقت از ۱/۱۰۰۰ تا ۱/۳۲۰۰۰ برای سرم حاصل از خونگیری دوم و توالی رقت از ۱/۸۰۰۰ تا ۱/۲۵۶۰۰۰ برای سرم حاصل از خونگیری آخر استفاده شد.

سپس در مرحله کانژوگه، رقت ۱/۲۰۰۰ کانژوگه IgG HRP ضدموشی در PBST اعمال شد. پس از آن، سوبسترای حاوی ۲ میلی‌گرم OPD در ۵ میلی‌لیتر بافر سیترات- فسفات (pH=۵) که به آن ۳ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ۳۰٪ افزوده شده بود، به هر چاهک اضافه شد و میکروپلیت به محل تاریکی انتقال یافت تا واکنش انجام گیرد. پس از تغییر رنگ محلول، واکنش با اسیدسولفوریک ۲/۵ مولار متوقف و رنگ زرد به نارنجی تبدیل شد. سپس جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه خواننده "الایزا" در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. به‌منظور کنترل اجزای واکنش الایزا، دو چاهک برای کنترل در نظر گرفته شد که داخل یکی از چاهک‌ها فقط آنتی‌ژن قرار داشت و دیگری فاقد آنتی‌ژن بود. برای موش شاهد نیز یک ستون "الایزا" در نظر گرفته شد و رقت‌های استفاده‌شده برای سرم موش کنترل شامل ۱/۲۰۰ تا ۱/۳۲۰۰ بود.

ساندویچ "الایزا": واکنش ساندویچ "الایزا" نیز بین آنتی‌بادی ضدCTXB خرگوشی به‌میزان ۲ میکروگرم در هر چاهک، پروتئین LTB تخلیص‌شده با سریال رقت از ۴ میکروگرم تا ۳۵ نانوگرم و سرم تهیه‌شده از موش با رقت ثابت ۱/۲۰۰ و کانژوگه موشی با رقت ۱/۲۰۰۰ انجام شد.

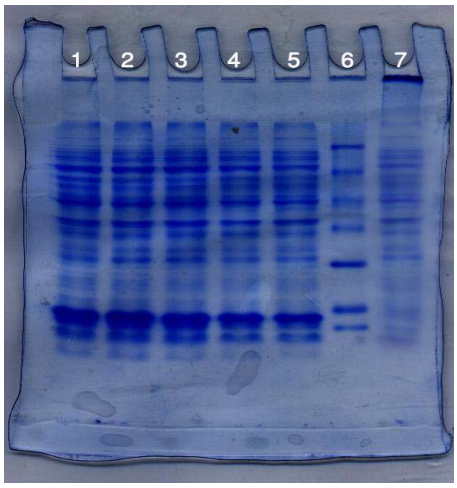
نتایج

بررسی بیان ژن LTB، بهینه‌سازی بیان ژن: پس از القای ژن، نمونه‌های باکتری رسوب داده شد و میزان بیان پروتئین LTB به کمک تکنیک SDS-PAGE بررسی شد. نتایج حاصل از بهینه‌سازی بیان ژن نشان داد که بهترین بیان، در زمان ۳ ساعت، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG صورت گرفته است (شکل‌های ۱، ۲، ۳).

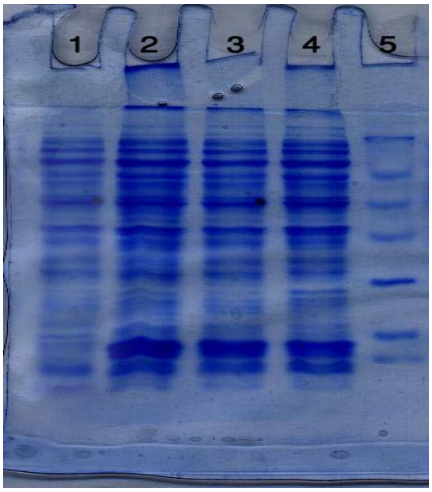
بررسی محلول‌بودن پروتئین بیانی یا تجمع پروتئین به‌شکل اجسام انکلوژن: عدم مشاهده پروتئین LTB در نمونه حاصل از بافر A نشان از غیرمحلول‌بودن پروتئین بیانی داشت. وجود پروتئین LTB در نمونه مربوط به بافر B حاکی از آن است که پروتئین تولیدشده تشکیل اجسام انکلوژنی داده است (شکل ۴).

تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA: پس از

انجام کروماتوگرافی با ستون Ni-NTA، نمونه‌های خروجی ستون جمع‌آوری شد. پروتئین نوترکیب با درجه خلوص بالایی در بافر شستشو و MES بافر، مشاهده شد (شکل ۵).

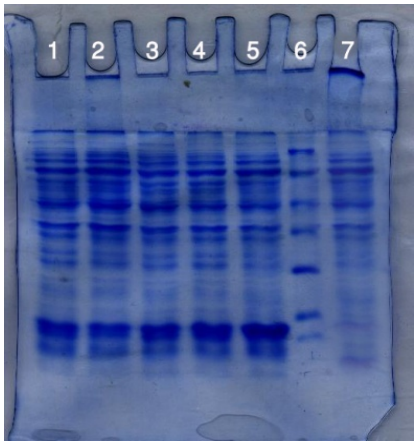


شکل ۱) بهینه‌سازی بیان ژن LTB با تغییر پارامتر زمان. ردیف ۱، ۲، ۳، ۴، ۵: کلون القاشده با IPTG به‌ترتیب در زمان‌های ۵، ۴، ۳، ۲، ۱ ساعت. ردیف ۶: نشانگر پروتئینی SM0431. ردیف ۷: کلون القا نشده.



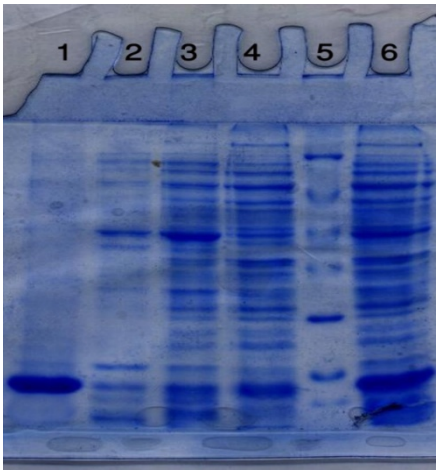
شکل ۲) بهینه‌سازی بیان ژن LTB با تغییر پارامتر دما. ردیف ۱: کلون القا نشده. ردیف ۲، ۳، ۴: کلون القاشده با IPTG به‌ترتیب در دماهای ۳۷، ۳۰، ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ردیف ۵: نشانگر پروتئینی SM0431.

تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین LTB در موش: نمودار ۱، واکنش "الایزا" مربوط به پروتئین LTB تخلیص‌شده (به‌میزان ۱میکروگرم در هر چاهک) و سرم موش‌ها را نشان می‌دهد. سری سوم، سرم حاصل از اولین خونگیری (یک هفته پس از تزریق دوم) با توالی رقت از ۱/۵۰۰ تا ۱/۸۰۰۰ را نشان می‌دهد. در سری دوم، سرم حاصل از خونگیری دوم (یک هفته پس از تزریق سوم) با توالی رقت از ۱/۱۰۰۰ تا ۱/۱۰۰۰۰ مشاهده می‌شود و در سری اول، سرم حاصل از سومین خونگیری (یک هفته پس از تزریق چهارم) با توالی رقت از ۱/۸۰۰۰ تا ۱/۲۵۶۰۰۰ دیده می‌شود. همان‌طور که در این نمودارها

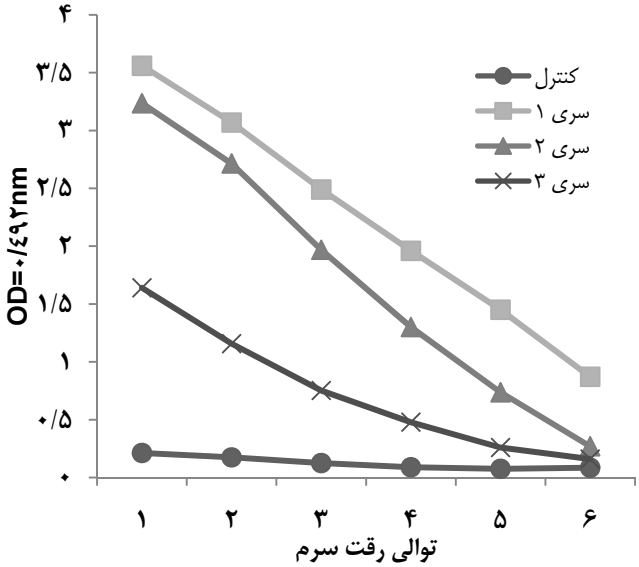


شکل ۳) بهینه‌سازی بیان ژن LTB با تغییر پارامتر غلظت IPTG. ردیف ۱، ۲، ۳، ۴، ۵: کلون القاشده با IPTG به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵ میلی‌مولار. ردیف ۶: نشانگر پروتئینی SM0431. ردیف ۷: کلون القا نشده.

شکل ٤) بررسی حلالیت پروتئین نوترکیب LTB. ردیف ۱: محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های لیزشده. ردیف ۲: محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های لیز و حل‌شده در بافر حاوی اوره ۸ مولار. ردیف ۳: محلول رویی حاصل از شستشوی رسوب سلولی مربوط به ردیف ۲. ردیف ۴: نشانگر پروتئینی SM0671.



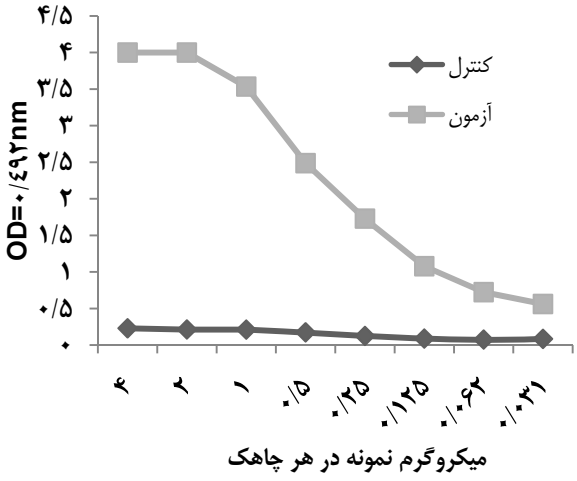
شکل ۵) تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA. ردیف ۱، ۲، ۳: نمونه خروجی از ستون پس از شستشو با بافر E، D، C. ردیف ۴: نمونه خروجی از ستون قبل از شستشو. ردیف ۵: نشانگر پروتئینی SM0431. ردیف ۶: نمونه پروتئین قبل از عبور از ستون.



نمودار ۱) بررسی تیتر آنتی‌بادی تولیدشده در موش بر علیه پروتئین نوترکیب LTB. سری ۱: تیتر آنتی‌بادی تهیه‌شده پس از تزریق چهارم با سریال رقت ۱/۸۰۰۰ تا ۱/۲۵۶۰۰۰. سری ۲: تیتر آنتی‌بادی تهیه‌شده پس از تزریق سوم با سریال رقت ۱/۱۰۰۰ تا ۱/۳۲۰۰۰. سری ۳: تیتر آنتی‌بادی تهیه‌شده پس از تزریق دوم با سریال رقت ۱/۵۰۰ تا ۱/۱۶۰۰۰. شاهد: سرم موش غیرایمن.

مشخص شد پس از هربار تزریق، میزان تولید آنتی‌بادی افزایش یافت. به‌گونه‌ای که در "الایزای" حاصل از سومین خونگیری در رقت‌های بالاتر از ۱/۸۰۰۰ میزان جذب نوری قرائت‌شده توسط دستگاه بیشتر از حد ۳/۵ OD_{492} بوده است.

واکنش ساندویچ "الایزا": ساندویچ الایزا با استفاده از آنتی‌بادی خرگوشی ضدCTXB به‌میزان ۲ میکروگرم در هر چاهک و سرم موش ضدLTB با رقت ثابت ۱/۲۰۰ انجام شد. نتایج نشان داد این سیستم قادر به شناسایی پروتئین rLTB تخلیص‌شده با توالی رقت از ۴ میکروگرم تا ۳۵ نانوگرم است (نمودار ۲).



نمودار ۲) ساندویچ الایزا با آنتی‌بادی ضدCTXB و آنتی‌سرم ضدLTB تهیه‌شده از موش ایمن

بحث

مقاومت روزافزون ETEC به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌علت توان بالای این باکتری در تبادل پلاسمیدهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. سویه‌های ETEC روزبه‌روز در حال مقاوم‌شدن نسبت به اریترومایسین هستند و استراتژی‌های جدید درمانی باید برای آنها طراحی شود [۸، ۲۱، ۲۲، ۲۳]. این امر باعث شده تا آمار مرگ‌ومیر به‌خاطر ناکامی در درمان موثر رو به افزایش باشد. اگرچه با بهبود کیفیت آب‌ها و افزایش سطح بهداشت می‌توان از شیوع اسهال جلوگیری کرد، اما این عمل با انبوه جمعیت در آینده و محدودیت منابع، ممکن نخواهد بود. از این رو کنترل این بیماری، سازمان‌های بهداشتی متعددی نظیر سازمان جهانی بهداشت را بر آن داشته تا به‌دنبال طراحی و تهیه واکسن باشند [۱، ۲].

یکی از مسایل مهمی که در طراحی واکسن علیه این بیماری مدنظر است، یافتن مولکول (یا مولکول‌های) کاندیدای واکسنی است که بیشتر سویه‌های ETEC واجد این مولکول باشند و بتواند برای مدت طولانی (حداقل دو سال) در ۷۰٪ افراد، ایجاد ایمنی حفاظتی نماید [۱، ۲، ۳]. بر پایه این اصل، این مطالعه درصدد تولید LTB به‌عنوان جزئی از واکسن است.

مولکول LTB نقش مهمی در پیوند توکسین به سلول اپی‌تلیال دارد. آنتی‌بادی ضد این جزء می‌تواند از اثرات توکسین (ازدست‌دادن آب و الکترولیت) جلوگیری نماید [۲، ۸]. در مطالعه قبلی، PCR ژن، کلون آن در وکتور بیانی pET28a و بیان ژن LTB گزارش شد [۱۵].

در مطالعه حاضر، شرایط مختلف بیان پروتئین نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد با افزایش غلظت IPTG از ۰/۲۵ تا غلظت ۱ میلی‌مولار، میزان بیان پروتئین افزایش می‌یابد. ولی افزایش غلظت تا ۱/۵ میلی‌مولار موجب افزایش بیان نمی‌شود. به‌نظر می‌رسد در غلظت ۱ میلی‌مولار، تمامی پروموترهای وکتور به‌وسیله IPTG اشباع و القا شده‌اند و غلظت‌های بیشتر IPTG نمی‌تواند تاثیرگذار باشد.

زمان القای پروموتر، عامل دیگری بود که بررسی شد. با افزایش زمان القا تا ۳ ساعت، بیان پروتئین افزایش می‌یافت، اما در ساعت‌های ۴ و ۵ میزان بیان اندکی رو به کاهش می‌گذاشت. به‌نظر می‌رسد با افزایش زمان القا، این امکان وجود دارد که برخی باکتری‌ها قادر به تحمل شرایط تولید و انباشت زیاد پروتئین نوترکیب نباشند و برخی از آنها دچار مرگ سلولی شده، محتویات سلولی از جمله پروتئین نوترکیب به داخل محیط کشت ریخته و تحت اثر پروتئازهای سلولی تجزیه شده باشند.

ما و همکاران، پروتئین LTB نوترکیب را در وکتور pGEX و در میزبان *E. coli* BL21DE3 بیان نمودند. آنها شرایط محیط کشت، pH، دما و القاکننده لاکتوز را بهینه‌سازی کردند و توانستند تا سه‌برابر، میزان بیان را افزایش دهند [۲۴].

به‌منظور جلوگیری از انباشت زیاد پروتئین نوترکیب و عدم حلالیت آن در اجسام انکلوژنی، القای بیان ژن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب صورت گرفت تا سلول باکتری با سرعت متابولیزم کمتری به سنتز پروتئین بپردازد و از تجمع آن در اجسام انکلوژنی به‌شکل نامحلول جلوگیری شود. نتیجه نشان داد اگرچه میزان پروتئین نوترکیب کمتری نسبت به شرایط بهینه تولید شده، اما این پروتئین در اجسام انکلوژنی تجمع یافته است. این نتیجه، حکایت از تمایل پروتئین LTB به تجمع دارد که با نتیجه *دماتوس‌آریز* مطابق است [۲۵].

ما و همکاران برای این‌که پروتئین LTB نوترکیب را به‌شکل محلول درآورند، از وکتور pGEX استفاده نمودند. با این روش پروتئین نوترکیب به‌شکل فیوژن‌پروتئین با گلوتاتیو- اس- ترانسفراز به‌حالت محلول در می‌آید. همچنین آنها ذکر کردند که هرچند در دمای پایین، سنتز پروتئین و رشد سلول کاهش می‌یابد، اما پروتئین فرصت دارد به‌شکل محلول درآید و با افزایش دما میزان سنتز پروتئین افزایش می‌یابد [۲۴]. هرچند استفاده از شکل فیوژن‌پروتئین، مشکل حلالیت را برطرف می‌سازد، اما مساله ایمنی‌زایی و ورود پروتئین دیگر در هنگام ایمن‌سازی را به‌دنبال دارد. هضم آنزیمی پروتئین نوترکیب نیز هزینه‌هایی همچون استفاده از آنزیم ترومبین را در پی دارد.

باکتری *اشریشیا کلی* سویه Bl21DE3 مقدار زیادی از پروتئین نوترکیب LTB با نشانه His_6 تولید نموده بود. از این نشانه برای تخلیص پروتئین با ستون Ni-NTA استفاده شد و پروتئین بیش از ۹۵٪ خالص‌سازی شد. *ما* و همکاران توانستند با استفاده از ستون تمایلی گلوتاتیون، فیوژن‌پروتئین را تا ۹۲٪ خالص‌سازی نمایند. این پروتئین نوترکیب هنگامی که به موش تزریق شد توانست در تمامی موش‌ها تیتر بالایی (۱/۱۲۸۰۰۰) از آنتی‌بادی را به‌وجود آورد. این پدیده را می‌توان به عملکرد ادجوانی و محرک سیستم ایمنی پروتئین LTB نسبت داد که توسط سایر محققان گزارش شده است [۱۲، ۱۳]. درنظر است تا در مطالعات بعدی، تولید پروتئین نوترکیب سایر مولکول‌های کاندیدای واکسن، فرمولاسیون آنها با نانوپارتیکل‌ها، تجویز خوراکی آن در حیوان آزمایشگاهی و پتانسیل آن در ایجاد ایمنی محافظتی بررسی شود.

نتیجه‌گیری

پروتئین LTB به‌عنوان مولکول ایمونوژن می‌تواند یکی از اجزای مهم در تولید واکسن علیه ETEC باشد.

منابع

1- World Health Organization. State of the art of vaccine research and development. Geneva: WHO; 2002. Available from: http://www.who.int/vaccines-documents

2- Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of entrotoxins and colonization factors in enterotoxigenic Escherichia coli [dissertation]. Sweden: Gutenberg University; 2008.

3- Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Travelling with infants and young children. Part III: Travelers diarrhea. J Travel Med. 2002;9:141-50.

4- Walker RI, Steele D, Aguado T. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic Escherichia coli disease. Vaccine. 2007;25:2545-66.

5- Jafari F, Shokrzadeh-Ahrabi L, Hamidian M, Salmanzadeh S, Zali MR. Acute diarrhea to enterotoxigenic bacteria in patients at hospital in Tehran. Jpn J Infect Dis. 2008;61:269-73.

6- Eisenstein BI, Zaleznik DF. Enterobacteriaceae. In: Mandell D, Bennett D, editors. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone; 2000.

7- Black R. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. Rev Infect Dis. 1990;12:73-8.

8- Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: Epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. Clin Microbiol Rev. 2005;18:465-83.

9- Zhi-Dong J, Mathewson JJ, Ericsson CD, Svennerholm A, Pulido C, DuPont HL. Characterization of enterotoxigenic Escherichia coli in patients with traveler's diarrhea acquired in Guadalajara, Mexico, 1992-1997. J Infect Dis. 2000;181:779-82.

10- World Health Organization. Weekly epidemiological record. Geneva: WHO; 2006.

11- Sooka A, Plessis M, Keddy K. Enterovirulent Escherichia coli. Southern African J Epidemiol Infect. 2004;19:23-33.

12- Hajishengallis G, Arce S, Gockel CM, Connell TD, Russell MW. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretary immunity or tolerance: Applications for oral infections. J Dent Res. 2005;84:1104-16.

13- Millar DG, Hirst TR, Snider DP. Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. Infect Immun. 2001;65:3476-82.

14- Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. Exp Rev Vaccines. 2008;7:795-804.

15- Khalesi R, Nazariyan S, Amani J, Ehsani Z, Mansori M, MOazeni SM, et al. Cloning and expression of Escherichia coli heat-sensitive toxin gene as a vaccine candidate. Kowsar J. 2009;14:95-100. [Persian]

16- Rusel D, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

17- Novagen Co. pET system manual. 10th ed. USA: Novagen Co; 2002.

18- Thatcher DR, Hitchcock A. Protein folding biotechnology in mechanisms of protein folding. Biotechnol Res. 1994;2:229-61.

19- Wingfield PT, Palmer I, Liang SM. Folding and purification of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli. Curr Protoc Protein Sci. 1995;1:651-7.

20- Bollag DM, Michel DR, Edelstein SJ. Protein methods. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1996.

21- Steffen R, Bernardis C, Banos A. Travel epidemiology: A global perspective. Int J Antimicrob Agents. 2003;21:89-95.

22- DeBoy JM, Wachsmuth IK, Davis BR. Antibiotic resistance in Enterotoxigenic and non-Enterotoxigenic Escherichia coli. J Clin Microbiol. 1980;12:264-70.

23- Trung VN, Phung Van Le, Chinh Huy Le, Andrej Weintraub. Antibiotic resistance in diarrheagenic Escherichia coli and Shigella strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:816-9.
24- Ma X, Zheng W, Wang T, Wei D, Ma Y. Optimization and high-level expression of a functional GST-tagged rHLT-B in Escherichia coli and GM1 binding ability of purified rHLT-B. J Microbiol. 2006;44:293-300.
25- De Mattos AP, Sarno ML, Ramos CR, Sbrogio-Almeida ME, Raw I, Ho PL. Synthesis of cholera toxin B subunit gene: Cloning and expression of a functional 6 his-tagged protein in Escherichia coli. Protein Express Purif. 2002;25:481-7.