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

کومش- جلد ۱۵، شماره ٤ (پیاپی ۵۲)، تابستان ۱۳۹۳

کلونینگ،بیان، تخلیص و بررسی فعالیت ضد استافیلوکوکی پروتئین لیزوستافین اولیه در شرایط آزمایشگاهی

لیلا فرهنگ‌نیا[۱](M.Sc)،احسان‌الله غزنوی راد [۲](Ph.D)، ندا مولایی[۳](M.Sc)، حمید ابطحی[*۴](Ph.D)

۱- *دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه بیوتکنولوژی*

۲- *دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی،گروه میکروب‌شناسیو ایمنی شناسی*

۳- *دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی،مرکز تحقیقات پزشکی ومولکولی*

۴- *دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی،گروه میکروب‌شناسی*

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوک اورئوس عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها،از عفونت‌های پوستی تا انتشار آن وعفونت‌های سیستمیک منجرشونده به نارسایی ارگانی ومرگ می‌باشد.مقاومت دارویی در این گروه از پاتوژن‌ها یک نگرانی جهانی شده و نیازمند توسعه‌ی عوامل درمانی جدیداست. لیزوستافینیک نمونه از این عوامل می‌باشد،لیزوستافینیک باکتریوسین تولیدشده به‌وسیله‌ی استافیلوکوک سیمولانس است که باعث کشتن سلول‌های استافیلوکوک اورئوس از طریق تخریب دیواره سلولی استافیلوکوک می‌شود.هدف از این مطالعه،بیان بالای لیزوستافین اولیه به شکل نوترکیب وبررسی فعالیت ضد استافیلوکوکی آن بر علیه استافیلوکوک اورئوس تحت شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه،ژن لیزوستافین از استافیلوکوک سیمولانس پس از تکثیر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در ناقل پلاسمیدیpET32a کلون وبیان شد. پروتئین بیان شده توسط کیتNi-NTA بر اساس کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد.فعایت آنتی‌باکتریال آن بر علیهیک سوسپانسیون سلولی از استافیلوکوک اورئوس با استفاده از روش کدورت‌سنجی مطالعه شد.

یافته‌ها:نتایجPCR وتعیین توالی نشان داد که ژن هدف به درستی در ناقل مورد نظر کلون شده است. بیان پروتئین به‌وسیلهIPTG القا شد و غلظت‌های بالایی از پروتئین نوترکیب توسط رزین نیکل با فعالیت ضد استافیلوکوکی تخلیص شد.

نتیجه‌گیری:pET32aیک سیستم بیانی کارآمد در بیان پروتئین نوترکیب پیش‌ساز لیزوستافین در میزبان بیانیE.coli می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوک طلایی، لیزوستافین،کلونینگ مولکولی

مقدمه

استافیلوکوک اورئوس یک باکتری گرم مثبت است، که عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها،از عفونت‌های پوستی تا انتشار آن وعفونت‌های سیستمیک منجرشونده به

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۸۶۳-۴۱۷۳۵۰۲ نمابر:۰۸۶۳-۴۱۷۳۵۲۶ Email: abtahi@arakmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۵

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

نارساییارگانی ومرگ می‌باشد[۱].و به دلیل وجودش روی پوست و در نازوفارنکس انتشار این باکتری شایع بود ودرطول قرن اخیر به خطرناک‌ترین پاتوژن انسانیوشایع‌ترین علت عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های اکتسابی از جامعه در سرتاسر جهان تبدیل شده است [۳،۲].افزایش ظهور مقاومت‌های چندداروییی در میان استافیلوکوک‌های اورئوس به خصوص به شکل استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)به نگرانی اصلی در محیط‌های بیمارستانی تبدیل شده است [۴].MRSAs اشاره به مقاومت به همه‌ی بتالاکتام‌های مقاوم به بتالاکتاماز مثل (متی‌سیلین،نفسلین،اگزاسیلین) وسفالوسپورین‌ها دارند[۵]. وامروزه مبارزه با بسیاری از آن‌ها برای درمان عفونت به علت ظهور مقاومت به همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های حاضر بسیار مشکل شده. این نشان می‌دهد که طیف آنتی‌بیوتیک‌های موثر در درمان عفونت‌های استافیلوکوک اورئوس بسیار اندک است و این احتمال وجود داردکه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های باقی مانده به طور مشابه رخ دهد. بنابراین موضوع مقاومت دارویی در اینگروه از پاتوژن‌ها نیازمند توسعه عوامل درمانی جدید و فعال بر علیه این گروه از پاتوژن‌ها می‌باشد.

لیزوستافینیک پپتیدوگلیکان هیدرولاز تولید شده به‌وسیله سلول‌هایاستافیلوکوک سیمولانس است که باعث شکست پیوند پپتیدی بین دو گلایسین مجاور هم در پل‌های پپتیدی پپتیدوگلیکان دیواره سلولی استافیلوکوک‌ها می‌شود[۶]. لیزوستافین در ابتدا به شکل یک پیش‌ساز پروتئینی (Preprolysostaphin)با ۴۸۰ اسیدآمینه سنتز می‌شود که در گام اول بعد از سنتز به‌وسیلهیک پپتید نشانه‌ای که در انتهای آمینی(N-terminal) پروتئین قرارگرفته وارد فاز ترشحی می‌شود. سپس پپتید نشانه‌ای از انتهای آمینی برداشته می‌شود وبه شکل لیزوستافین اولیه(prolysostaphin) با توالی‌های اسید آمینه‌ای تکراری وپشت سر هم در محیط کشت استافیلوکوک سیمولانس ترشح می‌شود.این توالی‌های تکراری که در انتهای آمینی پروتئین قرار دارند توسط یک سیستئین پروتئاز خارج سلولی ترشح شده در محیط کشت استافیلوکوک سیمولانس برداشته شده وبازده آن مولکول بالغ وکاملاً فعال لیزوستافین می‌باشد[۷].

لیزوستافین بالغ به شکل نوترکیب در E.coli بیان شده ودر بسیاری از مطالعات ژنتیکی استافیلوکوک‌ها برای جداسازی DNA[۸]،شکل‌گیری پروتوپلاست‌ها وافتراق استافیلوکوک‌های اورئوس از دیگر گونه‌های استافیلوکوکی ومیکروکوک‌ها کاربرد داشته است[۹].هم‌چنین لیزوستافین بالغ فعالیت باکتریسیدال بر علیه گونه‌های MRSA [۱۰]، گونه‌های دارای مقاومت نسبی به ونکومایسین [۱۱] و سلول‌های استافیلوکوک اورئوس دارای مقاومت به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده است [۱۲] و این فعالیت آنتی‌باکتریال لیزوستافین بیش‌تر از ونکومایسین ودیگرعوامل مرجع بوده.علاوه بر این اثربخشی لیزوستافین در پیش‌گیری از کلونیزه شدن استافیلوکوک اورئوس بر روی کاتترهای وریدی وعفونت‌های مرتبط با آن اثبات شده است [۱۴،۱۳] ولی تاکنون فعالیت ضد استافیلوکوکی اورئوس پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه مورد بررسی قرار نگرفته است.

هدف از این تحقیق،کلون و بیان لیزوستافین اولیه برای اولین بار با استفاده از ناقل بیانیpET32a در اشریشیاکلی، تخلیص پروتئین نوترکیب حاصل و بررسی فعالیت آن در شرایط آزمایشگاهی بر علیه استافیلوکوک اورئوس به منظور پی‌ریزی مطالعات عمل‌کردی بر روی پروتئین لیزوستافین اولیه به عنوان یک عامل آنتی‌استافیلوکوکال است.

مواد و روش‌ها

پلاسمید و سویه‌های باکتری و شرایط کشت:سویه استاندارد ۱۴۴۲استافیلوکوک سیمولانس تهیه ودرمحیط بلاد آگار کشت داده شد.سپس محیط کشت تلقیح شده و پلیت کنترل به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. وپس از این مدت باکتری‌های رشدیافته برای استخراج DNAپلاسمیدی مورد استفاده قرار گرفتند.

از باکتریE.coliسویه DH5 (شرکتاستراتاژن،امریکا) به عنوان میزبان اولیه برای تکثیر پلاسمیدنوترکیب استفاده

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

شد.برای بیان ژن، میزبان بیانی E.coli BL21 (DE3) pLYsS و وکتور بیانی pET32a (شرکت نواژن، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفتند.

کلیه مواد شیمیایی به‌کار رفته در ساخت بافرها، محلول‌ها و سایر مراحل از شرکت مرک(Merck, Germany)و شرکت رش (Roch,Germany)وآنزیم‌ها از شرکت‌های فرمنتاس(Fermentase,Lithuania)وسیناژن تهیه شدند.

سویه‌های E.coliاز پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران تهیه شدند.

جداسازی DNA پلاسمیدی: برای تکثیروجداسازی ناحیه کدکننده ژن لیزوستافین ابتدا پلاسمید حاوی ژن لیزوستافین با استفاده از روش Mini-preparation از کشت باکتری استافیلوکوک سیمولانس جداسازی شد[۱۵]. بدین منظور ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌با استفاده از سانتریفیوژ با ۴۰۰۰دور بردقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد.رسوب سلولی در ۱۰۰میکرولیتراز بافر SET (sucrose 50 mM,EDTA 10mM,Tris-HCL25mM,PH=8)حل شد، و سلول‌ها با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر بافر سرد lyses (NaOH 5N,SDS 10%,DDW) لیز شدند،سپس استات پتاسیم ۵ مولار (KAC 5M, Acetic acid, DDW)به منظور توقف عمل بافر lyses اضافه شد.برای خالص‌سازی DNA پلاسمیدی،پروتئین‌ها،بقایای سلولی ومواد اضافی با دو بار اضافه کردن فنل-کلروفرم-ایزوامایل (۱/۲۴/۲۵) از محلول خارج شدند.سپس DNA در اتانول ۱۰۰٪ رسوب داده شد.در پایان با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل شد.کیفیت وکمیت DNAبا استفاده ازالکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ در بافر TBEوبا اندازه‌گیری چگالی نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به دست آمد.

طراحی پرایمر وتکثیر ژن لیزوستافین: توالی ژن لیزوستافین با شماره دسترسی X06121 که 1825bp دارد از بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) تهیه شد. سپس توسط نرم‌افزارOligo5پرایمرهای مناسب مطابق با ناحیه‌ی کدکننده لیزوستافین اولیه (1440bp) طراحیگردید (جدول۱).اختصاصی بودن پرایمرها برای قطعه‌ی ژنی مورد نظر توسط برنامه‌Blast تایید شد.

جدول۱. پرایمرهایمورداستفادهدراینتحقیق

توضیحات	توالی
پرایمربالادستواجد جایگاه برش آنزیم محدود کنندهBamHI	(5-´GTA GGA TCC TTG AAG AAAACA AAA AAC A-3´)
پرایمرپایینددست واجد جایگاه برش آنزیم محدود کنندهXhoI	(5-´ACT CGA GTC ACT TTA TAG TTC CCC AA -3´)

تکثیر ژن لیزوستافین از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ۲۵۰ نانوگرم DNAالگو،۳ میلی‌مولاراز یون منیزیوم، ۰/۲ میکرومولاراز هر کدام از پرایمرها،۲۰۰ میکرومولار از هر دئوکسی نوکلئوزید تری‌فسفات، ۲/۵ واحد از آنزیم DNA پلیمرازTaq و بافر مربوط به آن انجام شد. PCR طبق برنامه از قبل داده شده (جدول ۲) به دستگاه ترمال سایکلر به تعداد ۳۰ سیکل راه‌اندازی شد. پس از انجام واکنش، محصول PCRروی ژل آگارز ۰/۸٪ در بافرTBE برده شد. پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن بادستگاه ترانس لومیناتورUV و تایید محصول در مقایسه با سایز مارکر (Marker)، تخلیص قطعه ژنی مورد نظر از ژل مطابق با دستورالعمل کیت استخراج محصول PCR (رش- آلمان) انجام گرفت.

جدول۲. برنامه PCR استفاده شده در این تحقیق

Primary Denaturation (واسرشتگی)	۹۴ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه
Secondary Denaturation	۹۴ درجه سانتیگراد	۱ دقیقه
Annealing (اتصال)	۵۰درجه سانتیگراد	۱ دقیقه
Extention (بسط)	۷۲ درجه سانتیگراد	۱ دقیقه
Final Extention	۷۲ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه

کلونینگ ژن در باکتری اشریشیاکلی: با توجه به جایگاه‌های آنزیمی تعبیه شده در پرایمرها،محصولPCR ژن با

آنزیم‌های BamHI و XhoI برش خورد.ناقل پلاسمیدی pET32aنیز با آنزیم‌های مشابه با آنزیم‌های برش‌دهنده قطعه ژنی در شرایط مشابه برش داده شد. در مرحله بعد واکنش الحاق بین ناقل پلاسمیدی pET32aو قطعه ژنی برش خورده با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 در حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت به منظور تولیدپلاسمید نوترکیب (pET32a-lys)انجام گرفت. سپس ناقل‌های نوترکیبحاصل از طریق ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی در میزبان کلونینگ(DH5□ E.coli)مستعد شده با روش کلسیم‌کلراید (CaCl2) وارد شدند. پس از رشد کلنی‌ها،کلنی‌های ترانسفورم شده به‌وسیله غربالگری بر روی محیط‌های نوترینت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین(۱۰۰mg/ml) انتخاب شدند. جهت اطمینان از ورود پلاسمیدهای نوترکیب به داخل سلول‌های مستعد، از سلول‌های انتخاب شده استخراج پلاسمید انجام گرفت و با PCRوهضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم‌هایBamHIوXhoIژن مورد نظر تایید شد.سپس تعیین توالی ژن توسط شرکت MWGآلمان انجام گرفت.و پلاسمیدهاینوترکیب حاوی ژن لیزوستافین به منظور بیان ژن به میزبانیانی E.coli سویه BL21 pLYsS (DE3)مستعد شده انتقال یافتند.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب لیزوستافین:برای بیان پروتئین نوترکیب،از کلنی‌های E.coli BL21(DE3) pLYsS حاوی پلاسمیدهای pET32a-lys در محیط نوترینت براث حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلینو کلرآمفنیکل کشت داده شد. سپس۵۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های کشت داده شده به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط القا اضافه شد و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی انکوباتور شیکردار با ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از این‌که تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید(OD600=۰/۶)، از محلول یک مولار IPTG به منظور القا بیان پروتئین به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی IPTG به یک میلی‌مولار برسد.دو و چهار ساعت پس از افزودن IPTG، رسوب باکتری‌ها از ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت نیم ساعت جمع‌آوری شد. برای بررسی نتیجه القاء ازروش الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری بر روی ژل پلی‌اکریل آمید(SDS-PAGE ۱۲٪) استفاده گردید.

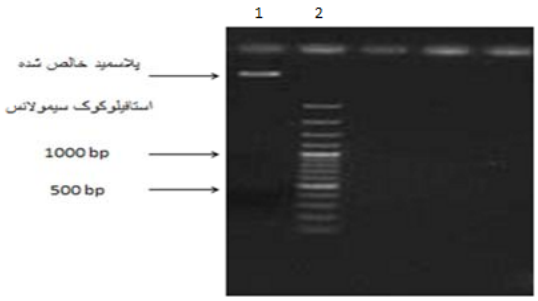
در این مطالعه به علت وجود دنباله هیستیدینی (۶His.tag) در پروتئین بیان شده که توسط وکتور بیانی pET-32aاضافه شده است، تخلیص آن توسط کیت (Ni-NTA agarose resin) طبق دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن،آمریکا) بر اساس کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش برد فورد اندازه‌گیری گردید و کیفیت آن نیز با استفاده از ژل الکتروفورز پلی‌اکریل آمید(SDS-PAGE۱۲٪) بررسی گردید.

کدورت‌سنجی:فعالیت سنجی در اغلب موارد با اندازه‌گیری وظیفه اصلییا عمل‌کرد یک‌آنزیم ارتباط مستقیم دارد. سنجش فعالیت لیزوستافین به‌وسیله‌ی مانیتورینگ لیز سلولییک سوسپانسیون سلولی از استافیلوکوک اورئوس انجام می‌شود.میزان لیز سلولی به طور مستقیم متناسب با کاهش چگالی نوری(جذب نوری) یک سوسپانسیون سلول باکتریای در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) می‌باشد[۱۶]. بنابراین به منظور بررسی عمل‌کرد پروتئین تولید شده در شرایط in vitro روش کدورت‌سنجی انجام شد.ابتدایک سوسپانسیون سلولی از استافیلوکوک اورئوسATCC25923 در محیط مولرهینتون براث به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از کشت ۱۸ ساعته سوسپانسون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد.رسوب سلولی به‌دست آمده دو بار در بافر فسفات سالین (PH=۷/۴ PBS) شستشو داده شد.در نهایت سلول‌ها در بافر PBSمعلق شدند تا به جذب نوری۰/۲۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر(OD600) برسند. سپس ۱میلی‌لیترازسوسپانسیون سلولی فوق به طور جداگانه در دو لوله ریخته شد. در یکی از لوله‌ها پروتئین نوترکیب با غلظت ۱۰۰µg/mlتلقیح شد، در دیگری به عنوان کنترل هیچ پروتئینی تلقیحنشد.سپس لوله‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدندو میزان

لیز سلولی با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر(OD600)در فواصل زمانی نیم ساعت بررسی شد.

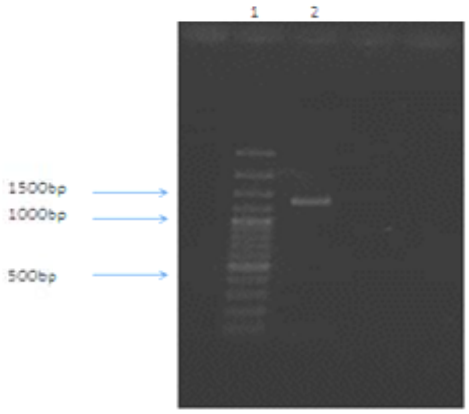
نتایج

استخراج DNA پلاسمیدی و PCR: پس از استخراج DNAپلاسمیدی (شکل ۱) از کلنی‌های رشدیافته استافیلوکوک سیمولانس،DNAدر غلظت براورد شده‌ی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تغلیظ شد و از آن به عنوان DNA الگو در واکنش PCR استفاده شد. برای تکثیر ژن لیزوستافین از غلظت‌های متفاوت یون منیزیوم و دماهای مختلف annealing استفاده شد. بهترین غلظت یون منیزیوم برای تکثیر ژن، غلظت ۳میلی‌مولار و دمای مناسب برای اتصال پرایمرها ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. باندbp ۱۴۴۰ حاصل از تکثیر ژن لیزوستافین روی ژل آگارز ۰/۸٪ مشاهده و اندازه آن از طریق مقایسه با مارکر استاندارد تایید شد(شکل۲).

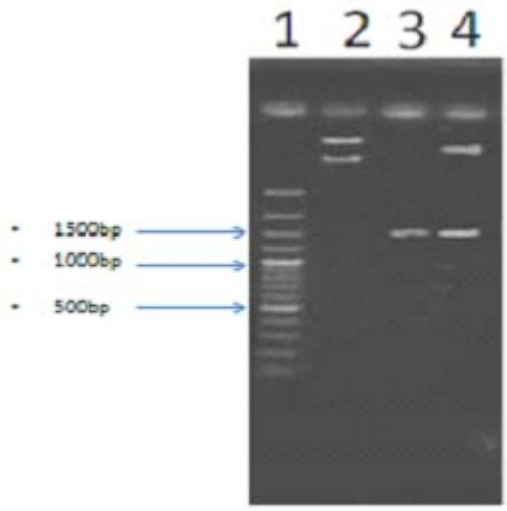


شکل۱.الکتروفورز DNA پلاسمیدی خالص شده بر روی آگاروز ۰/۸ درصد. چاهک شماره ۱:پلاسمید خالص شده استافیلوکوک سیمولانس.چاهک شماره۲: نشانگر #SM0321

کلونینگ ژن در باکتری اشریشیاکلی: به منظور تایید باکتری‌های حاوی ناقل نوترکیب،تخلیص پلاسمیدآن‌ها انجام شد. پلاسمیدهایی که حاوی ژن مورد نظربودند، حرکت کندتری داشتندJumping لذا از سایر پلاسمیدهای فاقد ژن شناسایی شدند. سپس تایید ژن مورد نظر در پلاسمیدها با انجام PCRبا پرایمرهای اختصاصی ژن لیزوستافین و هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم‌هایBamHIوXhoI که جایگاهآن در دو طرف ژن الحاق شده به پلاسمید قرار داشت انجام گرفت. در PCR قطعه‌ای به طولbp ۱۴۴۰ تکثیر شد و در هضم آنزیمی حضور ژن به همراه پلاسمید بر روی ژل آگاروز تایید گردید(شکل ۳).سپس تعیین ترادف به روش سنگر (Sanger) انجام گرفت. نتایج تعیین توالی (sequencing)و هم‌ردیفی(Alignment)با استفاده ازبرنامه Blast، صحت ترادف جداشده را تائید کرد.



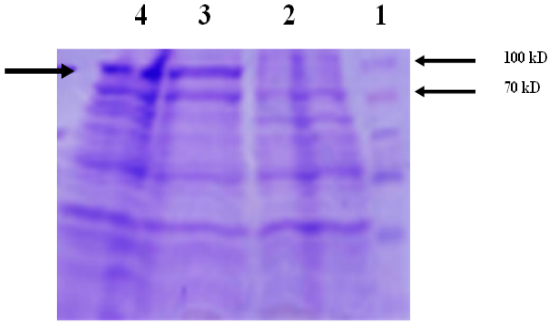
شکل۲.تکثیر ژن لیزوستافین توسط PCR. چاهک شماره ۱: نشانگر #SM0321.چاهک شماره ۲: محصول PCR ژن لیزوستافین



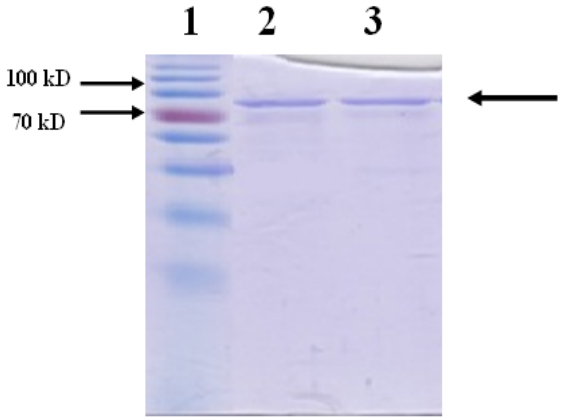
شکل۳.PCR وبرش آنزیمی پلاسمیدpET32a-lys. چاهک شماره ۱: نشانگر#SM0321.چاهک شماره۲: پلاسمید برش نیافته.چاهک شماره۳: محصول PCR ناشی از pET32a-lys.چاهک شماره ۴: برش آنزیمیpET32a-lys با آنزیم هایBamHI وXhoI

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب:پس از انتقال پلاسمیدهای نوترکیبpET32a-lys حامل ژن لیزوستافین به میزبان بیانیE.coli سویهpLYsS (DE3) BL2،بیان بالای

پروتئین هدف باIPTG القا شد.تولید پروتئین مورد نظر با انجامSDS-PAGE تایید شد.نتایج مربوط به تولید پروتئین در شکل ۴ آمده است. پروتئین بیان شده با استفاده از رزین نیکل با توجه به وجود دنباله‌های هیستیدینی در ترکیب پروتئینی بر اساس کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد. و روی ژل، تک‌باندی در ناحیه مورد نظر نشان داد(شکل ۵). نتیجه تخلیص تقریباً ۵۰میلی‌گرم پروتئین نوترکیب از یک لیتر محیط کشت بود.



شکل ۴. القا پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه. چاهک شماره ۱: نشانگر پروتئین.چاهک شماره ۲: نمونه قبل از القا.چاهک شماره ۳: نمونه ۲ ساعته بعد از القا.چاهک شماره ۴: نمونه ۴ ساعته بعد از القا



شکل ۵ . تخلیص پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه. چاهک شماره ۱:نشانگر پروتئین، چاهک شماره ۲ و ۳: پروتئین خالص شده

کدورت‌سنجی: میزان لیز سلولی به طور مستقیم متناسب با کاهش جذب نوریک سوسپانسیون سلولی از استافیلوکوک اورئوس در طول موج ۶۰۰ نانومتر(OD600) می‌باشد. جذب نوری (کدورت) سوسپانسیون سلولی استافیلوکوک اورئوس به میزان ۵۰٪ از(۰/۲۵۰ به ۰/۱۲۵) در PH=۷/۴ودمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد توسط پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه کاهش یافت.کاهش کدورت سوسپانسیون سلولی نشان می‌دهد که پروتئین تولید شده قادر به لیز سلول‌های استافیلوکوک اورئوس در شرایطآزمایش می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ژن لیزوستافین پس از تکثیر با استفاده از روش PCRدر وکتور pET-32a کلون شد.پس از تایید پلاسمید نوترکیب، این پلاسمید به سلول‌های E.coli BL21 s pLys (DE3) ترانسفورم شد،و بیان ژن تحت کنترل پروموتر باکتریوفاژT7 در حضور IPTG صورت گرفت.سپس پروتئیننوترکیب حاصل با فعالیت ضد استافیلوکوکی توسط کیت Ni-NTA تخلیص شد.

روش‌های اولیه برای تولید پروتئین لیزستافین استخراج آن از عصاره‌ی سلولی استافیلوکوک سیمولانس بود [۱۸،۱۷]، که این روش ممکن بود با آلودگی‌های چون آلرژن‌ها همراه باشد[۱۹] و تخلیص آن از منبع طبیعی را بسیار مشکل کرده بود. به شکل نوترکیب تولید و خالص‌سازی پروتئین‌ها نسبت به پروتئین طبیعی راحت‌تر انجام می‌شود،و همچنین تولید پروتئین در حالت نوترکیب رامی‌توان به میزان دلخواه افزایش داد.به هر حال لیزستافین بالغ در E.coli [۲۰]، در لاکتوکوکوس لاکتیس [۲۱] و در یک سیستمیوکاریوتی بیان شده است[۲۲].اما تا امروز تحقیقی در مورد تولید نوترکیب لیزوستافین اولیه و بررسی فعالیت ضد استافیلوکوکی آن انتشار نیافته است. لذا در این تحقیق علاوه بر تولید لیزستافین اولیه اثر ضد استافیلوکوکی آن نیز بررسی گردید.

E.coli به عنوان یک میزبان بیانی مناسب در نظر گرفته شد که تا به حال پروتئین‌های متعددی توسط آن بیان شده و به طور وسیعی به عنوان میزبان بیانی هم در تحقیقات وهم در صنعت از آن استفاده می‌شود.

در این مطالعه به منظور جلوگیری از تخریب آنزیمی و دست‌یابی به مقدار بالایی از پروتئین نوترکیب ازE.coli سویهBL21به عنوان میزبان بیانی استفاده شد،این سویه فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی شناخته شده است[۲۳].بنابراین بیان بالای پروتئین ناشی از نقص پروتئازها در این سویه می‌باشد.

سیستمpET از جمله قوی‌ترین سیستم‌ها برای بیان ژن و تولید پروتئین نوترکیب در میزبانE.coli می‌باشد. در این سیستم بیانژن هدف تحت کنترل پروموتر قویT7 بوده که تحت کنترل اپراتور Lac می‌باشد و در ژنوم میزبان (E.coli) رونویسی از ژن هدف تحت کنترل این پروموتر توسطRNA پلیمراز فاژ T7 که در سلول باکتری کلون شده است، انجام می‌پذیرد. بنابراین به علت استقلال سیستم رونویسی ژن از سلول میزبان، تولیدmRNA و نهایت تولید پروتئین در این سیستم متاثر از عوامل سلولی دخیل در سنتز پروتئین‌های سلولی میزبان نمی‌باشد؛ به همین دلیل تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم‌هایی است که در آن‌ها رونویسی وابسته به RNA پلیمرازهای سلول میزبان است [۱۵].

تا به حال لیزوستافین بالغ در چندین در وکتورمختلف(pET: pET23b,pET28a,pET15b) بیان شده که بازده محصول به ترتیب ۱۱ میلی‌گرم،۲۲ میلی‌گرم،۲۰ میلی‌گرم از یک لیتر محیطE.coli BL21(DE3) + pET-lys بوده است[۲۶،۲۵،۲۴].

در این مطالعه از وکتور بیانیpET32a برای بیان پروتئین هدف استفاده شد. ناقل pET32a دارای توالی الحاقی (ترادف ویژه مربوط به ۶ اسید آمینه هیستیدین)در ناحیه ´۵ مکان کلونینگ ژن می‌باشد که به تخلیص پروتئین هدف کمک کرد و با استفاده از روش تخلیص پروتئین بر اساس کروماتوگرافی تمایلی تقریباً ۵۰ میلی‌گرم پروتئین نوترکیب از یک لیتر محیط کشت E.coli BL21(DE3) + pET-lysحاصل شد.

امروزه پروتئین لیزوستافین بالغ درE.Coli بیان می‌شود وبه شکل تجاری توسط شرکت سیگما(آمریکا) با قیمت بالا به فروش می‌رسد. وبرای مطالعات ژنتیکی بر روی استافیلوکوک‌ها،جداسازیDNA،شکل‌گیریپروتوپلاست‌هاوافترا ق گونه‌های استافیلوکوک‌ها ضروری می‌باشد.

نتایجبه دست آمده نشان می‌دهند که پروتئین تولید شده قادر به لیز سلول‌های استافیلوکوک اورئوس در شرایط In vitro می‌باشد، بنابراین این پتانسیل را دارد که هم‌چون پروتئین نوترکیب لیزوستافین بالغ در کاربردهای تحقیقاتی به کار گرفته شود.

به دلیل این‌که پروتئین لیزوستافین اولیه به شکل تجاری موجود نمی‌باشد امکان مقایسه پروتئین تولید شده با فرم تجاری فراهم نگردید.

در این تحقیق پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه با استفاده از پروسه تولید وتخلیص حاضربا استفاده ازpET32a در E.coli برایآماده‌سازی مقدارهای بزرگی از پروتئین نوترکیب به منظور پی‌ریزی مطالعات عمل‌کردیبر روی آن به عنوان یک عامل آنتی‌استافیلوکوکال تولید شد. نتایج نشان داد که pET32aیک سیستم بیانی کارآمد در بیان پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیهمی‌باشد. پروتئین خالص شده فعالیت ضد استافیلوکوکی داشت،بنابراین این پتانسیل را دارد که به عنوان یک عامل موثر در پیش‌گیری و درمان عفونت‌های استافیلوکوکی استفاده شود. و مطالعات بیش‌تری با بررسی عمل‌کرد ضد استافیلوکوکی آن در شرایطin vivo می‌توان انجام داد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش از پایان‌نامه لیلا فرهنگ‌نیا کارشناسی ارشد زیست فناوری (شماره۷۷۲) دانشگاه علوم پزشکی اراک استخراج شده است. لذا بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش همکاری کرده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

[1] Lowy FD.Staphylococcus aureus infection.N Engl J Med1998;339:520-532.

[2] Brumfitt W, Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus.N Engl J Med 1989;320:1188-1196.

[3] Sheagren JN. Staphylococcus aureus: the persistent pathogen. N Engl J Med 1984;310:1368-1373.

[4] van Saene HK, Weir WI, de la Cal MA, Silvestri L, Petros AJ, Barrett SP. MRSA—time for a more pragmatic approach. J Hosp Infect 2004;56: 170-174.

[5] Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997;10:781-791.

[6] Kumar JK. Lysostaphin a antistaphylococcal agent.Appl Microbiol Biotechnol 2008;80:555-561.

[7] Heinrich P, Rosenstein R, Bohmer M, Sonner P, Gotz F. The molecular organization of the lysostaphin gene and its sequences repeated in tandem. Mol Gen Genet 1987;209:563-569.

[8] Klesius PH, Schuhardt VT.Use of lysostaphin in the isolation of highly polymerized deoxyribonucleic acid and in the taxonomy of aerobic Micrococcaceae.J Bacteriol 1968; 95:739-743.

[9] Geary C, Stevens M. Rapide lysostaphin test to differentiate Staphylococcus and Micrococcus species. J Clin Microbiol 1986;23: 1044-1045.

[10] Dajcs JJ, Hume EB, Moreau JM, Caballero AR, Cannon BM, O´Callaghan RJ. Lysostaphin treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus keratitis in the rabbit.Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41:1432-1437.

[11] Patron RL, Climo MW, Goldstein BP, Archer GL. Lysostaphin treatment of experimental aortic valve endocarditis caused by a Staphylococcus aureus isolate with reduced susceptibility to vancomycin.Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1754-1755.

[12] Bhakta M, Arora S, Bal M. Intraspecies transfer of a chloramphenicol-resistance plasmid of staphylococcal origin.Indian J Med Res 2003; 117:146-151.

[13] Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF. Lysostaphin disrupts Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms on artificial surfaces. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3407-3414.

[14] Shah A, Mond J, Walsh S. Lysostaphin-coated catheters eradicate Staphylococcus aureus challenge and block surface colonization. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2704-2707.

[15] SambrookJF, Fritsch EF, Maniatis T.Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edn.Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York 2001.

[16] Satishkumar R, Sankar S, Yurko Y, LincortA, Shipp J, Heniford BT, Vertegel A. Evaluation of the antimicrobial activity of lysostaphin-coated hernia repair meshes. Antimicrob Agents Chemother 2011;55: 4379-4385.

[17] Iversen OJ, Grov A. Studies on lysostaphin separation and characterization of three enzymes.Eur J Biochem 1973;38: 293-300.

[18] Schindler CA, Schuardt VT. Purification and properties of lysostaphin: a lytic agent for the Staphylococcus aureus. Biochem Biophys Acta1965; 97:242-250.

[19] Marova I, Dadak V. Modified simplified method for isolation of lysostaphin from the culture filtrate of Staphylococusstaphylolyticus.Folia Microbiol 1993;38:245-252.

[20] Recsei PA, Gruss AD, Novick RP. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from Staphylococcus simulans.Proc Natl Acad Sci USA1987;84:1127-1131.

[21] Mierau I, Leij P, van Swam I, Blommestein B, Floris E, Mond J, Smid EJ. Industrial scale production and purification of a heterologous protein in Lactococcuslactis using the nisin controlled gene expression system NICE: The case of lysostaphin. Microb Cell Fact 2005; 4: 15.

[22] Williamson CM, Bramley AJ, Lax AJ. Expression of the lysostaphin gene of Staphylococcus simulans in a eukaryotic system. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 771-776.

[23] Sugimura K, Higashi N.A novel outrmemberane-associated proteas in Esherichia coli.J Bacteriol 1988;170:3650-3654.

[24] Sharma R, Sharma PR, Choudhary ML, Pande A, Khatri GS. Cytoplasmicexpression of mature glycylglycine endopeptidase lysostaphin with an aminoterminal hexa-histidine in a soluble and catalytically active form in Escherichia coli. Protein Exp Purif 2006; 45: 206-215.

[25] Zhang B, Shangguan T, Ma H, Huang X,Zhang Y. Lysis of mastitispathogens isolated from dairy cow milk samples by purified recombinant lysostaphin. African J Biotechnol 2012;11: 4649-4659..

[26] Szweda P, Kotlowski R, Kur J.New effective sources of the staphylococcus simulans lysostaphin. J Biotechnol 2005; 117: 203-213.

Cloning, expression and purification of recombinant prolysostaphin protein and evaluating its in vitro antistaphylococcal activity

Leila Farhangnia (M.Sc)[1], Ehsanollah Ghaznavi Rad (Ph.D)[2], Neda Molaee (M.Sc)[3], Hamid Abtahi (Ph.D)[*4]

1- Biotechnology laboratory,Dept. of Biotechnology and Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Dept .of Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Molecular and Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

4- Dept .of Microbiology , Molecular and Medicine Research Center,Faculty of Medicine , Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received: 21 Jul 2013; Accepted: 16 Dec 2013)

Introduction: *Staphylococcusaureus* causes a wide range of infections, from skin infections disseminated to systemic infections leading to organ failure and death. Drug resistance in this group of pathogens is a world-wide concern and needs the development of novel agents. Lysostaphin, an example of such a novel agents,is a bacteriocin secreted by *Staphylococcussimulans* to kill *Staphylococcus aureus* through proteolysis of the *Staphylococcus* cell wall.The aim of this study was to high level expression and *in vitro* evaluation of antistaphylococcal activity of recombinant prolysostaphinprotein under invitro conditions.

Materials and Methods: In this experimental study, lysostaphin gene of *Staphylococcussimulans* was amplified by PCR method, then was cloned and expressed into the expression vector pET-32a. The expressed protein was purified by affinity- chromatography using (Ni-NTA) resin kit. The Study of antibacterial activity against a cell suspension of *S. aureus*were was performed using turbidity assay.

***Results*:** PCR and sequencing results showed the successful cloning of the target gene into the recombinant vector. The expression of protein was induced by IPTG and high concentration of the recombinant protein with antistaphylococcal activity was purified using Ni-NTA resin.

Conclusion: Our data showed that, the pET32a expression vector is a very efficient system for producing recombinant prolysostaphin protein in *E.coli*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Lysostaphin, Molecular cloning

*Corresponding author. Fax: +98 863 4173526 Tel: +98 863 4173502

abtahi@arakmu.ac.ir

How to cite this article:

Farhang nia L, Ghaznavi Rad E, Molaee N, Abtahi H. Cloning, expression and purification of recombinant prolysostaphin protein and evaluating its in vitro antistaphylococcal activity. koomesh. 2014; 15 (4) : 441-448

URL http://koomeshjournal.semums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-575-2&slc_lang=fa&sid=1