

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ۲: از ۸۳-۹۲
تابستان ۱۳۸۸

تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب اتصال فریک انتروباکتین

سیدمهدی لاری‌نقال^۱، سیدلطف موسوی‌گرگری^{۲*}، ایرج رسولی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸۸/۰۴/۳۱

دریافت مقاله: ۸۸/۰۴/۱۴

چکیده

هدف: باکتری اشرشیاکلی O157: H7، از زیرگروه اشرشیاکلی‌های خونریزی‌دهنده داخلی (انتروهموراژیک اشرشیاکلی) است. این باکتری تولیدکننده توکسینی شبیه شیکا توکسین است که در ایجاد اسهال‌های خونی، غیرخونی و نشانگان یورمی همولیتیک نقش دارد. نشانگان یورمی همولیتیک یک عامل مهم ناتوانی کلیوی در کودکان و بزرگسالان است. ژن *fepA* از باکتری اشرشیاکلی O157:H7 با ۲۲۴۱ جفت‌باز، پروتئین غشایی به نام پروتئین اتصال فریک انتروباکتین را کد می‌کند که برای جذب فریک انتروباکتین در باکتری اشرشیاکلی ضروری است. در صورت ممانعت از جذب آهن توسط باکتری، می‌توان میزبان را از تهاجم آن ایمن نمود. در این مطالعه تأثیر ایمنی‌زایی پروتئین غشایی FepA بررسی شد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور تهیه پروتئین نوترکیب FepA، پس از کشت باکتری اشرشیاکلی O157:H7، ژنوم آن به روش لیز قلبیایی تخلیص شد. با کمک واکنش زنجیره پلیمرز ژن *fepA* از اشرشیاکلی به‌طول ۲۲۴۱ جفت‌باز فراوان‌سازی و سپس روی ناقل بیانی pET28a(+) کلون شد. پس از انتقال سازه نوترکیب به میزبان اشرشیاکلی سویه B121DE3، بیان پروتئین مورد نظر توسط غلظت‌های مختلف ایزوپروپیل تیو بتا-دی گالاتوزید القا و بهینه‌سازی شد. نتایج بیان با SDS-PAGE بررسی و پروتئین نوترکیب از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی با کمک ستون Ni-NTA تخلیص شد. در نهایت پس از تزریق پروتئین تخلیص شده به موش و تکمیل دوره ایمن‌سازی، تیتراژ آنتی‌بادی با سنجش الایزا ارزیابی شد.

نتایج: پروتئین نوترکیب با وزن ۸۵ کیلودالتون تولید و تخلیص شد. تزریق پروتئین به موش‌های Balb/C نشان‌دهنده توان بالای آن در تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی و نیز توان آنتی‌بادی تولید شده در شناسایی پروتئین اتصال فریک انتروباکتین که منجر به تقویت مقاومت موش در برابر $LD_{50} 10^6$ است. **نتیجه‌گیری:** با توجه به توان بالای آنتی‌بادی نوترکیب در شناسایی پروتئین اتصال فریک انتروباکتین، امکان استفاده از این آنتی‌بادی در محدود کردن رشد و توسعه انتروباکتریاسه مطرح می‌شود.

کلیدواژگان: آهن، FepA، اشرشیاکلی O157: H7

۱- مقدمه

قوی آهن به‌دست آمده و در حال حاضر با نام سیدروفور (Siderophore) شناخته می‌شوند. باکتری اشرشیاکلی O157: H7 (*Escherichia coli*)، زیرگروهی از اشرشیاکلی‌های انتروهموراژیک (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*)

آهن یک نیاز غذایی مهم برای باکتری‌ها است به طوری‌که باکتری‌ها برای جذب آهن مورد نیاز برای رشد و تکثیر، در فرایند تکامل، قابلیت رقابت با فاکتورهای اتصال به آهن میزبان را کسب کرده‌اند. این توانایی با تولید کلاتورهای (Chelators)

*نشانی مکاتبه: تهران، بزرگراه خلیج فارس، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، صندوق پستی: ۱۵۹-۱۸۱۵۵
Email: slmousavi@shahed.ac.ir

پری‌پلاسمیک آن را به انتقال دهنده ABC موجود در غشای سیتوپلاسمی تحویل می‌دهد و فعالانه از غشای سیتوپلاسمی عبور می‌کند [۱۴]. استراتژی‌های اشرشیاکلی O157:H7 برای غلبه بر استرس آهن، تولید سیدروفور انتروباکتین است که به‌طور کلی به‌وسیله همه سویه‌های اشرشیاکلی در شرایط استرس آهن تولید می‌شود. برای ورود آهن به داخل سلول، پروتئین فریک انتروباکتین (FepA) نقش کلیدی دارد. پروتئین FepA در غشای خارجی قرار دارد و با مطالعاتی که صورت گرفته، مشخص شده است که این پروتئین دارای لوپ‌های خارج سلولی است که در شناسایی کمپلکس فریک-سیدروفور مؤثر است [۱۵، ۱۶]. بنابراین به‌نظر می‌رسد که با تولید و تخلیص این پروتئین نوترکیب بتوان از آن به‌عنوان یک کاندید احتمالی برای تهیه واکسن استفاده کرد و با تولید آنتی‌بادی موجب کاهش رشد این باکتری شد. از آنجایی که منبع این باکتری بیشتر دام‌ها هستند و با واکسیناسیون دام‌ها می‌توان از انتقال آن به انسان جلوگیری کرد؛ بنابراین در این تحقیق بر مبنای فرضیات فوق این پروتئین به‌صورت نوترکیب تولید و اثر ایمنی‌زایی آن در مدل آزمایشگاهی مطالعه شد.

۲- مواد و روش‌ها

باکتری اشرشیاکلی H7: O157 پلاسمید pET28a (Novagen، ایالات متحده آمریکا) و باکتری اشرشیاکلی سویه BL21DE3 (Novagen، ایالات متحده آمریکا) به‌عنوان سیستم بیانی پروکاریوتی و میزبان استفاده شدند. آغازگرهای (Primers) طراحی شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction: PCR) توسط شرکت CinnaGen سنتز شد و آنزیم‌های DNA پلیمرز (Taq DNA polymerase)، DNA لیگاز T4 (T4 DNA ligase) و آنزیم‌های محدودالتر *SalI* و *EcoRI* از شرکت Fermentas (روسیه) خریداری شدند. کیت تخلیص

تولیدکننده توکسین شیگا (Shiga toxin) (Stx1 و Stx2) است که اصلی‌ترین توکسین این باکتری محسوب می‌شود و در ایجاد اسهال‌های خونی، غیرخونی و نشانگان یورمی همولیتیک (Hemolytic uremic syndrome) نقش دارد. آهن در فتوستز، تنفس، چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید، انتقال اکسیژن، تثبیت نیتروژن، متانوژن (Methanogenesis)، تنظیم بیان ژن، و سنتز DNA نقش داشته [۱، ۲] و در محلول‌های آبی به‌طور ضعیف حل می‌شود [۳، ۴]. به‌طور متوسط هر سلول باکتری برای انجام فرایندهای زیستی خود به 10^6 - 10^5 یون آهن احتیاج دارد [۵، ۶] و گاهی میزان آهن تا ۱/۸ درصد وزن خشک سلول افزایش می‌یابد [۷]. باکتری‌هایی که در بدن انسان تشکیل کلونی می‌دهند برای تأمین آهن مورد نیاز خود با یک مشکل جدی روبرو هستند و آن داخل سلولی بودن بیش از ۹۹/۹ درصد آهن بدن انسان است که عملاً از دسترس باکتری خارج است؛ به‌علاوه این‌که آهن خارج سلولی که در پلاسما و مایع لنفاوی یافت می‌شود به شدت در اتصال با ترانسفرین‌ها (Transferrins) هستند [۸]. باکتری‌ها برای دسترسی به آهن از مکانیزم‌های متفاوتی استفاده می‌کنند. در شرایط هوازی، باکتری‌ها و قارچ‌ها انواع لیگاندهای آهن فریک (Ferric iron) با وزن مولکولی کم به نام سیدروفور تولید می‌کنند [۹]. تاکنون بیش از ۵۰۰ نوع سیدروفور مختلف از نظر شیمیایی شناسایی شده است [۱۰]. برای عبور کمپلکس فریک-سیدروفور از غشای خارجی، باکتری‌ها نیاز به انرژی و گیرنده اختصاصی دارند. انرژی به‌وسیله نیروی محرکه پروتونی غشای سیتوپلاسمی تأمین می‌شود و انتقال آن به غشای خارجی از طریق کمپلکس پروتئینی TonB-ExbB-ExbD صورت می‌گیرد [۱۱، ۱۲]. باکتری اشرشیاکلی و چندین گونه دیگر خانواده انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) در شرایط فقر آهن سیدروفور انتروباکتین (Enterobactin) ترشح می‌کنند که به پروتئین غشای خارجی FepA متصل شده و به‌وسیله آن در فضای پری‌پلاسمیک آزاد می‌شود [۱۳]. پروتئین FepB به سیدروفور فریک انتروباکتین متصل و با عبور از فضای

بافر PCR 1X بوده است. پارامترهای PCR برای تکثیر ژن *fepA* شامل واسرشته اولیه (Initial Denaturing) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه ۳ مرحله‌ای شامل واسرشته شدن (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و پلیمریزاسیون (Polymerization) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ دقیقه و در نهایت پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بودند. نتایج PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز با غلظت ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide: EtBr) در طول موج ۲۶۰ نانومتر مشاهده شدند. پس از بارگذاری محصول واکنش روی ژل آگارز با دمای پایین و استفاده از کیت تخلیص DNA، قطعه مورد نظر تخلیص شد. با استفاده از نرم‌افزار CLC جایگاه برش آنزیم‌های محدودالایتر، روی ژن *fepA* بررسی و مشخص شد که آنزیم محدودالایتر *EcoRI* این ژن را به دو قطعه با اندازه‌های ۱۶۱۹ و ۶۲۲ برش می‌دهد و از این روش برای آنالیز اولیه ژن فراوان‌سازی شده، استفاده شد.

۲-۳- ساخت سازواره مولکولی همسانه‌سازی

ژن *fepA*

پلاسمید pET28a و محصول تخلیص شده PCR با دو آنزیم محدودالایتر *BamHI* و *Sall* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ ساعت به صورت جداگانه هضم شدند، سپس محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز با دمای پایین بارگذاری شده و با استفاده از کیت تخلیص DNA، قطعات مورد نظر تخلیص شدند. برای انجام واکنش الحاق، واکنشی با حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم از قطعه مورد نظر و ۸۰ نانوگرم از پلاسمید هضم شده و ۲ واحد آنزیم DNA لیگاز *T4* و بافر آنزیم با غلظت نهایی 1X در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. محصول

DNA از ژل و تعیین توالی همسانه‌ها به شرکت تکاپوزیست (نماینده شرکت Bioneer کره) سفارش داده شده‌اند. ستون میل ترکیبی Ni-NTA از شرکت QIAGEN خریداری شد.

۲-۱- تخلیص DNA الگو

برای کشت باکتری از محیط کشت LB (Lysogeny broth) آبگوشتی استفاده شده است. به منظور تخلیص DNA ژنومی، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت به میکروتیوپ منتقل شد و سلول‌ها به کمک سانتریفوژ جمع‌آوری و در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) حل شد. به سوسپانسیون سلولی ۳۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate: SDS) ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر پروتیناز K اضافه و برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl (Cetyl trimethylammonium bromide) (۴ درصد NaCl و ۱۰ درصد CTAB) به مخلوط اضافه و ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت DNA ژنومی با استفاده از فنل-کلروفرم و تیمار با RNase عاری از DNase تخلیص شد. DNA ژنومی حاصل در بافر TE حل شد و خلوص و غلظت آن با اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۷].

۲-۲- تکثیر ژن *fepA*

فراوان‌سازی ژن *fepA* توسط ۲ آغازگر رفت با توالی 5'-TAAAGGATCCATGAACAAGAAGATTC-3' جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایتر (*BamHI*) و آغازگر برگشتی 5'-AGCAGTCGACGAAGTGAGTGTTTAC-3' جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایتر (*Sall*) صورت پذیرفت. حجم نهایی PCR ۳۰ میکرولیتر که حاوی ۲/۵ مول در لیتر از هر dNTP، ۱۵۰ نانومولار در لیتر از هر یک از آغازگرها، MgCl₂ با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار در مخلوط واکنش، ۲/۵ واحد DNA پلیمرز *Taq*، ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو و

اولتراسونیک (Ultrasonic) با قدرت رزونانس ۷۵ درصد و آمپلیفیکاسیون (Amplification) ۰/۵ در ۶ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای و در حمام یخ لیز شدند. سلول‌های لیز شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۸۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس رسوب حاصل در بافر لیز کننده حاوی اوره ۸ مولار به خوبی حل شد و هر کدام با SDS-PAGE بررسی شدند. در ادامه پروتئین نوترکیب هدف با کمک ستون میل ترکیبی Ni-NTA پس از شستشو با بافرهای شستشو دهنده C با pH=۶/۳ و D با pH=۵/۹ و بافر فروشویی E با pH=۴/۵ (ترکیب همه بافرهای ذکر شده شبیه به بافر B بوده و تنها pH آن‌ها تنظیم شده است) تخلیص شد و نتایج با SDS-PAGE بررسی شدند و در نهایت غلظت پروتئین با روش لوری (Lowry) اندازه‌گیری شد.

۶-۲- ایمن‌سازی موش‌ها

۲۰ سر موش Balb/C نر با سن ۶-۸ هفته‌ای به صورت زیرجلدی و صفاقی با ۱۰ نانوگرم پروتئین نوترکیب تخلیص شده و با حجم مساوی از ادجوانت کامل فروند (Freund's complete adjuvant) (مؤسسه رازی) ایمن‌سازی شدند. سه یادآور با همان مقدار پروتئین و ادجوانت ناقص به ترتیب با فاصله زمانی سه، پنج و هفت هفته از تزریق اول، تزریق شد. پس از تکمیل دوره تزریق به منظور بررسی تیترا آنتی‌بادی از موش‌ها خون‌گیری انجام شد و پس از جداسازی سرم سنجش الایزای (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) غیرمستقیم در پلیت‌های ۹۶ چاهکی که با پروتئین نوترکیب FepA پوشش داده شده بودند، انجام شد.

۷-۲- ELISA

برای سنجش قدرت واکنش‌دهی آنتی‌بادی تولیدی بر علیه پروتئین FepA، سنجش ELISA غیرمستقیم در پلیت‌های

واکنش الحاق به باکتری اشرشیاکلی سوش BL21DE3 با روش شوک حرارتی منتقل شدند و غربال‌گری همسانه‌های حاصل روی محیط LB آگار حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین (Kanamycin) انجام شد. به منظور تأیید همسانه‌سازی، پس از کشت همسانه‌های غربال شده در محیط LB آگوشتی حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین، تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام شد [۱۸]. با انجام هضم آنزیمی قرار گرفتن قطعه در ناقل پلاسمیدی تأیید و در نهایت با انجام تعیین توالی از همسانه‌ها، صحت همسانه‌سازی تأیید شد. سیستم بیانی ساخته شده pET 28a-FepA *E. coli* BL21DE3 نام‌گذاری شد.

۴-۲- بیان پروتئین نوترکیب هدف

LB pET 28a-FepA *E. coli* BL21DE3 در محیط LB آگوشتی حاوی ۶۰ میکروگرم در میکرولیتر کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور (Shaker Incubator) با ۲۰۰ دور در دقیقه هوادهی، کشت داده شدند و پس از رسیدن به جذب نوری (Optical Density: OD) ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ایزوپروپیل تیو بتا-دی گالاکتوزید (Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranosid: IPTG) با غلظت ۰/۷ میلی‌مولار القا و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در شیکر انکوباتور با ۲۰۰ دور در دقیقه هوادهی انکوبه شدند. در ادامه سلول‌ها با سانتریفوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری و نتایج بیان پروتئین با SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) بررسی شدند.

۵-۲- تخلیص پروتئین نوترکیب

رسوب باکتریایی جمع‌آوری شده از مرحله قبل در بافر لیز کننده B (Na₂HPO₄ ۱۰۰ میلی‌مولار، Tris ۱۰۰ میلی‌مولار و اوره ۸ میلی‌مولار) با pH=۸ حل شده و با استفاده از دستگاه

پس از اتمام عمل انتقال، کاغذ نیتروسولوز با محلول Ponceau S رنگ‌آمیزی شد تا از عمل انتقال اطمینان حاصل شود. محل باندهای مربوط به نشانه اندازه مولکولی علامت‌گذاری شد. ستون‌های مربوط به نمونه‌های مختلف از هم جدا و به مدت ۲ ساعت، در داخل بافر تثبیت‌کننده شناور شدند. بعد از شستشو با بافر PBS-T، آنتی‌بادی اولیه با رقت ۱:۱۰۰ به کاغذهای نیتروسولوز اضافه شد و بعد از ۲ ساعت نگهداری در دمای اتاق و شستشو با بافر PBS-T آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱:۱۰۰ روی کاغذهای بریده شده نیتروسولوز ریخته شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت. کاغذهای نیتروسولوز با بافر PBS-T شستشو داده شدند و در نهایت محلول DAB (Diaminobenzidine) به صورت تازه تهیه شد و روی کاغذها ریخته شد و پس از ظهور باندها واکنش ظهور با آب مقطر مهار شد. در نهایت از کاغذهای نیتروسولوز عکس تهیه شد.

۳- نتایج

۳-۱- PCR

برای انجام PCR ابتدا ژنوم به روشی که قبلاً ذکر شد استخراج شد. شکل ۱-الف نشان از یکپارچگی و عدم آلودگی ژنوم تخلیص شده دارد. در شکل ۱-ب محصول PCR ژن *fepA* با آنزیم DNA پلیمرز *Taq* با اندازه مورد انتظار نشان داده شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود طول قطعه به دست آمده در مقایسه با شاهد با اندازه ژن *fepA* (۲۲۴۱ جفت‌باز) هم‌خوانی دارد که بیانگر تکثیر صحیح ژن است. مشاهده نشدن باندهای غیراختصاصی نشان از اتصال اختصاصی آغازگرها به دو سر ژن هدف است. برای آنالیز اولیه، ژن فراوان‌سازی شده به وسیله آنزیم محدودالایر *EcoRI* هضم آنزیمی شد که نتیجه در شکل ۱-ب نشان داده است و مطابق انتظار ژن به دو قطعه با اندازه‌های ۱۶۱۹ و ۶۲۲ برش خورد. برای اطمینان بیشتر ژن *fepA* همسانه شده تعیین ترادف شد که نتیجه حاصل با توالی‌های موجود در بانک ژن مطابقت داشت.

۹۶ چاهکی که با پروتئین نوترکیب FepA (در هر چاهک ۲ میکروگرم) پوشش داده شده بودند، انجام شد. پس از بلاکینگ (Blocking) با ژلاتین ۳ درصد (وزنی به حجمی: w/v) با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۲۰۰ سرم موش‌های ایمن شده به چاهک اول، تا رقت ۱:۵۱۲۰۰ سریالی از رقت‌ها تهیه شد همین کار برای موش‌های کنترل نیز انجام شد. پس از شستشو با بافر (Phosphate Buffered Saline-Tween 20) PBS-T، کانژوگه ضد آنتی‌بادی موشی با رقت ۱:۳۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد و سپس سوبسترای OPD (O-phenylenediamine dihydrochloride) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به چاهک‌ها اضافه و بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، با مهار واکنش با اسید سولفوریک، در طول موج ۴۹۲ نانومتر، شدت رنگ با قرائت‌گر ELISA (ELISA Reader) خوانده شد.

۲-۸- مقایسه بیان پروتئین FepA باکتری

اشرشیاکلی H7: O157 در محیط‌های واجد و

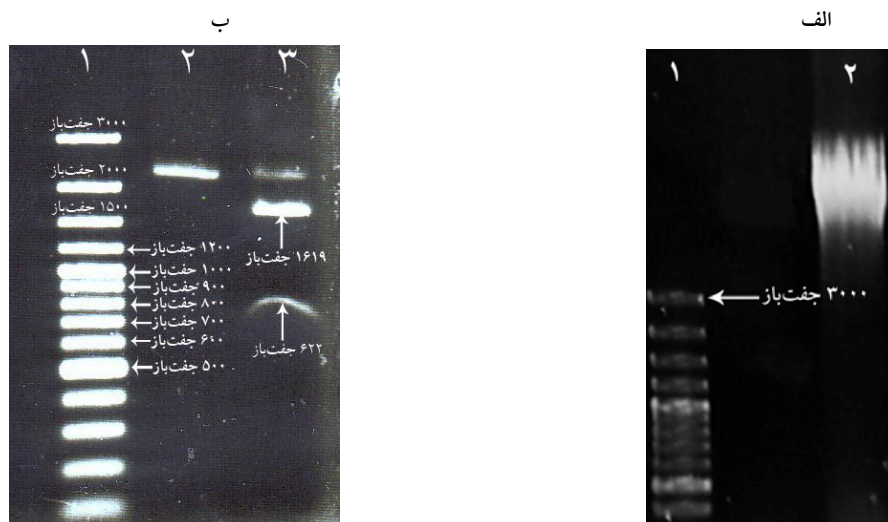
فقر آهن

به منظور بررسی نقش آهن در بیان پروتئین هدف از دو محیط M9 برای محیط فقر آهن و M9 حاوی ۲۰ میکرومولار از Fe_2SO_4 برای محیط حاوی آهن استفاده شد. میزان بیان پروتئین FepA در این دو محیط به وسیله لکه‌گذاری وسترن بررسی شد.

۲-۹- انجام لکه‌گذاری وسترن به منظور تأیید

پروتئین بیان شده

۳۰ میکرولیتر از نمونه‌های مورد نظر که حاوی ۳۰ میکروگرم پروتئین بود به همراه نشانه اندازه مولکولی پروتئینی روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. انتقال باندهای پروتئینی از روی ژل اکریل آمید روی کاغذ نیتروسولوز با ولتاژ ۷۵ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه در تانک وسترن انجام شد.



شکل ۱ ژنوم تخلیص شده اشرشیاکلی O157: H7 و محصول PCR ژن *fepA* با آنزیم *Taq* پلیمراز و هضم آنزیمی محصول PCR؛ پانل الف: ستون ۱) نشانه اندازه مولکولی DNA (DNA ladder)، ستون ۲) ژنوم تخلیص شده اشرشیاکلی O157: H7 را نشان می‌دهد. پانل ب: ستون ۱) نشانه اندازه مولکولی DNA، ستون ۲) محصول PCR ژن *fepA* با آنزیم *Taq* پلیمراز، ستون ۳) نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR

می‌شود پروتئین پس از شستشو و حذف پروتئین‌های غیراختصاصی، با خلوص قابل قبولی پس از فروشویی با بافر E استحصال شد.

۳-۴- ایمن‌سازی موش‌ها

در نمودار ۱ نتیجه‌ی الیزای غیرمستقیم سرم موش‌های ایمن شده علیه پروتئین نوترکیب FepA و موش‌های کنترل مشاهده می‌شود. تیترا آنتی‌بادی در موش‌های دریافت‌کننده پروتئین نوترکیب FepA در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل به خوبی افزایش یافته است.

۳-۵- مواجهه موش‌های ایمن با باکتری

اشرشیاکلی O157: H7

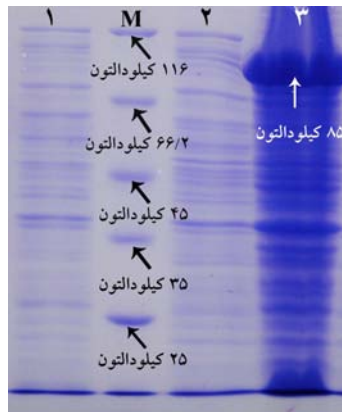
پس از تعیین LD₅₀ تزریقی به میزان ۱۰^۸، تعداد ۲۰ سر موش نر Balb/C ایمن شده، با تزریق زیرصفاقی LD₅₀ ۱۰^۶-۱۰^۷ باکتری (۱۰^۹-۱۰^{۱۴} باکتری زنده) مواجه شدند تا میزان ایمنی آن‌ها بررسی شود.

۳-۲- بیان پروتئین نوترکیب هدف

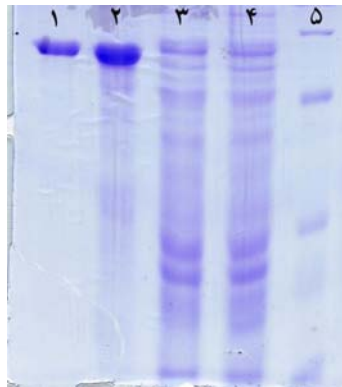
پس از الحاق ژن هدف به ناقل بیانی PET 28a و انتقال آن به سلول میزبان، بیان آن در غلظت‌های مختلف IPTG آزمایش شد. غلظت ۰/۷ میلی‌مولار از IPTG توانست به صورت کارآمد سیستم بیانی E.coli BL21DE3-pET 28a-FepA را القا کند. پس از لیز سلول و انجام الکتروفورز قسمت عمده پروتئین بیان شده در بخش رسوب سلولی مشاهده شد که نشان دهنده تشکیل اجسام نامحلول در داخل سلول است. نتایج حاصل از پروتئین‌سنجی نشان داد که پروتئین نوترکیب FepA حدود ۶۰ درصد پروتئین‌های سلول را به خود اختصاص داده است.

۳-۳- تخلیص پروتئین FepA

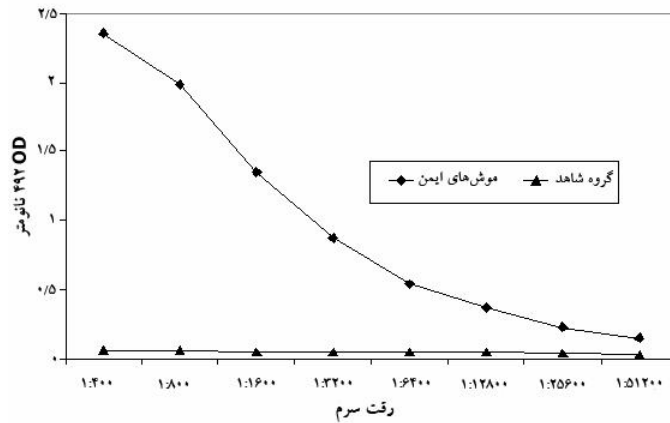
با توجه به این که پروتئین نوترکیب FepA در داخل سلول بیشتر به صورت اجسام نامحلول در می‌آید، بنابراین تخلیص آن در شرایط واسرشته، طبق دستورالعمل کیت QIAGEN صورت گرفت. همان‌طور که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده



شکل ۲ بررسی بیان پروتئین نوترکیب FcpA روی ژل SDS-PAGE (ژل ۱۰ درصد)؛ ستون ۱) نمونه محلول رویی حاصل از لیز سلولی پس از سانتریفوژ، ستون M) نشانه اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۲) نمونه کنترل قبل از القا، ستون ۳) نمونه رسوب سلولی، پروتئین به صورت اجسام نامحلول تولید شده است.



شکل ۳ بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب FcpA با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS-PAGE (۱۰ درصد؛ ستون‌های ۱، ۲) نمونه خروجی ستون پس از فروشویی با بافر E، ستون‌های ۳، ۴) نمونه خروجی ستون پس از بارگذاری محلول حاوی پروتئین نوترکیب، ستون ۵) نشانه اندازه مولکولی پروتئین



نمودار ۱ نتیجه ELISA غیرمستقیم سرم موش‌های ایمن شده علیه پروتئین نوترکیب FcpA

۳-۶- لکه‌گذاری وسترن

آنالیز پروتئین نوترکیب با آنتی‌بادی چندتبار (Polyclonal) موشی و همچنین واکنش متقاطع آنتی‌ژنی بین پروتئین FepA از اشرشیاکلی O157: H7 و آنتی‌سرم پروتئین نوترکیب به روش وسترن‌بلات (Western blot) انجام شد. از آن‌جا که روش SDS-PAGE تنها تولید پروتئینی با وزن مولکولی معین را نشان می‌دهد، برای اطمینان از صحت ماهیت پروتئین تولید شده، از روش لکه‌گذاری وسترن استفاده گردید. ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب به وسیله وسترن‌بلات با آنتی‌سرم موش‌ها بعد از تلقیح تأیید شد. آنتی‌بادی چندتبار موشی به‌طور اختصاصی با پروتئین نوترکیب واکنش داد، اما هیچ واکنشی با آنتی‌سرم کنترل منفی مشاهده نشده است (شکل ۴). باکتری اشرشیاکلی رشد یافته در محیط فاقد آهن در مقایسه با محیط واجد آهن دارای باندهای اضافی با وزن مولکولی حدود ۸۱ کیلوالتون است که نشان می‌دهد این پروتئین در فقر آهن القا می‌شود.



شکل ۴ وسترن‌بلاتینگ پروتئین نوترکیب FepA و پروتئین FepA بیان شده در شرایط فقر آهن توسط باکتری؛ ستون ۱) نشانه اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۲) نمونه سوپ سلولی بعد از بیان پروتئین نوترکیب FepA، ستون ۳) نمونه تخلیص شده پروتئین نوترکیب FepA، ستون ۴) نمونه سوپ سلولی باکتری رشد داده شده در شرایط فقر آهن که نشان‌دهنده بیان این پروتئین در شرایط فقر آهن است. ستون ۵) نمونه سوپ سلولی باکتری رشد داده شده در شرایط آهن‌دار که نشان‌دهنده عدم بیان این پروتئین در شرایط وجود آهن است.

۴- بحث

فرضیه واکنش‌های گاو یا تیمار حیوانات با عاملی که سطح کلونیزاسیون یا ریزش باکتری اشرشیاکلی O157: H7 را کاهش دهد به‌طور بالقوه می‌تواند منجر به کاهش در شیوع بیماری منتسب به اشرشیاکلی O157: H7 در انسان شود. برای ورود آهن به داخل سلول، پروتئین فریک انتروباکتین (FepA) نقش کلیدی دارد. پروتئین FepA در غشای خارجی قرار دارد و یک پروتئین ۸۱ کیلوالتونی است که از ۷۲۴ اسیدآمینو تشکیل شده است. با مطالعاتی که صورت گرفته، مشخص شده است که این پروتئین دارای لوپ‌های خارج سلولی است که در شناسایی کمپلکس سیدروفور- فریک مؤثر است. این گیرنده منومریک از ۲۲ رشته بتای ناهمسو (Antiparallel) و یک دومن کرک (Cork domain) تشکیل شده‌اند. رشته‌های بتای مجاور به وسیله ۱۱ لوپ خارج سلولی بلند که در سطح غشای خارجی قرار گرفته و ۱۰ پیچ کوتاه چند اسیدآمینو در سمت پری‌پلاسمی به همدیگر ارتباط دارند. لوپ‌های بلند خارج سلولی در تشخیص و اتصال لیگاند شرکت می‌کنند. لوپ‌های بلند خارج غشایی در FepA از ۷ الی ۳۷ آمینواسید تشکیل شده است [۱۵]. در این تحقیق، با توجه به اهمیت پروتئین FepA باکتری اشرشیاکلی O157: H7 در جذب آهن و ایجاد بیماری از یک سو، و تأثیر آن در ایمنی‌زایی علیه باکتری از سوی دیگر؛ این پروتئین برای تهیه آنتی‌بادی موشی علیه اشرشیاکلی استفاده شد. به‌منظور تهیه پروتئین مذکور به شکل نوترکیب، از سیستم بیانی pET که امکان دستیابی به بیان بالا در اشرشیاکلی و نیز تخلیص یک مرحله‌ای با روش میل ترکیبی نشان هیستیدین را فراهم می‌سازد، استفاده شد. در نهایت پروتئین نوترکیب به مقدار قابل توجه و با خلوص مطلوب به‌دست آمد. در ادامه پس از ایمن‌سازی موش‌ها، با انجام ELISA غیرمستقیم مشخص شد، آنتی‌بادی به خوبی توانایی شناسایی پروتئین نوترکیب FepA را داراست و موش‌های ایمن شده پس از مواجهه با باکتری زنده در مقیاس LD₅₀ ۱۰^۶ ازنده ماندند. در این موش‌ها آنتی‌بادی تولیدی احتمالاً با

حاضر است. براساس نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد مکانیسم عمل حفاظتی، فاگوسیتوز باکتری به واسطه آنتی FepA باشد؛ هرچند ارزیابی کامل پاسخ‌های ایمنی ناشی از واکنش‌های با FepA نیاز به بررسی و مطالعات بیشتری دارد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کمیسیون بیوتکنولوژی کشور برای تأمین هزینه‌های این پژوهش و دانشگاه شاهد در اختیار قرار دادن امکانات تحقیقاتی مورد نیاز، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

اتصال به باکتری‌ها به صورت اپسونین (Opsonin) عمل کرده‌اند و این عمل مستقیم یا غیرمستقیم با فعال‌سازی سیستم کمپلمان مرتبط بوده است [۱۹]. آنتی‌بادی‌های ضد FepA شاید مانع جذب آهن توسط باکتری‌ها و موجب مرگ آن‌ها شده باشند. پدیده ممانعت جذب آهن از طریق سیدروفورها و ترانسفرین در خصوص گونه‌های سودوموناس (*Pseudomonas*) و نیسریا (*Neisseria*) به ترتیب با آنتی‌بادی‌های چندتبار [۲۰] و تک‌تبار (Monoclonal) [۲۱] مؤثر بر پروتئین‌های غشای خارجی وابسته تنظیمی به آهن (Iron Regulated Outer Membrane Proteins: IROMP) گزارش شده که تأییدکننده مکانیسم عمل آنتی‌بادی گزارش

۶- منابع

- [1] Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 881-941.
- [2] Crichton RR. Inorganic biochemistry of iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences. John Wiley & Sons, New York 2001.
- [3] Grass G. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *Biometals* 2006; 19(2): 159-72.
- [4] Shouldice SR, Dougan DR, Williams PA, Skene RJ, Snell G, Scheibe D, Kirby S, Hosfield DJ, McRee DE, Schryvers AB, Tari LW. Crystal structure of *Pasteurella haemolytica* ferric ion-binding protein A reveals a novel class of bacterial iron-binding proteins. *J Biol Chem* 2003; 278(42): 41093-8.
- [5] Braun V, Günter K, Hantke K. Transport of iron across the outer membrane. *Biol Met* 1991; 4(1): 14-22.
- [6] Abdul-Tehrani H, Hudson AJ, Chang YS, Timms AR, Hawkins C, Williams JM, Harrison PM, Guest JR, Andrews SC. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J Bacteriol* 1999; 181(5): 1415-28.
- [7] Rouf MA. Spectrochemical analysis of inorganic elements in bacteria. *J Bacteriol* 1964; 88: 1545-9.
- [8] Bridges KR, Seligman PA. Disorders of iron metabolism. In: *Blood Principles and Practice of Hematology*. Edited by Handlin RI, Lux SE, Stossel TP. London: JB Lippincott Company; 1995:1433-72.
- [9] Crosa JH, Mey AR, Payne SM. Iron Transport in Bacteria. ASM Press, Washington, DC. 2004.
- [10] Drechsel H, Winkelmann G. Iron chelation and siderophores. In: *Transition Metals in Microbial Metabolism*. Winkelmann G, Carrano CJ (Eds.). Harwood Academic, Amsterdam, 1997; p: 1-49.

- [11] Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* 2006; 19(2): 143-57.
- [12] Schalk IJ, Yue WW, Buchanan SK. Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Mol Microbiol* 2004; 54(1): 14-22.
- [13] Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(4): 691-6.
- [14] Köster W. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* 2001; 152(3-4): 291-301.
- [15] Buchanan SK. Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9(4): 455-61.
- [16] Buchanan SK. bacterial metal detectors. *Mol Microbiol* 2005; 58(5): 1205-9.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual (M)*. 2nd edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; p:1.21-1.52,2.60-2.80,7.3-7.35,9.14-9.22.
- [18] Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 1966; 5(2): 467-77.
- [19] Ala'Aldeen DA, Stevenson P, Griffiths E, Gorringer AR, Irons LI, Robinson A, Hyde S, Borriello SP. Immune responses in humans and animals to meningococcal transferrin-binding proteins: implications for vaccine design. *Infect Immun* 1994; 62(7): 2984-90.
- [20] Pintor M, Ferrón L, Gómez JA, Powell NB, Ala'Aldeen DA, Borriello SP, Criado MT, Ferreirós CM. Blocking of iron uptake from transferrin by antibodies against the transferrin binding proteins in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 1996; 20(3): 127-39.
- [21] Pintor M, Ferrón L, Gómez JA, Gorringer A, Criado MT, Ferreirós CM. Blocking of iron uptake by monoclonal antibodies specific for the *Neisseria meningitidis* transferrin-binding protein 2. *J Med Microbiol* 1996; 45(4): 252-7.