

Original Article

Subcloning and Expression of *ML1-stxB* Fusion Gene of Mistletoe Lectin in *E. coli* and Production of its Antibody in Mouse

Soheila Rahnamaie Yahyaabadi¹ , Hossein Honari^{2*} , Masoud Abdolahi² , Seyed Mojtaba Aghaie² ,
Mohamadali Ebrahimi¹ 

¹Payame Noor University,
Tehran, Iran.

²Department of Biology,
Faculty of Basic Sciences,
Imam Hossein University,
Tehran, Iran.

***Corresponding Author:**

Hossein Honari;
Department of Biology,
Faculty of Basic Sciences,
Imam Hossein University,
Tehran, Iran.

Email:
honari.hosein@gmail.com

Received: 21 Nov, 2018
Accepted: 5 Jul, 2018

Abstract

Background and Objectives: Extract of mistletoe lectin (*Viscum album* L) leaves contains MLI protein that is a type 2 ribosome-inactivating protein (RIP2) with lectin properties. Shiga toxin (STxB) has been considered as an immunoadjuvant and carrier, which binds to its cell surface receptor, Gb3, that is expressed on most of the body cells. In this study, the expression of *ML1-stxB* antigen and production of its antibody, were investigated in mouse.

Methods: In this experimental study, *ML1* gene containing pUC57 plasmid with enzymes sites of NdeI and SalI, was subcloned in the pET28a(+)-stxB expression vector, and then was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The expression of *ML1-stxB* gene cassette was induced by IPTG. After purification, the MLI-STxB recombinant protein was purified by nickel affinity chromatography and injected into mice four times.

Results: In this study, the cloned *ML1-stxB* gene in expression vector of pET28a(+) was confirmed by PCR and enzyme analysis. The produced recombinant protein were confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. Then, the produced antibody was isolated from the serum of mouse and investigated using ELISA method.

Conclusion: According to this study, ML1 protein has ribosome inactivating property and STxB has adjuvant and carrier functions, therefore, this recombinant protein can be a candidate vaccine against ML-1 toxin of *Shigella dysentery*, which its antibody can be used as identifier.

Keywords: *Escherichia coli*, Subcloning; Mistletoe lectin; *Shigella*.

DOI: 10.29252/qums.12.12.42

زیرهمسانه سازی و بیان ژن ممزوجی *ML1-stxB* داروаш در *E. Coli* و تولید آنتی بادی آن در موش سوری

سهیلا رهنمایی یحیی آبادی^۱، حسین هنری^{۲*}، مسعود عبدالمهی^۲، سیدمجتبی آقایی^۲، محمدعلی ابراهیمی^۱

چکیده

^۱دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

زمینه و هدف: عصاره برگ‌های داروаш (*Viscum album* L) دارای پروتئین MLI از نوع RIP2 (پروتئین‌های غیرفعال ریپوزومی تیپ ۲) با خواص لکتینی هستند. STxB شیکا توکسین به عنوان یک ایمونوآجوانت و حامل، مطرح بوده و به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb3 متصل می‌گردد که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود. در این مطالعه، بیان آنتی‌ژن *ML1-stxB* در *E. coli* و تولید آنتی‌بادی آن در موش سوری بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، پلاسمید pUC57 حاوی ژن *MLI* با جایگاه‌های آنزیمی *NdeI* و *SalI* در وکتور بیانی pET28a(+)-stxB زیرهمسانه‌سازی شد و به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) تراریخت (ترانسفورم) گردید. بیان کاست ژنی *MLI-StxB* تحت القای IPTG انجام گرفت. پس از تخلیص، پروتئین نو ترکیب *MLI-STxB* به وسیله ستون نیکل کروماتوگرافی در چهار نوبت متوالی به موش‌های سوری تزریق شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، ژن *ML1-stxB* کلون‌شده در وکتور بیانی pET28a(+) با واکنش PCR و آنالیز آنزیمی تأیید گردید. همچنین پروتئین نو ترکیب تولیدشده به وسیله SDS-PAGE و لکه گذاری وسترن مورد تأیید قرار گرفت، سپس آنتی‌بادی تولیدشده از سرم موش جداسازی و با روش تست ELISA بررسی گردید.

نتیجه گیری: براساس نتایج این مطالعه، پروتئین *ML1* دارای خاصیت غیرفعال کننده ریپوزومی و STxB نقش یابوری و حاملی دارد؛ لذا این پروتئین نو ترکیب، کاندیدای واکسن علیه سم داروаш شیکا دیسانتری بوده که از آنتی‌بادی آن می‌توان به عنوان شناساگر استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: /شرشیاکلی؛ زیرهمسانه سازی؛ دارواش؛ شیکا.

^۲گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

حسین هنری؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

honari.hosein@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۴

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Rahnamaie Yahyaabadi S, Honari H, Abdolahi M, Aghaie SM, Ebrahimi MA.
Subcloning and expression of *ML1-stxB* fusion gene of mistletoe lectin in *E. coli*
and production of its antibody in mouse.
Qom Univ Med Sci J 2018;12(12):42-52. [Full Text in Persian]

مقدمه

گیاه دارواش، از خانواده *Santalaceae* بوده و نام علمی آن *Viscum album* L. می باشد.

برگ های دارواش (*Viscum album* L.) شامل: "سه نوع سم *MLIII*، *MLII*، *MLI* (پروتئین های غیرفعال ریبوزومی تیپ ۲) می باشد که از نظر جرم مولکولی و خصوصیات کربوهیدراتی با یکدیگر متفاوت اند (۱). کمیت نسبی DNA سه ژن *ml2*، *ml1* و *ml3* نیز با یکدیگر تفاوت دارند که به ترتیب ۱:۱:۵/۴ برابر و نسبت mRNA آن ها در گیاه به ترتیب ۵۰، ۱۰، ۱ می باشد. میزان بیان ژن ها در گیاه دارواش متفاوت بوده و میزان پروتئین *MLI* بیشتر از سموم دیگر است (۲). سلول های سرطانی به سموم آبرین و ریسین حساس می باشند؛ لذا عصاره دارواش به عنوان یک داروی مؤثر برای درمان سرطان مطرح است (۳، ۴). در مقایسه بین توالی اسید آمینه *MLP* با *ML2p*، *ML3p* و *ML1p* نتایج نشان داد درصد شباهت آن ها به ترتیب ۹۸، ۸۸ و ۷۷٪ می باشد (۵). نمایش سازه های *RML* (*MLI*، *MLII*، *MLIII*-mRNA) تفاوت قابل ملاحظه ای برای سه نوع *ML1p* نشان داده که بالاترین درصد شباهت (۹۹) ۹۸٪ *RML*: (۹۱) ۸۸٪ (۸۷) ۷۷٪ می باشد (۳). پروتئین *ML1* باعث دپورینه شدن اندوزین در 28S rRNA و واحد 60S ریبوزوم می گردد. همچنین این تغییر در ریبوزوم موجب مهار پروتئین سازی در سلول هدف می شود (۶). شیکا توکسین یا *STx*، به عنوان یکی از عوامل ویروالانس شیکلا دیساتری در ایجاد اسهال خونی مطرح است. *STxB*، ساختار هموپنتامریک (۵ زیر واحد) دارد که از 5 UTR منومر کاملاً یکسان تشکیل شده است. هر منومر آن متشکل از ۲۷۰ نوکلئوتید و ۶۹ اسید آمینه بوده و وزن مولکولی آن حدود ۷۷kDa می باشد. مطالعات اخیر نشان داده است برخلاف گذشته که دانشمندان ناحیه *STxB* را قسمت کاملاً غیرسمی می پنداشتند، این قسمت دارای خاصیت سمی خیلی ناچیز است (۶). *STxB* به گیرنده سطح سلولی خود به نام *Gb3* متصل شده که روی اکثر سلول های بدن بیان می شود. *Gb3*، بیان زیادی در سطح سلول های سرطانی مثل لنفوما، کارسینوماهای تخمدان، سینه و کولون دارد. همچنین این فراوانی در سطح سلول های دندریت (DC) انسانی و موش نیز دیده می شود (۷).

اکثر تحقیقات کاربردی مربوط به

RIP ها (Ribosome Inactivating Proteins) برای درمان سرطان بوده که *RIP* ها به طور گزینشی به سمت سلول های سرطانی بدخیم هدایت شده تا عمل حذف انجام گیرد. برای رساندن هدفمند *RIP* ها به سلول ها، از لینکر فورینی ژن *PA* باسیلوس آنتراسیس (مابین قطعه 1a-PA به *PA63*) می توان استفاده کرد (۸). *RIP* های نوع ۱ و زنجیره های *A* از *RIP* های نوع ۲ با آنتی بادی ها یا سایر *moieties* های هدفمند (شبه فاکتورهای رشد، سایر هورمون ها یا پپتیدهای کوچکتر) جفت شده و توکسین های هدفمند را به وجود می آورند (۹، ۱۰). این جفت ها، محتوی سموم قوی با عوارض جانبی بالا هستند؛ زیرا آن ها برگرفته از ماکروفاژ یا سلول های سوماتیکی می باشند. موضوع بعدی در مورد کاربرد این جفت ها در درمان سرطان، پاسخ سیستم ایمنی به آن ها به عنوان آنتی ژن است (۱۱). با توجه به خصوصیات آنتی ژن *ML1* و خاصیت حاملی *STxB*، این پروتئین به عنوان یک کاندید واکسن و داروی ضد سرطان مطرح بوده که در این مطالعه ساخت کاست ژنی و بیان آنتی ژن *ML1-stxB* در *E. coli* و تولید آنتی بادی در موش سوری مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

ترادف ژن *ML1* (*Viscum album* L) *Mistletoe* از بانک ژنی NCBI با شماره AY377891.1 استخراج گردید. با توجه به بررسی داده های موجود، ناحیه ژنی (ناحیه N- ترمینال) از نوکلئوتید ۸۷۴-۱۱۳ (۷۶۲ نوکلئوتید) انتخاب گردید. پلاسمید pUC57 حاوی ژن *ML1* از شرکت ندای فن تهیه شد. وکتور بیانی pET28a(+)-ipaD-Linker-stxB و سوش های DH5α و *E. coli* BL21(DE3) از آزمایشگاه گروه زیست شناسی دانشگاه تهیه شدند.

وکتور بیانی pET28a(+)-ipaD-Linker-stxB[8] و ژن *ML1* از وکتور با آنزیم های برشی محدودالتر *SalI* و *NdeI* هضم و از روی ژل آگارز تخلیص و جداسازی شدند، سپس قطعه ژنی *ML1* و pET28a(+)-Linker-stxB با آنزیم DNA Ligase (Fermentas) T4 به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه ممزوج شد.

درنهایت، پلاسمید نو ترکیب pET28a(+)-ML1-Linker-stxB در میزبان بیانی *E. coli* BL21 (DE3) تراریخت گردید. عمل ترانسفورماسیون به روش کلسیم کلراید و شوک حرارتی، انجام و از کلنی های رشد یافته، کشت تهیه گردید و تخلیص پلاسمید صورت گرفت. پلاسمیدهای استخراج شده با ژل آگارز، مطالعه و به وسیله PCR و هضم آنزیمی تأیید شدند (۱۲).

جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز و تکثیر قطعات ژنی مورد نظر، از دستگاه BIO RAD با حجم ۲۵ میکرو لیتر (واجد ۲/۵ میکرو لیتر 10X PCR buffer، ۱ میلی مول $MgCl_2$ ، ۱۵۰ میکرومول dNTP، ۴۰۰ پیکومول از زوج پرایمرهای R، F For 5'GCAGCCATCATCATCATC3' Rev 5'ATCT (CAGTGGTGGTGGTGG3')

در این مرحله، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymease و یک میکرو لیتر از DNA مربوط به هر نمونه استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده جهت تکثیر قطعه مورد نظر از یک سیکل ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه و از آنزیم های *SalI*، *NdeI* برای هضم آنزیمی استفاده شد.

از کشت شبانه کلنی های جداسازی شده، میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن $OD(Optical Density)$ به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ماده القا کننده پروموتور (IPTG) با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده شد و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و رسوب سلولی تهیه گردید (۱۳).

سلول های باکتریایی جمع آوری شده در مرحله فوق به روش دنا توره تیمار شدند. در این روش، سلول ها با ۵۰۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده B مخلوط و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند، سپس نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند و محلول رویی با نسبت ۱ (بافر نمونه) به ۵ (نمونه) با سمپل بافر دارای غلظت ۵x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانده شد. در نهایت، نمونه های تیمار شده با ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) ۱۲٪ از لحاظ بیان پروتئین های نو ترکیب بررسی شدند.

برای تهیه محلول ژل، درصد آکریل آمید و بیس آکریل آمید متناسب با اندازه پروتئین انتخاب شد. با توجه به اینکه پروتئین بیان شده در حدود ۴۱ کیلو دالتون وزن داشت؛ از ژل ۱۲٪ استفاده شد. نمونه های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن) تحت شرایط دنا توره الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲٪ با جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر بود. برای مشاهده باندهای پروتئین، از روش رنگ آمیزی با کوماسی بلو استفاده گردید. برای تأیید پروتئین نو ترکیب، تکنیک وسترن بلات به کار برده شد. بلا تینگ نمونه ها روی کاغذ نیتروسولوز انجام گرفت؛ به این منظور ابتدا نمونه خالص پروتئین هدف به مقدار ۳۰ میکرو گرم در الکتروفورز پلی آکریل آمید ۱۲٪ ران شد و از پروتئین BSA (به همان مقدار پروتئین هدف) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سپس ژل از کاست الکتروفورز جدا شده و در بافر بلا تینگ (شامل: تریس ۲۵ میلی مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی مولار و اتانول ۲۰٪) شست و شو داده شد. پس از شست و شو، ژل در ساندویچ وسترن بلات بسته بندی و در تانک وسترن قرار گرفت. فرآیند بلا تینگ در ولتاژ ۱۰۰ میلی ولت به مدت یک ساعت و نیم انجام شد، سپس به منظور پر کردن جایگاه های خالی (بلا کینگ)، کاغذ نیتروسولوز به مدت یک شب در محلول ۳٪ ژلاتین در

PBST (Phosphat-Buffered Salin-Tween) در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد، سپس سه مرتبه با PBST شست و شو داده شد. کاغذ با آنتی بادی های پلی کلونال موشی با رقت های مشخص شده توسط شرکت سازنده در ۳۷ درجه گرما گذاری شد. فرآیند شست و شو با PBST سه بار انجام گرفت. کونژوگه موشی با رقت ۱:۲۵۰۰ به عنوان آنتی بادی تشخیص دهنده به کار رفت. همانند مرحله قبل گرما گذاری انجام شد. فرآیند شست و شو نیز همانند مراحل قبلی صورت گرفت. در نهایت، کاغذ نیتروسولوز در محلول سوبسترای رنگ زای DAB (Diaminobenzidine) (۶۰ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بافر تریس، ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۸) تا ظهور باند پروتئینی گذاشته شد و برای توقف واکنش، کاغذ در آب مقطر قرار گرفت (۱۳، ۷).

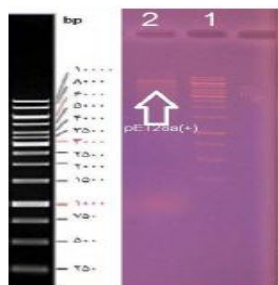
تمام مراحل تخلیص در اتاق سرما با دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد و پروتئین به دست آمده بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. مقدار ۲۵ میکرو لیتر از محلول های

و در چاهک کنترل منفی فقط بافر PBST اضافه شد (حجم نهایی با بافر PBST به ۱۰۰ ماکرولیتر رسید). در ادامه، به هر چاهک یک میکرولیتر سرم موش سوری در ۹۹ ماکرولیتر بافر PBST به‌عنوان Detection Antibody افزوده شد. در پایان، کانژوگه موش سوری، سپس سوبسترا اضافه و جذب چاهک‌ها قرائت گردید. در بین تمام این مراحل، شست‌وشو با بافر PBST صورت گرفت (۱۳،۷).

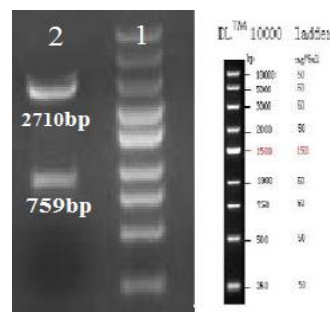
نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری R نسخه ۳، ۴ با رابط کاربری R Studio و آزمون واریانس یک‌طرفه (برای اندازه‌گیری‌های مکرر) بررسی شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ترادف ژنی *ML1* گیاه دارواش، از بانک ژنی NCBI با شماره AY377891.1 استخراج گردید. با توجه به بررسی داده‌های موجود که در مقدمه به آن پرداخته شد؛ بهترین ناحیه ژن از نوکلئوتید ۹۱۹-۱۵۸ (۷۶۲ نوکلئوتید) انتخاب و به کمک نرم‌افزار Gene Script بهینه گردید. همچنین به‌منظور تأیید حضور قطعه موردنظر در وکتور pUC57، از هضم آنزیمی به‌وسیله آنزیم محدودالآنزیم *NdeI* و *SalI* (شکل شماره ۱: الف) استفاده شد که در این حالت ژن *ML1* که حدود ۷۷۴bp طول دارد، از وکتور خارج شد. برای به دست آوردن قطعه pET28a(+)-Linker-stxB بر روی وکتور بیانی pET28a(+)-ipaD-Linker-stxB، از هضم آنزیمی محدودالآنزیم *NdeI* و *SalI* (شکل شماره ۱: ب) استفاده گردید که در این حالت قطعه با طول حدود ۵۶۰۰bp pET28a(+)-Linker-stxB به دست آمد.



(ب)



(الف)

شکل شماره ۱: الف) تصویر حاصل از پلاسمید ژن صناعی روی ژل آگارز ۱٪؛ ب) هضم دوگانه پلاسمید pET28a(+)-Linker-stxB.

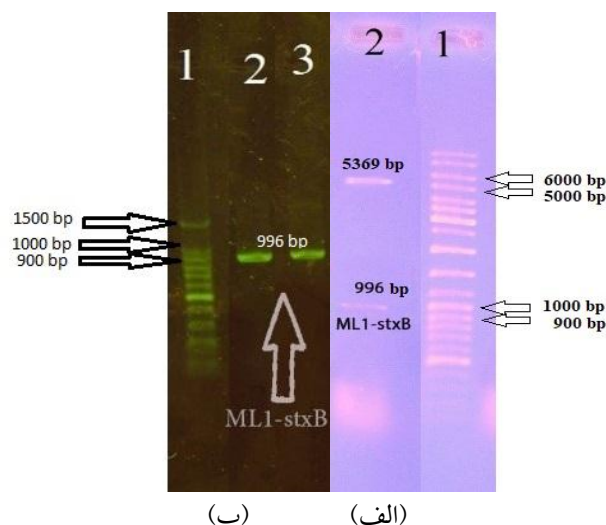
الف) ستون ۱: نشانگر مولکولی DNA؛ ستون ۲: برش آنزیمی PUC57 با آنزیم *NdeI* و *SalI*.

ب) ستون ۱: نشانگر مولکولی DNA؛ ستون ۲: برش آنزیمی pET28a(+)-ipaD-Linker-stxB با آنزیم‌های *NdeI* و *SalI*.

پس از برش آنزیمی قطعات ژنی *ML1* و

pET28a(+)-Linker-stxB با آنزیم‌های SalI - NdeI و تخلیص آنها از روی ژل آگارز، این قطعات به وسیله آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas) به یکدیگر ممزوج و در نهایت، پلاسمید نو ترکیب pET28a(+)-ML1-Linker-stxB در میزبان بیانی *E. coli* BL21 (DE3) ترانسفورم گردید.

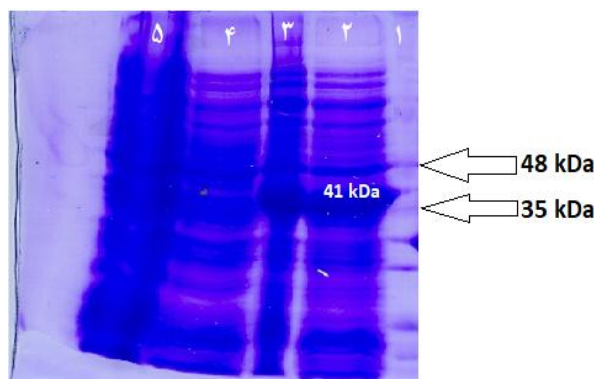
برای تأیید قطعه ممزوج و کتور نو ترکیب پس از استخراج پلازمید، عمل PCR بر روی آن انجام شد (شکل شماره ۲: ب). سپس با آنزیم‌های برشی محدودالایتر XhoI و NdeI عمل برش صورت گرفت و قطعه‌ای در حدود ۹۹۶bp (شکل شماره ۲، الف) مشاهده گردید.



شکل شماره ۲: برش آنزیمی و کتور نو ترکیب pET28a(+)-ML1-Linker-stxB
(الف) چاهک ۱: مارکر اسید نوکلئیک (#SM0313) و چاهک ۲: محصول برش آنزیمی
(ب) چاهک ۱: مارکر اسید نوکلئیک (#SM0313) و چاهک ۲ و ۳: محصول PCR.

سپس برای بررسی بیان و کیفیت آن، روی ژل 12% SDS-PAGE برده شد. باند پروتئینی مدنظر در جایگاه حدود ۴۱ کیلودالتونی قرار گرفت؛ درحالی که در کنترل هیچ بانندی مشاهده نشد.

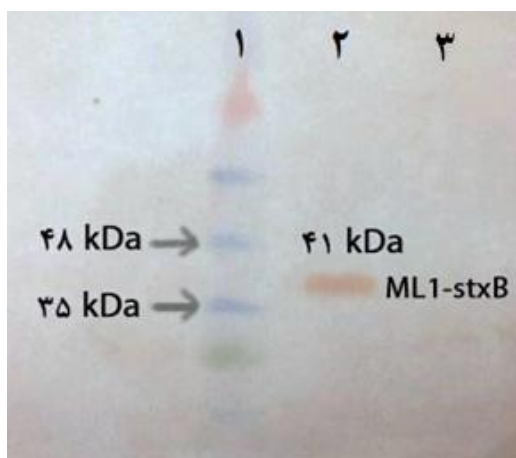
کلنی انتخاب شده در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد و پس از رسیدن به رشد کافی، به منظور بیان پروتئین، IPTG با غلظت ۱ میلی مولار اضافه گردید و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد.



شکل شماره ۳: الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE، به منظور بررسی بیان پروتئین مورد نظر.
ردیف شماره ۱: مارکر پروتئینی (#PR0602-S)؛ ردیف شماره ۲ و ۳: نمونه القاشده با ماده IPTG؛ ردیف شماره ۴ و ۵: نمونه بدون القا با ماده IPTG.

در ستون تست که مربوط به نمونه القاشده با IPTG است؛ یک باند در نزدیکی ۴۱kDa (شکل شماره ۵) مشاهده گردید. در ستون شاهد که تحت القای IPTG نبود، هیچ بانندی دیده نشد.

به منظور تأیید محصول پروتئینی، تکنیک Western Blotting به کاربرده شد. در این روش از آنتی بادی پلی کلونال ضد STxB کامل استفاده شد.

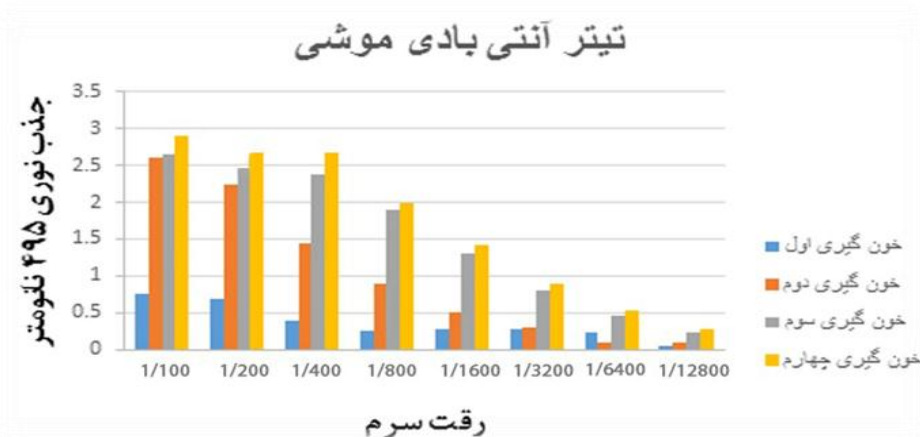


شکل شماره ۵: لکه گذاری وسترن.

ردیف ۱: مارکر پروتئینی؛ ردیف ۲: نمونه تست القاشده با IPTG؛ ردیف ۳: نمونه شاهد القاشده با IPTG.

آمد و بعد از جداسازی سرم آنها، آزمایش ELISA انجام شد. نتایج نشان داد دو تزریق جهت بررسی تیتراژ آنتی بادی موشی برای آنتی ژن MLI-STxB کفایت می کند (نمودار).

به منظور ارزیابی آنتی بادی تولیدشده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق، از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر تزریق، از موش های تست و شاهد خونگیری به عمل



نمودار: بررسی تیتراژ آنتی بادی موش با استفاده از تکنیک ELISA.

به وسیله شکافتن یک باقیمانده آدنین مخصوص (A^{4324}) از 28SrRNA مربوط به زیرواحد بزرگ 60S ریبوزومی جلوگیری می کنند (۱۴، ۱۲). بعضی از RIP های معین می توانند آدنین را از DNA و سایر پلی نوکلئوتیدهای دیگر جدا کنند که به همین دلیل، آنها به عنوان آدنوزین پلی نوکلئوتید گلیکوزیداز شناخته شده اند (۱).

بحث

پروتئین های غیرفعال کننده ریبوزومی (RIP)، سمومی هستند که خواص N - گلیکوزیداز دارند. آنها اساساً به وسیله گیاهان تولید می شوند و به عنوان RIP های نوع ۱ و RIP های نوع ۲ طبقه بندی شده اند. پروتئین های غیرفعال کننده ریبوزومی به دلیل فعالیت N-گلیکوزیدازی، از سنتز پروتئین

سموم دارویش شامل دو زنجیره پلی پپتیدی (A و B) است که معمولاً با یک پل دی سولفیدی به هم متصل می شوند. زنجیره A دارای عملکرد آنزیمی بوده و زنجیره B خاصیت لکتینی (Lectin) دارد که قادر است پروتئین هایشان را به باقیمانده گالاکتوز در روی سطح سلولی متصل کند. این خصوصیات، ورود زنجیره A به سلول را تسهیل می کند (۱۸-۱۵). RIPها فعالیت های آنزیمی کیتینازی (۱۹)، سوپراکسیدسموتازی (۲۰)، DNase I (۲۱) و لیپازی (۲۲) را نشان می دهند. RIPها به سبب فعالیت N-گلیکوزیدی روی RNA ویروسی دارای اثر ضد ویروسی هستند. فعالیت های آنزیمی RIPها می تواند مرتبط با نقش دفاع گیاهان در برابر شکارچیان و قارچ ها باشد (۲۳، ۲۴). در کشاورزی، تحقیقاتی در زمینه افزایش مقاومت در مقابل ویروس ها با استفاده از تکنولوژی DNA نو ترکیب انجام شده است. در پزشکی نیز برای معالجه امراض HIV، تحقیقات وارد فاز مطالعاتی II شده است (۲۵)، ولی اکثر تحقیقات کاربردی مربوط به RIPها، متوجه درمان سرطان بوده که منجر به هدایت RIPها به طور گزینشی به سمت سلول های توموری بدخیم برای حذف آنها می شود.

به علت وفور بیان گیرنده STB (Gb_3) بر سطح سلول های سرطانی، از STB برای انتقال دارو به سلول های سرطانی استفاده می گردد. کمپلکس STB نیز به همراه دارو به Gb_3 در سطح سلول های سرطانی متصل می شود. یکی از اهداف مهم شیمی درمانی در بیماران سرطانی، به حداقل رساندن عوارض جانبی داروها بر دیگر سلول های بدن است؛ به همین منظور، STB می تواند داروی ضد سرطان را مستقیماً وارد سلول سرطانی کند بدون اینکه بر سلول های دیگر تأثیر داشته باشد یا حداقل اثر کمتری داشته باشد. امروزه، از وزیکول های چند لایه لیپیدی به نام Spherulit به عنوان مخزنی برای انتقال داروها استفاده می شود. این وزیکول ها را می توان با STB ممزوج کرده و آنها را مستقیماً به سمت Gb_3 فرستاد. اتصال داروها به STB عموماً از ناحیه C ترمینال STB به واسطه یک پیوند گوگرد دار و به واسطه اسید آمینه Cys انجام می گیرد. امروزه، داروهای مختلفی را جهت شیمی درمانی سرطان توسط STB به سلول های سرطانی می فرستند (۲۶). براساس مطالعاتی که بر روی لینکرهای مختلف انجام شده است،

در این مطالعه از لینکر فورینی که غنی از آرژنین و انعطاف پذیر بود و از طرفی، این امکان را به پروتئین نو ترکیب می داد تا در سطح سلول های دارای گیرنده Gb_3 به دو قسمت تقسیم شود؛ استفاده گردید تا اپی توپ های پروتئین تولید شده به شکل مناسبی به سلول های ایمنی عرضه شوند. عملکرد این لینکر، ناشی از خصوصیت اسید آمینه های به کاررفته در ساخت آنکه اغلب آرژنین است، می باشد و موجب جداسازی موتیف های مختلف پروتئین فیوژن شده می شود. در گذشته، از این نوع لینکر برای انتقال دارو به سلول های سرطانی استفاده می شد. در پژوهشی در مورد انتقال داروهای مختلف به سلول های سرطانی، به این نتیجه رسیدند که لینکرهای فورینی نسبت به لینکرهای بدون انعطاف، مؤثرتر عمل می کنند (۲۷). در مجموع لینکرهای دارای آرژنین، فورینی به حساب می آیند؛ مانند لینکرهای RR، RXK و... که توسط فورین برش می خورند. لینکر مورد استفاده در این پژوهش RARR، که یک توالی غنی از آرژنین بوده، انتخاب گردید. این توالی لینکری، اقتباس شده از آنتی ژن PA باسیلوس آنتراسیس است (۲۸، ۸).

تزریق پروتئین های نو ترکیب ممزوجی به حیوان آزمایشگاهی، باعث افزایش تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین ها می شوند. حسین هنری و همکاران، سال ۱۳۹۳ در مطالعه ای با هدف «بیان پروتئین نو ترکیب IpaD-STxB و بررسی ایمنی زایی آن در موش سوری و خوکچه هندی» نشان دادند تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین IpaD-STxB در موش، افزایش محسوسی داشته است (۷، ۱۳). مهدی بارانوند و همکاران نیز در سال ۱۳۹۴ با بررسی ایمنی زایی آنتی ژن های STxB و IpaD-STxB به صورت نازال در رت های آزمایشگاهی، مشاهده کردند با ممزوج شدن IpaD به STxB، میزان تیتراژ آنتی بادی نسبت به تیتراژ آنتی بادی علیه آنتی ژن STxB افزایش یافته است، در مطالعه فوق جهت بررسی تیتراژ آنتی بادی در حیوانات آزمایشگاهی، ۴ مرتبه با فاصله ۱۵ روز تزریق انجام گرفت (۲۹). پروتئین های غیر فعال کننده ریبوزومی دارای خاصیت یابوری هستند و با تزریق یک یا حداکثر دو مرتبه به حیوان آزمایشگاهی به اندازه کافی آنتی بادی تولید می کنند که از خصوصیات بارز پروتئین های غیر فعال کننده ریبوزومی است. آزمایش های مربوط به کمیت تیتراژ آنتی بادی نشان می دهد مقدار

پروتئین غیرفعال‌کننده ریوزومی MLI بسیار پایدار بوده و با توجه به فعالیت حاملی و یآوری STxB، از آنتی‌بادی این ترکیبات، به‌عنوان کیت تشخیصی سم گیاه داروآش و باکتری شیگلا می‌توان استفاده کرد. تحلیل آماری نتایج، فرض یکسان بودن تیر آنتی‌بادی در نمونه‌گیری‌ها را رد کرده و تولید افزایشی آنتی‌بادی ($p=0/001$) را تأیید می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی اساتید، پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین(ع) که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

آنتی‌بادی خون‌گیری دوم و سوم با هم اختلاف معنی‌داری ندارند. عبدالهی و همکاران در سال ۱۳۹۶، کمیت آنتی‌بادی پلی‌کلونال پروتئین نو ترکیب SO6 را در رت مطالعه کردند که میزان آنتی‌بادی خون‌گیری اول، دوم و سوم با هم اختلاف چندانی نداشت (۳۰).

نتیجه‌گیری

افزایش تیر آنتی‌بادی موشی بعد از تزریق دوم برای آنتی‌ژن MLI-STxB ناشی از خصوصیات ایمونوجوانتی STxB می‌باشد و آنتی‌ژن MLI و SO6 از خانواده RIPها بوده که خاصیت یآوری نیز دارد.

در این تحقیق، با توجه به شناسایی آنتی‌ژن (MLI) به‌وسیله آنتی‌بادی MLI-STxB و خاصیت آنزیمی کتینازی، سوپراکسید دسموتازی، IDNas، لیپازی، اثر ضد ویروسی و خواص ضد سرطانی پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریوزومی، همچنین خاصیت ایمنی‌زایی، یآوری، حاملی پروتئین STxB و بیان زیاد Gb3 در سطح سلول‌های سرطانی انسان، تلاش گردید تا پروتئین نو ترکیبی با ممزوج کردن ژن‌های *MLI* و *stxB* تولید شود. پروتئین ساخته‌شده می‌تواند به‌عنوان یک کاندید واکسن و یک ترکیب ضد سرطان، ضد ویروس و ضد قارچ مطرح باشد.

References:

1. Barbieri L, Valbonesi P, Bondioli M, Alvarez ML, Dal Monte P, Landini MP, et al. Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. FEBS Lett 2001;505(1):196-7. PubMed
2. Kourmanova AG, Olga J, Soudarkina S, Jurij K. Cloning and characterization of the genes encoding toxic lectins in mistletoe (*Viscum album* L). Eur J Biochem 2004;271(12):2350-60. PubMed
3. Peumans WJ, Hao Q, Van Damme EJ. Ribosome- Inactivating proteins from plants: More than RNA N-glycosidases. FASEB J 2001;15(9):1493-506. PubMed
4. Lin JY, Tsern KY, Chen CC, Lin LT, Tung TC. Abrin and Ricin: New Anti-tumor Substances. Nature 1970;227(5255):292-3. PubMed
5. Katzin BJ, Collins EJ, Robertus J. Structure of Ricin A-chain at 2.5 Å. Proteins 1991;10(3):251-9. PubMed
6. Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig K. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. Microb Biotechnol 2011;4(1):32-46. PubMed

7. Honari H, Amlashi I, Minaei M. Expression of recombinant proteins IpaD-STxB and immunogenicity STxB in the mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2014;23(109):183-93.[Full Text in Persian] Link
8. Ahmadi AH, Honari H, Ebrahim M. Cloning, fusion and expression of domain a-1 protective antigen (pa20) of bacillus anthracis and n-terminal ipad gene of shigella in E. coli. Qom Univ Med Sci J 2015;9(4):20-9. [Full Text in Persian] Link
9. Fracasso G, Bellisola G, Castelletti D, Tridente G, Colombatti M. Immunotoxins and other conjugates: preparation and general characteristics. Med Chem 2004;4(5):545-62. PubMed
10. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. AAPS J 2006;8(3):E532-E551. PubMed
11. Gilabert-Oriol R, Weng A, Von Mallinckrodt B. Immunotoxins constructed with ribosome-inactivating proteins and their enhancers: A lethal cocktail with tumor specific efficacy. Curr Pharm 2014;20(42):6584-643. PubMed
12. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold spring-Harbour Laboratory Press; 2001. Link
13. Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaei S. Immunogenicity in guinea pigs by IpaD- STxB recombinant protein. Arak Med Uni J 2013;16(4):83-93. [Full Text in Persian] Link
14. Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S Ribosomal RNA caused by the toxins. J Biol Chem 1987;262(12):5908-12. PubMed
15. Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. Toxicon 2004;44(4):371-83. PubMed
16. Olsnes S, Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. Biochemistry 1973;12(16):3121-6. PubMed
17. Olsnes S, Pihl A. Isolation and properties of abrin: A toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains. Eur J Biochem 1973;35(1):179-85. PubMed
18. Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase activity of ricin a-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. J Biol Chem 1987;262(17):8128-30. PubMed
19. Shih N, McDonald K, Jackman A, Girbés T, Iglesias R. Bifunctional plant defence enzymes with chitinase and ribosome inactivating activities from trichosanthes kirilowii cell cultures. Plant Sci 1997;130(2):145-50. Link
20. Li XD, Chen W, Liu W, Wang G. Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating proteins-cinnamomin and camphorin from the seeds of cinnamomum camphora. Protein Expr Purif 1997;10(1):27-31. PubMed
21. Ruggiero A, Chambery A, Di Maro A, Mastroianni A, Parente A, Berisio R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of pd-l1, a highly glycosylated ribosome inactivating protein with dnase activity. Protein Pept Lett 2007;14(4):407-9. PubMed
22. Lombard S, Helmy M, Pieroni G. Lipolytic activity of ricin from ricinus sanguineus and ricinus communis on neutral lipids. Biochem J 2001;358(Pt 3):773-81. PubMed
23. Girbés J, Ferreras J, Arias F, Stirpe F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. Mini Rev Med Chem 2004;4(5):461-76. PubMed
24. Barbieri L, Battelli M, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants. Biochim Biophys. Acta 1993;1154(3-4):237-82. PubMed
25. Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. Toxicon 2013;67:12-16. PubMed
26. Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, Effenterre D. Intracellular trafficking of shiga toxin- B-subunit-functionalized spherulites. Biol Cell 2008;100(12):717-25. PubMed

27. Fuchs H, Bachran C, Heisler I, Sutherland M. A closer look at protein transduction domains as a tool in drug delivery. *Curr Nanosci* 2005;1(12):117-24. Link
28. *Bacillus anthracis* str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO1, complete sequence [*Bacillus anthracis* str. 'Ames Ancestor'. NCBI Reference Sequence: NC_007322.2. Link
29. Baranvand M, Honari H. Nasal Immunogenicity Induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats. *Koomesh* 2015;16(3):397-403. [Full Text in Persian] Link
30. Abdolahi M, Honari H, Nazarian S, Masoudi M. Subcloning and expression of SO6 Gene *Saponaria Officinalis* plant in *E.coli* and investigation of antibody titer in rats. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2017;24(12):1024-33. [Full Text in Persian] Link