

همسانه سازی، امتزاج و بررسی بیان دومن a-1 آنتی ژن حفاظتی (PA20) باسیلوس آنتراسیس و N-ترمینال ipaD شیگلا در اشرشیا کلی

امیرحسین احمدی^۱، حسین هنری^{۲*}، محمد ابراهیم مینایی^۳

چکیده

زمینه و هدف: جنس شیگلا یکی از عوامل اصلی بیماری اسهال در انسان و باسیلوس آنتراسیس عامل سیاه زخم (یک بیماری مشترک بین انسان و دام) می باشد. یکی از مهم ترین فاکتورهای بیماریزایی شیگلا، پروتئین IpaD است. همسانه سازی N ترمینال ژن ipaD به همراه ژن pa20 که دارای نقش ایمنی زایی است، به عنوان کاندید واکسن نو ترکیب می تواند مطرح باشد. در این مطالعه بیان ژن ممزوجی دومن a-1 آنتی ژن حفاظتی (PA20) باسیلوس آنتراسیس و N-ترمینال ipaD شیگلا در اشرشیا کلی بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، طراحی پرایمر برای ژن pa20 صورت گرفت و جهت تکثیر این قطعه، واکنش PCR انجام شد. سپس قطعه تکثیر شده به درون pGEM-T Easy Vector Systems همسانه سازی شد. ژن pa20 به وسیله آنزیم های محدودالایر EcoRI و XhoI برش خورده و در نهایت، ژن pa20 به ژن ipaD ممزوج شد. وکتور pET28a(+) حاوی کاست ژنی ipaD-pa20 ساخته شده به باکتری E. coli سویه BL21(DE3) تراریخت و بررسی بیان کاست ژنی انجام گرفت.

یافته ها: در این مطالعه، ژن های ممزوجی ipaD-pa20 در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله PCR و هضم آنزیمی تأیید گردید. همچنین پروتئین نو ترکیب تولید شده به وسیله SDS-PAGE لکه گذاری و سترن تأیید شد.

نتیجه گیری: با توجه به شناسایی آنتی ژن PA به وسیله آنتی بادی PA20 و خاصیت القای آپاتوز آن و خاصیت ایمنی زایی آنتی ژن ipaD تولید شده، به عنوان کاندید واکسن نو ترکیب علیه انواع شیگلا و باسیلوس آنتراسیس می تواند مطرح باشد.

کلید واژه ها: باسیل های آنتراسیس؛ پروتئین آپی ا دی، شیگلا فلکسنری؛ آنتی ژن های باکتریایی، آنتی ژن های ممزوجی (PA20) و ipaD.

^۱کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

^۲دانشیار ژنتیک، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

^۳دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

حسین هنری، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
honari.hosein@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Ahmadi AH, Honari H, Ebrahim Minaei 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):20-29. [Full Text in Persian]

مقدمه

بیماری‌های اسهالی ایجادشده به‌وسیله پاتوژن‌های روده‌ای، یک مشکل عمده سلامت عمومی در ایران و کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. شیگلوزیس (عفونت حاد روده‌ای) با میزان شیوع بالا در جهان، به‌علت نبود یک واکسن علیه آن و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌عنوان یک عامل بیوتروریستی مطرح است (۱). شیگلوزیس همواره به‌صورت یک اسهال خونی باسیلی حاد همراه با مدفوع آبکی با خون و موکوس توأم با علائم بالینی مانند تب و کرامپ‌های شکمی مشخص می‌شود که ممکن است به همراه سندرم اورمیک همولیتیک نیز باشد (۲،۳). اصلی‌ترین فاکتورهای که مکانیسم مولکولی بیماری‌زایی شیگلا را رهبری می‌کنند به‌وسیله پلاسمید بزرگ شیگلا کد می‌شوند (۴،۵). بیان فاکتورهای کدشونده در این ناحیه، شرط لازم و کافی برای حمله به سلول‌های اپی‌تلیال و نابود نمودن ماکروفاژها می‌باشد (۶،۷). از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به آنتی‌ژن‌های پلاسمیدی مهاجم (Invasion Plasmid Antigens A, B, C, D) اشاره کرد (۸). آنتی‌ژن‌ها IpaB, C, D، فاکتورهای بیماری‌زای کلیدی برای شیگلا هستند. صرف‌نظر از عملکرد تأثیرگذاری آنها در تهاجم به سلول و بقای دورن سلولی، این پروتئین‌ها ترشح و انتقال سایر فاکتورهای تأثیرگذار به درون سلول‌های میزبان را نیز بر عهده دارند (۹). پروتئین IpaD به‌عنوان یک آنتی‌ژن اصلی به‌وسیله سیستم ایمنی بدن انسان و میمون شناسایی می‌شود (۶،۱۰). آنتی‌بادی‌هایی که ناحیه N-ترمینال پروتئین IpaD را شناسایی می‌کنند می‌توانند برهمکنش این پروتئین با نمک‌های صفراوی، به‌ویژه دی‌اکسی کولات را سرکوب کنند. در این حالت، باکتری قادر به انجام فعالیت ویژه خود برای فراخوانی و به‌کارگیری فاکتورهای لازم برای ورود به سلول میزبان نخواهد بود، در نتیجه توان شیگلا برای ایجاد منفذ در سلول یوکاریوتی از بین رفته و پروسه ورود باکتری به درون سلول میزبان سرکوب می‌شود. با توجه به اینکه ناحیه N-ترمینال IpaD یک ایمونوژن بسیار قوی در بروز شیگلوز می‌باشد می‌توان از آن در طراحی واکسن استفاده کرد (۱۱-۱۳).

سیاه‌زخم (Anthrax) یک بیماری مشترک دامی - انسانی است که به‌وسیله باکتری باسیلوس آنتراسیس (*Bacillus anthracis*)

ایجاد شده و پتانسیل استفاده در جنگ‌های بیولوژیک را نیز دارا می‌باشد (۱۴). باسیلوس آنتراسیس علاوه بر یک DNA حلقوی (۴/۵ مگاباز)، دارای دو پلاسمید بزرگ pXO1 (شامل ژن‌های توکسیک) و pXO2 (شامل ژن‌های مولد کپسول) است. کپسول، عامل تعیین‌کننده در بیماری‌زایی بوده و باکتری را در برابر هجوم ماکروفاژهای میزبان محافظت می‌کند. توکسین با واسطه یک پلاسمید به‌نام PBA1 یا pXO1 ایجاد می‌شود که ۳ پروتئین یا فاکتور مولد ادم (Edema Factor, EF)، آنتی‌ژن محافظت‌کننده (Protective Antigen, PA) و فاکتور مولد مرگ سلولی (Lethal Factor, LF) را کد می‌کند (۱۵).

آنتی‌ژن مصنوعی‌زا (PA) پروتئین سمی نبوده، ولی دارای خاصیت مصنوعی‌زایی است و در واقع بخش تعیین‌کننده سم آنتراکس می‌باشد. این سم با اتصال به گیرنده غشای سلولی میزبان (Receptor Mediated Internalization) زمینه عملکرد دو بخش دیگر را فراهم می‌کند. هیچ‌یک از سموم سه‌گانه فوق به تنهایی خاصیت سمیت ندارند، اما ترکیب دو عامل PA و LF دارای تورم‌زایی است. پروتئین PA به‌وسیله ژن *Pag* کد شده و غنی از A/T (۶۹٪)، فاقد سیستئین، وزن مولکولی ۸۳kDa، دارای ۷۳۵ اسید آمینه و پروتئینی مسطح و بلند است (۱۶). ساختار کریستالی از PA طبیعی نشان می‌دهد PA شامل ۴ دومن مجزا و از نظر عملکردی غیروابسته به‌هم می‌باشند. دومن ۱ به دومن‌های 1a (مرکب از اسید آمینه‌های ۱۶۷-۱۶۷ و 1b مرکب از اسید آمینه‌های ۲۵۸-۱۶۷) تقسیم می‌شود و دومن ۲ مرکب از اسید آمینه‌های ۴۷۸-۲۵۹، دومن ۳ مرکب از اسید آمینه‌های ۵۹۵-۴۸۸ و دومن ۴ شامل اسید آمینه‌های ۷۳۵-۵۹۶ می‌باشد (۱۷). پروتئین PA کامل موقعی که به رسپتور خود در سطح سلول میزبان متصل شود به‌وسیله پروتئین‌های به‌نام Furin-Like Protease برش خورده و یک قسمت 20kDa به‌نام دومن ۱-a از PA جدا می‌شود. PA20kDa و PA63kDa در خون میزبان آلوده به باکتری یافت می‌شود، از این‌رو می‌توان برای تشخیص سریع از آن استفاده کرد. به‌علاوه، تأثیر PA20 بر سلول‌های PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) باعث افزایش فعالیت آنزیمی caspase3 و القای آپاپتوز می‌شود (۱۸).

با بررسی‌های انجام شده بر روی آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد PA کامل مشخص شده است ۶۲٪ این آنتی‌بادی‌ها به صورت اختصاصی اپی‌توپهای PA20 را شناسایی می‌کنند (۱۹). بنابراین، از PA20 نیز می‌توان به عنوان کاندید، همچنین برای درمان سلول‌های سرطانی با القای آپاپتوز استفاده کرد. همسانه‌سازی N-ترمینال ژن *ipaD* به همراه ژن *pa20* که دارای نقش شناسایی و ایمنی‌زایی است می‌تواند به عنوان کاندید واکسن نو ترکیب مطرح باشد. در این مطالعه بیان ژن ممزوجی دومن a-1 آنتی ژن حفاظتی (PA20) باسیلوس آنتراسیس و N-ترمینال *ipaD* شیگلا در *E. coli* مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

جهت طراحی پرایمر برای ژن *pa20*، وکتور بیانی pET28a(+)-*ipaD*-*stxB* از گروه زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین (ع) تهیه گردید (۲۰). توالی کامل ژن *pa20* از بانک ژن NCBI (با شماره Accession No: NC_007322.2) استخراج و پرایمرها با توجه به نقشه وکتور بیانی اشاره شده طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد. پرایمر بالادست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایر *EcoRI* و پرایمر پایین‌دست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایر *XhoI* است که به وسیله نرم‌افزار تحت شبکه BIOLABS-NEB-cutter تعیین گردید. قطعه ژنی موردنظر به همراه جایگاه‌های آنزیمی، لینکر و کدون پایان دارای ۵۲۸ جفت باز می‌باشد. توالی پرایمر رفت همراه با لینکر پرولینی (GGTCCTGGACCA) و جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایر:

EcoRI (gaattc): 5'-TAGaattc
GGTCCTGGACCAGGCGGTCATGGTGATGTAG-3'

توالی پرایمر برگشت با جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایر:

XhoI (ctcgag): 5'-CGctcgag
TTATAGATTTATTTCTTGTTTCGTTAAAT-3'

برای تکثیر ژن *Linker-pa20* با واکنش PCR باکتری باسیلوس آنتراسیس (از بخش هوازی مؤسسه رازی) تهیه شد. پلاسمیدهای باکتری با روش فنل - کلروفرم استخراج شده و پس از تعیین غلظت با اسپکتروفتومتری، به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شدند.

واکنش PCR برای تکثیر ژن *Linker-pa20* ابتدا با آنزیم Taq پلیمرز (سیناژن) در غلظت ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs و در دمای اتصال ۶۱ درجه سانتیگراد بهینه‌سازی شد. به منظور جلوگیری از جهش‌های ناخواسته، تکثیر نهایی ژن با استفاده از آنزیم Pfu پلیمرز (Fermentas) در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. هر واکنش PCR شامل ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۲۵ واحد آنزیم DNA پلیمرز Pfu، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X و $MgSO_4$ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار و ۵۰ نانوگرم از پلاسمیدهای استخراج شده باسیلوس آنتراسیس بود. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه موردنظر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه بود. برای همسانه‌سازی قطعه حاصل از واکنش PCR، محصول PCR به کمک مارکر اسیدنوکلیک (#SM0313) روی ژل آگارز بررسی شد.

سپس قطعه DNA از ژل آگارز تخلیص و به انتهای آنها نوکلئوتید A اضافه گردید. برای همسانه‌سازی و تراویخت (ترانسفورم) کردن از وکتور کلونینگ pEGM-T Easy Vector (Promega) و سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α استفاده شد. برای فیوژن ژن *Linker-pa20* با وکتور نو ترکیب pET28a(+)-*ipaD* ژن *Linker-pa20* از وکتور کلونینگ با آنزیم‌های برشی محدودالایر *EcoRI* و *XhoI* هضم و از روی ژل آگارز تخلیص و جداسازی شد.

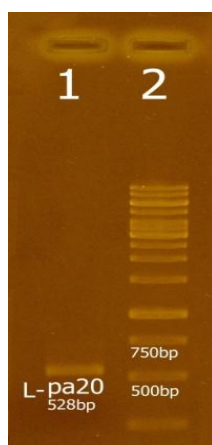
سپس قطعه ژنی *Linker-pa20* و pET28a(+)-*ipaD* با آنزیم T4 Ligase (Fermentas) به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه فیوژن شد و در نهایت، پلاسمید نو ترکیب pET28a(+)-*pa20* *ipaD*-*Linker* در میزبان بیانی *E. coli* BL21 (DE3) ترانسفورم گردید. برای بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب *IpaD* L-PA20 کلنی نو ترکیب انتخاب شده در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد.

۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۰/۱٪ و متانول ۲۰٪ و pH=۸/۳ روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. کاغذ نیتروسولوز با استفاده از بافر PBST (کلرید سدیم ۳۷ میلی مولار، کلرید پتاسیم ۲/۷ میلی مولار، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۴/۳ میلی مولار، توین ۲۰٪ و pH=۷/۲) حاوی ۵٪ شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست و شو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۴۰۰ آنتی بادی پلی کلونال ضد PA کامل در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. نمونه پس از شست و شوی مجدد با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۵۰۰ از آنتی بادی کونژوگه موشی (Dako) در بافر PBST در دمای اتاق قرار گرفت و در نهایت، پس از سه بار شست و شو با بافر PBST، برای آشکارسازی از بافر تریس ۵۰ میلی مولار، pH=۷/۸ حاوی ۶ میلی گرم DAB و ۱۰ میکرولیتر H_2O_2 استفاده شد. واکنش با استفاده از H_2O متوقف گردید (Error! Bookmark not defined.۲۱).

یافته‌ها

پس از تکثیر ژن *Linker-pa20* به روش PCR، محصول روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف همخوانی داشت (۵۲۸ جفت باز) (شکل شماره ۱).

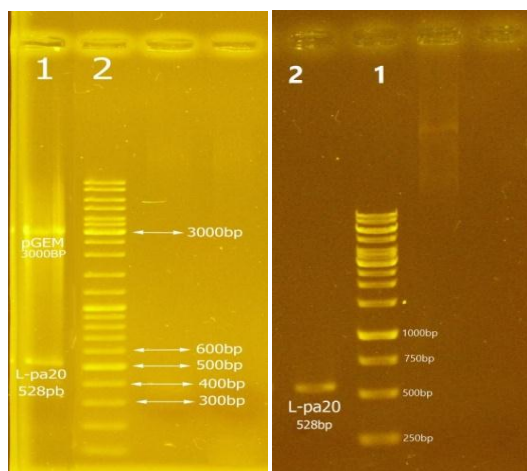
برای بیان حداکثری، محیط باکتری‌ها در میزان جذب (OD) ۰/۶ با طول موج ۶۰۰ نانومتر به وسیله محلول ۱ میلی مولار بر لیتر ایزوپروپیل تیو-β-D-گالاکتوزید (IPTG) القا شد و به مدت ۵ ساعت در ۳۷ درجه با شیکر (۱۱۰ دور بر دقیقه) انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، باکتری‌ها به وسیله سانتریفوژ جمع شدند. دیواره پلاک سلولی با بافر B(NaH_2PO_4 :13/8gr, Tris.HCl:1/2gr, urea 480/5gr, add DDW to 1liter, pH in 8) شکسته و سپس سونیکیت گردید. سلول‌های لیز شده به وسیله سانتریفوژ (دور ۱۳۵۰۰rpm، دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه) جمع شدند. میزان بیان و وزن مولکولی پروتئین نوترکیب IpaD L-PA20 به کمک الکتروفورز روی ژل سدیم دودسیل سولفات - پلی اکریل آمید ۱۲٪ (SDS-PAGE) همراه با مارکر پروتئینی (#PR0602-S) (Vivantis) تحت شرایط دناتوره مورد بررسی قرار گرفت. سپس تمام پروتئین‌های نوترکیب به کمک توالی His-tag در انتهای N-ترمینال خود به وسیله ستون کروماتوگرافی با رزین Ni-NTA تخلیص و توسط SDS-PAGE بررسی شدند (۲۱). برای تأیید پروتئین نوترکیب بیان شده، از تکنیک ایمونوبلات با آنتی بادی پلی کلونال ضد PA کامل استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلیاسین



شکل شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن *pa20* روی ژل آگارز ۱٪. چاهک ۱، محصول PCR ژن *pa20* و چاهک ۲، مارکر اسید نوکلئیک

همچنین با دو آنزیم محدودالایتر *EcoRI* و *XhoI* هضم شدند، سپس به کمک مارکر اسید نوکلئیک، اندازه قطعه خارج شده از وکتور تأیید گردید (شکل شماره ۲).

پس از تخلیص پلاسمید و تأیید آنها روی ژل آگارز، برای تأیید بیشتر، از پلاسمیدها به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید.



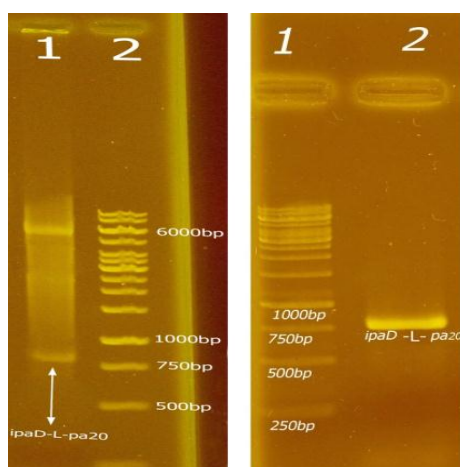
شکل شماره ۲: تأیید همسازسازی ژن هدف در وکتور کلونینگ pEGM-T Easy Vector

الف) چاهک ۱: مارکر اسید نوکلئیک و چاهک ۲: محصول PCR روی پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *Linker-pa20*.

ب) چاهک ۱: محصول برش آنزیمی روی pGEM-Teasy vector و چاهک ۲: مارکر اسید نوکلئیک.

استخراج شده با آنزیم های برشی محدودالایتر *EcoRI* و *XhoI* برش زده شدند و قطعه ژنی (*ipaD-Linker-pa20*) در حدود ۸۷۲bp و وکتور برش خورده pET28a(+) در حدود ۵۳۳۵bp مشاهده گردید (شکل شماره ۳).

قطعه ژنی *pa20* و *ipaD-Linker-pET28a(+)* با آنزیم T4 *Ligase* (Fermentas) فیوژ و در نهایت، پلاسمید نوترکیب *ipaD-Linker-pa20-pET28a(+)* در میزبان بیانی *E.coli* BL21 (DE3) ترانسفورم گردید. برای تأیید فیوژن وکتور نوترکیب پس از استخراج پلاسمید، آزمایش PCR انجام گرفت، سپس پلاسمید



(ب)

(الف)

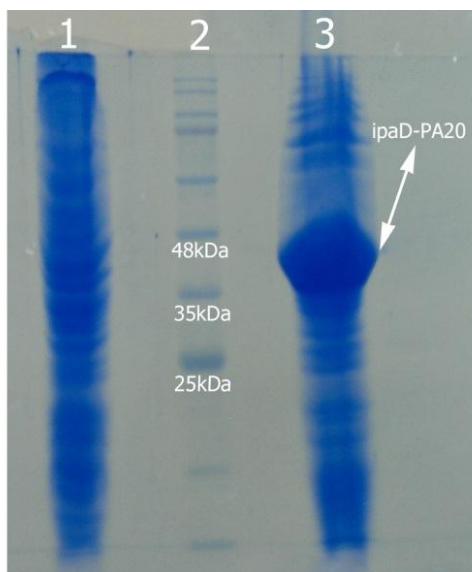
شکل شماره ۳: برش آنزیمی وکتور نوترکیب *ipaD-Linker-pa20-pET28a(+)*

الف) چاهک ۱: مارکر اسید نوکلئیک و چاهک ۲: محصول PCR.

ب) چاهک ۱: محصول برش آنزیمی و چاهک ۲: مارکر اسید نوکلئیک.

سپس برای بررسی بیان و کیفیت آن، روی ژل SDS-PAGE، ۱۲٪ برده شد. باند پروتئینی مدنظر در جایگاه حدود ۳۸ کیلوالتونی قرار گرفت درحالی که در کنترل‌ها هیچ باندی دیده نشد (شکل شماره ۴).

کلنی انتخاب شده در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد. پس از رسیدن به رشد کافی به منظور بیان پروتئین به وسیله IPTG یک میلی مولار القا گردید.

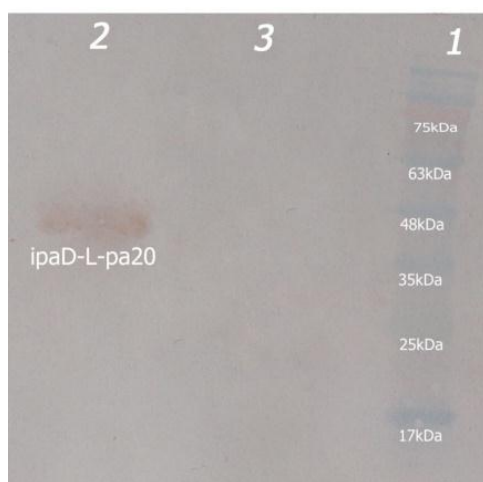


شکل شماره ۴: الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE به منظور بررسی بیان پروتئین مورد نظر.

ردیف ۱: کنترل منفی که در آن باکتری‌ها پس از رسیدن جذب نوری به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا نشده‌اند (رسوب باکتری)؛
ردیف ۲: مارکر پروتئینی؛ ردیف ۳: محتوی پروتئینی باکتری‌هایی که پس از رسیدن جذب نوری آنها به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا شده‌اند (رسوب باکتری).

در ستون تست که مربوط به نمونه القاشده با IPTG بود یک باند در نزدیکی ۳۸kDa مشاهده گردید که در ستون شاهد تحت القای IPTG دیده نشد (شکل شماره ۵).

به منظور تأیید محصول پروتئینی، تکنیک Western Blotting به کار برده شد. در این روش از آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد PA کامل استفاده شد.



شکل شماره ۵: لکه‌گذاری وسترن.

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

بحث

تولید پروتئین نوترکیب و ممزوج IpaD-PA20 می‌تواند به ایمنی‌زایی در برابر بیماری سیاه زخم و شیگلا کمک کرده و روزه‌ای برای تولید کاندید واکسن ایجاد کند. این موضوع مستلزم روش صحیح همسازسازی و بیان مناسب پروتئین نوترکیب است. ناحیه N-ترمینال IpaD یک ایمونوژن بسیار قوی برای شیگلوز بوده و با توجه به نقش ایمنی‌زایی آنتی ژن محافظتی (PA) می‌توان از آنها در طراحی واکسن استفاده کرد. بیماری‌های اسهالی مربوط به عامل شیگلا در دنیا بسیار گسترش داشته و در صورت عدم درمان به موقع منجر به مرگ می‌شود. سهم شیگلوزیس از این مرگ و میر در حدود ۶۰۰ هزار تا یک میلیون مرگ در سال است. شیگلاهای بیماری‌زا پس از نفوذ و تکثیر در سلول‌های اپی‌تلیال در واکوئل سیتوپلاسمیک داخل سلول زندگی می‌کنند. شیگلاهای متصل به سلول با ایجاد موادی با وزن مولکولی کم، پینوسیتوز را در سلول‌های نرمال دیگر آغاز می‌کنند. شیگلا به محض ورود به سلول باعث تورم و ایجاد زخم‌های سطحی، تجمع پلی‌نوکلئرها و بالاخره نکروز و خونریزی می‌شود که به صورت بلغم و خون همراه با مدفوع دفع می‌گردد (۲۲). پروتئین IpaD دارای وزن حدود ۳۷ کیلودالتون و یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای موجود در انواع شیگلاها بوده و برای تهاجم باکتری به سلول میزبان ضروری است. پروتئین IpaD ترشح و عرضه پروتئین‌های IpaB و IpaC در حفاصل سلول میزبان - باکتری، همچنین نفوذ صحیح ناقل‌های پروتئینی به داخل سلول میزبان را در کنترل خود دارد (۲۳).

سیاه‌زخم از کشنده‌ترین بیماری‌های انسانی و دامی است و پتانسیل استفاده در جنگ‌های بیولوژیک را دارا می‌باشد. بیماری سیاه‌زخم در انسان در نتیجه تماس مستقیم با حیوانات بیمار و یا فراورده‌های آنها مانند پوست، مو و پشم ایجاد می‌شود. با توجه به مطالعات انجام شده بر روی باسیلوس آنتراسیس مشخص شده است بهترین راه مقابله با آن، استفاده از واکسن بوده که واکسن‌های کنونی نیز برپایه PA می‌باشند (۲۴، ۲۵). آنتی ژن حفاظتی PA یکی از آنتی ژن‌های شناخته شده برای تحریک آنتی‌بادی‌های حمایتی علیه آنتراکس است. پروتئین PA به عنوان کاندید اصلی برای تحقیق واکسن در نظر گرفته می‌شود. وقتی PA در غیاب EF، LF تولید

شود، به عنوان یک پروتئین خالص شده و یک واکسن نوترکیب یا واکسن ضعیف شده قادر به تولید حمایت مؤثر می‌باشد (۲۶). واکسن AVA برپایه پروتئین PA و با فعالیت پروتئین‌زایی سرم باعث شکست PA به دو قسمت ۶۳ و ۲۰ کیلودالتون می‌شود. با بررسی‌های انجام شده بر روی آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد PA با تکنیک دات‌بلات مشخص شده است که به صورت اختصاصی ۶۲٪ این آنتی‌بادی‌ها، اپی‌توپ‌های PA20 را شناسایی می‌کنند. Hammamieh و همکاران (سال ۲۰۰۸) با بررسی خاصیت PA20 بر روی PBMNCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) چهار داوطلب نشان دادند PA20 توانایی القای ۵ برابری آپتوز نسبت به کنترل (پروتئین PA20 دناتوره شده توسط حرارت) را دارا می‌باشد. همچنین PA20 توانایی فعال کردن کاسپازها و افزایش خاصیت آنزیماتیک Caspase3 را دارد (۱۸). Error! (Bookmark not defined). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد با ممزوج کردن ژن‌های *ipaD-stxB* میزان تیتراژ آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی در حیوان آزمایشگاهی افزایش می‌یابد (۲۰). در تحقیق حاضر از ممزوج کردن ژن‌های *ipaD-L-pa20* بهره‌برداری شد. در ممزوج کردن ژن‌ها از دو نوع لینکر استفاده می‌شود که یکی از آنها لینکر فورینی بوده و به محض رسیدن به سطح سلول، دچار شکست به وسیله آنزیم‌های شبه‌فورینی می‌شود. با توجه به خصوصیات پروتئین IpaD می‌بایستی از لینکر فورینی استفاده کرد، به دلیل اینکه تولید آنتی ژن‌های بیماری‌زای شیگلا، اولین ژن فعال شده *ipaD* بوده که باعث القای B، ipaC می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیقات انجام شده، نقش آنتی ژنی IpaD را اثبات کرده‌اند و گزارش‌ها حاکی از ایمنی‌زایی قوی IpaD به تنهایی است. از این‌رو، ممزوج کردن ژن *ipaD* با ژن *pa20* می‌تواند به عنوان کاندید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا و باسیلوس آنتراسیس مطرح شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اساتید، پژوهشگران و کارکنان مرکز و گروه زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در این پژوهش از لحاظ علمی و مالی ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌شود.

References:

1. Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea to enterotoxigenic bacteria in patients at hospital in Tehran. *Jpn J Infect Dis* 2008;61(4):269-73.
2. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al. Global burden of Shigella infections: Implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 1999;77(8):651-66.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46(RR-10):1-55.
4. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(5):414-24.
5. Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen Y, Lu W, et al. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: Insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res* 2002;30(20):4432-41.
6. Kato J, Ito K, Nakamura A, Watanabe H. Cloning of regions required for contact hemolysis and entry into LLC-MK2 cells from *Shigella sonnei* form I plasmid: *VirF* is a positive regulator gene for these phenotypes. *Infect Immun* 1989;57(5):1391-8.
7. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: Master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 2007;14(1):10-22.
8. Mills JA, Buysse JM, Oaks EV. *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens B and C: Epitope location and characterization with monoclonal antibodies, infection and immunity. *Infect Immun* 1988;56(11):2933-41.
9. Menard R, Sansonetti P, Parsot C. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J* 1994;13(22):5293-302.
10. Martinez-Becerra FJ, Chen X, Dickenson NE, Choudhari SP, Harrison K, Clements JD, et al. Characterization of a novel fusion protein from IpaB and IpaD of *Shigella* spp. and its potential as a Pan-*Shigella* vaccine. *Infect Immun* 2013;81(12):4470-7.
11. Turbyfill KR, Mertz JA, Mallett CP, Oaks EV. Identification of epitope and surface-exposed domains of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigen D (IpaD). *Infect Immun* 1998;66(5):1999-2006.
12. Johnson S, Roversia P, Espina M, Olive A, Deanea J, Birket S, et al. Self-Chaperoning of the Type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J Biol Chem* 2007;282(6):4035-44.
13. Hesaraki M, Saadati M, Honari H, Olad G, Heiat M, Malaei F, Ranjbar R. Molecular cloning and biologically active production of IpaD N-terminal region. *Biologicals* 2013;41(4):269-74.
14. Schmidt TR, Scott EJ, Dyer DW. Whole-genome phylogenies of the family Bacillaceae and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. *BMC Genomics* 2011 Aug 24;12:430.
15. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. *Gene* 1989;81(1):45-54.
16. Abboud N, Casadevall A. Immunogenicity of *Bacillus anthracis* protective antigen domains and efficacy of elicited antibody responses depend on host genetic background. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(7):1115-23.
17. Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, Leppla SH, Liddington RC. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* 1997 Feb 27;385(6619):833-8.
18. Hammamieh R, Ribot WJ, Abshire TG, Jett M, Ezzell J. Activity of the *Bacillus anthracis* 20 kDa protective antigen Component. *BMC Infect Dis* 2008;8:124.

19. Reasona DC, Ullal A, Liberatoa J, Suna J, Keitel W, Zhoua J, et al. Domain specificity of the human antibody response to Bacillus anthracis protective antigen. *Vaccine* 2008;26(32):4041-7.
20. Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaei S. Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein. *Arak Med Univ J* 2013;16(73):83-93. [Full Text in Persian]
21. Madanchi H, Honari H, Safaei S, Sayadmanesh A. Fusion of Cholera Toxin B Subunit (ctxB) with Shigella dysenteriae Type I Toxin B Subunit (stxB); Cloning and expression in E. coli. *J Fasa Univ Med Sci* 2012,2(3):135-41. [Full Text in Persian]
22. Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya SK. Shigellosis: Challenges & management issues. *Indian J Med Res* 2004;120(5):454-62.
23. Espina M, Olive A, Kenjale R, Moore DS, Ausar SF, Kaminski RW, et al. Ipad localizes to the tip of the type III secretion system needle of Shigella flexneri. *Infect Immun* 2006;74(8):4391-400.
24. Hambleton P, Turnbull PCB. Anthrax vaccine development: A continuing story. In: Bacterial vaccines. advances in biotechnological processes. Mizrahi A, Editor. New York: Alan R. Liss; 1990. p. 105-22. (Vol 13)
25. Brey RN. Molecular basis for improved anthrax vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57(9):1266-92.
26. Ivins B, Welkos S. Recent advances in the development of an improved human anthrax vaccine. *Eur J Epidem* 1988;4:12-19.

Cloning, Fusion, and Expression of Domain a-1 Protective Antigen (PA20) of *Bacillus anthracis* and N-Terminal *ipaD* Gene of *Shigella* in *E. coli*

Amir Hossein Ahmadi¹; Hossein Honari^{2*}; Mohammad Ebrahim Minaei³

¹Master of Sciences in Molecular & Cellular Biology, Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

²Associate Professor of Genetics, Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

³PhD Student of Nanobiotechnology, Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:**
Hossein Honari, Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

Email:
honari.hosein@gmail.com

Received: 3 Jun, 2014

Accepted: 19 Oct, 2014

Abstract

Background and Objectives: Genus *Shigella* is one of the main causes of diarrhea in human and *Bacillus anthracis* is the cause of anthrax (a zoonotic disease). IpaD protein is one of the most important virulence factors of *Shigella*. The cloning of N-terminal *ipaD* gene along with *pa20* gene that have a role in immunization, can be considered as a recombinant vaccine candidate. In this study, we investigated the expression of the recombinant protein domain a-1 protective antigen (PA20) of *Bacillus anthracis* and N-terminal *ipaD* gene of *Shigella* in *E. coli*.

Methods: In this experimental study, primers were designed for *pa20* gene and PCR was performed to amplify this fragment. Then, the amplified fragment was cloned into pGEM-T Easy Vector Systems. The *pa20* gene was cut using restriction enzymes EcoRI and XhoI and finally, *pa20* gene was fused to *ipaD* gene. pET28a (+) Vector containing the gene cassette *ipaD-pa20* was prepared and transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3), and the expression of gene cassette was studied.

Results: In this study, the *ipaD-pa20* fusion genes in the expression vector pET28a(+), were confirmed by PCR and enzyme digestion. Also, the produced recombinant protein were confirmed by SDS-PAGE and Western blotting.

Conclusion: Considering the detection of PA antigen by PA20 antibody and its apoptosis induction and immunization property of the produced IpaD antigen, it can be proposed as a recombinant vaccine candidate against types of *Shigella* and *Bacillus anthracis*.

Keywords: *Bacillus Anthracis*; IpaD Protein; *Shigella flexneri*; Antigens, Bacterial; Fusion antigens (PA20) and IpaD.