

Expression of *blf1* Gene of *Burkholderia pseudomallei* in *Escherichia coli* and Assessment of Antibody Titer in Mouse

Mehdi Masoudi Kerahroudi¹, Hossien Honari^{1*}, Mohammad Ebrahim Minaei¹, Masoud Abdollahi¹

¹Department of Biology,
Faculty of Basic Sciences,
Imam Hossein
Comprehensive University,
Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Hossien Honari, Department
of Biology, Faculty of Basic
Sciences, Imam Hossein
Comprehensive University,
Tehran, Iran.

Email:
honari.hosein@gmail.com

Received: 25 Jun, 2016

Accepted: 28 Sep, 2016

Abstract

Background and Objectives: *Burkholderia pseudomallei* is the cause of the melioidosis disease in human, and is transmitted to patients through oral route, inhalation, or skin scratch. This agent is classified as a category B in the classification of biological agents. BLF1 specifically deaminates Gln339 from eIF4A. In this study, the expression of *blf1* gene of *B. pseudomallei* in *E. coli* and antibody production in mouse, were assessed.

Methods: In this experimental study, *blf1* gene of *B. pseudomallei*, was expressed in *E. coli*. The synthetic gene in pUC57 plasmid was purchased from Nedaye Fan COR. pUC57 plasmid containing *blf1* gene with BamHI and SallI restriction enzyme sites, was subcloned in pET28a(+) expression vector and transformed into *E. coli* BL21(DE3). *blf1* gene expression was induced by IPTG.

Results: In this study, *blf1* gene in cloned pET28a(+) expression vector, was approved by PCR and enzymatic analysis. Also, the produced recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. Then, antibody produced from the mice serum, was isolated and confirmed by ELISA test.

Conclusion: Given that BLF1 protein has the ability to stop protein synthesis and the produced antibody was confirmed by ELISA, the BLF1 recombinant protein can be used to treat cancer and as a vaccine candidate against *B. pseudomallei*.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*; BLF1 toxin, eIF4A; Melioidosis; Subcloning.

بیان ژن *Burkholderia pseudomallei blf1* در باکتری اشرشیاکلی و بررسی تیتراآنتی بادی در موش

مهدی مسعودی کرهرودی^۱، حسین هنری^{۱*}، محمدابراهیم مینایی^۱، مسعود عبدالهی^۱

چکیده

زمینه و هدف: باکتری *B. pseudomallei* عامل بیماری میلوئیدوزیس در انسان است و از راه خوراکی، استنشاقی و یا از طریق خراش پوستی به بدن بیماران منتقل می‌شود. این عامل در طبقه‌بندی عوامل بیولوژیک در گروه B قرار گرفته است. BLF1 به‌طور اختصاصی دآمیناسیون Gln339 از eIF4A را انجام می‌دهد. در این مطالعه، بیان ژن *blf1* باکتری *B. pseudomallei* در *E. coli* و تولید آنتی‌بادی در موش بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، بیان ژن *blf1* باکتری *B. pseudomallei* در *E. coli* صورت گرفت. ژن صناعی در پلاسمید pUC57 از شرکت ندای فن خریداری شد. پلاسمید pUC57 حاوی ژن *blf1* با جایگاه‌های آنزیمی *BamHI* و *Sall* در وکتور بیانی pET28a(+) زیرهمسانه‌سازی شد و به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3)، تراریخت (ترانسفورم) گردید. بیان ژن *blf1* تحت القای IPTG انجام گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه، ژن *blf1* کلون‌شده در وکتور بیانی pET28a(+) به‌وسیله PCR و آنالیز آنزیمی تأیید شد. همچنین پروتئین نوترکیب تولیدشده به‌وسیله SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن تأیید گردید. سپس آنتی‌بادی تولیدشده از سرم موش، جداسازی و به‌وسیله تست ELISA مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه پروتئین BLF1 توانایی توقف پروتئین‌سازی را دارد و آنتی‌بادی تولیدشده به‌وسیله تست ELISA مورد تأیید قرار گرفته است، از پروتئین نوترکیب BLF1 می‌توان برای درمان سرطان استفاده و به‌عنوان کاندیدای واکسن، علیه باکتری *B. pseudomallei* مطرح نمود.

کلید واژه‌ها: بورخولدریاسودومالئی؛ سم بی ال اف ۱، ای ال اف ۴؛ میلوئیدوزیس؛ زیرهمسانه‌سازی.

گروه 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: ۹۵/۴/۴

تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۶

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Masoudi Kerahroudi M, Honari H, Minaei ME, Abdollahi M. Expression of *blf1* gene of *Burkholderia pseudomallei* in *Escherichia coli* and assessment of antibody titer in mouse. Qom Univ Med Sci J 2018;11(10):30-39. [Full Text in Persian]

مقدمه

باکتری *Burkholderia pseudomallei* یک باسیل گرم منفی کوچک، متحرک و هوازی است و عامل بیماری میلوئیدوزیس در انسان می‌باشد. میلوئیدوزیس ممکن است در شکل عفونت حاد، تحت حاد و یا مزمن تظاهر کند. دوره نهفتگی بیمار می‌تواند در حدود ۲-۳ روز باشد، اما دوره نهفتگی تا چندین ماه و یا چندین سال نیز اتفاق می‌افتد. به نظر می‌رسد بعضی از عوامل فصلی باعث آشکار شدن عفونت‌های نهفته می‌شود (۱). باکتری *Burkholderia pseudomallei* یک ساپروفیت بیماری‌زای طبیعی است که از راه خوراکی، استنشاقی و یا از طریق خراش پوستی به بدن بیماران منتقل می‌گردد. در مناطق بومی شمال شرق تایلند، سرولوژی مثبت برای *B. pseudomallei* در ۸۰٪ کودکان چهارساله، گزارش شده است (۲). تشخیص میلوئیدوزیس بسیار دشوار است؛ زیرا شبیه بسیاری از علائم رایج بیماری‌هایی چون سل، تب حصبه یا مالاریا می‌باشد (۳). پاتوژن می‌تواند به شکل حاد، در چند هفته اول ظاهر شود که ۵۰-۲۰٪ از قربانیان خود را حتی با درمان‌های پزشکی می‌کشد، همچنین قبل از فعال‌سازی، به‌وسیله مکانیسم‌های ضعیفی قابل‌شناسایی است. بین سال‌های ۱۹۶۵ و ۱۹۷۲ برآورد گردید که سرولوژی حدود ۲۲۵۰۰۰ سرباز ایالات متحده (در جنگ ویتنام) نسبت به *B. pseudomallei* مثبت بوده است (۱). همچنین تخمین زده شده است میلوئیدوزیس در شمال شرق تایلند باعث مرگ بیش از ۱۰۰۰ نفر در سال می‌شود (۴). توالی‌یابی ژنوم *B. pseudomallei* در سال ۲۰۰۴ کامل شد که دو کروموزم حلقوی با منشأ تکاملی مجزا را نشان می‌دهد. کروموزم بزرگ، 4.7Mb بوده که کدکننده بسیاری از وظایف اصلی مرتبط با متابولیسم مرکزی و رشد سلول است. کروموزم کوچک، 3.17Mb بوده که کدکننده عملکردهای مرتبط با بیماری‌زایی، سازگاری و حفظ بقا در محیط‌های مختلف می‌باشد (۵). توالی آمینواسیدها در *blf1* از لحاظ همولوژی، اشتراکی با دیگر فاکتورهای شناخته‌شده ندارد، ولی ساختار کریستالی *blf1* نشان می‌دهد با دومین C ترمینال CNF1 مرتبط بوده و به‌وسیله برخی از گونه‌های پاتوژن باکتری *E. coli* تولید می‌شود. با این حال، *blf1* روی دآمیناسیون GTPase پروتئین رو و مونتاژ اسکلت سلولی که از CNF1 گزارش شده، تأثیری ندارد (۶).

ژن *blf1* به‌طور اختصاصی دآمیناسیون Gln339 از eIF4A را انجام می‌دهد. این تغییر، فعالیت RNA هلیکاز مورد نیاز برای بازکردن ساختار دوم mRNA در طول شروع ترجمه را غیرفعال می‌کند، اما فعالیت ATPase را از eIF4A تحت تأثیر قرار نمی‌دهد (۷). به‌نوبه خود این امر منجر به مهار گسترده‌ای از سنتز پروتئین‌ها در سلول‌های انسان می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن *B. pseudomallei blf1* در *E. coli* و بررسی تیتراآنتی‌بادی آن در موش سوری بود.

روش بررسی

توالی کامل ژن *blf1* باکتری *B. pseudomallei* از بانک ژن NCBI (با شماره NC_006350.1) استخراج شد. بادر نظر گرفتن جایگاه‌های برش آنزیمی *BamHI* و *Sall* در وکتور pUC57 جهت سنتز، به شرکت ندای فن سفارش داده شد. لازم به‌ذکر است پیش از ثبت سفارش، توالی ژن صناعتی مدنظر به‌منظور بهینه‌سازی، استفاده صحیح از کدون‌ها برای میزبان موردنظر، تصحیح مقدار محتوای GC، ایجاد ساختمان ثانویه صحیح برای mRNA، تصحیح نواحی پیرایشی و تعدیل جایگاه‌های برش جهت جلوگیری از تداخل در کلونینگ، به سایت www.genscript.com ارجاع داده شد. ژن فوق، سنتز و بر روی وکتور pUC57 کلون شد و پلاسمید نوترکیب تخلیص شده از یکی از کلون‌ها به‌صورت خشک ارسال گردید.

سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5 α براساس پروتکل استاندارد روش کلرید کلسیم تهیه شدند. پلاسمید سفارش داده‌شده با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد تراریخت شد. سلول‌ها بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌صورت چمنی کشت داده شدند (۸).

برای انجام زیرهمسازسازی، ابتدا واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *BamHI* و *Sall* بر روی پلاسمید pUC57 انجام شد و وکتور بیانی (+) pET-28a نیز به‌منظور زیرهمسازسازی با آنزیم‌های *BamHI* و *Sall* صورت گرفت. پس از هضم آنزیمی، قطعه ژنی *blf1* و (+) pET-28a برش‌خورده از روی ژل آگارز به‌وسیله کیت استخراج DNA تخلیص شد (۸).

بافر انتقال (گلاسیسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱٪، متانول ۲۰٪ و pH=۸/۳) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. به منظور پرکردن جایگاه‌های خالی (بلاکینگ)، کاغذ به مدت یک‌شب در محلول ۳٪ شیر خشک در PBST (Phosphat-Buffered Salin- Tween) در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس ۳ مرتبه با PBST شست‌وشو داده شد. کاغذ با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موشی با رقت ۱:۲۰۰۰ گرماگذاری شد. فرآیند شست‌وشو با PBST، ۳ بار انجام گرفت. کونژوگه موشی با رقت ۱:۱۰۰۰۰ به‌عنوان آنتی‌بادی تشخیص‌دهنده به کار رفت و همانند مرحله قبل، گرماگذاری انجام گرفت. فرآیند شست‌وشو نیز مانند مراحل قبلی بود. در نهایت، کاغذ نیتروسولوز در محلول سوبسترای رنگ‌زای DAB (Diaminobenzidine) (۶۰ میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸) تا ظهور باند پروتئینی قرار گرفت. برای توقف واکنش، کاغذ در آب مقطر قرار داده شد (۹). به منظور بررسی پاسخ ایمنی، با توجه به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات، از ۶ عدد موش سوری به‌عنوان تست و ۵ عدد به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر موش، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص‌شده با PBS استریل به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. جهت آماده‌سازی نمونه‌ها برای تزریق، هم‌حجم آن‌ها ادجوانت روغن در آب اضافه گردید (حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر)، سپس محتویات همگن شد. در پایان، به هر موش تست ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تهیه‌شده (حاوی ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن موردنظر) به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد و بررسی تیرآنتی‌بادی آن‌ها به‌وسیله آزمایش ELISA اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

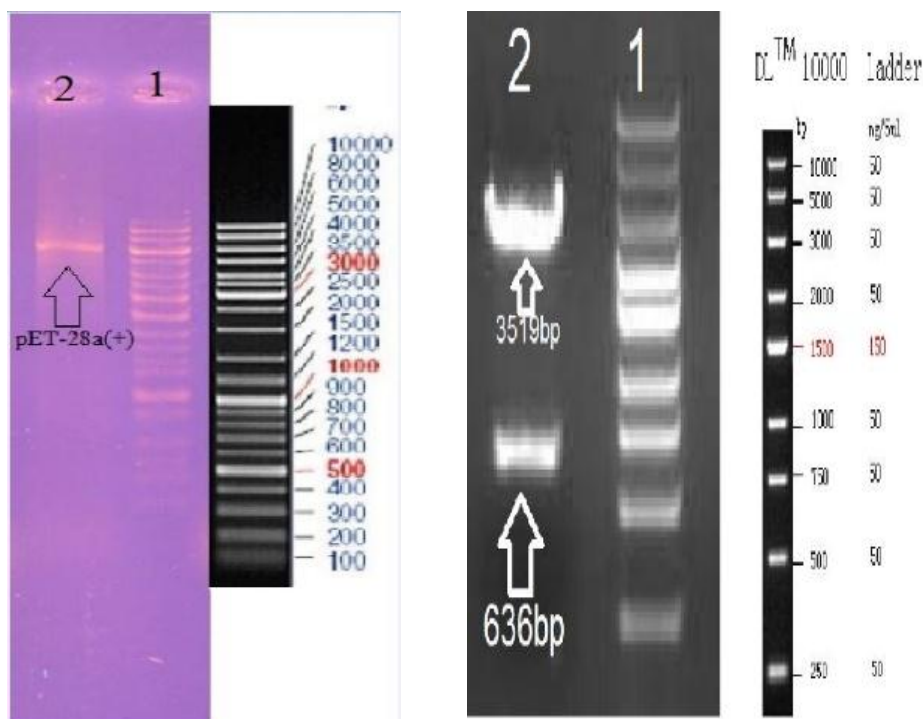
برای بیان قطعه ژنی موجود در pUC57، قطعه ژنی *blf1* به پلاسمید بیانی pET-28a(+) منتقل گردید. به‌منظور زیرهمسانه‌سازی، قطعه مورد نظر در وکتور pUC57 با هضم آنزیمی دوگانه به‌وسیله آنزیم‌های *Sall* و *BamHI* با اثر محدود استفاده شد که ژن مورد نظر با طول توالی ۶۳۶bp از وکتور خارج گردید (شکل شماره ۱- الف). برای قرار دادن قطعه ژنی *blf1* در وکتور pET-28a(+) ابتدا این پلاسمید با دو آنزیم *Sall* و

ژن *blf1* به‌وسیله آنزیم‌های *BamHI* و *Sall* با اثر محدود، برش خورد و به وکتور بیانی pET-28a(+) که با همین آنزیم‌ها برش خورده و استخراج شده بود، الحاق گردید. واکنش الحاق به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد به‌وسیله آنزیم T4 DNA Ligase شرکت فرمتاز صورت گرفت. محصول الحاق، با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد (تهیه‌شده به روش شیمیایی) *E. coli BL21* سویه DE3 تراریخت گردید. کلنی‌های نوترکیب با غربالگری آنتی‌بیوتیکی کاناماسین جدا شدند و حضور پلاسمید حاوی *blf1* با PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت (۸).

برای بیان ژن *blf1* از کشت شبانه، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از کلون‌های جداسازی‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کاناماسین تلقیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتور (IPTG) فرمتاز با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد (۹). سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری‌شده در مرحله فوق به روش دنا توره تیمار شدند. در این روش، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده B مخلوط و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند و محلول رویی با نسبت یک (بافر نمونه) به پنج (نمونه) با سمپل بافر دارای غلظت ۵x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانده شد. در نهایت، نمونه‌های تیمار شده به‌وسیله ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) از لحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب بررسی شدند (۹). برای تهیه محلول ژل، درصد آکریل‌آمید و بیس اکریل‌آمید متناسب با اندازه پروتئین انتخاب شد. با توجه به اینکه پروتئین بیان‌شده در حدود ۲۴ کیلو دالتون، وزن داشت، از ژل ۱۲٪ استفاده گردید. نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (سینازن) تحت شرایط دنا توره، الکتروفورز شدند. سپس تمام پروتئین‌های نوترکیب به کمک توالی His-tag در انتهای N-ترمینال خود به‌وسیله ستون کروماتوگرافی با رزین Ni-NTA، تخلیص و به‌وسیله

SDS-PAGE بررسی شدند (۹). برای تأیید پروتئین نوترکیب، از تکنیک Western Blot استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن (Mini Protean) Bio-rad و

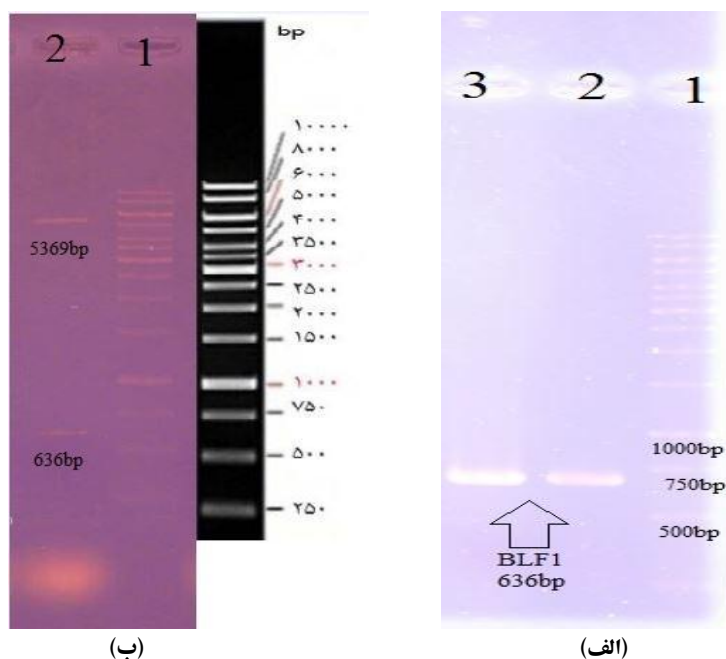
BamHI با اثر محدود، خطی شد. بعد از برش آنزیمی، پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص گردید. پلاسمید تک باند شده در جریان الکتروفورز در راستای باند حدود ۵۳۶۹ جفت بازی ایستاد (شکل شماره ۱-ب).



شکل شماره ۱: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی و کتور pUC57 و هضم دوگانه پلاسمید pET-28a(+). الف) الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی و کتور pUC57 بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک ۱: نشانگر اسید نوکلئیک، چاهک ۲: پلاسمید برش خورده. ب) هضم دوگانه پلاسمید pET-28a(+). چاهک ۱: نشانگر اسید نوکلئیک، چاهک ۲: محصول برش آنزیمی pET-28a(+).

پس از تکثیر ژن *blf1* به روش PCR، محصول روی ژل ۱٪ آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت که قطعه مورد نظر (۶۳۶ جفت باز) از لحاظ اندازه با ژن هدف همخوانی داشت (شکل ۲-الف). همچنین پلاسمیدها با دو آنزیم *BamHI* و *Sall* با اثر محدود هضم شدند، سپس به کمک مارکر، اندازه قطعه خارج شده از وکتور تأیید گردید (شکل شماره ۲-ب).

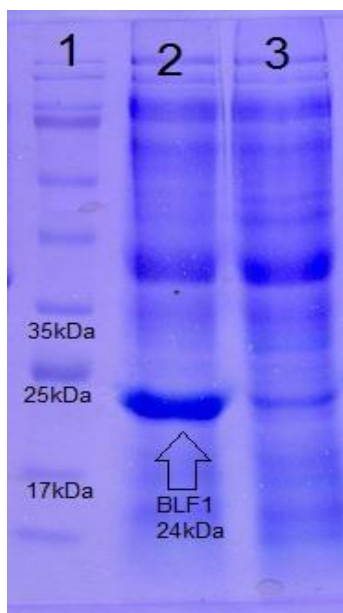
برای قرار دادن قطعه ژنی *blf1* در پلاسمید pET-28a(+)، واکنش اتصال با کمک آنزیم T4 لیگاز انجام گرفت. انتظار بر این بود که قطعه ژنی در بین جایگاه‌های *BamHI* و *Sall* وکتور قرار گیرد. بعد از الحاق، ژن وکتور به سلول‌های *E. coli* BL21 سویه DE3 تراریخت شد. برای تأیید زیرهمسازسازی، کلنی‌های سفیدرنگ کشت داده شدند و از آنها با روش لیز قلیایی استخراج پلاسمید انجام شد. برای پلاسمیدها PCR و برش هضم آنزیمی گذاشته شد.



شکل شماره ۲: تایید زیرهمسانه سازی ژن هدف در pET-28a(+).
 الف) چاهک ۱: نشانگر اسید نوکلئیک و چاهک ۲ و ۳: محصول PCR روی پلاسمید pET-28a(+).
 ب) چاهک ۱: نشانگر اسید نوکلئیک و چاهک ۲: محصول برش آنزیمی روی pET-28a(+).

با توجه به وزن پروتئین نو ترکیب، از ژل ۱۲٪ استفاده شد (شکل شماره ۳). با توجه به شکل، باند پروتئینی مورد نظر در محدوده ۲۴kDa مشاهده گردید.

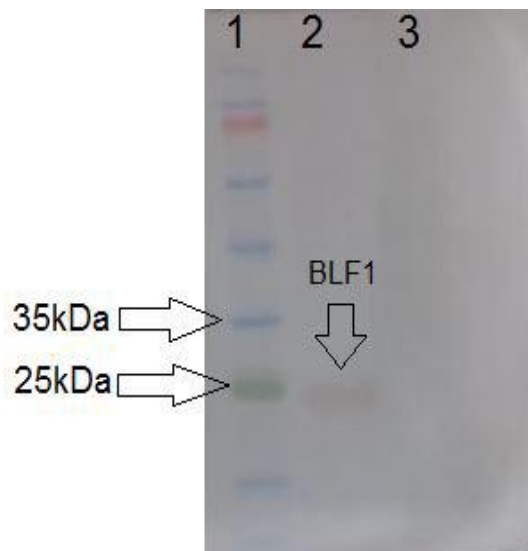
برای بررسی بیان ژن *blf1* در وکتور pET28a(+) پس از کشت سلول‌ها و القا با IPTG، بیان ژن صورت گرفت و پس از تیمار خام، بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت.



شکل شماره ۳: الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE، به منظور بررسی بیان پروتئین مورد نظر.
 ردیف ۱: مارکر پروتئینی ۳۱۰۰۰۳؛ ردیف ۲: محتوی پروتئینی باکتری‌هایی که پس از رسیدن جذب نوری آنها به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا شده‌اند (بافر لیزکننده B)؛ ردیف ۳: کنترل منفی که در آن باکتری‌ها پس از رسیدن جذب نوری به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا نشده‌اند (بافر لیزکننده B).

در ستون تست که مربوط به نمونه القاشده با IPTG است، یک باند در نزدیکی ۲۴kDa مشاهده می شود. در ستون شاهد که تحت القای IPTG نبوده، باندهای دیده نمی شود (شکل شماره ۴).

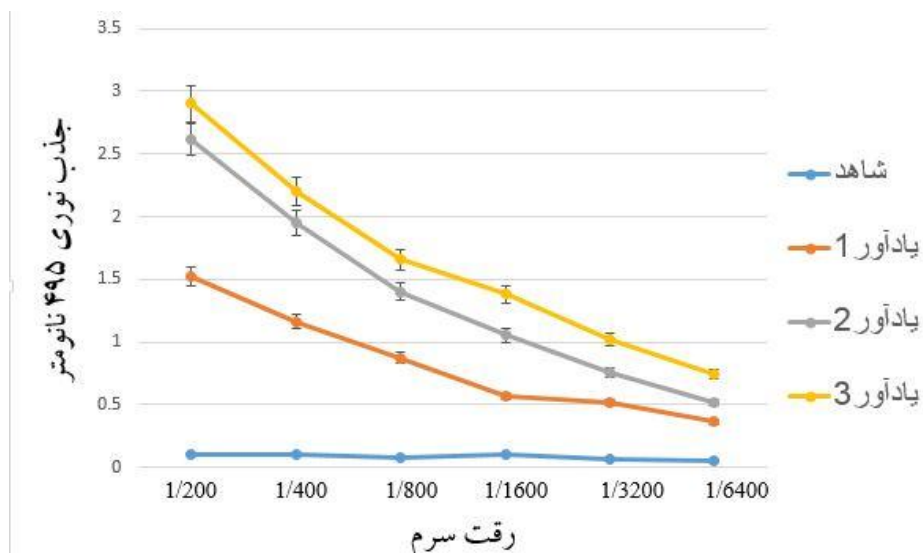
به منظور تأیید محصول پروتئینی، تکنیک Western Blotting به کار برده شد. در این روش از آنتی بادی علیه His-tag استفاده گردید.



شکل شماره ۴: تأیید پروتئین نو ترکیب بیان شده با استفاده از روش وسترن بلات همراه با آنتی بادی پلی کلونال. ردیف ۱: مارکر پروتئینی ۳۱۰۰۳؛ ردیف ۲: نمونه القاشده با IPTG و ردیف ۳: کنترل بدون القای IPTG.

میانگین تیتراآنتی بادی در هر مرحله در نمودار نشان داده شده است. با توجه به تیتراآنتی بادی (IgG)، سرم مناسب تولید شده و آنتی ژن باعث تحریک ایمنی هومورال شده است. در خونگیری آخر نیز بیشترین آنتی بادی علیه آنتی ژن می باشد (نمودار).

به منظور ارزیابی آنتی بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق، از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر بار تزریق (به استثنای تزریق اول)، از موش های تست و شاهد خونگیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آنها، آزمایش ELISA انجام شد.



نمودار: بررسی تیتراآنتی بادی با استفاده از تکنیک ELISA.

بحث

باکتری *B. pseudomallei*، یکی از باکتری‌های خطرناک است که در حال حاضر هیچ واکسنی برای آن وجود ندارد. این باکتری در سال ۲۰۰۲ جزء عوامل بیوتورریسم رده B قرار گرفت (۱۰). استفاده از پاتوژن توسط تروریست‌ها نیز باعث نگرانی است؛ چون به آسانی حتی در هوای سرد و خارج از مناطق گرمسیری نیز رشد می‌کند. علاوه بر این، باکتری در آب مقطر حداقل می‌تواند ۱۰ سال زنده بماند (۱۰). به تازگی گزارش شده *B. pseudomallei* قادر است گیاه گوجه‌فرنگی را آلوده کند که نگرانی‌های امنیتی برای استفاده آسان بیوتورریسم در گیاه به‌عنوان میزبان جدید برای پاتوژن را بالا می‌برد (۱۱). نگرانی‌ها در این باره نیز وجود دارد که باکتری در همه افرادی که آلوده شده‌اند خود را بروز نمی‌دهد و قادر است در مکان‌های مختلف بدن زندگی کند و در طول زندگی فرد فعال شود (۱۲).

علاوه بر این، باکتری *B. pseudomallei* می‌تواند در خاک و آب و در شرایط نامساعد محیطی مانند سطح مواد غذایی کم، pH پایین و دمای بالا زنده بماند (۱۳). در سال ۲۰۱۱ عامل میلونیدوزیس شناخته شد و گروهی از محققان بین‌المللی توسط گروه Wilson و گروه Rice در دانشگاه شفیلد، اولین فاکتور سیتوتوکسین کشنده را در *Burkholderia pseudomallei* که باعث غیرفعال کردن غیرقابل برگشت سنتز پروتئین در میزبان می‌شد شناسایی و پروتئین BPSL1549 را تعیین ساختار و کریستالوگرافی کردند و اولین سم *Burkholderia pseudomallei* را BLF1 نامیدند (۶).

B. mallei که باکتری نزدیکی به *B. pseudomallei* است، عامل بیماری مضمشه در اسب‌ها، الاغ‌ها و قاطرها می‌باشد (۱۴). این بیماری در ایران نیز دیده شده است. پروتئین BLF1 مشابهت زیادی به پروتئین موجود در *B. mallei* دارد که از این تشابه می‌توان برای تشخیص *B. mallei* استفاده کرد.

در این تحقیق از سیستم بیان پروتئین در *E. coli* استفاده شد. مهم‌ترین ویژگی بیان پروتئین در *E. coli* میزان بالای تولید پروتئین، بی‌خطر بودن و مقرون به‌صرفه بودن آن است. علاوه بر این، این سیستم همانند سایر سیستم‌های بیان پروکاریوتی، فاقد فرآیندهای پس از ترجمه مانند گلیکوزیلیزاسیون، استیلاسیون و

کربوکسیلاسیون است؛ بنابراین، برای بیان پروتئین‌هایی که جهت فعالیت خود نیازمند تغییرات پس از ترجمه هستند نمی‌توان از این سیستم استفاده کرد (۱۵). با توجه به اینکه پروتئین BLF1 نیاز به تغییرات پس از ترجمه ندارد، جهت تولید پروتئین BLF1 استفاده از سیستم بیانی *E. coli* مناسب است.

در شرایط آزمایشگاهی یک مولکول BLF1 قادر است تقریباً ۷۰۰ مولکول eIF4A را در دقیقه غیرفعال کند، تعداد تبدیل در این محدوده به عمل N-گلیکوزیدی در A4324 از 28S RNA از سم قوی ریسین شبیه بوده که می‌تواند ترجمه را متوقف کند (۱۶).

شناخت مکانیسم مولکولی توکسین BLF1 بر روی سلول‌های انسانی، راه را برای استفاده از آن در درمان سلول‌ها مهیا می‌کند و می‌تواند به‌عنوان بخشی از درمان ترکیبی با آنتی‌بیوتیک مفید باشد. علاوه بر این، غیرفعال کردن توکسین BLF1 نیز ممکن است به ما این اجازه را بدهد که بتوانیم برای اولین بار یک واکسن برای آن تولید کنیم. در واقع، یک جهش در C94S در *blf1* می‌تواند فعالیت دآمیناسیون گلوتامین را مهار کند و یک نقطه شروع مناسب برای تولید واکسن باشد (۶). مهندسی بیشتر بر روی توکسین BLF1 ممکن است به‌عنوان یک کاندید مناسب برای شناسایی واکسن مورد نیاز باشد. همچنین پروتئین BLF1 کاربردهای جایگزینی را در پزشکی می‌تواند ارائه دهد (۱۷). از مهارکننده‌های سنتز پروتئین می‌توان به مهارکننده‌های eIF4A به‌عنوان عوامل ضدسرطان اشاره کرد (۱۷). پروتئین BLF1 به‌عنوان یک عامل ضدسرطان قوی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد؛ به دلیل اینکه باعث تغییر eIF4A می‌شود که منجر به تعویض Gln339 به Glu339 شده و خود یک مهارکننده قوی ترجمه پروتئین است. بنابراین، پروتئین BLF1 و *eIF4A* ابزار جدید مولکولی قویی به‌منظور شیمی‌درمانی در تومورها هستند. واضح است تحویل پروتئین BLF1 یا eIF4A به تومور، شرط لازم برای استفاده درمانی از آن است. با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب می‌توان بخش‌هایی که در بروز بیماری‌زایی به‌واسطه آن‌ها نقش اساسی دارند را کلون و بیان کرد تا به‌عنوان کاندید واکسن، میزان ایمن‌سازی آن‌ها علیه باکتری مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، با اثبات نقش آنتی‌ژنی BLF1 و تولید آنتی‌بادی در موش سوری، مشخص گردید پروتئین BLF1 می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن علیه باکتری *B. pseudomallei* باشد.

ژن *blf1* در بیماری‌زایی باکتری بورخولدریا سودومالئی نقش کلیدی دارد؛ بنابراین، با کلون، بیان ژن *blf1* و بررسی تیرآنتی‌بادی *blf1* می‌تواند واکسنی علیه این باکتری تولید کند. همچنین با توجه به مکانیسم عمل پروتئین BLF1 که قادر به توقف ترجمه پروتئین در سلول است می‌تواند کاندید مناسبی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اساتید، پژوهشگران، 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. Howe C, Sampath A, Spotnitz M. The pseudomallei group: A review. *J Infect Dis* 1971;124(6):598-606.
2. Kanaphun P, Thirawattanasuk N, Suputtamongkol Y, Naigowit P, Dance DA, Smith MD, et al. Serology and carriage of *Pseudomonas pseudomallei*: A prospective study in 1000 hospitalized children in northeast Thailand. *J Infect Dis* 1993;167(1):230-3.
3. Chaowagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, et al. Melioidosis: A major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J Infect Dis* 1989;159(5):890-9.
4. Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, et al. Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82(6):1113-7.
5. Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeño-Tárraga AM, Atkins T, Crossman LC, et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(39):14240-5.
6. Cruz-Migoni A, Hautbergue GM, Artymiuk PJ, Baker PJ, Bokori-Brown M, Chang C-T, et al. A *Burkholderia pseudomallei* toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A. *Science* 2011;334(6057):821-4.
7. Pause A, Methot N, Svitkin Y, Merrick W, Sonenberg N. Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J* 1994;13(5):1205.
8. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.
9. Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: cloning, expression, purification, and proteolytic activity. *Protein Expr Purif* 1999;15(2):221-7.
10. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 2002;8(2):225.
11. Lee YH, Chen Y, Ouyang X, Gan Y-H. Identification of tomato plant as a novel host model for *Burkholderia pseudomallei*. *BMC Microbiol* 2010;10(1):1.

12. Koponen MA, Zlock D, Palmer DL, Merlin TL. Melioidosis: Forgotten, but not gone! Arch Intern Med 1991;151(3):605-8.
13. Lee SH, Chong CE, Lim BS, Chai SJ, Sam KK, Mohamed R, et al. *Burkholderia pseudomallei* animal and human isolates from Malaysia exhibit different phenotypic characteristics. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;58(3):263-70.
14. Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM. Biological warfare: A historical perspective. JAMA 1997;278(5):412-7.
15. Brown TA, Brown T. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. New York: John Wiley & Sons; 2016.
16. Endo Y, Tsurugi K. The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. J Biol Chem 1988;263(18):8735-9.
17. Malina A, Cencic R, Pelletier J. Targeting translation dependence in cancer. Oncotarget 2011;2(1-2):76-88.