NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/43 , 2021

Scan online to view this article

Cloning, expression and purification of vibrioblock proteins as candidates for cholera

Mohammadali Yaghobi Moghaddam, Alireza Saeedinia, Afshin Samimi Nemati, Mohammadjavad Dehghan*

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Iran

Abstract

Aim and Background: With the advent of cloning technology and recombinant DNA, it became possible to produce drugs and vaccines that were not possible in the past. Recombinant protein occupies a large part of the biopharmaceutical industry, one of the most important of which is vaccination.

Material and Methods: In this study, with the aim of obtaining a protein candidate for cholera vaccine, first cloning of a plasmid designed for the bacterial host E.*coli* DE3 *Rossetagami* was transformed, then expression was induced using IPTG and after protein expression was examined by SDS-PAGE gel electrophoresis, and then the protein was purified by nickel-sepharose (NI-NTA) chromatography column.

Result: The results show that the purified protein has a molecular weight of 31 kDa and the amount of purified protein is 1 mg.

Conclusion: Based on previous studies as well as the results of this study, the resulting protein can be considered as a suitable candidate for the cholera vaccine.

Keywords: cholera, candidate vaccine, Recombinant protein, Cloning**,** recombinant DNA, Iau Science.

Corresponding author:
Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Iran

Email: mohammad_dehghan@mut.ac.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۳ - تابستان ۱۴۰۰

NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

کلون، بیان و خالص‌سازی پروتئین ویبریوبلاک به‌عنوان کاندید برعلیه وبا

محمدعلی یعقوبی مقدم، علیرضا سعیدی نیا، افشین صمیمی نعمتی،
محمدجواد دهقان عصمت آبادی*

مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه مالک اشتر، ایران

چکیده

سابقه و هدف: با ظهور تکنولوژی کلونینگ و DNA نوترکیب، امکان تولید داروها و واکسن‌هایی محقق شد که در گذشته ممکن نبود. پروتئین نوترکیب بخش عظیمی از صنعت زیست دارو را به خود اختصاص داده که یکی از مهم‌ترین بخش‌های آن واکسن‌سازی است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش با هدف دست‌یابی به کاندید پروتئینی واکسن وبا، ابتدا کلونینگ پلاسمید طراحی شده به میزبان باکتریایی *E. coli* DE3 *Rossetagami* ترانسفورم شده، پس از آن با استفاده از IPTG القاء بیان صورت گرفته و پس از بررسی بیان پروتئین توسط ژل الکتروفورز SDS-PAGE، پروتئین موردنظر توسط ستون کروماتوگرافی نیکل-سفاروز خالص‌سازی شده است.

یافته‌ها: نتایج حاصل از پژوهش نشان می‌دهد پروتئین خالص‌سازی شده دارای وزن مولکولی ۳۱ کیلودالتون است هم‌چنین میزان پروتئین خالص‌سازی شده ۱ میلی‌گرم است.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه‌به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با دیگر مطالعه‌های مشابه، پروتئین حاصل از خلوصی مناسب برخوردار بوده و می‌توان برای مطالعه‌های بعدی مورد استفاده قرارگیرد.

واژگان کلیدی: وبا، کاندید واکسن، پروتئین نوترکیب، کلونینگ، DNA نوترکیب، Iau Science .

مقدمه

واژه کلون کردن یک DNA اولین بار درسال ۱۹۷۰ و پس از جداسازی اولین آنزیم محدود کننده توسط Howard Temin وDavid Baltimore که به‌صورت مستقل کار می‌کردند مورد استفاده قرار گرفت، پس از آن در سال ۱۹۷۲ اولین DNA نوترکیب با ترکیب DNA از ارگانیسم-های مختلف توسط Paul Berg و همکارانش ساخته شد (۱). فرآیند کلون کردن یک قطعه DNA، با قرار دادن قطعات DNA موردنظر در مولکول‌های DNA میزبان، در شرایط آزمایشگاهی صورت می‌گیرد، سپس مولکول-های DNA نوترکیب به سلول‌های میزبان وارد شده و توسط سیستم تکثیر ارگانیسم میزبان،تکثیر می‌گردند، در واقع مولکول DNA نوترکیب، ترکیبی از DNA خارجی و DNA ارگانیسم میزبان است (۲). ظهور DNA نوترکیب در واقع ابزار مقرون‌به صرفه‌ای را برای تولید پروتئین فراهم آورد به‌نحوی‌که امروزه بخش عظیمی از صنعت زیست دارو را پروتئین‌های نوترکیب تشکیل داده‌اند (۳).پروتیئن نوترکیب که محصول DNA نوترکیب است، نه تنها در تحقیقات آزمایشگاهی کاربرد فراوانی دارند بلکه به‌عنوان دارو اولین بار به‌طور موفق برای درمان بیماری انسولین در سال ۱۹۸۲ مورد استفاده قرار گرفت. امروزه بیش از ۱۷۰

نویسنده مسئول:
مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران
پست الکترونیکی: mohammad_dehghan@mut.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۳۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]

پروتئین نوترکیب برای درمان بیماری‌ها در سرتاسر جهان مورد استفاده هستند (۴،۵). از دیگر کاربردهای پروتئین نوترکیب، در صنعت واکسن‌سازی برای پیشگیری از بیماری‌ها فراگیر است (۹-۶). یکی از مهم‌ترین بخش‌های تاریخ علم، تأثیر واکسن بر سلامتی انسان و جلوگیری از گسترش بیماری است. از اختراع اولین واکسن بیش از ۳۰۰ سال می‌گذرد، اولین واکسنی که توسط ادوارد جنر برای پیشگیری از بیماری ابله گاوی مورد استفاده قرار گرفت. ساخت واکسن‌ها از ابتدای اختراع آن تا به امروز دستخوش تغییرهای بسیارگسترده‌ای قرار گرفته به‌نحوه‌که اولین واکسن‌ها در واقع همان عامل بیماری ضعیف شده یا کشته شده است، ولی واکسن‌های امروزی از عامل ضعیف شده تا پروتئین‌های نوترکیب را در بر می‌گیرد (۱۴-۱۰). پاسخ-های ایمنی نقش مهمی در مبارزه با تومورها، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی دارند. اپی‌توپ آنتی‌ژنیکیک واحد اساسی است که یا یک پاسخ ایمنی سلولیبا هومورال ایجاد می‌کند. یک واکسن چند اپی‌توپی متشکل از یک‌سری پپتید است که یک روش ایده-آل برای پیشگیری و درمان تومورها، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی است (۱۷-۱۵). ویبریوکلرا از خانواده ویبریوناسه، باکتری گرم منفی، متحرک و عامل بیماری وبا است. این بیماری که به مرگ آبی معروف است سبب، اسهال آبکی و شدید در انسان می‌شود (۱۸،۱۹). در طول سالیان مختلف واکسن‌های متفاوتی برای پیشگیری ازاین بیماری توسعه یافته‌اند که از جمله واکسن‌های موجود می‌توان‌به: Vaxchora، Dukoral، ShanChol، Euvichol-Plus/Euvichol اشاره کرد (۲۲-۲۰). نقطه ضعف واکسن‌های ذکر شده در بالا شامل: ۱-کوتاهی ماندگاری ایمنی ایجاد شده توسط واکسن، ۲-نیازمند تأمین زنجیره سرد و هزینه‌های بالا در تأمین دوز کافی و ... است. در مطالعه حاضر هدف کلون، بیان و خالص‌سازی پروتئین کایمریک سنتتیک ویبریوبلاک است، این پروتئین با هدف دست‌یابی پروتئینی پایدار و مناسب در جهت بررسی‌های بیش‌تر در تولید واکسن وبا تولید و مورد مطالعه قرار گرفته است. از دیگر اهداف این مطالعه تولید پروتئین با خلوص بالاتر به‌منظور بررسی‌های بیش‌تر در زمینه تولید واکسن به شیوه معکوس است.

مواد و روش‌ها

طراحی وکتور و کلون کردن در باکتری میزبان *E.coli DH5a*

سازه طراحی شده برای این مطالعه براساس یک تک ژن خاص نبوده و با مطالعه‌های بیوانفورماتیک تمام ORF های باکتری ویبریوکلرا مورد هدف قرار گرفته شده، در واقع شاخصه اصلی انتخاب پروتئین سطحی بودن و ترشحی بودن آن بوده است. در نهایت توالی آمینواسیدی این اپی-توپ‌ها به‌صورت توالی ژنتیکی ترجمه گردیده و اپی‌توپ-هایی کاندید به‌صورت سازه‌ای پلی‌توپی کایمریک سنتیتک طراحی شده است، این سازه توسط شرکت GENEray به-صورت شیمیایی سنتز و در بدنه pET23a کلون شده است. در شکل یک نمای شماتیک سازه طراحی شده قابل مشاهده است. پس از دریافت سازه لیوفیلیزه شده، سازه در بافر EDTA-tris (۰/۱ mM، ۸/۰ mM Tris-HCl, pH ۱۰) حل شده و تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شده است. پس از آن پلاسمید به‌منظور ازدیاد ژنوم به باکتری میزبان *E.coli DH5a* ترانسفورم گردید.

هضم آنزیمی به‌منظور تأیید سازه موردنظر

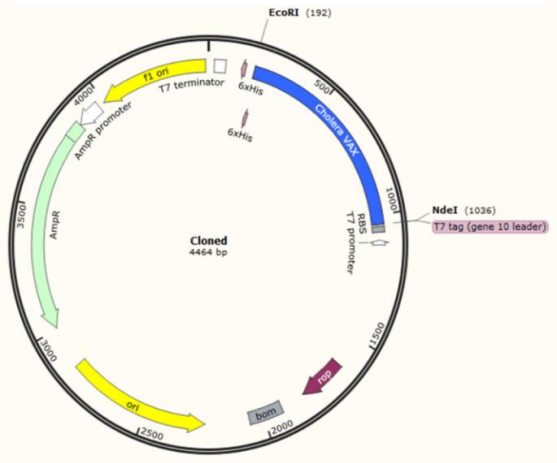
برای تأیید سازه طراحی شده، براساس جایگاه‌های تعبیه شده آنزیم‌های محدود کننده و قطعه کلون شده، هضم آنزیمی تحت شرایط زیر صورت گرفته است. براساس سازه طراحی شده برای فرآیند هضم آنزیمی از آنزیم‌های *NdeI* و *EcoRI* از شرکت پارس ژن استفاده گردیده که در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به‌مدت یک ساعت این فرآیند انجام شده است.

ترانسفورم پلاسمید به باکتری مستعد *E. coli DE3Rossetagami*

برای بیان پروتئین ویبریوبلاک پس از تأیید سازه در مرحله قبلی استخراج پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید PrimePrep از شرکت jenetbio طبق پروتوکل مربوطه صورت گرفته و سپس ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید به باکتری مستعد بیانی *E. coli DE3Rossetagami* با استفاده از روش شوک حرارتی ترانسفورم شده است. آماده‌سازی باکتری مستعد بیانی *E. coli DE3Rossetagami* طبق پروتوکل شیمیایی کلسیم‌کلراید صورت گرفته است (۲۳). برای تأیید موفقیت‌آمیز بودن ترانسفورم، با توجه‌به ژن مقاومت‌به آمپی‌سیلین موجود در پلاسمید، باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط LB آگار (Luria-Bertani) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین‌به‌عنوان یک مارکر انتخابی برای کلونی‌های حاوی پلاسمید کشت شدند. در نهایت

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]

کلونی‌ها رشد یافته بر بستر محیط کشت نوید از ترانسفورم موفق پلاسمید طراحی شده با میزبان باکتریایی را می‌دهد.



شکل ۱- نمایی شماتیک از وکتور طراحی شده و کلون شده در بدنه pET23a، همان‌طور که قابل مشاهده است دو جایگاه برش آنزیمی برای در دو سمت قطعه کلون شده در نظر گرفته شده که این دو جایگاه برای آنزیم‌های *NdeI* و *EcoRI* است.

بیان پروتئین ویبریوبلاک

به‌منظور بیان پروتئینویبریوبلاک،یک تک کلنی از محیط کشت آگار باکتری‌های‌ترانسفورم شده در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با شیک ۱۵۰ دور در دقیقه با استفاده از دستگاه آنکوباتور شیکردار کشت شبانه داده شده است. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های پیش کشت در ۱۰ میلی‌لیتر از یک کشت جدید LB مایع تلقیح و سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در دستگاه آنکوباتور شیکردار در (۱۵۰ دور در دقیقه) انکوبه شد، تا زمانی‌که محیط به OD ۰/۷ تا ۰/۸ برسد. سرانجام، پس از رسیدن به OD مذکور با افزودن ۱ میلی‌مولار IPTG (isopropylβ-D-1-thiogalactopyranosid) (سینا کلون) القاء صورت گرفته است. شرایط بیان پروتئین به‌صورت ذکر شده در ادامه است که منجر به تولید انکلوژن بادی شده است، شرایط بیان در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۴ ساعت‌صورت گرفته است. سرانجام به‌منظور استخراج آنکلوژن بادی از محیط کشت، از سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسویس به‌مدت ۱۵ دقیقه (میکروفوژ اپندورف R۵۴۱۷) استفاده شده است و سپس رسوب باقی‌مانده در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس تا زمان آنالیز نگه‌داری شده است. پس از القای بیان، نمونه‌ها به‌منظور بررسی بیان پروتئین با استفاده از الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل‌آمید (SDS-PAGE) ابتدا ژل SDS-PAGE ۱۲/۵٪ با توجه‌به روش Laemmli–SDS-PAGE تهیه گردیده و بیان پروتئین با روش رنگ‌آمیزی کماسی بلو مورد آنالیز قرار گرفته است (۲۴).

خالص‌سازی پروتئین ویبریوبلاک

پس از تأیید پروتئین بیان شده توسط SDS-PAGE به‌منظور تخلیص پروتئین از ستون کروماتوگرافی نیکل سفاروز (Ni-NTA) جریان سریع استفاده گردیده است. شرایط کشت مشابه مرحله قبل ولی در حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر صورت گرفت. این شرایط منجر به تولید پروتئین به شکل انکلوژن بادی شده که، برای استخراج انکلوژن بادی از محیط کشت، محیط کشت باکتری با استفاده از سانتریفیوژ با برنامه ۸۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوژ و رسوب ایجاد شده در بافر A حاوی (۲۰ میلی‌مولار تریس و ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) دوباره حل شده است. در مرحله بعد محلول به‌منظور سونیکاسیون و شکستن دیوار سلولی روی یخ قرار گرفته و در ۱۵ چرخه هر چرخه شامل پالس‌های ۲۰ ثانیه‌ای با فاصله‌های ۴۰ ثانیه‌ای با دستگاه اولتراسونیک مورد سونیکاسیون قرار گرفت. سرانجام، محلول حاصل با سانتریفیوژ در ۱۵۰۰۰ دور به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس برداشت گردیده است.پس از سانتریفیوژ، رسوب مجدد در بافر B حاوی (۲۰ میلی‌مولار تریس، ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول ، ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۸ مولار اوره، ۸ pH) حل شده است. این بافر انکلوژن بادی‌ها را حل کرده و برای حذف دیگر بخش‌های سلولی، محلول در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه مورد سانتریوفوژ قرار گرفت. محلول رویی این مرحله که حاوی انکلوژن بادی موردنظر است پس از فیلتراسیون توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۴ میکرون در ستون کروماتوگرافی (Ni-NTA) تلقیح شده است. آماده‌سازی ستون کروماتوگرافی همزمان با آماده‌سازی نمونه‌ها صورت گرفته که بدین‌منظور در مرحله اول ستون با بافر B (۲۰ میلی‌مولار تریس، ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۴۰۰ میلی-مولار کلرید سدیم، ۸ مولار اوره، ۸ pH) به تعادل رسیده است. پروتئین لیز شده پس از تعادل ستون از طریق پمپ پریستالت در ستون تلقیح گردیده است. سپس در مرحله

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]

بعد برای شستشو پروتئین‌های اتصال نیافته به ستون از بافر C (۱۰ میلی‌مولار تریس، ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۸ مولار اوره، pH ۸) استفاده شده و سرانجام برای جداسازی پروتئین‌های متصل شده به ستون از دستگاه گرادیان‌ساز برای ایجاد شیب غلظتی ایمیدازول از ۲۰ میلی‌مولار تا ۵۰۰ میلی‌مولار استفاده شده است. در این مرحله، چندین نمونه ۱/۵ میلی‌لیتری از ستون جمع‌آوری و با روش SDS-PAGE مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. بافر شستشو شامل ۲۰ میلی‌مولار تریس، ۵۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۴۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۶ مولار اوره و pH ۸ است.

تاخوردگی مجدد و فرمولاسیون پروتئین

به‌منظور حذف اوره از محیط و هم‌چنین ایجاد تاخوردگی مناسب در پروتئین تخلیص شده،از بافر فرمولاسیون حاوی (۱۰ میلی‌مولار تریس، ۳۰ میلی‌مولار مانیتول و ۰/۰۱٪ به-نسبت حجمی/ حجمی توین ۲۰) استفاده گردید. افزودن بافر به محلول پروتئینی به آرامی صورت گرفته تا محلول ۱۰۰ بار رقیق‌تر شود، در نهایت محلول به‌دست آمده توسط فیلتر آمیکون برای افزایش غلظت پروتئین در محلول مورد فیلتراسیون قرار گرفت. از فیلتر آمیکون به‌دلیل قابل استفاده بودن این فیلتر در سانتریفیوژ و هم‌چنین این فیلتر با اندازه‌ای مناسب برای جلوگیری از خروج پروتئین در حین سانتریفیوژ مورد استفاده قرار گرفت و با موفقیت اوره از محیط آن جدا شد.

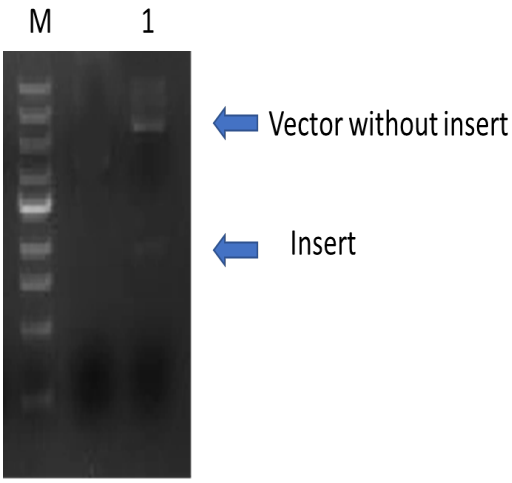
محاسبه غلظت پروتئین

پس از غلیظ‌سازی و فرمولاسیون پروتئین خالص شده، برای محاسبه مقدار پروتئین موجود در محلول نمونه، از روش برادفورد استفاده شده است. در این مرحله یک شاخص استاندارد برادفورد و همین‌طور یک نمودار استاندارد برای تعیین رقت سریال از یک پروتئین تجاری تهیه شد که، یک‌سری رقت از پروتئین آلبومین از ۱ میلی-گرم در میلی‌لیتر تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آماده گردیده و در مرحله بعدی، ۲۰ میکرولیتر از هر رقت به ۹۸۰ میکرولیتر از نشانگر استاندارد بردفورد اضافه گردیده و جذب نور در ۵۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway 6310 اسپکتروفتومتر) خوانده شد. سرانجام، برای هر غلظت شناخته شده پروتئین آلبومین، جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مورد خوانش قرار گرفته و مقدار غلظت پروتئین و جذب نور در ۵۸۰ نانومتر نمودار ایجاد می‌کنند. در نتیجه، غلظت نهایی پروتئین می‌تواند با استفاده از نمودار ترسیم شده تعیین شود.

نتایج

هضم آنزیمی به‌منظور تأیید سازه موردنظر

برای انجام فرآیند دابل دایجست براساس جایگاه برش آنزیمی تعبیه شده در وکتور موردنظر از دو آنزیم *NdeI* و *EcoRI* استفاده گردیده. این فرآیند به‌مدت یک ساعت و



شکل ۲- بررسی هضم آنزیمی برروی ژل الکتروفورز آگارز ۱٪ رنگ-آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. خط M مارکر وزن مولکولی ۱ کیلو دالتونی است و خط ۱ پلاسمید هضم شده به روش آنزیمی که دارای دوباند است باند ۸۴۹ جفت بازی و باند ۳۶۰۰ جفت بازی که به‌ترتیب مربوط به قطعه کلون شده و پلاسمید است.

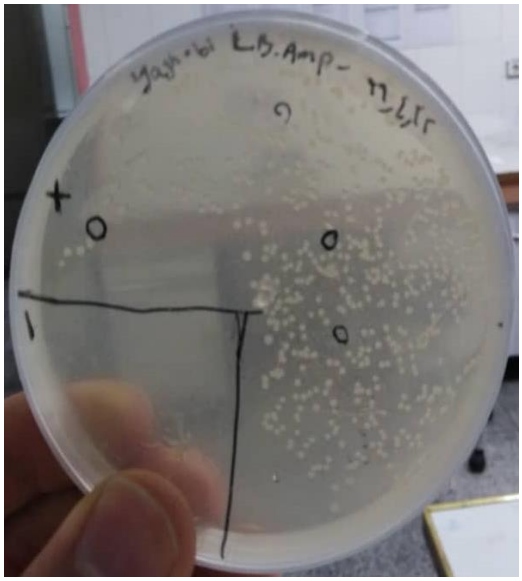
در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بر روی پلاسمید استخراج شده صورت گرفته و نتایج حاصل برروی ژل الکتروفورز آگارز ۱٪ رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. در شکل ۲ می‌توانید نتیجه هضم آنزیمی برای تأیید سازه موردنظر را مشاهده کنید.

ترانسفورم پلاسمید به باکتری مستعد بیانی *E. coli DE3Rossetagami*

فرآیند ترانسفورم به باکتری بیانی *E. coli DE3Rossetagami* توسط روش حرارتی صورت گرفته که نتیجه حاصل از ترانسفورم موفق توسط کشت باکتری بر روی محیط LB آگار که حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به‌عنوان مارکر انتخابی برای رشد تنها باکتری‌هایی است که پلاسمید را دریافت کرده‌اند چرا که، پلاسمید طراحی شده حاوی ژن مقاومت‌به آمپی‌سیلین است. نتیجه کشت بر روی محیط LB آگار در شکل ۳ قابل مشاهده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

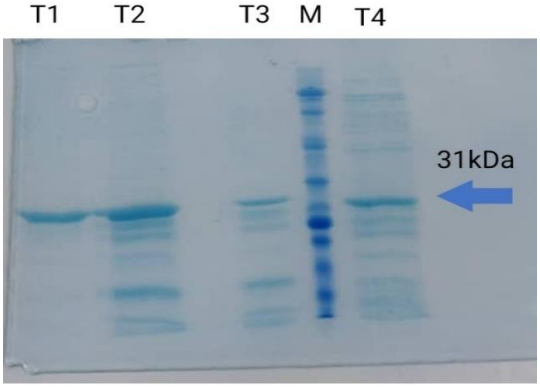
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]



شکل ۳- تأیید موفقیت‌آمیز بودن ترانسفورم وکتور به باکتری میزبان. همان‌طور که مشاهده می‌شود تمامی کلونی‌های رشد کرده بر سطح محیط کشت دارای پلاسمید موردنظر بوده و در بخش کنترل منفی کلونی مشاهده نگردیده است.

بیان پروتئین ویبریوبلاک

بررسی بیان پروتئین توسط ژل ۱۲/۵٪ SDS-PAGE صورت گرفته که نتیجه آن در شکل ۴ قابل مشاهده است. همانطورکه مشاهده می‌گردد پس از گذشت ۴ ساعت از القا توسط IPTG میزان بیان پروتئین مناسب برای تخلیص بوده است.



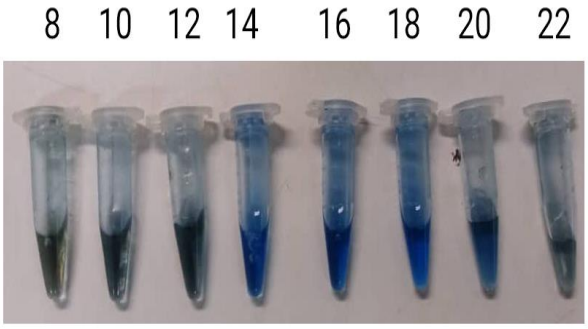
شکل ۴- نتیجه بررسی بیان پروتئین بر روی ژل ۱۲/۵٪ SDS-PAGE . نمونه‌گیری از محیط هر یک ساعت یک‌بار برای یافتن بهترین میزان بیان مورد بررسی قرار گرفت. خط M مارکر وزن مولکولی ۱ کیلودالتونی است. نمونه T1 بیان پروتئین در ساعت اول بعد از القا بیان است. نمونه T2 نمونه در ساعت دوم پس القا، نمونه T3 نمونه در ساعت سوم پس از القا و نمونه T4 نمونه در ساعت چهارم پس از القا است.

خالص‌سازی پروتئین ویبریوبلاک

برای بررسی و تأیید اولیه تخلیص پروتئین در هنگام خالص‌سازی می‌توان از تست برادفورد استفاده کرد. این تست وجود پروتئین در محلول را با تغییر رنگ محلول نشان می‌دهد، البته این تست غیراختصاصی و وجود هر پروتئینی را نشان می‌دهد، در واقع این مرحله به‌منظور مشاهده خروج پروتئین برای نمونه‌گیری صورت گرفته است. در شکل ۵ تست برادفورد صورت گرفته در این مرحله که نشان‌دهنده وجود پروتئین در محلول در هنگام تخلیص است قابل مشاهده است. هم‌چنین در شکل ۶ نتیجه بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از تخلیص را در ژل ۱۲/۵٪ SDS-PAGE قابل مشاهده است.

بحث

با کشف و پیشرفت بشر در زمینه کلون کردن یک ژن در میزبان باکتریایی، تولید پروتئین نوترکیب، زمینه‌ای جدید از توسعه داروها و واکسن‌ها ایجاد شده است. استفاده از پروتئین‌های نوترکیب در درمان بیماری‌ها، ریشه‌ای دیرینه در تاریخ بشریت دارد به‌نحوی‌که اولین بار در سال ۱۹۸۲ انسولین با موفقیت توسط تکنیک‌های ذکر شده تخلیص و مورداستفاده قرار گرفت (۴). استفاده از پروتئین‌های نوترکیب تنها محدود به درمان بیماری‌ها نیست، بلکه در



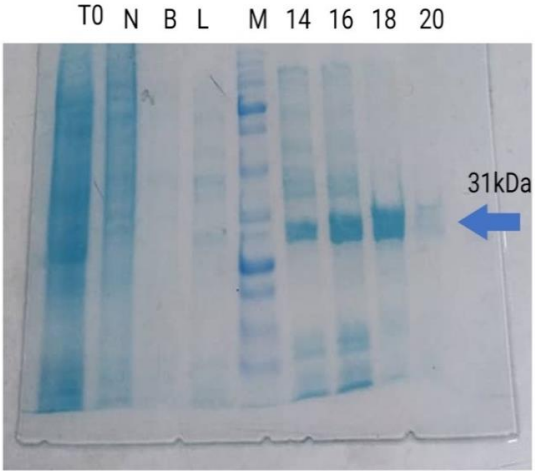
شکل ۵- تغییر رنگ از آبی کم‌رنگ تا آبی پررنگ توسط محلول برادفور در بعضی از نمونه‌های جمع-آوری شده از خروجی ستون نشان‌دهنده وجود پروتئین در محلول خروجی بوده. نمونه ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰ و ۲۲ در واقع خروجی‌های ستون بعد از تلقیح پروتئین به‌منظور خالص‌سازی هستند.

طی سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در زمینه پیشگیری از بیماری‌ها به‌وسیله پروتئین‌های نوترکیب گزارش شده است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴، Kiaie و همکاران به‌منظور دست‌یابی به کاندید واکسنی علیه

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]

ویبریوکلرا، پروتئین TcpA را هدف قرار داده اند. در این مطالعه ابتدا ژنوم TcpA را از سویه EL-Tor را با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر کرده و سپس در ژنوم تکثیر یافته را در بدنه میزبان باکتریایی pGEX4T1 کلون کرده‌اند. درنهایت پس از بیان پروتئین توسط میزبان باکتریایی، پروتئین موردنظر توسط ستون کروماتوگرافی GST خالص‌سازی شده است (۲۵).از دیگر مطالعه‌ها در زمینه استفاده از پروتئین نوترکیب به‌عنوان کاندید واکسن وبا می‌توان به مطالعه Mattos و همکاران در سال ۲۰۰۲ اشاره کرد که در این مطالعه هدف دست‌یابی به پروتئین نوترکیب زیرواحد B توکسین وبا است. در این مطالعه ژنوم حاوی ۶ توالی هیستیدین تگ با طول ۳۵۹ جفت باز طراحی گردیده که این ژنوم در مرحله بعد توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر و در میزبان باکتریایی *E.coli* کلون و بیان پروتئین در فرم محلول توسط این میزبان صورت گرفته است. هم‌چنین به‌منظور خالص‌سازی پروتئین



شکل ۶- نتیجه بررسی نمونه‌های خروجی از ستون کروماتوگرافی توسط ژل ۱۲/۵٪ SDS-PAGE. نمونه T0 نمونه گرفته شده از پیش-کشت که فاقد بیان بوده، نمونه N نمونه جمع‌آوری شده از محلول رویی بعد از القای ۴ ساعته، نمونه B نمونه جمع‌آوری شده از رسوب بعد از سونیکاسیون، خط M مارکر وزن مولکولی ۱ کیلو دالتونی و نمونه ۱۴ تا ۲۰ نمونه‌های جمع‌آوری شده از خروجی ستون بعد از شستشو با شیب غلظتی ایمیدازول. همان‌طور که مشاهده می‌شود نمونه‌های جمع‌آوری شده از خروجی ستون از نمونه ۱۴ تا ۲۰ در وزن مولکولی ۳۲ کیلو دالتونی قرار گرفته که براساس طراحی سازه پروتئین موردنظر نیز دارای وزن مولکولی ۳۲ کیلودالتونی است.

موردنظر از ستون کروماتوگرافی نیکل-سفاروز استفاده شده که پس از خالص‌سازی با بررسی توسط تست برادفورد میزان ۱۳ میلی‌گرم از پروتئین خالص‌سازی شده در محیط به‌دست آمده. در نهایت با بررسی پروتئین توسط وسترن بلات و الایزا نشان داده شده که پروتئین حاصل به‌خوبی توسط آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تشخیص داده می‌شوند (۲۶). از جمله مطالعه-های مشابه دیگر می‌توان به مطالعه Kazemian و همکاران در سال ۲۰۱۲ اشاره کرد در این مطالعه برای جداسازی ژن flaA از محتوای کل ژنوم ویبریوکلرا از بیوتیپ اینابا از روش CATB/NaCl استفاده شده و پس از آن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز قطعه ژنوم flaA تکثیر گردیده که به‌منظور سهولت در کلونینگ ژن دو جایگاه برش آنزیم Bam HI و XhoI در ابتدا و انتهای قطعه ژنومی تعبیه شده است. پس از آن ژنوم flaA تکثیر شده به درون پلاسمید pGEX4T-1 کلون و پلاسمید نهایی به درون میزبان باکتریایی *E. coli DH5α* ترانسفورم شده است، ترانسفورم به میزبان *E. coli DH5α* به‌منظور ازدیاد پلاسمید صورت گفته است. در نهایت پس از ازدیاد پلاسمید توسط میزبان باکتریایی پلاسمید از رسوب خشک باکتری توسط کیت استخراج پلاسمید، استخراج شده و به میزبان باکتریایی *E. coli* BL21 (DE3) ترانسفورم شده و به‌منظور القاء بیان پروتئین از غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG استفاده شده است. درنهایت پروتئین بیان شده توسط کیت استخراجی G.S.T خالص-سازی شده، پس از آن به‌منظور بررسی قدرت ایمنی‌زایی این پروتئین نوترکیب به مدل آزمایشگاهی رت تزریق گردیده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد بیان پروتئین موردنظر موفقیت‌آمیز بوده و هم‌چنین تزریق این پروتئین به حیوانات آزمایشگاهی، نشان داده که این پروتئین از قدرت آنتی‌ژنیسته بالایی برخوردار است (۲۷). از دیگر مطالعه‌های مشابه می‌توان به مطالعه Amerian و همکاران در سال ۲۰۱۸ اشاره کرد. در این مطالعه با بررسی بیوانفورماتیکی، ابتدا توالی کامل ژن tcpA از سایت GeneBank استخراج گردیده و کدون‌های طبیعی این قطعه ژنی توسط آنالیزهای بیوانفورماتیکی به‌منظور بررسی محتوای GC ژن tcpA، وجود کدون‌های نادر و هم‌چنین بررسی سازگاری کدون CAI مورد بررسی قرار گرفته که هدف از این مرحله بهینه‌سازی کدون‌های ژن tcpA و تبدیل این کدون‌ها به کدون‌های رایج در *E.coli* است. هم‌چنین در این طراحی دو جایگاه برش آنزیم HindIII و XohI نیز تعبیه گشته که پس از اتمام مرحله بیوانفورماتیکی سازه طراحی شده توسط شرکت Biomatik در بدنه pET32a(+) کلون گردیده است. پس

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]

از آن پلاسمید به باکتری میزبان *E. coli DH5α* به‌منظور ازدیاد پلاسمید و ژنوم موردنظر ترانسفورم شده و درنهایت پس از ازدیاد ژنوم و پلاسمید، پلاسمید از باکتری توسط کیت استخراج گردیده و به باکتری *E. coli* BL21 (DE3) ترانسفورم شده که هدف از این مرحله بیان پروتئین نوترکیب است، هم‌چنین القاء بیان با استفاده از غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG صورت گرفته است. درنهایت به‌منظور خالص‌سازی پروتئین تولید شده در فرم دناتوره از ستون نیکل-سفاروز استفاده شده است. درنهایت با استفاده از وسترن بلات بیان پروتئین و صحت آن تأیید گردیده است. در این مطالعه پروتئین حاصل به‌عنوان کاندیدی برای واکسن وبا در نظر گرفته شده است(۲۸).

مطالعه‌های ذکر شده دارای وجه تشابه بسیاری با مطالعه حاضر است، از جمله این موارد می‌توان به: ۱. القاء بیان پروتئین با استفاده از IPTG ۲. خالص‌سازی پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل-سفارز اشاره کرد. از جمله تفاوت‌های این مطالعه با مطالعه‌های ذکر شده به بررسی‌های بیوانفورماتیکی دقیق‌تر قبل از شروع کار و طراحی سازه با دقت بالا برای بیان قوی‌تر و دقیق‌تر پروتئین کایمریک و طراحی پروتئین کایمریک و هدف قرار دادن تعداد بیش‌تری از پروتئین‌ها با قدرت ایمنی‌زایی اشاره کرد. در مطالعه حاضر با هدف کلون، بیان و تخلیص پروتئین ویبریوبلاک که می‌تواند کاندید واکسن برعلیه وبا باشد، در ابتدا وکتور طراحی شده‌ای که، در بدنه pET23a قرار گرفته است به‌منظور ازدیاد وکتور به میزبان باکتریایی *DH5a* ترانسفورم شده است، سپس به‌منظور القاء بیان پروتئین پس از استخراج پلاسمید از میزبان باکتریایی *DH5a* و انجام هضم آنزیمی برای تأیید قطعه کلون شده و سازه طراحی شده، پلاسمید به باکتری مستعد بیانی *E. coli DE3 Rossetagami* ترانسفورم شده است. پس از آن برای القای بیان پروتئین، از غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG استفاده شده است. درنهایت تخلیص پروتئین توسط ستون کروماتوگرافی نیکل سفاروز صورت گرفته است. با توجه‌به نتایج حاصل از پژوهش و توانایی ایجاد پروتئین نوترکیب و خالص به‌میزان ۱ میلی‌گرم می‌توان، این پروتئین تخلیص شده می‌تواند کاندید مناسبی برای بررسی‌های بیش‌تر در زمینه ایمنی‌زایی باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده پروتئین کایمریک، ۳۱ کیلو دالتونی است، این پروتئین به‌میزان ۱ میلی‌گرم در طی این مطالعه خالص‌سازی شده و می‌تواند برای ادامه پژوهش مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری مؤثر کارکنان و دانشجویان پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر، بابت تمامی تلاش‌ها و کمکهایشان در حین انجام این پروژه، کمال تشکر و قدردانی می‌گردد. این مطالعه با حمایت‌های دانشگاه صنعتی مالک اشتر صورت پذیرفته است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]

منابع

1. Mandrich L. The Modern Biology: from DNA Discovery To Cell Cloning. Cloning & Transgenesis. 2013;02(02).

2. Lodish H, Zipursky SL. Molecular cell biology. Biochem Mol Biol Educ. 2001;29:126-33.

3. Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. Biotechnology advances. 2012; 30(5):1102-7.

4. Pham PV. Medical Biotechnology. 2018:449-69.

5. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. Current Opinion in Biotechnology. 2002;13(2): 23-117.

6. Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. Brazilian J. Medical and Biological Research. 2012;45(12):1102-11.

7. Brown TA. Gene cloning and DNA analysis: an introduction: John Wiley & Sons; 2016.

8. Froger A, Hall JE. Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. J.Visualized Experiments. 2007 (6).

9. Chang DC. Electroporation and Electrofusion. Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine2006.

10. Plotkin SA. History of vaccine development: Springer Science & Business Media; 2011.

11. Artenstein AW. Smallpox. Vaccines: A Biography: Springer; 2010. p. 9-29.

12. Plotkin S. History of vaccination. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014;111(34):12283-7.

13. Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future. Nature Reviews Microbiology. 2011;9(12):889-93.

14. Bazin H. Vaccination: a history from Lady Montagu to genetic engineering: John Libbey Eurotext; 2011.

15. Negahdaripour M, Nezafat N, Eslami M, Ghoshoon MB, Shoolian E, Najafipour S, et al. Structural vaccinology considerations for in silico designing of a multi-epitope vaccine. Infection, Genetics and Evolution. 2018;58:96-109.

16. BuonaguroL, Consortium H. Developments in cancer vaccines for hepatocellular carcinoma. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2016;65(1):93-9.

17. Brennick CA, George MM, Corwin WL, Srivastava PK, Ebrahimi-Nik H. Neoepitopes as cancer immunotherapy targets: key challenges and opportunities. Immunotherapy. 2017;9(4):361-71.

18. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. The Lancet. 2012;379(9835):2466-76.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]

19.Weil AA, Ryan ET. Cholera: recent updates. Current opinion in infectious diseases. 2018;31(5):61-455.

20. Mosley JF, II LLS, Brantley P, Locke D, Como M. Vaxchora: the first FDA-approved cholera vaccination in the United States. Pharmacy and Therapeutics. 2017;42(10):638.

21. Odevall L, Hong D, Digilio L, Sahastrabuddhe S, Mogasale V, BaikY, et al. The Euvichol story – Development and licensure of a safe, effective and affordable oral cholera vaccine through global public private partnerships. Vaccine. 2018;36(45):6606-14.

22. Ali M, Nelson A, Luquero FJ, Azman AS, Debes AK, M'Bang'ombe MM ,et al. Safety of a killed oral cholera vaccine (Shanchol) in pregnant women in Malawi: an observational cohort study. The Lancet Infectious Diseases. 2017;17(5):538-44.

23. Chang AY, Chau V, Landas JA, Pang Y. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. JEMI methods. 2017;1:22-5.

24. He F. Laemmli-sds-page. Bio-protocolBio101: e80. 2011.

25. Kiaie S, Abtahi H, Mosayebi G, Alikhani M, Pakzad I. Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. Iranian journal of microbiology. 2014;6(2):68.

26. de Mattos Arêas AP, de Oliveira MLS, Ramos CRR, Sbrogio-Almeida ME, Raw Ia, Ho PL. Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in Escherichia coli. Protein Expression and Purification. 2002;25(3):481-7.

27. Kazemian H, Najafi-Mosleh M, Abtahi H. Cloning and expression of the Vibrio cholera recombinant FlaA Flagellin protein and evaluation of its antigenicity characteristics. J. Arak University of Medical Sciences. 2012;15(7):54-62.

28. Amerian M, Nazarian S, honari H, Minaie M E. Design and expression recombinant protein of tcpA gene vibrio cholera in pET32a(+) vector. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 20 (4) :12-24

.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.4.6]