

کلون کردن ژن جهش یافته آنتی ژن ایمنی بخش باسیلوس آنتراسیس (PA) در باسیلوس سوتیلیس

محمد ابوطالب^{*}، هاتف آجودانی^۱

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی

چکیده:

سابقه و هدف: آنتی ژن ایمنی بخش باسیلوس آنتراسیس پروتئینی با خاصیت اتصال به گیرنده های سطح تمام سلول های بدن انسان می باشد. در سطح سلول های سرطانی گیرنده اختصاصی فعال کننده یوروکینازی پلاسمینوژن (uPA) ایجاد می شود که در سطح سایر سلول های نرمال بدن مشاهده نمی شوند. هدف از انجام این تحقیق تغییر جایگاه اتصال موجود بر روی PA با جهش زایی مستقیم می باشد به نحوی که این پروتئین فقط بتواند به سلول های سرطانی متصل گردد.

مواد و روش ها: در طی این تحقیق پلاسمید pMNA۱ حاوی ژن PA به روش لیز قلیایی از میزبان خود جدا سازی شد. در ادامه با استفاده از پرایمر های فسفریله شده و استفاده از روش PCR هم پوشان جهش هدفدار بر روی ژن PA صورت پذیرفت. در ادامه قطعه حاصله به طور مستقیم بر روی ناقل PTZ۵۷R کلون و به *E. coli* سویه DH۵α انتقال یافت. با استفاده از آنزیم های برش دهنده *SalI* و *KpnI* ژن PA جهش یافته جدا و بر روی ناقل pWB۹۸۰ انتقال داده شد. در آخر با استفاده از روش الکتروپوریشن به *B. subtilis* سویه WB۶۰۰ انتقال یافت.

یافته ها: طی این تحقیق در توالی ژن PA با روش SOE PCR جهش ایجاد کرده که در پی آن کد ژنتیکی اسید آمینه ۱۹۴ تغییر کرد. جهش ایجاد شده با تعیین ترادف بازی تأیید گردید.

نتیجه گیری: سرطان مشهور به بیماری غیر قابل درمان و مرگ آور است. یکی از روش های درمان سرطان استفاده از توکسین های باکتریایی است البته در صورتی که فقط به سلول های سرطانی آسیب برساند. لذا با استفاده از پروتئین تغییر یافته PA که فقط به سلول های سرطانی متصل می گردد می توان امیدی تازه در درمان سرطان ایجاد کرد.

واژگان کلیدی: فعال کننده یوروکینازی پلاسمینوژن، SOE PCR، آنتی ژن ایمنی بخش باسیلوس آنتراسیس.

مقدمه:

این پروتئین ها به وسیله ژن های *lef*، *cyo* و *pag* رمزدهی می گردند. هر کدام از دو فاکتور *LF* و *EF* همراه PA اثر خود را اعمال می کنند (۷). PA پروتئینی با وزن مولکولی ۸۳ kDa و متشکل از ۴ ناحیه (Domain) که از طریق انتهای کربوکسیل خود به گیرنده های سطح سلول از جمله UPA متصل شده، پس از ایجاد منفذ در غشای سلول سبب ورود زیر واحد های *LF* و *EF* توکسین به درون سلول می گردد (۴ و ۸). uPA سرین پروتئاز موجود در سلول های یوکاریوتیک با توانایی تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین، جایگاه ژنی آن کروموزوم ۱۹، دارای گیرنده سطح سلولی (uPAR) و اثر گذار بر پروتئین های ماتریکس خارج سلولی می باشد (۱۴، ۲). بیان

باسیلوس آنتراسیس، باکتری گرم مثبت هوازی بی هوازی اختیاری و عامل بیماری سیاه زخم است (۶). سم ترشح شده توسط این باکتری (آنتراکس توکسین) متشکل از سه قسمت: پادگان محافظت کننده (PA)، عامل کشنده (LF) و عامل مولد ادم (EF) می باشد.

* نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی
پست الکترونیکی: mohammad_abootaleb@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۱۳

شد. با توجه به هم پوشانی مکمل ۲ قطعه (به طول ۱۷bp) که ناشی از طول پرایمر ها است، با یک واکنش PCR دیگر، با به کار گیری روش Overlapping extention PCR قطعه نهایی که ژن PA جهش یافته است، سنتز گردید. به منظور تکثیر ژن جهش یافته از پرایمر های Rn و Fn و آنزیم EX Taq DNA Polymerase استفاده گردید.

کلون کردن ژن PA در *E.Coli* و *B.Subtilis* :

جهت تهیه *E.coli* حاوی ژن PA، واکنش اتصال (Ligation) بین ۵۰ng محصول PCR و ۲۰۰ng T.Vector گذاشته شد و سپس با روش استاندارد به *E.coli* انتقال داده شد. ۱۰۰µl مخلوط انتقال بر روی محیط کشت LB Agar حاوی آمپی سیلین (۱۰۰µg/ml)، X₂ gal (۳۰µg/ml) و IPTG (۲mM) کشت داده شد. کلونی های سفید رنگ، جدا گانه کشت داده شد. سپس توسط واکنش کلونی PCR و هضم آنزیمی کلونی های حاوی پلاسمید حامل ژن PA جدا سازی و توسط شرکت Bio science تعیین ترادف بازی گردیدند. در آخر کلونی حامل ژن جهش یافته PA مشخص و جداسازی گردید. جهت تهیه *B.Subtilis* حامل ژن PA جهش یافته، این T.vector این ژن با آنزیم های *KpnI* و *SalI* جداگانه هضم شد و در ادامه با کیت خالص سازی DNA از ژل (Viogen, Korea) خالص سازی گردید. واکنش اتصال برای ۱µg پلاسمید و ۳µg قطعه ژن گذاشته شد و سپس ۱۰µg واکنش اتصال با روش Electroporation (Biorad, USA) در ۱۰۰۰V و ۸/۵msec در تیوب ۰/۱cm انتقال داده شد. ۲۰۰µl مخلوط انتقال بر روی محیط کشت LB Agar حاوی کانامایسین (۱۰۰µg/ml) کشت و مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°C قرار داده شد.

یافته ها:

ایجاد ژن PA حاوی جهش و کلون در *E.coli*:

بعد از جدا سازی پلاسمید PMNA₁ حامل ژن PA از باسیلوس سوبتیلیس، با استفاده از پرایمر های طراحی شده، PCR انجام شد و باند ۲/۴kb به دست آمد (شکل ۱). انجام واکنش PCR با پرایمر های جهش زا و ایجاد قطعات حد واسط با طول حدود ۶۰۰bp و ۱۸۰۰bp قابل مشاهده است. (شکل ۲ و ۳) دو قطعه به دست آمده با توجه به ترادف بازی پرایمر های R₁ و H₂ مکمل یکدیگر می باشند، دارای منطقه هم پوشان به طول ۱۷bp هستند. قطعات هم پوشان به دست آمده با نسبت های مساوی از نظر مولاریته وارد واکنش PCR جدید گردیدند. با اتصال این دو قطعه و انجام یک واکنش PCR دیگر، دو قطعه جهش دار بر اساس توسعه محل هم پوشان به یکدیگر متصل شده و ژن PA (۱۶۰۰bp) جهش یافته ایجاد می گردد. نتیجه اتصال و تکثیر این ژن بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داده شده است (شکل ۴). از انتقال واکنش اتصال بین محصول PCR و T.Vector و کشت روی

بالای uPA و گیرنده سطح سلولی آن نشانه ای مبتنی بر وجود تومور های مختلف سرطانی است و به ندرت در سلول های نرمال بدن بیان می شوند (۱ و ۵). این پروتئین نقش اساسی در تجزیه ماتریکس بیرون سلولی، مهاجرت و ترمیم سلول دارا می باشد (۳۱). ایجاد جهش مستقیم Site Direct Mutagenesis (SDM) یک ابزار مهم در مهندسی ژنتیک بشمار می رود که یک روش آسان، برای ایجاد این نوع جهش، استفاده از واکنش PCR می باشد. پروتوکل های زیادی بدین منظور بیان شده است ولی در این بین یکی از روش هایی که توسعه زیادی پیدا کرده است، روش Single (SOE) Overlap Extension PCR می باشد (۱۰). هدف از این تحقیق ایجاد جهش در ژن PA و کلون آن در *Bacillus subtilis* با استفاده از وکتور pWB۹۸۰ می باشد (۵).

مواد و روش ها:

پلاسمید ها و سویه های باکتریایی و شرایط رشد: سویه های باکتریایی عبارتند از: *E.coli* سویه Top۱۰ و باسیلوس سوبتیلیس سویه WB۶۰۰ که هر دو از بانک ژن انسیتو پاستور ایران تهیه شد. تمام سویه ها روی محیط کشت LB Agar (SRL, India) و LB Broth (SRL, India) حاوی آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (۱۰۰ µg/ml) و کانامایسین (۱۰۰µg/ml) (Sigma, USA) کشت داده شدند. پلاسمید های مورد استفاده عبارت بود از: پلاسمید PTZ۵۷R (Fermentas, Lithuania) که به عنوان T.vector و پلاسمید pWB۹۸۰ به عنوان ناقل بیان کننده مورد استفاده قرار گرفتند.

خالص سازی و PCR :

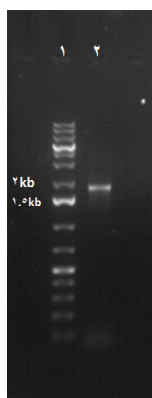
در این تحقیق از باکتری *B.subtilis* سویه WB۶۰۰ حاوی pMNA₁ حامل ژن PA جهت جدا سازی ژن PA استفاده شد. استخراج و خالص سازی پلاسمید باکتری به روش استاندارد Phenol و Choloforn با کمی تغییر انجام گرفت. جهت جدا کردن ژن PA پرایمر Fn با ترادف بازی ۵GTAGGTACCTAAAAGGAGAACGTATATGA^۳ و پرایمر Rn با ترادف بازی ۵TAGTCGACTGTTTAAAACA^۳ طراحی گردیدند. به منظور ایجاد جهش مورد نظر در قطعه به دست آمده از پرایمر های R₁ با ترادف بازی ۵pTGGTGAGTTCGAAGATTTTTGTTTTAATTCT^۳ و پرایمر H₂ با ترادف بازی pGGAAGTGGAAGATCAGC^۳

۳ AAGTACAAGTGCTGGACCTACGGTTCCAG استفاده شد. با انجام واکنش PCR و با استفاده از پرایمر های R₁ و Fn قطعه حد واسط اول (با طول تقریبی ۶۰۰bp) و با پرایمر های Rn و H₂ قطعه حد واسط دوم (با طول تقریبی ۱۸۰۰bp) به دست آمد. جهت تکثیر قطعات حد واسط از آنزیم EX Taq DNA Polymerase استفاده

LB آگار حاوی IPTG, X_{gal} و آمپی سیلین، تعدادی کلونی آبی و سفید رنگ رشد کردند. پس از تهیه ماتریکس پلیت از کلنی های سفید و انجام کلونی PCR وجود ژن تأیید دید و در پی آن استخراج پلاسمید انجام پذیرفت (شکل ۵). پس از تعیین سکانس و با توجه به بررسی آن تغییر در موقعیت اسید آمینه ۱۹۴ تأیید گردید.

کلون کردن ژن PA جهش یافته در *B.Subtilis*:

ژن PA جهش یافته به وسیله هضم آنزیمی با آنزیم های *KpnI* و *SalI* از پلاسمید PTZ57R جدا و به وسیله کیت، خالص سازی گردید (شکل ۶). پلاسمید pWB980 نیز جدا گانه به وسیله آنزیم های *KpnI* و *SalI* هضم و به وسیله کیت، خالص سازی گردید و واکنش اتصال بین این پلاسمید و ژن گذاشته شد. از انتقال واکنش اتصال به وسیله Electroporation بعد از ۴۸ ساعت تعداد زیادی کلنی بر روی محیط رشد کردند. پس از بررسی و هضم آنزیمی توسط آنزیم *SalI* پلاسمید حامل ژن PA جهش یافته جدا سازی شد (شکل ۷).

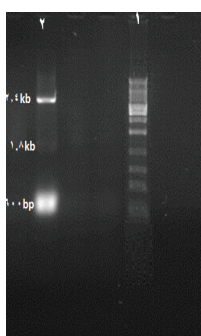


شکل ۳. ژل الکتروفورز قطعه حد واسط دوم، جدا شده توسط PCR بطول ۱۸۰۰b

ستون ۱: مارکر ۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

ستون ۲: الکتروفورز محصول PCR حاصل از جفت پرایمر Rn و H۲

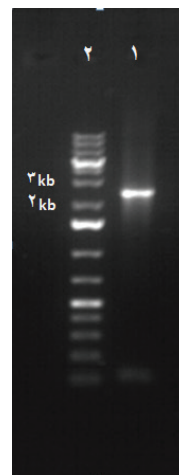


شکل ۴. ژل الکتروفورز اتصال ۲ قطعه حدواسط اول و دوم توسط PCR و تشکیل باندها ۲۴۰۰bp

ستون ۱: مارکر ۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

ستون ۲: محصول PCR اتصال ژن ۶۰۰bp و ۱۸۰۰bp

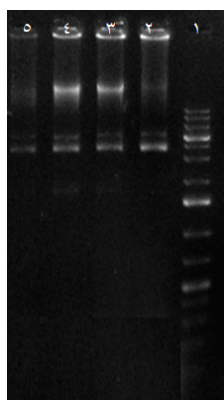


شکل ۱. ژل الکتروفورز PA تکثیر شده توسط PCR و خالص شده از روی ژل الکتروفورز

ستون ۱: مارکر ۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

ستون ۲: محصول PCR انجام شده بر روی پلاسمید pWB980 حاصل جفت پرایمر Fn و Rn



شکل ۵. ژل الکتروفورز T.vector استخراج شده از *E.coli*

ستون ۱: مارکر ۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

ستون ۲-۵: استخراج T.vector



شکل ۲. ژل الکتروفورز قطعه حد واسط اول، جدا شده توسط PCR بطول ۶۰۰b

ستون ۱: مارکر ۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

ستون ۲: الکتروفورز محصول PCR حاصل از جفت پرایمر Fn و R۱

ΔGTA GGT ACC TAA AAA GGA GAA CGT ATA TGA^۳

و

Δ TAG TCG ACT GTT TAA AAC ATA CTC TCC TTG^۳

به منظور تکثیر و از پرایمر های فسفریله با توالی

ΔpTGGTGAGTTTCGAAGATTTTTGTTTTAATTCTGG^۳

و ΔpGGAAGTGGGAAGATCAGCAAGTACA

AGTGCTGGACCTACGGTTCCAG^۳

به منظور جهش زایی استفاده نموده و با بهره گیری از روش PCR بسط هم پوشان در ژن PA جهش ایجاد کردند (۱۱).

در این مطالعه با استفاده از پرایمر های ابتدایی و انتهایی طراحی شده و بهره گیری از پرایمر های فسفریله میانی جهش زای ذکر شده در مقاله هو و هم کاران و استفاده از روش PCR هم پوشان، در ژن PA جهش ایجاد شد.

سولیوان و همکاران در سال ۱۹۸۴ از روش داویس و هم کاران که در سال ۱۹۸۴ ارائه کردند برای ترانسفورماسیون *E. coli* استفاده کردند. آن ها هم چنین از محیط مایع برای انتخاب ترانسفورم شده ها استفاده کردند (۱۲). اما در این مطالعه، از محیط جامد برای انتخاب ترانسفورم شده ها و به روش شوک CaCl₂ استفاده شد.

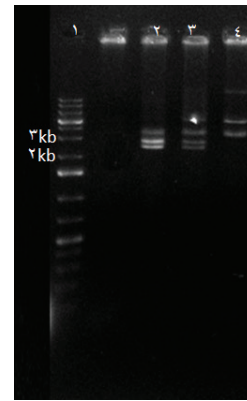
کارایی ترانسفورماسیون مربوط به DNA پلاسمیدی Ligase شده، به درون سلول های مستعد باسیلوس سوبتیلیس شدیداً وابسته به نسبت الیگومر های پلاسمیدی در محلول DNA پلاسمیدی و نسبت به با مقایسه سلول های شوک داده شده *E. coli* پایین است. روش مورد استفاده در بیش تر پروتوکل ها بیش تر بر اساس روش آناگنوستوپولوس و اسپریزین بر پایه استفاده از محیط کشت حداقل، همراه با گلوکز و آمینواسید ها می باشد (۳). در مطالعه حاضر از روش الکتروپوریشن به منظور انتقال DNA پلاسمیدی استفاده شد که روشی موثر برای باسیلوس سوبتیلیس می باشد. نتیجه آن، بازده بالای انتقال محصول اتصال به این باکتری می باشد.

نتیجه گیری:

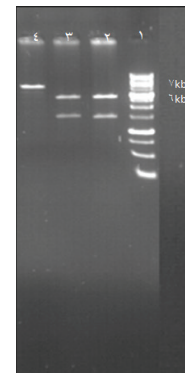
به دلیل شیوع بالای سرطان در جهان لزوم دست یابی به یک داروی موثر و جامع لازم است. به نظر می رسد نتیجه حاصل از این تحقیق می تواند به عنوان یک گزینه مناسب جهت گام برداشتن برای درمان سرطان باشد.

سپاسگزاری:

نویسندگان از حمایت و پشتیبانی کارشناسان و مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، به ویژه مدیر گروه محترم میکروبیولوژی سرکار خانم دکتر ارباب سلیمانی سپاسگزاری به عمل می آورند.



شکل ۶: هضم آنزیمی پلاسمید PTZΔ۷R به وسیله آنزیم های *SalI* و *KpnI* ستون ۱: مارکر (۱kb OGene Ruler, Thermo Scientific) ستون ۲ و ۳: برش دو آنزیمی انجام شده توسط ۲ آنزیم *SalI* و *KpnI* ستون ۴: T.Vector برش نخورده



شکل ۷: ژل الکتروفورز پلاسمید استخراج شده pWB980 حاوی ژن PA و محصول برش تک آنزیمی پلاسمید pWB980 حاوی ژن ستون ۱: مارکر ۱kb (۱kb OGene Ruler, Thermo Scientific) ستون ۲ و ۳: پلاسمید استخراج شده ستون ۴: محصول برش تک آنزیمی پلاسمید pWB980 حاوی ژن

بحث:

سولیوان (Sullivan) و همکاران در سال ۱۹۸۴ روش جدا سازی پلاسمید از باسیلوس را بر پایه استفاده از شیب غلظتی سزیوم کلراید-آنیدیدوم بروماید (CsCl-EtBr) و روش جدا سازی دیگری را با استفاده از جوشاندن ارائه نمودند. در این تحقیق جدا سازی پلاسمید از باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از لیز قلیایی و با ایجاد تغییر هایی به ویژه در استفاده از لیزوزیم انجام گرفت که نسبت به روش CsCl-EtBr ساده تر و کم هزینه تر می باشد. هر چند که پلاسمید جدا سازی شده از کیفیت پایین تری برخوردار بود (۱۱).

در سال ۲۰۰۳ هو و هم کاران با ایجاد جهش در توکسین آنتراکس به بررسی اثر ضد توموری این توکسین جهش یافته پرداختند. آن ها از پرایمر های ابتدایی و انتهایی با توالی

منابع:

1. Abi-Habib RJ, Singh R, Liu S, Bugge TH, Leppla SH, Frankel AE. A urokinase-activated recombinant anthrax toxin is selectively cytotoxic to many human tumor cell types. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(10):2556-62.
2. Casey JR, Petranka JG, Kottra J, Fleenor DE, Rosse W. The structure of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *Blood*. 1994;84(4):1151-6.
3. Cohn F. Ueber parasitische Algen. *Beitr Biol Pfl*. 1872;2:87-108.
4. Cunningham K, Lacy DB, Mogridge J, Collier RJ. Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(10):7049-53.
5. Elena I. Deryugina and James P. Quigley, Cell Surface Remodeling by Plasmin: A New Function for an Old Enzyme, *J Biomed Biotechnol.*, 2012 56:42-59.
6. Helgason E, Økstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(6):2627-30.
7. Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*. 2003;423(6935):87-91.
8. Liu S, Bugge TH, Frankel AE, Leppla SH. Dissecting the urokinase activation pathway using urokinase-activated anthrax toxin. *Proteases and Cancer: Springer*; 2009. p. 175-90.
9. Patel DH, Wi SG, Bae HJ. Modification of overlap extension PCR: A mutagenic approach. *Indian J. Biotechnology*. 2009;8(2):183-6.
10. RjivTyagi, Richard Lai, Roland G Duggleby, 2004, A new approach to megaprime polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BioMed Central*.
11. Shihui Liu, Hannah Aaronson, David J. Mitola, Stephen H. Leppla, and Thomas H. Bugge, 2003, Potent antitumor activity of a urokinase-activated engineered anthrax toxin, *PNAS*, January 21, vol 100, no 2, 657-662.
12. Sullivan MA, Yasbin RE, Young FE. New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. *Gene*. 1984;29(1):21-6.
13. Wang Y. The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis. *Medicinal research reviews*. 2001;21(2):146-70.
14. Zhang J, Sud S, Mizutani K, Gyetko MR, Pienta KJ. Activation of urokinase plasminogen activator and its receptor axis is essential for macrophage infiltration in a prostate cancer mouse model. *Neoplasia*. 2011;13(1):23-30.

