



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





برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

کلون، بیان و خالص‌سازی پروتئین ویبریوبلاک به عنوان 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 ظهر 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 مورد نظر توسط ستون کروماتوگرافی نیکل-سفاروز خالص‌سازی شده است.

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

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به 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 قرار گیرد.

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

(۱). فرآیند کلون کردن یک قطعه DNA، با قرار دادن قطعات DNA موردنظر در مولکول‌های DNA میزبان، در شرایط آزمایشگاهی صورت می‌گیرد، سپس مولکول‌های DNA نوترکیب به سلول‌های میزبان وارد شده و توسط سیستم تکثیر ارگانیسم میزبان، تکثیر می‌گردد، در واقع مولکول DNA نوترکیب، ترکیبی از DNA خارجی و DNA ارگانیسم میزبان است (۲). ظهرور DNA نوترکیب در واقع ابزار مقرر به صرفه‌ای را برای تولید پروتئین فراهم آورد بهنحوی که امروزه بخش عظیمی از صنعت زیست دارو را پروتئین‌های نوترکیب تشکیل داده‌اند (۳). پروتئین نوترکیب که محصول DNA نوترکیب است، نه تنها در تحقیقات آزمایشگاهی کاربرد فراوانی دارند بلکه به عنوان دارو اولین بار به طور موفق برای درمان بیماری انسولین در سال ۱۹۸۲ مورد استفاده قرار گرفت. امروزه بیش از ۱۷۰

مقدمه

واژه کلون کردن یک DNA اولین بار در سال ۱۹۷۰ و پس از جداسازی اولین آنزیم محدود کننده توسط Howard Temin و David Baltimore که به صورت مستقل کار می‌کردند مورد استفاده قرار گرفت، پس از آن در سال ۱۹۷۲ اولین DNA نوترکیب با ترکیب DNA از ارگانیسم‌های مختلف توسط Paul Berg و همکارانش ساخته شد

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

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-توب‌ها به صورت توالی ژنتیکی ترجمه گردیده و اپی‌توب-هایی کاندید به صورت سازه‌ای پلی‌توبی کایمیریک 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 mM Tris-HCl، pH ۸/۰، ۰۱ mM EDTA-tris بافر حل شده و تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه (۱) حل شده و تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شده است. پس از آن پلاسمید به منظور ازدیاد ژنوم به باکتری میزبان *E.coli* DH5a ترانسفورم گردید.

هضم آنزیمی به منظور تأیید سازه موردنظر

برای تأیید سازه طراحی شده، براساس جایگاه‌های تعییه 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 به مدت 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 پروتوكل 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 پروتوكل شیمیایی کلیم کلاید صورت گرفته است (۲۳). برای تأیید موفقیت‌آمیز بودن ترانسفورم، با توجه به ژن مقاومت‌به آمپیسیلین موجود در پلاسمید، باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط LB آگار (Luria-Bertani) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین به عنوان یک مارکر انتخابی برای کلونی‌های حاوی پلاسمید کشت شدند. در نهایت

پروتئین نوترکیب برای درمان بیماری‌ها در سرتاسر جهان مورد استفاده هستند (۴۵). از دیگر کاربردهای پروتئین نوترکیب، در صنعت واکسن‌سازی برای پیشگیری از بیماری‌ها فراگیر است (۶-۹). 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 به نحوه که اولین واکسن‌ها در واقع همان عامل بیماری ضعیف شده یا کشته شده است، ولی واکسن‌های امروزی از عامل ضعیف شده تا پروتئین‌های نوثرکیب را در بر می‌گیرد (۱۰-۱۴). پاسخ‌های ایمنی نقش مهمی در مبارزه با تومورها، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی دارند. اپی‌توب آنتی‌ژنیکیک واحد اساسی است که یا یک پاسخ ایمنی سلولیا هومورال ایجاد می‌کند. یک واکسن چند اپی‌توبی متشکل از یکسری پپتید است که یک روش ایده-آل برای پیشگیری و درمان تومورها، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی است (۱۵-۱۷). ویبریوکلرا از خانواده ویبریوناسه، باکتری گرم منفی، متحرك 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 از این بیماری توسعه یافته‌اند که از جمله واکسن‌های موجود می‌توان به: Vaxchora، Euvichol-Plus/Euvichol، ShanChol، Dukoral، اشاره کرد (۲۰-۲۲). 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 دور کافی و ... است. در مطالعه حاضر هدف کلون، بیان و خالص‌سازی پروتئین کایمیریک سنتیک ویبریوبلاک است، این پروتئین با هدف دستیابی پروتئینی پایدار و مناسب در جهت بررسی‌های بیشتر در تولید واکسن و با تولید و مورد مطالعه قرار گرفته است. از دیگر اهداف این مطالعه تولید پروتئین با خلوص بالاتر به منظور بررسی‌های بیشتر در زمینه تولید واکسن به شیوه معکوس است.

مواد و روش‌ها

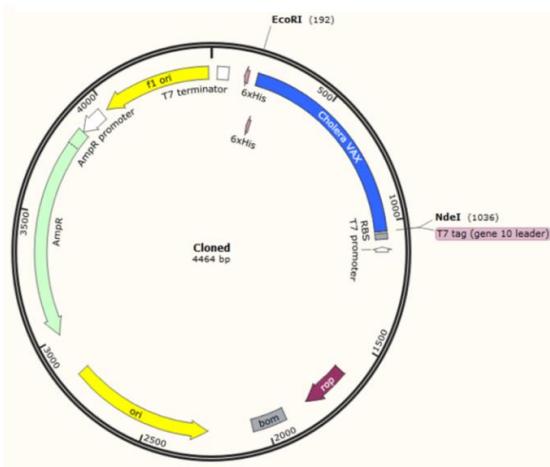
طراحی وکتور و کلون کردن در باکتری میزبان *E.coli* DH5a

منفی ۸۰ درجه سلسیوس تا زمان آنالیز نگهداری شده است. پس از القای بیان، نمونه‌ها به منظور بررسی بیان پروتئین با استفاده از الکتروفوروز ژل سدیم دودسیل SDS-PAGE (SDS-PAGE) ابتدا ژل Laemmli-SDS- PAGE ۱۲/۵٪ با توجه به روش PAGE تهیه گردیده و بیان پروتئین با روش رنگ‌آمیزی کامسی بلو مورد آنالیز قرار گرفته است (۲۴).

خاص‌سازی پروتئین ویبریوبلاک

پس از تأیید پروتئین بیان شده توسط SDS-PAGE به منظور 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 به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب ایجاد شده در بافر A (۲۰ میلی‌مولار تریس و ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) دوباره حل شده است. در مرحله بعد محلول به منظور 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 به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس برداشت گردیده است. پس از سانتریفیوژ، رسوب مجدد در بافر B (۲۰ میلی‌مولار تریس، ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۸ مولار اوره، pH ۸) حل شده است. این بافر انکلوژن بادی‌ها را حل کرده و برای حذف دیگر بخش‌های سلولی، محلول در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه مورد سانتریفیوژ قرار گرفت. محلول رویی این مرحله که حاوی انکلوژن بادی موردنظر است پس از فیلتراسیون توسط فیلتر سرسنگی ۰/۴ میکرون در ستون کروماتوگرافی (Ni-NTA) تلقیح شده است. آماده‌سازی ستون کروماتوگرافی همزمان با آماده‌سازی نمونه‌ها صورت گرفته که بدین منظور در مرحله اول ستون با بافر B (۲۰ میلی‌مولار تریس، ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۸ مولار اوره، pH ۸) به تعادل رسیده است. پروتئین لیز شده پس از تعادل ستون از طریق پمپ پریستالت در ستون تلقیح گردیده است. سپس در مرحله

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 ET23a، 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 EcoRI و NdeI است.

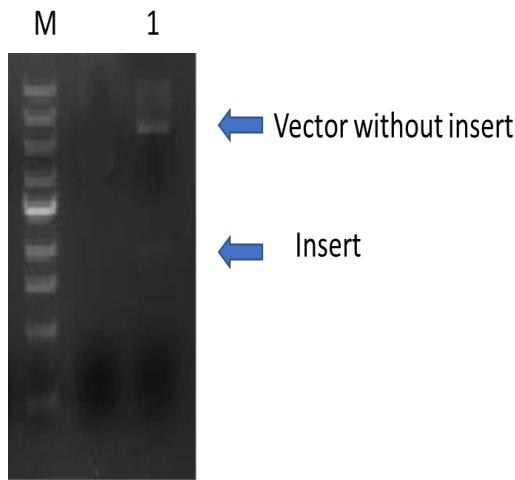
بیان پروتئین ویبریوبلاک

به منظور بیان پروتئینویبریوبلاک، یک تک کلنی از محیط کشت آگار باکتری‌های ترانسفورم 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 زمانی که محیط به OD ۰/۷ تا ۰/۸ برسد. سرانجام، پس از رسیدن IPTG به OD مذکور با افزودن ۱ میلی‌مولار (سینا کلون) القاء صورت گرفته است. شرایط بیان پروتئین به صورت 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 به مدت ۴ ساعت صورت گرفته است. سرانجام به منظور استخراج انکلوژن بادی از محیط کشت، از سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه (میکروفوژ اپندورف R5417) استفاده شده است و سپس رسوب باقی‌مانده در دمای

ایجاد می‌کنند. در نتیجه، غلظت نهایی پروتئین می‌تواند با استفاده از نمودار ترسیم شده تعیین شود.

نتایج

هضم آنزیمی به منظور تأیید سازه موردنظر
برای انجام فرآیند دابل دایجست براساس جایگاه برش آنزیمی تعییه شده در وکتور موردنظر از دو آنزیم *NdeI* و *EcoRI* استفاده گردیده. این فرآیند به مدت یک ساعت و



شکل ۲- بررسی هضم آنزیمی بر روی 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 دو باند است باند ۸۴۹ جفت بازی و باند ۳۶۰۰ جفت بازی که به ترتیب مربوط به قطعه کلون شده و پلاسمید است.

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

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

بعد برای شستشو پروتئین‌های اتصال نیافته به ستون از بافر C ۱۰ میلی‌مولار تریس، ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۸ مولار اوره، pH ۸ استفاده شده و سرانجام برای جداسازی پروتئین‌های متصل شده به ستون از دستگاه گرادیان‌ساز برای ایجاد شبیه 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 میلی‌مولار کلرید سدیم، ۶ مولار اوره و pH ۸ است.

تاخوردگی مجدد و فرمولاسیون پروتئین

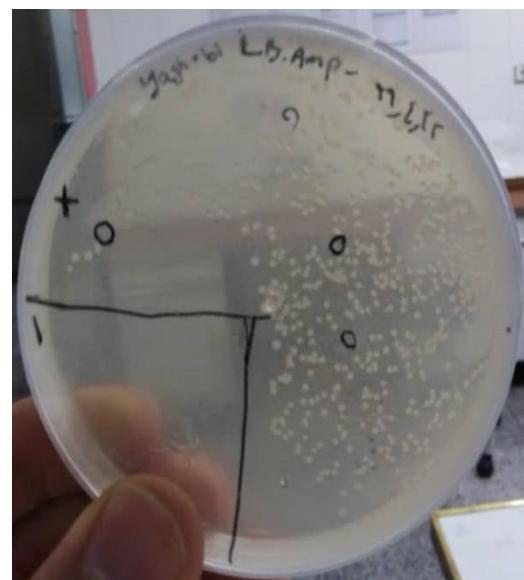
به منظور حذف اوره از محیط و همچنین ایجاد تاخوردگی مناسب در پروتئین تخلیص شده، از بافر فرمولاسیون حاوی ۱۰ میلی‌مولار تریس، ۳۰ میلی‌مولار مانیتول و ۱٪۰/۰ به- نسبت حجمی/ حجمی توین ۲۰ استفاده گردید. افزودن بافر به محلول پروتئینی به آرامی صورت گرفته تا محلول ۱۰۰ بار رقیق‌تر شود، در نهایت محلول به دست آمده توسط فیلتر آمیکون برای افزایش غلظت پروتئین در محلول مورد فیلتراسیون قرار گرفت. از فیلتر آمیکون به دلیل قابل استفاده بودن این فیلتر در سانتریفیوژ و همچنین این فیلتر با اندازه‌های 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 آمده گردیده و در مرحله بعدی، ۲۰ میکرولیتر از هر رقت به ۹۸۰ میکرولیتر از نشانگر استاندارد برادفورد اضافه گردیده و جذب نور در ۵۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Jenway 6310 اسپکتروفوتومتر) خوانده شد. سرانجام، برای هر غلظت شناخته شده پروتئین آلبومین، جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد خوانش قرار گرفته و مقدار غلظت پروتئین و جذب نور در ۵۸۰ نانومتر نمودار

خالص سازی پروتئین و بیریوبلاک

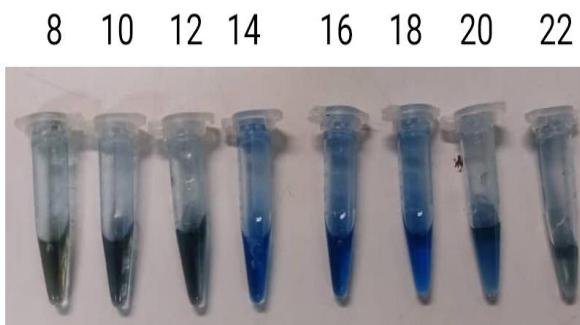
برای بررسی و تأیید اولیه تخلیص پروتئین در هنگام خالص سازی می‌توان از تست برادفورد استفاده کرد. این تست وجود پروتئین در محلول را با تغییر رنگ محلول نشان می‌دهد، البته این تست غیراختصاصی و وجود هر پروتئینی را نشان می‌دهد، در واقع این مرحله بهمنظور مشاهده خروج پروتئین برای نمونه‌گیری صورت گرفته است. در 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 SDS-PAGE قابل مشاهده است.



شکل ۳- تأیید موفقیت آمیز بودن ترانسفورم وکتور به باکتری میزان. 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.

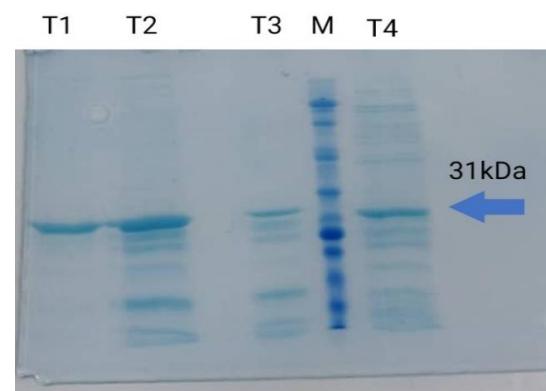
بیان پروتئین و بیریوبلاک

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



شکل ۵- تغییر رنگ از آبی کمرنگ تا آبی پررنگ توسط محلول برادفورد 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 خالص سازی 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

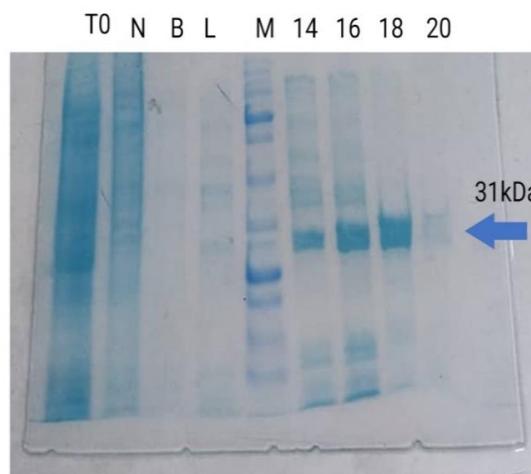


شکل ۴- نتیجه بررسی بیان پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE. نمونه‌گیری از محیط هر یک ساعت یکبار برای یافتن بهترین میزان بیان مورد بررسی قرار گرفت. خط M مارکر وزن مولکولی ۱ کیلو Daltonی است. نمونه T1 بیان پروتئین در ساعت اول بعد از القا بیان است. نمونه T2 نمونه در ساعت دوم پس القا، نمونه T3 نمونه در ساعت سوم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

به دست آمده. در نهایت با بررسی پروتئین توسط وسترن بلات و الایزا نشان داده شده که پروتئین حاصل به خوبی توسط آنتی بادی های پلی کلونال تشخیص داده می شوند (۲۶). از جمله مطالعه های مشابه دیگر می توان به مطالعه Kazemian و همکاران در سال ۲۰۱۲ اشاره کرد در این مطالعه برای جداسازی ژن flaA از محتوای کل ژنوم pGEX4T1 استفاده ویبریوکلرا از بیوتیپ اینبا از روش CATB/NaCl انجام شده و پس از آن با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز قطعه ژنوم flaA تکثیر گردیده که به منظور سهولت در کلونینگ ژن دو جایگاه برش آنزیم Bam HI و XhoI در ابتدا و انتهای قطعه ژنومی تعییه شده است. پس از آن ژنوم flaA تکثیر شده به درون پلاسمید pGEX4T-1 کلون و pGEX4T-1 پلاسمید نهایی به درون میزبان باکتریایی *E. coli DH5α* ترانسفورم شده است، ترانسفورم به میزبان *E. coli DH5α* به منظور از دیاد پلاسمید صورت گفته است. در نهایت پس از از دیاد پلاسمید توسط میزبان باکتریایی پلاسمید از رسوپ خشک باکتری توسط کیت استخراج پلاسمید، استخراج شده و به میزبان باکتریایی *E. coli BL21* ترانسفورم شده و به منظور القاء بیان پروتئین از (DE3) غلظت ۱ میلی مolar IPTG استفاده شده است. در نهایت پروتئین بیان شده توسط کیت استخراجی G.S.T خالص سازی شده، پس از آن به منظور بررسی قدرت ایمنی زایی این پروتئین نوترکیب به مدل آزمایشگاهی رت تزریق گردیده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد بیان پروتئین موردنظر موفقیت آمیز بوده و همچنین تزریق این پروتئین به حیوانات آزمایشگاهی، نشان داده که این پروتئین از قدرت آنتی ژنیسته بالایی برخوردار است (۲۷).

از دیگر مطالعه های مشابه می توان به مطالعه Amerian and Hemicarans در سال ۲۰۱۸ اشاره کرد. در این مطالعه با بررسی بیوانفورماتیکی، ابتدا توالی کامل ژن tcpA از سایت GeneBank استخراج گردیده و کدون های طبیعی این قطعه ژنی توسط آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور بررسی محتوای GC tcpA ژن، وجود کدون های نادر و همچنین بررسی سازگاری کدون CAI مورد بررسی قرار گرفته که هدف از این مرحله بهینه سازی کدون های ژن tcpA و تبدیل این کدون ها به کدون های رایج در *E. coli* است. همچنین در این طراحی دو جایگاه برش آنزیم HindIII و XbaI نیز تعییه گشته که پس از اتمام مرحله بیوانفورماتیکی سازه طراحی شده توسط شرکت Biomatik در بدنه (+) pET32a (+) کلون گردیده است. پس

ویبریوکلرا، پروتئین TcpA را هدف قرار داده اند. در این مطالعه ابتدا ژنوم TcpA را از سویه EL-Tor را با واکنش زنجیره ای پلی مراز تکثیر کرده و سپس در ژنوم تکثیر یافته را در بدنه میزبان باکتریایی pGEX4T1 کلون کرده اند. در نهایت پس از بیان پروتئین توسط میزبان باکتریایی GST پروتئین موردنظر توسط ستون کروماتوگرافی خالص سازی شده است (۲۸). از دیگر مطالعه ها در زمینه استفاده از پروتئین نوترکیب به عنوان کاندید واکسن و با می توان به مطالعه Mattos و همکاران در سال ۲۰۰۲ اشاره کرد که در این مطالعه هدف دست یابی به پروتئین نوترکیب زیر واحد B توکسین وبا است. در این مطالعه ژنوم حاوی ۶ توالی هیستیدین تک با طول ۳۵۹ جفت باز طراحی گردیده که این ژنوم در مرحله بعد توسط واکنش E.coli زنجیره ای پلی مراز تکثیر و در میزبان باکتریایی کلون و بیان پروتئین در فرم محلول توسط این میزبان صورت گرفته است. همچنین به منظور خالص سازی پروتئین



شکل ۶- نتیجه بررسی نمونه های خروجی از ستون کروماتوگرافی توسط ژل ۱۲٪ SDS-PAGE. نمونه T0 نمونه گرفته شده از پیش کشته که فاقد بیان بوده، نمونه N نمونه جمع آوری شده از محلول رویی بعد از القای ۴ ساعت، نمونه B نمونه جمع آوری شده از رسوپ بعد از سونیکاسیون، خط M مارکر وزن مولکولی ۱ کیلو دالتونی و نمونه ۱۴ تا ۲۰ نمونه های جمع آوری شده از خروجی ستون بعد از شستشو با شب غلظتی ایمیدازول. همان طور که مشاهده می شود نمونه های جمع آوری 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 کیلو دالتونی است.

موردنظر از ستون کروماتوگرافی نیکل-سفاروز استفاده شده که پس از خالص سازی با بررسی توسط تست برادفورد میزان ۱۳ میلی گرم از پروتئین خالص سازی شده در محیط

نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده پروتئین کایمیریک، ۳۱ کیلو دالتونی است، این پروتئین به میزان ۱ میلی گرم در طی این مطالعه خالص سازی 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، با بت تمامی تلاش‌ها و کمکهایشان در حین انجام این پژوهش، کمال تشکر و قدردانی می‌گردد. این مطالعه با حمایت‌های دانشگاه صنعتی مالک اشتر صورت پذیرفته است.

از آن پلاسمید به باکتری میزبان *E. coli DH5α* به منظور ازدیاد پلاسمید و ژنوم موردنظر ترانسفورم شده و در نهایت 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 غلاظت ۱ میلی مولار IPTG صورت گرفته است. در نهایت به منظور خالص سازی پروتئین تولید شده در فرم دناتوره از ستون نیکل-سفاروز استفاده شده است. در نهایت با استفاده از وسترن بلاست بیان پروتئین و صحت آن تأیید گردیده است. در این مطالعه پروتئین حاصل به عنوان 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. خالص سازی 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 کایمیریک و طراحی پروتئین کایمیریک و هدف قرار دادن تعداد بیشتری از پروتئین‌ها با قدرت ایمنی‌زایی اشاره کرد. در مطالعه حاضر با هدف کلون، بیان و تخلیص پروتئین ویربیولاک که می‌تواند کاندید واکسن برعلیه وبا pET23a باشد، در ابتدا وکتور طراحی شده‌ای که، در بدنه قرار گرفته است به منظور ازدیاد وکتور به میزبان باکتریایی *DH5α* ترانسفورم شده است، سپس به منظور القاء بیان پروتئین پس از استخراج پلاسمید از میزبان باکتریایی *DH5α* و انجام هضم آنزیمی برای تأیید قطعه کلون شده و سازه طراحی شده، پلاسمید به باکتری مستعد بیانی *E. coli DE3 Rossetagami* آن برای القای بیان پروتئین، از غلاظت ۱ میلی مولار IPTG استفاده شده است. در نهایت تخلیص پروتئین توسط ستون کروماتوگرافی نیکل سفاروز صورت گرفته است. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش و توانایی ایجاد پروتئین نوترکیب و خالص به میزان ۱ میلی گرم می‌توان، این پروتئین تخلیص شده می‌تواند کاندید مناسبی برای بررسی‌های بیشتر در زمینه ایمنی‌زایی باشد.

نتیجه‌گیری

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 Medicine*2006.
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.

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

.