



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

Mohammadali Yaghobi Moghaddam, Alireza Saedinia, 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 خالص سازی پروتئین ویبریوبلاک به عنوان کاندید بر علیه 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 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.

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 ارگانسیم‌های 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 مولکول‌های DNA نوترکیب به سلول‌های میزبان وارد شده و توسط سیستم تکثیر ارگانسیم میزبان، تکثیر می‌گردند، در واقع مولکول DNA نوترکیب، ترکیبی از DNA خارجی و DNA ارگانسیم میزبان است (۲). ظهور DNA نوترکیب در واقع ابزار مقرون به صرفه‌ای را برای تولید پروتئین فراهم آورد به نحوی 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

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 و ویبریولکرا مورد هدف قرار گرفته شده، در واقع شاخصه اصلی انتخاب پروتئین سطحی بودن و ترشحاتی بودن آن بوده است. در نهایت توالی آمینواسیدی این اپی-توپ‌ها به صورت توالی ژنتیکی ترجمه گردیده و اپی-توپ‌هایی کاندید به صورت سازه‌ای پلی‌تویی کایمریک سنتتیک 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 mM Tris-HCl, pH ۸/۰، ۰/۱ mM EDTA-tris (۱۰) 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 مورد نظر

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 به مدت یک ساعت این فرآیند انجام شده است.

ترانسفورم پلاسمید به باکتری مستعد *E. coli DE3Rossetagami*

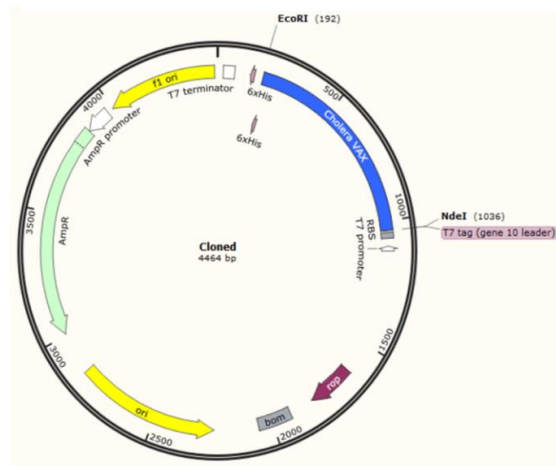
برای بیان پروتئین ویبریولاک پس از تأیید سازه در مرحله قبلی استخراج پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید PrimePrep از شرکت jenetbio طبق پروتکل مربوطه صورت گرفته و سپس ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید به باکتری مستعد بیانی *E. coli DE3Rossetagami* با استفاده از روش شوک حرارتی ترانسفورم شده است. آماده‌سازی باکتری مستعد بیانی *E. coli DE3Rossetagami* طبق پروتکل شیمیایی کلسیم کلراید صورت گرفته است (۲۳). برای تأیید موفقیت آمیز بودن ترانسفورم، با توجه به ژن مقاومت به 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 (۴،۵). 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 بسیار گسترده‌ای قرار گرفته به نحوی که 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 آنتی‌ژنیک واحد اساسی است که یا یک پاسخ ایمنی سلولیا هومورال ایجاد می‌کند. یک واکسن چند اپی‌تویی متشکل از یک سری پپتید است که یک روش ایده‌آل برای پیشگیری و درمان تومورها، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی است (۱۷-۱۵). ویبریولکرا 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 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 دوز کافی و ... است. در مطالعه حاضر هدف کلون، بیان و خالص‌سازی پروتئین کایمریک سنتتیک ویبریولاک 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 به منظور بررسی‌های بیشتر در زمینه تولید واکسن به شیوه معکوس است.

مواد و روش‌ها

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

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 دو سمت قطعه کلون شده در نظر گرفته شده که این دو جایگاه برای آنزیم‌های *EcoRI* و *NdeI* است.

بیان پروتئین ویبریولاک

به‌منظور بیان پروتئین ویبریولاک، 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) آنکوبه شد، تا زمانی که محیط به ۰/۷ OD تا ۰/۸ برسد. سرانجام، پس از رسیدن به OD مذکور با افزودن ۱ میلی‌مولار IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid) (سینا کلون) القاء صورت گرفته است. شرایط بیان پروتئین به صورت ذکر شده در ادامه است که منجر به تولید آنکلوژن بادی شده است، شرایط بیان در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه و به مدت ۴ ساعت صورت گرفته است. سرانجام به‌منظور استخراج آنکلوژن بادی از محیط کشت، از سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت 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 آکریل‌امید (SDS-PAGE) ابتدا ژل SDS-PAGE ۱۲/۵٪ با توجه به روش Laemmli-SDS-PAGE تهیه گردیده و بیان پروتئین با روش رنگ‌آمیزی کماسی بلو مورد آنالیز قرار گرفته است (۲۴).

خالص‌سازی پروتئین ویبریولاک

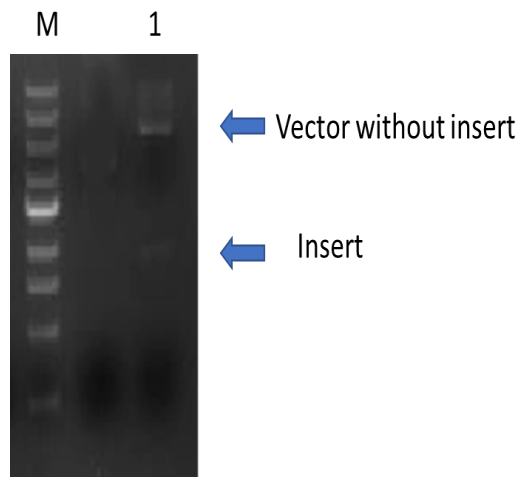
پس از تأیید پروتئین بیان شده توسط SDS-PAGE به منظور تخلیص پروتئین از ستون کروماتوگرافی نیکل سفاروز (Ni-NTA) جریان سریع استفاده گردیده است. شرایط کشت مشابه مرحله قبل ولی در حجم ۵۰۰ میلی-لیتر صورت گرفت. این شرایط منجر به تولید پروتئین به شکل آنکلوژن بادی شده که، برای استخراج آنکلوژن بادی از محیط کشت، محیط کشت باکتری با استفاده از سانتریفیوژ با برنامه ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ 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 به مدت 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، pH ۸) حل شده است. این بافر آنکلوژن بادی‌ها را حل کرده و برای حذف دیگر بخش‌های سلولی، محلول در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه مورد سانتریفوژ قرار گرفت. محلول رویی این مرحله که حاوی آنکلوژن بادی مورد نظر 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 بدین‌منظور 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

ایجاد می کنند. در نتیجه، غلظت نهایی پروتئین می تواند با استفاده از نمودار ترسیم شده تعیین شود.

نتایج

هضم آنزیمی به منظور تأیید سازه مورد نظر

برای انجام فرآیند دابل دایجست براساس جایگاه برش آنزیمی تعبیه شده در وکتور مورد نظر 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 دوباند 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 مورد بررسی قرار گرفت. در شکل ۲ می توانید نتیجه هضم آنزیمی برای تأیید سازه مورد نظر 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 آنتی بیوتیک آمپی سیلین به عنوان مارکر انتخابی برای رشد تنها باکتری هایی است که پلاسمید را دریافت کرده اند چرا که، پلاسمید طراحی شده حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین است. نتیجه کشت بر روی محیط LB آگار در شکل ۳ قابل مشاهده است.

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

تاخوردگی مجدد و فرمولاسیون پروتئین

به منظور حذف اوره از محیط و هم چنین ایجاد تاخوردگی مناسب در پروتئین تخلیص شده، از بافر فرمولاسیون حاوی (۱۰ میلی مولار تریس، ۳۰ میلی مولار 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 رقیق تر 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 هم چنین این فیلتر با اندازه ای 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 غلیظ سازی 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 همین طور یک نمودار استاندارد برای تعیین رقت سریال از یک پروتئین تجاری تهیه شد که، یک سری رقت از پروتئین آلبومین از ۱ میلی-گرم در میلی لیتر تا ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر آماده 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 ویبریولاک

برای بررسی و تأیید اولیه تخلیص پروتئین در هنگام خالص سازی می توان از تست برادفورد استفاده کرد. این تست وجود پروتئین در محلول را با تغییر رنگ محلول نشان می دهد، البته این تست غیراختصاصی و وجود هر پروتئینی را نشان می دهد، در واقع این مرحله به منظور مشاهده خروج پروتئین برای نمونه گیری صورت گرفته است. در شکل ۵ تست برادفورد صورت گرفته در این مرحله که نشان دهنده وجود پروتئین در محلول در هنگام تخلیص است قابل مشاهده است. هم چنین در شکل ۶ نتیجه بررسی نمونه های جمع آوری شده پس از تخلیص را در ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ قابل مشاهده است.

بحث

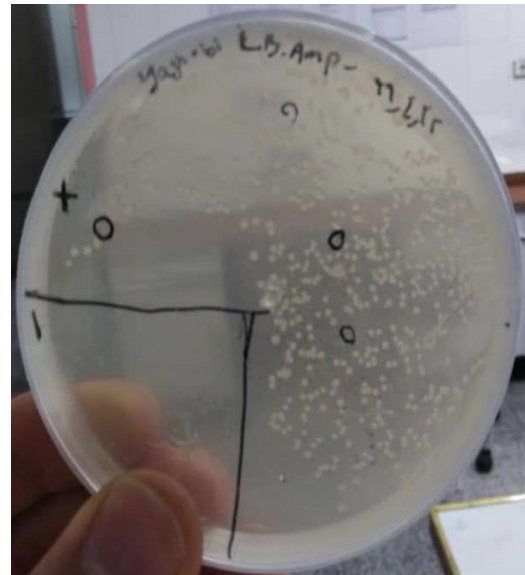
با کشف و پیشرفت بشر در زمینه کلون کردن یک ژن در میزبان باکتریایی، تولید پروتئین نوترکیب، زمینه ای جدید از توسعه داروها و واکسن ها ایجاد شده است. استفاده از پروتئین های نوترکیب در درمان بیماری ها، ریشه ای دیرینه در تاریخ بشریت دارد به نحوی که اولین بار در سال ۱۹۸۲ انسولین با موفقیت توسط تکنیک های ذکر شده تخلیص و مورد استفاده قرار گرفت (۴). استفاده از پروتئین های نوترکیب تنها محدود به درمان بیماری ها نیست، بلکه در

8 10 12 14 16 18 20 22



شکل ۵- تغییر رنگ از آبی کم رنگ تا آبی پررنگ توسط محلول برادفورد در بعضی از نمونه های جمع آوری شده از خروجی ستون نشان دهنده وجود پروتئین در محلول خروجی بوده. نمونه ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰ و ۲۲ در واقع خروجی های ستون بعد از تلقیح پروتئین به منظور خالص سازی هستند.

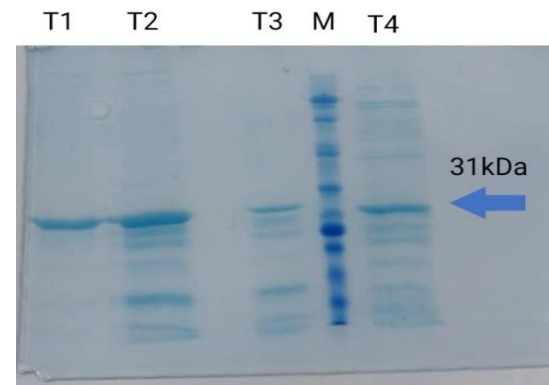
طی سال های اخیر تحقیقات گسترده ای در زمینه پیشگیری از بیماری ها به وسیله پروتئین های نوترکیب گزارش شده است. در مطالعه ای در سال ۲۰۱۴، Kiaie و همکاران به منظور دستیابی به کاندید واکسنی علیه



شکل ۳- تأیید موفقیت آمیز بودن ترانسفورم وکتور به باکتری میزبان. همان طور که مشاهده می شود تمامی کلونی های رشد کرده بر سطح محیط کشت دارای پلاسمید مورد نظر بوده و در بخش کنترل منفی کلونی مشاهده نگردیده است.

بیان پروتئین ویبریولاک

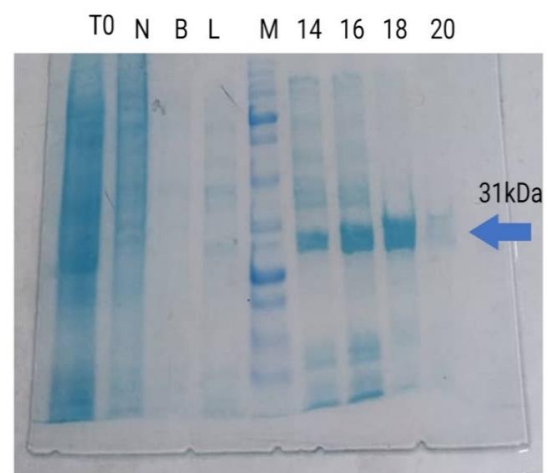
بررسی بیان پروتئین توسط ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ صورت گرفته که نتیجه آن در شکل ۴ قابل مشاهده است. همانطور که مشاهده می گردد پس از گذشت ۴ ساعت از القا توسط IPTG میزان بیان پروتئین مناسب برای تخلیص بوده است.



شکل ۴- نتیجه بررسی بیان پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲/۵. نمونه گیری از محیط هر یک ساعت یکبار برای یافتن بهترین میزان بیان مورد بررسی قرار گرفت. خط M مارکر وزن مولکولی ۱ کیلو دالتونی 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 الیزا نشان داده شده که پروتئین حاصل به خوبی توسط آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تشخیص داده می‌شوند (۲۶). از جمله مطالعه‌های مشابه دیگر می‌توان به مطالعه Kazemian و همکاران در سال ۲۰۱۲ اشاره کرد در این مطالعه برای جداسازی ژن *flaA* از محتوای کل ژنوم ویبریولکرا از بیوتیپ اینابا از روش CATB/NaCl استفاده شده و پس از آن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز قطعۀ ژنوم *flaA* تکثیر گردیده که به منظور سهولت در کلونینگ ژن دو جایگاه برش آنزیم Bam HI و XhoI در ابتدا و انتهای قطعۀ 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* به منظور ازدیاد پلاسمید صورت گرفته 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 به منظور القاء بیان پروتئین از غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG استفاده شده است. در نهایت پروتئین بیان شده توسط کیت استخراجی G.S.T خالص‌سازی شده، پس از آن به منظور 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 قطعۀ ژنی توسط آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور 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 XhoI نیز تعبیه گشته که پس از اتمام مرحله بیوانفورماتیکی سازه طراحی شده توسط شرکت Biomatik در بدنه pET32a(+) کلون گردیده است. پس

ویبریولکرا، پروتئین *TcpA* را هدف قرار داده اند. در این مطالعه ابتدا ژنوم *TcpA* را از سویه EL-Tor با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر کرده و سپس در ژنوم تکثیر یافته را در بدنه میزبان باکتریایی pGEX4T1 کلون کرده‌اند. در نهایت 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 به عنوان 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 پلی‌مرز تکثیر و در میزبان باکتریایی *E. coli* کلون و بیان پروتئین در فرم محلول توسط این میزبان صورت گرفته است. همچنین به منظور خالص‌سازی پروتئین



شکل ۶- نتیجه بررسی نمونه‌های خروجی از ستون کروماتوگرافی توسط ژل SDS-PAGE ۱۲/۵٪. 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 کیلو دالتونی 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

از آن پلاسمید به باکتری میزبان *E. coli DH5a* به منظور ازدیاد پلاسمید و ژنوم مورد نظر 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 نو ترکیب است، هم‌چنین القاء بیان با استفاده از غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG صورت گرفته است. در نهایت به منظور خالص‌سازی پروتئین تولید شده در فرم دنا توره از ستون نیکل-سفاروز استفاده شده است. در نهایت 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-سفاروز 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 به منظور ازدیاد وکتور به میزبان باکتریایی *DH5a* ترانسفورم شده است، سپس به منظور 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. در نهایت تخلیص پروتئین توسط ستون کروماتوگرافی نیکل سفاروز صورت گرفته است. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش و توانایی ایجاد پروتئین نو ترکیب 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.

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. Buonaguro L, 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. Neopeptides 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, Baik Y, 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-protocol* Bio101: 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