مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم ، شماره بیست و یکم - زمستان ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

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

محمد ابوطالب[1*]، هاتف آجودانی فر[1]

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 ازمیزبان 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 *Kpn*I و *Sal*I 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:

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. این پروتئین ها به وسیله ژن های *cyo*، *lef* 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

* 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.7.6]

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 µ g/ml) و کانامایسین(۱۰µg/ml) (Sigma, USA) کشت داده شدند. پلاسمید های مورد استفاده عبارت بود ند 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 pMNA۱ حامل ژن *PA* جهت جدا سازی ژن *PA* استفاده شد. استخراج و خالص سازی پلاسمید باکتری به روش استاندارد Choloform و Phenol با کمی تغییر انجام گرفت. جهت جدا کردن ژن *PA* پرایمر Fn با ترادف بازی ۵GTAGGTACCTAAAAGGAGAACGTATATGA۳ و پرایمر Rn با ترادف بازی۵TAGTCGACTGTTTAAAACA TACTCTCCTTG۳طراحی گردیدند. به منظور ایجاد جهش مورد نظر در قطعه به دست آمده از پرایمر های R۱ با ترادف بازی ۵pTGGTGAGTTCGAAGATTTTTGTTTTAATTCT GG ۳و پرایمر H۲ با ترادف بازی pGGAAGTGGAAGATCAGC

۳ AAGTACAAGTGCTGGACCTACGGTTCCAG استفاده شد. با انجام واکنش PCR و با استفاده از پرایمر های Fn و R۱ قطعه حد واسط اول (با طول تقریبی ۶۰۰bp) و با پرایمر های Rn و H۲ قطعه حد واسط دوم (با طول تقریبی ۱۸۰۰bp) به دست آمد. جهت تکثیر قطعات حد واسط از آنزیم Ex Taq DNA Plymerase استفاده 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 Fn وRn و آنزیم DNA Polymerase EX Taq استفاده گردید.

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

جهت تهیه *E.coli* حاوی ژن PA، واکنش اتصال (Ligation) بین ۵۰۰ng 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)، X_ 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، T.vector این ژن با آنزیم های *Kpn*I و *Sal*I 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 (۱۰µg/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 PMNA۱ 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. (شکل۲ و ۳) دو قطعه به دست آمده با توجه به ترادف بازی پرایمر های R۱ وH۲ مکمل یکدیگر می باشند، دارای منطقه هم پوشان به طول ۱۷bpهستند. 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(شکل۴). از انتقال واکنش اتصال بین محصول PCR و T.Vector و کشت روی

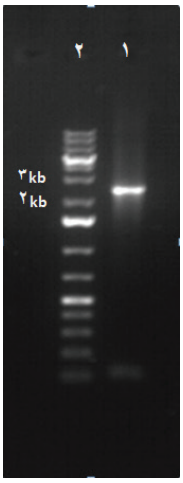
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.7.6]

LB آگار حاوی X_gal، IPTG 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 (شکل۵). پس از تعیین سکانس و با توجه به بررسی آن تغییر در موقعیت اسید آمینه ۱۹۴ تایید گردید.

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

ژن *PA* جهش یافته به وسیله هضم آنزیمی با آنزیم های *Kpn*I و*Sal*I از پلاسمید PTZ۵۷R جدا و به وسیله کیت، خالص سازی گردید(شکل ۶). پلاسمید pWB۹۸۰ نیز جدا گانه به وسیله آنزیم های*Kpn*I و *Sal*I 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 *Sal*I پلاسمید حامل ژن *PA* جهش یافته جدا سازی شد (شکل ۷).



شکل۱. ژل الکتروفورز *PA* تکثیر شده توسط PCR و خالص شده از روی ژل الکتروفورز

ستون ۱: مارکر ۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

ستون۲: محصول PCR انجام شده برروی پلاسمید pWB۹۸۰ حاصل جفت پرایمر Fn و Rn

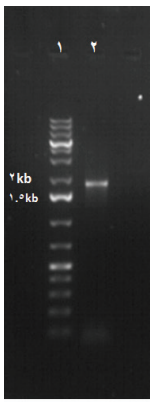


شکل۲. ژل الکتروفورز قطعه حد واسط اول، جدا شده توسط PCR بطول۶۰۰bp

ستون ۱: مارکر ۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

ستون۲: الکتروفورز محصول PCR حاصل از جفت پرایمر Fn و R۱

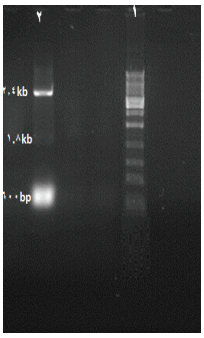


شکل۳. ژل الکتروفورز قطعه حد واسط دوم، جدا شده توسط PCR بطول ۱۸۰۰b

ستون ۱: مارکر ۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

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

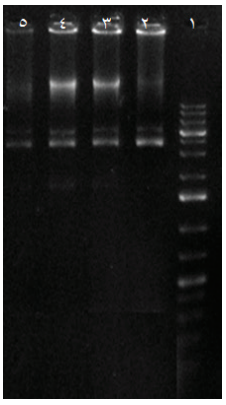


شکل۴. ژل الکتروفورز اتصال ۲ قطعه حدواسط اول و دوم توسط PCR و تشکیل باند۲۴۰۰bp

ستون ۱: مارکر ۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

ستون ۲: محصول PCR اتصال ۲ ژن ۶۰۰bp و۱۸۰۰bp



شکل۵. ژل الکتروفورز T.vector استخراج شده از *E.coli*

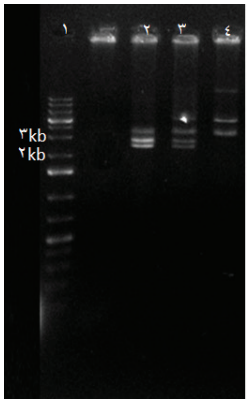
ستون ۱: مارکر۱kb

(۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific)

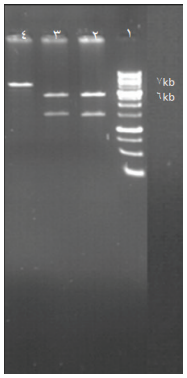
ستون ۵-۲: استخراج T.vector

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.7.6]



شکل۶: هضم آنزیمی پلاسمید PTZ۵۷R به وسیله آنزیم های *Sal*I و*Kpn*I
ستون ۱: مارکر (۱kb OGene Ruler,Thermo Scientific) ۱kb
ستون ۲ و ۳: برش دو آنزیمی انجام شده توسط ۲ آنزیم *Kpn*I و *Sal*I
ستون ۴: T.Vector برش نخورده



شکل۷. ژل الکتروفورز پلاسمید استخراج شده pWB۹۸۰ حاوی ژن *PA* و محصول برش تک آنزیمی پلاسمید pWB۹۸۰ 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 pWB۹۸۰ حاوی ژن

بحث:

سولیوان (Sulivan) و همکاران در سال ۱۹۸۴ روش جدا سازی پلاسمید از باسیلوس را بر پایه استفاده از شیب غلظتی سزیوم کلراید- اتیدیوم 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

۵GTA GGT ACC TAA AAA GGA GAA CGT ATA TGA۳

و

۵ TAG TCG ACT GTT TAA AAC ATA CTC TCC TTG۳

به منظور تکثیر و از پرایمر های فسفریله با توالی

۵pTGGTGAGTTCGAAGATTTTTGTTTTAATTCTGG۳

و۵pGGAAGTGGAAGATCAGCAAGTACA

AGTGCTGGACCTACGGTTCCAG۳

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 CaCl۲ استفاده شد.

کارایی ترانسفورماسیون مربوط به DNA پلاسمیدی Ligate شده، به درون سلول های مستعد باسیلوس سوبتیلیس شدیدا 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.7.6]

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< i> Bacillus subtilis</i> and< i> Escherichia coli</i> 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.7.6]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.7.6]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]