NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/42 , 2021

Scan online to view this article

PCR and cloning of the *lcs* chimeric gene in pcDNA3.1 vector and its expression in the cell line

Sepideh Saroughi[1] , Maryam Zare[2] , Rouhollah Kazemi[3] , Mohammad-Javad Motamedi[3] , Jafar Amani[4]

1- Department of Genetics, Payam Noor University, Tehran, Iran.
2- Department of Biology, Payam Noor University , Tehran, Iran.
3- Green Gene Company, Tehran, Iran
4- Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Diarrhea is the second most common cause of under-5 mortality. The most important strains of *Entrotoxigenic Escherichia coli* causing Lt and St toxin cause diarrhea and *Entrohemoragic E.coli* causing Shiga-like toxin secretion. Chlorine enterotoxin B subunit (Ctx) plays a key role in the development of diarrhea in Vibrio cholerae. More specific antibodies could be developed to counter these toxins by combining the CtxB, LtB and StB (LSC) epitopes and the production of trivalent vaccine. The aim of this study was to cloning *lsc* gene into pcDNA3.1 to design a vaccine DNA.

Materials and Methods: The *lsc* gene sequence was transferred to pcDNA3.1(+) vector after primer design and amplification by PCR. The pcDNA3.1(+) vector and the PCR product were digested using *Hind*III and *Eco*RI enzymes. Cloning of *lsc* gene was performed in pcDNA3.1(+) vector and PCR. The clones were digested enzymatically. To ensure expression of lsc gene, it was transferred to HEK-293T cell and confirmed by Western blotting.

Results: The *lsc* gene was confirmed by PCR and cloning in pcDNA3.1(+) vector using enzymatic digestion and a fragment length of 933 bp was detected and confirmed. Transfection kit was then transferred to HEK-293T cell and expression of the recombinant protein was confirmed by Western blotting and the protein was 39 kDa.

Conclusion: The results of the chimeric gene are well expressed in the cell line and confirmed by Western blotting that can be a good candidate for the fight against bacterial infection.

Keywords: Cloning, *lsc* gene, DNA vaccine, IAU science

Corresponding author:
Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: jafar.amani@gmail.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۲ - بهار ۱۴۰۰
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تکثیر و همسانه سازی ژن سه قسمتی *lsc* در وکتور pcDNA3.1 و بررسی بیان آن در لاین سلولی

سپیده ساروقی[۱]، مریم زارع[۲]، روح الله کاظمی[۳]، جواد معتمدی[۳]، جعفر امانی[۴*]

۱- گروه ژنتیک، دانشگاه پیام نور واحد ری، تهران، ایران.
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور تهران، ایران.
۳- شرکت ژن سبز، تهران، ایران.
۴- انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: اسهال دومین عامل رایج مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال است. مهم‌ترین سویه‌های بیماری‌زایی *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک با تولید سم Lt و St موجب بیماری اسهال مسافران و *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک با ترشح سم شبه شیگا موجب اسهال خونی می‌شود. زیرواحد B انتروتوکسین کلره در باکتری *ویبریوکلرا* در ایجاد بیماری اسهال نقش به‌سزایی دارد.به‌احتمال با ترکیب اپی-توپ‌های CtxB، LtB و StB (LSC) و تولید واکسن تری والان می‌توان آنتی‌بادی اختصاصی تری برای مقابله با این سموم ایجاد کرد. هدف از این تحقیق تکثیر ژن کایمر *lsc* جهت کلونینگ در وکتور pcDNA3.1(+) به‌منظور طراحی DNA واکسن و بررسی بیان در وکتور یوکاریوتیک است.

مواد و روش‌ها: توالی ژن *lsc* پس از طراحی پرایمر و تکثیر به‌وسیله PCR به وکتور pcDNA3.1(+) منتقل شد. وکتور pcDNA3.1(+) و محصول PCR با استفاده از آنزیم *Hind*III و *Eco*RI مورد هضم قرار گرفت. کلونینگ ژن *lsc* در وکتور pcDNA3.1(+) و PCR انجام شد. کلون‌ها مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. جهت اطمینان از بیان ژن *lsc* به سلول HEK-293T منتقل و با استفاده از روش وسترن بلاتینگ مورد تأیید قرار گرفت.

یافته‌ها: ژن *lsc* پس از PCR و کلونینگ در وکتور pcDNA3.1(+) با استفاده از هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت و قطعه‌ای به‌طول ۹۳۳ bp رویت و تأیید شد. سپس با استفاده از کیت توربوفکت به سلول HEK-293T منتقل و بیان پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلاتینگ مورد تأیید قرار گرفت و پروتئین به وزن ۳۹ کیلودالتون تأیید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده از ژن کایمر به‌خوبی در لاین سلولی بیان و توسط وسترن بلاتینگ تأیید شد که می‌تواند کاندید مناسبی برای مقابله با عفونت باکتریایی باشد.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، ژن *lsc*، DNA واکسن، IAU science

مقدمه

علی‌رغم پیشرفت‌های فراوان در زمینه بهداشت، هنوز هم بیماری‌های اسهالی، از مهم‌ترین عوامل ایجاد مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه هستند (۱). حدود ۱/۷ تا ۵ میلیارد مورد اسهال درسال رخ می‌دهد(۳،۲).

نویسنده مسئول:
انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.
پست الکترونیکی: jafar.amani@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۱

کودکان به‌طور متوسط ۳ بار در سال اسهال می‌گیرند (۳). از سال ۲۰۱۲، این بیماری دومین عامل رایج مرگ و میر در کودکان زیر پنج سال در سطح جهان است (۱۱٪) (۱،۴). از میان عوامل باکتریایی مؤثر در بروز عفونت‌های روده‌ای می‌توان به گونه‌های مختلف *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*)، *ویبریو* (*Vibrio*)، *کمپیلوباکتر* (*Campylobacter*)، *شیگلا*(*Shigella*) و *سالمونلا* (*Salmonella*) اشاره کرد (۵). در این میان *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک (*Entrohemoragic E.coli*) و *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک (*Entrotoxigenic E.coli*) و *ویبریوکلرا* (*Vibrio cholerae*) از عوامل عمده و مهم در ایجاد اسهال اندمیک و اپیدمیک از طریق تولید سم در سراسر دنیا هستند (۶). در دهه‌های اخیر چندین مورد شیوع *اشریشیاکلی* O157:H7، شایع‌ترین سوش *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* (EHEC) در سطح جهان گزارش شده است (۷،۸). علاوه‌بر *اشریشیاکلی* سالانه کمابیش ۴/۳-۱/۴ میلیون مورد ابتلا به کلرا گزارش می‌شود که به ۲۸۰۰۰ تا ۱۴۲۰۰۰ مرگ در جهان ختم می‌شود (۹). *اشریشیاکلی* یک کوکوباسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه و ساکن روده انسان و حیوان می باشد. این باکتری از طریق مسیر مدفوعی-دهانی از یک فرد به فرد دیگر منتقل می‌شود (۷). سم کلرا (*Ctx*) بر روی کروموزوم باکتری قرار دارد. این سم پس از پیدا کردن ساختار سه بعدی صحیح در فضای پری‌پلاسمی باکتری، توسط سیستم‌های ترشحی غشای خارجی به فضای داخل روده ترشح می‌شود (۱۰). سم حساس در برابر حرارت (*lt*)، توسط باکتری *اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک* (ETEC) در فضای روده کوچک تولید می‌شود و دارای دو زیرواحد A (LtA) و زیرواحد B (LtB) است که LtB خاصیت اتصال سم به سلول‌های روده را برعهده دارد. دو زیرواحد، بعد از سرهم شدن در فضای پری‌پلاسمی و تشکیل کل سم، توسط دستگاه ترشحی تیپ دو به بیرون سلول ترشح می‌شوند (۱۰). سم شیگا (*stx*) پس از سر هم شدن از طریق لیز باکتریایی که توسط فاژ القا می‌گردد، به محیط آزاد شده و در سطح سلول-های یوکاریوتی مانند سلول‌های اندوتلیالی کلیه و رگ‌ها به میزان بالایی بیان می‌شود (۱۱). این سموم جزء خانواده سموم AB_5 بوده و دارای دو قسمت کاتالیتیکی (زیر واحد A) و متصل شونده به گیرنده (زیرواحد B) هستند (۱۲) که پس از اتصال به غشاء، از طریق اندوسیتوز وارد سلول میزبان شده و از طریق یک مسیر معکوس به شبکه آندوپلاسمی زبر منتقل می‌شوند و پس از خروج از آن، بیماری را القا می‌کنند (۱۳). هم‌چنین وجود هر دو زیر واحد برای ایجاد بیماری‌زایی الزامی است (۱۲). اصلی‌ترین و عمومی-ترین عامل بیماری و بروز اسهال، سموم AB_5 تولید شده توسط این باکتری‌ها است، ایجاد ایمنی بر علیه این سموم، تا حد زیادی مانع بروز بیماری و مشکلات سیستمیکی که در ادامه بیماری ایجاد می‌شوند، خواهد شد. انتخاب قسمت مناسب از سم که علاوه‌بر تحریک سیستم ایمنی باعث ایجاد سمیّت در فرد نشود، بسیار حائز اهمیت است. با توجه‌به ساختار شرح داده شده سموم AB_5 ، بهترین کاندیدای واکسن زیر واحد اتصالی سم یعنی زیر واحد B خواهد بود (۱۴). طیف وسیع تأثیرات سمی این سموم از اسهال خفیف مسافران تا اسهال جدی و گاهی مرگ‌آور که توسط ویبریوکلرا و سندرم اورمی همولیتیک که توسط گروه شیگا ایجاد می‌شود متغیر است (۱۲). توجه‌به این مسئله که یک بار ابتلا به این عفونت‌ها در بدن فرد ایجاد مصونیت می‌کند (۱۵)، نشان از کارایی واکسیناسیون برای ایجاد ایمنی و پیشگیری از این عفونت‌ها است. انتخاب یک کاندید واکسن مناسب که بتواند ایمنی حفاظت کننده‌ای علیه این باکتری‌ها ایجاد کند، می تواند تضمین کننده کارایی واکسن و سلامت جامعه باشد (۱۶). با توجه‌به اهمیت میزان شیوع بیماری اسهال حتی در جوامع توسعه یافته هم-چنین عوارض و درمان در این تحقیق پس از استخراج و تکثیر ژن مورد نظر به بررسی بیان در لاین سلولی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ژن کایمریک *lsc*

در این تحقیق از ژن کایمریک که توسط Kazemi و همکاران طراحی شده بود استفاده گردید (۱۷). توالی ژن موردنظر در بانک اطلاعاتی NCBI به شماره دسترسی JX866680 وجود دارد. ژن *lsc* حاوی ترادف ژن‌های *ltB*، *stxB* و *ctxB* مربوط به سویه های *Enterotoxigenic E. coli*،

Enterohemoragic E. coli و *Vibrio cholera* است.

تخلیص پلاسمید pET28a-*lsc*

کلون حاوی پلاسمید pET28a-*lsc* در محیط LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰µg/ml) کشت داده و به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار نگهداری شد. به‌منظور تخلیص پلاسمید محتویات لوله سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته و از رسوب باقی‌مانده جهت استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی از Plasmid DNA Extraction Kit طبق پروتکل شرکت Genet Bio استفاده شد: رسوب انتهایی به‌ترتیب در بافر معلق کننده و بافر لیزکننده حل و به آرامی ورتکس گردید. سپس بافر اتصال دهنده اضافه و محلول رویی به آرامی جدا شد.سپس محلول به ستون سیلیس اضافه و سانتریفیوژ شد. هم‌چنین بافر شستشو دهنده و بافر استخراج به ستون اضافه و سانتریفیوژ گردید. محلول به‌دست آمده که حاوی پلاسمید *lsc* است بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

تکثیر ژن کایمریک *lsc*

از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده با نرم‌افزار oligo 6 جهت تکثیر ژن کایمریک *lsc* استفاده شد. توالی پرایمر فرادست ATTATAAAGCTTATGGCCCCGCAGA GTATTA دارای جایگاه برش آنزیمی *Hind*III در ابتدای '۵ بود و توالی پرایمر فرودست ACTTACGAATTCTTAGTGATGGTGAT GGTGATG دارای جایگاه برش آنزیمی *Eco*RI در ابتدای '۵ طراحی و توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید. قابل ذکر است Tm پرایمرها به‌ترتیب ۶۲/۷ و۶۳/۲ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد. هم‌چنین پرایمرها از نظرعدم تشکیل حلقه (primer loop) و جفت شدن (primer Dimer) بررسی شدند. میزان و مواد لازم جهت انجام واکنش PCR شامل: ۱ میکرولیتر DNA الگو (۵۰ نانوگرم)، ۱میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱۰، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر فرادست (با غلظت اولیه ۱۰ پیکومول/ میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر فرودست (با غلظت اولیه ۱۰ پیکومول/ میکرولیتر)، آنزیم *Taq* DNA polymerase (۰/۵ میکرولیتر معادل یک واحد) و در نهایت حجم واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. طبق برنامه PCR دمای ذوب برای پرایمرها ۶۲/۷ و۶۳/۲ درجه سانتی‌گراد برای ازدیاد قطعه مورد نظر تنظیم گردید. پس از به‌دست آوردن دمای بهینه (گرادیان دمایی) واکنش فوق با آنزیم *Pfu* DNA polymerase که دارای خاصیت تصحیح کنندگی است، انجام شد. کلیه آنزیم‌ها از شرکت ترموساینتیفیک تهیه شده بود. نحوه اجرای هر چرخه PCR عبارت بود از: واسرشتگی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه واسرشتگی به‌مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و تکثیر۴۰ ثانیه در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد ودر نهایت تکثیر در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پس از تکثیر قطعه‌ژنی، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

همسانه‌سازی وکتور بیانی pcDNA3.1(+) و اتصال ژن *lsc*

وکتور pcDNA3.1(+) جهت آماده نمودن الحاق به ژن *lsc* با دو آنزیم *Eco*RI و *Hind* III به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت و بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. در نهایت قطعه به‌دست آمده از ژل جداسازی و با استفاده از Gel Purification Kit طبق پروتکل شرکت GeNet Bio تخلیص گردید. پس از انجام هضم آنزیمی روی وکتور و محصول PCR، الحاق قطعه هدف با پلاسمید برش خورده به نسبت یک به سه قطعه انجام گرفت. جهت اطمینان از واکنش لیگاسیون، یک واکنش شاهد (Control) نیز طراحی و آماده‌سازی شد که از هر جهت با واکنش تست یکسان بود با این تفاوت که به‌جای محصول PCR به واکنش آب مقطر افزوده شد. پس از آماده‌سازی، واکنش فوق به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

آماده‌سازی سلول مستعد TOP10

برای آماده‌سازی سلول مستعد، از روش استاندارد TFB استفاده گردید. سویه TOP10 از باکتری

E.coli در محیط LB مایع به‌صورت شبانه کشت داده شدند. پس از رسیدن کدورت محیط رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴ محیط سانتریفیوژ گردید و رسوب به‌ترتیب در محلول TFBI (KAC با غلظت نهایی ۳۰ میلی‌مولار، $MnCl_2.4H_2O$ غلظت ۵۰ میلی‌مولار، KCl غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، $CaCl_2.2H_2O$ غلظت ۱۰ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۵ درصد) و TFBII (MOPS با غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار، $CaCl_2.2H_2O$ غلظت ۷۵ میلی‌مولار، KCl غلظت ۱۰ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۵ درصد) استریل حل گردید و تا زمان مصرف در دمای ۷۰- درجه سانتی-گراد نگهداری شد. سپس ناقل نوترکیب به درون باکتری مستعد شده به روش شوک حرارتی انتقال داده شد. کلونی‌ها روی پلیت‌های LB حاوی آمپی-سیلین (غلظت ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) ظاهر شدند.

تأیید کلون های pcDNA3.1 حاوی ژن *lsc*

برای تأیید همسانه‌سازی ژن موردنظر از کلونی‌های تشکیل شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی از Plasmid DNA Extraction Kit طبق پروتکل شرکت Genet bio انجام و به‌عنوان الگو در واکنش PCR و هضم آنزیمی از *Eco*RI و *Hind*III استفاده شد. با استفاده از پرایمرهای T7 با توالی پرایمر رفت: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' و توالی برگشت: 5'- CCGCTGAGCAATAACTAGC-3' کلونی PCR در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

ارزیابی بیان ژن pcDNA3.1-*lsc* در سلول HEK293T

برای ارزیابی بیان پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *lsc* با استفاده از کیت TurboFect Transfection Reagent به سلول HEK293T (انستیتو پاستور ایران) ترانسفکت انجام شد. سلول‌های اپیتلیالی در کانفلوئنسی ۸۱ درصد پاساژ داده شد. جهت ترانسفکشن، از کیت تجاری TurboFect Transfection Reagent طبق پروتکل شرکت Thermo Fisher Scientific استفاده شد که بر مبنای روش‌های بیوشیمیایی عمل می‌نماید. پلیت حاوی سلول‌ها در انکوباتور قرار داده شد تا عمل انتقال توسط توربوفکت بعد از ۲۴ ساعت انجام شود. بیان پلاسمید نوترکیب بعد از ۷۲ ساعت با استفاده از روش وسترن بلاتینگ ارزیابی شد.

وسترن بلاتینگ

لیزات سلولی تهیه شده از سلول‌های مرحله رشد نمایی جمع‌آوری و رسوب‌دهی شد. سپس با استفاده از آنتی‌بادی Anti-His tag متصل با HRP (شرکت سیگما) بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شد. بافر انتقال مورد استفاده بر روی غشای نیترو سلولز شامل گلایسین ۳۹ میلی‌مولار، تریس ۴۸ میلی‌مولار، اتانول ۲۰ درصد بود. سپس کاغذ نیترو سلولز در داخل بافر بلوکه‌کننده (۵ گرم skim milk در ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS (1x)) به‌مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌منظور پوشش نواحی آزاد و فاقد پروتئین قرار گرفت. در هر مرحله کاغذ نیتروسلولز با بافر PBST (بافر PBS واجد ۰/۰۵ توئین ۲۰) شستشو داده شد. در مرحله بعد آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-His tag (رقت ۱:۲۰۰۰ در داخل بافر PBS(1x)) بر روی غشای PVDF اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس کاتالیزور (H_2O_2 (٪۳۰ و محلول سوبسترا DAB (دی آمینو بنزیدین) بر روی غشای نیتروسلولز استفاده و پس از ظهور باندها واکنش با آب مقطر مهار گردید.

یافته‌ها

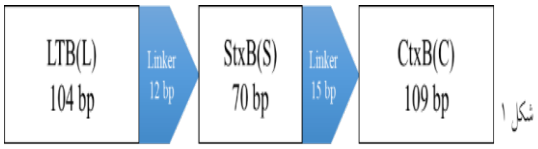
ساختار ژن کایمریک

ژن کایمریک *lsc* حاوی بخش‌های LtB (۱۰۴ aa)، CtxB (۱۰۹ aa) و StB (۷۰ aa) است. ژن کدکننده این سه پروتئین با استفاده از لینکر EAAAK و YAPQDP به یکدیگر متصل شده بود. سازه مورد نظر از تحقیق Kazemi و همکاران تهیه شد (شکل ۱).

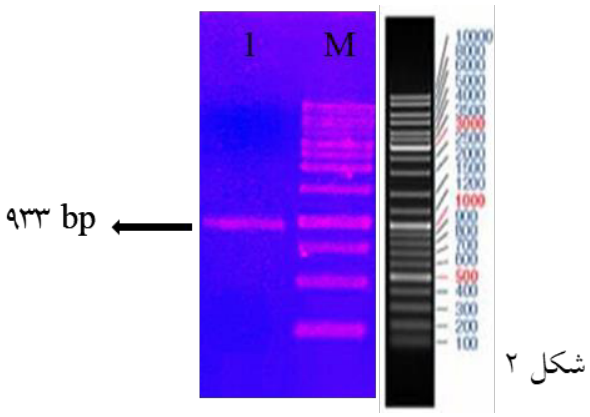
تأیید حضور پلاسمید نوترکیب با تکنیک PCR

ژن مورد نظر که در سویه *E.coli* BL21(DE3) کلون شده بود با Plasmid DNA Extraction Kit طبق پروتکل شرکت Genet bio استخراج و روی ژل

آگارز یک درصد بررسی شد. واکنش PCR بر روی ژن *lsc* با استفاده از پرایمر اختصاصی صورت گرفته و موجب تکثیر قطعه مورد نظر شد. ژن تکثیر یافته، در مقایسه با مارکر در اندازه ۹۳۳ جفت باز بود (شکل ۲).



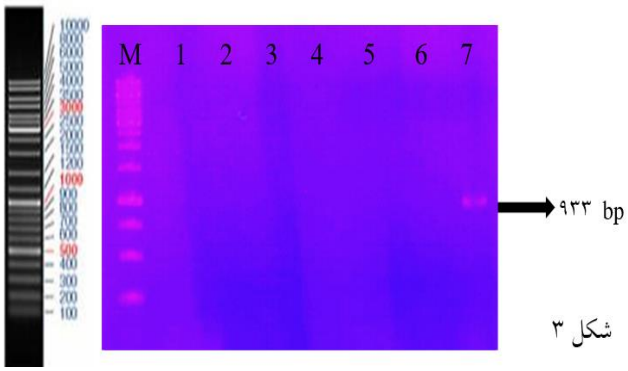
شکل ۱- شکل شماتیکی از ژن کایمریک *lsc* که نشان‌دهنده ژن‌های ltB ، stxB و ctxB و قطعات رابط است.



شکل ۲- تصویر الکتروفورز محصول واکنش PCR. ستون M: نشانگر وزن مولکولی. ستون ۱: محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آنزیم *Pfu*.

همسانه‌سازی ژن *lsc*

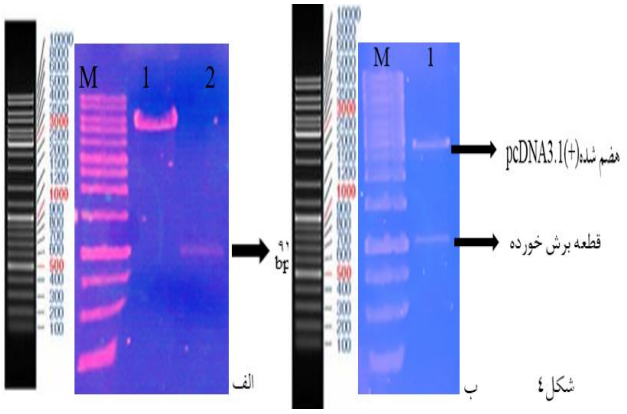
پس از انجام واکنش اتصال، محصولات واکنش با روش شوک حرارتی به سلول مستعد *E.coli* TOP10 انتقال داده شد. سپس بر روی کلون‌های ظاهر شده بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام شد (شکل ۳).



شکل ۳- کلونی حاوی قطعه نوترکیب. ستونM: نشانگر وزن مولکولی. ستون ۱ تا ۶: عدم تکثیر ژن نوترکیب در کلونی‌های انتخاب شده. ستون ۷: کلونی نوترکیب تکثیر شده.

هضم آنزیمی کلون‌های نوترکیب

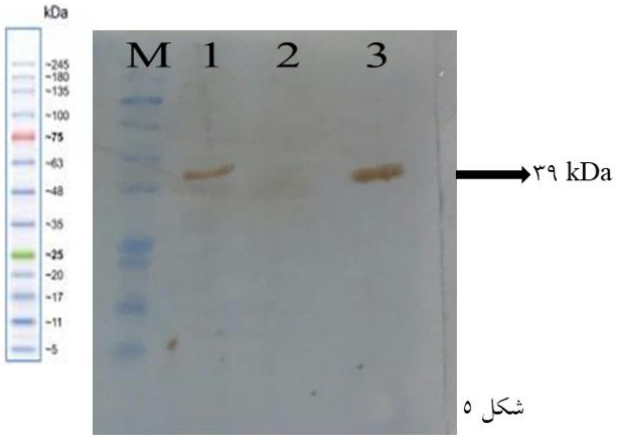
به‌منظور تأیید همسانه‌سازی، روی کلونی -های نوترکیب پس از PCR واکنش هضم با دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*dIII انجام شد و دو باند رویت شد که نشان‌دهنده جدا شدن قطعه الحاقی به‌طول ۹۳۳ bp از وکتور است (شکل ۴).



شکل ۴- هضم آنزیمی ژن *lsc* و وکتور pcDNA3.1(+)، هضم آنزیمی کلون‌های به‌دست آمده. (الف) هضم آنزیمی ژن *lsc* و وکتور pcDNA3.1(+). ستون M: نشانگر وزن مولکولی. ستون ۱: وکتورpcDNA3.1(+). ستون ۲: ژن *lsc*. (ب) هضم آنزیمی کلون‌های به‌دست آمده ستون M: نشانگر وزن مولکولی DNA، ستون ۱: هضم آنزیمی پس از واکنش PCR بر روی کلون مورد نظر که جدا شدن و که حضور قطعه نوترکیب به‌طول ۹۳۳ bp را تأیید می‌کند.

کشت سلول‌های حیوانی و بررسی بیان ژن کایمریک

بیان ژن کایمریک *lsc* پس از کشت کلونی‌های واجد پلاسمید نوترکیب روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد بررسی شد. صحت پروتئین نوترکیب تولید شده با روش وسترن بلات و آنتی‌بادی ضد هیستیدین به روش کیفی بررسی شد نتایج بیان پروتئین روی ژل SDS-PAGE نشان‌دهنده حضور یک باند در محدوده ۳۹ کیلو دالتون بود که با اندازه قطعه ۹۳۳ جفت‌بازی با احتساب بخش الحاقی مطابقت داشت (شکل ۵). هم‌چنین پس از تخلیص پروتئین با استفاده از روش برادفورد پروتئین موردنظر تعیین غلظت شد. در نهایت پروتئین تخلیص شده LSC در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.



شکل ۵- تأیید پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلاتینگ با استفاده از Anti-His-Tag. ستون M: نشانگر وزن پروتئین، ستون ۱: نمونه لیز سلولی از سلول‌های ترنسفکت شده ، ستون ۲: لیز سلولی از سلول‌های ترانسفکت نشده (کنترل منفی)، ستون ۳: نمونه پروتئین باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب *lsc*.

بحث

واکسیناسیون به‌واسطه DNA، روشی جدید و جایگزینی برای واکسن‌های دیگر بوده است. ساختار اصلی و مشخصی که از ابتدا تاکنون برای این واکسن-ها درنظر گرفته شده، DNA پلاسمیدی است که به-عنوان ناقل برای انتقال ژن ترانسفورم شده به کار می-رود. در ترکیب واکسن‌های زیرواحدی از عوامل بیماری‌زای ETEC شامل عوامل کلونیزه‌کننده و سموم روده‌ای LT و ST استفاده می‌شود. سم حساس به حرارت (Lt)، باکتری ETEC، سم شبه شیگا (Stx)، باکتری EHEC و سم کلرا (Ctx) باکتری ویبریوکلرا از دسته سموم AB_5 هستند که به‌عنوان یک کاندیدای واکسن در طراحی واکسن‌های زیرواحد مورد توجه محققان قرارگرفته و نتایج نشان داده است

که به‌کارگیری این عامل بیماری‌زای مهم می‌تواند پاسخ‌های خنثی کننده و حفاظتی سیستم ایمنی را در پی داشته باشد (۱۴).

در همین راستا، با توجه‌به اهمیت نقش کلیدی توکسین‌های نامبرده (LT، STX و CTX) در پاتوژنیسیته عوامل باکتریائی بیماری‌های روده‌ای و مطالعه‌هایی که نشان‌دهنده پاسخ‌های حفاظتی مناسب ناشی از ایمنی‌زایی مناسب توسط آن‌ها است، طراحی و به‌کارگیری یک کاندید واکسن با ساختار ژنی سه گانه در برگیرنده ناحیه اتصالی این ژن‌ها بر مبنای مطالعه‌های بیوانفورماتیکی مورد توجه قرار گرفت (۱۷).

در مطالعه‌ای Porter و همکاران در سال ۲۰۱۷ به چاپ رسانده‌اند به تحقیق در مورد واکسن DNA، سهولت تولید، ثبات در دمای محیط بدون نیاز به زنجیره سرد و توانایی تقلید از عفونت‌های طبیعی و ایجاد پاسخ ایمنی پرداخته‌اند که هر یک از آن‌ها از مهم‌ترین جذابیت‌های تولید این واکسن به شمار می‌رود. هم‌چنین به موفقیت‌هایی در مورد صدور مجوز چندین واکسن دامپزشکی دست یافته‌اند (۱۸).

langer و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی روش‌های جدید برای پیشگیری و درمان بیماری‌های انسانی از طریق واکسیناسیون بیولوژیکی DNA انجام داده و به بررسی موارد بیش‌تری با توجه‌به ایمنی‌زایی واکسن‌های DNA، از جمله جهش‌زایی در صورت ادغام کروموزومی، تشکیل احتمالی آنتی‌بادی‌های ضد DNA، القای پاسخ‌های خود ایمنی یا تحمل سیستم ایمنی پرداخته‌اند. علاوه‌بر این، به واکنش‌های موضعی در محل تجویز و عوارض جانبی ناشی از گسترش DNA پلاسمید به بافت‌های غیر هدفمند توجه شده است. هم‌چنین اگر مزایای محصول از خطرهای آن برای بیمار تحت درمان فراتر رود، یک محصول دارای منافع خطر قابل قبول خواهد بود (۱۹). در مطالعه‌ای که Ghanem و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی واکسن با پایه DNA پلاسمید و مقایسه با واکسن‌های معمولی مبتنی بر ویروس انجام دادند نشان داد که pDNA راه سریع‌تری برای توسعه و تولید است. هم‌چنین بر فرآیندهای کشت سلولی نسبت‌به زمان اتکا داشته و انعطاف‌پذیری بیش‌تری در حمل و نقل و ذخیره‌سازی دارند. تحریک آنتی‌بادی‌ها و اجزای حامل سلول از سیستم ایمنی به‌عنوان برخی از مهم‌ترین مزایای استفاده از واکسن‌های pDNA در نظر گرفته می‌شود و نیز توجه ویژه‌ای به تکنیک‌های کروماتوگرافی با هدف کاهش مراحل تصفیه نهایی، جداسازی پس از اولیه و بهبودی میانی، به‌منظور کاهش تعداد مراحل لازم برای رسیدن به محصول نهایی خالص از پلاسمید خام انجام دادند (۲۰). هم‌چنین Amani و همکاران در سال ۲۰۰۹ سازه کایمریک EIT را خالص و نتایج حاصل را در موش‌ها به‌صورت تزریقی ارزیابی کردند (۲۱). Kazami و همکاران در سال ۲۰۱۶ ایمنی‌زایی زیرواحد اتصالی سم شبه شیگا rSTX2B را در موش‌ها مورد بررسی قرار دادند (۱۷). برای این سازه در تحقیق قبل، جهت جداسازی قطعه‌های ژنی از لینکر استفاده شد و بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داده بود که به‌خوبی قادر به جداسازی هر سه قسمت از یکدیگر هستند. ساختار پروتئین کایمریک حاصل به کمک نرم‌افزار مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که از نظر پایداری و هم‌چنین ساختار mRNA و نیز ساختار دوم و سوم پروتئین در وضعیت مناسبی است.

در این تحقیق همسانه‌سازی ژن *lsc* در وکتور یوکاریوتی pcDNA3 به‌منظور استفاده از آن به‌عنوان DNA واکسن موردتوجه قرار گرفته است. برای رسیدن به این منظور پس از استخراج پلاسمید نوترکیب به کمک روش هضم آنزیمی باند ۹۳۳bp تأیید گردید. پس از آماده‌سازی وکتور بیانی یوکاریوتیک قطعه موردنظر به آن اضافه و پس از همسانه‌سازی در سلول مستعد حضور آن با روش PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت که با نتایج مورد انتظار مطابقت داشت. هم‌چنین وکتور یوکاریوتی به سلول HEK293T منتقل شد. نتیجه وسترن بلاتینگ بر روی پروتئین‌های استخراج شده از سلول‌های HEK293T با استفاده از آنتی‌بادی ضد His-Tag یک باند پروتئینی اختصاصی در محدوده ۴۰ کیلو دالتون را نشان می‌دهد که تأیید کننده بیان پروتئین نوترکیب LSC در سیستم بیانی یوکاریوت است. با توجه‌به این‌که His-Tag در انتهای کربوکسیلی این پروتئین نوترکیب قرار دارد نتیجه

وسترن بلاتینگ نشان‌دهنده بیان کامل پروتئین است. در وسترن بلاتینگ بر روی پروتئین نوترکیب LSC سیستم بیانی پروکاریوتی *E.coli* بیان شده باند یکسانی از نظر اندازه مشاهده می‌شود. به‌نظر می‌رسد این نتیجه نشان‌دهنده این است به‌احتمال که تغییرها پس از ترجمه نظیر گلیکوزیلاسیون که می‌تواند منجر به تغییر وزن پروتئین نوترکیب شود در سیستم یوکاریوت بر روی پروتئین نوترکیب انجام نشده است. نکته قابل توجه در بیان پروتئین نوترکیب LSC این است که ژن همسانه‌سازی شده *lsc* مورد استفاده در این تحقیق که از تحقیقات قبلی مورد استفاده قرار گرفته است، بر اساس جدول ترجیح کدونی میزبان بیانی *E.coli* بهینه‌سازی شده است. بیان این پروتئین در سیستم یوکاریوتی نشان دهنده این است که محدویت‌هائی که از نظر ترجیح کدونی وجود داشته نتوانسته مانع بیان این پروتئین در سیستم یوکاریوتی شود. از جمله محدودیت‌های این تحقیق استفاده از وکتورهای دارای مارکر و تزریق به بدن موجود زنده جهت بررسی مقادیر کمی و کیفی بیان ژن در بافت-های مختلف بود که می‌توانست تصویر روشن‌تری از عملکرد واکسن DNA موردنظر ارائه دهد.

نتیجه‌گیری

با توجه‌به نتایج تحقیق به‌نظر می‌رسد که پروتئین کایمریک LSC می‌تواند آماده بهره‌برداری در زمینه ایمنی‌زایی در حیوان مدل بوده و به‌عنوان جزئی از DNA واکسن علیه عفونت-ها مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک مصوب دانشگاه پیام نور تهران واحد ری است.

منابع

1- UNICEF, WHO D. Why children are still dying and what can be done. The United Nations Children's Fund. World Health Organization, Geneva. 2009.

2- Abdelmalak B, Doyle J. Anesthesia for otolaryngologic surgery: Cambridge University Press; 2012.

3- Smith K. Mental health: a world of depression. Nature News. 2014;515(7526):180.

4- Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. Comparison of 61 sequenced Escherichia coli genomes. Microbial ecology. 2010;60(4):708-20.

5- Jertborn M, Svennerholm A-M. Enterotoxin-producing bacteria isolated from Swedish travellers with diarrhoea. Scandinavian journal of infectious diseases. 1991;23(4):473-9.

6- Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiological reviews. 1996;60(1):167-215.

7- Russo LM, Melton-Celsa AR, Smith MA, Smith MJ, O'Brien AD. Oral intoxication of mice with Shiga toxin type 2a (Stx2a) and protection by anti-Stx2a monoclonal antibody 11E10. Infection and immunity. 2014;82(3):1213-21.

8- Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of Escherichia coli O157:H7. Vaccine. 2010;28(42):6923-9.

9- Janda JM, Newton AE, Bopp CA. Vibriosis. Clinics in laboratory medicine. 2015;35(2)-۲۷۳: ۸۸,

10- Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Microbiological reviews. 1992;56(4):622-47.

11- Obrig TG. Escherichia coli Shiga toxin mechanisms of action in renal disease. Toxins. 2010;2(12):2769-94.

12- Merritt EA, Hol WG. AB5 toxins. Current opinion in structural biology. 1995;5(2):165-71.

13- Lencer WI, Delp C, Neutra MR, Madara JL. Mechanism of cholera toxin action on a polarized human intestinal epithelial cell line: role of vesicular traffic. The Journal of cell biology. 1992;117(6):1197-209.

14- Karaman S, Cunnick J, Wang K. Expression of the cholera toxin B subunit (CT-B) in maize seeds and a combined mucosal treatment against cholera and traveler's diarrhea. Plant cell reports. 2012;31(3):527-37.

15- Al-Kobaisi MF. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology: 24(th) Edition. Sultan Qaboos Univ Med J. 2007;7(3):273-5.

16- Clarke SC. Diarrhoeagenic Escherichia coli--an emerging problem? Diagnostic microbiology and infectious disease. 2001;41(3):93-8.

17- Kazemi R, Akhavian A, Amani J, Salimian J, Motamedi MJ, Mousavi A, et al. Immunogenic properties of trivalent recombinant protein composed of B-subunits of LT, STX-2, and CT toxins. Microbes and infection. 2016;18(6۹,-٤٢١:(

18- Porter KR, Raviprakash K. DNA Vaccine Delivery and Improved Immunogenicity. Current issues in molecular biology. 2017;22:129-38.

19- Langer B, Renner M, Scherer J, Schule S, Cichutek K. Safety assessment of biolistic DNA vaccination. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2013;940:371-88.

20- Ghanem A, Healey R, Adly FG. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: a review. Analytica chimica acta. 2013;760:1-15.

21- Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH. In silico analysis of chimeric espA, eae and tir fragments of Escherichia coli O157:H7 for oral immunogenic applications. Theoretical biology & medical modelling. 2009;6:28.