Original Article

الحاق ژنی زیر واحد B سم کلرا (ctB) با زیر واحد B انتروتوکسین *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ (stxB)، همسانه‌سازی و بیان آن در باکتری *E. coli*

حمید معدنچی، حسین هنری*، صادق صفائی، علی صیادمنش

مرکز تحقیقات زیست شناسی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۰۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۵/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای اصلی در *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱، انتروتوکسین *شیگلا* یا STx می‌باشد، که از یک زیر واحد سمی آنزیماتیک به نام STxA و یک زیر واحد پنتامریک متصل شونده به رسپتور به نام زیر واحد B یا STxB تشکیل شده است. زیر واحد STxB مسئول اتصال زیر واحد سمی به گیرنده سطح سلولی Gb3 بوده و در نهایت باعث ورود سم به درون سلول و اثرات آن می‌شود. زیر واحد B سم کلرا (CTB) به عنوان ادجوانت مخاطی قوی برای واکسیناسیون شناخته شده و همجوشی ژنتیکی آن با هترو آنتی ژن هایی مثل stxB باعث تقویت ایمنی هومورال و مخاطی و پاسخ ایمنی علیه آن آنتی ژن می گردد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ژن‌های ctB و stxB پس از طراحی پرایمر به‌وسیله PCR تکثیر و در وکتور pGEMهمسانه‌سازی شدند. ژن stxB به همراه لینکر غیرفورینی به روش برش آنزیمی با ژن ctB در وکتور pGEM الحاق شدند و در نهایت قطعه کایمریکctB-stxB در وکتور بیانی pET28a(+) زیر همسانه‌سازی گردید. پروتئین کایمر تحت القای IPTG بهینه‌سازی و به‌وسیله تکنیک SDS-PAGE و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: قطعه کایمریک ctB-stxB در وکتور بیانی pET28a (+) به‌وسیله توالی یابی، PCR و آنالیز آنزیمی تأیید گردید. همچنین پروتئین تولیدی به‌وسیله SDS-PAGE و وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه گیری: پروتئین نوترکیب تولیدی بعد از بررسی ایمنی‌زایی می تواند به عنوان کاندیدی برای واکسن مخاطی مؤثر و نوین علیه باکتری *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: ***شیگلا دیسانتری تیپ ۱*، STxB، CTB، ادجوانت، لینکر غیر فورینی**

مقدمه

بیماری‌های اسهالی ۳/۱ میلیون مرگ و میر را در سال به خود اختصاص می‌دهند. از مهم‌ترین عوامل بیماری‌های عفونی روده‌ای و اسهالی می‌توان به *ویبریو کلرا*، *شیگلا*، *اشرشیا* و... اشاره کرد. سهم شیگلوزیس از این مرگ و میر در حدود ۶۰۰/۰۰۰ تا ۱/۰۰۰/۰۰۰ مرگ در سال است. شیگلوزیس همیشه به‌عنوان یک اسهال خونی باسیلی حاد شناخته می‌شود که با مدفوع آبکی همراه با خون و موکوس توأم با علایم بالینی چون تب و کرامپ‌های شکمی مشخص می‌گردد که ممکن است همراه با سندروم اورمیک همولیتیک باشد. اسهال‌های خونی با عامل *شیگلا* در بیشتر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان به موقع به مرگ می‌انجامد (۱). از این لحاظ واکسیناسیون علیه *شیگلا* دارای اهمیت فراوانی بوده و هنوز واکسن مناسبی علیه شیگلوزیس وجود ندارد. وبا نیز بیماری عفونی بسیار مهلکی می‌باشد که به صورت اپیدمی‌ها و پاندمی‌هایی بروز می کند. عامل وبا باسیلی گرم منفی به نام *ویبریو کلرا* بوده که بر اساس آنتی ژن O پلی ساکاریدی خود به دو سروتیپ O1 و O139 تقسیم می‌شود. سروتیپ O1 به دو شکل وبای EL TOR و کلاسیک بروز می‌کند که بر حسب تفاوت‌هایی که در آنتی ژن O دارند به نام‌های Innaba و Ogawa خوانده می‌شوند. وبا هر ساله ۵ تا ۷ میلیون نفر را مبتلا می‌کند که بیشتر از یک میلیون نفر آن‌ها جان می‌بازند. علایم بالینی وبا به صورت دهیدراسیون و از دست دادن آب و الکترولیت‌های ضروری بدن به شکل اسهالی آبکی و بسیار شل ظاهر می‌شود. راه انتقال هر دو عفونت یعنی شیگلوزیس و وبا از طریق آلوده شدن با غذا و آب آلوده و همچنین تماس شخص به شخص از طریق دست‌های آلوده می‌باشد (۲). ریسک ابتلا در هر دو بیماری بیشتر در کودکان زیر پنج سال، افراد پیر با سیستم ایمنی ضعیف، همچنین کسانی که نقص سیستم ایمنی ذاتی یا اکتسابی مثل ایدز داشته باشند، مسافران کشورهای در حال توسعه و سربازان دیده می‌شود. از بین فاکتورهای بیماری‌زای این دو پاتوژن، یکی از مهم‌ترین اهداف برای ساخت واکسن علیه این دو بیماری، زیر واحدهای B انتروتوکسین این دو باکتری می‌باشد که به نام‌های STxB (برای *شیگلا دیسانتری*) و CTB (برای *ویبریو کلرا*)

* **نویسنده مسئول: حسین هنری**، مرکز تحقیقات زیست شناسی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷
Email: honari.hosein@gmail.com

مشهورند. این دو بخش برای اتصال زیر واحدهای سمی(زیر واحد A) به گیرنده‌های سطح سلولی این دو توکسین در اپیتلوم روده و اثر مخرب آن‌ها ضروری هستند. زیر واحد STxA در *شیگلا* با اتصال به ریبوزوم، یک مهارکننده پروتئین سازی محسوب شده و باعث تخریب سلول‌های اپیتلیوم روده و خون‌ریزی می‌گردد. اما CTA در *ویبریو کلرا* با ADP ریبوزیلاسیون آدنیلات سیکلاز موجب افزایش cAMP و خروج بیش از حد آب و الکترولیت‌های بدن و اسهال می‌گردد(۳). با ایجاد پاسخ ایمنی علیه آن‌ها می‌تواند از ورود سم به داخل سلول ممانعت به عمل آورد. گزارشات حاکی از ایمنی‌زایی ضعیف STxB به تنهایی است (۴). از طرفی امروزه CTB را به عنوان ایمنوادجوانت قوی در ایمنی‌زایی وابسته به مخاط می‌شناسند (۳ و ۵). به همین منظور با فیوژن این دو ژن با هم می‌توان حدس زد که اولاً با استفاده از خاصیت ادجوانتی CTB میزان ایمنی‌زایی علیه STxB را افزایش داد، ثانیاً می‌توان علیه هر دو عامل عفونت‌زا ایمنی ایجاد کرد.

مواد و روش‌ها

آنزیم‌ها، وکتورها و سویه‌های باکتریایی: آنزیم‌های Pfu و Taq پلی مراز(2.5U/µl)، آنزیم‌های Hind III، Sal I و Bam H1 از شرکت (Vivantis, Malesia)، IPTG (Fermentas Lithuania)، وکتور pGEM-T (Promega, USA)، وکتور (+) pET-28a (Novagen USA)، وکتور حاوی ژن ctB به عنوان الگوی PCR (بانک وکتور دانشگاه امام حسین (ع))، وکتور حاوی ژن stx به عنوان الگوی PCR (بانک وکتور دانشگاه امام حسین (ع))، سویه‌های باکتریایی *E. coli*DH5α و *E. coli* Rosetta (DE3) به ترتیب برای استفاده به عنوان میزبان همسانه‌سازی و بیانی (بانک وکتور دانشگاه امام حسین (ع)) تهیه شد.

مراحل الحاق و جداسازی پلاسمیدهای نوترکیب: مرحله اول: ژن *ctB* (۳۷۲ جفت باز) از باکتری *ویبریوکلرا* سروتیپ ElTor که در یک وکتور همسانه‌سازی شده بود توسط PCR به کمک پرایمرهای زیر تکثیر یافت. در طراحی این پرایمرها از جایگاه‌های برشی *Bam HI*، *Sal I* و *Hind III* استفاده گردید:

Forward Primer(CTB): 5′GTCGACGGAGGCTTTATGAT TAAATTAAAATTTGG 3′

Reverse primer(CTB): 5′AAGCTTATTAGGATCCCAAAT TTGCCATACTAAT 3′

GTCGAC: Sal I GGATCC : Bam HI

AAGCTT: Hind III

ژن *ctB* توسط PCR معمولی به کمک آنزیم Pfu تکثیر شد، سپس محصول PCR از روی ژل آگارز با دمای پایین توسط کیت تخلیص DNA (Fermentas, Lithuania) تخلیص شد. محصول PCR با فرایند الحاق dATP دنباله‌دار، به وکتور pGEM-T الحاق و به باکتری *E. coli*DH5α ترانسفورم شد (۶).

مرحله دوم: ژن *stxB* از باکتری *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ که در یک وکتور همسانه‌سازی شده بود توسط PCR به کمک پرایمرهای زیر تکثیر یافت. در طراحی این پرایمرها از جایگاه‌های برشی Bam HI، Xho I و Hind III استفاده گردید. به منظور فیوژن دو ژن از جایگاه مشترک برشی Bam HI استفاده گردید. جایگاه Xho I نیز به منظور دست‌ورزی لینکر طراحی گردید:

Forward primer(stxB): 5′GGATCCGGACCAGGACCACTCG AGACGCCTGATTGTGTAACTG 3′

Reverse primer (stxB): 5′AAGCTTATTATCAACGAAAAAT AACTTC 3′

Linker sequence: GGACCAGGACCA

Xho I: CTCGAG

GGACCAGGACCA کدون کد کننده یک لینکر غیرفورینی است که غنی از اسید آمینه گلایسن (Gly) و پرولین (Pro)است. ژن *stxB* با پرایمر فوق توسط PCR با آنزیم Pfu تکثیر یافت. محصول PCR با dATB دنباله‌دار شد و سپس با وکتور نوترکیب pGEM-ctB که با آنزیم‌های Bam HI و Hind III برش خورده بود الحاق شد. سازه اخیر در باکتری *E. coli*DH5α ترانسفورم گردید(۶).

زیر همسانه‌سازی قطعه نوترکیب *ctB*-Linker-*stxB* در وکتور بیانی pET28a(+): قطعه *ctB*-linker-*stxB* با هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pGEM-*ctB*-Linker-*stxB* توسط آنزیم‌های Sal I و Hind III به‌دست آمد و در وکتور بیانی pET28a(+) که با همین آنزیم‌ها برش خورده بود، زیرهمسانه‌سازی گردید (۶). پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-*ctB*-Linker-*stxB* به‌منظور تکثیر به درون باکتری *E. coli*DH5α ترانسفورم شد. سپس پلاسمید بیانی نوترکیب توسط روش لیز قلیایی تخلیص و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. در نهایت پلاسمید نوترکیب pET28a (+)-*ctB*-Linker-*stxB* در میزبان بیانی *E.coli* Rosetta (DE3) ترانسفورم گردید (۶). در نهایت ۲۰ میکرولیتر از پلاسمید برای تعیین توالی به شرکت ندای فن ارسال شد و تعیین توالی گردید.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب *CTB*-L-*STxB*: کلنی انتخاب شده در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از این که میزان جذب (OD) به ۰/۶ رسید با محلول ۱ میلی‌مولار بر لیتر ایزوپروپیل تیو-D- β- گالاکتوزید(IPTG) القاء گردید و به مدت ۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با شیک ۱۵۰ دور بر دقیقه انکوبه گردید (۶). پس از انکوباسیون باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری شدند. دیواره پلاک سلولی توسط بافر B(NaH_2PO_4:13.8gr, Tris.HCl:1.2gr, urea 480.5gr, add DDW to 1liter, pH in 8) شکسته شد و سونیکیت گردید. میزان بیان و وزن مولکولی پروتئین نوترکیب *CTB*-L-*STxB* به کمک الکتروفورز روی ژل سدیم دو دسیل سولفات– پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین نوترکیب از درون اجسام اینکولوژنی خارج شد. سلول‌های لیزشده با سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه جمع شدند. سپس تمام پروتئین‌های نوترکیب به کمک توالی His-tag در انتهای N خود توسط ستون کروماتوگرافی با رزین Ni-NTA تخلیص و توسط SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت غلظت پروتئین مربوطه با روش غلظت سنجی استاندارد برادفورد اندازه‌گیری گردید.

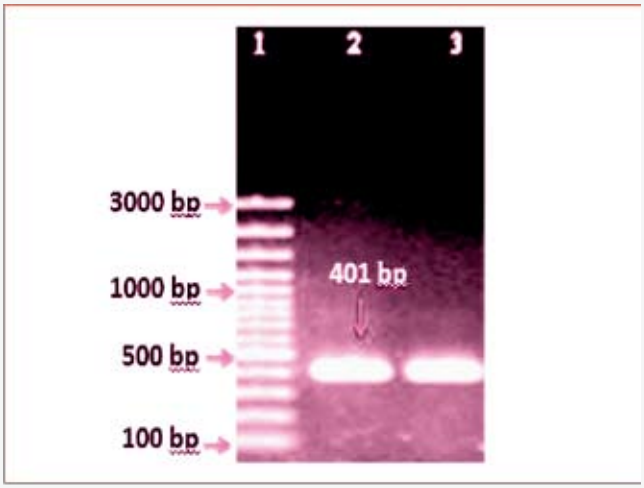
آنالیز با وسترن بلات: برای تأیید پروتئین نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم وسترن بلاتینگ و بافر انتقال(گلایسین ۳۹ میلی‌مولار، تریس ۴۸ میلی‌مولار، SDS ۰/۰۳۷% و متانول ۲۰%)

روی کـاغذ نیترو سلـولـز منتقل شد. کـاغذ نیترو سلولز بـا استفـاده از بافر PBST (۳۷ NaCl میلی‌مولار، ۲/۷ KCl میلی مولار، ۴/۳ $Na_2HPO_4,7H_2O$ میلی مولار، توین ۲۰ ۵% و pH:۷/۲) حاوی ۵% شیر خشک به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست و شو با بافر PBST به مدت یک ساعت با رقت ۱ به ۸۰۰ آنتی بادی ضد His-tag در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. نمونه پس از شست و شوی مجدد با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱ به ۲۰۰۰ از آنتی بادی کانژوگه موشی (Dako) در بافر PBST در دمای اتاق قرار گرفت و در نهایت پس از سه بار شست و شو با بافر PBST، برای آشکارسازی از بافر تریس ۵۰ mM حاوی DABmg ۶، H_2O_2 ۱۰ µl استفاده شد. واکنش با استفاده از H_2SO_4 متوقف گردید (۶).

نتایج

فیوژن *ctb-stxB* و مراحل همسانه‌سازی و زیر همسانه‌سازی آن در pET 28a(+):

ژن *ctB* از طریق واکنش PCR با آنزیم Pfu از DNA الگو تکثیر و استخراج گردید و به‌منظور تأیید روی ژل آگارز برده شد (شکل ۱)، سپس محصول PCR توسط کیت تخلیص DNA از روی ژل آگارز با دمای پایین جداسازی شد و پس از دنباله‌دار شدن در وکتور pGEM-T-easy همسانه‌سازی گردید و توسط ژل الکتروفورز روی آگارز تأیید گردید (شکل ۲). وکتور نوترکیب pGEM- *ctB* توسط آنزیم‌های HindIII و Bam HI برش خورد.

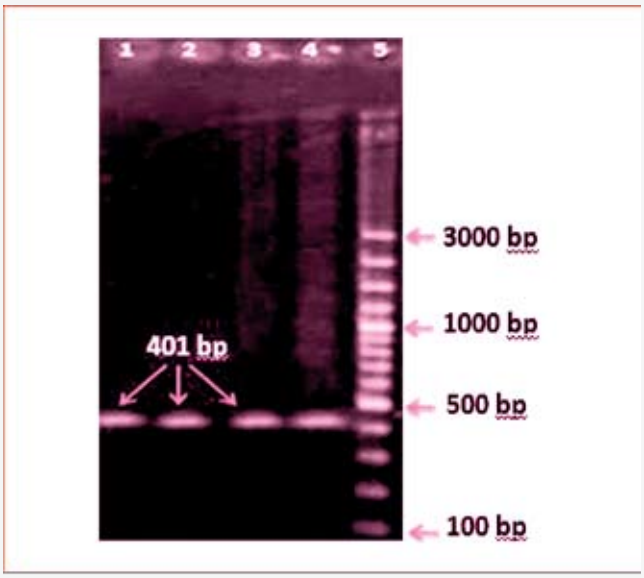


شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR ژن *ctB* از روی الگو به منظور تخلیص

ستون ۱: نشان گر DNA ۱۰۰ جفت بازی

ستون ۲ و ۳: باند ظاهر شده محصولات PCR ژن *ctB* که در ناحیه ۴۰۱ جفت بازی باند تشکیل داده است. در این واکنش PCR از وکتور دارای ژن کلراتوکسین استفاده شد.

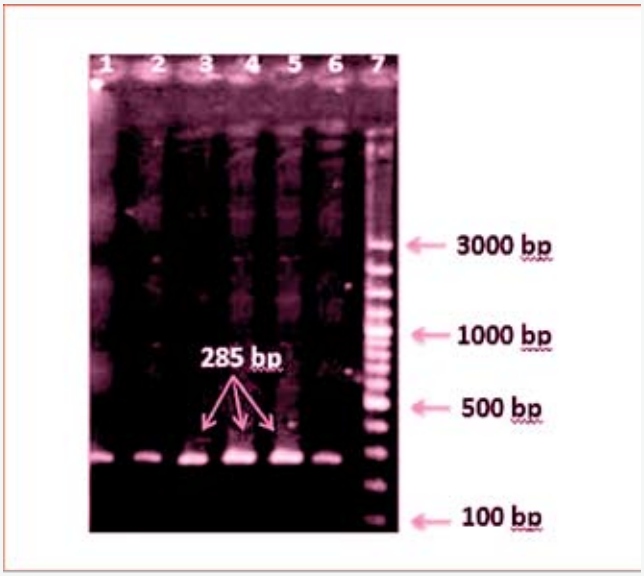
سپس ژن *stxB* به‌همراه لینکر گلایسین و پرولین با PCR تکثیر شده (شکل ۳) و سپس در وکتور حاوی ژن *ctB* همسانه‌سازی گردید و وکتور نوترکیب pGEM– *ctB-stxB* تولید گردید و پس از تخلیص پلاسمید به‌منظور تأیید روی ژل آگارز برده شد و با برش آنزیمی تأیید گردید (شکل ۴).



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR که به منظور تأیید همسانه‌سازی قطعه ژنی *ctB* در وکتور pGEM-T انجام گرفت.

ستون‌های ۱، ۲،۳ و ۴: باند ۴۰۱ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *ctB* با روش PCR از روی کلون‌های نمونه برداری شده را نشان می‌دهد.

ستون ۵: نشان گر DNA ۱۰۰ جفت بازی

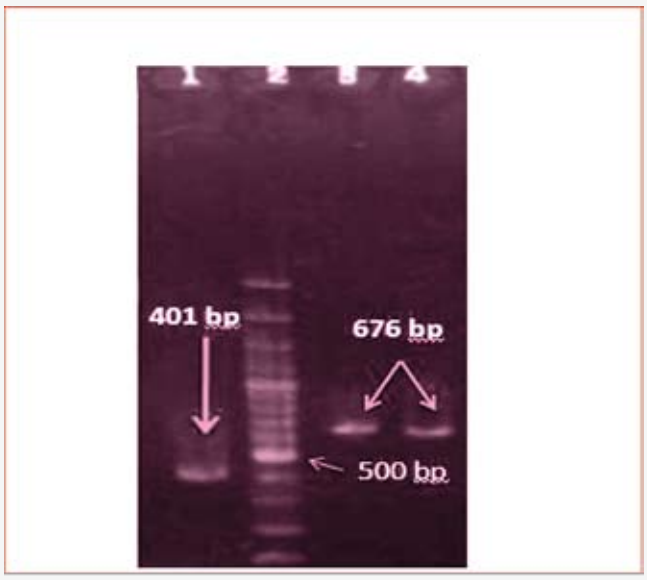


شکل۳: الکتروفورز محصولات PCR ژن *stxB* از روی الگو به منظور تخلیص

ستون ۱ تا ۶: باند ظاهر شده محصولات PCR ژن *stxB* که در ناحیه ۲۸۵ جفت بازی (با احتساب لینکر و توالی سیگنال) باند تشکیل داده است. در این واکنش PCR از وکتور دارای ژن سم شیگلا STx استفاده شد.

ستون ۷: نشان گر DNA ۱۰۰ جفت بازی

وکتور نوترکیب مذکور با آنزیم‌های *Sal I* و *Hind III* برش خورده و قطعه *ctB-stxB* جـدا گـردید. سپس قطعـه نام‌برده در وکتـور بیانی pET28a(+) زیر همسـانه‌سـازی شـد و وکتـور بیـانـی نوترکیب pET28a(+)-*ctB-stxB* حاصل شد. وکتور اخیر به باکتری

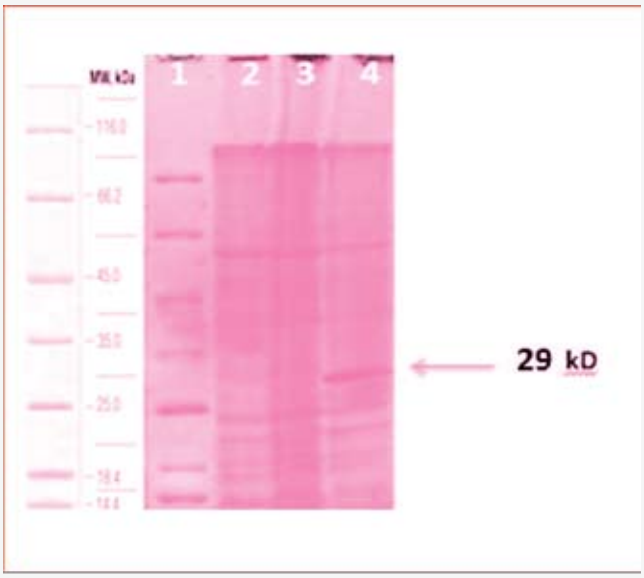


شکل ۴: الکتروفورز محصولات PCR غیر مستقیم از روی کلون ها جهت تأیید همسانه سازی.

ستون ۱: نمونه کنترل مثبت محصول PCR ژن *ctB* قبل از فیوژن با ژن *stxB* که باندهای مورد انتظار در راستای اندازه ۴۰۱ جفت بازی نشان‌گر DNA ایجاد شد.

ستون ۲: نشان‌گر DNA ۱۰۰ جفت بازی

ستون‌های ۳ و ۴: نمونه‌های محصول PCR مستقیم ژن *ctB -stxB* بعد از فیوژن است که باندهای مورد انتظار در راستای اندازه ۶۷۶ جفت بازی نشان‌گر DNA ایجاد شد.



شکل ۶: الکتروفورز پروتئین‌های بیان شده با استفاده از روش تیمار خام بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد.

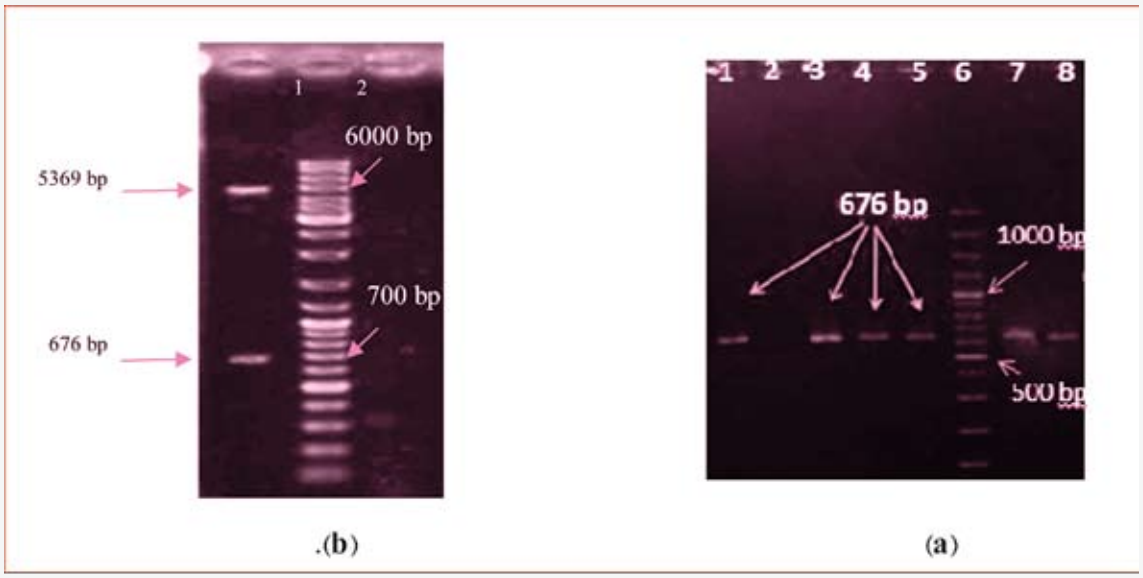
ستون ۱: پروتئین مارکر (cat No:# SM0431purchased from fermentas co.)

ستون ۲: کنترل منفی شماره یک که باکتری نوترکیبی است که به آن IPTG اضافه نشده است.

ستون ۳: کنترل منفی شماره دو می‌باشد که در حقیقت باکتری *E. coli rosetta* بدون pET28a (+) می‌باشد.

ستون ۴: باند پروتئینی مشاهده شده مربوط به پروتئین CTB-STxB که در راستای وزنی ۲۹ کیلو دالتونی قرارگرفته است.

ردیف شماره ۲: نشان گر DNA ۱۰۰ جفت بازی.



شکل ۵: الکتروفورز محصولات PCR مستقیم و هضم آنزیمی از روی پلاسمیدهای تخلیص شده pET-28a(+) نوترکیب

(a). ستون ۱ و ۲ تا ۸: باند حاصل PCR غیرمستقیم از پلاسمید تخلیص شده pET28a (+)-*ctB-stxB*.

ستون ۶: نشان‌گر DNA ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد.

(b). ردیف ۱: نتایج حاصل از واکنش هضم آنزیمی سازه pET28a (+)-*ctB-stxB* با آنزیم‌های *Sal I* و *Hind III*

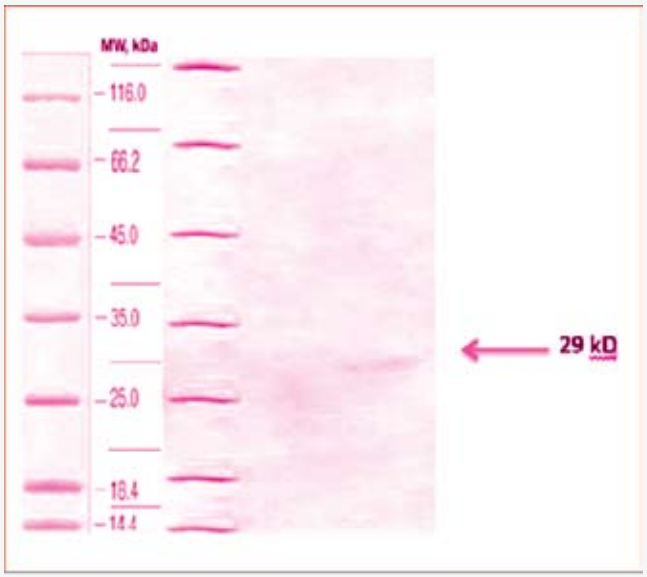
E.coli Rosetta (DE3) ترانسفورم شد. حضور پلاسمید نوترکیب با ژل الکتروفورز و با روش‌های PCR مستقیم (شکل 5a)، برش آنزیمی (شکل 5b) و تعیین توالی آن، تأیید گردید.

بیان پروتئین نوترکیب *CTB-STxB* و تخلیص آن: کلنی انتخاب شده، در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از رسیدن به رشد کافی به‌منظور بیان پروتئین، توسط IPTG 1 میلی مولار القاء گردید و برای بررسی بیان و کیفیت آن روی ژل SDS-PAGE برده شد(شکل ۶). باند پروتئینی مدنظر در جایگاه صحیح ۲۹ کیلو دالتونی قرار گرفت، در حالی که در کنترل‌ها هیچ باندی دیده نشد. پروتئین نوترکیب به کمک ستون نیکل خالص‌سازی گردید و غلظت پروتئین تولیدی به روش برادفورد اندازه‌گیری شد. میزان غلظت پروتئین ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر (µg/ml) ارزیابی شد.

آنالیز وسترن بلاتینگ با آنتی بادی ضد His-tag: بیان پروتئین نوترکیب *CTB-STxB* به دلیل داشتن توالی His-tag به کمک وسترن بلات و به‌کارگیری آنتی بادی علیه His-tag مورد تأیید و باند وسترن در جایگاه صحیح مدنظر قرار گرفت، اما در ستون کنترل هیچ باندی دیده نشد (شکل ۷).

بحث و نتیجه‌گیری

شیگلا دیسانتری یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های گوارشی محسوب می‌شود و عامل بیماری شیگلوزیس می‌باشد. از طرفی شیگا توکسین می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروتوکسیک ایجاد نماید (۷)، اما در حالت طبیعی این توکسین پتانسیل لازم را برای ایجاد بیماری ندارد، از آن جهت که این توکسین تنها توسط یک گونه از چهار گونه



شکل ۷: وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین:

ستون۱: پروتئین مارکر (cat No:# SM0431purchased from fermentas co.)

ستون ۲ نمونه کنترل منفی می‌باشد. (عصاره باکتری *E. coli* نوترکیب می‌باشد که با IPTG القا نشده است).

ستون ۳: باند پروتئینی ظاهرشده حاصل از بیان پروتئین مدنظر که در راستای ۲۹ کیلو دالتون قرار گرفت.

شیگلا به نام *شیگلا دیسانتری* بیوتایپ ۱ تولید می‌شود و همچنین تولید توکسین در بدن فرد در مرحله ثانویه تهاجم *شیگلا* یعنی پس از ورود به سلول میزبان رخ می‌دهد. اما تولید مصنوعی توکسین در مقیاس صنعتی به عنوان یک عامل نامتعارف بیولوژیک می‌تواند فوق‌العاده خطرناک و تهدید کننده جوامع انسانی باشد (۸).

در رابطه با ژن *stxB* در سراسر جهان مطالعات متعددی انجام شده است، ژن نام‌برده در موجودات مختلفی از *E. coli* گرفته تا انواع گیاهان مثل کاهو و ... همسانه‌سازی شده است. چون ایمنی‌زایی علیه *STxB* ضعیف گزارش شده بود و آنتی بادی ضد *STxB* هنوز نتوانسته به تنهایی ایمنی زایی خوبی ایجاد کند، به منظور ایجاد ایمنی قوی علیه آن تلاش‌های زیادی صورت گرفته است (۴). در سال ۲۰۰۵ به منظور تقویت ایمنی زایی علیه STxB این پروتئین با پروتئین هموسیانین کانجوگه شد. در بررسی ایمنی زایی این پروتئین کایمریک پاسخ ایمنی به طور ناچیزی بهبود یافت و IgG1 ترشحی قوی‌تری ایجاد گردید (۹). از سویی امروزه خاصیت ادجوانتیسیته *CTB* اثبات شده است و این ژن با ژن‌های متعدد دیگر به خاطر خاصیت ادجوانتی آن فیوژ شده است (۳ و ۵). دلیل استفاده از *CTB* به همین علت و هدف ما تولید پروتئین کایمریک *CTB-STxB* بود، تا بتوانیم ایمنی زایی آن را با *STxB* تنها مقایسه کنیم. به‌علاوه با ذکر این مطلب که *CTB* برای اثر سم وبا ضروری می‌باشد، با تولید این پروتئین می‌توان علیه هر دو عامل عفونی ایمنی ایجاد کرد و از اثرات ادجوانتی موکوزال قوی *CTB* نیز استفاده کرد و از ورود هر دو سم به داخل سلول‌های روده جلوگیری کرد. در رابطه با فیوژن *CTB* با دیگر ژن‌ها مطالعات زیادی انجام شده است.

در یک مطالعه نزدیک با پروژه ما در سال ۲۰۰۸ ژن *stxB2* باکتری *E. coli* با ژن *ctB* فیوژ شد و در باکتری *E. coli* بیان گردید. در این تحقیق این دو ژن پشت سر هم و بدون لینکر طراحی شد و بعد از تعیین توالی در وکتور بیانی pET30a بیان گردید. پروتئین تولیدی توانست به GM1 (گیرنده *CTB*) متصل شده و بعد از ایمنی زایی سطح مناسبی از آنتی بادی منوکلونال را تولید کند (۱۰). اما ما به منظور استحکام اتصال دو پروتئین و انعطاف پذیری بیشتر آن در برابر شکست از لینکر پرولین و گلایسین استفاده کردیم. این لینکر به فرم صحیح هر یک از پروتئین‌ها نیز کمک می‌کند. در این مطالعه از وکتور بیانی pET28a (+) استفاده گردید. وکتور بیانی نوترکیب ابتدا در باکتری *E. coli* Bl21 DE3 ترانسفورم شد، اما هیچ بیانی مشاهده نگردید. با مطالعه بیوانفورماتیکی کاست ژنی با نرم‌افزارهای Rare Codon Calculator و Gene Script معلوم شد که کاست ژنی ما دارای کدون‌های نادر برای بیان در *E. coli* بود. به این منظور از باکتری *E. coli* Rosetta که دارای tRNA اصلاح شده برای کدون نادر بود استفاده گردید. حضور His-tag کمک بزرگی برای تخلیص پروتئین با ستون نیکل و تأیید پروتئین به کمک وسترن بلات نمود. میزان کم پروتئین تولیدی به‌خاطر حضور همین کدون‌های نادر در کاست ژنی بود که این مشکل را می‌توان با بهینه‌سازی کدون‌های کاست ژنی و طراحی کاست ژنی سنتتیک حل کرد و میزان بیان پروتئین را افزایش داد.

در نتیجه بعد از الحاق و همسانه‌سازی ژن‌های مدنظر پروتئین کایمریک *CTB*– Linker– *STxB* تخلیص و تأیید گردید. این پروتئین در ادامه این مطالعه به منظور تولید آنتی بادی پلی کلونال از حیوانات آزمایشگاهی و بررسی اثر ادجوانتی *CTB* استفاده خواهد شد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمام اساتید و دانشجویان گروه و مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود، شایان ذکر است که بودجه پژوهشی این طرح از طرف دانشگاه جامع امام حسین (ع) تأمین شد.

References

1. Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya SK. Shigellosis: Challenges & Management Issues. Indian Journal of Medical Research. 2004;120(5):454-456.
2. Schaetti C. Vaccines for Enteric Diseases: Update on Recent Developments. Exper Rev Vaccines. 2009;8(12):1653-1655.
3. Odumosu O, Nicholas D, Yano H , Langridge W. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable. Toxins. 2010;2(7):1612-1645.
4. Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, et al. A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga Toxin 2 for Cross-protection against Shiga Toxin types 1 and 2. Vaccine. 2008;26(17):2092-2099.
5. Arêas AP, Oliveira ML, Miyaji EN, Leite LC, Aires KA, Dias WO, et al. Expression and characterization of Cholera Toxin B-Pneumococcal surface adhesin a fusion protein in Escherichia coli: Ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004;321(1):192–196.
6. Sambrook and Russell. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
7. Niyogi SK. Shigellosis. The Journal of Microbiology. 2005;43(2):133-43.
8. Cherla RP, Lee SY, Tesh VL. Shiga toxins and apoptosis. FEMS Microbiol. Lett. 2003;228(2):159-166.
9. Marcato P, Griener TP, Mulvey GL. Recombinant Shiga Toxin B Subunit-KeyholeLimpet Hemocyanin Conjugate Vaccine Protects Mice from Shigatoxemia. Infect Immun. 2005;73(10): 6523–6529.
10. Zhonghua L, Xing BXZ. Clone and express ctb-stx2b fusion gene in entero hemrrhagic Escherichia coli O157: H7 Shigea l Toxin 2B subunit and V Cholera Toxin B subunit and the detection of their immunogenicity. National Library of Medicine. 2008;29(4):378-382.

Original Article

Fusion of Cholera Toxin B Subunit (*ctxB*) with *Shigella Dysenteriae Type* I Toxin B Subunit (*stxB*); Cloning and Expression in *E. coli*

Madanchi H, Honari H*, Safaei S, Sayadmanesh A

Biological Research Center, Department of Biological Sciences, Basic Sciences Faculty, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

Recieved Date: 2012/02/24 Accepted Date: 2012/07/24

Abstract

Background & Objective: Shiga toxin (STx) is the main virulence factor in *Shigella Dysenteriae type* I and is composed of an enzymatic subunit STxA monomer and a receptor-binding STxB homopentamer. Shigella toxin B subunit (STxB) is a non-toxic homopentameric protein responsible for toxin binding and internalization into target cells by interacting with glycolipid (Gb3). Cholera toxin B subunit (CTB) has been known as a mucosal adjuvant for vaccines and genetic fusions of CTB with several hetroantigens such as stxB and can increase humoral and mucosal immunity response.

Materials & Methods: In this study, after primer designing, the *ctxB* and *stxB* genes were amplified by PCR and cloned into the pGEM-T vector. The *stxB* gene with a nonfurin linker was fused to the *ctB* gene in the pGEM vector via the restriction enzyme method and thereafter the fused genes of *ctB-stxB* were subcloned in the pET28a(+) as an expression vector. The expressed chimeric protein was induced with IPTG and evaluated via the SDS.PAGE and Western blot techniques.

Result: The pET28a (+)/*ctxB-stxB* expression vector was confirmed by endonuclease digestion, PCR, and sequence analysis. The CTB-STB fusion protein was confirmed by the SDS-PAGE and Western-blot.

Conclusion: The CTB-STB recombinant protein can be used as a new and desirable mucosal vaccine for *Shigella Dysenteriae type I*.

Keywords: Adjuvant, CTB; Nonfurin linker, *StxB*, *Shigella Dysenteriae type I*

*** Corresponding author: Honari Hosein,** Biological Research Center, Department of Biological Sciences, Basic Sciences Faculty, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
Tel: +98 912 3848187
Email: honari.hosein@gmail.com