مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا | سال ششم | شماره ٤ | زمستان ۱۳۹۵

مقاله پژوهشی

کلونینگ و بیان ژن نانوبادی علیه انتروتوکسین B باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

زهرا توسلی[۱]، حمیده روحانی نژاد[۱]، جلیل فلاح مهرآبادی[۲*]

۱- پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲- آزمایشگاه میکروب‌شناسی لیستر، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با ترشح انتروتوکسین‌های متعدد باعث بیماری‌های مختلف می‌شود، به همین دلیل روش‌های مؤثر و آسان شناسایی انتروتوکسین‌ها موردنیاز است. امروزه غالباً از روش‌های ایمونوشیمیایی برمبنای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شود. در سرم خون خانواده شترسانان آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین یافت شده که VHH یا نانوبادی نامیده می‌شوند. خصوصیات منحصربه‌فرد این آنتی‌بادی‌ها از قبیل اتصال به مولکول‌های کوچک نظیر توکسین‌ها، آن‌ها را کاندیدهای جذابی برای توسعه ترکیبات دارویی نموده است. برای دستیابی به مولکول VHH علیه انتروتوکسین B/*استافیلوکوکوس* تحقیق حاضر انجام شده است.

مواد و روش‌ها: غنی‌سازی کتابخانه‌ی فاژی به‌منظور جداسازی نانوبادی‌های اختصاصی علیه توکسین در کارهای قبل انجام‌شده بود. در ادامه وکتور pCANTAB 5E حاوی VHH از باکتری *E.coli* سویه xl1blue، استخراج و پس از انجام واکنش PCR با پرایمرهای مربوطه، ساب‌کلونینگ در وکتور بیانی pET21a(+) با مکان‌های برش NdeI و XhoI صورت گرفت. ترانسفورماسیون وکتور درون باکتری *E.coli* سویه بیانی BL2I (DE3) انجام شد. سپس سلول‌ها تحت القای IPTG قرار گرفتند و زمان و شرایط تولید بهینه گردید، درنهایت بیان پروتئین توسط تکنیک SDS-PAGE و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: برای تأیید کلونینگ ژن نانوبادی درون وکتور pET21a(+)، توالی نوکلئوتیدی ژن آنالیز و ترانسفورم به باکتری *E.coli* سویه BL21(DE3) با موفقیت انجام شد. پس از القاء، پروتئین فعال درون سلول توسط روش SDS-PAGE مشاهده و توسط لکه‌گذاری وسترن تأیید شد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق کلونینگ، ساب کلونینگ و بیان ژن نانوبادی انجام شد. تولید این پروتئین نوترکیب می‌تواند گامی مهم در جهت توسعه روش‌های درمانی جدید و یا تولید واکسن علیه انتروتوکسین B باکتری *استافیلوکوکوس* اورئوس بردارد.

کلمات کلیدی: نانوبادی، VHH، انتروتوکسین B، *استافیلوکوکوس اورئوس*

مقدمه

بشر از ابتدای خلقت با معضل مسمومیت درگیر بوده و هر انسانی حداقل یک‌بار در عمر خود به این عارضه مبتلا شده است، یکی از مهم‌ترین عوامل مسمومیت غذایی در انسان سموم باکتریایی از جمله انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* است. *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از گسترده‌ترین و مضرترین پاتوژن‌ها بوده که عامل عفونت‌های حاد و مزمن در انسان و حیوانات است؛ زیرا که فاکتورهای متعددی در مقابله با پاسخ ایمنی میزبان تولید می‌کند، بخصوص کاهش اثر نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها که به‌عنوان اولین خط دفاعی در برابر عفونت‌ها هستند (۱، ۲). این باکتری با ترشح انتروتوکسین‌های متعدد باعث بیماری‌های مختلف می‌شود، تابه‌حال ۱۹ انتروتوکسین شناخته شده و این فهرست همچنان در حال افزایش است (۳، ۴ و ۵).

در واقع انتروتوکسین‌ها سوپر آنتی‌ژن‌های قدرتمندی هستند که تکثیر غیراختصاصی سلول‌های T را تحریک می‌کنند (۶). به نظر می‌رسد انتروتوکسین‌ها نه تنها در عفونت‌های کلاسیک استافیلوکوکی بلکه در بیماری‌های غیر عفونی هم درگیر هستند (۵، ۷). برخی از انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* علت سندرم‌های گوارشی هستند؛ دیگر گونه‌های *استافیلوکوکوس* با تولید توکسین ۱ منجر به

* **نویسنده مسئول: جلیل فلاح مهرآبادی**، آزمایشگاه میکروب‌شناسی لیستر، تهران، ایران
Email: jalil.Fallah@gmail.com

شوک سمی می‌شوند (TSST-1)، همچنین انتروتوکسین‌های SEA-SEE, SHE, SEG و SEI نقش مهمی در مسمومیت غذایی بازی می‌کنند (۸، ۹). غذاهای مختلف مانند گوشت حیوانات و پرندگان، شیر و محصولات لبنی آلوده به *استافیلوکوکوس* و حاوی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی منابع بزرگ مسمومیت هستند (۱۰، ۱۴)، در این میان SEB یکی از مهم‌ترین توکسین‌ها است که به دلیل خصوصیات ویژه‌اش موردتوجه قرار گرفته است. این توکسین بسیار جالب‌توجه است زیرا علاوه بر اینکه مانند سایر تیپ‌های انتروتوکسین از طریق گوارش جذب می‌شود، از طریق تنفس و به‌صورت آئروسل نیز انتقال می‌یابد (۱۱). قدرت ناتوان‌کنندگی این انتروتوکسین و انتشار آن از راه تنفسی این ماده را به‌عنوان یک عامل بیولوژیک مطرح می‌کند.

از طرفی تیپ A و B از لحاظ دیگری نیز اهمیت نظامی دارد؛ باکتری تولیدکننده توکسین در دست افراد به‌صورت فلور طبیعی وجود دارد، افرادی که در تهیه غذای کارکنان نظامی در مناطق جنگی فعالیت دارند اگر مسائل بهداشتی را رعایت نکنند و همچنین در سیستم نگهداری و انتقال غذا مسائل بهداشتی رعایت نگردد، این باکتری فرصت رشد و تولید توکسین را پیدا کرده، توکسین مقاوم به حرارت تولید می‌کند. به‌طوری‌که حتی اگر مجدداً حرارت داده شود توکسین باقی‌مانده و منجر به مسمومیت غذایی می‌گردد. با توجه به اهمیت نظامی و پزشکی این توکسین به دست آوردن فن‌آوری جهت مقابله با آن و توسعه معرف‌های نوترکیب علیه آن از اهمیت بسیاری برخوردار است. روش‌های متعددی برای بررسی انتروتوکسین‌ها هم‌اکنون در دسترس است (۱۰-۲۰)، اما غالباً از روش‌های ایمونوشیمیایی بر مبنای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شود (۲۰).

آنتی‌بادی‌ها یا ایمونوگلوبولین‌ها، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که به‌طور اختصاصی مولکول‌های خارجی یعنی آنتی‌ژن‌ها و عواملی که باعث تشکیل آن‌ها شده‌اند را با مکانیزم‌های مختلف و بدون تأثیر سوء بر سلول‌های سالم شناسایی می‌کنند (۲۱). فراوان‌ترین نوع آنتی‌بادی در گردش خون مهره‌داران هومودایمرهای IgG است که دارای ساختمان کلی مشترک، شامل چهار زنجیره پلی‌پپتیدی که دوبه‌دو باهم مشابه‌اند: دوزنجیره‌ی سنگین یکسان و دوزنجیره سبک یکسان، است که خود این زنجیره‌ها باهم و با زنجیره دیگر با پیوند دیسولفیدی متصل شده‌اند، هر زنجیره‌ی سبک شامل یک منطقه‌ی متغیر VL و یک منطقه‌ی ثابت CL است. زنجیره‌ی سنگین شامل یک منطقه‌ی متغیر (VH) و سه منطقه‌ی ثابت (CH1, CH2, CH3) است. مناطق متغیر اختصاصیت، تنوع و تمایل اتصال به آنتی‌ژن را مشخص کرده و مناطق ثابت ساختار آنتی‌بادی را مشخص می‌کنند و در تعیین نیمه‌عمر آنتی‌بادی و استحکام ناحیه متصل شونده به آنتی‌ژن مؤثرند (۲۲، ۲۳).

در میان آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌بادی‌های منوکلونال دسته‌ای از آنتی‌بادی‌ها هستند که تنها آنتی‌ژن‌های خاصی را شناسایی می‌کنند، اما در سال ۱۹۹۳ استثنای جالبی در سرم انواع شترسانان شامل شترهای دنیای قدیم (*Camelus bacterianus*، *Camelus dromedaries*) و شترهای دنیای جدید (*llama glama*، *llama pacos*، *llama vicugna* ، *llama guanicoe*) همچنین ماهی‌های غضروفی مشاهده شد (۲۴)، در سرم خون این حیوانات علاوه بر آنتی‌بادی‌های معمولی مقادیر قابل‌ملاحظه‌ای آنتی‌بادی‌های عملکردی زنجیره سنگین عاری از زنجیره سبک یافت شد که در دسته آنتی‌بادی‌های منوکلونال قرار گرفت (۲۵)، سه زیرگونه عملکردی از IgGها در سرم خانواده شتر سانان وجود دارد: IgG1 هترودایمری متشکل از همودایمرهای زنجیره سبک و سنگین است درحالی‌که IgG2 و IgG3 تنها از زنجیره‌های سنگین تشکیل شده‌اند در نتیجه به آن‌ها آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین (hcAbs) گفته می‌شود. hcAbها از دومین‌های متغیر تشکیل شده‌اند که به آن‌ها VHH یا نانوبادی گفته می‌شود که توسط دومین‌های ثابت CH2 و CH3 همراهی می‌شود. در مقایسه با آنتی‌بادی‌های معمولی CH1 در آن‌ها وجود ندارد و ناحیه لولا که VHH و نواحی CH2 را به هم متصل می‌کند به‌طورمعمول خیلی سخت و در مقایسه با IgGهای معمولی بلند است (۲۶)، قطعه اتصال یابنده به آنتی‌ژن در یک آنتی‌بادی کلاسیک (Fab: VH-CH& VL-CL) و در آنتی‌بادی شتری تک دومین متغیر (VH) در hCAbs است (۲۷، ۲۸).

برای جداسازی آنتی‌بادی‌های اختصاصی معمولاً حیوان با ۱ mg آنتی‌ژن یک‌بار در هفته و در طول مدت ۵ هفته واکسینه می‌شود. ادجوانت کامل فروند برای تزریق اول و ادجوانت ناقص فروند برای تزریق کمکی مورد استفاده قرار می‌گیرد و مراحل تهیه کتابخانه و انتخاب VHH توسط روش غربالگری[1] صورت

[1] panning

می‌گیرد. روش دیگر آماده‌سازی کتابخانه‌ها به‌صورت بستری مصنوعی است که به‌وسیله پیوند تصادفی نواحی CDR با داربست زنجیره سنگین ساخته می‌شود (۲۷). روش اول مزیت بهتری دارد: VHHهایی که در داخل بدن بالغ می‌شوند معمولاً اختصاصیت و ثبات بالاتری از آن‌هایی که به روش بستر مصنوعی و غیر ایمن ساخته می‌شوند دارند. روش‌های مختلفی برای بیان قطعات محلول VHH وجود دارد. اولین انتخاب معمولاً تولید در *اشرشیا کلی* است که بستگی به وکتور انتخاب شده و سویه باکتری دارد، همچنین پروتئین بیان‌شده را می‌توان به پری‌پلاسم هدایت کرد و یا اینکه در سیتوپلاسم به‌عنوان یک محصول محلول یا به‌صورت اینکلوژن بادی باقی می‌ماند (۳۰).

مواد و روش‌ها

همکاران مراحل تولید نانوبادی علیه انتروتوکسین B و غنی‌سازی کتابخانه فاژی را به‌صورت زیر انجام دادند:

تزریق عضلانی توکسین SEB به شتر در ناحیه گردن و نزدیک به غدد لنفاوی طی چندین نوبت، به‌منظور ایمن‌سازی، خون‌گیری از شتر و تخلیص لنفوسیت‌ها با استفاده از فایکول از خون محیطی و یا غدد لنفاوی، استخراج mRNA با استفاده از SDS و گوانیدیوم تیوسیونات و تهیه cDNA توسط تکنیک RT-PCR، تکثیر ژن نانوبادی با استفاده از تکنیک Nested PCR، کلون ژن VHH در وکتور بیانی فاژی سپس ترانسفورم

جدول ۱- توالی پرایمرهای پیشرو و پسرو

Forward Primer	5´-TAT ACA TAT CAG ACC GAGCAT CA-3´
Reverse Primer	5´-TAA CTC GAG GGA TTG TCC TG-3´

به باکتری و تهیه کتابخانه، نهایتاً انتخاب VHHها توسط تکنیک نمایش فاژی که در آن cDNA تقویت‌شده نواحی متغیری را کد می‌کند که در سطح فاژهای رشته‌ای بیان می‌شود. فاژها نواحی متغیری را عرضه می‌کنند که به آنتی‌ژن متصل می‌شوند و VHH متصل شونده به آنتی‌ژن توسط روش غربالگری جداسازی می‌گردد (۳۱)، در ادامه فرآیند که دستور کار این تحقیق است: باکتری *E.coli* سویه XL1-blue در آزمایشگاه به‌منظور استخراج وکتور pCANTAB 5E حاوی ژن کلون شده VHH کشت داده شد، که این استخراج طبق کیت شرکت BioFlux صورت پذیرفت. سپس بر اساس توالی ژن VHH یک جفت پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی گردید.جدول ۱ توالی پرایمرها را نشان می دهد. سمت ´5 پرایمر پیشرو (Forward) جایگاه برش آنزیم NdeI و سمت ´5 پرایمر پسرو (Reverse) جایگاه برش آنزیم XhoI قرار داده شد.

سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر طبق برنامه زیر انجام گرفت: Denaturation در دمای 94˚c به مدت 5 دقیقه، سپس 30 سیکل، هر سیکل: (Denature:94˚C/35s)، (Annealing:56˚C/35s) ,(Extension:72˚C/35s) و (Final Extension:72˚C/10min).

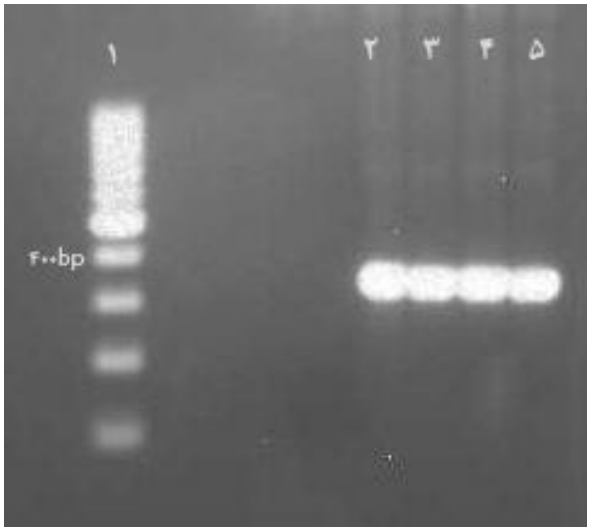
محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ آنالیز گردید و طبق کیت تخلیص از روی ژل شرکت BioFlux تخلیص و بعدازآن دو طرف قطعه و وکتور pET21a(+) با آنزیم‌های NdeI و XhoI بریده شد. بعد از برش وکتور و قطعه با آنزیم‌های مربوطه، مرحله بعدی اتصال انتهای چسبنده قطعه و وکتور بیانی pET21a(+) با آنزیم T_4 DNA لیگاز است. از طرفی باکتری *E.coli* سویه TOP10F در محیط مایع LB-Broth کشت داده شد و مراحل ایجاد سلول مستعد طی شد و وکتور حاوی ژن موردنظر به باکتری فوق ترانسفورم گردید. بعد از ترانسفورم، سوسپانسیون میکروبی در بلیت‌های حاوی آمپی‌سیلین ۸۰mg/ml و در انکوباتور ۳۷˚c قرار داده شد. سپس برای اطمینان از صحت ترانسفورم از تک کلونی‌های ظاهرشده بر روی پلیت ماتریکس تهیه شد و کلنی PCR با همان شرایط دمایی انجام شد.

از کلنی‌های که در کلنی PCR جواب مثبت دادند و از ترانسفورم پلاسمید pET21a به آن‌ها اطمینان حاصل شد استخراج پلاسمید صورت گرفت و برای بیان پروتئین VHH به باکتری *E.coli* سویه بیانی BL21(DE3) ترانسفورم شد. سپس با انتخاب کلنی‌ها و کشت آن‌ها در محیط مایع LB-Broth شرایط برای بیان این پروتئین بهینه گردید (جذب نوری ۰/۶، دمای ۳۷˚c، IPTG ۱ میلی مولار). بیان پروتئین پس از گذشت ۴ ساعت و همچنین ۱ شبانه‌روز پس از القاء، توسط تکنیک SDS-PAGE و ژل آگارز ۱۵٪ مورد بررسی قرار گرفت. بعد از مشاهده بیان این پروتئین ۱۵ کیلو دالتونی رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو صورت گرفت و تکنیک وسترن بلات جهت اطمینان از صحت ماهیت پروتئین تولیدشده انجام پذیرفت.

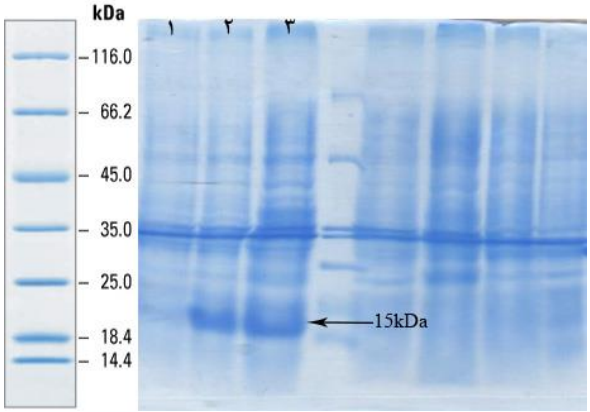
نتایج

مطابق برنامه دمایی ذکرشده در بخش قبل واکنش PCR جهت تکثیر قطعه VHH انجام شد. برای سنجش میزان غلظت قطعه

VHH و وکتور بیانی pET21a نسبت به یکدیگر، قبل و بعد از برش آنزیمی، هرکدام از نمونه‌ها در ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد. پس از الحاق وکتور و قطعه VHH و ترانسفورم وکتور مربوطه به باکتری *E.coli* سویه TOP10F، الکتروفورز محصول کلنی PCR از پلیت حاوی وکتور نوترکیب، قطعه ۴۰۰ جفت بازی را نشان داد. پس از تأیید صحت ترانسفورم وکتور به اکثر

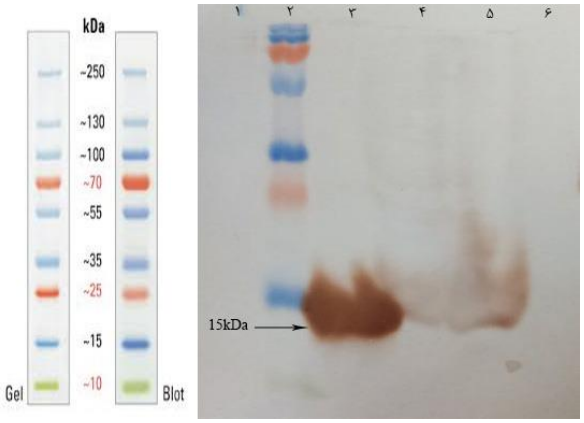


شکل ۱- الکتروفورز حاصل از پلاسمیدهای استخراج‌شده از باکتری TOP10F، حاوی قطعه VHH، همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود ستون‌های ۲ تا ۵ قطعه ۴۰۰ bp را نشان می‌دهد و ستون ۱ مارکر bp ۱۰۰ را نشان می‌دهد.



شکل ۲- بررسی بیان نانوبادی به کمک روش SDS-PAGE. ستون ۱ کنترل منفی (القا نشده)، ستون ۲ چهار ساعت پس از القا، ستون ۳ بیان پروتئین یک شبانه‌روز پس از القا و ستون ۴ مارکر اندازه مولکولی پروتئین

کلنی‌های باکتری نوبت به استخراج پلاسمید از کلنی‌های مثبت می‌رسد، در این مرحله بار دیگر برای تأیید از روی پلاسمیدها PCR انجام شد (شکل ۱). بعدازآن پلاسمید به باکتری *E.coli* سویه BL21(DE3) ترانسفورم شد. بعد از انجام SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی کوماسی بلو مطابق شکل ۲ باند پروتئینی VHH با وزن مولکولی ۱۵ کیلو دالتون مشاهده شد و لکه‌گذاری وسترن برای نمونه موردنظر و کنترل منفی آن انجام گردید. در شکل ۳ باند موردنظر بر روی کاغذ PVDF و در ناحیه ۱۵ کیلودالتون دیده می‌شود.



شکل ۳- بیان پروتئین به کمک وسترن بلات، ستون ۶ و ۱، کنترل منفی (باکتری القا نشده)، ستون ۲ نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ستون ۳ بیان دپروتئین موردنظر (یک شبانه‌روز پس از القا)، ستون ۴ دو ساعت پس از القا، ستون ۵ چهار ساعت پس از القا توسط IPTG.

بحث

آنتی‌بادی‌ها ابزاری برای تحقیقات ضروری و کلاس خوبی برای تشخیص‌های بالینی هستند. امروزه ثابت شده است که بسیاری از آنتی‌بادی‌ها برای تحقیقات درمانی و تشخیصی پایه و پیشرفته مفیدند (۳۲). بعد از گذشت بیش از ربع قرن تلاش در زمینه تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب امروزه این مواد فراوان‌ترین ترکیبات دارویی برای درمان انواع بیماری‌های انسانی می‌باشند؛ اما آنتی‌بادی‌های نوترکیب در آزمون‌های بالینی محدودیت‌های اساسی از خود نشان داده‌اند که مهم‌ترین این محدودیت‌ها: ایمونوژن بودن (به دلیل کد شدن توسط سلول‌های موش)، توزیع در بافت‌های طبیعی و نفوذ کم به تومورهای سخت است. تاکنون تلاش عمده‌ای در زمینه مهندسی واحدهای اتصالی کوچک‌تر که ویژگی و تمایل آنتی‌بادی‌های کلاسیک را حفظ کرده و ایمنی‌زایی کمتری داشته باشد، صورت گرفته است (۳۳، ۳۴).

کشف نانوبادی‌ها این پروتئین‌های کوچک را به‌عنوان عوامل دارویی مناسبی معرفی کرده است چراکه علاوه بر تمایل و اختصاصیت آن‌ها مانند آنتی‌بادی‌های منوکلونال است، از ساختارهای تک زنجیره‌ای طبیعی ساخته شده‌اند و دارای ویژگی‌های بیوفیزیکی متعددی هستند (۲۵)، ویژگی‌هایی از قبیل: ۱- ایمنی‌زایی ضعیف: به دلیل اشتراک و همولوژی زیاد توالی ژن‌های کدکننده آن‌ها با ژن‌های خانواده VH انسانی ۳ و ۴ (۳۵). ۲- تک دومینی بودن: با این ویژگی دست‌کاری ژنتیکی آن‌ها در مقایسه با قطعات متصل شونده به آنتی‌ژن آنتی‌بادی‌های معمولی که می‌تواند در اشکال Fab و scFv بیان شوند، (در هر دو مورد زنجیره‌های سبک و سنگین باید به‌طور جداگانه کلون شوند) راحت‌تر است، در مقابل، قطعه فعال متصل شونده به آنتی‌ژن آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین می‌توانند در شکل VHH به‌راحتی کلون شده و با عملکرد بالا با استفاده از سیستم‌های بیانی مختلف بیان شوند (۲۵). ۳- شناسایی انواع اپی‌توپ‌ها: تنوع زیاد طول و توالی VHHها آن‌ها را قادر به شناسایی اپی‌توپ‌هایی که نه‌تنها در سطح (۳۶)، بلکه در شکاف‌های اعماق یک پروتئین قرار دارند، می‌سازد. VHHها نشان داده‌اند که طیف وسیعی از اپی‌توپ‌ها اعم از هاپتن‌های کوچک (۳۷، ۳۸) تا محل اتصال آنزیم‌ها را شناسایی می‌کنند (۳۹). ۴- اندازه کوچک VHHها به آن‌ها اجازه می‌دهد تا در بافت‌ها نفوذ کنند، از موانع مانند سد خونی مغزی بگذرند و به اپی‌توپ‌هایی متصل شوند که اتصال آن‌ها به آنتی‌بادی‌های معمولی امکان‌پذیر نیست (۴۰). ۵- VHHها حلالیت و مقاومت بالایی حتی در شرایط واسرشتگی با دماهای بالا از خود نشان می‌دهند (۴۱) و خصوصیات دیگری چون نفوذ به عمق بافت متراکم، روند مطلوب برای تحویل دارو، افزایش ثبات ترمودینامیکی، حذف سریع و خصوصیات بیوفیزیکی و دارویی مناسب به همراه قابلیت تبدیل آن‌ها به پروتئین‌های چندکاره، سبب شده از آن‌ها به‌عنوان نسل جدیدی در درمان بر پایه آنتی‌بادی یاد شود. همچنین ظهور مهندسی مولکولی و تکنولوژی نمایش فاژی به گسترش کاربردهای آنتی‌بادی‌ها برای تصویربرداری مولکولی و درمان بیماری‌های متعدد، ازجمله بیماری‌های خود ایمنی، قلبی و عروقی، بیماری‌های عفونی، اختلالات هماتولوژیکی سرطان، التهاب و همچنین خنثی‌سازی توکسین‌ها کمک کرده است (۳۲).

گزارش‌ها در زمینه ساخت آنتی‌بادی‌های نوترکیب برای شناسایی پاتوژن‌های غذایی، سموم و عوامل جنگ بیولوژیک کم است. در سال ۱۹۸۹ کینل و همکاران یک گروه آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی علیه SEB وSEC1 را تهیه کردند که هیچ واکنش متقاطعی با سایر انتروتوکسین‌ها اعم از A، C2، C3، D و E ایجاد نکردند. در سال ۱۹۹۱ ریموندو همکاران روش ساندویچ الایزا را با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال خرگوشی با حساسیت تشخیصی بیشتر یعنی شناسایی مقادیر کمتر از ۱ng/mg از SEB، طراحی کردند. در سال ۲۰۰۶ راکویک روش دیگری برای شناسایی SEB در غذاهای آلوده ابداع کرد که با هیچ‌یک از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی واکنش متقاطع ندارد، نام این روش iQ-PCR است که ۱۰۰۰ بار نسبت به روش الایزا حساسیت و دقت بیشتری دارد، به این صورت که مقادیر بیش از ۱۰ Pg/mg را تشخیص می‌دهد (۴۲، ۴۳) اما برای شناسایی توکسین بوتولینیوم از آنتی‌بادی Fab نوترکیب جدا شده از کتابخانه نمایش فاژی استفاده شده است. همچنین از تکنیک نمایش فاژی برای ساخت آنتی‌بادی نوترکیب ScFv علیه عوامل بیولوژیکی چون آنتراکس، بروسلا و ریسین استفاده شده است که می‌توان با اتصال عوامل گزارشگر به این آنتی‌بادی‌ها از آن‌ها به‌عنوان بیوسنسور نیز استفاده کرد (۴۲، ۴۳ و ۴۴).

نتیجه‌گیری

اغلب کارهای انجام شده در ایران استفاده از تکنیک نمایش فاژی برای تولید کتابخانه و جداسازی نانوبادی خاص علیه بیماری‌های مختلف است.

اولین محققانی که موفق به کلون ژن VHH شدند، دکتر اربابی و همکاران بودند. آن‌ها یک نوع آنتی‌بادی شتری به نام cAb-Lys 3تولید کردند که می‌توانست فعالیت لیزوزوم را در آزمایشگاه مهار کند. این نوع آنتی‌بادی توانست به‌طور مؤثری تومورها و ضایعات متاستاتیک حاصل از تومور مدل موشی که لیزوزیم را در سطح غشای خود بروز می‌داد، مهار کند (۴۵).

و اما در این پروژه ساب کلون ژن نانوبادی در دو وکتوربیانی pET21a و pET28a و ترانسفورم به دو میزبان باکتریایی DH5a و TOP10F صورت گرفت؛ یعنی هر وکتور به دو میزبان انتقال داده شد.

القاء پروتئین هم یک‌بار با افزودن IPTG، ۱ mM و بار دیگر با افزودن IPTG، ۱۰۰mM به محیط کشت باکتری و رشد آن تحت دماهای مختلف؛ به این صورت که یک‌بار القا در دمای ۳۷°c، یک‌بار در دمای ۲۵°c و بار دیگر در دمای ۱۸°c، به‌منظور رسیدن به دمایی که در آن پروتئین القا شود و در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و یک شبانه‌روز و در حجم‌های مختلف ml ۵، ۵۰ml و ۲۵۰ml به‌منظور رسیدن به زمان و حجم مطلوب برای القا صورت پذیرفت. همچنین بررسی بیان ژن در ژل آکریل‌آمید ۱۲/۵٪ و ۱۵٪ انجام شد.

درنتیجه شرایطی که منجر به بیان پروتئین شد: ساب کلون ژن VHH در pET21a، ترانسفورم وکتور به باکتری TOP10F، القاء بیان پروتئین با افزودن IPTG، ۱ mM، کشت باکتری تحت دمای ۳۷°c، در حجم 5ml و با گذشت زمان ۴ ساعت و رسوب‌گیری و بار دیگر رسوب‌گیری با گذشت یک شبانه‌روز از القا و مشاهده بیان ژن در ژل آکریل‌آمید ۱۵٪.

استفاده از وکتورهای بیانی متنوع و انتقال آن‌ها به میزبان‌های متعدد همچنین القا در دماهای مختلف سبب بیان حداکثری این پروتئین در میزبان پروکاریوتی شد که نه تنها نقطه قوت این تحقیق است بلکه گام مهمی در تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب برای مقابله با بیماری‌ها و تولید واکسن است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله بر خود لازم می‌دانم از دانشگاه صنعتی مالک اشتر به خاطر حمایت‌های مالی و معنوی سپاسگزاری کنم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Barth J, Marshall S, Watson I. Consensus meeting on reporting glycated haemoglobin (HbA1c) and estimated average glucose (eAG) in the UK: report to the National Director for Diabetes, Department of Health. Diabetic Medicine. 2008;25(4):381-2.
2. Venditti EM, Kramer MK. Necessary components for lifestyle modification interventions to reduce diabetes risk. Current diabetes reports. 2012;12(2):138-46.
3. Bidi F, HASSANPOUR K, RANJBARZADEH A, ARAB KA. Effectiveness of Educational Program on Knowledge, Attitude, Self Care and Life Style in patients with type II diabetes. 2013.
4. Jalilian F, Zinat Motlagh F, Solhi M. Effectiveness of education program on increasing self management among patients with type ii diabetes. www sjimu medilam ac ir. 2012;20(1):26-34.
5. Hyacinth HI, Adekeye OA, Ibeh JN, Osoba T. Cervical cancer and pap smear awareness and utilization of pap smear test among Federal civil servants in North Central Nigeria. PLoS One. 2012;7(10):e46583.
6. Tanner-Smith EE, Brown TN. Evaluating the Health Belief Model: A critical review of studies predicting mammographic and pap screening. Social Theory & Health. 2010;8(1):95-125.
7. Soltani R, Kafee S, Salehi I, Karashki H, Rezaee S. Survey the quality of life in Guilan university students. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2010;19(75):25-35.
8. Group DPPR. Reduction in the incidence of type 2 iabetes with lifestyle intervention or metformin. The New England journal of medicine. 2002;346(6):393.
9. Mansoorian M, BehnamPoor N, Kargar M. health related Quality of life in Gorgan University of medical sciences students. J Gorgan Univ Med Sci. 2006;10:16-25.
10. Nadrian H, MOROVATI SM, Mirzaei A, Bahmanpur K, Moradzadeh R, SHARIATI A. Relationship between quality of life, health status and self-care behaviors in patients with rheumatoid arthritisi in yazd (central Iran). 2011.
11. Chlebowy DO, Hood S, LaJoie AS. Facilitators and barriers to self-management of type 2 diabetes among urban African American adults focus group findings. The diabetes educator. 2010;36(6):897-905.
12. Darvishpoor Kakhki A, Abed Saeedi Z, Yaghmaie F, Alavi Majd H, Montazeri A. Survey correlation between quality of life and disease and demographic variables of diabetic patients referred to Tehran hospitals in 2004. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2006;8(1):49-56.
13. Cezaretto A, Siqueira-Catania A, de Barros CR, Salvador EP, Ferreira SRG. Benefits on quality of life

concomitant to metabolic improvement in intervention program for prevention of diabetes mellitus. Quality of Life Research. 2012;21(1):105-13.
14. Baghianimoghadam M, Afkhami Ardekani M. The effect of educational intervention on quality of life of diabetic patients type 2, referee to diabetic research centre of Yazd. The Horizon of Medical Sciences. 2008;13(4):21-8.
15. Karlsson I, Berglin E, Larsson PA. Sense of coherence: quality of life before and after coronary artery bypass surgery—a longitudinal study. Journal of Advanced Nursing. 2000;31(6):1383-92.
16. M M. Editor. Guiding diabetic patients. 3rd ed. Tehran: Chahr Pub; 2000.
17. S M. editor. Principal of teaching to patient. Tehran: Salemi nashr; 2001. p. 9 -11.
18. Abbasgholizadeh N, Mazloomi-Mahmodabadi S, Baghianimoghadam M, Afkhami Ardekani M, Mozaffari-Khosravi H, Nemati A, et al. Improving Uutritional Behaviors of Pre-Diabetic Patients in Yazd City: a Theory-Based Intervention. Journal of Health. 2013;4(3):207-16.
19. Didarloo A, Shojaeizadeh D, ASL RG, Habibzadeh H, Niknami S, Pourali R. Prediction of self-management behavior among Iranian women with type 2 diabetes: application of the theory of reasoned action along with self-efficacy (etra). Iranian Red Crescent Medical Journal. 2012;14(2):86.
20. Toobert DJ, Hampson SE, Glasgow RE. The summary of diabetes self-care activities measure: results from 7 studies and a revised scale. Diabetes care. 2000;23(7):943-50.
21. Nejat S, Montazeri A, Holakouie Naieni K, Mohammad K, Majdzadeh S. The World Health Organization quality of Life (WHOQOL-BREF) questionnaire: Translation and validation study of the Iranian version. Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research. 2006;4(4):1-12.
22. Babazadeh T, Taghdisi M, Sherizadeh Y, Mahmoodi H, Ezzati E, Rezakhanimoghaddam H et al . The Survey of Health-Related Quality of Life and its effective factors on the Intercity Bus Drivers of the West Terminal of Tehran in 2015. chj. 2015; 9 (1) :19-27
23. Monami M, Zannoni S, Gaias M, Nreu B, Marchionni N, Mannucci E. Effects of a Short Educational Program for the Prevention of Foot Ulcers in High-Risk Patients: A Randomized Controlled Trial. International journal of endocrinology. 2015;2015.
24. Koonce TY, Giuse NB, Kusnoor SV, Hurley S, Ye F. A personalized approach to deliver health care information to diabetic patients in community care clinics. Journal of the Medical Library Association: JMLA. 2015;103(3):123.
25. Chen S-Y, Wang H-H. The relationship between physical function, knowledge of disease, social support and self-care behavior in patients with rheumatoid arthritis. Journal of Nursing Research. 2007;15(3):183-92.
26. Zendehtalab H, Vaghei S, Emamimoghadam Z. Effect of intervention based on BASNEF model on quality of life in patients with type 2 diabetes. Evidence Based Care. 2013;3(1):7-16.
27. Hazavehei M, Khani Jyhouni A, Hasanzadeh A, Rashidi M. The effect of educational program based on BASNEF model on diabetic (Type II) eyes care in Kazemi's clinic,(Shiraz). Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2008;10(2):145-54.
28. Najimi A1 AL HA, Sharifirad GR. The Effect of Nutritional Education on Metabolic Outcomes Based on BASNEF Model in Elderly Patients with Type 2 Diabetes. 2010; 6(3):549-58 .(Persian). J Res Health Sci 2010;6(3):549-58.
29. Ayele K, Tesfa B, Abebe L, Tilahun T, Girma E. Self care behavior among patients with diabetes in Harari, Eastern Ethiopia: the health belief model perspective. PLoS One. 2012;7(4):e35515.
30. Jaarsma T, Halfens R, Tan F, Abu-Saad HH, Dracup K, Diederiks J. Self-care and quality of life in patients with advanced heart failure: the effect of a supportive educational intervention. Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care. 2000;29(5):319-30.
31. Ghotbi N, Seyed Bagher Maddah S, Dalvandi A, Arsalani N, Farzi M. The effect of education of self care behaviors based on family-centered empowerment model in type II diabetes. Journal of Shahid Beheshti School of Nursing & Midwifery. 2014;23(83):7027-.
32. Oshvandi K, Jokar M, Khatiban M, Keyani J, Yousefzadeh MR, Sultanian AR. The Effect Of Self Care Education Based on Teach Back Method on Promotion of Self Care Behaviors In Type Ii Diabetic Patients: A Clinical Trial Study. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism. 2014;13(2):131-43.
33. M K, A MM, AH S, P R. Self-care behaviors and related factors in patients with heart failure reffering to medical & educational center of heart in Rasht.. Holistic Nursing and Midwifery Journal. 2013;23(1):22-9.
34. Beard E, Clark M, Hurel S, Cooke D. Do people with diabetes understand their clinical marker of long-term glycemic control (HbA1c levels) and does this predict diabetes self-care behaviours and HbA1c? Patient education and counseling. 2010;80(2):227-32.
35. Shayeghian Z, Aguilar-Vafaie M, Besharat MA, Parvin M, Roohi Gilani K. The Association between Self-Care and Control of Blood Sugar and Health-related Quality of Life in Type II Diabetes Patients. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2014;15(6):545-51.

Original Article

Cloning and Expression of Nanobody Gene against Enterotoxin B of *Staphylococcus Aureus*

Tavassoli Z[1], Rouhani Nejad H[1], Fallah Mehr Abadi J[2]*

1- Department of Bioscience and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran
2- The Lister Laboratory of Microbiology, Tehran, Iran

Received: 10 May 2016 Accepted: 09 Aug 2016

Abstract

Background & Objectives: *Staphylococcus aureus* bacteria causes many different diseases by secretion of various enterotoxins. Therefore, it is necessary to develop ways that facilitate the detection of enterotoxins. Nowadays, immunochemical methods which are based on monoclonal antibody technology are used. The heavy chain antibodies that are called VHH or Nano body were found in blood serum of the *Camelidae* family. The unique properties of this antibody such as their binding to small molecules like toxins make them attractive candidates for the development of immunodiagnostic tests. The present study was done to achieve a VHH molecules against Staphylococcus enterotoxin B.

Materials & Methods: Freighting phage library for isolate private Nano bodies against enterotoxin B was done in previous works. Next, pCANTAB 5E vector that consists VHH, extracted from *E.coli* bacteria strain xl1blue, and after doing PCR process with relative primers, sub cloning in pET21a(+) as an expression vector with cut sites NdeI and XhoI was done. Transformation in *E.coli* bacteria strain BL21(DE3) was done. Then, the cells effected with IPTG and producing time, and other terms were optimized. Finally, the expression of the protein with SDS-PAGE and western blot techniques was evaluated.

Result: For proving cloning of nano body gene in pET21a (+) vector, nucleotide sequence of gene was analyzed, and transforming to *E.coli* bacteria strain BL21(DE3) was successful. After inspiration, active protein in cell was seen by SDS-PAGE technique and proved by western blot.

Conclusion: cloning, sub cloning, and nonabody expression were surveyed in this research. Production of this protein can help to develop new therapeutic methods and produce vaccine against enterotoxin B of *Staphylococcus aureus*.

Keywords: nanobody, VHH, entrotoxin B, *Staphylococcus aureus*

***Corresponding author: Jalil Fallah Mehr Abadi,** The Lister Laboratory of Microbiology, Tehran, Iran
Email: jalil.fallah@gmail.com