مقاله
پژوهشی

بهینه سازی بیان اگزوتوکسین A (دومین I,II)نوترکیب سودوموناس آئروژینوزا، تخلیص و ارزیابی آن در آزمایشگاه

لیدا افتخاری وش[1]، صفر فرج نیا[2]، شهین نجار پیرایه[3]، اصغر تنومند[4]*

[1]مربی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران
[2]دانشیار بیوتکنولوژی، مرکزتحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[3]دانشیار باکتری شناسی، گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[4]استادیار باکتری شناسی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی مراغه، دانشگاه علوم پزشکی مراغه، مراغه ، ایران
*نویسنده مسئول: استادیار باکتری شناسی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی مراغه، دانشگاه علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران
پست الکترونیک: tanomanda@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: *اگزوتوکسین A فاکتور مهم در بیماریزایی سودوموناس آئروژینوزا بوده و خنثی سازی آن در مبارزه با عفونتهای ناشی از آن کمک کننده خواهد بود. بنابراین در این مطالعه بهینه سازی تولید و تخلیص اگزوتوکسین A (دومین I,II) و ارزیابی اولیه آن بعنوان کاندید واکسن مورد بررسی قرار گرفته است.*

مواد و روش کار: *بعد از استخراج DNA از سودوموناس آئروژینوزای سویه PAO1 و تکثیر با PCR، قطعه ژنی مورد نظر با اتصال به ناقل Pet22b به Escherichia coli BL21 (E.coli) منتقل و بیان آن با روش SDS-Page بررسی گردید و پروتئین نوترکیب با روش افینیتی کروماتوگرافی تخلیص شد. واکنش آنتی ژنیک آن با آنتی بادی ضد اگزوتوکسین A و سرم بیماران مبتلا به عفونت سودوموناس آئروژینوزا با روش وسترن بلاتینگ بررسی گردید.*

یافته ها: *بر اساس نتایج این مطالعه قطعه ژنی اگزوتوکسین A (دومین I,II) سودوموناس آئروژینوزا با اندازه ۱۲۱۲ bp در ژل الکتروفورزمحصول PCR مشاهده گردید که مقایسه توالی ژن کلون شده با توالی ژن اگزوتوکسین سودوموناس آئروژینوزای سویه PAO1، صحت توالی را تایید کرد. بیان در E. coli BL21 باعث تولید پروتئین مورد نظر با اندازه تقریبی ۴۵ KD گردید. بیان در شرایط مختلف نشان داد القای ۴ ساعت با نیم میلی مولار IPTG در دمای ۲۸ °C بهترین شرایط تولید پروتئین با غلظت بالا بود. نتایج نشان داد این پروتئین در وسترن بلاتینگ با آنتی بادی ضد اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزای و سرم بیماران مبتلا به عفونت سودوموناس بخوبی واکنش نشان داد.*

نتیجه گیری: *سیستم استفاده شده سیستم مناسبی برای تولید اگزوتوکسین A (دومین I,II) نوترکیب است و می تواند برای تولید این پروتئین در مقیاس بالا مورد استفاده قرار گیرد.*

واژه های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا، کاندید واکسن، اگزوتوکسینA، واکسن نوترکیب*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی سال ۹۴؛ دوره ۷ (۳):۴۹۵-۵۰۷
Journal of North Khorasan University 2015;7(2):495-507

وصول: ۹۳/۱/۲۳
اصلاح: ۹۳/۳/۷
پذیرش: ۹۳/۵/۱۱

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزابه طور رایج از عفونت های بیمارستانی جدا می شود. رایج ترین عامل پنومونی بیمارستانی بوده و باکتریمی ایجاد شده توسط سودوموناس آئروژینوزا دارای مرگ و میر بالای می باشد. سودوموناس آئروژینوزا در دستگاه تنفسی تطابق خوبی ایجاد کرده است. این تطابق بخصوص در بیماران برونکوپنومونی انسدادی مزمن (افرادی که ضعف سیستم ایمنی دارند و در بخش مراقبت های ویژه بستری می شوند) بیشتر دیده می شود. سودوموناس آئروژینوزا در بیماران پنومونی بیمارستانی استفاده کننده از ونتیلاتور از باکتریهای مهم عامل عفونت می باشد. همچنین از مهمترین عوامل عفونت ریوی در بیماران سیستیک فیبروزیس بوده وبه شکل مزمن در مجاری هوایی بیماران برونکتازی، برونکوپنومونی انسدادی یا بیماران سستیک فیبروزیس هم وجود دارد و در بیماران سرطانی نوتروپنک شیمی درمانی شده عفونت با سودوموناس آئروژینوزا از عفونتهای معمول است [۱].

سودوموناس آئروژینوزا فاکتورهای بیماریزای متعددی دارد که نشان دهنده ماهیت بیماریزایی پیچیده آن است، هر کدام از این فاکتورهای بیماریزای درعفونتهای سودوموناسی نقش مهمی دارند فاکتورهای سطحی مانند پیلی – لیپوپلی ساکارید و لایه پلی ساکاریدی آن در اتصال باکتری و کلونیزاسیون نقش دارند. پروتئین های ترشح شده ازاین باکتری نیز نقش مهمی در انتشار و آسیب بافت دارند.

با مصرف گسترده پنی سیلین و سایر آنتی بیوتیک ها برای کنترل ارگانیسم های گرم مثبت، درسال ۱۹۵۰ باکترهای گرم منفی بخصوص سودوموناس آئروژینوزا بعنوان عوامل ایجاد کننده عفونت در جمعیت انسانی خود را نشان دادند. در این زمان باکتریهای گرم منفی و سودوموناس آئروژینوزا بعنوان باکتری هدف در درمان عفونت در بیماران بستری در بیمارستان ها بودند. اگرچه در ابتدا آنتی بیوتیک های جدید با تاثیر ضد سودوموناسی در کنترول سودوموناس آئروژینوزا موفق بودند اما استعداد ذاتی این ارگانیسم در کسب مقاومت مشکل دیگری در درمان ایجاد کرد. بنابراین راههای آلترناتیو برای درمان و پیشگیری برای عفونتهای سودوموناس مطرح شد تحقیقات گسترده درمکانیسم های پاتوژنزسودوموناس آئروژینوزا منجر به معرفی فاکتورهای بیماریزای باکتری شده و بر اساس آن امکان مطالعات واکسیناسیون برای پیشگیری وایمنوتراپی ایجاد شد و فاکتورهای مختلفی از جمله لیپوپلی ساکارید-اگزوتوکسینA – ریبوزوم- فلاژل- پیلی- پلی ساکاریدهای با وزن مولکولی بالا آلژینات- پروتئین های غشاء خارجی – کونژوکه های چند ترکیبی –DNA واکسن ها – پروتئین های سیستم ترشحی III و غیره بعنوان ترکیبات کاندید واکسن مورد توجه قرار گرفتند [۲،۳].

در میان توکسینهای خارج سلولی سودوموناس آئروژینوزا، اگزوتوکسین A نقش مهمی در بیماریزای دارد. بررسیها نشان می دهد که یک موتانت با نقص در اگزوتوکسین A ۲۰بار بیماریزای کمتری نسبت به سویه وحشی در موشها دارد. اگزوتوکسین A یک –ADP ریبوزیل ترانسفراز است که باعث مهار فاکتور طویل سازی ۲- (eEF-2) در سلولهای یوکاریوت می شود، در نتیجه سنتز پروتئین مهار شده و سلول می میرد. اگزوتوکسین A باعث مهار پاسخ میزبان به عفونت می شود. همچنین اگزوتوکسین A خاصیت آنتی ژنیک داشته وقتی دوز کمتر از سیتوتوکسیک آن به کار می رود برعلیه آن آنتی بادی ساخته می شود که بر اساس نتایج مطالعات مختلف این آنتی بادی بسیار محافظت کننده است. بنابراین بعنوان یک فاکتور مهم برای کاندید واکسن مورد توجه قرار گرفت [۴-۹].

زنجیر پلی پپتیدی اگزوتوکسین A براساس عملکرد سه دومین مشخص دارد. دومین I باعث اتصال توکسین به سلول هدف می شود که خود به دو دومین کوچک تقسیم می شود Ia (آمینو اسید های ۱-۲۵۲) در انتهای آمینی قرار می گیرد، و مسئول شناسایی رسپتور واتصال به آن می باشد. دومین Ib (آمینو اسیدهای ۴۰۴-۳۶۵) عملکرد دقیق آن مشخص نیست ممکن است برای ترشح توکسین ضروری باشد و یا در سمیت نقش کمکی داشته باشد. دومین II (آسید آمینه های ۳۶۴-۲۵۳) برای انتقال توکسین ازغشائ مورد نیاز است. دومین III (آمینواسیدهای ۶۱۳-۴۰۵) همراه با چهار اسید امینه

(۴۰۰-۴۰۴) زیر واحد کاتالیتیکی را تشکیل می دهد و فعالیت ADP- ریبوزیل ترانسفرازی دارد. این عمل منجر به مهار سنتز پروتئین و در نهایت باعث مرگ سلول می شود [۱۰].

برای تزریق به حیوان آزمایشگاهی و مطالعه آثارحفاظتی اگزوتوکسین A غیرسمی، تهیه و تخلیص آن، اولین قدم در مطالعات می باشد که طی این مطالعه با حذف دومین توکسیک اگزوتوکسین A، تولید آن بروش نوترکیب و در شرایط بهینه با غلظت بالا و نتایج ارزیابی خصوصیات آنتی ژنیک آن درآزمایشگاه گزارش شده است.

روش کار

ابتدا یک جفت پرایمر برای دومین های I و II (ناحیه اتصال به رسپتور وانتقال دهنده) ژن exoA براساس توالی ژن exoA سودوموناس آئروژینوزای سویه PAO1 ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI طراحی شد. پرایمرهای طراحی شده با نرم افزار Gene Runner بررسی شد و تا حد ممکن اصول و شرایط طراحی یک پرایمر مناسب همانندعدم ایجاد لوپ، دایمر، سنجاق سر، تطابق و نزدیکی Tm و ٪ G+C، طول مناسب و غیره رعایت گردید.

سپس سودوموناس آئروژینوزای سویه PAO1 از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه و پس از کشت واحیاء با استفاده از تست های متداول بیوشیمیایی تعیین هویت گردید. برای استخراج DNA ژنومی استفاده شد. استخراج DNA ژنومی با روش فنل - کلروفرم صورت گرفته و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش های اندازه گیری جذب نوری در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و واکنش PCR برای ExoA با DNA ژنومی در حجم ۲۵ µl با شرایط زیر انجام شد:

برای جداسازی و تخلیص ExoA از سایر باندهای غیر اختصاصی احتمالی و حذف پرایمرهای باقی مانده، محصول PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز و سپس باند مورد نظر با دقت جدا گردید. ژل حاوی باند پس از ذوب کردن (دمای ۵۶ درجه به مدت ۱۰ دقیقه) با استفاده از کیت تخلیص از ژل MN (Macherey Nagel) طبق دستورالعمل شرکت سازنده بازیافت و خالص شد.

کلون سازی قطعه ژنی دومین های EXOA I,II با استفاده از وکتور PTZ57R، میزبان E.Coli DH5α و با روش T/A Cloning براساس دستورالعمل کیت INS TA clone PCR cloning kitانجام شد. برای غربالگری کلون‌های حاوی ناقل نوترکیب PTZ57R-ExoA تعدادی از کلنی های سفید رنگ رشد یافته در محیط LB آگار حاوی آمپی سیلین-Gal X و IPTG انتخاب و به محیط LB آگارآمپی سیلین دار دیگر پاساژ داده شد تا کشت خالص از کلنی ها تهیه شود و کلنی های دارای ناقل نوترکیب PTZ57R-ExoA با روش‌های انجام PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی از طریق شرکت MWG آلمان تایید شد.

برای ساب کلونینگ ابتدا پلاسمید نوترکیب PTZ57R-ExoA (برای آزاد شدن قطعه ژنی -ExoA) و پلاسمید بیانی PET22b (برای خطی شدن) دردو میکروتیوب مجزا با دو آنزیم BamhI و XhoI هضم شدند و محصولات با الکتروفورز بررسی گردیده و پس ازلیگیشن در ناقل بیانی PET22b به میزبان بیانی E. coli BL21 ترنسفورم شد. جهت بررسی بیان پروتئین از روش SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) استفاده شد.

برای این کار ازکلونی‌های تایید شده، کلونی تک انتخاب و در محیط LB براث حاوی آمپی سیلین کشت و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ ° C قرار گرفت. پس از اینکه کدورت ناشی از رشد باکتری‌ها به حدود ۰/۵ (nm ۶۰۰) رسید ۱ میلی لیتر از محیط برداشت شده و در دور ۹۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل بعنوان نمونه القاء نشده جمع آوری گردید. به باقی مانده محیط کشت IPTG با غلظت ۱ میلی مولار اضافه شد و مجدداً انکوباسیون محیط القاء شده تا دو ساعت ادامه پیدا کرد. پس از دو ساعت ۱ میلی لیتر از محیط برداشت شده و در دور ۹۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد و پلت حاصل بعنوان نمونه القاء شده جمع آوری گردید و با استفاده از SDS-PAGE میزان بیان بررسی گردید. برای پیدا کردن شرایط بهینه بیان و بدست آوردن بیشترین محصول نوترکیب ، میزان بیان پروتئین در ۱،۲،۳،۴ و ۲۴ ساعت بعدازالقاء با غلظت های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲،

جدول ۱: تنظیم دمایی دستگاه ترموسایکلر

primery Denaturation	۹۴	۴دقیقه
secondary Denaturation	۹۴	۱دقیقه
Annealing	۶۵	۱دقیقه
Primery Extention	۷۲	۱دقیقه
secondary Extention	۷۲	۵دقیقه
cycle	۳۱	

۳ میلی مولار و در دمای انکوباسیون ۲۸ و ۳۷ درجه سانتیگراد بررسی گردید.

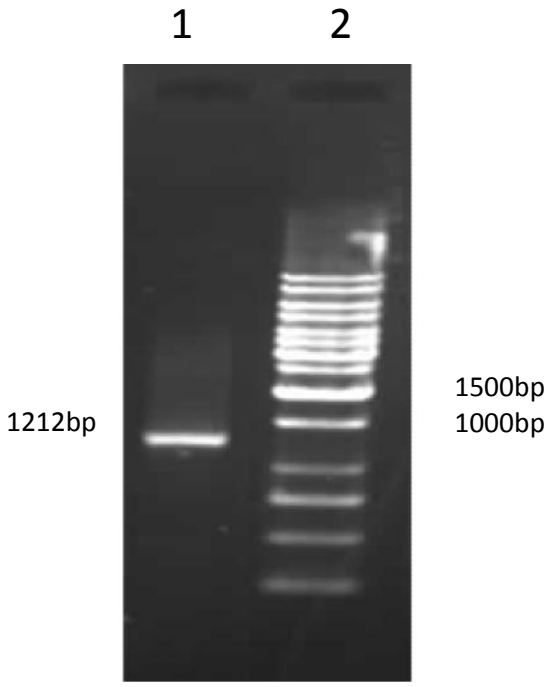
برای بررسی محلول بودن ویا انگلوژن بادی بودن پروتئین، با سانتریفوژ کردن ۱۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون القاء شده به مدت ۱۰ دقیقه در در دور ۷۰۰۰× g رسوب آن جمع آوری گردید و در ۳ میلی لیتر بافر حل کننده حل گردید و با سونیکاتور در فاصله‌های زمانی ۲۰ ثانیه و قدرت ۸۰% در روی یخ به تعداد ۱۰ بار سونیکه شدند. بعد لایزت سلولی به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰× g سانتریفوژ شد و مایع رویی آن به لوله دیگر منتقل شد. مقدار کمی از مایع رویی و رسوب به طور جداگانه با استفاده از SDS-PAGE بررسی گردید. تا بیان پروتئین به صورت محلول ویا انکلوژن بادی مشخص گردد.

برای تخلیص فیوژن پروتئین، روش افینیتی کروماتوگرافی (Agaros Nickel His- Ni-NTA) براساس دستورالعمل کیت ساخت شرکت QIAGEN استفاده شد. رسوب بدست آمده از محصول سونیکاسیون چندین بار در بافر PBS شستشو شده و در ۴-۶ میلی لیتر بافر لیز اوره حل گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه و در ۸۰۰۰× g سانتریفوژ شد تا ناخالصی های آن رسوب کند و مایع رویی برای انجام کروماتوگرافی آماده گردد.

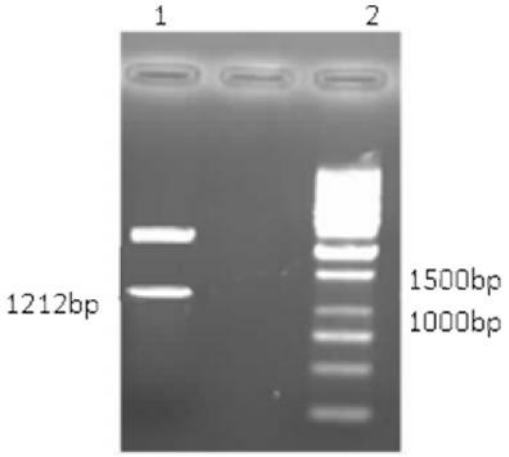
مایع رویی بدست آمده با ۲میلی لیتر زرین مخلوط شده وبه مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه (چند بار با هم زدن آرام) انکوبه شد. سپس به داخل ستون ریخته شد تا اتصال پروتئین مورد نظر به یون های نیکل انجام گیرد. سپس پروتئین مورد نظر، به وسیله ایمیدازول (Imidazole)(با غلظت های ۲۵-۲۵۰ میلی مولار) از ستون خارج شد ودرپایان فرآیند تخلیص محصول با SDS-PAGE مورد بررسی قرارگرفت. در نهایت برای بررسی عملکرد آنتی ژنیک آن از وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی ضد اگزوتوکسین A (Sigma Product Number P2318) و سرم بیماران بعنوان منبع آنتی بادی بطورجداگانه استفاده شد.

یافته ها

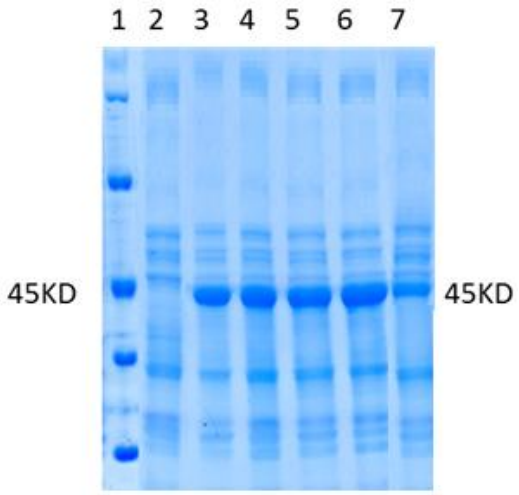
الکتروفورز محصولات PCR بر روی آگارز ۱% ، باندی با اندازه ۱۲۱۲ bp را نشان داد که با ژن exoA(دومین I,II) سودوموناس آئروژینوزای سویه PAO1 مطابقت داشت (شکل ۱).



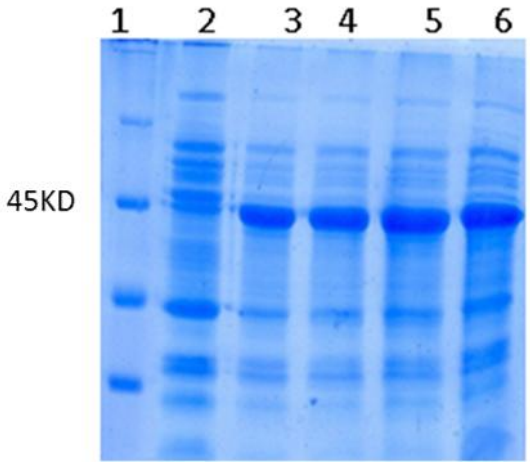
شکل ۱: نتیجه الکتروفورز محصول PCR: ۱، ژن exoA ۲، سایز مارکر



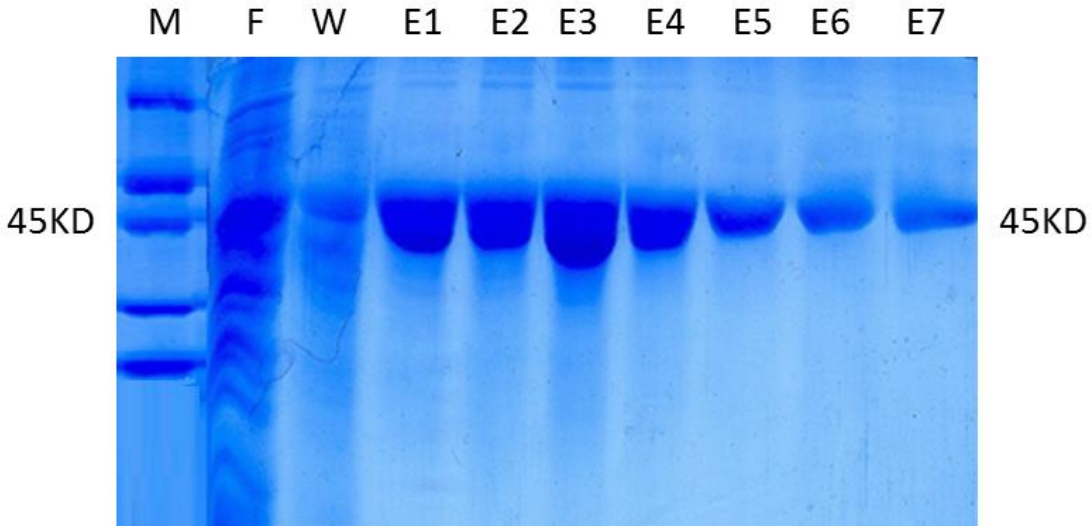
شکل ۲: الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل نوترکیب PET22b-ExoA با آنزیمهای BamhI و Xho I ۱- ExoAI,II ۲-سایز مارکر



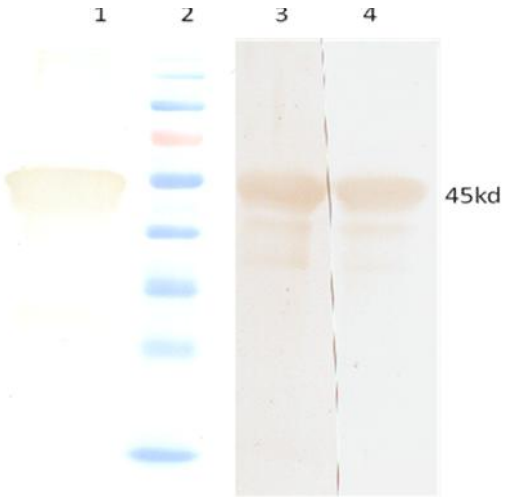
شکل ۳: بررسی بیان اگزوتوکسین A در ساعات مختلف بعداز القا :۱ پروتئین مارکر، ۲ قبل از القاء، ۳ الی۷ بترتیب ۴،۳،۲،۱ و ۲۴ ساعت بعد از القاء



شکل ۴: بررسی بیان اگزوتوکسین A با القاء توسط غلظت های مختلف IPTG :۱ پروتئین مارکر، ۲ قبل از القاء، ۳ الی ۶ بترتیب القاء با غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی مولار



شکل ۵: بررسی اگزوتوکسین A(I,II) تخلیص شده با SDS-PAGE. M، پروتئین مارکر ; F، محلول خروجی ستون، W= Wash؛ E1-E7 شستشوی ستون توسط بافر/ ایمیدازول 250mM



شکل۶: نتایج ایمونوبلاتینگ با استفاده از آنتی بادی اگزوتوکسین A و سرم بیماران مبتلا به عفونت سودوموناس آئروژینوزا
۱- آنتی بادی ضد اگزوتوکسین A ۲- پروتئین مارکر ۳،۴- سرم بیمار با عفونت سودوموناس آئروژینوزا

برای کلونینگ از ناقل PTZ57R و میزبان E. coli DH5α و برای ساب کلونینگ از ناقل بیانی PET22b و میزبان بیانی E.coli BL21 استفاده شد. کلونینگ با آزاد شدن قطعه ژنی مورد نظر (1212bp) در الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب و در نهایت با تعیین توالی از طریق شرکت MWG تایید شد (شکل۲).
پس از انجام مراحل کشت والقاء، نتایج SDS-PAGE بیان پروتیئن نوترکیب در موقعیت تقریبی ۴۵kD در مقایسه با شرایط غیر القاء نشان داد. آزمایشات مختلف نشان داد بهترین شرایط تولید، القاء ۴ساعت (شکل۳) با غلظت IPTG = 1mM/ml (شکل۴) در دمای ۳۷ °C می باشد. سونیکاسیون و بررسی مایع رویی ولیزات باکتریایی ثابت کرد که بیشتر پروتئین های تولیدی به شکل انکلوژن بادی بود. همچنین نتایج بدست آمده نشان داد پروتئین نوترکیب با شستشوی ستون توسط بافر/Imidazole 250mM بخوبی و با خلوص بالا از ستون جدا می شود (شکل۵)
واکنش آنتی ژنیک پروتئین اگزوتوکسین (دومین I,II) نوترکیب با آنتی بادی اگزوتوکسین A تهیه شده از سیگما (Product Number P2318 Sigma) در ایمونوبلاتینگ به اثبات رسید همچنین نتایج ایمونوبلاتینگ با استفاده از سرم بیماران مبتلا به عفونت سودوموناس آئروژینوزا نشان داد پروتئین نوترکیب تخلیص شده در این مطالعه با سرم این بیماران بخوبی واکنش نشان می دهد (شکل۶).

بحث

هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی امکان تولید اگزوتوکسین A (دومین I ,II) نوترکیب در شرایط بهینه بود بنابراین طی این مطالعه اگزوتوکسین A (دومین I ,II) به صورت نوترکیب تولید، تخلیص و ارزیابی گردید و فاکتورهای موثر در میزان بیان این پروتئین از جمله دمای انکوباسیون، مدت زمان انکوباسیون و غلظت ماده القاء کننده بررسی و بهینه سازی شد. و نتایج نشان داد امکان تولید اگزوتوکسین A (دومین I ,II) در مقیاس بزرگ و به صورت نوترکیب برای مصارف مختلف وجود دارد.
سودوموناس آئروژینوزا رایج ترین عامل پنومونی بیمارستانی است. باکتریمی ایجاد شده توسط سودوموناس آئروژینوزا دارای مرگ ومیر بالای می باشد [۳]. این باکتری همچنین دارای تعداد زیادی از فاکتورهای مقاومت آنتی بیوتیکی با واسطه پلاسمید و کروموزوم است که درمان آنتی بیوتیکی آن را با مشکل مواجه ساخته و آنتی بیوتیکهای جدید نیز مرگ ومیر ناشی از آن را کاهش نداده اند [۱۱-۱۶]. با توجه به مقاومت دارویی بالا و کاهش روزافزون تاثیر آنتی بیوتیک ها در سودوموناس آئروژینوزا، بررسی راههای آلترناتیو برای مقابله با عفونتهای آن یک ضروت فوری بوده و روش ایمونوتراپی و ایمونوپروفیلاکسی می تواند یکی از موثرترین راهها باشد [۱۷]. بنابراین در مطالعات مختلف فاکتورهای بیماریزای متعدد بعنوان کاندید واکسن مورد توجه قرار گرفته است. در این میان، اگزوتوکسین A از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و خنثی سازی آن, خنثی سازی عفونتهای سودوموناس آئروژینوزا را بدنبال دارد [۹،۱۸]. تولید و تخلیص اگزوتوکسین A با روشهای مختلف و ارزیابی آن بعنوان کاندید واکسن در مطالعات مختلف گزارش شده است بطوریکه منافی و همکاران درسال ۲۰۰۹ اگزوتوکسین A را از محیط کشت باکتری به طور نسبی تخلیص کردند و ایمنی زایی توکسوئید اگزوتوکسین A تهیه شده از سویه PA103 را درموش آزمایشگاهی بررسی کردند و نشان دادند که موش واکسینه شده با توکسوئید اگزوتوکسینA ۹۳/۸٪ از عفونتهای سودوموناس در سوختگی تجربی محافظت شده و مرگ و میر آنها درمقایسه با گروه کنترل کاهش پیدا کرد [۴]. زایم[1] و همکاران دو اپی توپ محافظت کننده در اگزوتوکسین A را معرفی کردند که یکی اسید امینه های ۲۸۹- ۳۳۳ و دیگری در ناحیه آنزیماتیک یعنی اسید امینه های ۶۱۰-۶۳۸ قرار دارد که پپتید های سنتیتیک این نواحی قادر به ایجاد آنتی بادی اختصاصی علیه اگزوتوکسین A شده و در آن خاصیت توکسیک هم وجود ندارد و مطالعه نشان داد هر دو این پپتیدها برای اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا محافظت کننده است همچنین به کار بردن پپتید ناحیه آنزیماتیک ۶۱۰-۶۳۸ به همراه آمیکاسین میزان زنده ماندن موش آلوده را افزایش داد [۵]. هدف مطالعه حاضر نیز بهینه سازی تولید و تخلیص

1 -Zaim

اگزوتوکسین A (دومین I,II) نوترکیب و ارزیابی اولیه آن در آزمایشگاه می باشد.

به علت مشکلات زیاد استخراج اگزوتوکسین A و همچنین ترشح پروتئازها به محیط کشت که باعث کاهش بازدهی محصول می شود تولید نوترکیب آن روش مناسبی برای بدست آوردن اگزوتوکسین A با کمیت و کیفیت بالا می باشد [۲۰،۱۹]. بنابراین تولید نوترکیب آن در مطالعات مختلف مورد توجه قرار گرفته است. بیات و همکاران طی یک مطالعه اقدام به کلونینگ وبیان دومین های توکسیک و انتقالی اگزوتوکسین A انجام دادند در این مطالعه دومین اتصال به رسپتور و دومین انتفال دهنده کلون، بیان و تخلیص شد که یک ترکیب ایمونوژن و غیر سمی از اگزوتوکسین A است این ترکیب دارای اپی توپ های متعدد بوده و ترکیب مناسبی با هدف کاندید واکسن می باشد [۲۰]. در مطالعه دیگری دانیل وزنیاک[۲] و همکاران برای تولید بیشتر از سویه توکسیژن دستکاری شده PA103 بعنوان میزبان تولید کننده اگزوتوکسین A نوترکیب استفاده کردند. آنها توانستند در این میزبان اگزوتوکسین A نوترکیب با فولدینگ طبیعی و با بازده بالا تولید کنند چون این سویه میزبان طبیعی تولید اگزوتوکسین A و آنزیم های پروتولیتیک شکننده توکسین را تولید نمی کند [۲۱]. وانگ[۳] و همکاران در سال ۲۰۱۰ در زمینه بهینه سازی و افزایش بیان اگزوتوکسین A در میزبان E.coli BL21 به صورت نوترکیب کار کردند و آنها با تغییر کدون ها و کم کردن GC٪ توانستند ۷۰٪ بیان اگزوتوکسین A را در E.coli بالا ببرند این تولید بالا در تخلیص و تولید اگزوتوکسین A نوترکیب بعنوان ترکیب کاندید واکسن ضروری می باشد [۲۲]. همچنین در مطالعات مختلف، ضمن توجه به تولید نوترکیب اگزوتوکسین A، تغییراتی در ساختمان آن جهت غیر سمی کردن با هدف کاندید واکسن انجام گرفته است که حذف اسید امینه گلوتامیک شماره ۵۵۳(Glu-553)- حذف دومین توکسیک – انتخاب اپی توپ های خاص از جمله این تغییرات می باشد [۹]. در مطالعه ما با حذف ۳۸ اسید امینه از انتهای کربوکسیلی آن ترکیب غیر سمی و نوترکیب از اگزوتوکسین A با خاصیت ایمونوژنیسیته مناسب بدست آمد.

نتیجه تعیین توالی ناقل نوترکیب PTZ57R-ExoA هویت ژن کلون شده را تایید کرده و گویای شباهت ۱۰۰% با توالی موجود در بانک ژنی بود.حامل های پلاسمیدی مختلفی برای بیان ژن در E. coli مورد استفاده قرار گرفته که از جمله آنها می توان از سیستم های بیانی PQE,PGEX و PET نام برد در سیستم های PET از پروموتور T7 استفاده می شود پروموتور فوق یک پروموتوربسیار قوی وبسیار اختصاصی بوده و توسط RNA پلی مراز E.coli شناسایی نمی شود [۲۳]. نتیجه بیان ژن EXOA با واسطه ناقل PET22b تولید پروتئین نوترکیب در باکتری القا شده بوده که در SDS-Page باندی با وزن مولکولی تقریبی ۴۵ گیلودالتون نشان داد که با اندازه مورد انتظار مطابقت داشت بنابراین این سیستم، میزبان مناسبی برای تولید پروتئین نوترکیب EXOA می باشد.

اگزوتوکسین A در سودوموناس آئروژینوزا به بیرون سلول و غشائ خارجی ترشح نمی شود بلکه در فضای پری پلاسمیک تجمع می یابد در این تحقیق مشاهده شد که اگزوتوکسین A در سیتوپلاسم سلول به صورت انکلوژن بادی تجمع می یابد وکاهش دمای انکوباسیون تا ۲۸ درجه سانتیگراد نیز کمک قابل توجهی به محلول سازی آن نکرد. همچنین استفاده از غلظت های مختلف IPTG و تغییر مدت القاء تفاوت معنی داری در افزایش بیان نشان نداد با این وجود غلظت یک میلی مولار IPTG، زمان ۴ ساعت القاء و دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد بهترین شرایط تولید در این مطالعه بود.

استفاده از ناقل pET22b و وجود ۶ هستیدین در ناحیه C – ترمینال پروتئین فیوژن به تخلیص آن توسط کروماتوگرافی رزین Ni-sepharose کمک کرد. IBs های جمع آوری شده در اوره ۸ مولار براحتی حل شد اما جداسازی آن از ستون در مراحل تخلیص توسط گرادیانت pH دارای بازده پایین بوده و استفاده از ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار بازده جداسازی محصول را افزایش می داد بنابراین استفاده از اوره ۸ مولار برای محلول سازی IBs ها

2-Wozniak
3- Wang

و گرادیانت غلظت ایمیدازول و ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار بهترین شرایط برای تخلیص پروتئین در این مطالعه بود.
نتایج وسترن بلاتینگ نشان دهنده ماهیت قابل قبول پروتئین نوترکیب بوده بطوریکه در آزمایش وسترن بلاتینگ، پروتئین نوترکیب تخلیص شده در این مطالعه با آنتی بادی پلی کلونال تهیه شده از شرکت سیگما و با سرم بیمارانی با عفونت سودوموناس آئروژینوزا بخوبی واکنش نشان داد. نتایج آزمایش وسترن بلاتینگ با سرم بیمارانی با عفونت سودوموناس آئروژینوزا حضور آنتی بادی بر علیه اگزوتوکسین A را در سرم تمامی بیماران مورد آزمایش نشان داد که این موضوع اهمیت اگزوتوکسین A بعنوان یک فاکتور بیماریزا را نشان می دهد بنابراین خنثی سازی آن در مبارزه با عفونت های سودوموناس آئروژینوزا از اهمیت ویژه ای برخورددار است. این نتایج پیشنهاد می کند پروتئین نوترکیب تهیه شده در این مطالعه می تواند در مطالعات ایمونیزاسیون مورد بررسی قرار گیرد بنابراین پیشنهاد می شود اثر آن در ایمو نیزاسیون فعال وغیر فعال و حتی استفاده ار آن بعنوان فاکتور کمک درمانی در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

اگزوتوکسین A (دومین I,II) نوترکیب در ناقل PET22b و در میزبان E.coliBl21 در شرایط القای ۴ ساعت با یک میلی مولارIPTG در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با غلظت بالا بخوبی بیان می شود و این پروتئین می تواند در مقیاس بالا در آزمایشگاه بصورت نوترکیب تولید شود و بعنوان یک ترکیب غیر سمی و کاندید واکسن در مدل حیوانی مورد بررسی قرارگیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه و بعنوان طرح مصوب (کد طرح ۰۵۱۴۷۱۹۰۰۲۲۷۰۰۲) انجام گرفت. نویسندگان از مساعدت معاونت پژوهشی این دانشگاه و از همکاری آقای حمید مصطفی زاده، خانم دکتر لیلا رهبر نیا و خانم شیوا عهدی تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P,“ et al”, Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium, Clin Microbiol Infect,2007; 13(6):560-78.
2. Ian Alan Holder, Pseudomonas immunotherapy: a historical overview, Vaccine 2004; 22: 831–839.
3. Roger Sordé, Albert Pahissa, Jordi Rello, Management of refractory Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis, Infection and Drug Resistance 2011;4: 31–41.
4. Manafi A, Kohanteb J, Mehrabani D, “et al”, Active immunization using exotoxin A confers protection against Pseudomonas aeruginosa infection in a mouse burn model, BMC Microbiol, 2009; Feb 1;9-23.
5. Zaim HS EI, Chopra Ak, pter son j w, Vasil M L, hggers J P, Protection against exotoxin A (ETA) and Pseudomonas aeruginosa infection in mice with ETA-spcific antipeptide antibodies, Infect Immun, 1998 Nov; 66(11):5551-4.
6. Cryz Sj, Fiirer E, Sadoff JC, “et al”, Use of pseudomonas aeruginosa toxin A in the construction of conjugate vaccines and immunotoxins, Clin Infect Dis 1987 9: 644-649.
7. Hertle R, Mrsny R, Fitzgerald D, Dual-Function Vaccine for Pseudomonas aeruginosa: Characterization of Chimeric Exotoxin A-Pilin Protein, Infect Immun 2001; 69(11): 6962–6969.
8. Denis-Mize KS, Price BM, Analysis of immunization with DNA encoding Pseudomonas aeruginosa exotoxin A, FEMS immunol Med Microbiol, 2000 Feb; 27(2):147-54.
9. Chen TY,Shang HF, Recombonant protein composed of pseudomonas exotoxin A, outer membrane proteins I and F as vaccine against P, aeruginosa infection, Appl Microbiol Biotechnol, 1999 oct; 52(4):524-33.
10.Wolf P, Elsässer-Beile U, Pseudomonas exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent, Int. J. Med. Microbiol 2009; 299(3):161–176.
11.Tavajjohi Z, Moniri R, Detection of ESBLs and MDR in Pseudomonas aeruginosa in a tertiary-care teaching hospital, Iran J Clin Infect Diseases 2011; 6(1):18-23[Persian].
12.Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S, “et al”, Metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in two Iranian teaching hospitals, their antimicrobial susceptibility and serotypes, J chemotherapy 2011; 23(2):114-116[Persian].
13.Lee S, Park YJ, Kim M,“ et al”,Prevalence of Ambler class A and D β-lactamases among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in korea, J antimicrobial chemotherapy 2005; 56:122-127.
14.Merlo CA, Boyle MP, Diener-West M, Marshall BC, Goss CH, Lechtzin N. Incidence and risk factors for multiple antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis, Chest 2007; 132(2):562–568.
15.Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y, Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa: Risk Factors and Clinical Impact , Antimicrob Agents Chemother,2006; 50(1): 43–48.
16.Breidenstein BE, Fuente-Núñez CDL, Hancock RE, Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance,Trends Microbiol 2011; 19(8):419–426.
17.Doring G, Pierb G, Vaccines and immunotherapy against Pseudomonas aeruginosa,Vaccine, 2008, 26:1011-1024.
18.Cryz SJ, Furer E, Que UJ, Synthesis and charactization of a Pseudomonas aeruginosa Alginate-Toxin A conjugate vaccine, Infect Immun, 1991; 59:1045-50.
19.Keyvani H, ghasemian H, Purification of exotoxin A from pseudomonas aeruginosa, J.Vet.Res 2001; 56(3):33-36[Persian].
20.Bayat A, Kamali A, Zarei A, “et al”, Isolation, identification and cloning of transfer domain of exotoxin A from pseudomonas aeruginosa, Kowsar Medical Journal 2010; 15(3): 149-154.
21.Wozniak D J, Han X Y and Galloway D R, Construction and use of a nontoxigenic strain of Pseudomonas aeruginosa for the production of recombinant exotoxin A.Appl. Environ. Microbiol 1995; 61(5):1739-1746.

22.Wang X, Li X, Zhang Z, Shen X, Zhong F, Codonoptimization enhances secretory expression of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A in E, coli.Protein Expression and Purification 2010; 72(1): 101–106.

23.Farajnia S, Hassanpour R, Lotfipour F, Cloning and expression of human IL-11 in E. coli. Pharma.Scie 2010; 15(4):353-359[Persian].

Original Article

Optimization of expression and in vitro characteristics evaluation of Pseudomonas aeruginosa recombinant exotoxin A (domains I and II)

*Eftekharivash L1 ، Farajnia S[2]، Najar Peerayeh Sh[3]، Tanomand A[4]**

[1]Instructor of Microbiology, Dept of Mirobiology, Islamic Azad University- Mragheh branch, Maragheh, Iran.
[2]Associate Professor of Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Associate Professor of Bacteriology, Dept of Bacteriology Faculty of Medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[4]Assistant Professor, Dept. of Laboratory Sciences, Maragheh Faculty of Medical Sciences, Maragheh university of Medical Sciences, Maragheh, Iran
***Corresponding Author:** Assistant Professor, Dept. of Laboratory Sciences, Maragheh Faculty of Medical Sciences, Maragheh university of Medical Sciences, Maragheh, Iran
Email: tanomanda@yahoo.com

Abstract

Background & Objectives: *P. aeruginosa exotoxin A plays an important role in virulence of the bacterium and its neutralization can abolish the P. aeruginosa pathogenicity. Therefore, we showed optimization of recombinant production and in vitro antigenic characteristics evaluation of exotoxin A (domains I and II) as a vaccine candidate.*

Material & Methods: *In this study, after DNA extraction and amplification with PCR, gene fragment was ligated to Pet22b vector and transferred to E.coli BL21. The protein expression was evaluated by SDS-PAGE method. The Ni-NTA affinity chromatography was used for recombinant protein purification. Then, the reactivity of recombinant exotoxin A with anti-exotoxin A antibody (Sigma) and sera from P. aeruginosa infected patients was evaluated by western blotting method.*

Results: *Sequencing of cloned gene showed that the sequence of exoA I-II gene was in accordance with exoA I-II from P. aeruginosa PAO1. SDS-PAGE analysis indicated that expression of recombinant protein with a molecular weight of 45kD. The results showed, 4 hours induction with IPTG = 0.5mM/m in 28°C is optimum condition for expression protein. Western blot analysis of the purified protein demonstrated that ExoA I-II could be recognized by antibody against native exotoxin A and the serum of patients with P. aeruginosa infection.*

Conclusion: *These results suggest that recombinant exoA I-II protein can be produced in the laboratory and this system can be used for large scale production of this protein for subsequent immunological studies.*

Key words: *Pseudomonas aeruginosa - vaccine candidate - exotoxin A- recombinant vaccine*

Journal of North Khorasan University 2015;7(3): 495-507

Recivied: 12 Apr 2014
Revised: 28 May 2014
Accepted: 2 Aug 2014