آنالیز بیوانفورماتیکی پروتئین مایکوباکتریایی Rv۱۷۳۳c بعنوان کاندیدای واکسن، همسانه سازی و بیان آن در *Escherichia coli*

میترا عشایری پناه[۱]، محمد مهدی فیض آبادی[۲]، بهرام کاظمی[۳]، فرشته افتخار[۴*]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱٤
تاریخ تصویب: ۹۵/۱۲/۱۱

چکیده

از آنجا که تعداد زیادی از جمعیت جهان به صورت نهفته با باسیل سل (Mycobacterium tuberculosis) آلوده هستند، واکسن هایی که سل نهفته را مورد هدف قرار بدهند تاثیر قابل توجهی در کنترل شیوع جهانی سل خواهند داشت. در این پژوهش ابتدا آنالیزهای بیوانفورماتیک روی یک پروتئین مایکوباکتریایی مربوط به فاز نهفته عفونت به نام Rv۱۷۳۳c انجام شد. پیش بینی شد که Rv۱۷۳۳c یک پروتئین غشایی با تعداد زیادی اپیتوپ های سلول B و T است که آن را کاندیدی مناسبی برای تولید واکسن می سازد. سپس، ژن rv۱۷۳۳c از H۳۷Rv M. tuberculosis به صورت شیمیایی سنتز شد، در پلاسمید pTG۱۹-T قرار داده شد و پلاسمید نوترکیب حاصل به E. coli Top۱۰ منتقل شد. پس از تایید توسط برش آنزیمی و توالی یابی، قطعه DNA مورد نظر به پلاسمید pET۲۳a(+) منتقل و در E. coli BL۲۱ (DE۳) بیان شد. پروتئین بیان شده بصورت باندی با وزن ملکولی تقریبی ۲٤ kDa در ژل مشاهده شدکه توسط آنتی بادی علیه دنباله هیستیدینی آن، باندی با اندازه مشابه در آنالیز وسترن بلات

۱-دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی
۲-استاد گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳-استاد گروه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
*٤-دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی
(نویسنده مسئول: f-eftekhar@sbu.ac.ir)

آشکار شد. در نهایت خالص سازی پروتئین با استفاده از یک کیت کروماتوگرافی تمایلی برای دنباله هیستیدینی صورت پذیرفت.

واژه های کلیدی: Rv۱۷۳۳c، Mycobacterium tuberculosis، Escherichia coli ، تخلیص پروتئین ، همسانه سازی و بیان.

مقدمه

اگرچه سل (tuberculosis) یک بیماری مربوط به ادوار گذشته محسوب می شد، طی ۳۰ سال گذشته به صورت بازپدید در بسیاری از قسمت های جهان تهدیدی جدی ایجاد کرده است. پیش بینی می شود که دو تا سه میلیون از مردم جهان به صورت نهفته به باسیل سل (*Mycobacterium tuberculosis*) آلوده هستند و آخرین گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ۱,۸ میلیون مرگ بر اثر سل را در سال ۲۰۱۵ میلادی برآورد کرده است (WHO, 2016). *M. bovis Bacillus* Calmette-Guerin (BCG) تنها واکسن در دسترس بر علیه سل می باشد (Partnership WST, 2010). در کشورهایی که سل اندمیک است، این واکسن بلافاصله بعد از تولد به نوزادان تجویز می شود زیرا در پیشگیری از شدیدترین فرم های سل در ابتدای کودکی کارایی دارد (Andersen & Doherty, 2005). به نظر می رسد که حفاظت حاصل از واکسن BCG محدود و متناقض است که نشان دهنده نیاز به واکسن های جدید و کارامدتر برعلیه سل می باشد (Colditz et al., 1994; Fine, 1995; Ottenhoff & Kaufmann, 2012)

یک واکسن ایده آل باید آنتی ژن های مربوط به فازهای مختلف عفونت سل را ارائه کند، یعنی شامل آنتی ژن هایی باشد که طی مرحله اولیه عفونت، مرحله نهفته عفونت (latency) و مرحله فعال شدن مجدد (reactivation) بیان می شوند (Ottenhoff & Kaufmann, 2012). این درحالی است که اکثر واکسن های سل که تاکنون وارد آزمایش های بالینی شده اند، واکسن های پیشگیری کننده (prophylactic vaccines) هستند که آنتی ژن های مربوط به مرحله اولیه عفونت را دربر می گیرند. بنابراین ، نیاز به واکسن هایی که آنتی ژن های فاز نهفته و/یا reactivation را بیان می کنند، با هدف حل معضل جهانی سل نهفته، به شدت احساس می شود.(Andersen, 2007) انتخاب یک کاندید مناسب از میان آنتی ژن های نهفته و تولید آن به صورت پروتئین نوترکیب می تواند گامی موثر در جهت افزایش کارایی واکسیناسیون با BCG باشد زیرا استفاده از پروتئین نوترکیب حاصل به عنوان یادآور و بعد از تزریق BCG می تواند

باعث بهبود عملکرد واکسیناسیون در ایمنی زایی گردد. در این مطالعه پس از انجام آنالیزهای بیوانفورماتیک، یک آنتی ژن نهفته باسیل سل به نام Rv1733c انتخاب شد. ابتدا ژن مربوطه بصورت شمیایی سنتز و سپس در میزبان *Escherichia coli* همسانه سازی و بیان شد. پروتئین نوترکیب خالص شده کاندیدی مناسب برای مطالعات بعدی می باشد.

مواد و روش ها

آنالیزهای بیوانفورماتیک: اطلاعات عمومی در مورد Rv1733c از جمله طول ژن کد کننده، محصول پروتئینی، طول و توالی آمینواسیدی آن از سایت توبرکولیست گرفته شد (Lew et al., 2011). اپی توپ های سلول B در توالی این پروتئین توسط دو نرم افزار تحت وب BepiPred (http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/) و ABCpred (http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/) پیش بینی شدند. محل های اتصال آنتی ژن های سازگاری نسجی لوکوسیت انسان (HLA) در توالی پروتئین بررسی شدند، به این ترتیب که اپی توپ های HLA کلاس I توسط پایگاه های NetCTL (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/) و HLAPred (http://www.imtech.res.in/raghava/hlapred/) و اپیتوپ های HLA کلاس II توسط پایگاه های HLAPred و ProPred (http://www.imtech.res.in/raghava/propred/) پیش بینی شدند. قدرت آنتی ژنی و پتانسیل آلرژن بودن پروتئین به ترتیب توسط برنامه های VaxiJen (http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen) و AlgPred (http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/) بررسی شدند. به منظور بررسی احتمال ترشحی بودن Rv1733c از نرم افزار های SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) و TATfind (www.signalfind.org/tatfind) استفاده شد. نرم افزار SignalP احتمال ترشح پروتئین از مسیر SecA و نرم افزار TATfind حضور موتیف twin-arginine translocation (Tat) که مربوط به مسیر TAT است را در توالی پروتئین بررسی می کنند. محل استقرار Rv1733c در درون سلول توسط پایگاه TBpred (http://www.imtech.res.in/raghava/tbpred/) و احتمال وجود مارپیچ های غشایی (transmembrane helices) در ساختار پروتئین و تعداد آن، توسط مدل Hidden Markov (Lew et al., 2011) و برنامه TMpred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) بررسی شد. در نهایت، ساختار سه بعدی Rv1733c توسط نرم افزار Swiss-Model پیش بینی شد (Arnold et al., 2006).

سویه های باکتریایی و ناقل های همسانه سازی: در این پژوهش از *E. coli* Top10 به

عنوان باکتری میزبان همسانه سازی و از *E. coli* BL12 (DE3) به عنوان باکتری میزبان بیانی استفاده شد که هر دو از شرکت Invitrogen (ایالات متحد آمریکا) تهیه شدند. از پلاسمید pTG19-T (شرکت Vivantis، مالزی) به عنوان ناقل همسانه سازی و از پلاسمید pET-23a(+) (شرکت Novagen، ایالات متحد آمریکا) به عنوان ناقل بیانی در E. coli استفاده گردید. آنزیمهای محدودالاثر و آنزیم DNA T4 لیگاز از (شرکت New England Biolabs، NEB، ایالات متحد آمریکا) تهیه شدند. از محیط کشت لوریا برتانی (LB) مایع و جامد (شرکت Sigma-Aldrich، انگلیس) جهت کشت باکتری استفاده شد (Green & Sambrook, 2012).

سنتز ژن: توالی نوکئوتیدی ژن rv1733c از *M. tuberculosis* سویه H37Rv از پایگاه NCBI به دست آمد (Accession No. JLDD01000018.1). این توالی به طول ۶۳۰ جفت باز سنتز و توسط توالی یابی تایید شد (شرکت پیشگامان انتقال ژن و شرکت Shingene، چین). جایگاه های برش BamHI و HindIII در دو طرف قطعه تعبیه شدند و کدون خاتمه حذف شد تا اجازه اتصال دنباله شش تایی هیستیدین حاصل از پلاسمید pET-23a در انتهای کربوکسیل پروتئین نوترکیب فراهم شود. قطعه سنتز شده به صورت محصول PCR در اختیار قرار گرفت.

تکثیر و همسانه سازی قطعه سنتز شده در pTG19-T: جهت تکثیر قطعه سنتز شده از روش PCR و آغازگرهای جدول ۱ استفاده شد. جهت تکثیر بهینه قطعه دو آنزیم Taq DNA polymerse (شرکت سیناکلون، ایران) وSoLong Taq DNA polymerase (شرکت بیوتکنولوژی پارس توس، ایران) و همچنین یک مستر میکس گرم-آغاز به نام EmeraldAmp Max HotStart PCR Master Mix(شرکت Takara، ژاپن) و PCR Master Mix از شرکت Promega (ایالات متحد آمریکا) مورد بررسی قرار گرفتند. هنگام استفاده از Taq DNA polymerse (شرکت سیناکلون)، مخلوط واکنش PCR (25 µl حاوی ۰,۲۵ µl قطعه DNA سنتز شده، ۱۰ pM از هر یک از پرایمرهای forward و reverse، ۲۰۰ µM مخلوط dNTP، 1.5 mM MgCl2 و U 2.5 Taq polymerase بود. هنگام استفاده از آنزیم SoLong Taq DNA polymerase و مسترمیکس های ذکر شده، مخلوط واکنش طبق دستورالعمل توصیه شده شرکت های سازنده آماده سازی شد. برنامه ترموسایکلر شامل ۱۰ دقیقه در ۹۵ °C، ۳۰ سیکل (۱ دقیقه در ۹۵ °C، ۱ دقیقه در ۶۰ °C و ۱ دقیقه در ۷۲ °C) و در آخر ۱۰ دقیقه ۷۲ °C بود. محصول PCR حاصل از شرایط بهینه توسط کیت استخراج از ژل (شرکت Bioneer، کره جنوبی) جدا گردید و با استفاده از روش همسانه سازی TA (TA cloning) در ناقل pTG19-T قرار

داده شد (Green & Sambrook, 2012). سپس پلاسمید نوترکیب pTG19-rv1733c با روش شوک حرارتی به میزبان باکتری *E.coli* Top10 که توسط تیمار کلرید کلسیم مستعد شده بود، منتقل گردید (Green & Sambrook 2012). این باکتریها مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت بر روی محیط کشت LB جامد حاوی X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside)، IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid)(شرکت Sigma، ایالات متحد آمریکا) و آمپی سیلین (شرکت جابرابن حیان، ایران) به ترتیب با غلظت های 0.1 mM، 40 µg/ml و 100 µg/ml کشت داده شدند. از میان کلنی های سفید رشد کرده، جهت تایید حضور پلاسمید نوترکیب، چند کلنی به صورت تصادفی انتخاب و DNA آن ها با روش جوشاندن استخراج شد تا بعنوان الگو برای واکنش PCR استفاده شود. چند کلنی حامل ژن در ۵ ml محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین (100 mg/ml) کشت شدند و استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انجام گرفت (Green & Sambrook, 2012). سپس برش با آنزیم های BamHI و HindIII صورت گرفت و پلاسمید نوترکیب پس از تایید توسط الکتروفورز آگارز، جهت توالی یابی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد.

زیرهمسانه‌سازی ژن در ناقل (+)pET23a: قطعه ژنی rv1733c توسط آنزیم های BamHI و HindIII از pTG19-rv1733c بریده شد و بوسیله آنزیم T4 Ligase در پلاسمید (+)pET23a که توسط همین آنزیمها برش داده شده بود قرار داده شد. در نهایت پلاسمید نوترکیب به باکتری *E.coli* BL21 (DE3) منتقل شد. انتخاب کلون های مثبت از طریق انجام colony PCR و تایید پلاسمید نوترکیب با هضم آنزیمی و توالی یابی انجام گرفت.

القای بیان و بررسی تولید پروتئین نوترکیب: جهت بررسی بیان، از یک کلنی نوترکیب بر روی پلیت LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، کشت شبانه تهیه شد. سپس چند کلنی به محیط LB مایع حاوی 100 mg/ml آمپی سیلین تلقیح و در دمای ۳۷ °C و دور ۱۵۰ rpm برای ۱٦ ساعت گرما گذاری شدند. جهت القای بیان، کشت به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد و پس از اینکه جذب نوری در طول موج ٦۰۰ نانومتر به ۰/٦ رسید، IPTG با غلظت ۰,٤ mM به محیط کشت اضافه گردید و مجددا در دمای ۳۷ °C دور rpm ۱۵۰ گرما گذاری شد. قبل از القا و هر یک ساعت (تا ۸ ساعت) پس از القا، نمونه هایی به حجم ۱ ml از محیط برداشته و سلولها با سانتریفیوژ در ٦۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه از محیط جدا و رسوب داده شدند. سپس رسوب باکتریایی حاصل از هر نمونه در ۱۰۰ µl از بافر فسفات (phosphate-buffered saline pH 7.4) (شرکت Sigma-Aldrich، ایالات متحد آمریکا) سوسپانسیون شد و سلول ها توسط مهره های شیشه ای در دستگاه

مینی لایز (شرکت Bertin Technologies، فرانسه)، سه مرتبه هر بار بمدت ۲۰ ثانیه با قدرت حداکثر تخریب شدند. نمونه ها با بافر Laemmli مخلوط و بمدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و در نهایت در ۱۳۰۰۰ g بمدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی جهت بررسی الگوی پروتئینهای کل سلول حاوی پروتئین نوترکیب بر روی دو ژل 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis)الکتروفورز شد. یک ژل توسط کوماسی بلو رنگ آمیزی شد (Laemmli 1970). از ژل دوم برای تأیید بیان پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات استفاده شد. به این منظور، پروتئینها به روش نیمه خشک و در حضور بافر تریس-گلایسین و متانول ۱۰% بمدت یک ساعت با ولتاژ ۹۰ V از ژل به غشای PVDF (poly vinylidene difluoride)(شرکت Millipore، ایالات متحد آمریکا) انتقال یافتند. سپس کاغذ PVDF برای ۱ ساعت در بافر انسداد (تریس حاوی ۵% اسکیم میلک و ۰,۰۵% توئین ۲۰) (محصول Sigma-Aldrich) در دمای اتاق قرار داده شد و سپس آنتی بادیmurine IgG1 monoclonal anti-penta His (محصول شرکت Thermo Fisher Scientific، ایالات متحد آمریکا) که با نسبت ۱ به ۲۰۰۰ توسط بافر انسداد رقیق شده بود، اضافه گردید. بعد از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، کاغذ با بافر تریس حاوی ۰,۰۵% توئین ۲۰، ۳ بار و هر بار ۵ دقیقه شستشو داده شد. سپس آنتی بادی ثانویه-goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated (محصول شرکت ،Santa Cruz ایالات متحد آمریکا) با رقت ۱:۵۰۰۰ در بافر انسداد تهیه و به کاغذ اضافه شد. بعد از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، شستشو مطابق مرحله قبل انجام گرفت. در مرحله پایانی سوبسترای لازم برای ظاهر شدن باند و آشکارسازی پروتئین مورد نظرWestern Blue Stabilized Substrate for) (Alkaline Phosphatase اضافه گردید. باندها توسط دستگاه ImageQuant ™ LAS ۵۰۰ (شرکت GE Healthcare Life Sciences، ایالات متحد آمریکا) مشاهده شدند.

تخلیص پروتئین نوترکیب: پروتئین نوترکیب Rv1733cکه دارای دنباله شش تایی هیستیدین در انتهای کربوکسیل بود با استفاده از ستون تخلیصcOmplete His-Tag Purification Column(شرکت Roche، آلمان) و بر اساس دستورالعمل توصیه شده تخلیص شد.

نتایج

نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیک در جدول ۲ آورده شده است. در نتیجه آنالیزهای انجام شده، پیش بینی شد که Rv1733c با طول ۲۱۰ آمینواسید، دارای تعداد زیادی اپیتوپ های سلول B و HLA کلاس I و II است که در طول توالی پروتئین پراکنده هستند. این

پروتئین احتمالا آنتی ژن بوده و آلرژن نیست. احتمالا غیر ترشحی، درون غشایی و دارای دو مارپیچ غشایی می باشد. ساختار سه بعدی بیش بینی شده برای دومین غشاییRv1733c (شکل ۱) نشان دهنده حضور غالب مارپیچ های آلفا و عدم حضور صفحات بتا می باشد.

از بین دو Taq polymerase و دو مسترمیکس مورد آزمایش برای تکثیر قطعه سنتز شده، مسترمیکس گرم-آغاز شرکت Takara کمترین میزان باند غیر اختصاصی و بهترین میزان محصول اختصاصی را نشان داد. برای مشاهده محصول PCR و باند اختصاصی ژن rv1733c ابتدا الکتروفورز در ژل آگارز ۱% انجام شد، سپس باند مطابق با اندازه قطعه در ژل ۲% الکتروفورز و جداسازی شد. شکل ۲ قطعه زیرهمسانه سازی شده در pET23a حاصل از colony PCR (شکل ۲ الف(و قطعه زیرهمسانه سازی شده هضم شده با آنزیم های BamHI و HindIII (شکل ۲ ب) را نشان می دهد. اطلاعات حاصل ازتعیین توالی، طول قطعه (۶۳۰ جفت باز) و عدم تغییر در قالب خواندن (ORF) آن را تأیید کرد.

قطعه ژنی سپس به پلاسمید pET23a زیر همسانه سازی شد و پلاسمید نوترکیب pET23a-rv1733c به سلول های *E. coli* BL21 منتقل شد. سلول های حاصل پس از تایید توسط colony PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی پلاسمید نوترکیب، جهت بیان پروتئین نوترکیب توسط IPTG القا شدند. شکل ۳ باندهای پروتئینی حاصل از سلول های حامل پلاسمید pET23a-rv1733c را قبل و بعد از القا بر روی ژل SDS-PAGE نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود در زمان های ۶، ۷ و ۸ ساعت بعد از القا باند پروتئین نوترکیب با وزن تقریبی kDa ۲۴ ظاهر شد (شکل ۳ الف). در شرایط آزمایش که شامل دمای ۳۷ ^{o}C و غلظت IPTG برابر با mM ۰,۴ بود، حضور پروتئین نوترکیب با افزایش زمان نمونه برداری بتدریج افزایش یافت و بیشترین بیان پروتئین نوترکیب در ۸ ساعت بعد از القا دیده شد. نتایج حاصل از آزمایش وسترن بلات نیز حضور باندی با اندازه مشابه را در نمونه القا شده بعد از ۸ ساعت نشان داد (شکل ۳ ب). در پایان پروتئین نوترکیب با استفاده از کیت تخلیص با موفقیت خالص سازی شد.

بحث و نتیجه گیری

مشخص شده است که BCG، تنها واکسن مورد تایید برعلیه سل، قادر به ایجاد حفاظت معنی دار بر علیه سل ریوی در افراد بالغ نیست. این درحالی است که فقط همین فرم از عفونت یعنی سل ریوی منجر به انتشار باسیل سل می شود (Fine, 1995). این

فقدان کارایی ممکن است به این دلیل باشد که BCG در القای پاسخ ایمنی بر علیه آنتی ژن های مربوط به فاز نهفته عفونت ناکارامد است (Lin et al., 2007). بنابراین، کاربرد کاندیدی مناسب از میان این آنتی ژن ها به همراه BCG، ممکن است به افزایش کارایی واکسیناسیون بیانجامد (Andersen, 2007).

Zvi و همکاران در یک مطالعه جامع بر پایه آنالیز های بیوانفورماتیک و داده های حاصل از مطالعات in vitro و in vivo روی پروتئین های بیان شده در مراحل مختلف عفونت سل، ۱۸۹ کاندید واکسن را از سرتاسر ژنوم *M. tuberculosis* انتخاب کردند و Rv1733c چهاردهمین رتبه را در این لیست داشت (Zvi et al., 2008).

Nguyen Thi و همکاران در سال ۲۰۱٤ با بررسی مقالات منتشر شده در پایگاه های مختلف، الگو های بیان ژن های باسیل سل را در in vivo طی مراحل مختلف عفونت در حیوانات و انسان بررسی کردند و ۳۸ پروتئین که بیان بالایی در مراحل اولیه، نهفته و reactivation داشتند را انتخاب کردند. آن ها پس از آنالیزهای بیوانفورماتیک بر روی این پروتئین ها، لیستی از کاندیدهای واکسن ارائه دادند که Rv1733c یکی از آنها بود (Nguyen Thi et al., 2014). آنالیزهای بیوانفورماتیک انجام گرفته در این پژوهش نیز نشان دادند که آنتی ژن فاز نهفته، Rv1733c، می تواند کاندیدای مناسبی برای واکسن باشد. بنابراین، پس از همسانه سازی ژن rv1733c، پروتئین نوترکیب در E. coli بیان و تخلیص شد که زمینه ای برای مطالعات بیشتر فراهم میاورد.

مطالعات انگشت شماری Rv1733c را به عنوان کاندید واکسن مورد آزمایش قرار داده اند. از آن جمله می توان به پژوهشی که در سال ۲۰۰۷ توسط Lin و همکاران انجام گرفت اشاره کرد. آنها پلاسمید های کد کننده هشت آنتی ژن مربوط به فاز نهفته سل از جمله Rv1733c را به موش ها تزریق کردند و نشان دادند که Rv1733 دومین رتبه را در ایجاد پاسخ سلول T به خود اختصاص داد (Lin et al., 2007). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۹ توسط Bivas-Benita و همکاران انجام گرفت، پلاسمید کد کننده Rv1733c در همراهی با نانو ذرات PLGA-PEI و بعد از آن پروتئین نوترکیب به عنوان یادآور، به ریه موش ها تلقیح شدند. این واکسیناسیون منجر به تحریک تکثیر سلول های T در ریه و پاسخ اینترفرون گاما شد (Bivas-Benita et al., 2009).

Zhang و همکاران در مطالعه ای در مدل موش، rv1733c را در غالب یک پلاسمید نوترکیب مورد بررسی قرار دادند و نتایج امیدوار کننده ای به دست آوردند. در این مطالعه، آنتی بادی اختصاصی برعلیه Rv1733c دو هفته بعد از واکسیناسیون در سرم موش ها رد

یابی شد و تیتر آن با گذشت زمان افزایش پیدا کرد طوری که هشت هفته پس از واکسیناسیون ۱۶۰۰ برابر شد. همچنین میزان اینترفرون گاما و اینترلوکین-۲ تولید شده توسط سلول های طحال موش های واکسینه بالاتر از گروه شاهد غیر واکسینه بود. از آنجا که این سایتوکاین ها شاخص هایی برای محافظت برعلیه سل هستند، نتیجه گیری شد که آنتی ژن Rv1733c می تواند کاندید واکسنی مناسب جهت افزایش ایمنی زایی بر علیه سل باشد (Zhang et al., 2014).

Coppola و همکاران در سال ۲۰۱۵ با طراحی پپتید های سنتزی طویل از تمام توالی Rv1733c به بررسی ایمنی زایی و محافظت حاصل از آن پرداختند و گزارش کردند این پپتیدها در همراهی با آدجوآنت CpG موجب تحریک سلول های +CD4 Tو محافظت معنی دار در موش های ترنس ژنیک شدند(Coppola et al., 2015) . نکته جالب آن است که در اکثر این مطالعات، قطعه ژنی rv1733 به فرم DNA مورد بررسی قرار گرفته است و فقط در مطالعه Bivas-Benita و همکاران پروتئین نوترکیب Rv1733c، آن هم به عنوان یادآور، بررسی شده است (Bivas-Benita et al., 2009). بنابراین، خلاء اطلاعاتی که در مورد Rv1733c نوترکیب وجود دارد بر اهمیت پژوهش حاضر می افزاید.

در پژوهش حاضر توالی ژن rv1733c از *M. tuberculosis* سویه H37Rv به عنوان الگوی سنتز مورد استفاده قرار گرفت. از آنجا که این ژن دارای محتوای بالای G + C و توالی های تکراری متعدد است، شرکت سنترکننده قادر به همسانه سازی قطعه سنتز شده نبود. در آزمایش های اولیه ما نیز واکنش PCR از روی این قطعه، منجر به تولید محصولات غیر اختصاصی می شد. با طراحی آغازگرهای طویل (۲۷ نوکلئوتیدی)، استاندارد سازی آزمایشات PCR و با استفاده از یک مسترمیکس گرم آغاز، محصول مناسبی بدست آمد که ابتدا با استفاده از روش TA cloning در pTG-19T همسانه سازی شد. در این روش همسانه سازی محصول PCR خالص شده مستقیما و بدون آنکه تحت برش آنزیمی قرار بگیرد، از طریق دنباله (T-overhang) Tخود به دنباله A ناقل باند می شود (Green & Sambrook, 2012). بنابراین، روش TA cloning نسبت به روش همسانه سازی معمول برتر بود زیرا بازیابی قطعه خالص سازی محصول PCR پس از دو مرحله الکتروفورز در ژل های ۱% و ۲% بمیزان بسیار کم صورت گرفت که جهت برش آنزیمی کافی نبود. سپس با زیرهمسانه سازی ژن rv1733c از pTG-19T به پلاسمید pET23a، کلون های نوترکیبی بدست آمد که محصول PCR با طول ۶۳۰ bp را نشان دادند و صحت زیرهمسانه سازی از طریق برش با آنزیمهای محدودالاثر و تعیین

توالی قطعه همسانه شده مورد تأیید قرار گرفت. القای بیان ژن در غلظت نهایی mM ۰,٤ IPTG در دمای C ۳۷ انجام شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE نشان داد که پروتئین موردنظر ۸ ساعت پس از القا به خوبی بیان شده و باند حدود kDa ۲٤ را نشان داد. وسترن بلات نیز نتایج SDS-PAGE را تایید نمود و پروتئین بیان شده بخوبی توسط کیت تخلیص و بر پایه کروماتوگرافی تمایلی دنباله هیستیدینی خالص سازی شد.

نتایج این پژوهش نشان می دهند که با توجه به ویژگی های بیوانفورماتیک مناسب آنتی ژن Rv1733c، پروتئین نوترکیب حاصل می تواند کاندید مناسبی برای واکسن باشد. همچنین، مطالعات انجام گرفته روی این آنتی ژن اگرچه محدود و انگشت شمار بوده اند، همگی موید تاثیر مثبت آن در ایمنی زایی و محافظت می باشند (Lin et al., 2007; Bivas-Benita et al., 2009; Zhang et al., 2014; Coppola et al., 2015).

در پژوهش حاضر قدم اولیه برداشته شد و امید است که پروتئین تخلیص شده حاصل پایه ای برای پژوهش های بعدی در راستای طراحی واکسن سل کارامد در کشورمان باشد.

منابع

Andersen, P., Doherty T.M. (2005) The success and failure of BCG – implications for a novel TB vaccine. Nature Reviews Microbiology 3: 656-662.

Andersen, P. (2007). Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. Trends in Microbiology 15(1): 7-13.

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. Bioinformatics 22(2): 195-201.

Bivas-Benita, M., Lin, M.Y., Bal, S.M., van Meijgaarden, K.E., Franken, K.L., Friggen, A.H., Junginger, H.E., Borchard, G., Klein, M.R., Ottenhoff, T.H. (2009) Pulmonary delivery of DNA encoding *Mycobacterium tuberculosis* latency antigen Rv1733c associated to PLGA-PEI nanoparticles enhances T cell responses in a DNA prime/protein boost vaccination regimen in mice. Vaccine 27(30): 4010-4017.

Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S., Wilson, M.E., Burdick, E., Fineberg, H.V., Mosteller, F. (1994) Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Me-

ta-analysis of the published literature. the Journal of the American Medical Association 271(9): 698-702.

Coppola, M., van den Eeden, S.J., Wilson, L., Franken, K.L., Ottenhoff, T.H., Geluk, A. (2015) Synthetic long peptide derived from *Mycobacterium tuberculosis* latency antigen Rv1733c protects against tuberculosis. Clinical and Vaccine Immunology 22(9): 1060-1069.

Fine, P.E. (1995) Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet 346(8986): 1339-1345.

Green, M.R., Sambrook, J. (2012) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-685.

Lew, J.M., Kapopoulou, A., Jones, L.M., Cole, S.T. (2011). TubercuList-10 years after. Tuberculosis 91(1): 1-7.

Lin, M.Y., Geluk, A., Smith, S.G., Stewart, A.L., Friggen, A.H., Franken, K.L.M.C. (2007) Lack of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon proteins following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. Infection and Immunity 75(7): 3523-3530.

Nguyen Thi, L.T., Sarmiento, M.E., Calero, R., Camacho, F., Reyes, F., Hossain, M.M. (2014) Immunoinformatics study on highly expressed *Mycobacterium tuberculosis* genes during infection. Tuberculosis 94(5): 475-81.

Ottenhoff, T.H., Kaufmann, S.H. (2012) Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? PLoS Pathogens 8(5): e1002607.

Partnership WST. (2010) The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the flight towards elimination of tuberculosis. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/iris/handle/10665/44437

WHO Global Report. (2016) World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. WHO/HTM/TB/2016.13. Geneva: World Health Organization.

Zhang, W., Jiang, H., Bai, Y.L., Kang, J., Xu, Z.K., Wang, L.M. (2014) Construction and immunogenicity of the DNA vaccine of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy

antigen Rv1733c. Scandinavian Journal of Immunology 79(5): 292-298.

Zvi, A., Ariel, N., Fulkerson, J., Sadoff, J.C., Shafferman A. (2008) Whole genome identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses. BMC Medical Genomics 1: 18.