● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ نوزدهم، شمارهٔ ۴، ص ۳۴۴-۳۳۷، ۱۳۹۱

مقالهٔ پژوهشی

تولید پروتئین نوترکیب زیر واحد B پیلی ویبریوکلره

سمیه کیایی[۱]، حمید ابطحی[*۲و۳]، قاسم مسیبی[۳و۲]، محمدیوسف علیخانی[۴]

خلاصه

مقدمه: ویبریوکلره یک باکتری گرم منفی است که باعث ایجاد بیماری وبا می‌شود. به‌دنبال خوردن مواد آلوده به این باکتری، باکتری در روده باریک میزبان شروع به کلونیزاسیون و تولید انتروتوکسین می‌کند. یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای باکتری پیلی (TCP) است. این پیلی به‌عنوان اولین فاکتور در کلونیزاسیون و تداوم باکتری‌ها در روده کوچک مورد نیاز است. باکتری پیلی هم- تنظیم شونده با توکسین به‌صورت پیلی تشکیل‌دهنده دسته‌ای است که به شکل هماهنگ با توکسین کلرا(CT) تنظیم می‌شود. توکسین کلره به‌عنوان بخشی از ژنوم باکتریوفاژ رشته‌ای (CTXQ) است، به‌طوری که این باکتریوفاژ از پیلی هم- تنظیم‌شونده با توکسین به‌عنوان گیرنده خود استفاده می‌کند. هدف از این مطالعه تولید یک واکسن نوترکیب برای ویبریوکلره در آینده است.

روش: در این مطالعه ژن tcpB با روش PCR تولید شد. سپس به‌داخل وکتور بیانی pET32 a وارد گردید. سلول‌های مستعد E.coli. BL21(DE3)plays به‌وسیله پلاسمید نوترکیب pET32 a– tcpB ترانسفورم گردید. سپس در محیط‌های کشت متفاوت با تغییر دادن پارامترهایی مثل گلوکز به‌عنوان منبع کربن، عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن، بیان پروتئین با استفاده از IPTG انجام شد. پروتئین نوترکیب به‌وسیله کروماتوگرافی‌تمایلی Ni-NTA تخلیص گردید. در نهایت میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش براد فورد اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج تعیین توالی با روش سنجر نشان داد که توالی ژن شباهت کامل باژن tcpB دارد. باکتری E.coli,BL21(DE3), plysS به‌وسیله pET32a-tcpB ترانسفورم شد و بیان ژن به‌وسیله IPTG صورت گرفت. پروتئین بیان شده توسط کروماتوگرافی تمایلی و به‌وسیله کیت Ni-NTA تخلیص گردید.

نتیجه‌گیری: تولید پروتئین نوترکیب tcpB، ویبریوکلره در سیتوپلاسم باکتری اشریشیاکلی با استفاده از پلاسمید بیانی pET32a انجام گرفت. تولید این پروتئین در میزبان اشریشیاکلی سویه plysS با استفاده از وکتورهای بیانی مثل pET 32a در این مطالعه امکان‌پذیر است.

واژه‌های کلیدی: پیلی، ویبریوکلره، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، پروتئین نوترکیب، اشریشیاکلی

۱- دانشجوی دوره کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک ۲- دانشیار گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک ۴- دانشیار گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

* نویسنده مسؤول، ● آدرس پست الکترونیک: abtahi@arakmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۷/۳۰ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۰/۱۰/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۱۴

مقدمه

وبا یک بیماری عفونی شدید و گاهی کشنده است که به‌وسیله باکتری گرم منفی ویبریو کلره ایجاد می‌گردد. این باکتری می‌تواند مشکلات سلامتی عمده‌ای را در بخش‌های مختلفی از دنیای امروز ایجاد کند (۱). در حدود ۲۰۰ سروتیپ از ویبریو کلره شناخته شده که تنها دو سروتیپ O۱ و O۱۳۹ با همه‌گیری وبا ارتباط دارد (۲). چندین ویبریو کلره غیر از O۱ و O۱۳۹ وجود دارد که توانایی کد کردن بسیاری از فاکتورهای بیماری‌زای ویبریو کلره که عامل وبای همه‌گیر هستند را دارند. بعد از خوردن غذا یا آشامیدن آب آلوده به ویبریو کلره باکتری در داخل روده کوچک کلونیزه می‌شود؛ برای این کلونیزاسیون وجود پیلی نوع چهارمی به نام پیلی هم- تنظیم شونده با توکسین tcp (toxin co regulated of pilus) ضروری است. این پروتئین توالی مشابهی با دیگر پیلی‌های نوع چهار مربوط به باکتری‌های روده‌ای دارد (۳). پیلی تیپ چهار دارای ضمائم رشته‌ای است که در تعدادی از باکتری‌های گرم منفی بیان می‌شود. این تقسیم‌بندی بر اساس شباهتی که در بین توالی N- ترمینال آب‌گریز پیلی بالغ و باقی مانده N- ترمینال متیله شده پیلی بالغ دیده می‌شود انجام شده است (۶-۴). دو زیر کلاس از پیلی تیپ چهار به نام 4A و4B. یافت شده است. پیلی هم تنظیم شونده با توکسین در دسته 4B قرار می‌گیرد (۷). Tcp به‌عنوان یک پروتئین مهم به‌منظور کلونیزاسیون در روده کوچک بسیار ضروری است و به محض کلونیزاسیون باکتری ویبریو کلره شروع به تولید توکسین می‌کند، این سم از یک زیر واحد A و پنج زیرواحد B تشکیل شده است. توکسین کلرا به‌صورت بخشی از ژنوم باکتریوفاژ به نام CTXQ است؛ به‌طوری که این باکتریوفاژ از TCP به‌عنوان گیرنده خود استفاده می‌کند (۸). نقش این پیلی در ایجاد شکل بیماری‌زای ویبریو کلره بسیار پیچیده و ضروری است و شکل‌های جهش یافته این پروتئین قادر به کلونیزاسیون در روده کوچک انسان و موش نیستند (۳). پروتئین TCP پلی‌مری از واحدهای تکراری است،که در میان جزیره بیماری‌زای ویبریو VPI (V.cholera pathogenicity Island) یافت می‌شود (۹،۱۰). مقایسه‌ی تفاوت‌های ژنتیکی در میان ایزوله‌های ویبریو کلره نشان می‌دهد که ناحیه کربوکسیل پروتئین tcp در نواحی در معرض قرار گرفته سطحی این پیلی حالت پلی‌مرفیسم دارد (۱۱). این حالت نشان دهنده تفاوت در لوکوس tcp و یا لوکوس‌های کروموزومی ویبریو کلره در مقایسه با دیگر لوکوس‌های تشکیل دهنده این نواحی است (۱۱). توالی‌های DNA،tcp مربوط به گونه‌های التور O۱ و O۱۳۹ شباهت‌های زیادی با یکدیگر دارند (۱۲). بنابراین سرم تشکیل شده در برابر این پروتئین باعث ایجاد ایمنی نسبت به این گونه‌ها می‌شود. پروتئین tcpB با توجه به داشتن اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک، کاندیدای بالقوه‌ای برای توسعه ایمنی ضد کلونیزاسیون بر علیه بیماری وبا محسوب می‌شود. پروتئین tcpB با وزنی حدود ۶۳/۵ کیلودالتون یکی از اجزای مهم ویبریو کلره است. ژن سازنده این پروتئین دارای ۱۲۹۷جفت باز است. در این مطالعه به‌منظور تولید این پروتئین از سویه E.coli, BL21(DE3), plysS باکتری اشرشیاکلی استفاده شده است. تولید پروتئین tcpB به‌صورت نوترکیب منجر به انجام مطالعات بیشتر در زمینه ایمنی‌زایی آن خواهد شد.

روش بررسی

تولید پروتئین نوترکیب tcpB یک مطالعه بنیادی- کاربردی است. باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل: ویبریو کلراه سویه اینابا تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، اشریشیاکلی سویه DH5α و اشریشیاکلی سویه E. coli, BL21(DE3), plysS است، که از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه شد. به‌منظور کلونینگ و تولید پروتئین tcpB از پلاسمید pET32a استفاده شد. پلاسمید ذکر شده از مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

تهیه گردید. تخلیص کروموزوم ویبریو کلره بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا ویبریو کلره در محیط براث مغذی (Nutrient broth) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد گاز CO2 کشت داده شد. رسوب به‌دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 8) حل شد و سلول باکتری‌ها توسط سدیم دو دسیل سولفات (SDS) و آنزیم پروتئیناز K لیز گردید. کروموزوم باکتری بااستفاده از محلول CTAB/NaCl (CTAB 10% و NaCl 0.7 M) استخراج شد. پروتئین‌ها و سایر اجزای سلولی با استفاده از مخلوط فنل /کلروفرم / ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵/۲۴/۱ برداشت گردید. DNA به‌دست آمده با استفاده از الکل ایزوپروپانول رسوب داده شد و سپس توسط اتانول ۷۰ درصد شستشو گردید. کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE مورد بررسی قرار گرفت. مقدار DNA تخلیص شده با اندازه‌گیری جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌دست آمد.

با استفاده از ترادف ژن tcpB طراحی پرایمرهای جلو(Forward) و عقب (Reverse) انجام شد:

Forward: 5’ TCG AGC TCA TGA GAA AAT ACC AA 3’

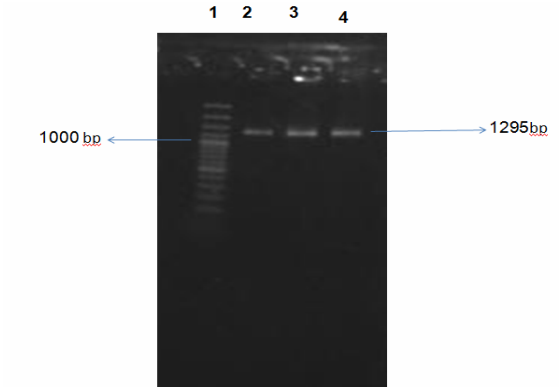
Reverse: 5’ ACT CGA GAT TTT CAC ACC ATT GA 3’

پرایمر جلو دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر عقب دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم sacI است. تکثیر ژن tcpB با استفاده از تکنیک PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. غلظت عوامل PCR به‌قرار: ۵۰۰ نانوگرم از DNA الگو، یک میلی‌مولار از هر پرایمر، ۳ میلی‌مولار از یون منیزیوم، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری‌فسفات، ۲/۵واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر 10X PCR لحاظ گردید. برنامه استفاده شده برای PCR به‌صورت: دمای اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (یک سیکل)، مرحله دوم PCR متشکل از سی سیکل که هر سیکل شامل: دناتوراسیون (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، اتصال پرایمرها به DNA الگو (۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه) انجام شد. مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. بررسی نهایی محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر تریس- اسید بوریک- EDTA (TBE) انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز از طریق از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت رش (Roche) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. کلون‌سازی ژن tcpB در پلاسمید pET32a به‌ترتیب زیر انجام شد: ابتدا محصول PCR با آنزیم‌های BamHI و sacI برش داده شد و سپس در ناقل ذکر شده وارد گردید. پلاسمید فوق نیز با همین آنزیم‌ها برش داده شد. عمل اتصال ژن tcpB در این پلاسمید با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در حرارت ۱۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شبانه روز انجام گرفت. پلاسمید pET32a - tcpB به‌ترتیب در سلول‌های مستعد اشریشیاکلی سویه DH5α و سویه plysS وارد شد. برای تأیید صحت ترادف نوکلئوتید ژن به‌دست آمده از محصول PCR ساختار پلاسمیدی pET32a-tcpB، به شرکت ژن فن‌آوران ارسال گردید. به‌منظور تولید پروتئین tcpB، پلاسمید pET32a-tcpB به سویه plysS اشرشیاکلی وارد شد و به‌مدت یک شبانه روز در محیط براث مغذی کشت داد شد و در حرارت ۳۷°C بر روی شیکر با حداقل ۱۷۰ دور قرارگرفت. پس از اینکه تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید (OD 0.6) محلول یک میلی‌مولار IPTG به سوسپانسیون باکتری به اندازه‌ای اضافه گردید که غلظت نهایی IPTG به یک میلی‌مولار برسد. چهار ساعت پس از افزودن IPTG رسوب باکتری‌ها با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ RPM به مدت نیم ساعت به‌دست

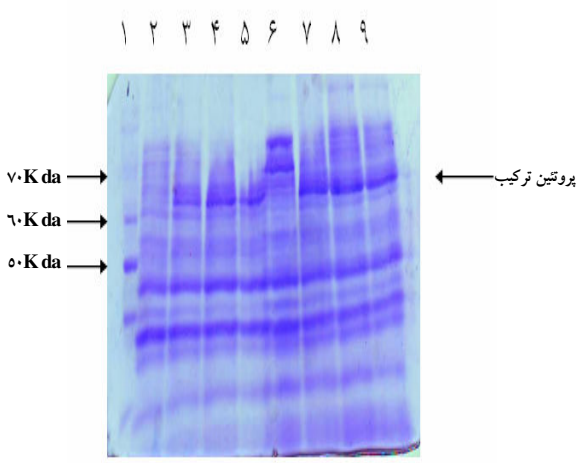
آمد. برای بررسی نتیجه القاء از الکتروفورز رسوب باکتری بر روی ژل۱۲ درصد SDS-PAGE استفاده گردید. تخلیص پروتئین با استفاده از کیت Ni-NTA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن) انجام گرفت. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری گردید و کیفیت آن نیز با استفاده از الکتروفورز پروتئین بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بررسی شد.

نتایج

غلظت DNA کروموزومی به‌دست آمده از باکتری ویبریو کلره ۵۰۰ µg/ml برآورد گردید. کروموزوم از باکتری ویبریو کلره تخلیص شد و به‌عنوان الگو برای تکثیر ژن tcpB مورد استفاده قرار گرفت. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر برابر ۱۲۹۷ جفت باز بود(شکل۱). به‌منظور تأیید ژن تکثیر یافته و نیز بررسی پرایمرهای طراحی شده، پلاسمید حاوی ژن مورد نظر به شرکت ژن فن‌آوران ارسال گردید. نتایج نشان داد که محصول PCR شباهت زیادی با ژن مربوطه دارد. در این مطالعه با استفاده از باکتری E. coli, BL21(DE3), plysS پروتئین tcpB در محیط‌های القای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل۲). پروتئین مورد نظر در محیط‌های مختلف نتایج تقریباً مشابهی را نشان داد. پروتئین tcpB با وزن مولکولی ۶۳/۵ KD در محیط القای مناسب، به‌وسیله کیت Ni-NTA تخلیص شد(شکل۳). باکتری E. coli, BL21(DE3), plysS به‌علت نداشتن برخی از آنزیم‌های پروتئاز قادر است میزان بالایی از پروتئین را بیان کند. با به کارگیری سیستم pET به‌عنوان یکی از قدرتمندترین وکتورهای بیانی، پروتئین tcpB تولید گردید. وکتور بیانی pET دارای یک منشأ همانندسازی F1 و پروموتور T7 Lac است، که با به‌کارگیری IPTG پروتئین مربوطه القاء شد. وکتور بیانی pET-32a دارای توالی‌های پروتئینی ویژه‌ای است که شامل 6xHis-tag و T7-tag بوده و وزن مولکولی در حدود13Kd را به پروتئین مورد نظر اضافه می‌کند. (وزن خالص مولکولی پروتئین tcpB در حدود ۴۹/5kD می‌باشد.) به‌نظر می‌رسد پروتئین نوترکیب tcpB آنتی‌ژن مهمی برای روش‌های سرولوژیکی در تشخیص بیماری وبا باشد.

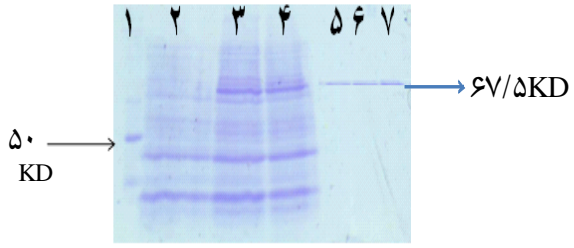


شکل ۱: *تکثیر ژن tcpB توسط PCR تکثیر ژن tcpB ستون ۱: مارکر(Fermentas) #SM0321 ستون ۲،۳،٤: محصول ژن PCR*



شکل ۲. *القای پروتئین tcpB*

جایگاه شماره ۱: مارکر (SM0661)، جایگاه شماره ۲: نمونه پروتئین قبل از القاء در محیط برات مغذی بدون گلوکز، جایگاه شماره ۳: نمونه پروتئین بعد از القاء در محیط برات مغذی بدون گلوکز بعد از ۲ ساعت، جایگاه شماره ۴: نمونه پروتئین بعد از القاء در محیط برات مغذی بدون گلوکزبعد از ۴ ساعت، جایگاه شماره ۵: نمونه پروتئین بعد از القاء در محیط برات مغذی بدون گلوکز بعد از ۶ ساعت، جایگاه شماره ۶: نمونه پروتئین قبل از القاء در محیط القاء بدون گلوکز، جایگاه شماره ۷: نمونه پروتئین بعد از القاء در محیط برات مغذی بدون گلوکز بعد از ۲ ساعت، جایگاه شماره ۸: نمونه پروتئین بعد از القاء در محیط القاء بدون گلوکز بعد از ۴ ساعت، جایگاه شماره ۹: نمونه پروتئین بعد از القاء در محیط القاء بدون گلوکز بعد از ۶ ساعت



شکل ۳. *تخلیص پروتئین tcpB*

تصویرژل بالا الگوی مربوط به محیط‌های القاء به کار برده شده مختلف را نشان می‌دهد. جایگاه شماره ۱: مارکر(Fermentas , SM0661#) جایگاه شماره ۲: نمونه پروتئین قبل از القاء درمحیط براث مغذی بدون گلوکز جایگاه شماره۳،۴: نمونه پروتئین القاء شده درمحیط براث مغذی بدون گلوکز جایگاه شماره ۵،۶،۷: نمونه پروتئین تخلیص شده

بحث

در این مطالعه ژن پیلی هم- تنظیم‌شونده با توکسین B به‌وسیله PCR جدا شد. با به‌کارگیری وکتور بیانی pET32a پروتئین tcpB با وزن مولکولی ۶۳/۵ کیلو دالتون تخلیص گردید. تخلیص پروتئین مربوطه در محیط‌های القاء مختلف نتایج تقریباً یکسانی را نشان داد. اما با توجه به این‌که گلوکز شرایط باز دارنده‌ای را برای سیستمpET ایجاد می‌کند، از محیط‌های بدون گلوکز برای بیان پروتئین tcpB استفاده شد. یکی از عوامل مهم بیماری‌زایی ویبریو کلره میزان چسبندگی این باکتری به روده کوچک است. عامل چسبندگی باکتری پیلی است، که به‌عنوان یکی از عوامل مهم فاکتورهای ویرولانس در ویبریو کلره محسوب می‌شود. ژن پیلی هم -تنظیم شونده با توکسین از پانزده زیرواحد از جمله tcpA, tcpB,tcpG, تشکیل شده است؛ تاکنون مطالعات متنوعی برروی این ژن‌ها صورت گرفته است. ژن tcpB به‌عنوان جزئی از زیرواحد بزرگ پیلی هم-تنظیم‌شونده با توکسین است، که تا اندازه‌ای میانکنش خاصی میان این پروتئین با پروتئین tcpA وجود دارد (۱۳). با توجه به اینکه پروتئین tcpB نیز همانند tcpA در تشکیل زیر واحد بزرگ پیلی شرکت دارد، در مطالعه حاضر تخلیص و بیان این پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت.

پروتئین tcpB بر خلاف سایر پروتئین‌های تشکیل دهنده این پیلی تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است و می‌توان گفت این کار برای اولین بار انجام شد. مطالعاتی که توسط شمس الزمان و همکاران انجام شده نشان داده افرادی که در مرحله نقاهت بیماری وبا قرار دارند نه تنها می‌توانند پاسخ‌های شدیدی نسبت به TCPA ایجاد کنند، بلکه قادر به تولید آنتی‌بادی نسبت به زیرواحدB توکسین کلرا و لیپوپلی ساکارید مربوط به گونه‌های عفونت‌زا هستند (۱۳). طی بررسی دیگری نشان داده شده که پروتئین TCP در هر دو بیوتیپ التور و کلاسیک بیان می‌شود، به‌طوری‌که این پروتئین در این دو بیوتیپ دارای تشابهات ژنتیکی است(۱۴). در پی تایید این شباهت ژنتیکی توسط محققان دیگر نشان داده شد که بیماران آلوده شده با بیوتیپ کلاسیک و در عین حال بیماران آلوده شده با بیوتیپ التور تغیرات سرمی بسیار کمی را نشان می‌دهند؛ به‌طوری‌که پروتئین tcpA در این دو بیوتیپ، توالی‌های آمینو اسیدی مشابهی درحدود ۸۰٪ با یکدیگر دارند (۱۵). اثبات بیماری‌زایی پروتئین tcp طی مطالعاتی صورت پذیرفت که نشان داد، در سویه‌های ویبریو کلره که ژن پیلی هم-تنظیم‌شونده با توکسین آن‌ها دچار جهش شده باشد، این باکتری‌ها قادر به کلونیزاسیون در روده کوچک انسان و موش نیستند (۱۶). با توجه به اهمیت و ضرورت عملکرد tcpB در بیماری‌زایی ویبریو کلره بر آن شدیم که با تولید این پروتئین گامی مؤثر در زمینه ایمنی‌زایی و طراحی واکسن در مطالعات بعدی برداریم. در مطالعه حاضر، پروتئین TcpB در باکتری اشرشیاکلی سویه plysS بیان شد. وزن مولکولی پروتئین الحاقی His-tagged در حدود ۱۳ کیلو دالتون است، که این توالی پروتئینی در پلاسمید pET-32a که در این تحقیق برای تولید پروتئین نوترکیب tcpB استفاده گردیده است به ابتدای این پروتئین اضافه شد. بنابراین وزن پروتئین تولید شده در حدود ۶۳/۵ کیلو دالتون است. پروتئین tcpB تحت کنترل اپراتورLac تولید شد(۱۷).

در وکتور بیانی pET32a استقلال سیستم رونویسی ژن از سلول میزبان، تولید mRNA و در نهایت تولید پروتئین در سیستم بیان ژن از عوامل سلولی دخیل در سنتز پروتئین، علت تولید محصول زیاد در این سیستم نسبت به سیستم‌هایی است که وابسته به پلیمرازهای سلول میزبان هستند (۱۷). این پروتئین توانست پایداری خود را در فضای سیتوپلاسمی باکتری E.coli به‌واسطه پروتئین‌های الحاقی حفظ کند. اتصال پروتئین‌های الحاقی به پروتئین tcpB، مانع تخریب پروتئین نوترکیب tcpB، توسط پروتئازهای داخل سلولی باکتری مانند DegP و HtpR در E.coli شد. به‌دلیل اهمیت بیماری‌زایی پروتئین مورد نظر (tcpB) هدف این مطالعه تولید واکسن‌های کاملاً مؤثر و همچنین فراهم آوردن ایمنی مناسب در برابر کلونیزاسیون ویبریو کلره در روده است.

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان می‌دهد وکتورهایی مثل pET32a که دارای یک پروموتور قوی T7 لاکتوز هستند، به علت دارا بودن پروتئین‌های الحاقی با وزن مولکولی پایین قادرند بدون تأثیر بر عملکرد پروتئین در داخل باکتری میزبان E-coli پایداری لازم را ایجاد کنند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از ریاست محترم مرکز تحقیقات و معاونت آموزش و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک به لحاظ تأمین اعتبار این طرح قدردانی می‌شود.

References

1. Klose KE. Regulation of virulence in Vibrio cholerae. *Int J Med Microbiol* 2001; 291(2): 81-8.
2. Ramamurthy T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Vibrio cholerae O139 Bengal: odyssey of a fortuitous variant. *Microbes Infect* 2003; 5(4):329-44.
3. Pal BB, Khuntia HK, Samal SK, Kar SK, Patnaik B. Epidemics of severe cholera caused by EI Tor Vibrio cholerae O1 Ogawa possessing the ctxB gene of theclassical biotype in Orissa, India. *Int J Infect Dis* 2010; 14(5):e384-9.
4. Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, et al. Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiology. 2004; 150(Pt 3): 527-38.
5. Nudleman E, Kaiser D. Pulling together with type IV pili. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004; 7(1-2):52-62.
6. Bertrand JJ, West JT, Engel JN. Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 2010; 192(4): 994-1010.
7. Nandi B, Nandy RK, Vicente AC, Ghose AC. Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (TcpA) in a toxigenic non-O1/Non-O139 strain of Vibrio cholerae. *Infect Immun* 2000; 68(2):948-52.
8. Davis BM, Waldor MK. Filamentous phages linked to virulence of Vibrio cholerae. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6(1): 35-42.
9. Chaparro AP, Ali SK, Klose KE. The ToxT-dependent methyl-accepting chemoreceptors AcfB and TcpI contribute

to Vibrio cholerae intestinal colonization. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 302(2): 99-105.
10. Sarkar A, Nandy RK, Nair GB, Ghose AC. Vibrio pathogenicity island and cholera toxin genetic element-associated virulence genes and their expression in non-O1 non-O139 strains of Vibrio cholerae. *Infect Immun* 2002; 70(8): 4735-42.
11. Li M, Kotetishvili M, Chen Y, Sozhamannan S. Comparative genomic analyses of the vibrio pathogenicity island and cholera toxin prophage regions in nonepidemic serogroup strains of Vibrio cholerae. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(3):1728-38.
12. Boyd EF, Waldor MK. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic Vibrio cholerae non-O1/non-O139 serogroup isolates. *Microbiology* 2002; 148(Pt 6):1655-66.
13. Shamsuzzaman S, Ahmed T, Mannoor K, Begum YA, Bardhan PK, Sack RB, et al. Robust gut associated vaccine-specific antibody-secreting cell responses are detected at the mucosal surface of Bangladeshi subjects after immunization with an oral killed bivalent V. cholerae O1/O139 whole cell cholera vaccine: comparison with other mucosal and systemic responses. *Vaccine* 2009; 27(9): 1386-92.
14. Qadri F, Chowdhury MI, Faruque SM, Salam MA, Ahmed T, Begum YA, et al. Peru-15, a live attenuated oral cholera vaccine, is safe and immunogenic in Bangladeshi toddlers and infants. *Vaccine* 2007; 25(2):231-8.
15. Hulbert RR, Taylor RK. Mechanism of ToxT-dependent transcriptional activation at the Vibrio cholerae tcpA promoter. *J Bacteriol* 2002; 184(20): 5533-44.
16. Peterson KM. Expression of Vibrio cholerae virulence genes in response to environmental signals. *Curr Issues Intest Microbiol* 2002; 3(2):29-38.
17. Pedro L.S. Thrombolysis with recombinant streptokinase in Cuba. *BMJ*. 2003. 326(7386): 445-9.

Expression of Recombinant Protein B Subunit Pili from *Vibrio Cholera*

Kiaie S., B.Sc.[1], Abtahi H., Ph.D.[2,3*], Mosayebi G., Ph.D.[2,3], Alikhany M., Ph.D.[4]

1. Postgraduate Student of Bacteriology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2. Associate professor, Microbiology and Immunology Department, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3. Associate professor, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
4. Associate professor, Microbiology Department, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

* Corresponding author; e-mail: abtahi@arakmu.ac.ir

(Received: 21 Oct. 2011 Accepted: 4 March 2012)

Abstract

Background & Aims: *Vibrio cholerae* is a gram-negative bacterial pathogen that causes cholera disease. Following ingestion by a host and entry into the upper intestine, *V. cholera* colonizes and begins to emit enterotoxin. One of the most pathogenic factors of *Vibrio cholera* is toxin-coregulated pili (TCP). Toxin-Coregulated pili is as the primary factor requiered for the colonization and insistence of bacteria in the small intestine. The toxin-coregulated pili are bundle-forming pili that are coordinately regulated with cholerae toxin (CT). The CT operon is part of the genome of the cholera toxin bacteriophage (CTXQ) which utilizes TCP as its receptor. The aim of this study is to produce a recombinant vaccine for *V. cholerae* in the future.

Methods: The tcpB gene was amplified by Polymerase chain reaction (PCR) method and subcloned into pET32a expression vector. *Escherichia coli* BL21 (DE3) plysS competent cells were transformed by pET32a - tcpB recombinant plasmid. In different media with changing the parameters of nutrient content like glucose as carbon source and yeast extract as nitrogen source, protein expression was induced by using IPTG. Recombinant protein were purified by affinity chromatography (Ni-NTA). The concentration of Recombinant proteins measured according to Bradford assay.

Results: The sequencing results by Sanger method showed a similar sequence as tcpB gene. *Escherichia coli* BL21 plysS was transformed with TCPB-pET32a and gene expression was induced by IPTG. The expressed protein was purified by affinity chromatography and Ni-NTA kit.

Conclusion: Recombinant protein tcpB was produced in the cytoplasm of *Escherichia coli* BL21 plysS, by pET32a expression vector. Therefore, utilization of this protein in *Escherichia coli* BL21 plysS by expression vectors such as pET32a is possible.

Keyword: pili, Vibrio cholerae, Polymerase chain reaction (PCR), Recombinant proteins, *Escherichia coli*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2012; 19(4): 337-344