

Cloning, expression and purification of *Pseudomonas aeruginosa* pilin protein in the prokaryotic host

Fatemeh Korpi¹, Bahador Behrouz², Mohmmad Motameifar³ and Gholamreza Irajian¹

1. Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. Department of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Bacteriology and Virology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Article Information

Article history:

Received: 2015/07/29

Accepted: 2015/12/12

Available online: 2016/01/10

Article Subject:

Microbial Biotechnology

IJMM 1394; 9(4): 55-62

Corresponding author at:

Dr Gholamreza Irajian

Department of Microbiology,
Iran University of Medical
Sciences, Tehran, Iran.

Tel:

+98 21 88058649

Email:

m.hg52@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains produce polar pili has required for motility, adhesion, and invasion. The main aims of the present study are to identify, clone, express and purify the recombinant pilin protein of *P. aeruginosa* in the prokaryotic host.

Materials and Methods: The recombinant pilin gene (*pilA*) was isolated from *P. aeruginosa* PAO1 strain by PCR and cloned into pET-22b vector. The recombinant plasmid was subsequently verified by restriction analysis, and DNA sequencing. The recombinant vector was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain, then the recombinant pilin overexpressed and affinity purified by Ni-NTA agarose-affinity chromatography. Western blot analysis was performed using anti-6His tag antibody.

Results: The PCR and enzymatic digestion results showed the accuracy of the *pilA* gene cloning. The protein electrophoresis showed that the molecular weight of recombinant pilin is about 19 kDa. Western blot analysis also confirmed the production of recombinant protein. The amount of produced protein was measured by the direct spectrophotometry method, which was 2.58 mg/mL.

Conclusions: Western blot and ELISA results along with that of sequencing ensure accurate production of recombinant pilin, retaining its partial epitopes.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa* pilin protein, Cloning, Expression.

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Korpi F, Behrouz B, Motameifar M, Irajian G. Cloning, expression and purification of *Pseudomonas aeruginosa* pilin protein in the prokaryotic host. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :55-62



کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین پیلین سودوموناس آئروژینوزا در میزبان پروکاریوتی

فاطمه کرپی^۱، بهادر بهروز^۲، محمد معتمدی فر^۳، غلامرضا ایراجیان^۱

۱. گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲. گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳. گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: سویه های پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا پیلی قطبی تولید می کند که برای تحرک، چسبندگی و تهاجم مورد نیاز است. هدف از این مطالعه تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب پیلین می باشد.

مواد و روش ها: ژن کد کننده پیلین (*pilA*) از سویه PAO۱ سودوموناس آئروژینوزا با بوسیله PCR جدا گردید و در وکتور بیانی pET-22b کلون شد. تایید ساختار وکتور نوترکیب به وسیله ی هضم آنزیمی دوگانه و تعیین توالی صورت گرفت. وکتور نوترکیب به داخلی باکتری E.coli BL21 (DE3) ترانسفورم شد و تخلیص پروتئین نوترکیب بوسیله کروماتوگرافی تمایلی انجام شد. آزمون وسترن بلات با استفاده از توسط آنتی بادی ضد پلی هیستیدینی انجام شد.

یافته ها: نتایج تعیین توالی و هضم آنزیمی صحت کلونینگ را تایید نمود. الکتروفورز پروتئین نشان داد که وزن مولکولی پروتئین نوترکیب پیلین حدود ۹۱ کیلودالتون می باشد. همچنین نتایج آزمون وسترن بلات تولید پروتئین نوترکیب را تایید کرد. مقدار پروتئین تولید شده که به روش اسپکتروفتومتری مستقیم اندازه گیری شد که مقدار آن ۲/۵۸ میلی گرم به هر میلی لیتر تعیین شد.

نتیجه گیری: نتایج وسترن بلات و الیزا به موازات نتایج تعیین توالی نشان دهنده صحت تولید پروتئین نوترکیب پیلین و حفظ ساختار نسبی آن می باشد

کلمات کلیدی: پروتئین پیلین سودوموناس آئروژینوزا، کلونینگ، بیان

کپی رایت © حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۰۷

پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1394; 9(4): 55-62

نویسنده مسئول:

دکتر غلامرضا ایراجیان

گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران.

تلفن: ۰۲۱۸۸۰۵۸۶۴۹

پست الکترونیک:

dr.irajain@gmail.com

مقدمه

فنیل آلانین طبقه بندی شده است (۳). فیلامنت پیلی از هزاران زیر واحد مونومریک پروتئین *PilA* یا پیلین تشکیل شده است که توسط ژن *pilA* کد می شود (۴). *PilA* به عنوان یک پیش پیلین با یک طول کوتاه (۵۰ تا ۶۰ اسید آمینه) با بار مثبت و توالی رهبر است که در میان گونه ها به شدت محافظت شده است (۶). توالی *PilA* ادامه پیدا کرده که به یک مارپیچ آلفا در قسمت N-ترمینال و یک منطقه آنتی پارالل β -strand در قسمت C-ترمینال که انتهایش بصورت یک لوپ دی سولفیدی (DSL) disulphide bonded loop ختم می شود (۷، ۸). N-ترمینال پیلین مسئول میانکنش بین زیر واحدهاست در حالی که C-ترمینال در نوک پیلی ظاهر شده و مسئول اتصال به سلول میزبان

سیستیک فیبروزیس (Cystic fibrosis)، سوختگی، جراحی، اختلال سیستم دفاعی، تروما، لوله گذاری در راه های هوایی، سرطان، ایدز و غیره از عوامل مستعد کننده برای عفونت سودوموناس آئروژینوزا می باشند. آلودگی با این باکتری در میان بیماران بستری در بیمارستان بسیار شایع است و از مهم ترین عوامل مرگ و میر محسوب می شود (۱). سودوموناس آئروژینوزا عوامل ویروالانس متعددی از جمله توکسین ها، آنزیم ها، پیلی، فلاژل در فاز حاد عفونت به کار می گیرد (۲). سودوموناس آئروژینوزا پیلی قطبی تولید می کند که به عنوان پیلی تیپ IV یا پیلی N-متیل

با تراداف ۵'-ACGAAGCTTCCGCAGTACGGTTCAG ۳'-AGTG با $T_m=25$. واکنش PCR انجام شد. جایگاه برش برای آنزیم *BamHI* در انتهای ۵' پرایمر ۵'-CTCGGATCCA ۳'-CTGATGATCGTGGTTGCGA و جایگاه برش برای آنزیم *HindIII* در انتهای ۵' پرایمر ۵'-ACGAAGCTTCCGCAGT ۳'-ACGGTTCAGAGTG طراحی شد. تکثیر ژن مورد نظر با PCR توسط آنزیم PrimSTAR® HS انجام گرفت. واکنش با برنامه دمایی شامل ۹۸ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ دوره شامل ۹۸ درجه سلسیوس (۱۰ ثانیه)، ۵۲ درجه سلسیوس (۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

کلونینگ

برای جداسازی و تخلیص ژن *pilA* از سایر باندهای غیراختصاصی، محصول PCR حاصل از ۱۰ واکنش به صورت چاهک پیوسته‌ای بر روی ژل آگارز الکتروفورز و سپس باند مورد نظر با دقت از سایر باندها با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (Bioneer, Korea) جدا و خالص شد. ژن *pilA* و وکتور pET-22b بصورت جداگانه تحت هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود الاثر *BamHI* و *HindIII* قرار گرفته سپس وارد واکنش الحاق شدند. پلاسمیدهای نوترکیب *pilA*-pET22b به باکتری اشریشیا کلی (*E. coli*) DH5α (Top/10F) ترانسفورم شد و کلون‌های نوترکیب با از طریق PCR با پرایمرهای اختصاصی غربالگری شدند. تایید نهایی پلاسمیدهای نوترکیب pET-22b (+) با هضم آنزیمی و تعیین توالی صورت گرفت.

بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب پیلی

پلاسمید نوترکیب *pilA*-pET22b در سویه بیانی *E. coli* BL21 (DE3) با روش شوک حرارتی ترانسفورم شد. باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب *pilA*-pET22b در محیط مایع لوریا برتانی (LB) حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تلقیح و ۱۸ ساعت در انکوباتور با حرکت دورانی و دمای ۷۳ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. از این کشت ۱۸ ساعته برای تلقیح محیط مایع جدید LB حاوی آمپی سیلین استفاده شد. محیط مذکور در انکوباتور با حرکت دورانی قرار گرفت و زمانی که کدورت محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ رسید بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ۱ میلی مولار القا شد. نمونه‌های زمان صفر الی ۴ ساعت از باکتری‌های القا شده گرفته شد و میزان بیان ژن *pilA* با روش SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) در ژل ۱۲/۵٪ و رنگ آمیزی کوماسی بلو G-250 (Coomassie blue G250) ارزیابی گردید. برای تخلیص پروتئین نوترکیب پیلین یک کشت ۱۸ ساعته از باکتری *E. coli* BL21 (DE3) به شکلی که

است (۹، ۰۱). پیلی به دی ساکاریدهای موجود در آسیالو GM۱ و GM۲ و لاکتوزسرامید متصل می‌شود (۱۱، ۱۰). پیلی تیپ IV سودوموناس آئروژینوزا مسئول اتصال اولیه، حرکت لغزشی، تشکیل تشکیل بیوفیلم و ترشح آگروتوکسین S می‌باشند (۱۳، ۱۲). پیلی تیپ IV نقشی مهمی در اتصال به لوازم و تجهیزات پزشکی و عفونت‌های بیمارستانی مرتبط با کاتترها و ونتیلاتورها، لنزهای تماسی دارا می‌باشد (۱۵، ۱۴). در مدل حیوانی پنومونی حاد و عفونت قرنیه سودوموناس آئروژینوزا، موتانت‌هایی که پیلی تولید نمی‌کنند دارای قدرت ویروانس کمتری می‌باشند که با کاهش توانایی‌های این سویه‌ها برای استقرار در بافت میزبان همراه است (۱۶، ۱۷). مطالعات آزمایشگاهی نشان داد آنتی بادی‌های ضد پیلی می‌تواند از اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال جلوگیری کند (۱۸، ۱۹). به نظر می‌رسد پروتئین پیلی یک عامل ایمونولوژیک موثر برای ایمنی در برابر عفونت سودوموناس آئروژینوزا باشد. هدف این مطالعه، کلون، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب پیلین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، آنزیم‌ها و وکتور

سویه‌های استاندارد PAO۱ سودوموناس آئروژینوزا از مرکز تحقیقات سوختگی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه و پس از کشت و احیاء با روش‌های متداول بیوشیمیایی تعیین هویت گردید. اشریشیا کلی (*E. coli*) DH5α (Top/10F) و اشریشیا کلی (*E. coli*) BL21 (DE3) به عنوان میزبان‌های تکثیر و بیانی استفاده شد. پلاسمید pET-22b ساخت شرکت Novagen برای کلون ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم‌های محدود الاثر *BamHI* و *HindIII* شرکت Fermentas و DNA T4 لیگاز شرکت TaKaRa استفاده شد. از آنزیم HS DNA Polymerase شرکت PrimSTAR® برای تکثیر ژن هدف از ژنوم باکتری با PCR استفاده شد که قدرت تصحیح خطای بسیار بالایی دارد.

استخراج DNA ژنومی

ابتدا سویه PAO۱ در ۳ میلی لیتر محیط LB براث کشت داده شد و پس از ۲۱ ساعت انکوباسیون در ۷۳ درجه سلسیوس، سانتریفیوژ و از رسوب حاصل با استفاده از کیت استخراج ژنوم باکتری (Bioneer, Korea) استخراج DNA صورت گرفت.

توالی ژن *pilA* سویه‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GenBank) اخذ و توسط نرم افزار VectorNTI ۱۱ بررسی شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Forward با تراداف ۵'-CTC ۳'-GGATCCACTGATGATCGTGGTTGCGA و Reverse

کمیلومینسانت (Substrate Chemiluminescent) تحت شرایط استاندارد مجاور شده و بلافاصله باند های فلورسنت روی غشای رادیوگرافی ثبت و ظاهر شد.

انجام الیزا

میزان IgG توتال در سرم های انسانی به روش الیزای استاندارد در پلیت های ۹۶ خانه ای (Extragen, Korea) به روش الیزا اندازه گیری شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰ میلی نوترکیب (۱ g/well) در phosphate buffered saline (PBS) (pH=۷/۴) به هر چاهک پلیت میکروتیترا اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از ۳ بار شستشو با بافر PBS-T (بافر PBS محتوی ۰/۵٪ درصد Tween-۲۰)، با PBS-T محتوی ۰/۵٪ Bovine serum (BSA) albumin به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس بلوکه شد و به دنبال چند بار شستشو با PBS-T، از نمونه های سرم انسانی که شامل ۲۰ نمونه مثبت (افراد با زخم سوختگی سودوموناس آئروژینوزا) و ۲۰ نمونه منفی (افراد سالم) رقت ۱:۱۰۰ تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک ها اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از ۴ بار شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی کونژوگه با پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰۰ به هر چاهک اضافه و ۱/۵ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. به دنبال چند مرحله شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از معرف رنگزای (H₂O₂/TMB) (Razi institute, Iran) به هر چاهک اضافه، فعالیت آنزیمی به کمک اسید سولفوریک ۱ نرمال (Merck, Germany) متوقف و جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر (Pharmacia, France) قرائت شد.

یافته ها

شناسایی سویه سودوموناس آئروژینوزا و استخراج ژن پیلین

با استفاده از یکسری از آزمون های بیوشیمیایی مثل اکسیداز، حرکت، رشد در ۴۲ درجه سلسیوس، آرژنین دهیدرولاز و تولید پیوسیانین سویه های PAO۱ تعیین هویت شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از سویه PAO۱ ژنومی با دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز و UV اسپکتروفتومتری ارزیابی شد. غلظت DNA استخراج شده ۲۹۶ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن *pilA* را روی ژل آگارز باندی با طول ۴۶۲ جفت باز را نشان می دهد که با *pilA* از سایر سویه های ثبت شده در بانک ژنی مطابقت دارد. در نهایت برای بدست آوردن ژن *pilA* خالص، باند ۴۶۲ bp حاصل از ۱۰ واکنش PCR از روی ژل آگارز بریده شد و مجدداً با کیت تخلیص محصول PCR بازیافت گردید (شکل ۱).

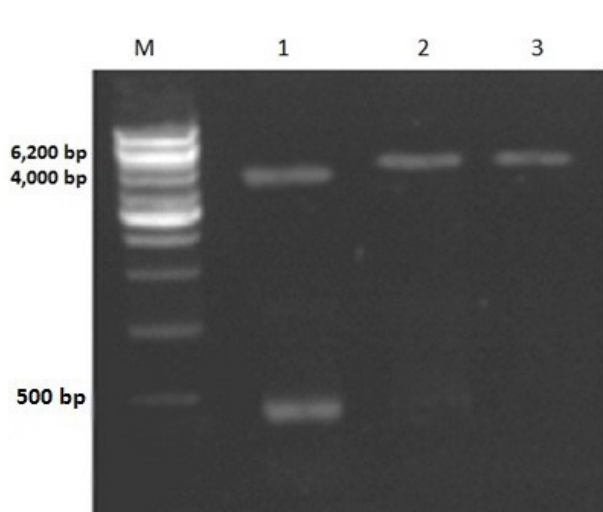
کلونینگ ژن *pilA*

محصول PCR و وکتور pET-22b با آنزیم های *BamHI*

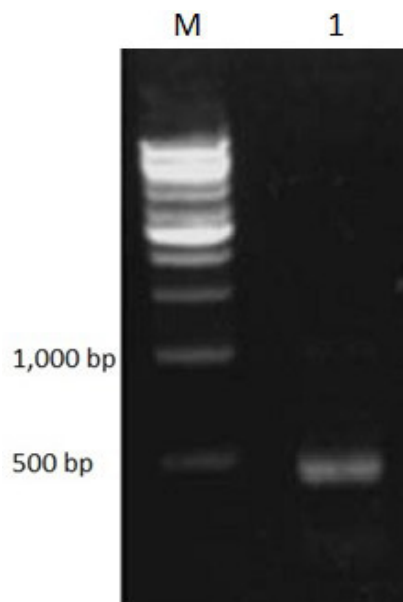
قبلاً شرح داده شد تهیه و از آن برای تلقیح یک لیتر محیط تازه LB استفاده گردید. بعد از اینکه باکتری ها به کدورت مناسب رسیدند با IPTG ۱ میلی مولار القاء و به مدت ۴ ساعت بعد از آن در ۷۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از طی شدن این زمان، سلول های باکتری با سانتریفیوژ در ۹۰۰۰ × g جمع آوری و با بافر فسفات نمکی شستشو داده شدند. رسوب سلول های باکتری در بافر B (اوره ۸ مولار + Tris-HCl ۱۰ میلی مولار + NaH₂PO₄ ۱۰۰ میلی مولار) با pH=۸/۵ حل و در ۱۸۰۰۰ × g به مدت ۳۰ دقیقه بمنظور جداسازی فاز محلول از اجسام سلولی نامحلول سانتریفیوژ شد. سپس رزین نیکل (Ni-NTA) به فاز محلول اضافه و برای ۲ ساعت مخلوط شد. این مخلوط پس از انتقال به ستون پلی استایرینی، با بافر C (اوره ۸ مولار + Tris-Cl ۱۰ میلی مولار + NaH₂PO₄ ۱۰۰ میلی مولار) با pH=۶/۳ شستشو داده شد. حذف اوره با استفاده از بافرهای حاوی شیب کاهشی غلظت اوره (۸، ۶، ۴، ۲ و صفر مولار) انجام و در نهایت پروتئین ها با استفاده از محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار از ستون جدا و جمع آوری شدند. حذف ایمیدازول با دیالیز انجام شد. محلول حاوی پروتئین های نوترکیب تخلیص شده در کیسه های دیالیز با منافذ ۱۲ کیلو دالتون ریخته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در برابر بافر فسفات با pH=۷/۴ به میزان ۱۰ حجم در هر بار و سه مرتبه تکرار در دمای یخچال توسط همزن مغناطیسی دیالیز شدند. پروتئین تغلیظ شده از کیسه دیالیز خارج و بعد از تعیین غلظت با روش اسپکتروفتومتری در ۲۸۰ نانومتر و بررسی کمی و کیفی با روش SDS-PAGE در ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

واکسن بلات

هدف از آزمایش واکسن بلات (ایمونوبلات) تأیید بیان و ارزیابی آنتی ژنیسیته و خصوصیات ایمونولوژیک پیلین نوترکیب می باشد. پروتئین نوترکیب از ژل SDS-PAGE با سیستم انتقال نیمه خشک (Bio-Rad) به کاغذ پلی وینیلیدین دی فلورید (Polyvinylidene Fluoride: PVDF) توسط دستگاه بلات Bio-Rad در شرایط نیمه خشک منتقل شد. برای کنترل انتقال پروتئین از رنگ پانسو (Ponceau S) استفاده و غشا به صورت نوار های نازک حاوی پروتئین های منتقل شده بریده شد. مسدود سازی غشای PVDF با محلول آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) به مدت ۱ ساعت انجام شد. در مرحله بعد غشای PVDF با آنتی بادی بر علیه His-tag ۶ با رقت ۱:۱۰۰۰۰ یا سرم بیمارانی (رقت ۱:۲۰۰۰) با تشخیص عفونت سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان بستری بودند به مدت ۲ ساعت مجاور شدند. شستشو با بافر تریس نمکی محتوی ۰/۵ درصد تئوین ۲۰ (Tris-Buffered Saline with Tween: TBS-T) انجام شد. سپس غشا با آنتی بادی ثانویه Goat anti-Mouse IgG و Anti-Human IgG کونژوگه با پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰۰ برای مدت ۲ ساعت مجاور شد. غشا پس از شستشو با محلول سوبسترای



تصویر شماری ۲: شناسایی *pilA*-pET22b با هضم آنزیمی؛ چاهک ۱: وکتور نوترکیب *pilA*-pET22b هضم شد با آنزیمهای *BamHI* و *HindIII*؛ چاهک ۲: وکتور نوترکیب pET22b-*pilA*، چاهک ۳: وکتور pET22b هضم شده با آنزیم *BamHI* چاهک M: مارکر (DNA VC 1kb DNA Ladder)



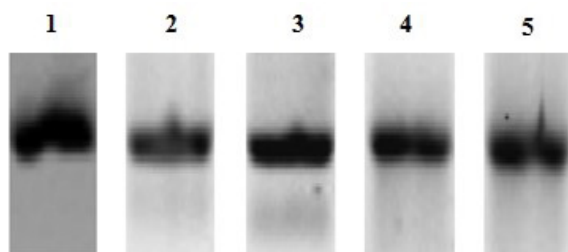
تصویر شماری ۱: چاهک ۱: ژن *pilA* خالص از سویه PAO۱، چاهک M مارکر (DNA VC 1kb DNA Ladder)

تعیین توالی ژن *pilA* نوترکیب با توالی مرجع این ژن توسط نرم افزار Sequencher version ۵ نشان داد که ژنهای مورد نظر بدون هیچ جهشی و به درستی در ناقل مورد نظر کلون شده‌اند.

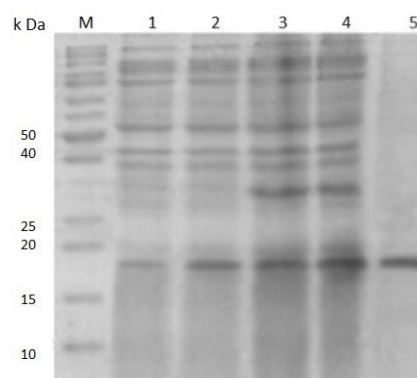
بیان پروتئین نوترکیب پیلین در *E. coli*

آزمایشات مختلف بر روی مایع رویی کشت و لیزات باکتریایی ثابت کرد که بیشتر پروتئین های تولیدی به شکل انکلوژن بادی در داخل سیتوپلاسم باکتری تجمع می یابند و بهترین شرایط که منجر به بیان بالای پروتئین می گردد لقاء ۴ ساعته با IPTG ۱ میلی مولار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس می باشد. پروتئین نوترکیب با روش دنا تورا سیون و متعاقبا شیب کاهشی اوره بر روی ستون Ni-NTA شرکت کیاژن (Qiagen, Germany) به شکل محلول در بافر حاوی ایمیدازول از ستون جدا شدند. بررسی پروتئین خالص شده با روش SDS-PAGE نشان داد که تخلیص پروتئین نوترکیب به خوبی صورت گرفته است (شکل ۳). همان

و *HindIII* برش داده شدند و پس از تخلیص محصولات هضم شده از روی ژل آگارز، عمل الحاق بین وکتور و ژن *pilA* در محل آنزیم های مذکور با آنزیم T4DNA Ligase صورت گرفت. محصول الحاق به درون باکتری DH5α (Top/10F) ترانسفورم شد و پس از رشد بر روی محیط LB حاوی کانامایسین، چندین کلنی انتخاب و برای تأیید حضور وکتور نوترکیب (-pET22b-*pilA*) از آنها استخراج پلاسمید صورت گرفت. همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می شود؛ حاصل برش تک آنزیمی وکتور نوترکیب *BamHI* پلاسمیدی خطی با طول ۶۴۱۸ bp بود (شکل ۲). در حالی که طول وکتور pET-22b فاقد قطعه ۵۳۶۹ bp می باشد. در هضم دو آنزیمی نیز قطعه *pilA* از وکتور نوترکیب جدا و در موقعیت خود یعنی ۴۶۲ bp قرار گرفت (شکل ۲). مقایسه نتایج



تصویر شماری ۲: ایمونوبلاتینگ پیلین نوترکیب؛ چاهک ۱: ایمونوبلاتینگ با آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستیدینی؛ پیلین: چاهک ۲، ۳، ۴ و ۵: ایمونوبلاتینگ با آنتی سرم انسانی ضد سودوموناس آئروژینوزا



تصویر شماری ۲: SDS-PAGE پروتئین نو ترکیب تخلیص شده؛ مارکر پروتئینی؛ چاهک ۱: لیزات باکتریایی حاصل از یک کلون نوترکیب القاء نشده (کنترل بیان)؛ چاهک ۲، ۳ و ۴: لیزات باکتریایی القاء شده با IPTG، به ترتیب ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از القاء با IPTG؛ چاهک ۵: پروتئین نو ترکیب تخلیص شده

گونه که در شکل نشان داده شد، نتایج آزمایش ایمونوبلاتینگ، حاکی از بیان پروتئین نوترکیب پیلین با وزن مولکولی تقریبی ۹۱ کیلودالتون و تشابهات آنتی ژنی این پروتئین با شکل طبیعی آن بود. همچنین واکنش پذیری پروتئین نوترکیب پیلین را با آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستیدینی و سرم بیماران با عفونت سودوموناس آئروژینوزا تایید می کند (شکل ۴).

نتایج الیزا سرم های انسانی

میانگین جذب نوری (OD) آنتی بادی های انسانی علیه آنتی ژن نوترکیب پیلین با روش الیزا غیر مستقیم مورد ارزیابی قرار گرفت. در جدول ۱ میانگین جذب نوری برای چاهک های بلانک (چاهک های فاقد آنزیم کونژوگه)، نمونه های منفی و نمونه های مثبت ارائه شده است. سرم های انسانی با عفونت زخم سوختگی سودوموناس آئروژینوزا بالاترین میانگین OD در مقایسه سرم های انسانی سالم نشان می دهد که اختلافشان از نظر آماری معنی دار می باشد ($P < 0.001$). برای بررسی سنجش میانکنش سرم های انسانی با پروتئین نوترکیب پیلین، میانگین تیتراژ نمونه منفی را با سه برابر مقدار انحراف معیار جمع نموده و آنرا به عنوان حد آستانه تشخیص یا cut of برای آزمون الیزای غیر مستقیم در نظر میگیریم. Cut off استفاده از فرمول $\text{mean of} = \text{Cut off} \pm 3 \text{ Standard deviation (SD)}$ محاسبه شد که برابر با (۰/۲۴۶-۰/۰۶۶) می باشد.

نمونه بلانک	میانگین جذب نوری $\pm$ SD
	۰/۰۹۶ $\pm$ ۰/۰۰۶
نمونه منفی	۰/۱۵۶ $\pm$ ۰/۰۳
نمونه مثبت	۰/۷۶۳ $\pm$ ۰/۲۳

بحث

در این مطالعه علاوه بر تکثیر موفقیت آمیز توالی کامل ژن پیلین (*pilA*)، دو ناحیه برش برای آنزیم های محدودالتر را نیز به محصول PCR اضافه می کنند بنابراین در مقایسه با مطالعات گذشته این روش در تکثیر ژن *pilA* در جهت کلونینگ پرکاربردتری باشد (۳، ۲۰). در سال ۱۹۸۶ Strom و همکاران، DNA سویه PAK سودوموناس آئروژینوزا جهت کلونینگ در معرض برش تک آنزیمی Sau3A قرار داده و در وکتور pUCI8 کلون کردند و به منظور اثبات حضور قطعه پیلین در وکتور، از تکنیک ساترن هیبریداسیون استفاده کردند (۲۰). در تحقیق حاضر برای اثبات حضور قطعات تکثیر شده *pilA* از تکنیک ساده PCR و هضم آنزیمی استفاده گردید این دو روش نسبت به تکنیک ساترن کم هزینه تر و با صرف زمان کمتری انجام می پذیرند بنابراین می توانند در کنار این تکنیک مورد توجه باشد. در مطالعه ای در سال ۱۹۸۵ ژن کد کننده پیلین

در وکتور pBPO10 به صورت مستقل از پروموتور وکتور در باکتری *E. coli* بیان شد که بازده بیان پروتئین پایین بوده و با استفاده از روش وسترن بلات تایید شد که میزان خلوص پروتئین ناچیز بود (۲۰). وکتورهای pET حاوی توالی هایی مجاور با سایت های کلونینگ اند که تعدادی از برچسب ها را کد می کنند این برچسب ها زمانی که به پروتئین هدف می چسبند عملکردهای متنوعی را به آن می دهند؛ برخی از آن ها باعث تسهیل در شناسایی و یا تخلیص پروتئین نوترکیب می شوند درحالی که برخی دیگر احتمال فعالیت بیولوژیک را با تأثیر بر حلالیت رد سیتوپلاسم یا ترشح به پری پلاسم را افزایش می دهند. ژن پیلین از سویه PAO۱ در وکتور pET-22b کلون و در میزبان بیانی /شریشیا کلی (BL21 (DE3 ترانسفورم و بیان شد. در تحقیق ما ژن کامل پیلین در سطح بالایی بیان، تخلیص و خصوصیات بیولوژیک آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

حاصل بیان ژن *pilA* سویه PAO۱ پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۹ کیلودالتون بود. از آنجایی که جداسازی اجسام انکلوژن فرآیندی وقت گیر و پرهزینه است (۲۱)، لذا در این مطالعه از اوره با غلظت ۸ مولار استفاده گردید که می تواند غشای باکتری ها و ذرات انکلوژن را کاملاً حل نماید. روش خالص سازی و باز تاخوردگی روی ستون به طور کارآمدی پروتئین نوترکیب موردنظر را بدون لخته کردن یا رسوب پروتئین باز تاخوردگی می کند. در این روش کاهش غلظت ماده دناتوره کننده باید گام به گام و تدریجی باشد تا بازده پروتئین های باز تاخوردگی افزایش یابد. در این تکنیک مواد جامد رزین یا ماتریکس تاخوردگی، ریز محیط مناسبی را فراهم می نماید به طوری که پروتئین ها روی ستون بی حرکت شده و قسمت های آب گریز در معرض به طور جزئی تاخوردگی می شوند. در نتیجه از برهم کنش نامناسب زنجیره های پلی پپتیدی ممانعت شده و بازیافت پروتئین فعال زیستی را تقویت می نماید. مواد ستون ممکن است نقشی شبیه چاپرون در نگهداری و حفظ پروتئین های تاخوردگی داشته، ایفا نماید (۲۲). در این تحقیق، با استفاده از ستون Ni-NTA agarose، پروتئین نوترکیب با اتصال به رزین نیکل به واسطه داشتن دنباله هیستیدینی بی حرکت گردید و در واقع بدین وسیله از سایر پروتئین های موجود در محلول اولیه حاصل از دناتوراسیون با اوره ۸ مولار جدا شد. جهت حذف عامل دناتوره کننده (اوره) و به دست آوردن پروتئین محلول، بافرهای حاوی شیب کاهشی غلظت اوره (کاهش غلظت اوره تا صفر) در مرحله محلول سازی پروتئین بکار برده شد. حذف تدریجی اوره این فرصت را مهیا می سازد تا پیوندهای هیدروژنی درون ساختاری پروتئین ها تشکیل شود. در مورد پروتئین مورد مطالعه در این تحقیق، سرعت تاخوردگی درست پروتئین ها نسبت به تاخوردگی نادرست آنها و واکنش های نامطلوب بین پروتئینی بیشتر بوده بنابراین در ساختاری قرار گرفته اند که قابلیت حل شدن در محلول های آبی فاقد عامل دناتوره کننده را داشته اند. اما مشابه با روش بکار رفته در این تحقیق، مطالعات متعددی روی

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران که حمایت مالی این طرح را با شماره ۹۴-۰۲-۱۹۸-۲۵۹۶۲ بر عهده داشت تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروپزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافع وجود ندارد.

Reference

1. Jeschke MG, Pinto R, Kraft R, Nathens AB, Finnerty CC, Gamelli RL, et al. Morbidity and Survival Probability in Burn Patients in Modern Burn Care. Crit Care Med. 2014; 31(3):165-65
2. Gellatly SL, Hancock RE. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 2013;67(3):159-73.
3. Pasloske BL, Finlay BB, Paranchych W. Cloning and sequencing of the Pseudomonas aeruginosa PAK pilin gene. FEBS Lett. 1985;183(2):408-12.
4. Finlay BB, Pasloske BL, Paranchych W. Expression of the Pseudomonas aeruginosa PAK pilin gene in Escherichia coli. J Bacteriol. 1986;165(2):625-30.
5. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. Annu Rev Microbiol. 2002;56:289-314.
6. Watson AA, Mattick JS, Alm RA. Functional expression of heterologous type 4 fimbriae in Pseudomonas aeruginosa. Gene. 1996;175(1-2):143-50.
7. Craig L, Taylor RK, Pique ME, Adair BD, Arvai AS, Singh M, et al. Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of Vibrio cholerae toxin-coregulated pilus and Pseudomonas aeruginosa PAK pilin. Mol Cell. 2003;11(5):1139-50.
8. Craig L, Volkmann N, Arvai AS, Pique ME, Yeager M, Egelman EH, et al. Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. Mol Cell. 2006;23(5):651-62.

پروتئین‌های دیگر با بازده باز تاخوردگی بالایی انجام گردیده است که به چند مورد از آن می‌توان اشاره نمود. Udono و همکاران باز تاخوردگی تدریجی پروتئین‌های جذب‌شده به ستون را برای خالص سازی hsp۶۰ استفاده کردند و گزارش نمودند که استفاده از PBS حاوی شیب کاهشی غلظت اوره، فعالیت ATP آزی بالایی را به پروتئین مورد نظر اعطا می‌کند (۲۲). در یک مطالعه ESAT-۶ نوترکیب مایکوباکتریوم توپرکلوزیس به‌طور موفقیت‌آمیزی با دیالیز گرادیان اوره به شکل طبیعی درآمد و بازده پروتئین تولیدشده ۴۸ میلی گرم در ۴ لیتر کشت گزارش شد (۲۳). در مطالعه دیگر که تا حدی مشابه با تحقیق حاضر می‌باشد خالص سازی روی ستون و باز تاخوردگی آنتاگونیست نوترکیب رسپتور اینترلوکین یک انسانی، بیشتر از ۴ میلی گرم پروتئین در میلی لیتر تولید کرد (۲۴). در مطالعه حاضر، اگرچه بیان سیتوپلاسمی پروتئین نوترکیب پیلین در فرم ذرات انکلوژن صورت گرفته است، سطح بسیار بالایی از پروتئین نوترکیب بیان شده و با روش تخلیص استفاده شده، پروتئین نوترکیب به‌صورت محلول و با خلوص بالا از ستون جمع‌آوری گردیده است. نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات که با آنتی‌بادی مونوکلونال علیه توالی پلی هسیتیدینی و آنتی سرم انسانی ضد سودوموناس آئروژینوزا نشان می‌دهد که استراتژی تولید و تخلیص بکار برده شده در این پروژه کارآمد بوده و توانسته مشکلات ناشی از تجمع پروتئین نوترکیب را مرتفع سازد. نتایج آزمون الیزا حاکی از این می‌باشد آنتی‌بادی علیه آنتی ژن پیلی سودوموناس در فاز حاد عفونت (عفونت زخم سوختگی) تولید می‌شود. نتایج الیزا و وسترن بلات، واکنش آنتی‌بادی‌های سرم‌های انسانی با پروتئین نوترکیب پیلین را تایید کرده و نشان‌دهنده‌ی این امر می‌باشند که اپی‌توپ‌های بیان شده مشابه با پیلی طبیعی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۲۵). در مطالعه حاضر، بازده پروتئین نوترکیب ۴ میلی گرم در میلی لیتر بوده است. با توجه به راندمان بسیار بالای پروتئین نوترکیب که تا حد بسیار زیادی عاری از سایر پروتئین‌های آلوده‌کننده بودند شاید بتوان گفت که روش بکار برده شده در این تحقیق، روشی ساده، کارآمد و سریع برای تولید و محلول کردن پروتئین‌های نوترکیب باکتری‌ها به‌ویژه در مورد سودوموناس آئروژینوزا با برچسب هیسیتیدینی و مستقل از موقعیت این برچسب هیسیتیدینی (در سمت کربوکسیلی یا آمینی) در ساختمان پروتئین می‌باشد.

ماهیت طبیعی و اکتسابی سودوموناس آئروژینوزا در کسب مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های جدید باعث شده که محققین به دنبال روش‌های نوین جهت درمان و پیشگیری از عفونت ناشی از این باکتری باشد (۲۶). نتایج وسترن بلات و الیزا به‌موازات نتایج تعیین توالی نشان‌دهنده صحت تولید پروتئین نوترکیب پیلین و حفظ ساختار نسبی آن است، لذا در آینده قصد داریم از پیلین نوترکیب به‌عنوان کاندید واکسن در برابر عفونت سودوموناس آئروژینوزا استفاده نمائیم.

9. Hazes B, Sastry PA, Hayakawa K, Read RJ, Irvin RT. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. *J Mol Biol*. 2000;299(4):1005-17.
10. Krivan HC, Ginsburg V, Roberts DD. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to ganglioside GM1 and ganglioside GM2. *Arch Biochem Biophys*. 1988;260(1):493-6.
11. Baker N, Hansson GC, Leffler H, Riise G, Svanborg-Eden C. Glycosphingolipid receptors for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1990;58(7):2361-6.
12. Hayashi N, Nishizawa H, Kitao S, Deguchi S, Nakamura T, Fujimoto A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. *FEBS Lett*. 2015;589(8):890-6.
13. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol*. 2008;10(9):2331-43.
14. Rosenthal VD, Maki DG, Salomao R, Moreno CA, Mehta Y, Higuera F, et al. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. *Ann Intern Med*. 2006;145(8):582-91.
15. Giltner CL, van Schaik EJ, Audette GF, Kao D, Hodges RS, Hassett DJ, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol Microbiol*. 2006;4:1083-96.
16. Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene*. 1997;192(1):99-108.
17. Hazlett LD, Moon MM, Singh A, Berk RS, Rudner XL. Analysis of adhesion, piliation, protease production and ocular infectivity of several *P. aeruginosa* strains. *Curr Eye Res*. 1991;10(4):351-62.
18. Woods DE, Straus DC, Johanson WG, Jr., Berry VK, Bass JA. Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Infect Immun*. 1980;29(3):1146-51.
19. Ramphal R, Sadoff JC, Pyle M, Silipigni JD. Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to injured tracheal epithelium. *Infect Immun*. 1984;44(1):38-40.
20. Strom MS, Lory S. Cloning and expression of the pilin gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAK in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1986;165(2):367-72.
21. Mierendorf RC, Morris BB, Hammer B, Novy RE. Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *Methods Mol Med*. 1998;13:257-92.
22. Udono H, Saito T, Ogawa M, Yui Y. Hsp-antigen fusion and their use for immunization. *Methods*. 2004;32(1):21-4.
23. Wang BL, Xu Y, Wu CQ, Xu YM, Wang HH. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif*. 2005;39(2):184-8.
24. Tan H, Dan G, Gong H, Cao L. On-column refolding and purification of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rHuIL-1ra) expressed as inclusion body in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*. 2005;27(16):1177-82.
25. Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clin Lab Med*. 2014; 34: 197-217.
26. Johansen HK and Gotzsche PC. Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 6: CD001399.