مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

کلونینگ ژن InvG از باکتری *سالمونلا انتریکا* در حامل pET32a و بررسی بیان آن در میزبان BL21-DE3

محمدحسن جهاندار[۱]، محمدرضا نصیری*[۲و۳]، علی اصغر اسلمی نژاد[۴]، مجتبی طهمورث پور[۲]، علیرضا حق پرست[۵]

[۱] دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

[۲] استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

[۳] استاد، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی و دامی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد.

[۴] دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

[۵] استادیار، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه فردوسی مشهد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۲/۰۳

چکیده

باکتری *سالمونلا* یکی از عوامل ایجاد بیماریهای عفونی و به عنوان یک بیماری مشترک در انسان و حیوانات، از لحاظ بهداشتی و اقتصادی دارای اهمیت فراوان است، که تا کنون واکسن برای آن تولید نشده است. ژن InvG به سبب ساختاری و به عنوان یکی از ژن های اصلی تشکیل دهنده سیستم ترشحی نوعIII و همچنین قرار گرفتن در غشاء باکتری، نقش مهمی را در اتصال اولیه باکتری به سلول میزبان دارد. هدف اصلی از پژوهش حاضر بیان پروتئین نوترکیب InvG و معرفی آن به عنوان یک ادجوانت موثر جهت DNA واکسن بود. در این پژوهش با طراحی آغازگر اختصاصی و استفاده از روش PCR، ژن InvG باکتری *سالمونلا* تکثیر گردید. پس از تخلیص، ژن فوق در ناقل پلاسمیدی pET32a(+) جهت بیان کلون شد. سپس پلاسمیدی نوترکیب pET32a-InvG وارد باکتری *اشریشیاکلی* سویه BL21- DE3 گردید. به منظور تولید پروتئین نوترکیب در سیستم بیانی، باکتری حاوی پلاسمید بیانی و ژن هدف (InvG) با استفاده از IPTG القاء شد. نتایج توالی یابی نشان داد که توالی ژن تکثیر شده در حامل بیانی pET32a کلون شده با ترادف ثبت شده برای ژن InvG در بانک ژن یکسان بود. تولید پروتئین نوترکیب با القاء IPTG به میزبان حاوی پلاسمید pET32a -InvG با موفقیت انجام گرفت. تایید بیان ژن InvG در این سیستم بیانی، توسط آنالیز SDS-PAGE و دات بلاتینگ انجام گردید. پژوهش حاضر نشان داد تولید پروتئین نوترکیب InvG در میزبان *اشریشیاکلی* امکان پذیر است و پروتئین تولید شده، وزنی در حدود ۸۱ کیلو دالتون دارد.

کلید واژه ها: *ژن InvG ، سالمونلا، پروتئین نوترکیب، ناقل پلاسمیدی pET32a.*

* نویسنده مسئول: محمدرضا نصیری تلفن: ۰۵۱۳۸۷۹۵٦۱۸ Email: nassiryr@gmail.com

مقدمه

ماده ژنتیکی[1] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند. نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Tohidi nejhad *et al*., 2015). *سالمونلوز* یک بیماری مهم عفونی است که به عنوان یک بیماری مشترک در بین انسان و حیوانات، از لحاظ بهداشتی و اقتصادی دارای اهمیت فراوان است. عامل ایجاد کننده این بیماری، یک باکتری تاژکدار گرم منفی و بی هوازی اختیاری از جنس *سالمونلا* و در خانواده *انتروباکتریاسه* بوده که بر اساس جدیدترین تقسیم بندی این جنس به دو گونه *سالمونلا انتریکا*[2] و *سالمونلا بنگوری*[3] تقسیم می شود. *سالمونلا انتریکا* به شش زیر گونه (I، II، IIIa، IIIb، IV، V) تقسیم شده که از بین این آنها زیر گونه I مسئول غالب عفونتهای *سالمونلا* در حیوانات خون گرم می باشد (Porwollik *et al*., 2004). خوشه های ژن حدت[4] *سالمونلا* در ۱۲ جزیره‌ی بیماری‌زایی[5] (SPI) واقع شده اند. ژن های مسئول حدت که در فاز روده‌ای عفونت نقش دارند، در SPI-۱ و SPI-۲ واقع شده‌اند. ناحیه SPI-۱ به طول kb ٤۳ و حاوی ۳۱ ژن و همچنین سیستم ترشحی نوع III[6] (T3SS) می‌باشد (Tindall *et al*., 2005). این سیستم ترشحی که سرنگ مولکولی نیز خوانده می‌شود، مسئول ترشح وابسته به تماس یا انتقال پروتئین‌های حدت به داخل سلول میزبان است (Galan, & Collmer, 1999). اولین گام در تثبیت این باکتری اتصال به سلول های میزبان است که بواسطه سیستم ترشحی نوع III و از طریق میانکنش بین پروتئین های ترشحی صورت می گیرد. در این میان ژن InvG به سبب ساختاری و همچنین قرار گرفتن در غشاء باکتری و به عنوان یکی از ژن های اصلی تشکیل دهنده سیستم ترشحی، ارتباط تنگاتنگی با اتصال اولیه باکتری به سلول میزبان را دارد (Galan & Wolf-Watz, 2006). ژن InvG دارای توالی نوکلئوتیدی ۱٦۸۹ نوکلئوتید می باشد که پلی پپتیدی با ٥٦۳ اسید آمینه با وزن مولکولی ٦۲ کیلو دالتون را کد می کند. این ژن دارای توالی حفاظت شده و بدون تغییر در گونه ها و سویه های مختلف تمامی *سالمونلا*ها بوده و یکی از آنتی ژن های اصلی است که نقش مهمی در ایجاد بیماری و همچنین زنده ماندن باکتری *سالمونلا* دارد (Galan & Wolf-Watz, 2006). در سال-

[1] DNA
[2] Salmonella Enterica
[3] Salmonella Bangor
[4] Virulence gene clusters
[5] Salmonella pathogenicity islands
[6] Type three secretion system

های اخیر، انواع مختلفی از آنتی بیوتیک ها برای مقابله با باکتری *سالمونلا* استفاده شده است که با افزایش تعداد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک، استفاده از روش های جایگزین ضروری به نظر می رسد. از این رو می‌تواند پروتئین InvG به عنوان عامل آنتی ژنیک از این باکتری، یک کاندیدای مهم محسوب شده و همچنین کلونینگ و بیان این ناحیه ژنی و استفاده از آن به عنوان پروتئین نوترکیب برای تحریک سیستم ایمنی میزبان جهت تولید ایمونوگلوبین اختصاصی حائز اهمیت فراوان باشد. لذا، هدف از انجام این پژوهش بررسی امکان بیان پروتئین نوترکیب InvG از توالی طبیعی ژن مربوطه بعد از همسانه سازی در ناقل بیانی، در میزبان *اشریشیاکلی* بوده است که می تواند به عنوان ادجوانت موثر به منظور یک DNA واکسن از آن استفاده شود.

مواد و روش ها

سویه های باکتری، پلاسمید و محیط کشت

باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* سویه (ATCC:۱٤۰۲۸) از دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد بر روی محیط کشت BHK-21 تهیه گردید. سویه های *اشرشیاکلی* DH5α و BL21(DE3) به ترتیب به عنوان میزبان کلونینگ و بیان انتخاب شدند. پلاسمیدهای pTZ57 R/T (Thermo Scientific) و pET32a(+) (Novagen) به ترتیب به عنوان ناقل های کلونینگ و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند.

سلول باکتری حاوی ناقل دستورزی[1] شده بر روی محیط کشت مایع Luria Broth (۱درصد تریپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ کلرید سدیم) حاوی ۱۰۰ µg/ml آمپی سیلین کشت داده شد.

جداسازی و تکثیر ژن InvG

آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن InvG با توجه به همولوژی توالی ثبت شده در NCBI با استفاده از نرم افزار Primer Premier، نسخه ۵ (Lalitha, 2000)، طراحی شد. ناحیه رمزگردان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی لینکردار رفت F:CGCGGATCCGCGGGCAGACAAAT GAAGACACATA و برگشت R: CCGCTCGAGCGGTTTAATTGCCTCCT GACCTCTAT تکثیر و جداسازی شد. جایگاه برشی *BamHI* و *XhoI* به منظور انتقال ژن InvG به حامل بیانی به ترتیب به آغازگرهای رفت و برگشت اضافه شد (جایگاه های برشی در آغازگرهای لینکردار با خط مشخص شده‌اند). تکثیر ژن مورد نظر با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر dNTP ۲۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر MgCl2 ۵۰ میلی مولار، ۱۰ پیکومول آغازگر رفت و برگشت، ۱/۲۵ واحد آنزیم pfu و ۵۰ نانوگرم DNA الگو انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن InvG با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (T-Personal) ساخت کشور آلمان

[1] Manipulation

به صورت زیر انجام شد. مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤°C برای مدت ٦ دقیقه، واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در ۹٤ °C، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۸ °C و بسط ٤۵ ثانیه در ۷۲ °C برای ۳۲ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. پس از انجام PCR جهت تخلیص DNA از ژل آگارز، از کیت Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای انجام واکنش الحاق، ۱۵۰ نانوگرم ناقل pTZ57R/T، ٦ میکرولیتر بافر الحاق (5X)، ۲۰۰ نانوگرم قطعه تخلیص شده، ۲ میکرولیتر محلول پلی اتیلن گلایکول و ٤ واحد آنزیم T4 DNA لیگاز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مخلوط شد. واکنش الحاق طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. محصول الحاق به سلول های مستعد شده باکتری *اشرشیاکلی* سویه DH5α با استفاده از روش شوک حرارتی انجام شد (Sorensen *et al*., 2005). بدین ترتیب که تیوب حاوی باکتری و محصول الحاق به مدت ٤۰ دقیقه درون یخ قرار داده شدند. سپس برای ایجاد یک شوک حرارتی، باکتری به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ٤۲°C قرار گرفتند و بعد به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ نگهداری شدند. در مرحله بعد ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB بدون آنتی‌بیوتیک به میکروتیوب ها اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷° C درون شیکر انکوباتور قرار گرفتند. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از محلول باکتری ترنسفورم شده روی پتری دیش حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (٤۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) توزیع گردید و در دمای ۳۷°C به مدت ١٤ ساعت نگهداری شدند. به منظور انتخاب کلونی های انتقال ژن شده، واکنش کلونی PCR و هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم محدودکننده *BamHI* و *XhoI* انجام گردید. برای انجام کلونی PCR، مقدار ۵۰ ماکرولیتر آب دیونیزه استریل را در میکروتیوپ ۱/۵ ریخته و با استفاده از لوپ، خطی از باکتری کلونی سفیدی که کشت خطی داده شده برداشته، در آب دیونیزه حل گردید. میکروتیوپ مذکور به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوشانده شد. سپس سانتریفیوژ در ۸۰۰۰rpm انجام شد. از سوپر ناتانت به عنوان DNA الگو برای واکنش کلونی PCR استفاده شد.

بیان پروتئین InvG

پس از تایید حضور ژن InvG از طریق واکنش کلونی PCR و هضم آنزیمی، از کلونی مورد نظر، استخراج پلاسمید صورت گرفت. برای این منظور از محیط کشت جامدی که تک پرگنه ای کشت داده شده بود، برداشته و در محیط کشت مایع ۳ میلی لیتر کشت داده شد (به مدت ١٦ ساعت). استخراج پلاسمید pTZ57R / T+InvG با استفاده از کیت Miniprep، (Thermo Scientific) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. هضم آنزیمی

برای پلاسمیدهای pTZ57R / T+InvG و ناقل بیانی pET32a(+) با استفاده از آنزیم های برشی *BamHI* و *XhoI* انجام شد. غلظت قطعه InvG و همچنین ناقل pET-32a (+) که هر دو در مراحل قبلی توسط جفت آنزیم مشترک *BamH*I و *Xho*I هضم و خالص سازی شدند، توسط نانودراپ تعیین شد و سپس بر اساس طول هر سازه، وزن مولی هر یک محاسبه و در نهایت قطعه و ناقل با نسبت مولی ۳ به ۱ برای انجام واکنش الحاق مورد استفاده قرار گرفت. واکنش الحاق پس از خالص سازی محصولات هضم با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز (Roche) صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب حاصل به منظور تکثیر به باکتری *اشرشیاکلی* سویه DH5α وارد شد و بر روی محیط کشت LB-Agar حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین کشت داده شد. غربالگری و انتخاب کلونی حاوی ژن هدف با استفاده از واکنش کلونی PCR و هضم دو آنزیمی انجام شد. ناقل بیانی pET32-InvG جهت بررسی چارچوب خوانش صحیح با استفاده از آغازگرهای عمومی T7 promoter و T7 terminator جهت توالی یابی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شد. سپس ناقل بیانی نوترکیب به میزبان بیان *اشرشیاکلی* BL21(DE3) منتقل شد و تک کلونی نوترکیب به مدت ۱٦ ساعت در ۳ میلی لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. یک میلی لیتر از محیط کشت تهیه شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی آمپی سیلین اضافه و تا رسیدن به OD ۰/٦، در طول موج ٦۰۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. در این مرحله، نمونه صفر برداشته و سپس به منظور تولید پروتئین نوترکیب InvG در سیستم بیانی *E.coli* BL21 (DE3)، می‌بایست باکتری حاوی پلاسمید بیانی pET-32 و ژن هدف InvG با استفاده از IPTG القاء شوند. برای این منظور IPTG در غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار به محیط کشت اضافه شد. نمونه برداری در ساعت های ۱، ۲، ۳و ٤ به منظور مشخص کردن بیان ژن InvG صورت گرفت. سلول ها در ۸۰۰۰ rpm سانترفیوژ و پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر بافر لاملی به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوشانده شدند. محصول در ۸۰۰۰ rpm سانترفیوژ و محلول رویی و انتهایی بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. بیان ژن InvG در این سیستم بیانی، توسط آنالیز SDS-PAGE انجام گردید. برای الکتروفورز محصول تحریک بیان ژن، از ژل پایینی ۱۲٪ و ژل بالایی ۵٪ و دستگاه الکتروفورز Mini- gel (۸cm ×۱۰cm) (Bio-Rad, USA) استفاده شد. به منظور شناسایی پروتئین نوترکیب تولید شده در سیستم بیانی و تایید آن، از روش سریع و حساس دات بلاتینگ استفاده شد. اساس علمی این روش بدین ترتیب است که یک آنتی بادی اختصاصی بر روی پروتئین هدف اضافه شده تا به اپی توپ اختصاصی خود اتصال یابد. سپس آنتی بادی دوم که معمولا حاوی آنزیم

گونژوگه مانند HRP[1]، است به آن اضافه می شود. درحضور پراکسید هیدروژن، این آنزیم سوبسترای 3-3' Diaminobenzidine (DAB) که ماده ای شفاف است به رسوب قهوه ای رنگی تبدیل می شود که در مکان های کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی در روی غشاء رسوب می کند.

نتایج و بحث

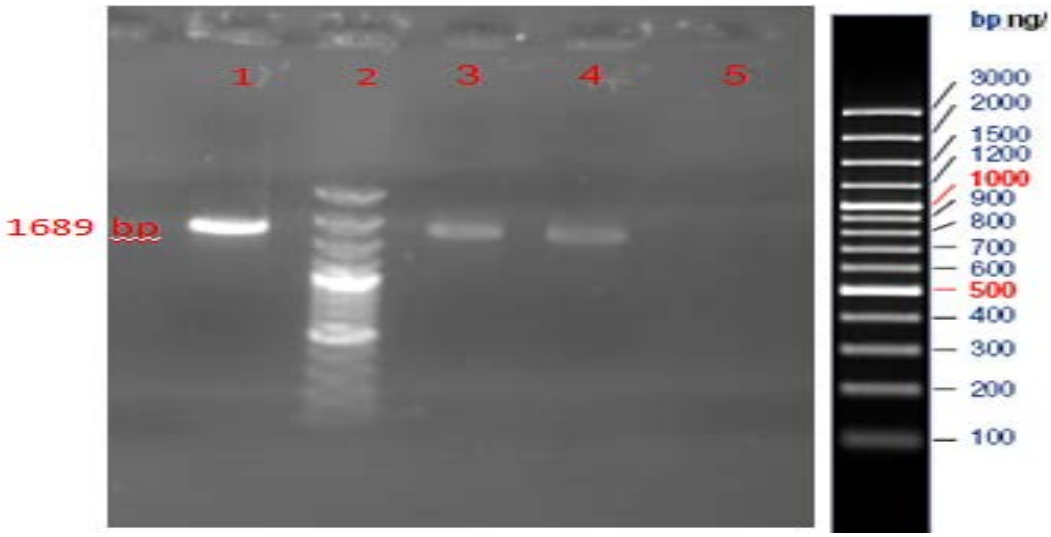
کلونینگ ژن InvG در ناقل pTZ57R/T

نتایج واکنش PCR، تکثیر ژن باکتری InvG *سالمونلا تیفی موریوم* استفاده شده در این پژوهش را تایید کرد. برای قطعه ژنی InvG باندی به طول ۱٦۸۹ جفت باز روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل۱). ناحیه کد کننده InvG روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی به طول ۱٦۸۹ جفت باز، به خوبی تکثیر شده است. حضور ژن InvG در ناقل pTZ57R/T با روش کلونی PCR و هضم دو آنزیمی تایید گردید (شکل۲).

بیان ژن InvG در *اشرشیاکلی*

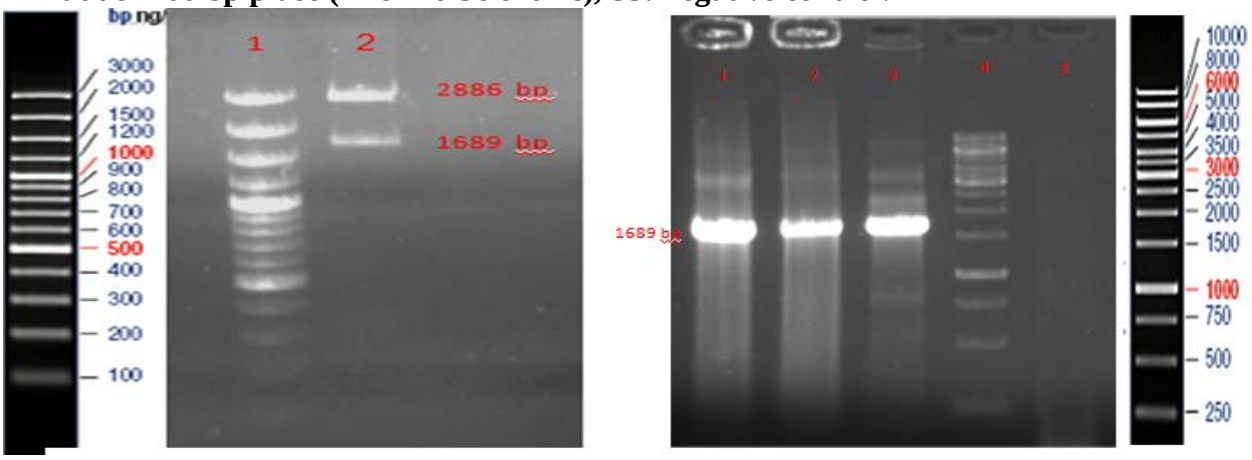
ناحیه کدکننده ژن InvG به شکل موفقی از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T+ InvG توسط واکنش هضم دو آنزیمی انجام و از ژل تخلیص گردید. فرآورده خالص‌سازی شده، که حاوی جایگاه‌های برشی برای آنزیم‌های *BamHI* و *XhoI* بود، در جایگاه همسانه‌سازی ناقل pET32a(+) با موفقیت الحاق شد. محصول pET32-InvG به درستی به میزبان *اشرشیاکلی* BL21(DE3) منتقل گردید و جهت تأیید صحت الحاق و طول قطعه کلون شده، با استفاده از پلاسمید نوترکیب استخراج شده به عنوان الگو، واکنش کلونی PCR به وسیله آغازگرهای T7 promoter و T7 terminator و هضم آنزیمی با آنزیم های *BamHI* و *XhoI* انجام شد. نتیجه کلونی PCR و هضم دو آنزیمی صحت انجام واکنش الحاق را تایید کرد (شکل ۳). الکتروفورز پروتئین های تولیدی پس از القاء و بیان، باند پروتئینی قابل توجهی را در محدوده وزنی ۸۱ کیلو دالتون نشان داد (شکل ٤). وزن مولکولی پروتئین نوترکیب با مقدار تخمین زده شده در نرم افزار CLC Workbench 5 همخوانی داشت. در سال ۱۹۹٤ وزن پروتئین نوترکیب InvG حدود ٦۲/۲۷۵ کیلو دالتون گزارش شده است (Kaniga., 1994). در سال ۱۹۹۸ قطعه ژن تخلیص شده InvG از سالمونلا تیفی موریوم SJW1103 در پلاسمید pAR3040 کلون شد، در آن گزارش تولید پروتئین نوترکیب InvG در پلاسمید PAMCG1 و در باکتری *E. coli* C41(DE3) انجام شده بود که وزن آن را ٦۲ کیلو دالتون نشان داد، در آن گزارش عنوان شده میزان پروتئین نوترکیب InvG تحت تاثیر بیان ژن InvH افزایش یافته است (Aimee *et al*.,1998).

[1] Horseradish Peroxidase



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی ژل آگارز (یک درصد) برای تکثیر قطعه‌ای ژنی InvG باکتری *سالمونلا* با آغازگرهای لینکر دار، ستون‌های ۱ و ۳ و ٤ قطعه‌ای ژنی InvG، ستون ۲ نشانگر 100 bp pluse(Thermo Scientific) و ستون ۵ کنترل منفی.

Figure 1- Agaros gel electrophoresis pattern (%1) of PCR products InvG gene of *Salmonella* with linker primer. The S1& S3, S4: InvG PCR Product (1689bp), S2: DNA Ladder 100 bp pluse (Thermo Scientific), S5: negative control.

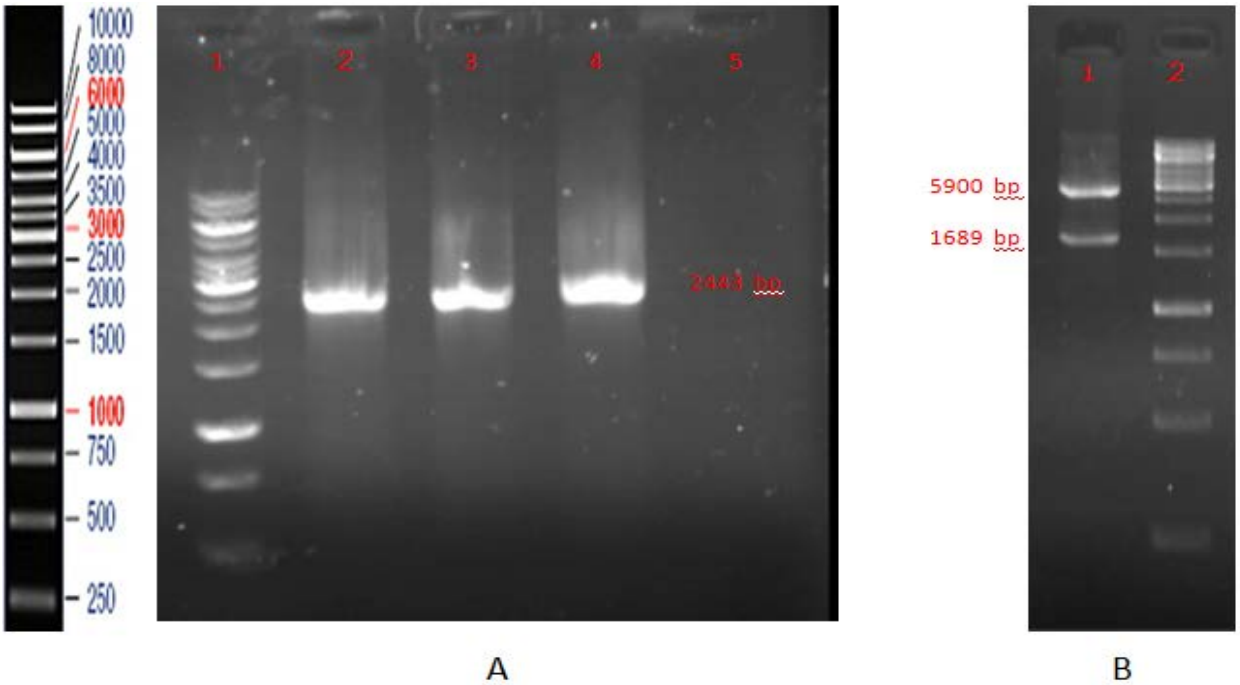


B A

شکل ۲- A- الگوی الکتروفورزی ژل آگارز (یک درصد) واکنش کلونی PCR، ستون ۱و۲ و ۳ کلونی PCR، ستون ۵ کنترل منفی و ستون ٤ نشانگر 1kb (Thermo Scientific). B- ستون ۱: نشانگر100 bp (Thermo Scientific) pluse و ستون ۲ : هضم دو آنزیمی pTZ57R/TP1- InvG.

Figure 2: Figure A- Agaros gel electrophoresis pattern (%1) of action clony PCR. The S1 & S2, S3: clony PCR, S5:negative control, S4: DNA Ladder 1kb (Thermo Scientific).

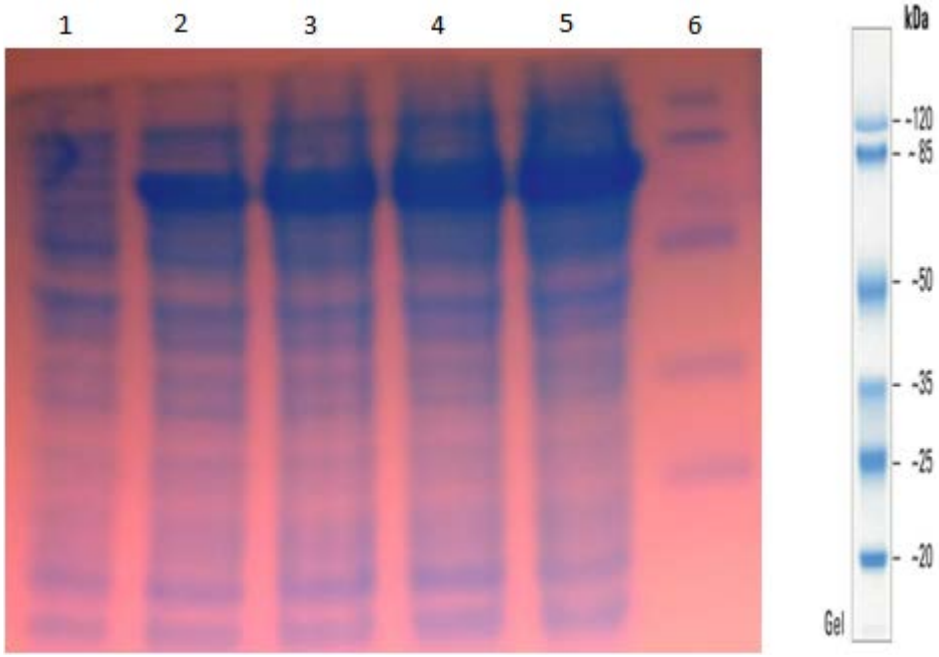
Figure B- S1: DNA Ladder 100 bp pluse (Thermo Scientific), S2: Double digest of pTZ57R/TP1- InvG.



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی ژل آگارز (یک درصد) کلونی PCR و هضم دو آنزیمی پلاسمید نوترکیب. شکل A- ستون ۱ نشانگر 1kb (Thermo Scientific)، ستون ۲ و ۳ و ٤ کلونی PCR با آغازگر اختصاصی T7 و ستون ۵ کنترل منفی. شکل B- ستون ۱ هضم دو آنزیمی، ستون ۲ نشانگر 1kb (Thermo Scientific).

Figure 3- Agaros gel electrophoresis pattern (%1) of clony PCR and double digestion. Figure A – The S1: DNA Ladder 1kb (Thermo Scientific), S2& S3, S4: clony PCR. Figure B – S1: Double digest of pET32a-InvG, S2: DNA Ladder 1kb (Thermo Scientific).

در مرحله بعد پس از کشت باکتریها و القاء با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت. پس از شکست باکتریها، سوسپانسیون حاصله روی ژل SDS-PAGE منتقل شد و به کمک نشانگر پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب و نواحی اضافه شده به آن توسط ناقل بیانی (مجموعا ۸۱ کیلودالتون) از ژل ۱۲ درصد استفاده شد. نتایج نشان داد که پروتئین مورد نظر در نمونه القاء شده، بیان شده، ولی در نمونه صفر که مربوط به زمان قبل از القاء با IPTG می باشد، بیان نشده است (شکل ٤). مراحل تخلیص پروتئین نوترکیب تحت شرایط دناتوره طبق پروتکل استاندارد انجام گرفت. مقدار ۲۵ میکرولیتر از محصول هر مرحله برداشته و برای الکتروفورز SDS-PAGE روی ژل ۱۲ درصد استفاده شد.



شکل ٤- **الگوی الکتروفورزی ژل SDS-PAGE پروتئین نوترکیب InvG استخراج شده از باکتری *اشرشیاکلی* BL21(DE3). ستون ۱ تا ۵ به ترتیب مربوط به زمان های (ساعت) صفر، ۱، ۲، ۳ و ٤ می-باشد.**

Figure 4- SDS-PAGE gel electrophoresis pattern of the recombinant protein InvG in *E. coli* BL21 (DE3). S1:Negative control, S2, S3, S4,S5 cell extracts from *E. coli* BL21 (DE3) cultured for 1, 2, 3 and 4 hours after 1 mM IPTG induction and lane S6, Molecular mass markers.

جهت تایید تولید پروتئین نوترکیب در باکتری BL21(DE3) از روش دات بلاتینگ استفاده شد. حضور شش اسید آمینه هیستیدین در ابتدایی ژن CagA که از ناقل بیانی به ژن هدف اضافه گردیده، به عنوان نشانگر استفاده شد. حضور نقطه های رنگ شده بر روی کاغذ نیتروسلولز تایید حضور پروتئین نوترکیب تولید شده می‌باشد. پروتئین InvG یک پروتئین غشاء خارجی بوده و در تمامی سویه های *سالمونلا* به صورت حفاظت شده وجود دارد و به عنوان عامل آنتی ژنیک این باکتری، به نظر می رسد یک کاندیدای مهم برای کلونینگ و بیان این ناحیه ژنی و استفاده از آن به عنوان یک ادجوانت موثر برای تحقیقات DNA واکسن مورد استفاده قرار گیرد. تولید پاسخ قوی سیستم ایمنی و القای هر دو ایمنی هومورال و سلولی در برابر آنتی ژن واکسن، به شدت در فرمولاسیون با ادجوانت بستگی دارد (Wang *et al*., 2011).

شکل ۵- آنالیز دات بلات پروتئین نوترکیب InvG . ۱- BL21/ InvG، ۲- کنترل منفی.

Figure 5- Dot blot analysis of recombinant protein InvG. S1: BL21/ InvG, S2: negative control.

بدین منظور در این پژوهش، تولید پروتئین نوترکیب InvG در باکتری *اشریشیاکلی* به شکل نوترکیب با استفاده از ناقل پلاسمیدی سیستم pET32a(+) با موفقیت آمیز انجام گرفت. حامل های بیانی متعددی در پروکاریوتها وجود دارد که از مهمترین آنها می توان به PET21a(+)، PET28 a(+) و pET32a(+) اشاره کرد، که از این میان pET32a(+) به دلیل داشتن ژن Trx دو جایگاه His.Tag و یک جایگاه S.Tag و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین بسیار پر کاربرد است. ژن TrxA دارای ۱۰۹ اسید آمینه است که این ژن با اتصال به ترکیبات انکلوژن بادی باعث محلول شدن پروتئین می شود، وجود شش His.Tag در این وکتور می تواند قدرت ما را در شناسایی پروتئین مورد نظر نسبت به سایر حامل ها دو چندان کند (Kaligh *et al.*, 2012). پس از بیان ژن و خالص سازی پروتئین حاصل، برچسب هیستدین را می توان با استفاده از پروتئاز ترومبین از انتهای آمین پروتئین هدف حذف کرد. در پژوهشی دیگر به علت بیان بهتر پروتئین نوترکیب در pET-32a(+) و ویژگی های ذکر شده، از آن استفاده شده است (Arbabi *et al.*, 2012). در مطالعه ای نشان داده شده که پروتئین نوترکیب CagA از هلیکوباکتر پیلوری در حامل بیانی pET-32a و در میزبان *اشریشیاکلی* با موفقیت بیان شد. در این تحقیق ذکر گردیده که پروتئین نوترکیب CagA آنتی ژنسیته خود را حفظ کرده و می تواند برای تشخیص سرولوژیک بیماری هلیکوباکتر پیلوری و تولید واکسن مورد استفاده قرار گیرد (Farjadi *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای دیگر عنوان شده، بیان ژن flic از سالمونلا تیفی موریوم در پلاسمید نوترکیب

pVAX-flic در سلول های یوکاریوتی با موفقیت انجام گردید، در این مطالعه عنوان شده که از آن می توان به عنوان ادجوانت برای تحقیقات DNA واکسن استفاده نمود (Taherkhani *et al.*, 2014). بنابراین در پژوهش حاضر از حامل بیانی pET32a(+) که قادر است به طور اختصاصی و به میزان زیاد ژن مورد نظر را بیان کند، استفاده گردید. در گزارشی دیگر آمده است که *اشریشیاکلی* به عنوان میزبان برای بیان پروتئین های نوترکیب هم در تحقیق ها و هم در صنعت به طور گسترده به کار می رود (Baneyx & Mujacic, 2004). از آنجا که میزبان های بیانی با داشتن عناصر تنظیمی مناسب و موتاسیون در پروتئازهای خود، امکان بیان بیشتر پروتئین نوترکیب را فراهم می آورند، همچنین فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی از جمله DegP، OmpT و HtpR می باشند (Kamani, 2011)، در پژوهش حاضر نیز برای تولید پروتئین نوترکیب InvG از سویه BL21(DE3) به عنوان میزبان استفاده شد. می توان نتیجه گرفت بیان مناسب InvG در این میزبان به دلیل عدم حضور پروتئازهای فوق الذکر می باشد. پروتئین تولید شده در این مطالعه، وزنی در حدود ۸۱ کیلو دالتون داشت که به علت افزوده شدن برخی پروتئین های جانبی از ناقل پلاسمیدی به پروتئین نوترکیب تولید شده، می باشد. با این حال در این مطالعه برای اولین بار، ژن InvG در pET32a بیان شد و به عنوان یک نامزد ادجوانت، جهت DNA واکسن معرفی گردید .

سپاسگزاری

این پروژه در آزمایشگاههای دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفته و بدین ترتیب از مسولان مربوطه کمال تشکر را داریم.

منابع

Aimee M, Crago AM, Koronakis V (1998). Salmonella InvG forms a ring-like multimer thatrequires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. Molecular Microbiology 30: 47–56.

Arbabi N, Behdani M, golkar M, Aghaee bakhtiari S, Khan ahmad shahreza H, MahdianR (2012). Cloning and expression of placental growth factor protein of human -1 (hPLGF-1) in Rosetta E.coli expression system. Medical Sciences Journal of Islamic Azad Univesity - Tehran Medical Branch 22: 32-38.

Baneyx F, Mujacic M (2004). Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Natural Biotechnol Nov 22 (11): 1399-408.

Farjadi V, Abtahi H, Zolfaghari M.R, Soufian S, Hasanzadeh L (2013). Production of recombinant CagA protein of Helicobacter pylori. Arak Medical University Journal 16: 35-44.

Galan JE, Collmer A (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science 284: 1322–1328.

Galan JE, Wolf-Watz H (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. Nature 444: 567–573.

Kaligh S, Bandehpour M, Yassaee V, Parivar K, Kazemi B (2012). Cloning, Expression and Purification CEL I Endonuclease Enzyme from Celery Plants. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 2: 79-87.

Kamani M (2011). The expression of recombinant streptodornase in E. coli bacteria. Arak Medical University Journal 14: 96-113.

Kaniga K J, Bossio C, Galán JE (1994). The Salmonella typhimurium invasion genes invF and invG encode homologues to the PulD and AraC family of proteins Molec. Microbiol 13: 555-568.

Lalitha, S (2000). Primer premier 5. Biotech Software & Internet Report: The Computer Software Journal for Scient 1: 270-272.

Porwollik S, Boyd EF, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, McClelland M (2004). Characterization of Salmonella enterica subspecies I genovars by use of microarrays. Journal of Bacteriol 186: 5883-98.

Sorensen HP, Mortensen KK (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. Journal Biotechnol 115: 113-28.

Taherkhani R, Farshadpour F, Makvandi M, Samarbafzadeh AR (2014). Cloning of fliC Gene From Salmonella typhimurium in the Expression Vector pVAX1 and Evaluation of its Expression in Eukaryotic Cells. Jundishapur Journal Microbiol 7: e12351.

Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzeby JP (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. International Journal of Systematic and Evolutionary 55: 521–524.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015). Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Journal of Agricultural Biotechnology 6: 35-50.

Wang W, Manmohan S (2011). Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency. World Journal of Vaccines 1: 33-78.

Cloning of InvG gene from *Salmonella Enterica* in the Expression Vector pET32a and Evaluation of its Expression in hosts BL21- DE3

Jahandar M.H. [1], Nassiri M.R.[*2, 3], Aslaminejad A.A. [4], Tahmoorespour M.[2], Haghparast A.R. [5]

[1]PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[2] Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[3]Professor, Department of Agricultural and Animal Biotechnology, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[4]Assistant Professor , Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[5]Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Abstract

Salmonella is one of the causes of infectious diseases as a common disease in human and animals, has important health and economic terms, which has so far of a vaccine for it not been established. The InvG gene due to structural and Type three secretion systems as one of the primary genes located in the membrane of Bacteria also play a major role in the initial binding of the Bacteria to the host cell. The main aim of the present study was to introduce recombinant protein expression InvG as an effective adjuvant and a DNA vaccine. The design makes use of specific primers and reaction PCR, InvG gene was amplified *Salmonella*. After purification, the gene in the plasmid vector pET32a(+) cloned for expression. The recombinant plasmid pET32a-InvG into *Escherichia coli* strain became BL21-DE3. To produce recombinant protein expression system, the Bacterial expression vector containing the target gene (InvG) induced using IPTG. The results of sequencing showed that the sequence of the amplified gene cloned into pET32a expression vector for gene InvG with sequences recorded in the same gene bank. Recombinant protein production with IPTG induction to vector containing the plasmid pET32a-InvG performed successfully. Confirmation of InvG gene expression in the expression system performed by SDS-PAGE and Dot blotting analysis. The present study showed that the production of InvG recombinant in *E. coli* hosts is possible and protein with a weight of about 81 kDa was produced.

Keywords: *InvG gene, Salmonella, recombinant proteins, vector pET32a(+).*

[*] Corresponding Author: Nassiri M.R. Tel: 05138795618 Email: nassiryr@gmail.com