

همسان سازی، تعیین توالی و بیان بخش C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) مایکوباکتریوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس

داریوش غریبی^۱، غلامرضا نیکبخت بروجنی^{۲*}، حسن تاج بخش^{۲،۳}، نادر مصوری^۴، سید امیر حسین جلالی^۲

(۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.

(۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۳) فرهنگستان علوم جمهوری اسلامی ایران، تهران - ایران.

(۴) بخش توبرکلوزیس، موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۸ دی ماه ۱۳۸۹، پذیرش نهایی: ۲۲ شهریور ماه ۱۳۹۰)

چکیده

پروتئین های شوک حرارتی (HSPs) در نقش کمک ایمنی باعث افزایش توان پاسخ دستگاه ایمنی ذاتی و اختصاصی بدن نسبت به آنتی ژن های مختلف به خصوص آنتی ژن های توموری و آنتی ژن های عوامل عفونی مختلف می شوند. بخش C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در کنار آنتی ژن های پروتئینی ساختاری قدرتمند برای تحریک پاسخ های ایمنی فراهم می آورد. در مورد پروتئین شوک حرارتی ۷۰ متعلق به گونه پاراتوبرکلوزیس و نقش آن در تحریک سیستم ایمنی مطالعات چندانی صورت نگرفته است، اما به نظر می رسد در ساختار واکسن DNA هم چون توبرکلوزیس از توانایی های بالایی برخوردار باشد. در این مطالعه پلاسمید اوکاریوتی PEGFP-N1 حاوی قسمت C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس طراحی و ساخته شد. در این پلاسمید از ژن پروتئین سبز درخشان در کنار ژن هدف برای تأیید بیان و بررسی کارایی پلاسمید استفاده گردید. صحت توالی نوکلئوتیدی قطعه همسان سازی شده در پلاسمید مزبور با روش تعیین توالی مشخص شد. همچنین بیان پروتئین حاصل از پلاسمید طراحی شده در کشت سلول COS-7 با روش برداری معکوس به اثبات رسید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پلاسمید بیان شونده اوکاریوتی PEGFP-N1 حاوی قطعه C ترمینال ژن پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس به خوبی قابلیت بیان در کشت سلول COS-7 را دارد. این پلاسمید را می توان به عنوان یک محمول در تهیه واکسن های DNA واجد قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس به کار برد.

واژه های کلیدی: مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس، پروتئین شوک حرارتی ۷۰، پروتئین سبز درخشان.

اختصاصی سلول های T می شوند (۶،۲۳). این پروتئین ها در تنظیم بیان مولکول های CD83، CD86، MHC و ترشح سیتوکاین ها و کموکاین های پیش التهابی دخالت داشته و قادر به القا، فعال شدن و بلوغ سلول های عرضه کننده آنتی ژن هستند (۳،۱۷،۲۴).

اعضای خانواده پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) شباهت ساختاری زیادی دارند و از یک قسمت متصل شونده به مولکول ATP، یک قسمت متصل شونده به پپتید و یک قسمت C ترمینال تشکیل شده اند (۳۷). مشخص گردیده است که قسمت انتهایی N دومین متصل شونده به مولکول ATP (اسید آمینه ۳۷۰-۱۶۰) پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مایکوباکتریوم و دومین متصل شونده به مولکول ATP پروتئین شوک حرارتی ۷۰ پستانداری (اسید آمینه ۳۸۵-۲۸۰) برای ایجاد پاسخ ایمنی وابسته به لمفوسیت های T سیتوتوکسیک علیه پروتئین یا پپتیدهای متصل شده به آن لازم است (۱۱،۲۹). مطالعات دیگر نشان داده است که قسمت C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مایکوباکتریوم باعث تحریک تولید سیتوکین و کموکین ها بوسیله سلول های دندریتیک شده و این امر باعث تسهیل القای پاسخ ایمنی وابسته به لمفوسیت های T سیتوتوکسیک می شود و این در حالی است که قسمت انتهایی N متصل

مقدمه

پروتئین های شوک حرارتی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی حراست شده های دارند و شاید شباهت ساختاری زیاد آنها در بین انواع متفاوت جانداران گویای ضرورت آنها در چرخه حیات باشد (۲). پروتئین های شوک حرارتی ۶۰ و ۷۰ پروکاریوتی و یوکاریوتی فقط در ۵۰ درصد توالی نوکلئوتیدی خود با یکدیگر تفاوت دارند (۱۳،۱۸،۳۶). حضور این پروتئین ها در شرایطی همچون استرس حرارتی، هیپوکسی، محرومیت غذایی، رادیکال های آزاد اکسیژن، اختلالات متابولیکی، عفونت های ویروسی و فاگوسیتوز، جهت حفظ فعالیت های حیاتی سلول ضروری است (۲۰،۳۴،۳۵). پروتئین های شوک حرارتی عوامل قدرتمند یاری کننده دستگاه ایمنی بدن هستند. این پروتئین ها به عنوان عامل همراه کننده (Chaperoning) توانایی متصل شدن به آنتی ژن های توموری و پپتیدهای مشتق از پاتوژن ها را داشته و باعث القای پاسخ های ایمنی علیه این آنتی ژن ها می گردند (۹،۲۶). پروتئین های شوک حرارتی با اتصال به پذیرنده های اندوسیتوز بر روی یاخته های عرضه کننده آنتی ژن (APC) عرضه آنتی ژن، تحریک متقاطع و القای پاسخ سیتوتوکسیستی



حرارتی میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس پرداخته و بیان آنرا را در سلول 7-COS ارزیابی کرده است.

مواد و روش کار

۱-۳- کشت باکتری: میکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس سویه D4 از موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردید و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط سنتتیک Herrolds egg yolk غنی شده با میکوباکتین J (۲ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) کشت داده شد. لوله های کشت به صورت مورب به مدت ۱ هفته در موسسه واکسن و سرم سازی رازی گرمخانه گذاری شدند. پس از یک هفته لوله ها به صورت عمودی و به مدت ۸ هفته در شرایط مناسب در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد و هر هفته از نظر رشد باکتری کنترل می شدند.

۲-۳- استخراج DNA ژنومی از میکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس: استخراج DNA ژنومی از میکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در موسسه واکسن و سرم سازی حصارک کرج صورت گرفت. به طور خلاصه ۲-۳ کلونی از باکتری با استفاده از لیزوزیم و سدیم دو دسیل سولفات لیز گردید. DNA ژنومی پس از مجاورت با فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل با استفاده از اتانول و رسوب داده شد و در بافر Tris-EDTA (TE) حل گردید. DNA حاصل بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید و خلوص DNA نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ارزیابی گردید و تا زمان آزمایش در برودت ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۳-۳- طراحی آغازگرهای اختصاصی قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ میکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس: طراحی آغازگرها بر اساس توالی ژن کد کننده پروتئین شوک حرارتی ۷۰ میکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس موجود در داده های بانک ژن به شماره شناسایی AF254578 صورت گرفت (۱۶). سپس با استفاده از نرم افزار Fast PCR اقدام به طراحی ۲ جفت آغازگر برای قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ میکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس گردید. زوج آغازگر مزبور در سمت ۵' آغازگر پیشرو در بردارنده مکان برشی برای آنزیم محدودیت HindIII و در سمت ۵' آغازگر معکوس در بردارنده مکان برشی برای آنزیم محدودیت PstI بود. توالی آغازگر پیشرو شامل ' ۳-CCAAGCTTACCATGGAGGTGAAAGACGTTCTG-۵' و آغازگر معکوس ۳'-ACCTGCAGCTTGGACTCCCGTCATCGTCG-۵ می باشد که قطعه ای به طول حدود ۷۸۰bp را در واکنش زنجیره ای پلی مرز افزوده سازی می کند.

۴-۳- افزوده سازی، همسان سازی و تعیین ردیف نوکلئوتیدی قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ میکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس: قطعه مربوط به قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی

شونده به مولکول ATP قادر به القای چنین اثری نیست (۱۹، ۳۰). اخیراً در دومن C ترمینال اپی تاپ های تحریک کننده و ممانعت کننده که می توانند باعث تعدیل تولید سیتوکین و بلوغ سلول های دندریتیک شوند رانیز مشخص کرده اند (۳۱).

اغلب واکسن ها برای تحریک موثر و ایجاد پاسخ ایمنی محافظت کننده نیاز به مواد کمک ایمنی دارند و اغلب مواد کمک ایمنی که در تحقیقات نیز استفاده می شوند، اثرات جانبی نامطلوب و مضر بر انسان و حیوانات دارند. به همین دلیل در سال های اخیر تمایل زیادی به طراحی واکسن هایی نظیر آنتی ژن های همراه شده با HSP70 مشاهده میشود که بدون نیاز به ماده کمک ایمنی باعث ایجاد پاسخ ایمنی قوی می شوند. پروتئین های شوک حرارتی میکوباکتریوم به خصوص HSP70 نیز زمانی که با آنتی ژن های توموری یا آنتی ژن های عوامل پاتوژن همراه شوند قادرند توان ایمنی اختصاصی بر علیه آن آنتی ژن را افزایش دهند زیرا نشان داده شده است که این مولکول ها فعال کننده های موثر سیستم ایمنی هستند و باعث القای پاسخ های ایمنی علیه تومورها و عوامل عفونی می شوند (۱۰، ۲۵).

واکسن های مختلفی بر پایه استفاده از پروتئین های شوک حرارتی جهت درمان سرطان ها و افزایش پاسخ سیستم ایمنی بدن نسبت به عوامل عفونی، تولید و مورد آزمایش قرار گرفته اند (۲۷). از میان رهیافت های مختلف واکسیناسیون بر پایه پروتئین های شوک حرارتی، واکسن های DNA نقش برجسته ای دارند؛ پلاسمید DNA رهیافت معمول و ساده ای است که به دلیل قابلیت دست کاری و کد کردن آنتی ژن های مختلف برای بیان پروتئین های مطلوب و دلخواه مورد توجه قرار گرفته است. به علاوه پروتئین های بیان شده بوسیله واکسن DNA و پردازش های بعدی که روی آنها صورت می گیرد بسیار شبیه زمانی است که یک پاتوژن وارد بدن می شود. پلاسمید های DNA نیاز کمتری به شرایط نگهداری سخت (دما و درجه حرارت) در مقایسه با پروتئین ها دارند و در نتیجه رهیافت عملی بیشتری را برای توسعه واکسن ها فراهم می کنند. از آن مهم تر اینکه واکسن های DNA می توانند طوری طراحی شوند که هم ایمنی هومورال و هم ایمنی سلولی را برانگیزند (۲۱).

همانند پروتئین شوک حرارتی ۷۰ میکوباکتریوم توبرکلوزیس HSP70 میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس نیز دارای ۶۲۳ اسید آمینه می باشد و از سه دومین ساختاری تشکیل شده است. اگر چه ساختار پروتئین های شوک حرارتی میکوباکتریوم توبرکلوزیس و میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس مشابه است ولی احتمال اینکه اعضای این خانواده خصوصیات متفاوتی را دارا باشند نیز وجود دارد. با توجه به خصوصیات بالا در مورد پروتئین های شوک حرارتی و برای بررسی بیشتر اثرات کمک ایمنی پروتئین شوک حرارتی میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به خصوص در زمینه استفاده آن در زمینه واکسن های دامی، تجربه حاضر به ساخت پلاسمید بیان شونده اوکاریوتی حاوی قسمت C ترمینال پروتئین شوک



DH5± ترانسفورمه شد و در حضور آنتی بیوتیک کانامایسین (۴۰ میلی گرم در میلی لیتر) کشت داده شد. به طور تصادفی کلون های انتخاب شده برای حضور قطعه مورد نظر بوسیله آغازگرهای T7-BGH غربال شد و کلون های مثبت جدا و در محیط مایع LB و در حضور کانامایسین کشت داده شد. پلاسمید نو ترکیب سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Qiagen Spin Miniprep Kit) استخراج و حضور قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی بوسیله هضم دو گانه با آنزیم های HindIII و PstI تایید گردید. قطعات حاصل از برش آنزیمی بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید. همچنین حداقل سه کلون مثبت در سیستم Korea ABI 3730 XL (Macrogen Inc. Seoul) نیز تعیین توالی گردید.

۳-۶- ارزیابی بیان قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰

مایکوباکتریوم در کشت سلول COS-7 ترانسفکته با پلاسمید اوکار یوتی pEGFP-N1: کشت سلولی COS-7 به شکل روتین در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FCS) Fetal Calf Serum، ۱ درصد آمینو اسیدهای غیر ضروری، ۱ درصد L- گلوتامین، ۱ واحد بر میلی لیتر (U/ml) پنی سیلین و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر (μg/ml) استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و در حضور ۵ درصد گاز کربنیک (CO₂) تحت شرایط استاندارد رشد و پاساژ داده شد. ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن، سلول های COS-7 در حالت رشد بوسیله تریپسین از فلاسک کشت سلولی جدا و به پلیت های ۳۵ میلی متری (۶ خانه) کشت سلولی با تراکم سلولی ۱۰^۴ × ۵ به ازای هر گوده (well) انتقال یافت. سپس ۳ میلی لیتر محیط کشت به هر گوده اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد گاز کربنیک (CO₂) انکوبه شد. جهت ترانسفکشن دی اتیل آمینواتیل دکستران (DEAE-dextran) به غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر در بافر فسفات نمکی (PBS) استریل مهیا گردید. در داخل سه تیوب ۱۰۵ میلی لیتری به طور جداگانه میزان ۱۵۰ میکرو لیتر از محلول فوق اضافه گردید. در داخل یکی از تیوب ها به عنوان کنترل پلاسمیدی اضافه نگردید. در مورد دو تیوب به یکی از تیوب ها پلاسمید pEGFP به عنوان کنترل مثبت و به تیوب دیگر پلاسمید ساخته شده 70 pEGFP-cterminal HSP با غلظت ۱ میکروگرم برای هر پلاسمید اضافه گردید (غلظت پلاسمید با الکتروفورز کردن پلاسمید در کنار غلظت های مشخص DNA و مقایسه آنها با صورت گرفت). محیط کشت از روی کشت سلولی تک لایه موجود در گوده های پلیت ۳۵ میلی متری بوسیله پیپت استریل برداشته شد. به هر یک از گوده ها از مخلوط آماده شده در بالا ۱۵۰ میکرو لیتر اضافه شد و کشت سلولی تک لایه COS-7 که به روش گفته شده در بالا با پلاسمید های مزبور ترانسفکت شده بود برای مدت ۳ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. بعد از این مرحله هر یک از گوده ها با بافر فسفات نمکی استریل شسته شده و کلروکین (Chloroquine) آماده شده در محیط کشت سلول با غلظت ۱۰۰ میکرو مول (100 μM) به هر گوده اضافه شد و برای ۳-۵ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. محیط کشت همه

۷۰ مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR) با کمک زوج آغازگر طراحی شده افزوده گردید. مخلوط مواد مورد نیاز جهت تکثیر قطعه شامل ۲ میکرو لیتر DNA ژنومی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (۱۰۰-۷۵ نانوگرم)، ۲۵ پیکومول از هر آغازگر، ۲۰۰ میلی مولار از هر کدام بازهای پورینی و پیریمیدینی، ۵۰ میلی مولار کلرید پتاسیم، ۲۰ میلی مولار تریس هیدروکلراید، ۲ میلی مولار کلرید منیزیم و ۱ واحد آنزیم پلی مرز DNA (شرکت سیناژن) بود. چرخه های گرمایی برای افزوده سازی قطعه مربوط به قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ شامل ۱ سیکل ۹۴ درجه ۸ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل: ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۹ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و ۱ سیکل ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (BioRad-Mexico) با حجم ۵۰ میکرو لیتر تعیین گردید. محصول حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مرز در ژل آگاروز الکتروفورز گردید (تصویر ۱) و پس از اطمینان از صحت وزن مولکولی مورد انتظار (۷۸۰bp) قطعه حاصل با استفاده از کیت خالص سازی شرکت سیناژن خالص گردید (Germany Qiagen, Hilden). به منظور تسهیل در تعیین توالی قطعه C ترمینال ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس و برش بهتر، قطعه خالص شده در مرحله قبل به پلاسمید تکثیری Vector pDrive که از نمونه و کتورهای TA طبق دستور العمل پیشنهادی شرکت سازنده (Hilden, Germany Qiagen PCR Cloning Kit) انتقال داده شد و در باکتری DH5± ترانسفورمه گردید پس از گذشت زمان باز یافت پلاسمید توسط باکتری، باکتری DH5± بر روی محیط LB آگار حاوی ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر آمپی سیلین کشت داده شد. غربال گری و آزمایش کلون های حاوی قطعه C ترمینال ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ بوسیله آغازگرهای عمومی T7-M13 انجام گردید و حداقل سه کلون های مثبت انتخاب و در محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند. در ادامه پلاسمید های نو ترکیب حاوی قطعه مزبور با استفاده از کیت خالص سازی پلاسمید (Qiagen Spin Miniprep Kit) مهیا گردید و پلاسمید های نو ترکیب حاوی قطعه مورد نظر با استفاده از برش آنزیمی دو گانه بوسیله آنزیم های HindIII و PstI تایید گردید. پلاسمید های استخراج شده بوسیله دستگاه تعیین کننده ردیف نوکلئوتیدی 3730 XL ABI ساخت کشور کره (Macrogen Inc. Seoul, Korea) تعیین توالی گردید.

۳-۵- ساخت پلاسمید pEGFP-N1 حاوی قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس: پس از

برش آنزیمی پلاسمید pDrive حاوی قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مایکوباکتریوم با آنزیم های HindIII و PstI قطعه حاصل از برش با کیت مخصوص تخلیص شد و بوسیله آنزیم T4 لیگاز در داخل وکتور pEGFP-N1 که از قبل بوسیله آنزیم های HindIII و PstI برش داده شده بود قرار گرفت. پلاسمید نو ترکیب pEGFP-N1 HSP70 در باکتری



۱۵-۲۰ درجه سانتیگراد یخ زد شد. پلت RNA بدست آمده با ۱ میلی لیتر الکل ۷۵ درصد شسته شده و بعد در دور ۷۵۰۰ rpm برای ۸ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رو خارج گردید و رسوب بدست آمده در مجاورت هوای آزمایشگاه خشک گردید. در نهایت رسوب بدست آمده در آب مقطر استریل حل و تیوب حاوی RNA در ۷۰- درجه نگهداری شد.

cDNA با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Germany) M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentase Life Science, RevertAidTM ساخته شد. برای این منظور از آغازگرهای با توالی ۶ نوکلئوتیدی تصادفی استفاده گردید (random hexamer شرکت Roach germany). cDNA تهیه شده، در واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR) با کمک جفت آغازگر مربوط به تکثیر قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ که توالی آن قبلاً ذکر شد و با همان شرایط افزوده شد.

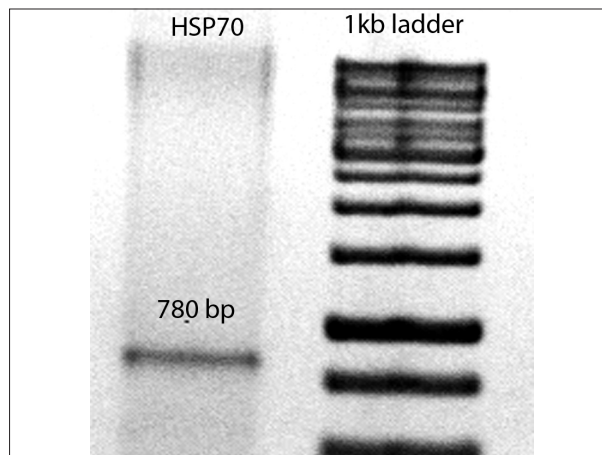
نتایج

۱-۴- افزوده سازی، همسان سازی و تعیین ردیف نوکلئوتیدی قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس: افزوده سازی قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ سویه D4 مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه ای در حدود ۷۸۰ bp تولید کرد (تصویر ۱). تعیین توالی نوکلئوتیدی (تصویر ۲) و آمینواسیدی (تصویر ۳) قطعه همسان سازی شده مزبور در پلاسמיד pDrive در مقایسه با توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی (AF254578 Gene Bank accession number) به ترتیب ۸۹ درصد و ۹۵ درصد شباهت را نشان داد.

۲-۴- نتایج حاصل از افزوده سازی قطعه کلون شده با آغازگرهای اختصاصی و برش آنزیمی پلاسמיד: افزوده سازی با آغازگرهای اختصاصی تعیین توالی نوکلئوتیدی مربوط به پلاسמיד pEGFP-N1 بر روی پلاسמיד ساخته شده pEGFP-Cterminal domain (تصویر ۵) و همچنین برش های آنزیمی بر روی پلاسמיד با استفاده از آنزیم های HindIII و PstI (تصویر ۶) بر روی پلاسמיד C-terminal domain -pEGFP نیز نشان داده شده است.

۳-۴- ارزیابی بیان ژن HSP70: پلاسמיד نو ترکیب domain pEGFP-Cterminal در کشت سلول COS-7 ترانسفکت و بیان گردید. واکنش RT-PCR با RNA تام استخراج شده از کشت سلول COS-7 ترانسفکت شده با پلاسמיד، بیان RNA ژن مزبور را با تولید یک باند در حدود ۷۸۰ bp نشان داد (تصویر ۷) که حاصل رونوشت برداری موفق از قطعه ژن مورد نظر است. باند مورد نظر در واکنش RT-PCR بر روی RNA تام استخراج شده از کشت سلول COS-7 کنترل که با پلاسמיד ترانسفکت نشده بود مشاهده نگردید (تصویر ۷).

۴-۴- مشاهده بیان پروتئین مربوط به قطعه C ترمینال پروتئین شوک



تصویر ۱- قطعه افزوده شده C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در واکنش زنجیرهای پلی مرز. گوده شماره ۱ قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی افزوده شده با پرایمرهای اختصاصی، گوده ۲ مارکر 1kb.

گوده ها بعد از این مدت با پیبت استریل خارج گردید و ۲ بار با بافر فسفات نامکی استریل شسته شد. در نهایت از گلیسرول ۱۰ درصد جهت شوک گلیسرولی استفاده شد به گونه ای که به هر گوده، گلیسرول ۱۰ درصد به مدت ۳ دقیقه اضافه شد. بعد از این مدت گوده های پلیت کشت سلولی ۲ بار با بافر فسفات نامکی استریل شسته شد و در آخر ۳ سی سی محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله به هر گوده اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت هر یک از گوده های ترانسفکت شده با میکروسکوپ فلورسنت جهت بررسی فلورسانس پروتئین سبز درخشان در گروه کنترل مثبت و گروه حاوی پلاسמיד حاوی قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در کنار پروتئین سبز درخشان مورد بررسی قرار گرفت. تمام مراحل فوق برای گروه کنترل منفی (فاقد پلاسמיד) نیز انجام گرفت.

۷-۳- RT-PCR بر روی کشت سلول COS-7 جهت ارزیابی بیان ژن قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰: به منظور ارزیابی بیان ژن قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی ۷۰، ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، سلول های COS-7 موجود در گوده های کشت سلولی تریپسین شده و به تیوب ۱۰۵ میلی لیتری انتقال داده شد. سپس تیوب در ۱۲۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج و رسوب سلول تا زمان آزمایش در ۷۰- درجه نگهداری شد.

برای استخراج RNA از سلول های COS-7 از روش پیشنهادی کیت (PLUS RNX، ساخت شرکت سیناژن) استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول RNX به رسوب سلولی داخل تیوب اضافه شد سپس مخلوط شد. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفرم به تیوب اضافه شد و مجدداً مخلوط گردید. بعد از گذشت ۵ دقیقه تیوب در دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۵-۲۰ درجه سانتیگراد یخ زد شد. در مرحله بعد مایع رویی شفاف به تیوب جدیدی منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه و به خوبی مخلوط شد سپس در دور ۱۲۰۰ rpm برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای



		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
MAP-C-terminal Domain	1	ATGGCTCGTCCGGTCGGTATCGACTCGGGACCACTCCGTCGCTGCTGCTGAGGGGGGACCCGTCGTCGTCGCCAACTCCGAGGGCTCGC										
TB-C-terminal Domain	1G.....T.G..T.G..A..T..C.....G.....CA										
Cloned C-terminal Domain	1G.....T.G..T.G..A..T..C.....G.....CA										
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
MAP-C-terminal Domain	101	GGACCCACCCGTCGCTGTCGCGTTCCGCCCAACGGGAGAGGTGCTGTCGGCCAGCCGCCAAGAACCAGGGCGGTGACCAACGTGCAACCGACCCGTCGG										
TB-C-terminal Domain	101A.T.....T.....G.....T.....G.G.....										
Cloned C-terminal Domain	101A.T.....T.....G.....T.....G.G.....										
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
MAP-C-terminal Domain	201	TTCGGTCAAGCGCACATGGGCAACGACTGGTCCATCGAGATCGACGGCAAGAAATACACCGCTGGAGATCAGCGCCCGCTGCTGATGAAGCTCAAG										
TB-C-terminal Domain	201A.....G.....A.....T.....G.....C.....A.T.....G.C.....										
Cloned C-terminal Domain	201A.....G.....A.....T.....G.....C.....A.T.....G.C.....										
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
MAP-C-terminal Domain	301	CGCGACCGGAGGCTTCTGGTGGAGGACATCCCGACCGGTCATCACTACCGGCTACTTCAAGACGCCCAAGCGCTCAGGGCCCAAGGAGAGCCCG										
TB-C-terminal Domain	301C.C.....T.....T.....GACG.C.C.....T.....C.....C.....										
Cloned C-terminal Domain	301C.C.....T.....T.....GACG.C.C.....T.....C.....C.....										
		410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
MAP-C-terminal Domain	401	GCCGATCGCCGCTCAACGTGCTGCGCTCGTCAACGAGCCGACCGCGCCGCTGGCTACGGCTGACCAAGGGCAGAAAGGAGCAGACCATCCT										
TB-C-terminal Domain	401G.....C.....C.....CGA.....										
Cloned C-terminal Domain	401G.....C.....C.....CGA.....										
		510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
MAP-C-terminal Domain	501	GGTCTTCGACCTGGGCGGACCTTCGACGTTTCTGCTCGAGATCGGCGAGGTTGGTGGAGTCCCGCCCAAGCGGTGACCAACCACTCGGT										
TB-C-terminal Domain	501T.G..T.T.....T.....C.....G.....T.....T.....T.....TTCG.....C.....C.....										
Cloned C-terminal Domain	501T.G..T.T.....T.....C.....G.....T.....T.....T.....TTCG.....C.....C.....										
		610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
MAP-C-terminal Domain	601	GGCGACGACTGGGACGACCGGATCGTCAAGTGGCTGGTACAAAGTTCAAGGGCACCAGCGGCATCGACTGACCAAGGACAAGATGGGCTATCAGCGGC										
TB-C-terminal Domain	601C.G..G.....G.T.....G.....T.....G.....										
Cloned C-terminal Domain	601C.G..G.....G.T.....G.....T.....G.....										
		710	720	730	740	750	760	770	780	790		
MAP-C-terminal Domain	701	TCCGTAAGCCCGCAGAAAGGCAAGATCGAGCTGCCAGCTCCAGAGCACTCGATCAACTCGCCCTACATCAACCTCGACCGGCAAGAAACCC										
TB-C-terminal Domain	701G..A.....A.....A.....AGTTCGAGT..TC.....C.....										
Cloned C-terminal Domain	701G..A.....A.....A.....AGTTCGAGT..TC.....C.....										

تصویر ۲- توالی نوکلئوتیدی قسمت C ترمینال همسان سازی شده و مقایسه آن با توالی نوکلئوتیدی قسمت C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و پاراتورکلوزیس.

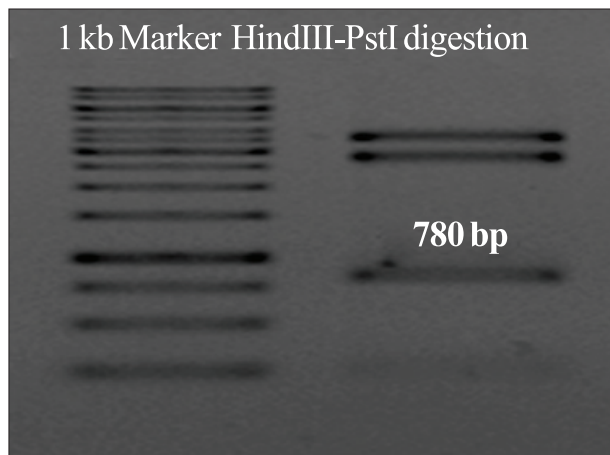
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
MAP-C-terminal Domain	1	MARAVGIDLGTINSVVVLEGGDPVVVAHSEGSRTTPSIVAFARNGEVLVGGPARKNQAVTNDRTLRSVKRHHGIDWSIEIDGKKYTALEISARFLMKLR										
TB-C-terminal Domain	1S.....V.....S.....P.....I.....										
Cloned C-terminal Domain	1S.....V.....S.....P.....I.....										
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
MAP-C-terminal Domain	101	RDAEAYLGEDITDAVITMPAYFNDAQRQATKAGQLAGLNLVLRVNEPTAAALAYGLDKGEKEQHLVFDLGGGTFDVSLLIEGEGVVEVRATSGDNVIG										
TB-C-terminal Domain	101T.....D.....R.....H.....										
Cloned C-terminal Domain	101T.....D.....R.....H.....										
		210	220	230	240	250	260					
MAP-C-terminal Domain	201	GDDWDVLRVNLVDFKFGTSGIDLTKDKMAMQRLREAAEKAKIELSSSQSTSINLPYITVDADKK										
TB-C-terminal Domain	201Q.V.D.....										
Cloned C-terminal Domain	201Q.V.D.....										

تصویر ۳- توالی آمینواسیدی قسمت C ترمینال همسان سازی شده و مقایسه آن با توالی آمینواسیدی قسمت C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم پاراتورکلوزیس.

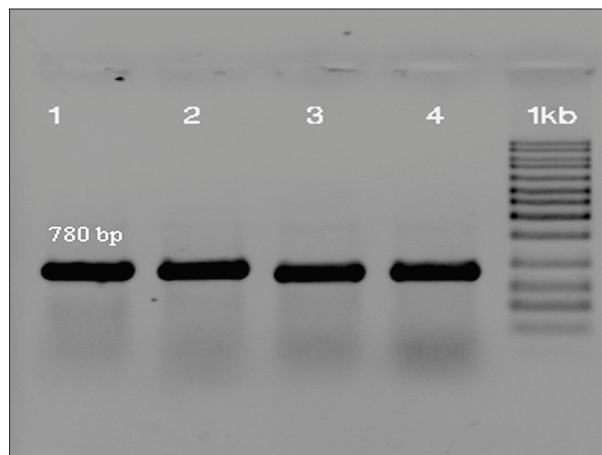
ترانسفکته در زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده گردید (تصویر ۵). همچنین این حالت در مورد پلاسمید pEGFP-N1 بدون قطعه (کنترل مثبت) مشاهده گردید در حالی در مورد کنترل منفی (سلول COS-7 بدون پلاسمید) مشاهده نگردید (تصویر ۵).

حرارتی مایکوباکتریوم پاراتورکلوزیس در کنار پروتئین سبز درخشان (GFP): بیان پروتئین مربوط به قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پاراتورکلوزیس با بیان پروتئین سبز درخشان (GFP) مشخص گردید و فلورسانس پروتئین سبز درخشان در سلول های

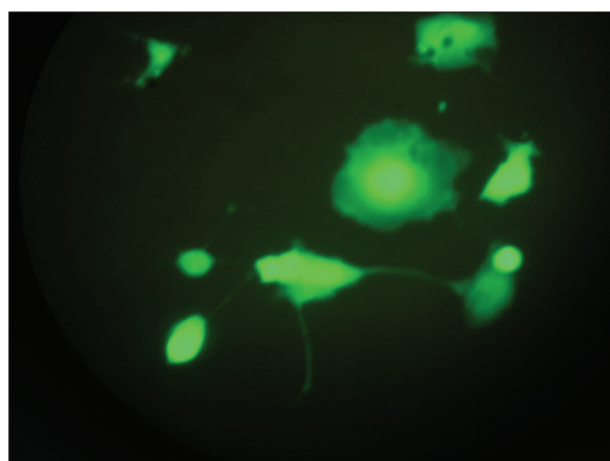




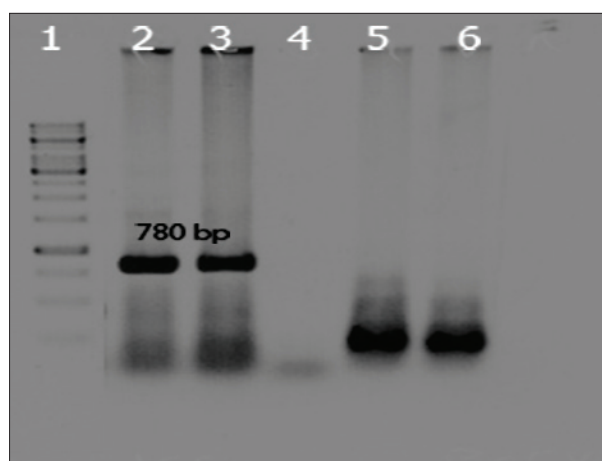
تصویر ۵- برش های آنژیومی بر روی پلاسمید C-terminal HSP70 pEGFP N1 با استفاده از آنژیومی های HindIII و PstI.



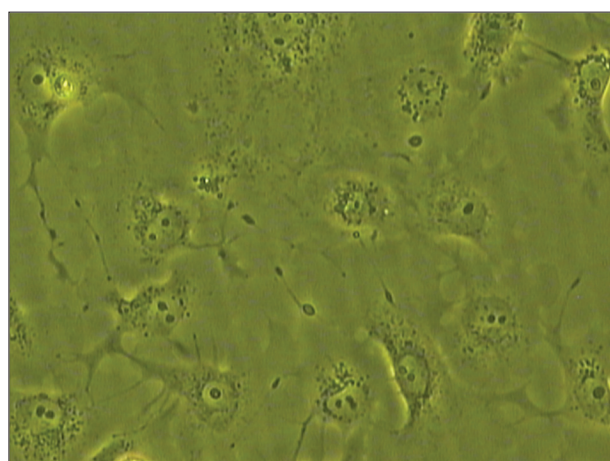
تصویر ۴- آزمایش زنجیره ای پلی مرز با پرایمرهای اختصاصی تعیین توالی نوکلئوتیدی مربوط به پلاسمید (pEGFP-N1) گوده های ۱-۴ کلون های مثبت می باشند).



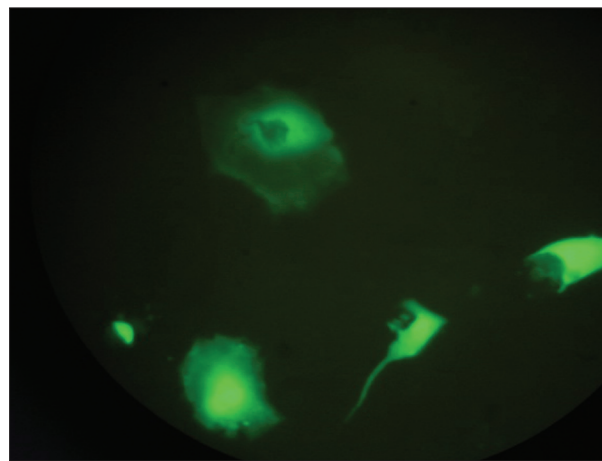
تصویر ۷- مشاهده بیان پروتئین مربوط به قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در کنار پروتئین سبز درخشان (GFP): قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در کنار پروتئین سبز درخشان.



تصویر ۶- ارزیابی رونوشت برداری قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای افزوده سازی قطعه. گوده ۱ مارکر 1 kb، گوده ۲ و ۳ قطعه C ترمینال پروتئین شوک حرارتی افزوده شده با پرایمرهای اختصاصی، گوده ۴ کنترل منفی، گوده ۵ و ۶ 2-actin.



c: سلول COS-7 بدون پلاسمید.



b: پلاسمید pEGFP-N1 بدون قطعه (کنترل مثبت).



بحث

در باکتری‌ها پروتئین شوک حرارتی ۷۰ سه دومین عملکردی مجزا دارد که شامل یک بخش متصل شونده به مولکول ATP، یک قسمت متصل شونده به پپتید و یک قسمت C ترمینال است (۳۷). بخش‌های مختلف این پروتئین از لحاظ عملکرد و خصوصیات تحریک دستگاه ایمنی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

به طور کلی پروتئین‌های شوک حرارتی درجات بالایی از شباهت را در بین گونه‌های مختلف نشان می‌دهند ولی در بخش‌هایی از آن تفاوت‌هایی به چشم می‌خورد. این تفاوت‌ها در بخش C ترمینال بیشتر است (۳۴). بنابراین استفاده از قسمت C ترمینال HSP70 باکتریایی در ساختار واکسن، به دلیل تفاوت‌های بیشتر، خطرات بروز بیماری‌های خودایمنی را در حیوانات و انسان و یا گونه‌ای که واکسن را دریافت می‌کند کاهش خواهد داد. اگر چه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و پاراتوبرکلوزیس مشابهت زیادی دارند اما اختلافات هر چند اندک آنها می‌تواند اثرات متفاوتی را در گونه‌های مختلف داشته باشد. این ویژگی‌ها موضوع اصلی انتخاب بخش C ترمینال HSP70 مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در این تحقیق بوده‌است. در این مطالعه توالی نوکلئوتیدی بخش C ترمینال همسان سازی شده سویه D4 در مقایسه با توالی ثبت شده HSP70 مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس (Gene Bank accession number AF254578) ۸۹ درصد، مایکوباکتریوم آویوم (Gene Bank accession number CP000479) ۸۹ درصد و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Gene Bank accession number EU747334) ۹۹ درصد شباهت را نشان داد. همچنین توالی آمینواسیدی قطعه همسان سازی شده مزبور با توالی آمینواسیدی HSP70 مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس (Gene Bank accession number AF254578) ۹۵ درصد، مایکوباکتریوم آویوم (Gene Bank accession number CP000479) ۹۵ درصد و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Gene Bank accession number EU747334) ۹۵ درصد و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Gene Bank accession number EU747334) ۹۹ درصد شباهت را نشان داد. در همین ارتباط توالی آمینواسیدی قسمت C ترمینال HSP70 مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در مقایسه با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ۱۲ اسید آمینه، توالی آمینواسیدی قطعه همسان سازی شده با مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در ۱۳ اسید آمینه و توالی آمینواسیدی قطعه همسان سازی شده با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ۱ اسید آمینه اختلاف داشتند (تصویر ۳).

در برخی مطالعات در مورد اثرات کمک ایمنی قسمت C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مطالعاتی صورت گرفته است برای مثال Yanming و همکاران در سال ۲۰۰۶ قسمت‌های مختلف پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را برای افزایش توان سیستم ایمنی نسبت به واکسن هیپاتیت B بررسی کرده‌اند و به این نتیجه رسیده‌اند که

دومین C ترمینال این مولکول می‌تواند پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را نسبت به آنتی ژن‌های ویروس هیپاتیت B افزایش دهد (۳۳). بخش C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس همانند پروتئین شوک حرارتی کامل (تمام طول) توانایی تحریک سیستم را داراست (۲). این موضوع با احتمال بسیار قوی در مورد پروتئین شوک حرارتی ۷۰ گونه پاراتوبرکلوزیس نیز صادق است اما در خصوص نقش آن در تحریک سیستم ایمنی و به خصوص در زمینه استفاده از این پروتئین در واکسن DNA، مطالعات چندانی صورت نگرفته است. به منظور انجام مطالعات تکمیلی در آینده، در این مطالعه پلاسمید بیان شونده یوکاریوتی pEGFP-N1 که حاوی بخش C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس است طراحی و ساخته شد.

قرار دادن قسمت C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در کنار پروتئین سبز درخشان در پلاسمید pEGFP-N1 این مزیت را داراست که به هنگام بیان پروتئین قسمت C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پروتئین سبز درخشان نیز بیان گردیده و این کار بررسی و ارزیابی بیان پروتئین را در شرایط محیط آزمایشگاهی *in vitro* (همانند بیان در کشت سلول) و همچنین در شرایط محیط زنده *in vivo* (همانند نسوج میزبان) تسهیل می‌کند.

نتایج حاصل از بررسی بیان پروتئین قسمت C ترمینال HSP70 مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در پلاسمید طراحی شده در این مطالعه با میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین مزبور به خوبی در کشت سلول بیان گردیده است. در بررسی بیان RNA ژن C-terminal HSP70 بوسیله تکنیک RT-PCR نیز صحت رونوشت برداری از ژن مزبور به اثبات رسید. در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پلاسمید طراحی شده حاوی قسمت C ترمینال پروتئین شوک حرارتی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به شیوه صحیحی طراحی و ساخته شده است و می‌توان از این پلاسمید جهت مطالعات آتی در ارزیابی نقش کمک ایمنی پروتئین کد شده توسط آن در کنار آنتی ژن‌های عوامل عفونی و در ترکیب واکسن‌های DNA بهره جست.

واکسن‌های DNA به خاطر پایداری و سهولت کار با آنان همواره به عنوان یک رهیافت مناسب برای برقراری پاسخ ایمنی اختصاصی علیه آنتی ژن مورد نظر مد نظر بوده‌اند. ولی نگرانی در مورد واکسن‌های DNA بیشتر در مورد توانایی و قدرت پایین ایمنی‌زایی آنان است. برای غلبه بر این مشکل استراتژی‌های مختلفی را می‌توان به کار برد که عبارتند از هدف قرار دادن آنتی ژن برای تجزیه داخل سلولی سریع تر (۲۲)، هدایت آنتی ژن به سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن با پیوند آن با لیگاندهای مربوط به رسپتورهای سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن (۵)، امتزاج آنتی ژن با کمپلکس‌ها (۴) و یا توالی‌هایی از عوامل پاتوژن از قبیل قسمت C توکسین کزاز (۱۴)، تزریق همزمان سایتوکین‌ها (۷، ۳۲)، مولکول‌های تحریک کننده همزمان (۸) و کاربرد همزمان الیگونوکلئوتیدهای CpG (۱۵).



References

1. Aaron, A. R., Tobian, D. H., Canaday, C. Harding, V. (2004) Bacterial heat shock proteins enhance class II MHC antigen processing and presentation of chaperoned peptides to CD4⁺T Cells. *J. Immunol.* 173:5130-5137.
2. Ang, D., Liberek, K., Skowrya, D., Zylicz, M., Georgeopoulos, C. (1991) Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 24233-24236.
3. Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., et al. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 6:435-442.
4. Biragyn, A., Tani, K., Grimm, M. C., Weeks, S., and Kwak, L. W. (1999) Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity. *Nat. Biotechnol.* 17: 253-258.
5. Boyle, J. S., Brady, J. L., Lew, A. M. (1998) Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature (London).* 392: 408-411.
6. Castellino, F., Boucher, P. E., Eichelberg, K., Mayhew, M., Rothman, J. E., Houghton, A. N., et al. (2000) Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp .Med.* 191:1957-64.
7. Chow, Y. H., Chiang, B. L., Lee, Y. L., Chi, W. K., Lin, W. C., Chen, Y. T., Tao, M. H. (1998) Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J. Immunol.* 160: 1320-1329.
8. Corr, M., Tighe, H., Lee, D., Dudler, J., Trieu, M., Brinson, D. C., Carson, D. A. (1997) Co-stimulation provided by DNA immunization enhances antitumor immunity. *J. Immunol.* 159: 4999-5004.
9. Gething, M-J., Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature (London).* 355: 33-45.
10. Hsu, K. F., Hung, C. F., Cheng, W. F., He, L., Slater, L. A., Ling, M., et al. (2001) Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by linking *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 to an antigen. *Gene Ther.* 8:376-83.
11. Huang, Q., Richmond, J. F., Suzue, K., Eisen, H. N., Young, R. A. (2000) In vivo cytotoxic T lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain and is CD4⁽⁺⁾T-cell independent. *J. Exp Med.* 191:403-8.
12. Hunt, C., Morimoto, R. I. (1985) Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6455-9.
13. Jindal, S., Dudani, A. K., Singh, B., Harley, C. B., Gupta, R.S. (1989) Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol. Cell. Biol.* 9: 2279-2283.
14. King, C. A., Spellerberg, M. B., Zhu, D., Rice, J., Sahota, S. S., Thompsett, A. R., Hamblin, T. J., Radl, J., Stevenson, F. K. (1998) DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma. *Nat. Med.* 4: 1281-1286.



15. Klinman, D. M., Yamshchikov, G., Ishigatsubo, Y. (1997) Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* 158: 3635-3639.
16. Koets, A. P., Rutten, V. P., de Boer, M., Bakker, D., Valentin-Weigand, P., van Eden, W. (2001) meat shock protein-, lipoarabinomannan- and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis infection. *Infect. Immun.* 69: 1492-1498.
17. Kuppner, M. C., Gastpar, R., Gelwer, S., Nossner, E., Ochmann, O., Scharner, A., et al. (2001) The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* 31:1602-9.
18. Lindquist, S., Craig, E. A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.
19. MacAry, P. A., Javid, B., Floto, R. A., Smith, K. G., Oehlmann, W., Singh, M., et al. (2004) HSP70 peptide binding mutants separate antigen delivery from dendritic cell stimulation. *Immunity.* 20:95-106.
20. Morimoto, R. I., Milarski, K. L. (1990) Expression and function of vertebrate hsp70 genes. In: *Stress Proteins in Biology and Medicine.* Morimoto, R. I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA. p. 323-359.
21. Robinson, H. L., Torres, C. A. (1997) DNA vaccines. *Semin. Immunol.* 9: 271-83.
22. Rodriguez, F., An, L. L., Harkins, S., Zhang, J., Yokoyama, M., Widera, G., Fuller, J. T., Kincaid, C., Campbell, I. L., Whitton, J. L. (1998) DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J. Virol.* 72: 5174-5181.
23. Singh-Jasuja, H., Hilf, N., Scherer, H. U., Arnold-Schild, D., Rammensee, H. G., Toes, R. E., et al. (2000) The heat shock protein gp96: a receptor targeted cross priming carrier and activator of dendritic cells. *Cell Stress Chaperones.* 5:462-70.
24. Singh-Jasuja, H., Scherer, H. U., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Rammensee, H. G., Toes, R. E., et al. (2000) The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur. J. Immunol.* 30: 2211-5.
25. Srivastava, P., (2002) Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2:185-194.
26. Srivastava, P. K., Udono, H. (1994) Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 728-32.
27. Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M., Srivastava, P. K. (1997) Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science.* 278: 117-120.
28. Tobery, T. W., Siliciano, R. F. (1997) Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization. *J. Exp. Med.* 185: 909-920.
29. Udono, H., Yamano, T., Kawabata, Y., Ueda, M., Yui, K. (2001) Generation of cytotoxic T lymphocytes by MHC class I ligands fused to heat shock cognate protein 70. *Int. Immunol.* 13:1233-42.
30. Wang, Y., Kelly, C. G., Singh, M., McGowan, E. G., Carrara, A. S., Bergmeier, L. A., et al. (2002) Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *J. Immunol.* 169:2422-9.
31. Wang, Y., Whittall, T., McGowan, E., Younson, J., Kelly, C., Bergmeier, L. A., et al. (2005) Identification of stimulating and inhibitory epitopes within the heat shock protein 70 molecule that modulate cytokine production and maturation of dendritic cells. *J. Immunol.* 174:3306-16.
32. Weiss, W. R., Ishii, K. J., Hedstrom, R. C., Sedegah, M., Ichino, M., Barnhart, K., Klinman, D. M., Hoffman, S. L. (1998) A plasmid encoding murine granulocytemacrophage colony-stimulating factor increases protection conferred by a malaria DNA vaccine. *J. Immunol.* 161: 2325-2332.
33. Xiangming, L., Xiaofeng, Y., Liangwei, L., Haibo,



- L., Jing, L. (2006) A truncated C-terminal fragment of *Mycobacterium tuberculosis* HSP70 gene enhanced potency of HBV DNA vaccine. *Vaccine*. 24:3321-3331.
34. Young, R. A. (1990) Stress proteins and immunology. *Ann. Rev. Immunol.* 8:401-420.
35. Young, R. A., Elliot, T. J. (1989) Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell*. 59: 5-8.
36. Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O., Georgopoulos, C. (1991) The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 301-325.
37. Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E., et al. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*. 272: 1606-14.



CLONING, SEQUENCING AND EXPRESSION OF HSP70 C-TERMINAL DOMAIN IN *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. PARATUBERCULOSIS

Gharibi, D.¹, Nikbakht Broujeni, G.R.^{2,3*}, Tadjbakhsh, H.^{2,3}, Mosavari, N.⁴, Jalali, S.A.H.²

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahid Chamran, Ahvaz-Iran.

²Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

³Iranian Academy of Sciences, Tehran-Iran.

⁴Department of Tuberculin, Razi Institute, Karaj, Iran.

(Received 8 January 2011 , Accepted 13 September 2011)

Abstract:

Heat shock proteins (HSPs) have been shown to act as an adjuvant when co-administered with different antigens, especially tumor antigens or antigens from infectious agents. C-terminal domain of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 (Hsp70), when fused to peptide antigens, provides a unique structure that is able to induce potent immune responses. In this study, an eukaryotic expression vector pEGFP-N1, containing C-terminal domain of *Mycobacterium paratuberculosis* HSP 70, Green Fluorescent Protein (GFP) gene in the plasmid construct, was designed for use as a reporter. With GFP system, expression of the target protein was evaluated in the cell culture. The nucleotide sequence of the cloned gene was revealed by sequencing. The protein expression of designed plasmid was also proved by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Our eukaryotic expression vector (pEGFP-N1 -hsp70 c-terminal) was successfully constructed and HSP70 c-terminal domain protein was expressed effectively. The current experiment, as a basis for a new DNA vaccine design, can be used for the future studies on reverse vaccinology.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, heat shock protein 70(Hsp70), green fluorescent protein (GFP).

*Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir, Tel: 021-61117057, Fax: 021-66427517

