مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۱، ۱۲۷-۱۲۱
Original Article
Journal of Veterinary Research. 72,1:121-127, 2017

تولید پروتئین‌های نوترکیب فسفولیپاز D و پروتئین شوک حرارتی کورینه‌باکتریوم سودوتوبر کلوزیس

فاطمه برون مسعود رضا صیفی‌آباد شاپوری مسعود قربانپور* داریوش غریبی صالح اسماعیل‌زاده
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۱۰ آذر ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۱ بهمن ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری لنفادنیت پنیری ناشی از کورینه‌باکتریوم سودوتوبر کلوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گوسفند و بز است که منجر به ضررهای اقتصادی دام‌پروران می‌شود. فسفولیپاز D (PLD) این باکتری یک اگزوتوکسین قوی است که به‌عنوان یک عامل حدت اصلی آن در نظر گرفته می‌شود و احتمالاً در انتشار باکتری از محل عفونت به سایر قسمت‌های بدن میزبان مشارکت دارد. پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) کاندیداهای خوبی برای تهیه واکسن‌ها هستند چون هم ایمنی هومورال و هم ایمنی سلولی را تحریک می‌کنند. **هدف:** مطالعه حاضر باهدف تولید پروتئین‌های نوترکیب PLD و HSP_{60} کورینه‌باکتریوم سودوتوبر کلوزیس جهت فراهم شدن زمینه‌ی بررسی توان محافظت‌کنندگی و ساخت واکسن ضد این باکتری صورت گرفت. **روش کار:** ژن‌های PLD و HSP_{60}، در پلاسمید pMAL-c2X کلون گردیدند و در اشرشیاکلی سویه DH5α ترانسفورمه شدند. بیان پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE بررسی‌شده و صحت ردیف نوکلئوتیدی محصولات کلون شده با تعیین توالی نوکلئوتیدی مورد تأیید قرار گرفتند. **نتایج:** نتایج نشان داد که اشرشیاکلی سویه DH5α ترانسفورمه شده به‌خوبی پروتئین‌های فوق را بیان می‌نماید. پروتئین‌های نوترکیب بیان‌شده تقریباً به‌طور کامل محلول بودند. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به امکان تولید پروتئین‌های نوترکیب فوق، در مطالعات بعدی می‌توان ایمنی‌زایی و محافظت‌کنندگی آن‌ها در برابر عفونت‌های ناشی از کورینه باکتریوم سودوتوبر کلوزیس را موردسنجش قرارداد.

واژه‌های کلیدی: کورینه باکتریوم سودوتوبر کلوزیس، فسفولیپاز D، پروتئین شوک حرارتی (HSP_{60})، کلونینگ

مقدمه

کورینه باکتریوم سودوتوبر کلوزیس باکتری گرم مثبت، داخل سلولی اختیاری و عامل بیماری مزمن و واگیردار لنفادنیت پنیری (Caseous lymphadenitis) در گوسفند و بز است که موجب لاغری می‌شود. بیماری با تورم یک‌طرفی یا دو طرفی عقده‌های لنفاوی سطحی مشخص می‌گردد و ضایعات ناشی از آن قابل‌سرایت به کلیه‌ها، ریه‌ها، کبد و طحال است. این باکتری عامل درصد قابل توجهی از آبسه‌های کبدی گزارش شده است (۱۳،۲۰). اگرچه میزان تلفات ناشی از این بیماری خیلی کم است، اما میزان ابتلای به آن زیاد است. بیماری انتشار جهانی داشته و علاوه بر گوسفند و بز، گاو، اسب و شتر، آهو و انسان را نیز درگیر می‌سازد (۱۸).

مهم‌ترین عامل حدت در بیماریزایی این جرم فسفولیپاز D (PLD) آن است که یک اگزوتوکسین پروتئینی بوده که باعث هیدرولیز باندهای استری اسفنگومیلین در غشاء سلولی پستانداران، افزایش نفوذپذیری عروق و گسترش عفونت به مکان‌های ثانویه می‌شود، اما عامل چرک‌زای مقاوم به حرارت که باعث جذب لوکوسیت‌ها به موضع عفونت می‌شود و لیپید با خاصیت آنتی‌فاگوسیتوزی موجود در جدار جرم، نیز از دیگر عوامل حدت این باکتری هستند (۲۱، ۱۵). به دلیل داخل سلولی بودن این باکتری آنتی‌بیوتیک درمانی چندان بر بهبودی تأثیرگذار نیست (۱۶)، بنابراین تلاش بر پایه پیشگیری با واکسیناسیون است. واکسن‌های متعددی جهت مبارزه با لنفادنیت پنیری، شامل استفاده از سویه‌های غیرفعال یا تخفیف حدت یافته این باکتری (۱۰)، اجزاء سلول باکتری شامل آنتی‌ژن‌های پیکری باکتری، آنتی‌ژن‌های مایع رویی کشت باکتری (۴) و DNA واکسن‌ها (۷) مورد آزمایش قرارگرفته‌اند، اما تاکنون واکسن مناسب تجاری برای حفاظت مؤثر در مقابل لنفادنیت پنیری معرفی نشده است (۲۱).

استفاده از PLD نوترکیب با افزایش عیار آنتی‌بادی ضد اگزوتوکسین و محافظت نسبی در گوسفند همراه بوده است (۱۷، ۹، ۶، ۳). پروتئین‌های شوک حرارتی آنتی‌ژن‌های خوبی برای تهیه واکسن هستند چون هم ایمنی هومورال و هم ایمنی سلولی را تحریک می‌کنند. Pinho و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش نموده‌اند که ایمن‌سازی موش‌های BALB/C با پروتئین شوک حرارتی نوترکیب، باعث افزایش معنی‌دار IgG ضد HSP_{60} می‌شود ولی منجر به القاء محافظت در برابر آلودگی داخل صفاقی نمی‌گردد (۹). استفاده از واکسن‌های DNA حاوی ژن‌های فسفولیپاز D و CTLA4 در گوسفند، با حفاظت ۵۶ تا ۷۰ درصدی همراه بوده است (۷). همان‌گونه که مشاهده می‌شود، HSP_{60} و PLD این باکتری هر یک به‌تنهایی به‌عنوان کاندیدی جهت واکسن به کار گرفته شده‌اند، اما ایمن‌سازی موش با این پروتئین‌ها منجر به القاء محافظت در برابر آلودگی داخل صفاقی نشده است. با این فرض که استفاده توأم این دو پروتئین ممکن است با القاء مقاومت همراه باشد، این مطالعه باهدف تولید نوترکیب PLD و HSP_{60} این باکتری انجام گردید تا زمینه بومی‌سازی تولید نوترکیب این دو پروتئین و

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۳۳۳۳۰۰۷۳-۰۶۱ نمابر: ۳۳۳۶۰۸۰۷-۰۶۱ Email: m.ghorbanpoor@scu.ac.ir

بررسی توان محافظت‌کنندگی آن‌ها در برابر عفونت ناشی از این باکتری در دام‌ها فراهم گردد.

مواد و روش کار

سویه‌های باکتری و پلاسمید مورداستفاده: به‌عنوان سویه باکتریایی از یک جدایه کورینه باکتریوم سودوتوبر کلوزیس که در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشکده دامپزشکی اهواز از گوسفند جدا شده بود و با PCR حضور ژن‌های PLD و HSP_{60} در آن اثبات‌شده بود، استفاده شد. همچنین از سویه DH5 α شرشیا کلی که از موسسه پاستور ایران تهیه‌شده بود به‌عنوان میزبان پروکاریوتی و پلاسمید بیانی پروکاریوتی pMAL-c2X- محصول شرکت New England Biolabs جهت کلونینگ و بیان پروتئین استفاده شد.

آزمایش PCR: با استخراج توالی ژن‌های کد کننده ناحیه‌ی PLD و HSP_{60} کورینه باکتریوم سودوتوبر کلوزیس از Gene Bank، پرایمرهای این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Primer۳ طراحی شد (جدول ۱). پرایمرهای پیشرو دارای جایگاه شکست برای آنزیم *EcoR I* و پرایمرهای معکوس دارای جایگاه شکست برای آنزیم *Sal I* بودند. با استفاده از این پرایمرها و DNA استخراج‌شده از جدایه کورینه‌باکتریوم سودوتوبر کلوزیس، PCR به شرح زیر انجام گرفت: مقدار ۱۲/۵ µl (۱۰mM) مسترمیکس ۲x (سیناژن، ایران)، ۲ µl (۱۰pmol) از هرکدام از پرایمرهای F و R، ۴ µl DNA و ۴/۵ µl آب دو بار تقطیر استریل، در حجم نهایی ۲۵ µl مخلوط و تکثیر ژن‌های موردنظر در ترمال سایکلر (اپندورف، آلمان)، با برنامه دمایی ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه (۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰°C برای PLD و ۵۰°C برای HSP_{60} به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه) و در آخر ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. محصولات قابل‌انتظار PCR، قطعاتی به طول ۹۲۴ bp (PLD) و ۱۶۰۹ bp (HSP_{60}) بودند.

کلونینگ و بیان: پس از انجام PCR و دستیابی به قطعات DNA موردنظر، محصولات PCR و پلاسمید pMAL-c2X توسط آنزیم‌های محدودالاثر *EcoR I* و *Sal I* هضم و بعد از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪ با کیت استخراج DNA از ژل (شرکت ویوانتیس، مالزی) خالص شدند و واکنش لیگاسیون بین پلاسمیدها و محصولات PCR با استفاده از آنزیم لیگاز T۴ (فرمنتاس، لیتوانی) و طبق دستورالعمل آنزیم انجام شد. محصولات لیگاسیون با روش چندمرحله‌ای توسط کلرید کلسیم به سویه DH5 α شرشیا کلی منتقل و باکتری‌های ترانسفورمه شده در محیط LB جامد آمپی‌سیلین‌دار کشت گردیدند. غربالگری کلون‌های باکتری حاوی پلاسمیدهای نوترکیب با روش PCR انجام شد. پس از الکتروفورز و اطمینان از صحت کلونینگ، باکتری در محیط LB مایع دارای آمپی‌سیلین (۱۰۰µg/ml) و ۲٪ گلوکز کشت داده شد؛ با رشد باکتری و رسیدن به کدورت ۰/۶ در طول‌موج ۶۰۰ nm، به‌منظور القاء بیان پروتئین، IPTG (ایزوپروپیل بتا دی‌گالاکتوپیرانوزید، سیگما) با غلظت نهایی ۱ mM اضافه شد و کشت باکتری در دمای ۳۷° تا ۲ ساعت ادامه یافت. نمونه‌های تهیه‌شده پیش و پس از افزودن IPTG، با الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی ژل با رنگ آبی کوماسی، ازنظر بیان مورد ارزیابی قرار گرفتند (۲). با توجه به پلاسمید مورداستفاده، انتظار می‌رفت، پروتئین نوترکیب تولیدی به شکل فیوژن با پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP) تولید گردد. برای هریک از ژن‌های موردمطالعه سه کلونی بیان‌کننده پروتئین انتخاب و پلاسمیدهای نوترکیب آن‌ها به‌منظور تعیین توالی با کیت استخراج پلاسمید (شرکت ویوانتیس، مالزی) استخراج و از طریق شرکت تکاپوزیست به شرکت Bioneer، کره جنوبی ارسال شدند.

خالص‌سازی پروتئین: جهت خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب از ستون کروماتوگرافی رزین - آمیلوز و براساس دستورالعمل شرکت تولید کننده‌ی pMAL-c2X استفاده شد. به‌طور خلاصه، کلون‌های باکتریایی موردنظر در حجم موردنیاز کشت گردید و پس از رسیدن کدورت محیط‌ها به حد مناسب، IPTG اضافه شد و دو ساعت بعد سانتریفوژ گردید. به رسوب باکتریایی بافر ستون افزوده شد. این سوسپانسیون در دمای ۲۰°C- ، ۳ مرتبه منجمد و ذوب شد و به آن لیزوزیم، تریتون X-۱۰۰، DDT و PMSF اضافه شد. سوسپانسیون فوق، سونیکه (۱۰ چرخه ۸۰ واتی به فاصله ۲۰ ثانیه) و سپس سانتریفوژ گردید. مایع رویی با بافر ستون رقیق و به‌آرامی به ستون رزین - آمیلوز شسته شده با بافر ستون منتقل گردید. ستون با بافر ستون شستشو شد و آزادسازی پروتئین‌های متصل شده به رزین با بافر حاوی مالتوز انجام شد. درنهایت، اقدام به جمع‌آوری مایع خروجی گردید. جهت تأیید استخراج پروتئین‌های نوترکیب، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده مورد SDS-PAGE قرار گرفتند (۲).

ارزیابی فعالیت PLD نوترکیب: با توجه به این‌که PLD مانع از همولیز ناقص استافیلو کوکوس اُئوس می‌شود (۵)، این فعالیت در PLD نوترکیب و PLD طبیعی (مایع روی کشت شبانه کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس در

جدول ۱. توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای مورداستفاده جهت تکثیر اختصاصی ژن‌های PLD و HSP کورینه با کتریوم سودوتوبر کلوزیس.

پرایمر	فسفولیپاز D	HSP۶۰
مستقیم	'۳-TCGGAATTCATGGCAAAGCTGATTG-'۵ EcoR I	۳-GCTGGAATTCATGAGGGAGAAAGTTGTTTT-'۵ EcoR I
معکوس	'۳-GCCTGTCGACTTAGTGGTGGTGATGGTG-'۵ Sal I	'۳-GCCTGTCGACTCACCACGGGTTATCCGMTA-'۵ Sal I

محیط BHI براث) و توکسوئید PLD نوترکیب (PLD نوترکیب مجاورشده با فرمالین و سپس دیالیز شده) مطابق روش Songer و همکاران در سال ۱۹۹۰ به‌طور خلاصه به شرح زیر انجام شد:

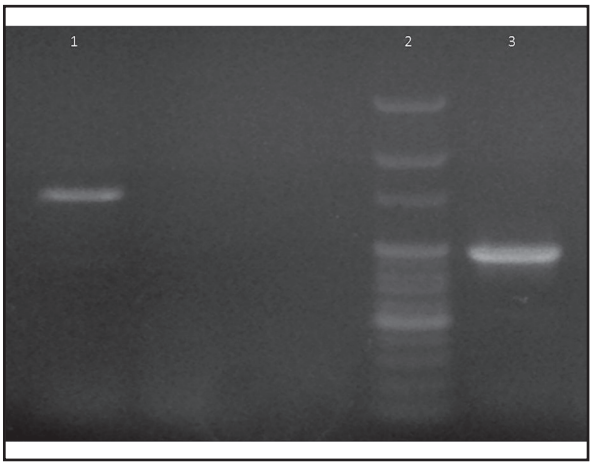
در محیط آگار خون گوسفند گوده‌هایی به قطر ۴mm ایجاد شد و در هر گوده، ۲۰µl، PLD نوترکیب یا طبیعی و توکسوئید PLD نوترکیب ریخته شده و پلیت یک‌شب در دمای ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شد. روز بعد ۲ml از مایع روی کشت شبانه \استافیلو کوکوس \آئوس روی سطح پلیت ریخته شد و پس از ۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷°C و یک ساعت در ۴°C پلیت ازنظر بروز یا عدم بروز همولیز در اطراف گوده‌ها بررسی شد (۱۹).

نتایج

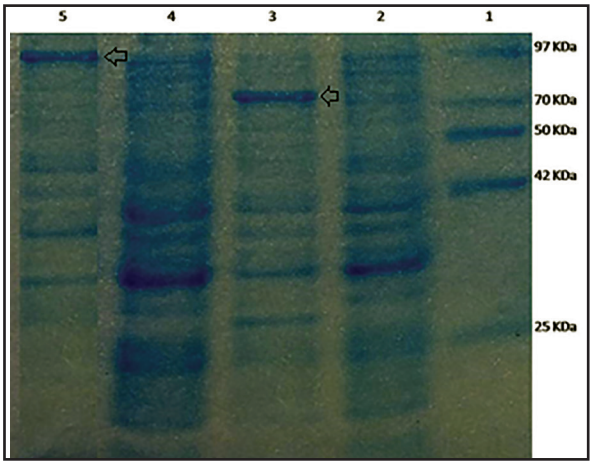
الکتروفورز محصولات انجام شده بر روی DNA باکتری استخراج‌شده نشان داد که PCR با موفقیت منجر به ساخت قطعات DNA مورد انتظار با طول ۹۲۴ bp و ۱۶۰۹ bp شده است (تصویر ۱). ظهور کلونی‌های قابل تکثیر بر روی محیط جامد LB آمپی‌سیلین‌دار پس از هضم و اتصال محصولات PCR به پلاسمید pMAL-c2X و سپس ترانسفورماسیون محصولات اتصال در \شرشیاکلی، نشان‌دهنده ورود موفق پلاسمیدهای حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در باکتری‌ها بود. SDS PAGE- انجام شده بر روی کلون‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب مورد القاء بیان پروتئین قرار گرفته دال بر بیان مناسب پروتئین‌های فوق در سویه‌های فوق بود. همان‌گونه که در تصویر ۲ مشخص‌شده است، باکتری DH۵ حاوی پلاسمید pMAL-c2X-HSP پس از افزودن IPTG در مقایسه بازمان پیش از افزودن IPTG، حاوی پروتئینی جدید در محدوده ۱۰۰kDa بود که با وزن مولکولی قابل‌انتظار برای پروتئین بیانی (با احتساب وزن ۵۹ kDa تا ۶۰kDa برای HSP_{60} و ۴۲ kDa برای پروتئین MBP کد شده توسط پلاسمید) هم‌خوانی داشت. باکتری حاوی پلاسمید pMAL-c2X-PLD نیز در حضور IPTG پروتئینی با وزن حدود ۷۶ kDa را تولید نمود که با وزن ملکولی قابل‌انتظار برای PLD نوترکیب (با احتساب وزن ۳۴ kDa برای PLD و ۴۲ kDa برای پروتئین MBP کد شده توسط پلاسمید) هم‌خوانی داشت. تعیین توالی و آنالیز بلاست نشان داد که توالی قطعه‌های تکثیرشده با ژن‌های PLD و HSP_{60} تطابق دارند.

انجام SDS-PAGE بر روی محلول‌های جمع‌آوری شده، از ستون آمیلوز حاکی از تخلیص پروتئین‌های PLD و HSP_{60} با ستون کروماتوگرافی بود. حضور باندهای پروتئینی قوی‌تر در برخی فراکشن‌های اولیه دیده شد (تصویرهای۳،۴).

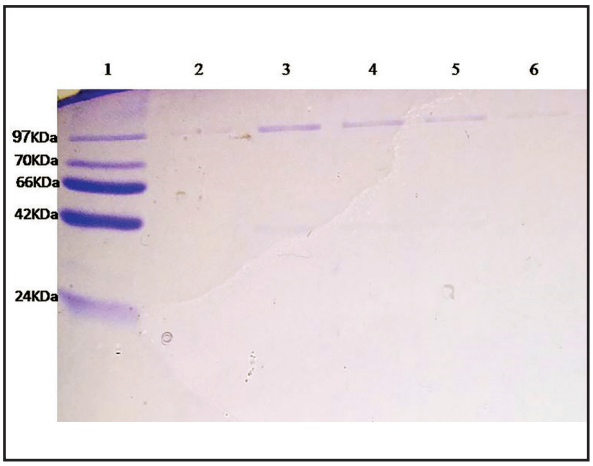
PLD نوترکیب و طبیعی برخلاف توکسوئید PLD نوترکیب توانستند از ایجاد همولیز ناقص \استافیلو کوکوس \آئوس ممانعت نمایند (تصویر ۵) که نشان‌دهنده فعالیت طبیعی PLD نوترکیب تهیه‌شده بود.



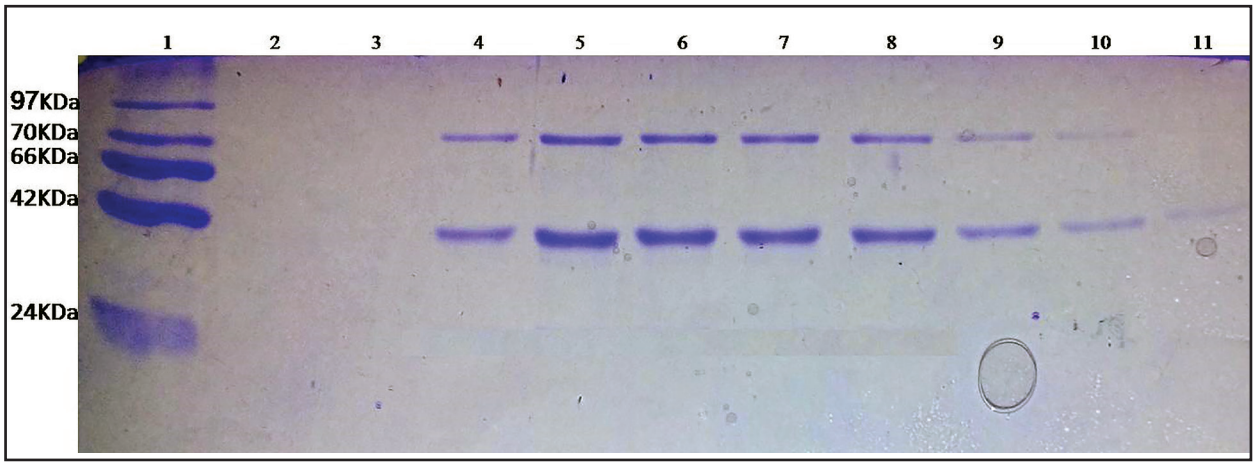
تصویر ۱. الکتروفورز محصول‌های PCR ژن‌های PLD و HSP۶۰ کورینه‌با کتریوم سودوتوبر کلوزیس (ستون ۱: محصول PCR ژن HSP۶۰ (با طول ۱۶۰۹bp)، ستون ۲ مارکر ۱۰۰bp و ستون ۳ حاوی محصول PCR ژن PLD با طول حدود ۹۲۳ bp).



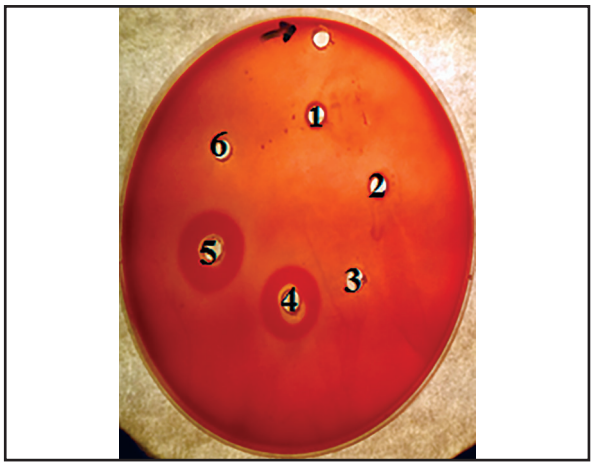
تصویر ۲. SDS- PAGE مایع رویی حاصل از لیز کلون‌های \شرشیا کلی DH۵ ترانسفورمه شده با ژن‌هایPLD و HSP۶۰ کورینه‌با کتریوم سودوتوبر کلوزیس (ستون ۱: مارکر وزن مولکولی، ستون‌های ۲ و ۴: به ترتیب کلون‌های واجد PLD و HSP۶۰ قبل از افزودن IPTG، ستون‌های ۳ و ۵: به ترتیب کلون‌های واجد PLD و HSP۶۰ بعد از افزودن IPTG؛ پیکان‌ها باندهای القاء شده را نشان می‌دهند).



تصویر ۳. SDS- PAGE پروتئین نوترکیب HSP۶۰ پس از خالص سازی با رزین آمیلوز (ستون ۱: شاخص وزن مولکولی، ستون‌های ۲ تا ۶ فراکشن‌های جمع‌آوری شده از ستون).



تصویر ۴. الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از کلون‌های \شرشیا کلی DH۵ حاوی ژن PLD در ژل پلی‌اکریل‌آمید پس از خالص سازی با رزین آمیلوز (ستون ۱: مارکر، ستون‌های ۲ تا ۱۱ فراکشن‌های اولیه جمع‌آوری شده از ستون).



تصویر ۵. جلوگیری از همولیز \استافیلو کوکوس آئوس توسط فسفولیپاز D: اطراف گودهای شماره ۴ و ۵ که حاوی فسفولیپاز D هستند. را ناحیه‌ای از گلبول‌های لیز نشده احاطه کرده است.

بحث

باوجود واکسن‌های تجاری Biodectin و Glan vac استرالیایی، Caseous D-T و Case Bac تولیدی ایالات‌متحده و Linfo vac برزیلی لنفادنیت پنیری همچنان شایع است و نیاز به معرفی واکسن‌های جدیدی است که در گوسفند و بز با محافظت بالایی همراه باشد (۳). در مطالعه حاضر که قدمی درراه رسیدن به واکسن مناسب برای مبارزه با عفونت‌های ناشی از کورینه‌باکتریوم سودوتوبر کلوزیس به‌خصوص لنفادنیت پنیری است، ژن‌های PLD و HSP_{60} درون وکتور بیانی پروکاریوتی pMal-c۲X کلون شد و پلاسمید نوترکیب به درون سویه DH۵ \شرشیا کلی، منتقل گردید که القاء بیان با IPTG دال بر بیان خوب پروتئین‌های فوق در این کلون‌ها بود.

تاکنون در چندین مطالعه دیگر نیز اقدام به کلونینگ ژن‌های فوق شده است که در هیچ یک از پلاسمید به‌کاررفته در مطالعه حاضر استفاده نشده است. Hodgson و همکاران در سال ۱۹۹۰ برای کلون نمودن PLD از پلاسمید pUC۱۲ و pUC۱۱۸ و جهت بیان آن از سویه DH۵ \شرشیا کلی استفاده نموده‌اند (۱۴) Songer و همکاران نیز در سال ۱۹۹۰ اقدام به کلون ژن مذکور در پلاسمید pUC۱۹ نموده و پلاسمید فوق را در کلی باسیل سویه DH۵ بیان نموده‌اند (۱۹). Pinho و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Costa و همکاران در سال ۲۰۱۱ برای کلون نمودن HSP_{60} از پلاسمید pProEx-Hta و جهت بیان آن از سویه Top۱۰ \شرشیا کلی استفاده نموده‌اند (۸، ۹). پلاسمید pMal-c۲X استفاده‌شده در این تحقیق دارای پروموتور قویی است که موجب بیان بیشتر پروتئین در مقایسه با بسیاری از پلاسمیدهای بیانی پروکاریوتی می‌گردد (۱). همچنین یکی از معایب بیان پروتئین‌های هترولوگ در *E. coli* تولید اشکال نامحلول پروتئین بیانی به شکل گنجیدگی است که نسبتاً به فراوانی روی می‌دهد اما استفاده از پلاسمید pMALc۲x تا حد بسیار زیاد موجب رفع این مشکل می‌شود زیرا MBP کد شده توسط این پلاسمید به‌عنوان یکی از مؤثرترین عوامل محلول کننده پروتئین‌های باقابلیت تشکیل گنجیدگی محسوب می‌شود (۱۲، ۱۱). در این رابطه می‌توان به نامحلول بودن پروتئین HSP بیان‌شده توسط پلاسمید pTOPO استفاده شده توسط Pinho و همکاران در سال ۲۰۰۹ اشاره نمود (۹) درصورتی‌که در مطالعه حاضر با استفاده از پلاسمید فوق HSP به شکل محلول تولید گردید (اطلاعات نشان داده نشده است). مزیت دیگر استفاده از پلاسمید pMALc۲x این است که MBP ضمن کمک به بیان پروتئین‌های هترولوگ به شکل محلول، امکان خالص‌سازی پروتئین بیانی را نیز با استفاده از رزین آمیلوز به نحو مطلوب میسر می‌سازد. درزمینه کلون ژن‌های PLD و HSP_{60} چه در سیستم‌های پروکاریوتی و چه در سیستم‌های یوکاریوتی تاکنون هیچ مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است و به نظر می‌رسد، مطالعه حاضر اولین تحقیق درزمینه‌ی بومی‌سازی تولید پروتئین‌های نوترکیب فوق باشد. درمجموع مطالعه‌ی حاضر توانست به‌خوبی فسفولیپاز D و HSP_{60} را در پلاسمید پروکاریوتی pMal-c۲X کلون نموده و در سطح بالایی در \شرشیا کلی بیان کند. با توجه به بیان مناسب این پروتئین‌های نوترکیب می‌توان آن را با ستون زین-آمیلوز استخراج و خالص‌سازی نمود و جهت انجام مطالعات آتی

پیرامون تولید واکسن بکار برد.

تشکر و قدردانی

نویســندگان وظیفه می‌دانند از دانشگاه شــهید چمران اهواز به سبب تأمین هزینه این پایان نامه تشکر نمایند.

References

1. Amann, E. (1985) Plasmid vectors for the regulated, high level expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli*. Dev Biol Stand. 59: 11-22.
2. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1992) Short Protocols in Molecular Biology. (2nd ed.) Greene Publishing Associates and John Wiley and Sons, New York, USA.
3. Bastos, B.L., Dias Portela, R.W., Dorella, F.A., Ribeiro, D., Seyffert, N. (2012) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological responses in animal models and zoonotic potential. J Clin Cell Immunol. S4: 005.
4. Braga, W.U. (2007) Protection in alpacas against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using different bacterial components. Vet Microbiol. 119: 297-303.
5. Brown C.C., Olander, H.J., Alves, S.F. (1987) Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. Can J Vet Res. 51: 46-49.
6. Brown, C.C., Olander, H.J., Biberstein, E.L., Morse, S.M. (1986) Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am J Vet Res. 47: 1116 -1119.
7. Chaplin, P.J., De Rose, R., Boyle, J.S., Mc Waters, P., Kelly, J. (1999) Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. Infect Immun. 67: 6434-6438.
8. Costa, M.P., McCulloch, J.A., Almeida, S.S., Dorella, F.A., Fonseca, C.T., Oliveira, D.M., Teixeira, M.F., Laskowska, E., Lipinska, B., Meyer, R., Portela, R.W. (2011) Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* HSP60-HSP10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by HSP60 DNA vaccination in mice. BMC Research Notes: 4: 243.
9. Dorella, J.M.R.P.F., Fonseca, C.T., Portela, R.W., de Carvalho Azevedo, V.A. (2009) Immunization with recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* Heat-shock protein (HSP)-60 is able to induce an immune response in mice, but fails to confer protection against infection. Open Vet Sci J. 3: 22-27.
10. Eggleton, D.G., Middleton, H.D., Doidge, C.V., Minty, D.W. (1991) Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. Aust Vet J. 68: 317-319.
11. Fox, J.D., Routzahn, K.M., Bucher, M.H., Waugh, D.S. (2003) Maltodextrinbinding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. FEBS Lett. 537: 53-55.
12. Fox, J.D., Waugh, D.S. (2003) Maltose-binding protein as a solubility enhancer. Methods Mol Biol. 205: 99-117.
13. Ghadrdan-Mashhadi, A., Ghorbanpoor, M., Soleimani, M. (2006) Bacteriological study of liver abscesses in sheep in Ahvaz (Iran). Pak J Biol Sci. 9: 2161-2164.
14. Hodgson, A.L., Bird, P., Nisbet, I.T. (1990) Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. J Bacteriol. 172: 1256-1261.
15. Markey, B.K., Leonard, F.C., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire, D. (2013) Clinical Veterinary Microbiology. (2nd ed.) Mosby, China.
16. Moura-Costa, L.D., Bahia, R.C., Carminati, R., Vale, V.L.C., Paule, B.J.A., Portela, R.W., de Carvalho Azevedo, V.A. (2008) Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. Vet immunol immunopathol. 126: 131-141.
17. Paton, M.W., Sutherland, S.S., Rose, I.R., Hart,

R.A., Mercy, A.R. (1995) The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. Aust Vet J. 72: 266-269.

18. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchclif, K.W., (2000) Veterinary Medicine. (9th ed.) W.B. Saunders Company, London, UK.
19. Songer, J.G., Libby, S.J., Iandolo, J.J., Cuevas, W.A. (1990) Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. Infect Immun. 58: 131-133.
20. Tehrani, A.A., Javanbakht, J., Agha Mohammad Hassan, M., Zamani, M., Rajabian, M., Akbari, H., Shafei, R. (2012) Histopathological and bacteriological study on hepatic abscesses of Herrik sheep. J Med Microb Diagn. 1: 4.
21. Williamson, L.H. (2001) Caseous lymphadenitis in small ruminants. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 17: 359 -371.

Production of the phospholipase D and heat-shock protein (HSP)-60 recombinant proteins from *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Boroon, F., Seyfi Abad Shapouri, M.R., Ghorbanpoor, M.*, Gharibi, D., Esmaeilzadeh, S.

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

(Received 30 November 2016, Accepted 20 January 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Caseous lymphadenitis, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is one of the most important diseases of sheep and goats, causing considerable losses for herd owners. Phospholipase D (PLD) is a potent exotoxin produced by *C. pseudotuberculosis* and it has been considered as the major virulence factor for this bacterium, possibly contributing to the spread of the bacteria from the initial site of infection to secondary sites within the host. Heat shock proteins (HSPs) are important candidates for the development of vaccines because they are usually able to promote both humoral and cellular immune responses in mammals. **OBJECTIVES:** The aim of this study was the cloning and expression of the PLD and HSP_{60} genes of *C. pseudotuberculosis*, used subsequently to evaluate the protectivity of these recombinant proteins for vaccine development against this bacterium. **METHODS:** PLD and HSP_{60} genes were cloned into pMAL-c2X vector and recombinant plasmids construct was transformed to DH_5 strain of *E. coli*. Expression of the proteins was shown by SDS-PAGE and accuracy of the cloned genes was confirmed by nucleotide sequence analysis. **RESULTS:** The transformed *E. coli* strain DH_5 expressed PLD and HSP_{60} proteins effectively. The expressed fusion protein was found almost entirely in the soluble form. **CONCLUSIONS:** In the following studies the immunogenicity and protectivity of these recombinant proteins against *C. pseudotuberculosis* infections can be assessed.

Keyword: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, phospholipase D, pheat-shock protein, cloning

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used for the specific amplification of PLD and HSP_{60} genes of *C.pseudotuberculosis*.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products obtained from PLD and HSP_{60} genes of *C. pseudotuberculosis* (Lane 1: 923bp PCR product of PLD gene; Lane 2: 100 bp and Lane 3: 1609bp PCR product of HSP_{60} gene).

Figure 2. SDS- PAGE profile of DH5 strain of *E. coli* lysate transformed with the PLD or HSP_{60} genes of *C. pseudotuberculosis* (lane 1: Molecular weight marker; Lanes 2 and 4: Supernatant of the PLD and HSP60 cloned before IPTG induction; Lanes 3 and 5: Supernatant of the IPTG induced cloned; Arrows indicates induced bands).

Figure 3. SDS- PAGE profile of recombinant HSP_{60} protein after purification with amylose resin (lane 1: Molecular weight marker; Lanes 2 through 6 different collected fractions).

Figure 4. SDS- PAGE profile of recombinant PLD protein after purification with amylose resin (lane 1: Molecular weight marker; Lanes 2 through 6 different collected fractions).

Figure 5. *Staphylococcus aureus* hemolysis-inhibiting activity of phospholipase D: Wells number 4 and 5 which contain recombinant PLD were surrounded by a zone of unlysed erythrocytes.

***Corresponding author's email: m.ghorbanpoor@scu.ac.ir, Tel: 061-33330073, Fax: 061-33360807**