مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۲، ۲۵۷-۲۵۱
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.207837.2479

ساخت پروتئین نوترکیب FanC \شریشیا کلی انتروتوکسیژنیک مرتبط با اسهال گوساله

سعید طباطبایی[۱] غلامرضا نیکبخت بروجنی[۱*] مجید تیبانیان[۲] خلیل زینل[۱] امیر حسین جلالی[۳]

۱) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) گروه ایمونولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۳) پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

(دریافت مقاله: ۱۳ آبان ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۹ دی ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: اسهال یکی از بیماری‌های شایع و مهمترین عامل مرگ و میر و تاخیر رشد در گوساله‌های زیر یک ماه است. در بین سویه‌های \شریشیا کلی انتروتوکسیژنیک که مسبب اسهال در گوساله‌های یک تا هفت روزه هستند، سویه‌های واجد فیمبریه F۵ اهمیت زیادی دارند. بخش FanC فیمبریهF۵ نقش اساسی در اتصال باکتری به یاخته‌های روده و آغاز بیماری داشته و پادتن‌های تولید شده بر علیه آن اثر حفاظتی دارند. **هدف:** ساخت و ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب FanC \شریشیا کلی انتروتوکسیژنیک مرتبط با اسهال گوساله. **روش کار:** در این مطالعه پلاسمید پروکاریوتی ۲۸a-pET حاوی قسمت fanC فیمبریه F۵ طراحی و ساخته شد و تولید پروتئین حاصل از پلاسمید طراحی شده در باکتری (DE۳) BL۲۱ اثبات رسید. **نتایج:** حاصل این تحقیق ساخت پلاسمید پروکاریوتی ۲۸a-pET حامل ژن FanC و تهیه پروتئین خالص آن پس از بیان ژن در باکتری (DE۳) BL۲۱ بود که با روش‌های تعیین توالی و وسترن بلاتینگ به اثبات رسید. **نتیجه‌گیری نهایی:** پروتئین FanC و سویه باکتری نوترکیب تولید شده را می‌توان در آزمون‌های تشخیصی و همچنین طراحی و تولید واکسن کلی باسیلوز گوساله به کار برد.

واژه‌های کلیدی: کلونینگ، پروتئین نوترکیب FanC، \شریشیا کلی انتروتوکسیژنیک گاو

مقدمه

اسهال گوساله‌ها بدلیل هزینه‌ها و دشواری‌های درمان و همچنین افت تولید پس از بهبودی، همواره مورد توجه دامداران و دامپزشکان بالینی بوده‌است. یکی از عوامل مهم اسهال در گوساله‌های تازه متولد شده (بین ۳ تا ۵ روز)، سویه‌های حاد باکتری \شریشیا کلی انتروتوکسژنیک هستند. گوساله‌های آلوده و مبتلا به اشکال حاد و فوق حاد بیماری ممکن است تلف شوند. گزارش مرکز پایش ملی سلامت حیوانات آمریکا در سال ۲۰۰۷ برای گاوهای شیری نشان می‌دهد که ۵۷ ٪ مرگ و میر گوساله‌های شیرخوار به علت اسهال بوده است. اخیراً میزان مرگ و میر مشابهی (۵۳/۴٪) برای گوساله‌های شیری در اثر اسهال در کره جنوبی گزارش شده است. میزان ضرر اقتصادی ایجاد شده در اثر مرگ گوساله در نروژ، که سالانه ۲۸۰ هزار راس گوساله تولید می‌کند، در حدود ده میلیون دلار آمریکا در سال ۲۰۰۶ برآورد شده است (۲،۲۰). بر پایه یک تحقیق بیش از ۲۵ درصد دلایل مراجعه دامپزشکان به دامداری‌ها اسهال گوساله است (۳).

در بین سویه‌های \شریشیا کلی، جدایه‌های متعلق به پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک نقش مهمتری در ایجاد اسهال کلی باسیلوزی دارند. این سویه‌ها پس از ورود به دستگاه گوارش از طریق فیمبریه‌های سطحی به پذیرنده‌های اختصاصی گانگلیوزیدی موجود بر روی انتروسیت‌های روده باریک متصل می‌شوند و سپس شروع به ترشح توکسین حساس به حرارت یا مقاوم به حرارت می‌کنند. این توکسین‌ها عامل بروز اسهال از طریق افزایش ترشح آب و املاح به روده وهمچنین کاهش جذب مایعات هستند (۲۰).

در حال حاضر به منظور پیشگیری از خسارات ناشی از بیماری، اقدامات درمانی و یا روش‌های پیشگیرانه به کار گرفته می‌شوند. به دلیل بالا بودن هزینه‌های درمان دارویی، اثر نامطلوب بیماری بر رشد گوساله، احتمال بروز سویه‌های مقاوم در اثر استفاده از آنتی بیوتیک و همچنین موارد عدم موفقیت درمان، راهبردهای مبتنی بر درمان در گله‌ها مطلوب نیست و در مقابل روش‌های پیشگیرانه به دلیل نداشتن معایب ذکر شده مورد توجه هستند. ایمنی در کنار رعایت اصول بهداشتی به عنوان یکی از مداخلات موثر در جهت پیشگیری از اسهال کلی باسیلوزی در نظر گرفته می‌شود(۲۰). فیمبریه‌ها به علت نقش مهمی که در مراحل اولیه بیماریزایی (مرحله اتصال به مخاط روده) ایفا می‌کنند هدف مناسبی برای تهیه واکسن هستند. بیشتر باکتری‌های انتروتوکسیژنیک مرتبط با اسهال گوساله، انواع محدودی از فیمبریه‌های اتصالی را بیان می‌کنند که مهمترین آن‌ها فیمبریه F۵ است (۲۰).

یک اپرون kb ۷/۱ مشتمل بر هشت ژن fanA-fanH مسئول شکل گرفتن ساختار فیمبریه F۵ است. این مجموعه برروی یک پلاسمید غیر کونجوگاتیو kb ۸۷/۸ قرارگرفته است و معمولا در باکتری‌های گروه‌های سرمی O۸، O۲۰ و O۱۰۱ دیده می‌شود. فیمبریه F۵ در کل شامل یک تحت واحد عمده تکرار شونده به وزن kD ۱۸/۲ بوده که بوسیله ژنfanC کد میشود. سایر بخش‌های فیمبریه (پروتئین‌های تنظیم، انتقال و بازآرایی) توسط ژنهای دیگر اپرون کد می‌شوند. پروتئین FanC خود یک تحت

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۵۷ نمابر: ۰۲۱-۶۶۴۲۷۵۱۷ Email: nikbakht@ut.ac.ir

واحد ۱۵۹ اسـید آمینه‌ای اسـت و لیگاند اتصال به پذیرنده گانگلیوزیدی محسوب ی شود (۵،۶). مطالعات بر روی موتان‌های پروتئین F5 که بر روی سطح باکتری بیان شده‌اند نشان می‌دهد که وجود پنج آمینواسید در ناحیه کربوکسی ترمینال محصول FanC برای اتصال فیمبریه به انتروسیت‌ها الزامی است (۱۵،۲۵).

در ایـران مطالعاتی صورت گرفته که نشـان می‌دهنـد باکتری‌های انتروتوکسیژنیک حاوی ژن k۹۹ در ایجاد اسهال گوساله‌ها نقش دارند ولی شـیوع آن‌ها در مناطق مختلف کشور متفاوت (از ۱/۰۷٪ تا ۲۱/۸۷٪) است (۱۰،۱۱،۱۴،۱۹،۲۷). با این وجود در ایران جمعیت قلیلی از گوساله‌ها (تنها حدود ۱۰ ٪) مقادیر قابل توجهی از پادتن بر علیه فیمبریه F5 دارند (۱۸،۲۲) که نیاز مبرم به ایمن سازی را نشان می‌دهد. البته بیشتر اطلاعات موجود با استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی PCR بر روی جدایه‌های باکتری و یا کیت‌های تشـخیصی تجاری به دسـت آمده است. باید توجه نمود که برای تعیین سروتیپ باکتری نیاز به آنتی‌سرم اختصاصی و برای تشخیص پادتن سـرمی نیز به پروتئین خالص نیاز است که هر دو با در دست داشتن پادگن خالص امکان پذیر خواهد بود. از سـوی دیگر شکل غالب فیمبریه در ترکیب واکسـن‌های تجاری از نوع تحت واحدی (Subunit) است، و البته نه تحت واحد نوترکیـب (Recombinant subunit)، که اغلب با روش‌های خالص سـازی مکانیکی فیمبریه تهیه شده اند. این محصولات حاوی انواع فیمبریه‌ها بوده و خالص نیستند. با توجه به هزینه‌های بالای کیت‌هـای وارداتی و نیاز مبـرم به تولید مطلوب و خالص پادگن F5 جهت مصارف تشخیصی و تحقیقات واکسن برآن شدیم تا بخش مهم فیمبریه F5 (FanC) را در دسـتگاه اوکاریوتی به شیوه نوترکیب طراحی و ساخته و پروتیئن بیان شده را خالص و مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش کار

افزوده‌سازی ژن fanC پرایمرها شرایط واکنش چرخه‌ها: افزوده‌سازی ژن fanC با استفاده از روش PCR پیشنهاد شده توسط فرانک و همکاران در سـال ۱۹۹۸ انجام گردید(۷). واکنش در حجم ۲۵ µl شامل ۰/۵ µM از هریک از پرایمرها(Forward: TATTATCTTAGGTGGTATGG; Reverse: GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC)، ۰/۲ mM dNTP، ۲/۵ µl بافر و ۲ واحد از آنزیم Taq پلیمراز بود. واکنش چرخه‌ها در دستگاه PCR و به شرح ذکرشده انجام گرفت: واسرشت اولیـه ۹۴ °C بـه مدت ۵ دقیقه و ۲۵ سـیکل شـامل واسرشت در دمـای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصـال پرایمر دردمای ۵۰ °C بـه مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ °C به مدت یک دقیقه و سی ثانیه (به همراه افزایش بعدی ۳ ثانیه‌ای به ازای هر سیکل) و در انتهای سـیکل، واکنـش در دمای ۷۲ °C به ۱۰ مدت دقیقه پایان یافت. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصدی الکترفورز گردیدند و بعـد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید عکس برداری تحت اشعه UV انجام گرفت.

تعییـن توالی ژن fanC در سـویه‌های جدا شـده در ایـران با روش خاتمه دهنده رنگی: تعیین توالی در دو جهت بر روی ۷ سـویه جدا شـده انجام شـد. تعیین توالی توسط مؤسسه ماکروژن (سـئول، کره) با دستگاه توالی‌یاب خودکار ABI) DNA ۳۷۳۰ XL) انجام شد. شناسایی توالی‌ها با استفاده از BLASTn و از طریق وب سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) صورت گرفت. توالی‌های به دسـت آمده توسـط برنامه Clustal W باتوالی مرجع P۱۸۱۰۳ثبت‌شـده در پایگاه Uniprot مورد مقایسه قرار گرفتند.

طراحی،کشت و استخراج پلاسمید بیانی pET۲۸a: به این منظور از روش سنتز ژن استفاده شد. ژن FanC ساخته شده در پلاسمید pET۲۸a وارد گردید و پلاسـمید recFanC سـاخته شده برای تأیید، تعیین توالی شـد. کشت باکتری DH۵α حاوی پلاسمید بیانی pET۲۸a- recFanC در محیـط LB آگار انجام شـد و کلنی تک از آن جدا گردید. سـپس یک کلنـی تـک در ۵ cc محیط LB براس یک شـبانه روز در دمای ۳۷ °C و درون انکوباتور شیکردار انکوبه شد و با استفاده از کیت (QIAprep spin miniprep kit) Qiagen استخراج گردید.

ترانسفورماسـیون باکتری BL۲۱ با اسـتفاده از پلاسمید pET۲۸a: بدین منظور از روش ترانسفورماسـیون شـیمیایی کلرید کلسیم و انجماد اسـتفاده شـد. محلول حاوی پلاسـمید pET۲۸a با باکتری‌های پذیرا به نسبت ۱ به ۱۰ ترکیب شـده و مراحل بعدی طبق روش ترانسفورماسیون صورت گرفت و سپس محتوی باکتری‌های ترانسفورمه recFanC–BL۲۱ روی محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک کانامایسـین کشـت شدند. به علت وجود ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسـین در پلاسمید pET۲۸a، در صورت وجود این پلاسمید در داخل باکتری، باکتری‌ها قادرند روی محیط حاوی کانامایسین به میزان ۵۰ µg/ml رشد کنند.

انجـام PCR بـرای تأییـد ترانسفورماسـیون: پـس از انجـام ترانسفورماسـیون به طور تصادفی از کلونی‌های تک موجود در محیط LB حاوی کانامایسین در محیط جدید دیگری حاوی کانامایسین گسترش تهیه گردید و آزمون PCR با اسـتفاده از پروتوکل ذکر شـده در قسمت قبل با پرایمـر فوروارد T۷ و پرایمر ریورز ژن F5 انجام گرفت. پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصـد، کلنی‌هایـی کـه قطعه مورد نظـر را دارا بودند انتخاب شدند. کلونی‌های تأیید شده در محیط LB broth کشت داده شدند و پس از تقسیم بندی و اضافه کردن گلیسرول (۳۰٪ حجم نهایی) در دمای منهای ۷۰ °C نگهداری شدند.

القـای بیـان کلون‌هـای انتخابـی بـا IPTG: به این منظـور باکتری recFanC–BL۲۱ در محیط LB broth حاوی کانامایسین به مدت یک شـب در دمای ۳۷ کشـت داده شـد. پس از ۱۸ سـاعت IPTG با غلظت ۱ mM اضافه گردید و به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید.

مقداری از کشت بدون اضافه کردن IPTG به عنوان کنترل القا استفاده شد. از نمونه‌های بدست آمده با استفاده از سانتریفیوژ (rpm۴۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه) رسوب تهیه گردید و رسوب و مایع رویی بدست آمده در منفی °C ۲۰ تا زمان انجان SDS-PAGE نگهداری شد.

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید: الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) بر اساس روش لاملی (۲۵) در ژل جداکننده ۱۶ ٪ و ژل متراکم کننده ۵ ٪ تحت شرایط احیایی انجام شد. یک حجم نمونه سوسپانسیون باکتری به یک حجم بافر نمونه افزوده شد و ده دقیقه درآب جوش قرار گرفت. µl ۱۰ تا ۱۲ از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه و ابتدا در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت و سپس ۱۳۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی آبی R-۳۵۰ (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد. وزن ملکولی پروتئین فیمبریه F۵ توسط مارکر پروتئین‌ی استاندارد با وزن مولکولی مشخص تعیین گردید.

خالص سازی پروتئین با استفاده از Ni-NTA Agarose در شرایط دناتورینگ: به علت نامحلول بودن پروتئین نوترکیب به دست آمده، تخلیص پروتئین به روش کروماتوگرافی جذبی بر روی نیکل (Ni-NTA) در شرایط دناتورینگ صورت پذیرفت. ابتدا رسوبات حاصل از کشت باکتری recFanC-BL۲۱ با استفاده از بافر B لیز گردید. برای تکمیل فرآیند لیز کردن از دوبار فریز و یخ زدایی و همچنین سونیکاسیون (ده بار، هر بار به مدت یک دقیقه) نیز استفاده شد. سپس سوسپانسیون به دست آمده سانتریفیوژ (g۱۰۰۰۰، ۳۰ دقیقه) گردید. در ادامه مایع رویی با مقدار مناسب Ni-NTA Agarose از مخلوط گردید و به مدت یک ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. سپس مخلوط ذکر شده در یک سرنگ پلاستیکی حاوی فیلتر ریخته شد و با باز کردن درب سرنگ مایع موجود تخلیه و در مرحله بعدی آگارز باقی مانده با استفاده از بافر C دو بار شستشو گردید. در مرحله بعدی برای جدا کردن پروتئین نوترکیب ابتدا از بافر D و سپس بافر E که دارای pH متفاوت می‌باشند استفاده شد. کلیه مراحل تخلیص بر طبق پروتکل The QIAexpressionist شرکت Qiagen آلمان انجام گرفت و پس از هر مرحله مقداری از نمونه برای الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمیدبه روش ذکر شده در نظر گرفته شد.

وسترن بلاتینگ: برای تأیید فیمبریه نوترکیب از آزمون وسترن بلاتینگ استفاده شد. ابتدا فیمبریه خالص شده به همراه سوسپانسیون باکتری recFanC-BL۲۱ القا شده و نشده در ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند. پس از انجام الکتروفورز، انتقال پروتئین‌ها به غشای PVDF با استفاده از دستگاه براساس دستورالعمل پیشنهادی دستگاه صورت گرفت. غشای PVDF پس از خروج از دستگاه به مدت یک ساعت در بافر بلاکینگ حاوی PBS و Tween (۰/۵٪) قرار داده شد و سپس از محلول بلاکینگ خارج و به مدت نیم ساعت در بافر بلاکینگ حاوی Skim milk (۵٪) قرار گرفت. از پادتن مونوکلنال ضد فیمبریه F۵ ساخت شرکت Abcam با غلظت ۱ به ۲۰۰۰ به عنوان پادتن اولیه استفاده گردید. غشای PVDF به مدت یک شب در محلول حاوی پادتن قرار گرفته و روز بعد پس از سه بار شستشوی غشا به مدت یک ساعت در بافر بلوکینگ به همراه کونژوگه پراکسیداز پادتن ضد موش (Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnologies) در رقت ۱/۵۰۰۰ به عنوان پادتن ثانویه نگهداری شد. پس از ۳ بار شستشو، برای رویت باندها از محلول TMB استفاده گردید.

نتایج

تعیین و تحلیل توالی‌های بدست آمده از سویه‌های ایران با سویه‌های استاندارد: تنها تفاوت در توالی اسید آمینه‌های مربوط به سویه‌های ایران با توالی گزارش شده P۱۸۱۰۳ و در موقعیت شماره ۴۱ بدلیل تغییر اسید آمینه اسپاراتیک به گلوتامیک مشاهده شد. از آنجایی که اسیدهای آمینه مذکور از نظر خواص فیزیکوشیمیایی به هم بسیار شبیه‌اند و همچنین موقعیت اسید آمینه شماره ۴۱ نقشی در عملکرد اتصالی پروتئین FanC ندارد، این جایگزینی تغییری در ساختمان و عملکرد این پروتئین نخواهد داد. با در نظر گرفتن این موضوع در نهایت ترجیح داده شد از توالی نوکلئوتیدی مربوط به توالی استاندارد پروتئین FanC برای این مطالعه استفاده گردد.

تأیید ترانسفورماسیون باکتری BL۲۱ با استفاده از پلاسمید pET۲۸a: پس از انجام PCR بر روی کلونی‌های ترانسفورمه شده یک قطعه حدود ۷۰۰ بازی (شامل قطعه کلون شده به طول ۵۱۳ جفت باز و قسمت ابتدایی ناحیه مربوط به کلونینگ پلاسمید به طول۱۸۸ جفت باز) بدست آمد که نشان دهنده موفقیت آمیز بودن ترانسفورماسیون بود.

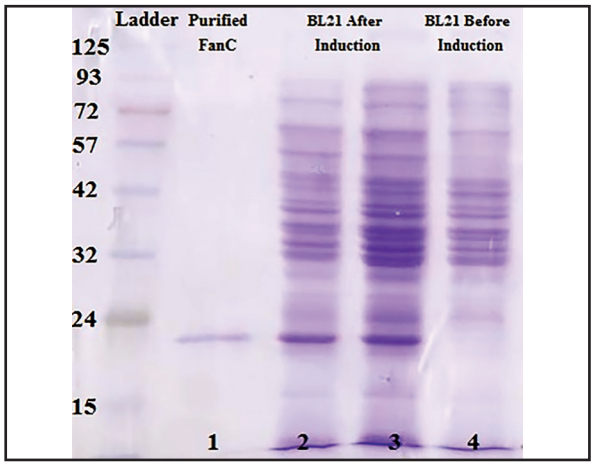
القای بیان کلون‌های انتخابی و تأیید و تخلیص پروتئین بدست آمده: پس از الکتروفرز پلت باکتری‌های القا شده و باکترهای کنترل بر روی ژل اکریلامید، یک باند پروتئینی با غلظت بالا به وزن حدود kD ۲۱ در باکتری‌های القا شده وجود داشت که در باکترهای القا نشده موجود نبود (تصویر ۱). همچنین وزن مولکولی قطعه بدست آمده با وزن پیش بینی شده منطبق بود.

آزمون وسترن بلاتینگ نشان داد که پادتن مونوکلنال علیه FanC به صورت اختصاصی به این قطعه پروتئینی متصل می‌شود و بنابراین پروتئین تولید شده همان قطعه مورد نظر FanC است (تصویر ۲).

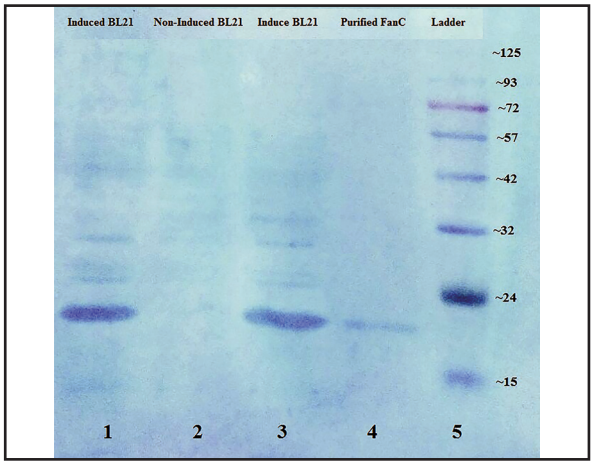
در مرحله بعدی با استفاده از Ni-NTA Agarose در شرایط دناتورینگ، پروتئین FanC با خلوص بالا به دست آمد (تصویر ۲). پس از اندازه گیری با روش اسپکتروفتومتری غلظت پروتئین به دست آمده در حدود mg/L ۳/۵ کشت باکتریایی است.

بحث

با وجود پیشرفت صنعت گاو شیری در زمینه هایی مثل مدیریت گله،



تصویر ۱. الکترفورز پروتئین نو ترکیب FanC تخلیص شده به وزن تقریبی ۲۱ kD (لاین شماره ۱)، باکتری recFanC-BL۲۱ بعد از القا با IPTG (لاین شماره ۲و۳) و قبل از القا(لاین شماره ۴).



تصویر ۲. نتایج وسترن بلاتینگ پروتئین تخلیص شده FanC: باکتری recFanC-BL۲۱ بعد از القا با IPTG (لاین‌های شماره ۱و۳) و قبل از القا(لاین شماره ۲). پروتئین نو ترکیب تخلیص شده FanC (لاین شماره ۴). مارکر پروتئینی (لاین شماره ۵).

تاسیسات و امکانات نگهداری حیوانات، تغذیه و استفاده هدفمند از داروها مشکل اسهال گوساله به علت ماهیت چند عاملی آن هنوز حل نشده است (۲،۲۰). تشخیص بیماری، ارزیابی پاسخ ایمنی در مادران و امکان انتقال پادتن محافظت کننده به نوزاد و همچنین واکسیناسیون بر علیه کلی باسیلوز نیازمند دراختیار داشتن پادگن اختصاصی با خلوص بالا است. در این راستا، با توجه به اهمیت پادگن F۵ (K۹۹) جهت تهیه کیت‌های تشخیصی، ارزیابی و حتی ایمن سازی، تلاش نمودیم تا بخش مهم این پادگن (FanC) را با روش نوترکیب تهیه کنیم. نتایج هم ردیفی توالی ترجمه شده ژن fanC سویه‌های ایران با توالی استاندارد فیمبریه F۵ که در پایگاه Uniprot ثبت گردیده (P۱۸۱۰۳) نشان داد که توالی FanC ساختاری بسیار حراست شده دارد. عدم وجود تغییرات حایز اهمیت در توالی اسیدهای آمینه و تشابه آن در سویه‌های متعدد این مزیت را دارد که در صورت استفاده از آن در ترکیب واکسن ایمنی بر علیه تمامی سویه‌های انتروتوکسیژنیک F۵ مثبت ایجاد خواهد شد.

در مطالعه حاضر از سیستم بیانی باکتری اشریشیا کلی استفاده گردید که یکی از پرکاربردترین روش‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است. از خصوصیات این سیستم بیانی پروکاریوتی میتوان به مقرون به صرفه بودن ,آسان و سریع بودن تولید و همچنین راحت تر بودن بررسی آنتی ژنیک پروتئین نو ترکیب اشاره کرد (۱۶). سویه BL۲۱(DE۳) به کار برده شده در این تحقیق از جمله سویه‌های ناکارآمد و دارای نقص در تولید پروتئینازها است. استفاده از این سویه‌ها به دلیل کاهش اثر پروتیولیتیک سویه میزبان بر پروتئین نوترکیب تولید شده دارای ارجحیت است (۲۳). یکی از نکات ضروری در افزایش تولید پروتئین نوترکیب استفاده از حامل بیانی واجد پروموتوری با فعالیت بالا در سویه میزبان است (۲۸). با در نظر گرفتن این موضوع کلونینگ ژن FanC در وکتور بیانی pET۲۸a انجام شد که دارای پروموتور T۷ باکتریوفاژ با فعالیت بالا در باکتری BL۲۱ (DE۳) است. توانایی سیستم‌های مبتنی بر پروموتور T۷ در تولید پروتئین از µg ۱۰۰ تا mg ۱۰ در شرایط معمولی بسته به نوع پروتئین متغیر می‌باشد که در مطالعه حاضر غلظتی در حدود mg ۳/۵ به دست آمد. لازم به ذکر است که این نوع سیستم‌ها توانایی خوبی برای تطبیق با مقیاس‌های صنعتی و تولید انبوه دارند. از سوی دیگر وکتور pET۲۸a دارای توالی His-Tag در قسمت N ترمینال است که به صورت کلی این توالی تأثیری بر ساختار پروتئین‌های نوترکیب ندارد. وجود این قطعه تنها باعث تسهیل اتصال پروتئین تولید شده به ستون نیکل، که به منظور تخلیص آسان و موثر پروتئین‌ها استفاده می‌شود، می‌گردد (۲۴،۲۶) و به این ترتیب تخلیص پروتئین FanC به صورت بهینه و موثری صورت می‌گیرد.

پروتئین نوترکیب FanC در مطالعه حاضر به صورت گنجیدگی داخل سلولی در باکتری BL۲۱ تولید گردید. از مزیت‌های تولید گنجیدگی این است که اولا پروتئین نوترکیب از آسیب‌های پروتیولیتیک در امان می‌ماند و ثانیا این امکان وجود دارد که مقادیر نسبتاً خالص پروتئین نوترکیب را با استفاده از سانتریفیوژ کردن به دست آورد و به این ترتیب خالص سازی را تسهیل کرد. نکته دیگر اینکه در روش‌ها و پلاسمید هایی که منجر به تولید گنجیدگی می‌شوند معمولاً انتظار می‌رود پروتئین نوترکیب بیشتری تولید گردد و به همین دلیل برای تولید آنتی ژن نوترکیب که خالص سازی در شرایط دناتوره و داشتن ساختمان و عملکرد کامل پروتئین نوترکیب چندان تأثیرگذار نیست توصیه می‌گردد. با در نظر گرفتن مطالب مورد اشاره، آزمون وسترن بلات در مطالعه حاضر نشان داد با وجود استخراج پروتئین نوترکیب در شرایط دناتورینگ، آنتی بادی مونوکلنال تجاری بر علیه FanC کماکان توان شناسایی اپی توپ مربوطه را دارد و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تغییر ساختمانی در شرایط دناتورینگ اثر منفی بر خواص آنتی ژنی پروتئین نوترکیب FanC نداشته باشد.

به منظور بررسی بهینه ترین شرایط برای تولید پروتئین نوترکیب

توصیه شـده اسـت که پلاسـمیدهای مختلف سیسـتم pET بـه همراه وکتورهای متنوع باکتریایی مورد بررسی قرار گیرد. در این زمینه نصیری و همکاران در سال ۲۰۱۶ ژن پروتئینFanC را در وکتور pET۳۲a(+) کلون کـرده و اقدام به بیان آن در باکتری *E.coli* BL۲۱ (DE۳-CodonPlus) نموده اند (۲۱). از مشخصات قابل ذکر در مطالعه مورد اشاره، تولید پروتئین به صورت غیر گنجیدگی و متعاقبا استخراج آن تحت شرایط غیر دناتورینگ می‌باشد و از این جهت با مطالعه حاضر تفاوت دارد. متاسفانه به دلیل نحوه مبهـم تأیید پروتئین نوترکیب FanC (اسـتفاده از روش دات بلاتینگ به جای وسـترن بلاتینگ) در مطالعه نصیری، امکان مقایسـه یافته‌ها وجود ندارد (۲۱).

نتایج الکترفورز اکریلامید و وسـترن بلاتینگ نشـان داد که پروتئین FanC به طور پیوسـته و در مقدار مناسب در باکتری pET۲۸a بیان شده اسـت. ایـن نکته از این جهت حایز اهمیت اسـت که در کشـت معمولی سویه‌های \شریشیا کلی انتروتوکسیژنیک به دلیل اثر مهاری شناخته شده اجزای محیط شامل منابع کربنی (پیروات، آرابینوز، لاکتوز و گلوکز)، بعضی از اسـیدهای آمینه (آلانین، متیونین، لوسین، والین) و همینطور اکسیژن دهی و مرحله رشد باکتری بر بیان فیمبریه F۵، تنها مقادیر اندکی از این فیمبریه تولید می‌شود (۸،۹،۱۳). از سوی دیگر با توجه به عوامل ذکرشده، مقادیر فیمبریه تولید شده می‌تواند متغیر باشد که این امر برای تولید انبوه این پروتئین به هیچ عنوان مطلوب نیست.

سـویه نوترکیب تهیه شده در مطالعه حاضر با توجه به مزیت‌های آن و دانـش موجود می‌تواند به روش‌های متنوعـی در آینده به عنوان پادگن تشخیصی و یا واکسن بر علیه کلی باسیلوز گوساله مورد استفاده قرار گیرد و این امر می‌تواند کمک شـایانی به روند دستیابی به واکسنی موثر نماید. به عنوان مثال علاوه بر اینکه پروتئین نوترکیبFanC تولید شده توسط این سویه می‌تواند به عنوان واکسن تحت واحد به همراه ادجوانت مناسب استفاده شـود، این امکان نیز وجود دارد که سـویه ذکر شده بوسیله اشعه فرابنفش یا گاما غیر فعال شـده و به عنوان واکسـن کشته استفاده گردد. مزیت این روش این است که به دلیل حذف مرحله استخراج و خالص سازی پروتئین نوترکیب F۵، تهیه واکسن آسانتر و مقرون به صرفه تر خواهد بود و همچنین مطالعات گذشـته نشان داده است که این نوع واکسن به دلیل داشتن عوامل مشوق ایمنی مربوط به باکتری می‌تواند بدون نیاز به ادجوانت پاسخ ایمنی ایجاد کند (۱،۱۲).

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این طرح از بودجه طرح کلان واکسن در بخش تولید دانش فنی واکسن کلی باسیلوز گوساله تأمین شده است.

References

1. Brockstedt, D.G., Bahjat, K.S., Giedlin, M.A., Liu, W., Leong, M., Luckett, W., Gao, Y., Schnupf, P., Kapadia, D.G., Castro, J.Y., Lim, H., Sampson-Johannes, A., Herskovits, A.A., Stassinopoulos, A., Archie, H.G., Bouwer, J. E., Hearst, D., Portnoy , A., Cook, D.N., Dubensky Jr., T.W. (2005) Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. Nature Medicine. 11: 853-860
2. Cho, Y.I., Yoon, K.J. (2014) An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. J Vet Sci. 15: 1-17.
3. Rousseau, C. (2002) Pathologie du veau. Activéto. Paris, France, (2nd ed.) Frances Morris. p. 6.
4. Carson. M., Johnson, D.H., McDonald, H. (2007) Brouillette C, Delucas LJ. His-tag impact on structure. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 63:295-301.
5. De Graaf, F.K., Krenn B.E., Klaasen, P. (1984) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. Infect Immun. 43: 508-514.
6. van Embden, J.D.A., de Graaf, F.K., Schouls, L.M., Teppema, J.S. (1980) Cloning and expression of a deoxyribonucleic acid fragment that encodes for the adhesive antigen K99. Infect Immun. 29: 1125-1133.
7. Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moon, H.W., (1998) Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. J Clin Microbiol. 36: 1795-1797.
8. Francis, D.H., Ryan, C.J., Fritzemeier, J.D. (1983) Effect of sodium acetate on expression of K99 pili by *Escherichia coli*. Infect Immun. 41: 1368-1369.
9. Francis, D.H. (1986) Effect of amino acids on expression of K99 adherence pili by *Escherichia coli*. Vet Microbiol. 11: 117-123.
10. Ghaemmaghami, S.H., Pourbakhsh S.A., Goodarzi, H., Ebrahimi, K., (2005) Survey of F5 fimbriae in *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves in arak city (Iran) Pajouhesh& Sa-

zandegi. (In Persian) 67: 87-91.
11. Ghanbarpour, R., Khalili, M., Molaei, M.M., Peshdar, M., (2008) Frequency of K99 factor in *E.coli* strains isolated from healthy and diarrheic calves. Iran Vet J. (Shahid Chamran University). 3: 58-65.
12. Huang, C.P., Liu, Y.T., Nakatsuji, T., Shi, Y., Gallo, R.R., Lin, S.B., Huang, C.M. (2008) Proteomics integrated with *Escherichia coli* vector-based vaccines and antigen microarrays reveals the immunogenicity of a surface sialidase-like protein of Propionibacterium acnes. Proteomics Clin Appl. 2: 1234-1245.
13. Isaacson, R.E. (1980) Factors affecting expression of the *Escherichia coli* pilus K99. Infect Immun. 28: 190-194.
14. Lotfollahzadeh, S., Ziaei daroonkolai, N., Zahraei Salehi, T., Poorbakhsh, S.A., Mokhber Dezfouli, M.R., Afshari, GH. R. (2004) A study on presence of *Escherichia coli*, Coccidia and Cryptosporidium in stool samples of under one month age diarrheic calves in Ghaemshahr and Babol and antibiotic sensitivity of isolates. J Fac Vet Med Uni Tehran. 59: 131-136.
15. Jacobs A.A.C., Simons L.H., de Graaf F.K. (1987) The role of lysine-132 and arginine-136 in the receptor-binding domain of the K99 fibrillar subunit. EMBO J. 6: 1805-1808.
16. Jana, S., Deb, J.K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 67: 289-298.
17. Lee, J.H., Isaacson, R.E. (1995) Expression of the gene cluster associated with the *Escherichia coli* pilus adhesin K99. Infect Immun. 63: 4143-4149.
18. Morshedi, A., Rabbani, M., Zahraei Salehi, T., Rezazadeh, F., Taghipoor-Bazargani, T. (2010) Evaluation of antibodies levels against *Escherichia coli*, rotavirus and coronavirus in the colostrum of non-vaccinated cows in southern Tehran, Iran. Int J Vet Res. 4: 217-219.
19. Mousakhani, F., Badiei, A., Asadi, A., Asadi H., Shaghayegh, A., Zafari, M. (2012) Identification of Rota virus, Corona virus, *E.coli* (K99), Cryptosporidium and Salmonella in calf diarrhea syndrome in cattle farms of Tehran. Vet Clin Invest. 3: 1-10.
20. Nagy, B., Fekete, P.Z. (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. Vet Res. 30: 259-284.
21. Nasiri, K., Nassiri, M., Tahmoorespur, M., Haghparast, A., Zibaee, S. (2016) Cloning, sequencing, and epression of FanC antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. G3M. 13: 4112-4119.
22. Rabbani, M., MoKhber-Dezfuli, M.R., Zahraie-Salehi, T., Yoosefi-Ramandi, A., Bahonar, A.R., Rezazadeh, F. (2007) Detection of anti-*E.coli*, rota virus and corona virus antibodies in sera samples of diarrheic and normal calves under 1 month of age. J Vet Res. 62: 145-149.
23. Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol. 5: 172.
24. Rosenberg, I.M., Packman, L.C. (1998) Protein analysis and purification, benchtop techniques. Protein Sci.7:806.
25. Simons B.L., Rathman P., Maij C.R., Oudega B., de Graaf F.K. (1990) The penultimate tyrosine residue of the K99 fibrillar subunit is essential for stability of the protein and its interaction with the periplasmic carrier protein. FEMS Microbiol Lett. 55:107-112.
26. Saluta, M., Bell, P.A. (1998) Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli*. Life Sci News. 1:1-3
27. Shams, Z., Tahamtan, Y., Kargar, M., Hoseini, S.MH., Pourbakhsh, S.A. (2010) Isolation and antibiotic sensitivity of *E. coli* K99 isolates from diarrheic calves at Fars province. J Microb World. 2(4): 256-260.
28. Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol. 189: 113-130.

Production of Recombinant FanC of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Associated with Calf Diarrhea

Tabatabaei, S.[1], Nikbakht Borojeni, Gh.[1*], Tebyanian, M.[2], Zainel, Kh.[1], Jalali, S.A.H.[3]

[1]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

[2]*Department of Immunology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran*

[3]*Department of Natural Resources, Institute of Biotechnology & Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran*

(Received 4 November 2017, Accepted 9 January 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Diarrhea is a common disease in the neonate calf which imposes significant economic burden on cattle industry around the world. During the first week after birth, Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) strains carrying F5 fimbria are one of the most important pathogens causing calf diarrhea. F5 fimbria is involved in early stage of pathogenesis and is responsible for attachment of bacteria to enterocytes; this attachment is mediated by FanC protein of F5 fimbria. Antibodies directed against F5 fimbriae play a significant role in prevention and control of the disease. **OBJECTIVES:** Evaluation and expression of recombinant expression of F5 Fimbriae of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* associated with calf diarrhea. **METHODS:** In the present study, the fanC region of F5 fimbria was cloned in a pET28a plasmid. **RESULTS:** The recombinant construct was confirmed by sequencing and protein production in *Escherichia coli* BL21 (DE3) was evaluated by western blotting procedure. **CONCLUSIONS:** Based on our findings, the recombinant FanC protein or the BL21 (DE3) strain are suitable candidates to develop an effective vaccine against calf colibacillosis or use in a diagnostic kit for F5+ ETEC.

Keyword: Cloning, Recombinant F5 Protein, Bovine Enterotoxigenic *E.coli*

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Eelectrophoretic protein separation of recombinant FanC(Line 1), recFanC-BL21 after (Line 2, 3) and before (line 4) induction of BL21 (DE3) using IPTG.

Figure 2. Western blotting analysis of FanC expression; recFanC-BL21 after induction of using IPTG (Line 1 and 3), before induction (Line 2) and purified protein (Line 4). Protein Ladder (lane 5).

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