مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره۲، ۱۴۰۰، ۱۷۰-۱۶۲
مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی انگل *توکسوکارا کنیس* در باکتری *اشریشیا کلای* سویه BL21(DE3)

مهسا شه‌بخش[۱]، فاطمه جالوسیان[۱]، سیدحسین حسینی[۱]، پرویز شایان[۱]، عبدالرضا ناصرمقدسی[۲]

[۱] گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات ام اس، پژوهشکده علوم و اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۲ دی ماه ۱۳۹۹، **تاریخ پذیرش:** ۱۴ فروردین ماه ۱۴۰۰
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.2.3.3
10.22059/jvr.2020.287488.2966

چکیده

زمینهٔ مطالعه: *توکسوکاریازیس* یک بیماری مهم زئونوز است که توسط نوزاد مرحله دوم *توکسوکارا کنیس* و *توکسوکارا کتی* ایجاد می‌شود. در خیلی از کشورهای معتدل توکسوکاریازیس رایج‌ترین عفونت کرمی است و سبب بروز عوارض شدید می‌شود. لکتین نوع سی از محصولات تولیدی در مرحله نوزادی این انگل است. این پروتئین در واکنش‌های ایمنی ازجمله ارسال سیگنال سلول‌های ایمنی در مهره‌داران، فعال کردن ایمنی ذاتی در مهره‌داران و بی‌مهرگان و القا هموستاز دخالت دارد.

هدف: مطالعه حاضر با هدف بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی انگل *توکسوکارا کنیس* و بررسی خواص آنتی‌ژنی (پادگنی) آن صورت گرفته است.

روش‌کار: توالی نوکلئوتیدی مرجع مربوط به لکتین نوع سی(CTL) انگل *توکسوکارا کنیس* از بانک ژن استخراج شد. سپس پلاسمید pET32a حاوی توالی مورد نظر توسط شرکت GENERAY سنتز گردید. پلاسمید نوترکیب به باکتری *اشریشیا کلای* سویه BL21(DE3) منتقل شد. بیان این پروتئین با استفاده از روش‌های SDS-PAGE و داتبلات بررسی و با سرم انسانی مثبت، مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج: مطالعه حاضر نشان داد که بهینه‌سازی شرایط برای دستیابی به بیشترین میزان تولید پروتئین با انتخاب باکتری *اشریشیا کلای* سویه BL21(DE3)، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پس از القا و غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG حاصل گردید. پس از بهینه‌سازی پروتئین نوترکیب با غلظت ۰/۶±۱۱۶۰میکروگرم بر میلی‌لیتر استخراج شد. وزن مولکولی پروتئین حاصل ۴۲ کیلودالتون بود. پاساژ پلاسمید نوترکیب قبل از القا، در باکتری *اشریشیا کلای* سویه DH5α باعث افزایش معنی‌دار بیان پروتئین گردید. نتایج ارزیابی بهینه‌سازی شرایط، با روش‌های SDS-PAGE و داتبلات نشان داد که بیشترین میزان تولید پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی انگل *توکسوکارا کنیس* در شرایط بهینه‌سازی حاصل شده است.

نتیجه‌گیری نهایی: جهت تولید هر پروتئین نوترکیب به‌ویژه در مقادیر زیاد و به‌منظور مصارف تجاری لازم است که بهینه‌سازی مخصوص آن پروتئین، انجام شود و دقیقاً براساس شرایط بهینه‌سازی تعیین‌شده، تولید پروتئین نوترکیب قابل انجام است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شرایط بهینه جهت تولید پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی، انتخاب باکتری *اشریشیا کلای سویه* BL21(DE3)، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۴ ساعت پس از القا است که با حفظ ویژگی‌های ایمنی‌زایی نیز همراه است. به‌طورکلی می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که سویه باکتری انتخاب شده و همچنین دما و زمان القا بر میزان بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب مانند لکتین نوع سی انگل *توکسوکارا کنیس* تأثیر مستقیم دارد.

کلمات کلیدی: *توکسوکارا کنیس*، پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی، باکتری *اشریشیا کلای سویه* BL21(DE3)، باکتری *اشریشیا کلای سویه* BL21، پلاسمید pET32a

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: فاطمه جالوسیان، گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: jalousian_f@ut.ac.ir

مقدمه

کرم‌ها موجودات انگلی هستند که بیشتر از یک میلیارد نفر در دنیا به آن‌ها آلوده‌اند (۹). آلودگی به کرم‌های انگلی می‌توانند آسیب‌های پاتولوژی مانند گرانولوماتوز و ازکارافتادگی اعضا را ایجاد کنند. اما اغلب بین انگل و میزبان هماهنگی ایجاد می‌شود به‌طوری

که آلودگی معمولاً بدون علائم بوده و منجر به مرگ نمی‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که آلودگی به کرم‌ها سبب تعدیل پاسخ‌های ایمنی می‌شود. آلودگی‌های کرمی سبب کاهش التهاب در برابر آلودگی با باکتری‌ها و تک‌یاخته‌ها می‌شود. همچنین برخی مطالعات، اثر این آلودگی‌ها را بر کاهش واکنش‌های حساسیت‌زا نیز نشان داده است. یکی از ویژگی‌های حفاظتی ناشی از آلودگی‌های کرمی، جهت‌دار شدن پاسخ ایمنی میزبان به سمت فعال شدن سلول‌های Th2 و سلول‌های T- regulatory است (۹).

گونه‌های توکسوکارا قادر به حمله به طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها ازجمله بی‌مهرگان، پرندگان، موش و انسان هستند (۲،۳). در مرحله نوزادی این انگل قادر است به مدت طولانی در بدن انسان بماند و چرخه زندگی را در بدن میزبان حامل به حالت تعلیق درآورد و در صورت رسیدن به یک میزبان سگ‌سان بالغ شود. درصورتی‌که سگ‌سانان ماده به این انگل آلوده شوند تا زمان بارداری، انگل در بافت‌های سگ‌سانان ماده باقی می‌ماند و سپس از طریق جفت یا شیر به توله‌ها منتقل می‌شود (۲۴).

توکسوکارا کنیس انگل روده‌ای شایع سگ‌ها و عامل بیماری توکسوکاریازیس احشایی و توکسوکاریازیس چشمی در انسان است. توکسوکاریازیس رایج‌ترین عفونت کرمی در بسیاری از کشورهای معتدل است و سبب بروز عوارض شدید می‌شود (۱۳،۱۸،۲۰،۲۵). چرخه زندگی این انگل در سگ‌سانان تکمیل می‌گردد، تخم‌هایی که توسط سگ‌سانان دفع می‌شوند توانایی آلوده ساختن میزبان‌های متنوعی از جمله انسان را دارند. در میزبان‌های غیرسگ‌سان نوزاد مرحله دوم که از تخم خارج شد، در بافت‌های نرم مانند قلب و مغز میزبان مهاجرت می‌کند و برای مدت چند ماه تا چند سال در این بافت‌ها بدون رشد یا تغییر باقی می‌ماند (۱۳).

برای پی‌بردن به توانایی زنده ماندن این نوزادها در بدن میزبان و چگونگی تعدیل ایمنی میزبان، باید محصولات ژنی تولیدی در این مرحله را بررسی کرد، مانند لکتین نوع سی که با لکتین نوع سی پستانداران مشابه است (۲۵).

لکتین نوع سی از خانواده پروتئین‌های carbohydrate-binding است که در واکنش‌های ایمنی نقش دارد (۱۷). پروتئین لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* چهار نوع است. نوع یک و چهار پروتئین‌های دفعی-ترشحی هستند. غلظت نوع یک در بین پروتئین‌های دفعی-ترشحی بیشتر است. این پروتئین‌ها در تعدیل سلول‌های ایمنی نقش دارند و سبب کاهش واکنش‌های التهابی در میزبان می‌شوند. لذا این پروتئین‌ها می‌توانند جهت مطالعات ایمنی‌شناسی و به‌ویژه کرم‌درمانی مورد توجه قرار گیرند.

لکتین نوع سی ترشح شده از کرم‌های انگلی با لکتین‌های موجود در سلول‌های ایمنی پستانداران مانند موش تشابه دارد. لذا عملکرد این پروتئین در سلول‌های موش قابل پیش‌بینی است. لکتین نوع سی یک (CTL-1) *توکسوکارا کنیس*، یک پروتئین سطحی است و به سیستم ایمنی سلولی و هومورال عرضه می‌شود (۶). لذا پیش‌بینی می‌شود این پروتئین بر روندهای تعدیل سلول‌های ایمنی تأثیر داشته باشد. بنابراین می‌توان این پروتئین را به عنوان یک کاندیدا جهت مطالعات کرم‌درمانی حائز اهمیت دانست. همه پروتئین‌های نوترکیب به‌طور یکسان در *اشریشیا کلای* بیان نمی‌شوند و نیاز به بهینه‌سازی شرایط برای دستیابی به بیشترین بیان، وجود دارد. بنابراین هدف اصلی مطالعه حاضر بهینه‌سازی شرایط برای دستیابی به بیشترین بیان پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی در باکتری *اشریشیا کلای* سویه BL21(DE3) است.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر دو سویه باکتری *اشریشیا کلای* به نام‌های BL21(DE3) و BL21 استفاده شد. پلاسمید pET32a نیز به عنوان وکتور بیانی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز ژن و ORF کدکننده لکتین نوع سی براساس ژن ثبت شده در بانک ژن: توالی نوکلئوتیدی مربوط به لکتین نوع سی انگل *توکسوکارا کنیس* از بانک ژن استخراج شد. سپس پلاسمید pET32a حاوی توالی مورد نظر توسط شرکت GENERAY سنتز شد. جایگاه شناسایی آنزیم‌های BamH1 و EcoR1 بر روی توالی مورد نظر اضافه شدند. به منظور سنتز پلاسمید نوترکیب توالی لکتین نوع سی به همراه دو جایگاه برش آنزیمی و کدون متوقف کننده به شرکت ارائه گردید.

ترانسفورماسیون در باکتری *اشریشیا کلای* سویه DH5α و غربالگری سلول‌های حاوی ژن لکتین نوع سی: پلاسمید نوترکیب به باکتری *اشریشیا کلای* سویه DH5α به عنوان میزبان اولیه برای تکثیر پلاسمید نوترکیب با روش شوک حرارتی منتقل شد. جهت تأیید ترانسفورماسیون از کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به شکل تصادفی و

با استفاده از پرایمرهای یونیورسال T7 کلنی PCR انجام شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (MBST, Iran) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پلاسمید استخراج شده، به باکتری‌های *اشریشیا کلای* سویه‌های BL21(DE3) و BL21 جهت بیان ژن به روش شوک حرارتی منتقل شد.

ترانسفورماسیون در باکتری *اشریشیاکلای* BL21(DE3) و BL21: جهت بیان پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی (CTL) کلنی‌های حامل پلاسمید نوترکیب در محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد. از این محیط کشت به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد. سپس محیط کشت در دو دمای ۳۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. پس از این که تعداد باکتری به حد مناسب رسید (Optical Density=0.6 در طول موج ۶۰۰ نانومتر)، القا بیان پروتئین با استفاده از IPTG (شرکت Sigma آمریکا) در غلظت ۱ میلی مولار صورت گرفت. نمونه گیری در ساعت صفر، یک، دو، سه و چهار پس از القا IPTG (در پنج نوبت) انجام شد. رسوب باکتری جمع‌آوری شد. به رسوب حاصل ۷۰ میکرولیتر بافر لیز کننده اضافه و به مدت ۱ ساعت با دور تند مخلوط شد. محصول در ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی و رسوب حاصل با روش SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی (CTL): جهت تخلیص پروتئین از کیت Ni-NTA (QIAGEN) spin و مطابق با دستورالعمل کیت استفاده شد. به منظور شناسایی پروتئین نوترکیب و تأیید بیان آن از روش دات‌بلات با استفاده از سرم انسان مبتلا به توکسوکارا استفاده شد.

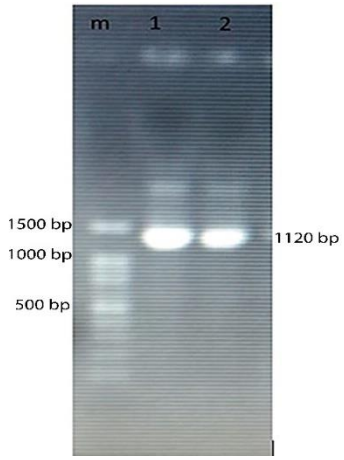
بررسی بیان پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی با استفاده از روش دات‌بلات: نمونه‌های پروتئینی استخراج‌شده با غلظت ۱۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی کاغذ نیتروسلولز (BIORAD) لکه‌گذاری شدند. سپس نقاط غیراختصاصی موجود بر روی کاغذ توسط بافر بلوکه‌کننده PBST (phosphate bffer saline +tween20) حاوی ۵ درصد شیر خشک بدون چربی بلوکه شدند. پس از انجام سه مرحله شستشو با بافر PBST سرم مثبت توکسوکاریازیس انسانی، مثبت شده با کیت تجاری و مورد تأیید پزشک بالینی، با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس پنج مرحله شستشو مانند قبل انجام شد. پس از آن آنتی‌بادی Anti Human-IgG متصل به آنزیم HRP (Razi biotech) در رقت ۱:۵۰۰۰ اضافه و به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. پنج مرحله شستشو مانند قبل انجام شد. در پایان کاغذ با سوبسترای رنگی DAB (Sigma) در حضور پراکسیدهیدروژن به عنوان سوبسترا آنزیم در محیط تاریک به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد.

نتایج

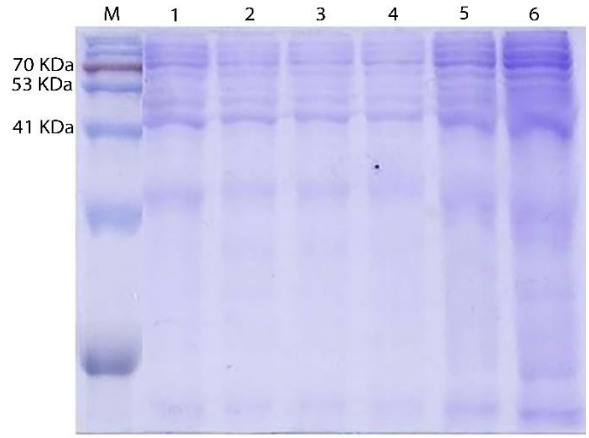
پلاسمید نوترکیب استخراج‌شده به باکتری *اشریشیا کلای* BL21(DE3) و BL21 منتقل شد. برای تأیید انتقال درست کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال T7 انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد (تصویر۱). پس از القا بیان پروتئین با استفاده از IPTG، سوسپانسیون حاصل به روش SDS-PAGE و به کمک نشانگر پروتئینی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان‌دهنده بیان پروتئین نوترکیب CTL به وزن ۴۱ کیلودالتون بود (تصویر۲). در بررسی محصول تخلیص پروتئین با روش SDS-PAGE نیز باندی به وزن ۴۱ کیلودالتون مشاهده شد (تصویر۳). ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب CTL به روش دات‌بلات نشان‌دهنده قابلیت واکنش این پروتئین با سرم جدا شده از خون فرد مبتلا به توکسوکاریازیس بود (تصویر۴).

در مطالعه حاضر بیان پروتئین نوترکیب CTL در پلاسمید pET32a و تحت شرایط متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت.

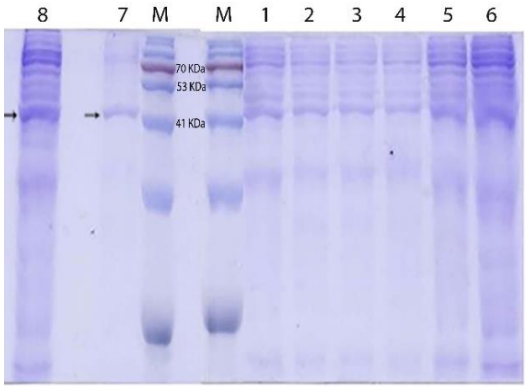
مقایسه بیان پروتئین نوترکیب در سویه‌های مختلف *اشریشیا کلای*: در مطالعه حاضر بیان پروتئین نوترکیب در باکتری *اشریشیا کلای* سویه‌های BL21(DE3) و BL21 مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین نوترکیب در باکتری *اشریشیا کلای* سویه BL21 بیان نشد و یا به مقدار بسیار کم بیان شد به طوری که با روش SDS-PAGE قابل مشاهده نبود؛ اما در باکتری *اشریشیا کلای* سویه BL21(DE3) باند به وزن ۴۱ کیلودالتون مربوط به پروتئین نوترکیب CTL به روش SDS-PAGE به وضوح قابل مشاهده بود (تصویر ۲).



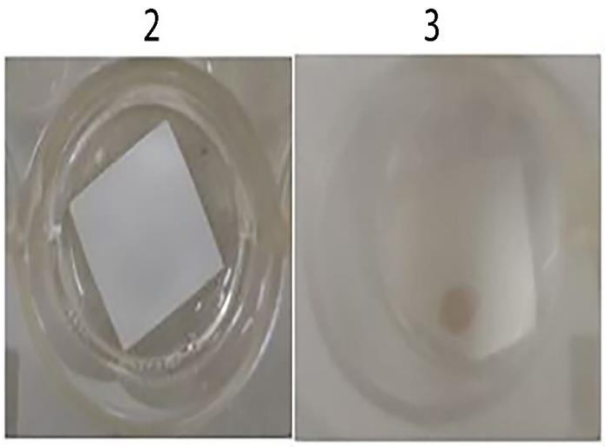
تصویر ۱. نتیجه الکتروفورز محصول PCR کلنی باکتری‌های *اشریشیا کلای* سویه BL21(DE3)حاوی ژن کدکننده پروتئین لکتین نوع سی در وکتور pET32a، M مارکر ۱۰۰ جفت‌باز، ستون ۱ تا ۳ محصول PCR پلاسمید حاوی قطعه توالی نوکلئوتیدی CTL به طول ۱۱۲۰ جفت‌باز.



تصویر ۲. M مارکر پروتئین، ردیف ۱ لیزات باکتری در ساعت سوم بعد از القا، ردیف ۲ لیزات باکتری حاوی پلاسمید بدون قطعه در ساعت سوم بعد از القا، ردیف ۳ لیزات باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب قبل از القا، ردیف ۴ تا ۶ به ترتیب لیزات باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از القا در ساعت‌های دوم، سوم و چهارم.



تصویر ۳. الکتروفورز پروتئین استخراج شده پس از بیان در باکتری *اشریشیاکلای* سویه BL21(DE3)، M مارکر پروتئین، ستون ۷ پروتئین تخلیص شده با استفاده از کیتNi-NTA spin(QIAGEN) به وزن ۴۱ کیلودالتون، ستون ۸ لیزات باکتری بعد از القا، ستون ۱ لیزات باکتری در ساعت سوم بعد از القا، ستون ۲ لیزات باکتری حاوی پلاسمید بدون قطعه در ساعت سوم بعد از القا، ستون ۳ لیزات باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب قبل از القا، ستون ۴ تا ۶ به ترتیب لیزات باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از القا در ساعت‌های دوم، سوم و چهارم. نتایج SDS-PAGE مطالعه حاضر نشان داد که باند حاصل از بیان ژن ۴ ساعت بعد از القا از غلظت بیشتری برخوردار است.



تصویر ۴. دات‌بلات پروتئین نوترکیب CTL، ۱- پروتئین نوترکیب CTL با سرم مثبت توکسوکاریازیس انسانی و همچنین آنتی‌هیومن متصل به آنزیم HRP به عنوان آنتی‌بادی ثانویه و رنگ‌آمیزی شده با DAB، ۲- کنترل منفی فاقد پروتئین نوترکیب (فاقد آنتی ژن) و دارای سرم مثبت توکسوکاریازیس انسانی و همچنین آنتی هیومن متصل به آنزیم HRP به عنوان آنتی‌بادی ثانویه و رنگ آمیزی شده با DAB.

مقایسه تأثیر دما بر بیان پروتئین نوترکیب در سویه‌های مختلف *اشریشیا کلای*: در مطالعه حاضر بیان پروتئین در دو دمای ۳۲ و ۳۷ درجه سانتی گراد در باکتری *اشریشیا کلای* BL21(DE3) مقایسه شد. نتایج نشان داد که بیان باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قابل قبول بود. و در ادامه آزمایش‌های بعد القا در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

مقایسه تأثیر غلظت IPTG بر بیان پروتئین نوترکیب سویه‌های مختلف *اشریشیا کلای*: در مطالعه حاضر بیان پروتئین نوترکیب CTL در دو غلظت ۱ و ۰/۵ میلی‌مولار IPTG مورد بررسی قرار گرفت. که در غلظت ۱ میلی‌مولار باند مربوط به پروتئین مورد نظر قابل مشاهده بود.

بحث

به منظور تولید پروتئین نوترکیب انتخاب میزبان مناسب بسیار مهم است. طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها برای بیان پروتئین‌ها در دسترس هستند. پروتئین‌ها را می‌توان در کشت سلول‌های باکتریایی، مخمر، قارچ‌های رشته‌ای، حشرات، پستانداران یا گیاهان تولید کرد. امروزه علاوه بر کشت‌های سلولی، تولید پروتئین‌ها در گیاهان و حیوانات تراریخت نیز مرسوم است. پروتئین‌های بزرگ عموماً در سیستم‌های یوکاریوتی و پروتئین‌های کوچک در سیستم‌های پروکاریوتی بیان می‌شوند. یکی از راه‌های متداول تولید پروتئین‌های دارویی، تهیه آن‌ها به صورت نوترکیب است. در این روش می‌توان از میزبان‌های یوکاریوت و پروکاریوت متعددی بهره برد، اما استفاده از باکتری *اشریشیا کلای* به دلیل سهولت کشت و دست‌کاری آسان در مقام نخست قرار دارد (۲۱،۲۸). در مطالعاتی که توسط افراد مختلف انجام شده، پروتئین‌های نوترکیب متفاوتی در این باکتری بهینه سازی شده است و در هر مورد شرایط کشت، دمای پس از القا، مدت زمان پس از القا یا غلظت القاگر مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱،۱۲،۲۱،۲۳،۲۸).

از اوایل سال ۱۹۰۰، زمانی که تنها منابع اصلی در دسترس گیاهان و حیوانات بودند، پروتئین‌ها به عنوان عوامل درمانی مهم مورد توجه بودند. با استخراج انسولین از پانکراس خوک در سال ۱۹۲۰، استفاده از پروتئین‌ها آغاز گردید. با این حال در سال ۱۹۷۰ با ظهور تکنولوژی DNA نوترکیب مشاهده گردید که پروتئین‌های دارویی نوترکیب می‌توانند به وسیله‌ی باکتری *اشریشیا کلای* با یک روش قدرتمند و مقرون به‌صرفه تولید شوند. در اوایل ۱۹۸۰ انسولین نوترکیب تولید شده به‌وسیله باکتری *اشریشیا کلای* برای درمان دیابت توسط سازمان غذا و داروی آمریکا تأیید شد و درهای جدیدی را بر روی تولید سایر داروهای نوترکیب گشود. امروزه بیش از ۱۵۱ داروی نوترکیب مجزا توسط سازمان غذا و داروی آمریکا برای کاربردهای مختلف پزشکی تأییدیه گرفته‌اند که یک سوم از این پروتئین‌ها در باکتری *اشریشیاکلای* تولید می‌شوند (۲،۱۶).

Savari و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که به منظور دستیابی به بیشترین میزان تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در باکتری *اشریشیا کلای* بهترین محیط کشت TB، بهترین دمای کشت ۲۵ درجه سانتی گراد و بهترین زمان پس از القا ۱ ساعت است (۲۳).

Azaman و همکاران در سال ۲۰۱۰ تولید اینترفرون آلفا را در پریپلاسم باکتری *اشریشیا کلای* بهینه‌سازی و غلظت ۰/۵IPTG میلی‌مولار و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد را به عنوان شرایط بهینه معرفی کردند (۱). Gholami و همکاران در سال ۲۰۱۷ بهینه‌سازی تولید B-NGF نوترکیب را در باکتری *اشریشیاکلای* در مقیاس آزمایشگاهی انجام دادند و بهترین غلظت القاگر IPTG، دمای پس از القا و زمان پس از القا را به ترتیب ۱ میلی‌مولار، ۲۵ درجه سانتی گراد و ۲ ساعت به‌دست آوردند (۱۲).

شایان ذکر است که اغلب این بررسی‌ها در مقیاس آزمایشگاهی و در ظروف کشت انجام شده است. بررسی‌های انجام شده در ظروف کشت حاکی از این مطلب است که در مورد هر پروتئین نوترکیب، شرایط کشت و القا مثل غلظت القاگر، دمای پس از القا و زمان پس از القا متفاوت است و در هر مورد باید به منظور دستیابی به بیشترین بازده تولید، بهینه-سازی این عوامل صورت پذیرد (۲۷).

در این مطالعه بیان پروتئین نوترکیب CTL انگل *توکسوکارا کنیس* با استفاده از پلاسمید بیانی PET32a در باکتری *اشریشیاکلای* با موفقیت انجام گرفت. با هدف افزایش کارایی این پلاسمید، یک توالی خاتمه دهنده رونویسی و دو جایگاه برش آنزیم‌های BamHI و EcoRI به ساختار آن افزوده شد.

حامل‌های بیانی متعددی در پروکاریوت‌ها وجود دارد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به pET32a، pET28a وpET21a اشاره کرد، که از این میان pET32a به دلیل داشتن ژن Trx دو جایگاه Histidin Tag و یک جایگاه S.Tag و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بسیار پر کاربرد است. ژن Trx دارای ۱۰۹ اسیدآمینه است و با اتصال به انکلوژن بادی باعث محلول شدن پروتئین می‌شود، وجود Histidin Tag در این وکتور، قدرت شناسایی پروتئین مورد نظر را نسبت به سایر حامل‌ها دوچندان می‌کند (۱۴). مطالعه‌ای که توسط Farjadi و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد نشان داد که پروتئین نوترکیب CagA *هلیکوباکتر پیلوری* در حامل pET32a و در میزبان *اشریشیا کلای* به‌خوبی قابل بیان است. نتایج این مطالعه

همچنین نشان داد که پروتئین نوترکیب مذکور خاصیت آنتی ژنی خود را حفظ کرده و جهت استفاده در روش‌های تشخیصی سرم‌شناسی قابل استفاده است (۷).

بنابراین در مطالعه حاضر نیز از پلاسمید pET32a که می‌تواند ژن مورد نظر را به‌طور اختصاصی و به مقدار زیاد بیان کند، استفاده شد. *اشریشیا کلای* به‌عنوان میزبان برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در صنعت و مطالعات تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). میزبان‌های بیانی فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی (از جمله DegP, OmpT, HtpR) هستند و به دلیل داشتن عناصر تنظیمی و موتاسیون در پروتئازهایشان امکان بیان بیشتر پروتئین‌های نوترکیب را فراهم می‌کنند (۱۵). در مطالعه حاضر پروتئین تولید شده دارای وزن مولکولی ۴۱ کیلودالتون بود که این وزن حاصل اضافه شدن ۱۶۰ اسیدآمینه از ناقل پلاسمیدی به پروتئین نوترکیب بود. همچنین انتقال اولیه پلاسمید نوترکیب به سویه DH5α، به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان پروتئین شد. در مطالعه حاضر دمای بیان و همین‌طور نوع باکتری و شرایط بیان مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان داد که با استفاده از باکتری *اشریشیا کلای* سویه BL21(DE3) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیشترین بیان پروتئین حاصل می‌شود.

به منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی در باکتری *اشریشیا کلای* سویه Fazeli BL21(DE3) و همکاران در سال ۲۰۱۹، اقدام به بهینه سازی بافر لیز کننده نمودند و نتایج نشان داد که این بهینه‌سازی باعث جلوگیری از تجمع اولیه انکلوژن بادی‌ها و بهبود بیان شده است (۸). Santos و همکاران در سال ۲۰۱۸ برای بیان پروتئین‌های TES-30 و TES-120 *توکسوکارا کنیس* از وکتور Pae و باکتری *اشریشیا کلای* سویه BL21star استفاده کردند. حساسیت و ویژگی این پروتئین‌های نوترکیب به‌عنوان آنتی‌ژن‌های (پادگن‌های) تشخیصی در روش‌های سرم شناسی ارزیابی شدند و نتایج نشان داد که از حساسیت و ویژگی قابل قبول برخوردار هستند (۲۲). Brown و همکاران در سال ۲۰۰۷ لکتین نوع سی انگل *انکیلوستوما سیلانیکوم* را با استفاده از وکتور pMT/BiP/V5-His درسیستم یوکاریوتی Drosophila S2 cell بیان کردند (۳). سیستم‌های یوکاریوتی هزینه بالاتری را به تحقیقات تحمیل می‌کنند لذا اگر بیان در سیستم‌های پروکاریوتی، از حساسیت و ویژگی قابل قبول برخوردار باشند محققان ترجیح می‌دهند از این روش استفاده نمایند. Fong و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای بیان پروتئین TES-120 *توکسوکارا کنیس* از وکتور بیانی pTrcHis2C استفاده نمودند که در سیستم پروکاریوتی موفقیت آمیز بود. نتایج آن‌ها این پروتئین نوترکیب را به عنوان یک آنتی‌ژن اختصاصی مناسب جهت تشخیص سرم‌شناسی معرفی کرد (۱۰).

در مطالعه حاضر القا بیان ژن بعد از ۴ ساعت با IPTG یک میلی مولار بهترین نتیجه را نشان داد (تصویر ۲،۳). لازم به ذکر است که بیان پروتئین نوترکیب در باکتری *اشریشیا کلای* علیرغم مزایای بسیاری که دارد با مشکلاتی همراه است. بیان باند دی سولفیدی در *اشریشیا کلای* با مشکل مواجه است، همچنین پروتئین‌هایی که در *اشریشیا کلای* تولید می‌شوند به صورت غیرگلایکوزیله هستند و به همین دلیل آنتی‌بادی‌های تولید شده توسط *اشریشیا کلای* در شناسایی پروتئین‌های پستانداران با شکست روبرو می‌شوند. این پروتئین‌ها با اندوتوکسین‌ها تولید می‌شوند و کشت در تراکم بالا نیز منجربه تولید استات می‌شود که روی سلول اثر سمی دارد. به‌طور معمول، پروتئین‌هایی که در سیتوپلاسم بیان می‌شوند، انکلوژن بادی تشکیل می‌دهند، علاوه بر آن *اشریشیا کلای* قادر نیست زیر واحدهای پروتئینی را به شیوه‌ای مناسب متصل سازد و پروتئین فعال تولید کند. از مهم‌ترین مشکلات بیان پروتئین در این سیستم می‌توان به عدم بیان پروتئین و یا بیان به میزان کم، شکل‌گیری انکلوژن بادی، غیرفعال بودن پروتئین اشاره کرد، البته راه‌کارهایی جهت رفع این مشکلات ارائه شده است (۵،۱۹،۲۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین نوترکیب حاصل شده در *اشریشیاکلای* سویه BL21(DE3)، خاصیت ایمنی‌زایی خود را حفظ کرده و جهت تشخیص توکسوکاریازیس انسانی قابل استفاده است (تصویر۴).

سپاسگزاری

مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی مرکز تحقیقات مالتیپل اسکلروزیس، پژوهشکده علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پژوهشیاری ۹۶- ۰۴- ۱۸۸- ۳۷۰۱۸ و معاونت پژوهش و فناوری دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران انجام شد و مراحل آزمایشگاهی آن در آزمایشگاه مولکولی گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به انجام رسید.

نویسندگان بدین ترتیب مراتب قدردانی خود را از حامیان، ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Azaman, S.N.A., Ramakrishnan, N.R., Tan, J.S., Rahim, R.A., Abdullah, M.P., Ariff, A.B. (2010). Optimization of an induction strategy for improving interferon-α2b production in the periplasm of *Escherichia coli* using response surface methodology. Biotechnol Appl Biochem, 56(4), 141-150. https://doi.org/10.1042/BA20100104
2. Brondyk, W.H. (2009). Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. In Methods Enzymol, 463, 131-147. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63011-1 PMID: 19892171
3. Brown, A.C., Harrison, L.M., Kapulkin, W., Jones, B.F., Sinha, A., Savage, A., Villalon, N., Cappello, M. (2007). Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from *Ancylostoma ceylanicum*: evidence for a role in hookworm reproductive physiology. Mol Biochem Parasitol, 151(2), 141-147. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.10.017 PMID: 17129620
4. Chen, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. Biotechnol Adv, 30(5), 1102-1107. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013 PMID: 21968145
5. Demain, A.L., Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv, 27(3), 297-306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008 PMID: 19500547
6. Etebar, F., Hosseini, S.H., Jalousian, F., Ranjbar, M.M. (2018). Phylogenetic analysis of C type lectin from *Toxocara canis* infective larvae and comparison with the C type lectin family in the immune system of mouse and human. Iran J Parasitol, 13(1), 49. PMID: 29963085
7. Farjadi, V., Abtahi, H., Zolfaghari, M.R., Soufian, S., Hasanzadeh, L. (2013). Production of recombinant CagA protein of Helicobacter pylori. AMUJ, 16(7), 35-44.
8. Fazeli, B., Akbari, V., Barkhordari, A., Sadeghi, H.M.M. (2019). Improvement of soluble production of reteplase in *Escherichia Coli* by optimization of chemical chaperones in lysis buffer. Adv Biomed Res, 8, 65. PMID: 31737582
9. Fleming, J.O. (2011). Helminths and multiple sclerosis: will old friends give us new treatments for MS? J Neuroimmunol, 233(1), 3-5. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.01.003
10. Fong, M.-Y., Lau, Y.-L., Init, I., Jamaiah, I., Anuar, A.K., Rahmah, N. (2003). Recombinant expression of *Toxocara canis* excretory-secretory antigen TES-120 in *Escherichia coli*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 34(4), 723-726.
11. Galvin, T.J. (1964). Experimental *Toxocara canis* infections in chickens and pigeons. J Parasitol, 124-127. PMID: 14125154
12. Gholami Tilko, P., Hajihassan, Z., Moghimi, H. (2017). Optimization of recombinant β-NGF expression in *Escherichia coli* using response surface methodology. Prep Biochem Biotechnol, 47(4), 406-413. https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1252927 PMID: 27813712
13. Hotez, P.J., Wilkins, P.P. (2009). Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? PLoS Negl Trop Dis, 3(3), 400. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000400
14. Kaligh, S., Bandehpour, M., Parivar, K., Kazemi, B. (2012). Cloning, expression and purification CEL I endonuclease enzyme from celery plants. NCMBJ, 2(8), 79-87.
15. Kamani, M. (2011). The expression of recombinant streptodornase in *E. coli* bacteria. AMUJ, 14(1), 96-113.
16. Li, Y. (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. Protein Expr Purif, 80(2), 260-267. https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.001 PMID: 21843642
17. Loukas, A., Maizels, R. (2000). Helminth C-type lectins and host–parasite interactions. Parasitol Today, 16(8), 333-339. https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01704-X PMID: 10900481
18. Macpherson, C.N. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. Int J Parasitol, 43(12-13), 999-1008. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.004 PMID: 23954435
19. Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol, 5, 172. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172 PMID: 24860555
20. Rubinsky-Elefant, G., Hirata, C., Yamamoto, J., Ferreira, M.U. (2010). Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. Ann Trop Med Parasitol, 104(1), 3-23. https://doi.org/10.1179/136485910X12607012373957 PMID: 20149289
21. Sahdev, S., Khattar, S.K., Saini, K.S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem, 307(1-2), 249-264.
22. Santos, L.M.d., Magalhães, C.G., Telmo, P.d.L., Cerqueira, M.P., Donassolo, R.A., Leite, F.P.L., Elefant, R., Avilla, L.F.d.C., Scaini, C.J., Moreira, Â.N., Conceicao, F.R. (2018). Sensitivity and specificity of recombinant proteins in *Toxocara* spp. for serodiagnosis in humans: Differences in adult and child populations. PloS one, 13(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208991 PMID: 30543696
23. Savari, M., Esfahani, S.H.Z., Edalati, M., Biria, D. (2015). Optimizing conditions for production of high levels of soluble recombinant human growth hormone using Taguchi method. Protein Expr Purif, 114, 128-135. https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.06.006 PMID: 26151869
24. Schnieder, T., Laabs, E.-M., Welz, C. (2011). Larval development of *Toxocara canis* in dogs. Vet Parasitol, 175(3-4), 193-206. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.027 PMID: 21095061
25. Smith, H., Holland, C., Taylor, M., Magnaval, J., Schantz, P., Maizels, R. (2009). How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. Trends Parasitol,

25(4), 182-188. https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.006 PMID: 19269251
26. Strube, C., Heuer, L., Janecek, E. (2013). *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. Vet Parasitol, 193(4), 375-389. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033 PMID: 23312872
27. Zaslona, H., Trusek-Holownia, A., Radosinski, L., Hennig, J. (2015). Optimization and kinetic characterization of recombinant 1, 3-β-glucanase production in *Escherichia coli* K-12 strain BL21/pETSD10–a bioreactor scale study. Lett Appl Microbiol, 61(1), 36-43. https://doi.org/10.1111/lam.12419
28. Zhao, K., Liu, M., Burgess, R.R. (2005). The global transcriptional response of *Escherichia coli* to induced σ32 protein involves σ32 regulon activation followed by inactivation and degradation of σ32 in vivo. JBC, 280(18), 17758-17768.

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 76, Number 2, 2021
Original Article

Optimization of Expression and Extraction of *Toxocara canis* Recombinant C-Type Lectin Protein in *Escherichia coli BL21* (DE3)

Mahsa Shahbakhsh[1], Fateme Jalousian[1], Seyed Hossein Hosseini[1], Parviz Shayan[1], Abdorreza Naser Moghadasi[2]

[1] *Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Multiple Sclerosis Research Center, Neuroscience inistitute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2020.287488.2966
Received: *11 January 2021*, ***Accepted:*** *3 April 2021*

Abstract

BACKGROUND: Toxocaiasis is an important zoonotic disease caused by the second stage larvae of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. Toxocariasis is the most common worm infection in several temperate countries and causes severe complications. C-type lectin is one of the larval stage products of this parasite. It is involved in immune responses, including cellular signals in vertebrate immunity, activation of innate immunity in vertebrates and non-vertebrates, and induction of homeostasis.

OBJECTIVES: The current research aimed to optimize the production of recombinant C-type lectin of *Toxocara canis* and investigate its antigenic properties.

METHODS: Reference nucleotide sequence of lectin type C (CTL) of *Toxocara canis* (T. canis) was extracted from Genbank. Recombinant Plasmid, pET32a, including the desired sequence was then constructed by GENERAY. The recombinant plasmid was transformed to Escherichia coli strain BL21 (DE3). The expression of the recombinant protein was investigated using SDS-PAGE and dot blot methods and approved with human T. canis positive serum.

RESULTS: The findings of the present study showed that optimization and high level production of recombinant protein expression was achieved by selecting Escherichia coli (BL21 (DE3), 37 °C temperature for 4 hours after induction and 1 mM IPTG concentration. After optimization, the recombinant protein was obtained at a concentration of 1160±0.6 µg/mL. The molecular weight of the resulting recombinant protein was 42 kDa. Recombinant plasmid passage in Escherichia coli DH5α strain caused a significant increase in recombinant protein expression. The results of condition optimization evaluation, with SDS-PAGE and Dot blot methods, showed that the highest production of recombinant C type lectin protein of T. canis was obtained under optimized conditions.

CONCLUSIONS: Based on these results, to produce reasonable amounts of specific C-type lectin recombinant protein, further studies are needed to evaluate its immunogenicity and protection against *Toxocara canis* infection.

Keywords: *Toxocara canis*, C type Lectin recombinant protein, *Escherichia coli* BL21 (DE3), *Escherichia coli* BL21, pET32a Plasmid

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: jalousian_f@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-61117161/021-61117161

How to cite this article:

Shahbakhsh, M., Jalousian, F., Hosseini, S., Shayan, P., Naser Moghadasi, A. (2021). Optimization of Expression and Extraction of *Toxocara canis* Recombinant C-Type Lectin Protein in *Escherichia coli* BL21 (DE3). J Vet Res, 76(2), 162-170. https://doi.org/10.22059/jvr.2020.287488.2966

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Results of electrophoresis of colony PCR of *Escherichia coli* (BL21DE3), including sequence of C type lectin in pET32a, M ladder 100 bp, 1-3 PCR product 1120 bp.

Figure 2. M protein marker, 1 bacterial lysate 3 hours after induction, 2 bacterial lysate, including pET32a plasmid 3 hours after induction, 3 bacterial lysate, including recombinant plasmid before induction, 4-6 bacterial lysate, including recombinant plasmid 2,3, and 4 hours after induction.

Figure 3. SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein. M protein marker, 7 purified recombinant protein 41 KDa, 8 bacterial lysate after induction, 1 bacterial lysate 3 hours after induction, 2 bacterial lysate, including pET32a plasmid 3 hours after induction, 3 bacterial lysate, including recombinant plasmid before induction, 4-6 bacterial lysate, including recombinant plasmid 2,3, and 4 hours after induction.

Figure 4. Dot-blot analysis of recombinant protein, 1 recombinant C type lectin with Toxocara-positive human serum, 2 negative controls without recombinant protein.