دوازدهمین کنگره ملی سراسری
فناوریهای نوین در حوزه توسعه پایدار ایران
12th National Congress of
the New Technologies in Sustainable Development of Iran
senaconf.ir

ارزیابی کارایی پروتئین متصل شونده به کولین باکتری پنوموکک بعنوان کاندید واکسن

زهرا صادقی[1]، شیرین ترحم جو (نویسنده مسئول)[2]

[1]دانشکده علوم و فناوریهای نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

[2] موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج starahomjoo@gmail.com

چکیده

باکتری پنوموکک یکی از مهمترین باکتریهای بیماری زا در انسان است. این باکتری عامل اصلی بیماریهای پنومونی و مننژیت میباشد. مبارزه علیه پنوموکوک در حال حاضر به واسطه پوشش غیر کافی واکسن و افزایش مقاومت ضد میکروبی به آنتی بیوتیک‌های سنتی با اختلال همراه است و انجام تحقیقات در مورد اهداف جدید، ضروری است. در این مطالعه پروتئین متصل شونده به کولین D پنوموکک (CBPD) با ابزار بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت و نتایج ما حاکی از همپوشانی بالای اپیتوپهای قادر به القاء پاسخ ایمنی محافظتی در ناحیه متشکل از امینواسیدهای ۳۵۳-۵۱ این پروتئین بود. به این ترتیب ژن کد کننده قطعه مذکور با PCR از ژنوم پنوموکک تکثیر و پس از الحاق به وکتور pET28a به باکتری اشرشیاکلی منتقل شد. نتایج SDS-PAGE نشان دهنده بیان پروتئین بود. انالیز حلالیت پروتئین مذکور نشان دهنده حضور آن در فاز محلول سلولی علاوه بر اینکلوژن بادی بود. اما تخلیص پروتئین از فاز محلول سلولی در حالت native موفقیت آمیز نبود در حالیکه تخلیص آن از اینکلوژن بادی در حالت denaturing موفقیت آمیز بود.

واژه‌های کلیدی

پنوموکک، پروتئینهای سطح سلولی، پروتئین متصل شونده به کولین

۱. مقدمه

پنوموکک یک باکتری گرم مثبت و یکی از گونه‌های جنس استرپتوکوک است که عامل ایجاد بیماریهای مهاجمی مانند مننژیت، پنومونی، عفونت گوش میانی و سپسیس در انسان است [۱]. این باکتری عامل عمده مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال در جهان میباشد. سازمان بهداشت جهانی، مرگ و میر سالیانه کودکان زیر ۵ سال در جهان که بر اثر عفونتهای پنوموککی بوده است ۴۷۶۰۰۰ نفر اعلام کرده است [۲]. این موضوع در حالی است که درمانهای آنتی بیوتیکی در عفونتهای پنوموککی به دلیل ظهور سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک تاثیرگذار نیست. بعلاوه واکسن موجود برضد پنوموکک که کنژوگه کپسول پلی ساکاریدی پنوموکک به پروتئین حامل است گران قیمت است که امکان استفاده از آن را در کشورهای در حال توسعه محدود میکند [۳] . لذا ساخت واکسن های پروتئینی بر ضد پنوموکک مورد توجه است [۴].

مطالعات نشان داده که پروتئین‌های سطح سلولی پنوموکوک از جمله پروتئین متصل شونده به کولین D، (CBPD)، باکتری را قادر می‌سازد تا به سلولهای میزبان بچسبد و تهاجم آن را در این سلولها تسهیل کند. باکتری در غیاب این پروتئین‌ها قادر به اتصال به سلول میزبان است، اما قدرت تهاجمی آن به شدت کاهش می‌یابد [۱و۵و۶]. به این ترتیب هدف این مطالعه بررسی کارایی پروتئین مذکور در ایجاد محافظت بر ضد پنوموکک است تا به این ترتیب زمینه ای برای ایجاد واکسن پروتئینی موثر بر ضد لاکتری مذکور ایجاد شود.

۲. مواد و روشها

۱،۲. آنالیزهای بیوانفورماتیک

توالی امینواسیدی پروتئین CBPD با شماره دسترسی YP_002741626.1 از سایت NCBI بدست آمد. تعیین اپی‌توپ‌های سلول B خطی با استفاده از نرم افزارهای BCpreds و Bepipred انجام شد. قابلیت اپی‌توپ‌ها در القاء پاسخ ایمنی محافظتی با نرم افزار VaxiJen و با در نظر گرفتن ۰/۴ به عنوان Threshold مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اپی‌توپ‌های سلول T نیز با استفاده از نرم افزارهای موجود در IEDB به شرح ذیل مورد بررسی قرار گرفتند:

تعیین اپی‌توپ‌های DRB1 0401 و DRB1 0101 متصل شونده به MHC II با نرم افزار پپتید متصل شونده به MHC II واپی‌توپ‌های A0201 و B2705 با استفاده از نرم‌افزار پپتید متصل‌شونده به MHC I و اپی‌توپ‌های A0204 با نرم‌افزار NetCTLpan انجام شد. اپی‌توپ‌های سلول T همچنین از نظر IC50 با روش Artificial Neural Networks مورد بررسی قرار گرفتند. اپی‌توپ‌هایی که IC50 آنها کمتر از ۵۰ نانومولار بود به عنوان اپی‌توپ‌های قوی انتخاب شدند.

۲،۲. شرایط رشد باکتری

باکتری‌ها بر روی پلیت‌های بلاد آگار در دمای ۳۷ °C و ۵ درصد CO_2، به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شدند. سپس، کلونی‌ها از پلیت بلاد آگار به فالکون حاوی محیط Todd-hewitt انتقال یافت. سپس فالکون‌ها مجددا در انکوباتور ۳۷ °C و ۵ درصد CO_2، به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. .

۳،۲. دستورزی DNA

تکثیر ژن با استفاده از پرایمرهای ATC GAA TTC GGG GAT GAT TAT CCT GCT TAT TAT AAA و AAT GG GAG AGA CTC GAG TTA ACC GAC AGT TGA ACT ATT ATT GGA TCC به ترتیب به عنوان پرایمرهای فوروارد و معکوس بکار رفتند. این پرایمرها با استفاده از نرم افزار Primer 3 plus طراحی شدند. هضم آنزیمی محصول PCR و وکتور pET28a با استفاده از آنزیمهای *Xho*I و *EcoR*I انجام شد. سپس الحاق محصولات هضم آنزیمی به یکدیگر با استفاده از کیت ligation شرکت تاکارا انجام شد. محصولات حاصل با الکتروپوریشن به سلولهای اشرشیاکلی منتقل شدند. استخراج پلاسمید از کلنی های حاصل انجام و وجود ژن در آنها با استفاده از تعیین توالی تایید شد.

۴،۲. آنالیز بیان پروتئین نوترکیب و حلالیت آن

برای این منظور باکتری بدست آمده در محیط LB حاوی کانامایسین در غلظت ۲۵ µg/ml در دمای ۳۷°C و با همزدگی ۲۵۰rpm تا OD_{600} برابر با ۰،۵ کشت داده شد. سپس برای القاء بیان ژن IPTG به آن در غلظت نهایی ۱ mM افزوده شد. بیان ژن تا ۶ ساعت ادامه یافت و در مقاطع زمانی مختلف از سلولها نمونه تهیه شد. آنالیز نمونه ها با استفاده از SDS-PAGE ده درصد انجام شد.

برای تعیین حلالیت پروتئین نوترکیب، سلولها در معرض شکست سلولی با استفاده از اولتراسوند قرار گرفتند. به این ترتیب پس از سانتریفوژ فاز محلول سلولی از فاز نامحلول سلولی که حاوی اینکلوژن بادی بود، جدا شد. سپس با بررسی نمونه های هر دو فاز سلولی با استفاده از SDS-PAGE وضعیت حلالیت پروتئین نوترکیب بررسی شد.

۵،۲. تخلیص پروتئین نوترکیب

تخلیص پروتئین با استفاده از ستونهای Ni-NTA superflow محصول شرکت کیاژن با دو روش Native و Denaturing طبق راهنمای سازنده انجام شد. در روش native خالص سازی پروتئین از فاز محلول سلولی انجام شد و الوشن پروتئین از ستون با استفاده از بافر فسفات و ایمیدازول انجام شد. در حالیکه در روش denaturing تخلیص پروتئین از فاز نامحلول سلولی که حاوی اینکلوژن بادی بود انجام شد. پروتئین نوترکیب با استفاده از اوره محلول شد و الوشن پروتئین بر مبنای کاهش pH به اسیدی بوده است. پس از آن دیالیز نمونه حاصل برای حذف اوره انجام شد. سپس آنالیز نمونه ها با استفاده از SDS-PAGE و وسترن انجام شد.

۳. نتایج و بحث

پروتئین CBPD با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک از نظر وجود اپیتوپهای محافظتی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). بالاترین همپوشانی اپیتوپهای آنتی ژنیک در ناحیه حاوی امینواسیدهای ۳۵۳-۵۱ بود که ناحیه مذکور برای کلونینگ انتخاب شد. برای این منظور تکثیر ژن کد کننده این قطعه پروتئینی با استفاده از PCR انجام شد و محصول PCR در سایز مورد انتظار ۹۰۹ bp مشاهده شد (شکل ۱).

بررسی موجود در

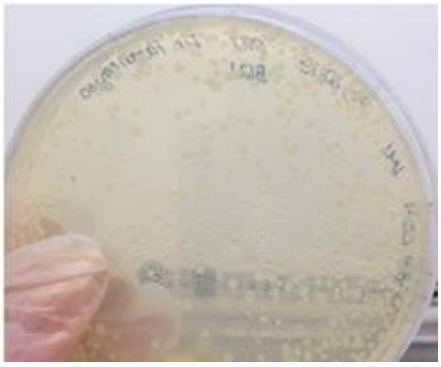
جدول ۱. اپیتوپهای CBPD

	Protective capacity	Position	Vaxijen score
HLA-DRB10101 T-cell (MHC II)	Strong	282	1.1567
	Weak	194	0.496
HLA-A0204 T-cell (MHC I)	Strong	29	0.84
	Weak	78	0.44
HLA-DRB10401 T-cell (MHC II)	Strong	309	1.3108
	Weak	28	0.4186
Bepipred B-cell epitopes	Strong	126	1.853
	Weak	279	0.161
BCpreds B-cell epitopes	Strong	123	2.1710
	Weak	219	0.4627

PCR product Marker

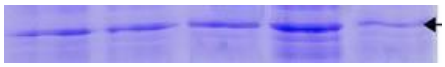
شکل۱. محصول PCR

پس از هضم آنزیمی محصول PCR و وکتور، الحاق آنها به یکدیگر با استفاده از ligation انجام شد. سپس محصول حاصل به سلولهای اشرشیاکلی منتقل شد. استخراج پلاسمید از کلنی های حاصل بر روی پلیت انجام شد (شکل ۲). وجود ژن در پلاسمید استخراج شده با استفاده از تعیین توالی که نشان دهنده ۱۰۰٪ تطابق با توالی مورد انتظار بود، تایید شد.



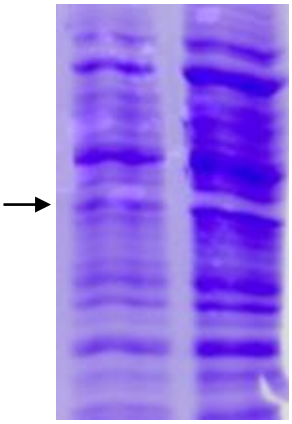
شکل ۲. کلنی های حاصل پس از انتقال محصول **ligation**

بررسی بیان پروتئین با استفاده از SDS-PAGE نشان دهنده بیان موفقیت آمیز پروتئین هدف بود (شکل ۳).



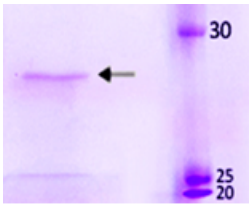
شکل ۳. بیان پروتئین هدف در اشرشیاکلی در مقاطع زمانی مختلف. لاین ها از سمت چپ مربوط به زمان ۰ (شروع القاء بیان ژن)، ۱,۵ ساعت، ۳ ساعت، ۴,۵ ساعت و ۶ ساعت هستند. باند پروتئین هدف با فلش نشان داده شده است.

آنالیز حلالیت با استفاده از SDS-PAGE نشان داد که پروتئین بیان شده در هر دو فاز محلول و نامحلول وجود داشته است (شکل ۴).

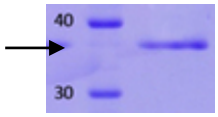


شکل ۴. انالیز حلالیت پروتئین بیان شده. لاین سمت چپ مربوط به فاز محلول سلولی و لاین سمت راست نشان دهنده فاز نامحلول سلولی است. موقعیت پروتئین هدف با فلش نشان داده شده است.

تخلیص پروتئین هدف از فاز محلول با روش native منجر به تخلیص قطعه پروتئینی در سایز ملکولی کمتر از ۳۰ kDa شد که بسیار کمتر از سایز ملکولی مورد انتظار پروتئین هدف (۳۷ kDa) است (شکل ۴). اما تخلیص پروتئین از فاز نامحلول سلولی با روش denaturing منجر به حصول پروتئین نوترکیب در سایز ملکولی مورد انتظار شده است (شکل ۵).

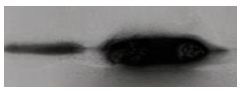


شکل ۴. پروتئین تخلیص شده با روش native. در لاین سمت چپ پروتئین تخلیص شده با فلش نشان داده شده است. مارکر در لاین سمت راست نشان داده شده است.



شکل ۵. پروتئین تخلیص شده با روش **denaturing**. لاین سمت راست نشان دهنده پروتئین تخلیص شده و لاین سمت چپ نشان دهنده مارکر است. موقعیت پروتئین روی شکل با فلش نشان داده شده است.

نتایج وسترن بلات با آنتی بادی تگ هیستیدین موجود در N ترمینال پروتئین هدف نیز تایید کننده تخلیص پروتئین مذکور با روش denaturing بوده است (شکل ۶).



شکل ۶. نتایج وسترن بلات. لاین سمت راست ، پروتئین تخلیص شده و لاین سمت چپ نمونه سلولی بیان پروتئین هدف است.

۴. نتیجه گیری

پروتئین CBPD باکتری پنوموکک دارای اپیتوپهای آنتی ژنیک است که قادر به القاء پاسخ ایمنی محافظت کننده بر ضد پنوموکک هستند. قطعه ای از پروتئین مذکور که شامل امینواسیدهای ۳۵۳-۵۱ است دارای بالاترین سطح همپوشانی اپیتوپهای محافظتی است. بیان این قطعه پروتئینی در اشرشیاکلی انجام شد و تخلیص آن از اینکلوژن بادی امکان پذیر بود.

منابع

[1]. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: Transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol. 2018; 16(6): 355-367.

[2]. Varon E. Epidemiology of Streptococcus pneumoniae. Med Mal Infect. 2012; 42(8): 361-365.

[3]. Cherazard R, Epstein M, Doan TL, Salim T, Bharti S, Smith MA. Antimicrobial resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, mechanisms, and clinical implications. Am J Ther. 2017; 24(3): 361-369.

[4]. Masomian M, Ahmad Z, Gew LT, Poh CL. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. Vaccines (Basel). 2020; 8(1): 1-7.

[5]. Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae's* virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention. Front Immunol. 2018; 9: 1-6.

[6]. Sempere J, Llamosí M, Del Río Menéndez I, López Ruiz B, Domenech M, González-Camacho F. Pneumococcal choline-binding proteins involved in virulence as vaccine candidates. Vaccines (Basel). 2021; 9(2): 1-8.