مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۹/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۳۱

مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن بهینه شده‌ی زیر واحد B کلرا توکسین به عنوان کاندید واکسن

دکتر شهرام نظریان[۱]، محمدعلی عارف‌پور[۲]، محمدجواد باقری‌پور[۳]، دکتر غلامرضا اولاد[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: وبا بیماری خطرناکی است که توسط باکتری ویبریوکلرا ایجاد می‌شود. توکسین کلرا مهم‌ترین عامل ویرولانس در بیماری‌زایی ویبریو کلرا می‌باشد. زیر واحد B انتروتوکسین (CtxB یا Cholera toxin subunit B) که مسؤول اتصال سم به سلول یوکاریوتی است، ویژگی‌های ایمونوژنیک دارد. هدف از این تحقیق، بررسی بیوانفورماتیکی و تولید پروتئین نوترکیب (CtxB) بود.

روش‌ها: ژن CtxB به لحاظ وجود کدون‌های نادر مورد بررسی قرار گرفت و بهینه‌سازی ژن با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی انجام شد. پلاسمید نوترکیب pET۲۸a/CtxB به سلول‌های E. coli BL۲۱ DE۳ (Escherichia coli) منتقل و بیان پروتئین با استفاده از IPTG (Isopropyl β-D-۱-thiogalactopyranoside) القا گردید. بیان پروتئین با روش‌های Western blotting و SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate- Polyacrylamide gel electrophoresis) ارزیابی شد. پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic acid) تخلیص گردید.

یافته‌ها: شاخص سازگاری کدون (CAI یا Codon adaptation index) مربوط به ژن طبیعی ۰/۶۱ بود؛ در حالی که ژن بهینه‌سازی شده شاخص ۰/۹۲ را داشت. درصد کدون‌های با شیوع بالا در ژن به ۶۷ درصد بهبود یافت. آنالیز آنزیمی صحت همسانه‌سازی ژن CtxB در وکتور pET۲۸a/CtxB را تأیید کرد. Western blotting واکنش اختصاصی پروتئین نوترکیب با آنتی بادی ضد توکسین کلرا را نشان داد. میزان پروتئین خالص شده برای هر لیتر از محیط، ۹ میلی‌گرم بود.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی ژن *CtxB* روش مناسب برای بیان بالای پروتئین نوترکیب می‌باشد. این پروتئین را می‌توان به صورت کپسوله شده به منظور ایمنی‌زایی خوراکی تولید کرد.

واژگان کلیدی: کلرا توکسین، زیر واحد B کلرا توکسین، بهینه‌سازی ژن، پروتئین نوترکیب

ارجاع: نظریان شهرام، عارف‌پور محمدعلی، باقری‌پور محمدجواد، اولاد غلامرضا. **مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن بهینه شده‌ی زیر واحد B کلرا توکسین به عنوان کاندید واکسن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۹): ۳۸۷-۳۷۸

۱- مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۴- پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شهرام نظریان
Email: nazarian56@gmail.com

مقدمه

گونه‌های ویبریو جزء شایع‌ترین ارگانیسم‌های موجود در آب می‌باشند. در این میان، ویبریو کلرا عامل بیماری مهلک وبا است که اغلب کشورهای جهان سوم را درگیر می‌نماید و با مرگ و میر بالایی نیز همراه است (۲-۱). بیماری وبا توسط سویه‌هایی از ویبریو کلرای تولید کننده‌ی توکسین وبا ایجاد می‌شود. عملکرد توکسین منجر به از دست دادن سریع آب و الکترولیت‌ها و در نتیجه کاهش شدید حجم پلاسمای خون و در نهایت کلاپس عروق و مرگ در عرض چند ساعت خواهد شد (۴-۳). ویبریو کلرا، دارای عوامل بیماری‌زایی متعددی از جمله آنزیم‌ها و سموم مختلف می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها کلرا توکسین است که یک اگزوتوکسین و عامل اصلی بیماری وبا می‌باشد (۶-۵).

کلرا توکسین (Ctx یا Cholera toxin) خواص آنتی ژنیک قابل توجهی از خود نشان می‌دهد؛ به طوری که توجه محققین را برای ایجاد مصونیت در برابر این بیماری به خود معطوف داشته است (۸-۷). این توکسین، پروتئین اولیگومری متشکل از زیر واحدهای هترودایمر A (CtxA) با وزن مولکولی ۲۷۴۰۰ دالتون و زیر واحدهای هوموپنتامر B (CtxB) با وزن مولکولی حدود ۵۸۰۰۰ دالتون می‌باشد. زیر واحد B شامل ۵ قسمت ۱۰۳ اسید آمینه‌ای است که آرایش حلقه مانند دارد و دارای محل اتصال به GM۱ سلول‌های اپی‌تلیال ژژنوم است (۹). زیر واحد A به صورت پروتئولیتیکی برش خورده و دو زنجیره‌ی پلی پپتیدی به نام‌های A۱ و A۲ ایجاد می‌نماید. به نظر می‌رسد زیر واحد A۱ مسؤول کلیه‌ی فعل و انفعالات بیولوژیکی کلرا توکسین باشد (۱۰، ۳).

زیر واحد B خاصیت سمی ندارد و مسؤول اتصال سم به گیرنده‌های موجود در غشای سیتوپلاسمی سلول میزبان است. این بخش، زیر واحد A۱ را قادر می‌سازد تا درون سلول نفوذ کند. عملکرد زیر واحد A۱ باعث افزایش آدنیلات سیکلاز و افزایش مداوم آدنوزین مونو فسفات حلقوی (Cyclic adenosine monophosphate یا cAMP) داخل سلولی می‌گردد که در نهایت، ترشح بیش از حد آب و الکترولیت در روده را سبب می‌شود (۹، ۴).

در سال‌های اخیر، خواص ایمونولوژیکی Ctx بسیار مورد توجه بوده است، اما سمیت Ctx موجب محدود شدن استفاده‌ی آن برای واکسیناسیون انسانی شده است. در عوض استفاده از CtxB به علت نداشتن عوارض جانبی، به طور وسیعی به عنوان ایمونوژن مخاطی در انسان مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲-۱۱، ۸). از این رو، تولید پروتئین نوترکیب CtxB می‌تواند کاربردهای فراوانی در تهیه‌ی واکسن‌های خوراکی داشته باشد (۱۴-۱۳). روش‌های قدیمی تخلیص CtxB بر پایه‌ی کشت انبوه باکتری ویبریو کلرا و سپس جمع‌آوری محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته و در نهایت، استخراج سم از آن بود. در این روش‌ها، علاوه بر این که امکان جداسازی CtxB به صورت خالص وجود نداشت، پروتئین به دست‌آمده حاوی مقادیری CtxA و سایر پروتئین‌های ناخواسته بود که موجب محدودیت استفاده از آن می‌شد (۱۵).

در روش تولید پروتئین نوترکیب، علاوه بر کاهش خطرات ناشی از کار با عامل بیماری، پروتئین به دست آمده، خالص است و در ضمن، تولید آن مقرون به صرفه می‌باشد؛ به طوری که می‌توان در مدت زمان

و با هزینه‌ی کمتر، میزان پروتئین خالص بیشتری تولید نمود (۱۵). با توجه به خاصیت ادجوانی (adjuvant) زیر واحد اتصالی سم و امکان استفاده از آن به عنوان کاندید واکسن، در این مطالعه، بررسی بیوانفورماتیکی و بهینه‌سازی ژن کد کننده‌ی CtxB جهت بیان پروتئین ناحیه‌ی اتصال دهنده‌ی کلرا توکسین با استفاده از باکتری E. coli (Escherichia coli) مد نظر قرار گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه از باکتری E. coli BL۲۱ DE۳ استفاده شد. همچنین از محیط‌های کشت لوریا برتونی مایع (Luria-Bertani یا LB Broth) و آگار جهت رشد باکتری E. coli استفاده گردید. جهت انتخابی نمودن رشد باکتری نیز از آنتی‌بیوتیک کانامایسین شرکت فرمنتاز استفاده شد. به منظور تأیید همسانه‌سازی ژن در وکتور بیانی، از آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI و HindIII ساخت شرکت فرمنتاز استفاده گردید.

مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی از شرکت‌های مرک، سیناژن، کیاژن و فرمنتاز تهیه شد. همچنین برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل- نیتریلو استیک اسید (Ni-NTA یا Nickel-Nitrilotriacetic acid) از شرکت کیاژن استفاده شد.

برای انجام مطالعه، ابتدا ترادف ژن زیر واحد اتصال دهنده کلراتوکسین از بانک ژن (NCBI یا National center for biotechnology information) استخراج گردید. به منظور بهینه‌سازی کدون‌های ژن CtxB طبیعی و تبدیل آن به کدون‌های رایج E. coli، آنالیزهای بیوانفورماتیکی لازم با استفاده از نرم‌افزارهای تحت شبکه و نرم‌افزار DNAsis به منظور بررسی محتوای GC این ژن، وجود کدون‌های نادر، پایداری mRNA (Messenger RNA) و نیز شاخص سازگاری کدون (CAI یا Codon adaptation index) انجام گرفت. با استفاده از الگوریتم OptimumGene™ و نرم افزار OPTIMIZER کلیه‌ی پارامترهای ذکر شده به منظور رسیدن به بیان حداکثر در باکتری E. coli مطابق با الگوی کدون‌های رایج این باکتری بهینه‌سازی شد (۱۶-۱۷).

پایداری mRNA ژن بهینه‌سازی شده با استفاده از نرم‌افزار Mfold انجام شد (۱۸). توالی مورد نظر، بعد از بررسی شباهت با توالی آمینو اسیدی، توسط نرم‌افزار وب کاتر مورد آنالیز قرار گرفت و از میان آنزیم‌هایی که فاقد جایگاه برش در توالی بهینه‌سازی شده بودند، دو آنزیم EcoRI و HindIII انتخاب شدند. شباهت توالی بهینه‌سازی شده با توالی اولیه‌ی پروتئین CtxB با نرم‌افزار BLASTx (Basic local alignment search tool) مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت، برای ساخت به شرکت Shingene چین ارسال شد. سازه‌ی ژنی دارای توالی EcoRI در ابتدا و توالی HindIII در انتها بر روی وکتور pEt۲۸a سنتز و به صورت لئوفیلیزه دریافت شد.

پس از دریافت ژن، با استفاده از سلول‌های مستعد E. coli LB۲۱ DE۳ و روش شوک حرارتی، تراریخت صورت گرفت. از میان کلونهای به دست‌آمده در محیط LB آگار حاوی ۸۰ µg/ml کانامایسین، ۱۰ کلنی انتخاب و به طور جداگانه در محیط LB مایع حاوی ۸۰ µg/ml کانامایسین به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای

۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ rpm کشت داده شدند. پس از جمع‌آوری سلول‌ها، با روش لیز قلیایی، پلاسمید استخراج گردید. با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI و HindIII بر روی پلاسمیدهای استخراج شده، هضم آنزیمی صورت گرفت و وجود ژن CtxB در کنار نشانگر مولکولی توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد ارزیابی شد.

جهت بیان پروتئین نوترکیب، کلونی‌های تأیید شده در محیط LB مایع حاوی ۸۰ µg/ml کانامایسین تلقیح و به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از کشت مجدد، زمانی که جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۶ رسید، با افزودن ماده‌ی القاکننده‌ی IPTG (Isopropyl β-D-۱-thiogalactopyranoside) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار در شرایط استریل، القا صورت گرفت. محیط‌های پیش‌گفته در Shaker انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از گذشت ۵ ساعت، سلول‌های محیط با سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. سلول‌ها با بافر لیز کننده شکسته و به همراه نشانگر پروتئینی، روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate- Polyacrylamide gel electrophoresis) الکتروفورز گردیدند. بررسی صحت پروتئین نوترکیب بیان شده با روش ایمونوبلاتینگ و استفاده از آنتی‌بادی ضد کلرا توکسین (Anti-CTX) انجام شد (۱۹).

برای تخلیص پروتئین، از ستون نیکل- نیتریلو استیک اسید ساخت شرکت کیاژن استفاده شد. با توجه به این که پروتئین نوترکیب به دست آمده به صورت نامحلول و اجسام انکلوژنی بود، از بافرهای حاوی اوره‌ی ۸ مولار برای شستشوی ستون با شرایط دناتوره استفاده شد. پس از تخلیص پروتئین، حذف اوره به روش شیب دیالیز انجام گرفت.

یافته‌ها

توالی ژن CtxB از لحاظ وجود کدون‌های نادر و همچنین میزان نوکلئوتیدهای C و G مورد ارزیابی قرار گرفت. برای افزایش میزان بیان پروتئین نوترکیب، توالی ژن مورد نظر بهینه‌سازی شد. محتوای GC و درصد توزیع کدون‌های ژن CtxB قبل و بعد از فرایند بهینه‌سازی در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان GC این ژن از ۳۶/۴۰ (در حالت طبیعی) به مقدار ۴۹/۹۰ بعد از بهینه‌سازی افزایش یافته است و در نتیجه‌ی آن، میزان AT از ۶۳/۶۰ در حالت طبیعی به مقدار ۵۰/۱۰ در حالت بهینه‌سازی شده، کاهش یافته است. همچنین شکل ۳، شاخص سازگاری کدون ژن CtxB قبل و بعد از بهینه‌سازی را نشان می‌دهد که از ۰/۶۱ به ۰/۹۲ بعد از بهینه‌سازی رسیده است.

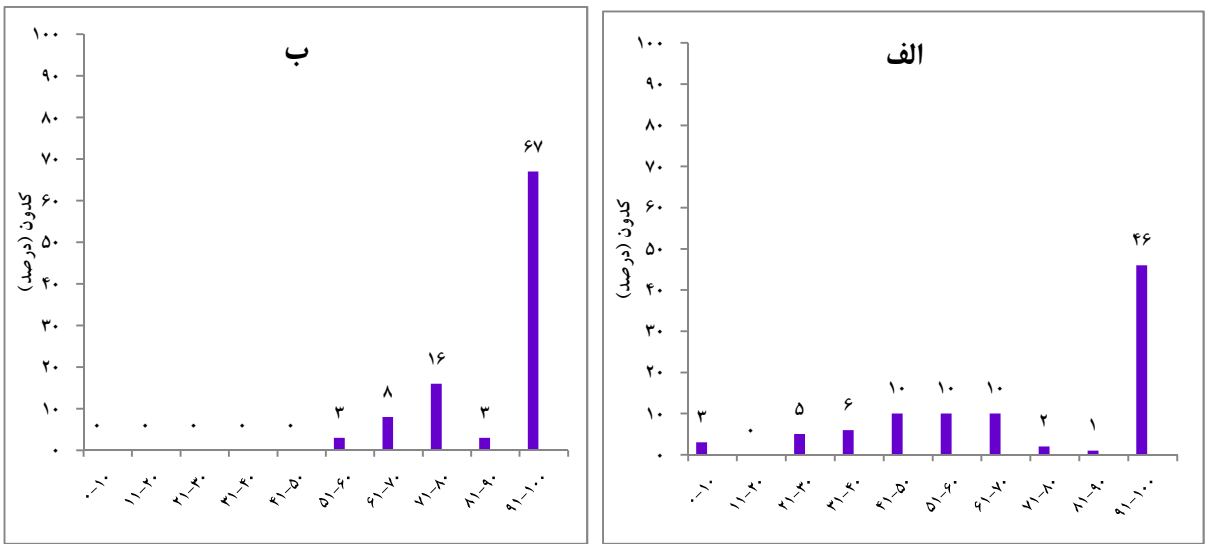
نتایج حاصل از جستجوی توالی نوکلئوتیدی در بانک‌های اطلاعاتی پروتئینی BLASTx نشان داد که این توالی به صورت کامل و ۱۰۰ درصد با توالی پروتئین طبیعی همولوژی دارد.

ساختار ثانویه‌ی mRNA پس از بهینه‌سازی کدون‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۴). میزان حداقل انرژی ساختار mRNA نیز ۷۶/۰۶- کیلوکالری بر مول بود. همچنین، ساختارهای نامناسب که بر فرایند ترجمه‌ی پروتئین مؤثر هستند، نیز دیده نشد.

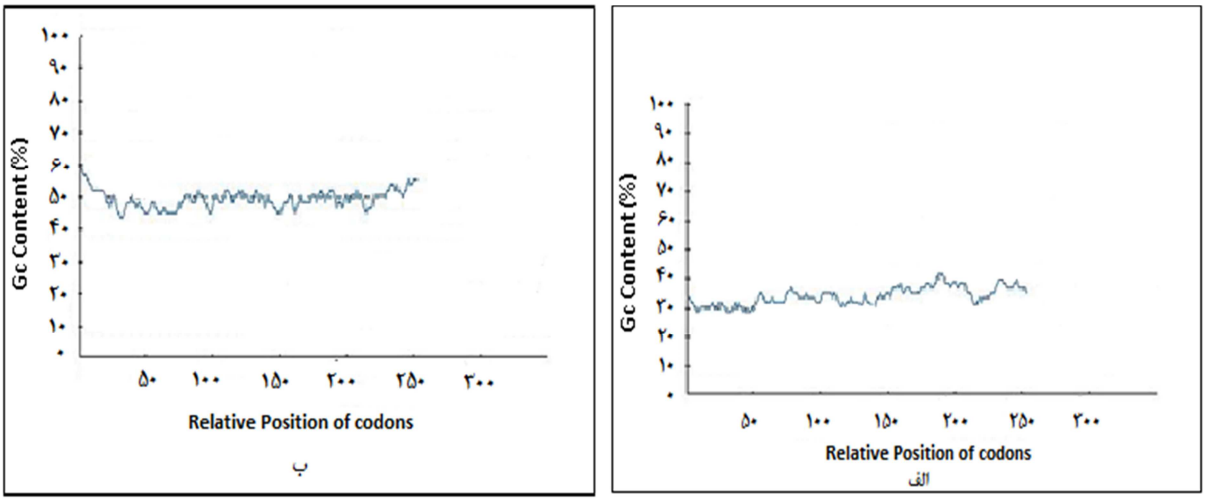
استخراج پلاسمید از باکتری E. coli با روش لیز قلیایی انجام و روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. بررسی صحت پلاسمید حاوی ژن با روش هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI و HindIII انجام گرفت و صحت سازه‌ی ژنی تأیید شد (شکل ۵).

نتایج بررسی بیان ژن مورد مطالعه (pET۲۸a/CtxB) با استفاده از بررسی کل محتوای پروتئینی سلول‌های بیانی جمع‌آوری شده بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE، مورد تأیید قرار گرفت. در نمونه‌های القا شده، پروتئین با بیان بسیار بالا مشاهده شد؛ در حالی که در نمونه‌های القا نشده، پروتئین CtxB وجود نداشت (شکل ۶).

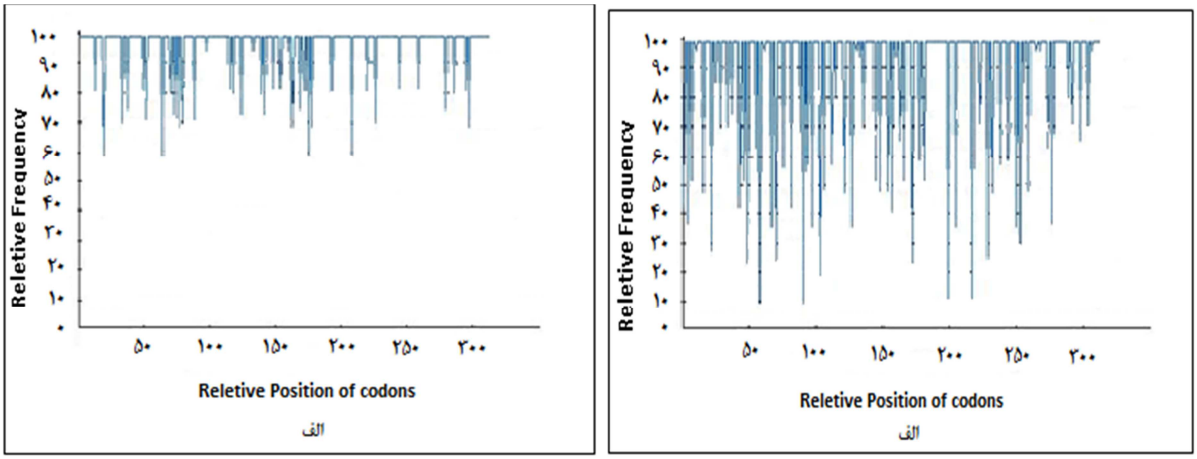
بررسی حلالیت پروتئین نشان داد که پروتئین به صورت اجسام انکلوژنی در سیتوپلاسم تجمع پیدا می‌کند.



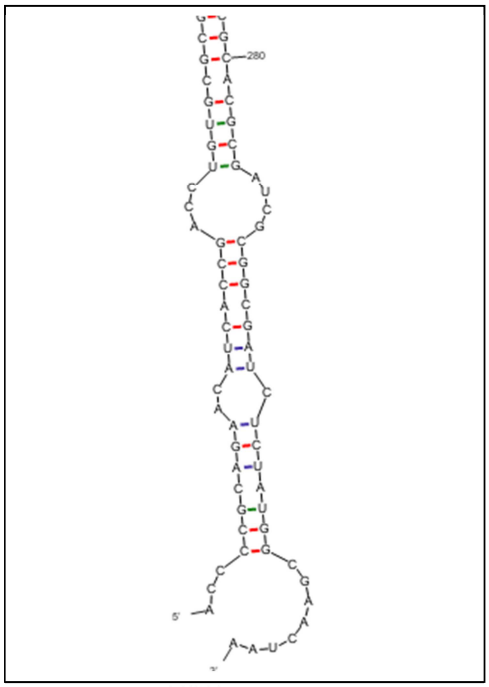
شکل ۱. درصد توزیع کدون‌های مربوط به ژن طبیعی CtxB (الف) و ژن بهینه‌سازی شده‌ی CtxB (ب)
به کدون‌هایی که بالاترین فراوانی را دارند، ارزش ۱۰۰ داده شده است.



شکل ۲. متوسط درصد بازهای GC مربوط به ژن طبیعی CtxB (الف) و ژن بهینه‌سازی شده‌ی CtxB (ب)



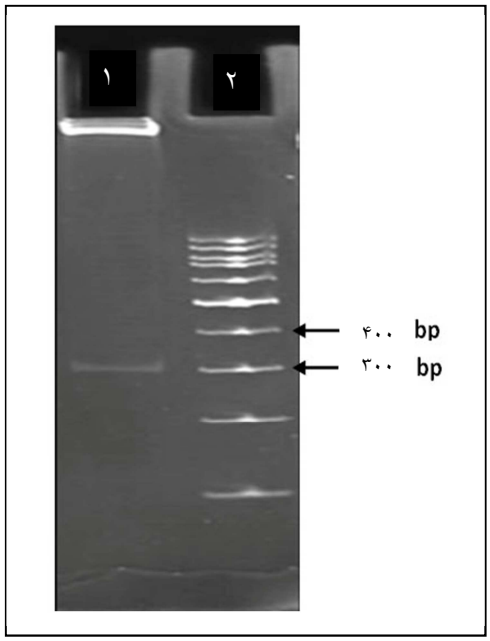
شکل ۳. شاخص سازگاری کدون (**CAI** یا **Codon adaptation index**) مربوط به ژن طبیعی **CtxB** (الف) و ژن بهینه‌سازی شده‌ی **CtxB** (ب)



شکل ۴. پیش‌بینی ساختار ثانویه‌ی **mRNA** پس از بهینه‌سازی کدون‌های ژن **CtxB**

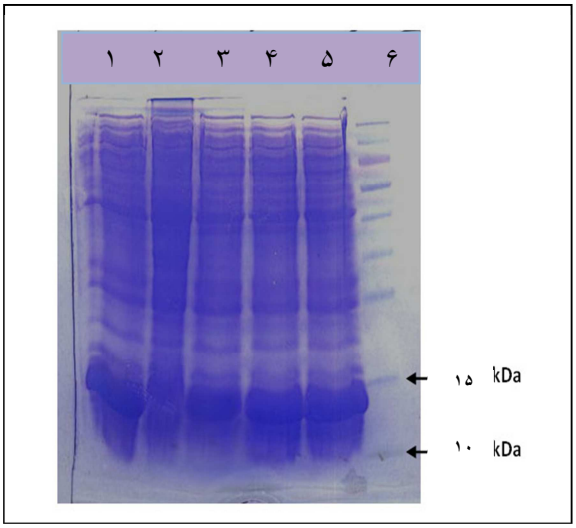
ساختار ناحیه‌ی شروع ۵' mRNA نشان داده شده است.

نتایج حاصل از تکنیک ایمونوبلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی Anti-CTX، پروتئین نوترکیب حاصل از بیان ژن CtxB را در مقایسه با شاهد، به خوبی تأیید نمود (شکل ۷). نتایج حاصل از تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل- نیتریلو استیک اسید، بیانگر وجود پروتئین نوترکیب در نمونه‌ی جمع‌آوری شده از مرحله‌ی آخر شستشو با درجه‌ی خلوص بالا بود (شکل ۸).



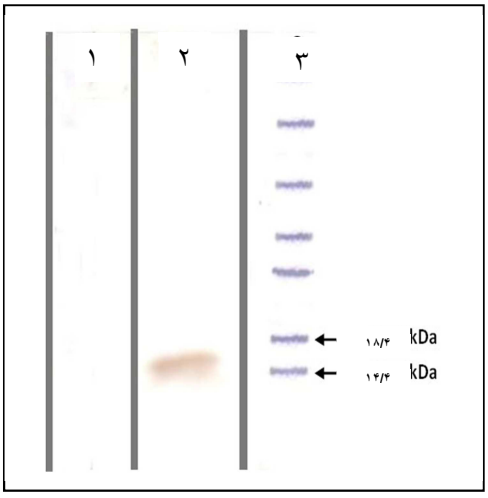
شکل ۵. تأیید همسانه‌سازی ژن **CtxB** در پلاسمید **pET۲۸a** به روش هضم آنزیمی

ستون ۱) هضم آنزیمی پلاسمیده‌ی تخلیص شده، ستون ۲) نشانگر اندازه‌ی DNA (DNA Ladder ۱۰۰ bp فرمتاز)



شکل ۶. بررسی بیان پروتئین CtxB بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو

ستون ۱، ۳، ۴، ۵ نمونه‌های بعد از القا، ستون ۲ نمونه‌ی قبل از القا، ستون ۶ نشانگر اندازه‌ی پروتئین (SM۰۶۷۱ فرمنتاز)

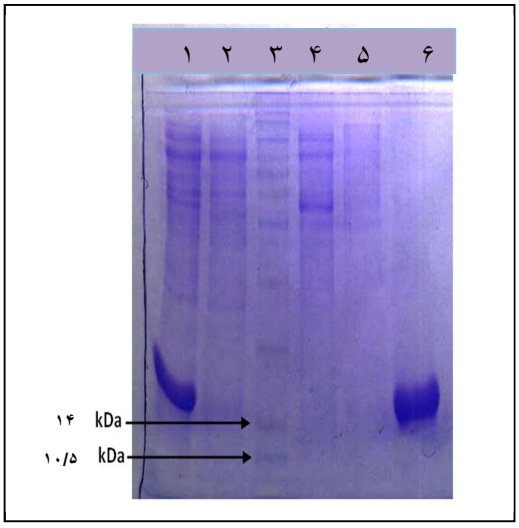


شکل ۷. تأیید پروتئین نوترکیب به روش Western blotting با استفاده از Anit-CTX

ستون ۱ نمونه‌ی قبل از القا، ستون ۲ نمونه‌ی بعد از القا، ستون ۳ نشانگر اندازه‌ی پروتئین (SM۰۴۳۱ فرمنتاز).

بحث

ژن CtxB بعد از طراحی و انجام بررسی‌های بیوانفورماتیکی و سنتز، به باکتری BL۲۱ DE۳ E.coli منتقل شد. تمامی نتایج از جمله تعیین وزن



شکل ۸. بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS- PAGE ۱۲ درصد

ستون ۱ نمونه‌ی قبل از تخلیص، ستون ۲ نمونه‌ی خروجی قبل از شستشو، ستون ۴ و ۵ نمونه‌ی خروجی پس از شستشو با بافر C و D، ستون ۶ پروتئین تخلیصی شده با بافر استخراج E، ستون ۳ نشانگر اندازه‌ی پروتئین (PR۰۶۰۲۰ ویوانتیس).

مولکولی بیان شده و واکنش آن با Anti-CTX مؤید بیان زیر واحد B کلرا توکسین است. مطالعات مختلف نشان داده است که بر خلاف کلرا توکسین که دارای سمیت است و استفاده از آن به حیوان محدود شده است، CtxB دارای خاصیت ایمونوژنی و ادجوانی مخاطی می‌باشد (۱۵). Isaka و همکاران نشان دادند که زیر واحد بتای سم کلرا و تجویز آن از طریق بینی به همراه توکسوئید دیفتری عملکرد ادجوانی مناسبی را به همراه دارد (۲۰).

Kundu و همکاران زیر واحد بتا از سم و باکتری ویبریو کلرا O۱ را تکثیر و در وکتور pET-۱۴b زیر همسانه‌سازی و بیان کردند. نتایج تحقیقات نشان داده است که استفاده از CtxB علاوه بر عملکرد ادجوانی به تنهایی توانسته است تا ۷۰ درصد از فعالیت سم ممانعت کند (۲۱). در واقع، CtxB با اتصال به

آنتی‌ژن‌ها، موجب تحریک پاسخ ایمنی به واسطه‌ی برهمکنش آنتی‌ژن با سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن (APC یا Antigen-presenting cell) موجود در مخاط گوارش و تنفس می‌شود. CtxB به صورت کوالان به آنتی‌ژن‌ها متصل می‌شود و آن‌ها را از طریق گانگلیوزید GM۱ به سلول‌های مخاطی حمل می‌کند و بدین ترتیب، خاصیت ادجوانی CtxB زمانی که به صورت کونژوگه همراه با سایر پروتئین‌ها باشد، تأیید شده است (۲۰، ۱۵).

از آن جا که تولید بالای پروتئین نوترکیب، یکی از نکات مهم در تهیه‌ی کاندیداهای واکسن می‌باشد، نتایج این تحقیق نشان داد که بهینه‌سازی ژن به منظور بالا بردن تولید پروتئین، راهکاری مناسب است. ضیغمی و همکاران در تحقیقی زیر واحد بتای سم کلرا را از طریق (Polymerase chain reaction) PCR تکثیر و پس از همسانه‌سازی در وکتور بیانی، به صورت نوترکیب تولید کردند (۲۲). میزان تخلیص پروتئین نوترکیب مورد نظر ۴۸۰ میکروگرم در لیتر گزارش شد که در مقایسه با میزان تخلیص پروتئین تولید شده در تحقیق حاضر (۹ میلی‌گرم در لیتر) بسیار کمتر می‌باشد. همچنین در تحقیق حاضر، بر خلاف روش ضیغمی و همکاران، از آنتی پروتئاز نیز استفاده نشده است.

Kundu و همکاران نیز این زیر واحد را در وکتور pET-۱۴b زیر همسانه‌سازی و بیان کرد؛ اما در مقاله‌ی آن‌ها اشاره‌ای به میزان تولید پروتئین در هر لیتر از محیط کشت نشده است (۲۱).

یکی از ویژگی‌های مهم زیر واحد بتای سم کلرا، تشابه بسیار زیاد آن با زیر واحد بتای سم حساس به حرارت اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک می‌باشد. از آن جا که این دو پروتئین دارای اپی‌توپهای مشترک می‌باشند (۲۳)، می‌توان در تحقیقات مربوط به ایمنی‌زایی علیه اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک از آنتی‌بادی تولید شده علیه CtxB نیز استفاده کرد.

با توجه به خواص ادجوانی و همچنین اهمیت این پروتئین در واکسن‌سازی، به نظر می‌رسد بیان این پروتئین به صورت نوترکیب، روش مناسب، کارا و مقرون به صرفه‌ای برای تولید این پروتئین و انجام مطالعات بعدی مانند اثرات ایمنی‌زایی آن به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ایمونوژن و همچنین به صورت‌های مختلف مانند خوراکی باشد

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی گروه و مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) در انجام این تحقیق، قدردانی می‌شود.

References

1. Mousavi SL, Nazarian S, Amani J, Rahgerdi AK. Rapid screening of toxigenic vibrio cholerae O1 strains from south Iran by PCR-ELISA. Iran Biomed J 2008; 12(1): 15-21.
2. Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera: a great global concern. Asian Pac J Trop Med 2011; 4(7): 573-80.
3. Vanden Broeck D, Horvath C, De Wolf MJ. Vibrio cholerae: cholera toxin. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(10): 1771-5.
4. Hill DR, Ford L, Lalloo DG. Oral cholera vaccines: use in clinical practice. Lancet Infect Dis 2006; 6(6): 361-73.
5. Mousavi SL, Rasouli I, Nazarian SH, Amani J. Simultaneous detection of escherichia coli o157:h7, toxigenic vibrio cholerae, and salmonella typhimurium by multiplex pcr. Iran J Clin Infect Dis 2009; 4(2): 97-103. [In Persian].

6. Bharati K, Ganguly NK. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. Indian J Med Res 2011; 133: 179-87.
7. Banerjee R, Das B, Balakrish NG, Basak S. Dynamics in genome evolution of Vibrio cholerae. Infect Genet Evol 2014; 23: 32-41.
8. Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. Cell Mol Life Sci 2008; 65(9): 1347-60.
9. Ahmadi S, Mousavi ML, Sorouri R, Salimian J, Karimi A, Nazarian SH, et al. Rapid detection of toxigenic vibrio cholera o1 using PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). Kowsar Medical Journal 2006; 11(1): 41-50. [In Persian].
10. De Haan L, Hirst TR. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). Mol Membr Biol 2004; 21(2): 77-92.
11. Fan JL, Peterson JW, Prabhakar BS. Adjuvant effects of cholera toxin b subunit on immune response to recombinant thyrotropin receptor in mice. J Autoimmun 2000; 14(1): 43-52.
12. Sun JB, Eriksson K, Li BL, Lindblad M, Azem J, Holmgren J. Vaccination with dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen conjugated to cholera toxin efficiently induces specific tumoricidal CD8+ cytotoxic lymphocytes dependent on cyclic AMP activation of dendritic cells. Clin Immunol 2004; 112(1): 35-44.
13. Tochikubo K, Isaka M, Yasuda Y, Kozuka S, Matano K, Miura Y, et al. Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. Vaccine 1998; 16(2-3): 150-5.
14. Kim HJ, Kim JK, Seo SB, Lee HJ, Kim HJ. Intranasal vaccination with peptides and cholera toxin subunit B as adjuvant to enhance mucosal and systemic immunity to respiratory syncytial virus. Arch Pharm Res 2007; 30(3): 366-71.
15. de Geus B, Dol-Bosman M, Scholten JW, Stok W, Bianchi A. A comparison of natural and recombinant cholera toxin B subunit as stimulatory factors in intranasal immunization. Vaccine 1997; 15(10): 1110-3.
16. Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. Nucleic Acids Res 2007; 35(Web Server issue): W126-W131.
17. Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. J Microbiol Methods 2012; 90(1): 36-45.
18. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 2003; 31(13): 3406-15.
19. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiol Res 2014; 169(2-3): 205-12.
20. Isaka M, Yasuda Y, Kozuka S, Taniguchi T, Matano K, Maeyama J, et al. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. Vaccine 1999; 18(7-8): 743-51.
21. Kundu J, Mazumder R, Srivastava R, Srivastava BS. Intranasal immunization with recombinant toxin-coregulated pilus and cholera toxin B subunit protects rabbits against Vibrio cholerae O1 challenge. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 56(2): 179-84.
22. Zeighami H, Sattari M, Rezayat M. Purification of the recombinant beta subunit of Vibrio cholera entrotoxin. J Arak Univ Med Sci 2011; 14(3): 27-35. [In Persian].
23. Lebens M, Shahabi V, Backstrom M, Houze T, Lindblad N, Holmgren J. Synthesis of hybrid molecules between heat-labile enterotoxin and cholera toxin B subunits: potential for use in a broad-spectrum vaccine. Infect Immun 1996; 64(6): 2144-50.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 30.01.2014
Vol. 32, No. 279, 4th Week, May 2014
Accepted: 20.04.2014

Bioinformatical Study and Evaluation of Expression of Cholera Toxin Subunit B Optimized Gene as a Vaccine Candidate

Shahram Nazarian PhD[1], Mohhamad Ali Arefpour MSc[1], Mohhamd Javad Bagheripour[2], Golamreza Olad PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Cholera is a lethal diarrheal disease caused by Vibrio cholerae. Cholera toxin is the major virulence factor in pathogenesis of Vibrio cholerae. The B subunit of the enterotoxin, which is responsible for toxin binding to eukaryotic cells, has immunogenic properties. The aim of this study was bioinformatic investigation and production of recombinant cholera toxin subunit B (CtxB).

Methods: CtxB gene was analysed for rare codons and gene optimization was performed using optimization software. Recombinant pET28a/ctxb plasmid was transformed to E. coli BL21 DE3 and expression was induced with Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The protein expression was evaluated using Sodium dodecyl sulphate- Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blotting analysis. The recombinant protein was purified using Nickel-Nitrilotriacetic acid (Ni–NTA) affinity chromatography.

Findings: Codon adaptation index (CAI) on the native gene was 0.61, while the optimized sequence had a CAI of 0.92. Percentage of codon having high-frequency distribution was improved to 67%. Restriction analysis confirmed cloning of the CtxB gene into pET28a vector. Western blotting showed specific reactivity of recombinant protein with anti-CTX antibody. The total yield of purified protein was 9 mg/l.

Conclusion: The results indicated that CtxB gene optimization is a useful approach to high-level expression of recombinant protein. The protein could be produced in capsulated form for oral immunization purpose.

Keywords: Cholera toxin, Cholera enterotoxin subunit B (CtxB), Gene optimization, Recombinant protein

Citation: Nazarian Sh, Arefpour MA, Bagheripour MJ, Olad G. **Bioinformatical Study and Evaluation of Expression of Cholera Toxin Subunit B Optimized Gene as a Vaccine Candidate.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(279): 378-87

1- Biology Research Centre, School of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
2- PhD Student in Nanobiotechnology, Biology Research Centre, School of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3- Applied Biotechnology Research Centre, Baqitatolah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Shahram Nazarian, Email: nazarian56@gmail.com