

Cloning, Expression and Purification of P₆₄₇₋₁₅₃ of *Haemophilus influenzae*

Nojoomi F¹, Mohabati Mobarez A^{1*}, Salmanian AH², Siadat SD³, Khoramabadi N¹, Aghababa H¹

¹ Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

³ Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute, Tehran, Iran

* Corresponding Author. Tel: +982182883862 Fax: +982182884555 E-mail: mmmobarez@modares.ac.ir

Received: 22 October 2011 Accepted: 4 January 2012

ABSTRACT

Background & Objectives: *Haemophilus influenzae* is a Gram-negative bacterium that is part of the normal nasopharyngeal flora of most humans. *H. influenzae* strains were defined in two categories: encapsulated (typeable) and non-encapsulated (nontypeable) strains. Outer membrane protein P6 is a highly conserved and stable protein in the outer membrane of both encapsulated and non-encapsulated strains of *H. influenzae*. As an immunogen, P6 protein is a potential candidate vaccine against *H. influenzae* strains. The aim of this study was to produce recombinant protein P6 as a carrier protein for production of conjugate vaccines.

Methods: The sequence (324 bp) coding P₆₄₇₋₁₅₃ protein of *H. influenzae* was successfully cloned in pJET1.2 and subsequently in pET28a (+). Expression of the recombinant protein was induced with 1mM IPTG. Recombinant P₆₄₇₋₁₅₃ was purified through dissolving inclusions in 8M urea buffer, absorbing to Ni-NTA resins, washing by buffers with decreasing urea concentration and finally eluted in Imidazole solution. Imidazole was removed by dialysis against PBS (pH 7.4). The recombinant p₆₄₇₋₁₅₃ was confirmed by western blot analysis using rabbit anti *H. influenzae* polyclonal antiserum.

Results: The recombinant P₆₄₇₋₁₅₃ was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified (4 mg /lit of broth culture). The immunoblotting showed that recombinant P₆₄₇₋₁₅₃ conserved its native antigenic structure.

Conclusion: Western blot results, along with that of sequencing, confirmed accurate production of recombinant P₆₄₇₋₁₅₃ and partially retention of its conformational epitopes.

Keywords: *Haemophilus influenzae*; P₆₄₇₋₁₅₃; Cloning and Expression

کلون، بیان و تخلیص پروتئین P6₄₇₋₁₅₃ هموفیلوس آنفلوانزا

فرشاد نجومی^۱، اشرف محبتی مبارز^{۱*}، علی هاتف سلمانیان^۲، سید داور سیادت^۳، نیما خرم آبادی^۱
هانیه آقابابا^۱

^۱ گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ^۲ گروه بیوتکنولوژی گیاهی، مؤسسه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران ^۳ گروه ایدز و هپاتیت، انستیتو پاستور، تهران، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱ ۸۲۸۸۳۸۶۲ فاکس: ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۵۵۵ E-mail: mmmobarez@modares.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: هموفیلوس آنفلوانزا، باسیل گرم منفی است که بخشی از میکروفلور نازوفارنکس را در اغلب افراد تشکیل داده و سویه های مختلف آن در دو گروه کپسولدار (قابل طبقه بندی) و بدون کپسول (غیرقابل طبقه بندی) مورد مطالعه قرار می گیرد. پروتئین غشاء خارجی P6، نوعی ایمونوژن حفاظت شده و پایدار در میان سویه های فاقد کپسول و نیز سویه های کپسولدار هموفیلوس آنفلوانزا می باشد و خود بعنوان کاندید مناسبی جهت واکسیناسیون علیه هموفیلوس آنفلوانزا مطرح گردیده است. هدف از این مطالعه، تولید و تخلیص آنتی ژن نوترکیب P6 به عنوان یک پروتئین حامل در واکنش های کونژوگه می باشد.

روش کار: قطعه ای به طول ۳۲۴ جفت باز از بخش انتهایی ژن کد کننده پروتئین P6 در حامل پلاسمیدی pJET1.2 و متعاقباً در pET28a(+) کلون شد. القای تولید پروتئین با یک میلی مولار IPTG صورت گرفت و تخلیص آن با حل کردن اجسام سلولی در اوره، جذب با رزین نیکل، حذف اوره با شیب کاهشی اوره در محلول های شستشو و نهایتاً جمع آوری پروتئین نوترکیب به شکل محلول در ایمیدازول انجام شد. حذف ایمیدازول با دیالیز در برابر بافر فسفات نمکی صورت پذیرفت. پروتئین نوترکیب P6₄₇₋₁₅₃ با استفاده از آنتی سرم پلی کلونال خرگوشی ضد هموفیلوس آنفلوانزا با استفاده از روش وسترن بلات تایید گردید.

یافته ها: پروتئین نوترکیب P6₄₇₋₁₅₃ در میزبان *E. coli* BL21(DE3) با موفقیت بیان و تخلیص گردید (حدود ۴ میلی گرم در هر لیتر کشت مایع LB). ساختار آنتی ژنی پروتئین نوترکیب P6 نیز با استفاده از ایمونوبلاستینگ تأیید شد. **نتیجه گیری:** نتایج وسترن بلات به موازات نتایج تعیین توالی، حاکی از صحت تولید پروتئین P6₄₇₋₁₅₃ نوترکیب و حفظ نسبی ساختار اپی توپی آن می باشد.

کلمات کلیدی: هموفیلوس آنفلوانزا؛ کلون و بیان؛ P6₄₇₋₁₅₃

دریافت: ۹۰/۷/۱۵ پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۰

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا، باسیل گرم منفی هوازی اختیاری، فاقد اسپور و تاژک که براساس وجود یا عدم وجود کپسول پلی ساکارییدی به ۲ گروه قابل طبقه بندی (کپسولدار) و غیرقابل طبقه بندی (فاقد کپسول) تقسیم می شود. جنس کپسول هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b از پلی ریپوزیل

ریبیتول فسفات (PRP) است و از مهمترین عوامل مننژیت باکتریائی در انسان خصوصاً در سنین ۳ ماهگی الی ۳ سالگی می باشد. هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b تا پیش از انجام برنامه های مدون واکسیناسیون (حدود ۲۰ سال پیش) به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر نوزادان در سراسر جهان شمار می رفت [۱،۲].

روش کار

سویه های باکتریایی، وکتورها و آنزیم ها

هموفیلوس آنفلوانزا سویه استاندارد ATCC 10211 از انستیتو پاستور ایران (بخش تولید واکسنهای باکتریال) تهیه گردید. از سویه های باکتریائی *E. coli* GM2163 و *E. coli* BL21(DE3) نیز به ترتیب به عنوان میزبان های تکثیری و بیانی استفاده شد. پلاسمید تکثیری pJET1.2 از (Fermentas) و پلاسمید بیانی pET28a(+) (Novagen) جهت کلون سازی ژن هدف، مورد استفاده قرار گرفتند. آنزیم های محدود اثر *Bam*HI و *Hind*III شرکت فرمنتاز و DNA لیگاز (Takata)T4 استفاده شدند. از آنزیم DNA پلیمرز PrimeSTAR® که قدرت تصحیح خطای بسیار بالایی دارد، جهت تکثیر قطعه ژن هدف از ژنوم باکتری با PCR استفاده گردید.

کشت باکتری و استخراج DNA هموفیلوس آنفلوانزا
ابتدا با تلقیح نیم میلی لیتر محیط کشت مایع (BHI) به داخل ویال باکتری لیوفیلیزه شده و انکوباسیون بمدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۵٪ CO₂، احیاء اولیه باکتری صورت گرفت. پس از آن باکتری به محیط کشت شکلات آگار انتقال یافت. پلیت ها بمدت ۴۸ ساعت در جار شمع دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از این مدت کلنی های گرد و محدب سفید مایل به خاکستری به قطر تقریبی ۲ الی ۳ میلی متر در سطح پلیت با بصورت خالص مشاهده گردید. پس از انجام آزمونهای بیوشیمیائی و آگلوتیناسیون روی لام در مجاورت آنتی سرم اختصاصی کپسول پلی ساکاریدی، باکتری هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b، شناسائی و تأیید شد. سپس ۱ تا ۲ کلنی جوان از کشت ۴۸ ساعته باکتری با استفاده از لوپ استریل به داخل میکروتیوبهای ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد و ۱ میلی لیتر نرمال سالین استریل به هر میکروتیوب اضافه گردید. سانتریفوژ در دور ۱۰ هزار بمدت ۳

سویه های کپسول دار هموفیلوس از قدرت تهاجمی بیشتری برخوردار بوده و معمولاً عفونتهای منتشر و مهاجم در انسان از قبیل مننژیت، آرتریت عفونی، باکتری می، سپتی سمی و اپی گلویتیت ایجاد می نمایند. آنتی ژن کپسولی در این باکتریها از جنس پلی ساکارید است و همانند سایر آنتی ژنهای پلی ساکاریدی جزء آنتی ژنهای غیروابسته به تیموس و لنفوسیت T می باشد که به همین دلیل، پاسخ ایمنی ضعیفی را خصوصاً در کودکان زیر ۲ سال بر می انگیزد، لذا این آنتی ژنها به منظور تولید واکسن باید بصورت کونژوگه با یک پروتئین حامل مثل توکسوئید دیفتری، توکسوئید کزاز و یا پروتئین غشاء خارجی مننگوکوک مورد استفاده قرار گیرند [۳، ۴].

امروزه ثابت شده که وجود آنتی بادی محافظت کننده بر علیه برخی از پروتئین های غشاء خارجی از جمله پروتئین P6 و نیز برضد کپسول پلی ساکاریدی می تواند نقش مهمی در پیشگیری از عفونتهای موضعی و یا منتشر ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا داشته باشد [۵، ۶].

پروتئین P6 حدود ۱ الی ۵ درصد کل پروتئینهای غشاء خارجی هموفیلوس آنفلوانزا را تشکیل داده، لیوپروتئینی به وزن تقریبی ۱۶ کیلو دالتون و مشتمل بر ۱۵۳ اسید آمینه است که از همولوژی بسیار بالائی در میان سویه های فاقد کپسول و نیز سروتیپ b هموفیلوس آنفلوانزا برخوردار بوده، در مطالعات با استفاده از مونوکلونال و پلی کلونال آنتی بادی، این پروتئین حفاظت شده گزارش شده است. این پروتئین بشدت ایمونوژن و آنتی بادی علیه آن باکتری سیدال می باشد. لذا با توجه به اهمیت این پروتئین در ایجاد پاسخهای ایمنی محافظتی علیه هموفیلوس آنفلوانزا، در این مطالعه اقدام به کلون و بیان این پروتئین در میزبان *E. coli* شد. این پروتئین می تواند به عنوان یک کاندیدای مناسب جهت تولید واکسن علیه هموفیلوس آنفلوانزا مطرح باشد [۷-۱۱].

ثانیه)، ۵۹ درجه سانتیگراد (۱۵ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه) و در نهایت یک مرحله ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

کلون سازی ژن کد کننده پروتئین P6

محصول تکثیر ژن p6 (۳۴۲ جفت باز) بعد از تکثیر با آنزیم DNA پلیمراز PrimeSTAR[®] و خالص سازی از روی ژل آگارز، در پلاسمید pJET1.2 طبق دستورالعمل شرکت و اکنش الحاق به باکتری *E. coli* GM2163 انتقال داده شد. غربالگری پلاسمیدهای حاوی ژن هدف با روش PCR مستقیم روی کلنی و با استفاده از پرایمرهای عمومی pJET1.2 و متعاقب آن پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن کد کننده P6 صورت گرفت. با هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب، کلون شدن ژن پروتئین P6 در پلاسمید pJET1.2 تأیید شد. تأیید نهایی پلاسمیدهای نوترکیب، با توالی یابی انجام گرفت. نتایج توالی یابی آنها با استفاده از نرم افزار Vector NTI Advanced[™] 11.0 بررسی و با توالی مرجع مقایسه شد. قطعه کلون شده ژن پروتئین P6 با هضم آنزیمی توسط آنزیم های *Bam*HI و *Hind*III از pJET1.2 خارج و بعد از خالص سازی داخل (+) pET28a که توسط همین دو آنزیم بریده، خطی و سپس خالص شده بود، مجدداً به واکنش الحاق وارد گردید. پلاسمیدهای نوترکیب (pET28a-P6) به باکتری *E. coli* GM 2163 منتقل و کلون های نوترکیب از طریق PCR مستقیم روی کلنی با پرایمرهای عمومی T7 و متعاقب آن با پرایمرهای اختصاصی ژن پروتئین P6 غربالگری شدند. تأیید نهایی پلاسمیدهای نوترکیب pET28a-P6 با هضم آنزیمی و توالی یابی انجام گرفت.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب P6 (rP6)

پلاسمید نوترکیب pET28a-P6 به میزبان بیانی *E. coli* BL21(DE3) انتقال داده شد. باکتریهای حاوی پلاسمید نوترکیب (pET28a-P6) در محیط

دقیقه صورت گرفت و پس از آن، مایع فوقانی دور ریخته شد. عمل شستشو و سانتریفوژ تا ۳ نوبت تکرار گردید و در نهایت توده سلولی مورد نظر جهت استخراج DNA بدست آمد. استخراج ژنوم باکتری با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA (Bioneer) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

پرایمرها و شرایط PCR

مقادیر مورد استفاده در واکنش PCR جهت تکثیر ژن p6 شامل: ۲ میکرولیتر از بافر 10x، ۰/۸ میکرولیتر از کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت 10pmol/μl، یک میکرولیتر از DNA الگو با غلظت 175 μg/ml، یک میکرولیتر از dNTPs، 2.5mM و ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم DNA پلیمراز *Taq* با غلظت 5u/μl در حجم نهائی ۲۰ میکرولیتر تهیه شدند.

توالی های ثبت شده ژن p6 هموفیلوس آنفلوانزا در بانک ژنی، از پایگاه NCBI اخذ و توسط نرم افزارهای MEGA4 و VectorNTIAdvanced[™] 11.0 بررسی قرار گرفت. یک جفت پرایمر برای تکثیر ناحیه کد کننده مربوط به اسیدهای آمینه ۴۷ الی ۱۵۳ این پروتئین طراحی شد که عبارتند از پرایمر بالادست با ۳۱ نوکلئوتید

(5'-AGAGGATCCCGTTACAATACCGTTTATTTTCG-3')

و پرایمر پائین دست با ۳۳ نوکلئوتید

(5'-TATAAGCTTTTAGTACGCTAACACTGCACGACG-3')

سایت برش برای آنزیم *Bam*HI در انتهای ۵' پرایمر بالادست و سایت برش برای آنزیم *Hind*III در انتهای ۵' پرایمر پائین دست طراحی شد (حروف زیر خط دار).

تکثیر ژن مورد نظر با PCR توسط آنزیم DNA پلیمراز PrimeSTAR[®] انجام گرفت. واکنش تحت برنامه دمایی شامل ۹۸ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ دوره شامل ۹۸ درجه سانتی گراد (۱۵

مولار) انجام و در نهایت پروتئین ها با استفاده از محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار از ستون جدا و جمع آوری شدند. برای حذف ایمیدازول، محلول پروتئینی در برابر بافر فسفات نمکی (pH ۷/۴) به مدت ۳۶ ساعت دیالیز شد. میزان پروتئین با روش اسپکتروفوتومتری تعیین و مقدار کل پروتئین محلول خالص شده از یک لیتر کشت باکتری محاسبه گردید.

تأیید آنتی ژنی پروتئین تخلیص شده با روش وسترن بلات

پروتئین نوترکیب از ژل پلی آکرلامید به کاغذ پلی وینیلیدین دی فلوراید (PVDF) در شرایط نیمه خشک منتقل شد (Bio Rad). برای کنترل انتقال پروتئین از رنگ پانسواس استفاده و غشا به نوارهای نازک حاوی پروتئین منتقل شده بریده شد. مسدودسازی غشای PVDF با محلول آلبومین سرم گاوی (BSA) ۵٪ به مدت ۱ ساعت انجام گرفت. در مرحله بعد این غشاء با محلول حاوی رقت ۱:۵۰۰۰ آنتی سرم پلی کلونال خرگوشی ضد هموفیلوس آنفلوانزا سویه استاندارد ATCC 10211 (تولید داخلی بخش واکسن های باکتریال انستیتو پاستور) به مدت ۲ ساعت مجاور شد. شستشو با بافر تریس نمکی حاوی ۰/۰۵٪ توئین ۲۰ (TBS-T) انجام گرفت. غشاء با آنتی بادی های ثانویه (ضد IgG خرگوشی ۱:۱۰۰۰۰) برای مدت ۲ ساعت مجاور گردید. غشاء پس از شستشو با محلول سوپسترای رنگزای دی-آمینوبنزدین (DAB) مجاور شده و باندهای مربوطه پس از ظهور اسکن گردید.

یافته ها

کلون سازی و تعیین توالی ژن کد کننده P6
بخش کد کننده اسیدهای آمینه ۴۷ الی ۱۵۳ از ژن کد کننده پروتئین P6 (۳۲۴ جفت باز) به وسیله آنزیم DNA پلیمراز Prime STAR® که دارای قدرت تصحیح خطای بسیار بالایی است تکثیر شد. به سبب

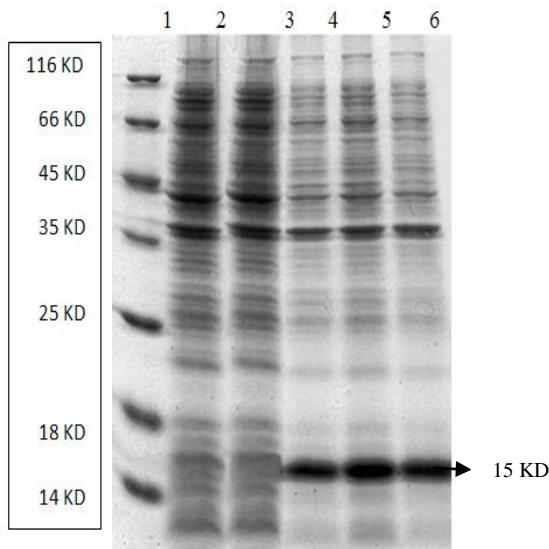
مایع لوریا برتانی (LB) حاوی کانامایسین با غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر تلقیح و ۱۸ ساعت در انکوباتور با حرکت دورانی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. از این کشت ۱۸ ساعته برای تلقیح محیط مایع جدید LB حاوی کانامایسین با غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر استفاده شد. محیط مذکور در انکوباتور با حرکت دورانی قرار گرفت و زمانی که کدورت محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ رسید، بیان پروتئین نوترکیب با ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگلاکتوپیرانوزید (IPTG) یک میلی مولار القا شد. نمونه های زمان صفر الی ۳ ساعت از باکتری های القا شده گرفته شد و میزان بیان پروتئین در زمان های مذکور با الکتروفورز بر روی ژل پلی آکرلامید ۱۵٪ و سپس رنگ آمیزی با کوماسی بلو G-250 مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تولید پروتئین نوترکیب P6₄₇₋₁₅₃ (rP6₄₇₋₁₅₃)، یک کشت ۱۸ ساعته از باکتری *E. coli* BL21(DE3) به شکلی که قبلاً شرح داده شد تهیه و از آن برای تلقیح یک لیتر محیط تازه LB استفاده گردید. بعد از اینکه باکتری ها به کدورت مناسب رسیدند با IPTG ۱ میلی مولار القاء و به مدت ۳ ساعت بعد از آن در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از طی شدن این زمان، سلولهای باکتری با سانتریفیوژ در $9000 \times g$ جمع آوری و با بافر فسفات نمکی شستشو داده شدند. رسوب سلولهای باکتری در بافر B (اوره ۸ مولار + Tris-Cl ۱۰ میلی مولار + NaH₂PO₄ ۱۰۰ میلی مولار) با pH ۸/۵ حل و در $18000 \times g$ بمدت ۳۰ دقیقه بمنظور جداسازی فاز محلول از اجسام سلولی نامحلول سانتریفیوژ شد. سپس رزین نیکل (Ni-NTA) به فاز محلول اضافه و برای ۲ ساعت مخلوط شد. این مخلوط پس از انتقال به ستون پلی استایرنی، با بافر C (اوره ۸ مولار + Tris-Cl ۱۰ میلی مولار + NaH₂PO₄ ۱۰۰ میلی مولار) با pH: ۶/۳ شستشو داده شد. حذف اوره با استفاده از بافرهای حاوی شیب کاهش غلظت اوره (۸، ۶، ۴، ۲، ۱ و صفر

شکل ۲. محصول هضم پلاسمید نوترکیب pET28-p6 با دو آنزیم *HindIII* و *BamHI* بر روی ژل آگارز. چاهک ۱: مارکر 1 kb. چاهکهای ۲ تا ۵: باندهای بالا: pET28a(+) خطی شده / باندهای پائین: قطعه خارج شده مربوط به ژن پروتئین P6

بیان و تخلیص پروتئین rP6₄₇₋₁₅₃

نتایج الکتروفورز ژل پلی آکرلامید، بیان یک پروتئین در محدوده میان باندهای ۱۴ الی ۱۸ کیلودالتونی راهنمای وزنی را نشان می دهد که با وزن مولکولی حدود ۱۵ کیلودالتون پیش بینی شده همخوانی دارد بیان پروتئین ها بین ساعت اول و سوم تفاوت قابل ملاحظه ای نشان نمی دهد (شکل ۳).

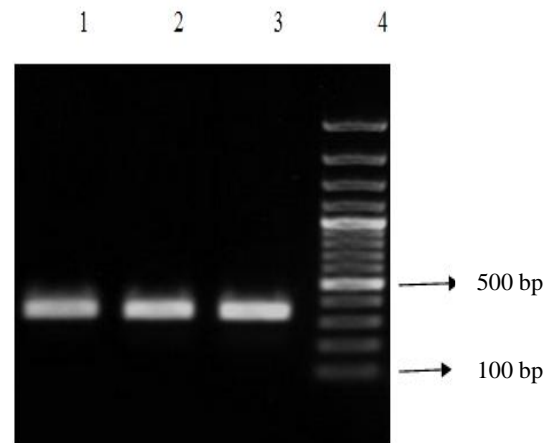


شکل ۳. نتایج القاء و بیان پروتئین نوترکیب rP6₄₇₋₁₅₃ بر روی ژل پلی آکرلامید رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو G-25.

چاهک ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین. چاهک ۲: *E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید دست نخورده pET28a(+). چاهک ۳: *E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-P6 (ساعت صفر). چاهک ۴: *E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-P6 (ساعت اول). چاهک ۵: *E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-P6 (ساعت دوم). چاهک ۶: *E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-P6 (ساعت سوم)

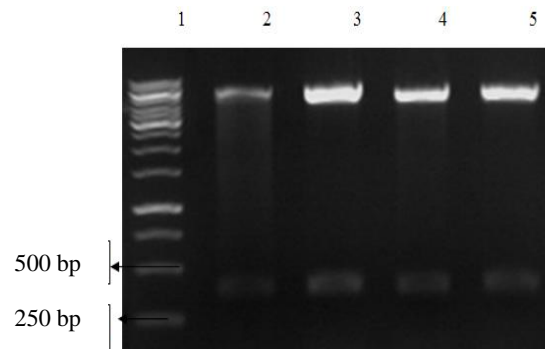
بررسی الکتروفوریک نتایج تخلیص rP6₄₇₋₁₅₃ حاکی از غلظت قابل توجه این پروتئین می باشد (شکل ۲). بر اساس اندازه گیری با روش اسپکتروفوتومتری توسط دستگاه (NanoDrop)، میزان استحصال پروتئین محلول از یک لیتر کشت باکتری میزبان ۴ میلی گرم تعیین شد (شکل ۴).

اضافه شدن توالی های شناسایی کننده آنزیمهای *HindIII* و *BamHI* و سه نوکلئوتید اضافی به عنوان دستگیره آنزیمی در دو طرف، اندازه محصول PCR، ۳۴۲ جفت باز می باشد (شکل ۱).



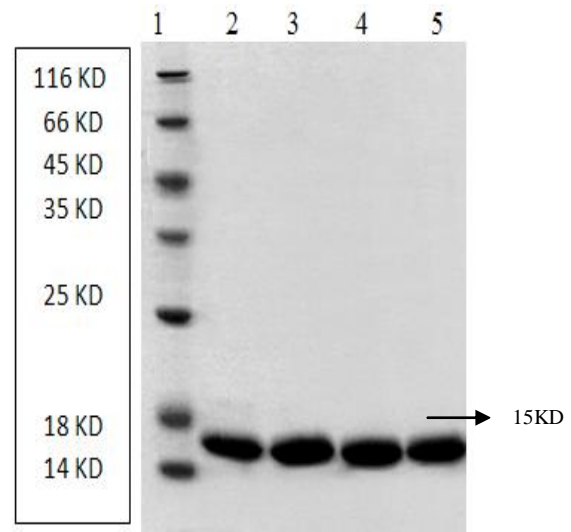
شکل ۱. محصول PCR تکثیرشده با آنزیم DNA پلیمرز Primes TAR[®] بر روی ژل آگارز. چاهکهای ۱ تا ۳: محصول PCR با ۳۴۲ جفت باز، چاهک ۴: مارکر 100 bp

محصول PCR با موفقیت در پلاسمید pJET1.2 کلون شد. هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pJET-P6 و توالی یابی، صحت کلون شدن بخش مورد نظر از ژن کدکننده پروتئین P6 را تأیید می نمایند. مقایسه نتایج توالی یابی با توالی های مرجع نشان داد هیچگونه تغییر و جهشی در این قطعه ژن کلون شده روی نداده است. توالی مورد نظر از ژن پروتئین P6 در پلاسمید (+) pET28a نیز با موفقیت کلون و با هضم آنزیمی (شکل ۲) و در نهایت توالی یابی نیز صحت آن تایید شد.



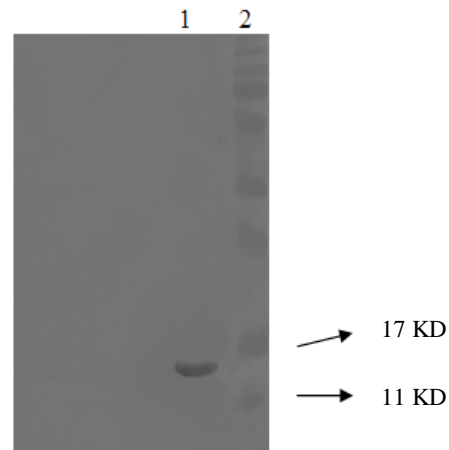
بخصوص هموفیلوس انفولانزا مطرح می باشد لذا شیوه تولید و تخلیص این آنتی ژنها از اهمیت خاصی برخوردار است. پروتئین P6 نیز یکی از آنتی ژنهای غشاء خارجی هموفیلوس انفولانزاست که ساختاری لیپوپروتئینی داشته و از جمله پروتئینهای متصل به دیواره سلولی باکتری بشمار می آید. از این پروتئین میتوان در کنار یک ادجوانت مناسب به عنوان واکنشی علیه سویه های فاقد کپسول هموفیلوس انفولانزا و یا بصورت کونژوگه با یک آنتی ژن پلی ساکاریدی در نقش یک پروتئین حامل استفاده نمود [۱۴-۱۱]. در این تحقیق بخش کد کننده اسیدهای آمینه ۴۷ الی ۱۵۳ ژن پروتئین P6 در پلاسمید بیانی (+) pET28a کلون شد. پروتئین P6₄₇₋₁₅₃ در سویه میزبان *E. coli* BL21(DE3) به میزان چشمگیری تولید گردید. میزان تولید پروتئین نوترکیب rP6₄₇₋₁₅₃ در حدود ۴ میلی گرم در میلی لیتر به ازای هر لیتر کشت باکتری بود که تولید قابل توجهی می باشد. به دلیل اهمیت این پروتئین و نقش مهم آن به عنوان یک کاندید واکنش محققین بسیاری سعی در تولید انبوه آن داشته اند.

اولین بار مانسون^۱ و همکارانش [۱۵] پروتئین P6 را با استفاده از SDS یک درصد، تریس (۰/۵ مولار)، کلرید سدیم (۰/۱ درصد) و ۲-مرکاپتواتانل (pH ۸) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بصورت محلول درآوردند و با استفاده از سانتریفیوژ آن را از سایر اجزاء دیواره سلولی باکتری جدا نمودند. و از ستون کروماتوگرافی S-200 عبور دادند. آنها در گزارش خود اعلام کردند که گرچه جداسازی پروتئین P6 طبیعی با این روش نسبتاً آسان و با صرفه است، اما آثاری از اسید مورامیک در پروتئین استخراج شده از ستون کروماتوگرافی وجود دارد که نشان دهنده آلودگی با پپتیدوگلیکان هموفیلوس انفولانزا می باشد. مانسون و همکارانش بمنظور حذف بقایای



شکل ۴. نتایج تخلیص پروتئین نوترکیب rP6₄₇₋₁₅₃ بر روی ژل پلی آکرلامید رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو G250
چاهک ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین ، چاهکهای ۲ تا ۵: استخراجهای اول تا چهارم پروتئین نوترکیب rP6₄₇₋₁₅₃ خالص شده

نتایج وسترن بلات نشان می دهد rP6₄₇₋₁₅₃ توسط آنتی سرم پلی کلونال خرگوشی ضد هموفیلوس انفولانزا قابل شناسائی می باشد (شکل ۵).



شکل ۵. چاهک ۱: نتیجه آزمون وسترن بلات پروتئین نوترکیب rP6₄₇₋₁₅₃ با استفاده از آنتی سرم پلی کلونال خرگوشی، چاهک ۲: مارکر وزن مولکولی پروتئین

بحث

باتوجه به اینکه پروتئین های غشاء خارجی (OMP)، به عنوان کاندیدهای مهمی جهت واکسیناسیون علیه بسیاری از عفونتهای ناشی از باکتریهای گرم منفی و

¹Munson

کارالوس^۳ و همکاران وی با شیوه ای اصلاح شده اقدام به تولید و تخلیص پروتئین P6 بطور طبیعی از کشت مایع هموفیلوس آنفلوانزا نمودند. آنها از هر لیتر کشت مایع هموفیلوس، حدود ۲ میلی گرم پروتئین طبیعی P6 استخراج کردند که در مقایسه با کارهای مشابه، میزان قابل ملاحظه‌ای بود. اما مشکل اصلی آنها آلودگی پروتئین با لیپو اولیگوساکارید موجود در غشاء خارجی هموفیلوس آنفلوانزا بود [۱۰].

هوتومی^۴ و همکارانش، اقدام به تولید پروتئین نوترکیب P6 فاقد انشعابات لیپیدی در *E. coli* نمودند و پروتئین نوترکیب P6 را بصورت سیتوپلاسمی و محلول تخلیص کردند و اظهار داشتند که پروتئین مذکور واجد ۹۰٪ هومولوژی با پروتئین طبیعی P6 می‌باشد. با این حال آنها نیز به ناچار پروتئین P6 را بصورت فیوژن پروتئین تولید نمودند که در نهایت ۷ اسیدامینه اضافه بر اسیدهای آمینه پروتئین طبیعی داشت [۱۸].

تولید پروتئین نوترکیب rP6₄₇₋₁₅₃ در میزبان پروکاریوتی در سیستم pET28a(+) و تحت کنترل پروموتور قدرتمند T7 صورت گرفت که منجر به تولید حدود ۴ میلی گرم از این پروتئین نوترکیب به ازای هر لیتر کشت باکتری شده است که نسبت به تجربیات دیگر محققین دستاورد ارزشمندی است. از سوی دیگر سیستم تخلیص پروتئین مذکور که بر پایه دنباله پلی هیستیدین و روش مشروح انجام شده خلوص بالای ۹۰٪ را نشان می‌دهد که برای پروتئینی با وزن پایین بسیار چشمگیر و ایده آل است. ویژگی‌های آنتی ژنیک این پروتئین نوترکیب نیز حفظ شده که با توجه به اهمیت آن در تجربیات ایمن سازی، اهمیت فوق‌العاده ای دارد.

پیتیدوگلیکان از لیزوزیم استفاده نمودند، اما در گزارش خود به این نکته اشاره کردند که تلاش آنها برای حذف لیزوزیم از محلول پروتئین با کمک کروماتوگرافی تعویض یونی ناموفق بوده است.

نلسون^۱ و همکاران وی اقدام به کلون و تعیین توالی پروتئین P6 کردند. آنها ژن P6 را با استفاده از باکتروفاژ لیتیک λgt11 از ژنوم هموفیلوس جدا نموده و فاژ مذکور را در پلاسمید pUC18 در *E. coli* کلون و بیان نمودند. تولید پروتئین نوترکیب P6 با استفاده از این روش، بمراتب کمتر از روش تخلیص طبیعی مانسون و همکارانش گزارش گردید. بعلاوه، آنها در گزارش خود اعلام نمودند که پروموتور پلاسمید مذکور در *E. coli* نمی‌تواند بخوبی پروموتور هموفیلوس آنفلوانزا سبب بیان ژن P6 گردد. مشکل دیگر آنها این بود که چون پروتئین P6 از خانواده پروتئین OmpA در *E. coli* بود و بدلیل وجود انشعابات لیپیدی و توالی سیگنال خود در دیواره سلولی میزبان جدید استقرار می‌یافت، لذا جداسازی و تخلیص آن بصورت یک پروتئین سیتوپلاسمی و محلول با مشکل مواجه می‌شد [۱۶].

گرین^۲ و همکارانش موفق به تولید پروتئین نوترکیب P6 بصورت فاقد انشعابات لیپیدی شدند. آنها بخشی از ژن P6 بطول ۳۱۵ جفت نوکلئوتید را با ژن کد کننده آنزیم بتا- گالاکتوزیداز بصورت فیوژن پروتئین درآوردند و در پلاسمید pUC19 در *E. coli* کلون نمودند. آنها نیز در گزارش خود از محدودیت عمل پروموتور این پلاسمید در میزبان جدید به عنوان یک عامل محدودکننده جهت بیان بالای پروتئین نوترکیب P6 یاد کردند. از طرفی عنوان نمودند که تولید پروتئین P6 به شکل فیوژن پروتئین سبب تفاوت در ایمنی زائی آن در مقایسه با پروتئین طبیعی P6 شده است [۱۷].

³Karalus⁴Hotomi¹Nelson²Green

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت پروتئین P6 به عنوان یک پروتئین حفاظت شده در بین سروتایپهای مختلف هموفیلوس انفلانزا، این پروتئین می تواند در تشخیص، مطالعات ایمنی زایی و همچنین به عنوان یک کاندیدای واکسن استفاده شود. تسهیل تولید و خالص سازی این

پروتئین نو ترکیب زمینه ساز تسریع در مطالعات سرولوژیکی و ایمن سازی شده و ایجاد و پیشبرد تکنولوژی تولید انبوه آن می تواند تا حد بالایی منجر به کاهش هزینه های توسعه واکسن علیه هموفیلوس انفلانزا گردد.

References

- 1- Kelly FD, Moxon RE. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Immunology*. 2004 Oct; 113 (2):163-174.
- 2- Morris SK, Moss WJ, Halsey N. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness. *Lancet Infect Dis*. 2008 Nov; 8 (11): 435-43.
- 3- Mawas F, Bolgiano B, Rigsby P, Crane D, Belgrave D, Corbel MJ. Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO international standard for *Haemophilus influenzae* b capsular polysaccharide. *Biologicals* . 2007 Oct; 35 (4): 235-245.
- 4- Merritt J, Allard G, O'Toole L, Swartz R, Licari P. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae*. *J Biotechnol*. 2000 Aug; 81(2-3): 189-197.
- 5- Berenson CS, Murphy TF, Wrona CT, Sethi S. Outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines. *Infect Immun*. 2005 May; 73 (5): 2728-2735.
- 6- Badr WH, Loghmanee D, Karalus RJ, Murphy TF, Thanavala Y. Immunization of mice with P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae*: Kinetics of the antibody response and IgG subclasses. *Vaccine*. 2000 Aug; 18 (1-2): 29-37.
- 7- Poolman JT, Bakaletz L, Cripps A, Denoel PA, Forsgren A, Kyd J, et al. Developing a nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) vaccine. *Vaccine*. 2001 Dec; 19 (Suppl 1): S108-S115.
- 8- Gnehm HE, Pelton SI, Gulati S. Characterization of antigens from nontypeable *Haemophilus influenzae* recognized by human bactericidal antibodies. *J Clin Invest*. 1985 May; 75 (5): 1645-1658.
- 9- Foxwell RA, Kyd J, Cripps WA. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Pathogenesis and Prevention. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Jun; 62 (2): 294-308.
- 10- Karalus RJ, Murphy TF. Purification and characterization of outer membrane protein P6, a vaccine antigen of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999 Nov; 26 (2): 159-166.
- 11- Wu TH, Gu X. Outer membrane proteins as a carrier for detoxified Lipooligosaccharide conjugate vaccines for nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*. 1999 Oct; 67(10): 5508-5513.
- 12- Chang A, Kaur R, Michel LV, Casey JR, Pichichero M. *Haemophilus influenzae* vaccine candidate outer membrane protein P6 is not conserved in all strains. *Hum Vaccin*. 2011 Jan; 7(1):102-5.
- 13- Kodama S, Hirano T, Noda K, Umemoto S, Suzuki M. Nasal immunization with plasmid DNA encoding P6 protein and immune stimulatory complexes elicits nontypeable *Haemophilus influenzae* specific long-term mucosal immune responses in the nasopharynx. *Vaccine*. 2011 Feb; 29 (10):1881-90.

- 14- Yorihiro I, Muneki H, Keiji F, Kiyonori I Y. Studies of specific immune responses to *Haemophilus influenzae* in otitis prone children and in mice intranasally immunized with outer membrane protein P4 and P6. Journal of the Wakayama Medical Society. 2004, 55 (1); 31-39.
- 15- Munson RS, Granoff DM. Purification and partial characterization of outer membrane proteins P5 and P6 from *Haemophilus influenzae* type b. Infect Immun. 1985 Sep; 49(3) : 544-549.
- 16- Nelson MB, Apicella MA, Murphy TF, Vankeulen H, Spotila LD, Rekosh D. Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. Infect Immun. 1988 Jan; 56 (1): 128-134.
- 17- Green BA, Metcalf BJ, Quinn-Dey T, Kirkley DH, Quataret SA, Deich RA. A recombinant non-fatty acylated form of the Hi-PAL(P6) protein of *Haemophilus influenzae* elicits biologically active antibody against both nontypeable and type b *Haemophilus influenzae*. Infect Immun. 1990 Oct; 58 (10):3272-3278.
- 18- Hotomi M, Yamanaka N, Shimada J, Suzumoto M, Ikeda Y, Sakai A, et al. Intranasal immunization with recombinant outer membrane protein P6 induces specific immune responses against nontypeable *Haemophilus influenzae*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2002 Aug; 65(1):109-116.