Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.12, No.4, Winter 2012, Pages 408-417

Cloning, Expression and Purification of $P6_{47-153}$ of *Haemophilus influenzae*

Nojoomi F[1], Mohabati Mobarez A[1]*, Salmanian AH[2], Siadat SD[3], Khoramabadi N[1], Aghababa H[1]

[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-capsulated (nontypeable) strains. Outer membrane protein P6 is a highly conserved and stable protein in the outer membrane of both encapsulated and non-capsulated 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 $P6_{47-153}$ 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 $P6_{47-153}$ 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 $p6_{47-153}$ was confirmed by western blot analysis using rabbit anti *H. influenzae* polyclonal antiserum.

Results: The recombinant $P6_{47-153}$ was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified (4 mg /lit of broth culture). The immunoblotting showed that recombinant $P6_{47-153}$ conserved its native antigenic structure.

Conclusion: Western blot results, along with that of sequencing, confirmed accurate production of recombinant $P6_{47-153}$ and partially retention of its conformational epitopes.

Keywords: *Haemophilus influenzae*; $P6_{47-153}$; Cloning and Expression

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

*این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دوره دکتری باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران می باشد.

کلون، بیان و تخلیص پروتئین $P6_{47-153}$ 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: همـوفیلوس 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 می‌گیرد. پروتئین غشاءِ خارجی P6، نوعی ایمونوژن حفاظت شده و پایدار درمیان سویه‌های فاقد کپسول و نیز سویه‌های کپسولدار هموفیلوس آنفلوانزا می‌باشد و خود بعنوان کاندید مناسبی جهت واکسیناسیون علیه هموفیلوس آنفلوانزا مطرح گردیده است. هدف از این مطالعه، تولید و تخلیص آنتی‌ژن نوترکیب P6 به عنوان یک پروتئین حامل در واکسنهای کونژوگه می‌باشد.

روش کار: قطعه‌ای به طول۳۲٤ جفت باز از بخش انتهای ژن کد کننده پروتئین P6 در حامل پلاسمیدی pJET1.2 و متعاقبا 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 نهایتا جمع آوری پروتئین نوترکیب به شکل محلول در ایمیدازول انجام شد. حذف ایمیدازول با دیالیز در برابر بافرفسفات نمکی صورت پذیرفت. پروتئین نوترکیب $P6_{47-153}$ با استفاده از آنتی سرم پلی کلونال خرگوشی ضد هموفیلوس آنفلوانزا با استفاده از روش وسترن بلات تایید گردید.

یافته ها: پروتئین نوترکیب$P6_{47-153}$ در میزبان *E. coli* BL21(DE3) با موفقیت بیان و تخلیص گردید (حدود ٤ میلی گرم درهر لیتر کشت مایع LB). ساختار آنتی‌ژنی پروتئین نوترکیب P6 نیز با استفاده از ایمونوبلاتینگ تأیید شد.

نتیجه گیری: نتایج وسترن بلات به موازات نتایج تعیین توالی، حاکی ازصحت تولید پروتئین $P6_{47-153}$ نوترکیب و حفظ نسبی ساختار اپی‌توپی آن می‌باشد.

کلمات کلیدی: هموفیلوس آنفلوانزا؛ کلون و بیان؛ $P6_{47-153}$

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 پـلی ساکاریدی به ۲ گروه قابل طبقه‌بندی (کپسولدار) و غیرقابل طبقه‌بندی (فاقدکپسول) تقسیم می‌شود. جنس کپسول هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b از پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات (PRP) است و از مهمترین عوامل مننژیت باکتریائی در انسان خصوصا در سنین ۳ ماهگی الی ۳ سالگی می‌باشد. هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b تا پیش از انجام برنامه‌های مدون واکسیناسیون (حدود ۲۰ سال پیش) بـه عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر نوزادان در سراسر جهان بشمار می‌رفت [۱،۲].

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

سویه‌های کپسول دار هموفیلوس از قدرت تهاجمی بیشتری برخوردار بوده و معمولا عفونتهای منتشر و مهاجم در انسان از قبیل مننژیت، آرتریت عفونی، باکتریمی، سپتی سمی و اپی گلوتیت ایجاد می‌نمایند. آنتی‌ژن کپسولی در این باکتریها از جنس پلی‌ساکارید است و همانند سایر آنتی‌ژنهای پلی ساکاریدی جـزءِ آنتی‌ژنهای غیروابسته به تیموس و لنفوسیت T می‌باشد که به همین دلیـل، پاسخ ایمنی ضعیفی را خصوصا در کودکان زیر ۲ سـال بر می‌انگیزد، لذا این آنتی‌ژنها به منظور تولید واکسن باید بصورت کونژوگـه با یک پروتئین حامل مثل توکسوئید دیفتری، توکسوئید کزاز و یا پروتئین غشاءِ خارجی مننگوکوک مورد استفاده قرار گیرند [۳،٤].

امروزه ثابت شده که وجود آنتی بادی محافظت کننده برعلیه برخی از پروتئین‌های غشاءِ خارجی ازجمله پروتئین P6 و نیز برضد کپسول پـلی ساکاریدی می‌تواند نقش مهمی در پیشگیری از عفونتهای موضعی و یا منتشر ناشی از هموفـیلوس آنفلوانزا داشته باشد [۵،۶].

پروتئین P6 حدود ۱ الی ۵ درصد کل پروتئینهای غشاءِ خارجی هموفیلوس آنفلوانزا را تشکیل داده، لیپوپروتئینی به وزن تقریبی ۱۶ کیلو دالتون و مشتمل بر ۱۵۳ اسیدآمینه است که از هـمولوژی بسیار بالائی در میان سویه‌های فاقد کـپسول و نیز سروتیپ b هموفیلوس آنفلوانزا برخوردار بوده، در مطالعات با استفاده از مونوکلونال و پلی کلونال آنتی بادی، این پروتئین حفـاظت شده گزارش شده است. این پروتئین بشدت ایمونوژن و آنتی بادی علیه آن باکتریسیدال می‌باشد. 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 می‌تواند به عنوان یک کـاندیدای مناسب جهت تولید واکسن علیه هموفیلوس آنفلوانزا مطرح باشد [۷-۱۱].

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 سویه‌های باکتریائی *E. coli* GM2163 و *E. coli* BL21(DE3) نیز به ترتیب به عنوان میزبان‌های تکثیری و بیانی استفاده شد. پلاسمید تکثیری pJET1.2 از (Fermentas) و پلاسمید بیانی pET28a(+) (Novagen) جهت کلون‌سازی ژن هدف، مورد استفاده قرار گرفتند. آنزیم‌های محدود الاثر *BamHI* و *HindIII* شرکت فرمنتاز و DNA لیگاز T4(Takata) استفاده شدند. از آنزیمDNA پلیمراز 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 سانتی‌گراد و در حضور ۵٪ CO_2، احیاءِ اولیه باکتری صورت گرفت. پس از آن باکتری به محیط کشت شکلات آگار انتقال یافت. پلیت ها بمدت ٤۸ ساعت در جار شمع دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از این مدت کلنی‌های گرد و محدب سفید مایل به خاکستری به قطر تقریبی ۲ الی ۳ میلی متر در سطح پلیتها 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 تا۲ کلنی جوان از کشت ٤۸ ساعته باکتری با استفاده از لوپ استریل به داخل میکروتیوبهای ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد و۱ میلی لیتر نرمال سالین استریل به هر میکروتیوب اضافه گردید. سانتریفوژ دردور۱۰ هزار بمدت ۳

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

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.

پرایمر ها و شرایط PCR

مقادیر مورد استفاده در واکنش PCR جهت تکثیر ژن p6 شامل: ۲ میکرولیتر از بافر 10x، ۰/۸ میکرولیتر از کلریدمنیزیوم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت 10pmol/µl، یک میکرولیتر از DNA الگو با غلظت 175 µg/ml، یک میکرولیتر از $dNTP_s$ 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 مورد بررسی قرار گرفت. یک جفت پرایمر برای تکثیر ناحیه کـــد کننده مربوط به اسیـــدهای آمینه ٤٧ الی ۱۵۳ ایـــن پروتئین طـــراحی شد که عبارتند از پرایمر بالا دست با ۳۱ نوکلئوتید (5'-AGAGGATCCCGTTACAATACCGTTTATTTCG-3') و پرایمر پائین دست با ۳۳ نوکلئوتید (5'-TATAAGCTTTTAGTACGCTAACACTGCACGACG-3'). سایت برش برای آنزیم *BamHI* در انتهای '۵ پرایمر بالادست و سایت برش برای آنزیم *HindIII* در انتهای '۵ پرایمر پائین دست طراحی شد (حروف زیر خط دار).

تکثیر ژن مورد نظر با PCR توسط آنزیمDNA پلیمراز PrimeSTAR® انجام گرفت. واکنش تحت برنامه دمایی شامل ۹۸ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ٤٠ دوره شامل ۹۸ درجه سانتی‌گراد (۱۵ 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 (۳٤۲جفت باز) بعد از تکثیر با آنزیم DNA پلیمراز PrimeSTAR® و خالص سازی از روی ژل آگارز، در پلاسمید pJET1.2 طبق دستور کیت الحاق و محصول واکنش 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 کدکننده 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 *BamHI* و *HindIII* 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. تأییـــد نهـــایی پلاســـمیدهای 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

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

مایع لوریا برتانی (LB) حاوی کانامایسین با غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر تلقیح و ۱۸ ساعت در انکوباتور با حرکت دورانی و دمای۳۷ درجه سانتی گرادگرماگذاری 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 نانومتربه حدود ۰/۶ رسید، بیان پروتئین نوترکیب با ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) یک میلی مولار القا شد. نمونه‌های زمان صفر الی ۳ ساعت از باکتری های القا شده گرفته شد و میزان بیان پروتئین در زمان‌های مذکور با الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریلامید ۱۵٪ و سپس رنگ آمیزی با کوماسی بلو G-250 مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تولید پروتئین نوترکیب $P6_{47-153}$ ($rP6_{47-153}$)، یک کشت ۱۸ ساعته از باکتری *E. coli* BL21(DE3) به شکلی که قبلا 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 القاءِ 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 ۹۰۰۰ ×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 + NaH_2PO_4 ۱۰۰ میلی مولار) با pH ۸/۵ حل و در ۱۸۰۰۰ ×g بمدت ۳۰ دقیقه بمنظور جداسازی فاز محلول از اجسام سلولی نامحلول سانتریفوژ 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 میلی‌مولار + NaH_2PO_4 ۱۰۰ میلی‌مولار) با pH: ۶/۳ شستشو داده شد. حذف اوره با استفاده از بافرهای حاوی شیب کاهشی غلظت اوره (۸،۶، ٤، ۲، ۱ و صفر 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 ۷/٤) 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 آنتی‌ژنی پروتئین تخلیص شده با روش وسترن بلات

پروتئین نوترکیب از ژل پلی آکریلامید به کاغذ پلی وینیلیدین دی فلورا ید (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 غشاءِ با محلول حاوی رقت ۱:۵۰۰۰ آنتی سرم پلی کلونال خرگوشی ضد هموفیلوس آنفلوانزا سویه استاندارد ATCC 10211 (تولید داخلی بخش واکسن‌های باکتریال انستیتو پاستور) به مدت ۲ ساعت مجاور شد. شستشو با بافر تریس نمکی حاوی ۰/۰۵٪ توئین ۲۰ (TBS-T) انجام گرفت. غشاءِ با آنتی بادی های ثانویه (ضد IgG خرگوشی ۱:۱۰۰۰۰) برای مدت ۲ ساعت مجاورگردید. غشاءِ پس از شستشو با محلول سوبسترای رنگ‌زای دی-آمینوبنزیدین(DAB) مجاور شده و باندهای مربوطه پس از ظهور اسکن گردید.

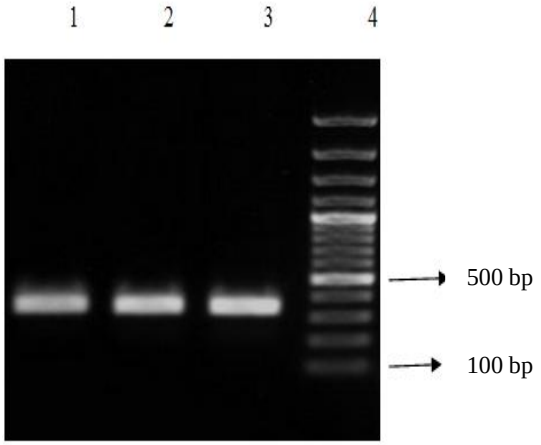
یافته ها

کلون سازی و تعیین توالی ژن کد کننده P6

بخش کد کننده اسیدهای آمینه ٤٧ الی ۱۵۳ از ژن کدکننده پروتئین P6 (۳۲٤جفت باز) به وسیله آنزیم DNA پلیمراز Prime STAR® که دارای قدرت تصحیح خطای بسیار بالایی است تکثیر شد. به سبب

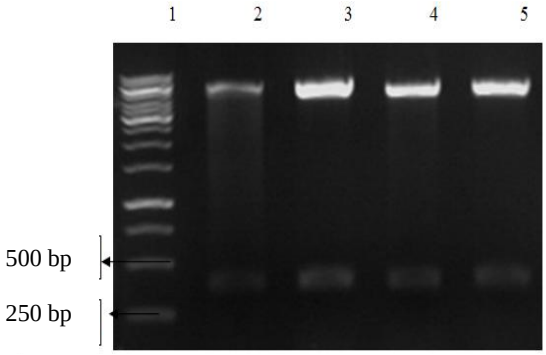
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

اضافه شدن توالی های شناسایی کننده آنزیم‌های *BamHI* و *HindIII* و سه نوکلئوتید اضافی به عنوان دستگیره آنزیمی در دو طرف، اندازه محصولPCR، ٣٤٢جفت باز می‌باشد (شکل١).



شکل ١. محصول PCR تکثیرشده با آنزیم DNA پلیمراز Primes TAR® بر روی ژل آگارز. چاهکهای ١ تا ٣:محصول PCR با ٣٤٢ جفت باز ، چاهک ٤: مارکر 100 bp

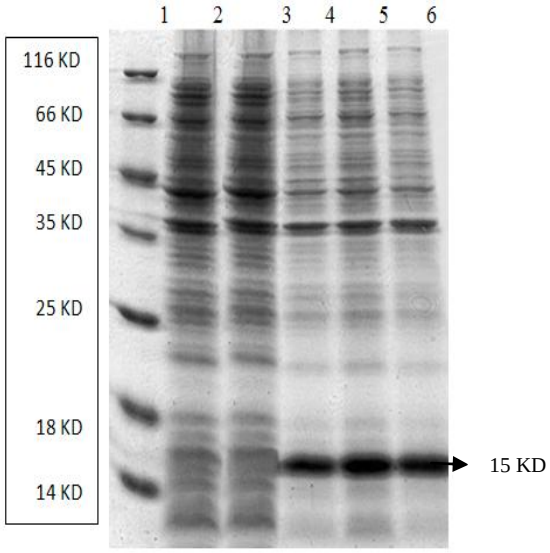
محصول PCR با موفقیت در پلاسمید pJET1.2 کلون شد. هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pJET-P6 و توالی یابی، صحت کلون شدن بخش مورد نظر از ژن کدکننده پروتئین P6 را تأیید می‌نمایند. مقایسه نتایج توالی یابی با توالی‌های مرجع نشان داد هیچگونه تغییر و جهشی در این قطعه ژن کلون شده روی نداده است. توالی مورد نظر از ژن پروتئین P6 در پلاسمید pET28a (+) نیز با موفقیت کلون و با هضم آنزیمی (شکل ٢) و در نهایت توالی‌یابی نیز صحت آن تایید شد.



شکل ٢. محصول هضم پلاسمید نوترکیب pET28-p6 با دو آنزیم *Bam*HI و *Hin*dIII بر روی ژل آگارز.چاهک ١: مارکر 1kb . چاهکهای ٢ تا ٥ : باندهای بالا : pET28a(+) خطی شده / باندهای پائین : قطعه خارج شده مربوط به ژن پروتئین P6

بیان و تخلیص پروتئین $rP6_{47-153}$

نتایج الکتروفورز ژل پلی آکریلامید، بیان یک پروتئین در محدوده میان باندهای ١٤ الی ١٨ کیلودالتونی راهنمای وزنی را نشان می دهد که با وزن مولکولی حدود ١٥ کیلودالتون پیش بینی شده همخوانی دارد بیان پروتئین ها بین ساعت اول و سوم تفاوت قابل ملاحظه ای نشان نمی‌دهد (شکل٣).

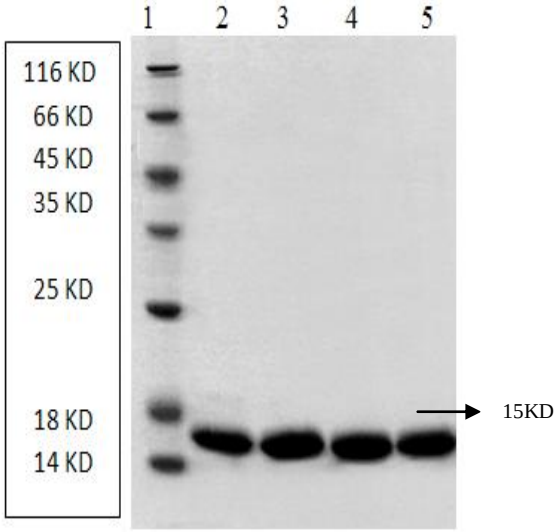


شکل ٣. نتایج القاء و بیان پروتئین نوترکیب $rP6_{47-153}$ بر روی ژل پلی آکریلامید رنگ آمیزی شده با کوماسی بلوG-25 .

چاهک١: مارکر وزن مولکولی پروتئین ، چاهک٢: *E.coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید دست نخورده pET28a(+)، چاهک٣: *E.coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-P6 القاء نشده (ساعت صفر)، چاهک٤: *E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-P6 القاء ساعت اول، چاهک٥: *E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-P6 القاء ساعت دوم ، چاهک٦:*E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-P6 القاء ساعت سوم

بررسی الکتروفورتیک نتایج تخلیص $rP6_{47-153}$ حاکی از غلظت قابل توجه این پروتئین می‌باشد (شکل ٢). بر اساس اندازه گیری با روش اسپکتروفتومتری توسط دستگاه (NanoDrop)، میزان استحصال پروتئین محلول از یک لیتر کشت باکتری میزبان ٤ میلی‌گرم تعیین شد (شکل٤).

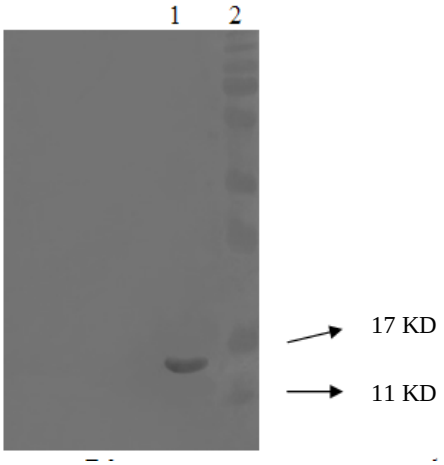
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]



شکل ٤. نتایج تخلیص پروتئین نوترکیب $rP6_{47-153}$ بر روی ژل پلی آکریلامید رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو G250

چاهک۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین ، چاهکهای ۲ تا۵: استخراجهای اول تا چهارم پروتئین نوترکیب $rP6_{47-153}$ خالص شده

نتایج وسترن بلات نشان می‌دهد $rP6_{47-153}$ توسط آنتی سرم پلی کلونال خرگوشی ضد هموفیلوس آنفلوانزا قابل شناسائی می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۵. چاهک۱ : نتیجه آزمون وسترن بلات پروتئین نوترکیب $rP6_{47-153}$ با استفاده از آنتی سرم پلی کلونال خرگوشی، چاهک۲: مارکر وزن مولکولی پروتئین

بحث

باتوجه به اینکه پروتئین های غشاءِ خارجی (OMP)، به عنوان کاندیداهای مهمی جهت واکسیناسیون علیه بسیاری از عفونتهای ناشی از باکتریهای گرم منفی و بخصوص هموفیلوس انفولانزا مطرح می باشند لذا شیوه تولید و تخلیص این آنتی‌ژنها از اهمیت خاصی برخوردار است. پروتئین P6 نیز یکی از آنتی‌ژنهای غشاءِ خارجی هموفیلوس آنفلوانزاست که ساختاری لیپوپروتئینی داشته و از جمله پروتئینهای متصل به دیواره سلولی باکتری بشمار می‌آید. از این پروتئین میتوان در کنار یک ادجوانت مناسب به عنوان واکسنی علیه سویه های فاقدکپسول هموفیلوس آنفلوانزا و یا بصورت کونژوگه با یک آنتی‌ژن پلی ساکاریدی در نقش یک پروتئین حامل استفاده نمود [١٤-١١]. در این تحقیق بخش کد کننده اسیدهای آمینه ٤٧ الی ١٥٣ ژن پروتئین P6 در پلاسمید بیانی pET28a(+) کلون شد. پروتئین $P6_{47-153}$ در سویه میزبان *E.coli* BL21(DE3) به میزان چشمگیری تولید گردید. میزان تولید پروتئین نوترکیب $rP6_{47-153}$ در حدود ٤ میلی گرم در میلی لیتر به ازای هر لیتر کشت باکتری بود که تولید قابل توجهی می‌باشد.

به دلیل اهمیت این پروتئین و نقش مهم آن به عنوان یک کاندید واکسن محققین بسیاری سعی در تولید انبوه آن داشته اند.

اولین بار مانسون[1] و همکارانش [١٥] پروتئین P6 را با استفاده از SDS یک درصد، تریس (٠/٥ مولار)، کلرید سدیم (٠/١ درصد) و ٢- مرکاپتواتانل (pH٨) و در دمای ٣٧ درجه سانتی گراد بصورت محلول درآوردند و با استفاده از سانتریفیوژ آن را از سایر اجزاءِ 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 نسبتا آسان و باصرفه است، اما آثاری از اسید مورامیک در پروتئین استخراج شده از ستون کروماتوگرافی وجود دارد که نشان دهنده آلودگی با پپتیدوگلیکان هموفیلوس انفلوانزا می‌باشد. مانسون و همکارانش بمنظور حذف بقایای

[1]Munson

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

پپتیدوگلیکان 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[1] و همکاران وی اقدام به کلون و تعیین توالی پروتئین P6 کردند. آنها ژن P6 را با استفاده از باکتریوفاژ 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 پروموتر پلاسمید مذکور در *E. coli* نمی‌تواند بخوبی پروموتر هموفیلوس آنفلوانزا سبب بیان ژن P6 گردد. مشکل دیگرآنها 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 می یافت ، لذا جداسازی و تخلیص آن بصورت یک پروتئین سیتوپلاسمی و محلول با مشکل مواجه می شد [١۶].

گرین[2] و همکارانش موفق به تولید پروتئین نوترکیب P6 بصورت فاقد انشعابات لیپیدی شدند. آنها بخشی از ژن P6 بطول ٣١۵ 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 پروموتر 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 [١٧].

کارالوس[3] 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 ٢ میلی‌گرم 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 غشاءِ خارجی هموفیلوس آنفلوانزا بود[١٠].

هوتومی[4] 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 ٩٠٪ هومولوژی با پروتئین طبیعی P6 می‌باشد. با این حال آنها نیز به ناچار پروتئین P6 را بصورت فیوژن پروتئین تولید نمودند که درنهایت ٧ اسیدامینه اضافه بر اسیدهای آمینه پروتئین طبیعی داشت [١٨].

تولید پروتئین نوترکیب $rP6_{47-153}$ در میزبان پروکاریوتی در سیستم pET28a(+) و تحت کنترل پروموتر قدرتمند T7 صورت گرفت که منجر به تولید حدود ٤ میلی‌گرم 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 ٩٠٪ را نشان می‌دهد که برای پروتئینی با وزن پایین بسیار چشمگیر و ایده‌آل است. ویژگی‌های آنتی‌ژنیک این پروتئین نوترکیب نیز حفظ شده که با توجه به اهمیت آن در تجربیات ایمن سازی، اهمیت فوق‌العاده ای دارد.

[1] Nelson
[2] Green
[3] Karalus
[4] Hotomi

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت پروتئین P6 به عنوان یک پروتئین حفاظت شده در بین سروتایپهای مختلف هموفیلوس انفولانزا، این پروتئین می تواند در تشخیص، مطالعات ایمنی زایی و همچنین به عنوان یک کاندیدای واکسن استفاده شود. تسهیل تولید و خالص‌سازی این پروتئین نوترکیب زمینه‌ساز تسریع در مطالعات سرولوژیکی و ایمن‌سازی شده و ایجاد و پیشبرد تکنولوژی تولید انبوه آن می‌تواند تا حد بالایی منجر به کاهش هزینه های توسعه واکسن علیه هموفیلوس انفولانزا 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 *Haemophilu sinfluenzae* 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, ThanavalaY .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 antigenes 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 MolBiol 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.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

14- Yorihiko I, Muneki H, Keiji F, KiyonoriI Y. Studies of specific immune responses to *Haemophilus influenzae* in otitis prone children and in mice intranasaly 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. 1985Sep; 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 from 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 Otorhinolaringol. 2002 Aug; 65(1):109-116.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]