Original Article

Expression of the protein gp40/15 Cryptosporidium parvum in *E. coli*

Sobati H[1*], Jasor-Gharebagh H[2], Honari H[2]

1- Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.
2- Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, I. R. Iran.

Received June 30, 2015; Accepted January 28, 2016

Abstract:

Background: Cryptosporidium is a parasitic protozoa of medical and veterinary importance that causes gastroenteritis in a variety of vertebrate hosts. Some of the parasite surface antigens such as gp40/15 play an important role in attaching and invasion to host cell and stimulating the immune system. The possible access to recombinant proteins of the parasite can be provided by cloning and expression of these antigens. The aim of this study was to study the gene expression of gp40/15 Cryptosporidium parvum in *Escherichia coli (E. coli).*

Materials and Methods: The sequence of gene gp40/15 for Cryptosporidium parvum was extracted from GenBank (No.AF155624) and was synthetically cloned in PET28a+. The recombinant plasmid was confirmed by the colony PCR and the BamHI and XhoI restriction enzymes. The recombinant plasmid was transferred into *E. coli* and the protein expression was verified using SDS-PAGE, Western blot and ELISA which was then purified by column chromatography.

Results: The results showed that the gene gp40/15 was cloned into PET28a+ plasmid. The confirmation of isolated gene cloned in PET28a+ was done by colony PCR, restriction enzymes which showed a 921bp band. The PET28a-gp40/15 plasmid expressed in *E. coli* showed a 43 kDa band which was confirmed using the SDS-PAGE, Western blotting and ELISA.

Conclusion: The results showed that the gene gp40/15 successfully cloned into the expression plasmid PET28a+ expressed in *E.coli* and recombinant protein gp40/15 is produced in it. Therefore, the recombinant protein can be used to design recombinant vaccines and diagnostic kits in further.

Keywords: Cryptosporidium parvum, Gene gp40/15, Protein expression, *Escherichia coli*

* **Corresponding Author.**
Email: sobatih@gmail.com
Tel: 0098 21 824 83417
Fax: 0098 21 886 20843

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2016; Vol. 20, No 1, Pages 73-80

Please cite this article as: Sobati H, Jasor-Gharebagh H, Honari H. Expression of the protein gp40/15 Cryptosporidium parvum in *E. coli*. ***Feyz*** 2016; 20(1): 73-80.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-10-19]

بررسی بیان پروتئین gp40/15 کریپتوسپوریدیوم پاروووم در *E. coli*

حسین ثباتی [۱*]، حبیب جسور قره‌باغ [۲]، حسین هنری [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: کریپتوسپوریدیوم یک انگل تک‌یاخته‌ای دارای اهمیت در پزشکی و دامپزشکی است که سبب اسهال و استفراغ در طیف وسیعی از مهره داران می‌شود. برخی از آنتی‌ژن‌های سطحی انگل از جمله gp40/15 در اتصال و تهاجم به سلول میزبان و تحریک سیستم ایمنی نقش مهمی بر عهده دارند. با کلون و بیان نمودن این آنتی‌ژن‌ها امکان دسترسی به پروتئین‌های نوترکیب انگل فراهم می‌شود. هدف این مطالعه بیان ژن gp40/15 کریپتوسپوریدیوم پاروووم در باکتری اشرشیاکلی است.

مواد و روش‌ها: توالی ژن gp40/15 کریپتوسپوریدیوم پاروووم از بانک ژن به‌شماره AF155624 استخراج و به‌صورت صناعی در PET28a+ کلون و تهیه گردید. جهت تایید از روش‌های ColonyPCR و هضم آنزیمی به‌وسیله آنزیم‌های محدودکننده BamHI و XhoI استفاده شد. پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری اشرشیاکلی منتقل شده و بیان پروتئین با استفاده از SDS-PAGE، وسترن بلات و الایزا با استفاده از سرم حاوی آنتی‌بادی بر ضد انگل کریپتوسپوریدیوم پاروووم تایید شد و سپس با ستون کروماتوگرافی تخلیص گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که ژن gp40/15 درپلاسمید PET28a+ کلون شده است و نتایج ColonyPCR و هضم آنزیمی پلاسمید PET28a+ حاوی ژن gp40/15، قطعه 921bp را نشان داد. بیان pEgp40/15 در باکتری اشرشیاکلی با استفاده از روش‌های SDS-PAGE، وسترن بلات والایزا تایید شد و باندی در حدود ۴۳ کیلودالتون را نشان داد.

نتیجه‌گیری: ژن gp40/15 کلون شده در پلاسمید بیانی PET28a+ به‌طور موفقیت آمیزی در باکتری اشرشیا کلی بیان شده و پروتئین نوترکیب gp40/15 درآن تولید شده است. لذا، می‌توان از این پروتئین در مطالعات بعدی جهت ساخت واکسن‌های پروتئینی نوترکیب و طراحی کیت تشخیصی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: کریپتوسپوریدیوم پاروووم، ژن gp40/15، بیان پروتئین، اشرشیاکلی

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵، صفحات ۸۰-۷۳

مقدمه

کریپتوسپوریدیوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده که به‌وسیله انگلی از گروه اپی‌کمپلکسا به‌نام کریپتوسپوریدیوم پاروووم ایجاد می‌شود. این انگل طیف گسترده‌ای از پستانداران از جمله انسان را آلوده کرده و عامل به‌مخاطره انداختن سلامتی و بهداشت عمومی و تهدید کننده زندگی به‌خصوص در اطفال و افراد دچار نقص ایمنی است و تاکنون هیچ دارو و درمان موثری برای آن وجود ندارد [۱]. عفونت از طریق ورود اووسیست‌های انگل از طریق آب و مواد غذایی آلوده، به دستگاه گوارش و خروج اسپروزوئیت‌ها از آن و حمله و اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده ایجاد می‌شود. بررسی‌های جدید با هدف کنترل عفونت و براساس شناسایی آنتی-ژن‌هایی که در مراحل تهاجمی و اتصال انگل به سلول میزبان نقش مهمی بر عهده دارند، متمرکز شده است [۳،۲].

مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های مهم انگل از جمله gp40/15، P23، gp40، gp15 و gp900 در تهاجم و اتصال به سلول و در تولید پاسخ ایمنی میزبان بر علیه عفونت نقش مهمی داشته و توسط آنتی بادی‌های موجود در سرم انسان و حیوانات مختلف آلوده به کریپتوسپوریدیوم پاروووم قابل شناسایی می‌باشند [۵،۴]. در نتیجه با تهیه این پروتئین‌های ایمونوژن به-صورت پروتئین‌های نوترکیب و DNA واکسن می‌توان از آنها در تشخیص عفونت و ایمونیزه کردن حیوانات استفاده نمود [۹-۶]. اولین گلیکوپروتئین و بهترین آنتی‌ژن شناسایی شده انگل یک گلیکوپروتئین سطحی به‌نام gp40/15 است. این آنتی‌ژن مشابه موسین بوده که به‌عنوان پروتئین پیش‌ساز سنتز شده و سپس به دو گلیکوپروتئین بالغ gp40 و gp15 شکسته می‌شود [۱۰]. گلیکوپروتئین gp15 به غشاء اسپوروزوئیت‌ها به‌وسیله گلیکوفسفاتیدیل اینوزیتول متصل شده و گلیکوپروتئین gp40 بیشتر به‌صورت محلول بوده و دارای اپی‌توپ‌هایی است که توسط گیرنده‌های سلول میزبان شناسایی می‌شود. محصول پروتئینی تولید شده توسط این گلیکوپروتئین‌ها قادر است سیستم ایمنی میزبان را تحریک نموده و سرم افراد مبتلا به عفونت می‌تواند آنها را شناسایی نماید [۱۱]. این دو گلیکوپروتئین به فرم کمپلکس بوده و توانایی حمله و اتصال به سطح سلول میزبان را دارند و لذا می-

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)

[۲] کارشناس ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

[۳] دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)

***نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، ونک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)

تلفن: ۰۲۱۸۲۴۸۳۴۱۷ **دورنویس:** ۰۲۱۸۸۶۲۰۸۴۳

پست الکترونیک: sobatih@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۹ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۴/۱۱/۸

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-10-19]

توانند هدف خوبی برای درمان و کنترل کریپتوسپوریدیوزیس باشند [۱۲]. مطالعات کمی در خصوص کلون و بیان ژن gp40/15 در سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی انجام شده است. Connor و همکاران ژن gp40/15 را به توکسوپلاسما گوندی جهت بیان پروتئین آن منتقل نمودند. آنها نشان دادند پروتئین نوترکیب gp40/15 بیان شده در سطح تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد gp15 و gp40 شناسایی شده و با آنها واکنش ایجاد می‌نمایند [۱۴،۱۳]. ایشان عقیده داشتند این پروتئین‌ها در اتصال به دیواره روده میزبان نقش مهمی داشته و اولین گام عفونت زایی را ایجاد می‌کنند. Tilley و همکاران پروتئین gp40/15 کریپتوسپوریدیوم پاروووم را به موش‌ها تزریق کرده، سرم تهیه شده از آنها را با اسپوروزوئیت‌های انگل مجاور کرده و مشاهده نمودند که این سرم دارای حساسیت بالایی بر ضد انگل بوده و با آن واکنش خوبی ایجاد می‌نماید. آنها از این پروتئین برای تشخیص انگل کریپتوسپوریدیوم پاروووم استفاده کرده و عقیده داشتند که می‌توان از آن به‌عنوان کاندید واکسن جهت کنترل و تشخیص انگل استفاده نمود [۱۵]. Cevallos و همکاران با بررسی ژن gp40/15 به این نتیجه رسیدند که این ژن در ژنوم انگل به‌صورت Single copy بوده و فاقد اینترون است. این پروتئین پیش‌ساز دو پروتئین gp40 و gp15 بوده که در مراحل داخل سلولی انگل بیان شده و قادرند با آنتی بادی‌های اختصاصی بر علیه این دو پروتئین واکنش داده و سرم افراد آلوده به انگل می‌تواند آنها را شناسایی کرده و با آن واکنش ایجاد نماید [۱۰]. آنها با آنالیز توالی آمینواسیدی ژن gp40/15 نشان دادند که دارای یک ناحیه سیگنال پپتید در N ترمینال، ردیفی از اسید آمینه پلی سرین، جایگاه گلیکولیزه شدن و ناحیه هیدروفوبیک در C ترمینال بوده و وزن مولکولی آن حدود ۹۸۱bp است. Leav و همکاران در سال ۲۰۰۲ با بررسی و آنالیز توالی ژن gp40/15 در کودکان مبتلا به ایدز و آلوده به کریپتو-سپوریدیوم در آفریقای جنوبی نشان دادند که این ژن در ژنوتایپ-های مختلف انگل دارای جایگاه‌های پلی‌مورفیک متعددی بوده و عقیده داشتند که پروتئین تولید شده توسط این ژن پروتئین مهمی در انگل کریپتوسپوریدیوم پاروووم بوده و می‌توان از آن برای تعیین زیرگونه‌های انگل استفاده کرد [۱۶]. باتوجه به اهمیت این انگل در ایجاد بیماری و زئونوز بودن آن و هم‌چنین عفونت فرصت طلب در افراد دارای نقص ایمنی و نیز نقش موثر واکسیناسیون در پیشگیری از آن و اینکه هیچ‌گونه مطالعه‌ای در خصوص ژن gp40/15 کلون شده در پلاسمید بیانی +PET28a و بیان آن در سلول اشرشیاکلی در دنیا انجام نشده، این تحقیق صورت گرفت. هدف این مطالعه بیان ژن gp40/15 کریپتوسپوریدیوم پاروووم در باکتری اشرشیاکلی است تا امکان تهیه و دست‌یابی به پروتئین نوترکیب gp40/15 برای مطالعات بعدی فراهم شود. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در تهیه واکسن‌های نوترکیب و نیز طراحی کیت تشخیصی کریپتوسپوریدیوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

توالی کامل ژن gp40/15 کریپتوسپوریدیوم پاروووم از بانک ژنی به‌شماره AF155624 استخراج شده و قطعه ۹۲۱ بازی آن انتخاب و به‌صورت صناعی در پلاسمید +PET28a کلون و تهیه شد. برای بهینه سازی ژن از نرم‌افزار GenScript استفاده شد. وکتور بیانی +pET28a دارای ژن صناعی gp40/15 یعنی پلاسمید نوترکیب pEgp40/15 در سلول‌های مستعد *E. coli* سویه BL21(DE3) (stratagen) ترانسفورم و در محیط کشت LB اگار حاوی کانامایسین کشت داده شد. کلون‌های انتخابی در محیط جامد با استفاده از پرایمرهای پیشرو catcatcacag-cagcggcc و پرایمر پیرو ggatctcagtggtggtggtgg با روش کلونی PCR بررسی شده، سپس این پلاسمید نوترکیب در محیط LB مایع کشت شده و پس از تکثیر آن را استخراج کرده و با استفاده از آنزیم‌های برشی BamHI و XhoI تایید شد [۱۷]. از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشت و به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن OD به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به‌دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتر (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه و به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. نمونه‌ها قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (SM0671) تحت شرایط دناتوره بر روی ژل با غلظت ۱۲ درصد و جریان ثابت ۲۵ میلی-آمپر الکتروفورز شد. برای تایید پروتئین‌های نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد [۱۸،۱۷]. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیترو-سلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی‌مولار، KCl ۲/۷ میلی‌مولار، Na2HPO4.7H2O ۴/۳ میلی‌مولار، توین۲۰ درصد و pH: ۷/۲) حاوی ۵ درصد شیر خشک به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شستشو با بافر PBST، به‌مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰۰

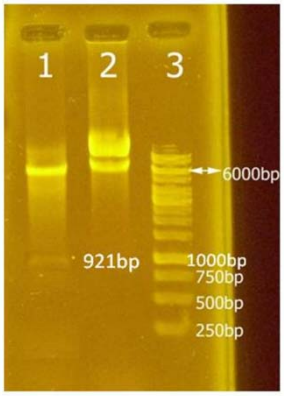
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-10-19]

آنتی‌بادی ضد His-tag (Abcam) کانژوگه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شستشو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سوبسترا (بافر تریس ۵۰mM و pH:۷/۸ حاوی 6mg DAB، 10µl H2O2) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیتروسلولزی، واکنش با استفاده از H2O متوقف گردید. پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NTA جداسازی شده و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد. این پروتئین نوترکیب با سرم حاوی آنتی-بادی ضد انگل کریپتوسپوریدیوم پاروووم تهیه شده از گروه انگل شناسی دانشگاه شهید بهشتی با روش الایزا در طول موج ۴۹۵ نانومتر مورد بررسی و تایید مجدد قرارگرفت. غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی BSA (سیناژن به عنوان استاندارد) تعیین شد [۲۰،۱۹].

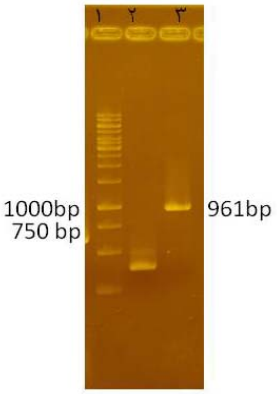
نتایج

بررسی حضور ژن سنتتیک در پلاسمید بیانی

بعد از ترانسفورم کردن پلاسمید نوترکیب حاوی ژن مورد نظر (pEgp40/15) به باکتری *E. coli* به‌منظور صحت ترانسفورم از کلونی باکتری PCR مستقیم گذاشته شد. همان‌طور که در شکل شماره ۱-الف مشاهده می‌شود باندی حدود ۹۶۱ باز بر روی ژل الکتروفورز دیده شد. با توجه به پرایمرهای مورد استفاده در رونویسی که حدود ۴۰ باز از دو طرف ژن کلون شده بر روی PET28a+ انجام گرفته، یعنی حدود ۴۰ باز به ژن ۹۲۱ بازی gp40/15 کلون شده در وکتورPET28a+ اضافه شده و در مجموع باند حدود ۹۶۱ باز را نشان می‌دهد که این مطلب صحت ترانسفورم پلاسمید نوترکیب pEgp40/15 را به داخل باکتری نشان می‌دهد. به‌منظور تایید حضور قطعه مورد نظر در وکتور بیانی pET28a+ بعد از استخراج پلاسمید، از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدودالاثر BamHI و XhoI استفاده شد. همان‌طور که در شکل شماره ۱-ب دیده می‌شود ژن gp40/15 از دو سر توسط آنزیم‌های برشی BamHI و XhoI برش خورده و ژن ۹۲۱ بازی gp40/15 از وکتور جدا شده که این مطلب صحت وجود ژن gp40/15 در پلاسمید بیانیpET28a+ را نشان می‌دهد.



شکل ۱ ب



شکل ۱ الف

شکل شماره ۱- الف) واکنش PCR ستون ۱ نشانگر اسید نوکلوئیک، ستون ۲ محصول PCR ژن gp/15 و ستون ۳ محصول PCR ژن gp40/15.

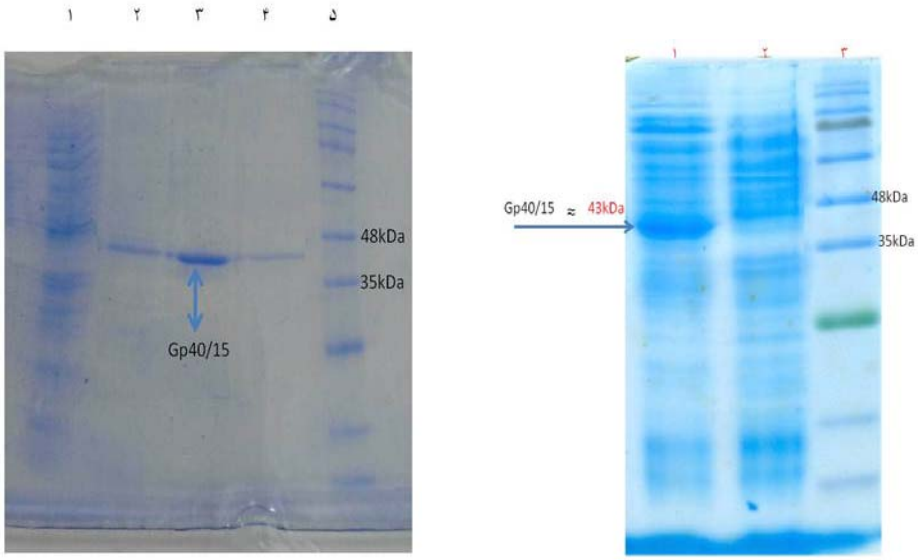
ب) هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیبpEgp40/15. چاهک ۱ برش آنزیمی وکتور با آنزیم‌های BamHI و XhoI ، چاهک ۲ پلاسمید نوترکیب pEgp40/15 بدون برش آنزیمی، چاهک ۳ نشانگر اسید نوکلئیک

بیان پروتئین gp40/15 و تخلیص آن

کلونی باکتری دارای پلاسمید نوترکیب pEgp40/15 در محیط LB کشت داده شده و سپس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از رسیدن کلونی‌ها به رشد کافی و به‌منظور بیان و تولید پروتئین در آنها توسط ۰/۵ میلی‌مولار IPTG القاء گردید. جهت بررسی بیان و کیفیت پروتئین تولید شده، بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد (شکل شماره ۲-الف)؛ باند پروتئینی gp40/15 در جایگاه حدود ۴۳ کیلودالتون قرار گرفت، درحالی‌که در نمونه‌های کنترل هیچ باندی دیده نشد. پروتئین نوترکیب به کمک ستون نیکل خالص‌سازی شده (شکل شماره ۲-ب) و بر روی ژل الکتروفورز شد. همان‌طور که در شکل شماره ۲-ب دیده می‌شود، باند پروتئینی حدود ۴۳ کیلودالتون در اثر شستشو با

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-10-19]

محلول ایمیدازول ۱۰۰ به‌خوبی از ستون جدا شده است؛ در ضمن غلظت پروتئین به‌روش برادفورد اندازه‌گیری شد.



ب الف

شکل شماره ۲- الکتروفورز بیان پروتئین gp40/15

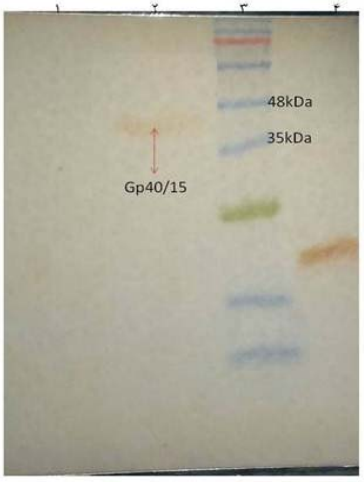
الف) قبل از کروماتوگرافی: ستون ۱ باند پروتئینی در حضور IPTG، ستون ۲ بدون حضور IPTG و ستون ۳ نشانگر پروتئینی؛ ب) تخلیص پروتئین نوترکیب gp40/15 توسط ستون کروماتوگرافی نیکل: ستون ۱ محلول خروجی فلو، ستون ۲ محلول خروجی شستشو شده با ایمیدازول ۴۰ میلی‌مولار (E_{40})، ستون ۳ محلول خروجی شستشو شده با ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار(E_{100}) (پروتئین با وزن مولکولی حدود ۴۳ کیلودالتون از ستون جدا شد)، ستون ۴ محلول خروجی شستشو شده با ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار E_{250} و ستون ۵ نشانگر پروتئینی

وسترن بلات با استفاده ازآنتی بادی منوکلونال ضد His-tag

پروتئین نوترکیب gp40/15 بیان شده به‌دلیل داشتن توالی His -tag با استفاده از آنتی‌بادی ضد His -tag به‌روش وسترن بلات مورد تائید قرار گرفت. پروتئین نوترکیب gp40/15 بیان شده در باکتری القاء شده با IPTG با آنتی بادی ضد His-tag واکنش داده و باندی حدود ۴۳ کیلودالتون را نشان داد (ستون ۲ شکل شماره ۳) اما در ستون ۱ (کنترل منفی) که از سلول باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب بدون القاء با IPTG استفاده شده، هیچ باندی دیده نشد.

تأیید مجددپروتئین نوترکیب gp40/15

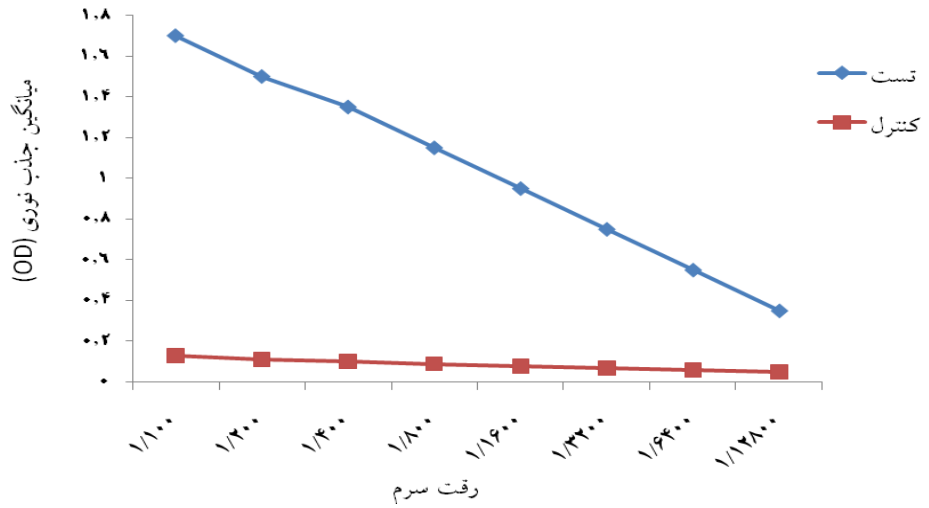
نتایج حاصل از الایزا در طول موج ۴۹۵ نانومتر نشان داد که سرم حاوی آنتی‌بادی بر علیه انگل کریپتوسپوریدیوم پاروم توانسته این پروتئین نوترکیب را شناسایی کند و با آن واکنش ایجاد نماید که نشان‌دهنده صحت تولید این پروتئین و تایید مجدد آن توسط سرم حاوی آنتی‌بادی بر علیه این پروتئین است. همان-طور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود میزان جذب نوری ایجاد شده در اثر واکنش بین این پروتئین نوترکیب و آنتی‌بادی موجود در سرم در غلظت‌های پایین‌تر سرم (۱/۱۲۸۰۰) کاهش و در غلظت‌های بالاتر (۱/۱۰۰) افزایش را نشان می‌دهد.



شکل شماره ۳- نتایج وسترن بلات.

ستون۱: کنترل منفی (سلول باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب بدون القاء با IPTG)، ستون۲: پروتئین نوترکیب gp40/15 بیان شده در باکتری القاء شده با IPTG، ستون۳: نشانگر پروتئینی، ستون۴: پروتئین شاهد جهت کنترل و اطمینان از عملکرد مواد و آنتی بادی مورد استفاده در روش وسترن بلات

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-10-19]



نمودار شماره ۱- نتایج واکنش پروتئین gp40/15 با سرم حاوی آنتی بادی بر ضد انگل کریپتوسپوریدیوم پاروم با روش الایزا

بحث

کریپتوسپوریدیوزیس یک بیماری عفونی است که توسط انگلی تک یاخته‌ای به‌نام کریپتوسپوریدیوم پاروم ایجاد می‌شود [۲۱]. این انگل عامل بالقوه و تهدیدکننده زندگی در افراد دارای سیستم ایمنی سرکوب شده است و موجب بروز اسهال می‌شود. امروزه هیچ درمان اختصاصی و کامل و موثری برای کریپتوسپو-ریدیوزیس وجود ندارد [۲۲]. آنتی‌ژن‌های سطحی و ناحیه اپیکال انگل مانند cp23، gp900، gp15، gp40/15، gp40 و CSL در روند اتصال و تهاجم اسپوروزوئیت‌های کریپتوسپوریدیوم به سلول‌های هدف دخالت داشته و این یک مرحله حیاتی در ایجاد عفونت و بیماری است [۲۴،۲۳]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که آنتی-ژن‌ها و پروتئین‌های نوترکیب ایمونوژن انگل به‌وسیله آنتی بادی-های سرم انسان و تعدادی دیگر از حیوانات آلوده شده به انگل قابل شناسایی است. این آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌ها به‌عنوان کاندیدی امیدوارکننده برای توسعه واکسن و تشخیص عفونت مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲۳]. تعدادی از این‌ها گلیکوپروتئین‌ها موسینی یا شبه‌موسینی بوده و در تولید پاسخ ایمنی میزبان بر علیه عفونت نقش مهمی بازی می‌کنند. بهترین گلیکوپروتئین شبه‌موسین انگل آنتی‌ژن gp40/15 است که به‌صورت یک گلیکوپروتئین پیش‌ساز بیان شده و به دو پروتئین gp40 و gp15 شکسته می‌شود. این پروتئین‌ها ایمونوژن بوده و آنتی‌بادی مورد استفاده بر علیه آنها موجب کنترل عفونت و جلوگیری از آلودگی به انگل کریپتوسپو-ریدیوم پارووم شده و در ضمن قابلیت شناسایی آنها توسط سرم افراد آلوده به انگل وجود دارد [۱۰]. مطالعات کمی در خصوص کلون و بیان آنتی‌ژن‌های کریپتوسپوریدیوم از جمله آنتی‌ژن gp40/15 انجام شده است. مطالعه حاضر اولین کار تحقیقاتی در ایران و دنیا در خصوص بیان ژن gp40/15 تعبیه شده در پلاسمید بیانی pET28a+ است. ما در این مطالعه ژن gp40/15 را به‌دلیل نقش حیاتی آن در فرآیند بیماری‌زایی انگل انتخاب کردیم. در مطالعه حاضر ۹۲۱ جفت باز از ژن gp40/15 انتخاب شد و در پلاسمید پروکاریوتی pET28a+ بهینه‌سازی و کلون شد. سپس، جهت بیان پروتئین به اشرشیاکلی BL21 انتقال داده شد و به‌خوبی در آن بیان شد. نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات نشان داد که این پروتئین دارای وزن مولکولی حدود ۴۳ کیلودالتون است. تنها بررسی انجام شده در خصوص بیان این ژن در سلول پروکاریوتی توسط Cevallos و همکاران در سال ۲۰۰۰ بوده است. ایشان ژن gp40/15 را در سلول‌های پروکاریوتی بیان نموده و با بررسی توالی این ژن نشان دادند که دارای ۹۸۱ جفت باز می‌باشد. آنها این ژن را در وکتور PET-32LIC/Xa کلون کرده و به باکتری اشرشیاکلی AD494 منتقل نموده و مشاهده نمودند که وزن مولکولی آن حدود ۴۹ کیلودالتون است [۱۰]. وزن مولکولی پروتئین gp40/15 تولید شده در داخل انگل به‌علت گلیکولیزه شدن حدود ۵۵ تا۶۰ کیلودالتون بوده و دو گلیکوپروتئین gp15 و gp40 برش‌خورده از آن به‌ترتیب حدود ۱۵ و ۴۵ کیلودالتون است. در سلول‌های پروکاریوتی به‌دلیل عدم گلیکولیزه شدن و بر حسب تعداد نوکلئوتیدهای انتخاب شده و نوع وکتور، بیانی وزن کمتری داشته و بین ۴۰ تا ۴۹ کیلودالتون است [۲۵،۱۰]. Strong و همکاران بر این باورند که gp40/15 حدود ۳۳۰ اسیدآمینه داشته و کدکننده پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۳۴ کیلودالتون است. آنها نشان داده‌اند داربست اصلی آنتی‌ژن از پروتئین‌های

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-10-19]

gp15 و gp40 تشکیل شده که دارای وزن مولکولی حدود ۱۱ و ۲۰ کیلودالتون است و اختلاف آن با وزن مولکولی پروتئین بیان شده در سلول‌های مختلف از جمله در انگل به‌دلیل وجود گسترده موسین و تعداد زیادی سرین و ترئونین و از طرفی گلیکولیزه شدن جایگاه‌های متعدد آنتی ژنیک آن است که موجب افزایش وزن این پروتئین در سیکل زندگی مراحل داخل سلولی می‌شود [۲۵]. به‌نظر می‌رسد اختلاف وزن مولکولی پروتئین تولید شده توسط ما و Cevallos و همکاران می‌تواند مربوط به نوع وکتور و تعداد باز انتخابی و باکتری بیان کننده پروتئین باشد و به‌طور کلی می‌توان گفت که این دو پروتئین تا حدودی باهم مشابهت دارند. نتایج الایزا نشان داد این پروتئین توسط سرم حاوی آنتی‌بادی بر علیه انگل کریپتوسپوریدیوم پاروم شناسایی شده و با آن واکنش خوبی ایجاد نموده است. به‌نظر می‌رسد این سرم توانسته اپی‌توپ-های آنتی‌ژنیک پروتئین نوترکیب gp40/15 را به‌خوبی شناسایی کرده و با آن واکنش ایجاد نماید که این می‌تواند نشان دهنده ایمونوژن بودن این پروتئین باشد. این نتیجه نیز با نظر محققین دیگر مبنی بر ایجاد پاسخ ایمنی توسط آنتی‌ژن gp40/15 و یا دو گلیکوپروتئین برش خورده آن یعنی gp15, gp40 مطابقت دارد [۱۵-۹]. لازم به‌ذکر است ارزیابی ایمنی‌زایی این پروتئین در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که ژن gp40/15 کلون شده در وکتور PET28a+ به‌خوبی در اشرشیاکلی بیان شده و پروتئین gp40/15 در آن تولید شده است. بنابراین، می‌توان از این پروتئین نوترکیب به‌عنوان ابزار بالقوه‌ای برای طراحی کیت‌های تشخیصی و کاندید واکسن جهت تشخیص آلودگی و ایمونیزه کردن حیوانات و انسان استفاده کرد و با این کار قدم مهمی در امر شناسایی و مبارزه با انگل جهت کنترل عفونت برداشته شود.

تشکر و قدردانی

از تمامی اساتید و پژوهشگران محترم بخش سلولی-مولکولی و بیوشیمی دانشگاه جامع امام حسین(ع) و جناب آقای دکتر فرید تحویلداری و آقای دکتر سید جواد سید طبایی، اعضای هیئت علمی گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی که در به نتیجه رسیدن این تحقیق درقالب پایان نامه کارشناسی ارشد با ما همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

[1] Wang C, Luo J, Amer S, Guo Y, Hu Y, Lu Y, et al. Multivalent DNA vaccine induces protective immune responses and enhanced resistance against Cryptosporidium parvum infection. ***Vaccine*** 2011; 29(2): 323–8.

[2] Petry F, Jakobi V, Tessema TS. Host immune response to Cryptosporidium parvum infection. ***Exp Parasitol*** 2010; 126(3): 304-9.

[3] Singh I, Theodos C, Tzipori S. Recombinant proteins of Cryptosporidium parvum induce proliferation of mesenteric lymph node cells in infected mice. ***Infect Immun*** 2005; 73(8): 5245-8.

[4] Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. Cryptosporidium Pathogenicity and Virulence. ***Clin Microbiol Rev*** 2013; 26(1): 115-34.

[5] Boulter-Bitzer JI1, Lee H, Trevors JT. Molecular targets for detection and immunotherapy in Cryptosporidium parvum. ***Biotechnol Adv*** 2007; 25(1): 13-44.

[6] Ehigiator HN, Romagnoli P, Priest JW, Secor WE, Mead JR. Induction of murine immune responses by DNA encoding a 23-kDa antigen of Cryptosporidium parvum. ***Parasitol Res*** 2007; 101(4): 943-50.

[7] Shayan P, Ebrahimzadeh E, Mokhber-Dezfouli MR, Rahbari S. Recombinant Cryptosporidium parvum p23 as a target for the detection of Cryptosporidium-specific antibody in calf sera. ***Parasitol Res*** 2008; 103(5): 1207-11.

[8] Ebrahimzadeh M, Shayan P, Mokhber Dezfouli MR, Rahbari S. Recombinant Cryptosporidium parvum p23 as a Candidate Vaccine for Cryptosporidiosis. ***Iran J Parasitol*** 2009; 4(1): 1-7.

[9] Borad A, Ward H. Human immune responses in cryptosporidiosis. ***Future Microbiol*** 2010; 5(3): 507-19.

[10] Cevallos AM, Zhang X, Waldor MK, Jaison S, Zhou X, Tzipori S, et al. Molecular cloning and expression of a gene encoding Cryptosporidium parvum glycoproteins gp40 and gp15. ***Infect Immun*** 2000; 68(7): 4108–16.

[11] O'Connor R, Wanyiri J, Cevallos A, Priest J, Ward HD. Cryptosporidium parvum glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. ***Mol Biochem Parasitol*** 2007; 156(1): 80–3.

[12] Wanyiri JW, O'Connor R, Allison G, Kim K, Kane A, Qiu J, et al. Proteolytic Processing of the Cryptosporidium Glycoprotein gp40/15 by Human Furin and by a Parasite-Derived Furin-Like Protease Activit. ***Infect Immun*** 2007; 75(1): 184–92.

[13] O'Connor RM, Kim K, Khan F, Ward HD. Expression of Cpgp40/15 in Toxoplasma gondii: a

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-10-19]

Surrogate System for the Study of Cryptosporidium Glycoprotein Antigens. ***Infect Immun*** 2003; 71(10): 6027–34.
[14] O'Connor RM, Wanyiri J, Wojczyk B, Kim K, Ward H. Stable expression of Cryptosporidium parvum glycoprotein gp40/15 in Toxoplasma gondii. ***Mol Biochem Parasitol*** 2007; 152(2): 149–58.
[15] Tilley M, Upton SJ, Fayer R, Barta JR, Chrisp CE, Freed PS, et al. Identification of a 15-kilodalton surface glycoprotein on sporozoites of Cryptosporidium parvum. ***Infect Immun*** 1991; 59(3): 1002–7.
[16] Leav BA, Mackay MR, Anyanwu A, O' Connor RM, Cevallos AM, Kindra G, et al. Analysis of Sequence Diversity at the Highly Polymorphic Cpgp40/15 Locus among Cryptosporidium Isolates from Human Immuno deficiency Virus-Infected Children in South Africa. ***Infect Immun*** 2002; 70(7): 3881–90.
[17] Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: A laboratory manual, third edition. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor New York; 2001.
[18] Lan DT, Lan TT, Viet LQ, Quyet PV, Quang HT, Loc NH, et al. Cloning and expression of gene encoding P23 protein from Cryptosporidium parvum. ***J BioSci Biotech*** 2014; 3(3): 189-93.
[19] Ahmadi AH, Honari H, Minaei ME. Cloning, Fusion, and Expression of Domain a-1 Protective Antigen (PA20) of Bacillus anthracis and N-Terminal ipaD Gene of Shigella in E. coli. ***Qom Univ Med Sci J*** 2015; 9(4): 20-9. [in Persian]
[20] Bradford MM. Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem*** 1979; 72: 248-54.
[21] Rossle NF, Latif B. Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. ***Asian Pac J Trop Biomed*** 2013; 3(11): 916–24.
[22] Manque PA, Tenjo F, Woehlbier U, Lara AM, Serrano MG, Xu P, et al. Identification and immunological characterization of three potential vaccinogens against Cryptosporidium species. ***Clin Vaccine Immunol*** 2011; 18(11): 1796-802.
[23] Allison GM, Rogers KA, Borad A, Ahmed S, Karim MM, Kane AV, et al. Antibody responses to the immunodominant Cryptosporidium gp15 antigen and gp15 polymorphisms in a case-control study of cryptosporidiosis in children in Bangladesh. ***Am J Trop Med Hyg*** 2011; 85(1): 97-104.
[24] Liu K, Zai D, Zhang D, Wei Q, Han G, Gao H, et al. Divalent Cp15-23 vaccine enhances immune responses and protection against Cryptosporidium parvum infection. ***Parasite Immunol*** 2010; 32(5): 335-44.
[25] Strong W B, Gut J, Nelson Richar G. Cloning and Sequence Analysis of a Highly Polymorphic Cryptosporidium parvum Gene Encoding a 60-Kilodalton Glycoprotein and Characterization of Its 15- and 45-Kilodalton Zoite Surface Antigen Products. **Infect *Immun*** 2000; 68(7): 4117–34.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-10-19]