

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

Sobati H^{1*}, Jasor-Gharebagh H², Honari H²

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.

بررسی بیان پروتئین gp40/15 کریتوسپوریدیوم پارووم در *E. coli*

حسین ثباتی^{۱*}، حبیب جسور قره‌باغ^۲، حسین هنری^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: کریتوسپوریدیوم 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 کlon و بیان نمودن این آنتی‌ژن‌ها امکان دسترسی به پروتئین‌های نو ترکیب انگل فراهم می‌شود. هدف این مطالعه بیان ژن gp40/15 کریتوسپوریدیوم پارووم در باکتری اشرشیاکلی است.

مواد و روش‌ها: توالی ژن gp40/15 کریتوسپوریدیوم پارووم از بانک ژن به شماره AF155624 استخراج و به صورت صنعتی در PET28a+ کlon و تهیه گردید. جهت تایید از روش‌های ColonyPCR و هضم آنزیمی به وسیله آنزیم‌های محدودکننده BamHI و XhoI استفاده شد. پلاسمید نو ترکیب 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 کریتوسپوریدیوم پارووم تایید شد و سپس با ستون کروماتوگرافی تخلیص گردید. **نتایج:** نتایج نشان داد که ژن gp40/15 در پلاسمید PET28a+ کlon 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 و الایزا تایید شد و باندی در حدود ۴۳ کیلو دالتون را نشان داد.

نتیجه‌گیری: ژن gp40/15 کlon شده در پلاسمید بیانی PET28a+ به طور موفقیت آمیزی در باکتری اشرشیا کلی بیان شده و پروتئین نو ترکیب gp40/15 در آن تولید شده است. لذا، می‌توان از این پروتئین در مطالعات بعدی جهت ساخت واکسن‌های پروتئینی نو ترکیب و طراحی کیت تشخیصی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: کریتوسپوریدیوم پارووم، ژن gp40/15، بیان پروتئین، اشرشیاکلی

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

مقدمه

کریتوسپوریدیوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده که به وسیله انگلی از گروه اپی کمپلکسا به نام کریتوسپوریدیوم پارووم ایجاد می‌شود. این انگل طیف گسترده‌ای از پستانداران از جمله انسان را آلوده کرده و عامل به مخاطره انداختن سلامتی و بهداشت عمومی و تهدید کننده زندگی به خصوص در اطفال و افراد دچار نقص ایمنی است و تاکنون هیچ دارو و درمان موثری برای آن وجود ندارد [۱]. عفونت از طریق ورود اوو سیست‌های انگل از طریق آب و مواد غذایی آلوده، به دستگاه گوارش و خروج اسپروزوئیت‌ها از آن و حمله و اتصال به سلول‌های اپی تلیال 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 [۲،۳].

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 کریتوسپوریدیوم پارووم قابل شناسایی می‌باشند [۴،۵]. در نتیجه با تهیه این پروتئین‌های ایمونوژن به صورت پروتئین‌های نو ترکیب 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 به نام gp40/15 است. این آنتی‌ژن مشابه موسین بوده که به عنوان پروتئین پیش ساز سنتز شده و سپس به دو گلیکوپروتئین بالغ gp40 و gp15 شکسته می‌شود [۱۰]. گلیکوپروتئین gp15 به غشاء اسپروزوئیت‌ها به وسیله گلیکوفسفاتیدیل اینوزیتول متصل شده و گلیکوپروتئین gp40 بیشتر به صورت محلول بوده و دارای اپی توپ‌هایی 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)

دورنویس: ۰۲۱۸۸۶۲۰۸۴۳

تلفن: ۰۲۱۸۲۴۸۳۴۱۷

پست الکترونیک: sobatih@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۱۱/۸

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۹

هدف این مطالعه بیان ژن gp40/15 کریتوسپوریدیوم پارووم 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 کریتوسپوریدیوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

توالی کامل ژن gp40/15 کریتوسپوریدیوم پارووم از بانک ژنی به شماره AF155624 استخراج شده و قطعه ۹۲۱ بازی آن انتخاب و به صورت 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 (stratagen) BL21(DE3) ترانسفورم و در محیط کشت LB اگر حاوی کانامایسین کشت داده شد. کلون‌های انتخابی در محیط جامد با استفاده از پرایمرهای پیشرو -catcatcacag-cagcggcc و پرایمر پیرو ggatctcagtggtggtgg 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 به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتور (IPTG) فرمتاز با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه و به مدت 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 نیتروسولوز منتقل شد. کاغذ نیترو-سلولز با استفاده از بافر PBST (۳۷ NaCl میلی‌مولار، ۲/۷ KCl میلی‌مولار، ۴/۳ Na₂HPO₄.7H₂O میلی‌مولار، توین ۲۰ درصد و pH: ۷/۲) حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شستشو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰۰

توانند هدف خوبی برای درمان و کنترل کریتوسپوریدیوزیس 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 توکسوپلازما گوندی جهت بیان پروتئین آن منتقل نمودند. آنها نشان دادند پروتئین نوترکیب gp40/15 بیان شده در سطح ناکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما 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 کریتوسپوریدیوم پارووم 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 کریتوسپوریدیوم پارووم استفاده کرده و عقیده داشتند که می‌توان از آن به عنوان 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 به صورت Single copy بوده و فاقد ایترون است. این پروتئین پیش‌ساز دو پروتئین gp40 و gp15 بوده که در مراحل داخل سلولی انگل بیان شده و قادرند با آنتی‌بادی‌های 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 پتید 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 کریتوسپوریدیوم پارووم بوده و می‌توان از آن برای تعیین زیرگونه‌های انگل استفاده کرد [۱۶]. باتوجه به اهمیت این انگل در ایجاد بیماری و ژئونوز 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.

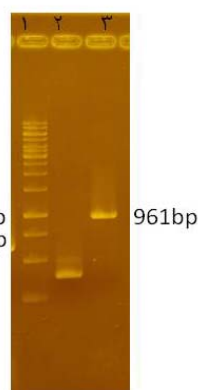
آنتی‌بادی ضد His-tag (Abcam) کانژوگه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شستشو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سوپسترا (بافر تریس ۵۰mM و pH:۷/۸ حاوی ۱۰µl H₂O₂، ۶mg DAB) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوپسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیتروسلولزی، واکنش با استفاده از H₂O متوقف گردید. پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون جداسازی شده و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد. این پروتئین نوترکیب با سرم حاوی آنتی-بادی ضد انگل کریپتوسپوریديوم پارووم 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

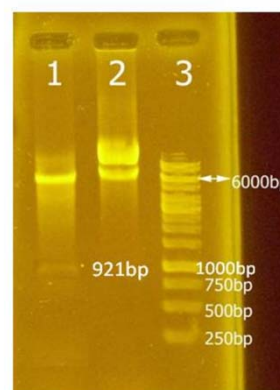
بررسی حضور ژن سنتتیک در پلاسمید بیانی

بعد از ترانسفورم کردن پلاسمید نوترکیب حاوی ژن مورد

نظر (pEgp40/15) به باکتری *E. coli* به منظور 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 بازى gp40/15 کلون شده در وکتور PET28a+ 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. به منظور تایید حضور قطعه مورد نظر در وکتور بیانی PET28a+ بعد از استخراج پلاسمید، از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدودالانر 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 بازى gp40/15 از وکتور جدا شده که این مطلب صحت وجود ژن gp40/15 در پلاسمید بیانی PET28a+ را نشان می‌دهد.



شکل ۱ الف



شکل ۱ ب

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

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

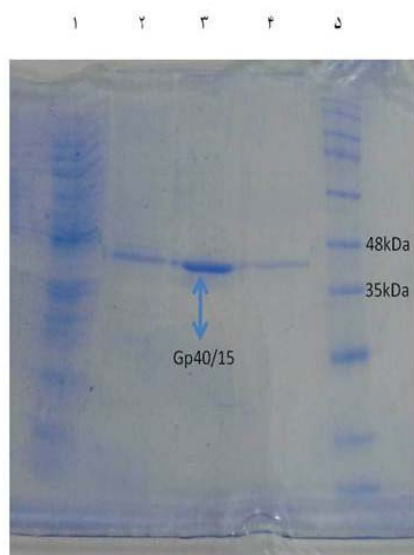
PAGE الکتروفورز شد (شکل شماره ۲-الف)؛ باند پروتئینی gp40/15 در جایگاه حدود ۴۳ کیلودالتون قرار گرفت، درحالی‌که در نمونه‌های کنترل هیچ باندی دیده نشد. پروتئین نوترکیب به کمک ستون نیکل خالص‌سازی شده (شکل شماره ۲-ب) و بر روی ژل الکتروفورز شد. همان‌طور که در شکل شماره ۲-ب دیده می‌شود، باند پروتئینی حدود ۴۳ کیلودالتون در اثر شستشو با

بیان پروتئین gp40/15 و تخلیص آن

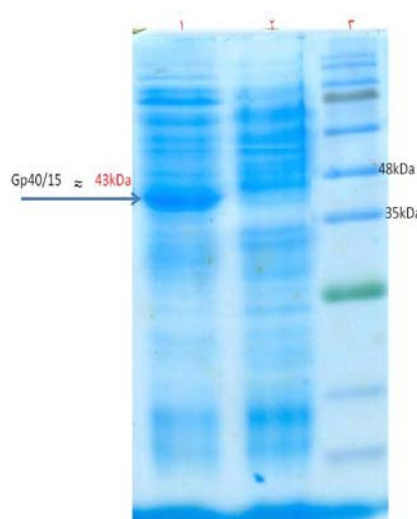
کلونی باکتری دارای پلاسمید نوترکیب pEgp40/15 در محیط LB کشت داده شده و سپس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از رسیدن کلونی‌ها به رشد کافی و به منظور بیان و تولید پروتئین در آنها توسط ۰/۵ میلی‌مولار IPTG القاء گردید. جهت بررسی بیان و کیفیت پروتئین تولید شده، بر روی ژل SDS-

غلظت پروتئین به روش برادفورد اندازه گیری شد.

محلول ایمیدازول ۱۰۰ به خوبی از ستون جدا شده است؛ در ضمن



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 نو ترکیب gp40/15 توسط ستون کروماتوگرافی نیکل: ستون ۱ محلول خروجی فلو، ستون ۲ محلول خروجی شستشو شده با ایمیدازول ۴۰ میلی مولار (E₄₀)، ستون ۳ محلول خروجی شستشو شده با ایمیدازول ۱۰۰ میلی مولار (E₁₀₀) (پروتئین با وزن مولکولی حدود ۴۳ کیلو دالتون از ستون جدا شد)، ستون ۴ محلول خروجی شستشو شده با ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار E₂₅₀ و ستون ۵ نشانگر پروتئینی

موجود در سرم در غلظت های پایین تر سرم (۱/۱۲۸۰۰) کاهش و در غلظت های بالاتر (۱/۱۰۰) افزایش را نشان می دهد.



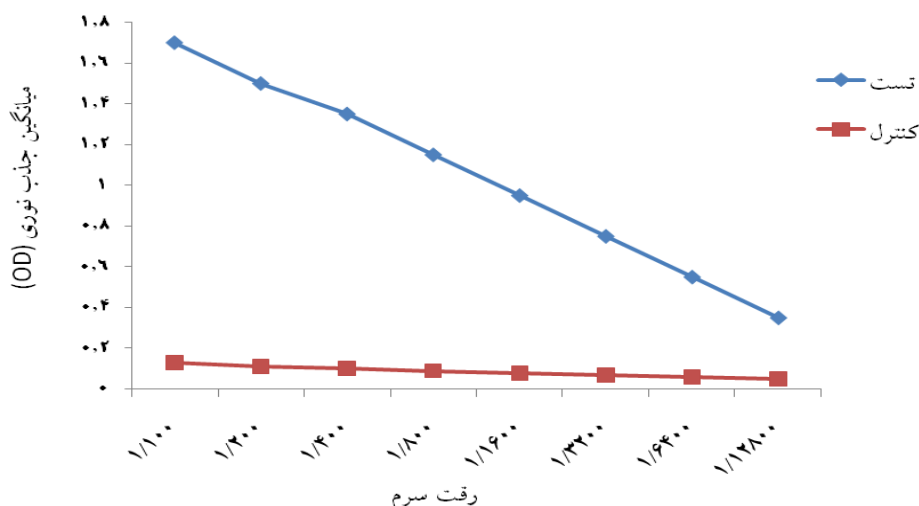
شکل شماره ۳- نتایج وسترن بلات.

ستون ۱: کنترل منفی (سلول باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب بدون القاء با IPTG)، ستون ۲: پروتئین نو ترکیب gp40/15 بیان شده در باکتری القاء شده با IPTG، ستون ۳: نشانگر پروتئینی، ستون ۴: پروتئین شاهد جهت کنترل و اطمینان از عملکرد مواد و آنتی بادی مورد استفاده در روش وسترن بلات

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

تأیید مجدد پروتئین نو ترکیب gp40/15

نتایج حاصل از الیزا در طول موج ۴۹۵ نانومتر نشان داد که سرم حاوی آنتی بادی بر علیه انگل کریپتوسپوریدیوم پارووم توانسته این پروتئین نو ترکیب را شناسایی کند و با آن واکنش ایجاد نماید که نشان دهنده صحت تولید این پروتئین و تأیید مجدد آن توسط سرم حاوی آنتی بادی بر علیه این پروتئین است. همان طور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می شود میزان جذب نوری ایجاد شده در اثر واکنش بین این پروتئین نو ترکیب و آنتی بادی



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

بحث

کریتوسپوریديوم یک بیماری عفونی است که توسط انگلی تک یاخته‌ای به نام کریتوسپوریديوم پارووم 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 کریتوسپوریديوم ریدیویز وجود ندارد [۲۲]. آنتی‌ژن‌های سطحی و ناحیه اپیکال انگل مانند gp23، gp900، gp15، gp40/15، gp40 و CSL در روند اتصال و تهاجم اسپوروزوئیت‌های کریتوسپوریديوم به سلول‌های هدف دخالت داشته و این یک مرحله حیاتی در ایجاد عفونت و بیماری است [۲۳، ۲۴]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که آنتی-ژن‌ها و پروتئین‌های نوترکیب ایمونوژن انگل به وسیله آنتی بادی-های سرم انسان و تعدادی دیگر از حیوانات آلوده شده به انگل قابل شناسایی است. این آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌ها به عنوان 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 به صورت 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 کریتوسپوریديوم 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 کریتوسپوریديوم 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 به دلیل 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 به خوبی 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 به علت گلیکولیزه شدن حدود ۵۵ تا ۶۰ کیلودالتون بوده و دو گلیکوپروتئین gp15 و gp40 برش‌خورده از آن به ترتیب حدود ۱۵ و ۴۵ کیلودالتون است. در سلول‌های پروکاریوتی به دلیل 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 اسیدآمینیه داشته و کدکننده پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۳۴ کیلودالتون است. آنها نشان داده‌اند داربست اصلی آنتی‌ژن از پروتئین‌های

مطالعات بعدی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که ژن gp40/15 کلون شده در وکتور PET28a+ به خوبی در اشرشیاکلی بیان شده و پروتئین gp40/15 در آن تولید شده است. بنابراین، می توان از این پروتئین نوترکیب به عنوان ابزار بالقوه ای برای طراحی کیت های 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 تحویلدار 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 در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد با ما همکاری داشته اند، تشکر و قدردانی می شود.

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 JI, 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

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 سلول های مختلف از جمله در انگل به دلیل وجود گسترده موسین و تعداد زیادی سرین و ترئونین و از طرفی گلیکولیزه شدن جایگاه های متعدد آنتی ژنیک آن است که موجب افزایش وزن این پروتئین در سیکل زندگی مراحل داخل سلولی می شود [۲۵]. به نظر می رسد اختلاف وزن مولکولی پروتئین تولید شده توسط ما و Cevallos و همکاران می تواند مربوط به نوع وکتور و تعداد باز انتخابی و باکتری بیان کننده پروتئین باشد و به طور کلی می توان گفت که این دو پروتئین تا حدودی باهم مشابهت دارند. نتایج الایزا نشان داد این پروتئین توسط سرم حاوی آنتی بادی بر علیه انگل کریپتوسپوریديوم پارووم شناسایی شده و با آن واکنش خوبی ایجاد نموده است. به نظر می رسد این سرم توانسته اپی توپ های آنتی ژنیک پروتئین نوترکیب gp40/15 را به خوبی شناسایی کرده و با آن واکنش ایجاد نماید که این می تواند نشان دهنده ایمونوژن بودن این پروتئین باشد. این نتیجه نیز با نظر محققین دیگر مبنی بر ایجاد پاسخ ایمنی توسط آنتی ژن gp40/15 و یا دو گلیکوپروتئین برش خورده آن یعنی gp15, gp40 مطابقت دارد [۹-۱۵]. لازم به ذکر است ارزیابی ایمنی زایی این پروتئین در

- 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, Jaisson 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

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.