Original Article

Gene cloning and evaluation of the *Acinetobacter baumannii nlpD* gene expression in human dermal fibroblast cells using RT-PCR

Hashemzehi R[1,2], Doosti A[3*], Kargar M[4], Jaafarinia M[2]

1- Department of Molecular Genetics, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Shiraz, I. R. Iran.
2- Department of Molecular Genetics, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, I. R. Iran.
3- Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I. R. Iran.
4- Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, I. R. Iran.

Received April 6, 2017; Accepted July 4, 2017

Abstract:

Background: *Acinetobacter baumannii* is one of the highly antibiotic-resistant bacteria in the world. This bacterium is a cause of endemic and epidemic nosocomial infections and despite many efforts, there is still no effective vaccine agains it. NlpD is one of the important antigenic agents that stimulate the immune system. So, the aim of this study was to examine gene cloning and expression of the *nlpD* gene of *A. baumannii* in human dermal fibroblast (HDF) cells.

Materials and Methods: In this experimental study, the *nlpD* gene was amplified from *A. baumannii* genome using polymerase chain reaction (PCR). Then, the *nlpD* gene was cloned and sub-cloned in pTZ57R/T and pIRES2-EGFP vectors, respectively. Confirmation of gene cloning was performed by PCR, restriction endonuclease and sequencing methods. The final pIRES2-EGFP-nlpD recombinant vector was transformed into HDF cells using electroporation and the expression of target gene was evaluated by RT-PCR.

Results: In this study, the 831 bp *nlpD* gene of *A. baumannii* was amplified successfully. Also, the results of the study showed that the recombinant pIRES2-EGFP-nlpD final construct was produced. Observation of the 831 bp band on agarose gel in transformed cells compared to control cells confirmed the *nlpD* gene expression in HDF cells.

Conclusion: The final construct that generates in this study can express the *nlpD* gene of *A. baumannii* in eukaryotic cells. Successful expression of the target gene can be used as a new recombinant vaccine in animal model. The pIRES2-EGFP-nlpD recombinant vector has also the potential as a gene vaccine for future research.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, *nlpD*, Gene expression, RT-PCR

* **Corresponding Author.**
Email: abbasdoosti@yahoo.com
Tel: 0098 913 383 8830
Fax: 00983 833 61048

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2017; Vol. 21, No 4, Pages 359-366

Please cite this article as: Hashemzehi R, Doosti A, Kargar M, Jaafarinia M. Gene cloning and evaluation of the *Acinetobacter baumannii nlpD* gene expression in human dermal fibroblast cells using RT-PCR. ***Feyz*** 2017; 21(4): 359-66.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-01]

کلون سازی و بررسی بیان ژن *nlpD* *اسینتوباکتر بومانی* در سلول‌های HDF انسان به روش RT-PCR

رسول هاشم‌زهی [۱،۲]، عباس دوستی [۳*]، محمد کارگر [۴]، مجتبی جعفری‌نیا [۲]

خلاصه:

سابقه و هدف: *اسینتوباکتر بومانی* یکی از باکتری‌های بسیار مقاوم در برابر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در جهان است. این باکتری عامل عفونت‌های بیمارستانی به‌صورت بومی یا همه‌گیر بوده و هنوز واکسن موثری علیه آن وجود ندارد. NlpD یکی از عوامل آنتی‌ژنی مهم است که سبب تحریک سیستم ایمنی میزبان می‌گردد. بنابراین، هدف از این تحقیق، کلون‌سازی و بررسی بیان ژن *nlpD* باکتری *اسینتوباکتر بومانی* در سلول‌های HDF (Human dermal fibroblast) است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی ژن *nlpD* از روی ژنوم *اسینتوباکتر بومانی* با استفاده از روش PCR تکثیر شد. سپس، ژن مذکور به‌ترتیب در ناقل‌های pTZ57R/T و pIRES2-EGFP کلون‌سازی و ساب‌کلون گردید. تایید صحت کلون‌سازی ژن با سه روش PCR، آنزیم‌های برش دهنده و تعیین توالی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس، ناقل نوترکیب نهایی pIRES2-EGFP-nlpD با کمک الکتروپوریشن به سلول‌های HDF منتقل گردید و بیان ژن هدف در این سلول‌ها با روش RT-PCR بررسی شد.

نتایج: قطعه ۸۳۱ جفت بازی مربوط به ژن *nlpD* *اسینتوباکتر بومانی* با موفقیت تکثیر شد. هم‌چنین، نتایج تحقیق نشان داد که سازواره نهایی pIRES2-EGFP-nlpD تشکیل گریده است. مشاهده باند ۸۳۱ جفت بازی پس از انجام RT-PCR، در سلول‌های ترانسفورم شده نسبت به سلول‌های شاهد، موید بیان ژن *nlpD* در سلول‌های HDF می‌باشد.

نتیجه‌گیری: سازواره نهایی ساخته شده در این تحقیق توان بیان ژن *nlpD* *اسینتوباکتر بومانی* را در سلول‌های یوکاریوتی دارد. بیان موفق ژن هدف می‌تواند در راستای بررسی ایمنی‌زایی در حیوانات آزمایشگاهی به‌عنوان یک واکسن نوترکیب مدنظر قرار گیرد. هم‌چنین، سازواره pIRES2-EGFP-nlpD از پتانسیل لازم برای بررسی به‌عنوان واکسن ژنی در تحقیقات آینده برخوردار است.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر بومانی*، *nlpD*، بیان ژن، RT-PCR

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۳۶۶-۳۵۹

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی یک کوکوباسیل گرم منفی است که به‌عنوان یکی از عوامل عفونی فرصت‌طلب مطرح است [۱]. کشف اسینتوباکتر به سال ۱۹۱۱ میلادی بر می‌گردد. این باکتری بیماری‌زا که اولین‌بار از خاک جدا شده بود، ابتدا *میکروکوکوس کالکو-استیکوس* نامیده شد. برای چندین سال، باکتری‌های این گروه با نام‌های مختلف نام گذاری شدند تا اینکه در دهه‌ی ۱۹۵۰ میلادی، نام اسینتوباکتر به‌کار گرفته شد [۲].

جنس اسینتوباکتر متعلق به رده‌ی گاماپروتئوباکتریا (Gamma-proteobacteria)، راسته سودودوموناداله‌ا (Pseudomona-dales) و خانواده موراگزیلاسه (Moraxellaceae) است. تنها تعداد اندکی از اسینتوباکترها نظیر *اسینتوباکتر بومانی*، *اسینتوباکتر پیتی* (*A. pittii*) و *اسینتوباکتر نازوکومیالیس* (*A. nosocomia-lis*) در انسان ایجاد بیماری می‌کنند و بسیاری از اعضای این جنس بیماری‌زا نیستند [۳]. *اسینتوباکتر بومانی* مسئول طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل عفونت ریه، عفونت خون، عفونت زخم و پوست، مننژیت و عفونت دستگاه ادراری می‌باشد [۴]. باکتری‌های جنس اسینتوباکتر از نظر باکتری شناسی و ویژگی‌های بیوشیمیایی، هوازی اجباری، نامتحرک و فاقد تاژک، غیرتخمیرکننده، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی هستند [۵]. *اسینتوباکتر بومانی* به اغلب آنتی-بیوتیک‌های رایج مقاوم است [۶]؛ به‌طوری‌که کنترل عفونت حاصل از این باکتری با گروه‌های آنتی‌بیوتیکی نظیر کرباپنم‌ها، فلورو-کوئینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها با شکست روبرو شده است. جدیدترین آنتی‌بیوتیکی که برای کنترل عفونت *اسینتوباکتر بومانی* مورد استفاده قرار گرفته است، کولیستین نام دارد، اما گزارش‌های اخیر نیز حاکی از ظهور سویه‌های مقاوم نسبت به این آنتی‌بیوتیک

[۱] گروه ژنتیک مولکولی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز

[۲] گروه ژنتیک مولکولی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت

[۳] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد

[۴] گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم

* **نشانی نویسنده مسئول:**
شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ **دورنویس:** ۰۳۸۳۳۶۱۰۴۸

پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۶/۴/۱۳

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-01]

است [۷]. هرچند تاکنون واکسن موثری علیه این باکتری ایجاد نشده است، اما موارد متعددی به‌عنوان کاندیداهای واکسن علیه *اسینتوباکتر بومانی* مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. برخی از واکسن-هایی که تاکنون در این زمینه مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته‌اند و در حیوانات آزمایشگاهی (اغلب موش) سبب ایجاد ایمنی نسبی شده‌اند شامل: باکتری کشته شده، کمپلکس پوشش خارجی، وزیکول‌های غشای خارجی، پلی‌ساکارید کپسولی K1 و پروتئین غشای خارجی A می‌باشند [۴]. واکسن‌های متنوع و متعددی نظیر واکسن‌های ژنی علیه عفونت‌های باکتریایی ابداع شده‌اند. واکسن ژنی یک نوع واکسن بر پایه DNA است که با تولید آن با روش-های نوین مهندسی ژنتیک و تزریق آن به موجود زنده، باعث ایجاد پاسخ ایمنی می‌شود. این واکسن می‌تواند در برابر بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زای عفونی مثل باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ای‌ها و حتی برای سرطان‌ها و بیماری‌ها با منشاء ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. دیده شده است که در حیوانات آزمایشگاهی واکسیناسیون به‌وسیله DNA موجب ایجاد ایمنی علیه بسیاری از عوامل عفونی می‌شود [۸]. بر اساس نتایج یک تحقیق صورت گرفته در سال ۲۰۱۳، تعداد ۶۲ آنتی‌ژن در تعداد زیادی از سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* بررسی شده‌اند. این آنتی‌ژن‌ها به‌منظور دست‌یابی به واکسنی موثر علیه این عامل عفونی از لحاظ قابلیت انحلال، جایگاه قرارگیری پروتئین تولیدی در سلول و حفظ شدگی توالی ژنی بین سویه‌های مختلف بررسی شده‌اند. نتایج این تحقیق منجر به یافتن ۴۲ آنتی‌ژن بسیار خوب گردید که برای ایجاد واکسن علیه *اسینتوباکتر بومانی* کاندیداهای مناسبی تشخیص داده شدند. یکی از این آنتی‌ژن‌ها، نوعی لیپوپروتئین بود که توسط ژن *nlpD* رمزگذاری می‌شود. محصول پروتئینی ژن *nlpD* دارای ۲۷۶ اسید آمینه است [۹]. محصول ژن *nlpD* یکی از آنتی‌ژن‌ها و فاکتورهای مهم ویرولانس در باکتری هاست. به‌عنوان مثال، مطالعات صورت گرفته در باکتری *یرسینیا پستیس* (*Yersinia pestis*) نشان می‌دهد که حذف ژن *nlpD* از کروموزوم این باکتری سبب کاهش شدید بقا و بیماری‌زایی آن خواهد شد [۱۰]. همان‌طورکه در مباحث بالا اشاره شد *اسینتوباکتر بومانی* یکی از موفق‌ترین باکتری‌هاست و پروتکل‌های درمانی را معمولا با شکست روبرو می‌کند. از طرفی تاکنون واکسن موثری علیه این باکتری تولید نشده است [۴]، لذا یافتن راهی برای پیشگیری از این عامل عفونی خطرناک ضروری به‌نظر می‌رسد. در همین راستا، در تحقیق حاضر اقدام به کلون‌سازی و بررسی بیان ژن *nlpD* در سلول‌های یوکاریوتی HDF (Human dermal fibroblasts) شده است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها، ناقلین ژن و سلول‌های انسانی

برای انجام این پژوهش تجربی از دو سویه باکتریایی استفاده شد. به‌منظور تکثیر و به‌دست آوردن ژن *nlpD* از سویه استاندارد باکتری *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC 19606) بهره گرفته شد. میزبان کلون‌سازی ژن و تکثیر وکتورهای نوترکیب نیز باکتری *E. coli* سویه TOP10F بود. به‌منظور کلون‌سازی ژن از دو ناقل به نام‌های pTZ57R/T و pIRES2-EGFP استفاده شد. وکتور pTZ57R/T به‌عنوان یک T-vector مورد استفاده بوده و برای کلون‌سازی محصولات PCR مناسب است. این ناقل که برای سهولت نگارش در این مقاله به‌صورت مخفف و به شکل pTZ نوشته می‌شود، مربوط به کیت کلون‌سازی T/A (ترموفیشر، آمریکا) است. اندازه وکتور pTZ برابر ۲۸۸۶ جفت باز است و نشان‌گر انتخابی آن ژن مقاوت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین می‌باشد. ناقل بیانی یوکاریوتی pIRES2-EGFP (کلونتک، آمریکا) که در این مقاله به‌صورت مخفف pIRE به‌کار می‌رود، یک وکتور یوکاریوتی غیر ویروسی به اندازه ۵۳۰۸ جفت باز بوده و دارای پروموتور قوی CMV برای بیان ژن کلون شده در سلول‌های پستانداران می‌باشد. نشان‌گرهای آنتی‌بیوتیکی انتخابی آن در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی به‌ترتیب شامل مقاومت به کانامایسین و نئومایسین است. سلول HDF نیز به‌عنوان میزبان یوکاریوتی برای بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA و تکثیر ژن *nlpD*

خالص‌سازی DNA ژنومی از *اسینتوباکتر بومانی* با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) انجام شد. غلظت و کیفیت DNA تخلیص شده با استفاده از نانودراپ (ND-1000 PeqLab) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تکثیر ژن *nlpD* ردیف نوکلئوتیدی آن از درون ژنوم ثبت شده *اسینتوباکتر بومانی* در پایگاه بانک جهانی ژن به شماره دسترسی CP016298 گرفته شد. سپس، پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با کمک نرم‌افزار Gene Runner طراحی شدند. ردیف نوکلئوتیدی پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق به‌صورت زیر است:

F:5'-GTGAGATCTATGCATTTAACTGGGCAAC-3'
R:5'-AGTGAGCTCCTAATTTGGTAAAAGATTTGCG-3'

برای سهولت کلون‌سازی و یا خارج ساختن ژن *nlpD* از یک ناقل و کلون‌سازی مجدد آن در ناقل‌های متفاوت دیگر، در انتهای ۵-پریم پرایمرهای طراحی شده، جایگاه برش آنزیمی درنظر گرفته شد؛ به‌طوری‌که جایگاه برش در توالی پرایمر رفت سایت AGATCT برای آنزیم BglII و در توالی پرایمر برگشت سایت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-01]

GAGCTC برای آنزیم SacI قرار داده شد (نواحی که زیر آنها خط کشیده شده است). در بالادست هریک از سایت‌های برش آنزیمی تعداد سه نوکلئوتید به‌عنوان پایه درنظر گرفته شد. آزمایش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۲ میلی‌مولار MgCl2 (۱ میکرولیتر)، ۲۰۰ میکرو-مولار dNTPs (۰/۵ میکرولیتر)، ۱۰۰ نانومولار از هریک از پرایمرهای رفت و برگشت (۱ میکرولیتر از هر پرایمر)، ۱۰۰ نانو-گرم از DNA ژنومی تخلیص شده از *استیتوباکتر بومانی* (۲ میکرولیتر DNA)، و ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq (۰/۲۵ میکرولیتر) (همه مواد و واکنشگرهای PCR ساخت شرکت سینا-ژن، ایران) در دستگاه ترمال سایکلر (اپندروف، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی شامل ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی به‌صورت تک مرحله‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس، ۳۰ چرخه دمایی متناوب شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به-مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از انجام PCR محصولات آن به چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل شده و در ۹۰ ولت به‌مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شدند و با نور ماورای بنفش مشاهده گردیدند.

کلون‌سازی T/A

برای کلون‌سازی T/A مطابق آنچه که در بالا مورد اشاره قرار گرفت از T-vector (ترموفیشر، آمریکا) استفاده شد. در این مرحله لازم است قطعه خالصی از ژن *nlpD* تهیه شده و در وکتور pTZ درج گردد. وکتور pTZ دارای یک نوکلئوتید T به‌صورت تک‌رشته در هر انتهای خود است و به‌همین دلیل به آن T-vector گفته می‌شود. از طرف دیگر، ویژگی تعدادی از آنزیم‌های DNA پلیمراز این است که در دو انتهای محصولات PCR یک نوکلئوتید A بدون الگو و به‌صورت تک‌رشته‌ای قرار می‌دهند. از-آنجاکه A مکمل با T است، می‌توان محصولات حاصل از تکثیر به روش PCR را در وکتور T به‌راحتی درج کرد و به این سیستم کلون‌سازی یا همسانه‌سازی T/A گویند. در تحقیق حاضر قطعات تکثیر شده ژن *nlpD* روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و در برابر نور ماورای بنفش قطعه DNA مربوط به ژن *nlpD* با آگارز همراه آن با استفاده از اسکالپل بریده شد. ژن *nlpD* با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA از ژل (Bioneer، کره جنوبی) تخلیص شد. واکنش اتصال بین محصولات PCR و وکتور pTZ براساس روش کار کیت صورت پذیرفت. تراریزش (Transformation) محصول اتصال در باکتری *E. coli* سویه TOP10F به‌روش شیمیایی (با کاربرد CaCl2 ۰/۱ مولار) و متعاقب آن با انجام شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه) مطابق روش‌های استاندارد انجام شد [۱۱]. سپس، باکتری‌های مذکور روی پلیت کشت LB-آگار حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) کشت داده شدند. پلیت‌های کشت به‌مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شده و کلونی‌های حاصل برای غربال‌گری حضور ژن کلون شده ارزیابی گردیدند. برای تایید حضور ژن کلون شده در وکتور pTZ و بررسی تشکیل وکتور نوترکیب pTZ-nlpD از روش‌های PCR و هضم آنزیمی با آنزیم‌های برش دهنده BglII و SacI (بیولب، آمریکا) استفاده شد.

ایجاد سازواره نهایی pIRES2-EGFP-nlpD

سازواره نهایی مدنظر در این تحقیق از خارج ساختن ژن *nlpD* از ناقل pTZ-nlpD و ساب‌کلون کردن آن در ناقل pIRE به‌دست می‌آید. بدین‌منظور، ابتدا ناقل نوترکیب pTZ-nlpD با دو آنزیم BglII و SacI برش داده شد تا ژن *nlpD* از آن خارج گردد. همچنین، ناقل یوکاریوتی pIRE نیز با همین دو آنزیم مذکور بریده شد تا به‌صورت خطی درآید. همه محصولات برش آنزیمی روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. سپس، قطعه ژن *nlpD* و ناقل pIRE از روی ژل با کمک اسکالپل بریده شدند و با استفاده از کیت تخلیص گردیدند. واکنش اتصال بین ناقل یوکاریوتی pIRE و ژن *nlpD* با کمک آنزیم T4-لیگاز (سیناژن، ایران) انجام شد و مراحل تراریزش محصولات اتصال به درون باکتری *E. coli* سویه TOP10F انجام شد. به‌منظور تأیید صحت ساب‌کلونینگ و بررسی تشکیل سازواره نهایی pIRES2-EGFP-nlpD ابتدا واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت مخصوص ژن *nlpD* انجام گرفت. برای تایید بیشتر و دقیق‌تر سازواره نهایی هضم آنزیمی با آنزیم‌های BglII و SacI و تعیین توالی صورت پذیرفت. تعیین توالی ژن موردنظر به‌روش سانگر و توسط شرکت Genray کشور چین انجام شد.

تراریزش سلول‌های HDF با سازواره نهایی pIRES2-EGFP-nlpD

آزمایشات این مرحله با هدف انتقال سازواره نهایی حامل ژن *nlpD* به سلول‌های HDF انجام شد. برای تراریزش این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن استفاده شد [۱۲] که در این مرحله

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-01]

از دستگاه الکتروپوریشن مدل Gene Pulser Xcell (Bio Rad، آمریکا) بهره گرفته شد. تعداد ۲×۱۰^{۶} عدد سلول در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر در کووت ۰/۴ ویژه دستگاه الکتروپوریشن ریخته شد. سپس، مقدار ۸۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از سازواره نهایی pIRE-nlpD به این سوسپانسیون سلولی افزوده شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه‌سازی‌شده ۰/۲۴۰ کیلوولت و ۴۶۰ میکرو-فاراد به سلول‌های HDF داده شد و نمونه‌ها بلافاصله به‌مدت ۲ دقیقه روی یخ (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. سپس، سلول‌های تراریزش شده در محیط کشت RPMI 1640 (مرک، آلمان) به‌همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک‌های استر-پتومایسین و پنی‌سیلین (برای جلوگیری از آلودگی میکروبی) کشت داده شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط ۵ درصد CO_2 و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، به هریک از فلاسک‌های کشت مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسن (ژن مقاومت و نشانگر انتخابی ناقل یو-کاریوتی pIRE) اضافه شد و سلول‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت دیگر گرمخانه‌گذاری گردیدند. تمام مراحل فوق (الکتروپوریشن) برای دسته دیگری از سلول‌های HDF که به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شده بودند، نیز انجام شد؛ بااین‌تفاوت که به سلول‌های گروه شاهد هیچ‌گونه DNAای اضافه نگردید.

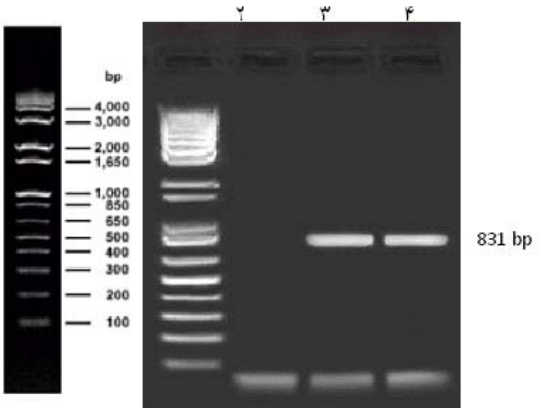
بررسی بیان ژن *nlpD* در سلول‌های HDF به‌روش RT-PCR

برای ارزیابی بیان اختصاصی ژن *nlpD* در سلول‌های انسانی از سلول‌های HDF تراریزش شده با ناقل نوترکیب pIRE-nlpD و سلول‌های گروه شاهد (فاقد ناقل نوترکیب) استفاده شد. استخراج RNA از این دو دسته سلول با استفاده از کیت (Qiagen, USA) انجام شد. سپس، تهیه cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (ترموساینتیفیک، آمریکا) بر اساس روش کار کیت صورت پذیرفت. واکنش رونوشت‌برداری معکوس (RT) برای تهیه cDNA با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر RT 10X، ۴ میکرولیتر RNA تخلیص شده از سلول‌های HDF (۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر)، ۱ واحد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (۱ میکرو-لیتر)، ۱ واحد آنزیم RNase Inhibitor (۱ میکرولیتر)، ۲ میکرو-لیتر Random Hexamer Primers (۱۰۰ نانومول) و با افزودن ۱۰ میکرولیتر آب مقطر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش‌گرها به‌مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر (اپندروف، آلمان) قرار داده شدند. سپس، آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت مخصوص ژن *nlpD* روی cDNAهای تولید شده انجام شد و نتایج روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید.

نتایج

تکثیر ژن *nlpD* *اسینتوباکتر بومانی*

در پژوهش حاضر تخلیص DNA ژنومی از سویه استاندارد باکتری *اسینتوباکتر بومانی* با موفقیت انجام شد. نتایج الکتروفورز DNA تخلیص شده روی ژل آگارز نشان دهنده کیفیت مناسب آن و بررسی غلظت DNA خالص سازی شده با نانودراپ نشان دهنده مقدار ۱۲۰ نانوگرم در هر میکرولیتر بود. نتایج انجام PCR برای ژن *nlpD* روی ژنوم *اسینتوباکتر بومانی* منجر به تشکیل باند ۸۳۱ جفت بازی مربوط به این ژن شد. نتایج PCR در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.



شکل شماره ۱- نتیجه آزمایش PCR برای تکثیر ژن *nlpD* *اسینتوباکتر بومانی*

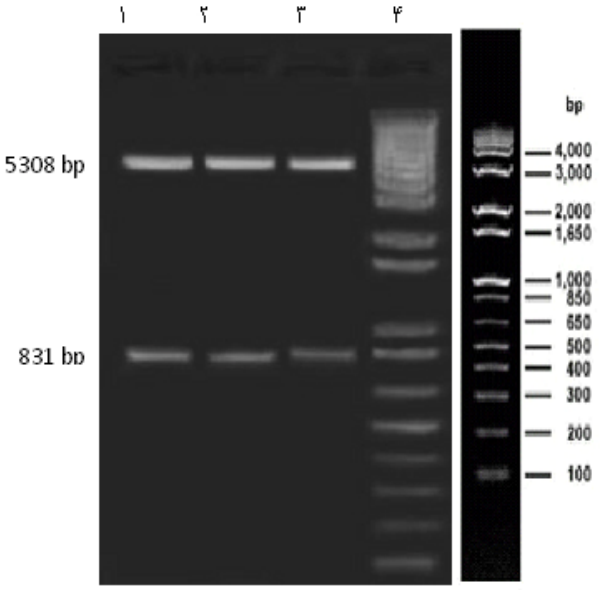
شماره ۱: نشانگر DNA مدل 1Kb شرکت ترموفیشر با شماره کاتالوگ -10816 015، شماره ۲: کنترل منفی (بدون DNA)، شماره‌های ۳ و ۴: باند ۸۳۱ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن nlpD.

نتایج مراحل کلون‌سازی ژن *nlpD*

نتیجه‌ی واکنش اتصال بین ناقل pTZ و قطعه ژن *nlpD* منجر به تشکیل سازواره نوترکیب pTZ-nlpD شد. بررسی درستی تشکیل سازواره pTZ-nlpD با PCR نشان‌دهنده موفقیت آزمایش بود. در واقع با انجام آزمایش PCR روی این سازواره باند اختصاصی مربوط به ژن هدف به اندازه ۸۳۱ جفت باز تشکیل شد. هم‌چنین، هضم آنزیمی سازواره نوترکیب pTZ-nlpD با آنزیم‌های BglII و SacI سبب تشکیل دو باند به اندازه‌های ۲۸۸۶ و ۸۳۱ جفت بازی به‌ترتیب مربوط به وکتور pTZ و قطعه ژن *nlpD* گردید. هرچند وکتور pTZ نوترکیب حاصل شده در این تحقیق حامل ژن *nlpD* بود، اما قادر به بیان آن نخواهد بود. لذا مرحله خارج ساختن ژن *nlpD* از ناقل pTZ-nlpD و انتقال آن

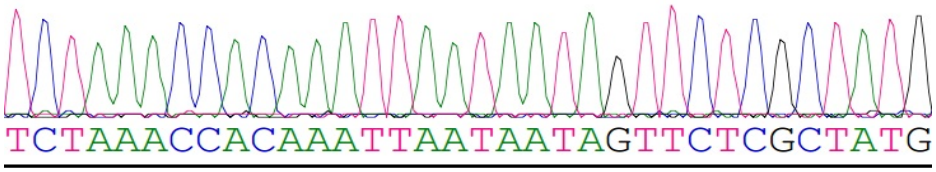
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-01]

به پلاسمید یوکاریوتی pIRE انجام شد. ساب‌کلونینگ ژن *nlpD* درون وکتور pIRE نتایج موفقیت‌آمیزی درپی داشت. تایید صحت ساب‌کلونینگ با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام گرفت و یافته‌های حاصل از این آزمایشات صحت تشکیل سازواره نهایی pIRE-nlpD را نشان داد. برش آنزیمی این پلاسمید تشکیل دو باند ۵۳۰۸ و ۸۳۱ جفت بازی که به‌ترتیب مربوط به وکتور pIRE و ژن *nlpD* می‌باشند را روی ژل آگارز ۱ درصد نمایان کرد (شکل شماره ۲). نتایج تعیین توالی قطعه ژن *nlpD* کلون شده در وکتور pIRE پس از مقایسه با توالی‌های موجود از این ژن در پایگاه داده‌های NCBI نشان‌دهنده این بود که هیچ‌گونه تغییر نوکلئوتیدی در اجزای سکانس این ژن به‌وجود نیامده و صحت توالی آن مورد تایید است. بخشی از نتایج تعیین توالی این ژن در شکل شماره ۳ نشان داده شده است.



شکل شماره ۲- برش آنزیمی ناقل نوترکیب نهایی pIRE-nlpD با آنزیم‌های BglII و SacI.

شماره‌های ۱ تا ۳: باندهای با اندازه‌های ۵۳۰۸ و ۸۳۱ جفت بازی به‌ترتیب مربوط به وکتور pIRE و ژن nlpD است، شماره ۴: نشانگر DNA مدل 1Kb شرکت ترموفیشر با شماره کاتالوگ 10816-015.



شکل شماره ۳- نمایش بخشی از دندروگرام تعیین توالی ژن *nlpD*

نتایج الکتروپوریشن و RT-PCR

برای تراریزش سازواره نهایی pIRE-nlpD که بیان کننده ژن *nlpD* در سلول‌های HDF از تکنیک الکتروپوریشن بهره گرفته شد. دست‌کاری سلول‌های HDF سبب تشکیل سلول‌های مقاوم به نئومایسین در محیط کشت گردید که نشان‌دهنده فعالیت موفق وکتور pIRE-nlpD در سلول‌های یوکاریوتی است. نتایج حاصل از انجام واکنش اختصاصی RT-PCR برای تایید بیان ژن *nlpD* *استیتوباکتر بومانی* در سلول‌های HDF مثبت بود؛ به‌طوری‌که پس از انجام PCR روی cDNAهای حاصل از آزمایش RT-PCR برای سلول‌های دریافت‌کننده وکتور نوترکیب حامل ژن هدف، باند ۸۳۱ جفت بازی مربوط به ژن *nlpD* تشکیل شد. اما همین آزمایش برای سلول‌های فاقد وکتور نوترکیب مثبت نبود. نتایج این آزمایش موید بیان موفق ژن *nlpD* در سلول‌های HDF می‌باشد.

بحث

استیتوباکتر بومانی یکی از باکتری‌های بیماری‌زای انسان است که بیشتر با عفونت‌های بیمارستانی همراه بوده و به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم است [۱۳]. علی‌رغم تلاش‌های بسیار، تاکنون واکسن موثری برای پیشگیری از عفونت ناشی از این باکتری تولید نشده است [۱۴]. سازواره ژنی به‌دست‌آمده در این تحقیق پتانسیل تولید محصول ژن *nlpD* را داشت. بررسی بیان این ژن در سطح RNA در سلول‌های یوکاریوتی HDF ارزیابی شد و نتایج آزمایش RT-PCR نشان از موفقیت‌آمیز بودن بیان این ژن در سلول‌های یوکاریوتی داشت. سازواره نوترکیب pIRE-nlpD از دو دیدگاه پتانسیل کاربرد در تحقیقات در زمینه واکسن‌های

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-01]

نوترکیب را دارد. اول جنبه اینکه می‌توان محصول پروتئینی آن را تولید نموده و به‌عنوان واکسن پپتیدی نوترکیب مورد بررسی قرار داد. دیدگاه دوم اینکه این وکتور یوکاریوتی امکان کاربرد به‌صورت واکسن ژنی در راستای تحقیقات واکسیناسیون علیه *اسینتوباکتر بومانی* در مدل حیوانات آزمایشگاهی را دارد. از زمان کشف اولین واکسن در سال ۱۷۹۶ میلادی توسط Edward Jenner برای پیشگیری از بیماری آبله تا کنون، واکسن‌های مفید و موثری علیه بسیاری از بیماری‌های مهم مثل فلج اطفال، دیفتری، کزاز و غیره کشف شده است [۱۵]. در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی در زمینه یافتن واکسن علیه *اسینتوباکتر بومانی* انجام شده است که به‌عنوان نمونه در ادامه به بعضی از آنها اشاره می‌شود. در یک تحقیق صورت گرفته در سال ۲۰۱۲ محققان با تزریق پروتئین نوترکیب OmpA مربوط به باکتری *اسینتوباکتر بومانی* به موش القای بالای آنتی‌بادی ضد OmpA را مشاهده نمودند. هم‌چنین، تیتر بالای IgG در موش‌های واکسینه شده نسبت به گروه شاهد دیده شد [۱۶]. در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۱۳ انجام شد محققان اقدام به کلون‌سازی ژن *ompA* *اسینتوباکتر بومانی* نمودند. در این تحقیق ژن *ompA* در محل سایت‌های برش آنزیمی BamHI و PstI در وکتور بیانی QE-32 کلون‌سازی شد و سپس محصول پروتئینی این ژن به‌صورت نوترکیب تولید و تخلیص گردید. در نهایت، تزریق دوزهای مختلف پروتئین نوترکیب OmpA به موش به‌همراه هیدروکسید آلومینیوم به‌عنوان ادجوانت انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که OmpA *اسینتوباکتر بومانی* قادر به تحریک سیستم ایمنی میزبان در سطوح مختلف است [۱۷]. این تحقیق از جنبه استفاده از یکی از آنتی‌ژن‌های مهم *اسینتوباکتر بومانی* و انجام مراحل کلون‌سازی مشابه تحقیق ماست، اما از نظر نوع وکتور بیانی و نوع ژن انتخابی با تحقیق ما متفاوت است. در سال‌های اخیر تحقیقات مهندسی ژنتیک در زمینه کلون‌سازی و کاربرد ژن‌های *اسینتوباکتر بومانی* بیشتر شده است. مثلاً در سال ۲۰۱۶ Singh و همکاران با استفاده از واکسینولوژی معکوس از بین ۵۷ پروتئین مورد بررسی از باکتری مذکور، پروتئین غشای خارجی پیلوس (FilF) را مناسب یافتند. پروتئین FilF در بین سویه‌های مختلف *اسینتوباکتر بومانی*، توالی اسید آمینه‌ای حفظ شده‌ای دارد. این محققان ژن *filF* را از ژنوم *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی کرده و در وکتور بیانی پروکاریوتی pET-28a کلون‌سازی نمودند و بیان این ژن را در باکتری *E. coli* سویه BL21 بررسی کردند [۱۸]. تفاوت این تحقیق با تحقیق صورت گرفته در پروژه ما استفاده از وکتور پروکاریوتی pET-28a و بررسی بیان این ژن در سیستم باکتریایی می‌باشد، درصورتی‌که ما از وکتور بیانی یوکاریوتی و سلول یوکاریوتی HDF برای بررسی بیان ژن استفاده نمودیم. کار ما با کار صورت گرفته توسط Singh و همکاران در تکنیک‌ها و روش کار صورت گرفته مشابه است. Huang و همکاران به بررسی ژن *ompW* باکتری *اسینتوباکتر بومانی* پرداختند. این محققان ژن *ompW* را بین دو سایت آنزیمی BamHI و EcoRI در پلاسمید pThioHisA کلون‌سازی نمودند و سازواره نوترکیب را به باکتری *E. coli* سویه BL21 منتقل نمودند. این ژن در باکتری میزبان بیان بسیار بالایی را نشان داد. در تحقیق مذکور برخلاف تحقیق ما از وکتور پروکاریوتی استفاده شده بود، اما شباهت آن استفاده از یکی از ژن‌های مهم و آنتی‌ژنتیک *اسینتوباکتر بومانی* است [۱۹]. مزیت محصول به‌دست آمده در تحقیق ما (سازواره نهایی pIRE-nlpD) در این است که بیان موفقی را در سلول‌های یوکاریوتی در محیط کشت نشان داده و امکان کاربرد به‌صورت تزریق مستقیم به عضله حیوان آزمایشگاهی را به‌عنوان واکسن ژنی دارد. اما کاستی‌های آن ممکن است عدم جذب کافی این وکتور نوترکیب توسط سلول‌های عضلانی حیوانات مدل، در صورت تزریق به‌صورت مستقیم باشد که در این صورت سبب کاهش تولید محصول ژن نوترکیب و عدم وجود ایمنی‌زایی کافی خواهد شد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ژن *nlpD* باکتری بیماری‌زای *اسینتوباکتر بومانی* به‌طور موفقیت‌آمیز در ناقل pTZ درج شد و سازواره نوترکیب pTZ-nlpD حاصل گردید. باتوجه به صحت نتایج به‌دست آمده از تعیین توالی می‌توان از سازواره pTZ-nlpD به‌عنوان منبعی از ژن هدف برای انجام تحقیقات آینده استفاده کرد. از طرف دیگر، سازواره نهایی pIRE-nlpD که از ترکیب ناقل بیانی یوکاریوتی pIRES2-EGFP به‌علاوه ژن *nlpD* به‌دست آمده است، می‌تواند در زمینه تولید واکسن‌های نوترکیب به‌صورت بیان ژن *nlpD* و تولید محصول پروتئینی و خالص‌سازی آن با اهداف کاربردی به‌صورت واکسن پپتیدی مدنظر قرار گیرد. همچنین، بیان اولیه و موفق ژن *nlpD* در سیستم یوکاریوتی که در پژوهش حاضر محقق شد راهی روشن در راستای کاربرد pIRE-nlpD به‌عنوان واکسن ژنی در مدل حیوانی پیش رو قرار می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجوی دکترای تخصصی است. محققان و نویسندگان این مقاله برخود لازم می-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-01]

دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از تمامی همکاران و محققانی که ما را در به ثمر رسیدن این پایان‌نامه یاری نمودند، اعلام نمایند.

References:

[1] Pourhajibagher M, Hashemi FB, Pourakbari B, Aziemzadeh M, Bahador A. Antimicrobial resistance of Acinetobacter baumannii to imipenem in Iran: a systematic review and meta-analysis. ***Open Microbiol J*** 2016; 10: 32-42.

[2] Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen. ***Virulence*** 2012; 3(3): 243-50.

[3] Kroger C, Kary SC, Schauer K, Cameron AD. Genetic regulation of virulence and antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii. ***Genes (Basel)*** 2016; 8(1): pii: E12.

[4] Ni Z, Chen Y, Ong E, He Y. Antibiotic resistance determinant-focused Acinetobacter baumannii vaccine designed using reverse vaccinology. ***Int J Mol Sci*** 2017; 18(2): pii: E458.

[5] Ahmad TA, Tawfik DM, Sheweita SA, Haroun M, El-Sayed LH. Development of immunization trials against Acinetobacter baumannii. ***Trials Vaccinol*** 2016; 5: 53-60.

[6] Hua X, Liu L, Fang Y, Shi Q, Li X, Chen Q, et al. Colistin resistance in Acinetobacter baumannii MDR-ZJ06 revealed by a multiomics approach. ***Front Cell Infect Microbiol*** 2017; 7: 45.

[7] Singh R, Capalash N, Sharma P. Reverse vaccinology: developing vaccine against MDR Acinetobacter baumannii. ***J Vaccines Vaccin*** 2016; 7(3): 1-3.

[8] Eslami E, Doosti A. Cloning and expression study of the hcpD gene of Helicobacter pylori. ***J Ardabil Uni Med Sci*** 2017; 17(1): 499-510. [in Persian]

[9] Moriel DG, Beatson SA, Wurpel DJ, Lipman J, Nimmo GR, Paterson DL, et al. Identification of novel vaccine candidates against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. ***PLoS One*** 2013; 8(10): e77631.

[10] Tidhar A, Flashner Y, Cohen S, Levi Y, Zauberman A, Gur D, et al. The NlpD lipoprotein is a novel Yersinia pestis virulence factor essential for the development of plague. ***PLoS One*** 2009; 4(9): e7023.

[11] Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Kargar M, Sharifi A. Generation of divalent DNA vaccine based on p39 and shiga-like toxin 2 (stx2) genes. ***Genetika*** 2015; 47(2): 499-507.

[12] Ghorbani M, Doosti A. Isolation and cloning of Helicobacter Pylori ureE gene into pIRES2-DSRed expression vector to generate a gene vaccine. ***J Birjand Uni Med Sci*** 2016; 23(4): 286-97. [in Persian]

[13] Snitkin ES, Zelazny AM, Montero CI, Stock F, Mijares L, Murray PR, et al. Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of Acinetobacter baumannii. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2011; 108(33): 13758-63.

[14] Taiwo AA, Falilat AJ, Ezemuel YS. Computational design of peptide vaccine against Acinetobacter baumannii infection using comparative genomic approach. ***Comput Biol Bioinform*** 2014; 2(1): 13-18.

[15] Jorritsma SH, Gowans EJ, Grubor-Bauk B, Wijesundara DK. Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. ***Vaccine*** 2016; 34(46): 5488-94.

[16] Luo G, Lin L, Ibrahim AS, Baquir B, Pantapalangkoor P, Bonomo RA, et al. Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-Acinetobacter baumannii infection. ***PLoS One*** 2012; 7(1): e29446.

[17] Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Hujer AM, Taracila MA, et al. Acinetobacter baumannii rOmpA vaccine dose alters immune polarization and immunodominant epitopes. ***Vaccine*** 2013; 31(2): 313-8.

[18] Singh R, Garg N, Shukla G, Capalash N, Sharma P. Immunoprotective efficacy of Acinetobacter baumannii outer membrane protein, FilF, predicted In silico as a potential vaccine candidate. ***Front Microbiol*** 2016; 7: 158.

[19] Huang W, Wang S, Yao Y, Xia Y, Yang X, Long Q, et al. OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. ***Vaccine*** 2015; 33(36): 4479-85.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-01]