زیر همسانه سازی و بیان آنتی ژن کایمر C-CFTX1-STxB زهر عروس دریایی و بررسی آنتی ژنیسیتی آن در موش سوری

حسین هنری*[۱]، سید مجتبی آقایی[۱]، مهدی حسین زاده[۱]

۱) مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۹**

چکیده

مقدمه: گزش عروس دریایی جعبه ای دردناک بوده و می تواند مهلک باشد. زهر گونه C. fleckeri حاوی انواع پروتئین های فعال زیستی است. دو مورد از فراوان ترین پروتئین های موجود در این گونه، CfTX-1 و CfTX-2 است که با استفاده از روش الکتروفورز یا کروماتوگرافی به راحتی قابل جداسازی نمی باشند. فناوری بیان نوترکیب، جایگزینی مناسب برای جداسازی پروتئین طبیعی زهر می باشد. هدف از این مطالعه، بیان پروتئین C-CfTX1-STxB در E.coli و بررسی آنتی ژنیسیتی آن در موش سوری می باشد.

مواد و روش ها: ژن کامل CfTX1 صناعی در پلاسمید pUC57 تهیه شد. قطعه C- CfTX-1 به وسیله PCR تکثیر و با جایگاه های آنزیمی BamHI و SalI در وکتور بیانی pET28a-stxB زیر همسانه سازی و به باکتری E.coli ترانسفورم شد. بیان ژن تحت القای IPTG انجام گردید. پس از تخلیص پروتئین و تزریق به موش سوری، میزان آنتی بادی تولید شده در سرم اندازه گیری شد. هم چنین موش ها به وسیله زهر عروس دریایی Rhopilema nomadica چالش شدند.

یافته های پژوهش: در این مطالعه تجربی، ژن C-CfTX1-STxB، کلون شده در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله PCR، توالی یابی و با آنالیز آنزیمی تایید گردید. هم چنین پروتئین نوترکیب تولید شده به وسیله وسترن تایید شد. آنتی بادی تولید شده در سرم، توسط تست الایزا کمیت سنجی شد.

بحث و نتیجه گیری: موش های ایمن شده در چالشی پس از ۶۰ روز، ۵۰ برابر LD50 زهر عروس دریایی را تحمل می نمایند. با توجه به عدم خاصیت کاردیوتوکسیستی و نوروتوکسیستی پروتئین نوترکیب، این پروتئین تولید شده می تواند به عنوان کاندید واکسن زهر عروس دریایی در موش سوری یا در مراحل بعدی کارآزمایی بالینی برای انسان پیشنهاد شود.

واژه های کلیدی: Chironex fleckeri ، زهر عـــروس دریایی، آنـــــتی ژن کایمر C-CfTX-1-STxB، آنتی ژنیسیتی

* نویسنده مسئول: مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

Email: honari.hosein@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

عروس دریایی به عنوان یک مشکل اورژانسی در مناطق مختلف ساحلی در سراسر جهان از جمله سواحل خلیج فارس محسوب می شود. گزش عروس دریایی، در آب های نمکی سواحل جنوبی کشور و در هنگام شنای مسافران اتفاق می افتد که در برخـــی موارد می تواند مرگ آور باشد. عروس دریایی جعبه ای Chironex fleckeri از خطرناک ترین گونه های عروس دریایی بوده که جزو(عروس دریایی جعبه ای) box jellyfish است و می تواند به عنوان یک عامل کشنده مد نظر قرار گیرد. گزش عـــروس دریایی جعبه ای دردناک بوده و می تواند کشنده باشد. زهر گونه C. fleckeri حاوی انواع پروتئیـــن های فعال زیستی است که سیتولیتیک، سیتوتوکسیک، التهابی یا کشنده هستند(۳-۱). این زهرها شامل: آنزیم ها، زهرهای قوی ایجاد کننده منافذ و نوروتوکسین ها که بر سلول های سیستم عصبی تاثیرگذارند می باشند. زهرهای ایجاد کننده منافذ به شکل قوی، منافذ غشایی را ایجاد می کنند که با استفاده از لیز اسمزی باعث مرگ سلولی می شوند(۴). در اثر گزش مداوم و مکرر توسط کیسه تنان، همولیز توسط چندین زهر صورت می گیرد و گاهی اوقات کشنده است(۵). در حال حاضر بخش عمده ایی از اطلاعات در مورد زهر همولیتیک کیسه تنان از شقایق های دریایی و مرجان های نرم به دست آمده است. اطـــلاعات کمتری مربوط به زهرعروس دریایی وجود دارد که از گزش بدن موجودات و ماهیگیران به دست آمده است(۵،۶). سالیانه ۱۵۰ میلیون مورد گزش با عروس دریایی در سرتاسر جهان گزارش می شود(۷). در سال ۱۳۹۲، ۳۰۵ مورد گزیدگی در آب های خلیج فارس توسط عروس دریایی گزارش شده است(۲). پروتئین های موجود در نماتوسیت عـــروس هـــای دریایی C. fleckeri پروتئین های پایه با وزن مولکولی ۴۳ الی ۴۵ کیلودالتون می باشند و شامل هر دو ناحیه آلـــفا و بتا می باشند. فراوان ترین آن ها CfTX-1 و CfTX-2 می باشند(۸). ژن cftx دارای ۱۴۹۳ جفت باز، ۴۶۱ اسید آمینه و دارای mRNA خطی می باشد که پروتئینی به وزن مولکولی ۵۱ کیلودالتـــون را کد می کند. C. fleckeri دارای زهری با اثر آنی می باشد به حدی که قادر است در کمتر از ۵ دقیقه یک فرد را از پا در بیاورد(۹). زهرهای های CfTX نوع ۱ حدوداً دارای ۴۳ کیلودالتون و نوع ۲ دارای وزن تقریبی ۴۵ کیلودالتون می باشند، که از طریق کروماتوگرافی تمایز یونی و کروماتوگرافی ژلی با هم تخلیص می شوند(۸).

مطالعه اخیری که در مورد زهرهای CfTX انجام شد، نشان داد که CfTX-1/2 درعرض یک دقیقه در موش های صحرایی بی هوش، که در معرض این زهرها قرار گرفتند باعث فروپاشی قلبی عروقی شد(۸). شایع ترین علت مرگ در این گونه، نارسایی تنفسی و ایست قلبی بوده است(۸،۱۰). پیچیـــدگی زهرهای CfTX عروس دریایی نشان دهنده یک چالش درمانی منحصر به فرد بوده که نیاز به ابداع روش های درمانی و پیشگیری را یادآوری می کند بنا بر این به عنوان یک هدف درمانی، برای درمان گزیدگی یا نیش زدگی و یا به عنوان ترکیباتی برای طراحی دارو، دارای اهمیت هستند(۹). پادزهر علیه زهر عروس دریایی جعبه ای می تواند اثر زهر را خنثی کند(۱۱)، البته در زمانی که مقدم بر ونوم استفاده شود(۱۲). استفاده به موقع و سریع از پادزهر علیه زهر C. fleckeri بهترین درمان در کاهش درد و کاهش اسکار گزش می باشد(۱۳).

بیشتر آنتی ژن های حفاظتی که تجویز می گردند به مقدار زیادی ایمـــونوژنیـــک نیستند و بیشتر ادجوانت های به ثبت رسیده فعلی در شروع فعال سازی ایمنی مخاطی غیر موثر هستند. در تحقیقات صورت گرفته مشخص گردید که مقدار آنتی ژنی که در حالت متصل شده با یک ادجوانت برای مصرف ضروری است، کمتر از مقداری می باشد که به صورت تجویز هم زمان برای ایمنی زایی استفاده می گردد که این نشان از مزیت های متصل کردن آنتی ژن‌ها با ادجوانت های مختلف دارد. امروزه توجه خاصی به واکسن هایی شده که دارای این مزیت هستند که علاوه بر نوترکیب بودن، از طریق فعال سازی سیستم ایمنی، تاثیر آن ها نیز افزایش یافته باشد(۱۴،۱۵). STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb3 متصل می گردد که روی اکثر سلول هـــای بـــدن بیان می شود(۱۶). مطالعات نشان داده است که بیان Gb3

در سطح سلول های سرطانی انسان، فراوانی بسیار زیادی دارد. هم چنین این فراوانی در سطح سلول های دندریت(DC) انسانی و موش نیز دیده می شود(۱۷). STxB به پروتئازها به خاطر نداشتن واحد لیزین مقاوم بوده و در سیتوزول محافظت می شود بنا بر این به عنوان یک ادجوانت مناسب کاربرد دارد(۱۸). تحقیق بر روی فعالیت های زیستی زهر عروس دریایی می تواند برای جلوگیری و یا کاهش علائم ناشی از آلوده شدن به همان زهر مفید باشد؛ هم چنین مطالعه روی زهر عروس دریایی می تواند برای ارتقای سلامت انسان مفید باشد(۱۹). با توجه به پیشینه تحقیقات انجام شده بر روی پروتئین های CfTX1 و CfTX2 و ونوم(۲۰) و نیز بررسی های بیوانفورماتیکی انجام شده در این پژوهش، این قسمت دربین هر دو زهر CfTX-1/2 همولوژی ۹۶ درصد دارد. لذا در این مطالعه کلونینگ و بیان قسمت ۵۷۶ جفت بازی به همراه ژن STxB که دارای خاصیت آنتی ژنسیتی، حاملی، یاوری و دارای گیرنده سطح سلولی به نام Gb3 است که به راحتی به سطح سلول متصل می گردد، برای بررسی انتخاب گردید.

مواد و روش ها

در این مطالعه توالی آمینواسیدی پروتئین های CfTX1 از بانک ژن NCBI (با شماره Accession No. EF636902) استخراج گـــردید. از پلاسمـــید pET28a(+) حاوی پروتئین stxB همراه با لینکر پروتئینی RARR از آزمایشگاه مولکولی دانشگاه جامع امام حسین(ع) استفاده شد(۲۱). ژن C-CfTX1 جهت سنتز در وکتور pUC57، با جایگاه های برش آنزیمی BamHI و SalI به شرکت ندای فن سفارش داده شد. پیش از ثبت سفارش، توالی ژن صناعی مورد نظر به منظور بهینه سازی به سایت ww.genscript.com ارجاع داده شد. آماده سازی محصول برش آنزیمی و پلاسمیدی برای ساخت کاست ژنی جدید، ژن CfTX1 کـــلون شـــده در وکتور pUC57، و pET28a(+)-stxB با آنزیم های محدودکننده SalI و BamHI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. سپس هر دو قطعه برش خورده از روی ژل آگارز به وسیله کیت استخراج DNA استخراج شد.

الحاق و ترانسفورماسیون: به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد توسط آنزیم T4 DNA Ligase شرکت فرمنتاز قطعه ژنی به دست آمده در پلاسمید pET28a(+)-stxB ساب کلون گردید. محصول الحاق، به وسیله شوک حرارتی به سلول های مستعد شده(تهیه شده به روش شیمیایی) E.coli BL21 سویه DE3 منتقل شد. کلنی های نوترکیب با غربالگری آنتی بیوتیکی کانامایسین جدا شدند و کاست C-CfTXA-STxB با PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت(۲۲).

بیان کاست ژنی C-CfTXA-STxB: برای بیان کاست ژنی از کشت شبانه کلون های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر(برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاء کننده پروموتر(IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد(۲۳).

الکتروفورز SDS-PAGE: سلول های باکتریایی جمع آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول ها با بافر لیزکننده B مخلوط و از طریق سونیکاسیون شکسته و نمونه ها سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با نسبت یک(بافر نمونه) به پنج(نمونه) با سمپل بافر دارای غلظت 5x مخلوط و به مدت ۵ دقیـــقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانده شد. در نهایت نمونه های تیمار شده توسط ژل الکتروفورز(SDS-PAGE) از لحاظ بیان پروتـــئین های نوترکیب بررسی شدند(۱۵). نمونه های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی(سیناژن) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲ درصد با جریان ثـــابت ۲۵ میلی آمپر بود. برای مشاهده باندهای پروتئین، از روش رنگ آمیزی با کوماسی بلو استفاده شد(۲۳).

تخلیص و تعیین غلظت پروتئین نوترکیب: پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NAT جداسازی و نمونه های حاصل برروی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد. غلظت پروتئین بیان شده

به کمک برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی(BSA) به عنوان استاندارد انجام شد.

تخلیص پروتئین نوترکیب از روی ژل: پس از الکتروفورز دونوار طولی از دو طرف ژل مـــورد نظر می بریم یکی از این دو نوار شامل پروتئین مارکر و یکی از چاهک های محتوی نمونه می باشد و نوار بزرگ تر که از اتصال چاهک ها به هم بوده همان نمونه را شامل می شود. نوار اول را رنـــگ آمیـــزی می کنیم. باند بریده شده را با آب مقطر می شوییم هر تکه ژل را به قطعات کوچک ۲ تا ۵ میلی متری تکه تکه می کنیم و سپس ۱ میلی لیتر یا بیشتـــــر از بافر حل کننده(Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، NaCl ۱۵۰ میلی مولار و EDTA ۰/۱ میلی مولار با PH=7.5) افزوده می شود. قطعات ژل کاملاً با ته پیستون سرنگ خرد شدند. انتظار می رود که ۲ میلی لیتر پروتئین از ژل مورد نظر آزاد شده باشد.

تولید آنتی بادی علیه C-CfTXA-STxB: به منظور بررسی پاسخ ایمنی، از ۵ عدد موش سوری به عنوان تست و ۴ عدد به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر موش، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده C-CfTXA-STxB با ادجوانت روغن در آب به صورت داخل صفاقی در ۴ نوبت در فاصله زمانی ۱۴ روز به هر موش تزریق شد. در کنار هر مرحله از تزریق به حیوانات تست به موش های کنترل فقط مخلوط ادجوانت و PBS استریل همگن شده تزریق گردید. تیتر آنتی بادی آن ها توسط آزمایش الایزا اندازه گیری شد.

تایید پروتئین نوترکیب: برای تائید پروتئین نوترکیب، از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وســـترن Bio-rad (Mini Protean) روی کـــــاغذ نیتروسلولز منتقل شد. پس از بلاکینگ جایگاه های خالی و شستشو با PBST، کاغذ با آنتی بـــــادی های پلی کلونال موشی با رقت ۱:۲۰۰۰ گرماگذاری شد. سپس با PBST شستشو و کونژوگه موشی با رقت ۱:۱۰۰۰۰ به عنوان آنتی بادی تشخیص دهنده به کار رفت. نهایتاً، کاغذ نیتروسلولز در محلول سوبسترای رنگ زای DAB تا ظهور باند پروتئینی، قرار گرفت. برای توقف واکنش، کاغذ در آب مقطر قرار داده شد(۲۳).

چالش حیوانات ایمن شده با زهر عروس دریایی: بعد از ایمن سازی حیوانات، ۵۰ برابر LD50 زهر عروس دریایی به موش ها تزریق و بعد از ۲/۵ روز نتایج آن مورد بررسی و حیوانات تا ۳۰ روز تحت نظر قرار گرفتند.

یافته های پژوهش

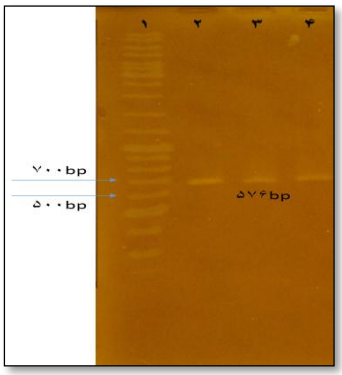
ساخت کاست ژنی c-cftx1-stxB: قطعه ژنی cftx1 با آغازگرهای مربوطه تکثیر شد. با هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم های محدودالاثر SalI و BamHI ژن مورد نظر با طول توالی ۵۷۶ جفت باز از وکتور خارج گردید(شکل شماره ۱). برای قرار دادن قطعه ژنی cftx1 در وکتور pET-28a(+)-stxB پلاسمیدهای pUC57، pET-28a(+)-stxB با آنزیـــــم های محدودالاثر SalI و BamHI خطی شدند. بعد از برش آنزیمی، پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص شد. پلاسمید تک باند شده در جریان الکتروفورز در راستای باند حدود ۵۶۰۹ جفت بازی و ۵۷۶ جفت بازی ایستاد(شکل شماره ۲).

تایید صحت زیر همسانه سازی: برای تایید ژن زیر همسانه سازی شده، واکنش PCR و برش آنزیمی انجام شد.

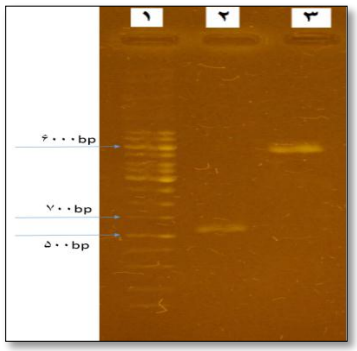
PCR از روی پلاسمیدهای تخلـــیص شده: از کلون هایی که PCR آن ها مثبت بود پلاسمید تخلیص شد و به دنبال آن از روی آن ها PCR انجام شد. پس از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز، در موقعیت ۸۷۰ جفت بازی(۵۷۶ جفت باز cftx1، ۲۴۰ جفت باز stxB(به همراه لینکر) و حدود ۵۴ جفت باز پرایمرها) باند تشکـــــیل شد. همان گونه که در شکل شماره ۳،۳ مشاهده می شـــود باندهای ظاهر شده نـــشان گر مثبـــــت بودن فـــرآیند PCR برای نمونه آزمایش مـــــورد نظر می باشد.

تایید زیر همسانه سازی با استفاده از واکنش هضم با آنزیم های XhoI و BamHI: انتظار می رود پس از برش وکتور با آنزیم های مذکور(XhoI و BamHI) یک تک باند پلاسمیدی در ناحیه ۵۳۶۹ جفت بازی تشکیل شود و یک باند در راستای ۸۲۲

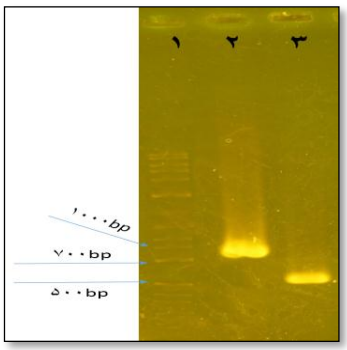
جفت بازی تشکیل شود. برای مشخص شدن صحت کار ۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش برش روی ژل آگارز الکتروفورز شد(شکل شماره ۴).



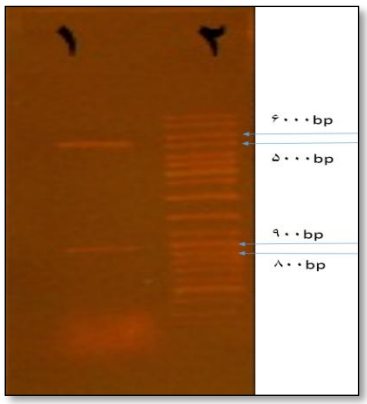
شکل شماره ۱. الگوی الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تکثیر قطعه ۵۷۶ جفت بازی ژن cftx1 توسط PCR.
ردیف ۱- نشانگر مولکولی DNA. ردیف های ۲ تا ۴- محصولات PCR



شکل شماره ۲. برش آنزیمی قطعه ژنی cftx1 و pET-28a(+)-stxB با آنزیم های محدودالاثر SalI و BamHI و تخلیص آن ها چاهک ۱) نشانگر DNA، چاهک ۲) باند ظاهر شده بعد از تخلیص ژن cftx1 از روی ژل در ناحیه تقریبی ۵۷۶ جفت بازی ۳) برش آنزیمی پلاسمید pET-28a(+)-stxB



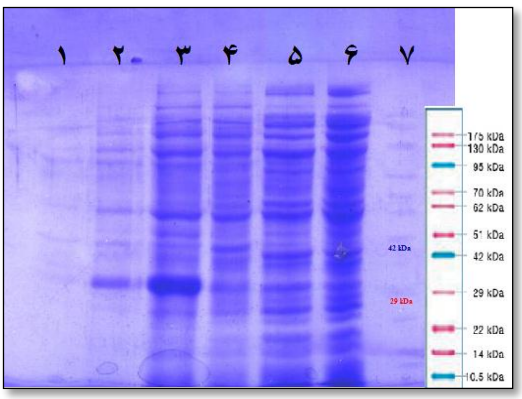
شکل شماره ۳. الکتروفورز محصولات PCR چاهک ۱) نشانگر DNA، چاهک ۲) باند حاصل از الکتروفورز محصول PCR از ژن c-cftx1-stxB که در جایگاه صحیح ۸۷۰ جفت بازی متوقف شد. چاهک ۳) باند حاصل از الکتروفورز محصول PCR از ژن cftx1 که در جایگاه صحیح ۵۷۶ جفت بازی متوقف شد.



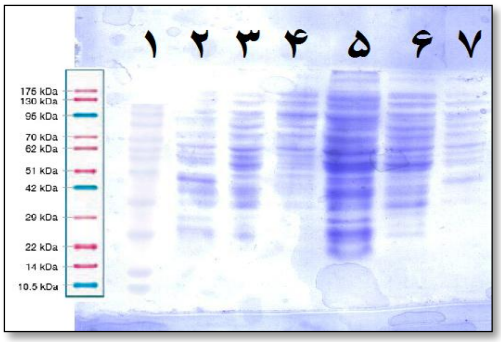
شکل شماره ۴. چاهک ۱) نشانگر DNA ، چاهک ۲) برش آنزیمی pET28a(+)-c-cftx1-stxB با آنزیم‌های XhoI و BamHI

بیان پروتئین نوترکیب C-CfTX1-STxB: پس از کشت سلول ها و القاء با IPTG، بیـــان پروتـــئین C-CfTX1-STxB صورت پذیرفت و سپس نمونه ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان طور که در شکل شماره ۵ مشخص است، باند پروتئینی مورد نظر درون بافر لیزکننده B حاصل از سونیکاسیون دیده می شود. بنا بر این پروتئین ما، به صورت انکلوژن بادی تولید شده و در محیط سیتوپلاسمی باکتری محلول نمی باشد. نتایج باند پروتئینی نشان می دهد که ژن همسانه سازی شده با القاء IPTG بیان بسیار بالایی را به صورت انکـلوژن بادی در باکتری تولید می کند.

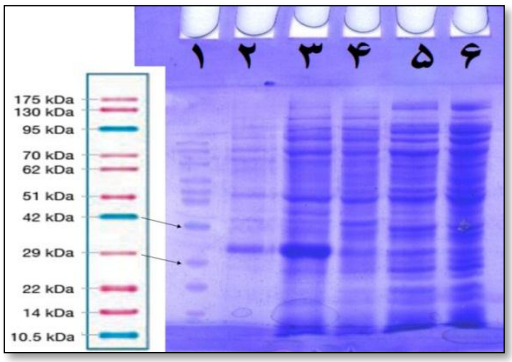
بهینه سازی بیان کایمر CfTX1-STxB: با تغییر پارامترهای موثر بر میـــزان و نحوه بیان نوترکیب پروتئین ها در باکتری E.coli (دمـــای گرماگذاری، غلظت IPTG و بازه زمانی القاء)، امکان بیان نوترکیب کایمر C-cftx1-stxB به شکل محلول بررسی شد. با کاهش دما از ۳۷ درجه تا ۱۸ درجه سانتی گراد به مرور از بیان پروتئین C-cftx1-stxB به شکل نامحلول کاسته و به فاز محلول منتقل شده است که این روند برای نمونه های گرماگذاری شده در دمای ۱۸ درجه محسوس تر است(شکل شماره ۶ و ۷).



شکل شماره ۵. الگوی الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲ درصد حاصل از بیان پروتئین نوترکیب C-CfTX1-STxB.
ردیف ۱- نمونه با القای IPTG در محلول ایمیدازول ۲- نمونه با القای IPTG در محلول ایمیدازول. ردیف ۳- نمونه با القای IPTG در بافرلیزکننده B (فاز اوره). ردیف ۴- نمونه کنترل بدون القای IPTG در بافر لیزکننده B. ردیف ۵- نمونه با القای IPTG در محلول PBS. ردیف ۶- : نمونه کنترل بدون القای IPTG در محلول PBS. ۷- نشانگر مولکولی پروتئین.

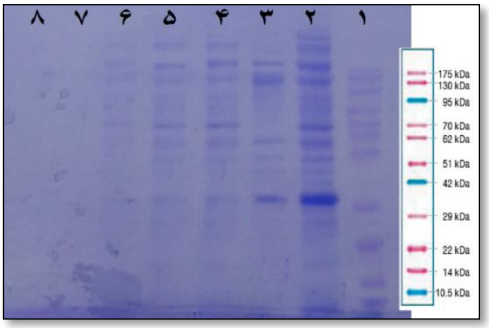


شکل ۶: الگوی الکتروفورز بیان آنتی‌ژن کایمر C-cftx1-stxB در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور غلظت ۱ میلی مولار از IPTG.
۱- نشانگر ملکولی پروتئین. ردیف ۲-شاهد ایمیدازول ردیف ۳- بیان در فاز ایمیدازول. ردیف ۴- بیان در فاز اوره . ردیف ۵- شاهد اوره.
ردیف ۶- بیان PBS. ردیف ۷- شاهد PBS.

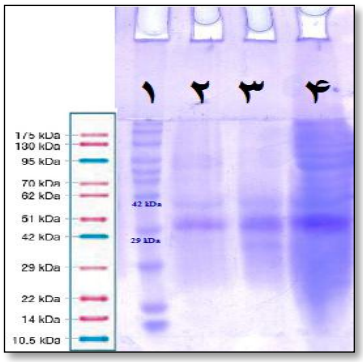


شکل شماره ۷. الف) الگوی الکتروفورز بیان آنتی ژن کایمر C-cftx1-stxB در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد در حضور غلظت ۱ میلی مولار از IPTG و به مدت ۱۶ ساعت. ۱- نشانگر ملکولی پروتئین. ردیف ۲- بیان در فاز ایمیدازول. ردیف ۳- بیان در فاز اوره .
ردیف ۴- شاهد اوره. ردیف ۵- بیان PBS. ردیف ۶- شاهد PBS.

آماده سازی نمونه برای عبور از ستون کروماتوگرافی:
محلول به دست آمده برای اســـــتفاده در ستون Ni-NTA مورد استفاده قرار گرفت. سپس محلول شفاف به ستـــون منتـــقل گردید و در هر مرحله شستشو نمونه ای از آن برای بررسی میزان خلوص پروتئین نوترکیب با استفاده از SDS-PAGE برداشته شد که نتایج آن نشان می دهد که پروتئین ما از ستون یکباره خارج می شود و ستون قابلیت جداسازی مطلوبی برای پروتئین نوترکیب نشان نمی دهد و به دلیل بازدهی بسیار کم روش کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل برای تخلیص پروتئین نوترکیب از روش تخلیص از روی ژل استفاده شد(شکل شماره ۸ و ۹).



شکل شماره ۸. تصویر الکتروفورز حاصل از تخلیص پروتئین از ستون نیکل. با استفاده از ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE
ستون۱: مارکر پروتئینی، ستون ۲: flow قبل از ستون نیکل، ستون ۳: flow ستون، ستون ۴: بافر C ، ستون ۵: بافر D،
ستون ۶: بافر E ، ستون ۷: ایمیدازول ۲۵۰. ستون ۸: بافر MES.



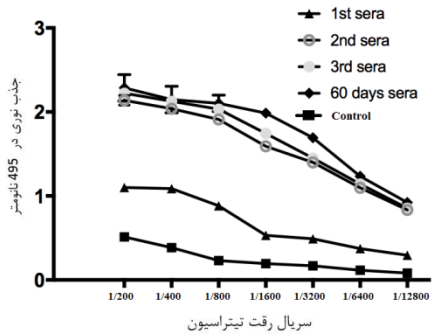
شکل شماره ۹. تخلیص پروتئین نوترکیب C-cftx1-stxB از روی ژل ستون ۱: مارکر پروتئینی، ستون ۲ و ۳: تخلیص پروتئین از ژل، ستون ۴: پروتئین تخلیص نشده.

تخلیص پروتئین نوترکیب C-cftx1-stxB از روی ژل: تزریق آنتی ژن کایمر C-CfTX1-STxB به موش سوری: با آماده شدن آنتی ژن نوترکیب C-CfTX1-STxB به شکل خالص شده و پس از تعیین غلظت آن، فرآیند تزریق آنتی ژن آزاد با ادجوانت فروند کامل و ناقص به شکل زیر جلدی در چهار نوبت به فاصله هر ۲ هفته یک بار به موش های گروه آزمون انجام شد. هم چنین میزان برابری از تزریقات گروه آزمون، بافر PBS استریل و ادجوانت فروند به گروه کنترل تزریق شد. در این بازه زمانی وضعیت فعالیت بدنی و تغذیه ای، پاسخ التهاب پوستی و خونریزی در محل تزریق بررسی شد و هیچ گونه مشکل و آسیبی در حیوان طی تزریقات مشاهده نگردید.

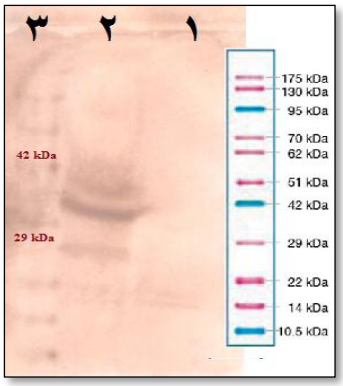
ارزیابی تیتر آنتی بادی ضد پروتئین نوترکیب به روش الایزای غیر مستقیم: به منظور ارزیابی آنتی بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر بار تزریق به صورت تصادفی از موش های تست و شاهد خون گیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن ها آزمایش الایزا انجام شد که در نمودار شماره ۱، میانگین تیتر آنتی بادی در هر مرحله و مقایسه تیتر آنتی بادی در گروه های موش سوری نشان داده شده است.

تائید پروتئین نوترکیب C-cftx1-stxB به روش وسترن بلات: پس از انجام این آزمون، رنگ پذیری کاغذ نیتروسلولز در مقابل باند ۳۲ کیلو دالتونی نشانگر ملکولی پروتئین انجام شد(شکل شماره ۱۰).

چالش موش های ایمن با استفاده از زهرخام عروس دریایی گونه های جنوب و زهر نوترکیب: پس از استحصال زهرخام عروس دریایی گونه های جنوب و پس از محاسبه میزان نیمه دُز کشنده(LD50)، عصاره زهرتا غلظت ۵۰ برابر آن به موش های ایمن شده تزریق شد که قادر به تحمل بودند.



نمودار شماره ۱. نمودار بررسی تیتر آنتی بادی IgG تولید شده در موش سوری علیه نمونه آنتی ژن C-CfTX1-STxB برهنه تزریقی به همراه ادجوانت روغن در آب



شکل شماره ۱۰. الگوی آنالیز وسترن بلات تائید آنتی ژن کایمر C-CfTX1-STxB. ردیف ۱: BSA به عنوان شاهد منفی. ردیف ۲: باند متعلق به آنتی ژن C-CfTX1-STxB تخلیص شده از روی ژل. باند رنگ گرفته در ردیف ۲ متناظر با باند محدوده ۳۲ کیلو دالتون نشانگر مولکولی پروتئین می باشد. ردیف ۳: نشانگر مولکولی پروتئین.

بحث و نتیجه گیری

در خلیج فارس و دریای عمان گونه های مختلف جانوری وجود دارند که برخی از آن ها جزء جانداران خطرناک دریایی تلقی می گردند. عروس دریایی از گونه های فراوان در خلیج فارس بوده که گاهاً افرادی که در سواحل یا دریا کار می کنند را مورد گزش قرار می دهد. گزارش های متعددی از گزش انسان توسط عروس دریایی وجود دارد که منجر به سوزش دردناک، تنگی نفس، کاهش فشارخون و حتی گاهی مرگ می شود، و گاهی برخی تأثیرات از ترکیب مخلوطی از مولکول های فعال بیولوژیکی که از زهر عروس دریایی ساخته می شوند، به وجود می آیند. یکی از مناطقی که زیستگاه مناسب عروس دریایی در جهان می باشد خلیج فارس و دریای عمان است. بررسی های موجود نشان می دهد علی رغم فراوانی گزش های عروس دریایی در سواحل خلیج فارس و جزایر آن تحقیقات اندکی در این موضوع انجام گردیده است. یکی از گونه های مهم که بیشتر مورد توجه قرار گرفته است C. fleckeri می باشد،(دو گونه از عروس های دریایی خلیج فارس و دریای عمان توسط نویسنده مسئول مقاله به ثبت رسیده است) گر چه مواردی از این گونه در کشور گزارش نگردیده است که به دلیل عدم انجام مطالعات در این زمینه می باشد. با توجه به میزان فراوانی گزش های عروس دریایی در مناطق جنوبی کشور و عدم انجام کار مطالعاتی خاص در این زمینه لزوم بررسی و پژوهش در این موضوع اهمیت پیدا می کند. از طرفی ونوم این جاندار می تواند به عنوان یکی از عوامل ناتوان کننده مد نظر قرار گیرد. تهیه پادزهر یکی از راه های درمانی می باشد، لیکن دارای مشکلاتی است. دلایل زیادی برای عدم تاثیر مناسب پادزهر وجود دارد که یکی از مهم ترین آن ها، تاثیر سریع زهر و کاردیوتوکسیک بودن آن می باشد(۲۴). گونه های مختلفی از عروس دریایی جعبه ای در منطقه دریای عرب و عمان و آب های پاکستان گزارش شده است که بیشتر مربوط به جنس Carybdea و Altinidea هستند. در آب های شمالی دریای عرب و آب های پاکستان نمونه برداری از عروس های دریایی جعبه ای به انجام رسید که با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی و ویژگی های تشخیصی تمام این نمونه ها به عنوان نمونه های متعلق به خانواده Alatina grandis, Alatina rainensis و Alatina alata ارزیابی گردیدند که نشان دهنده وجود گونه های فوق در آب های دریای عمان می باشد(۲۵). ساختار پروتئینی زهر عروس های دریایی با زهر Carybdea rastonii، Carybdea alata و Chironex yamaguchii دارای قرابت و خویشاوندی می باشند که این تشابه در وزن مولکولی آن ها نیز دیده می شود. پروتئین CaTX-A که مربوط به زهر Carybdea alata می باشد دارای ۴۸۵ اسید آمینه می باشد که تشابه زیادی با پروتئین CfTX-1

دارد(۲۶). زهر C. fleckeri دارای ترکیبات پروتئینی فعالی می باشد که می تواند سریعاً جذب و وارد گردش خون شود و روی دستگاه قلبی و عروقی و دستگاه عصبی تاثیر بگذارد. شایع ترین علت مرگ و میر با این گونه، نارسایی تنفسی و ایست قلبی می باشد که در ۵ تا ۲۰ دقیقه پس از گزش اتفاق می افتد. Alatania alata نیز در خانواده عروس های جعبه ای قرار دارد. این نوع از عروس دریایی، به دلیل فعالیت همولیزی زیادی که دارد از اهمیت خاصی برخوردار است(۲۷). ممزوج شدن STxB با آنتی ژن های دیگر، میزان تیتر آنتی بادی را نسبت به حالت غیر ممزوج، افزایش می دهد. در سال ۲۰۱۵ مهدی باران وند و همکاران ایمنی زایی آنتی ژن های STxB و STxB-IpaD را به صورت نازال در رت های آزمایشگاهی بررسی و مشاهده کردند که با ممزوج شدن IpaD با STxB میزان تیتر آنتی بادی نسبت به تیتر آنتی بادی علیه آنتی ژن STxB افزایش یافته است(۲۸). بعضی از آنتی ژن ها دارای خاصیت ادجوانتی بوده که بعد از خون گیری دوم، تیترآنتی بادی بالا و نزدیک به هم مشاهده می شود(۲۹). آقای Griselda و همکاران در سال ۲۰۱۸ ا کمک آنتی بادی اختصاصی Cf حاصل از تخم مرغ، آنتی بادی موشی علیه(Carukia barnesi Cb) و(Mk) Malo kingi و آنتی بادی خرگوشی اختصاصی نسبت به دو توکسین(CfTX-1 و 2) و هم چنین سرم انسانی، واکنش متقابل آنتی بادی های پلی کلونال اختصاصی عروس دریایی علیه این سه جنس را مورد بررسی قرار دادند. آزمایشات ایمونوبلات نشان داد که میزان ایمنی زایی در سه گونه متفاوت است و واکنش های اختصاصی Mk ممکن است هر سه جنس را درگیر کند. زهر دوگونه cb و MK، به استثنای چند پروتئین در محدوده ۴۶/۴۳ کیلودالتون ظاهرا آنتی ژنیک بوده، و ممکن است با CfTX-1 و ۲ همولوگ باشد(۳۰).

نمودار شماره ۱ نشان می دهد که برای گرفتن حداکثر تیتر آنتی بادی، دو یا سه تزریق برای این آنتی ژن ها کفایت می کند. نتایج به دست آمده از این مطالعات، نشان داد که اغلب پروتئین های نماتوسیت، مانند CfTX-1 را می توان در یک میزبان باکتریایی بیان کرد. چالش موش های نژاد سوری توسط آنتی ژن کایمر C-CfTX1-STxB به شکل برهنه، حاکی از نتایجی جالب، قابل تأمل و موفقیت آمیزی بود. چنان که موش ها تا ۵۰ برابر متوسط دوز کشنده را تحمل کردند. هدف از این مطالعه طراحی سیستم تولید پروتئین نوترکیب زهر عروس دریایی، ایجاد پروتئین اصلی آنتی ژنیک زهر عروس دریایی به طریق نوترکیب و بررسی میزان ایمنی زایی پروتئین صناعی در حیوان بود. بیان ژن کامل CfTX-1 در باکتری E.coli باعث لیز شدن دیواره سلولی باکتری می گردد(۵).

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری E.coli قادر به تولید پروتئین نوترکیب C- CfTX-1 می باشد و بیشترین میزان بیان در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت بعد از القاء با IPTG رخ می دهد. اکثر مطالعات انجام شده در زمینه درمان گزش عروس دریایی جعبه ای مربوط به تولید پادزهر می باشد. لیکن آن چه مسلم است با توجه به تاثیر سریع زهر و اثرات کاردیوتوکسینی که گاهی منجر به مرگ می شود، طراحی واکسن به منظور ایجاد مصونیت برای افرادی که بیشتر در معرض گزش عروس دریایی قرار می گیرند موثر خواهد بود. لذا در این تحقیق استفاده از پروتئین نوترکیب به منظور ایمنی زایی موش ها در برابر زهر عروس دریایی بسیار موثر بود. نتایج هم چنین نشان داد که موش های ایمن شده در چالشی پس از ۶۰ روز، ۵۰ برابر LD50 زهر عروس دریایی را تحمل می نمایند.

References

1.Hadavand N, Nikpor I, Ramazani Z, Aberomand M. Extraction and purification of Crambionella seaweed nematocytosis. Con Sus Deve2014;1:23.

2.Jafari H, Honari H, Zargan J, Jahromi ST. Identification and hemolytic activity of jellyfish Rhopilema sp. venom from the Persian gulf and Oman sea. Biodiversitas 2019; 20: 1228-32. doi: 10.13057/biodiv/d200440.

3. Zarehzade R. Dangerous marine animals gulf and Oman sea. Tehran Publication Acad. 2010; P:124-9.
4.Jouiaei M, Angel A, Yanagihara M, Timo J, Nevalainen F. Ancient venom systems a review on cnidaria toxins. Toxins Base 2015; 7:2251-71. doi: 10.3390/toxins 7062251.
5.Brinkman D, Jia X, Potriquet J, Kumar D, Dash D, Kvaskof D. Transcriptome and venom proteome of the box jellyfish Chironex fleckeri. Genomics 2015; 16: 407. doi: 10.1186/s12864-015-1568-3.
6. Mariottini GL, Pane L. Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms a review on health implications and possible therapeutic applications. Toxins Base 2014; 6: 108-51. doi.org/10.3390/toxins6010108.
7. Currie BJ. Marine antivenoms. J Toxicol Clin Toxicol 2003; 41: 301-8. doi: 10.1081/clt-120021115.
8.Brinkman D, Konstantakopoulos N, Mcinerney M, Mulvenna J, Seymour J. Chironex fleckeri box jellyfish venom proteins expansion of a cnidarian toxin family that elicit. J Biol Chem 2014; 289:4798-812. doi: 10.1074/jbc.M113. 534149.
9. Alam MJ, Ashraf KU. Prediction of an epitope based computational vaccine strategy for gaining concurrent immunization against the venom proteins of Australian box jellyfish. Toxicol Int 2013; 20:235-53. doi: 10.4103/0971-6580. 121677.
10. Moosler A, Rinehart KL, Grimmelikhuijzen CJ. Isolation of three novel neuropeptides the cyanea RFamides I-III from Scyphomedusae. Biochem Biophys Res Commun 1997; 236: 743-9. doi: 10.1006/bbrc.1997.7022.
11. Addad S, Exposito JY, Faye C. Isolation characterization and biological evaluation of jellyfish collagen for use in biomedical applications. Mar Drugs 2011; 9: 967-83. doi: 10.3390/md9060967.
12. Konstantakopoulos N, Isbister GK, Seymour JE. A cell based assay for screening of antidotes to and antivenom against chironex fleckeri box Jellyfish venom. J Pharmacol Toxicol Meth 2009; 59: 166-70. doi: 10.1016/j.vascn. 2009.02. 003.
13. Williamson JA, Le Ray LE, Wohlfahrt M. Acute management of serious envenomation by box Jellyfish Chironex fleckeri). Med J Aust 1984; 141: 851-3.
14.Bai Y, WC Shen. Improving the oral efficacy of recombinant granulocyte colony stimulating factor and transferrin fusion protein by spacer optimization. Pharm Res 2006; 23: 2116-21. doi: 10.1007/s11095-006-9059-5.
15. Chia MY. The immunogenicity of DNA constructs expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus conjugated by GPGP linker in Pigs. Vet Microbiol 2010; 146: 189-99. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.007.
16. Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga Toxin B subunits thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. Toxicon 2005; 45: 389-93. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.12.014.
17. Janssen KP. Invivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. Cancer res 2006; 66: 7230-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0631.
18.Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp. controlling host cell signaling, invasion and death by type iii secretion. Clin Microbiol Rev 2008; 21: 134-56. doi: 10.1128/CMR.00032-07.
19. Cuiping L, Pengcheng L, Jinhua F. Cytotoxicity of the venom from the nematocysts of jellyfish cyanea nozakii kishinouye. Toxicol Ind Health 2012; 28: 186-92. doi: 10.1177/0748233711410910.
20. Ponce D, Brinkman DL, Luna K, Wright CE, Dorantes J. Comparative study of the toxic effects of chrysaora quinquecirrha Cnidaria scyphozoa and Chironex fleckeri venoms using cell based Assays. Toxicon 2015; 106: 57-67. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.09.014.
21. Honari H, Amlashi I, Minaee ME, Safaee S. Immunogenicity in Guinea Pigs by IpaD-STxB recombinant protein. JAMS 2013;16:83-93.
22. Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain cloning, expression purification and proteolytic activity protein expression and purification. Protein Exp Pur 1999;15:221-7. doi: 10.1006/prep. 1998.1007.
23.Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning a laboratory manual. 3th ed. Cold-

spring Harbour Lab UK Publication. 2001;P.202-9.
24. Isbister GK. Antivenom efficacy or effectiveness the Australian experience. Toxicology 2010; 268:148-54. doi: 10. 1016/j.tox.2009.09.013.
25.Straehler I, Gul S. Rediscovery and description of the cubomedusa alatina grandis from Pakistani waters. Plankton Benthos Res 2017;12:1-14. doi: 10.3800/ pbr.12.1.
26. Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, et al. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. Science 2000; 287: 2013-17. doi: 10.1126/science.287.5460.2013.
27. Saggiomo SL, Seymour JE. Cardiotoxic effects of venom fractions from the Australian box jellyfish Chironex fleckeri on human myocardiocytes. Toxicon 2012;60: 391-5. doi: 10.1016/j. toxicon. 2012.03.025.
28.Baranvand M, Honari H. [Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory Rats]. Komesh 2015; 16: 397-403.(persian)
29. Abdollahi M, Honari H, Nazarian S, Masoudikerahroudi M. [Subcloning and expression of SO6 gene saponaria officinalis plant in E.coli and investigation of antibody titer in Rats]. JSSU 2017; 24: 1024-1033. (Persian)
30.Vila G, Gershwin L, Winkel K, Burnell J. Comparative evaluation of polyclonal antibodies in the characterization of nematocyst proteins from Australian Irukandji and Chironex fleckeri Species. Anim Sci Zoo2018. doi: 10.20944/preprints201808.0481.v1

Subcloning and Expression of the Chimeric Antigen C-CFTX1-STxB of the Jellyfish Venom and

its Antigenicity Assessment in Syrian Mice

Honari H[1], Aghaee M[1], Hosseinzadeh M[1]*

(Received: January 1, 2019 Accepted: April 8, 2019)

Abstract

Introduction: Box jellyfish stings are painful and may be life-threatening. The venom of Chironex fleckeri contains a variety of bioactive proteins as well as two of the most abundant proteins, namely CfTX-1 and CfTX-2 which cannot be isolated easily using electrophoresis or chromatography techniques. Recombinant expression technology may offer an alternative to the isolation of native C.fleckeri venom protein. This study aimed at expressing C-CfTX1-STxB protein in Escherichia coli and assessing its antigenicity in Syrian mice.

Materials & Methods: Synthesis of the artificial CfTX1complete gene was prepared in plasmid pUC57. The C-cftx1 was cloned using a polymerase chain reaction (PCR) and subcloned with BamHI and SalI restriction enzyme sites in pET28a-stxB expression vector and transformed into E.coli. Gene expression was artificially induced by Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside. After the purification of the protein and its injection into the Syrian mice, the amount of produced antibody was measured in the serum. The rats were also challenged by the venom of the jellyfish (i.e., Rhopilema nomadic).

Findings: In this experimental study, the C-CfTX1-STxB gene was cloned in the expression vector pET28a (+), sequenced by PCR, and analyzed by enzymatic analysis. Moreover, the produced recombinant protein was confirmed by Western blotting. The produced antibody in the serum was quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay.

Discussion & Conclusions: After 60 days, the immunized mice tolerated 50x LD50 of jellyfish venom. Considering the ineffectiveness of cardiotoxicity and neurotoxicity of the recombinant protein, this produced protein can be suggested as a jellyfish venom vaccine candidate in Syrian mice or at a later stage of a clinical trial in humans.

Keywords: Antigenicity, C-CFTX1-STxB chimeric antigen, Chironex fleckeri, Jellyfish venom

1. Biological Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
**Corresponding author Email: honari.hosein@gmail.com*