کلونینگ ناحیه ایمونوژنیک توکسین B کلستریدیوم دیفیسیل در لاکتوکوکوس لاکتیس با هدف توسعه واکسن دهانی مبتنی بر لاکتوکوکوس علیه کولیت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل

یاسر رحیمی[۱]، محمد ربانی خوراسگانی[۱*]، سیدحمید زرکش اصفهانی[۱]، رحمان امام زاده[۱]، حسین کیوانی امینه[۲]، مرضیه رضایی[۱]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲) گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۵

چکیده

مقدمه: باکتری کلستریدیوم دیفیسیل عامل ایجاد عفونت بیمارستانی و کولیت غشای کاذب می باشد. توکسین B این باکتری به عنوان یکی از فاکتورهای اصلی بیماری زایی این باکتری شناخته شده است. ناحیه اتصالی پذیرنده(RBD) این توکسین، ناحیه ایمنی زای توکسین شناخته و به گیرنده واقع در روده متصل می شود. هدف این مطالعه کلون نمودن و بیان ناحیه ایمنی زای توکسین B در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس به منظور تهیه واکسن دهانی مطمئن و ایمن علیه کولیت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل، به عنوان یک روش درمانی جایگزین در مطالعات آینده و مبتنی بر لاکتوکوکوس می باشد.

مواد و روش ها: ابتدا با استخراج DNA از باکتری کلستریدیوم دیفیسیل و با پرایمرهای طراحی شده، قطعه RBD به روش PCR تکثیر شد. قطعه تکثیر شده در پلاسمید pTZ57R/T الحاق و در باکتری E.coli ترانسفورم شد. سپس قطعه RBD با برش آنزیمی توسط آنزیم های NcoI و SacI، از پلاسمید pTZ57R/T خارج و خالص سازی شد. قطعه RBD در پلاسمید بیانی pNZ8149 برش خورده با آنزیم های مشابه تحت شرایط مناسب الحاق شد. سپس پلاسمید بیانی pNZ8149 حاوی قطعه با روش الکتروپوریشن درون سلول های مستعد لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شد.

یافته های پژوهش: پس از غربالگری کلونی های ترانسفورم شده، صحت کلونینگ با انجام PCR، هضم آنزیمی بر روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده و نهایتاً با تعیین توالی، تایید شد.

بحث و نتیجه گیری: لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده این ناحیه ایمنی زا می تواند به منظور تهیه واکسن دهانی مطمئن و ایمن، به عنوان یک روش درمانی جایگزین جهت کاهش شیوع عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: کلستریدیوم دیفیسیل، کلونینگ، توکسین B، لاکتوکوکوس لاکتیس

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: m.rabbani@biol.ui.ac.ir

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]

مقدمه

باکتری کلستریدیوم دیفیسیل، باکتری میله ای گرم مثبت، بی هوازی و اسپور زا می باشد. عفونت کلستریدیوم دیفیسیل، شایع ترین عامل کولیت غشای کاذب و اسهال ناشی از آنتی بیوتیک شناخته شده است(۱). فلور طبیعی روده، سد مهمی در برابر کلونیزاسیون این عامل بیماری زا محسوب می شود(۲)، لذا بیماری های ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل زمانی رخ می دهد که فلور طبیعی تغییر کند، پس از تغییر فلور طبیعی روده میزبان، میزبان به رشد و کلونیزاسیون باکتری کلستریدیوم دیفیسیل حساس می شود و سپس این باکتری با رشد و نمو در روده و با تولید سم، ایجاد اسهال می کند. علت اصلی به هم خوردن جمعیت باکتری های طبیعی روده، مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها به ویژه آمپی سیلین، کلیندامایسین و سفالوسپورین ها می باشد. به طوری که خطر شیوع بیماری کولیت غشای کاذب ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل به واسطه مصرف این آنتی بیوتیک ها افزایش می یابد(۲). با توجه به نقش توکسین ها در بیماری زایی این باکتری، پژوهش های زیادی در زمینه توکسین های این باکتری انجام شده است. مطالعات در مورد دو اگزوتوکسین باکتری کلستریدیوم دیفیسیل، توکسین A (TcdA) و توکسین B (TcdB) نشان می دهد این دو توکسین عوامل مهم بیماری زایی این باکتری محسوب می شوند(۱). TcdA و TcdB به ترتیب به عنوان انتروتوکسین و سیتوتوکسین شناخته شده اند(۲). دو توکسین TcdA (۳۰۸ kDa) و TcdB (۲۷۰ kDa) به وسیله ژن های کروموزومی کد شده که در اواخر فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون رشد باکتری در پاسخ به محرک های محیطی بیان می شوند(۳). این دو توکسین جزو خانواده توکسین های گلیکوزیله کننده کلستریدیومی هستند و از نظر ساختاری از ناحیه گلیکوترانسفراز انتهای N (GT)، ناحیه خود واکنشگری سیستئین پروتئاز(CPD)، ناحیه انتقال مرکزی(TMD) حاوی مناطق آبگریز و ناحیه اتصال به گیرنده در انتهای C (RBD) شامل الیگوپپتیدهای تکراری کلستریدیومی(CROPs) تشکیل شده است(۴)(شکل شماره ۱). پروتئین های Rho هدف توکسین های A و B کلستریدیوم دیفیسیل قرار می گیرند(۵). فعالیت گلیکوترانسفرازی توکسین های باکتری در سلول های هدف، ساختار پروتئین های Rho را تغییر و در نهایت با غیر فعال شدن عملکرد این پروتئین ها، فرآیندهای فیزیولوژیکی زیادی در سلول ها روی می دهد و مستقیماً در ایجاد بیماری نقش دارند(۴). درمان و کنترل بیماری مرتبط با کلستریدیوم دیفیسیل با شناخت دقیق سویه بیماری زا، نوع توکسین تولید شده توسط باکتری، نوع و شدت بیماری می تواند شامل درمان آنتی بیوتیکی و یا جراحی در صورت پیشرفت بیماری باشد. کاهش میزان عفونت کلستریدیوم دیفیسیل با استفاده محدودتر آنتی بیوتیک ها امکان پذیر است. در حال حاضر اطلاعات محدودی در مورد استفاده از پروبیوتیک ها و واکسیناسیون برای کنترل بیماری وجود دارد(۱). واکسن در حال تولید توسط سانوفی پاستور، برای جلوگیری از بیماری توسط کلستریدیوم دیفیسیل معرفی شده است. این واکسن حاوی توکسین A و B فوق خالص غیرفعال شده با فرمالین و جذب شده با آلوم می باشد(۶). با توجه به گسترش روزافزون اسهال ناشی از درمان آنتی بیوتیکی و هم چنین گسترش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و البته هزینه بالای درمان بیمار، استفاده از روشی ایمن و کنترل کننده بیماری به واسطه باکتری های پروبیوتیک پیشنهاد می شود. یک گروه مهم از باکتری های پروبیوتیک، باکتری های لاکتیک اسید گرم مثبت، بی هوازی اختیاری، غیر اسپورزا و غیرمتحرک می باشند. این باکتری ها مزوفیلیک، هتروفرمانتاتیو و جزو ارگانیسم های ایمن(GRAS) هستند که به طور گسترده در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرند(۷). یکی از کاربردهای مهم این باکتری ها، به عنوان حامل های کلونینگ و بیان پروتئین های هترولوگ درون سلول می باشد(۸). لاکتوکوکوس لاکتیس یکی از اعضای شناخته شده باکتری های لاکتیک اسید برای تولید پپتیدها، پروتئین ها و واکسن های دهانی به طور گسترده استفاده می شود. در مقایسه با ناقل های واکسن مبتنی بر اشرشیاکلی، لاکتوکوکوس لاکتیس به دلیل تولید پروتئاز کمتر، عدم وجود اندوتوکسین(۱۰) و توانایی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]

تحریک هر دو نوع پاسخ های ایمنی عمومی و مخاطی جایگزین بهتری محسوب می شود(۱۰،۱۱) با توجه به مطالعات انجام شده در مورد ساختار توکسین B و اهمیت آن در بیماری زایی باکتری کلستریدیوم دیفیسیل، هدف این مطالعه کلون نمودن و بیان ناحیه ایمنی زای توکسین B باکتری کلستریدیوم دیفیسیل در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس می باشد تا در مطالعات آینده نقش آن در ایمنی زایی و احتمالاً تولید واکسن دهانی ایمن بیشتر بررسی شود.

مواد و روش ها

سویه های باکتریایی و محیط کشت های مورد استفاده: در این مطالعه سویه های میکروبی Clostridium difficil 027 (تهیه شده از مرکز تحقیقات دکتر البرزی)، Escherchia coli TOP 10 و Lactococcus lacis NZ3900- lacF⁻، محیط کشت های CDMN محیط غنی انتخابی جهت رشد باکتری C.difficile (Thermo Scientific CM0601). محیط کشت الیکر با ۰/۵ درصد لاکتوز جهت غربالگری کلنی حاوی وکتور نوترکیب و محیط کشت M17 آبگوشت حاوی لاکتوز(MERCK) به منظور رشد Lactococcus lacis NZ3900- lacF⁻ استفاده شد.

تهیه قطعه ژنی RBD از DNA کروموزومی استخراج شده از کلستریدیوم دیفیسیل با استفاده از PCR: باکتری کلستریدیوم دیفیسیل از مرکز تحقیقات میکروبی دکتر البرزی تهیه شد. پودر لیفوفلیزه حاوی باکتری کلستریدیوم دیفیسیل با استفاده از ۵ میلی لیتر محیط CDMN مایع و رشد تحت شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت فعال شد. در ادامه از این محیط مایع جهت کشت روی محیط بلاد آگار برای به دست آوردن کلنی تک استفاده شد. پس از به دست آوردن کلنی تک و رشد کلستریدیوم دیفیسیل بر روی محیط آگار خوندار به صورت چمنی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت، استخراج DNA کروموزومی به روش فنل-کلروفرم انجام شد. به منظور تکثیر قطعه ژنی RBD، ابتدا توالی کدکننده tcdB با شماره دسترسی NC-009089.1 از سایت NCBI دریافت شد. ایمونوژنیک بودن توالی پلی پپتیدی آن با پیش بینی اپی توپ های خطی و فضایی B-Cell با استفاده از سرور ElliPro و هم چنین پیش بینی ساختار سه بعدی توالی آمینواسیدی با استفاده از سرور I-TASSER تایید شد. سپس از این توالی به عنوان الگو جهت طراحی پرایمر برای قسمت ایمونوژنیک آن و دارای ترادف لازم برای شناسایی جایگاه های برش آنزیمی NcoI و SacI در وکتور pNZ8149، استفاده شد. توالی و طول دو پرایمر رفت و برگشت طراحی شده در جدول شماره ۱ ذکر شده است. برنامه حرارتی PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر با طول bp ۱۴۴۳ از روی DNA کروموزومی کلستریدیوم دیفیسیل طبق (جدول شماره ۲) انجام و جهت فرآیند الکتروفورز محصول PCR روی ژل ۱ درصد بارگذاری شد.

کلون کردن توالی قطعه ژنی RBD باکتری C. difficle 027 درون ناقل TA clone (pTZ57R/T): به منظور وارد کردن قطعه ایمونوژنیک تکثیر شده درون پلاسمید pTZ57R/T) TA clone)، ابتدا محصول PCR بر روی ژل بارگذاری و پس از مشاهده باند مورد نظر، محصول PCR با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل(Fermentase) تخلیص شد. در نهایت توالی ژن مورد نظر درون ناقل pTZ57R/T) TA clone) با استفاده از کیت Thermo Scientific Ins TAclone PCR Cloning Kit کلون شد.

ترانسفورماسیون ناقل pTZ57R/T حاوی قطعه به درون سلول های مستعد E.coli TOP10: نمونه های مختلف ناقل pTZ57R/T حاوی قطعه، به سلول های E.coli TOP10 مستعد شده به روش شوک حرارتی انتقال داده شدند. باکتری های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آمپی سیلین با غلظت نهایی ۵۰ mg/ml به صورت چمنی به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند(۱۲). *غربالگری سویه های نوترکیب به وسیله Colony PCR و روش هضم آنزیمی ساده و هضم دوگانه:* به منظور تایید ترانسفورماسیون(انتقال) وکتور نوترکیب به باکتری E.coli TOP10 ، کلنی PCR صورت گرفت و جهت انجام واکنش هضم، ابتدا پلاسمید ناقل توسط

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]

کیت(Thermo Scientific) استخراج شد. سپس برای هر کدام از آنزیم های برش دهنده NcoI و SacI واکنش هضم به طور جداگانه(هضم ساده) و هم چنین به طور هم زمان(هضم دوگانه) انجام گرفت. محلول فوق به مدت ۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد دمادهی و نمونه ها با روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج پلاسمید pNZ8149 از باکتری Lactococcus lactis NZ3900-lacF-: پلاسمید pNZ8149 ناقل بیانی(cat≠VS-ELV00300-01) حاوی توالی هورمون رشد می باشد. پس از تکثیر این پلاسمید، با استفاده از کیت(Thermo Scientific) از باکتری Lactococcus lactis استخراج و سپس به منظور آماده سازی برای دریافت قطعه مدنظر برش آنزیمی NcoI (Thermo Scientific) و SacI (Promega) انجام شد.

هضم دوگانه pTZ57R/T)TA vector) حاوی قطعه ژنی RBD و وکتور pNZ8149 با آنزیم های NcoI و SacI: واکنش هضم دوگانه با دو آنزیم Nco1 و Sac1 بر روی ناقل pTZ57R/T)TA) جهت خارج نمودن قطعه ژنی tcdB و هم چنین بر روی ناقل pNZ8149 به منظور حذف توالی کدکننده همرمون رشد و دریافت قطعه ژنی ایمونوژنیک انجام شد. در نهایت پس از خالص سازی محصول DNA هضم شده، غلظت هر یک از محصولات هضم شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد در مقایسه با اندازه نمای DNA تخمین زده شد.

الکتروپوریشن سلول مستعد باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور نوترکیب pNZ8149 دارای قطعه ژنی قطعه ژنی RBD و غربالگری کلنی های حاوی وکتور نوترکیب: غربالگری در سیستم NICE به منظور تشخیص سلول های ترانسفورم شده از ترانسفورم نشده بر اساس توانایی رشد بر روی محیط اختصاصی الیکر حاوی لاکتوز می باشد. محیط بنفش رنگ با وجود باکتری دریافت کننده پلاسمید زرد رنگ می شود(۸). در مرحله غربالگری، تعدادی از کلنی های زرد به طور جداگانه با استفاده از خلال دندان استریل به محیط M17 آبگوشت حاوی لاکتوز منتقل شدند و بعد از ۱۶ ساعت از باکتری های مذکور استخراج پلاسمید انجام گرفت. به منظور بررسی وجود قطعه الحاق یافته در کلنی های حاصل، واکنش PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده انجام شد. جهت اطمینان وجود قطعه الحاق یافته دارای توالی مدنظر در کلنی های غربال شده، در ابتدا هضم ساده و دوگانه انجام شد. با انجام تعیین توالی به صورت یک طرفه با پرایمر R طراحی شده(جدول شماره ۱) توسط شرکت کاوش فناورکوثر تایید نهایی انجام و در بانک ژن جهانی با شماره دسترسی KT334334.1 ثبت شد.

بیان قطعه ژنی RBD در وکتور pNZ8149 نوترکیب: باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس حاوی پلاسمید نوترکیب pNZ8149 در محیط M17 و در حضور ۵ ng/ml القاکننده نایسین کشت داده شدند و در نهایت با سونیکاسیون باکتری های القا شده و هم چنین باکتری های القا نشده به عنوان کنترل منفی (عدم بیان قطعه) پروتئین استخراجی بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد الکتروفورز شد(۱۲).

یافته های پژوهش

استخراج DNA از کلستریدیوم دیفیسیل و انجام واکنش PCR قطعه ژنی RBD: پس از استخراج DNA کروموزومی از کلستریدیوم دیفیسیل و بررسی کیفی آن به روش الکتروفورز، واکنش PCR طبق شرایط مندرج در جدول شماره ۲ انجام شد. طول قطعه ایمونوژنیک tcdB، ۱۴۴۳ bp می باشد که در چاهک شماره ۲ کمی پائین تر از باند ۱۵۰۰ bp اندازه نما به درستی قرار گرفته است(شکل شماره ۲).

کلونینگ قطعه ژنی RBD باکتری C.difficle 027 درون ناقل TA clone (pTZ57R/T): پس از کلون نمودن قطعه مورد نظر درون وکتور TA clone (pTZ57R/T) و ترانسفورماسیون به درون باکتری مستعد(E.coli TOP10)، درستی ترانسفورماسیون TA clone در اشرشیاکلی TOP10 با مقایسه رشد کلنی های الحاق یافته با pcDNA به عنوان نمونه کنترل مثبت و عدم رشد کنترل منفی(فاقد قطعه) تایید شد(شکل شماره ۳).

تایید کلونینگ قطعه ژنی RBD درون ناقل TA clone (pTZ57R/T) به روش Colony

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]

PCR کلنی های اشرشیاکلی TOP10: به منظور تایید ترانسفورماسیون(انتقال) وکتور نوترکیب pTZ57R/T حاوی قطعه ژنی RBD درون سلول های مستعد اشرشیاکلی TOP10، واکنش Colony PCR با پرایمرهای طراحی شده برای قطعه مورد نظر انجام گرفت. مشاهده باند bp ۱۴۴۳ طی الکتروفورز محصول Colony PCR، درستی عملکرد کلونینگ در ناقل TA clone (pTZ57R/T) و ترانسفورماسیون درون سلول های مستعد اشرشیاکلی TOP10 را تایید می کند(شکل شماره ۴a).

تایید کلونینگ قطعه ژنی RBD درون ناقل TA clone (pTZ57R/T) به روش هضم دوگانه: پس از هضم آنزیمی دوگانه بر روی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T، با مشاهده قطعه ژنی tcdB با طولی برابر bp ۱۴۴۳ و قطعه پلاسمید pTZ57R/T فاقد قطعه ژنی tcdB با طول bp ۲۸۸۶، کلون سازی قطعه ژنی tcdB تائید شد(شکل شماره ۴b).

به منظور کلون سازی قطعه ژنی RBD در وکتور بیانی pNZ8149، واکنش هضم دوگانه بر روی وکتور pTZ57R/T با هدف خروج قطعه ژنی و هم چنین بر روی وکتور بیانی pNZ8149 به منظور خروج توالی هورمون رشد انجام شد. سپس وکتور هضم شده با آلکالین فسفاتاز تیمار و در نهایت استخراج پلاسمید (وکتور) از ژل و تخلیص آن انجام شد.

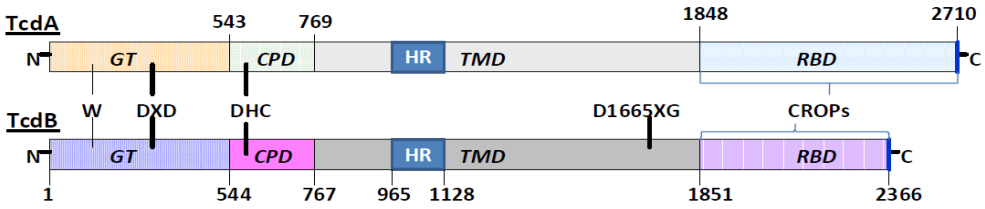
تایید حضور قطعه ژنی RBD در وکتور بیانی pNZ8149 به روش Colony PCR کلنی های زرد لاکتوکوکوس لاکتیس: پس از تنظیم واکنش الحاق قطعه ژنی درون وکتور بیانی pNZ8149 بر اساس شدت باندهای استخراجی وکتور و قطعه ژن درخواستی و هم چنین محاسبه میزان وکتور و قطعه هضم آنزیمی شده در سایت www.insilico.uni-duesseldorf.de، الکتروپوریشن سلول مستعد باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور بیانی نوترکیب دارای قطعه مورد نظر انجام شد. به دلیل حذف ژن lacF از سویه L. lactis NZ3900 مورد مطالعه، این سویه قادر به تخمیر لاکتوز نمی باشد مگر این که از طریق پلاسمید دریافت شود. بنا بر این این سویه قبل از ترانسفورماسیون نباید لاکتوز را تخمیر کند. غربالگری کلنی های لاکتوکوکوس لاکتیس حاوی وکتور نوترکیب پس از کشت محصول الکتروپوریشن روی محیط الیکر با انتخاب کلنی های زرد رنگ انجام و برای تایید حضور قطعه ژنی مورد نظر در مراحل بعد مورد کشت مجدد قرار گرفتند. پس از استخراج پلاسمید از کلنی های زرد رنگ، واکنش PCR با پرایمرهای طراحی شده برای قطعه ژنی مورد نظر، حضور قطعه را در یکی از کلنی ها تائید نمود(شکل شماره ۵a).

تایید حضور قطعه ژنی RBD در وکتور نوترکیب بیانی pNZ8149 به روش هضم آنزیمی ساده و دوگانه: ضمن تایید حضور قطعه درکلنی وکتور نوترکیب به روش Colony PCR، روش هضم آنزیمی ساده و دوگانه وکتور نوترکیب pNZ8149 حاوی قطعه ژنی RBD نیز انجام شد که در شکل نشان داده شده است (شکل شماره ۵b). تایید نهایی حضور قطعه ژنی RBD در باکتری ترانسفورم شده به روش تعیین توالی انجام شد. به طوری که محصول PCR با استفاده از پرایمر R طراحی(بخش مواد و روش ها) توسط شرکت کاوش فناور کوثر، به صورت یک طرفه تعیین توالی و در بانک ژن جهانی با شماره دسترسی KT334334.1 ثبت شد.

بیان قطعه ژنی RBD در وکتور pNZ8149 نوترکیب: پس از کشت باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس حاوی پلاسمید نوترکیب pNZ8149 در محیط M17 و در حضور القاکننده نایسین، در مقایسه با کشت کنترل منفی(لاکتوکوکوس لاکتیس فاقد پلاسمید نوترکیب) بیان پروتئین مورد نظر(گیرنده توکسین B) با وزن مولکولی حدود ۵۲ کیلو دالتون به روش SDS-PAG مورد بررسی قرار گرفت(شکل شماره ۶).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]



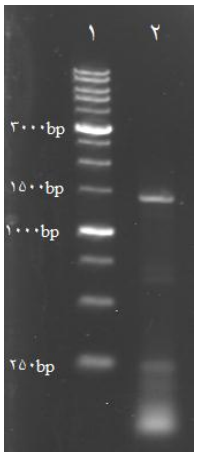
شکل شماره ۱. ساختار شماتیک TcdA و TcdB: ناحیه اتصال به گیرنده(RBD) به عنوان ناحیه ای ایمنی زا در انتهای C توکسین B

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه

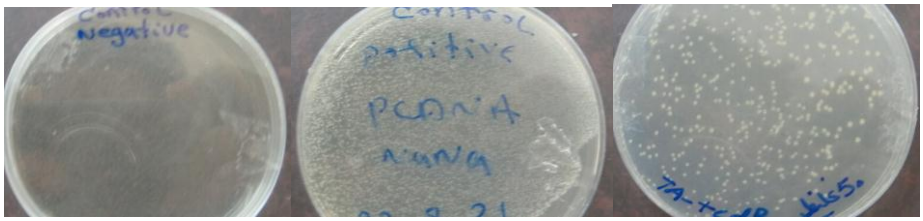
5' GCATCCCATGGGCCAAACAGGTGTATTTAGTACAGAAGATGG 3' NcoI Restriction site: CCATGG	پرایمرF: ۴۲ جفت باز
5' CTTCTGAGCTCCTATTCACTAATCACTAATTGAGCTGTATCAG 3' Sac I Restriction site : GAGCTC	پرایمر R: ۴۳ جفت باز

جدول شماره ۲. برنامه داده شده به دستگاه ترموسایکلر جهت انجام واکنش PCR

مرحله	دما(درجه سلسیوس)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۴	۱۲۰	
واسرشت	۹۴	۶۰	
اتصال	۵۶	۳۰	
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۱۰۰	۳۵
بازآرایی نهایی	۹۴	۶۰۰	



شکل شماره ۲. الکتروفورز محصول PCR: چاهک اول، اندازه نما DNA و چاهک دوم، قطعه bp ۱۴۴۳ قطعه ژنی RBD

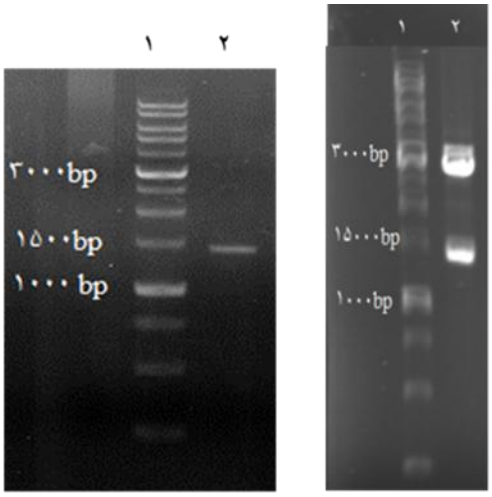


الف ب ج

شکل شماره ۳. تایید ترانسفورماسیون وکتور TA clone (pTZ57R/T) ناقل قطعه ژنی RBD در کلنی های E.coli TOP10
الف) کلنی های حاوی پلاسمید TA clone دریافت کننده قطعه ژنی RBD، ب) کلنی های حاوی پلاسمید pcDNA به عنوان کنترل مثبت، ج) کنترل منفی

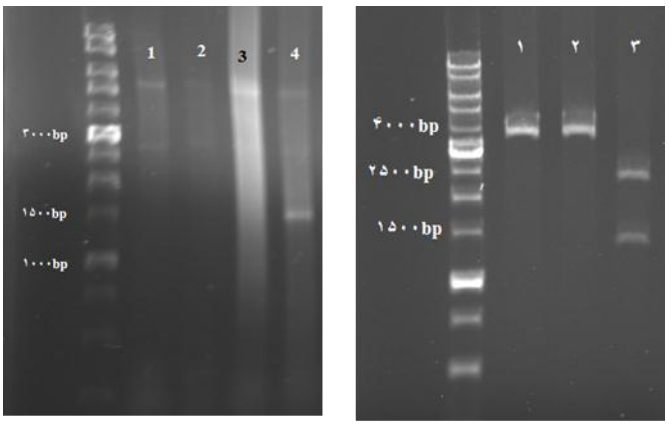
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]



a) b)

شکل شماره ۴. تاییدکلونینگ قطعه ایمونوژنیک درون ناقل pTZ57R/T با دو روش هضم دوگانه و Colony PCR در کلنی های اشرشیاکلی TOP10 a) روش Colony PCR کلنی های اشرشیاکلی TOP10، b) روش هضم دوگانه: با برش دوگانه وکتور pTZ57R/T نوترکیب با دو آنزیم NcoI و Sac I، در چاهک شماره ۲، ظهور دو قطعه bp ۲۸۸۶ (بدنه وکتور) و bp ۱۴۴۳(ژن مورد نظر) نشاندهنده درستی کلونینگ می باشد

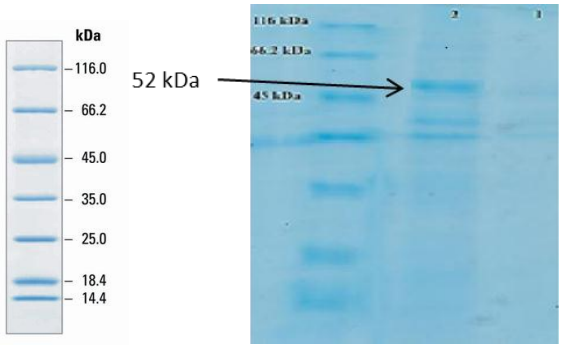


a) b)

شکل شماره ۵. تاییدکلونینگ قطعه ایمونوژنیک درون وکتور بیانی pNZ8149 با دو روش هضم دوگانه و Colony PCR در کلنی های زرد لاکتوکوکوس لاکتیس a) روش Colony PCR کلنی های زرد لاکتوکوکوس لاکتیس b) روش هضم آنزیمی ساده و دوگانه وکتور نوترکیبpNZ8149: چاهک ۱ هضم ساده با آنزیم NcoI، چاهک ۲ هضم ساده با آنزیم Sac I، چاهک ۳ هضم دوگانه با دو آنزیم NcoI و Sac I

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]



شکل شماره ۶. ژل SDS PAGE مربوط به پروتئین بیان شده در وکتور بیانی نوترکیب pNZ8149 در حضور القاگر نایسین: مارکر پروتئین(Thermo Scientific™ 26610)، چاهک شماره ۱ کنترل منفی(لاکتوکوکوس لاکتیس فاقد پلاسمید نوترکیب)، چاهک شماره ۲ لاکتوکوکوس لاکتیس حاوی پلاسمید نوترکیب pNZ8149 ناقل قطعه ژنی مورد نظر

بحث و نتیجه گیری

مطالعات قبلی در زمینه کنترل عفونت زایی باکتری کلستریدیوم دیفیسیل و بهبودی بیماری کولیت غشای کاذب با استفاده از ناقل های مختلف جهت بیان توکسین های باکتری کلستریدیوم دیفیسیل بیشتر معطوف به اشرشیاکلی می باشد. به عنوان مثال تانگ و همکاران در سال ۲۰۰۲ کلونینگ و بیان توکسین TcdB باکتری کلستریدیوم دیفیسیل را مورد مطالعه قرار دادند. به طوری که ژن این توکسین در سلول های مستعد اشرشیاکلی TOP10 کلون و در وکتور بیانی pBAD اشرشیاکلی وارد شده است. بیان پروتئین نوترکیب، توکسین TcdB به روش وسترن بلات و با حضور آنتی توکسین کلستریدیوم سوردلی مورد تایید قرار گرفت(۱۳). بررسی های انجام شده جهت کلونینگ و بیان توکسین های کلستریدیوم دیفیسیل نشان می دهد معایبی از جمله عدم تولید توکسین های کاملاً خالص در اشرشیاکلی، وجود فعالیت پروتئازی، اندوتوکسین LPS و هم چنین روش پیچیده خالص سازی(۹)، محققین را بر این داشته است که ناقل های پروبیوتیک ایمنی زا و با کاربرد تولید واکسن دهانی ایمن، جایگزین باکتری اشرشیاکلی را پیشنهاد نمایند. در این مطالعه باکتری های لاکتیک اسید به عنوان کاندیدهای جایگزین اشرشیاکلی پیشنهاد می شوند چرا که امروزه استفاده از باکتری های لاکتیک اسید به عنوان حامل بیان کننده ترکیبات دارای خصوصیات درمانی و یا پیشگیری کننده توجه محققین را به خود جلب کرده است.

پروبیوتیک های نوترکیب به طور فزاینده ای به عنوان حامل برای بیان و تحویل هدفمند مولکول های نوترکیب یا طبیعی به سطوح مخاطی در تغذیه و سلامت عمل می کنند. سیستم های تحویل با واسطه پروبیوتیک ها نیاز به خالص سازی مولکول ها در حد وسیع را رفع می کنند و امکان تحویل مولکول ها به مخاط را ممکن می سازند. مفهوم داروی زیستی به تجویز خوراکی میکروارگانیسم های نوترکیب زنده برای پیشگیری یا درمان بیماری های مختلف گفته می شود(۱۴). در این مطالعه باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان میزبانی ایمن و مناسب برای کلون نمودن ناحیه اتصالی پذیرنده(RBD) توکسین B باکتری کلستریدیوم دیفیسیل مورد استفاده قرار گرفت. سویه استفاده شده در این مطالعه کاملاً ایمن بوده و مقادیر نایسین مورد نیاز برای القاء بسیار جزئی می باشد. این سویه بسیار سریع در محیط مناسب رشد کرده، در طول مراحل رشد نیاز به هوادهی نداشته، بنا بر این مراحل انجام کار بسیار آسان می باشد. باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس، عضو شاخص باکتری های اسید لاکتیک بوده و ویژگی های آن به طور کامل بررسی شده است. لاکتوکوکوس لاکتیس برای تولید پروتئین های زیستی مفید و برای انتقال DNA پلاسمیدی به سلول های یوکاریوتی مناسب می باشد. از جمله مزایای استفاده از این باکتری به عنوان روشی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]

برای تحویل واکسن و انتقال آنتی ژن می توان به ۱) ایمن بودن ۲) انجام پژوهش های مولکولی و ژنتیکی متمرکز جهت کاربردهای گسترده فراوان و جدید این باکتری به عنوان سیستم تحویل واکسن، تحویل ژن، بیان پروتئین های غیر مشابه و تحویل دارو ۳) فقدان لیپو پلی ساکاریدهای گرم منفی و اندوتوکسین ۴) کوچک بودن اندازه ژنوم و داشتن اگزوپروتئین های کمتر نسبت به اشرشیاکلی ۵) غیر تهاجمی و غیر انگلی بودن آن و پتانسیل کمتر برای ایجاد تحمل ایمنی یا بروز اثرات جانبی ۶) القای پاسخ های ایمنی مخاطی (ترشحIgA) و سیستمیک(عمومی) پس از تحویل آنتی ژن ها، اشاره نمود(۱۵).

اهمیت این مطالعه، امکان تولید قطعه ژنی گیرنده توکسین B در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس می باشد. با تاکید بر این موضوع که تولید این قطعه در باکتری ایمن با ویژگی درجه غذایی برای مصارف خوراکی و یا سایر مصارف دیگر انسانی را نسبت به سایر سیستم های تولید وابسته به اشرشیاکلی، ایمن تر می کند. مطالعه حاضر احتمالاً می تواند در آینده جهت تولید واکسن های کاربردی غذایی به کار رود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه اصفهان در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Chen X, Dong M, Sun X. Mechanisms of action and applications of probiotics for the treatment of Clostridium difficile infection. Form Res Cent 2013;2: 1154-63.
2. Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. Clostridium difficile its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988;1:1-18. doi: 0893-8512/88/010001-18$02.00/0.
3. Voth DE, Ballard JD. Clostridium difficile toxins mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 2005; 18:247-63. doi :10.1128/CMR.18.2.247-263.2005
4. Sun X, Savidge T, Feng H. The enterotoxicity of Clostridium difficile toxins. Toxins 2010;2:1848-80. doi: 10.3390/toxins2071848.
5. Jank T, Giesemann T, Aktories K. Rho glucosylating Clostridium difficile toxins A and B new insights into structure and function. Glycobiology2007; 17:15-22. doi: 10.1093/glycob/cwm004
6. Greenberg RN, Marbury TC, Foglia G, Warny M. Phase I dose finding studies of an adjuvanted Clostridium difficile toxoid vaccine. Vaccine 2012; 30:2245-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.065
7. Mercenier A, Mulleralouf H, Grangette C. Lactic acid bacteria as live vaccines. Curr Iss Mol Biol 2000; 2:17-26.
8. Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin controlled gene expression system in Lactococcus lactis. Appl Microbiol Biotechnol 2005;68:705-17. doi: 10.1007/s00253-005-0107-6
9. Yang XQ, Zhao YG, Chen XQ, Jiang B, Sun DY. The protective effect of recombinant Lactococcus lactis oral vaccine on a Clostridium difficile infected animal model. BMC Gastroenterol 2013;13:1 doi: 10.1186/1471-230X-13-117.
10.Pontes DS, De Azevedo MSP, Chatel JM, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A. Lactococcus lactis as a live vector heterologous protein production and DNA delivery systems. Prot Expr Pur 2011; 79:165-75. doi: 10.1016/j.pep.2011.06.005.
11.Steidler L, Neirynck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, et al. Biological containment of genetically modified Lactococcus lactis for intestinal delivery of human interleukin 10. Nat Biotechnol 2003; 21:785-9. doi: 10.1038/nbt840
12. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning a laboratory manual. 3th ed. Coldspring Harbour Lab UK Publication. 2001;P.123.
13. Tangfeldman YJ, Ackermann G, Henderson JP, Silva J, Cohen SH. One step cloning and expression of Clostridium difficile toxin B gene. Mol Cell Prob 2002; 16:170-83. doi:
14. Dsilva I. Recombinant technology and probiotics. Int J Eng Technol 2011; 3:288-93.
15. Bermudez LG. Lactococcus lactis as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. Hum Vac 2009; 5:264-7. doi: 10.4161/hv.5.4.7553

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]

Cloning of Immunogenic Domain of Clostridium Difficile Toxin B in Lactococcus lactis to Develop an Oral Vaccine Based on Lactococcus against Clostridium difficile Associated Colitis

Rahimi Y[1], Rabbanikhorasgani M[1], Zarkeshesfahani H[1], Emamzadeh R[1], Keyvaniamineh H[2], Rezaei M[1]*

(Received: September 26, 2018 Accepted: August 27, 2019)

Abstract

Introduction: Clostridium difficile bacterium is the leading cause of clinical infection and pseudomembranous colitis. Toxin B (TcdB) of C. difficile is regarded as one of the main virulence factors of this bacterium. Moreover, the receptor binding domain (RBD) of this toxin which is known as an immunogenic domain attaches to its receptor in intestine. This study aimed to clone and express the immunogenic domain of the Toxin B in Lactococcus lactis to provide a safe oral vaccine against colitis caused by C. difficile as an alternative treatment in future studies based on Lactococcus.

Materials & Methods: In order to clone this segment, at first, the DNA was extracted from C. difficile, and then, the RBD gene segment was amplified by the PCR method using designed primers. The amplified segment was attached to pTZ25R/T plasmid and transformed into Escherichia coli. Subsequently, the RBD segment was extracted from pNZ9418 plasmid using restriction enzymes, such as SacI and NcoI, and then it was purified in this study. Following that, the RBD segment was cut in pNZ8149 plasmid using the same enzymes and was attached under the proper condition. The pNZ8149 plasmid with segment was transformed into L. lactic competent cells by electroporation method.

Findings: After the screening of electro-transformed colonies, the accuracy of cloning was verified using PCR, enzyme digestion on the extracted recombinant plasmid, and sequencing.

Discussion & Conclusions: According to the results, L. lactic which produces the immunogenic domain can be used as a safe oral vaccine and can be considered as an alternative therapy to reduce the incidence of Clostridium difficile infection in further investigations.

Keywords: Clostridium difficile, cloning, toxin B, Lactococcus.lactic

1. Dept of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2. Dept of Virology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
** Corresponding author Email: m.rabbani@biol.ui.ac.ir*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-13]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.25]