طراحی و مطالعه بیوانفورماتیکی ژن موتانت زیر واحد کاتالیتیک دیفتریاتوکسین(dtxA) و بررسی بیان پروتئین نوترکیب کاندید واکسن علیه دیفتری

غلامرضا اولاد[1*]

[1]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱۵

چکیده

مقدمه: دیفتری ناشی از باسیل کورینه باکتریوم، بیماری مهلکی است که بقراط در ۵ قرن قبل از میلاد آن را شرح داده است. عامل بیماری، اگزوتوکسین DTX، شامل دو زنجیره کاتالیتیک(A) و اتصال دهنده(B) می باشد. بخش A پس از ورود به سلول به واسطه اتصال بخش B که به بسیاری از سلول های بدن، باعث مهار سنتز پروتئین و مرگ سلول می گردد. هدف از این مطالعه طراحی و تهیه ژن موتانت زیرواحد کاتالیتیک دیفتریاتوکسین(dtxA) و بررسی های بیوانفورماتیکی آن به منظور بررسی بیان در وکتور pET28a و تولید پروتئین نوترکیب حاصل از آن، به عنوان کاندید واکسن علیه دیفتری می‌باشد.

مواد و روش ها: پس از تعیین و بهینه سازی ترادف ژن dtxA واجد جهش های A158G /G52E و بررسی های بیوانفورماتیکی سازه ژنی pET28a/ dtxA به میزبان بیانی E.Coli Bl21 DE3 منتقل گردید. سپس بیان و تولید پروتئین نوترکیب حاصل به عنوان کاندید واکسن، با کمک وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌های پژوهش: نتایج بیوانفورماتیکی حاصل از بهینه سازی کدون های ژن مورد مطالعه منجر به سفارش و تهیه این ژن در وکتور بیانی گردید. صحت این ژن با کمک واکنش هضم آنزیمی و الکتروفورز، مورد تائید قرار گرفت. پس از آن بیان و تولید این پروتئین نوترکیب با وسترن بلات تایید گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به مزیت های پروتئین نوترکیب DTxA به توکسوئید دیفتری، به نظر می آید پروتئین نوترکیب حاصل می‌تواند جایگزینی مناسب به عنوان کاندید واکسن علیه دیفتریاتوکسین قرار گیرد که نیازمند مطالعات بیشتر می باشد.

واژه های کلیدی: کورینه باکتریوم دیفتریه، دیفتریاتوکسین، پروتئین زیرواحد DTxA، ژن dtxA، واکسن نوترکیب

* **نویسنده مسئول**: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهران

Email: *grolad@gmail.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]

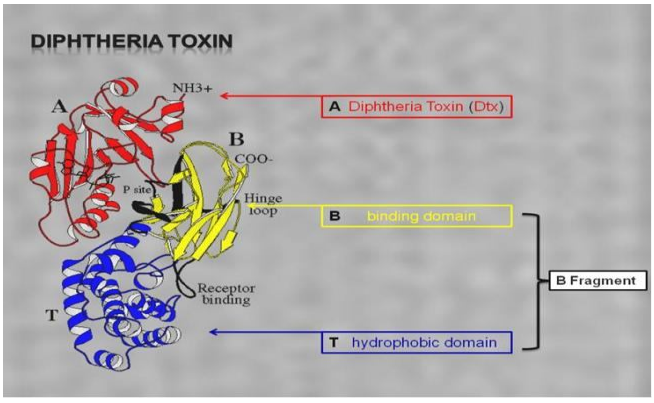
مقدمه

کورینه باکتریوم دیفتریه(باسیل کلبس-لوفلر) مهم ترین گونه خانواده کورینه باکتریاهاست که در محیط لوفلر به صورت باسیل چند شکلی رشد می کند. این باکتری باسیل گرم مثبت، کاتالاز مثبت و هوازی اختیاری است و در چهار شکل بلفانتی، انترمیدیوس، میتیس و گراویس دیده می شود. در سال ۱۸۹۹ ویلیام و پارک متوجه شدند که از بین باسیل های دیفتری، یک نوع میتیس بیشتر و بهتر از انواع دیگر، توکسین تولید می کند و آن را به نام اختصاصی PW8 نام گذاری نمودند. در حال حاضر تقریباً اکثر مطالعاتی که برای به دست آوردن توکسین انجام می شود بر روی این سوش صورت می‌گیرد.(۱،۲،۳)

دیفتری، بیماری حاد دستگاه تنفسی و بالقوه کشنده است که سبب آسیب به نسوج بافت هایی مانند میوکارد، اعصاب محیطی و کلیه ها می گردد و میزان مرگ و میر آن در کودکان خردسال و افراد مسن زیادتر می باشد. استفاده از واکسن دیفتری در ۵۰ سال گذشته باعث کاهش شیوع این بیماری شده است،(۱،۲). اگر چه باسیل دیفتری ارگانیسم زیاد مهاجمی نمی باشد ولی قدرت بیماری زایی آن ناشی از سمی است که تولید می کند. التهاب موضعی ناشی از نکروز نسج و توده باکتری، غشاء دیفتری را ایجاد می نماید،(۳،۴). جهت درمان بیماری از آنتی توکسین نوع اسبی و جهت ایمن سازی فعال، از توکسوئید آن استفاده می گردد،(۵،۶). میزان اثر واکسن بیش از ۹۵ درصد است اما تجویز آنتی بیوتیک مناسب لازم است هر چند جایگزین آنتی توکسین نمی شود.(۷)

سمیت این باسیل به طور مستقیم به اگزوتوکسین آن مربوط می شود و باکتری برای ایجاد علائم نیازی به ورود به خون ندارد. ژن dtx که تولیدکننده اگزوتوکسین باکتری است توسط باکتریوفاژ لیزوژن ß به باکتری وارد شده است. اگزوتوکسین از جنس پروتئین با وزن مولکولی حدود ۶۱ کیلو دالتون است و به حرارت حساس بوده و در اثر نور، عوامل شیمیایی و مرور زمان، اثر آن کاهش می یابد.(۸،۹)

آن چنان که در تصویر شماره ۱ مشاهده می شود این توکسین از دو زیر واحد A و B تشکیل شده و دارای دو پل دی سولفیدی است که می توان با استفاده از تریپسین یا پروتئاز و در حضور یک ماده احیاء کننده، این دو زیر واحد را از هم جدا نمود. زیر واحد کاتالیتیک A با ۱۹۲ اسید آمینه مقاوم به حرارت با وزن مولکولی حدود ۲۱ کیلو دالتون می باشد که اثر توکسین دیفتری مربوط به این زیر واحد است و زیر واحد B حساس به حرارت با وزن مولکولی ۴۰ کیلو دالتون که باعث اتصال سم به گیرنده های غشاء سلول های حساس می شود. گیرنده توکسین، فاکتور اپیدرمی متصل به هپارین است که بر روی بسیاری از سلول های یوکاریوت به ویژه سلول های قلبی و عصبی حضور دارد.(۱۰،۱۱)



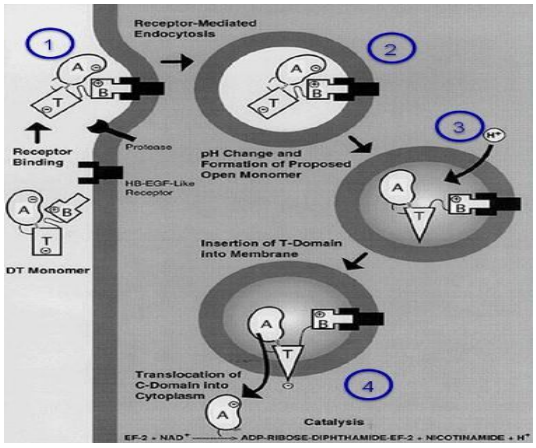
تصویر شماره ۱. زیر واحدهای توکسین دیفتری

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]

حداقل دو نوع مکانیسم ورود توکسین به درون سلول میزبان وجود دارد:

۱. ورود مستقیم: در این مکانیسم، بخش B از توکسین به رسپتور خاص خود در سطح سلول میزبان اتصال یافته و سپس درون غشاء سلول میزبان، یک حفره(Pore) ایجاد می کند و بخش A را از حفره ایجاد شده، به درون سلول منتقل می نماید.

۲. ورود توسط اندوسیتوز وابسته به رسپتور: در این مکانیسم که به(RME) نیز معروف است(تصویر شماره ۲) رسپتوری که توکسین به آن متصل می شود، باعث القاء اندوسیتوز به سلول شده و در نتیجه سلول، توکسین را اندوسیتوز می کند و آن را به صورت یک اندوزوم به درون سلول وارد می کند. در واقع عملی شبیه به فاگوسیتوز اتفاق می افتد.



تصویر شماره ۲. مکانیسم عملکرد توکسین دیفتری

به عبارت دیگر، توکسین پس از اتصال به سطح سلول میزبان، به درون سلول فاگوسیته شده و پس از جدا شدن دو زنجیره، بخش A از درون سیتوپلاسم سلول آزاد و بخش B با واسطه دومین هیدروفوب T درون اندوزوم باقی مانده و از طرف دیگر سلول خارج می‌شود.(۱۲،۱۳،۱۴)

از این جا به بعد بخش A توکسین دیفتری، فعالیت توکسیسیتی خود را اعمال می نماید. سوبسترای این زیر واحد، پروتئینی به نام EF-2 می باشد که نقش اساسی در طویل شدن پروتئین در حال سنتز سلول را دارد اما باعث غیرفعال شدن آن می شود. در نتیجه این عمل، سنتز پروتئین در سلول متوقف شده و نهایتاً منجر به مرگ سلول می شود.(۱۵)

این واکنش با هیچ پروتئینی به جزء EF-2 در سلول پستانداران صورت نمی گیرد و برای انجام این واکنش، وجود +NAD ضروری است. در سلول های آلوده به توکسین، پس از توقف سنتز پروتئین، از همانندسازی DNA و رونویسی RNA نیز جلوگیری می شود.(۱۵،۱۶،۱۷)

اگزوتوکسین برخی باکتری ها نیز مانند توکسین دیفتری عمل می کنند ولی توکسین دیفتری اثرات گسترده تری روی بافت های بدن انسان دارد که علت آن، تفاوت در بخش B توکسین دیفتری می باشد زیرا بخش B توکسین دیفتری به طیف وسیعی از سلول های بدن مانند رسپتورهای قلب، کبد، کلیه، چشم ها متصل می شود.(۱۲،۱۷،۱۸)

تولید واکسن و آنتی سرم حیوانی علیه دیفتری با استفاده از اگزوتوکسین خالص شده از محیط کشت سویه PW8 و تبدیل آن به توکسوئید به وسیله روش های شیمیایی صورت می گیرد،(۳،۱۹،۲۰). هر چند که ساده ترین روش کشت، همان کشت ثابت سنتی است ولی این روش علاوه بر این که نیازمند زمان و فضای زیادی است، امکان آلودگی محیط کشت نیز وجود دارد،(۶،۷،۲۱). در این روش معمولاً در کشت های متوالی میزان توکسین کاهش می یابد. علاوه بر این، در این نوع کشت، افزایش مقیاس نیز مشکل بوده و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]

برای رفع این مشکل می توان از روش مهندسی ژنتیک و تولید پروتئین نوترکیب در فرمانتور با ویژگی های زیر استفاده کرد: تولید توکسین در حجم خیلی زیاد، مقرون به صرفه بودن این روش، تولید تحت شرایط تجاری کنترل شده، تولید تیتر بالای توکسین که نیاز کشور را برای واکسن های DT و DPT تامین می نماید، وجود کمترین مشکلات برای رعایت شرایط استریل، استفاده از یک نوع تجهیزات برای تولید انواع مختلف واکسن، کاهش کار آزمایشگاهی وکاهش فضای مورد نیاز برای کار.(۲۲،۲۳)

با توجه با برتری های فوق هدف از این مطالعه تولید پروتئین نوترکیب و ترجیحاً زیر واحد کاتالیتیک A، دارای جهش نقطه ای، به عنوان کاندید برتر تولید واکسن و آنتی سرم علیه دیفتری می باشد.

محققین تاکنون جایگاه های مختلفی از این زیر واحد را انتخاب و با ایجاد جهش نقطه ای تولید پروتئین نوترکیب نموده اند. مهم ترین آن ها اصطلاحاً CRM197 نام دارد. مطالعات متعددی در این جایگاه انجام گردیده و دارای نتایج بسیار خوبی نیز بوده است. این جهش نقطه ای باعث جایگزینی یک گلوتامیک اسید به جای یک گلایسین در جایگاه ۵۲ می گردد. این جایگزینی دقیقاً در جایگاه فعال بخش کاتالیتیک بوده و در نتیجه منجر به تغییر در ساختار فضایی پروتئین و از بین رفتن سمیت این زیر واحد می شود. به همین دلیل هم نیاز به تیمار با فرمالدهید ندارد و هم این پروتئین به راحتی به حالت محلول در آمده و تخلیص می گردد.

هم چنین با وجود این جهش پروتئین در مقابل آنزیم های پروتئولایتیک مقاوم خواهد شد و تخریب پذیری آن به شدت کاهش خواهد یافت. از دیگر جهش هایی که مورد مطالعه قرار گرفته است می توان به جایگزینی آسپارژین به جای گلوتامیک در جایگاه ۱۴۸، جایگرینی آرژنین به جای هیستیدین در جایگاه ۲۵۷ و جایگرینی گلایسین به جای آلانین در جایگاه ۱۵۸ نیز اشاره نمود.(۱۰،۱۵،۲۲،۲۴،۲۵،۲۶)

یکی از ویژگی های منحصر به فرد مطالعه حاضر نسبت به مطالعات دیگری که در این زمینه تاکنون گزارش شده است، طراحی ژن زیر واحد dtxA واجد دو جهش G52E و A158G به صورت هم زمان است که تاکنون هیچ گزارشی از آن به ثبت نرسیده است. پیش بینی می شود با وجود این دو جهش به صورت هم زمان ضمن حفظ خاصیت ایمنوژنیکی خود نسبت به توکسین طبیعی، دارای حداقل خاصیت سمیت نیز باشد.

مواد و روش ها

ابتدا ترادف ژن کامل توکسین دیفتری از بانک ژن(با کد K01723.1) استخراج گردید. سپس ترادف بخش کاتالیتیک ژن توکسین دیفتری(زیر واحد A با کد AY820132.1) شامل ۵۸۲ جفت باز انتخاب گردید. سپس جایگاه ایجاد جهش شناسایی و تنها در دو نوکلئوتید ۱۵۵ و ۴۷۳ تغییر ایجاد گردید. این دو جهش باعث تغییر در اسید آمینه هایG52E و A158G از این پروتئین خواهد شد. پس از آن در این ترادف ژن، با استفاده از ترجیح کدونی باکتری E coli. به منظور بیان در این باکتری، به وسیله الگوریتم OptimumGeneTM بهینه سازی لازم صورت گرفت. توالی قطعه حاصل، توسط نرم افزار DNasis با توالی ژن اولیه مورد مقایسه و هم ردیف سازی قرار گرفت. نقشه و الگوی آنزیم های محدودکننده موثر بر این توالی، قبل و بعد از بهینه سازی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

میزان CAI که در حقیقت کمیتی است که می گوید یک کدون در یک ژن با چه درجه ای به کدون های موجود در ژن های بیان شونده به میزان بالا(مثل پروتئین های ریبوزومی و فاکتورهای طویل سازی) شباهت دارد، نیز اندازه گیری شد

پایداری mRNA عموما به وسیله تغییرات انرژی آزاد نشان داده می شود. ساختار mRNA پروتئین نوترکیب DTxA به وسیله نرم افزار mfold مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین با الگوریتم به کار گرفته شده تا حد ممکن ساختارهای حلقه–ساقه که در اتصال ریبوزومی و پایداری mRNA مهم هستند و می توانند کارایی ترجمه را به نحو چشمگیری کاهش دهند، شکسته شدند.

ساخت توالی ژن مذکور به شرکت Shine Gene چین سفارش داده شد. قطعه مورد نظر واجد توالی آنزیم

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]

EcoR I در ابتداء و توالی آنزیم Hind III در انتهای ژن بر روی وکتور pET28a سنتز و به صورت لیوفلیزه دریافت شد. طبق دستور شرکت سازنده، این وکتور در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شده و با استفاده از سلول های مستعد تهیه شده از طریق واکنش شوک حرارتی، تراریختی صورت پذیرفت،(۲۷). کلون های حاوی وکتور PET28a/dtxA در محیط LB مایع حاوی ۸۰µg/ml آنتی بیوتیک کانامایسین به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

تخلیص پلاسمید به روش لیز قلیایی با استفاده از محیط کشت شبانه فوق انجام گردید. به منظور بررسی و تأیید پلاسمیدهای استخراج شده، این محصول بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مطالعه و بررسی گردید. به جهت حصول اطمینان کامل، واکنش هضم آنزیمی این پلاسمید pET28a/dtxA به کمک دو آنزیم HindIII و EcoRI(آنزیم های طراحی شده در دو طرف ژن)، به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شده انجام گردید و محصول نهایی بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین جهت بررسی صحت ژن مورد مطالعه، تعیین توالی با استفاده از این پلاسمید انجام گردید.(۲۷)

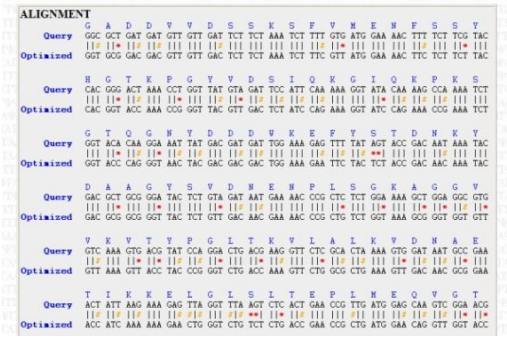
جهت بیان ژن نوترکیب ابتدا تعدادی از کلونی ها انتخاب شده و هر کدام در محیط LB به صورت شبانه کشت داده شدند. سپس کشت مجدد انجام گرفته و بیان ژن در میزان جذب(OD) حدود ۰/۶ درطول موج ۶۰۰ نانومتر، با اضافه نمودن ماده القاء کننده IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی ملار در شرایط استریل به لوله های تست انجام شد و به همراه لوله شاهد (بدون القاء کننده) به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ rpm در شیکر انکوباتور گرماگذاری انجام گردید.(۲۷)

پس از اتمام زمان فوق سلول های موجود در هر کدام از محیط های کشت مورد آزمایش و شاهد درون میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری ریخته شده و به کمک سانتریفوژ در سرعت ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه جمع آوری شدند. سپس هر کدام از سلول های جمع آوری شده مستقیماً با سمپل بافر(۲/۵ X) مخلوط و بعد از قرار دادن در دمای ۱۰۰ درجه به مدت ۵ دقیقه، در ژل آکریل آمید SDS-PAGE الکتروفورز گردیدند.(روش کرود) پس از اطمینان از بیان پروتئین و تأیید آن با روش های فوق، بیان پروتئین نوترکیب در مقیاس بالای آزمایشگاهی در حجم ۲۵۰ml انجام گردید. سپس به منظور تائید پروتئین نوترکیب حاصل، از تکنیک وسترن بلات استفاده گردید. جهت انجام این واکنش ازآنتی بادی پلی کلونال آنتی هیستیدین (6His) و آنتی بادی ثانویه ضد Fc کانژوگه شده با HRP استفاده شد.

یافته‌های پژوهش

تصویر شماره ۳ نمای توالی ژن موتانت dtxA قبل و بعد از فرایند بهینه سازی را نشان می دهد. آن چنان که مشاهده می شود میزان درصد C+G این ژن از ۴۰/۰۹ (در حالت طبیعی) به مقدار ۵۳/۳۳ بعد از بهینه سازی افزایش یافته و در نتیجه میزان T+A از ۶۰ درصد در حالت طبیعی به مقدار ۴۷ درصد در حالت بهینه سازی شده، کاهش یافته است.

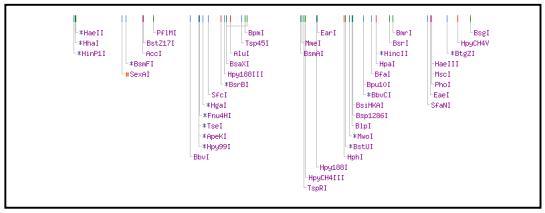
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]



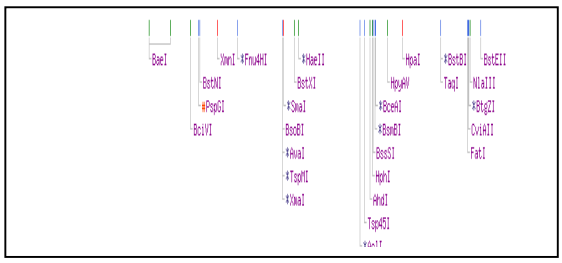
تصویر شماره۳. مقایسه توالی قبل و بعد از بهینه سازی کدون ها

تصاویر ۴ و ۵ نتیجه مقایسه نقشه آنزیم های محدود کننده قبل و بعد از بهینه سازی ژن فوق را نشان می دهد

.



تصویر شماره ٤. الگوی نقشه آنزیم های محدود کننده ژن قبل از بهینه سازی



تصویر شماره ٥. الگوی نقشه آنزیم های محدود کننده ژن بعد از بهینه سازی

نتایج حاصل از BLAST X نشان داد که این توالی(بهینه سازی شده) به صورت ۱۰۰ درصد با توالی پروتئین طبیعی همولوژی دارد.(جدول شماره ۱)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]

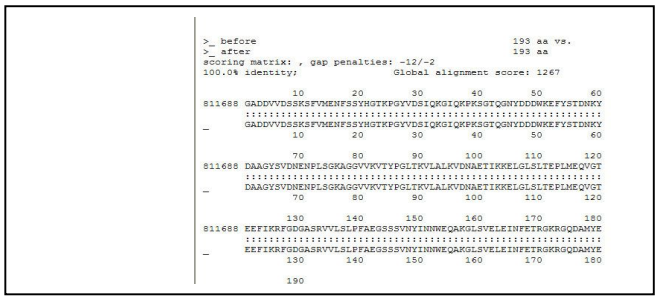
جدول شماره ۱. تغییرات بعد از بهینه سازی ژن dtxA بر اساس تک تک آمینو اسیدهای
CODON USAGE OF QUERY AND OPTIMIZED SEQUENCE

Codons	Query	Optimized	Codons	Query	Optimized	Codons	Query	Optimized	Codons	Query	Optimized
GCA (A)	2	0	GCC (A)	2	0	GCG (A)	3	13	GCT (A)	6	0
TGC (C)	0	1	TGT (C)	1	0	GAC (D)	3	13	GAT (D)	10	0
GAA (E)	8	15	GAG (E)	7	0	TTC (F)	2	7	TTT (F)	5	0
GGA (G)	8	0	GGC (G)	3	0	GGG (G)	3	0	GGT (G)	6	20
CAC (H)	1	1	CAT (H)	0	0	ATA (I)	1	0	ATC (I)	1	6
ATT (I)	4	0	AAA (K)	13	16	AAG (K)	3	0	TTA (L)	3	0
TTG (L)	1	0	CTA (L)	1	0	CTC (L)	4	0	CTG (L)	1	12
CTT (L)	2	0	ATG (M)	4	4	AAC (N)	4	11	AAT (N)	7	0
CCA (P)	2	0	CCC (P)	1	0	CCG (P)	2	6	CCT (P)	1	0
CAA (Q)	6	0	CAG (Q)	1	7	AGA (R)	0	0	AGG (R)	2	0
CGA (R)	1	0	CGC (R)	0	0	CGG (R)	0	0	CGT (R)	4	7
AGC (S)	3	0	AGT (S)	3	0	TCA (S)	0	0	TCC (S)	1	0
TCG (S)	2	0	TCT (S)	8	17	ACA (T)	1	0	ACC (T)	2	9
ACG (T)	3	0	ACT (T)	3	0	GTA (V)	4	0	GTC (V)	3	0
GTG (V)	5	0	GTT (V)	4	16	TGG (W)	2	2	TAC (Y)	3	10
TAT (Y)	7	0	TAA (.)	1	1	TGA (.)	0	0	TAG (.)	0	0

پس از بهینه سازی و انجام تغییرات لازم در توالی ژن dtxA و حصول نتایج بیوانفورماتیکی، وکتور حاوی ژن صناعی pET28a/dtxA از شرکت سازنده تهیه گردید.

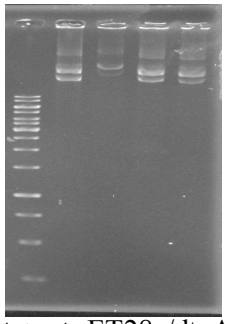
هم چنین نتایج حاصل از هم ردیف سازی توالی پروتئین طبیعی و پروتئین حاصل از ژن صناعی این گفته را نیز تایید می نماید.(تصویر شماره ۶)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]

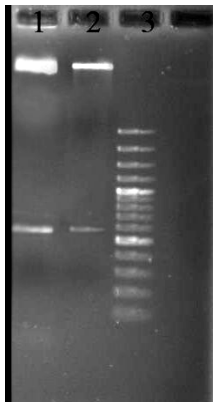


تصویر شماره ٦. مقایسه توالی آمینو اسیدی ژن dtxA قبل و بعد از بهینه سازی

از نتایج حاصل از ژل آگاروز، کلیه مراحل تهیه سلول مستعد، فرایند تراریختی آن ها به وسیله سازه ژنی، غربالگری کلون های مثبت و در نهایت نتایج تخلیص پلاسمید حاصل، به وسیله واکنش هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت. نتایج این بررسی ها صحت سازه ژنی انتقال یافته در سلول را تایید نمود.(تصاویر ۷،۸)



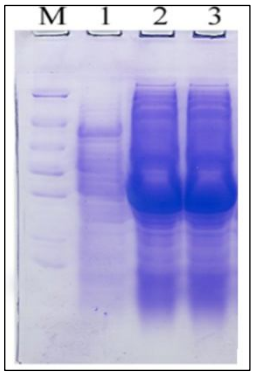
تصویر شماره ۷. بررسی پلاسمید pET28a/dtxA استخراج شده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد
ردیف۱- نشانگر اندازه مولکولی (100 bp DNA ladder plus)
ردیف ۱،۲،۳،٤- پلاسمید تخلیص شده از ٤ کلون مختلف



تصویر شماره ۸. آنالیز کلون ها به روش هضم آنزیمی
ردیف ۱،۲- پلاسمید و قطعه ژنی dtxA برش خورده
ردیف ٤- نشانگر اندازه مولکولی(100 bp DNA ladder plus)

نتایج بیان اولیه ژن مورد مطالعه pET28a/dtxA با استفاده از بررسی کل محتوای پروتئینی سلول های بیانی جمع آوری شده بر روی ژل SDS-PAGE مورد تایید قرار گرفت. در نمونه های القاء شده، پروتئین با بیان بسیار بالا مشاهده گردید در حالی که چنین پروتئینی در نمونه های القاء نشده وجود نداشت.(تصویر شماره ۹)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]



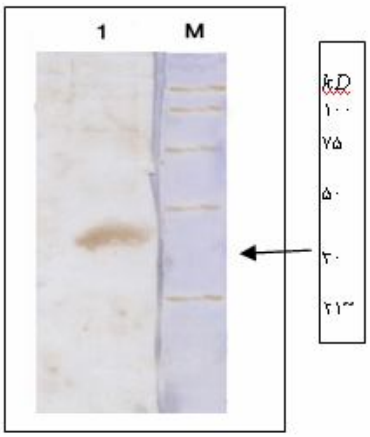
تصویر شماره ۹. بررسی پروتئینی بیانی DTxA بر روی ژل SDS-PAGE

ردیف M- مارکر SMO431

ردیف۱- کنترل منفی(کلون‌های القاء نشده با IPTG)

ردیف ۲،۳- کلون‌های القاء شده با IPTG حاوی قطعه بیانی

نتایج حاصل از تکنیک وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی Anti His Tag، پروتئین نوترکیب DTxA بیان شده در وکتور pET28a را مورد تایید قرار داد. تصویر شماره ۱۰ نشان می دهد که این آنتی بادی توانسته است پروتئین نوترکیب حاصل از بیان ژن dtxA را به خوبی شناسایی نماید.



تصویر شماره ۱۰. تائید پروتئین DTxA از طریق ایمونو بلاتینگ

ردیف ۱- نمونه تست پروتئین بیانی DTxA

ردیف M- مارکر پروتئین: ۱۵-۳۰-۵۰-۷۵-۱۰۰

بحث و نتیجه گیری

در سال ۱۸۸۸ میلادی روکس و همکاران نشان دادند که پس از تزریق عصاره کورینه باکتریوم استریل شده به حیوانات آزمایشگاهی، آسیب بیشتری در این حیوانات(در مقایسه با انسان) ایجاد شد. به این ترتیب مشخص شد که عامل اصلی بیماری زایی، یک اگزوتوکسین قوی می باشد که با استفاده از آن، هم می توان یک آنتی توکسین مؤثر برای درمان عفونت های حاد به دست آورد و هم یک واکسن توکسوئید بسیار مؤثر تولید نمود،(۳). بهرینگ ۱۸۹۰ توانست آنتی توکسین دیفتری را از خون خوکچه هندی که قبلاً به او مایع صاف شده و غیرفعال حاصل از محیط کشت دیفتری تزریق شده بود، به دست آورد. در سال ۱۹۰۷ ایمن سازی فعال علیه دیفتری به وسیله اسمیت شروع شد و در سال ۱۹۲۰ رامون با اضافه کردن فرمالدئید به سم دیفتری و حرارت دادن، توکسوئیدی تولید نمود که بعداً جهت واکسیناسیون مورد استفاده قرار گرفت.(۴)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]

در سال ۲۰۰۱ توسط ساندران و همکاران مطالعاتی برای تولید توکسین دیفتری انجام شد، آن ها از آبگوشت پاپائین هضم شده ماهیچه گاو توسط پاپائین همراه با مالتوز(به عنوان منبع کربن) برای تولید حداکثری توکسین در یک فرمانتور(با یک طراحی ساده) استفاده نمودند. آهن اضافی موجود در براث(که مانع از آزاد شدن توکسین می شود) را می توان با استفاده از مخمر Baker حذف نمود.(۸،۹،۲۶،۲۸)

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸ توسط تقوی مقدم و همکاران،(۲۲)، در دانشگاه جندی شاپور اهواز برای تولید توکسین دیفتری انجام گرفت، آن ها تولید توکسوئید دیفتری در فرمانتور را با روش های قدیمی تولید ساکن مقایسه نمودند. با استفاده از یک فرمانتور ۳۵۰ لیتری، بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون توانستند ۳۰۰ تیتر توکسین با /Lf۳۰۰-۲۵۰ تولید نمایند.(۲۲،۲۹،۳۰) توکسین به دست آمده در روش کشت غوطه ور را می توان توسط فرمالدئید تیمار کرده و به توکسوئید تبدیل نمود اگر چه هنوز هم استفاده از روش اخیر در تولید انبوه این واکسن در کشور ما و بسیاری از کشورهای توسعه نیافته و یا در حال توسعه ادمه دارد ولی ظهور تکنیک های پیشرفته بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در جهان اقبال دانشمندان را در بهره وری از این فناوری دو چندان نموده است. چرا که ویژگی های برتر و غیر قابل مقایسه واکسن های نسل دوم(نوترکیب) و سوم و حتی چهارم آن چنان بدیهی و چشمگیر است که در آینده بسیار نزدیک به انقراض تولید واکسن های نسل اولی خواهد انجامید. هم چنان که این شروع برای برخی از واکسن های نسل اول اتفاق افتاده است و برخی از واکسن های نوترکیب دارای مجوز رسمی، در کشور آمریکا یا برخی از کشورهای توسعه یافته جایگزین شده اند.

مطالعات متعدد آقایان مئنز و همکاران از فرانسه در سال ۱۹۹۷، Figueiredo و همکاران از آمریکا در سال ۲۰۰۰، Rogerio و همکاران از ایتالیا در سال ۲۰۰۱، Mills و همکاران از ایتالیا در سال ۲۰۰۱ و Ladokhin و همکاران از آمریکا در سال ۲۰۱۰ پیرامون طراحی، ساخت و بررسی ویژگی های برتر پروتئین های نوترکیب مختلف به عنوان کاندید واکسن علیه دیفتری، و حتی استفاده از فناوری نانوبیوتکنولوژی در تولید واکسن خوراکی و یا استنشاقی آن با کارایی بالاتر از واکسن های نسل اول، تنها بخش کوچکی از مطالعات در حال انجام در جهان برای واکسن دیفتری است،(۱۵،۲۴،۲۵،۲۶،۳۱،۳۲،۳۳). این به این معنی است که ضرورت دارد که محققین کشور ما نیز در این سمت مطالعاتی را آغاز نمایند. بدین منظور این مطالعه بر اساس آخرین یافته های دیگر محققین با این استراتژی طراحی گردید که پروتئین نوترکیب حاصل می تواند بخش کوچک تری از کل پروتئین باشد که بتواند ۱- سیستم ایمنی را به راحتی و کامل نسبت به توکسین طبیعی تحریک و ایجاد پاسخ ایـمنی کامل علیه آن نماید. ۲- این بخش ترجیحاً می تواند بخش کاتالیتیک توکسین انتخاب گردد تا بتواند اثر خود را در ایجاد پاسخ ایمنی همانند توکسین یا توکسوئید دیفتری کامل نماید. ۳- به جهت بالا رفتن ضریب ایمنی و کاهش سمیت پروتئین، با ایجاد تغییر بسیار ناچیز در توالی ژن آن مانند جهش نقطه ای در جایگاه فعال این زیر واحد، می توان خاصیت توکسوسیتی آن را کاهش و یا مهار نمود. ۴- با کوچک شدن زنجیره نوترکیب دست ورزی با ژن آن به راحتی و قابل کنترل خواهد بود. و دیگر ویژگی های آن که بر محققین در این زمینه پوشیده نیست. بر همین اساس در این مطالعه از ژن زیر واحد جهش یافته dtxA استفاده گردید و بعد از طراحی ژن و جهش های مربوطه و بررسی های بیوانفورماتیکی آن، با استفاده از ژن صناعی در وکتور بیانی، و انتقال آن به باکتری بیانی مناسب، بیان و تولید پروتئین نوترکیب آن صورت پذیرفت و تست های تائیدکننده این پروتئین نیز انجام گردید. بدیـهـی اسـت کـه در ادامـه ایـن مـطالعـه لازم اسـت کـه مـطالـعه پیـرامـون بهـیـنـه سـازی روش هـای بیـان، اسـتخراج و تخـلیص و هـم چـنین استـفاده از روش های مهـندسی پروتئـین در استحصال بهتر این پروتئین انجام پذیرد. هم چنین در مرحله بعد بررسـی ایمنی زایی این پروتئین نوترکیب موتانت، در مدل های حیوانات آزمایشگاهی در مقایسه با واکسن های موجود، مورد ارزیابی قرار گیرد که خوشبـختانه ادامه این مطالعه توسـط تیـم حاضر در حال انجام است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]

References

1-WHO: WHO's contributions to world health. In: The world health report. World Health Organization: Geneva;1995.P.49-76.
2-WHO: The state of world health. In: The world health report, World Health rganization:Geneva;1996.P.l-62.
3-Milstein JB, Gellin BG, Kane M, diFabio JL, Homma A. Global DTP manufacturing capacity and capability. Status report. Vaccine 1995;14:313-20.
4-Mueller JH. A simplified formula for diphtheria toxin broth. J Immun 1939; 37:103-12.
5-Edwards DC. The growth and toxin production of Corynebacterium diphtheriae in submerged culture. J Gen Microbiol 1960: 22:698-704.
6-Righelato R C and Van Hemert P A. Growth and toxin synthesis in batch and chemostat cultures of Corynebacterium diphtheria. J Gen Microbiol 1969:58:403-10.
7-Pope CG, Muriel F. Purification of diphtheria toxoid. J Bacteriol1975;139:61-4.
8-WHO: Manual for the production and control of vaccines. Diphtheria toxoid; 1977.
9-Kasauli HP. Manual for the production and standardization of Diphtheria-Pertussis-Tetanus Vaccine. Central Research Institute:India CRI;1989.
10-Collier E. Recombinant diphtheria toxin a fragment muteins. *Mod Toxic Vaccines* 1987;47:90-7.
11-Bheeman S, Udaya Y, Bhaskarao, R. Process optimization for enhanced production toxin by submerged cultivation of diphtheria. J Biosci Bioengin 2001;91:123-8.
12-WHO: Expert committee on biological standardization. Requirements for diphtheria and tetanus toxoid. Tech Rep Ser 1964; 4:293-8.
13-Seamer PA. Estimation of microgram quantities of iron in culture medium using bathophenanthroline. Nature 1959; 184: 636-7.
14-Laemmli UL. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
15-Niclas R. Development of New Oral Vaccine against Diphtheria and the Study of its Immunogenicity in Mouse and Man. ACTA Uni J 2004;231:462-9.
16-Major-Brown HC. Further observations on the standardization of bacterial suspensions. Ind J Med Res 1919;7:238-50.
17-Ramon G. Flocculation test for assaying toxin, toxoid and antitoxin. Compt Rend Soc Biol 1922;86:711-2.
18-Tasman A, Braod AC. Experiments on metabolism with diphtheria. J Infect Dis 1938;63:10-20.
19-Pappenheimer AM, Johnson SJ. Studies in diphtheria production. I. The effect of iron and copper. Br J Exp Path 1936; 17:335-41.
20-Mueller JH and Pauline AM. Production of diphtheria toxin of high potency (1OOLf) oh a reproducible medium. J Immunol 1941;48:21-32.
21-Stainer DW. Separation of bovine sensitizing material from papain digest of beef broth. Can J Microbiol 1967;13:1001-8.
22-Taghavi MA, Afsharpad K. Application of fermentor technology in production of diphtheria toxin. Jundishapur J Microbiol 2008;1:24-7.
23-Tchorbanov AL, Dimtrov JD, Vassilev TL. Optimization of casein based semi synthetic medium for growing of toxigenic Corynbacterium diphtheria in fermentor. Can J Microb 2004;50:821-6.
24-Karin L, Pascal D, Michel LO, Cecile FR, Frederic D, Evelyne L, Caroline L, Andre M. Towards a recombinant vaccine against diphtheria toxin. Infect Immun 1998; 66:418-23.
25-Eliane N, Rogerio P, Mazzantini, WO, Dias O, Nascimento RM, Denise S, et al. induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant Mycobacterium bovis BCG exprressing CRM197, a mutant diphtheria toxin. Infect Immun 2001;69:869-74.
26-Edel A. McNeela E, David OA, Inderjit B, Lisbeth IB, Stanley S. et al. A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material(CRM197) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery. Vaccine 2001; 19:1188-98.
27-Rusel D, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory Manual. 3th ed. New York:Cold Spring Harbor, Laboratory Press; 2001.
28-Pappenheimer A. Diphtheria toxin. Ann Rev Biochem 1977;46:69-94.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]

29-WHO. Manual for the production and control of vaccine, diphtheria toxoid. 1990.
30-WHO. Expert committee on biological standardization. J Biol 1981;659:16-19.
31-Jonathan W. Francis H, Robert H, Brown J, Dayse F, Mary P, et al. Enh-ancement of diphtheria toxin potency by replacement of the receptor binding domain with tetanus toxin C-fragment: A potential vector for delivering heterologous proteins to neurons. J Neurochem 2000;74:2528-36.
32-Mykola V, Rodnin1 W, Alexander K, Paul K, Onkar S, Yevgen O, et al. Conformational switching of the diphtheria toxin T domain. J Mol Bio 2010;402:1-7.
33-Efstratiou A, Roure C. The European laboratory working group on diphtheria, a global microbiogic network. J Infect Dis 2000;181:S146-S51.

Designing and Bioinformatics Study of Synthetic Mutated Diphtheria Toxin(dtxA) Catalytic Domain Gene and Survey of its Recombinant Protein Expression as Vaccine Candidate

*Olad G.R**

(Received: 7 Apr. 2013 Accepted: 6 Aug. 2013)

Abstract

ntroduction: Diphtheria, caused by a toxicogenic strain of Corynebacterium diphtheria, is a fatal disease that was characterized by Hippocrates in 5 BC. Exotoxin (dTX) is the causative agent of this lethal disease. Diphtheria toxin consists of two chains, catalytic (A) and binding (B) chains. The toxin binds to its receptor through binding chain (B) and enters into many host cells such as myocardial, kidney and peripheral nerve cells. After entering, the catalytic chain (A) inhibits protein synthesis and lead to the death of target cell. Currently, a toxoid form of diphtheria toxin is used as vaccine. The aim of this study was to design and provide a mutated catalytic subunit of diphtheria toxin. After studying the mutant protein through bioinformatics methods, we sought to express its gene in the vector, pET28a, and produce this toxoid as a candidate recombinant vaccine against diphtheria.

Materials & Methods: After determining and optimizing of the sequence of dtx gene containing two mutations (A158G, G52E), and performing its bioinformatics study, this synthetic gene was introduced in an expression vector and appropriate molecular analysis was carried out. The pET28a/dtxA construct was transformed in Bl21DE3 E.coli. Then, recombinant protein expression and production as a vaccine candidate was evaluated by western blotting technique.

Findings: The bioinformatics results obtained through optimizing the codons of the gene under study lead to synthesis of the gen in the expression vector. The molecular analysis of this gene by restriction digestion and electrophoresis confirmed its accuracy. The protein product of the gen was confirmed by western blotting after expression and production.

Discussion & Conclusion: Given to the advantages of DtxA recombinant protein compared to diphtheria toxoid, it is conceived that this recombinant protein, as a vaccine candidate, the conventional diphtheria vaccine could be replaced with the recombinant vaccine. This issue should be corroborated by further researches.

Keywords: corynebacterium diphtheria, diphtheria toxin, dtxA gene, recombinant protein

1. Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
** (corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-06]