Downloaded from g3m.ir at 5:46 +0330 on Sunday December 17th 2017

ABSTRACT

Cloning and expression of stxB Gene from Shigella dysenteriae Gype I in E.coli Rosseta DE3

Hamid Madanchi, Hossein Honari *, Mahdi Hesaraki, Ali Sayadnanesh

Shigellosis is a global human health problem. Currently, no vaccine exists against Shigella infection. Shiga Toxin (ST) is a main virulence factor in Shigella dysenteriae type I that is encoded by the stx gene.

This toxin is a hexameric protein with a molecular mass of 70.5 kDa, which is composed of a StxA monomer and a receptor-binding StxB homopentamer subunit. The Shiga toxin A subunit (STxA) mediates toxicity and the B subunit (STxB) is a non-toxic protein responsible for toxin binding and internalization into target cells. STxB is a candidate vaccine antigen for Shigellosis. In this work, the primer was designed using the stxB gene sequence obtained from the NCBI gene bank.

The stxB gene was amplified by PCR and then cloned in pGEM- T Easy Vector and subcloned in pET-28a (+) as an expression vector. The stxB gene was expressed in Escherichia coli Rosetta DE3, and purified by a Ni-NTA resin column; then, its molecular weight and immunogenicity were determined using SDS-PAGE and Western-blot. The goal of this work was to produce STxB protein. The purified protein was used in our next studies such as immunization and production of polyclonal antibody against Shiga toxin.

Key words: Shigella dysenteriae I; Shiga Toxin 2 B Subunit; Escherichia coli Rosetta DE3.

* **Hossein Honari, PhD**
Department of Biology Sciences, Faculty of science,
Imam Hossein University, Tehran, Iran.
Email: honari.hossein@gmail.com
Submission Date: 1. Mar. 2012 • Acceptance Date: 15. May. 2012

Downloaded from g3m.ir at 5:46 +0330 on Sunday December 17th 2017

مقاله پژوهشی

کلونینگ و بیان ژن (stx B) شیگلا دیسانتری تیپ یک در باکتری Roestta DE3 E. coli

حمید معدنچی[۱]، حسین هنری[۱] *، مهدی حصارکی[۲]، علی صیادمنش[۱].

۱. گروه و مرکز تحقیقات علوم زیستی ـ دانشگاه جامع امام حسین(ع) ـ تهران، ایران. ۲. پژوهشکده سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان ـ تهران، ایران.

چکیده/ شیگلوزیس یک مسئله جهانی مهم برای سلامتی بشر محسوب می‌شود. تا به امروز واکسن موثری علیه شیگلا یافت نشده است. یکی از مهمترین فاکتورهای بیماری‌زای اصلی در شیگلا دیسانتری تیپ ۱، انتروتوکسین شیگلا یا ST می‌باشد که توسط ژن stx کد می‌شود. شیگا توکسین یک پروتئین شش زیر واحدی با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلو دالتون بوده که از یک زیر واحد به نام STxA و یک زیر واحد پنتامریک غیر سمی متصل شونده به رسپتور به نام زیر واحد B یا STxB تشکیل شده است. زیر واحد اخیر باعث اتصال و ورود سم به درون سلول و اثرات آن می‌شود. STxB یک آنتی ژن کاندید واکسن برای شیگلوزیس محسوب می‌شود. در این مطالعه با استفاده از توالی ژن stxB بدست آمده از بانک ژنی NCBI طراحی پرایمر صورت گرفت. ژن مورد نظر با استفاده از روش PCR از باکتری شیگلا دیسانتری تیپ ۱ تکثیر یافت و در پلاسمید pGEM- T Easy Vector کلون و سپس در وکتور بیانی pET-28a(+) ساب کلون شد. ژن STxB در باکتری E. coli سویه Rosetta DE3 بیان گردید. پروتئین تولیدی توسط ستون نیکل تخلیص و از لحاظ وزن مولکولی و ایمنوبلاتینگ توسط ژل SDS-PAGE و وسترن بلات مورد تایید قرار گرفت. هدف از انجام این مطالعه تولید پروتئین STxB به منظور استفاده آن در بررسی ایمنی‌زایی و تولید آنتی‌بادی پلی کلونال علیه سم شیگلا (شیگا توکسین) بود.

واژگان کلیدی: شیگلا دیسانتری تیپ ۱؛ زیر واحد B ۲ سم شیگا (STxB) ؛ E. coli سویه Rosetta DE3.

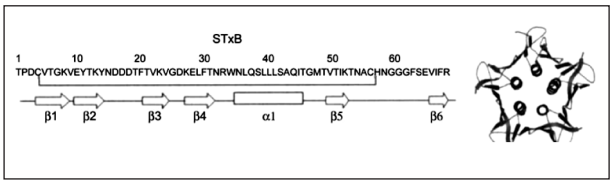
مقدمه

باکتری شیگلا اولین بار توسط آقای کیوشی شیگا در سال ۱۸۹۸ در ژاپن از افراد مبتلا به دیسانتری جداسازی و به افتخار ایشان شیگلا نامیده شد. شیگلاهای زیادی در طی سال‌های بعد شناسایی شدند اما مهمترین آن‌ها از نظر بیماری زایی و بروز اپیدمی‌ها چهار سروتیپ بود که بر اساس پلی ساکارید اختصاصی O شان (osp) در LPS طبقه بندی می‌شوند و به نام‌های شیگلا دیسانتری (S.dysenteria)، شیگلا فلکسنری (S.flexneri)، شیگلا سونئی (S.sonneii)، شیگلا بویدی (S.boydii) نامگذاری شدند. اسهال خونی با عامل شیگلا در بیشتر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان به موقع به مرگ می‌انجامد(۱و۲). از این لحاظ واکسیناسیون علیه شیگلا دارای اهمیت فراوانی است، علاوه بر این هنوز واکسن مناسبی علیه شیگلوزیس وجود ندارد. سالیان زیادی است که شیگا توکسین یا STx (به افتخار آقای کیوشی شیگا نامگذاری شد) به عنوان یکی از عوامل ویرولانس شیگلا دیسانتری تیپ یک در ایجاد اسهال خونی و دیسانتری

* حسین هنری، PhD
استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین، تهران، ایران
پست الکترونیک: honari.hosein@gmail.com
تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۱ • تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲۶

Downloaded from g3m.ir at 5:46 +0330 on Sunday December 17th 2017

مطـرح اســت. توکسین شــیگا STx یک پروتئین هگـزامر با وزن مولکـولــی ۷۰/۵ کیلـودالتون بوده که از یک زیر واحد منومریک سمی و آنزیمـاتیک به نام STxA و از یک زیر واحد متصل شـونده به رسپتور هموپنتامـریک به نام STxB تشکیل شـده است. قسمت غیرسمی STxB برای ورود و عملکـرد قسمت سمی یا STxA ضروری می‌باشــد. STxB ســاختار هموپنتامریــک (۵ زیر واحدی) دارد. هـــر منومر آن از ۶۹ اسـید آمینه (۲۰۷ جفت باز) تشــکیل شده و وزن ملکولی حدود ۷/۷ کیلودالتون دارد (شکل ۱).



شکل۱: ساختار سه بعـدی و توالی آمینـواسیدی STxB: هر منـور STxB از ۶۹ اسید آمینـه تشکیل شـده و وزن مولکـولی حـدود ۷/۷ کیلـودالتون دارد [۴].

STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb3 متصل می‌گـردد که روی اکثر ســلول‌های بدن بیان می‌شود. می‌توان حـدس زد که با تولید آنتـی بادی علیه STxB و خنثی‌ســازی آن می‌توان از اتصـال و ورود قســمت ســمی (STxA) به درون ســلول هـدف جلوگیری بــه عمل آورد. ناحیــه STxA دارای وزن مولکولــی در حدود ۳۲ کیلودالتون بوده که خــود از دو قطعـه که با پیوند کووالانس به هم متصل شده‌اند: قطعـه اول A1 نام دارد که وزن آن در حـدود ۲۸ کیلودالتــون بوده و قطعـه دوم بنام A2 دارای وزنی در حدود ۴ کیلودالتون می‌باشـد.

stxA1 باعث دپورینـه شــدن آدنوزین در 28S rRNA در زیر واحـد ۶۰S ریبوزوم می‌گـردد. این تغییر در ریبوزوم باعث می‌شــود که tRNA نتواند به کمپلکس پروتئین ســازی متصل شــود و در نتیجه پروتئین‌ســازی در ســلول هدف مهـار می‌گـردد. شــیگا توکسین می‌تواند مشــکلات سیتوتوکســیک و نوروتوکســیك ایجاد نماید (۳و۴). از این رو STx یکی از کاندیداهـای مهم برای تولید واکـسن علیه توکسین شیگلا دیسانـتری تیپ ۱ محسوب می‌گردد.

عــلاوه بر این از ایــن زیر واحد در زمینه‌هــای مختلفی همچون انتقــال دهنده آنتــی ژن‌هـــا و داروهای ضد سرطان به ســلول سرطانــی و همچنیــن تصویر بــرداری از تومور بــه کمک مواد فلوروسنت استفـاده می‌گـردد(۵و۶). در این مطالعه هدف تولید پروتئیــن STxB در باکــتری E. coli بود. این پروتئیــن در باکتری E. coli BL21 بیان کمی از خود نشــان داده بود (نتیجه بدست آمده توســط همین گروه) به این منظــور در این تحقیق بیان ژن stxB در باکتری E. coli Rosetta DE3 مورد بررسی قـرار گرفت. هدف از انجـام این پــروژه تولید پروتئین STxB به منظور مطالعات بعدی مـــا در زمینه ایمنـــی زایی و تولید آنتی بادی پلـــی کلونـال علیه شیگا توکسین بود.

مواد وروش‌ها

الف. آنزیم‌هـا، وکتورهـا و سویه‌هـای باکـتریایی

آنزیم‌هـای Pfu و Taq پلی مـراز (2.5U/ μl, Fermentas, Lithuania)، آنزیم‌هــای Hind III و Sal I T4 لیــگاز (IPTG, Fermentas , Lithuania Vivantis, Malesia))، وکتـــور pGEM-T (Promega, USA)، وکتـــور pET-28a(+) (Novagen USA). وکتـــور pGEM-T حـــاوی ژن stx به عنوان الگوی PCR (بانک وکتور دانشــگاه جامع امـام حسین(ع)، (ســویه‌های باکتریایــی E. coli DH5α و E. coli Rosetta (DE3)) دانشــگاه امام حســین(ع)) به ترتیب برای اســتفـاده به عنـوان میزبان همسانه‌سـازی و بیانی مورد استفاده قـرارگرفتند.

ب. مـراحــل طـراحــی پرایمـــر و همسانه‌ســـازی در وکتـور pGEM-T-easy

ژن stxB (۲۰۷ جفت‌باز) باکـتری شــیگلا دیسانتری تیپ ۱ کـه در یک وکتورکه دارای ژن stx از قبـل کلـون شــده بود توســط PCR بــه کمک پرایمرهـای زیر تکثیر یافــت. پرایمر با برنامه Primer 3 و Genescript طراحــی و با نـرم‌افـزار Oligo مورد بررســی قـرار گـرفــت. در طراحی این پرایمرهـا از جایگاه‌هـای برشــی Sal I و Hind III استفاده گردید.

Forward primer (stxB):

5′ GTCGACGGATCCGGCCCGGGCCCGGAATTCGAGCTCAA-GCTTCGTGCGCGTCGTATGACGCCTGATTGTGTAACTGG-3'

Reverse primer (stxB):

5′ AAGCTTATTATCAACGAAA AATAACTTC 3′

چــون این مطالعــه در ادامه مطالعـه قبلی مـــا در زمینه فیـوژن stxB بـــا ایمنـوادجوانت ctxB بود به همیــن منظور مـا از پرایمر

Downloaded from g3m.ir at 5:46 +0330 on Sunday December 17th 2017

قبلی stxB استفاده کردیم(۷). ژن stxB با پرایمر فوق توسط PCR با آنزیم Pfu تکثیر یافت. محصول PCR به کمک آنزیم Taq پلی مراز با dATP دنباله دار شد و سپس در وکتورpGEM-T-easy همسانه‌سازی شد و وکتور نوترکیب pGEM -stxB بدست آمد. سازه اخیر در باکتری E. coli DH5 α ترانسفورم گردید. حضور پلاسمید نوترکیب pGEM -STxB در باکتری میزبان به کمک کنترل آنتی بیوتیکی (آمپی سیلین)، PCR ، هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تایید قرارگرفت.

ج. زیرهمسانه‌سازی قطعه stxB در وکتور بیانی pET28a(+)

قطعه stxB با هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pGEM-stxB توسط آنزیم‌های Sal I و Hind III بدست آمد و در وکتور بیانی pET28a(+) که با همین آنزیم‌ها برش خورده بود زیر همسانه‌سازی گردید(۸). پلاسمید نوترکیب stxB /pET28a در میزبان بیانی (E.coli Rosetta (DE3 ترانسفورم گردید. کلنی‌های نوترکیب با غربال‌گری آنتی بیوتیکی کانامایسین جدا شدند و حضور پلاسمید نو ترکیب با PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرارگرفت.

د. بیان و تخلیص پروتئین stxB کلنی انتخابی در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده‌شد.

پس از اینکه میزان جذب (OD) به ۰/۶ رسید با محلول ۱ میلی مولار بر لیتر ایزوپروپیل تیو- β - D – گالاکتوزید(IPTG) القاء گردید و به مدت ۶ ساعت در ۳۷ درجه با شیک ۱۵۰ دور بر دقیقه انکوبه گردید(۸). پس از انکوباسیون باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ جمع شدند. دیواره پلاک سلولی توسط بافر B (NaH2PO4:13/8gr, Tris.HCl:1/2gr, urea 480/5gr, add DDW to 1liter, pH in 8) شکسته و مجدا" سونیکیت گردید. میزان بیان و وزن مولکولی پروتئین نوترکیب stxB به کمک الکتروفورز روی ژل سدیم دودسیل سولفات ـ پلی اکریل امید (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های لیزشده با سانتریفیوژ در 14000 rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه جمع شدند. سپس تمام پروتئین‌های نوترکیب به کمک توالی His-tag در انتهای N خود توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی با رزین Ni-NTA تخلیص گردیدند و توسط SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند.

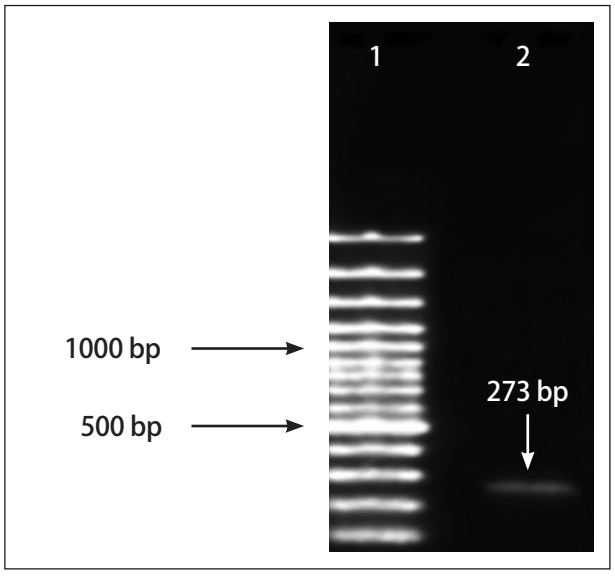
ح. آنالیز با وسترن بلات

به منظور تایید اختصاصی پروتئین‌های تخلیص شده stxB، پروتئین‌ها با روش حساس وسترن بلات بررسی شدند. برای انجام وسترن بلاتینگ پس از اینکه پروتئین‌ها روی ژل آکریل آمید برده شد، پروتئین‌ها ابتدا به غشاء نیتروسلولزی انتقال داده شدند و با آنتی‌سرم خرگوشی ضد (Anti-His tag (His-tag وآنتی بادی دوم آنتی ـ آنتی بادی IgG خرگوشی نشاندار با HRP انکوبه گردید. سپس باند ایجاد شده از لحاظ صحت مکان حضور مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

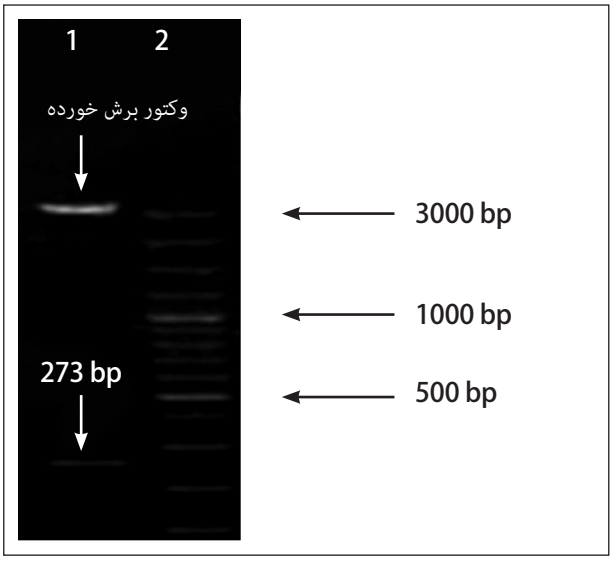
الف. مراحل تکثیر ژن، همسانه‌سازی و زیرهمسانه‌سازی آن در pET 28a(+).

ژن stxB از طریق واکنش PCR با آنزیم Pfu از DNA الگو تکثیر و استخراج گردید و به منظور تایید روی ژل آگارز برده شد قطعات در راستای جایگاه ۲۷۳ جفت بازی (۲۰۷ جفت باز خود ژن + ۶۶ پرایمر) قرار گرفت (شکل ۲) سپس محصول PCR توسط



شکل ۲: تکثیر ژن stxB به کمک PCR توسط آنزیم pfu و تائید آن توسط الکتروفورز روی ژل اگارز.
ستون ۱: نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی.
ستون ۲ : باند ظاهر شده بعد از تخلیص که در مکان مورد انتظار یعنی در راستای ۲۷۳ جفت‌بازی قرارگرفت.

Downloaded from g3m.ir at 5:46 +0330 on Sunday December 17th 2017



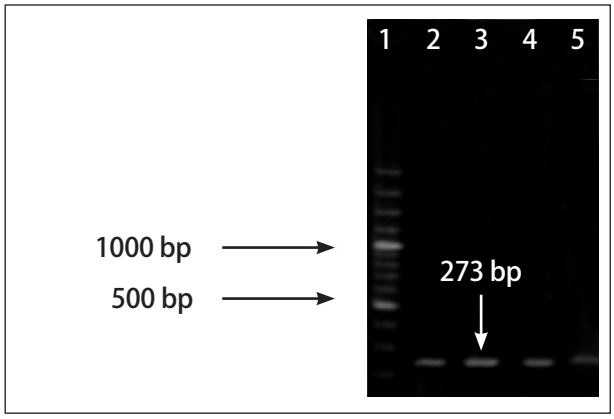
شـکل۳: بـرش آنزیمی بـا آنزیم‌هـای Sal I و Hind III بـه منظـور تائید همسانه‌سـازی از وکتـور نوترکیب pGEM-stxB. **سـتون ۱**: محصول برش آنزیمـی پلاسـمید نوترکیب pGEM -stxB با آنزیم هـای نامبرده، باند در راسـتای جایگاه مد نظر قرارگرفت و وکتـور بـرش خورده در بالا قـرار گـرفت. **ستون ۲ :** نشان‌گـر DNA ۱۰۰جفت باز.

کیت تخلیص DNA از روی ژل آگارز با دمـای پایین جداسـازی شـد و پس از دنباله‌دار شـدن در وکتـور pGEM-T-Easy همسانه‌سـازی گـردیـد و توسـط PCR از کلنی‌هـا و به کمـک ژل الکتروفـورز روی آگارز تائیـد گـردیـد. وکتـور نوترکیب pGEM-stxB توسـط آنزیم‌های Hind III و Sal I برش خـورد(شکل ۳).

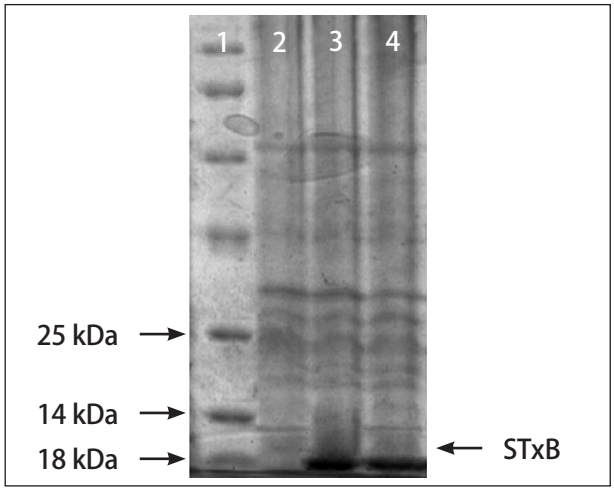
پـس از تخلیـص قطعـه برش خـورده یعنی قطعـه ۲۷۳ جفت بازی stxB، در وکتـور بیانی pET28a(+) زیر همسانه‌سـازی شد و وکتور بیـانی نوترکیب pET28a(+)-stxB حاصل شـد. وکتور اخیر به باکتری (E. coli Rosetta (DE3 ترانسـفورم شـد. حضور پلاسمید نوترکیب با PCR و برش آنزیمی‌تاییدگـردید(شکل ۴).

ب. بیـان پروتئیـن STxB و تخلیـص آن،

کلنی انتخـابی در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتـی‌گراد کشـت داده شـد و پس از رسیدن به رشـد کافـی به منظور بیان پروتئین توسـط IPTG 1 میلی مولار القاء گـردید و برای بررسـی بیـان و کیفیت آن روی ژل SDS-PAGE برده شـد(شـکل ۵). باند پروتئینـی مدنظـر در جایگاه صحیـح ۱۴ کیلودالتونی (۱۰ کیلو دالتون خود پروتئین اسـت و حـدود ۴ کیلو دالتون وکتور به آن اضافه می‌کنـد) قـرارگرفت در حالی که در کنترل‌هـا هیچ باندی



شـکل۴: تائید کلنی‌های حاوی وکتور بیانی نوترکیـب pET28a (+)-stxB توسـط PCR از کلون‌های منتخب **ستون ۱**: نشان‌گر DNA ۱۰۰جفت باز. **ستون ۲ و ۳،۴،۵ :** باند ظاهر شده محصولات PCR از کلون های نوترکیب حاوی وکتور بیانی نوترکیب pET28a (+)-stxB که در ناحیه ۲۷۳جفت باز d (۲۷۳ با پرایمر) باند تشکیل داده است.



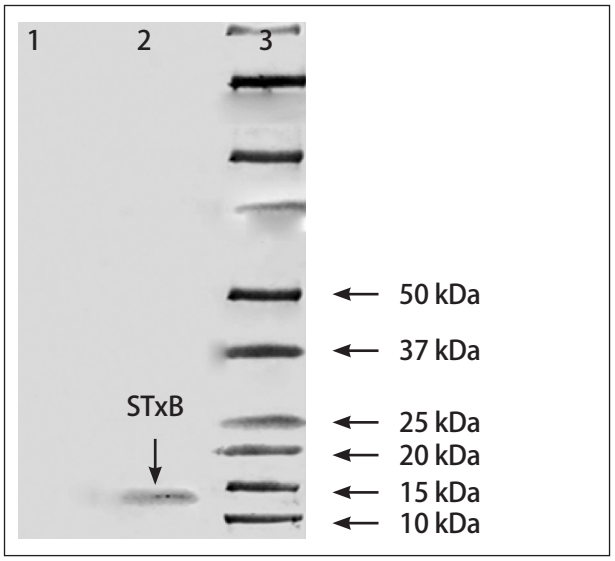
شکل۵: الکتروفورز پروتئین‌های بیان شده STxB با استفاده از روش تیمار خـام بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲درصد. **سـتون ۱**: پروتئین مارکر(cat .No:# SM0431purchased from fermentas co). **سـتون ۲:** کنـترل منفی بدون افزودن IPTG. **ستون ۳ و ۴:** بیان پروتئین STxB در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد . باند های پروتئینی در جایگاه مد نظر قرار گرفتند.

Downloaded from g3m.ir at 5:46 +0330 on Sunday December 17th 2017

دیده نشد. پروتئین نوترکیب به کمک ستون نیکل مراحل خالص سازی گردید و غلظت پروتئین تولیدی به روش برادفورد اندازه گیری شد. میزان غلظت پروتئین ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر (µgr/ml) ارزیابی شد.

ج. آنالیز وسترن بلاتینگ با آنتی بادی ضد His-tag.

بیان پروتئین STxB به دلیل داشتن توالی His-tag به کمک وسترن بلات و بکارگیری آنتی بادی علیه His-tag مورد تائید قرار گرفت و باند وسترن در جایگاه صحیح مدنظر قرارگرفت اما در ستون کنترل هیچ باندی دیده نشد(شکل ۶).



شکل۶: وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین. **ستون ۱:** نمونه کنترل منفی می‌باشد. (عصاره باکتری E. coli نوترکیب می‌باشد که با IPTG القا نشده است). **ستون ۲:** باند پروتئینی ظاهرشده حاصل از بیان پروتئین STxB که در راستای ۱۴ کیلو دالتون قرار گرفت. **ستون ۳:** پروتئین سایز مارکر.

بحث

شیگلوزیس همیشه بعنوان یک اسهال خونی باسیلی حاد شناخته می‌شود که با مدفوع آبکی همراه با خون و موکوس توام با علائم بالینی چون تب، کرامپ‌های شکمی مشخص می‌گردد که ممکن است به همراه سندروم اورمیک همولیتیک باشد. از طرفی شیگا توکسین می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروتوکسیك ایجاد نماید(۹). امروزه تلاش‌های زیادی برای ساخت واکسن علیه شیگلا و سم آن انجام شده و کاندیداهای زیادی گزارش شده‌است. جالب اینکه هیچ کدام از این کاندیداها به دلایل مختلف تا امروز مورد تائید سازمان جهانی سلامت WHO و FDA قرارنگرفته است. اما تلاش‌ها برای ساخت واکسن علیه شیگلوز به طور جدی ادامه دارد. در این مطالعه هدف تولید پروتئین STxB به منظور استفاده در مطالعات بعدی در رابطه با مقایسه ایمنی زایی آن به صورت تنها، همراه با ادجوان‌های طبیعی، استفاده از آن به عنوان یک اجوانت موکوسی و انتقال دهنده پروتئینی به سلول‌های سرطانی می‌باشد.

در رابطه با ژن STxB در سراسر جهان مطالعات و بررسی‌های گوناگونی به عمل آمده، ژن نامبرده در موجودات مختلفی از E. coli گرفته تا انواع گیاهان مثل کاهو و... همسانه‌سازی شده است. در یک تحقیق در سال ۱۹۸۸ ژن stx در باکتری E. coli همسانه‌سازی و توالی آن با توالی یابی مورد تائید قرارگرفت(۱۰). در همین سال (Ilana Harari) و همکارانش ایمنی‌زایی یک پپتید سنتتیک از ناحیه N ترمینال STxB را انجام دادند این پپتید توانست آنتی بادی تولید کرده و در تست آنتی توکسیستی در سلول‌های هلا اتصال سم شیگا به رسپتورهای سطح سلولی را مهارکند(۱۱).

در سال ۱۹۹۳ ژن STxB در سطح بالایی در باکتری E. coli بیان شد و به خوبی به کمک ستون نیکل تخلیص و غلظت خوبی از این پروتئین فراهم گردید(۱۲). به علت شباهت ساختاری این زیر واحد سمی با همتای آن در باکتری اشرشیا کلی (EHEC) یعنی SLT در تحقیقات یک هدف مشترک از این همسانه‌سازی‌ها در نظر محققین دنبال می‌شد و آن هدف ایمنی زایی موثرعلیه هر دو عامل شیگلا و اشرشیا کلی بود. در سال ۲۰۰۵ به منظور افزایش ایمنی زایی مخاطی علیه STxB تلاشی انجام شد که در طی آن پروتئین تخلیص شده STxB را به کمک میکروسفرهای لیپیدی سنتتیک به صورت نازال تلقیح کردند که نتایج آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی را نشان می‌داد(۱۳).

در این راستا در سال ۲۰۰۸ در یک پروژه تحقیقاتی ژن STxB در باکتری E. coli کلون شده و بیان آن بررسی گردید و ایمنی زایی آن صورت پذیرفت که البته ژن این پروتئین به صورت

سـنتتیک بود(۱۴). در یک مطالعه جـداگانه در همیـن سال تلاش برای سـاخت یک واکسن نازال (دماغی) از طـریق خالص‌سـازی پروتئیـن STxB و تلقیـح آن صـورت پذیرفـت. در کل مطالعات نشـان می دهد که بـه خاطر وزن مولکـولی پایین STxB پاسـخ ایمنی ناچیزی علیـه آن دیده می‌شود و این امـر مستلزم استفـاده ادجـوان به STxB را کاملاً شرح می‌دهـد.

از طرفی STxB بـه خـاطر اتصال اختصـاصـی‌اش با گیـرنده Gb3 روی اکثر سـلول‌هـای سرطانـی امروزه برای انتقـال داروهـای ضد سرطان به این سـلول‌هـا و کاهش اثرات سوء شیمی درمـانی توجه دانشمندان زیادی را به خود جلب کرده است.

در اغلـب مطالعـات بیان پروتئین STxB به صورت سـنتتیک در باکتری E. coli از سـویه E. coli BL21 استفاده شـده بود اما استفاده مـا از سـویه E. coli Rosetta DE3 از نظـر بیـانـی بـرای ژن غیر سنتتیک ما بیان بهتری را نشـان داد. ژن غـیر سنتتیک STxB دارای چند کدون نادر می باشـد که فرکانس بیـان کمـی در سویه E. coli BL21 داشـته به همین منظـور ما برای بهینـه‌سازی بیـان و تولـید بیشتر پروتئین غیرسنتتیک از سویه Rosetta DE3 استـفاده کـردیم که دارای بیـان فرکانس بیان بیشتری نسبت به سـویه قبـل بود.

حضـور His-tag در وکتـور pET28a(+) کمک بزرگی برای تخلیص پروتئین با سـتـون نیکل و تایید پروتئین به کمـک وسـترن بلات نمود. با برش آنزیمی در پروتئین تخلـیص شده می توان پروتئـین خالص STxB بدسـت آورد. پروتئین تولیدی پس از تخلیـص برای مطالعات بعدی ما در زمینه ایمن‌سـازی و تولیـد آنتی بادی پلی کلونال مـورد استفاده قـرار گرفت.■

Downloaded from g3m.ir at 5:46 +0330 on Sunday December 17th 2017

References /منـابع

1. Key B, Clemens J and Kotloff. Generic protocol to estimate the burden of shigella diarrhoea and dysenteric mortal. Tex. Book1999. pp 146-151.
2. Swapan Kumar Niyogi. Shigellosis. The Journal of Microbiology 2005; 133-43.
3. Oludare Odumosu, Dequina Nicholas, Hiroshi Yano and William Langridge. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable, Toxins 2010. 2, 1612-45
4. David G. Pina, Ludger Johannes, Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications, Toxicon 2005; 389–93
5. Viel T, Dransart E, Nemati F, Henry E . In vivo tumor targeting by the B-subunit of shiga toxin.2008; 239-47
6. Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, van Effenterre D. Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites. Biol Cell. 2008 Dec;100(12):717-25.
7. Hamid Madanchi, Hossein Honari, Mohammad Sadraeian, Mahdi Hesaraki . Fusion of CtxB with StxB, Cloning and Expression of in Esherichia coli: A challenge for Improvement of Immune Response Against StxB. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Summer 2011: 7(3): 185-190
8. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989
9. Cherla R.P, Lee S.Y and Tesh V.L. "Shiga toxins and apoptosis.FEMS Microbiol". Lett . 2003. 228:159–166.
10. Strockbine N , Jackson M, Sung L, Holmes R, and O'brien A. Cloning and Sequencing of the Genes for Shiga Toxin from Shigella dysenteriae Type 1. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Mar. 1988, P. 1116-122
11. Harari I, Donohue-Rolfe A, Keusch G, And Arnon R. Synthetic Peptides of Shiga Toxin B Subunit Induce Antibodies Which Neutralize Its Biological Activity. INFECTION AND IMMUNITY, June 1988, p. 1618-624
12. Su G et al. High level expression of Shiga toxin B subunit of Shigella dysenteriae serotype 1 in Escherichia coli. Chin J Biotechnol, 1993, 9(1), 49 – 55
13. Kurohane K, Kobayashi C, Imai Y. Facilitated production of secretory IgA against Shiga toxin B subunits by intranasal application of antigen-coated polystyrene microspheres. Microbiol Immunol. 2005;49(2):149-54.
14. Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B, Glenn G, Boedeker EC. Protection against Shiga toxin-producing Escherichia coli infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B. Clin Vaccine Immunol. 2008 Feb;15(2):359-66.

Downloaded from g3m.ir at 5:46 +0330 on Sunday December 17th 2017