

## تولید پروتئین دوگانه EspA-Tir از باکتری اشریشیا کلی O157:H7 در گیاه توتون (*Nicotiana tobaccum*)

حسین ملکی<sup>۱</sup>، علی هاتف سلمانیان<sup>۲\*</sup>، جعفر امانی<sup>۳</sup>، علاء الدین کردنائیج<sup>۴</sup> و محیات جعفری<sup>۵</sup>

۱، کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه شاهد، تهران، ۲، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری،

تهران، ۳، استادیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ۴، استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه

شاهد، تهران، ۵، کارشناس ارشد آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران.

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۰ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۰/۴)

### Production of Bivalent Protein EspA-Tir from *Escherichia coli* O157: H7 in Tobacco (*Nicotiana tobaccum*)

H. MALEKI<sup>1</sup>, A. H. SALMANIAN<sup>2\*</sup>, J. AMANI<sup>3</sup>, A. KORDENAIEJ<sup>4</sup> AND M. JAFARI<sup>5</sup>

1, M.Sc. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran

2, Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and

Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, 3, Assistant Professor, Applied Microbiology Research Center,

Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, 4, Assistant Professor, Department of

Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran, 5, Plant Biotechnology Lab.,

National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran,

(Received: May.10, 2013 - Accepted: Dec.25, 2013)

#### Abstract

*E. coli* O157:H7 is an important zoonotic pathogen that causing severe gastrointestinal disease such as hemorrhagic diarrhea and hemolytic uremic syndrome. The first step of bacterial pathogenicity is, attaching to the host cell. EspA is a protein molecule and forms as filamentous structure that is transiently expressed on the outer membrane surface and interacts with the host cell during the early stage adhesion and forms bacterial biofilm, this filamentous structure make it a strong immunogenic. Tir is bacterial protein that translocated to host cell after expression in the bacteria by type III secretion system (T3SS) and integrated in to host cell membrane. Intimin can attach to the host cell by conducting to Tir. The purpose of this study is constructing bivalent gen which contains virulence factor mention before and transferring in to target plant in order to production edible vaccine against *E. coli* O157:H7. After bioinformatics investigation the two bivalent gen construction (espA-Tir) were attached by peptide linker, and the gens were constructed. After codon optimization based on tobacco; construction were cloned in expression vector which contains CaMV35s promoter. After transformation and regeneration, the expressions of transgenes were showed in analysis.

**Keywords:** Edible vaccine, *E. coli* O157:H7, Tir, EspA

#### چکیده

باکتری *E. coli* O157:H7 یک پاتوژن مهم انسان و حیوان است که در انسان موجب بروز اسهال خونریزی دهنده و سندرم اورمی همولیتیک (HUS) می‌شود. اتصال به سلول‌های میزبان اولین گام در تثبیت این باکتری است که به واسطه سیستم ترشچی نوع III (T3SS) و از طریق میانکش بین پروتئین‌های ترشچی صورت می‌گیرد. در این میان EspA به‌عنوان جزء اصلی تشکیل‌دهنده سیستم ترشچی است و ارتباط تنگاتنگی با اتصال اولیه باکتری به سلول میزبان و تشکیل بیوفیلم باکتریایی دارد. EspA به سبب ساختار خود و قرارگرفتن در غشاء باکتری، یک ایمنی‌زای قوی می‌باشد. Tir نیز پروتئینی است که پس از بیان در باکتری و از طریق T3SS به سلول میزبان منتقل و در غشاء آن مستقر می‌شود و نقش مهمی در اتصال باکتری به میزبان دارد. هدف از این تحقیق ساخت سازه ژنی که دارای فاکتورهای فوق‌الذکر (EspA-Tir) بوده و انتقال آن به درون گیاه هدف می‌باشد. در راستای ساخت واکسن خوراکی کارا بر علیه باکتری اشریشیا کلی O157:H7. پس از بررسی‌های بیوانفورماتیکی سازه ژنی دو قسمتی و espA-tir توسط رابط جداکننده پپتیدی به یکدیگر متصل و ژن آن‌ها به‌طور مصنوعی ساخته شد. پس از بهینه‌سازی کدون‌ها براساس گیاه تنباکو، تحت کنترل پروموتور CaMV35S در ناقل بیانی گیاه کلون گردید. سپس تراریختی و باززایی گیاه تنباکو با آن انجام گرفت. آنالیزهای انجام‌شده مشخص کرد که ژن‌های مربوطه در گیاه موردنظر وارد و بیان می‌گردد.

**واژه‌های کلیدی:** واکسن خوراکی، اشریشیا کلی O157:H7، EspA،

Tir

می‌یابد. EspA جز اصلی TTSS می‌باشد که ارتباط تنگاتنگی با اتصال اولیه باکتری به سلول میزبان و تشکیل بیوفیلم باکتریایی دارد. این پروتئین به صورت پلیمریزه کانالی (پیلی) را ایجاد می‌کند و به عنوان یک رابط در رساندن افکتور پروتئین‌ها به سلول میزبان عمل می‌کند، اینتیمین پروتئینی است که داخل غشای خارجی باکتری قرار دارد و در چسبیدن و اتصال باکتری EHEC به سلول‌های روده میزبان نقش مهمی را بر عهده دارند (Dzivia, 2004; Van Diemen *et al.*, 2005). Tir مولکول باکتریایی است که از طریق TTSS به سلول میزبان انتقال یافته و پس از پردازش روی سطح سلول میزبان آماده دریافت لیگاند خود می‌شود به این ترتیب باکتری با اتصال اینتیمین به Tir روی سطح داخلی اپیتلیوم روده بزرگ میزبان سوار و کلونیزه می‌شود (Potter *et al.*, 2004). با توجه به نقشی که این اجزاء بر عهده دارند، جلوگیری از عملکرد سیستم متصل‌کننده باکتری به میزبان می‌تواند بیماری‌زایی باکتری را در مراحل اولیه متوقف کند. به‌طور کلی واکسن‌های تولیدشده بر علیه این باکتری به صورت تزریقی (McNeilly *et al.*, 2011) و در مطالعات جدید به صورت خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lal *et al.*, 2007). در سیستم‌های جدید تولید و ارائه مواد ایمنی‌زا، واکسن‌های خوراکی<sup>۱</sup> به‌طور عمده شامل اجزایی از گیاهان تراریخت بوده که قادر می‌باشند آنتی‌ژن موردنظر را در بافت‌های خوراکی خود تولید کنند. مزیت عمده استفاده از گیاهان برای تولید آنتی‌ژن‌ها، سالم‌بودن فرآورده حاصل از آن‌ها و عدم آلودگی به بیماری‌زاهای انسانی می‌باشد. یک گیاه ایده‌آل برای تولید واکسن خوراکی باید توانایی تراریخت و باززایی‌شدن را داشته و قابلیت مصرف بخشی از گیاه که حاوی پروتئین نوترکیب است بدون پخته‌شدن میسر باشد (Judge *et al.*, 2004; Amani *et al.*, 2011). در کارهای پیشین، ایمنی‌زای پروتئین سه قسمتی Tir، اینتیمین و EspA در مدل موشی بررسی شد. در ادامه برای پاسخ به این سؤال که آیا می‌توان با به‌کارگیری بخش‌های کوچکتری از آنتی‌ژن (ژن دو قسمتی به جای سه قسمتی) به همان نتیجه دست یافت، گیاه تراریخت حاوی ژن دو قسمتی *espa-tir* ساخته شد. در این تحقیق و در ادامه پژوهش‌های پیشین، سازه ژنی دو قسمتی *espa-tir* که بوسیله رابط جداکننده به یکدیگر متصل شدند در گیاه تنباکو بیان گردید. فرضیه این تحقیق بر این پایه استوار است که با استفاده

## مقدمه

اشریشیا کلی انتروهموراژیک (*Enterohaemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) سویه O157:H7 باکتری گرم منفی است که در روده بزرگ کلونیزه‌شده و به عنوان یکی از پاتوژن‌های انسانی شناخته می‌شود. این باکتری سبب اسهال، روده خونریزی دهنده و حتی مخاطرات جانی ناشی از سندرم اورمی همولیتیک (HUS) می‌شود (Murphy *et al.*, 2007). موارد ابتلا به عفونت با این باکتری، اولین بار از کشورهای غربی گزارش شده است. اما آلودگی به این باکتری محدود به کشور ما نبوده و موارد ابتلا به آن از سراسر جهان از جمله ایران نیز گزارش شده است (Aslani and Bozari, 2003; Shekarforoush *et al.*, 2008). حیوانات مختلفی جدا می‌شوند و مخزن اصلی آن‌ها حیواناتی مانند گاو و گوسفند است. راه انتقال سویه‌های EHEC از طریق آب و غذای آلوده می‌باشد. فرآورده‌های لبنی و گوشتی آلوده این حیوانات، مهم‌ترین منبع آلودگی انسان به خصوص در کشورهای توسعه‌یافته محسوب می‌شود (Clarke, 2001). موارد ابتلا به عفونت باکتری EHEC سویه O157:H7 در سال‌های ۱۹۹۴ تا ۲۰۰۰ در کشورهای غربی تقریباً به دو برابر رسیده است. در بررسی انجام‌شده در کشورهای اروپایی (در سال ۲۰۰۰)، در ۲۸ درصد گوشت‌های گاو آلودگی به این باکتری مشاهده شد (Stevens *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2002). اهمیت اقتصادی دامداری‌ها و امکان انتقال این باکتری به انسان از طریق مصرف فرآورده‌های لبنی و گوشتی آلوده، یافتن روشی موثر برای پیشگیری و کنترل گسترش آلودگی این باکتری در دام‌ها را ضروری ساخته است. اهمیت پیشگیری از آنجا ناشی می‌شود که آنتی‌بیوتیک‌های معمول سبب تشدید بیماری‌زایی این باکتری می‌شوند. از این رو یافتن جایگزین مناسب برای کنترل این عفونت اهمیت بالایی دارد. واکسیناسیون یکی از این روش‌ها می‌باشد. گرچه در حال حاضر هیچ واکسن موفقی که بتواند به صورت بالینی قرار گیرد، وجود ندارد (Fan *et al.*, 2011). از آنجایی که پروتئین‌های کدشده توسط ژن‌های LEE نقش کلیدی در کلونیزه‌شدن EHEC دارند، تلاش‌ها برای تهیه واکسن علیه EHEC بیشتر بر ایمنی‌زایی به وسیله محصولات این ژن‌ها متمرکز بوده است (Stephenson, 1998). EHEC چندین عامل بیماری‌زایی تولید می‌کند که سبب کلونیزه‌شدن آن می‌گردد. بسیاری از این فاکتورها توسط TTSS به سلول میزبان انتقال

غریبالگری کلونی‌ها بر اساس کتب مرجع در روش‌های آزمایشگاهی مولکولی انجام شد (Russel and Sambrook, 2004).

### ساخت و تکثیر از طریق واکنش PCR

از ژن سه قسمتی *espA (eit)*، *tir* و *eae* توسط Amani *et al.* (2009) تهیه و بهینه‌سازی نموده بودند، به عنوان الگو برای ساخت سازه ژنی *espA-tir (et)* استفاده گردید. به منظور جداسازی سازه دو قسمتی با استفاده از نرم‌افزار Oligo 5 آغازگرهای اختصاصی طراحی شد. جهت کلونینگ ژن‌های دوتایی، جایگاه برش برای آنزیم‌های *XbaI* برای انتهای ۵' و *SacI* به همراه توالی اسیدآمیننه KDEL برای انتهای ۳' طراحی گردید. جهت اتصال دو قطعه *espA* و *tir* آغازگر به گونه‌ای طراحی شد تا بتوان از طریق تکنیک SOEing PCR این دو را به یکدیگر متصل کرد پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است. جهت تکثیر قطعات از آنزیم *pfu* DNA polymerase (Fermentas) روسیه) استفاده گردید.

خوراکی از این دو سازه ژنی که در گیاه بیان می‌گردند ایمنی هومورال و مخاطی بر علیه باکتری اشریشیا کلی O157:H7 ایجاد خواهد شد.

### مواد و روش‌ها

آغازگرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار Oligo5 طراحی و از طریق شرکت ژن فن‌آوران (ایران) تهیه گردید *Pfu* DNA polymerase از شرکت Roche (آلمان) و آنزیم *Taq* DNA polymerase، dNTP، آگارز، آنزیم‌های محدودگر، کیت کلونینگ pJET از شرکت Fermentas (روسیه) تهیه شد. هورمون‌های استفاده شده برای تهیه محیط کشت از جمله بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک اسید (NAA) از شرکت Fluka (آلمان) تهیه شد. تمامی روش‌های به کار گرفته شده جهت تهیه آنتی‌بیوتیک‌ها، اندازه‌گیری غلظت DNA، محیط‌های کشت، سلول‌های مستعد، تخلیص و هضم آنزیمی پلاسمید، تخلیص محصول هضم آنزیمی، الحاق قطعه هدف در ناقل،

جدول ۱- طراحی پرایمر برای ساخت سازه ژنی حاوی *espA* و *tir*

Forward <i>espA</i>	5'-TCTAGAGCCACCATGGCTGATATGAAC-3'
Reverse <i>espA</i>	5'-CTTAGCAGCAGCCTCCTTAGCTGC-3'
Forward <i>tir</i>	5'-GAGGCTGCTGCAAAAGAGGCTG-3'
Reverse <i>tir</i>	5'-GAGCTCTCAAAGCTCATCCTTTCCAGC-3'

گردید و آگروباکتریوم‌های حاوی سازه‌های *pBI121-et* و *pBI121-ei* جداسازی گردید.

### انتقال ژن به گیاه و بازرایی آن

برای تهیه ریزنمونه مناسب از گیاه تنباکو ابتدا بذور تنباکو (*Nicotiana tobaccum*) رقم Samsun را ضدعفونی و استریل نموده، سپس جهت کشت، به محیط MS انتقال داده شد. نمونه‌ها در شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در گلخانه قرار گرفتند (Amani *et al.*, 2011). آگروباکتریوم نو ترکیب واجد *pBI121-et* برای تراریخت نمودن ریزنمونه‌های تنباکو استفاده شد. برای این منظور کشت شبانه از آگروباکتریوم تومی‌فایشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) در غلظت مناسب کاناماسین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ریفامپیسین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام شد. باکتری‌های رشد یافته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و به رسوب حاصل مقدار ۱۰-۵ میلی‌لیتر محلول MS استریل بدون قند اضافه گردید تا جذب نوری (OD: Optical Density) آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ برسد. از برگ‌های استریل و

### تهیه سازه ژنی *pBI121-et*

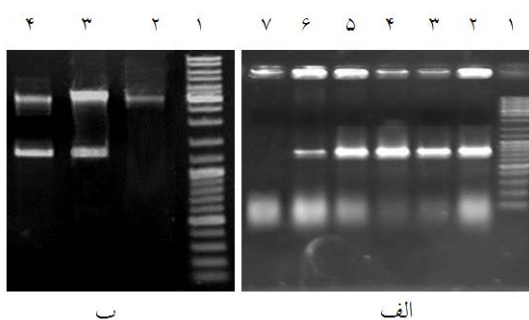
برای تهیه سازه *et* محصول SOEing PCR در ناقل pJET که مخصوص کلون کردن قطعات با انتهای صاف است، استفاده گردید. واکنش اتصال در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. همزمان، ناقل *pBI121* از درون باکتری اشریشیا کلی *DH5α* به روش لیز قلیایی استخراج گردید و هضم آنزیمی آن (*XbaI/SacI*) مطابق با روش استاندارد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ ساعت انجام شد. در این مرحله و با این هضم آنزیمی، ژن گزارشگر بتا گلوکورونیداز (*gus*) به وزن تقریبی ۲۰۰۰ جفت‌باز از بدنه ناقل خارج و بدنه ناقل با استفاده از کیت استخراج از روی ژل آگارز تخلیص شد. قطعه مورد نظر نیز با هضم آنزیمی از ناقل *pJET-et* خارج و با استفاده از ناقل *pBI121* برش خورده واکنش اتصال قطعات انجام گرفت. نتیجه الحاق به درون میزبان اشریشیا کلی منتقل و در شرایط مناسب، کلونی‌های مورد نظر انتخاب گردید. پس از اطمینان از مراحل اتصال، پلاسمید استخراج و به باکتری آگروباکتریوم تومی‌فایشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) منتقل

قطعات را شناسایی می‌کند، نمودار استاندارد پروتئین ET (پروتئین دوگانه EspA و Tir) رسم شد. در ادامه پروتئین تام از گیاه تراریخت استخراج شده و با استفاده از روش برادفورد (Bradford) غلظت آن محاسبه گردید. میزان ۵ میکروگرم از پروتئین تام گیاه تراریخت در پلیت ELISA بارگذاری شد و با استفاده از آنتی‌بادی EIT (Amani et al., 2011) و واکنش ELISA انجام گرفت مقادیر OD به دست آمده از دستگاه ELISA reader را در نمودار استاندارد قرار داده شد و براساس آن میزان غلظت پروتئین نوترکیب ET تولید شده در گیاه محاسبه گردید. این آزمون با سه بار تکرار انجام شد.

### نتایج

#### تکثیر ژن دو قسمتی *et* و کلون آن در ناقل (pJET)

ژن کایمیک سه قسمتی *espA*، *eae* و *tir* با ترجیح کدونی گیاه به‌عنوان الگو (Amani et al., 2011) برای تهیه و تکثیر ژن کایمیک دو قسمتی *espA-tir* با کمک واکنش SOEing PCR تهیه و تکثیر شدند. سپس در ناقل pJET کلون گردید. محصول اتصال از طریق شوک حرارتی به درون سلول مستعد اشریشیا کلی DH5 $\alpha$  انتقال داده شدند. حضور قطعات ژنی موردنظر در کلونی‌های رشدیافته در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک، با استفاده از PCR تأیید شد. سپس استخراج پلاسمید انجام شده و هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های دو سر ژن جهت تأیید کلون‌های مربوطه صورت گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج PCR و هضم آنزیمی سازه ژنی *pJET-et* (الف) محصول کلونی‌PCR برای تأیید حضور سازه *pJET-et* (ستون ۱) نشانگر اندازه DNA (ستون ۲-۶) محصول PCR ژن *et* (ستون ۷) کنترل منفی (ب) محصولات هضم آنزیمی بر روی چند پلاسمید نوترکیب حاوی سازه ژن *pJET-et* (ستون ۱) نشانگر اندازه DNA (ستون‌های ۲-۴) پلاسمید *pJET-et* برش خورده با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI*

جوان یک ماهه تنباکو برش قطعاتی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر تهیه شد و به‌صورت جداگانه به درون سوسپانسیون‌های باکتری انتقال یافتند تا به مدت ۱۰ دقیقه در این شرایط باقی بمانند. پس از آن، ریز نمونه‌ها به محیط هم‌کشتی حاوی هورمون‌های NAA ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و BAP ۲ میلی‌گرم در لیتر انتقال یافتند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. سپس ریزنمونه‌ها برای باززایی به محیط گزینش‌گر با غلظت مناسب کاناماسین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و سفوتاکسیم ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند تا کالوس تولید نمایند. ۱۴ روز بعد از تشکیل کالوس، شاخساره‌ها از کالوس‌ها شروع به باززایی کردند. پس از ظاهر شدن برگ‌های اولیه این جوانه‌ها جهت رشد کامل‌تر به درون شیشه و بر روی همان محیط قبلی انتقال یافتند و در ادامه به‌منظور ریشه‌زایی هورمون‌های BAP و NAA را از محیط کشت حذف و پس از رشد ریشه‌ها، گیاهان به خاک منتقل شدند و در نهایت پس از گل‌دهی بذر دو سری گیاه تراریخت حاصل گردید.

#### تأیید تراریختی گیاهان تنباکو از طریق PCR

استخراج DNA ژنومی دو گروه گیاه تراریخت با استفاده از روش بهینه‌سازی شده استخراج ژنوم از گیاه (Amani et al., 2010) صورت گرفت. با استفاده از DNA ژنومی گیاهان تراریخت و با آغازگرهای اختصاصی ژن مربوطه آزمون PCR انجام و محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### تأیید بیان ژن ساختار ژنی ET در سطح رونویسی از طریق RT-PCR

استخراج RNA تام از گیاه تراریخت به کمک کیت RNX-PLUS (شرکت سیناژن)، صورت گرفت و در ادامه با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Reverse Transcriptase) و آغازگرهای اختصاصی cDNA تک رشته‌ای تهیه شد سپس از روی cDNA تک رشته‌ای با کمک روش PCR، cDNA دو رشته‌ای ساخته شد. نتایج در شکل ۴ قابل مشاهده است.

#### تعیین غلظت پروتئین نوترکیب تولیدشده در گیاه با استفاده از روش ELISA

پروتئین نوترکیب ET (rET) تولید شده در باکتری اشریشیا کلی با استفاده از تکنیک ELISA، بود (Amani et al., 2010) سریال رقت از ۵ میکروگرم تا ۲ نانوگرم تهیه شد و در کف پلیت تثبیت (coat) گردید سپس با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه EIT که قبلاً اثبات شده بود تک تک

قطعه دوگانه دو قسمتی *et* برش خورده با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI*.

#### کشت بافت و تراریختی گیاه تنباکو

از برگ‌های جوان تنباکو (سه هفته‌ای) برای تهیه ریزنمونه جهت انتقال سازه‌های ژنی موردنظر به گیاه استفاده شد. آگروباکتریوم نوترکیب حاوی سازه *et*-pBI121 برای انتقال سازه ژنی استفاده شد و سپس ریز نمونه‌ها به محیط هم‌کشتی حاوی هورمون (به بخش مواد و روش‌ها مراجعه شود) انتقال داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در این محیط نگهداری شد. پس از ظاهر شدن شاخساره‌های اولیه این ریزنمونه‌ها جهت رشد کامل‌تر به درون شیشه‌ها انتقال یافتند در نهایت ۱۰ گیاه رشد کافی نموده و تبدیل به گیاه کامل شدند (شکل ۳).

#### تجزیه و تحلیل مولکولی گیاه تراریخت

##### آزمون PCR به منظور اثبات حضور سازه ژنی در گیاهان تراریخت‌شده

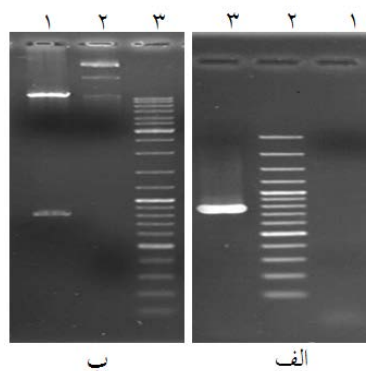
از بافت گیاهان تراریخت حاوی ژن *et* DNA استخراج گردید. با استفاده از این DNA خالص شده واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *et* انجام نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است.

##### بررسی بیان ساختار ژنی ET در سطح رونویسی به روش RT-PCR

RNA تام از بافت گیاهان تراریخت استخراج گردید و از آن به عنوان الگو برای تولید cDNA تک رشته‌ای استفاده گردید. جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از آغازگرهای اختصاصی و آنزیم RT استفاده شد. در ادامه از cDNA تک رشته‌ای عنوان الگو جهت ساخت cDNA دو رشته‌ای استفاده شد. نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است.

#### زیر همسانه‌سازی ژن کایمیریک *et* در ناقل بیانی گیاه، pBI121 و انتقال به داخل آگروباکتریوم

از ناقل pBI121 که دارای پروموتور عمومی CaMV35S می‌باشد جهت بیان ساختار ژنی *et* در کل گیاه صورت گرفت. برای این منظور ناقل pBI121 و ناقل نوترکیب pJET حاوی سازه ژنی با دو آنزیم *XbaI* و *SacI* هضم و پس از خالص‌سازی قطعه مورد نظر واکنش اتصال و عمل انتقال پلاسمید نوترکیب به درون سلول مستعد اشریشیا کلی DH5 $\alpha$  از طریق شوک حرارتی صورت گرفت (شکل ۲). انتقال pBI121 نوترکیب به داخل آگروباکتریوم انجام و حضور سازه‌های ژنی در باکتری‌های نوترکیب از طریق PCR با آغازگرهای اختصاصی ارزیابی و حضور ژن تأیید گردید. مراحل تراریختی و باززایی نیز طبق روش‌های استاندارد (بخش مواد و روش‌ها) انجام شد.



شکل ۲- الگوی الکتروفورز محصول PCR از کلون‌های حاوی قطعه دوگانه دو قسمتی *et* و محصول هضم آنزیمی pBI121 نوترکیب حاوی قطعه دوگانه دو قسمتی *et* با دو آنزیم *XbaI* و *SacI* بر روی ژل آگارز یک درصد. (الف) ستون ۱) کنترل منفی، ستون ۲) نشانگر اندازه DNA، ستون ۳) PCR کلون حاوی قطعه دوگانه مورد نظر. (ب) ستون ۱) نشانگر اندازه DNA ستون ۲) پلاسمید pBI121 برش نخورده ستون ۳) پلاسمید pBI121 حاوی



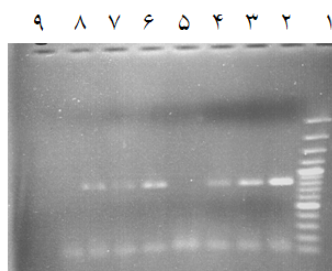
شکل ۳- مراحل انتقال سازه ژنی به گیاهان تنباکو، جداسازی گیاهان تراریخت از غیر تراریخت

### بررسی میزان تولید پروتئین نوترکیب ET در گیاهان تراریخت

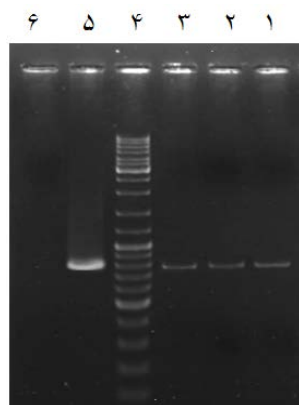
برای بررسی میزان بیان پروتئین نوترکیب ET، از مقدار مشخصی برگ گیاه تراریخت جهت استخراج پروتئین تام استفاده شد و مقدار پروتئین محلول تام (TSP: Total Soluble Protein) به روش برادفورد تعیین گردید. در ادامه ۵ میکروگرم از این پروتئین درون چاهک‌های ELISA تثبیت شد. آنتی‌بادی علیه EIT تولیدشده در مطالعات قبلی (Amani *et al.*, 2010) برای بررسی حضور پروتئین مورد نظر استفاده شد. در این آزمون OD های به دست آمده با نمودار استاندارد ELISA مقایسه گردید. نتایج نشان داد که در بهترین حالت میزان ۰/۸ درصد از کل پروتئین‌های برگ متعلق به پروتئین نوترکیب ET است. نتایج این تجزیه و تحلیل بر روی هفت گیاه انجام شد (شکل ۶).

### بحث

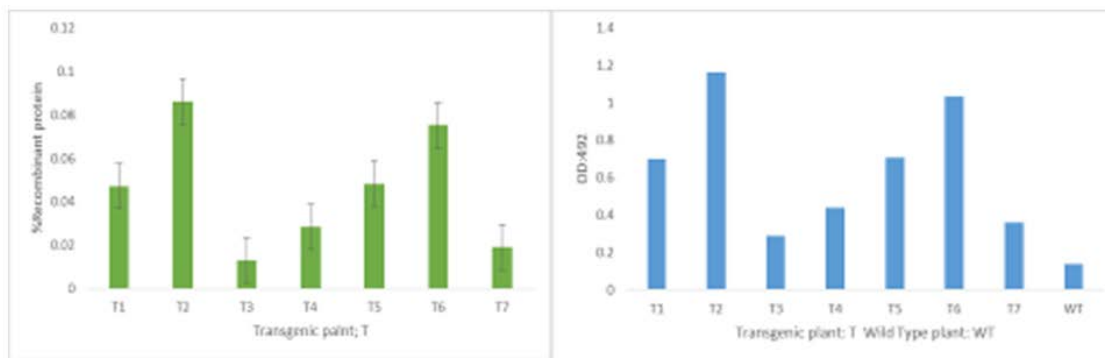
شیوع جهانی EHEC و شدت بیماری‌زای آن و توجه به این نکته که آنتی بیوتیک‌های مرسوم شدت بیماری‌زای آن را افزایش می‌دهند، اهمیت پیشگیری را برجسته می‌سازد. واکسیناسیون یکی از مؤثرترین شیوه‌های پیشگیری از عفونت‌ها می‌باشد. از این رو تلاش‌های زیادی جهت تهیه واکسن علیه EHEC صورت گرفته است. واکسن‌های لیپوپلی ساکریدی (LPS) خطر شدت یافت بیماری را به همراه دارد چرا که آنتی‌بادی تشکیل شده علیه LPS سبب تحریک ترشح شینگاتوکسین توسط EHEC می‌شود. باکتری‌های کشته شده نیز به علت پیچیدگی آنتی‌ژن‌های سطحی اثرات جانبی نامشخصی می‌توانند داشته باشند. همچنین واکسن‌های ضعیف‌شده در کنار مزایای خود در مورد



شکل ۴- الگوی الکتروفورز محصول PCR بر روی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *et* و *ei* بر روی ژل یک درصد. ستون ۱ نشانگر اندازه DNA، ستون ۲ محصول PCR با استفاده از پلاسمید نوترکیب به عنوان کنترل مثبت، ستون ۳-۸ محصول PCR از DNAهای گیاهان تراریخت، واجد ژن *et* (ستون ۹) محصول PCR با استفاده از DNA ژنومی از گیاه غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی می‌باشند.



شکل ۵- محصول واکنش RT-PCR از گیاهان تراریخت: ستون ۱ و ۲ محصول PCR با استفاده از cDNA تک رشته‌ای گیاهان تراریخت، ستون ۳ نشانگر وزن مولکولی (Mix Fermentas)، ستون ۴ محصول PCR با استفاده از پلاسمید حاوی ژن *et* به عنوان الگو (کنترل مثبت)، ستون ۵ محصول PCR با استفاده از cDNA تک رشته‌ای گیاهان غیرتراریخت.



شکل ۶- تعیین میزان پروتئین نوترکیب در برگ گیاه تراریخت توتون به روش ELISA، (الف) مقایسه OD های به دست آمده گیاهان تراریخت و

گیاه غیرتراریخت به عنوان کنترل برای محاسبه غلظت پروتئین نوترکیب، (ب) بررسی میزان بیان پروتئین نوترکیب ET در گیاهان تراریخت، ستون T<sub>1</sub> تا T<sub>7</sub> معرف رده‌های گیاهان تراریخت می‌باشند.

بین Tir و اینتیمین می‌تواند از بروز ضایعات A/E جلوگیری کند. در یک مطالعه تأثیر واکسن خوراکی حاوی EspA، EspB و اینتیمین بر کاهش میزان ریزش اشریشیا کلی O157:H7 در مدفوعی گوسفند بررسی شد. این گزارش نخستین نمونه در هدف قراردادن سیستم ایمنی گوسفند برای کاهش ریزش مدفوعی اشریشیا کلی O157:H7 می‌باشد (Yekta et al., 2011). تحقیقات انجام شده در ایران نشان می‌دهد که می‌توان با بیان قسمت‌های ایمونژن پروتئین‌های EspA، اینتیمین و Tir در گیاهان تراریخت، ایمن‌سازی حیوانات مدل را از طریق خوراکی انجام داد و سبب تحریک ایمنی هومورال (IgG) و مخاطی (IgA) موجود هدف شد (Amani et al., 2011).

نتایج کارهای پیشین کارایی پروتئین کایمیریک سه قسمتی EspA، اینتیمین و Tir در القای ایمنی هومورال و مخاطی در حیوان مدل و از طریق خوراکی نشان می‌دهد (Amani et al., 2011). انتخاب ایمونژن مناسب برای ایمن‌سازی مؤثر اهمیت ویژه‌ای دارد. استفاده از دومین-های ایمونژن یک آنتی‌ژن و ایجاد ایمنی حداکثری اهمیت زیادی دارد. به عبارتی ساختارهای کوچکتر علاوه بر بیان ساده‌تر در گیاه (به سبب فشار متابولیکی کمتر بر گیاه)، عوارض جانبی کمتری در بدن موجود هدف ایجاد می‌کند. از این رو در این بررسی از ساختار سه قسمتی (Amani et al., 2009)، ساختار کایمیریک دو قسمتی et تهیه شد. این تحقیق در ادامه تحقیقات قبلی صورت گرفته است که در آن‌ها اثر پروتئین سه قسمتی EIT و پروتئین دو قسمتی IT در ایجاد پاسخ ایمنی بررسی شد صورت گرفت. به طوری که ابتدا ژن مصنوعی دو قسمتی et که براساس کدون‌های گیاه بهینه‌سازی شده بود درون ناقل pBI121 که واجد پیش‌برنده عمومی CaMV35S می‌باشد؛ زیر همسانه‌سازی گردید و از طریق آگروباکتریوم تومی‌فایشینس‌های تراریخت‌شده به گیاه تنباکو منتقل شد. تراریختی با آگروباکتریوم روشی ساده و ارزان است که کارایی مناسبی دارد (Fan et al., 2012). پیش‌برنده عمومی CaMV35S، متداول‌ترین پیش‌برنده‌ای است که در تحقیقات استفاده شده است. این پیش‌برنده در تمامی مراحل مختلف نموی گیاه و در تمامی اندام‌ها قابلیت فعالیت دارد. به این ترتیب بیان پروتئین تحت تأثیر مراحل نموی آن قرار نمی‌گیرد. تنها حدود ۱/۰ از وزن برگ گیاه تنباکو را پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند از این‌رو این گیاه در بیان

تولید آنتی‌ژن به صورت طبیعی، ممکن است با ارگانسیم‌های رقیب، آنتی‌بیوتیک‌ها و یا پادتن (آنتی‌بادی) های موجود مهار شوند. به علاوه احتمال آلوده‌شدن سایر حیوانات غیرهدف با این ارگانسیم‌ها، امنیت لازم نیز تضمین نمی‌کند. قطع نظر از آنتی‌ژن‌های ارائه‌شده توسط یک واکسن زیر واحدی نوترکیب، شیوه ارائه آن نقش مهمی در ایجاد ایمنی دارد. با توجه به مکانیسم بیماری‌زایی EHEC و ورود آن از طریق سطوح مخاطی روده، ایجاد ایمنی مخاطی (از طریق تحریک تولید IgA) روش مؤثرتری در پیشگیری ارائه می‌نماید. نقش دریافت دهانی واکسن‌ها در ایجاد ایمنی مخاطی در چندین مطالعه اثبات شده است در این میان واکسن‌های خوراکی و مهندسی ژنتیک شده گزینه مناسبی جهت ارائه واکسن به سطوح مخاطی هستند. چراکه سلول‌های گیاهی به صورت میکروکپسول از تخریب پروتئین‌های آنتی‌ژن طی عبور از دستگاه گوارش و پیش از رسیدن به سطوح مخاطی جلوگیری می‌کند.

اولین مرحله در تهیه یک واکسن خوراکی انتخاب آنتی‌ژن‌های کاندید می‌باشد. EHEC چندین فاکتور بیماری‌زایی تولید می‌کند، که عملکرد برخی از آن‌ها به تازگی شناسایی شده است، به طوری که باکتری را قادر می‌سازد در روده بزرگ کلونیزه شود. تیترا بالای آنتی‌بادی ضد EspA، ضد Tir و ضد Initimin در بیماران آلوده به EHEC بیانگر ماهیت ایمونوژنی این فاکتورهای باکتریایی می‌باشد. بسیاری از این عوامل بیماری‌زا از طریق سیستم ترشحی نوع III به سلول میزبان انتقال پیدا می‌کنند. پروتئین EspA بخش اصلی TTSS است که علاوه بر انتقال فاکتورهای باکتریایی از طریق ایجاد یک کانال ارتباطی، در اتصال اولیه باکتری نقشی اساسی دارد. پروتئین Tir یکی از این فاکتورها است که توسط باکتری بیان می‌شود و از طریق TTSS به میزبان انتقال پیدا می‌کند و در غشاء میزبان الحاق می‌شود و به عنوان گیرنده اینتیمین عمل می‌کند. ارتباط Tir و اینتیمین سبب اتصال محکم باکتری به سلول میزبان شروع واکنش پلیمریزه‌شدن اکتین می‌شود. پلیمریزه‌شدن اکتین زیر محل اتصال باکتری تغییر شکل سلول میزبان و بروز علائم تخریبی (A/E) می‌شود. با توجه به نقش EspA، اینتیمین و Tir ایجاد اختلال در عملکرد هر یک از این آنتی‌ژن‌ها می‌تواند از کلونیزه‌شدن باکتری در روده میزبان جلوگیری کند. این نکته اثبات شده است که ایجاد اختلال در میانکنش



پروتئین‌ها چندان مطلوب نیست. در مطالعات مشابه که بر روی یک آنتی‌ژن باکتریایی کار شده است (LTB: Labile toxin beta)، میزان بیان در گیاه تنباکو بین ۰/۴-۰/۱ درصد گزارش شده است (Kang *et al.*, 2004). بهینه‌سازی کدون‌ها بر مبنای گیاه تنباکو و به‌کارگیری ترادف‌های تنظیمی می‌توانند میزان بیان پروتئین نوترکیب را افزایش دهند. علاوه بر این تعداد نسخه‌های وارد شده به گیاه و اثرات مکان الحاق ژن در ژنوم (positional effect) بر میزان بیان پروتئین اثر دارد. از این‌رو به عنوان یک متغیر در میزان بیان پروتئین‌ها باید در نظر گرفته شود. با توجه به با بهینه‌شدن کدون‌ها بر مبنای گیاه توتون و به‌کارگیری ترادف‌های تنظیمی، همان‌گونه که انتظار می‌رفت میزان بیان پروتئین دوگانه ET در برگ گیاه تنباکو مناسب می‌باشد. اما با توجه به نتایج به‌دست آمده در تحقیقات پیشین، بیان

پروتئین نوترکیب ET به میزان ۰/۸۶ درصد کمتر از مقادیر گزارش شده قبلی می‌باشد که مسئله می‌تواند ناشی از اثرات موضعی مکان الحاق یا تعداد نسخه‌های انتقالی باشد. اهمیت میزان بیان بالاتر از آنجا ناشی می‌شود که مقادیر مناسب آنتی‌ژن را می‌توان در حداقل حجم برگ جهت استفاده ایمنی‌زای از طریق خوراکی تأمین نمود. نتایج به‌دست آمده در تحقیقات مختلف نشان داده است که گیاه تنباکو برای بیان تهیه واکسن خوراکی، تنها به‌عنوان یک مدل قابل بررسی است و استفاده از گیاهان دیگر که ارزش غذایی و مطلوبیت خوراکی بهتری دارند، می‌تواند نتایج بهتری داشته باشد. همچنین استفاده از دیگر بافت‌های خوراکی، نظیر دانه و بذر یا میوه نیز برای تهیه واکسن خوراکی را به‌عنوان یک راهکار مناسب در نظر داشت (Lal *et al.*, 2011; Yekta *et al.*, 2007).

## REFERENCES

- Amani J, Kazemi R, Abbasi A, Salmanian AH (2011) A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for PCR analysis. *Iran. J. Biotechnol.* 9(1)
- Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH (2011) Immunogenicity of a plant-derived edible chimeric EspA, Intimin and Tir of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Plant. Sci.* 180: 620-627.
- Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL (2010) Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine.* 28: 6923-9.
- Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH (2009) Theoretical Biology and Medical Modelling. *Theo. Biol. Med. Mode.* 6: 28.
- Aslani MM, Bouzari S (2003) An epidemiological study on Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection among population of northern region of Iran (Mazandaran and Golestan provinces). *Eur. J. Epidemiol.* 18: 345-349.
- Clarke SC (2001) Diarrhogenic *Escherichia coli* - an emerging problem? *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 41: 93-98
- Dzivia, F (2004) Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology.* 150: 3631-3645
- Fan HY, Wang L, Luo J, Long BG. (2011) Protection against *Escherichia coli* O157:H7 challenge by immunization of mice with purified Tir proteins. *Mol. Bio. Rep.* DOI 10.1007/s11033-011-0824-0.
- Fan HY, Wang L, Luo J, Long BG, (2012) Protection against *Escherichia coli* O157:H7 challenge by immunization of mice with purified Tir proteins. *Mol. Biol. Rep.* 39: 989-997.
- Judge NA, Mason HS, O'Brien AD (2004) Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infect. Immun.* 72: 168-175.
- Kang TJ, Han SC, Jang MO, Kang KH, Jang YS, Yang MS (2004) Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117: 175-187.
- Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R (2007) Edible vaccines: current status and future. *Indian. J. Med. Microbiol.* 25: 93-102
- McNeilly TN, Mitchell MC, Nisbet AJ, McAteer S, Erridge C (2011) IgA and IgG antibody responses following systemic immunization of cattle with native H7 flagellin differ in epitope recognition and capacity to neutralise TLR5 signaling. *Vaccine.* 28:1412-1421.



- Murphy M, Buckley JF, Whyte P, O'Mahony M, Anderson W, Wall PG (2007) Surveillance of dairy production holdings supplying raw milk to the farmhouse cheese sector for *Escherichia coli* O157, O26 and O111. *Zoonoses. Publi. Health.* 54: 358-365
- Potter AA, Klashinsky S, Li Y, Frey E, Townsend H, Rogan D (2004) Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine.* 22: 362-369.
- Rao AQ, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Shahid AA, Husnain T (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnol. Adv.* 27:753-763
- Russel D, Sambrook J (2004) *Molecular cloning A laboratory Manual.* edition T, editor. New York
- Shekarforoush S, Tahamtan Y, Pourbakhsh A (2008) Detection and frequency of Stx2 gene in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. *Pak. J. Biol. Sci.* 11: 1085-1092.
- Stephenson J (1998) *E. coli* O157 Vaccine. *JAMA,* 279:818-b
- Stevens MP, Van Diemen PM, Dziva F, Jones PW, Wallis TS (2002) Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. *Microbiology.* 148: 3767-3778.
- Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol. Adv.* 27: 449-467.
- Van Diemen PM (2005). Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H<sub>7</sub> genes required for intestinal colonization in calves. *Infect. Immun.* 73: 1735-1743
- Yekta MA, Goddeeris BM, Vanrompay D, Cox E (2011) Immunization of sheep with a combination of intimin, EspA and EspB decreases *Escherichia coli* O157:H7 shedding. *Vet Immunol. Immunopathol.* 140: 42-46.