مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۹- ۱)

Crop Biotech.
Autumn and Winter (2013) 5: 1-9

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

حسین ملکی[۱]، علی‌هاتف سلمانیان[۲]*، جعفر امانی[۳]، علاء الدین کردنائیج[۴] و محیات جعفری[۵]

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، کارشناس‌ارشد 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 tobbacum*)

H. MALEKI[1], A. H. SALMANIAN[2]*, J. AMANI[3], A. KORDENAIEJ[4] AND M. JAFARI[5]

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)

چکیده

باکتری *E.coli* O157:H7 یک پاتوژن مهم انسان و حیوان است که در انسان موجب بروز اسهال خونریزی دهنده و سندرم اورمی همولتیک (HUS) می‌شود. اتصال به سلول‌های میزبان اولین گام در تثبیت این باکتری است که به‌واسطه سیستم ترشحی نوع III (T3SS) و از طریق میانکش بین پروتئین‌های ترشحی صورت می‌گیرد. در این میان EspA به‌عنوان جزء اصلی تشکیل‌دهنده سیستم ترشحی 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. Tirنیز 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 فوق الذکر (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 پروموتر 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

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

* نویسنده مسئول: علی هاتف سلمانیان
E-mail: salman@nigeb.ac.ir

مقدمه

اشریشیا کلی انتروهموراژیک (*Enterohaemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) سویه O157:H7 باکتری گرم منفی است که در روده بزرگ کلونیزه‌شده و به‌عنوان یکی از پاتوژن‌های انسانی شناخته می‌شود. این باکتری سبب اسهال، روده خونریزی دهنده و حتی مخاطرات جانی ناشی از سندرم اورمی همولتیک (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). این سویه‌ها از 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*., 2002; Murphy *et al*., 2007). 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 آنتی بیوتیک‌های معمول سبب تشدید بیماری‌زایی این باکتری می‌شوند. از این رو یافتن جایگزین مناسب برای کنترل این عفونت اهمیت بالایی دارد. واکسیناسیون یکی از این از روش‌ها می‌باشد. گرچه در حال حاضر هیچ واکسن موفقی که بتواند به‌صورت بالینی قرار گیرد، وجود ندارد (Fan *et al*., 2011). از آنجایی‌که پروتئین‌های کدشده توسط ژن‌های LEE نقش کلیدی در کلونیزه‌شدن EHEC دارند، تلاش‌ها برای تهیه واکسن علیه EHEC بیشتر بر ایمنی‌زایی به‌وسیله محصولات این ژن‌ها متمرکزبوده است (Stephenson, 1998). چندین عامل EHEC بیماری‌زایی تولید می‌کند که سبب کلونیزه‌شدن آن می‌گردد. بسیاری از این فاکتورها توسط TTSS به سلول میزبان انتقال می‌یابد. EspA جز اصلی TTSS می‌باشد که ارتباط تنگاتنگی با اتصال اولیه باکتری به سلول میزبان و تشکیل بیوفیلم باکتریایی دارد. این پروتئین به‌صورت پلیمریزه کانالی (پیلی) را ایجاد می‌کند و به‌عنوان 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. به‌طورکلی واکسن‌های تولیدشده بر علیه این باکتری به صورت تزریقی (McNeilly *et al*., 2011) و در مطالعات جدید به‌صورت خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lal *et al*., 2007). در سیستم‌های جدید تولید و ارائه مواد ایمنی‌زا، واکسن‌های خوراکی[1] 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 عدم‌آلودگی 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

1. Edible Vaccine

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 شرکتRoche (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 به‌کار 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، غربالگری 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 (*eit*) *esp*A، *eae* و *tir* توسط Amani *et al*. (2009) تهیه و بهینه‌سازی نموده بودند، به عنوان الگو برای ساخت سازه ژنی *esp*A-*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 *Xba*I برای انتهای '۵ و *Sac*I به همراه توالی اسیدآمینه 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.

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

Forward espA	5'-TCTAGAGCCACCATGGCTGATATGAAC-3'
Reverse espA	5'-CTTAGCAGCAGCCTCCTTAGCTGC-3'
Forward tir	5'-GAGGCTGCTGCAAAAGAGGCTG-3'
Reverse tir	5'-GAGCTCTCAAAGCTCATCCTTTCCAGC-3'

تهیه سازه ژنی pBI121-*et*

برای تهیه سازه *et* محصول SOEing PCR در ناقل pJET که مخصوص کلون‌کردن قطعات با انتهای صاف است، استفاده گردید. واکنش اتصال در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. همزمان، ناقل pBI121 از درون باکتری اشریشیاکلی DH5α به روش لیز قلیایی استخراج گردید و هضم آنزیمی آن (*Xba*I/*Sac*I) مطابق با روش استاندارد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳ ساعت انجام شد. در این مرحله و با این هضم آنزیمی، ژن گزارشگر بتا گلوکورونیداز (*gus*) به وزن تقریبی ۲۰۰۰جفت‌باز از بدنه ناقل خارج و بدنه ناقل با استفاده از کیت استخراج از روی ژل آگارز تخلیص شد. قطعه موردنظر 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 موردنظر انتخاب گردید. پس از اطمینان از مراحل اتصال، پلاسمید استخراج و به باکتری آگروباکتریوم تومی‌فاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) منتقل گردید و آگروباکتریوم‌های حاوی سازه‌های pBI121-*et* و pBI121-*ei* جداسازی گردید.

انتقال ژن به گیاه و باززایی آن

برای تهیه ریزنمونه مناسب از گیاه تنباکو ابتدا بذور تنباکو (*Nicotiana tobbacum*) 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 نوترکیب واجد pBI121-*et* برای تراریخت نمودن ریزنمونه‌های تنباکو استفاده شد. برای این منظور کشت شبانه از آگروباکتریوم تومی‌فاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) در غلظت مناسب کاناماسین۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ریفامپیسین۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام شد. باکتری‌های رشدیافته 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

جوان یک ماهه تنباکو برش قطعاتی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر تهیه شد و به‌صورت جداگانه به درون سوسپانسیون‌های باکتری انتقال یافتند تا به‌مدت 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 به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. سپس ریزنمونه‌ها برای باززایی به محیط گزینش‌گر با غلظت مناسب کانامایسین 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 ظاهرشدن 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.

تأئید بیان ژن ساختار ژنیET در سطح رونویسی از طریق RT-PCR

استخراج RNA تام از گیاه تراریخت به‌کمک 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.

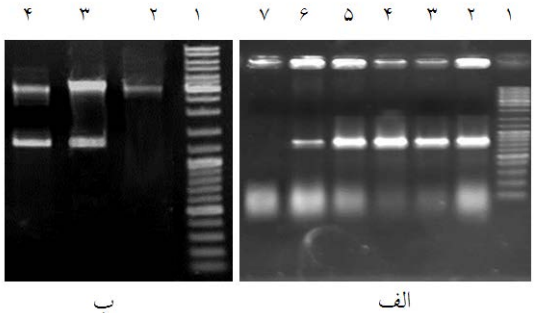
تعیین غلظت پروتئین نوترکیب تولیدشده در گیاه با استفاده از روش ELISA

پروتئین نوترکیب ET (rET) تولید شده در باکتری اشریشیا کلی با استفاده از تکنیک ELISA، بود (Amani *et al.*, 2010) سریال رقت از ۵ میگروگرم 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 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) واکنش ELISA انجام گرفت مقادیر OD به‌دست 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)

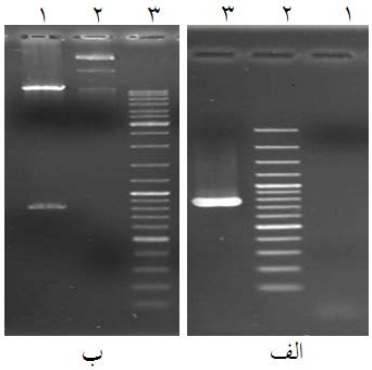
ژن کایمریک سه قسمتی *esp*A ، *eae* و *tir* با ترجیح کدونی گیاه به‌عنوان الگو (Amani *et al.*, 2011) برای تهیه و تکثیر ژن کایمریک دو قسمتی *esp*A-*tir* با کمک واکنش SOEing PCR تهیه و تکثیر شدند. سپس در ناقل pJET کلون گردید. محصول اتصال از طریق شوک حرارتی به درون سلول مستعد اشریشیا کلی DH5α انتقال داده شدند. حضور قطعات ژنی موردنظر در کلونی‌های رشدیافته در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک، با استفاده از PCR تائید 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 *Xba*I و *Sac*I.

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

از ناقل pBI121 که دارای پروموتر 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 *Xba*I و *Sac*I هضم و پس از خالص‌سازی قطعه مورد نظر واکنش اتصال و عمل انتقال پلاسمید نوترکیب به درون سلول مستعد اشریشیا کلی DH5α 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 تائید 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 *Xba*I و *Sac*I 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 قطعه دوگانه دو قسمتی *et* برش خورده با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I.

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 pBI121- *et* 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 به‌مدت ۴۸ ساعت در این محیط نگهداری شد. پس از ظاهرشدن 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).

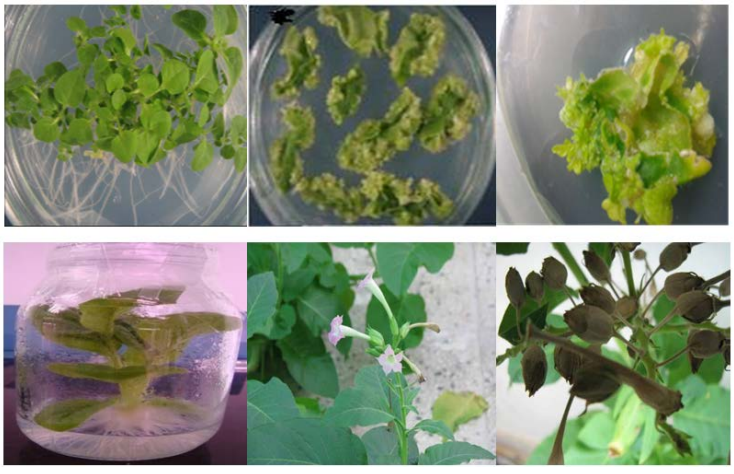
تجزیه و تحلیل مولکولی گیاه تراریخت

آزمون PCR به‌منظور اثبات حضور سازه‌ژنی در گیاهان تراریخت‌شده

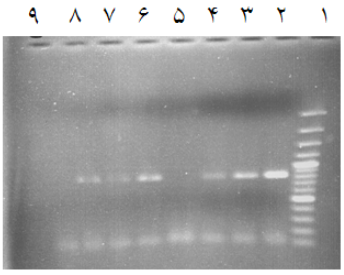
از بافت گیاهان تراریخت حاوی ژن *et*، DNA استخراج گردید. با استفاده از این DNA خالص شده واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *et* انجام نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است.

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

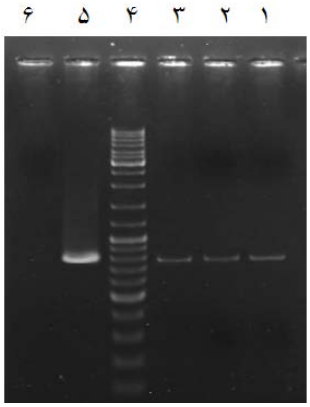
RNAتام از بافت گیاهان تراریخت استخراج گردید و از آن به عنوان الگو برای تولید cDNA تک رشته‌ای استفاده گردید. جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از آغازگرهای اختصاصی و آنزیم RT استفاده شد. در ادامه از cDNA تک رشته‌ای عنوان الگو جهت ساخت cDNA دو رشته‌ای استفاده شد. نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است.



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



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 به‌عنوان کنترل منفی می‌باشند.



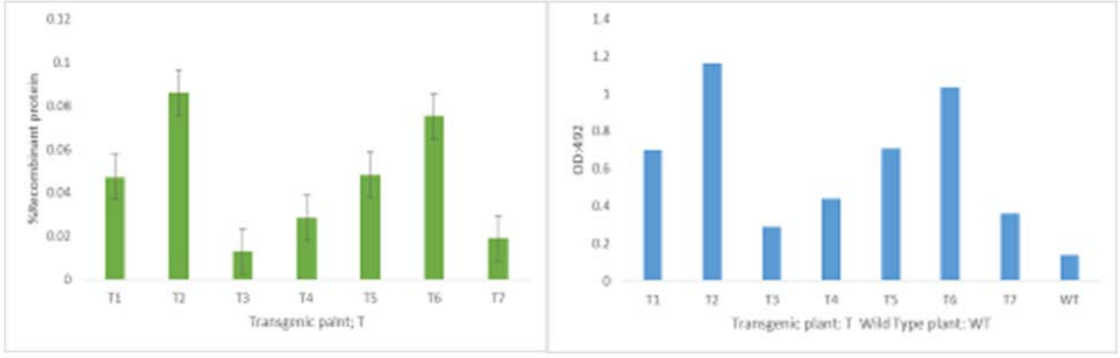
شکل ۵- محصول واکنش RT-PCR از گیاهان تراریخت: ستون ۲،۱ و ۳ محصول PCR با استفاده از cDNA تک رشته‌ای گیاهان تراریخت، ستون ۴) نشانگر وزن مولکولی (Mix Fermentas)، ستون ۵) محصول PCR با استفاده از پلاسمید حاوی ژن *et* به‌عنوان الگو (کنترل مثبت) ، ستون ۶) محصول PCR با استفاده از cDNA تک رشته‌ای گیاهان غیرتراریخت.

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 به‌دست 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 این‌رو 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 تشکیل‌شده علیه LPS سبب تحریک ترشح شیگاتوکسین 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



ب الف

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

گیاه غیرتراریخت به‌عنوان کنترل برای محاسبه غلظت پروتئین نوترکیب. (ب) بررسی میزان بیان پروتئین نوترکیب ET در گیاهان تراریخت، ستون T۱ تا T۷ معرف رده‌های گیاهان تراریخت می‌باشند.

تولید آنتی‌ژن به‌صورت طبیعی، ممکن است با ارگانیسم‌های رقیب، آنتی‌بیوتیک‌ها و یا پادتن (آنتی‌بادی) های موجود مهار شوند. به علاوه احتمال آلوده‌شدن سایر حیوانات غیرهدف با این ارگانیسم‌ها، 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 موثرتری 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، به‌طوری‌که باکتری را قادر می‌سازد در روده بزرگ کلونیزه شود. تیتر بالای آنتی‌بادی ضد EspA، ضد Tir و ضد Initimin در بیماران آلوده به EHEC بیانگر ماهیت ایمونوژنی این افکتورهای 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 افکتورهای باکتریایی از طریق ایجاد یک کانال ارتباطی، در اتصال اولیه باکتری نقشی اساسی دارد. پروتئین Tir یکی از این افکتورها است که توسط باکتری بیان می‌شود و از طریق TTSS به میزبان انتقال پیدا می‌کند و در غشاء میزبان الحاق می‌شود و به‌عنوان 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 ، اینتیمن و Tir ایجاد اختلال در عملکرد هریک از این آنتی‌ژن‌ها می‌تواند از کلونیزه‌شدن باکتری در روده میزبان جلوگیری کند. این نکته اثبات شده است که ایجاد اختلال در میانکنش 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 اشریشیاکلی O157:H7 می‌باشد (Yekta *et al.*, 2011). تحقیقات انجام شده در ایران نشان می‌دهد که می‌توان با بیان قسمت‌های ایمنوژن 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 کایمریک 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 ایمنوژن مناسب برای ایمن‌سازی مؤثر اهمیت ویژه‌ای دارد. استفاده از دومین-های ایمنوژن 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 می کند. از این رو در این بررسی از ساختار سه قسمتی *eit* (Amani *et al.*, 2009)، ساختار کایمریک 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. به‌طوری‌که 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 تومی‌فاشینس‌های 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 ۰/۱از وزن برگ گیاه تنباکو را پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند از این‌رو این گیاه در بیان

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 براین 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 TSP ۰/۸۶درصد 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 (Yekta *et al.*, 2011; Lal *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 schrichia 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) Inglis NF, et al. 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_ 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 intimingamma, EspA and EspB decreases Escherichia coli O157:H7 shedding. Vet Immunol. Immunopathol. 140: 42-46.