DOI: 10.22092/vj.2018.110836.1318
شماره ۱۲۱ زمستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

کلونینگ و بیان ژن *hly*

Listeria monocytogenes در *Lactococcus lactis*

• **معصومه حیاتی**
دانش‌آموخته دکتری تخصصی بیوتکنولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز ،شیراز، ایران
• **سعید حسین زاده (نویسنده مسئول)**
استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
• **محمد طباطبایی**
دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
• **سید محمدحسین حسینی**
استادیار بخش ایمونولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۳-۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۴-۱۷
Email: saeid_hosseinzadeh@yahoo.com

چکیده

ژن *hly* یکی از مهم‌ترین عوامل ویرولانس *Listeria monocytogenes* می‌باشد که پروتئین لیستریولیزین O (LLO) را رمزگذاری می‌کند. LLO یک پروتئین ایمونوژن با قابلیت بالاست، که قادر به برانگیختن ایمنی سلولی و هومورال است و علاوه بر فعالیت همولیتیک، عملکردهای متعدد دیگری نیز دارد. این پروتئین با تخریب فاگولیزوزوم به فرار باکتری از سیتوپلاسم، زنده ماندن و رشد درون سلولی *L. monocytogenes* کمک می کند.از طرفی *Lactococcus lactis* سویه ای از باکتریهای اسید لاکتیک می‌باشد که برای بیان پروتئین‌های نوترکیب کاربرد زیادی دارد. هدف ما در این تحقیق بیان آنتی ژن نوترکیب LLO در سویه *L. lactis* بود.که این کاردر ابتدا با واسطه پلاسمید pTG19-T (وکتور T/A کلونینگ) و سپس با استفاده از پلاسمید pNZ8110 که مربوط به سیستم پلاسمیدهای بیانی ترشحی مختص L. lactis می‌باشد، انجام گردید. ژن *hly*، با طراحی محل برش آنزیم‌های محدودکننده در دو سر ژن، وارد پلاسمید شده و پس از کلونینگ و تکثیر در *E. coli* MC۱۰۶۱ بعنوان میزبان واسط با روش الکتروپوریشن وارد *L. lactis* گردیده و در نهایت پروتئین LLO بیان گردید. بیان این پروتئین با استفاده از روش SDS PAGE و وسترن بلات تایید شد.

کلمات کلیدی: لیستریولیزین، *Lactococcus lactis*، *Listeria monocytogenes*، کلونینگ

● Veterinary Researches & Biological Products No 121 pp: 63-73

Cloning and expression of *Listeria monocytogenes hly* in *Lactococcus lactis*

By: Hayati, M., PhD Student of Biotechnology, Department of Pathobiology ,School of Veterinary Medicine. Shiraz University, Shiraz , Iran. Hosseinzadeh, S., (Corresponding Author) Department of Food Hyggiene and Quality Control , School of Veterinary Medicine. Shiraz University, Shiraz , Iran. Tabatabaei, M., Department of Pathobiology ,School of Veterinary Medicine. Shiraz University, Shiraz , Iran. and Hosseini, S.M.H., Immunology department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch,Agricultural Research ,Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz,Iran.

Received: 2017-05-31 **Accepted: 2018-07-08**

Email: saeid_hosseinzadeh@yahoo.com

The *hly* gene is one of the most important virulence factors of Listeria monocytogenes encoding listeriolysin O (LLO). LLO is a potent immunogenic protein eliciting both cellular and humoral immunity and has manyother functions besides hemolytic activity. This protein mediates the bacterial escape to the cytoplasm by disruption of phagosomal membrane leading to intracellular survival and proliferation of *L. monocytogenes*. On the other hand, *Lactococcus lactis* is a lactic acid bacterium which has many applications in expression of recombinant proteins. Our aim in this study was expression of recombinant LLO in *L. lactis* strain. Initially, the pTG19-T plasmid which is a T/A cloning vectorwas employed and then pNZ8110 was used as a Lactococcal secretional expression plasmid to clone *L. monocytogenese hly* gene by restriction enzymes cutting and ligation method. After cloning and propagation in *E. coli* MC1061 intermediate host, it was electro-transformed into *L. lactis*. Expression of LLO was confirmed by SDS-PAGE and western blot.

Key words: Listeriolysin, *Listeria monocytogenese*, *Lactococcus lactis*, cloning

مقدمه

Listeria monocytogenes، باکتری گرم مثبت درون سلولی اختیاری است که باعث بیماری لیستریوز می‌شود. این بیماری در اثر خوردن موادغذایی آلوده به این باکتری به وجود می‌آید. بیماری لیستریوز عمدتا در افرادی که دارای سیستم ایمنی تضعیف شده یا باردار هستند، عفونت ایجاد می‌کند. این باکتری در حیواناتی نظیر گاو و گوسفند نیز می‌تواند خطر آفرین بوده و باعث سقط جنین شود. همچنین بعنوان یک بیماری زئونوز مطرح می‌گردد (۲۲). Listeria قدرت تهاجم و ورود به سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های هپاتوسیت، فیبروبلاست، سلول‌های اندوتلیال و ماکروفاژها را با مکانیسم منحصر به فرد دارد. قدرت تهاجم Listeria به فاکتورهایی از جمله لیستریولیزین O و اینترنالین A وB بستگی دارد. لیستریولیزین O یک اگزوتوکسین سیتولیتیک و همولیزین غیر آنزیمی وابسته به کلسترول و تیول می‌باشد، که توسط عوامل احیا کننده فعال شده و با عوامل اکسید کننده غیر فعال می‌گردد. فعالیت این توکسین در pH ۵,۵ حداکثر بوده و در شرایط قلیایی کاهش می‌یابد. این پروتیین توسط ژن *hly* کد می‌شود که در ناحیه pathogenicity island LIPI-1 بر روی کروموزوم قرار دارد (۱۲و۱۵و۲۲). لیستریولیزین O (LLO) دارای عملکردهای متعددی می‌باشد، از جمله باعث فرار باکتری از فاگوزوم می‌شود. با تخریب فاگوزوم و رشد درون سیتوزولی باکتری، آنتی‌ژنهای باکتری از طریق MHC I به سلول‌های T cytotoxic عرضه می‌شود (۱۰ و ۱۵). LLO همچنین باعث دفسفریلاسیون هیستون H۳ و داستیلاسیون هیستون H۴ در ابتدای فاز عفونت قبل از ورود به سلول می‌زبان می‌گردد. این عملکرد ارتباطی به فعالیت همولیزینی آن ندارد، بلکه در تنظیم منفی ژن‌های دخیل در پاسخ التهابی نقش دارد. (۷ و ۱۲و ۱۶ و ۲۴). لیستریولیزین دارای وزن مولکولی حدود۵۸۰۰۰ دالتون می‌باشد و مشابه استرپتولیزین و پنومولیزین است (۷ و ۱۴) این پروتئین خاصیت ایمونوژنیسیته داشته و یکی از آنتی‌ژن‌های حفاظت‌کننده‌ای است که در بحث واکسن‌سازی علیه Listeria مورد توجه می‌باشد (۱ و ۵).

از طرفی باکتری‌های لاکتیک اسیدکه اصطلاحا GRAS یا غیر بیماری‌زا (generally regarded as safe) هستندکاندیداهای خوبی برای عرضه مولکول‌های درمانی و یا واکسن‌های پیشگیری‌کننده می‌باشند. *Lactococcus lactis* یکی از این باکتری‌های اسید لاکتیک گرم مثبت می‌باشد که علاوه بر خاصیت پروبیوتیک و کاربرد فراوان در صنایع غذایی و تخمیری، امروزه در بیوتکنولوژی از جمله تولید واکسن‌های نوترکیب مورد توجه قرار گرفته است (۴). عدم بیماری‌زایی، خاصیت پروبیوتیکی و سلامت بخش، ترشح پروتئین‌های خودی کمتر و ظهور پلاسمیدها و ابزارهای مهندسی ژنتیک مخصوص این سویه باعث شده استفاده از باکتری *L. lactis* بعنوان کارخانه تولید یک پروتئین خاص مزایای زیادی داشته باشد (۱۳). اخیرا سیستم‌های بیانی ترشحی القایی

وابسته به نایسین جهت بیان القایی پروتئین‌های نوترکیب در این سویه معرفی شده‌اند. پلاسمید pNZ8110 یکی از این سیستم‌ها می‌باشد (۹ و ۱۷).

در این تحقیق ژن *hly* مربوط به لیستریا با واسطه این پلاسمید در *L. lactis* برای تحقیقات بیشتراز جمله کاربرد در طراحی و ساخت واکسن‌های نوترکیب کلون و بیان شده است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و پلاسمیدهای مورد استفاده

سویه‌های *Lactococcus lactis*، *E. coli* DH5α، *E. coli* MC1061 NZ9000 و پلاسمید pTG19-T و pNZ8110 (شرکت NIZO) بترتیب بعنوان میزبان‌های واسط، میزبان بیانی، وکتور واسط T/A و شاتل وکتور مورد استفاده قرار گرفتند. سویه‌ی *L. lactis* NZ9000 زیرگونه MG1363 می‌باشد که بر روی کروموزوم خود ژن‌های تنظیمی nisRK مربوط به تنظیم بیان پروموتر نایسین را دارد. پلاسمید pNZ8110 حاوی پروموتر نایسین و سیگنال پپتید Usp45 در پایین دست آن می‌باشد. همچنین ژن مقاومت به کلرمفنیکل را دارد. اندازه این پلاسمید ۳۴۵۹ جفت باز است (۱۷).

تکثیر ژن *hly*

استخراج DNA از کشت شبانه *L. monocytogenes* EGD-e با استفاده از کیت DNP ساخت شرکت سیناژن مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. جهت تکثیر ژن *hly* از یک جفت پرایمر اختصاصی مکمل دو سر ژن، بدون توالی سیگنال پپتید همراه با دو توالی اضافی دارای مکان برش آنزیمی استفاده شد (جدول ۱). برای دسترسی به توالی کامل ژن *hly* و طراحی پرایمر به سایت GenBank و NCBI Reference Sequence: NC_003210.1 که مربوط به توالی کامل ژن *hly* سویه *L. monocytogenes* EGD-e می‌باشد، مراجعه شد. با حذف ۷۵ نوکلئوتید اول که مربوط به سیگنال پپتید بود، ۲۲ نوکلوتید بعدی از ناحیه بالا دست ژن و ۲۱ نوکلوتید بصورت مکمل و معکوس از انتهای ژن بترتیب برای پرایمر Forward و Reverse در نظر گرفته شد. همچنین با توجه به مکان‌های برش آنزیمی موجود بر روی وکتور pNZ8110 و پس از بررسی عدم وجود مکان برش آنزیم‌های انتخابی بر روی ژن *hly* با استفاده از نرم افزار NEBcutter، توالی خاص برش آنزیم NaeI در پرایمر Forward و XbaI در پرایمر Reverse طراحی گردید. الیگونوکلئوتیدها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) ساخته و ارسال شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندرف (آلمان) طی ۳۰ سیکل با دمای واسرشت ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه و دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و زمان بسط ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه بعد از مرحله واسرشت ابتدایی و قبل از بسط نهایی انجام شد. اجزای واکنش نیز شامل بافر 10x، dNTP، $MgCl_2$ پرایمر رفت و برگشت، بترتیب با غلظت‌های نهایی 1x، 2mM، 0.5µM از هر کدام و ۱/۵ U آنزیم Taq DNA Polymerase، آب مقطر دیونیزه و DNA الگو بود. برای تعیین دمای بهینه اتصال، آزمایش گرادیان دمایی نیز قبلا انجام شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

کلونینگ محصول PCR در وکتور T-pTG۱۹ و انتقال به *E. coli* DH۵α

محصول PCR با استفاده از کیت T/A کلونینگ ساخت شرکت سیناژن مطابق دستورالعمل کیت، در وکتور pTG19-T کلون شد. در مورد محاسبه میزان وکتور و قطعه PCR نیز مطابق جدول موجود در

جدول۱- پرایمرها و توالی آنها. توالی هایی که در زیر آنها خط کشیده شده است ، مکان شناسایی و برش آنزیمهای محدود کننده NaeI و XbaI می باشد. lonae و loxba بترتیب پرایمرهای رفت و برگشت تکثیر ژن *hly* می باشند، M13-F و M13-R بترتیب پرایمرهای رفت و برگشت مکمل قسمت های کناری کلونینگ سایت در وکتور T-pTG۱۹ (موجود در کیت T/A کلونینگ) و VEC-F و VEC-R بترتیب پرایمرهای رفت و برگشت مکمل قسمت های کناری کلونیتگ سایت و مکان ورود ژن در وکتور pNZ8110 می باشند که با استفاده از نرم افزار Primer۳ طراحی شدند.

پرایمر	توالی -'5'3
lonae	GGGGCGCCGGCGATGCATCTGCATTCAATAAAG
loxba	CGGTCTAGATTATTCGATTGGATTATCTAC
M13-F	AGGGTTTTCCCAGTCACGA
M13-R	GAGCGGATAACAATTTCACA
VEC-F	GCATAATAAACGGCTCTGATTA
VEC-R	AACTGCTGCTTTTTGGCTATCA

دستورالعمل کیت عمل شد. بطور مختصر لازم به ذکر است که مطابق فرمول و نسبت مولی ۱:۳ وکتور به قطعه از آنجایی که اندازه وکتور ۲۸۸۰ جفت باز، قطعه مورد نظر حدود ۱۵۰۰ جفت باز و غلظت وکتور ۲۵ ng/µl بود به ازای ۲ µl وکتور حدود ۷۸ ng از قطعه PCR که با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپ تعیین غلظت شده بود در واکنش لیگاسیون با آنزیم DNA Ligase T۴ موجود در کیت مورد استفاده قرار گرفت. کشت تازه از باکتری *E. coli* DH۵α در محیط کشت LB Broth تهیه شد و با استفاده از کلرید کلسیم ۱۰۰ mM سرد، باکتری competent آماده شد (۱۹) و با روش شوک حرارتی در ۴۲ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، باکتری‌ها با وکتور مذکور ترانسفرم شدند. کلنی‌های سفید بر روی محیط کشت LB Agar حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین به اضافه‌ی IPTG و X-Gal جمع‌آوری شدند و با روش colony PCR با استفاده ازجفت پرایمرهای رفت و برگشت M۱۳ از نظر وجود قطعه مورد نظر (۱۷۲۸ bp) بررسی شدند. کلنی‌های مثبت در محیط LB Broth حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شدند و استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (Bioneer، کره جنوبی) و سپس الکتروفورز صورت گرفت.

کلونینگ ژن *hly* در وکتور بیانی pNZ8110 و ترانسفورماسیون E. coli MC۱۰۶۱

پلاسمید استخراج شده مورد نظر با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده NaeI و XbaI (Jena Bioscience, GmbH)، آلمان برش زده شد.

پس از الکتروفورز و خالص سازی از روی ژل با استفاده از کیت مخصوص استخراج از ژل (Bioneer، کره جنوبی) برای واکنش اتصال با پلاسمید pNZ8110 که توسط دو آنزیم ذکر شده برش خورده و تخلیص شده بود، با در نظر گرفتن میزان وکتور و اندازه آن (حدود ۳/۴ kb) و همچنین میزان و اندازه قطعه الحاقی (insert) (حدود ۱/۵ kb) با نسبت مولی ۳ به ۱ قطعه الحاقی به وکتور با استفاده از فرمول زیر محاسبات انجام شد.

Insert (ng) = ۳×{ insert size(kb)× vector concentration(ng/µl)/ vector size (kb) }

Insert(ng) = ۱٫۳ ×vector concentration(ng/µl)

از آنجایی که غلظت وکتور ۳۹ ng/µl و غلظت قطعه الحاقی ۲۰ ng/µl بود، به ازای هر یک میکرولیتر وکتور نیاز به حدود ۵۰ ng یا ۲/۵ میکرولیتر از قطعه الحاقی بود که در مجاورت آنزیم Ligase T۴ DNA (Vivantis، کره جنوبی) جهت واکنش لیگاسیون، مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تهیه سلول‌پذیرا (competent) از باکتری *E.coli* MC۱۰۶۱ با استفاده از $CaCl_۲$ ۱۰۰ mM، این باکتری‌ها با مخلوط لیگاسیون، با روش شوک حرارتی ۴۲ درجه به مدت یک دقیقه ترانسفرم شدند. کلنی‌های موجود بر روی محیط LB Agar حاوی ۲۰ µg/ml کلرمفنیکل (سیگما ، USA) با روش colony PCR با کمک پرایمرهای رفت و برگشت VEC بررسی شدند. استخراج پلاسمید انجام شد و با روش PCR و برش آنزیمی بررسی و برای تایید به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer (کره جنوبی) فرستاده شد.

انتقال پلاسمید pNZ8110 + *hly* به سویه *L. lactis*

پلاسمید pNZ8110 + *hly* با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن (Biorad، آمریکا) و کووت ۲/. سانتی متر (Biorad، آمریکا) مطابق دستورالعملNIZO (۱۸) جهت ترانسفرم نمودن سویه *L. lactis* NZ۹۰۰۰ بکار گرفته شد. خلاصه این پروتکل عبارتست از کشت باکتری در محیط کشت M۱۷ همراه با گلیسین، شستشو با محلول سوکروز M ۵/. وگلیسرول ۱۰ درصد و سپس الکتروترانسفرم کردن باکتری‌ها با پالس v ۲۰۰۰، µf۲۵ و Ω۲۰۰ و استفاده از محیط کشت M۱۷ + mM۲۰ کلرید منیزیم +mM ۲ کلرید کلسیم. برای احیای باکتری‌ها. پس از دو ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد باکتری‌ها بر روی محیط

جدول۲- نحوه انجام برش آنزیمی pTG19+*hly* و pNZ8110

مقدار	مواد مورد نیاز
۵µl	۱۰ x universal buffer (Jena Bioscience)
۱۰µl	پلاسمید*
۱µl	NaeI
۱µl	XbaI
۳۳µl	ddH۲O

*منظور از پلاسمید ، pTG19+*hly* و pNZ8110 می باشد که هر کدام در مخلوط جداگانه با آنزیمها مجاور شدند.

جامد M۱۷ حاوی µg/ml۱۰ کلرمفنیکل کشت داده شدند. کلنی‌های بدست آمده از نظر وجود پلاسمید همراه با ژن مورد نظر مانند مرحله قبل بررسی شدند. کلنی‌های ترانسفورم شده با پلاسمید و ژن مورد نظر، خالص‌سازی شده و برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب با روش SDS-PAGE و وسترن بلات ارزیابی گردیدند.

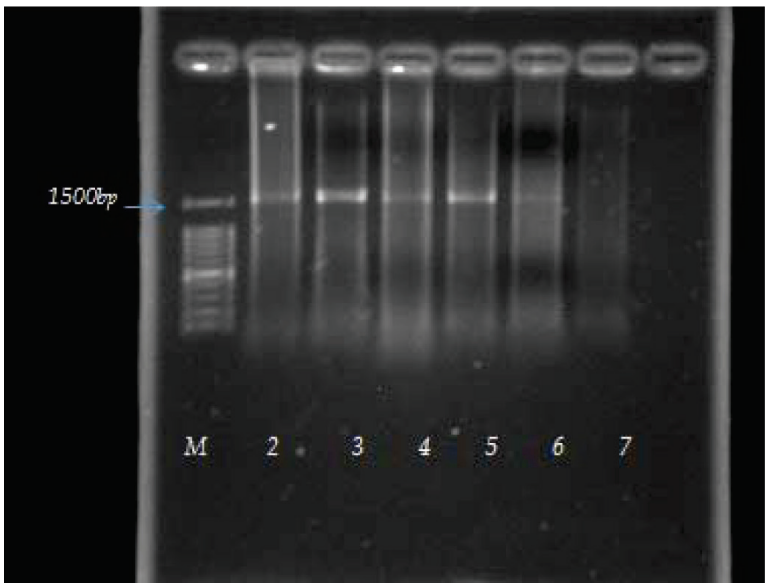
بررسی بیان پروتئین LLO

بدین منظورمطابق دستورالعمل NIZO (۱۸) به کشت فاز تصاعدی باکتری در محیط مایع M۱۷، به میزان ۵ ng/ml ماده القاکننده نایسین (Ultra purenisin A ,Handary ,Belgium) اضافه و حدود دوتا سه ساعت گرمخانه‌گذاری، مایع‌رویی با استفاده از روش رسوب‌گیری TCA (۱) با اضافه کردن ۱۵ درصد حجمی ماده تری کلرو استیک اسید رسوب داده شد و سپس با استون سرد شستشو و با sample buffer قلیایی شامل (۵۰mMTris pH =8, 2%SDS, 100mM DTT 10% glycerol) مخلوط شد و پس از جوشاندن بر روی ژل اس –دی- اس پلی آکریل آمید ۱۲/۵ درصد الکتروفورز گردید و با کوماسی بلو رنگ آمیزی و با اسید استیک ۱۰ درصد رنگ‌بری شد. برای وسترن بلات نیز، باندهای پروتئینی درون ژل قبل از رنگ‌آمیزی به کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند. برای این منظور کاغذ نیتروسلولز ابتدا به اندازه ژل برش و در بافر انتقال مرطوب و در تماس با ژل قرار داده شد به‌طوری که حباب هوا در میان آن‌ها قرار نگیرد. دو عدد کاغذ صافی مرطوب شده در بافر انتقال در دو طرف ژل و کاغذ نیتروسلولز گذاشته شد. این مجموعه بین دو اسفنج مرطوب و لابلای قاب مخصوص دستگاه بطور محکم قرار داده شد و درون بافر در تانک قرار گرفت و جریان ۱۰۰ میلی آمپر به مدت ۳ ساعت برقرار گردید.

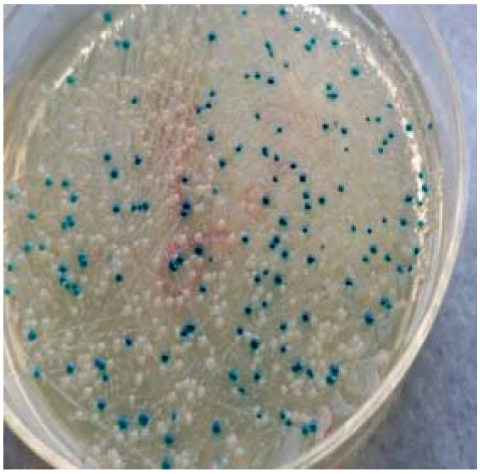
سپس ژل و کاغذ نیتروسلولز خارج شده و ژل به منظور مشاهده انتقال باندها رنگ‌آمیزی و کاغذ نیتروسلولز پس از بلاک نمودن با آلبومین سرم گاوی ۱ درصد به مدت یک شب، به ترتیب با آنتی‌بادی‌های اولیه پلی کلونال خرگوشی علیه لیستریولیزین O (شرکتAbcam، آمریکا) با رقت ۱/۱۰۰۰ در بافر PBS به مدت سه ساعت بر روی شیکر و سه بار شستشو با بافر PBS+Tween و سپس با آنتی‌بادی ثانویه ضد IgG خرگوش کونژوگه با پراکسید (HRP Sigma، آمریکا) با رقت ۱/۴۰۰۰ در بافر PBS به مدت دو ساعت بر روی شیکر وپس از سه بار شستشو، اضافه نمودن سوبسترا (پراکسید هیدروژن) و کروموژن (دی آمینو بنزیدین ۱۰mg) به مدت ۵ دقیقه تیمار شدند. سپس کاغذ نیتروسلولز چندین بار با آب مقطر شستشو و ظهور باندها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

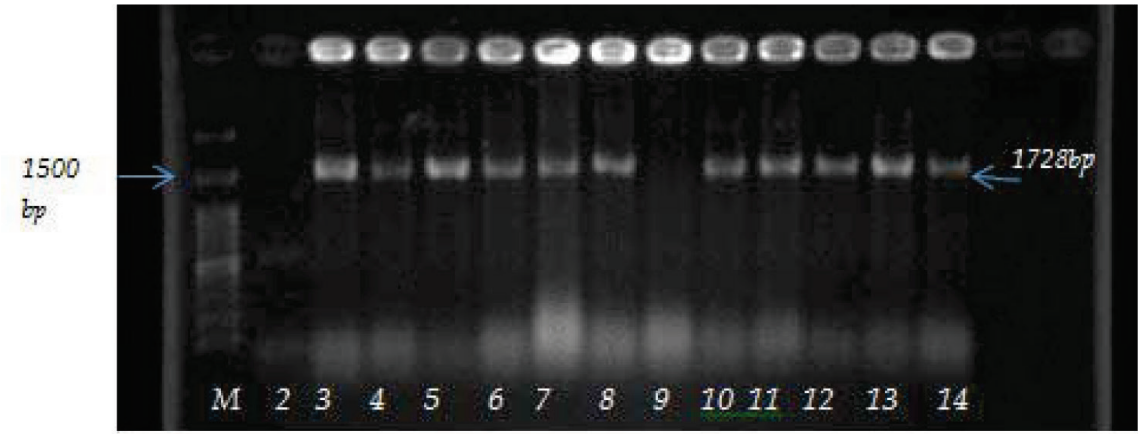
نتایج آزمایش گرادیان دمایی نشان داد که دمای بهینه اتصال پرایمر



شکل۱- نتایج گرادیان دمایی جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمر در آزمایش PCR برای تکثیر ژن *hly*. سمت چپ تصویر لدر ۱۰۰bp DNA ladder RTU, Cat. No.PR901644 (شرکت سیناژن ، ایران) شامل ۱۱ باند ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ pb می باشد.چاهک دوم تا هفتم الکتروفورز محصول PCR در دماهای اتصال مختلف به ترتیب شامل ۵۴، ۵۵، ۵۶، ۵۷، ۵۸ و ۵۹ C^{o} را نشان می دهد. محصول PCR شامل باند ۱۵۳۵ bp است که در ردیفهای ۲ تا ۶ دیده می شود.



شکل۲- کلنی های سفید آبی *E. coli* DHαα بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آمپی سیلین ، X-Gal و IPTG پس از ترانسفورماسیون با پلاسمید pTG19+*hly*



شکل ۳- نتایج کلنی PCR با استفاده از پرایمر M13 . کلنی های مثبت باند bp1728 را نشان میدهند. سمت چپ چاهک اول (M) تصویرمارکر یا لدر ۱۰۰ bp Plus DNA ladder RTU ,Cat. No.PR911653 (شرکت سیناژن ، ایران) شامل ۱۲ باند ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰bp می‌باشد. چاهک شماره ۲ کنترل منفی واکنش PCR، چاهک‌های شماره ۲ تا ۸ و ۱۰ تا ۱۲ نتایج PCR کلنی‌های مثبت *E. coli* DHαα ترانسفرم شده با پلاسمید pTG19+*hly* که باند bp ۱۷۲۸ را نشان می‌دهند. و چاهک ۹ کلنی منفی از نظر ترانسفورماسیون را نشان می‌دهد.

جهت تکثیر ژن *hly*، حدود ۵۵ درجه سانتی‌گراد بود که در شکل ۱ در چاهک سوم مشاهده می‌گردد. محصول PCR شامل باندی حدود ۱۵۳۵ جفت باز بود که ۱۵۱۵ جفت باز آن مربوط به ژن *hly* و حدود ۲۰ جفت باز مربوط به توالی‌های کناری موجود در پرایمرهاست.

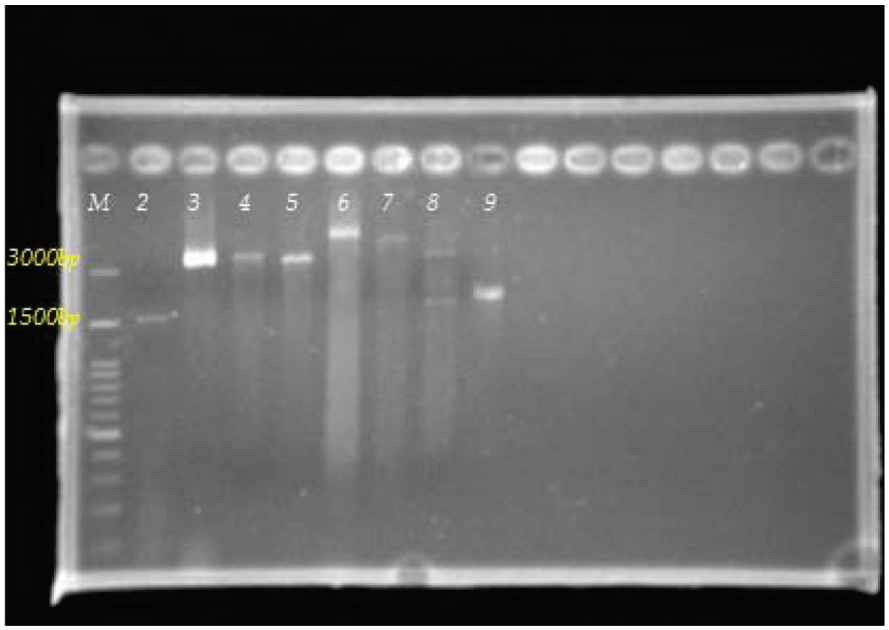
نتایج کلنی PCR، کلنی‌های سفید موجود بر روی پلیت (شکل ۲) با استفاده از پرایمر M۱۳ پس از کلونینگ اولیه موفقیت آمیز ژن در پلاسمید pTG19-T در مرحله اولیه کلونینگ در شکل ۳ نشان داده شده است.

نتایج کلنی PCR، اندازه پلاسمیدهای استخراج شده و اندازه قطعات ایجاد شده بر اثر برش‌های آنزیمی پلاسمیدها با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده NaeI و XbaI تاییدی بر کلونینگ ژن بود (شکل ۴).

بررسی فایل chromatogram در برنامه Chromas و آنالیز نتایج تعیین توالی ژن وارد شده در پلاسمید همراه با توالی‌های کناری آن که توسط شرکت Bioneer انجام شده، تاییدی بر صحت کلونینگ و قاب خوانش بود. مجموعه نتایج BLASTn در پایگاه NCBI وجود ژن مورد نظر را در قطعه کلون شده نشان می‌داد. علاوه بر انجام Alignment در NCBI، با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit و MEGA۷ توالی قطعات سکانس شده با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت VEC-F و VEC-R مربوط به پلاسمید در نواحی کنار قطعه کلون شده و همچنین پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده برای قسمت‌های مختلف میانی ژن، مورد بررسی قرار گرفته و توالی‌ها مقایسه، همتراز و مرتب شدند. نتایج مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن کلون شده در پایگاه NCBI همخوانی ۱۰۰ درصد با ژن مورد نظر در ۲۹ سویه لیستریا مونوسیتوژنز ثبت شده در بانک ژنی را نشان داد.

ترجمه توالی نوکلئوتیدی مورد نظر به پروتئین با استفاده از ExPASy translate tool و بررسی ORF و کدون‌های stop قاب خوانش صحیح را در frame۱ مورد نظر نشان می‌داد. این توالی پروتئین شامل ۲۹ اسید آمینه متشکل از اسیدهای آمینه MAKKKIISAILMSTVILSAAAPLSGVYAG مربوط به سیگنال پپتید USP۴۵ و بلافاصله توالی ژن در قاب خوانش صحیح شامل ۵۰۴ اسید آمینه را نشان می‌داد. مقایسه توالی مربوط به سیگنال پپتید، ۹۶ درصد مشابهت با پروتئین پیشساز USP۴۵ لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس MG1363 با Accession number ABY۸۴۳۵۷,۱ با تفاوت در یک اسید آمینه (اضافه شدن اسید آمینه الانین) را نشان داد.

نتایج SDS-PAGE وجود چند باند از جمله باند بین ۵۰ تا ۶۰ کیلو دالتون را نشان می‌داد (شکل ۵). مشاهده باند اختصاصی در آزمایش وسترن بلات تاییدی بر بیان پروتئین نوترکیب لیستریولیزین O بود که پس از القا توسط نایسین در مایع‌رویی محیط کشت *L. lactis* ترانسفرم



شکل ۴- الکتروفورز ژل آگاروز در کنار لدر bp Plus DNA ladder RTU ۱۰۰(شرکت سیناژن ، ایران) (چاهک اول، سمت چپ). در چاهک دوم به بعد بترتیب محصول PCR ژن *hly* (۱۵۳۵bp)، پلاسمید pNZ8110 (bp3459)، پلاسمید pNZ8110 در مجاورت یکی از آنزیمهای محدودگر و بعدی در مجاورت دو آنزیم ، پلاسمید pNZ 8110+*hly* (bp4932)، برش آن با یک و دو آنزیم و محصول colony PCR سویه های ترانسفورم شده با استفاده از پرایمرهای VEC(bp1801).

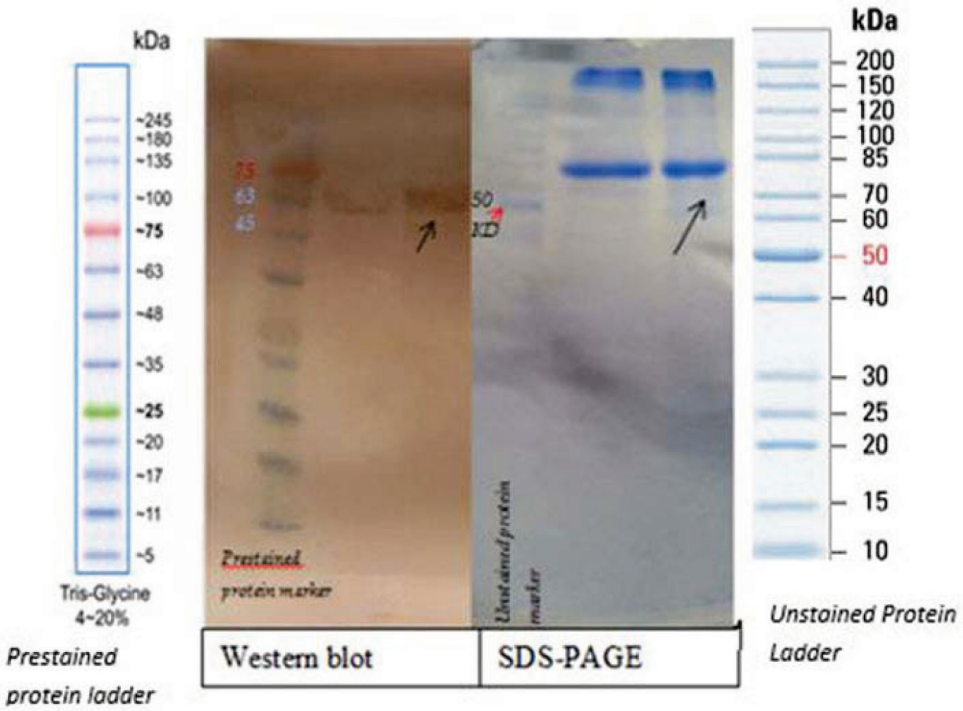
شده ترشح شده بود.

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری *L. monocytogenes* عامل بیماری لیستریوز با درصد مرگ و میر ۲۰ تا ۳۰ درصد در انسان می‌باشد. سقط جنین و مننژیت نوزادان از عوارض این بیماری محسوب می‌شود. بعلت اینکه بیماری بیشتر در افراد دارای سیستم ایمنی تضعیف شده خطرناک است واکسیناسیون جامع علیه لیستریا وجود ندارد. اما تحقیقاتی برای بررسی آنتی‌ژن‌های محافظت‌کننده این باکتری و تولید واکسن علیه این باکتری انجام شده است (۲۰، ۲۲). لستریولیزین O عمده‌ترین فاکتور بیماری‌زایی در Listeria می‌باشد. این پروتئین با کلسترول دیواره واکوئل واکنش داده و در دیواره فاگولیزوزوم سوراخ ایجاد و آنرا تخریب می‌نماید و به فرار باکتری از سیتوپلاسم، زنده ماندن و رشد درون سلولی Listeria کمک می‌کند (۱۲ و ۲۱).

از آنجایی که لیستریولیزین یک آنتی‌ژن ایمونوژنیک موثر در تحریک ایمنی هومورال و سلولی می‌باشد، دانشمندان طی مطالعاتی ژن لیستریولیزین را با هدف بررسی ایمنی‌زایی آن کلون نموده‌اند (۲ و ۳ و ۸). ایجاد ایمنی محافظت‌کننده علیه چالش با Listeria تا حدی در مدل موشی با کلون‌های این ژن موثر بوده است (۱ و ۵ و ۲۰).

از طرفی باکتری *L. monocytogenes* بعلت اینکه قادر به ورود و رشد درون سلولی است و در نتیجه می‌تواند ایمنی سلولی را تحریک کند، توجه محققین را اخیرا به خود جلب کرده است، مخصوصا در زمینه واکسن‌سازی که از این باکتری به شکل تخفیف حدت‌یافته بعنوان وکتور در تهیه واکسن‌های نوترکیب استفاده می‌شود. وجود تحقیقاتی در زمینه تولید واکسن علیه سرطان، ایدز، هپاتیت، انفلوانزا، نیوکاسل، لیشمانیا ماژورو سایر بیماری‌هایی که مخصوصاً برانگیخته شدن سیستم ایمنی سلولي، دارای اهمیت است، با استفاده از این باکتری قابل اشاره می‌باشد (۲،۳،۱۱،۲۳). بطور مثال Xu و همکارانش از سویه تخفیف حدت یافته *L. monocytogenes* برای تهیه واکسن نوترکیب



شکل۵.سمت راست، ژل SDS-PAGE رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو که مایع رویی کشت *L. lactis* نوترکیب همراه با مارکر پروتئینی page Ruler Unstained Protein Ladder, 26614 (Thermo Scientific, USA) که تصویر و اندازه باندهای آن بر اساس KD در سمت راست تصویر SDS-PAGE نشان داده شده است را نشان می دهد. باند KD ۵۰ به صورت باند پررنگتر و با علامت پیکان قرمز رنگ بر روی مارکر در شکل مشخص شده که این باند بین باندهای ۴۰ و ۶۰ KD می باشد.سمت چپ، نتایج وسترن بلات بر روی کاغذ نیتروسلولز را نشان میدهد با این تفاوت که این بار از مارکر پروتئینی از پیش رنگ شده (BLUelfprestained protein ladder GeneDireX، تایوان)استفاده شده است که تصویر و اندازه باندهای آن بر اساس KD در سمت چپ تصویر وسترن بلات نشان داده شده است.باند KD ۷۵ به رنگ قرمز و باند های ۶۳ و ۴۵ KD به رنگهای آبی در کنار مارکر نوشته شده است.وجود باند پروتئینی بین ۵۰ تا ۶۰ کیلو دالتون موید وجود این پروتئین نوترکیب در باکتری *L. lactis* می باشد که با علامت پیکان سیاه رنگ مشخص شده است.

علیه ویروس نیوکاسل استفاده نمودند (۲۳).

عده‌ای از محققین نیز به جای استفاده از باکتری تخفیف حدت‌یافته لیستریا، با کلون نمودن ژن *hly* که عامل عمده موثر در زنده مانی باکتری درون سلول بوده، در سایر باکتری‌ها مخصوصاً باکتری‌های غیر بیماری‌زا بعنوان وکتوری برای تهیه واکسن‌های نوترکیب جهت عرضه آنتی‌ژن‌های نوترکیب همراه با این آنتی‌ژن لیستریولیزین به MHC کلاس I و تحریک سلول‌های CD8 + Tcell پیشنهاد داده‌اند زیرا از نظر تئوری، LLO می‌تواند به سایر آنتی‌ژن‌های همراهش برای ورود به مسیر سیتوپلاسمی عرضه آنتی‌ژن کمک کند. تحقیقاتی در این زمینه با استفاده از میزبان‌های باکتریایی از جمله *Bacillus anthrasis* تخفیف حدت‌یافته، *E. coli*، *Bacillus indicus*، *Bacillus subtilis* و *Mycobacterium bovis* انجام شده است که نتایج این تحقیقات کم و بیش تحریک سلول‌های ایمنی T سایتوتوکسیک و ایجاد ایمنی سلولی و در مواردی سرکوب سلول‌های سرطانی را نشان داده است (۱، ۳، ۸، ۱۰، ۱۱، ۲۰).

امروزه گزارشات متعددی از کاربرد باکتری‌ها به عنوان کاندیدای واکسن از جمله سالمونلا و لیستریا یا باکتری‌های غیربیماری‌زا از جمله لاکتوکوکوس وجود دارد. این باکتری‌های پاتوژن و غیرپاتوژن بعنوان حاملان واکسن هر کدام دارای معایب و مزایای خاصی هستند. استفاده از باکتری‌های مولد اسید لاکتیک برای انتقال اجزای یک پاتوژن نسبت به استفاده از خود پاتوژن تخفیف حدت‌یافته کمتر مورد استفاده قرار گرفته است. به علت ویژگی غیر بیماری‌زا بودن، داشتن عوارض جانبی کمتر و دسترسی به ابزار ژنتیکی برای بیان ژن‌ها در باکتری‌های اسید لاکتیک، این باکتری‌ها بعنوان حامل واکسن مورد توجه قرار گرفته‌اند. بعلاوه غیر بیماری‌زا بودن باعث می‌شود که نیازی به صرف هزینه و زمان برای ساختن سویه‌های تخفیف حدت‌یافته باکتری‌های بیماری‌زا نباشد. اما از طرف دیگر این سویه‌ها قدرت تهاجم به سلول‌ها را ندارند و انتقال آنتی ژن‌ها به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن ممکن است تاثیر کمتری نسبت به باکتری‌های مهاجم داشته باشد (۶). با کلون نمودن ژن *hly*در این سویه‌ها احتمالاً بتوان وکتورهای مؤثرتری برای بیان سایر آنتی‌ژن‌های پاتوژن‌ها و در نهایت تحریک پاسخ ایمنی سلولی بهتری ایجاد کرد (۱، ۳، ۱۱).

از طرفی NICE- NIsin-Controlled gene Expression system یک سیستم بیانی مختص باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. پلاسمیدهای مختلفی با استفاده از این سیستم برای بیان پروتئین بصورت درون سلولی و یا ترشحی ساخته شده و بصورت تجارتی در دسترس می‌باشند. یکی از این پلاسمیدها، پلاسمید pNZ8110 می‌باشد. در همه این پلاسمیدها پروموتر نایسین وجود دارد. نایسین یک پپتید ضدمیکروبی جزو خانواده لانتی‌بیوتیک‌هاست که می‌تواند پروموتر خودش یعنی nisA را با استفاده از دو سیستم تنظیمی متشکل از هیستیدین پروتئین کیناز (NisK) و تنظیم‌کننده پاسخ (NisR) القا نماید (۱۷). مزایای استفاده از این سیستم شامل عدم تولید پروتئین مورد نظر در شرایط غیر القایی، میزان بیان بیشتر بسته به نایسین اضافه شده می‌باشد. مزیت دیگر آن اینست که پروتئین تولیدشده می‌تواند تا ۶۰ درصد پروتئین کل سلول برسد. استفاده از این سیستم القایی در *L. lactis* موفقیت‌آمیز می‌باشد (۱۳، ۱۷). از این باکتری در تهیه واکسن نوترکیب استفاده‌های زیادی شده است (۴، ۱۳، ۱۷). استفاده از میزبان *L. lactis* برای بیان پروتئین لیستریولیزین O، تنها توسط بهی‌الدین و همکارانش در آمریکا انجام شده است. آنها با استفاده از پلاسمیدهای pQE30 و pNZ8048 و بکارگیری تکنیک SOEژن لیستریولیزین را به ترتیب در میزبان واسط *E. coli* BL۲۱ و میزبان بیانی *L. lactis* وارد نمودند. این محققین یکبار ژن *hly* را به تنهایی و بار دیگر همراه با ژن مربوط به آنتی‌ژن P۶۰ مربوط به لیستریاکلون نمودند و اثر آن را بعنوان واکسن علیه لیستریا بر روی موش‌ها بررسی کردند. نتایج آنان ایجاد ایمنی محافظت‌کننده تنها از طریق تزریق درون صفاقی را نشان می‌داد (۱ ، ۲ ، ۳).

تفاوت تحقیق حاضر، نسبت به تحقیق بهی‌الدین استفاده از پلاسمیدها و آنزیم‌های برشی متفاوت و عدم نیاز به انجام Overlap PCR و تکنیک SOE بود.

جداسازی LLO از کشت Listeria عمدتا بعلت کم بودن آن در محیط کشت نیز کاری دشوار است (۸ و ۲۴). لذا یکی از اهداف دیگر کلونینگ این ژن با افزایش بیان آن برای جداسازی و خالص‌سازی راحت‌تر آن می‌باشد که می‌توان از این لیستریولیزین جهت تحقیقات پایه‌ای و شناسایی ساختمان و عملکرد، خواص و کاربردهای آن مانند خاصیت ادجوانسیتی آن در تعدیل سیستم ایمنی و سرکوب سلول‌های تومری و همچنین تهیه آنتی‌بادی علیه آن استفاده نمود (۲۴، ۲۱، ۸). علاوه بر این موارد، با کلون نمودن و بیان این ژن در باکتری‌های خارج سلولی، مخصوصاً باکتری‌های غیر بیماری‌زای لاکتیک اسید (پروبیوتیک)، دیگر نیازی به ایجاد سویه‌های تخفیف حدت‌یافته لیستریا یا سایر باکتری‌های درون سلولی نیست و بعلاوه می‌توان قدرت ورود و تکثیر باکتری را در سلول‌های یوکاریوتی و ماکروفاژها بررسی نمود. در صورت بدست آمدن این خصوصیت و بررسی عدم پاتوژنیسیته می‌توان آن‌را کاندیدی برای تحقیقات بعدی جهت تولید واکسن‌های نوترکیب که نیاز به تحریک ایمنی سلولی دارند، با کلونینگ و بیان همزمان این آنتی‌ژن و آنتی‌ژن‌های دیگر، علاوه بر ایجاد ایمنی جزئی علیه عفونت Listeria بعنوان وکتور واکسن و یا وکتور داروی خاص در نظر گرفت.

مادر این تحقیق توانستیم ژن *hly* را پس از T/A کلونینگ واسط در وکتور pTG19-T جهت آسانتر شدن و حصول اطمینان از برش آنزیمی و خالص‌سازی آن از روی ژل در وکتور بیانی-ترشحی pNZ8110 کلون نماییم. سپس با ترانسفرم نمودن *E.coli* MC۱۰۶۱ که بعنوان باکتری واسط در پلاسمیدهای بیانی وابسته به نایسین معرفی شده است، این پلاسمید را تکثیر و پس از خالص‌سازی وارد باکتری هدف یعنی *L. lactis* نموده و پس از القا، ترشح LLO را با روش وسترن بلات تایید کنیم. این یک تحقیق پایه‌ای بوده و زمینه‌ای برای تحقیقات بعدی فراهم می‌کند. هدف ما از این تحقیق بررسی‌های بعدی جهت برآورد قدرت ایمنی‌زایی این سویه نوترکیب علیه Listeria و تحقیقات بیشتر بر روی خواص عملکردی این کلون، ارزیابی قدرت رشد درون سلولی و توانایی تحریک ایمنی سلولی جهت استفاده از آن بعنوان وکتور واکسن برای طراحی واکسن‌های نوترکیب علیه انفلوانزا، نیوکاسل و سایر بیماری‌هایی که ایمنی سلولی در مهار و پیشگیری از آن‌ها نقش مهمی دارد می‌باشد. این تحقیق که شامل کلون کردن ژن لیستریولیزین در باکتری پروبیوتیک

لاکتوکوکوس لاکتیس می‌باشد در کشور ما برای اولین بار صورت گرفته است و تحقیقات بعدی برای استفاده از آن بعنوان وکتور واکسن‌های نوترکیب ادامه دارد.

منابع مورد استفاده

1-Bahey-El-Din, M., P. G. Casey , B.T. Griffin and C.G.M. Gahan. 2008. *Lactococcus lactis*-expressing listeriolysin O (LLO) provides protection and specific CD8(+) T cells against *Listeria monocytogenes* in the murine infection model. *Vaccine* 26 (41): 5304-14.

2-Bahey-El Din, M., C.G.M. Gahan and B.T. Griffin. 2010a. *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. *Current Gene Therapy* 10, 34-45.

3-Bahey El Din M., P. G. Casey, B.T. Griffin and C.G.M. Gahan. 2010b. Expression of two *Listeria monocytogenes* antigens (P60 and LLO) in *Lactococcus lactis* and examination for use as live vaccine vectors. *Journal of Medical Microbiology* 20, 59 (Pt 8): 904-12.

4-Bermudez-Humaran, L.G. 2009. *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins, *Human Vaccines,* 5:4, 264-267.

5-Cornell, K.A. et al.,1999. Genetic immunization of mice against *Listeria monocytogenes* using plasmid DNA encoding listeriolysin O. *Journal of Immunology* 163 : 322-329.

6-del Rio, B., J. F. M .L.Seegers and M.Gomes-Solecki. 2010. Immune response to *Lactobacillus plantarum* expressing *Borrelia burgdorferi* OspA is modulated by the lipid modification of the antigen. *PLoS ONE* 5(6): e11199.

7-Dramsi, S. and P. Cossart. 2002. Listeriolysin O a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *Journal of Cell Biology* 18, 156(6): 943–946.

8-Giammarini, C. and F. Andreoni. 2004 . Purification and characterization of a recombinant listeriolysin O expressed in *Eschrichia coli* and possible diagnostic applications. *Journal of Biotechnology* 109: 13-20.

9-Henrich, B., J.R. Klein, B. Weber, C. Delorm, P. Renault and U. Wegmann. 2002. Food grade delivery system for controlled gene expression in Lactococcuslactis. *Applied & Environmental Microbiology*, 68 (11) :5429-5436.

10-Huang, J.M., R.M. LaRagione, W.A. Cooley, S.Todry and S.M., Cutting. 2008 . Cytoplasmic delivery of antigens by Bacillus subtilis enhances Th1 responses. *Vaccine* 26 . 6043-6052.

11-Johnston, C., A.O. Coffey, J.M. Mahonyand R.D. Sleator. 2009. Development of a novel oral vaccine against *Mycobacterium avium* paratuberculosis and Johnẻs disease. *Bioengineered Bugs* 1:2, 1-8.

12-Kayal, S. and A. Charbit. 2006. Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 4: 514-529.

13-Kunji, E.R., D.J. Slotboom and B. Poolman. 2003. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochimistry Biophysic Acta* 1610, 97-108.

14-Lety, M.A., C. Frehel, C. Raynaud, M. Dupuis and A. Charbit. 2006. Exploring the role of the CTL epitope region of listeriolysin O in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes. Microbiology*152: 1287-96.

15-Leimeister-Wachter, M. and T. Chakraborty 1989. Detection of listeriolysin, thethiol dependent hemolysin in *Listeria monocytogenes , Listeria ivanovii,* and *Listeria seeligeri*. *Infection and Immunity* 57: 2350-2357.

16-Meyer-Morse, N. et al ., 2010. Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection. *Journal PLoS ONE* 5(1).

17-Mierau, I., and M. Kleerebezem. 2005. 10 years of nisin controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

18-NIZO food research BV. MoBiTec Molecular Biotechnology. 2010. NICE Expression System for *Lactococcus lactis*. Available online at: www.yrgene.com/documents/vector/nice.pdf.

19-Sambrook, J., and D.W. Russel. 2001. Molecular cloning.Third edition. New York , USA Cold Spring Harbor Laboratory Press.

20- Sirard, J.C., C. Fayolle, D.C. Chastollier, M. Mock, C. Leclerc and P. Borche. 1997 .Intracytoplasmic delivery of listeriolysin O by a vaccinal strain of *Bacillus indicus* CD8+ mediated protection against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Immunology* 159(9). 4435-43.

21- Stachowiak, R., M. Lyzniak, M. Grabowska, K. Roeske, T. Jagielski, J. Bielecki, et al. 2014. Cytotoxicity of purified listeroplysin O on mouse and human leukocytes and leukemia cells. BMC Biotechnology .14 (77).

22- Vázquez-Boland,J.A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Gustavo Domínguez-Bernal, et al.,2001. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology* Review 14(3): 584–640.

23- Xu, J.J et al., 2006. Characterization of a recombinant *Listeria monocytogenes* strain containing the fusion protein gene of newcastle disease virus. *Acta Microbiologica Sinica* 43 (3) :445-450.

24- Yin, Y.L., X.A. Jiao, Z.M. Pan, X.M. Zhang and Z.Q. Gu. 2004. Prokaryotic expression and bioactivity of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O. *Acta Microbiologica Sinica* 44(6) : 752-755.