Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:22 +0330 on Tuesday September 26th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(85): 67-75

Production and purification of enzymatic region of s*treptococcal* Hyaluronidase in E.coli

Mirjamali Mehrabadi NA[1], Soufian S[2], Abtahi H[3*]

1- Department of Microbiology, science and research branch, Islamic Azad University, Arak branch, Arak, Iran.
2- Department of Biology, Payame Noor University, Arak, Iran.
3- Molecular and Medicine Research Center, Department of Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Received: 11 March 2014, Accepted: 7 May 2014

Abstract

Background: *Streptococcus pyogenes* produce extracellular hyaluronidase enzyme which is directly associated with the spreading of the organism during infection. Hyaluronidase enzyme is able to break hyaluronic acid or interstitial cement. This enzyme might be used in cancer treatment.The objective of the present study was to clone and express the nucleotide sequence of this enzyme which is involved in hyaluronidase enzymatic activity.

Materials and Methods: The enzymatic region of *hyaluronidase* gene was detected by bioinformatics methods. The polymerase chain reaction method was used to amplify the region. The amplified product was cloned into the expression vector *pET32a*. *E. coli* BL21 (DE3) pLYsS was transformed with recombinant plasmids. Then gene expression was induced by IPTG. The expressed protein was purified successfully via affinity chromatography by NiNTA kit. The integrity of the product was confirmed by western-blot analysis.

Results: The nucleotide sequence of amplified gene was consistent with the streptocuccal hyaluronidase gene. The concentration of recombinant protein calculated to 500 mg purified protein per liter. The enzymatic region of recombinant protein from *Streptococcus pyogenes* was recognized by all five patient's sera with Streptococcus infection.

Conclusion: In general, it is possible to produce the enzymatic regions of the *Streptococcus pyogenes* hyaluronidase in *Escherichia coli*. The antigenic property of the produced protein is well retained. Considering the product's domestic demand and also low efficiency of production and pathogenicity of Streptococcus species, it is possible to produce it as recombinant product.

Keywords: Cloning, Gene Expression, Hyaluronidase, *Streptococcus pyogenes*.

*Corresponding author:
Address: Department of Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Email: abtahi@arakmu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:22 +0330 on Tuesday September 26th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 17، شماره 4 (شماره پیاپی 85)، تیر 1393، 75-67

تولید و تخلیص نواحی آنزیمی هیالورونیداز استرپتوکوک در باکتری اشریشیا کلی

نفیسه السادات میرجمالی مهرآبادی[1]، صفیه صوفیان[2]، حمید ابطحی[3*]

1- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک، اراک، ایران.
2- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور اراک، اراک، ایران.
3- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه میکروب شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

تاریخ دریافت: 92/12/20 تاریخ پذیرش: 93/2/17

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوکوس پیوژنز آنزیم هیالورونیداز خارج سلولی تولید می‌کند که با انتشار ارگانیسم در طول عفونت ارتباط مستقیم دارد. آنزیم هیالورونیداز قادر به تجزیه هیالورونیک اسید یا سیمان بین بافتی می‌باشد. از این آنزیم میتوان در درمان سرطان‌ها استفاده نمود. هدف از تحقیق حاضر کلون کردن و بیان توالی نوکلئوتیدی که در فعالیت آنزیمی هیالورونیداز نقش دارد، می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا توالی نوکلئوتیدی از ژن هیالورونیداز که در فعالیت آنزیمی دخیل است، شناسایی گردید. سپس ناحیه مورد نظر توسط PCR تکثیر یافت. قطعه تکثیر یافته در وکتور pET32a الحاق شد. پلاسمید نوترکیب به سلول *E.coli* BL21-DE3-plysS ترانسفورم گردید. سپس بیان ژن به وسیله IPTG القا گردید. پروتئین تولید شده با روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از کیت Ni-NTA تخلیص گردید. برای تایید پروتئین تولید شده از تست وسترن بلات استفاده گردید.

یافته‌ها: ترادف نوکلئوتیدی ژن تکثیر شده با ژن هیالورونیداز استرپتوکوکوس پیوژن یکسان بود. غلظت پروتئین تولیدشده و خالص شده با کیت Ni- NTA برابر 500 میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. سرم بیماران مبتلا به عفونت‌های استرپتوکوکی در روش وسترن بلات با پروتئین تولید شده واکنش داد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی تولید نواحی آنزیمی هیالورونیداز استرپتوکوک پیوژنز در باکتری اشریشیاکلی امکان پذیر می‌باشد. پروتئین تولید شده خاصیت آنتی ژنیک خود را به خوبی حفظ می‌کند. با توجه به نیاز داخلی کشور و هم‌چنین بازدهی کم تولید و بیماری زا بودن استرپتوکوک‌ها تولید این محصول به صورت نوترکیب امکان پذیر است.

واژگان کلیدی: کلونینگ، بیان ژن، هیالورونیداز، استرپتوکوک پیوژنز

[*]**نویسنده مسئول:** اراک، میدان بسیج، پردیس دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی پزشکی
Email:abtahi@arakmu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:22 +0330 on Tuesday September 26th 2017

مقدمه

استرپتوکوک همولیتیک گروه A باکتری‌های کروی شکل گرم مثبت هستند که به صورت زنجیر مانند به دنبال هم قرار می‌گیرند، طول این زنجیرها در چرک و محیط جامد نسبتاً کوتاه است ولی در محیط مایع بلند می‌باشد. استرپتوکوک‌های متعلق به گروه A لنسفیلدی عامل بسیاری از عفونت‌های چرکی در انسان می‌باشند(1، 2). مهم‌ترین عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها در انسان شامل: سلولیت، لنفانژیت، گلو درد چرکی، باد سرخ و زرد زخم است. علاوه بر این، استرپتوکوکوس پیوژنز باعث بروز عوارض دیررس چرکی در انسان می‌شوند(3). تب روماتیسمی و گلومرولونفریت دو عارضه مهم ناشی از بروز عفونت استرپتوکوک‌های گروه A در انسان است. تشخیص عفونت‌های استرپتوکوکی بر دو پایه کشت (جداسازی باکتری) و تست‌های سرولوژیک است. استرپتوکوکوس پیوژنزها تعدادی از فاکتورهای بیماری‌زا با خاصیت آنتی ژنی تولید می‌کنند. بعضی از آنها تحت عنوان فاکتورهای انتشار نام دارند. از جمله این فاکتورها هیالورونات لیاز خارج سلولی می‌باشد(4، 5).

اسید هیالورونیک که ماده زمینه‌ای مهم در بافت همبند محسوب می‌شود و با عنوان سیمان بین بافتی شناخته می‌شود با اثر آنزیم هیالورونیداز این باکتری تجزیه می‌شود. لذا هیالورونیداز در تهاجم استرپتوکوک چرک زا، نقش موثری داشته و یکی از عوامل موثر در بیماریزایی این باکتری محسوب می‌شود(6، 7). آنزیم هیالورونیداز را می‌توان در درمان برخی بیماری‌ها استفاده کرد. در سال 1928 به اولین استفاده درمانی این آنزیم به عنوان فاکتور انتشاردهنده اشاره شد، به این صورت که تزریق زیرجلدی آن باعث افزایش نفوذ زیرجلدی واکسن‌ها و توکسین‌ها می‌گردد(8). از لحاظ درمانی این آنزیم همراه با داروهای بیهوش کننده موضعی و داروهای تسکین دهنده درد استفاده می‌شود(9، 10). هم‌چنین هیالورونیداز با تشدید نفوذ داروهای ضد سرطان (با استفاده از فعالیت انتشار دهندگی) تومورهای مقاوم نسبت به شیمی درمانی را نسبت به درمان حساس‌تر می‌کند(11). کاربرد دیگر هیالورونیداز در تشخیص عفونت می‌باشد. این آنزیم به وسیله یک آنتی بادی اختصاصی (آنتی هیالورونیداز) در سرم انسان مهار می‌شود. این آنتی بادی چندین هفته بعد از آغاز عفونت استرپتوکوکی گسترش می‌یابد، بعد از فروکش کردن التهاب هم‌چنان باقی می‌ماند، در بخش گاما- گلوبولین سرم پدیدار می‌شود و به طور اختصاصی هیالورونیداز استرپتوکوک‌های گروه A را خنثی می‌کند(12). تحقیقات نشان می‌دهد که تولید نوترکیب آنزیم هیالورونیداز به علت بزرگی ملکول آن بازده مناسبی ندارد. در عین حال به علت اهمیت دارویی این آنزیم تولید آن همواره مورد توجه بوده است.

لذا در این تحقیق سعی شده است با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک ناحیه آنزیمی ژن هیالورونیداز که در فعالیت آنزیمی هیالورونیداز نقش دارد را شناسایی نماییم، سپس با القای ژن در باکتری اشریشیاکلی (Escheriohia cili-E.coli) ناحیه مورد نظر تولید کردد. هدف از این تحقیق بیان و تولید بخش پروتئینی نوترکیب دخیل در فعالیت آنزیمی آنزیم هیالورونیداز در باکتری اشریشیاکلی است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر یک مطاله تجربی می‌باشد. این مطالعه با کد اخلاقی 12-5-88 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک به تصویب رسیده است.

کلیه آنزیم‌های استفاده شده در این پژوهش از شرکت سیناژن (ایران) و مواد شیمیایی از شرکت مرک(آلمان) تهیه گردید. هم‌چنین در این تحقیق از آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین وکلرامفنیکل(سیگما، آمریکا) استفاده شد.

تعیین توالی دخیل در عملکرد آنزیمی

توالی ژن هیالورونیداز با شماره دسترسی EU078690.1 که2607 جفت باز و 869 اسید آمینه دارد از بانک ژنی NCBI تهیه شد. سپس با استفاده از نرم

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:22 +0330 on Tuesday September 26th 2017

افزارهای بیوانفورماتیکی Emboss Antigenic، ABCpred و Bcepred فاصله نوکلئوتیدی 519 تا 1815 به عنوان ناحیه دارای با قدرت آنزیمی تعیین گردید. در نهایت با استفاده از نرم افزار Oligo5 پرایمرهای مناسب طراحی گردید. در این مرحله از آنالیزهای کامپیوتری توسط برنامه Blast استفاده شد.

با توجه به توالی 1296 نوکلئوتیدی تعیین شده پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شدند. پرایمر رفت (5'ATGGGATCCATGTATGAACACGCT3') شامل ناحیه *BamHI* و پرایمر برگشت (5'AACAAGCTTTATTTTGTTTCCTAAGAT A3') شامل ناحیه *HindIII* است (ترادف آنزیم‌ها با زیر خط مشخص شده‌اند).

جداسازی و تخلیص DNA

برای تخلیص کروموزوم استرپتوکوکوس پایوژنز از سویه PTCC 1447 (آزمایشگاه رفرانس) استفاده شد. اساس تخلیص با استفاده از روش CTAB/ NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا باکتری در محیط مولر هینتون براث کشت داده شد، سپس به مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سانتریفوژ سوسپانسیون کشت باکتری، رسوب به دست آمده در بافر TE حل گردید. باکتری‌ها با استفاده از آنزیم لیزوزیم و سپس با اثر SDS وآنزیم پروتئیناز K لیز شدند. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/ NaCl استخراج گردید. پروتئین‌ها و سایر اجزای سلولی با استفاده از مخلوط فنل/ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل و سانتریفیوژ حذف گردید. DNA به دست آمده با استفاده از یک حجم ایزوپروپانول رسوب داده شد و پس از شستشو با اتانول 70 درصد در بافر TE حل گردید.

تکثیر ژن

تکثیر ژن هیالورونیداز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم 25 میکرولیتر انجام شد. غلظت عوامل PCR شامل 500 نانو گرم از DNA الگو، 1 میلی مولار از هر پرایمر، 1/5 میلی‌مولار از یون منیزیوم، 200 میلی‌مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5 واحد از آنزیم DNA پلیمراز Taq و بافر PCR با غلظت 1 برابر بود. برنامهPCR استفاده شده به صورت: مرحله اول حرارت اولیه در 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه (یک چرخه)، مرحله دوم PCR متشکل از 30 چرخه که هر یک از سه قسمت تشکیل شده: قسمت اول واسرشت کردن (95 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (50 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و 30 ثانیه)، و در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و برای یک چرخه بود. بررسی نهایی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز 1 درصد در بافر تریس- اسید بوریک- EDTA (TBE با pH: 8) انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید ومشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص (Roche، آلمان) بر اساس دستورالعمل آن انجام شد.

کلونینگ ژن در ناقل پلاسمیدی

برای کلون سازی ژن هیالورونیداز A در پلاسمید pET32a (Novagene، آمریکا) به این ترتیب عمل گردید: ابتدا محصول PCR با آنزیم‌های *Bam*HI و *HindIII* برش داده وسپس در ناقلین مورد نظر که با همان آنزیم‌ها بریده شده بودند، وارد شد. عمل اتصال ژن هیالورونیداز در این پلاسمیدها با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 در حرارت 22 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام گرفت. پلاسمید pET32a -hylA به ترتیب در سلول‌های مستعد اشریشیا کلی سویه DH5α (پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، ایران) و سویه BL21- DE3-plySs (پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، ایران) وارد شد. برای تایید کلونینگ ژن hylA، از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن و برش آنزیمی استفاده شد. برای انجام واکنش برش آنزیمی پس از مخلوط کردن بافر، DNA پلاسمیدی و آنزیم‌های *BamHI*

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:22 +0330 on Tuesday September 26th 2017

و *HindIII* به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اتمام این زمان برای اطمینان از عمل هضم 5 میکرولیتر از مخلوط در کنار مارکر با استفاده از ژل آگارز، الکتروفورز شد.

برای تائید صحت ترادف نوکلئوتیدی ژن به دست آمده از محصول PCR، ساختار پلاسمیدی pET32a - hylA به باکتری اشریشیا کلی سویه DH5α وارد گردید. پس از آن جهت تعیین ترادف به شرکت MWG آلمان ارسال شد. ترادف نوکلئوتیدی محصول PCR با استفاده از روش سنگر (Sanger) تعیین شد.

تولید پروتئین

برای تولید ناحیه آنزیمی پروتیین HylA، باکتری‌های اشریشیا کلی تراریخت شده با پلاسمید pET32a- hylA در محیط نوترین براث کشت داده و در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با حداقل 170 دور در دقیقه قرار داده شد. پس از این که تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید (OD=0/6)، از محلول یک مولار IPTG (isopropylthio-β-galactoside) به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی IPTG به یک میلی‌مولار برسد. چهار ساعت پس از افزودن IPTG، رسوب باکتری‌ها با سانتریفیوژ در 4000 دور در دقیقه به مدت نیم ساعت جمع‌آوری شد. برای بررسی نتیجه القاء ازروش الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE استفاده گردید.

تخلیص پروتئین با استفاده از کیت Ni-NTA براساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری گردید. کیفیت آن نیز با استفاده از روش الکتروفورز پروتئین بر روی ژل 12 درصد SDS-PAGE بررسی گردید.

برای تائید صحت پروتئین تولید شده و تعیین ویژگی آنتی‌ژنتیک آن از آزمون وسترن بلات استفاده شد. برای این منظور از سرم پنج بیمار مبتلا به گلو درد چرکی استرپتوکوکی که از نظر پزشک و آزمایشات سرولوژی تایید شده بود، استفاده گردید. آزمون وسترن بلات به این صورت انجام شد: پس از الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری‌های القاء یافته بر روی ژل 12 درصد SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به دست آمده به کاغذ PVDF (polyvinylidene difluoride) (Roche، آلمان) منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری 25 میلی‌مولار تریس، 192 میلی‌مولار گلایسین و 20 درصد متانول به مدت یک و نیم ساعت و در شدت جریان 90 ولت انجام گرفت. مرحله مسدود سازی کاغذ PVDF با قرار دادن کاغذ در بافر بلوکه کننده (حاوی یک درصد آلبومین گاوی) به مدت یک ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدودسازی، کاغذ PVDF به مدت دو ساعت در مجاورت سرم بیماران و یک نمونه سرم فرد سالم قرار داده شد. پس از 2 ساعت انکوباسیون با نمونه‌های سرم، نوارهای کاغذ PVDF سه مرتبه با بافر TBS- T (شامل 15 NaCl میلی‌مولار، 10Tris- HCl میلی‌مولار با pH: 7/4، tween20 0/1 در صد) شستشو داده شد و به مدت یک و نیم ساعت با آنتی بادی ضد موش متصل با پراکسیداز 1/500 انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها با بافر TBS-T، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ PVDF، کاغذ مزبور در محلول دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت(12).

یافته ها

ناحیه دارای خاصیت آنزیمی

توالی آمینواسیدی 173 تا 605 به عنوان تاثیرگذارترین بخش پروتئین در فعالیت آنزیمی آن شناخته شد. قطعه ژنی مرتبط با این بخش پروتئینی از توالی 519 تا توالی 1815 ژن آنزیم هیالورونیداز بود. ترادف پروتئینی استفاده شده در شکل 1 آمده است.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:22 +0330 on Tuesday September 26th 2017

Fmyehaynldrenhqttgkenkenwwdyeigtprainntlslmypyftqeeilkytapiekfvpd
ptrfrvraanfppfeansgnlidmgrvklisgilrkddleisdtikaiekvftlvdegngfyqdgslidh
vvtnaqsplykkgiaytgaygnvlidglsqlipiiqktkspieadkmatiyhwinhsffpiivrgem
mdmtrgrsisrfnaqshvagiealrailriadmseephrlalktriktlvtqgnvfynvydnlktyhdi
klmkellsdtsvpvqkldsyvasfnsmdklalynnkhdfafglsmfsnrtqnyeamnnenlhgw
ftsdgmfylynndlghysenywatvnpyrlpgtteteqkplegtpeniktnyqqvgmtslsddafv
askklnntsalaamtftnwnksltlnkgwfil

شکل 1. توالی آمینواسیدی بخش موثر در فعالیت آنزیمی آنزیم هیالورونیداز استرپتوکوکوس پیوژنز (توالی 173 تا 605).

تکثیر DNA

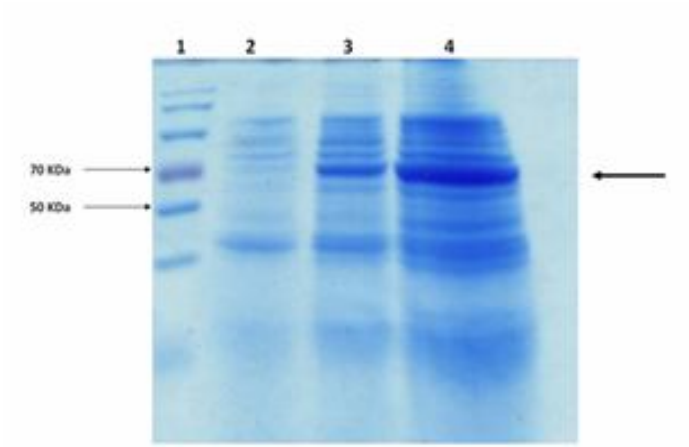
DNA کروموزومی استرپتوکوکوی پیوژنز برای تکثیر ژن هیالورونیداز استخراج شد. قطعه تکثیرشده در مقایسه با مارکر 100 جفت باز (فرمنتاز، لیتوانی) اندازه ناحیه ژن مورد نظر 1296 جفت باز را نشان می‌داد.

تعیین توالی ژن تکثیر یافته

پلاسمید نوترکیب (pET32a_hylA) توالی‌یابی شد. نتایج توالی‌یابی با مقایسه آن با نرم‌افزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد توالی تکثیر یافته کاملاً مشابه توالی نوکلئوتیدی بخش آنزیمی ژن هیالورونیداز بود.

تولید پروتئین

پروتئین نوترکیب هیالورونیداز پس از 4 ساعت از القاء با IPTG تولید گردید. وزن پروتئین تولیدشده در حدود 60 کیلودالتون بود. نتیجه القای پروتئین هیالورونیداز در شکل 2 آمده است. خالص سازی پروتئین HylA با استفاده ازکیت Ni-NTA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت (شکل 2). غلظت پروتئین تخلیص شده با استفاده از روش براد فورد سنجیده شد. مقدار پروتئین موجود در محلول برابر 500 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

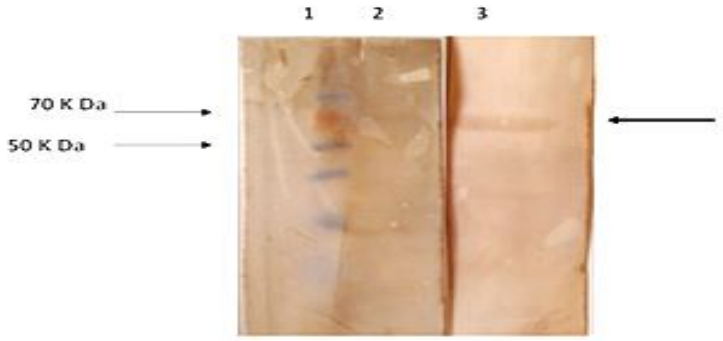


شکل 2. بیان قطعه آنزیمی نوترکیب پروتئین هیالورونیداز.
ستون 1: مارکر پروتئینی؛ ستون 2: وکتور پیش از القاء؛ ستون 3: وکتور 2 ساعت پس از القاء؛ ستون 4: وکتور 4 ساعت پس از القاء.

ایمنو بلات

نتایج مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در آزمون وسترن بلات در شکل 3 آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده، در نمونه سرمی بیماران باندهایی مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ PVDF مشاهده شد. در عین حال هیچ باندی مبنی بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه سرم فرد نرمال دیده نشد (شکل 3).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:22 +0330 on Tuesday September 26th 2017



شکل 3. آنالیز وسترن بلات قطعه آنزیمی نوترکیب هیالورونیداز با استفاده از سرم بیمار.
ستون 1: مارکر پروتئینی. ستون 2: وسترن بلات با استفاده از سرم فرد طبیعی و ستون 3: وسترن بلات با استفاده از سرم بیمار.

بحث

در این تحقیق، بخش‌های آنزیمی ژن هیالورونیداز استرپتوکوکوس پیوژنز با استفاده از برنامه‌های بیوانفورماتیک مورد شناسایی قرار گرفت. پس از تکثیر نواحی ژن مورد نظر، این ژن در وکتور بیانی کلون شده و بیان پروتئین موردنظر صورت گرفت. سپس پروتئین تولیدشده تخلیص گردید. در نهایت برای تایید صحت پروتئین تولید شده از آزمون وسترن بلاتینگ استفاده شد.

یافته‌های ما نشان می‌دهد ناحیه آنزیمی نوترکیب پروتئین هیالورونیداز استرپتوکوکی می‌تواند به وسیله پلاسمید pET32a در *E. coli* تولید شود.

هیالورونیداز یک آنزیم موثر خارج سلولی می‌باشد که اسید هیالورونیک، ماده زمینه‌ای مهم در بافت همبند را تجزیه می‌کند. لذا هیالورونیداز در تهاجم میکروارگانیسم نقش موثری داشته و یکی از عوامل موثر در بیماریزایی این باکتری محسوب می‌شود. این آنزیم توسط میکروارگانیسم‌های گرم مثبت مختلفی شامل گونه‌های استرپتوکوکوس، استافیلوکوکوس، پروپیونی‌باکتریوم، پپتواسترپتوکوکوس و استرپتومیسس تولید می‌شود.

تولید این آنزیم با استفاده از منابع اصلی و طبیعی آن به علت پایین بودن محصول و هم‌چنین خطر آلودگی استرپتوکوکی معمولاً انجام نمی‌شود، لذا تحقیقات مربوط به تولید این آنزیم بیشتر بر شکل نوترکیب آن تاکید دارد. پروتئین هیالورونیداز استرپتوکوکوس پیوژنز دارای وزنی برابر 99636 دالتون می‌باشد(5). تولید این آنزیم قبلا توسط ابطحی و همکاران انجام گرفته است(13)، اما به دلیل سنگینی پروتئین پروتئین شکسته شده و در نتیجه مقدار محصول کمی تخلیص گردید.

در مطالعات دیگر نیز هیالورونیداز نوترکیب استخراج شده از استرپتوکوک دارای وزنی حدود 107 کیلو دالتون را نشان می‌دهد. علاوه بر آن قطعاتی با اندازه‌های 107، 94 ، 91 و 83 کیلودالتون وجود دارد که نشان دهنده خرد شدن آن در حین تولید است(14، 15).

اهمیت نقش درمانی این پروتئین باعث شده تا تولید آن به خصوص به شکل نوترکیب از نظر اقتصادی مهم باشد، لذا در این تحقیق جهت افزایش محصول پروتئین تنها بخشی از پروتئین هیالورونیداز که دارای خاصیت آنزیمی بود با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک تعیین گردید و از تولید بخش‌های اضافی (که فاقد خاصیت آنزیمی بودند) صرف نظر شد. بنابراین با تولید بخش آنزیمی پروتئین کوچک‌تری تولید و از شکسته شدن آن در حین مراحل مختلف تولید و تخلیص جلوگیری گردید.

ناحیه ژنی مورد نظر با 1296 نوکلئوتید پروتئینی برابر43200 دالتون را کد می‌کند. لذا در شکل 2 پروتئین تولید شده وزنی برابر 65 کیلو دالتون را نشان می‌دهد. علت افزایش وزن به دست آمده پروتئین افزوده شدن برخی پروتئین‌های مربوط به ناقل پلاسمیدی از جمله پروتئین تیرودوکسین بود.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:22 +0330 on Tuesday September 26th 2017

اشریشیا کلی به عنوان میزبانی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب هم در تحقیقات و هم در صنعت به طور گسترده به کار می‌رود(12، 16). برای تولید پروتئین نوترکیب در این مطالعه از سویه *E.coli* BL21-pLysS به عنوان میزبان استفاده شد که فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی از جمله Lon, OmpT, DegP و HtpR می‌باشد(6). به این ترتیب بیان بالای هیالورونیداز در *E. coli* سویه BL21 به دلیل عدم حضور پروتئاز در این باکتری بود.

در این تحقیق از ناقل پلاسمیدی pET32a استفاده شد. سیستم pET از جمله قوی‌ترین سیستم‌ها برای بیان ژن و تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری اشریشیا کلی می‌باشد. در این سیستم ژن هدف تحت کنترل پروموتور قوی T7 بوده و در ژنوم میزبان (BL21-pLysS *E.coli*) رونویسی از ژن تحت کنترل این پروموتور توسط RNA پلیمراز فاژ T7 که در سلول باکتری کلون شده است انجام می‌پذیرد. بنابراین به علت استقلال سیستم رونویسی ژن از سلول میزبان، تولید mRNA و در نهایت تولید پروتئین دراین سیستم متاثر از عوامل سلولی دخیل در سنتز پروتئین نمی‌باشد. به همین علت تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم‌هایی است که رونویسی وابسته به پلیمرازهای سلول میزبان است(7). چنانچه در این تحقیق میزان پروتئین تا حدود 500 میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد شد.

نتیجه آزمون وسترن بلات در این تحقیق نشان دهنده ساختار مشابه بین پروتئین نوترکیب تولید شده با شکل طبیعی آن بود.

تولید پروتئین نوترکیب هیالورونیداز در سیستم‌های پروکاریوت و یوکاریوت قبلا گزارش نشده و تعداد منابع و تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده بسیار محدود می‌باشد. این تحقیق اولین گزارش از کلونینگ، بیان و تخلیص هیالورونیداز خارج سلولی استرپتوکوکوس پیوژنز در *E.coli* می‌باشد.

نتیجه گیری

اطلاعات حاضر تایید کننده تولید بخش‌های آنزیمی ژن هیالورونیداز به صورت نوترکیب در میزبان اشریشیاکلی می‌باشد. این پروتئین دارای خاصیت آنتی ژنیک مشابه با شکل تجارتی بوده و دارای مزایایی از جمله اندازه بسیار کوچک‌تر از اندازه طبیعی آن بوده و کار با آن بسیار راحت‌تر بوده و می‌توان از آن جهت تشخیص آنتی بادی ضد هیالورونیداز A در افراد مبتلا نیز استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی «تولید استرپتوکیناز نوترکیب و بررسی آنتی ژنیسیته آن» مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک(طرح شماره 140) و هم‌چنین قسمتی از پایان نامه دانشجویی خانم نفیسه السادات میرجمالی مهرآبادی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی می‌باشد. لذا بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش همکاری کرده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Bisno A, Brito M, Collins C. Molecular basis of group A streptococcal virulence. The Lancet infectious diseases. 2003;3(4):191-200.
2. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clinical microbiology reviews. 2000;13(3):470-511.
3. Guarner J, Sumner J, Paddock CD, Shieh W-J, Greer PW, Reagan S, et al. Diagnosis of invasive group A streptococcal infections by using immunohistochemical and molecular assays. American journal of clinical pathology. 2006; 126(1):148-55.
4. Hahn RG, Knox LM, Forman TA. Evaluation of poststreptococcal illness. American family physician. 2005;71(10) :1949-54.
5. Hynes WL, Dixon AR, Walton SL, Aridgides LJ. The extracellular hyaluronidase gene (hylA) of Streptococcus pyogenes. FEMS microbiology letters. 2000;184(1):109-12.
6. Butler LM, Rainger G, Nash GB. A role for the endothelial glycosaminoglycan hyaluronan

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 5:22 +0330 on Tuesday September 26th 2017

in neutrophil recruitment by endothelial cells cultured for prolonged periods. Experimental cell research. 2009;315(19):3433-41.
7. Starr CR, Engleberg NC. Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus. Infection and immunity. 2006;74(1):40-8.
8. Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. FEMS microbiology letters. 2000;183(2):201-7.
9. Kreikemeyer B, Klenk M, Podbielski A. The intracellular status of Streptococcus pyogenes: role of extracellular matrix-binding proteins and their regulation. International journal of medical microbiology. 2004;294(2):177-88.
10. Kreikemeyer B, McIver KS, Podbielski A. Virulence factor regulation and regulatory networks in Streptococcus pyogenes and their impact on pathogen–host interactions. Trends in microbiology. 2003;11(5):224-32.
11. Kolaskar A, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS letters. 1990; 276(1):172-4.
12. Mahmoudi S, Abtahi H, Bahador A, Mosayebi G, Salmanian A. Production of recombinant streptokinase in E. coli and reactivity with immunized mice. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2010;13(8).
13. Moradkhani A, Abtahi H, Pakzad I, Karimi M. Antigenic characteristics of recombinant hyaluronidase A of Streptococcus pyogenes expressed in E. coli. Arak Medical University Journal. 2011;14(2): 72-80.[Persian]
14. Ponnuraj K, Jedrzejas MJ. Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of Streptococcus pneumonia hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution. Journal of molecular biology. 2000; 299(4):885-95.
15. Li S, Kelly SJ, Lamani E, Ferraroni M, Jedrzejas MJ. Structural basis of hyaluronan degradation by Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase. The EMBO journal. 2000; 19(6):1228-40.
16. Steer AC, Vidmar S, Ritika R, Kado J, Batzloff M, Jenney AW, et al. Normal ranges of streptococcal antibody titers are similar whether streptococci are endemic to the setting or not. Clinical and Vaccine Immunology. 2009; 16(2):172-5.