Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2011; 14(55): 72-80

Antigenic characteristics of recombinant hyaluronidase A of Streptococcus pyogenes expressed in E. coli

Moradkhani A[1], Abtahi H[2], Pakzad I[3]*, Karimi M[2]

1- Sciences and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Microbiology and Immunology, Medical and Molecular Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3- Department of Microbiology, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

Received 19 Jul 2010, Accepted 31 Agu 2010

Abstract

Background: Hyaluronidase A is an antigenic protein that is secreted by Streptococcus pyogenes. Nowadays, streptococcal infections are diagnosed by tracking down anti-hyaluronidase A antibodies. In this study, the attempt was made to generate recombinant hyaluronidase A in E. coli.

Materials and Methods: In this experimental study, through designing specific primers and polymerase chain reaction (PCR), hyaluronidase A gene was amplified and after purification, it was sub-cloned in plasmid expression vector pET32a. Then pET32a-hylA was transferred to E. coli BL21-DE3-plySs. Protein generation induced by IPTG. The recombinant protein was purified by Ni-NTA kit and its concentration was assayed by Bradford method. Western-Blot analysis was run for verifying the recombinant hyaluronidase A.

Results: The nucleotide sequencing of the gene amplified by PCR was the same as hyaluronidase A gene from Streptococcus pyogenes. Production of the recombinant hyaluronidase A via induction by pET32a-hylA plasmid was done through IPTG. The expressed protein was purified by affinity chromatography by Ni-NTA resin. The concentration of purified protein was 500µg/ml. analysis using a mouse anti-hyaluronidase A serum was reacted with the generated protein using Western-Blot analysis.

Conclusion: Recombinant HylA protein can be generated in E.coli and the resulting protein maintains its antigenic properties desirably.

Keywords: E. Coli, Gene Expression, Hyaluronidase A Gene, Streptococcus Pyogenes

*Corresponding author:
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
Email: pakzad_i2006@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 14، شماره 2 (شماره پیاپی 55)،خرداد و تیر 1390، 80-72

بررسی خواص آنتی ژنیک پروتئین نو ترکیب هیالورونیداز A استرپتوکوک پیوژنز بیان شده در باکتری اشریشیا کلی

آذر مرادخانی[1]، حمید ابطحی[2]، ایرج پاکزاد[3*]، مسعوده کریمی[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
2- استادیار، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
3- استادیار،گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی ، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
4- کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت 89/4/28، تاریخ پذیرش 89/6/9

چکیده

زمینه و هدف: هیالورونیداز A از جمله پروتئین‌های ترشحی استرپتوکوک پیوژن بوده که دارای قدرت آنتی ژنیک می‌باشد. امروزه با ردیابی آنتی بادی‌های ضد این پروتئین روند عفونت ناشی از این باکتری پی‌گیری می‌شود. در این تحقیق سعی گردیده تا تولید پروتئین نوترکیب هیالورونیداز A در باکتری اشریشیا کلی انجام گیرد.

مواد و روش ها: در این تحقیق تجربی با طراحی پرایمر اختصاصی و استفاده از روش PCR، ژن هیالورونیداز A از استرپتوکوک پیوژن تکثیر گردید. پس از تخلیص، ژن فوق در ناقل پلاسمیدی pET32a جهت بیان کلون گردید. سپس ساختار پلاسمیدی pET32a -hylA وارد باکتری اشریشیا کلی سویه BL21- DE3-plySs شد. تولید پروتئین با القاء توسط IPTG صورت گرفت. پروتئین نوترکیب با استفاده از کیت Ni-NTA خالص و میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری شد. آزمایش وسترن بلات برای تایید پروتئین نوترکیب انجام شد.

یافته ها: ترادف نوکلئوتیدی ژن تکثیر شده توسط روش PCR با ژن هیالورونیداز A استرپتوکوک پیوژن یکسان بود. تولید پروتئین نوترکیب هیالورونیداز A با القاء پلاسمید pET32a -hylA توسطIPTG انجام گردید. تخلیص پروتئین با روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از کیت Ni-NTA صورت گرفت. میزان پروتئین خالص شده برابر 500 میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. سرم موش واجد آنتی هیالورونیداز A در روش وسترن بلات با پروتئین تولید شده واکنش داد.

نتیجه گیری: تولید پروتئین نوترکیب هیالورونیداز A در میزبان اشریشیا کلی نیز امکان پذیر است. پروتئین تولید شده خاصیت آنتی ژنیک خود را به خوبی حفظ می‌کند.

واژگان کلیدی: استرپوکوک پیوژن، اشریشیا کلی، بیان ژن، ژن هیالورونیداز A

***نویسنده مسئول:** ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی پزشکی
Email: pakzad_i2006@yahoo.com

مقدمه

باکتری استرپتوکوک پیوژنز یکی از رایج ترین پاتوژن‌های انسانی است و باعث ایجاد عفونت‌های وسیعی از جمله سلولیت، زرد زخم، تب روماتیسمی و بیماری روماتیسم قلبی می‌شود که شایع‌ترین آنها گلودرد استرپتوکوکی است(1، 2). تشخیص اصلی در عفونت‌های ناشی از این باکتری بر اساس جدا سازی آن از بافت یا اندام آلوده است(3) ولی در مورد تشخیص عفونت‌های غیر چرکی استرپتوکوکی مثل تب روماتیسمی حاد یا گلومرونفریت استرپتوکوکی، همیشه امکان به دست آوردن پیشینه بالینی در حد کافی از ارگانیسم وجود ندارد. در این قبیل موارد وجود پاسخ ایمنی از سوی میزبان تنها مدرک از عفونت اخیر است که باقی مانده است، بنابراین اندازه گیری آنتی بادی‌ها که ویژه آنتی ژن‌های استرپتوکوکی است برای تایید تشخیص عفونت استرپتوکوک‌های گروه A که از پیش وجود داشته ضروری است(4).

استرپتوکوک پیوژن‌ها شمار بزرگی از فاکتورهای بیماریزا با خاصیت آنتی ژنی تولید می‌کنند که بعضی از آنها تحت عنوان فاکتورهای انتشار نام دارند. از جمله این فاکتورها هیالورونات لیاز خارج سلولی می‌باشد(5). هیالورونیداز موجب شکست اسید هیالورونیک می‌شود. اسید هیالورونیک جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی مهره داران می‌باشد و به طور وسیعی در بافت‌های مختلفی از قبیل مایع زجاجیه چشم، آئورت، خون، کبد، مایع سینوویال، بافت همبند سست و پوست پراکنده است(6) همچنین ترکیب اصلی کپسول بعضی باکتری‌ها است(7). دارا بودن خاصیت شکنندگی هیالورونیک اسید کپسول، اتصال و کولونی زایی باکتری را تسهیل می‌کند(8). در سال 1928 به اولین استفاده درمانی این آنزیم به عنوان فاکتور انتشار دهنده اشاره شد، به این صورت که نفوذ زیر جلدی واکسن‌ها و توکسین‌های به کار برده شده را تسهیل می‌کرد. از لحاظ درمانی این آنزیم همراه با داروهای بیهوش کننده موضعی و داروهای تسکین دهنده درد استفاده می‌شود(9، 10). همچنین هیالورونیداز به وسیله تشدید نفوذ داروهای ضد سرطان، با استفاده از فعالیت انتشار دهندگی، تومورهای مقاوم نسبت به درمان های شیمی درمانی را نسبت به درمان حساس‌تر می‌کند(11). کاربرد دیگر هیالورونیداز در تشخیص عفونت می‌باشد؛ این آنزیم به وسیله یک مهارکننده اختصاصی (آنتی هیالورونیداز) که یک آنتی‌بادی واقعی است 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).

در تب روماتیسمی گاهی سطح سرمی آنتی هیالورونیداز زودتر از آنتی استرپتولیزین O سرم بالا می‌رود و حتی بعد از به سطح نرمال برگشتن آنتی استرپتولیزین O سرم، برای مدت طولانی در سطح بالا باقی می‌ماند(13).

بر اساس بررسی‌های انجام شده بر روی بیماران مبتلا به نکروزفاسیا مشخص شد که عفونت ناشی از استرپتوکوک پیوژنز را می‌توان با تعیین سطح آنتی بادی ضد هیالورونیداز تشخیص داد(14).

هدف از این تحقیق، بیان ژن هیالورونیداز خارج سلولی (hylA) استرپتوکوک پیوژنز با استفاده از ناقل پلاسمیدی pET32a در اشرشیاکلی (E.coli)، تخلیص پروتئین نوترکیب حاصل و بررسی آنتی ژنیسیته آن می‌باشد.

مواد و روش ها

باکتری‌های استفاده شده در این مطالعه تجربی شامل استرپتوکوک پیوژن سویه PTCC 1447 (تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس)، اشریشیا کلی سویه DH5α و اشریشیا کلی سویه BL21- DE3-plySs (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران، ایران) بودند. برای کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه از پلاسمید pTz57R/T (شرکت فرمنتاس، لیتوانی) و جهت تولید هیالورونیداز A از پلاسمید pET32a (شرکت نواژن، آمریکا) استفاده شد. این پلاسمیدها از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک وتکنولوژی زیستی تهیه

گردید. در این تحقیق از آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و کلرامفنیکل استفاده شد. آنزیم‌های استفاده شده از شرکت سیناژن تهیه گردید.

تخلیص کروموزوم استرپتوکوک پیوژن بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا استرپتوکوک پیوژن در محیط تریپتی کیس سوی برات (Trypticase Soy Broth) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE (pH معادل برابر 8، EDTA 1 میلی مولار Tris 10 میلی مولار) حل گردید و با استفاده از آنزیم لیزوزیم و سپس با اثر SDS (sodium dodecyl sulfate) وآنزیم پروتئیناز K لیز شد. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول 10% CTAB (CTAB/NaCl و NaCl 0.7 M) استخراج گردید. پروتئین‌ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل /کلروفرم / ایزوآمیل الکل به نسبت 25/24/1 و سانتریفیوژ (13000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه) حذف گردید. DNA به دست آمده با استفاده از یک حجم ایزوپروپانول رسوب داده شد و سپس توسط اتانول 70 درصد شستشو گردید. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز آن در ژل آگارز 0/8 درصد در بافرTBE بررسی گردید. مقدار DNA تخلیص شده نیز با اندازه‌گیری جذب نور در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر به دست آمد.

با استفاده از ترادف استاندارد ژن هیالورونیداز A (AF218838.1) طراحی پرایمرهای رفت (Forward) و برگشت (Reverse) انجام شد.

Forward:
5' ATGGATCCGTGAATACTTATTTTTG 3' '
Reverse:
5' AAGAATTCCTAAATCCTTAAGTCTT 3'

پرایمر رفت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر برگشت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیمEcoRI می‌باشد

تکثیر ژن هیالورونیداز A با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم 25 میکرولیتر و با استفاده از 500 نانو گرم DNA الگو، یک میلی مولار از هر پرایمر، 1/5 میلی مولار از یون منیزیوم، 200 میلی مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5 واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر PCR (Polymerase Chain Reaction) با غلظت 1X انجام شد. برنامه PCR در دو مرحله انجام شد که مرحله اول شامل حرارت اولیه در 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه (یک چرخه) و مرحله دوم PCR متشکل از 30 چرخه که هر یک شامل سه قسمت بود؛ قسمت اول دناتورکردن (95 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (50 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و 30 ثانیه)؛ در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه و برای یک چرخه انجام شد. 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 و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام شد و تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت روش (Roche) بر اساس دستور العمل آن انجام گرفت.

برای کلون سازی ژن هیالورونیداز A در دو پلاسمید pTz57R/T و pET32a ابتدا محصول PCR با آنزیم های BamHI وEcoRI برش داده سپس در ناقلین مورد نظر که با همان آنزیم ها بریده شده بودند، وارد شد. عمل اتصال ژن هیالورونیداز A در این پلاسمیدها با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در حرارت 22 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام گرفت. پلاسمیدهای pTz57R/T-hylA و pET32a-hylA به ترتیب در سلول‌های مستعد اشریشیا کلی سویه DH5α و سویه BL21- DE3-plySs وارد شدند. 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 R، DNA پلاسمیدی و آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. 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 تایید صحت ترادف نوکلئوتیدی، ژن پلاسمید به شرکت MWG آلمان ارسال شد. ترادف نوکلئوتیدی محصول PCR با استفاده از روش سنگر (Sanger) تعیین گردید.

جهت تولید پروتیین HylA، باکتری‌های اشریشیاکلی تراریخت شده با پلاسمید pET32a -hylA در محیط نوترین برات 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 (Optical Density=0/6)، از محلول یک مولار Isopropyle-Beta-D-thiogalactopyranoside) (IPTG به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی IPTG به یک میلی مولار 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 از روش الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE استفاده گردید.

تخلیص پروتئین با استفاده از کیت Ni-NTA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن، آمریکا) به صورت زیر انجام گرفت. رسوب سلولی حاصل از 250 میلی‌لیتر کشت باکتری پس از مرحله القاء، در 5 میلی‌لیتر از بافر 1 (Tris HCl 10mM ,NaH_2 PO_4 100 mM ,pH 8 Urea 8M) حل شد . پس از ورتکس، به مدت یک ساعت بر روی راکر در حرارت اتاق قرارگرفت. سپس نمونه در یخ قرار داده شد و سونیکه گردید. پس از شفاف شدن، به مدت 20 دقیقه با 12000 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به ازاء هر 4 میلی‌لیتر محلول رویی مرحله قبل، یک میلی‌لیتر رزین NitriloTriacetic Acid Ni- آگارز اضافه شد. سپس به مدت یک ساعت بر روی راکر در حرارت اتاق قرار گرفت. با سانتریفیوژ کوتاه مدت (2000 دور در دقیقه برای 3 دقیقه) رزین رسوب داده شد و محلول رویی آن خالی شد. سپس سه بار و هر بار با 5 ملیی لیتر از بافر 2 (Tris HCl, 10mM ,NaH_2 PO_4 100 mM ,pH 6.3 Urea 8M) شستشوی بافر انجام گرفت. جدا سازی پروتئین از رزین با استفاده از بافر 3 و 4 انجام گرفت. حدود 1 میلی‌لیتر بافر 3 (Tris HCl 10mM ,NaH_2 PO_4 100 mM ,pH 5.9, Urea 8M) به رزین اضافه شد. با سانتریفیوژ کوتاه مدت مایع رویی حاوی پروتئین جدا گردید. رسوب باقیمانده از مرحله قبل با 1 میلی‌لیتر بافر 4 (Tris HCl 10mM, NaH_2 PO_4 100 mM ,pH 4.5 Urea 8M,) شستشو داده شد و به مدت نیم ساعت بر روی راکر در حرارت اتاق قرارگرفت. سپس با سانتریفیوژ کوتاه مدت مایع رویی حاوی پروتئین جدا گردید. برای اطمینان از وجود پروتئین تخلیص شده، محلول‌های رویی با استفاده از الکتروفورز SDS PAGE در روی ژل الکتروفورز بررسی شد. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری گردید و برای تائید صحت پروتئین تولید شده وتعیین ویژگی آنتی ژنتیک آن از آزمون وسترن بلات استفاده شد.

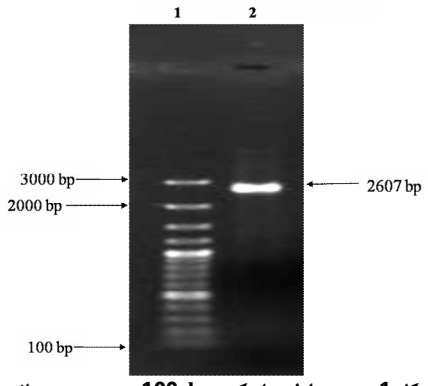
ابتدا به یک عدد موش در دو نوبت به فاصله یک هفته به صورت زیر جلدی و درون صفاقی عصاره محیط کشت حاوی استرپتوکوکوس پیوژنز به همراه آدجوانت فروند تزریق گردید و پس از بالا رفتن تیتر آنتی بادی بر علیه این پروتئین سرم حیوان تهیه شد.

آزمون وسترن بلات بدین شکل انجام شد که پس از الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری‌های القاء یافته بر روی ژل 12 SDS-PAGE درصد، باندهای پروتئینی به دست آمده به کاغذ PVDF منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری 25 میلی مولار تریس، 192 میلی مولار 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 به مدت یک ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدود سازی، کاغذ PVDF به مدت دو ساعت در مجاورت سرم موش تلقیح شده با هیالورونیداز A تجارتی (1/100) و یک نمونه سرم موش تلقیح نشده (کنترل منفی) قرار داده شد. پس از انکوباسیون دو ساعته با نمونه‌های سرم، نوارهای کاغذ PVDF سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل NaCl 15 میلی مولار، Tris-HCl pH 7.4 10 میلی مولار، tween20 0/1 در صد) شستشو شده و به مدت یک و نیم ساعت با آنتی بادی ضد موش متصل با پراکسیداز با رقت 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.

یافته ها

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری استرپتوکوک پیوژن برابر 500 میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد شد. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن هیالورونیداز A استفاده گردید. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر 100 جفت بازی حدود 2607 جفت باز بود (شکل 1).

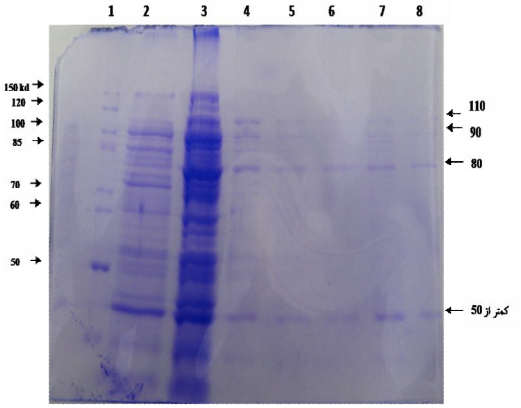


شکل 1. ستون اول مارکر 100 bp، ستون دوم باند 2607 bp مربوط به ژنhylA (با 1/5 میلی مولار منیزیم)

نتیجه مقایسه انجام شده بین ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pTz57R/T کلون گردیده بود، با ترادف ارایه شده برای ژن هیالورونیداز A که در بانک ژن ثبت شده است، یکسان بود.

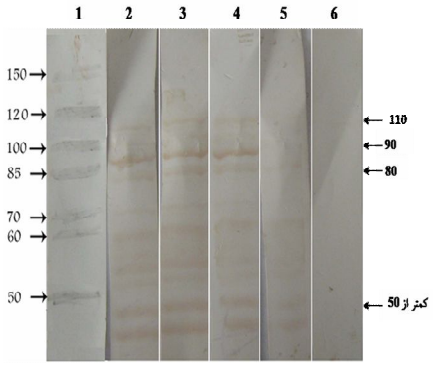
پروتئین نوترکیب هیالورونیداز A پس از 4 ساعت از القاء با IPTG تولید گردید. وزن پروتئین تولید شده در حدود 120 کیلودالتون بود.

خالص سازی پروتئین HylA با استفاده ازکیت Ni-NTA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد سنجیده شد. مقدار پروتئین موجود در محلول برابر 500 میکروگرم در میلی‌لیتر بود(شکل 2).



شکل 2. تخلیص پروتئینHylA : پروتئین مارکر(ستون 1)، نمونه قبل از القاء(ستون 2)، نمونه بعد از القاء(ستون 3)، پروتئین خالص شده (ستون 8-4)

نتایج مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در آزمون وسترن بلات در شکل 3 نمایش داده است. بر اساس نتایج به دست آمده، در نمونه سرمی موش تلقیح شده باندهایی مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ PVDF مشاهده شد؛ در عین حال هیچ باندی دال بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه سرم موش نرمال دیده نشد.



شکل 3. آزمون ایمنوبلات با سرم موش تلقیح شده با هیالورونیداز A (ستون 5-2)، موش طبیعی (ستون 6) و پروتئین مارکر (ستون 1)

بحث

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 استرپتوکوک پیوژنز در E.coli می‌باشد. 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 (سویه BL21-pLysS اشریشیا کلی) رونویسی از ژن تحت کنترل این پروموتور توسط RNA پلیمرآز فاژ T7 که در سلول باکتری کلون شده است، انجام پذیرفت. بنابراین به علت استقلال سیستم رونویسی ژن از سلول میزبان، تولید mRNA و در نهایت تولید پروتئین در این 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 پلیمرآزهای سلول میزبان است(15)؛ چنانچه در این تحقیق میزان پروتئین تا حدود 500 میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد شد.

پروتئین هیالورونیداز استرپتوکوک پیوژن دارای وزنی برابر 99636 دالتون می‌باشد(5). همان طور که در شکل 2 دیده می‌شود پروتئین تولید شده دارای وزن حدود 120 کیلودالتون است؛ علت اختلاف وزنی مشاهده شده در پروتئین، افزوده شدن برخی پروتئین‌های مربوط به ناقل پلاسمیدی از جمله پروتئین تیرودوکسین است.

در ژل SDS-PAGE وسترن بلات علاوه بر باند اصلی یعنی 120 کیلو دالتون، باندهای کوچک‌تر نیز مشاهده شد(شکل 3). با توجه به وجود این باندها این احتمال وجود دارد که پروتئین شکسته شود و شکسته شدن این پروتئین احتمالا ناشی از سنگینی وزن باشد. شکسته شدن این پروتئین در مطالعات دیگر نیز دیده شده است(4) و یا ممکن است قطعات ترجمه آغازین متفاوتی را نشان دهند و ترجمه از جایگاه‌های آغازین بعدی نظیر متیونین دوم، سوم انجام شده باشد، بنابراین پروتئین فاقد آمینواسیدهای ابتدایی ناحیه N-ترمینال باشد و در اندازه‌های کوچک‌تر تشکیل شود.

هیالورونیداز استخراج شده از استرپتوکوک پنومنی دارای وزنی حدود 107 کیلو دالتون است. مطالعات نشان می دهد، در تولید فرم نوترکیب در E.coli ، قطعاتی با اندازه‌های 107، 94 ، 91 و 83 کیلودالتون وجود دارد، که نشان‌دهنده خرد شدن آن در حین تولید است. از بین این قطعات تنها شکل 83 کیلو دالتونی پروتیئن دارای فعالیت آنزیمی می‌باشد(18-16). بنابراین میزان کل پروتئین تولید شده در این تحقیق (500 میکروگرم در میلی لیتر) مربوط به همه اشکال تولید شده پروتئین است. هینز و همکاران نیز وزن‌های مولکولی متفاوتی از هیالورونیداز را بسته به روش تخلیص بدست آورند، با روش ژل فیلتراسیون وزنی برابر با 70 کیلو دالتون و با استفاده از الکتروفورز SDS-آکریلامید وزنی حدود 50 کیلو دالتون بود(5).

برای جلوگیری از شکسته شدن پروتئین تحقیقات دیگری نیز باید انجام شود. با تغییر شرایط از جمله دما، محیط کشت، طول مدت القاء و تغییر پلاسمید می‌توان شرایط مناسب پایداری پروتئین را تعیین کرد تا از شکست آن تا حد امکان جلوگیری شود. همچنین برای شناسایی خاصیت آنتی ژنیک و فعالیت آنزیمی هر یک از این قطعات، نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد.

با توجه به تولید ناچیز آنزیم در استرپتوکوک پیوژنز و خطرات احتمالی انتقال عفونت که در حین تولید

آنزیم از این باکتری وجود دارد، تولید این آنزیم باید با روش‌های نوترکیب و در باکتری‌های دیگر نظیر E.coli صورت پذیرد.

نظر به واکنش هیالورونیداز A نوترکیب به دست آمده با آنتی بادی ضد هیالورونیداز A می توان از این پروتئین برای تشخیص عفونت ناشی از استرپتوکوک پیوژن بهره برد. با استفاده از روش‌های تشخیصی کمی نظیر الیزا می‌توان میزان آنتی بادی ضد این پروتئین را نیز تعیین نمود. نیاز به مطالعات بیشتر در این خصوص به خوبی احساس می گردد.

نتیجه گیری

ژن کلون شده در این تحقیق از نظر سکانس با ژن هیالورونیداز A، 100 درصد همولوژی را نشان داد. تولید این پروتئین با استفاده از ناقل pET32a انجام شد . این پروتئین خاصیت آنتی ژنیک مشابه با هیالورونیداز داشته و می توان از آن جهت تشخیص آنتی بادی ضد هیالورونیداز A در افراد مبتلا نیز استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایلام تحت عنوان "تولیدهیالورونیداز نوترکیب در E.coli و بررسی آنتی ژنیسیته آن" همچنین قسمتی از پایان نامه دانشجویی خانم آذر مرادخانی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد می‌باشد؛ لذا بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام تشکر و قدردانی بعمل می آید.همچنین از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی تجهیزات وامکانات واز کلیه همکارانی که که ما را در این پژوهش یاری نموده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Ikebe T, Endo M, Ueda Y, Okada K, Suzuki R, Minami T, et al. The genetic properties of Streptococcus pyogenes emm49 genotype strains recently emerged among severe invasive infections in Japan. Jpn J Infect Dis. 2004 Aug;57(4):187-8.
2. Morosini M, Canton R, Loza E, Del Campo R, Almaraz F, Baquero F. Streptococcus pyogenes isolates with characterized macrolide resistance mechanisms in Spain: in vitro activities of telithromycin and cethromycin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003;52(1):50.
3. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 11th ed. St Louis: Mosby; 2002.
4. Karmarkar M, Venugopal V, Joshi L, Kamboj R. Evaluation & revaluation of upper limits of normal values of anti-streptolysin O & anti-deoxyribonuclease B in Mumbai. Indian J Med Res. 2004 May;119 Suppl:26-8.
5. Hynes W, Dixon A, Walton S, Aridgides L. The extracellular hyaluronidase gene (hylA) of Streptococcus pyogenes. FEMS Microbiol Lett. 2000 Mar;184(1):109-12.
6. Butler L, Rainger G, Nash G. A role for the endothelial glycosaminoglycan hyaluronan in neutrophil recruitment by endothelial cells cultured for prolonged periods. Exp Cell Res. 2009 Nov;315(19):3433-41.
7. Starr C, Engleberg N. Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus. Infect Immun. 2006 Jan;74(1):40-8.
8. Pecharki D, Petersen F, Scheie A. Role of hyaluronidase in Streptococcus intermedius biofilm. Microbiology. 2008 Mar;154(Pt 3):932-8.
9. Schulze C, Bittorf T, Walzel H, Kundt G, Bader R, Mittelmeier W. Experimental evaluation of hyaluronidase activity in combination with specific drugs applied in clinical techniques of interventional pain management and local anaesthesia. Pain Physician.2008 Nov-Dec;11(6):877-83.
10. Stern R, Jedrzejas M. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. Chem Rev. 2006 Mar;106(3):818-39.

11. Stern R. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. Pathol Biol (Paris). 2005 Sep;53(7):372-82.
12. Steer A, Vidmar S, Ritika R, Kado J, Batzloff M, Jenney A, et al. Normal ranges of streptococcal antibody titers are similar whether streptococci are endemic to the setting or not. Clin Vaccine Immunol. 2009 Feb;16(2):172-5.
13. Hahn R, Knox L, Forman T. Evaluation of poststreptococcal illness. Am Fam Physician. 2005 May;71(10):1949-54.
14. Lindbaek M, Høiby E, Lermark G, Steinsholt I, Hjortdahl P. Which is the best method to trace group A streptococci in sore throat patients: culture or GAS antigen test? Scand J Prim Health Care. 2004 Dec;22(4):233-8.
15. Sambrook J, Russel D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
16. Akhtar M, Bhakuni V. Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase: An overview. Current Science. 2004;86(2):285-95.
17. Ponnuraj K, Jedrzejas M. Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 A resolution. J Mol Biol. 2000 Jun;299(4):885-95.
18. Li S, Kelly S, Lamani E, Ferraroni M, Jedrzejas M. Structural basis of hyaluronan degradation by Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase. EMBO J. 2000 Mar; 19(6): 1228-40.