

## ساخت پروتئین نو ترکیب FanC اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک مرتبط با اسهال گوساله

سعید طباطبایی<sup>۱</sup>، غلامرضا نیکبخت بروجنی<sup>۱\*</sup>، مجید تیبانیان<sup>۲</sup>، خلیل زینل<sup>۱</sup>، امیر حسین جلالی<sup>۳</sup>

(۱) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۲) گروه ایمونولوژی، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، کرج، ایران

(۳) پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

(دریافت مقاله: ۱۳ آبان ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۹ دی ماه ۱۳۹۶)

### چکیده

زمینه مطالعه: اسهال یکی از بیماری‌های شایع و مهمترین عامل مرگ و میر و تاخیر رشد در گوساله‌های زیر یک ماه است. در بین سویه‌های اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک که مسبب اسهال در گوساله‌های یک تا هفت روزه هستند، سویه‌های واجد فیمبریه F5 اهمیت زیادی دارند. بخش FanC فیمبریه F5 نقش اساسی در اتصال باکتری به یاخته‌های روده و آغاز بیماری داشته و پادتن‌های تولید شده بر علیه آن اثر حفاظتی دارند. هدف: ساخت و ارزیابی بیان پروتئین نو ترکیب FanC اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک مرتبط با اسهال گوساله. روش کار: در این مطالعه پلاسمید پروکاریوتی ۲۸۸-pET حاوی قسمت fanC فیمبریه F5 طراحی و ساخته شد و تولید پروتئین حاصل از پلاسمید طراحی شده در باکتری (DE3) BL21 اثبات رسید. نتایج: حاصل این تحقیق ساخت پلاسمید پروکاریوتی ۲۸۸-pET حامل ژن FanC و تهیه پروتئین خالص آن پس از بیان ژن در باکتری (DE3) BL21 بود که با روش‌های تعیین توالی و وسترن بلاتینگ به اثبات رسید. نتیجه‌گیری نهایی: پروتئین FanC و سویه باکتری نو ترکیب تولید شده را می‌توان در آزمون‌های تشخیصی و همچنین طراحی و تولید واکنس کلی باسیلوز گوساله به کار برد.

واژه‌های کلیدی: کلونینگ، پروتئین نو ترکیب FanC، اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک گاو

### مقدمه

(۲۰)

در حال حاضر به منظور پیشگیری از خسارات ناشی از بیماری، اقدامات درمانی و یا روش‌های پیشگیرانه به کار گرفته می‌شوند. به دلیل بالا بودن هزینه‌های درمان دارویی، اثر نامطلوب بیماری بر رشد گوساله، احتمال بروز سویه‌های مقاوم در اثر استفاده از آنتی بیوتیک و همچنین موارد عدم موفقیت درمان، راهبردهای مبتنی بر درمان در گله‌ها مطلوب نیست و در مقابل روش‌های پیشگیرانه به دلیل نداشتن معایب ذکر شده مورد توجه هستند. ایمنی در کنار رعایت اصول بهداشتی به عنوان یکی از مداخلات موثر در جهت پیشگیری از اسهال کلی باسیلوزی در نظر گرفته می‌شود (۲۰). فیمبریه‌ها به علت نقش مهمی که در مراحل اولیه بیماری‌زایی (مرحله اتصال به مخاط روده) ایفا می‌کنند هدف مناسبی برای تهیه واکنس هستند. بیشتر باکتری‌های انتروتوکسیژنیک مرتبط با اسهال گوساله، انواع محدودی از فیمبریه‌های اتصالی را بیان می‌کنند که مهمترین آن‌ها فیمبریه F5 است (۲۰).

یک اپرون kb ۷/۱ مشتمل بر هشت ژن fanA-fanH مسئول شکل گرفتن ساختار فیمبریه F5 است. این مجموعه بر روی یک پلاسمید غیر کونجوگاتیو kb ۸/۸ قرار گرفته است و معمولاً در باکتری‌های گروه‌های سرمی O8، O20 و O101 دیده می‌شود. فیمبریه F5 در کل شامل یک تحت واحد عمده تکرار شونده به وزن kb ۱۸/۲ بوده که بوسیله ژن fanC کد میشود. سایر بخش‌های فیمبریه (پروتئین‌های تنظیم، انتقال و بازآرایی) توسط ژنهای دیگر اپرون کد می‌شوند. پروتئین FanC خود یک تحت

اسهال گوساله‌ها دلیل هزینه‌ها و دشواری‌های درمان و همچنین افت تولید پس از بهبودی، همواره مورد توجه دامداران و دامپزشکان بالینی بوده است. یکی از عوامل مهم اسهال در گوساله‌های تازه متولد شده (بین ۳ تا ۵ روز)، سویه‌های حاد باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک هستند. گوساله‌های آلوده و مبتلا به اشکال حاد و فوق حاد بیماری ممکن است تلف شوند. گزارش مرکز پایش ملی سلامت حیوانات آمریکا در سال ۲۰۰۷ برای گاوهای شیری نشان می‌دهد که ۵۷٪ مرگ و میر گوساله‌های شیرخوار به علت اسهال بوده است. اخیراً میزان مرگ و میر مشابهی (۵۳/۴٪) برای گوساله‌های شیری در اثر اسهال در کره جنوبی گزارش شده است. میزان ضرر اقتصادی ایجاد شده در اثر مرگ گوساله در نروژ، که سالانه ۲۸۰ هزار راس گوساله تولید می‌کند، در حدود ده میلیون دلار آمریکا در سال ۲۰۰۶ برآورد شده است (۲، ۲۰). بر پایه یک تحقیق بیش از ۲۵ درصد دلایل مراجعه دامپزشکان به دامداری‌ها اسهال گوساله است (۳).

در بین سویه‌های اشریشیا کلی، جدایه‌های متعلق به پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک نقش مهمتری در ایجاد اسهال کلی باسیلوزی دارند. این سویه‌ها پس از ورود به دستگاه گوارش از طریق فیمبریه‌های سطحی به پذیرنده‌های اختصاصی گانگلیوزیدی موجود بر روی انتروسیت‌های روده باریک متصل می‌شوند و سپس شروع به ترشح توکسین حساس به حرارت یا مقاوم به حرارت می‌کنند. این توکسین‌ها عامل بروز اسهال از طریق افزایش ترشح آب و املاح به روده و همچنین کاهش جذب مایعات هستند



تحت اشعه UV انجام گرفت.

**تعیین توالی ژن fanC در سویه‌های جدا شده در ایران با روش خاتمه دهنده رنگی:** تعیین توالی در دو جهت بر روی ۷ سویه جدا شده انجام شد. تعیین توالی توسط مؤسسه ماکروژن (سئول، کره) با دستگاه توالی‌یاب خودکار (ABI DNA ۳۷۳۰ XL) انجام شد. شناسایی توالی‌ها با استفاده از BLASTn و از طریق وب سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) صورت گرفت. توالی‌های به دست آمده توسط برنامه Clustal W باتوالی مرجع P۱۸۱۰۳ ثبت شده در پایگاه Uniprot مورد مقایسه قرار گرفتند.

**طراحی، کشت و استخراج پلاسمید بیانی pET۲۸a:** به این منظور از روش سنتز ژن استفاده شد. ژن FanC ساخته شده در پلاسمید pET۲۸a وارد گردید و پلاسمید recFanC ساخته شده برای تأیید، تعیین توالی شد. کشت باکتری DH۵α حاوی پلاسمید بیانی pET۲۸a-recFanC در محیط LB آگار انجام شد و کلنی تک از آن جدا گردید. سپس یک کلنی تک در ۵ cc محیط LB براس یک شبانه روز در دمای ۳۷°C و درون انکوباتور شیکردار انکوبه شد و با استفاده از کیت (QIAprep spin) درون انکوباتور شیکردار انکوبه شد و با استفاده از کیت (Qiagen (miniprep kit استخراج گردید.

**ترانسفورماسیون باکتری BL۲۱ با استفاده از پلاسمید pET۲۸a:** بدین منظور از روش ترانسفورماسیون شیمیایی کلرید کلسیم و انجماد استفاده شد. محلول حاوی پلاسمید pET۲۸a با باکتری‌های پذیرا به نسبت ۱ به ۱۰ ترکیب شده و مراحل بعدی طبق روش ترانسفورماسیون صورت گرفت و سپس محتوی باکتری‌های ترانسفورمه BL۲۱-recFanC روی محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت شدند. به علت وجود ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در پلاسمید pET۲۸a، در صورت وجود این پلاسمید در داخل باکتری، باکتری‌ها قادرند روی محیط حاوی کانامایسین به میزان ۵۰ μg/ml رشد کنند.

**انجام PCR برای تأیید ترانسفورماسیون:** پس از انجام ترانسفورماسیون به طور تصادفی از کلونی‌های تک موجود در محیط LB حاوی کانامایسین در محیط جدید دیگری حاوی کانامایسین گسترش تهیه گردید و آزمون PCR با استفاده از پروتوکول ذکر شده در قسمت قبل با پرایمر فوروارد TV و پرایمر ریورز ژن F۵ انجام گرفت. پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، کلنی‌هایی که قطعه مورد نظر را دارا بودند انتخاب شدند. کلونی‌های تأیید شده در محیط LB broth کشت داده شدند و پس از تقسیم بندی و اضافه کردن گلیسرول (۳۰٪ حجم نهایی) در دمای منهای ۷۰°C نگهداری شدند.

**القای بیان کلون‌های انتخابی با IPTG:** به این منظور باکتری recFanC-BL۲۱ در محیط LB broth حاوی کانامایسین به مدت یک شب در دمای ۳۷°C کشت داده شد. پس از ۱۸ ساعت IPTG با غلظت ۱ mM اضافه گردید و به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه گردید.

واحد ۱۵۹ اسید آمینه‌ای است و لیگاند اتصال به پذیرنده گانگلیوزیدی محسوب می‌شود (۵،۶). مطالعات بر روی موتان‌های پروتئین F۵ که بر روی سطح باکتری بیان شده‌اند نشان می‌دهد که وجود پنج آمینواسید در ناحیه کربوکسی ترمینال محصول FanC برای اتصال فیمبریه به انتروسیت‌ها الزامی است (۱۵،۲۵).

در ایران مطالعاتی صورت گرفته که نشان می‌دهند باکتری‌های انتروتوکسیژنیک حاوی ژن k۹۹ در ایجاد اسهال گوساله‌ها نقش دارند ولی شیوع آن‌ها در مناطق مختلف کشور متفاوت (از ۱/۰۷٪ تا ۲۱/۸۷٪) است (۱۰،۱۱،۱۴،۱۹،۲۷). با این وجود در ایران جمعیت قلیلی از گوساله‌ها (تنها حدود ۱۰٪) مقادیر قابل توجهی از پادتن بر علیه فیمبریه F۵ دارند (۱۸،۲۲) که نیاز مبرم به ایمن سازی را نشان می‌دهد. البته بیشتر اطلاعات موجود با استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی PCR بر روی جدایه‌های باکتری و یا کیت‌های تشخیصی تجاری به دست آمده است. باید توجه نمود که برای تعیین سروتیپ باکتری نیاز به آنتی سرم اختصاصی و برای تشخیص پادتن سرمی نیز به پروتئین خالص نیاز است که هر دو با در دست داشتن پادکن خالص امکان پذیر خواهد بود. از سوی دیگر شکل غالب فیمبریه در ترکیب واکسن‌های تجاری از نوع تحت واحدی (Subunit) است، و البته نه تحت واحد نوترکیب (Recombinant subunit)، که اغلب با روش‌های خالص سازی مکانیکی فیمبریه تهیه شده‌اند. این محصولات حاوی انواع فیمبریه‌ها بوده و خالص نیستند. با توجه به هزینه‌های بالای کیت‌های وارداتی و نیاز مبرم به تولید مطلوب و خالص پادکن F۵ جهت مصارف تشخیصی و تحقیقات واکسن بر آن شدیم تا بخش مهم فیمبریه F۵ (FanC) را در دستگاه اوکاریوتی به شیوه نوترکیب طراحی و ساخته و پروتئین بیان شده را خالص و مورد ارزیابی قرار دهیم.

## مواد و روش کار

**افزوده سازی ژن fanC پرایمرها شرایط واکنش چرخه‌ها:** افزوده سازی ژن fanC با استفاده از روش PCR پیشنهاد شده توسط فرانک و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام گردید (۷). واکنش در حجم ۲۵ μl شامل ۰/۵ μM از هر یک از پرایمرها (Forward: TATTATCTTAGGTGGTATGG; Reverse: GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTC) ، ۰/۲ mM dNTP، ۲/۵ μl بافر و ۲ واحد از آنزیم Taq پلیمرز بود. واکنش چرخه‌ها در دستگاه PCR و به شرح ذکر شده انجام گرفت: واسرشت اولیه ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و ۲۵ سیکل شامل واسرشت در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۰°C به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه و سی ثانیه (به همراه افزایش بعدی ۳ ثانیه‌ای به ازای هر سیکل) و در انتهای سیکل، واکنش در دمای ۷۲°C به ۱۰ مدت دقیقه پایان یافت. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصدی الکتروفورز گردیدند و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید عکس برداری



مقداری از کشت بدون اضافه کردن IPTG به عنوان کنترل القا استفاده شد. از نمونه‌های بدست آمده با استفاده از سانتریفیوژ (۴۰۰۰ rpm به مدت ۸ دقیقه) رسوب تهیه گردید و رسوب و مایع رویی بدست آمده در منفی °C ۲۰ تا زمان انجمان SDS-PAGE نگهداری شد.

**الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید:** الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دو سدیل سولفات (SDS-PAGE) بر اساس روش لاملی (۲۵) در ژل جداکننده ۱۶٪ و ژل متراکم کننده ۵٪ تحت شرایط احیایی انجام شد. یک حجم نمونه سوسپانسیون باکتری به یک حجم بافر نمونه افزوده شد و ده دقیقه در آب جوش قرار گرفت. ۱۰ تا ۱۲ از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه و ابتدا در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت و سپس ۱۳۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی آبی R-۳۵۰ (فارماسیا) رنگ آمیزی شد. وزن مولکولی پروتئین فیمبریه F5 توسط مارکر پروتئینی استاندارد با وزن مولکولی مشخص تعیین گردید.

## نتایج

**تعیین و تحلیل توالی‌های بدست آمده از سویه‌های ایران با سویه‌های استاندارد:** تنها تفاوت در توالی اسید آمینه‌های مربوط به سویه‌های ایران با توالی گزارش شده P18103 و در موقعیت شماره ۴۱ بدلیل تغییر اسید آمینه اسپاراتیک به گلوتامیک مشاهده شد. از آنجایی که اسیدهای آمینه مذکور از نظر خواص فیزیوشیمیایی به هم بسیار شبیه‌اند و همچنین موقعیت اسید آمینه شماره ۴۱ نقشی در عملکرد اتصالی پروتئین FanC ندارد، این جایگزینی تغییری در ساختمان و عملکرد این پروتئین نخواهد داد. با در نظر گرفتن این موضوع در نهایت ترجیح داده شد از توالی نوکلئوتیدی مربوط به توالی استاندارد پروتئین FanC برای این مطالعه استفاده گردد.

**تأیید ترانسفورماسیون باکتری BL21 با استفاده از پلاسمید pET28a:** پس از انجام PCR بر روی کلونی‌های ترانسفورمه شده یک قطعه حدود ۷۰۰ بازی (شامل قطعه کلون شده به طول ۵۱۳ جفت باز و قسمت ابتدایی ناحیه مربوط به کلونینگ پلاسمید به طول ۱۸۸ جفت باز) بدست آمد که نشان دهنده موفقیت آمیز بودن ترانسفورماسیون بود.

**القای بیان کلون‌های انتخابی و تأیید و تخلیص پروتئین بدست آمده:** پس از الکتروفورز پلت باکتری‌های القا شده و باکترهای کنترل بر روی ژل اکریلامید، یک باند پروتئینی با غلظت بالا به وزن حدود ۲۱ kD در باکتری‌های القا شده وجود داشت که در باکترهای القا نشده موجود نبود (تصویر ۱). همچنین وزن مولکولی قطعه بدست آمده با وزن پیش بینی شده منطبق بود.

آزمون وسترن بلا تینگ نشان داد که پادتن مونوکلنال علیه FanC به صورت اختصاصی به این قطعه پروتئینی متصل می‌شود و بنابراین پروتئین تولید شده همان قطعه مورد نظر FanC است (تصویر ۲).

در مرحله بعدی با استفاده از Ni-NTA Agarose در شرایط دناتورینگ، پروتئین FanC با خلوص بالا به دست آمد (تصویر ۲). پس از اندازه گیری با روش اسپکتروفتومتری غلظت پروتئین به دست آمده در حدود ۳/۵ mg/L کشت باکتریایی است.

## بحث

با وجود پیشرفت صنعت گاو شیری در زمینه‌هایی مثل مدیریت گله،

مقداری از کشت بدون اضافه کردن IPTG به عنوان کنترل القا استفاده شد. از نمونه‌های بدست آمده با استفاده از سانتریفیوژ (۴۰۰۰ rpm به مدت ۸ دقیقه) رسوب تهیه گردید و رسوب و مایع رویی بدست آمده در منفی °C ۲۰ تا زمان انجمان SDS-PAGE نگهداری شد.

**الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید:** الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دو سدیل سولفات (SDS-PAGE) بر اساس روش لاملی (۲۵) در ژل جداکننده ۱۶٪ و ژل متراکم کننده ۵٪ تحت شرایط احیایی انجام شد. یک حجم نمونه سوسپانسیون باکتری به یک حجم بافر نمونه افزوده شد و ده دقیقه در آب جوش قرار گرفت. ۱۰ تا ۱۲ از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه و ابتدا در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت و سپس ۱۳۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی آبی R-۳۵۰ (فارماسیا) رنگ آمیزی شد. وزن مولکولی پروتئین فیمبریه F5 توسط مارکر پروتئینی استاندارد با وزن مولکولی مشخص تعیین گردید.

## خالص سازی پروتئین با استفاده از Ni-NTA Agarose در شرایط دناتورینگ:

به علت نامحلول بودن پروتئین نو ترکیب به دست آمده، تخلیص پروتئین به روش کروماتوگرافی جذبی بر روی نیکل (-Ni NTA) در شرایط دناتورینگ صورت پذیرفت. ابتدا رسوبات حاصل از کشت باکتری recFanC-BL21 با استفاده از بافر B لیز گردید. برای تکمیل فرآیند لیز کردن از دوبار فریز و یخ زدایی و همچنین سونیکاسیون (ده بار، هر بار به مدت یک دقیقه) نیز استفاده شد. سپس سوسپانسیون به دست آمده سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰g، ۳۰ دقیقه) گردید. در ادامه مایع رویی با مقدار مناسب Ni-NTA Agarose از مخلوط گردید و به مدت یک ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. سپس مخلوط ذکر شده در یک سرنگ پلاستیکی حاوی فیلتر ریخته شد و با باز کردن درب سرنگ مایع موجود تخلیه و در مرحله بعدی آگارز باقی مانده با استفاده از بافر C دو بار شستشو گردید. در مرحله بعدی برای جدا کردن پروتئین نو ترکیب ابتدا از بافر D و سپس بافر E که دارای pH متفاوت می‌باشند استفاده شد. کلیه مراحل تخلیص بر طبق پروتکل The QIAexpressionist شرکت Qiagen آلمان انجام گرفت و پس از هر مرحله مقداری از نمونه برای الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید به روش ذکر شده در نظر گرفته شد.

## وسترن بلا تینگ:

برای تأیید فیمبریه نو ترکیب از آزمون وسترن بلا تینگ استفاده شد. ابتدا فیمبریه خالص شده به همراه سوسپانسیون باکتری recFanC-BL21 القا شده و نشده در ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند. پس از انجام الکتروفورز، انتقال پروتئین‌ها به غشای PVDF با استفاده از دستگاه براساس دستورالعمل پیشنهادی دستگاه صورت گرفت. غشای PVDF پس از خروج از دستگاه به مدت یک ساعت در بافر بلاکینگ حاوی PBS و Tween (۰/۵٪) قرار داده شد و سپس از محلول بلاکینگ خارج و به مدت نیم ساعت در بافر بلاکینگ حاوی Skim milk (۵٪) قرار گرفت. از پادتن مونوکلنال ضد فیمبریه F5 ساخت شرکت

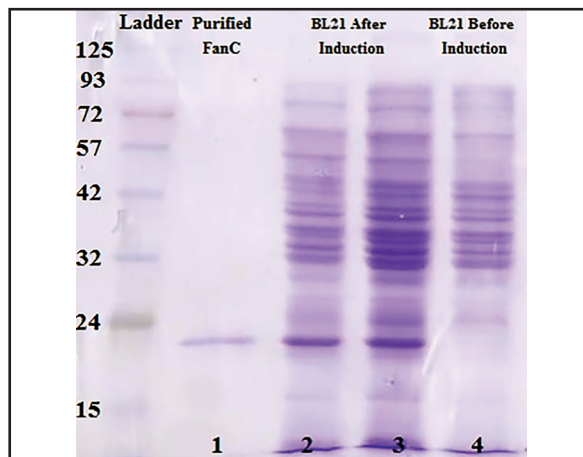


انتروتوکسیژنیک F5 مثبت ایجاد خواهد شد.

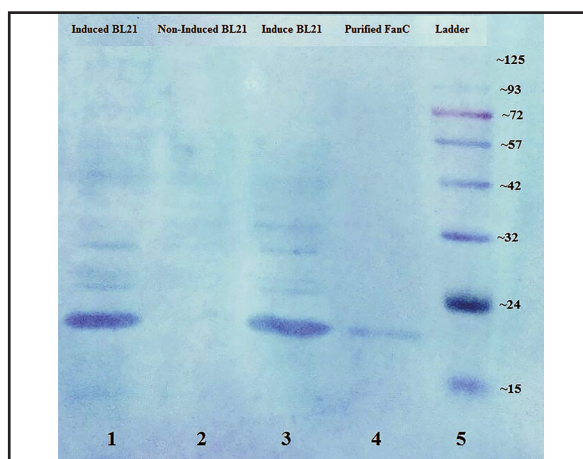
در مطالعه حاضر از سیستم بیانی باکتری شریشیاکلی استفاده گردید که یکی از پرکاربردترین روش‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است. از خصوصیات این سیستم بیانی پروکاریوتی می‌توان به مقرون به صرفه بودن، آسان و سریع بودن تولید و همچنین راحت تر بودن بررسی آنتی ژنیک پروتئین نو ترکیب اشاره کرد (۱۶). سویه BL21(DE3) به کار برده شده در این تحقیق از جمله سویه‌های ناکارآمد و دارای نقص در تولید پروتئین‌ها است. استفاده از این سویه‌ها به دلیل کاهش اثر پروتئولیتیک سویه میزبان بر پروتئین نو ترکیب تولید شده دارای ارجحیت است (۲۳). یکی از نکات ضروری در افزایش تولید پروتئین نو ترکیب استفاده از حامل بیانی واجد پروموتوری با فعالیت بالا در سویه میزبان است (۲۸). با در نظر گرفتن این موضوع کلونینگ ژن FanC در وکتور بیانی pET28a انجام شد که دارای پروموتور TV باکتریوفاژ با فعالیت بالا در باکتری BL21(DE3) است. توانایی سیستم‌های مبتنی بر پروموتور TV در تولید پروتئین از ۱۰۰ تا ۱۰ mg در شرایط معمولی بسته به نوع پروتئین متغیر می‌باشد که در مطالعه حاضر غلظتی در حدود ۳/۵ mg به دست آمد. لازم به ذکر است که این نوع سیستم‌ها توانایی خوبی برای تطبیق با مقیاس‌های صنعتی و تولید انبوه دارند. از سوی دیگر وکتور pET28a دارای توالی His-Tag در قسمت N ترمنال است که به صورت کلی این توالی تأثیری بر ساختار پروتئین‌های نو ترکیب ندارد. وجود این قطعه تنها باعث تسهیل اتصال پروتئین تولید شده به ستون نیکل، که به منظور تخلیص آسان و موثر پروتئین‌ها استفاده می‌شود، می‌گردد (۲۶، ۲۴) و به این ترتیب تخلیص پروتئین FanC به صورت بهینه و موثری صورت می‌گیرد.

پروتئین نو ترکیب FanC در مطالعه حاضر به صورت گنجیدگی داخل سلولی در باکتری BL21 تولید گردید. از مزیت‌های تولید گنجیدگی این است که اولاً پروتئین نو ترکیب از آسیب‌های پروتئولیتیک در امان می‌ماند و ثانیاً این امکان وجود دارد که مقادیر نسبتاً خالص پروتئین نو ترکیب را با استفاده از سانتریفیوژ کردن به دست آورد و به این ترتیب خالص سازی را تسهیل کرد. نکته دیگر اینکه در روش‌ها و پلاسמיד‌هایی که منجر به تولید گنجیدگی می‌شوند معمولاً انتظار می‌رود پروتئین نو ترکیب بیشتری تولید گردد و به همین دلیل برای تولید آنتی ژن نو ترکیب که خالص سازی در شرایط دنا توره و داشتن ساختمان و عملکرد کامل پروتئین نو ترکیب چندان تأثیر گذار نیست توصیه می‌گردد. با در نظر گرفتن مطالب مورد اشاره، آزمون وسترن بلات در مطالعه حاضر نشان داد با وجود استخراج پروتئین نو ترکیب در شرایط دنا توری، آنتی بادی مونوکلنال تجاری بر علیه FanC کماکان توان شناسایی اپی توپ مربوطه را دارد و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تغییر ساختمانی در شرایط دنا توری اثر منفی بر خواص آنتی ژنی پروتئین نو ترکیب FanC نداشته باشد.

به منظور بررسی بهینه ترین شرایط برای تولید پروتئین نو ترکیب



تصویر ۱. الکتروفورز پروتئین نو ترکیب FanC تخلیص شده به وزن تقریبی ۲۱ kD (لاین شماره ۱). با کتری recFanC-BL21 بعد از القا با IPTG (لاین شماره ۳ و ۴) و قبل از القا (لاین شماره ۲).



تصویر ۲. نتایج وسترن بلا تیگ پروتئین تخلیص شده FanC: با کتری recFanC-BL21 بعد از القا با IPTG (لاین‌های شماره ۳ و ۴) و قبل از القا (لاین شماره ۲). پروتئین نو ترکیب تخلیص شده FanC (لاین شماره ۴). مارکر پروتئینی (لاین شماره ۵).

تاسیسات و امکانات نگهداری حیوانات، تغذیه و استفاده هدفمند از داروها مشکل اسهال گوساله به علت ماهیت چند عاملی آن هنوز حل نشده است (۲، ۲۰). تشخیص بیماری، ارزیابی پاسخ ایمنی در مادران و امکان انتقال پادتن محافظت کننده به نوزاد و همچنین واکنش‌های بر علیه کلی باسیلوز نیازمند در اختیار داشتن پادکن اختصاصی با خلوص بالا است. در این راستا، با توجه به اهمیت پادکن F5 (K99) جهت تهیه کیت‌های تشخیصی، ارزیابی و حتی ایمن سازی، تلاش نمودیم تا بخش مهم این پادکن (FanC) را با روش نو ترکیب تهیه کنیم. نتایج هم ردیفی توالی ترجمه شده ژن fanC سویه‌های ایران با توالی استاندارد فیمریه F5 که در پایگاه Uniprot ثبت گردیده (P18103) نشان داد که توالی FanC ساختاری بسیار حراست شده دارد. عدم وجود تغییرات حایز اهمیت در توالی اسیدهای آمینه و تشابه آن در سویه‌های متعدد این مزیت را دارد که در صورت استفاده از آن در ترکیب واکسن ایمنی بر علیه تمامی سویه‌های



## References

1. Brockstedt, D.G., Bahjat, K.S., Giedlin, M.A., Liu, W., Leong, M., Luckett, W., Gao, Y., Schnupf, P., Kapadia, D.G., Castro, J.Y., Lim, H., Sampson-Johannes, A., Herskovits, A.A., Stassinopoulos, A., Archie, H.G., Bouwer, J. E., Hearst, D., Portnoy, A., Cook, D.N., Dubensky Jr., T.W. (2005) Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. *Nature Medicine*. 11: 853-860
2. Cho, Y.I., Yoon, K.J. (2014) An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci*. 15: 1-17.
3. Rousseau, C. (2002) *Pathologie du veau*. Actéto. Paris, France, (2<sup>nd</sup> ed.) Frances Morris. p. 6.
4. Carson, M., Johnson, D.H., McDonald, H. (2007) Brouillette C, Delucas LJ. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 63:295-301.
5. De Graaf, F.K., Krenn B.E., Klaasen, P. (1984) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. *Infect Immun*. 43: 508-514.
6. van Embden, J.D.A., de Graaf, F.K., Schouls, L.M., Teppema, J.S. (1980) Cloning and expression of a deoxyribonucleic acid fragment that encodes for the adhesive antigen K99. *Infect Immun*. 29: 1125-1133.
7. Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moon, H.W., (1998) Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol*. 36: 1795-1797.
8. Francis, D.H., Ryan, C.J., Fritzscheier, J.D. (1983) Effect of sodium acetate on expression of K99 pili by *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 41: 1368-1369.
9. Francis, D.H. (1986) Effect of amino acids on expression of K99 adherence pili by *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*. 11: 117-123.
10. Ghaemmaghami, S.H., Pourbakhsh S.A., Goodarzi, H., Ebrahimi, K., (2005) Survey of F5 fimbriae in *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves in arak city (Iran) Pajouhesh& Sa-

توصیه شده است که پلاسמידهای مختلف سیستم pET به همراه وکتورهای متنوع باکتریایی مورد بررسی قرار گیرد. در این زمینه نصیری و همکاران در سال ۲۰۱۶ ژن پروتئین FanC را در وکتور pET۳۳a (+) کلون کرده و اقدام به بیان آن در باکتری (CodonPlus (DE۳-E.coli BL۲۱) نموده اند (۲۱). از مشخصات قابل ذکر در مطالعه مورد اشاره، تولید پروتئین به صورت غیر گنجدگی و متعاقبا استخراج آن تحت شرایط غیر دناتورینگ می باشد و از این جهت با مطالعه حاضر تفاوت دارد. متاسفانه به دلیل نحوه مبهم تأیید پروتئین نوترکیب FanC (استفاده از روش دات بلاتینگ به جای وسترن بلاتینگ) در مطالعه نصیری، امکان مقایسه یافته ها وجود ندارد (۲۱).

نتایج الکتروفورز اکریلامید و وسترن بلاتینگ نشان داد که پروتئین FanC به طور پیوسته و در مقدار مناسب در باکتری pET۳۳a بیان شده است. این نکته از این جهت حایز اهمیت است که در کشت معمولی سویه های شیشیا کلی انتروتوکسیژنیک به دلیل اثر مهارى شناخته شده اجزای محیط شامل منابع کربنی (پيروات، آرابینوز، لاکتوز و گلوکز)، بعضی از اسیدهای آمینه (آلانین، متیونین، لوسین، والین) و همینطور اکسیژن دهی و مرحله رشد باکتری بر بیان فیمبریه F۵، تنها مقادیر اندکی از این فیمبریه تولید می شود (۸،۹،۱۳). از سوی دیگر با توجه به عوامل ذکر شده، مقادیر فیمبریه تولید شده می تواند متغیر باشد که این امر برای تولید انبوه این پروتئین به هیچ عنوان مطلوب نیست.

سویه نوترکیب تهیه شده در مطالعه حاضر با توجه به مزیت های آن و دانش موجود می تواند به روش های متنوعی در آینده به عنوان پادگن تشخیصی و یا واکسن بر علیه کلی باسیلوز گوساله مورد استفاده قرار گیرد و این امر می تواند کمک شایانی به روند دستیابی به واکسنی موثر نماید. به عنوان مثال علاوه بر اینکه پروتئین نوترکیب FanC تولید شده توسط این سویه می تواند به عنوان واکسن تحت واحد به همراه ادجوانت مناسب استفاده شود، این امکان نیز وجود دارد که سویه ذکر شده بوسیله اشعه فرابنفش یا گاما غیر فعال شده و به عنوان واکسن کشته استفاده گردد. مزیت این روش این است که به دلیل حذف مرحله استخراج و خالص سازی پروتئین نوترکیب F۵، تهیه واکسن آسانتر و مقرون به صرفه تر خواهد بود و همچنین مطالعات گذشته نشان داده است که این نوع واکسن به دلیل داشتن عوامل مشوق ایمنی مربوط به باکتری می تواند بدون نیاز به ادجوانت پاسخ ایمنی ایجاد کند (۱،۱۲).

## تشکر و قدردانی

هزینه های این طرح از بودجه طرح کلان واکسن در بخش تولید دانش فنی واکسن کلی باسیلوز گوساله تأمین شده است.



- zandegi. (In Persian) 67: 87-91.
11. Ghanbarpour, R., Khalili, M., Molaei, M.M., Peshdar, M., (2008) Frequency of K99 factor in *E.coli* strains isolated from healthy and diarrheic calves. Iran Vet J. (Shahid Chamran University). 3: 58-65.
  12. Huang, C.P., Liu, Y.T., Nakatsuji, T., Shi, Y., Gallo, R.R., Lin, S.B., Huang, C.M. (2008) Proteomics integrated with *Escherichia coli* vector-based vaccines and antigen microarrays reveals the immunogenicity of a surface sialidase-like protein of *Propionibacterium acnes*. Proteomics Clin Appl. 2: 1234-1245.
  13. Isaacson, R.E. (1980) Factors affecting expression of the *Escherichia coli* pilus K99. Infect Immun. 28: 190-194.
  14. Lotfollahzadeh, S., Ziaei daroonkolai, N., Zahraei Salehi, T., Poorbakhsh, S.A., Mokhber Dezfouli, M.R., Afshari, G.H. R. (2004) A study on presence of *Escherichia coli*, Coccidia and Cryptosporidium in stool samples of under one month age diarrheic calves in Ghaemshahr and Babol and antibiotic sensitivity of isolates. J Fac Vet Med Uni Tehran. 59: 131-136.
  15. Jacobs A.A.C., Simons L.H., de Graaf F.K. (1987) The role of lysine-132 and arginine-136 in the receptor-binding domain of the K99 fibrillar subunit. EMBO J. 6: 1805-1808.
  16. Jana, S., Deb, J.K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 67: 289-298.
  17. Lee, J.H., Isaacson, R.E. (1995) Expression of the gene cluster associated with the *Escherichia coli* pilus adhesin K99. Infect Immun. 63: 4143-4149.
  18. Morshedi, A., Rabbani, M., Zahraei Salehi, T., Rezazadeh, F., Taghipoor-Bazargani, T. (2010) Evaluation of antibodies levels against *Escherichia coli*, rotavirus and coronavirus in the colostrum of non-vaccinated cows in southern Tehran, Iran. Int J Vet Res. 4: 217-219.
  19. Mousakhani, F., Badiei, A., Asadi, A., Asadi H., Shaghayegh, A., Zafari, M. (2012) Identification of Rota virus, Corona virus, *E.coli* (K99), Cryptosporidium and Salmonella in calf diarrhea syndrome in cattle farms of Tehran. Vet Clin Invest. 3: 1-10.
  20. Nagy, B., Fekete, P.Z. (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. Vet Res. 30: 259-284.
  21. Nasiri, K., Nassiri, M., Tahmoorespur, M., Haghparast, A., Zibae, S. (2016) Cloning, sequencing, and expression of FanC antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. G3M. 13: 4112-4119.
  22. Rabbani, M., MoKhber-Dezfuli, M.R., Zahraei-Salehi, T., Yoosefi-Ramandi, A., Bahonar, A.R., Rezazadeh, F. (2007) Detection of anti-*E.coli*, rota virus and corona virus antibodies in sera samples of diarrheic and normal calves under 1 month of age. J Vet Res. 62: 145-149.
  23. Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol. 5: 172.
  24. Rosenberg, I.M., Packman, L.C. (1998) Protein analysis and purification, benchtop techniques. Protein Sci. 7:806.
  25. Simons B.L., Rathman P., Maij C.R., Oudega B., de Graaf F.K. (1990) The penultimate tyrosine residue of the K99 fibrillar subunit is essential for stability of the protein and its interaction with the periplasmic carrier protein. FEMS Microbiol Lett. 55:107-112.
  26. Saluta, M., Bell, P.A. (1998) Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli*. Life Sci News. 1:1-3
  27. Shams, Z., Tahamtan, Y., Kargar, M., Hoseini, S.M.H., Pourbakhsh, S.A. (2010) Isolation and antibiotic sensitivity of *E. coli* K99 isolates from diarrheic calves at Fars province. J Microb World. 2(4): 256-260.
  28. Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol. 189: 113-130.



## Production of Recombinant FanC of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Associated with Calf Diarrhea

Tabatabaei, S.<sup>1</sup>, Nikbakht Borojeni, Gh.<sup>1\*</sup>, Tebyanian, M.<sup>2</sup>, Zainel, Kh.<sup>1</sup>, Jalali, S.A.H.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Immunology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

<sup>3</sup>Department of Natural Resources, Institute of Biotechnology & Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received 4 November 2017, Accepted 9 January 2018)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Diarrhea is a common disease in the neonate calf which imposes significant economic burden on cattle industry around the world. During the first week after birth, Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) strains carrying F5 fimbria are one of the most important pathogens causing calf diarrhea. F5 fimbria is involved in early stage of pathogenesis and is responsible for attachment of bacteria to enterocytes; this attachment is mediated by FanC protein of F5 fimbria. Antibodies directed against F5 fimbriae play a significant role in prevention and control of the disease. **OBJECTIVES:** Evaluation and expression of recombinant expression of F5 Fimbriae of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* associated with calf diarrhea. **METHODS:** In the present study, the fanC region of F5 fimbria was cloned in a pET28a plasmid. **RESULTS:** The recombinant construct was confirmed by sequencing and protein production in *Escherichia coli* BL21 (DE3) was evaluated by western blotting procedure. **CONCLUSIONS:** Based on our findings, the recombinant FanC protein or the BL21 (DE3) strain are suitable candidates to develop an effective vaccine against calf colibacillosis or use in a diagnostic kit for F5+ ETEC.

**Keyword:** Cloning, Recombinant F5 Protein, Bovine Enterotoxigenic *E.coli*

### Figure Legends and Table Captions

**Figure 1.** Electrophoretic protein separation of recombinant FanC(Lane 1), recFanC-BL21 after (Line 2, 3) and before (line 4) induction of BL21 (DE3) using IPTG.

**Figure 2.** Western blotting analysis of FanC expression; recFanC-BL21 after induction of using IPTG (Line 1 and 3), before induction (Line 2) and purified protein (Line 4). Protein Ladder (lane 5).



\*Corresponding author's email: [nikbakht@ut.ac.ir](mailto:nikbakht@ut.ac.ir), Tel: 021-61117057, Fax: 021-66427517

J. Vet. Res. 73, 2, 2018