



کلون و بیان پروتئین حدت CFP-10 مایکوباکتریوم بویس سویه AN5

رضا عارف پژوهی^۱، تقی زهرائی صالحی^۱، نادر مصوری^۲، زهرا صالحی نجف آبادی^۳، رامک یحیی رعیت^۱

^۱ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ بخش تحقیق و تولید توپرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

^۳ بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۹، تاریخ پذیرش: ۱۰ آذر ماه ۱۳۹۹



10.22059/jvr.2019.281406.2932

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.1.14.2>

چکیده

زمینه مطالعه: سل گاوی به وسیله گونه مایکوباکتریوم بویس ایجاد می شود و اثرات مهمی در بهداشت عمومی و اقتصادی از جمله تجارت حیوانات و تولید دارد. برنامه کنترل مرسوم براساس آزمایش پوستی و کشتار گاوهای آلوده به سل است. علی رغم اعتماد به این آزمایش، واکنش های مثبت کاذب از معایب آن به شمار می رود که جهت رفع آن استفاده از پروتئین هایی با ویژگی بالاتر توصیه می گردد.

هدف: مطالعه حاضر به منظور کلون، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب CFP-10 به عنوان آنتی ژن مایکوباکتریوم بویس صورت گرفت.

روش کار: ژن پروتئین CFP-10 با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره پلی مرز تکثیر شد. محصول واکنش پس از هضم توسط دو آنزیم *EcoRI* و *HindIII* در وکتور pET23a(+) کلون شد و بعد از ترانسفورماسیون در سلول *E. coli* DH5α تکثیر گردید. پس از الحاق و تعیین توالی، وکتور کلون شده در سلول بیانی BL21 *E. coli* ترانسفورم شد. جهت القاء، از ایزوپروپیل-دی-بتا-تیوگالاکتوپیرانوزید استفاده گردید. جهت انحلال اجسام توده ای در پلت سلولی از اوره ۸ مولار استفاده شد. پس از تخلیص پروتئین نوترکیب با رزین نیکل، حذف اوره با گرادیان کاهنده انجام گرفت.

نتایج: صحت کلون ژن CFP-10 با تعیین توالی اثبات گردید. بیان پروتئین CFP-10 با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی اختصاصی با وسترن بلاتینگ اثبات شد. نتایج تعیین توالی ژن در کنار وسترن بلاتینگ، حاکی از آن بود که پروتئین نوترکیب بدست آمده در وزن مولکولی حدود ۱۰ کیلو دالتون به خوبی بیان و تخلیص گردیده است.

نتیجه گیری نهایی: نتایج نشان داد که ژن *cfp-10* به خوبی در سیستم پروکاریوتی کلون، بیان گردید و پروتئین CFP-10 می تواند جهت مطالعات بیشتر در تولید کیت های تشخیصی علیه سل گاوی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: CFP-10، مایکوباکتریوم بویس، پروتئین نوترکیب، کلون، بیان

کپی رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: تقی زهرائی صالحی، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیکی: tsalehi@ut.ac.ir

مقدمه

پیشگیری این بیماری، مبتنی بر سیاست آزمایش پوستی توپرکولین و کشتار گاوهای واکنش مثبت گله است (۱۲).

در ایران سال ها تست توپرکولین مقایسه ای با استفاده از (Protein Purified Derivative) PPD تهیه شده در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، به عنوان آزمایش غربالگری

سل گاوی که عامل آن مایکوباکتریوم بویس می باشد گونه ای است که بالاترین توانایی ایجاد بیماری سل را در طیف وسیعی از میزبان ها و عمدتاً گاو دارد. پیامدهای ابتلاء به سل گاوی شامل کاهش تولید، مرگ زودرس گاوهای مبتلا و خسارات اقتصادی شدید در گله های آلوده می باشد. استراتژی عمده در کنترل و

توبرکولین و مالئین موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی جهت استخراج DNA استفاده گردید. سلول‌های DH5 α و BL21 از بخش تولید واکسن تب برفکی و پلاسمید pET23a(+) از بخش بیوتکنولوژی تأمین گردید. سنتز پرایمرها و همچنین تعیین توالی ژن‌های کلون شده، توسط شرکت Macrogen کره جنوبی صورت گرفت. آنزیم‌های محدود کننده *HindIII* و *EcoRI* همچنین رزین Ni-NTA از شرکت Thermo Fisher Scientific تهیه شد. برای استخراج پلاسمید، از دو کیت ساخت شرکت Roche و MBST استفاده شد. دیگر مواد مولکولی مصرفی از دو شرکت Sinaclone و Sigma تأمین گردید.

کشت باکتری و استخراج DNA ژنومی: باکتری مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 در محیط اختصاصی لوانشتاین جانسون پیرووات دار کشت داده شد و به مدت ۶ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. تحت شرایط ایمن از پرگنه‌های باکتری به میزان یک لوپ کامل برداشته شد و پس از غیر فعال سازی باکتری به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، عملیات استخراج DNA با استفاده از روش Van Soolingen و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام گرفت (۱۶).

طراحی پرایمرهای اختصاصی حاوی مناطق برش خورده و انجام عملیات PCR: توالی ثبت شده ژن *cfp-10* از پایگاه Bovilist انستیتو پاستور اخذ گردید. برای پرایمرهای بالادست و پائین دست، جایگاه برش آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* در نظر گرفته شد. طراحی پرایمرها توسط نرم افزار Vector NTI Advance 11 صورت پذیرفت و توسط شرکت Macrogen کره جنوبی سنتز گردید. توالی پرایمرهای ژن *cfp-10* که ۳۰۳ جفت باز را تشکیل می‌نماید، عبارت است از:

5' AGCTAGAATTCATGGCAGAGATGAAGACC3' (*EcoRI*)

5' CAGGAGCGTTTACCCGAAGTTCGAATTAT 3' (*HindIII*)

ترکیب اجزای تشکیل دهنده PCR با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به شرح ذیل صورت گرفت:

بافر PCR ۱۰X به میزان ۱۰ میکرولیتر، dNTP ۱۰ میلی‌مولار به مقدار ۲ میکرولیتر، DMSO (Dimethyl Sulfoxide) با حجم ۵ میکرولیتر، پرایمر بالادست و پائین دست هر کدام ۵ میکرولیتر، DNA الگو با مقدار ۱ میکرولیتر، pfu

قابل اعتماد در تشخیص گاوهای آلوده به طور موفقیت آمیزی استفاده شده است. با پیشرفت برنامه‌های ریشه‌کنی، تعداد واکنش‌های مثبت کاذب نیز افزایش می‌یابد. وجود آنتی‌ژن‌های مشترک فراوان بین گونه‌های مختلف مایکوباکتریایی مانند مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه آویوم، مایکوباکتریوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس و مایکوباکتریوم‌های محیطی که منجر به مداخله در تفسیر آزمایش می‌گردد و از معضلات عمده در شناسایی دام‌های آلوده در گله به شمار می‌رود، یکی از دلایل عمده ایجاد نتایج مثبت کاذب محسوب می‌شود. از سوی دیگر استفاده از حرارت و مواد شیمیایی در هنگام تولید توپرکلپروتئین باعث تغییراتی در آنتی ژنیسیته و ساختار PPD از جمله واسرشت شدن و از بین رفتن گروهی از پروتئین‌های ترش‌سبک وزن با ویژگی بالا می‌گردد که این پروتئین‌ها نقش مهمی در رابطه با پاسخ ایمنی سلولی ایفا می‌کنند (۵).

با توجه به ضعف‌های اشاره شده در بالا و به منظور کاهش ضررهای اقتصادی و اطمینان خاطر دامدار در برنامه‌های کنترلی، نیاز به آزمایش مجدد در گاوهای راکتور مثبت با تست‌های تکمیلی و یا انجام تست با پروتئین‌هایی که واجد حساسیت و ویژگی بالاتری هستند، ضروری به نظر می‌رسد.

پروتئین (The 10 KDa Culture Filtrate Protein) CFP-10، پروتئین ایمونوزن ترش‌سبک در سویه مایکوباکتریوم بویس می‌باشد که نقش آن از نظر حدت و آنتی‌ژن محافظتی نشان داده شده است. این ژن به طور مجزا توسط مناطق ژنی *esxB* (*cfp-10*) کد کننده پروتئین CFP-10 کد می‌گردد و در ناحیه RD1 (Region of Differentiation 1) مایکوباکتریوم بویس قرار دارند. ناحیه مذکور در مایکوباکتریوم بویس وحشی وجود دارد ولی در BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) و اکثر مایکوباکتریوم‌های محیطی وجود ندارد که از این خصوصیت می‌توان جهت تمایز دام‌های عفونی به مایکوباکتریوم‌های محیطی و یا گله آلوده از گله واکسینه شده با یون بهره برد (۱۷). نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند به عنوان پایه‌ای جهت مطالعات بیشتر در تولید کیت‌های تشخیصی الیزا علیه سل گاوی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش کار

سویه‌های باکتریایی، آنزیم‌ها و کیت‌های مصرفی: از سویه AN5 مایکوباکتریوم بویس موجود در بخش تحقیق و تولید

به منظور بیان پروتئین، پلاسمیدهای کلون شده در سلول بیانی *E. coli* BL21 مستعد شده ترانسفورم شد و بذر کاری به ارلن محتوی ۵۰ میلی لیتر محیط LB Broth حاوی آمبی سیلین افزوده شد. عمل هوادهی ارلن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۴۴ آرپی‌ام انجام گرفت. به محض رسیدن جذب نوری به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، قبل از افزودن ایزوپروپیل-دی-بتا-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، ۱ میلی لیتر نمونه زمان صفر برداشت گردید. جهت القاء بیان پروتئین از IPTG استفاده شد. به منظور بهینه‌سازی، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی مولار از IPTG در حجم نهایی محیط LB Broth محاسبه شد و فالكون‌ها در دمای ۳۷ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه و هوادهی شدند. از هر یک از فالكون‌ها در فواصل زمانی ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ دقیقه به میزان ۱ میلی لیتر نمونه برداری شد. مایع رویی و پلت باکتریایی هر یک از نمونه‌ها از نظر بیان پروتئین با ژل SDS-PAGE (۱۲-۴ درصد) با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند (۵).

استحصال پروتئین His-Tagged به فرم اجسام

توده‌ای با روش مکانیکی سونیکاسیون: با توجه به بیان پروتئین به شکل اجسام توده‌ای (Inclusion Body) در پلت سلولی، عملیات متلاشی نمودن سلول پس از شستشو با بافر نمکی در حضور PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) با امواج فراصوت (دامنه ۸۰، با فواصل زمانی ۱ دقیقه ضربان و ۱ دقیقه استراحت به مدت ۵ بار) صورت پذیرفت. برای محلول ساختن پروتئین غیر محلول از اوره ۸ مولار استفاده شد.

تخلیص: به منظور جداسازی پروتئین‌های نو ترکیب با

توالی His از رزین Ni-NTA استفاده گردید. تحت شرایط استریل ۱۰۰ میکرولیتر رزین به دو میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری افزوده شد و دو برابر حجم رزین از بافر متعادل کننده (بافر PBS 1X، همراه با ایمیدازول ۱۰ میلی مولار و اوره ۸ مولار با pH برابر ۷/۴) به رزین افزوده شد. پس از سانتریفیوژ، حجم مساوی از عصاره پروتئینی سونیکه شده با بافر متعادل کننده مخلوط شد و به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه به خوبی هم زده شد. میکروتیوب‌ها مجدداً سانتریفیوژ گردیدند. پس از جداسازی مایع رویی به رزین، ۱ میلی لیتر از بافر شستشو (بافر PBS 1X، همراه با ایمیدازول ۲۵ میلی مولار و اوره ۸ مولار با pH برابر ۷/۴) افزوده شد و پس از سانتریفیوژ، عملیات شستشو دو بار تکرار گردید. در نهایت به حجم رزین اولیه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر شستشو

پلی‌مراز با حجم ۰/۷ میکرولیتر، آب مقطر با مقدار ۷۱/۳ میکرولیتر.

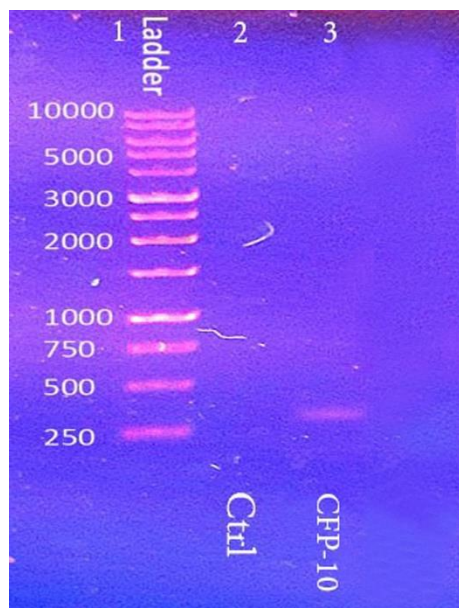
برنامه دمایی و زمان در دستگاه Eppendorf Gradient

به شرح زیر اجرا شد:

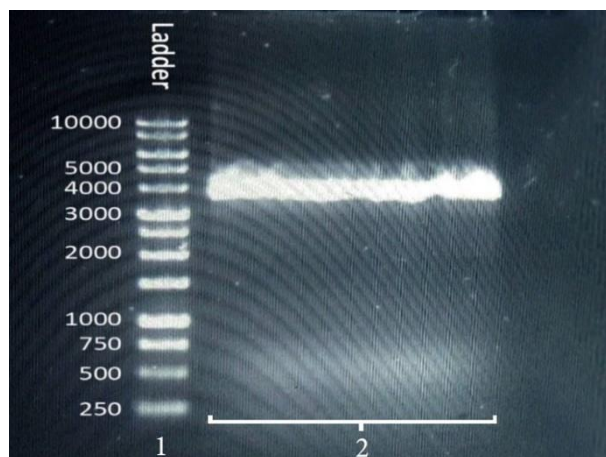
واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه یک چرخه، واسرشت‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط زنجیره ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکرار ۳۵ چرخه و در نهایت بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه یک چرخه انجام گرفت. ژن تکثیر یافته *cfp-10* در آگارز ۱ درصد در ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید. محصول PCR بدست آمده منطبق با دستورالعمل کیت PCR Product Purification ساخت شرکت Roche تخلیص شد.

کلونینگ و بیان ژن *cfp-10* در وکتور pET23a(+): به

منظور کلون نمودن ژن *cfp-10* در وکتور pET23a(+), هضم آنزیمی مضاعف محصول PCR با دو آنزیم محدود کننده *Hind III* و *EcoRI* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز صورت گرفت. هم‌زمان عملیات هضم آنزیمی مضاعف بر روی وکتور pET23a(+) نیز انجام شد. پلاسمید خطی شده پس از برش از روی ژل آگاروز، مطابق با دستورالعمل کیت PCR Product Purification ساخت شرکت Roche تخلیص شد. پس از ارزیابی کمی و کیفی صورت گرفته بر روی پلاسمید و محصول PCR هضم شده، با استفاده از نرم افزار NEB Ligation Calculator بهترین غلظت جهت عملیات الحاق محاسبه گردید. الحاق با استفاده از آنزیم T4 لیگاز در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز انجام گرفت. به منظور تکثیر، عملیات ترانسفورماسیون وکتور کلون شده در سلول مستعد *E. coli* DH5α با روش کلرید کلسیم سرد شده، صورت گرفت و سلول به محیط لوریا برتانی (LB Broth) حاوی غلظت مناسب آمبی سیلین (۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تلقیح شد. عملیات استخراج پلاسمید از سلول با روش لیز قلیایی انجام گرفت. غربال‌گری پلاسمیدهای این مطالعه با انجام کلونی PCR تأیید شد. جهت تأیید نهایی، تعیین توالی به صورت خوانش دو طرفه با پرایمرهای یونیورسال صورت گرفت. برای آنالیز توالی‌ها از نرم افزار Chromas Version 2.6.4 استفاده شد.



تصویر ۱. تکثیر ژن *cfp-10* مایکوباکتریوم بویس با تکنیک PCR. ۱- مارکر مولکولی استاندارد یک کیلو باز، ۲- کنترل منفی، ۳-باند ۳۰۳ جفت باز ژن *cfp-10*



تصویر ۲. هضم آنزیمی مضاعف پلاسمید pET23a(+). ۱- سایز مارکر استاندارد (Bioneer) یک کیلو باز، ۲- پلاسمید pET23a(+) خطی هضم شده مضاعف حدود ۴۰۰۰ جفت باز با آنزیمهای *HindIII* و *EcoRI*

شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید. نتایج حضور پلاسمید خطی شده با حدود ۴۰۰۰ جفت باز با خلوص و غلظت بالا را نشان داد. پس از برش ژل محتوی وکتور، پلاسمید از داخل ژل تخلیص گردید (تصویر ۲).

الحاق و تعیین توالی: تعیین توالی و آنالیز نرم افزاری پس

از عملیات الحاق بین ژن *cfp-10* با وکتور pET23a(+) حاکی از آن بود که هیچ گونه جهشی در ژن های کلون شده وجود ندارد و کلونینگ با موفقیت صورت گرفته است (تصویر ۳).

۲۵۰ میلی مولار (بافر PBS 1X، همراه با ایمیدازول ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی مولار و اوره ۸ مولار با pH برابر ۷/۴) افزوده شد و پس از سانتریفیوژ، مایع رویی جمع آوری شد و همین عملیات مجدداً با بافر شستشو ۴۰۰ میلی مولار تکرار شد. حذف اوره با استفاده از گرادیان کاهشی ۰، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ مولار اوره صورت گرفت. پروتئین های استحصالی با روش Lowry ارزیابی شدند (۹). آنالیز پروتئین ها با تکنیک SDS-PAGE (۱۲-۴ درصد) صورت گرفت. ژل با کوماسی بلو G-250 رنگ آمیزی گردید.

وسترن بلائینگ: به منظور تأیید بیان پروتئین CFP-10

از روش ایمونوبلائینگ استفاده شد (۱۳). به طور خلاصه، پس از الکتروفورز پروتئین نوترکیب تخلیص شده به روی ژل SDS-PAGE، ژل و کاغذهای واتمن و غشاء پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF) در کاست مخصوص قرار داده شدند. مجموعه به تانک محتوی ترانسفر بافر انتقال یافت. جریان با شدت ۴۰۰ میلی آمپر به مدت ۱ ساعت برقرار گردید. بلاک نمودن کاغذ PVDF با غوطه ور سازی کاغذ در محلول سرم آلبومین گاوی ۳ درصد به مدت ۱ ساعت انجام شد. پس از شستشوی کاغذ PVDF با بافر تریس نمکی (TBST)، آنتی بادی آنتی His tag ساخت شرکت Abcam با رقت ۱:۵۰۰۰ به مدت ۱ ساعت روی غشاء افزوده شد. کاغذ با بافر TBST شستشو گردید. سپس آنتی بادی ثانویه goat anti-Rabbit کنژوگه با HRP ساخت شرکت Abcam با غلظت ۱:۵۰۰۰ به غشاء افزوده شد و کاغذ به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه شیک گردید. غشاء پس از شستشو در مجاورت DAB یک درصد به همراه آب اکسیژنه ۳۰ درصد و PBS 1X به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت.

نتایج

تکثیر ژن پروتئینی *cfp-10* محصولات PCR بر روی

ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. نتایج، تکثیر ژن *cfp-10* با اندازه ۳۰۳ جفت باز را به خوبی نشان داد. به منظور پاک سازی محصول PCR از باقیمانده مواد، عملیات تخلیص با استفاده از کیت PCR Product Purification ساخت شرکت Roche انجام شد (تصویر ۱).

هضم آنزیمی مضاعف پلاسمید pET23a(+): به منظور

خطی شدن پلاسمیدهای استخراج شده، هضم با استفاده از آنزیم های برشی *EcoRI* و *HindIII* انجام شد و محصول هضم

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

60 sequence AACAGGAGAAATTCTCTAGAAATAATTTGTTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGG
0 CFP-10 -----
                                     EcoRI
120 Sequence CTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGGCAGAGATGAAGA
16 CFP-10 -----
                                     Atggcagagatgaaga
                                     *****
180 sequence CCGATGCCGCTACCCTCGCGCAGGAGGCAGGTAATTTGAGCGGATCTCCGGCGACCTGA
76 CFP-10 -----
                                     *****
240 sequence AAACCCAGATCGACCAGGTGGAGTCGACGGCAGGTTTCGTTGCAGGGCCAGTGGCGCGGCG
136 CFP-10 -----
                                     aaacccagatcgaccaggtggagtcgacggcaggttcgattgcagggccagtggcgcggcg
                                     *****
300 sequence CGGCGGGGACGGCCGCCAGGCCGCGGTGGTGCCTTCCAAGAAGCAGCCAATAAGCAGA
196 CFP-10 -----
                                     cggcgggacggccgccaggccggtggtgccctccaagaagcagccaataagcaga
                                     *****
360 sequence AGCAGGAACTCGACGAGATCTCGACGAATATTCGTCAGGCCGGCGTCCAATACTCGAGGG
256 CFP-10 -----
                                     agcaggaaactcgacgagatctcgacgaatattcgtcaggccggcggtccaataactcgaggg
                                     *****
420 sequence CCGACGAGGAGCAGCAGCAGGCGCTGTCTCGCAAATGGGCTTCAAGCTTGCGGCCGCAC
300 CFP-10 -----
                                     ccgacgaggagcagcagcaggcgctgtctcgcaaatgggcttcaagcttgcggccgcac
                                     *****
                                     HindIII
    
```

تصویر ۳. آنالیز ژن *cfp-10* پس از الحاق در پلاسمید pET23a(+)

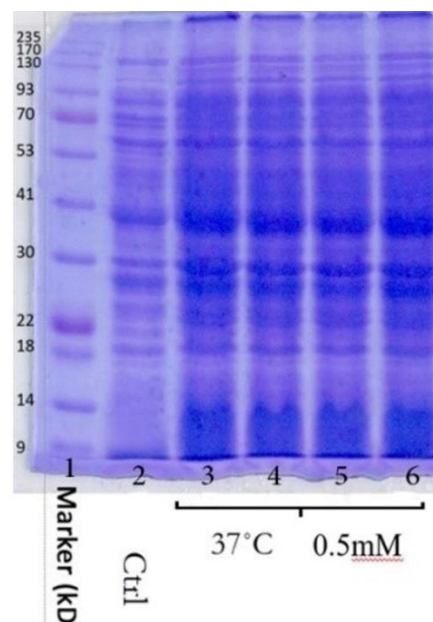
بیان پروتئین نو ترکیب CFP-10: بهترین بیان پروتئین

نو ترکیب CFP-10، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با غلظت ۰/۵ میلی مولار طی ۴ ساعت بدست آمد. آنالیز SDS-PAGE بیان موفقیت آمیز پروتئین نو ترکیب فوق را با اندازه مولکولی حدود ۱۰ کیلودالتون در پلت سلولی به خوبی نشان داد (تصویر ۴).

به منظور تأیید بیان پروتئین CFP-10، وسترن بلات ظهور باند مورد نظر و بیان پروتئین در محدوده ۱۰ کیلودالتون را تأیید کرد (تصویر ۵).

بحث

مایکوباکتریوم بویس باکتری ایجاد کننده سل گاوی است که تقریباً ۵۰ میلیون راس گاو را در سراسر جهان مبتلا کرده است و علاوه بر خسارات اقتصادی به دامدار و به مخاطره انداختن تجارت دام، به جهت زئونوز بودن در بهداشت عمومی اهمیت فراوانی دارد. علی رغم اینکه اکثریت دام های مبتلا به این بیماری در کشورهای توسعه نیافته زندگی می کنند، با این

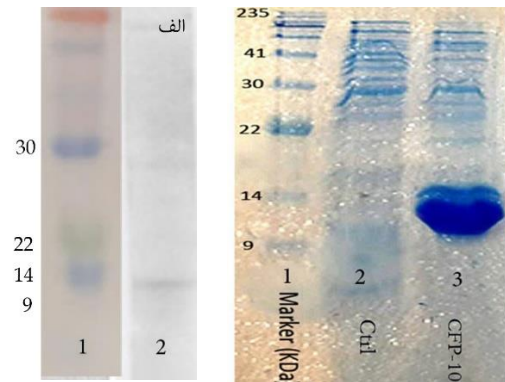


تصویر ۴. آنالیز SDS-PAGE پلت سلولی BL21 کلون شده حاوی پلاسمید pET23a(+)-CFP-10 در فواصل زمانی مختلف پس از القاء با IPTG. ۱- مارکر پروتئینی استاندارد (۱۷۰-۱۰ کیلودالتون)؛ ۲- پلاسمید کلون شده قبل از القاء با IPTG (کنترل)؛ ۳ الی ۶، CFP-10-pET23a(+). پس از القاء در فواصل زمانی ۱ تا ۴ ساعت.

BCG می‌گردد. دو پروتئین اخیر تقریباً برای کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس اختصاصی است و ژن آن‌ها در تمام سویه‌های مایکوباکتریوم توپرکلوزیس و مایکوباکتریوم بویس حاد وجود دارد، ولی در تمام سویه‌های BCG و بسیاری از گونه‌های محیطی مایکوباکتریومی حذف شده است. بنابراین CFP-10 می‌تواند به عنوان نامزد بالقوه در تشخیص زود هنگام، در کیت‌های تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد (۱۸).

در مطالعه صورت گرفته به منظور بیان این پروتئین از سیستم پروکاریوتیک استفاده گردید. علت استفاده از این سیستم از یک سو کسب حداکثر میزان بازده و از طرفی دیگر، عدم نیاز تغییرات پس از ترجمه پروتئین می‌باشد. در این مطالعه از وکتور pET23a(+) استفاده شد، به دلیل اینکه این وکتور ارزان و در دسترس می‌باشد. وکتور pET23a(+) دارای ۳۶۶۶ جفت باز است و مکان‌های برش آنزیمی متعددی در منطقه MCS (Multiple Cloning Site) خود از جمله *HindIII* و *EcoRI* دارد. انتخاب این دو آنزیم از این جهت صورت گرفت که ضمن در دسترس بودن، این دو آنزیم فاصله مناسبی را از جهت برش نسبت به یکدیگر دارند. همچنین وکتور دارای ساختار His-Tag با توالی CATCATCACCACCACCAT در C-ترمینال می‌باشد. توجه به این مساله حائز اهمیت است، چرا که در برخی موارد تولیدات ژنی خاص از قبیل پروتئین‌های نوترکیب بلند ممکن است در معرض خاتمه بیان پیش از بلوغ قرار گیرند که وجود ساختاری واجد توالی His در انتهای C باعث اطمینان یافتن از بیان کامل پروتئین می‌باشد (۵، ۱۴). بکارگیری ساختارهای واجد توالی His در مهندسی ژنتیک / شریشی‌کلی بسیار متداول است و عموماً آسان‌ترین راه برای بیان ژن محسوب می‌شود. از ویژگی‌های مهم این توالی عدم تأثیر بر روی ساختار و عملکرد پروتئین نوترکیب بیان شده، خنثی بودن آن در pH فیزیولوژی و ضعیف بودن خاصیت ایمونوژنیک آن می‌باشد که در نهایت وجود آن در کنار پروتئین بیان شده تأثیری در نتایج و ارزیابی‌های ایمنی حاصل نخواهد داشت. همچنین این Tagها باعث عدم تحرک پروتئین بر روی سطوح شلات کننده فلزی مثل Ni می‌شوند که در تخلیص پروتئین کاربرد فراوان دارد (۵).

به منظور بهینه سازی بیان، آنالیز نمونه‌ها در دوره‌های زمانی انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که القاء با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار از IPTG طی ۴ ساعت بهترین میزان بیان را نشان داد. اندازه‌گیری جذب نوری سلول کلون شده در طول موج ۶۰۰ نانومتر نشان داد



تصویر ۵. الف: تخلیص پروتئین CFP-10 با رزین نیکل (۱-مارکر پروتئینی استاندارد (شرکت سیناکلون)، ۲- کنترل، ۳- پروتئین تخلیص شده CFP-10)؛ ب: تأیید پروتئین نوترکیب CFP-10.

وجود این بیماری در کشورهای توسعه یافته هنوز هم وجود دارد (۱۲).

استراتژی اصلی و فراگیر مراقبت از بیماری مبتنی بر سیاست آزمایش و کشتار است (۴)، اما تست پوستی خیلی حساس نیست و تنها ۱/۳ حیوانات آلوده ضایعات گرانولوماتوز را نشان می‌دهند، ضمناً گرانولومای کوچک ممکن است زمانی قابل مشاهده باشد که در غدد لنفی برش‌های نازک زده شوند. علاوه بر این در برخی حیوانات واکنش مثبت، ضایعه قابل مشاهده‌ای در بررسی کشتارگاهی مشاهده نمی‌شود و گزارش کشت عقده لنفی آن‌ها از نظر مایکوباکتریوم بویس در اکثر موارد منفی است. با پیشرفت برنامه‌های کنترل سل گاوی و ریشه‌کنی آن، تعداد گاوهای راکتور مثبت افزایش می‌یابد که از چالش‌های اصلی در کنترل و ریشه‌کنی برنامه‌های کشوری است (۱۲). لذا بهره‌گیری از تست‌های تکمیلی یا پپتیدهایی با ویژگی بالاتر در تست توپرکلوزین، میزان راکتور مثبت کاذب را کاهش خواهد داد. با پیشرفت علم ژنتیک و شناسایی ژنوم مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا، استفاده از آنتی‌ژن‌های پروتئینی در تشخیص و تولید واکسیناسیون تحت واحدی بیشتر و کامل‌تر شده است (۱۰). هدف از این مطالعه، کلون و بیان پروتئین نوترکیب CFP-10 مایکوباکتریوم بویس جهت بهبود ویژگی تست غربال‌گری است.

از نظر متابولیسمی در فاز فعال یا اولیه عفونت، مایکوباکتریوم‌های فعال، پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم و ایمنی‌زایی بالا، مانند CFP-10 ترشح می‌کنند که در محیط کشت فیلتر شده مایکوباکتریوم بویس شناسایی می‌شوند. این آنتی‌ژن‌ها باعث تحریک پاسخ اینترفرون گاما در حیوانات واکنش مثبت و مسلولین و نه در افراد واکسن خورده با

در تحقیق Ting و همکاران در ۲۰۱۳، ترکیب پپتیدهای ESAT-6، CFP-10 و TB10.4 در تست پوستی در گاوهای آلوده به مایکوباکتریوم بویس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که این ترکیب توانایی تمایز بین مایکوباکتریوم بویس از مایکوباکتریوم آویوم را دارد و نتایج آن همبستگی بالایی با تست توبرکولین و گاما اینترفرون داشت (۱۹).

در مطالعه Tashakkori و همکاران در سال ۲۰۱۶، پروتئین‌های نوترکیب ESAT-6 و MPT-64 مایکوباکتریوم بویس، به منظور ارزیابی تشخیصی در دام‌های آلوده به روش الیزا مورد استفاده قرار گرفتند. بر همین اساس حساسیت و ویژگی کسب شده در رقت ۱:۱۰ از نمونه‌های سرمی به ترتیب برای ESAT6 ۹۲/۱۵ و ۸۹/۲۴ درصد و برای MPT-64 به ترتیب ۹۴/۱۱ و ۹۱/۴۰ درصد محاسبه گردید. نتایج حاکی از آن بود که دو پروتئین فوق با دقت نسبتاً قابل قبولی توانستند نمونه‌های سرمی دام‌های بیمار را از سرم دام‌های سالم تمیز دهند (۱۵).

با توجه به نتایج امیدبخشی که اخیراً با استفاده از این پروتئین نوترکیب در آزمایشات بالینی داوطلبین انسانی جهت تشخیص بیماری سل مورد استفاده قرار گرفته است (۸،۱۴)، می‌توان به استفاده از CFP-10 در بهبود تشخیص سل دامی با هدف افزایش ویژگی امیدوار بود.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از جناب آقای دکتر اسماعیل‌زاد که کمک شایان و قابل توجهی را بابت در اختیار گذاشتن تجهیزات و مواد آزمایشگاهی در طول پروژه داشتند، اعلام می‌نمایم. این مقاله بخشی از پایان نامه دکترای تخصصی باکتری‌شناسی است و با حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انجام گرفته است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

که با گذشت زمان از سرعت رشد سلول‌های میزبان کاسته می‌شود که این امر می‌تواند به دلیل افزایش تقاضای متابولیسی سلول میزبان به واسطه نسخه برداری بالا در جهت ترجمه پروتئین‌های نوترکیب باشد (۱۳).

نتایج وسترن بلات با آنتی‌بادی مونوکلونال موید تعیین توالی صحیح ژن کلون شده و از سوی دیگر تأیید کننده بیان قابل قبول پروتئین‌ها در میزبان پروکاریوت بود و از این جهت می‌توان نتیجه گرفت که روش بکار رفته مطلوب می‌باشد و ساختار پپتیدی تا حد بسیاری حفظ شده است.

Asadi و همکاران در سال ۲۰۰۹، کلون و بیان ژن *esat-6* مربوط به ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که ژن فوق در پلاسמיד pQE30 به خوبی کلون گردید و بیان آن در سلول M15 با موفقیت همراه بود که این موضوع نشان می‌دهد، استفاده از پلاسמיד و سلول بیانی متفاوت نیز می‌تواند به شکل موفقیت آمیزی برای کلون و بیان ژن‌های مشابه مورد استفاده قرار گیرد که این امر با مطالعه حاضر نیز هم‌خوانی دارد (۱).

Buddle و همکاران در سال ۲۰۰۳، تعدادی از آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریال شامل MPB83، MPB70، MPB64، MPB59، ESAT-6 و CFP-10 در تست گاما اینترفرون بر روی حیوانات غیر آلوده، حیوانات واکسینه شده با یون و راکتور مثبت با PPD را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که استفاده از دو ترکیب آنتی‌ژنی ESAT-6 و CFP-10، میزان راکتورهای مثبت کاذب را به طور معنی‌داری در میان گاوهای آلوده کاهش دادند که این نتایج در مقایسه با سایر آنتی‌ژن‌ها، فراوانی بالاتری از تشخیص گاوهای آلوده را در بر می‌گرفت (۳).

Jones و همکاران در سال ۲۰۱۲، مطالعه‌ای به منظور بهبود تست پوستی در تشخیص افتراقی گاوهای آلوده به مایکوباکتریوم بویس و واکسینه با BCG انجام دادند. در این مطالعه ابتدا کوکتل پروتئینی ESAT-6، CFP-10 و Rv3615c تزریق شد که نتیجه آن ایجاد پاسخ‌های قابل تشخیص در ۱۲ حیوان از ۱۶ راس بود (۶).

References

- Asli, E., Taghizadeh, M., Rezaei Mokaram, A., Ebrahimi, S.M., Zavarani Hoseini, A., Tebianian, M. (2009). Cloning and expression of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 in prokaryotic system. Arch Razi inst. 64(1), 1-7. <https://doi.org/10.22092/ARI.2009.103800>
- Bpriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., Maertens, B. (2015). Purification of His-tagged proteins, Methods

- Enzymol, 559, 1-15. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003> PMID: 26096499
3. Buddle, B.M., McCarthy, A.R., Ryan, T.J., Pollock, J.M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Andersen, P., de Lisle, G.W. (2003). Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Vet Rec*, 15, 615-620. PMID: 14653340
 4. Esmaeili, H., Tajik, P., Ekhtiyarzadeh, H., Bolourchi, M., Hamed, M., Khalaj, M., Amiri, K. (2012). Control and eradication program for bovine brucellosis in Iran: An epidemiological survey. *J Vet Res*, 67(3), 211-221. <https://doi.org/10.22059/JVR.2012.28498>
 5. Gopal, G.J., Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J*, 32(6), 419-425. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5> PMID: 23897421
 6. Jones, G.J., Whelan, A., Clifford, D., Coad, M., Vordermeier, H.M., (2012). Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. *Clin Vaccine Immunol*, 19(4), 620-622. <https://doi.org/10.1128/CVI.00024-12> PMID: 22301696
 7. Larankena, K., Jacobs, L., van Dijk, T., Good, M., Duignan, A., de Jong, M.C.M. (2018). A new model to calibrate a reference standard for bovine tuberculin purified protein derivative in the target species. *Front Vet Sci*, 5(232), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00232>
 8. Li, F., Xu, M., Zhou, L., Xiong, Y., Xia, L., Fan, X., Gu, J., Pu, J., Lu, S., Wang, G. (2016). Safety of recombinant fusion protein ESAT6-CFP10 as a skin test reagent for tuberculosis diagnosis: an open-label, randomized, single-center phase I clinical trial. *Clin Vaccine Immunol*, 23(9), 767-773. <https://doi.org/10.1128/CVI.00154-16>
 9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275. PMID: 14907713
 10. Li, H., Liu, L., Zhang, W., Zhang, X., Zheng, J., Li, L., Zhu, X., Yang, Q., Zhang, M., Liu, H., Chen X., Jin, Q. (2019). Analysis of the antigenic properties of membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*, 9, 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39402-z>
 11. Mohammadi Tashakkori, M., Tabatabaei, M., Tebianian, M., Mosavari, N. (2017). Production of MPT-64 recombinant protein from virulent strain of *Mycobacterium bovis*. *IJVR*, 19(2), 108-112. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2018.4854>
 12. NanderWaal, K., Enns, E.A., Picasso, C., Alvarez, J., Perez, A., Fernandez, F., Gil, A., Craft, M., Wells, S. (2017). Optimal surveillance strategies for bovine tuberculosis in a low-prevalence country. *Sci Rep*, 23;7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04466-2>
 13. Lessard, J.C. (2013). Molecular cloning. *Methods Enzymol*, 529, 85-98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00007-0>
 14. Shang, C., Song, X., Zhao, Y., Zhang, H., Zhao, S., Mao, F., Bai, B., Wu, S., Shi, C. (2015). *Mycobacterium tuberculosis* secreted proteins as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis and latent tuberculosis infection. *J Clin Lab Anal*, 29, 375-382. <https://doi.org/10.1002/jcla.21782> PMID: 25131423
 15. Tashakkori, M.M., Tebianian, M., Tabatabaei, M., Mosavari, N. (2016). Cloning, expression, and purification of recombinant protein MPT-64 from a virulent strain of *Mycobacterium bovis* in a prokaryotic system. *Int J Mycobacteriol*, 5(1), 249-250. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.10.027> PMID: 28043587
 16. Van Soolingen, D., De Hass, E.W.P., Kremer, K. (2001). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of *Mycobacteria*. *Methods Mol Med*, 54, 165-203. <https://doi.org/10.1385/1-59259-147-7:165> PMID: 21341076
 17. Vncinas, M., Marfil, M.J., Garbaccio, S., Barandiaran, S., Huertas, P., Morsella, C., Macías, A., Magnano, G., Zapata, L., Bigi, F., Cataldi, A., Paolicchi, F., Zumárraga, M., Eirin, M.E. (2018). *Mycobacterium bovis* ESAT-6, CFP-10 and EspC antigens show high conservation among field isolates. *Tuberculosis (Edinb)*, 111, 143-146. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.06.007> PMID: 30029900
 18. Xerrano, M., Elgueabal, N., Sevilla, I.A., Geijo, M.V., Molina E., Arrazuria, R., Urkitza, A., Jones, G.J., Vordermeier, M., Garrido, J.M., Juste, R.A. (2017). Tuberculosis detection in paratuberculosis vaccinated calves: new alternatives against interference. *PLoS ONE*, 12(1), 1-4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.016973>
 19. Xin, T., Jia, H., Ding, J., Li, P., Yang, H., Hou, S., Yuan, W., Guo, X., Wang, H., Liang, Q., Li, M., Wang, B., Zhu, H. (2013). Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle. *Clin Vaccine Immunol*, 20(4), 482-490. <https://doi.org/10.1128/CVI.00592-12>



Cloning and Expression of Virulent Protein CFP-10 from *Mycobacterium bovis* Strain AN5

Reza Arefpajoohi¹, Taghi Zahraei Salehi¹, Nader Mosavari², Zahra Salehi Najafabadi³, Ramak Yahya Raeyat¹

¹ Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

² Department of Research and Production of Tuberculin and Mallein, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran

³ Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran

doi: [10.22059/jvr.2019.281406.2932](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.281406.2932)

Received: 21 September 2020, Accepted: 30 November 2020

Abstract

BACKGROUND: Bovine tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* is an important disease that has negative effects on public health and entails economic loss. Traditional controlling programs for cattle focus on test and slaughter strategy, and false positive is one of the disadvantages associated with tuberculin skin test. To overcome this limitation, proteins with high specificity have to be utilized.

OBJECTIVES: The objective of this study was to clone and express virulent protein CFP-10 from *Mycobacterium bovis* AN5.

METHODS: Full-length genes of *cfp-10* were amplified by PCR technique. In parallel, pET23a(+) and PCR products were double digested by *EcoRI* and *HindIII*. Ligation was performed at 16 competence *E. coli*

E. coli BL21.

Induction was performed by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Urea 8M was used to dissolve the expressed protein in the inclusion body form. Recombinant protein was purified by Nickle-Resin, and urea was eliminated by decreasing the gradient.

RESULTS: The *CFP-10* gene clone was proved by sequencing method. The CFP-10, as a 10 KDa protein, was confirmed by Western blotting using monoclonal antibodies. Based on the results, the recombinant protein was successfully cloned and expressed.

CONCLUSIONS: The results showed that *cfp-10* gene was successfully cloned and expressed in prokaryotic system, indicating that this recombinant protein could be utilized in diagnostic kits against bovine tuberculosis in the future.

Keywords: CFP-10, *Mycobacterium bovis*, Recombinant protein, Clone, Expression

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

tsalehi@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-66933222/021-61117056

How to cite this article:

Arefpajoohi, R., Zahraei Salehi, T., Mosavari, N., Salehi Najafabadi, Z., Yahya Raeyat, R. (2021). Cloning and Expression of Virulent Protein CFP-10 from *Mycobacterium bovis* Strain AN5. J Vet Res, 76(1), 124-132. <https://doi.org/10.22059/jvr.2019.281406.2932>

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. *Mycobacterium bovis cfp-10* gene amplification by PCR technique.

Figure 2. Enzymatic double digestion of the plasmid pET23a (+).

Figure 3. Analysis of *cfp-10* gene following ligation in the plasmid pET23a (+).

Figure 4. SDS-PAGE analysis the cloned BL21 cellular pellet containing pET23a (+)-CFP-10 plasmid at different time intervals followed induction by IPTG.

Figure 5. A. Purification of CFP-10 protein with Ni-resin (1-standard protein marker, 2-control, 3-purified CFP-10 protein); B. Confirmation of recombinant CFP-10 protein.