

کاربرد بیوانفورماتیک و مهندسی ژن جهت طراحی کلون بهینه، برای افزایش تولید پروتیین فعال کننده‌ی نوتروفیل هلیکوباکتریلوری در اشریشیا کلی

محمد علی حقیقی^۱، دکتر اشرف محبتی مبارز^۲، دکتر هائف علی سلمانیان^۳، دکتر محمد رضا زالی^۴،

دکتر سید محمد مودنی^۵، دکتر علی اصغر کارخانه^۶

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی mmmobarez@modares.ac.ir

دریافت: ۹۱/۵/۲ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: پروتیین فعال کننده‌ی نوتروفیل در هلیکوباکتریلوری (HP-NAP) از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای این باکتری است که از اهمیت به‌سزایی در ایجاد ایمنی حفاظتی بر علیه این پاتوژن برخوردار است. این آنتی ژن کاندیدای بسیار مطرحی به‌عنوان بخشی از واکسن‌های چند قسمتی بر علیه این باکتری در مطالعات کلینیکی می‌باشد. به‌دلیل اهمیت پروتیین HP-NAP، در این مطالعه از آن به‌عنوان الگویی برای بهینه کردن ژن‌های هترولوگ که محتوای تیمین و آدنین بالا و میزان بیان پایینی در باکتری اشریشیاکلی دارند، استفاده شد.

روش بررسی: با کاربرد علوم بیوانفورماتیک ژن کد کننده‌ی این پروتیین برای بیان حداکثری در میزبان مربوطه بهینه و سپس ساخته شد.

یافته‌ها: در بهینه کردن ژن HP-NAP عوامل مختلفی تغییر داده شد. کدن‌ها به کدن‌های رایج در باکتری اشریشیا کلی تغییر کرد، محتوای G+C از ۳۸ درصد به ۴۵ درصد افزایش یافت و ساختارهای فضایی نامناسب در ساختمان دوم mRNA شکسته شد، این تغییرات منجر به طولانی شدن نیمه عمر mRNA و افزایش قابل ملاحظه‌ی بیان پروتیین نوترکیب HP-NAP به‌میزان حداقل ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر گردید.

نتیجه‌گیری: کاربرد ابزار بیوانفورماتیک در افزایش و بهینه‌سازی بیان پروتیین HP-NAP در باکتری اشریشیا کلی موفق بود. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد کاربرد این ابزارها روشی منطقی در بهینه کردن ژن‌هایی با منشا متفاوت جهت بیان در میزبان‌های بیانی دیگر باشد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتریلوری، بیوانفورماتیک، بهینه‌سازی، پروتیین نوترکیب فعال کننده نوتروفیل، کلونوبیان

مقدمه

بالاتر است (۲ و ۱)، هرچند این عفونت در اکثر موارد (۸۰ تا ۹۰ درصد) بدون علائم باقی می‌ماند ولی عفونت به هلیکوباکتریلوری عامل مستعد کننده‌ی مهمی برای تکوین

تقریباً نیمی از جمعیت جهان در بخش فوقانی دستگاه گوارش خود حامل باکتری هلیکوباکتریلوری بوده، این درحالی است که شدت این عفونت در کشورهای جهان سوم

۱- دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه باکتری شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

۳- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، دانشیار پژوهشکده زیست فن آوری گیاهی، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری

۴- متخصص داخلی، استاد مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵- دکترای تخصصی ایمونولوژی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

۶- دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، استاد یار پژوهشکده زیست فن آوری صنعت و محیط زیست، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری

زخم پپتیک و ابتلا به سرطان معده شناخته شده است (۳). این باکتری به عنوان عامل سرطان‌زا از طرف سازمان جهانی بهداشت معرفی شده، در حال حاضر از دیدگاه پزشکی، مسوول بسیاری از مرگ و میرها در دنیا است (۵ و ۴). شیوه‌ی درمان چند دارویی بیماران در ریشه کنی این عفونت موثر می‌باشد اما افزایش شیوع مقاومت دارویی و عفونت مجدد بعد از درمان آنتی‌بیوتیکی لزوم و اکسیناسیون را بر علیه این باکتری مورد تاکید قرار می‌دهد (۲). به همین منظور تحقیقات گسترده‌ای جهت شناسایی عوامل بیماری‌زایی و خواص ایمنی‌زایی آن‌ها برای طراحی و ساخت واکسنی مناسب علیه این باکتری در حال انجام است. پروتئین HP-NAP (Neutrophil Activating Protein) از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی شناخته شده در این باکتری است که نقش به‌سزایی در شکل‌گیری عفونت و تکوین علائم بیماری در میزبان را دارد. این آنتی‌ژن توسط تمامی سویه‌های بالینی هلیکوباکتریلوری بیان شده و حضور آنتی‌بادی ضد آن در سرم بیماران مبتلا به عفونت با این باکتری دلیل بر وخامت بیماری است چرا که بیشتر در مراحل حاد بیماری حضور آن قابل مشاهده می‌باشد (۶-۸) مطالعات ساختار این پروتئین شباهت آن را به پروتئین‌های محافظت کننده DNA (DNA protecting protein) (۹) و متصل شونده به آهن (Ferritin like Protein) نشان می‌دهد (۱۱ و ۱۰). خواص بیولوژیک متعدد این پروتئین در شرایط آزمایشگاهی و بالینی مورد بررسی و تایید قرار گرفته است. این پروتئین غشایی بوده و از طریق اتصال به موسین، به مخاط معده می‌چسبد. به احتمال زیاد HP-NAP پس از لیز سلولی آزاد می‌گردد و به دنبال عبور از سلول‌های اپیتلیال به بافت‌های زیرین رسیده، با تحریک سلول‌های ماست (Mast cell) ساکن در محل و تولید TNF α (Tumor Necrotic Factor Alpha) التهاب ایجاد می‌نماید. علاوه بر این با تاثیر بر روی مونوسیت‌ها با افزایش تولید فاکتور بافتی

(Tissue Factor) و PAI2 (Plasminogen Activator Inhibitor-2) سرانجام تشکیل فیبرین و فعالیت‌های ترومبوتیک را افزایش می‌دهد و بدین ترتیب بارسوب فیبرین روی دیواره‌ی باکتری از فاگوسیت شدن آن جلوگیری می‌نماید و علاوه بر آن با جلوگیری از تجزیه‌ی فیبرین و خروج ضایعات بافتی در محل عفونت از التیام بافتی جلوگیری کرده، گاستریت مزمن و جراحات بافتی ایجاد می‌نماید. این پروتئین سبب تکامل سلول‌های دندریتیک نابالغ و تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک بالغ می‌شود و بیان MHC II و تولید IL-12 را در این سلول‌ها افزایش می‌دهد (۷). از ویژگی‌های مهم این پروتئین در جذب و فراخوانی سلول‌های نوتروفیل در مخاط معده می‌باشد که در تکوین عفونت موثر بوده، میزان آسیب‌های بافتی بستگی به شدت حضور آن‌ها دارد. مهاجرت سریع نوتروفیل‌ها به محل عفونت با تولید اینترلوکین‌ها نه تنها شرایط کموتاکتیکی را برای حضور بیشتر نوتروفیل‌ها بلکه برای سایر سلول‌هایی نظیر مونوسیت‌ها، دندریتیک‌ها، لنفوسیت‌ها از طریق تولید CCL3 و CCL4 فراهم می‌آورد (۱۲ و ۸). اشکال مونومری و دوازده وجهی پروتئین HP-NAP توانایی تحریک نوتروفیل را دارند بخش تحریک کننده‌ی نوتروفیل‌ها، هلیکس‌های H3 (L69-L75) و H4 (K89-E114) و کوئل ارتباطی بین آن‌ها (H63-Thr68 و Thr76-lys83) می‌باشد (۱۲ و ۹). TLR2 گیرنده‌ی اختصاصی HP-NAP بر روی سلول بوده، خواص ایمونومادولاتوری این پروتئین بر روی سیستم ایمنی بدن برای تغییر سمت پاسخ‌ها از Th2 به Th1 با اتصال به این گیرنده آغاز شده و با تولید اینترلوکین‌های ۱۲ و ۲۳ مدیریت می‌گردد (۱۳). به دلیل این ویژگی‌ها HP-NAP ابزار جدید و مناسبی است که می‌تواند در طراحی واکسن‌های مناسب مفید باشد (۱۵ و ۱۴). استراتژی کلون و بیان آنتی ژن‌های پروتئینی راهکار مناسبی جهت مطالعات ساختاری و ایمونولوژیکی آنتی‌ژن‌های میکروبی است ولی خواستگاه

بررسی جایگاه‌های‌های برش آنزیمی: جایگاه‌های برش آنزیمی در توالی ژنی HP-NAP با کاربرد نرم‌افزار تعیین شد. با الگو قرار دادن نقشه ژنتیکی پلاسمیدهای pUC57 و pET28a(+) جایگاه برش آنزیمی *Bam*HI در پایین دست و *Hind*III در بالا دست این ژن تعبیه گردید.

بهینه کردن (Optimization) و کلون سازی ژن HP-NAP: توالی بازهای ژن HP-NAP (۴۳۵ bp) به همراه جایگاه‌های انتخاب شده برش آنزیمی، با کاربرد نرم‌افزار Optimum Gene TM Algorithm جهت بیان در باکتری *E. coli* بهینه‌سازی شد (۲۰). کلون سازی ژن بهینه شده (HP-NAP) درون پلاسمید pUC57 توسط شرکت Genscript (www.genscript.com USA Piscataway, New Jersey)، انجام گردید. برای پیشگیری از هرگونه تغییر مترادف در بازها، توالی ژن سنتز شده فوق (Sequencing) توسط شرکت سازنده تعیین گردید و با کاربرد نرم‌افزار Vector NTI AdvancedTM 11 (Invitrogen; USA) مترادف اسید آمینه‌های کد شونده توسط این ژن بررسی و با توالی پروتیین مرجع مقایسه شد.

پیش بینی ساختار دوم RNA پیامبر (mRNA): پیش‌بینی و مقایسه‌ی ساختار دوم و پایداری mRNA قبل و بعد از بهینه شدن ژن HP-NAP به کمک نرم افزار Centroidfold انجام گردید (۲۱).

طراحی آغازگرها (Primer) و شرایط PCR: با الگو قرار دادن توالی بهینه شده ژن HP-NAP و توالی ژنی پلاسمیدهای pET28a(+)(Novagen; USA) (Genscript: USA) pUC57 و کاربرد نرم‌افزار آنالیز آغازگر (OLIGO Primer Analysis Software) OLIGO آغازگرهای لازم جهت آزمایش‌های تاییدی کلونینگ این ژن طراحی گردید. تکثیر ژن مورد نظر با PCR تحت برنامه‌ی دمایی شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ دوره

متفاوت ژن‌ها، تفاوت در محتوای درصد G+C و تفاوت در کدن‌های مورد استفاده در سلول‌های مختلف سبب کاهش میزان بیان پروتیین‌های نو ترکیب در سیستم‌های پروکاریوتی گردیده است. راه کار مناسبی که هم‌اکنون پیش رو قرار گرفته، استفاده از بهینه سازی ژن می‌باشد. در این روش کدن کد کننده‌ی اسید آمینه در یک ژن با منشأ متفاوت (Heterologous) با کدن رایج (Codon usage) همان اسید آمینه در میزبان جدید تغییر می‌یابد و سبب افزایش بیان ژن هترولوگوس می‌گردد. از این روش در مطالعات تهیه‌ی واکسن‌ها در میزبان‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی (گیاهی) استفاده شده است (۱۷ و ۱۶). کاربرد این روش‌ها در اصلاح عملکرد آنزیم‌ها و بیان آن‌ها در صنعت نیز مورد توجه قرار گرفته است. نبود راه کار مناسب در مطالعات قبلی جهت افزایش مقادیر کم بیان پروتیین نو ترکیب HP-NAP در میزبان‌های بیانی همچون باکتری اشریشیاکلی (*E. coli*) یا باسیلوس سوبتیلیس (*B. subtilis*) از مشکلات جدی کاربرد این پروتیین در مطالعات ایمنی‌زایی و تولید واکسن شمرده می‌شود (۱۸ و ۷، ۲). اگر چه قبلاً برای افزایش بیان این پروتیین بیشتر بر روی بهینه کردن شرایط محیط کشت تمرکز شده بود (۱۹)؛ لیکن پیشرفت علوم بیوانفورماتیک راه حل‌های منطقی را برای تغییرات بر روی خود ژن و نحوه‌ی بیان آن بدون تغییر در ردیف اسیدهای آمینه پروتیین کد شونده‌ی پیش‌رو قرار داد. هدف این مطالعه افزایش بیان پروتیین HP-NAP در باکتری اشریشیاکلی به روش بهینه سازی ژن این پروتیین به کمک ابزارهای بیوانفورماتیک بود.

روش بررسی

هم ردیفی توالی (Alignment): توالی اسیدهای آمینه پروتیین HP-NAP در سویه‌های مختلف هلیکو باکتر پیلوری، از بانک ژنی (NCBI Gene Bank) استخراج و با استفاده از نرم افزار میزان شباهت آنها با هم مقایسه گردید.

شامل ۹۴، ۵۶ و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد هر کدام یک دقیقه و در نهایت یک مرحله ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

سویه‌های باکتریایی، ناقل‌ها و آنزیم‌ها: اشریشیاکولی JM107، DH5 α و اشریشیاکولی BL21-DE3 به ترتیب به عنوان میزبان‌های تکثیری و بیانی استفاده شدند. پلاسمیدهای pUC57 و pET28a(+) به ترتیب جهت کلون و بیان ژن هدف مورد استفاده قرار گرفتند. آنزیم‌های محدودکننده BamHI و HindIII در برش‌های آنزیمی و DNAT4 لیگاز (Fermentas) در واکنش الحاق استفاده شدند. از آنزیم DNA PolymeraseTaq نیز جهت تکثیر و تایید قطعه‌ی ژن هدف در پلاسمید بیانی با PCR استفاده شد (۲).

ساب کلون ژن HP-NAP: پلاسمید pUC57+HP-NAP حاوی ژن سیسنتتیک HP-NAP (Accession Number: HQ831507) در میزبان اشریشیاکولی JM107 تکثیر شد و با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (Fermentase) خالص سازی گردید و سپس جهت الحاق در پلاسمید بیانی پلاسمید pET28a(+) (Novagen) مورد هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده BamHI و Hind قرار گرفت (۲). قطعه‌ی بریده شده ژنی پس از خالص سازی از ژل، در پلاسمید pET28a(+)، که توسط همین دو آنزیم بریده شده بود با واکنش الحاق (Ligation) وارد گردید. در تمامی مراحل برای تخلیص قطعه و یا پلاسمید بریده شده از روی ژل از کیت تخلیص (Roche) استفاده شد. محصول الحاق (پلاسمید نو ترکیب pET28a(+)-NAP) به باکتری اشریشیاکولی JM107 انتقال داده شد. غربالگری باکتری‌های حامل پلاسمیدهای مورد نظربه کمک روش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژن HP-NAP بهینه شده، انجام گردید. جهت تایید نهایی کلون

شدن ژن HP-NAP در pET28a(+), از هضم آنزیمی آنزیم‌های محدودکننده یاد شده روی پلاسمیدهای نو ترکیب خالص شده، استفاده شد (۱۴).

بیان و خالص سازی پروتئین نو ترکیب HP-NAP: پلاسمید نو ترکیب pET28a(+)-NAP به میزبان بیانی اشریشیاکولی BL21-DE3 انتقال داده شد. جهت غربالگری توانایی بیان باکتری‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب رشد یافته بر روی LB جامد حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین، کشت مجزای کلنی در ۳ میلی لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین تهیه و در انکوباتور با حرکت دورانی (۲۰۰ دور در دقیقه) و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک شب گرماگذاری گردید و از آن‌ها جهت کشت مجدد ۱۵ محیط مایع LB با شرایط قبل استفاده شد و زمانی که کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ تا ۱ رسید، پلاسمیدهای نو ترکیب با ۱ میلی مولار ایزوپروپیل -بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) القا شدند. پنج نمونه در زمان‌های صفر، سه، پنج، هفت، هجده ساعت از کشت باکتری‌های القا شده تهیه و میزان بیان پروتئین در زمان‌های مختلف با کمک روش PAGE-SDS در ژل ۱۲/۵ درصد رنگ آمیزی شده با کوماسی R-250 مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶). سلول‌های باکتری در محیط کشت پس از القا در ساعت‌های مذکور جمع‌آوری و رسوب داده شدند. رسوب باکتری‌های مذکور بعد از شستشو شدن با بافر تخریب (۵۰ میلی مول NaH₂PO₄، ۳۰۰ میلی مول NaCl، ۱۰ میلی مول ایمیدازول pH=۸) مجدداً در همین بافر به همراه آنزیم لیزوزیم (۵mg/ml) و PMSF (۱۷۰ µg/ml) به شکل سوسپانسیون در آمده و بر روی یخ در ده نوبت با فاصله‌ی چهل و پنج ثانیه و در هر نوبت سی ثانیه با فرکانس ۰/۶ ثانیه و توان ۷۰ درصد تحت اثر امواج فراصوت قرار گرفتند تا به طور کامل متلاشی شوند. در مرحله‌ی بعد لیزات سلولی در ۲۰۰۰۰xg برای مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. به منظور

بلات Bio-Rad در شرایط مرطوب منتقل شد. برای کنترل انتقال پروتئین از مارکر پروتئینی از پیش رنگ شده استفاده گردید (Pre-stain ladder SM0607). مسدود سازی (Blocking) غشای PVDF با محلول TBS (۵۰ میلی مولار Tris، ۱۵۰ میلی مولار NaCl) حاوی ۵ درصد شیر خشک (Fat Free Milk) به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. در مرحله ی بعد غشا با آنتی بادی مونوکلونال موشی بر علیه 6His-tag (Roche) در بافر TBS-T یک بار قتل ۱:۱۰۰۰ به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق مجاور شد. شستشو با بافر TBS-T (TBS حاوی ۰/۵ درصد توتین ۲۰) انجام شد. پس از شستشوی نهایی غشا با محلول ۰/۰۶ درصد DAB (۵۰ میلی مولار Tris به همراه یک دهم درصد آب اکسیژنه) قرار گرفت و پس از ظهور باند واکنش با آب مقطر متوقف شده و از آن عکس تهیه گردید (۱۶).

یافته ها

بررسی هم ردیفی پروتئین HP-NAP: ژن HP-NAP در تمامی سویه های هلیکوباکتریلوری حفاظت شده و مقایسه ی ترادف اسیدهای آمینه پروتئین HP-NAP در بسیاری از سویه های استاندارد و بیماری زای این باکتری همسانی (Identity) ۹۸٪ الی ۱۰۰٪ را در بین آنها مشخص می نماید.

بهینه و کلون سازی توالی ژن HP-NAP: ترادف کد کننده ی ژن HP-NAP با تغییر عوامل متعددی که می توانند بر روی بیان آن در باکتری /شریشیاکلی تاثیر گذار باشند، بهینه گردید. این بهینه سازی در ۲ بخش قابل بررسی بود که در بر گیرنده ی تنظیم Codon usage bias (شکل ۱) و افزایش درصد محتوای سایتوزین و گوانین می شد (شکل ۲).

افزایش شاخص CAI (Codon Adaptation Index) نشان دهنده ی افزایش کدون های مورد استفاده برای بیان این ژن در باکتری /شریشیاکلی است (شکل ۱- الف). پراکندگی درصد

پیگیری نحوه ی بیان پروتئین، به شکل رسوبی (Inclusion Body) و یا محلول، برای تعیین روش مناسب تخلیص پروتئین با استفاده از رزین نیکل، (QIAGEN) یک نمونه از مایع رویی به تنهایی و یک نمونه از رسوب پس از حل شدن در بافر B (۱۰۰ میلی مولار NaH_2PO_4 ، ۱۰ میلی مولار Tris-Cl، ۸ مولار اوره pH=۸) به وسیله رزین نیکل و SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. برای تولید انبوه پروتئین نوترکیب HP-NAP یک کشت شبانه به شرحی که قبلاً داده شد تهیه و از آن برای کشت مجدد ۱۰×۱۰۰ میلی لیتر از محیط تازه LB در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری استفاده گردید. زمانی که جمعیت باکتری ها به کدورت مناسب رسیدند با ۱ میلی مول IPTG القا و به مدت پنج ساعت بعد از آن در ۳۷ درجه ی ۸ سانتی گراد نگهداری شدند. پس از این زمان، سلول های باکتری با سانتریفوژ در ۹۰۰۰×g جمع آوری و با بافر Tris بیست میلی مولار شستشو داده شدند. با انتخاب روش تخلیص پروتئین های نوترکیب تحت شرایط رسوبی (Denature Condition) رسوب سلول های باکتری در بافر B حل و پس از انتقال به ستون رزین نیکل (QIAGEN)، با بافر C (۱۰۰ میلی مول NaH_2PO_4 ، ۱۰ میلی مول Tris-HCl و ۸ مول اوره، pH=۶/۳) شستشو شده و در پایان با بافر استخراج (بافر C حاوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار pH=۶/۳)، پروتئین از ستون جدا و جمع آوری شد (۲۲ و ۱۴). میزان خلوص پروتئین ها به کمک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفته، غلظت پروتئین با روش براد فورد تعیین و مقدار کل پروتئین خالص شده از یک لیتر کشت باکتری محاسبه گردید (۲۳). پیش بینی وزن ملکولی پروتئین بیان شده در پلاسמיד بیانی با استفاده از نرم افزار ExPASy- Compute pI/Mw tool انجام گردید.

و سترن بلات: پروتئین نوترکیب از ژل SDS-PAGE به کاغذ پلی وینیلیدین دی فلورید (PVDF) توسط دستگاه

کاربرد کدن‌های مورد استفاده (Frequency of Optimal Codon) در بعد از بهینه شدن به کمترین حد ممکن کاهش یافته و تغییرات با انتخاب کدن‌هایی بوده است که در مسیر متابولیسم سلول/شریشیاکلی بیشترین کاربرد را داشته‌اند (شکل ۱-ب). انتخاب و تغییر کدن مناسب به نحوی بوده که محتوی سیتوزین+ گوانین از ۳۸ درصد حد اکثر به ۴۵ درصد افزایش یافته است (شکل ۲). در مراحل بهینه‌ی کردن ساختارهای Stem- Loop در mRNA اولیه که منجر به اختلال در اتصال ریبوزوم می‌گردد، برداشته شده و این تغییر با مقایسه‌ی بین ساختمان دوم mRNA در قبل و بعد از بهینه‌سازی ژن HP-NAP در شکل ۳ قابل مشاهده است. مقایسه‌ی تغییر در بازهای قبل و بعد از بهینه شدن ژن HP-NAP به وضوح میزان کم کدون‌های مورد استفاده در باکتری/شریشیاکلی را قبل از تغییر این ژن نشان می‌دهد (شکل ۴). ژن HP-NAP با موفقیت پس از بهینه‌سازی در پلاسمید pUC57 توسط شرکت سازنده کلون سازی شد. نتایج حاصل از تعیین توالی ژن بهینه ساخته شده و مقایسه‌ی هم ردیفی ترجمه‌ی مترادف اسید آمینه کد شده توسط آن با پروتیین هدف هیچ‌گونه تغییری را در اسیدهای آمینه کد شونده به وسیله‌ی ژن بهینه شده نشان نمی‌دهد (شکل ۵) و تایید می‌نماید که اعمال تغییرات روی ژن بدون هیچ‌گونه تغییری بر روی ردیف اسیدهای آمینه در پروتیین هدف بوده است. نتایج مقایسه‌ای سایر تغییرات در شکل ۶ آمده است.

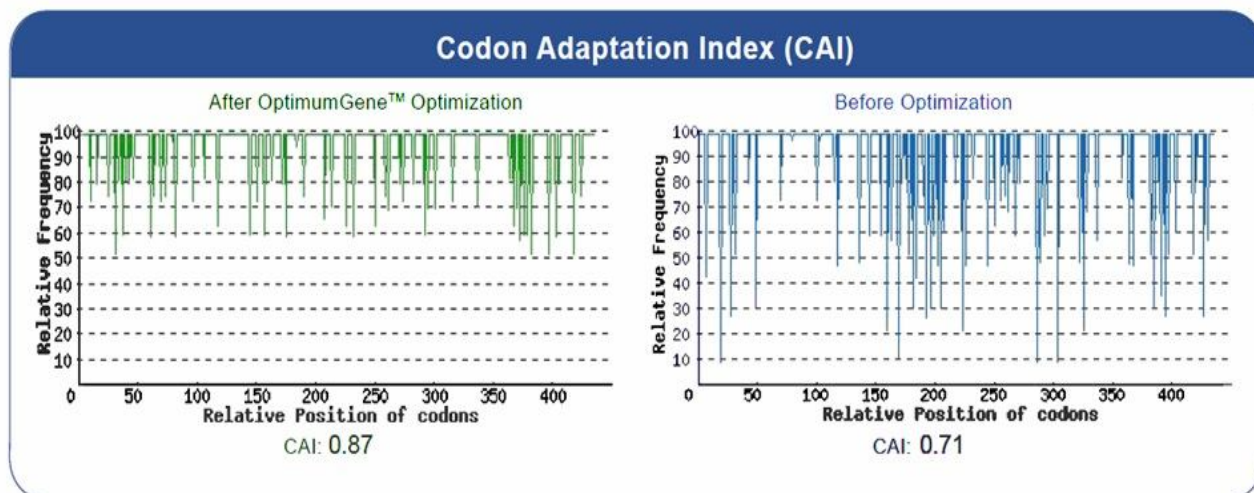
آغازگرهای طراحی شده: آغازگرهای پیش رونده (Forward) با مترادف 5' GGA, TCC, ATG, AAA, ACC, TTC, GA 3' و معکوس (Reverse) با مترادف 3' AAGCTTTTACGCCAGGTGC 5' (هر کدام ۲۰ باز) توانایی شناسایی ژن بهینه شده HP-NAP را در روی هر یک از پلاسمیدهای pET28a و pUC57 دارا می‌باشد. در طراحی آغازگرها ملاحظات لازم برای پیشگری

از تشکیل ساختارهای نامناسب اعم از لوپ، دایمر و یکسان بودن طول آغازگرها و نزدیک بودن دمای آنیلینگ و اتصال اختصاصی رعایت گردیده است. **ساب کلون‌سازی در pET28a(+):** الحاق ژن بهینه شده HP-NAP بدرون پلاسمید pET28a(+) با موفقیت انجام شد. نتایج آزمایش PCR با آغازگرهای طراحی شده و تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۴۷ (bp) باز (شکل ۷) و همچنین خروج قطعه‌ای با همین اندازه در نتیجه‌ی هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدوداثر BamHI و HindIII بر روی پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-NAP این الحاق را تایید می‌نماید (شکل ۸). **بیان و تخلیص پروتیین نوترکیب HP-NAP:** نتایج SDS-PAGE، بیان یک پروتیین در محدوده‌ی باند ۲۰ کیلودالتونی راهنمای وزنی را نشان می‌دهد که با وزن مولکولی حدود ۲۰۴۷۷ دالتون پیش‌بینی شده همخوانی دارد (شکل ۹-الف) وزن خود پروتیین حدود ۱۶۹۳۳ دالتون است (۱۴۴ اسید آمینه) و اضافه شدن ۳۴ اسید آمینه مربوط به جایگاه چند گانه کلونینگ (Multiple Cloning Site) پلاسمید pET32a(+) به ابتدای آن موجب افزایش ۳/۵ کیلودالتونی آن شده است. بیان این پروتیین از ساعت سوم آغاز و در ساعت پنجم به بیشترین مقدار خود رسید بین ساعت پنجم، هفتم و القای شبانه تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود نداشت. با بررسی‌های انجام شده مشخص شد که بیشترین مقدار پروتیین نوترکیب به صورت ذرات جامد غیر محلول (اینکلوزن) در فاز رسوبی قرار دارند. رسوبی بودن این پروتیین با نتایج به دست آمده از تخلیص فاز مایع حاصل از لیزات سلول با روش Native و استفاده از بافرهای فاقد اوره نیز تایید گردید و مشخص شد تنها مقادیر اندکی از پروتیین در فاز مایع قرار دارد. بررسی الکتروفورتیک نتایج تخلیص پروتیین نوترکیب حاکی از خلوص قابل توجه این پروتیین می‌باشد (شکل ۹-الف). نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ بیان این پروتیین را به طور اختصاصی تایید کرده و

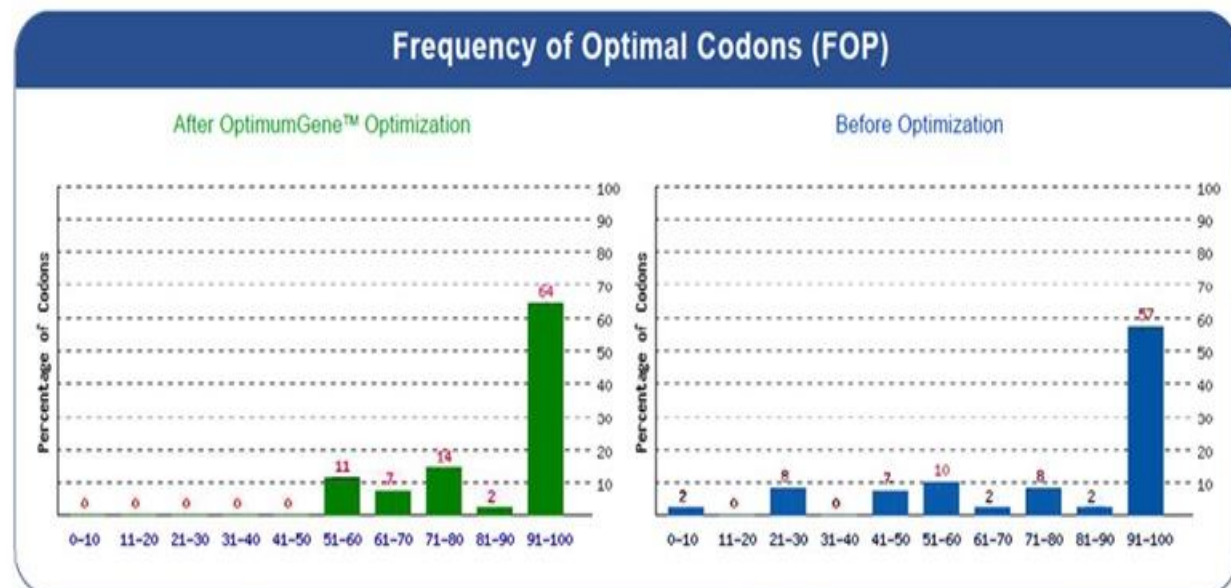
پروتیین رسوبی از یک لیتر کشت باکتری حدوداً میزان ۸۰۰ میلی گرم تعیین شد.

نشان می‌دهد از درجه‌ی خلوص بالایی برخوردار است (شکل ۹-ب). براساس اندازه‌گیری با روش برادفورد (به همراه استاندارد BSA) و اسپکتروفتومتری، استحصال

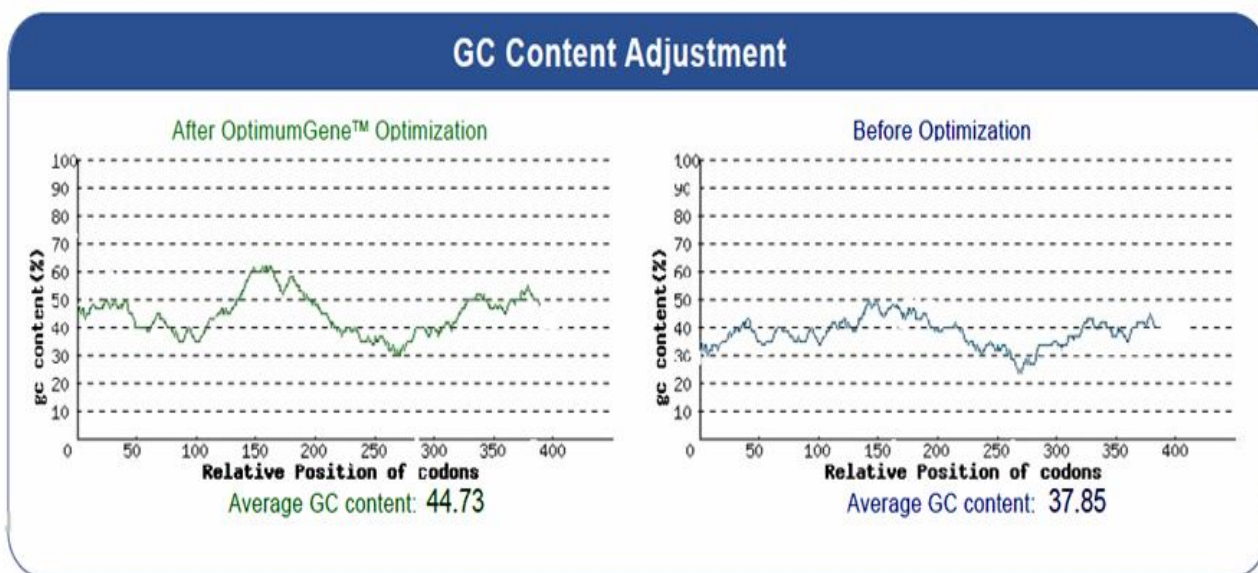
Codon usage bias adjustment



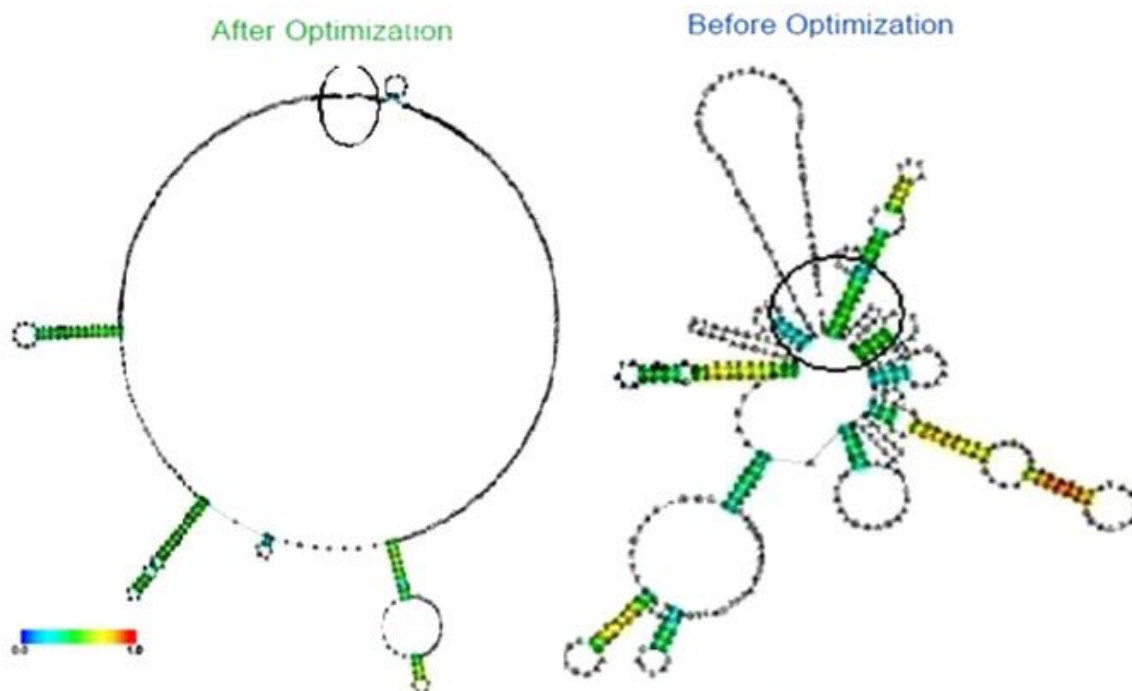
شکل ۱- الف: توزیع و فرکانس Codon usage در طول ژن HP-NAP. ایده آل ترین مقدار شاخص CAI برای بیان یک ژن برابر ۱ است و مقادیر بالاتر از ۰/۹ به معنی سطح بیان حداکثری است (High expression)



شکل ۱- ب: فرکانس توزیع کدون ها در ژن HP-NAP بین گروه های مختلفی که بر اساس درصد کاربری آنها در باکتری اشریشیا کلی تقسیم شده اند. مقایسه قبل و بعد از بهینه سازی تجمع کدون های بهینه شده در گروه های با درصد کاربری بالاتر نشان می دهد



شکل ۲: مقایسه محتوای درصد سیتوزین گوانین قبل وبعد از بهینه سازی ژن HP-NAP.



شکل ۳: مقایسه ساختار دوم mRNA قبل وبعد از بهینه سازی ژن. دایره بر روی شکل موقعیت جایگاه اتصال ریبوزوم را نشان می دهد. درحالت بهینه این جایگاه برای اتصال به ریبوزوم هیچگونه محدودیت فضایی ندارد

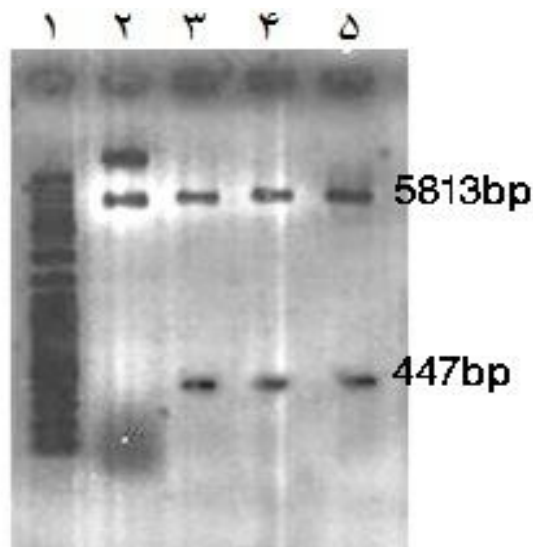
Optimized	7	ATGAAAACCTTCGAAATCCTGAAACACCTGCAAGCCGAOGCCATCGTTCTGTTTATGAAA
Original	7	ATGAAAACATTTGAAATTCTAAACATTTGCAAGCGGATGCGATCGTGTATTATGAAA
Optimized	67	GTCCACAACCTTCCACTGGAATGTCAAAGGCACCGATTTCTTTAACGTTTATAAAGCGACG
Original	67	GTGCATAACTTCCATTGGAATGTGAAAGGCACCGATTTTTTCAATGTGCATAAAGCCACT
Optimized	127	GAAGAAATTTATGAAGAATTTGCGGACATGTTGATGACCTGGCCGAAAGTATCGTCCAG
Original	127	GAAGAAATTTATGAAGAGTTTGCGGACATGTTTGACGATCTCGCTGAAAGGATCGTTCAA
Optimized	187	CTGGGT CATCACCGCTGGTGACCTGAGTGAAGCAATTAAC TGACGCGCGTCAAAGAA
Original	187	TTAGGGCATCACCCCTTAGTCACTTTATCCGAAGCGATCAAAC TACTCGTGTAAAGAA
Optimized	247	GAAACCAAAACGAGCTTTCACTCTAAAGATATCTTCAAAGAAATCTGGAAGACTACAAA
Original	247	GAAACTAAAACGAGCTTCCACTCTAAAGACATCTTTAAAGAAATCTAGAGGACTACAAA
Optimized	307	TACCTGGA AAAAGAAATTC AAAGAACTGAGCAACACCGCAGAAAAAGAGGCGATAAAGTG
Original	307	TATCTAGAAAAAGAAATTTAAAGAGCTCTCTAACACCGCTGAAAAAGAGGCGATAAAGTT
Optimized	367	ACCGTTACGTACGCTGACGACCAACTGGCGAAACTGCAAAAATCAATCTGGATGCTGCAA
Original	367	ACCGTAACTTATGCGGATGATCAATTAGCCAAGTTGCAAAAATCCATTTGGATGCTGCAA
Optimized	427	GCGCACCTGGCGTAA
Original	427	GCCCATTTGGCTTAA

شکل ۴: مقایسه ترادف ژن HP-NAP قبل و بعد از بهینه سازی ژن. رنگ قرمز بازهای تغییر یافته را نشان می دهد.

Optimized	1	MKTFEILKHLQADAI VLFMKVHNFNHWNVKGTDFFNVHKATEEIIYEEFADMFDLLAERIVQ
Original	1	MKTFEILKHLQADAI VLFMKVHNFNHWNVKGTDFFNVHKATEEIIYEEFADMFDLLAERIVQ
Optimized	61	LGHHP LVTLS EAIKLTRVKEETKTSFHSKDI FKEILEDYKYLEKEFKELSNTAEKEGDKV
Original	61	LGHHP LVTLS EAIKLTRVKEETKTSFHSKDI FKEILEDYKYLEKEFKELSNTAEKEGDKV
Optimized	121	TVTYADDQLAKLQKSIWMLQAHLA*
Original	121	TVTYADDQLAKLQKSIWMLQAHLA*

شکل ۵: هم ردیفی اسیدهای آمینه کد شده توسط ژن HP-NAP در قبل و بعد از بهینه سازی

شکل ۶: بررسی وجود سایر ترادف های اختصاصی در HP-NAP اولیه و بهینه شده.



pET28a(+)

شکل ۱: نتیجه هضم آنزیمی حامل بیانی *pET28a-Nap*

۱- مارکی DNA

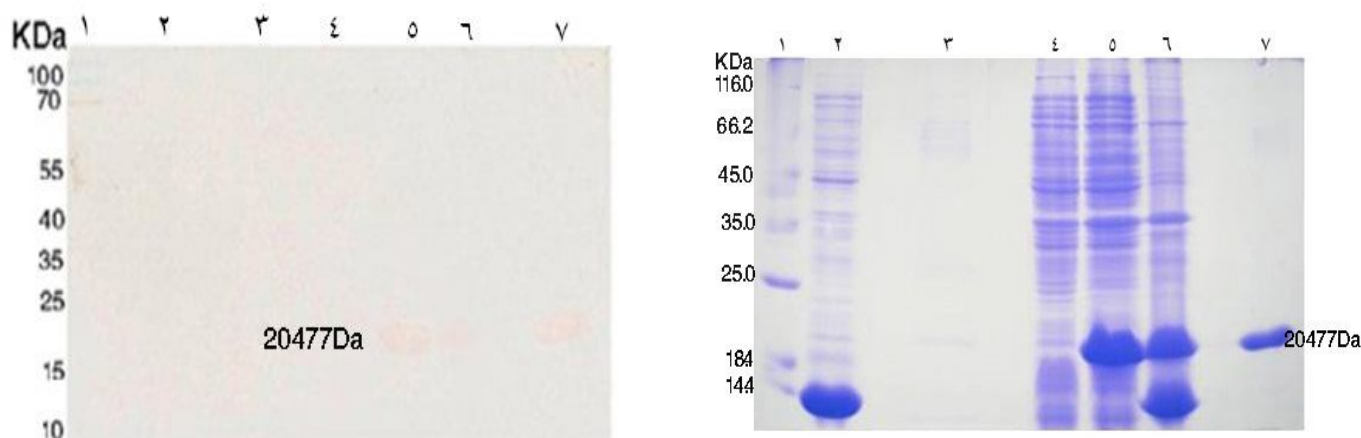
۲- پلاسمید *pET28a-Nap* هضم نشده

۳- الی-۵- کلون‌های مختلف *pET28a(+)-NAP* و

خروج قطعه HP-NAP

در نتیجه هضم آنزیمی همزمان آنزیم‌های *BamHI* و

HindIII



شکل راست ۹- الف؛ تخلیص، بیان و وضعیت حالیت پروتئین HP-NAP در ژل SDS-PAGE ۱۲٪

۱- راهنمای وزنی پروتئین SM0431 ۲- محلول رویی حاصله از شکست سلول با لیزوزیم و امواج فرا صوتی ۳- استخراج پس از عبور محلول رویی از رزین نیکل با روش Native با استفاده از بافر شستشوی بدون اوره حاوی ۲۵۰ میلی مول ایمیدازول ۴- سویه حاوی پلاسمید القا نشده ۵- بیان پروتئین HP-NAP پس از ۵ ساعت القای باکتری اشریشیاکولی BL21-DE3 حاوی پلاسمید pET28a(+)-HP-NAP ۶- رسوب حاصله از شکست سلول با لیزوزیم و امواج فرا صوتی حل شده در بافر هشت مولار اوره ۷- مرحله پایانی تخلیص پروتئین نو ترکیب HP-NAP با روش های Denature با استفاده از بافر شستشوی (Buffer C) حاوی اوره هشت مولار و ۲۵۰ میلی مول ایمیدازول.

شکل چپ ۹- ب؛ (الگوی قرارگیری نمونه ها در این ژل با ژل تصویر راست یکسان است)، وسترن بلات با آنتی بادی ضد ساختار پلی هیسیتیدین متصل شده به پروتئین نو ترکیب HP-NAP.

۱- راهنمای وزنی پروتئین SM0671 (Prestain ladder)، ۵- و ۷- جواب مثبت پاسخ شماره ۶ در ژل به طور ضعیف دیده می شود. بقیه جواب ها نیز مطابق انتظار منفی است.

بحث

شیوع جهانی عفونت با هلیکوباکتریلوری در جوامع بشری و افزایش بروز مقاومت دارویی، ساخت و طراحی واکسن را به عنوان منطقی ترین روش مبارزه بر علیه این عفونت، پیش روی محققین قرار داده است (۱). در بین انواع آنتی ژن های شناخته شده از هلیکوباکتریلوری، HP-NAP دارای ویژگی های منحصر به فردی است که سبب شده محققین آن را انتخاب مناسبی برای ساخت واکسن بر علیه این عفونت و حتی بعضی از بیماری های دیگر نیز بدانند (۷ و ۸). پروتئین HP-NAP عضو گروه پروتئین های شبه فریتین است (Ferritin-Like Proteins) و بررسی های هم ردیفی در این مطالعه نشان می دهد تنوع این پروتئین در بین سویه های مختلف بسیار کم و توالی آن در بین آن ها حفاظت

شده است (۱۳). در این مطالعه با بهره گیری همزمان از ابزارهای بیوانفورماتیک و تجربیات عملی سعی شد تا با اتخاذ روشی منطقی مشکل کاهش بیان آنتی ژن HP-NAP که از جدی ترین مشکلات پیش روی تولید و کاربرد این پروتئین است، مرتفع گردد. خواستگاه متفاوت و بالا بودن محتوی آدنین و تیمین این پروتئین از مهمترین دلایل کاهش بیان آن در میزبان های پروکاریوتیک مثل باکتری اشریشیاکلی و باسیلوس سابیلیس می باشد (۱۰ و ۲). این اشکال به همراه فاکتورهای متعددی که بیان ژن را تحت تاثیر قرار می دهند به کمک ابزارهای بیوانفورماتیک تصحیح و سرانجام ژنی طراحی و ساخته شد که پیش بینی گردید پروتئین HP-NAP را در مقادیر بالایی در میزبان بیانی اشریشیاکلی بیان کند. از عوامل موثر در افزایش این پتانسیل، ارتقای محتوای

پروتئین (Maltose Binding Protein) MBP انجام شده بود، صد میلی گرم در لیتر بوده است که این مقدار در مقایسه با مقدار بیان این پروتئین در مطالعه (۸۰۰ میلی گرم در لیتر) حاضر بسیار پایین تر است (۱۸). از مجموع نتایج بلاتینگ پروتئین نو ترکیب تولید شده با آنتی بادی ضد هیستیدین و تعیین ترادف صحت پروتئین تولیدی تایید می شود.

نتیجه گیری

کاربرد ابزار بیوانفورماتیک در بهینه کردن ژن HP-NAP جهت تولید انبوه این پروتئین موفق بود. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می رسد کاربرد این ابزارها روشی منطقی در بهینه کردن ژن هایی با منشا متفاوت جهت بیان در میزبان های بیانی دیگر باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پروژه دکتری می باشد که توسط دانشگاه تربیت مدرس حمایت مالی شده است. از مرکز تحقیقات گوارش و کبد، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری که در اجرای این تحقیقات همکاری داشته اند سپاسگزاری می گردد.

References

- 1- Agarwal K, Agarwal S. *Helicobacter pylori* vaccine: from past to future. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83: 169-75.
- 2- Iankov ID, Haralambieva IH, Galanis E. Immunogenicity of attenuated measles virus engineered to express *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Vaccine.* 2010;

سیتوزین گوانین بود که سبب افزایش طول عمر mRNA می شود. علاوه بر این شکست ساختارهای نامناسبی مثل Stem-loop که ممانعت فضایی در چسبیدن mRNA به جایگاه اتصال ریبوزوم ایجاد می کنند و حذف عناصر Negative Cis-Acting Sites افزایش بیان را ترغیب می نماید. در مطالعات قبلی نیز کاربرد بیوانفورماتیک در بهینه سازی بیان ایمونوژن چند قسمتی تهیه شده از آنتی ژن های باکتری /شریشیاکلی O157 H:7 جهت افزایش بیان در گیاه موفق بوده است (۲۴). در این مطالعه تجربیات عملی در کلون و بیان این ژن بهینه شده درمی بان /شریشیاکلی و تولید پروتئین نو ترکیب HP-NAP، صحت پیش بینی های انجام شده توسط نرم افزارهای بیوانفورماتیک را تایید کرده، موفقیت این روش را در افزایش قابل ملاحظه تولید پروتئینی که مقادیر کم بیان آن در مطالعات قبلی اشاره شده بود را نشان می دهد (۱۸ و ۱۰، ۲). در مقایسه با مطالعات قبلی که با تغییر و کنترل شرایط کشت بیان این پروتئین را افزایش می داد (۱۹)، بهینه سازی در سطح ژن ضمن اینکه بیان این پروتئین را در ساده ترین شرایط کشت با مقادیر قابل توجهی افزایش داده از سرعت تولید بالاتری نیز برخوردار بود (۵ ساعت در مقابل ۲۴ ساعت). که این مساله در کاهش هزینه های تولید حایز اهمیت است بیشترین مقدار بیان این پروتئین در مطالعه ای که از اتصال این پروتئین با

29: 1710-20.

- 3- Del Giudice G, Malfertheiner P, Rappuoli R. Development of vaccines against *Helicobacter pylori*. *Expert Rev Vaccines.* 2009; 8: 1037-49.
- 4- Selgrad M, Malfertheiner P. New strategies for *Helicobacter pylori* eradication. *Curr Opin Pharmacol.* 2008; 8: 593-7.
- 5- Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial

- interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2008; 134: 306-23.
- 6- De Bernard M, D'Elios MM. The immune modulating activity of the *Helicobacter pylori* HP-NAP: Friend or foe? *Toxicon*. 2009 15; 56: 1186-92.
- 7- Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, et al. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med*. 2000; 191: 1467-76.
- 8- D'Elios MM, Amedei A, Cappon A, Del Prete G, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) as an immune modulating agent. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 50: 157-64.
- 9- Kottakis F, Papadopoulos G, Pappa EV, Cordopatis P, Pentas S, Choli-Papadopoulou T. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein activates neutrophils by its C-terminal region even without dodecamer formation, which is a prerequisite for DNA protection--novel approaches against *Helicobacter pylori* inflammation. *FEBS J*. 2008; 275: 302-17.
- 10- Tonello F, Dundon WG, Satin B, et al. The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol Microbiol*. 1999; 34: 238-46.
- 11- Dundon WG, Polenghi A, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C. Neutrophil-activating protein (HP-NAP) versus ferritin (Pfr): comparison of synthesis in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; 199: 143-9.
- 12- Choli-Papadopoulou T, Kottakis F, Papadopoulos G, Pendas S. *Helicobacter pylori* neutrophil activating protein as target for new drugs against H. pylori inflammation. *World J Gastroenterol*. 2011; 7; 17: 2585-91.
- 13- Amedei A, Cappon A, Codolo G, et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1092-101.
- 14- Iankov ID, Penheiter AR, Carlson SK, Galanis E. Development of monoclonal antibody-based immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *J Immunol Methods*. 2012; 384: 1-9.
- 15- Malfertheiner P, Schultze V, Rosenkranz B, et al. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. *Gastroenterology*. 2008; 135: 787.
- 16- Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157: H7. *Vaccine*. 2010; 28: 6923-9.
- 17- Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH. Immunogenicity of a plant-derived edible chimeric EspA, Intimin and Tir of *Escherichia coli* O157: H7 in mice. *Plant Sci*. 2010; 180: 620-7.
- 18- Kang QZ, Duan GC, Fan QT, Xi YL. Fusion expression of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein in E.coli. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 454-6.
- 19- Niccolai A, Fontani S, Kapat A, Olivieri R.

Maximization of recombinant *Helicobacter pylori* neutrophil activating protein production in *Escherichia coli*: improvement of a chemically defined medium using response surface methodology. *FEMS*. 2003; 221: 257-62.

20- Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH. In silico analysis of chimeric espA, eae and tir fragments of *Escherichia coli* O157:H7 for oral immunogenic applications. *Theor Biol Med Model*. 2009; 6: 28.

21- Sato K, Hamada M, Asai K, Mituyama T. CentroidFold: a web server for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: W277-W80.

22- Aghbaba H, Mohabati Mobarez A, Behmanesh M, Khoramabadi N, Mobarhan M. Production and purification of mycolyl transferase B of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tanaffos*. 2011; 10: 23-30.

23- Dakterzada F MMA, Habib Roudkenar M, Forouzandeh M. Cloning and expression of N-terminal domain of *pseudomonas aeruginosa* flagellin and evaluation of antibodies raised against it on motility inhibition of *pseudomonas aeruginosa*. *J Zanzan Uni Med Sci*. 2012; 20: 1-11.

Application of Bioinformatics and Genetic Engineering for Designing Optimized Cloning and Overexpression of Neutrophil Activating Protein of *Helicobacter pylori* in *Escherichia coli*

Haghighi MA¹, Mohabati Mobarez A¹, Salmanian AH², Zali MR³, Moazzeni SM⁴, Karkhane AA⁵

¹Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

²Dept. of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

³Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases (RCGLD), University of Shahid Beheshti Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁴Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

⁵Dept. of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Corresponding Author: Mohabati Mobarez A, Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

E.mail: mmmobarez@modares.ac.ir

Received: 23 Jul 2012 **Accepted:** 3 Feb 2013

Background and Objective: As the main virulence factor of *Helicobacter pylori*, HP-NAP has an important role in immunoprotection against this pathogen. This antigen is a strong candidate as a part of multi-component vaccine in the clinical trial against this bacterium. Due to NAP importance, it was used in this study as a template for optimization of heterologous genes with a low A-T content and low expression in *E. coli*.

Materials and Methods: A synthetic single gene that could reach the highest level of expression in the host was designed by using bioinformatics tools.

Results: A number of factors that influence gene expression level were changed for *HP-NAP* gene optimizing: the codon usage bias in *E. coli* was changed; the G+C content was upgraded from 38% to 45%; and the stem-loop structure was broken. These could result to prolong of the half-life of the mRNA and overexpression of recombinant of HP-NAP protein up to 800 mg per liter.

Conclusion: Applying of bioinformatics tools was appropriated to optimize of HP-NAP overexpression in *E. coli*. From our results, it appears that combination of *In Silico* and experimental approach is a logical approach for expression of heterologous genes in another host.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Bioinformatics, Optimization, Recombinant HP-NAP, Cloning, Expression.