"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2022.1954420.1362**

Cloning of *Mycobacterium avium paratuberculosis hsp70* gene into pET-24a plasmid and its expression in *Escherichia coli*

Sheini Mehrabzadeh, R.[1], Seyfiabad Shapouri, M.R.[2], Ghorbanpoor, M.[3]*, Gharibi, D.[4]

1- Ph.D. Student in Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
4- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
*Corresponding author's email: m.ghorbanpoor1967@gmail.com
(Received: 2022\4\29 Accepted: 2022\8\13)

Abstract

Johne's disease (Paratuberculosis) is a disease caused by *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) which is a chronic and progressive infection that chiefly affects ruminants. The disease can lead to significant economic losses in the livestock industry and may also be a threat for public health; because it may be transmitted to humans through consumption of milk and other contaminated animal products. Immunity and resistance against the Johne's disease is mainly due to cell mediated immune response. Heat Shock Protein 70 (HSP70) of this bacterium is one of its important proteins, which the immune response against it can prevent the fecal excretion of bacteria. In order to facilitate the production of recombinant vaccine against Johne's disease, in this study the recombinant HSP (recombinant HSP; rHSP) was produced and its immunogenicity investigated in rabbits. For this purpose, the *hsp70* gene was cloned into pET-24a plasmid and the resulting recombinant plasmid was transferred to *E. coli* strain BL21. The expression of the above protein was checked by SDS-PAGE and the accuracy of the nucleotide sequence was confirmed by sequencing. Immunization of rabbits by rHSP70 resulted in the production of high levels of antibodies. Based on the findings, it seems that the HSP70 specific antibody can be evaluated in the design of diagnostic methods of the disease and the produced recombinant protein can be assessed for the production of recombinant vaccines.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Cloning, Heat Shock Protein 70, Johne's disease, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, pET-24a plasmid.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2022.1954420.1362

همسانه‌سازی ژن *hsp70* *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه *پاراتوبرکلوزیس* در پلاسمید pET-24a و بیان آن در باکتری *اشریشیا کولای*

رسا شینی‌محراب‌زاده[۱]، مسعودرضا صیفی‌آباد شاپوری[۲]، مسعود قربانپور[۳*]، داریوش غریبی[۴]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۴- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: m.ghorbanpoor1967@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۲/۹ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۵/۲۲)

چکیده

بیماری یون (پاراتوبرکلوزیس) ناشی از باکتری *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* (*Mycobacterium avium paratuberculosis*; MAP) عفونت مزمن و پیشرونده‌ای بوده و به‌طور عمده نشخوارکنندگان را درگیر می‌سازد. این بیماری می‌تواند خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت دامپروری وارد سازد و ممکن است تهدیدی نیز برای بهداشت عمومی باشد، چون با انتقال از راه شیر و دیگر فراورده‌های دامی آلوده ممکن است انسان را نیز آلوده نماید. مقاومت و ایمنی در برابر بیماری یون، بیش‌تر به پاسخ ایمنی با واسطهٔ سلولی مرتبط است. پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (heat shock protein70; HSP70) باکتری فوق، یکی از پروتئین‌های مهم آن می‌باشد که پاسخ ضد آن از دفع مدفوعی باکتری جلوگیری می‌کند. به‌منظور فراهم‌سازی تولید واکسن نوترکیب جهت مقابله با بیماری یون، در این مطالعه تولید HSP نوترکیب (recombinat HSP; rHSP) و بررسی ایمنی‌زایی آن در خرگوش مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ژن *hsp70* در پلاسمید pET-24a همسانه‌سازی گردید و پلاسمید نوترکیب حاصله به سویهٔ BL21 باکتری *اشریشیا کولای* منتقل شد. بیان پروتئین فوق با استفاده از SDS-PAGE بررسی و صحت توالی نوکلئوتیدی با تعیین توالی، تأیید گردید. تزریق rHSP70 به خرگوش با تولید سطح بالایی از آنتی‌بادی ضدِّ آن همراه بود. بر اساس یافته‌ها، به نظر می‌رسد که آنتی‌بادی ضد rHSP70 را می‌توان در طراحی روش‌های تشخیصی بیماری و پروتئین نوترکیب تولیدشده را جهت تولید واکسن‌های نوترکیب مورد ارزیابی قرار داد.

کلیدواژه‌ها: بیماری یون، پروتئین شوک حرارتی ۷۰، *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس*، همسانه‌سازی، پلاسمید pET-24a.

مقدمه

بیماری یون (پاراتوبرکلوزیس)، التهاب گرانولوماتوزی مزمن روده کوچک نشخوارکنندگان است که عامل آن باکتری *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* می‌باشد. این بیماری گسترش جهانی دارد و به‌طور معمول، نشخوارکنندگانِ اهلی و وحشی با سن بالای دو سال را درگیر می‌نماید (Constable *et al.*, 2017). یون از جمله بیماری‌های شایع دامی است که در ایران نیز در طی مطالعات متعدد جنبه‌های مختلف آن بررسی شده است (Tolouei Kaleibar *et al.*, 2016; Bagheri *et al.*, 2017). در این بیماری پاسخ‌های ایمنی با واسطه سلولی، در مقاومت میزبان، کنترل عفونت و دفع میکروب نقش دارند. اگر مقاومت کاملی در برابر عامل بیماری ایجاد نشود، جرم، به‌تناوب دفع می‌شود و گاهی نیز اصلاً مقاومتی ایجاد نمی‌شود و دائماً عامل به خارج دفع می‌گردد که علایم درمانگاهی بیماری یون، صرفاً در دام‌های این گروه دیده می‌شود. نشانی‌های بیماری یون پس از طی دورهٔ کمون نسبتاً طولانی (به‌طور متوسط ۱۸–۱۵ ماه)، با بروز ضایعات روده‌ای شدید مشاهده می‌شود (Markey *et al.*, 2013). اسهال مزمن به همراه کاهش وزن تدریجی ازجمله علائم شاخص بیماری است. گاهی کاهش وزن قبل از بروز اسهال دیده می‌شود و حتی در بز و گوسفند ممکن است دام تلف شود ولی اسهال عارض نشود (Constable *et al.*, 2017). خسارات اقتصادی ناشی از یون قابل توجه بوده و احتمال سرایت عامل آن از طریق شیر و دیگر محصولات به انسان نیز مطرح است (Koets *et al.*, 2006).

کنترل و ریشه‌کنی بیماری یون به‌دلیل گسترش بیماری و ویژگی و حساسیت کمِ روش‌های تشخیصی موجود، سخت به نظر می‌رسد ولی در صورت معرفی واکسن مؤثر، قابل تصور خواهد بود (Manning *et al.*, 2001). واکسن‌هایی که جهت پیش‌گیری از بیماری یون مطرح شده‌اند، بیش‌تر شامل باکتری کشته‌شده MAP (با یا بدون ادجوانت) یا سویه‌های تضعیف شده آن بوده‌اند که اگرچه این واکسن‌ها در جلوگیری از پاراتوبرکلوزیس بالینی مؤثر هستند، ولی قادر به جلوگیری از دفع مدفوعی باکتری نیستند و لذا منجر به حذف عفونت از گله نمی‌شوند و از طرفی هم با تشخیص تفریقی سل و یون تداخل ایجاد می‌کنند (Gurung *et al.*, 2014). در جهت مبارزه با بیماری، در کنار ارتقاء سطح بهداشت و مدیریت دامداری‌ها، معرفی واکسن‌هایی کارا که تحریک ایمنی سلولی را باعث شوند و در تشخیص نیز تداخلی ایجاد ننماید، ضرورت دارد (Griffiths *et al.*, 2014). از جمله پادگن‌های نوترکیب پروتئینی که در مطالعات واکسن یون بسیار مورد توجه قرار گرفته است، پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (Heat shock protein70; HSP70) *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* می‌باشد. پروتئین‌های شوک حرارتی، علاوه بر نقشی که در ایجاد ساختار فضایی صحیح و کارایی درستِ پروتئین‌های ترجمه‌شده ایفا می‌نمایند، عملکردهای ضدالتهابی هم دارند. مطالعات نشان داده که HSP70 پاسخ‌های ایمنی هومورال و وابسته به سلول را القاء می‌کند و از آن به عنوان یک واکسن تحت واحد، به‌طور موفقیت‌آمیزی برای مقابله با بیماری یون گاوی استفاده شده‌است (Koets *et al.*, 2006).

با توجه به مطالب ذکر شده، در مطالعهٔ حاضر، بومی‌سازی تولید HSP70 نوترکیب (Recombinat HSP; rHSP) و ارزیابی ایمنی‌زایی آن در خرگوش مد نظر قرار گرفت تا زمینهٔ استفاده از آن در قالب واکسن‌های نوترکیب (تحتِ واحد) یا همسانه‌سازی آن در باکتری‌هایی مثل *بروسلا آبورتوس* که شبیه *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس*، یک جرم داخل سلولی اختیاری است، فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

این مطالعهٔ تجربی در طی سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰ در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز صورت گرفت.

- **سویه‌های باکتریایی و وکتورهای استفاده‌شده:** جدایهٔ محلیِ باکتری *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه *پاراتوبرکلوزیس* از موسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (کرج، ایران) تهیه شد. سویه‌های DH5α و BL21 (DE3) باکتری *اشریشیا کولای* هم که از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) تهیه شده بود، به‌عنوان میزبان‌های تکثیری و بیانی استفاده شدند. همچنین وکتور پلاسمیدی pET-24a (شرکت تراژن‌ساز ویستا، تهران، ایران) جهت همسانه‌سازی ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت.

- **استخراج DNA ژنومی و تعیین هویت جدایه محلیِ MAP**: استخراج DNA ژنومی از MAP با استفاده از یک کیت تجاری (شرکت رها زیست پادتن، ایران) صورت گرفت. در ادامه DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز (پایا پژوهش، ایران) گردیده و خلوص آن نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (Eppendorf, Germany) ارزیابی شد. DNA استخراجی تا زمان انجام آزمایش در برودت ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شد. تعیین هویت باکتری فوق، با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی مربوط به سکانس IS900 مطابق روش وایتینگتون و همکاران، صورت گرفت (Whittington *et al*., 1998).

- **طراحی آغازگر و برنامه PCR**: توالی ژن کدکنندهٔ پروتئین HSP70 (ژن*hsp70*)، با شماره دسترسی AF254578 از بانک ژن، استخراج و طراحی آغازگرهای مربوط به آن با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام گردید (جدول ۱). البته با توجه به عدم وجود محل برش آنزیم HindIII در توالی ژن فوق، توالی محل برش این آنزیم در ابتدای ۵′ آغازگرهای طراحی شده اضافه گردیده و سپس ساخت پرایمرها به شرکت ژن فناوران (تهران، ایران) سفارش داده شد. تکثیر ژن مورد نظر با استفاده از PCR و توسط آغازگرهای طراحی شده و مسترمیکس (آپمپلیکون، دانمارک) طی برنامهٔ دمایی و زمانی شامل: واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۳ دقیقه، واسرشته‌سازی اصلی در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس (۳۰ ثانیه)، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجهٔ سلسیوس (۳۰ ثانیه)، گسترش در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس (۲ دقیقه) و تکثیر نهایی هم در دمای ۷۲درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه و طی ۳۰ چرخه، صورت گرفت. در نهایت محصول PCR (۱۹۰۹ جفت باز) بر روی ژل آگارز ۱ درصد و در کنار سایز مارکر DNA (سیناژن، ایران)، الکتروفورز گردیده (Ausubel *et al*., 1992) و پس از تأیید درستی PCR، محصول آن توسط کیت

تخلیص (شرکت رها زیست پادتن، ایران) طبق دستورالعمل شرکت، خالص‌سازی شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر ژن *hsp70* باکتری *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه *پاراتوبرکلوزیس* مورد آزمایش (جایگاه برشی آنزیم محدودکننده HindIII در این پرایمرها با حروف ایتالیک مشخص شده‌است).

نام پرایمرها	توالی پرایمرها (′3 →′5)
HSPF	GTT*AAGCTT*TTATGGCTCGTGCGGTCGGTATC
HSPR	GTT*AAGCTT*CTTGGACTCCCGGTCATCG

- **همسانه‌سازی ژن *hsp70*** بدین منظور، ابتدا محصول PCR تخلیص‌شده در مرحله قبل و پلاسمید pET-24a، هر یک جداگانه با آنزیم HindIII (شرکت Jena Bioscience، آلمان) برش داده شدند و پس از تخلیص محصولات هضم‌شده با استفاده از کیت تجاری (رها زیست پادتن، ایران)، عمل اتصال پلاسمید و محصول PCR، توسط آنزیم DNA لیگاز T_4 (Thermo scientific، لیتوانی) طبق دستورالعمل شرکت تولیدکننده صورت گرفت. در ادامه پلاسمیدهای نوترکیب pET-24a-hsp70 توسط شوک حرارتی به سویه DH5α *اشریشیا کولای* پذیراشده با کلرید کلسیم، منتقل شد و باکتری‌ها بر روی محیط LB (Luria-Bertani) آگار حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین (Sigma, USA) کشت داده شدند. غربالگری کلونی‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب با روش PCR و هضم آنزیمی صورت گرفت (Ausubel *et al.*, 1992). پلاسمیدهای نوترکیب دارای ژن HSP70 با کیت تجاری (شرکت رها زیست پادتن، ایران) استخراج گردید و جهت تعیین توالی از طریق شرکت تکاپوزیست، به شرکت بیونیر کره جنوبی فرستاده شد.

تعیین توالی توسط پرایمرهای عمومی T_7 Promoter (5' – TAATACGACTCACTATAG – 3') و T_7 Terminator (5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G - 3') صورت گرفت.

- **تأیید همسانه‌سازی با تعیین توالی دوطرفه:** برای تأیید عدم وجود جهش در ژن *hsp70*، دو نمونه پلاسمید نوترکیب پس از استخراج با کیت (شرکت رها زیست پادتن، ایران)، با آغازگرهای T_7 Promoter و T_7 Terminator از طریق شرکت تکاپوزیست، توسط شرکت بایونیر (Bioneer) کره جنوبی تعیین توالی دو طرفه گردید. پس از حصول اطمینان از درستی همسانه‌سازی، باکتری واجد پلاسمید نوترکیب در حجم انبوه تکثیر و پروتئین نوترکیب خالص‌سازی شد.

- **نحوه بیان پروتئین نوترکیب شوک حرارتی ۷۰ (rHSP70) و تخلیص آن:** عمل فوق با انتقال پلاسمید نوترکیب pET-24a-hsp70 در سویهٔ پذیراشدهٔ BL21 (DE3) *اشریشیا کولای* و کشت (دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۸ ساعت) یکنواخت بر روی محیط LB جامد حاوی کانامایسین آغاز گردید. در ادامه پس از ظهور کلنی‌ها و کشت شبانه آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در محیط LB مایع دارای ۸ میلی‌مولار گلوکز، به نسبت ۱ به ۱۰۰ کشت داده شد. پس از گذشت مدت زمان لازم و رسیدن دانسیته نوری (OD) محیط به حدود ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، بیان

پروتئین نوترکیب با افزودن میزان ۱ میلی‌مولار از Isopropylthio-β-galactoside (IPTG, V, Germany) القاء شده و البته کشت باکتری در دمای۳۷ درجهٔ سلسیوس، تحت تکان شدید (۱۵۰ دور در دقیقه) به مدت ۴ ساعت ادامه یافت . در ادامه محتویات محیط کشت مذکور، در شتاب g ۶۰۰۰ و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس، به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی حذف شد. در نهایت، بیان پروتئین در رسوب باکتریایی، قبل و بعد از اضافه کردن IPTG، در ژل پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد با استفاده از روش SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی آبی‌کوماسی (Merck، آلمان) ارزیابی گردید. پس از اطمینان از بیان پروتئین مورد نظر، خالص‌سازی آن صورت گرفت. برای این کار، به باکتری‌های رسوب داده شده، بافر لیزکننده حاوی ایمیدازول (۱۰میلی‌مولار)، تریتون x-100 (۰/۱ درصد)، لیزوزیم (۱۰۰µg/ml)، Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (۱ میلی‌مولار) و گلیسرول (۱۰ درصد) اضافه گردیده و پس از یکنواخت‌سازی، ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده‌شد. در ادامه بعد از چندین بار انجماد در ۷۰- درجهٔ سلسیوس و ذوب کردن رسوب مذکور، به آن به مقدار ۱ میلی‌گرم آنزیم DNase و نیز به میزان ۲ میلی‌مول از ترکیب $MgCL_2$ اضافه گردیده و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس قرار داده‌شد، تا شفاف گردد. سپس محلول حاوی باکتری لیزشده به مدت ۱۵ دقیقه در شتاب g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی حاصله که حاوی پروتئین مورد نظر بود، جمع‌آوری شد. در خاتمه، مایع رویی از ستون رزین-کبالت (Thermofisher, Germany) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده عبور داده شد و پروتئین rHSP70 حاوی توالی ۶ هیستیدینی خالص گردید و تخلیص آن هم با استفاده از ژل۱۰ درصد پلی‌آکریلامید و روش SDS-PAGE مورد تأیید قرار گرفت (Ausubel *et al.*, 1992).

- **بررسی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب HSP70 درخرگوش**: بدین منظور ابتدا میزان ۱۰۰ میکروگرم از rHSP70 با ادجوانت مونتاناید ISA70 به نسبت حجمی ۳۰ درصد پروتئین و ۷۰ درصد ادجوانت، به طور کامل مخلوط گردیده و به‌صورت داخل عضلانی، به ۲ سر خرگوش تزریق شد. ایمن‌سازی‌ها به فاصله‌های ۳ هفته‌ای، دو بار دیگر تکرار گردید (Stills, 2012).

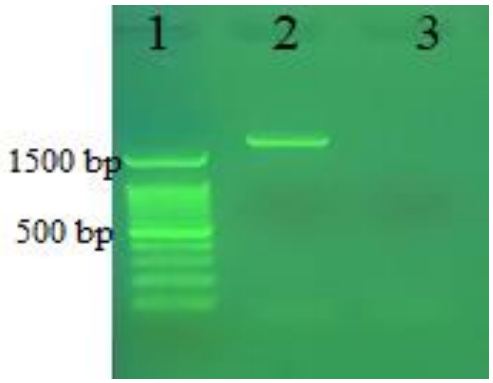
لازم به ذکر است که جهت بررسی روند افزایش عیار آنتی‌بادی ناشی از عمل ایمن‌سازی ذکرشده، قبل از تزریق اول و هم‌چنین در مرتبه دوم و دو هفته پس از تزریق نهایی، خون‌گیری از خرگوش‌ها از طریق ورید حاشیه‌ای گوش انجام می‌گرفت. در ادامه خون‌های اخذ شده ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرار داده می‌شد تا لخته شوند و سپس جهت تهیه سرم مربوطه، در شتاب g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ می‌شدند. سرم‌های جداشده هم تا زمان انجام آزمایش الایزا در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری می‌شدند.

- **نحوه انجام آزمایش الایزا**: جهت ارزیابی عیار آنتی‌بادی ضدِّ پروتئین rHSP70، آزمایش الایزا غیرمستقیم صورت پذیرفت. برای این کار مقدار ۱ میکروگرم از rHSP70 در حجم ۱۰۰میکرولیتر از بافر کربنات/ بی‌کربنات با pH=۹/۶ در هر چاهک از پلیت الایزا ریخته شد و پلیت برای یک شب در یخچال ۴ درجهٔ سلسیوس قرار داده‌شد. سپس چاهک‌ها با

استفاده از PBST (بافر نمکی فسفات حاوی ۰/۵ در هزار توئین ۲۰) دوبار شسته شده و در ادامه با استفاده از PBST حاوی ۵ درصد پودر شیرخشک (Merck, Germany) به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس، نواحی خالی احتمالی، پر گردید. در این مرحله بعد از شستشو مطابق روش گفته‌شده، رقت‌های دو برابر (۱:۴۰۰، ۱:۸۰۰، ....، ۱:۵۱۲۰۰) سرم‌های خرگوشی در PBST حاوی ۰/۵ درصد شیر خشک تهیه گردیده و در دو تکرار به چاهک‌ها اضافه شدند. بعد از یک ساعت قرارگیری در دمای محیط و ۴ مرتبه شستشو با PBST، رقت ۱:۵۰۰۰ از کونژوگه پراکسیداز ضدِّ پادتن خرگوش (sigma، آمریکا) به چاهک‌ها اضافه گردیده و پلیت ۹۶ چاهکی مربوطه، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده‌شد. در ادامه چاهک‌ها ۴ مرتبه دیگر با PBST شسته شدند و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کروموژن (Tetramethylbenzidine) سوبستریِ (H_2O_2) تولیدیِ شرکت رها زیست پادتن به چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت هم واکنش آنزیمی پس از ۱۵ دقیقه با اضافه‌کردن مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول ۰/۱ مولار اسید کلریدریک (Merck, Germany) متوقف گردید. دانسیتهٔ نوری چاهک‌ها هم در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Accuareader، تایوان) تعیین گردید (Ausubel *et al.*, 1992).

یافته‌ها

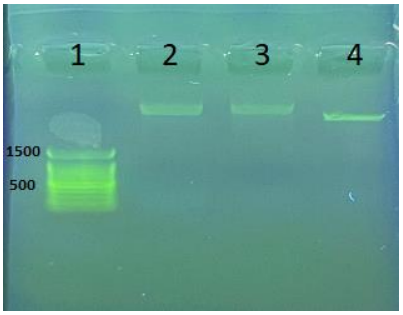
- **نتایج مربوط به تکثیر ژن *hsp70*:** بر اساس شکل ۱، نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن *hsp70* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوطه و پس از الکتروفورز محصول واکنش تخلیص‌شده، نشان داد که قطعه‌ای به اندازه ۱۹۰۹ جفت باز تکثیر یافته‌است.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *hsp70 مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه *پاراتوبرکلوزیس*. ۱- مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ۲- نمونهٔ مثبت، ۳- کنترل منفی.

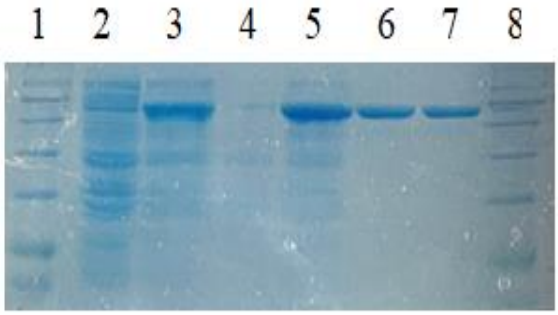
- **نتایج مربوط به همسانه‌سازی ژن *hsp70*:** واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی کلونی‌های حاصل از همسانه‌سازی، دال بر الحاق موفق ژن فوق در پلاسمید pET-24a بود (شکل ۲). تعیین توالی نوکلئوتیدی پلاسمید نوترکیب در یکی از کلونی‌های به‌دست آمده

نیـز، تأییدکننـدهٔ همسـانه‌سـازی موفـق ژن یادشـده در وکتور pET-24a بود.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR حاصله از پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *hsp70 مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه *پاراتوبرکلوزیس*. ۱- مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت ۴- کنترل منفی پلاسمید pET-24a.

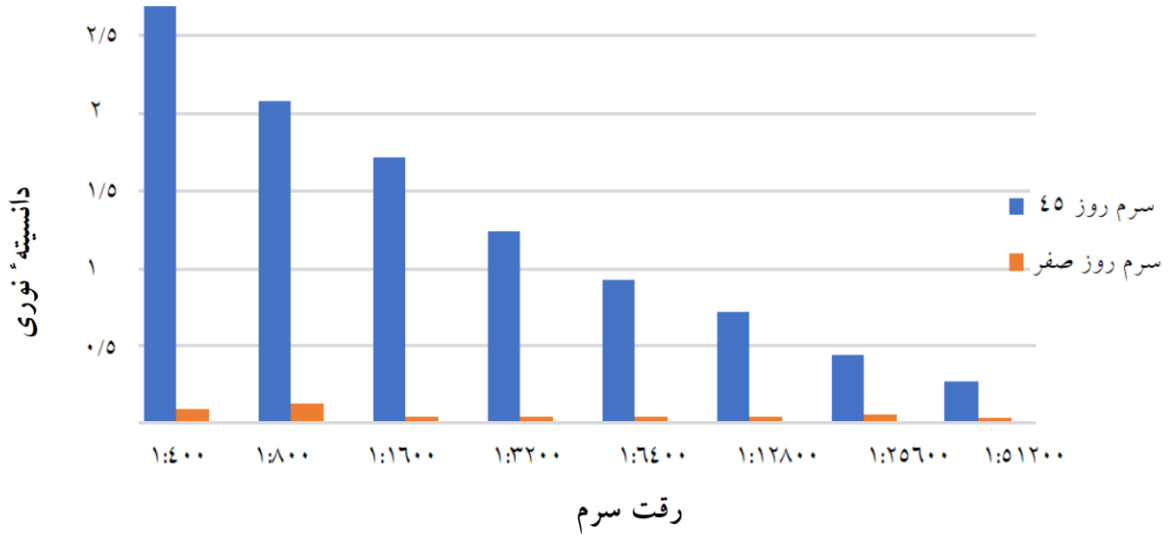
- نتایج مربوط به بیان پروتئین شوک حرارتی ۷۰: مطـابق اطلاعات ارائه شده در شـکل ۳، عمـل انتقـال پلاسـمید نوترکیب به *اشریشیا کـولای* BL21 (DE3)، القـاء بیـان پروتئین با IPTG و متعاقبـا بررسـی پروفایـل پروتئینـی باکتری حامل پلاسمید با SDS-PAGE، دلالت بـر بیـان پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۷۰ کیلودالتـون داشـت که با وزن مولکولی مورد انتظار بـرای پـروتئین HSP70 تطـابق دارد. بانـدهای ۶ و ۷ هـم در تصـویر مـذکور، پروتئین مورد نظر را، پس از تخلـیص بـا سـتون رزیـن کبالت نشان می‌دهد.



شکل ۳- الکتروفورز پروتئین‌های نوترکیب حاوی پلاسمید pET24a-HSP70 بیان‌شده در سویه BL21 *اشریشیا کولای*، قبل و پس از القاء بیان پروتئین rHSP70. ستون‌های ۱ و ۸، مارکر وزن مولکولی، ستون‌های ۲ و ۴ دو کلون نوترکیب قبل از القاء بیان پروتئین، ستون‌های ۳ و ۵ دو کلون نوترکیب پس از القاء بیان پروتئین و ستون‌های ۶ و۷، rHSP70 خالص شده با ستون رزین-کبالت را نشان می‌دهند.

- نتایج مربوط به ایمنی‌زایی پروتئین rHSP70 تولیدشده: براساس اطلاعات ارائه شده در نمودار ۱، ارزیـابی عیـار پادتن ضد پروتئین rHSP70 در خرگوش‌های ایمن‌شده در روزهای صفر (شروع ایمـن‌سـازی) و ۴۵ (دو هفتـه پس از مرحلهٔ دوم ایمن‌سازی)، پس از انجـام آزمـایش الایـزا نشـان داد کـه دانسـیتهٔ نـوری (optical density; OD) سرم در روز صفر برابـر بـا ۰/۰۸۲ و در حـد دانسیتهٔ نوری سرم به تنهایی و بدون وجود آنتی‌ژن (بـه عنوان شاهد منفی) می‌باشد؛ در صورتی که این میزان در روز ۴۵ در رقت ۱:۴۰۰ بـه ۲/۶۹۶ افـزایش یافتـه بـود.

افزایش دانسیتهٔ نوری تا رقت ۱:۲۵۶۰۰ سرم نیز قابل توجه بود که نشان دهندهٔ ایمنی‌زایی بسیار زیاد این پروتئین در خرگوش بود.



نمودار ۱- میانگین عیار پادتنِ ضد rHSP70 (دانسیتهٔ نوری مشاهده‌شده در آزمایش الایزا) در سرم ۲ سر خرگوش ایمن‌شده با پروتئین نوترکیب در روزهای صفر (قبل از ایمن‌سازی) و ۴۵ روز پس از دریافت rHSP70. محور افقی رقت‌های سرم از ۱:۴۰۰ تا ۱:۵۱۲۰۰ را نشان می‌دهد. محور عمودی، نشان‌دهنده میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری یون ناشی از جرم داخل سلولی *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* است که در سرتاسر دنیا تهدیدی برای سلامت نشخوارکنندگان و احتمالاً انسان محسوب می‌شود. تشخیص آزمایشگاهی و کنترل این بیماری همیشه چالش برانگیز بوده‌است (Santema *et al.*, 2009). از آنجایی که واکسن‌های حاوی جرم کامل زنده یا کشته (باکترین) عامل بیماری یون با برنامه‌های کنترلی بیماری سل نشخوارکنندگان تداخل ایجاد می‌نماید و نتوانسته‌اند به طور کامل دفع مدفوعی باکتری را کاهش دهند، در عمل علیه بیماری مذکور، هنوز واکسن تجاری مورد تأیید قرار گرفته‌ای، در دسترس نمی‌باشد. شاید پروتئین‌های اختصاصی MAP، به‌عنوان واکسن زیرواحد، ایرادهای واکسن‌های کامل مربوطه را نداشته باشند (Bannantine *et al.*, 2008; Santema *et al.*, 2009)، از این‌رو در سال‌های اخیر تلاش‌هایی در خصوص ارزیابی پروتئین‌های اختصاصی نوترکیب جرم به عنوان واکسن صورت گرفته است (Dheenadhayalan *et al.*, 2002; Whittington *et al.*, 2004; Koets *et al.*, 2006). پروتئین‌های شوک حرارتی، در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی، مولکول‌های حفاظت شده‌ای هستند که در اثر تنش‌های مختلف مثل گرما، سرما و تابش پرتو فوق بنفش، بیان آن‌ها افزایش می‌یابد. این پروتئین‌ها، در بازیابی مجدد فعالیت پروتئین‌های تغییریافته در اثر تنش دخالت دارند.

در سلول‌های یوکاریوت این پروتئین‌ها در عرضهٔ آنتی‌ژن‌ها توسط مولکول‌های پذیرش بافتی اصلی (MHC) نیز نقش دارند و بنابراین پاسخ ایمنی سلولی (لنفوسیت‌های T) را تحریک می‌کنند. مایکوباکتریوم‌ها چهار نوع HSP (Hsp90، Hsp70، Hsp60 و small Hsp) دارند که بسیار حفاظت شده می‌باشند. Hsp70 به‌طور اختصاصی به گیرنده‌های سطح ماکروفاژها و سلول‌های دندرتیک وصل می‌گردد و تولید سایتوکین‌های پیش التهابی و IFN-γ توسط سلول‌های T و NK را باعث می‌شود. بیان متفاوت پروتئین‌های شوک حرارتی از جمله HSP65 و HSP70 در طی مراحل مختلفِ بیماری پاراتوبرکلوز گزارش شده که می‌تواند در تشخیص مراحل متفاوت عفونت و شکل بیماری کاربرد داشته باشد (Koets *et al*., 2001).

تحقیق حاضر به منظور بومی‌سازی تولید پروتئین نوترکیب HSP70 و فراهم‌سازی زمینهٔ تهیهٔ واکسن نوترکیبِ زیرواحدی جهت مقابله با بیماری یون و نیز فراهم شدن بستر لازم جهت بررسی امکان همسانه‌سازی آن در برخی از باکتری‌های داخل سلولی اختیاری مانند *لیستریا مونوسیتوژنز* و *بروسلا آبورتوس* صورت گرفت. از آنجایی که مقاومت در برابر بیماری یون بیش‌تر به ایمنی سلولی مربوط می‌شود تا ایمنی هومورال، احتمالاً در صورت همسانه‌سازی ژن‌های مربوط به پروتئین‌های محافظت‌کننده در باکتری‌های داخل سلولی اختیاری و استفاده از آن‌ها به عنوان واکسن (جرم نوترکیب)، تحریک ایمنی سلولی و مقاومت بیشتری در برابر یون شکل خواهد گرفت. بر اساس اطلاعات موجود، در این زمینه، تاکنون مطالعه‌ای در داخل کشور انجام نگرفته است ولی در خارج از کشور تحقیقات نسبتاً مشابهی صورت گرفته که به اختصار بدان‌ها اشاره می‌شود:

کولستون و همکاران در انگلستان، همسانه‌سازی *hsp60* *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* در پلاسمید pGEX-2t و انتقال آن به کلی‌باسیل سویهٔ JM38 و بیان موفق آن را گزارش نموده‌اند (Colston *et al*., 1994). کوتز و همکاران مطالعه‌ای را بر روی پاسخ‌های ایمنی سلولی در گاوها با استفاده از سه ترکیب PPD، HSP65 و HSP70 *مایکوباکتریوم اویوم* تحت‌گونه *پاراتوبرکلوزیس* انجام داده و گزارش نموده‌اند که HSP70 در مقایسه با HSP65 و PPD به‌طور مؤثرتری می‌تواند پاسخ‌های ایمنی با واسطه سلول را القاء نماید (Koets *et al*., 1999).

کوتز و همکاران، همسانه‌سازی موفق ژن‌های *hsp70* و *hsp65* در پلاسمید pTrcHis و بیان آن در سویه Top10 *اشریشیا کولای* را گزارش نموده و بیان داشته‌اند که در مرحلهٔ بدون علایم بیماری یون، میزان پادتن‌های ضدِّ این آنتی‌ژن‌ها (IgG_1 و IgG_2)، بیش‌تر از مرحلهٔ کلینیکی بیماری است (Koets *et al*., 2001). نتایج نامبردگان در خصوص امکان تولید HSP70 نوترکیب و ایمنی‌زا بودن آن با یافته‌های پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد (نمودار ۱). لانگلار و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ نشان داده‌اند که در شرایط آزمایشگاهی پروتئین نوترکیب HSP70 قابل عرضه توسط سلول‌های دندریتیکی گاو می‌باشد که یافتهٔ مطالعهٔ حاضر در خصوص ایمنی‌زا بودن این پروتئین در خرگوش را تا حدودی توجیه می‌نماید (Langelaar *et al*., 2005). کوتز و همکاران برای اولین بار نشان دادند که HSP70 نوترکیب می‌تواند به عنوان یک واکسن زیرواحدی

به‌طور موفقیت‌آمیزی برای مقابله با بیماری یون گاوی استفاده شود. نامبردگان گزارش نموده‌اند که واکسن فوق، دفع مدفوعی باکتری را در ۲ سال اول پس از مایه‌کوبی به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد (Koets *et al.*, 2006). سانتما و همکاران، گزارش نموده‌اند که حداقل ۲ اپی‌توپ (شاخصِ آنتی‌ژنی) خطی تحریک‌کننده‌ٔ ایمنی هومورال (لنفوسیت‌های B) در مولکول HSP-70 وجود دارد که در دیواره‌ٔ سلولی باسیل یون کامل نیز وجود دارد و آنتی‌بادی‌ها با دسترسی و اتصال به آن‌ها می‌توانند محافظت‌کننده باشند (Santema *et al.*, 2011). همچنین طی مطالعه‌ای هم اعلام شده است که آنتی‌سرم خرگوشی پلی‌کلونال ضدِّ HSP70، جهت تشخیص و غربال‌گری بیماری یون با روش ایمنوهیستوشیمی قابل استفاده‌است (Okuni *et al.*, 2017). در مطالعه‌ای ومولاپالی و همکاران، ژن پروتئین شوک حرارتی۶۵ کیلودالتونی *مایکوباکتریوم بوویس* را در پلاسمید PBBR1MCS همسانه‌سازی نموده و به سویه‌ٔ RB51 باکتری *بروسلاآبورتوس* منتقل کرده و باکتری نوترکیب تولیدی را واکسنی با کارایی بالا جهت القاء ایمنی در برابر بروسلوز و سل گاوی دانسته‌اند (Vemulapalli *et al.*, 2000). بر این اساس به نظر می‌رسد که احتمالاً انتقال ژن ***hsp70*** باسیل یون (که در تحقیق حاضر با موفقیت همسانه‌سازی گردید) به باکتری *بروسلا* نیز بتواند به معرفی واکسنی کارا در برابر بیماری‌های بروسلوز و یون منجر گردد. همچنین لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر، برای اولین بار در ایران و جهان جهت تولید پروتئین HSP70 نوترکیب از سیستم پروکاریوتی pET-24a(+) که تحت کنترل پروموتر قوی T_7 می‌باشد، استفاده گردید. این وکتور با اندازه ۵۳۱۰ جفت باز، حاوی ژن مقاومت به کانامایسین و توالی His-tag در انتهای c–ترمینال خود می‌باشد که موجب اطمینان از بیان کامل پروتئین گردیده و تخلیص HSP70با بازده بالا با استفاده از ستون رزین کبالت را امکان‌پذیر می‌نماید (Gopal *et al.*, 2013; Rosano *et al.*, 2014).

براساس یافته‌های پژوهش حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که امکان تولید پروتئین نوترکیب ایمنی‌زای HSP70 باسیل یون وجود دارد و با توجه به بومی‌سازی تولید rHSP70 در این تحقیق، تولید انبوه و ارزیابی واکسن زیرواحد آن و نیز همسانه‌سازی این ژن در سویه‌ٔ RB51 باکتری *بروسلاآبورتوس* و بررسی توان تحریک ایمنی‌سلولی ضدِّ باکتری MAP پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر تأمین هزینه‌های پژوهش حاضر قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌نمایند که هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., *et al*. (1995). Short protocols in molecular biology. 3rd ed., New York: John Wiley & Sons, pp: 158-502.
- Bageri, S., Pourmehdi Broujeni, M., Haji Hajikolaei, M.R. and Ghorbanpoor Najafabadi, M. (2107) Seroprevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in goats of Khuzestan province. Veterinary Clinical Pathology, 10(4): 297-305. [In Persian]
- Bannantine, J.P., Rosu, V., Zanetti, S., Rocca, S., Ahmed, N. and Sechi, L.A. (2008). Antigenic profiles of recombinant proteins from Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in sheep with Johne's disease. Veterinary Immunology and Immunopathology, 122(1-2): 116-125.
- Colston, A., McConnell, I. and Bujdoso, R. (1994). Cloning and expression in Escherichia coli of DNA encoding a 60 kDa stress protein of Mycobacterium paratuberculosis, the causative agent of Johne's disease. Microbiology, 140(12): 3329-3336.
- Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H. and Grünberg, W. (2017). Veterinary Medicine, 11th ed., Missouri, Elsevier, pp: 552-565.
- Dheenadhayalan, V., Shin, K.S., Chang, C.F., Chang, C.D., Wang, S.J., McDonough, S., *et al*. (2002). Cloning and characterization of the genes coding for antigen 85A, 85B and 85C of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. DNA Sequence, 13(5): 287-294.
- Gopal, G.J. and Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. The protein Journal, 32(6): 419-425.
- Griffiths, K.L. and Khader, S.A. (2014). Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. Current Opinion in Immunology, 28: 58-63.
- Gurung, R.B., Purdie, A.C., Whittington, R.J. and Begg, D.J. (2014). Cellular and humoral immune responses in sheep vaccinated with candidate antigens MAP2698c and MAP3567 from Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4: 93.
- Koets, A., Hoek, A., Langelaar, M., Overdijk, M., Santema, W., Franken, P., *et al*. (2006). Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. Vaccine, 24(14): 2550-2559.
- Koets, A.P., Rutten, V.P., de Boer, M., Bakker, D., Valentin-Weigand, P. and van Eden, W. (2001). Differential changes in heat shock protein-, Lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection. Infection and Immunity, 69(3): 1492-1498.
- Koets, A.P., Rutten, V.P.M.G., Hoek, A., Bakker, D., Van Zijderveld, F., Müller, K.E., *et al*. (1999). Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 70(1-2): 105-115.
- Langelaar, M.F.M., Hope, J.C., Rutten, V.P.M.G., Noordhuizen, J.P.T.M., Van Eden, W. and Koets, A.P. (2005). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis recombinant heat shock protein 70 interaction with different bovine antigen presenting cells. Scandinavian Journal of Immunology, 61(3): 242-250.
- Manning, E.J. and Collins, M.T. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), 20(1): 133-150.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. and Maguire, D. (2013). Clinical veterinary microbiology e-book. Elsevier Health Sciences, pp: 161-176.
- Okuni, J.B., Kateete, D.P., Okee, M., Nanteza, A., Joloba, M. and Ojok, L. (2017). Application of antibodies to recombinant heat shock protein 70 in immunohistochemical diagnosis of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in tissues of naturally infected cattle. Irish Veterinary Journal, 70(1): 1-7.
- Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances

and challenges. Frontiers in Microbiology, 5: 172.

- Santema, W., Hensen, S., Rutten, V. and Koets, A. (2009). Heat shock protein 70 subunit vaccination against bovine paratuberculosis does not interfere with current immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. Vaccine, 27(17): 2312-2319.
- Santema, W., Van Kooten, P., Hoek, A., Leeflang, M., Overdijk, M., Rutten, V., *et al*. (2011). Hsp70 vaccination-induced antibodies recognize B cell epitopes in the cell wall of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Vaccine, 29(7): 1364-1373.
- Stills, H.F. (2012). Polyclonal antibody production. In The laboratory rabbit, Guinea pig, Hamster, and other rodents. Lexington: Academic Press, pp: 259-274.
- Tolouei Kaleibar, M., Mogaddam, G. and Fahimi, M. (2016) Evaluation of clinical and intestinal ultrasonographic findings in cows with Johne's disease. Veterinary Clinical Pathology, 10(1): 11-25. [In Persian]
- Vemulapalli R., He Y., Boyle S.M., Sriranganathan N. and Schurig G.G. (2000). Brucella abortus strain RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune responses. Infection and Immunity, 68(6): 3290.
- Whittington, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J., Marsh, I.B. and Reddacliff, L.A. (2004). Survival and Dormancy of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the Environment. Applied and Environmental Microbiology, 70(5): 2989-3004.
- Whittington, R.J., Marsh, I., Turner, M.J., McAllister, S., Choy, E., Eamens, G.J., *et al*. (1998). Rapid detection of Mycobacterium paratuberculosis in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS 900 PCR. Journal of Clinical Microbiology, 36(3): 701-707.