

همسانه سازی جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A سودوموناس آیروزینوزا

بهرام امینی^۱، دکتر مهدی کمالی^۲، دکتر علی زارعی محمودآبادی^۳، دکتر یوسف مرتضوی^۴، دکتر آزاده ابراهیم حبیبی^۵،
ابراهیم بیات^۶، نیما فرهادی^۷، حمیدرضا جوادی^۸، امیرهمایون کیهان^۹

نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی mehkamali@bmsu.ac.ir

دریافت: ۸۸/۱۰/۲۷ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: آنتی بادی بر علیه اگزوتوکسین A سودوموناس آیروزینوزا می تواند در ایمنوتراپی همراه با درمان آنتی بیوتیکی در بیماران دچار سوختگی شدید استفاده گردد. اگزوتوکسین A یکی از فاکتورهای بیماریزای سودوموناس آیروزینوزا است که از سه جایگاه اتصال دهنده، انتقال دهنده و کاتالیتیک تشکیل شده است. هدف از این مطالعه تولید نو ترکیب جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A این میکرواورگانیسم، جهت تولید آنتی بادی بر علیه آن می باشد.

روش بررسی: نمونه های سودوموناس آیروزینوزا از بیماران دچار سوختگی نوع دو و سه بستری در بیمارستان آیت الله موسوی زنجان، جدا و با روش های کشت و انجام آزمایشات بیوشیمیایی شناسایی گردید. DNA باکتری استخراج و وجود ژن اگزوتوکسین A روی کروموزوم باکتری از طریق PCR تایید گردید. جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A توسط PCR تکثیر و محصول PCR و پلاسمید توسط آنزیم های برش دهنده محدودالانر، برش داده شدند. محصول PCR و پلاسمید پس از الحاق به باکتری میزبان *E. coli BL21(DE3)* تراریخت گردید. کلون ها با واکنش PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی غربالگری و تایید گردیدند.

یافته ها: توالی بازهای منطقه ی کاتالیتیک اگزوتوکسین A با اطلاعات بانک ژنی مقایسه و میزان تشابه آن ها ارزیابی گردید. نتایج بیانگر عدم وجود تغییر در ژنوم آن در سوش های مورد مطالعه در کشور بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ۹۰ درصد باکتری های جدا شده دارای سم اگزوتوکسین A بوده و سوش های جدا شده از ایران نیز با توالی های گزارش شده در بانک ژن بین المللی مشابه بودند.

واژگان کلیدی: سودوموناس آیروزینوزا، کلونینگ، اگزوتوکسین A، جایگاه کاتالیتیک

- ۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
- ۲- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
- ۳- دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
- ۴- دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی، زنجان
- ۵- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی، تهران
- ۶- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
- ۷- کارشناس ارشد سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
- ۸- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
- ۹- کارشناس ارشد سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

مقدمه

سودوموناس آيروژینوزا از مهمترین عفونت‌های ثانویه بیمارستانی در بیماران دچار سوختگی می‌باشد. یکی از فاکتورهای بیماری‌زا در این باکتری آگزوتوکسین A است (۱و۲). آگزوتوکسین A از ۶۱۳ اسید آمینه با وزن ملکولی ۶۶ کیلودالتون تشکیل شده است و توسط باکتری به محیط پیرامون آن ترشح می‌شود (۳و۴). اسید آمینه‌ی لیزین در انتهای کربوکسیل آگزوتوکسین A توسط کربوکسیل پپتیداز شکسته شده، باعث اتصال سم به گیرنده‌ی α_2 - ماکروگلوبولین سلول‌های یوکاریوت می‌شود (۵) و از طریق آندوسیتوز وابسته به گیرنده‌ی آگزوتوکسین A وارد سلول می‌شود. آگزوتوکسین A در داخل سلول توسط پروتئازهای ویژه اندوزوم شکسته شده و از رسپتور جدا و پیوندهای دی‌سولفیدی آن احیا می‌شود (۶). از انتهای کربوکسیل آگزوتوکسین A یک قطعه (۶۱۳-۲۸۰ اسید آمینه‌ای) جدا و به شبکه‌ی آندوپلاسمی وارد و از شبکه آندوپلاسمی به سیتوزول منتقل می‌شود (۷و۸). آگزوتوکسین A در سیتوزول از طریق ریبوزیله کردن برگشت ناپذیر اسید آمینه هیستیدین فاکتور طولیل سازی ۲ (eEF-2)، باعث غیر فعال شدن آن می‌گردد. در نتیجه سنتز پروتئین متوقف و مرگ سلول صورت می‌گیرد. (۹) آگزوتوکسین A واجد سه جایگاه (Domain) می‌باشد. جایگاه I از دو جایگاه (aa ۳۶۵-۴۰۴ Ib و aa ۱-۲۵۲ Ia) تشکیل شده است. جایگاه Ia مسئول اتصال به گیرنده‌ی سلولی است. حذف و جهش در اسید آمینه موقعیت ۵۷ دامنه‌ی Ia باعث غیرفعال شدن آگزوتوکسین A و مهار اتصال سم به سلول می‌گردد. نقش جایگاه Ib هنوز مشخص نشده است. حذف بخشی از دامنه‌ی Ib (aa ۳۸۰-۳۶۵) هیچ تاثیری بر روی سمیت آگزوتوکسین A ندارد (۱۰). جایگاه II (aa ۳۶۴-۲۵۳) باعث عبور سم از عرض غشای سلول می‌شود (۱۱). جایگاه III (aa ۶۱۳-۴۰۵) از طریق پنج اسید آمینه‌ی انتهای کربوکسیل باعث ریبوزیله شدن فاکتور

طولیل سازی ۲ (eEF-2) می‌گردد (۱۲و۱۳). ژن آگزوتوکسین A بر روی کروموزوم باکتری قرار داشته به همین دلیل بیش از ۹۰ درصد گونه‌های سودوموناس آيروژینوزا این سم را تولید می‌کنند (۱۴و۱۵). همساز سازی آگزوتوکسین A و توالی یابی ژن آگزوتوکسین A در سال ۱۹۸۴ توسط گرگوری (Gregory) و همکاران انجام شد. ژن تنظیم کننده بیان آگزوتوکسین A در سال ۱۹۸۶ توسط هداستروم (Hedstrom) و همکاران مشخص گردید. در سال ۱۹۸۷ توسط کامرون (Cameron) و همکاران جایگاه بیان آگزوتوکسین A تعیین گردید. اخیراً مطالعات زیادی روی ایمنی‌زایی و درمان تومورها از طریق این سم انجام شده است. تولید دامنه‌ی کاتالیتیک آگزوتوکسین A به صورت نوترکیب در این مطالعه برای اولین بار در ایران انجام گردید.

روش بررسی

تشخیص سودوموناس آيروژینوزا: سودوموناس آيروژینوزا از بیماران دچار سوختگی نوع دو و سه بستری در بیمارستان آیت الله موسوی زنجان جدا شدند. این نمونه‌ها با سوآب استریل از بیماران جدا و در محیط نوترینت آگار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شدند. سپس باکتری توسط تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، TSI، تست سیترات، اندول، VP، MR و تولید پیگمان شناسایی و پس از کشت در محیط کشت LB مایع و افزودن گلیسرول (غلظت نهایی ۲۰ درصد) در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره گردیدند.

طراحی پرایمر: جهت تشخیص وجود ژن آگزوتوکسین A بر روی DNA باکتری یک جفت پرایمر، و نیز جهت تکثیر جایگاه کاتالیتیک یک جفت پرایمر دیگر واجد جایگاه‌های برش آنزیمی با توجه به اطلاعات موجود در بانک اطلاعات ژنی طراحی و سنتز گردید (سیناژن، ایران). توالی‌های پرایمر

PCF: 5'-GGC GAATTC GGC GAC GTC AGC TTC A -3'
 PCR: 5'-CGG AAGCTT CTT CAA GTC CTC GCG C -3'

آماده سازی DNA باکتری: سوش باکتری سودوموناس آیروژینوزا در محیط LB-broth به مدت ۱۲ ساعت رشد داده شد. ژنوم کروموزومی باکتری با استفاده از کیت تخلیص ژنوم (High Pure PCR Template Preparation, Roche) استخراج و مطابق جدول ۱ وجود ژن آگزوتوکسین A تأیید گردید.

بالا دست و پایین دست تشخیص سم آگزوتوکسین A عبارت بود از:

PBF: 5'-TGC TGC ACT ACT CCA TGG TC -3'
 PBR: 5'-ATC GGT ACC AGC CAG TTC AG -3'

پرایمرهای بالا و پایین دست جایگاه کاتالیتیک آگزوتوکسین A با جایگاه برش آنزیم‌های برش دهنده محدودالثر EcoRI و HindIII عبارت بود از:

جدول ۱: غلظت‌های عوامل واکنش PCR

Reaction	Concentration	Reagent
۱ µl	۲۰۰ ng/µl	Template DNA
۵ µl	۱۰ X	PCR buffer
۱ µl	۵۰ mM	MgCl ₂
۴ µl	۲/۵ mM	dNTPs
۲ µl	۱۰ pmol/ µl	Forward primer
۲ µl	۱۰ pmol/ µl	Reverse primer
۰/۵ µl	۵ uite/ µl	Taq.DNA pol.
۳۴/۵ µl	-	D.D.W.
۵۰ µl	-	Total volume

واکنش PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز گردید. آماده سازی محصول PCR: محصول واکنش PCR توسط دو آنزیم برش دهنده EcoRI و HindIII با ۲ میکرولیتر از هر آنزیم محدود کننده، ۳۰ میکرولیتر محصول PCR و ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X در حجم واکنش ۵۰ میکرولیتری بر اساس پروتکل شرکت سازنده آنزیم (Fermentase) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد. محصولات برش زده شده توسط کیت استخراج (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) استخراج و روی ژل آگاروز ۲ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز گردید.

جایگاه کاتالیتیک آگزوتوکسین A پس از مشخص شدن ژن آگزوتوکسین A از طریق PCR در شرایط زیر در حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر تکثیر گردید. (۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۲ میکرولیتر MgSO₄ (۲۵ mM)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ mM)، ۲ میکرولیتر DNA و نیم میکرولیتر آنزیم PWO پلیمراز). واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سه مرحله تکراری ۳۵ چرخه‌ای شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه انجام گرفت. پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول

پروتکل استاندارد استخراج شدند. وجود ژنوم نوترکیب از طریق PCR، برش آنزیمی و توالی‌یابی ارزیابی گردید. PCR مطابق شرایط انجام گرفته در همسازسازی صورت گرفت. برش آنزیمی پلاسمید با آنزیم‌های EcoRI، HindIII و BamHI بر اساس پروتکل شرکت سازنده‌ی آنزیم (Fermentas) انجام گرفت. توالی‌یابی نیز توسط مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... انجام شد.

به منظور بیان پروتیین، باکتری نوترکیب در دو لوله‌ی فالدکون ۱۵ میلی‌لیتری دارای محیط کشت LB مایع کانامایسین دار (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت گردید. در $OD=0.6$ به یکی از لوله‌ها IPTG با غلظت نهایی یک میلی‌مولار افزوده شد. لوله‌ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد القا و سپس رسوب هر لوله‌ی فالدکون جمع‌آوری و با دستگاه سونیکاتور در محلول PBS شکسته شد. بیان پروتیین نوترکیب توسط الکتروفورز SDS-PAGE ۱۵ درصد با ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه و رنگ آمیزی کوماسی بلو جستجو گردید. همچنین توسط وسترن بلاتینگ صحت بیان تایید گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه در مجموع ۱۰ نمونه سودوموناس آیروزینوزا از بیماران دچار سوختگی جدا گردید. تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، سیترات و TSI در این باکتری مثبت و تست‌های اندول، VP و MR در این باکتری منفی بود. پس از استخراج DNA، PCR جهت تشخیص ژن اگزوتوکسین A، با استفاده از کروموزوم باکتری، انجام گرفت و روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردید. تشکیل باند ۱۹۰ جفت بازی مربوط به این توکسین، تاییدکننده‌ی ژن اگزوتوکسین A بود. سپس محصول PCR سنتز جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد. نتیجه‌ی آزمایش با این امر کاملاً مطابقت

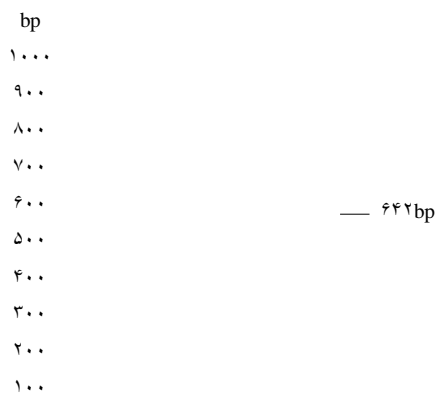
آماده سازی پلاسمید: باکتری حامل پلاسمید (pET28a) در محیط کشت LB مایع به مدت ۱۲ ساعت کشت گردید. پلاسمید آن بر اساس پروتکل استاندارد استخراج و روی ژل آگاروز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز شد. پلاسمید استخراج شده نیز مانند محصول PCR توسط دو آنزیم برش دهنده EcoRI و HindIII در شرایط یکسان به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برش داده شد. محصول برش توسط کیت بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Roche) استخراج و روی ژل آگاروز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت نیم ساعت الکتروفورز شد.

الحاق: مخلوط ابه ۳ محصول PCR و پلاسمید برش خورده را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد و بلافاصله به یخ منتقل گردید. ۲ میکرولیتر آنزیم T4 Ligase و ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X به آن اضافه گردید. به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۰ تا ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. محصول الحاق در نهایت توسط کیت (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Roche) جهت تراریخت استخراج گردید.

تراریخت: سلول‌های صلاحیت‌دار (Competent) بر اساس پروتکل استاندارد با گلیسرول ۱۰ درصد در دمای ۴+ درجه‌ی سانتی‌گراد تهیه و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره گردید. ۵ میکرولیتر از محصول الحاق و ۲۰ میکرولیتر از سلول‌های صلاحیت‌دار با هم مخلوط و به مدت ۱ دقیقه در داخل یخ قرارداد شده. توسط دستگاه Gen Pulser با ولتاژ ۲۵۰۰ محصول الحاق به *E. coli BL21(DE3)* منتقل و به مدت یک ساعت در محیط SOC کشت داده شد. رسوب باکتری‌های محیط کشت SOC پس از سانتریفوژ (۴۰۰۰ g) در محیط کشت LB جامد دارای کانامایسین (۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به صورت چمنی کشت داده شد. غربالگری کلنی‌ها: کلنی‌های محتوی پلاسمید بر اساس

نامحلول در سیتوپلاسم بیان و تجمع یافت. بیان پروتئین توسط الکتروفورز SDS-PEG و رنگ آمیزی کوماسی بلو مشخص گردید. تشکیل باند ۲۸۷۱۰ دالتونی تایید کننده پروتئین مورد نظر بود که در تصویر ۴ مشاهده می شود. در انتهای N و C ترمینال پروتئین شش اسید آمینه هیستیدین وجود داشت که در تایید نهایی بیان پروتئین توسط وسترن بلائینگ با آنتی بادی His-Tag مورد استفاده قرار گرفت.

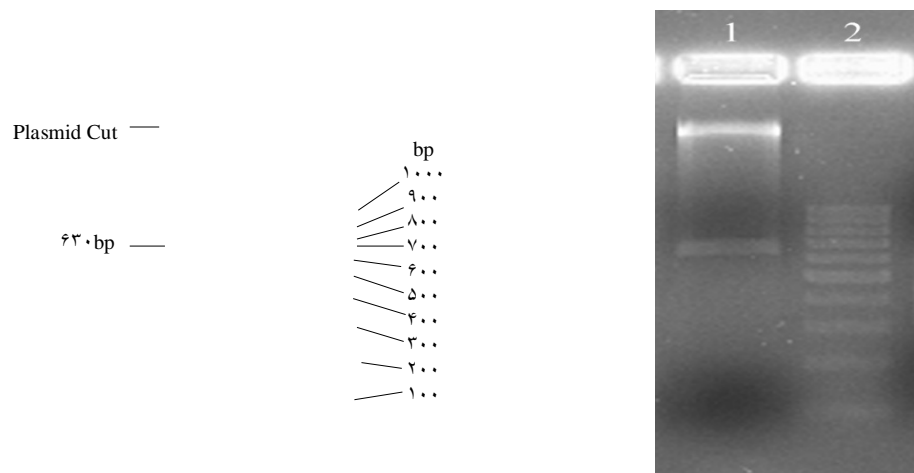
داشت و در تصویر ۱ مشاهده می شود. نتیجه‌ی تراریخت همسانه سازی انجام گرفته رشد بیش از ۲۰۰ کلونی روی پلیت بود. نتایج غربالگری کلنی‌ها از طریق PCR در تصویر ۲ مشاهده می شود. غربالگری پلاسمید با آنزیم‌های محدود کننده *HindIII* و *EcoRI*، یک قطعه ۶۳۰ جفت بازی را تایید کرد که در تصویر ۳ مشاهده می شود. در پایان نتیجه‌ی همسانه‌سازی توسط توالی‌یابی تایید گردید و توسط نرم افزار NCBI Blast مورد آنالیز قرار گرفت که ۹۹/۵ درصد تشابه را با اطلاعات بانک ژنی نشان داد. پروتئین به صورت



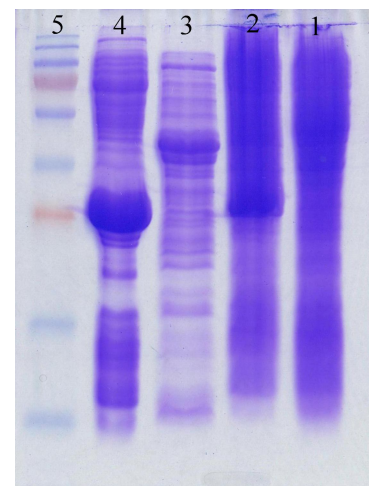
شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آیروژینوزا در ژل آگاروز ۲ درصد. (۱) - نشان‌گر وزن ملکولی (۱۰۰bp). DNA (۴،۳،۲) - باند ۶۴۲bp محصول PCR دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آیروژینوزا به ترتیب سوش‌های شماره ۱، ۲ و ۳



شکل ۲: الکتروفورز برش محصول PCR دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آیروژینوزا روی ژل آگاروز ۲ درصد. (۱، ۲، ۳) - دو باند bp ۳۷۰ و ۲۷۲ برش محصول PCR با آنزیم محدود کننده *BamHI* (۴) - نشان‌گر وزن ملکولی (۱۰۰bp) DNA



شکل ۳. الکتروفورز برش پلاسمید نو ترکیب دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آيروژینوزا روی ژل آگاروز ۲ درصد. ۱- بانده ۶۳۰ bp برش پلاسمید نو ترکیب دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ با آنزیم‌های محدود کننده‌ی *E.coRI*، *HindIII* (۲) - نشانگر وزن ملکولی (۱۰۰bp) DNA



شکل ۴. الکتروفورز SDS-PAGE بیان پروتئین دامنه‌ی کاتالیتیک اگزوتوکسین آ سودوموناس آيروژینوزا روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد. ۱- کنترل منفی بیان پروتئین بدون تحریک IPTG (۲) - پلیت باکتری لیز شده با سونیکاتور در محلول PBS و تحریک شده با IPTG (۳) - سوپ رویی سانتیفریژ پروتئین تحریک شده با IPTG (۴) - پروتئین حل شده در اوره ۸ مولار (۲۸۷۱۰ دالتون)، تحریک شده با IPTG (۵) - نشانگر وزن ملکولی پروتئین

بحث

جدا گردید (۱۶). انتهای کربوکسیل جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A در سودوموناس آيروژینوزا مسئول فرآیند ریبوزیل ترانسفرازی است. این جایگاه در اگزوتوکسین دیفتری در انتهای آمینی قرار دارد. هر دو سم روی eEF-2 تاثیر می‌گذارند. ولی توالی بازهای آلی و اسید آمینه آنها با یکدیگر متفاوت و تنها ۲۰ اسید آمینه مشابه دارند (۱۱). در

سودوموناس آيروژینوزا پاتوژن فرصت طلب و سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است. این باکتری باعث مرگ بیماران دچار سوختگی شدید می‌شود. سمی‌ترین پروتئین سودوموناس آيروژینوزا اگزوتوکسین A است. این پروتئین اولین بار توسط دکتر لو از سودوموناس آيروژینوزا

اطلاعات موجود در بانک ژنی مقایسه شد که قطعه‌ی مورد نظر دارای بالاترین تشابه بازی با جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A در اطلاعات بانک ژنی بود. بیان پروتئین با القای IPTG تحریک و افزایش یافت. جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A دارای وزن مولکولی ۲۸۷۱۰ دالتون بود که کمی سنگین‌تر از اندازه‌ی واقعی آن است. وزن مولکولی واقعی جایگاه کاتالیتیک خالص ۲۳۱۰۰ دالتون است که ۵۶۱۰ دالتون آن مربوط به وکتور است (۶). اولین بار بیان ژن فسفولیپاز C و سایر پروتئین‌های خارج سلولی سودوموناس آیروزینوزا در *E. coli* توسط لوری و تای بررسی گردید. آن‌ها مشاهده کردند، اگزوتوکسین A به بیرون سلول و غشای خارجی ترشح نمی‌شود، بلکه در فضای پری پلاسمی باکتری تجمع می‌یابد. در این تحقیق مشاهده شد، جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A در سیتوپلاسم سلول به صورت انکلوژن بادی تجمع می‌یابد. در واقع تفاوت *E. coli* نسبت به سودوموناس آیروزینوزا عدم ترشح سم به خارج سلول است (۲۰). تولید نو ترکیب جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A جهت تحقیقات بعدی اهمیت فراوانی دارد. در ایران تاکنون کلونینگ جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A انجام نشده بود. در این مطالعه برای اولین بار جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A کلون و بیان گردید. با توجه به افزایش شیوع عفونت در بیماران دچار سوختگی و مرگ و میر ناشی از آن در دسترس بودن پروتئین جهت تولید آنتی‌بادی علیه بیماری ضروری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد بیشتر سویه‌های سودوموناس آیروزینوزا اگزوتوکسین A تولید می‌کنند. توالی بازهای جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A با اطلاعات بانک ژنی مقایسه گردید و مشخص شد که دارای بیشترین تشابه بازی (۹۹/۵ درصد) است. با توجه به افزایش شیوع عفونت‌های سودوموناس آیروزینوزا در بیمارستان‌ها تولید نو ترکیب

این مطالعه باکتری از بیماران دچار سوختگی جدا و شناسایی شد. ۹۰ درصد باکتری‌ها دارای سم اگزوتوکسین A بودند. ژن کدکننده‌ی اگزوتوکسین A و همچنین جایگاه کاتالیتیک آن دارای بیشترین توالی بازی G + C (۶۸/۵ درصد) است، به این دلیل در هنگام طراحی پرایمر طول پرایمرها جهت کاهش دمای اتصال پرایمرها کوتاه‌تر انتخاب گردیدند و به علت عدم وجود جایگاه برش روی ژنوم دامنه‌ی کاتالیتیک باکتری دو آنزیم *HindIII* و *EcoRI* جهت برش وکتور و محصول PCR انتخاب گردیدند. پس از طراحی پلاسمید ژنوم باکتری استخراج گردید. به علت اینکه در دوره‌های بالای سانتریفوژ، ژنوم باکتری می‌شکست از سانتریفوژ با دور پایین استفاده گردید. واکنش PCR با تغییر دو فاکتور اساسی غلظت منیزیوم و دمای اتصال پرایمرها به رشته‌ی الگو تنظیم گردید. تولید اگزوتوکسین A از سودوموناس آیروزینوزا پیچیده است و تحت کنترل ژنتیکی باکتری است. تولید سم توسط محرک های محیطی مثل غلظت آهن، حرارت، میزان اکسیژن و ترکیبات محیط القا می‌شود. غلظت معین آهن در محیط کشت تولید اگزوتوکسین A توسط سودوموناس آیروزینوزا را تنظیم می‌کند. افزایش آهن محیط باعث جهش ژن *Tox C* و مهار بیان اگزوتوکسین A توسط باکتری می‌شود. در غلظت‌های کم آهن نیز سم تولید نمی‌شود (۱۷ و ۱۸). همچنین برخی از سویه‌های سودوموناس آیروزینوزا پروتئولیتیک هستند و آنزیم‌های پروتئاز به محیط کشت ترشح و باعث تجزیه‌ی اگزوتوکسین A و کاهش بازدهی استخراج سم می‌شود (۱۹). یکی دیگر از مشکلات استخراج اگزوتوکسین A از سودوموناس آیروزینوزا ترشح سایر پروتئین‌های باکتری به محیط کشت است، این حالت استخراج سم از مخلوط پروتئینی را مشکل می‌سازد (۱۱). در این تحقیق با همسانه سازی (کلونینگ) جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A و استخراج آن می‌توان بر این مشکلات فایز آمد. توالی بازی جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A پس از توالی‌یابی با

آنتی‌بادی و کنترل عفونت همراه با درمان آنتی‌بیوتیک است

جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A اولین قدم جهت تولید

References

- 1- Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad SH. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the south of Iran. *Burns*. 2006; 32: 343-7.
- 2- Tredget EE, Shankowsky HA, Rennie R, Burrell RE, Logsetty S. *Pseudomonas* infections in the thermally injured patient. *J Burns*. 2004; 30: 3-26.
- 3- Chang JH, Kwon HY. Expression of 14-3-3 δ , cdc2 and cyclin B proteins related to exotoxin A-induced apoptosis in HeLa S3 cells. *J Inter Immunopharmacolo*. 2007; 7: 1185-91.
- 4- Doring G, Pier GB. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Vaccine*. 2008; 26: 1011-24.
- 5- Holder IA. *Pseudomonas* immunotherapy a historical. *J Vaccine*. 2004; 22: 831-9.
- 6- Wolf P, Elsasser-Beile U. *Pseudomonas* exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. *J Med Microbiol*. 2009; 299: 161-76.
- 7- Pastrana DV, FitzGerald DJ. A nonradioactive, cell-free method for measuring protein synthesis inhibition by *Pseudomonas* exotoxin. *J Analytical Biochem*. 2006; 353: 266-71.
- 8- Wedekindl JE, Tramel CB, Dorywalska M, et al. Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *J Mol Bio*. 2001; 314: 823-37.
- 9- Yates SP, Merrill AR. A catalytic loop within *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A modulates its transferase activity. *J Bio Chem*. 2001; 276: 35029-36.
- 10- Hertle R, Mrsny R, Fitzgerald DJ. Dual-function vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of chimeric exotoxin a-pilin protein. *J Infec and Immun*. 2001; 69: 6962-9.
- 11- Mere J, Morlon-Guyot J, Bonhoure A, Chiche L, Beaumelle B. Acid-triggered membrane insertion of *Pseudomonas* exotoxin A involves an original mechanism based on pH-regulated tryptophan exposure. *Bio Chem*. 2006; 280: 21194-201.
- 12- Challa S, Barrette R, Rood D, Zinckgraf J, French R, Silbart L. Non-toxic *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A expressing the FMDV VP1 G-H loop for mucosal vaccination of swine against foot and mouth disease virus. *J Vaccine*. 2007; 25: 3328-37.
- 13- Song S, Xue J, Fan K, et al. Preparation and characterization of fusion protein truncated *Pseudomonas* exotoxin A (PE38KDEL) in *Escherichia coli*. *Pro Expr and Puri*. 2005; 44: 52-7.
- 14- Tramper-Stranders GA, Wolfs TFW, van der Ent CK. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in

- patients with cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis*. 2005; 4: 37-43.
- 15- Xiao X, Zhang J, Gong J, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by the fluorescence quantitative TaqMan PCR assay targeting ETA gene. *Chin J Biotech*. 2008, 24: 581-5.
- 16- Yates SP, Taylor PL, Jorgensen R, et al. Structure–function analysis of water-soluble inhibitors of the catalytic domain of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem*. 2005; 385: 667-75.
- 17- Armstrong S, Yates SP, Merrill A. Insight into the catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *J biolo Biochem*. 2002; 277: 46669-75.
- 18- Bjon MJ, Iglewskl BH, Ives SK, Sadoff JC, Vasll ML. Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA-103. *J Infec Immun*. 1978; 19: 785-91.
- 19- Keyvani Amineh H, Ghasemian Safaei H. Purification of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa* *J Tehran Vet Med*. 2000; 56:33-6.
- 20- Joshi BH, Puri RK. Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and *Pseudomonas* exotoxin in *Escherichia coli*. *Pro Expr and Puri*. 2005; 39: 189-98.

Cloning of Catalytic Domain of Exotoxin A from Pseudomonas Aeruginosa

Amini B¹, Kamali M², Zarei Mahmood abadi A³, Mortazavi Y⁴, Ebrahim habibi A⁵, Bayat E¹, Farhadi N²,
Javadi HR², kyhan AH²

¹Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Dept. of Biochemistry, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Dept. of Molecular Medicine and Genetics, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

⁵Dept. of Endocrinology and Metabolism Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Kamali M, Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences,
Tehran, Iran

E-mail: mehkamali@bmsu.ac.ir

Received: 17 Jan 2010 **Accepted:** 8 Mar 2010

Background and Objective: Antibody against *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A can be used in immunotherapy together with antibiotics to treat acute burn patients. Exotoxin A is one of the virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* that comprises of three domains, binding domain, translocation and catalytic domain. The purpose of this study was to construct the recombinant domain of the catalytic part of this microorganism in order to produce antibody against it.

Methods and Materials: *Pseudomonas aeruginosa* samples were isolated from burn patients hospitalized in Mousavi Hospital, Zanjan, Iran and its species was identified by Biochemical tests. Bacteria genomic DNA and also the catalytic domain of exotoxin A was amplified by PCR. PCR products and plasmid extracts was digested by restriction enzymes. Subsequently PCR products and plasmids transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Clones containing gene of interest was determined by restriction enzyme digestion and sequencing.

Results: The sequence homology of the catalytic domain of exotoxin A was compared with that of the published gene data banks. The results showed a complete homology between our gene species and the published genome in data banks.

Conclusion: The results of this study showed that about 90% of the isolated bacteria contained exotoxin A and there was a sequence homology between our species and published gene data banks.

Key word: *Pseudomonas aeruginosa*, Cloning, Exotoxin A, Catalytic domain