مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال نهم، شماره اول، پیاپی سی و سوم، تابستان ۱۳۹۹ (۸۷-۸۱)

بیان سازه دکامر لومازین سنتاز با منشأ بروسلایی در سیستم بیانی پروکاریوتی

بهجت مجیدی[۱*]، محسن فتحی نجفی[۲]،
شهریار سعیدیان[۳]

۱. دکتری رشته بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. استادیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، مشهد
۳. استادیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/٤/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۲۷)

چکیده

لومازین سنتاز بروسلایی، آنزیم دخیل در بیوسنتز ریبوفلاوین، مرکب از ۱۰ زیرواحد مشابه می‌باشد که به‌صورت کپسیدی تجمع می یابند. با توجه به کاربردهای وسیع لومازین سنتازها در زمینه‌های بیولوژی، تولید لومازین سنتاز در مقیاس بالا و خالص‌سازی کارآمد آن ضروری می‌نماید. در مطالعه حاضر، ساختار اولیه لومازین سنتاز بروسلا ملی‌تنسیس از پایگاه داده NCBI دریافت گردید. توالی لومازین سنتاز ابتدا با استفاده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر گردید و سپس کلون و بیان گردید. بیان سازه با استفاده از پلازمید بیانی pET28a و در باکتری BL21 DE3 انجام گردید. برای حذف بقایای دیواره باکتری و خالص‌سازی پروتئین، از روش‌های رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات و تکنیک‌های کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده گردید. از آزمون‌های الیزا و وسترن بلات جهت تأیید بیان و مانیتورینگ مراحل استفاده گردید. خالص‌سازی لومازین سنتاز با استفاده از روش کروماتوگرافی با استفاده از سفادکس دی اتیل آمینو اتیل DEAE منجر به حصول باند یگانه در الکتروفورز با ژل پلی اکریلامید (SDS-PAGE) گردید. نتایج این بررسی نشان داد که روش‌های بهینه‌سازی بیان و خالص‌سازی مورد استفاده در این تحقیق، می‌تواند در تولید لومازین سنتاز نوترکیب بروسلایی خالص و در مقیاس بالا به‌عنوان یک محصول نوترکیب ارزشمند در تحقیقات واکسن استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: بروسلا، بیان، خالص‌سازی، لومازین سنتاز، نوترکیب.

Expression of a decameric lumazine synthase from *Brucella* spp. in prokaryotic expression system

Behjat Majidi[1*], Mohsen Fathi Najafi[2], Shahriar Saeedian[3]

1. Ph.D. of Biochemistry, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran

(Received: Jul. 2, 2019 - Accepted: Aug. 18, 2019)

Abstract

Brucella sp. Lumazine synthase, the enzyme involved in riboflavin biosynthesis composed of 10 identical subunits. According to extended applications of LS, it is necessary to set up a high yield expression and purification method for this enzyme.in current study, Lumazine synthase primary structure was achieved from NCBI database and it was expressed by pET28a in BL21 E. coli. The optimum concentrations of IPTG and Kanamycin was evaluated and applied for high yield expression of rBLS. For LPS removal and purification of protein, ammonium precipitation and ion exchange chromatography were performed and no background in ELISA (against Brucella) was observed. ELISA and Western Blotting techniques were applied for expression and purification confirming. For monitoring of purification, SDS-PAGE was applied. Purification of protein with DEAE sephadex (Diethylaminoethyl) resulted in a single band purified rBLS. The approach applied in this study can be used in generation a relatively pure rBLS as a valuable recombinant product in vaccine industries.

Keywords: Brucella, recombinant, Lumazine synthase, purification.

* نویسندهٔ مسئول: بهجت مجیدی Email: b.majidi@rvsri.ac.ir

مقدمه

لومازین سنتاز، آنزیم دخیل در بیوسنتز ریبوفلاوین، متشکل از الیگومرهای مشابه هم است. این جنبه چند زیرواحدی لومازین سنتاز، آن را برای کاربردهای مختلف در زمینه‌های بیوپزشکی شامل سیستم‌های تحویل آنتی‌ژن (در تحقیقات واکسن) و مهندسی پروتئین مناسب نموده است. لومازین سنتازها، بسته به منشأ آنها، از لحاظ سطح الیگومری با یکدیگر تفاوت دارند. آنها می‌توانند از ۵، ۱۰ و یا ۶۰ زیرواحد تشکیل شده باشند (Wei *et al*., 2018). در گونه بروسلا (به‌ویژه بروسلا آبورتوس و ملی‌تنسیس)، لومازین سنتاز کد شده توسط ژن RibH2، که روی کروموزوم دو باکتری واقع شده است (Zylberman *et al*., 2006)، یک دکامر است (از ده مونومر تشکیل شده است)، به‌طوری‌که، دو بلوک پنج‌تایی به هم متصل می‌شوند تا یک دکامر تشکیل شود. لومازین سنتاز بروسلایی اولین لومازین سنتاز است که مورد مطالعه قرار گرفته و بیشترین مطالعات در این زمینه روی این پروتئین انجام شده است. یکی از مهم‌ترین جنبه‌های لومازین سنتاز بروسلایی (BLS)، پایداری آن در برابر تنش‌های شیمیایی و دمایی می‌باشد. این سازه در مقابل اوره ۸ مولار یا گوآنیدین هیدروکلراید، تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد (Zylberman *et al*., 2004). به‌علاوه، پایداری دمایی سازه BLS مورد مطالعه قرار گرفته و نشان داده شده است که این پایداری ناشی از میانکنش‌های یونی، هیدروژنی و هیدروفوب در ساختار کپسید است (Zhang, 2005).

BLS و سایر لومازین سنتازها، ذرات مشابه ویروس (VLP) را تشکیل می‌دهند که قادرند به‌صورت بسیار کارآمدی اپی‌توپ‌های ایمونوژن بیگانه را در سطح خود به سیستم ایمنی ارائه نمایند. آنها کپی‌های چندگانه‌ای از اپی‌توپ‌های مذکور را با تراکم بالا به سیستم ایمنی عرضه می‌دارند و می‌توانند به‌طور قدرتمندی با رسپتورهای سلول‌های B واکنش دهند. در مقایسه با عرضه منفرد اپی‌توپ‌ها، این نوع تحریک در واکسن‌های بر پایه VLPها، می‌تواند به‌طور کارآمدی سیستم ایمنی و پاسخ‌های ایمنی را تحریک نماید (Liu *et al*., 2010). BLS می‌تواند ۱۰ توالی آمینواسیدی (با طولی در حدود ۲۷ آمینواسید) را در انتهای آمینو خود بدون هیچ تغییری بر ساختار دکامر بپذیرد (Sciutto *et al*., 2005). در تحقیقات مختلف، اپی‌توپ‌های خارجی از شیگا توکسین (Mejias *et al*., 2013)، تنیا سولیوم (Sciutto *et al*., 2005) و آنفولانزا (Alvarez *et al*., 2013) به انتهای آمینو BLS اضافه گردید و ایمنی‌زایی قطعات خارجی مورد بررسی قرار گرفت و در همه این تحقیقات توانایی BLS در تحریک سیستم ایمنی به اثبات رسید.

مطالعات روی BLS نشان داد که این پروتئین می‌تواند در روش‌های تشخیصی سرولوژیک بروسلوز، به‌عنوان مارکر مورد استفاده قرار گیرد (Velikovsky *et al*., 2002). به‌دلیل وجود اپی‌توپ‌های مشابه روی لیپوپلی ساکاریدهای بروسلایی و برخی از باکتری‌های گرم منفی از جمله ای.کولای، حضور این بقایا در فراکشن‌های خالص‌شده پروتئین‌های تشخیصی سیتوپلاسمی می‌تواند موجب ایجاد نتایج منفی کاذب در تحقیقات گردد (Baldi *et al*., 2000).

هدف از این تحقیق، تهیه یک ساختار خام لومازین سنتازی جهت پذیرش پروتئین‌های خارجی و بهینه‌سازی بیان آن می‌باشد. در ضمن تنظیم یک روش مقرون به‌صرفه جهت حذف بقایای لیپو پلی‌ساکاریدی و خالص‌سازی لومازین سنتاز در زمینه تحقیقات واکسن‌های نوترکیب پپتیدی بسیار با ارزش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری و استخراج DNA

سویه باکتریایی باکتری بروسلا ملی‌تنسیس (ATCC 23456; 16 M) از اداره کل دامپزشکی تهیه گردید. استخراج DNA از روش فنل/کلروفرم (Sambrook & Russell, 2006) انجام شد و مقدار DNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ اندازه گیری گردید.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

ژن لومازین سنتاز بروسلا ملی‌تنسیس با استفاده از دو پرایمر فوروارد (FBLS: 5'-CCGGAATTCATGAACCAAAGCTGTC-3') و ریورز (RBLS: 5'-CGGGTCGACGTCAGACAAGCGCGGC-3') که سایت‌های آنزیم‌های برشی EcoRI و SalI (نواحی زیرخط کشیده در طول توالی) در توالی آنها در نظر گرفته شده است تکثیر شدند. طول محصول PCR ۴۸۹ جفت باز بود.

کلونینگ و بیان محصول PCR

محصول PCR که در دو انتها سایت برشی داشت و پلازمید بیانی pET28a+ توسط دو آنزیم ذکر شده برش داده شدند و پس از استخراج از ژل آگارز، فرایند الحاق با آنزیم T4 (NEB-M0202) انجام گردید. محصول الحاق به داخل باکتری E.coli Bl21 DE3 (NEB-C2527) ترانسفرم گردید. بعد از کشت بر روی پلیت حاوی محیط انتخابی، کلونی‌ها با انجام واکنش کلونی PCR گزینش گردیدند. کلون‌های تأییدشده در محیط کشت 2YT کشت داده شدند (Sambrook *et al*., 1989). برای گزینش بهترین کلونی‌ها با بیشترین سطح بیان، سوپرناتانت و رسوب سلولی (بعد از انجام فرایند فریز و بازکردن در نیتروژن مایع و آب جوش و با انجام سانتریفیوژ) تست الیزا علیه تگ پلی‌هیستیدینی انجام گردید (Monoclonal Anti-polyHistidine– Peroxidase antibody –Sigma A7058). کلونی‌های با بیشترین جذب در الیزا برای آنالیز بیشتر انتخاب شدند.

بهینه‌سازی غلظت کانامایسین و IPTG

برای بهینه‌سازی محیط کشت، اثر کانامایسین و IPTG بر جذب ۶۰۰ نانومتر محیط کشت و نتایج آزمون الیزا (علیه تگ پلی هیستیدینی) مورد بررسی قرار گرفت.

محلول سازی پروتئین

با توجه به این‌که لومازین سنتاز نوترکیب به‌صورت اینکلوژن بادی بیان می‌شود برای آزادسازی لومازین سنتاز از فرم نامحلول به فرم محلول، رسوب سلولی بعد از سانتریفیوژ با اوره ۸ مولار و SDS (۱٪ در تریس بافر pH، ۷/۵) تیمار گردید. انتخاب بهترین تیمار با استفاده از آزمون‌های الیزا انجام شد.

خالص‌سازی پروتئین

پس از بهینه‌سازی کشت، کشت در مقیاس بالاتر (۵ لیتر) انجام شد. رسوب های سلولی تیمار شده با SDS با روش رسوب‌دهی توسط آمونیوم سولفات تغلیظ شدند و SDS نیز با این روش تا حدود زیادی از سیستم خارج گردید. رسوب پروتئینی حاصل، روی ستون کروماتوگرافی (DEAE sephadex A25- Sigma) با سیستم بافری تریس ۵۰ میلی‌مولار pH، ۸ برده شد و فراکشن‌های خروجی (با گرادیان نمکی) روی ژل پلی‌اکریلامید (SDS-PAGE) برده شدند.

شناسایی و تأیید تشکیل دکامر لومازین سنتاز به‌وسیله روش وسترن بلات و SDS-PAGE

روش وسترن بلات پس از بیان لومازین سنتاز جهت کنترل سازه در کنار SDS-PAGE استفاده گردید. انتقال پروتئین‌ها به کاغذ نیتروسلولز (Amersham®) انجام شد و غشا به‌وسیله سرم آلبومین گاوی ۳ درصد بلاک گردید (دمای ۳۷ درجه به‌مدت یک ساعت). پس از انجام شست‌وشو (بافر تریس نمکی/ توئیین) غشا در آنتی‌بادی آنتی هیستیدین (متصل به HRP– Sigma A7058) قرار گرفت و مراحل شست‌وشو پس از تیمار صورت گرفت. در پایان، رنگ‌آمیزی با استفاده از رنگ رسوبی دی آمینو بنزیدین ترا هیدرو کلراید انجام شد (Sigma D4293).

نتایج

پس از تولید سازه (تولید پلازمید pET28 دارای ژن BLS) و ارسال آن جهت توالی‌یابی، توالی لومازین سنتاز (بروسلا ملی‌تنسیس ۱۶M)، به‌دست آمد. این توالی با

توالی‌های لومازین سنتاز موجود در پایگاه‌های داده مقایسه گردید (شکل ۱). نتایج بلاست و هم‌ردیفی توالی‌ها، شباهت ۱۰۰ درصدی و کامل توالی کارشده با توالی‌های لومازین سنتاز بروسلا آبورتوس و سایر لومازین سنتازهای بروسلایی موجود در پایگاه‌های داده را نشان داد.

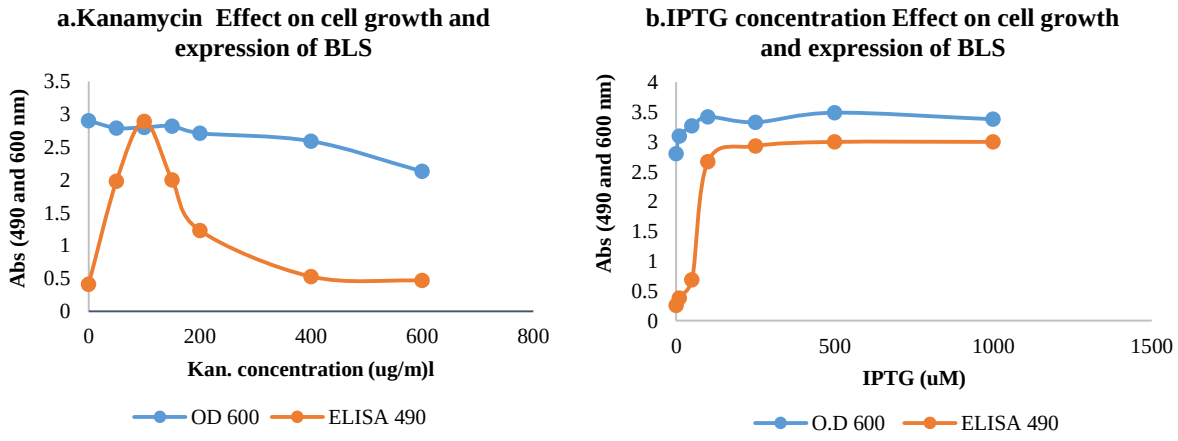
طول محصول PCR حاصل ۴۸۹ و طول توالی آمینواسیدی کدکننده توسط آن ۱۵۸ بود. نتایج توالی‌یابی در بررسی‌های بیشتر بیوانفورماتیک به نرم‌افزار آنلاین پروتپارام (https://web.expasy.org/protparam) ارسال گردید. خروجی نرم‌افزار نشان داد که وزن مولکولی لومازین سنتاز به‌صورت تک واحدی ۱۷/۵۳ کیلودالتون است و pI آن حدود ۶/۵۹ محاسبه گردید.

این محصول پس از تجمع ده‌تایی به وزن مولکولی حدودی ۱۷۳ کیلودالتون می‌رسد. کلونینگ و بیان لومازین سنتاز بروسلایی در سیستم pET28 با موفقیت طراحی و انجام شد و در باکتری میزبان *E. coli* BL21 DE3 ترانسفرم شد. بیان اولیه به‌وسیله وسترن بلات و الیزا تأیید گردید.

بهینه‌سازی غلظت کانامایسین و IPTG

با توجه به نتایج در شکل ۲، غلظت کانامایسن (۱۰۰ug/ml) و غلظت IPTG (۱۰۰uM) در میان سایر غلظت‌های مورد مطالعه بیشترین بازده را بر بیان و تولید لومازین سنتاز در سیستم بیانی حاضر در مطالعه داشتند (نمودار ۱).

شکل ۱. توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بروسلا ملی‌تنسیس مورد مطالعه



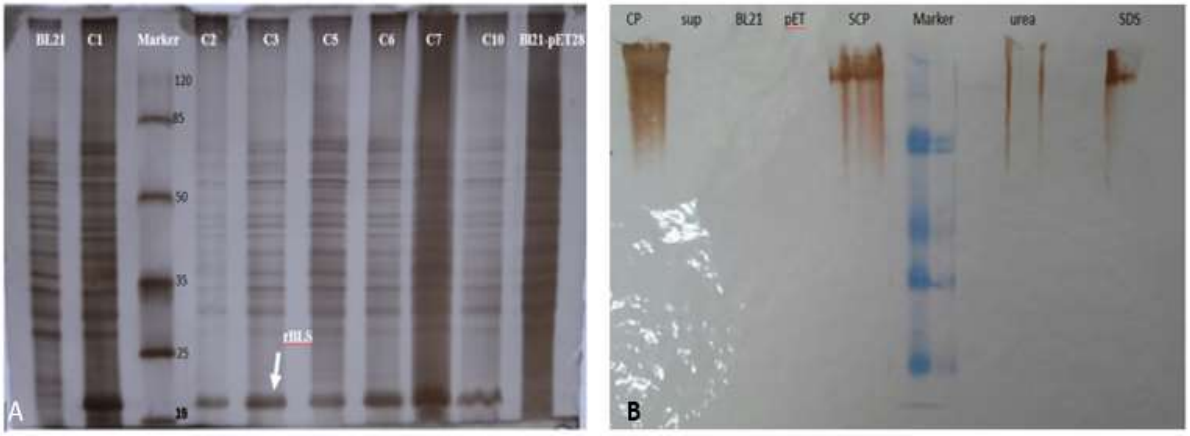
نمودار ۱. a و b) بررسی غلظت کانامایسین و IPTG بر رشد باکتریایی و بیان لومازین سنتاز (که توسط الیزا و روش اسپکتروفوتومتری کنترل گردید.)

خالص‌سازی پروتئین

آنالیز وسترن بلات نمونه‌های کشت‌شده و فریز/ دفریزشده (شامل نمونه‌های رسوب باکتریایی (CP)، سوپرناتانت کشت (sup)، سوپرناتانت ناشی از لیز سلولی (SCP)) نشان داد که حضور لومازین سنتاز نوترکیب بیشتر به‌صورت اینکلوژن بادی و در نمونه‌های CP و SCP می‌باشد. با توجه به نتایج الیزا، تیمار با SDS سبب محلول‌شدن و آزادشدن لومازین سنتاز از تجمع‌های اینکلوژن بادی گردید. اثر اوره بر آزادشدن پروتئین از اینکلوژن بادی مشابه SDS (اندکی کمتر از اثر SDS) بود. تیمارهای اوره و SDS تأثیری بر ساختار ده تایی لومازین سنتاز نداشت و باند مشاهده‌شده همچنان در حدود ۱۷۳ کیلودالتون بود. نتایج کروماتوگرافی یونی با DEAE در شکل ۳ نشان داده شده است. باند تک لومازین سنتاز (خالص‌سازی‌شده) در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار گرادیان نمکی ستون به‌دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری

لومازین سنتاز بروسلایی یک پروتئین ایمونوژن قوی با ساختار ده‌گانه است. تا کنون مطالعات زیادی کاربرد گسترده این سازه به‌عنوان سیستم تحویل دارو و ادجوانت و حامل را به اثبات رسانده است.



شکل ۲. A) انتخاب کلونی‌ها بر اساس سطح بیان rBLS، B) نتایج وسترن بلات نمونه‌های مختلف برای مشاهده rBLS تیمارهای مختلف و بخش های مختلف سلولی. بررسی اثر SDS و اوره بر پایداری سازه.

شکل ۳. نتایج وسترن بلات و SDS-PAGE ستون کروماتوگرافی تعویض یونی.لومازین سنتاز بروسلایی نوترکیب در فراکشن ۲۵۰ میلی‌مولار نمکی خالص گردید.

به‌دلیل داشتن آرایش چندگانه، لومازین سنتاز می‌تواند عرضه پرتکراری از اپی‌توپ‌های خارجی اضافه‌شده در انتهای آمینوی خود را به سیستم ایمنی (بدون این‌که این بخش خارجی تأثیری بر ساختمان پروتئینی بگذارد) داشته باشد. از همین رو، این سازه پروتئینی به همراه بخش خارجی اضافه شده می‌توانند به‌صورت کارآمدی با رسپتورهای اختصاصی سلول‌های B سیستم ایمنی میانکنش داشته باشند و پاسخ‌های ایمنی را نسبت به آنتی‌ژن‌های هدف تشدید نمایند (Wei *et al*., 2018). در تحقیق حاضر، لومازین سنتاز بروسلایی به‌عنوان پذیرنده توالی‌های خارجی کوچک پپتیدی آنتی‌ژن‌های مختلف تولید گردید. در طی فرایند بهینه‌سازی بیان، مشخص شد که بیان این سازه به فرم اینکلوژن بادی است و رهاسازی لومازین سنتاز با استفاده از موادی نظیر SDS تأثیری بر سازه دکامر نداشت. تنها جوشاندن در حضور دترجنت‌ها (SDS) سبب جدا شدن زیرواحدها و تخریب دکامر شد. این نتایج مویدی بر پایداری سازه لومازین سنتازی بود که پیشتر نیز در تحقیقاتی نظیر تحقیقات Zylberman *et al*. (2004) و یا تحقیقات Zhang *et al*. (2006) به اثبات رسیده بود.

سیستم بیانی و شرایط بهینه‌سازی شده منجر به حصول سطح بالا و قابل‌قبولی از rBLS گردید. روش‌های مؤثر فراوانی برای خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد. در مورد لومازین سنتاز، همانند سایر پروتئین‌های نوترکیب می‌توانیم از این روش‌ها استفاده نماییم. اما با توجه به هزینه های بالای این روش‌ها، استفاده از روش‌های کم هزینه تر با کارایی مناسب ضروری می نماید. در این تحقیق روش کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده شده، منجر به حصول سطوح بالایی از لومازین سنتاز خالص گردید. استفاده از روش پایش الیزا و وسترن بلات و SDS-PAGE نیز به‌صورت ترکیبی روش‌های بسیار مفیدی در حصول این نتایج بودند.

REFERENCES

Alvarez, P.; Zylberman, V.; Ghersi, G.; Boado, L.; Palacios, C.; Goldbaum, F.; Mattion, N.; (2013). Tandem repeats of the extracellular domain of Matrix 2 influenza protein exposed in Brucella lumazine synthase decameric carrier molecule induce protection in mice. Vaccine; 31(5): 806-812.

Baldi, P.; Velikovsky, C.; Braden, B.; Giambartolomei, G.; Fossati, C.; Goldbaum, F. (2000). Structural, functional and immunological studies on a polymeric bacterial protein. Brazilian Journal of Medical and Biological Research; 33(7): 741-747.

Liu, W., Sohn, H.W.; Tolar, P.; Pierce, S.K. (2010). It's all about change: the antigen-driven initiation of B-cell receptor signaling. Cold Spring Harbor perspectives in biology; 2(7): a002295.

Mejias, M.P.; Ghersi, G.; Craig, P.O.; Panek, C.A.; Bentancor, L.V.; Baschkier, A.; Goldbaum, F.A.; Zylberman, V.; Palermo, M.S. (2013). Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and brucella lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. Journal of Immunology; 191(5): 2403-2411.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory press.

Sambrook, J.; Russell, D.W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. Cold Spring Harbor Protocols; 2006(1): pdb. prot4455.

Sciutto, E.; Toledo, A.; Cruz, C.; Rosas, G.; Meneses, G.; Laplagne, D.; Ainciart, N.; Cervantes, J.; Fragoso, G.; Goldbaum, F.A. (2005). Brucella spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery

system. Vaccine 23(21): 2784-2790.
Velikovsky, C.A.; Cassataro, J.; Giambartolomei, G.H.; Goldbaum, F.A.; Estein, S.; Bowden, R.A.; Bruno, L.; Fossati, C.A.; Spitz, M. (2002). A DNA vaccine encoding lumazine synthase from Brucella abortus induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun; 70(5): 2507-2511.
Wei, Y.; Kumar, P.; Wahome, N.; Mantis, N.J.; Middaugh, C.R. (2018). Biomedical Applications of Lumazine Synthase. J Pharm Sci.; 107(9): 2283-2296.
Zhang, X. (2005). Structural studies of lumazine synthases: Thermostability, catalytic mechanism and molecular assembly, Biovetenskaper och näringslära/Biosciences and Nutrition.
Zhang, X.; Konarev, P.V.; Petoukhov, M.V.; Svergun, D.I.; Xing, L.; Cheng, R.H.; Haase, I.; Fischer, M.; Bacher, A.; Ladenstein, R.; Meining, W. (2006). Multiple assembly states of lumazine synthase: a model relating catalytic function and molecular assembly. J Mol Biol.; 362(4): 753-770.
Zylberman, V.; Craig, P.O.; Klinke, S.; Braden, B.C.; Cauerhff, A.; Goldbaum, F.A. (2004). High order quaternary arrangement confers increased structural stability to Brucella sp. lumazine synthase. J Biol Chem.; 279(9): 8093-8101.
Zylberman, V., Klinke, S.; Haase, I.; Bacher, A.; Fischer, M.; Goldbaum, F.A. (2006). Evolution of vitamin B2 biosynthesis: 6, 7-dimethyl-8-ribityllumazine synthases of Brucella. Journal of bacteriology; 188(17): 6135-6142.