

کلونینگ، بیان، تخلیص و بررسی فعالیت ضد استافیلوکوکی پروتئین لیزوستافین اولیه در شرایط آزمایشگاهی

- لیلا فرهنگ‌نیا^۱ (M.Sc)، احسان‌الله غزنوی راد^۲ (Ph.D)، ندا مولایی^۳ (M.Sc)، حمید ابطحی^۴ (Ph.D)
- ۱- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه بیوتکنولوژی
 - ۲- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و شناسایی میکروبیولوژی
 - ۳- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی
 - ۴- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوک اورئوس عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها، از عفونت‌های پوستی تا انتشار آن و عفونت‌های سیستمیک منجرشونده به نارسایی ارگانی و مرگ می‌باشد. مقاومت دارویی در این گروه از پاتوژن‌ها یک نگرانی جهانی شده و نیازمند توسعه‌ی عوامل درمانی جدید است. لیزوستافینیک نمونه‌ای از این عوامل می‌باشد. لیزوستافینیک باکتریوسین تولیدشده به وسیله‌ی استافیلوکوک سیمولانس است که باعث کشتن سلول‌های استافیلوکوک اورئوس از طریق تخریب دیواره سلولی استافیلوکوک می‌شود. هدف از این مطالعه، بیان بالای لیزوستافین اولیه به شکل نوترکیب و بررسی فعالیت ضد استافیلوکوکی آن بر علیه استافیلوکوک اورئوس تحت شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ژن لیزوستافین از استافیلوکوک سیمولانس پس از تکثیر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در ناقل پلاسمیدی pET32a کلون و بیان شد. پروتئین بیان شده توسط کیت Ni-NTA بر اساس کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد. فعالیت آنتی‌باکتریال آن بر علیه سوسپانسیون سلولی از استافیلوکوک اورئوس با استفاده از روش کدورت‌سنجی مطالعه شد.

یافته‌ها: نتایج PCR و تعیین توالی نشان داد که ژن هدف به درستی در ناقل مورد نظر کلون شده است. بیان پروتئین به وسیله IPTG القا شد و غلظت‌های بالایی از پروتئین نوترکیب توسط رزین نیکل با فعالیت ضد استافیلوکوکی تخلیص شد.

نتیجه‌گیری: pET32a یک سیستم بیانی کارآمد در بیان پروتئین نوترکیب پیش‌ساز لیزوستافین در میزبان بیانی E.coli می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوک طلائی، لیزوستافین، کلونینگ مولکولی

مقدمه

عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها، از عفونت‌های پوستی تا انتشار آن و عفونت‌های سیستمیک منجرشونده به

استافیلوکوک اورئوس یک باکتری گرم مثبت است، که

استافیلوکوک سیمولانس برداشته شده و بازده آن مولکول بالغ و کاملاً فعال لیزوستافین می‌باشد [۷].

لیزوستافین بالغ به شکل نوترکیب در E.coli بیان شده و در بسیاری از مطالعات ژنتیکی استافیلوکوک‌ها برای جداسازی DNA [۸]، شکل‌گیری پروتوبلاست‌ها و افتراق استافیلوکوک‌های اورئوس از دیگر گونه‌های استافیلوکوکی و میکروکوک‌ها کاربرد داشته است [۹]. هم‌چنین لیزوستافین بالغ فعالیت باکتری‌سیدال بر علیه گونه‌های MRSA [۱۰]، گونه‌های دارای مقاومت نسبی به ونکومایسین [۱۱] و سلول‌های استافیلوکوک اورئوس دارای مقاومت به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده است [۱۲] و این فعالیت آنتی‌باکتریال لیزوستافین بیش‌تر از ونکومایسین و دیگر عوامل مرجع بوده. علاوه بر این اثربخشی لیزوستافین در پیش‌گیری از کلونیزه شدن استافیلوکوک اورئوس بر روی کاتترهای وریدی و عفونت‌های مرتبط با آن اثبات شده است [۱۳، ۱۴] ولی تاکنون فعالیت ضد استافیلوکوکی اورئوس پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه مورد بررسی قرار نگرفته است.

هدف از این تحقیق، کلون و بیان لیزوستافین اولیه برای اولین بار با استفاده از ناقل بیانی pET32a در اشریشیاکلی، تخلیص پروتئین نوترکیب حاصل و بررسی فعالیت آن در شرایط آزمایشگاهی بر علیه استافیلوکوک اورئوس به منظور پی‌ریزی مطالعات عمل‌کردی بر روی پروتئین لیزوستافین اولیه به عنوان یک عامل آنتی‌استافیلوکوکال است.

مواد و روش‌ها

پلاسمید و سویه‌های باکتری و شرایط کشت: سویه استاندارد ۱۴۴۲ استافیلوکوک سیمولانس تهیه و در محیط بلاد آگار کشت داده شد. سپس محیط کشت تلقیح شده و پلیت کنترل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس از این مدت باکتری‌های رشد یافته برای استخراج DNA پلاسمیدی مورد استفاده قرار گرفتند.

از باکتری E.coli سویه DH5α (شرکت استراتازن، آمریکا) به عنوان میزبان اولیه برای تکثیر پلاسمید نوترکیب استفاده

نارسیایارگانی و مرگ می‌باشد [۱]. و به دلیل وجودش روی پوست و در نازوفارنکس انتشار این باکتری شایع بود و در طول قرن اخیر به خطرناک‌ترین پاتوژن انسان‌یوشایع‌ترین علت عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های اکتسابی از جامعه در سرتاسر جهان تبدیل شده است [۲، ۳]. افزایش ظهور مقاومت‌های چنددارویی در میان استافیلوکوک‌های اورئوس به خصوص به شکل استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) به نگرانی اصلی در محیط‌های بیمارستانی تبدیل شده است [۴]. MRSA's اشاره به مقاومت به همه‌ی بتالاکتام‌های مقاوم به بتالاکتام‌از مثل (متی‌سیلین، نفسلین، آگراسیلین) و سفالوسپورین‌ها دارند [۵]. و امروزه مبارزه با بسیاری از آن‌ها برای درمان عفونت به علت ظهور مقاومت به همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های حاضر بسیار مشکل شده. این نشان می‌دهد که طیف آنتی‌بیوتیک‌های موثر در درمان عفونت‌های استافیلوکوک اورئوس بسیار اندک است و این احتمال وجود دارد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های باقی مانده به طور مشابه رخ دهد. بنابراین موضوع مقاومت دارویی در این‌گروه از پاتوژن‌ها نیازمند توسعه عوامل درمانی جدید و فعال بر علیه این گروه از پاتوژن‌ها می‌باشد.

لیزوستافینیک پپتیدوگلیکان هیدرولاز تولید شده به وسیله سلول‌های استافیلوکوک سیمولانس است که باعث شکست پیوند پپتیدی بین دو گلابسین مجاور هم در پل‌های پپتیدی پپتیدوگلیکان دیواره سلولی استافیلوکوک‌ها می‌شود [۶].

لیزوستافین در ابتدا به شکل یک پیش‌ساز پروتئینی (Preprolystaphin) با ۴۸۰ اسید آمینه سنتز می‌شود که در گام اول بعد از سنتز به وسیله یک پپتید نشانه‌ای که در انتهای آمینی (N-terminal) پروتئین قرار گرفته وارد فاز ترشحی می‌شود. سپس پپتید نشانه‌ای از انتهای آمینی برداشته می‌شود و به شکل لیزوستافین اولیه (prolystaphin) با توالی‌های اسید آمینه‌ای تکراری و پشت سر هم در محیط کشت استافیلوکوک سیمولانس ترشح می‌شود. این توالی‌های تکراری که در انتهای آمینی پروتئین قرار دارند توسط یک سیستمین پروتئاز خارج سلولی ترشح شده در محیط کشت

نرم‌افزار Oligo5 پرایمرهای مناسب مطابق با ناحیه‌ی کدکننده لیزوستافین اولیه (1440bp) طراحی گردید (جدول ۱). اختصاصی بودن پرایمرها برای قطعه‌ی ژنی مورد نظر توسط برنامه Blast تایید شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

توضیحات	توالی
پرایمر بالادست واجد جایگاه برش آنزیم محدود کننده BamHI	5'-GTA GGA TCC TTG AAG AAAACA AAA AAC A-3'
پرایمر پایین دست واجد جایگاه برش آنزیم محدود کننده XhoI	5'-ACT CGA GTC ACT TTA TAG TTC CCC AA - 3'

تکثیر ژن لیزوستافین از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ۲۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۳ میلی‌مولار از یون منیزیم، ۰/۲ میکرومولار از هر دو کسبی نوکلئوزید تری فسفات، ۲/۵ واحد از آنزیم DNA پلیمراز Taq و بافر مربوط به آن انجام شد. PCR طبق برنامه از قبل داده شده (جدول ۲) به دستگاه ترمال سایکلر به تعداد ۳۰ سیکل راه‌اندازی شد. پس از انجام واکنش، محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸٪ در بافر TBE برده شد. پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV و تایید محصول در مقایسه با سایز مارکر (Marker)، تخلیص قطعه ژنی مورد نظر از ژل مطابق با دستورالعمل کیت استخراج محصول PCR (رش - آلمان) انجام گرفت.

جدول ۲. برنامه PCR استفاده شده در این تحقیق

Primary Denaturation (واشرنگی)	۹۴ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه
Secondary Denaturation	۹۴ درجه سانتیگراد	۱ دقیقه
Annealing (اتصال)	۵۰ درجه سانتیگراد	۱ دقیقه
Extention (بسط)	۷۲ درجه سانتیگراد	۱ دقیقه
Final Extention	۷۲ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه

کلونینگ ژن در باکتری اشریشیاکلی: با توجه به جایگاه‌های آنزیمی تعبیه شده در پرایمرها، محصول PCR ژن با

شد. برای بیان ژن، میزبان بیانی E.coli BL21 (DE3) pLYsS و وکتور بیانی pET32a (شرکت نوآژن، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفتند.

کلیه مواد شیمیایی به کار رفته در ساخت بافرها، محلول‌ها و سایر مراحل از شرکت مرک (Merck, Germany) و شرکت روش (Roch, Germany) و آنزیم‌ها از شرکت‌های فرمنتاس (Fermentase, Lithuania) و سیناژن تهیه شدند. سویه‌های E.coli از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران تهیه شدند.

جداسازی DNA پلاسمیدی: برای تکثیر و جداسازی ناحیه کدکننده ژن لیزوستافین ابتدا پلاسمید حاوی ژن لیزوستافین با استفاده از روش Mini-preparation از کشت باکتری استافیلوکوک سیمولانس جداسازی شد [۱۵]. بدین منظور ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری با استفاده از سانتریفیوژ با ۴۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد. رسوب سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر SET (sucrose 50 mM, EDTA 10mM, Tris-200 mM, HCL 25mM, PH=8) حل شد، و سلول‌ها با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر بافر سرد lyses (NaOH 5N, SDS 10%, DDW) لیز شدند، سپس استات پتاسیم ۵ مولار (KAC 5M, Acetic acid, DDW) به منظور توقف عمل بافر lyses اضافه شد. برای خالص‌سازی DNA پلاسمیدی، پروتئین‌ها، بقایای سلولی و مواد اضافی با دو بار اضافه کردن فنل-کلروفرم-ایزوامایل (۱/۲۴/۲۵) از محلول خارج شدند. سپس DNA در اتانول ۱۰۰٪ رسوب داده شد. در پایان با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ در بافر TBE و با اندازه‌گیری چگالی نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به دست آمد.

طراحی پرایمر و تکثیر ژن لیزوستافین: توالی ژن لیزوستافین با شماره دسترسی X06121 که 1825bp دارد از بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) تهیه شد. سپس توسط

مدت نیم ساعت جمع‌آوری شد. برای بررسی نتیجه القاء از روش الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری بر روی ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE ۱۲٪) استفاده گردید.

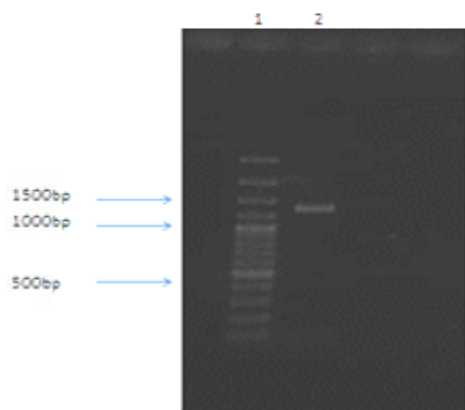
در این مطالعه به علت وجود دنباله هیستیدینی (His-tag) در پروتئین بیان شده که توسط وکتور بیانی pET-32a اضافه شده است، تخلیص آن توسط کیت (Ni-NTA agarose resin) طبق دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن، آمریکا) بر اساس کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش برد فورد اندازه‌گیری گردید و کیفیت آن نیز با استفاده از ژل الکتروفورز پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE ۱۲٪) بررسی گردید.

کدورت‌سنجی: فعالیت سنجی در اغلب موارد با اندازه‌گیری وظیفه اصلی عمل کرد یک‌آنزیم ارتباط مستقیم دارد. سنجش فعالیت لیزوستافین به وسیله‌ی مانیترینگ لیز سلولیک سوسپانسیون سلولی از استافیلوکوک اورئوس انجام می‌شود. میزان لیز سلولی به طور مستقیم متناسب با کاهش چگالی نوری (جذب نوری) یک سوسپانسیون سلول باکتریای در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) می‌باشد [۱۶]. بنابراین به منظور بررسی عمل کرد پروتئین تولید شده در شرایط *in vitro* روش کدورت‌سنجی انجام شد. ابتدا یک سوسپانسیون سلولی از استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 در محیط مولر هینتون براث به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از کشت ۱۸ ساعته سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی به دست آمده دو بار در بافر فسفات سالیین (PBS) (PH=۷/۴) شستشو داده شد. در نهایت سلول‌ها در بافر PBS معلق شدند تا به جذب نوری ۰/۲۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) برسند. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی فوق به طور جداگانه در دو لوله ریخته شد. در یکی از لوله‌ها پروتئین نوترکیب با غلظت ۱۰۰ µg/ml تلقیح شد، در دیگری به عنوان کنترل هیچ پروتئینی تلقیح نشد. سپس لوله‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند و میزان

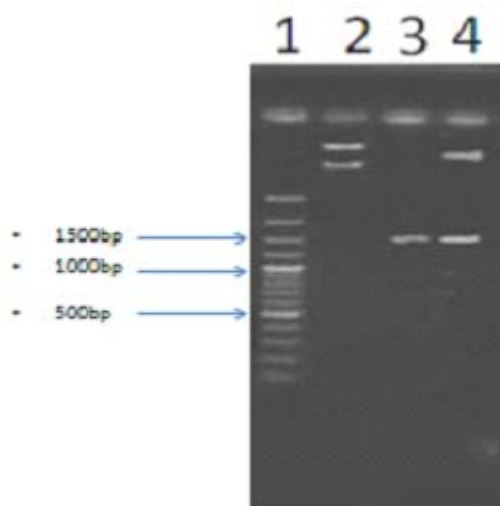
آنزیم‌های XhoI و BamHI برش خورد. ناقل پلاسمیدی pET32a نیز با آنزیم‌های مشابه با آنزیم‌های برش‌دهنده قطعه ژنی در شرایط مشابه برش داده شد. در مرحله بعد واکنش الحاق بین ناقل پلاسمیدی pET32a و قطعه ژنی برش خورده با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 در حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت به منظور تولید پلاسمید نوترکیب (pET32a-lys) انجام گرفت. سپس ناقل‌های نوترکیب حاصل از طریق ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی در میزبان کلونینگ (DH5α E. coli) مستعد شده با روش کلسیم کلراید (CaCl₂) وارد شدند. پس از رشد کلنی‌ها، کلنی‌های ترانسفورم شده به وسیله غربالگری بر روی محیط‌های نوترینت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ mg/ml) انتخاب شدند. جهت اطمینان از ورود پلاسمیدهای نوترکیب به داخل سلول‌های مستعد، از سلول‌های انتخاب شده استخراج پلاسمید انجام گرفت و با PCR و هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم‌های XhoI و BamHI ژن مورد نظر تایید شد. سپس تعیین توالی ژن توسط شرکت MWG آلمان انجام گرفت. و پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن لیزوستافین به منظور بیان ژن به میزبانانی E. coli سویه BL21 pLYsS (DE3) مستعد شده انتقال یافتند.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب لیزوستافین: برای بیان پروتئین نوترکیب، از کلنی‌های E. coli BL21(DE3) pLYsS حاوی پلاسمیدهای pET32a-lys در محیط نوترینت براث حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلینو کلرآمفنیکل کشت داده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های کشت داده شده به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط القا اضافه شد و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی انکوباتور شب‌کردار با ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از این که تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید (OD600=۰/۶)، از محلول یک مولار IPTG به منظور القا بیان پروتئین به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی IPTG به یک میلی‌مولار برسد. دو و چهار ساعت پس از افزودن IPTG، رسوب باکتری‌ها از ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به

در PCR قطعه‌ای به طول ۱۴۴۰ bp تکثیر شد و در هضم آنزیمی حضور ژن به همراه پلاسمید بر روی ژل آگاروز تایید گردید (شکل ۳). سپس تعیین ترادف به روش سنجر (Sanger) انجام گرفت. نتایج تعیین توالی (sequencing) هم‌ردیفی (Alignment) با استفاده از برنامه Blast، صحت ترادف جداشده را تایید کرد.



شکل ۲. تکثیر ژن لیزوستافین توسط PCR. چاهک شماره ۱: نشانگر SM0321#. چاهک شماره ۲: محصول PCR ژن لیزوستافین



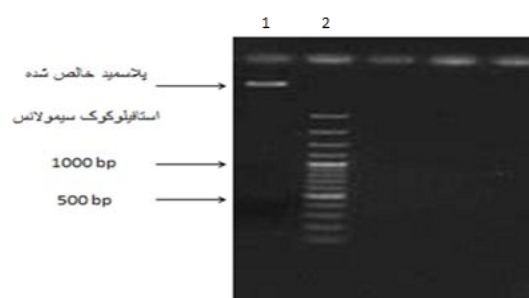
شکل ۳. برش آنزیمی پلاسمید pET32a-lys. چاهک شماره ۱: نشانگر SM0321#. چاهک شماره ۲: پلاسمید برش نیافته. چاهک شماره ۳: محصول PCR ناشی از pET32a-lys. چاهک شماره ۴: برش آنزیمی pET32a-lys با آنزیم‌های BamHI و XhoI

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب: پس از انتقال پلاسمیدهای نوترکیب pET32a-lys حامل ژن لیزوستافین به میزبان بیانی E. coli سویه pLYsS (DE3) BL2، بیان بالای

لیز سلولی با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) در فواصل زمانی نیم ساعت بررسی شد.

نتایج

استخراج DNA پلاسمیدی و PCR: پس از استخراج DNA پلاسمیدی (شکل ۱) از کلنی‌های رشدیافته استافیلوکوک سیمولانس، DNA در غلظت برآورد شده ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تغلیظ شد و از آن به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. برای تکثیر ژن لیزوستافین از غلظت‌های متفاوت یون منیزیم و دماهای مختلف annealing استفاده شد. بهترین غلظت یون منیزیم برای تکثیر ژن، غلظت ۳ میلی‌مولار و دمای مناسب برای اتصال پرایمرها ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. باند ۱۴۴۰ bp حاصل از تکثیر ژن لیزوستافین روی ژل آگارز ۰/۸٪ مشاهده و اندازه آن از طریق مقایسه با مارکر استاندارد تایید شد (شکل ۲).



شکل ۱. الکتروفورز DNA پلاسمیدی خالص شده بر روی آگاروز ۰/۸ درصد. چاهک شماره ۱: پلاسمید خالص شده استافیلوکوک سیمولانس. چاهک شماره ۲: نشانگر SM0321#

کلونینگ ژن در باکتری اشریشیاکلی: به منظور تایید باکتری‌های حاوی ناقل نوترکیب، تخلیص پلاسمید آن‌ها انجام شد. پلاسمیدهایی که حاوی ژن مورد نظر بودند، حرکت کندتری داشتند Jumping. لذا از سایر پلاسمیدهای فاقد ژن شناسایی شدند. سپس تایید ژن مورد نظر در پلاسمیدها با انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن لیزوستافین و هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم‌های BamHI و XhoI که جایگاه آن در دو طرف ژن الحاق شده به پلاسمید قرار داشت انجام گرفت.

اورئوس در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) می‌باشد. جذب نوری (کدورت) سوسپانسیون سلولی استافیلوکوک اورئوس به میزان ۵۰٪ از (۰/۲۵۰ به ۰/۱۲۵) در $\text{PH}=7/4$ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد توسط پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه کاهش یافت. کاهش کدورت سوسپانسیون سلولی نشان می‌دهد که پروتئین تولید شده قادر به لیز سلول‌های استافیلوکوک اورئوس در شرایط آزمایش می‌باشد.

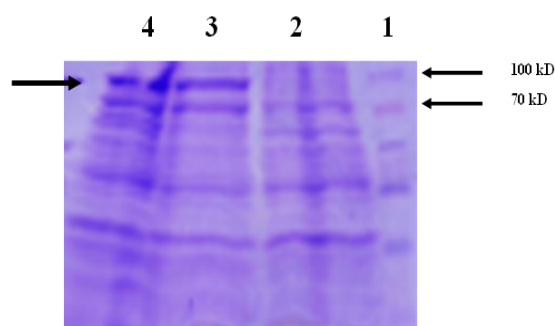
بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ژن لیزوستافین پس از تکثیر با استفاده از روش PCR در وکتور pET-32a کلون شد. پس از تایید پلاسمید نوترکیب، این پلاسمید به سلول‌های *E. coli* BL21 pLys (DE3) ترانسفورم شد، و بیان ژن تحت کنترل پروموتور باکتریوفاژ T7 در حضور IPTG صورت گرفت. سپس پروتئین نوترکیب حاصل با فعالیت ضد استافیلوکوکی توسط کیت Ni-NTA تخلیص شد.

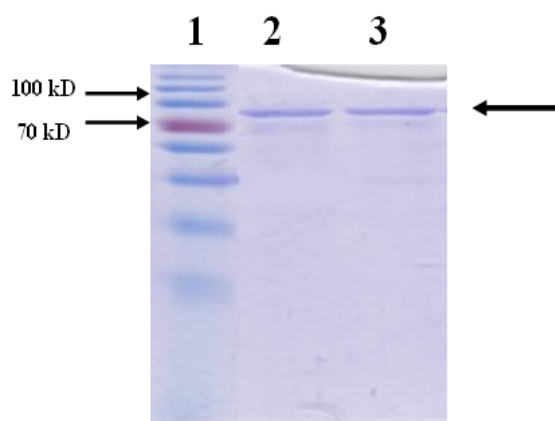
روش‌های اولیه برای تولید پروتئین لیزوستافین استخراج آن از عصاره‌ی سلولی استافیلوکوک سیمولانس بود [۱۸، ۱۷]، که این روش ممکن بود با آلودگی‌های چون آلرژن‌ها همراه باشد [۱۹] و تخلیص آن از منبع طبیعی را بسیار مشکل کرده بود. به شکل نوترکیب تولید و خالص‌سازی پروتئین‌ها نسبت به پروتئین طبیعی راحت‌تر انجام می‌شود، و هم‌چنین تولید پروتئین در حالت نوترکیب رامی‌توان به میزان دلخواه افزایش داد. به هر حال لیزوستافین بالغ در *E. coli* [۲۰]، در لاکتوکوکوس لاکتیس [۲۱] و در یک سیستمیوکاریوتی بیان شده است [۲۲]. اما تا امروز تحقیقی در مورد تولید نوترکیب لیزوستافین اولیه و بررسی فعالیت ضد استافیلوکوکی آن انتشار نیافته است. لذا در این تحقیق علاوه بر تولید لیزوستافین اولیه اثر ضد استافیلوکوکی آن نیز بررسی گردید.

E. coli به عنوان یک میزبان بیانی مناسب در نظر گرفته شد که تا به حال پروتئین‌های متعددی توسط آن بیان شده و به طور وسیعی به عنوان میزبان بیانی هم در تحقیقات وهم در صنعت از آن استفاده می‌شود.

پروتئین هدف با IPTG القا شد. تولید پروتئین مورد نظر با انجام SDS-PAGE تایید شد. نتایج مربوط به تولید پروتئین در شکل ۴ آمده است. پروتئین بیان شده با استفاده از رزین نیکل با توجه به وجود دنباله‌های هیستیدینی در ترکیب پروتئینی بر اساس کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد. و روی ژل، تک‌باندی در ناحیه مورد نظر نشان داد (شکل ۵). نتیجه تخلیص تقریباً ۵۰ میلی‌گرم پروتئین نوترکیب از یک لیتر محیط کشت بود.



شکل ۴. القا پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه. چاهک شماره ۱: نشانگر پروتئین. چاهک شماره ۲: نمونه قبل از القا. چاهک شماره ۳: نمونه ۲ ساعته بعد از القا. چاهک شماره ۴: نمونه ۴ ساعته بعد از القا



شکل ۵. تخلیص پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه. چاهک شماره ۱: نشانگر پروتئین، چاهک شماره ۲ و ۳: پروتئین خالص شده

کدورت‌سنجی: میزان لیز سلولی به طور مستقیم متناسب با کاهش جذب نور بیک سوسپانسیون سلولی از استافیلوکوک

استافیلوکوک‌ها، جداسازی DNA، شکل‌گیر پیروتوپلاست‌ها و افتراق گونه‌های استافیلوکوک‌ها ضروری می‌باشد.

نتایج دست آمده نشان می‌دهند که پروتئین تولید شده قادر به لیز سلول‌های استافیلوکوک اورئوس در شرایط *In vitro* می‌باشد، بنابراین این پتانسیل را دارد که هم‌چون پروتئین نوترکیب لیزوستافین بالغ در کاربردهای تحقیقاتی به کار گرفته شود.

به دلیل این‌که پروتئین لیزوستافین اولیه به شکل تجاری موجود نمی‌باشد امکان مقایسه پروتئین تولید شده با فرم تجاری فراهم نگردد.

در این تحقیق پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه با استفاده از پروسه تولید و تخلیص حاضر با استفاده از pET32a در *E. coli* برای آماده‌سازی مقادیر بزرگی از پروتئین نوترکیب به منظور پی‌ریزی مطالعات عمل‌کردیبر روی آن به عنوان یک عامل آنتی‌استافیلوکوکال تولید شد. نتایج نشان داد که pET32a یک سیستم بیانی کارآمد در بیان پروتئین نوترکیب لیزوستافین اولیه می‌باشد. پروتئین خالص شده فعالیت ضد استافیلوکوک داشت، بنابراین این پتانسیل را دارد که به عنوان یک عامل موثر در پیش‌گیری و درمان عفونت‌های استافیلوکوک استفاده شود. و مطالعات بیشتر با بررسی عمل‌کرد ضد استافیلوکوک آن در شرایط *in vivo* می‌توان انجام داد.

در این مطالعه به منظور جلوگیری از تخریب آنزیمی و دستیابی به مقدار بالایی از پروتئین نوترکیب از *E. coli* سویه BL21 به عنوان میزبان بیانی استفاده شد، این سویه فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی شناخته شده است [۲۳]. بنابراین بیان بالای پروتئین ناشی از نقص پروتئازها در این سویه می‌باشد.

سیستم pET از جمله قوی‌ترین سیستم‌ها برای بیان ژن و تولید پروتئین نوترکیب در میزبان *E. coli* می‌باشد. در این سیستم بیاتژن هدف تحت کنترل پروموتور قوی T7 بوده که تحت کنترل اپراتور Lac می‌باشد و در ژنوم میزبان (*E. coli*) رونویسی از ژن هدف تحت کنترل این پروموتور توسط RNA پلیمراز فاژ T7 که در سلول باکتری کلون شده است، انجام می‌پذیرد. بنابراین به علت استقلال سیستم رونویسی ژن از سلول میزبان، تولید mRNA و نهایت تولید پروتئین در این سیستم متأثر از عوامل سلولی دخیل در سنتز پروتئین‌های سلولی میزبان نمی‌باشد؛ به همین دلیل تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم‌هایی است که در آن‌ها رونویسی وابسته به RNA پلیمرازهای سلول میزبان است [۱۵].

تا به حال لیزوستافین بالغ در چندین در وکتور مختلف (pET: pET23b, pET28a, pET15b) بیان شده که بازده محصول به ترتیب ۱۱ میلی‌گرم، ۲۲ میلی‌گرم، ۲۰ میلی‌گرم از یک لیتر محیط *E. coli* BL21(DE3) + pET-lys بوده است [۲۶، ۲۵، ۲۴].

در این مطالعه از وکتور بیانی pET32a برای بیان پروتئین هدف استفاده شد. ناقل pET32a دارای توالی الحاقی (ترادف ویژه مربوط به ۶ اسید آمینه هیستیدین) در ناحیه ۵' مکان کلونینگ ژن می‌باشد که به تخلیص پروتئین هدف کمک کرد و با استفاده از روش تخلیص پروتئین بر اساس کروماتوگرافی تمایلی تقریباً ۵۰ میلی‌گرم پروتئین نوترکیب از یک لیتر محیط کشت *E. coli* BL21(DE3) + pET-lys حاصل شد.

امروزه پروتئین لیزوستافین بالغ در *E. coli* بیان می‌شود و به شکل تجاری توسط شرکت سیگما (آمریکا) با قیمت بالا به فروش می‌رسد. و برای مطالعات ژنتیکی بر روی

تشکر و قدردانی

این پژوهش از پایان‌نامه لیلا فرهنگ‌نیا کارشناسی ارشد زیست فناوری (شماره ۷۷۲) دانشگاه علوم پزشکی اراک استخراج شده است. لذا بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش همکاری کرده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

- [1] Lowy FD. Staphylococcus aureus infection. N Engl J Med 1998;339:520-532.
- [2] Brumfitt W, Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. N Engl J Med 1989;320:1188-1196.

- [16] Satishkumar R, Sankar S, Yurko Y, Lincort A, Shipp J, Heniford BT, Verregel A. Evaluation of the antimicrobial activity of lysostaphin-coated hernia repair meshes. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55: 4379-4385.
- [17] Iversen OJ, Grov A. Studies on lysostaphin separation and characterization of three enzymes. *Eur J Biochem* 1973;38: 293-300.
- [18] Schindler CA, Schuardt VT. Purification and properties of lysostaphin: a lytic agent for the *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Acta* 1965; 97:242-250.
- [19] Marova I, Dadak V. Modified simplified method for isolation of lysostaphin from the culture filtrate of *Staphylococcus staphylolyticus*. *Folia Microbiol* 1993;38:245-252.
- [20] Recsei PA, Gruss AD, Novick RP. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1127-1131.
- [21] Mierau I, Leij P, van Swam I, Blommestein B, Floris E, Mond J, Smid EJ. Industrial scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin controlled gene expression system NICE: The case of lysostaphin. *Microb Cell Fact* 2005; 4: 15.
- [22] Williamson CM, Bramley AJ, Lax AJ. Expression of the lysostaphin gene of *Staphylococcus simulans* in a eukaryotic system. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 771-776.
- [23] Sugimura K, Higashi N. A novel outmember-associated protease in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1988;170:3650-3654.
- [24] Sharma R, Sharma PR, Choudhary ML, Pande A, Khatri GS. Cytoplasmic expression of mature glycylglycine endopeptidase lysostaphin with an aminoterminal hexa-histidine in a soluble and catalytically active form in *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif* 2006; 45: 206-215.
- [25] Zhang B, Shangguan T, Ma H, Huang X, Zhang Y. Lysis of mastitis pathogens isolated from dairy cow milk samples by purified recombinant lysostaphin. *African J Biotechnol* 2012;11: 4649-4659.
- [26] Szweda P, Kotlowski R, Kur J. New effective sources of the *staphylococcus simulans* lysostaphin. *J Biotechnol* 2005; 117: 203-213.
- [3] Sheagren JN. *Staphylococcus aureus*: the persistent pathogen. *N Engl J Med* 1984;310:1368-1373.
- [4] van Saene HK, Weir WI, de la Cal MA, Silvestri L, Petros AJ, Barrett SP. MRSA—time for a more pragmatic approach. *J Hosp Infect* 2004;56: 170-174.
- [5] Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:781-791.
- [6] Kumar JK. Lysostaphin a antistaphylococcal agent. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;80:555-561.
- [7] Heinrich P, Rosenstein R, Bohmer M, Sonner P, Gotz F. The molecular organization of the lysostaphin gene and its sequences repeated in tandem. *Mol Gen Genet* 1987;209:563-569.
- [8] Klesius PH, Schuardt VT. Use of lysostaphin in the isolation of highly polymerized deoxyribonucleic acid and in the taxonomy of aerobic Micrococcaceae. *J Bacteriol* 1968; 95:739-743.
- [9] Geary C, Stevens M. Rapid lysostaphin test to differentiate *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. *J Clin Microbiol* 1986;23: 1044-1045.
- [10] Dajcs JJ, Hume EB, Moreau JM, Caballero AR, Cannon BM, O'Callaghan RJ. Lysostaphin treatment of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* keratitis in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1432-1437.
- [11] Patron RL, Climo MW, Goldstein BP, Archer GL. Lysostaphin treatment of experimental aortic valve endocarditis caused by a *Staphylococcus aureus* isolate with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1754-1755.
- [12] Bhakta M, Arora S, Bal M. Intraspecies transfer of a chloramphenicol-resistance plasmid of staphylococcal origin. *Indian J Med Res* 2003; 117:146-151.
- [13] Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3407-3414.
- [14] Shah A, Mond J, Walsh S. Lysostaphin-coated catheters eradicate *Staphylococcus aureus* challenge and block surface colonization. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2704-2707.
- [15] Sambrook JF, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York 2001.

Cloning, expression and purification of recombinant polysostaphin protein and evaluating its in vitro antistaphylococcal activity

Leila Farhangnia (M.Sc)¹, Ehsanollah Ghaznavi Rad (Ph.D)², Neda Molaei (M.Sc)³, Hamid Abtahi (Ph.D)^{*4}

1- Biotechnology laboratory, Dept. of Biotechnology and Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Molecular and Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

4- Dept. of Microbiology, Molecular and Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received: 21 Jul 2013; Accepted: 16 Dec 2013)

Introduction: *Staphylococcus aureus* causes a wide range of infections, from skin infections disseminated to systemic infections leading to organ failure and death. Drug resistance in this group of pathogens is a world-wide concern and needs the development of novel agents. Lysostaphin, an example of such a novel agent, is a bacteriocin secreted by *Staphylococcus simulans* to kill *Staphylococcus aureus* through proteolysis of the *Staphylococcus* cell wall. The aim of this study was to high level expression and *in vitro* evaluation of antistaphylococcal activity of recombinant polysostaphin protein under *in vitro* conditions.

Materials and Methods: In this experimental study, lysostaphin gene of *Staphylococcus simulans* was amplified by PCR method, then was cloned and expressed into the expression vector pET-32a. The expressed protein was purified by affinity- chromatography using (Ni-NTA) resin kit. The Study of antibacterial activity against a cell suspension of *S. aureus* were performed using turbidity assay.

Results: PCR and sequencing results showed the successful cloning of the target gene into the recombinant vector. The expression of protein was induced by IPTG and high concentration of the recombinant protein with antistaphylococcal activity was purified using Ni-NTA resin.

Conclusion: Our data showed that, the pET32a expression vector is a very efficient system for producing recombinant polysostaphin protein in *E. coli*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Lysostaphin, Molecular cloning

*Corresponding author. Fax: +98 863 4173526 Tel: +98 863 4173502
abtahi@arakmu.ac.ir

How to cite this article:

Farhang nia L, Ghaznavi Rad E, Molaei N, Abtahi H. Cloning, expression and purification of recombinant polysostaphin protein and evaluating its in vitro antistaphylococcal activity.

koomesh. 2014; 15 (4) : 441-448

URL http://koomeshjournal.semums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-575-2&slc_lang=fa&sid=1