جلد ۲۶، شماره ۲، پیاپی ۱۰۰، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۳

doi: 10.69107/koomesh-149316

مقاله پژوهشی

بیان دومین متصل‌شونده به رسپتور (RBD) پروتئین اسپایک کرونا ویروس متصل به انتهای کربوکسیلی انتروتوکسین کلستریدیوم پرفرنژنس (c-CPE) در مخمر پیکیاپاستوریس

الهام بهوندی [۱]، قاسم باقرپور [۱،۲*]، کیوان ندائی [۱]، سعید کابلی [۱]، بهروز جوهری [۲]

[۱] گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

[۲] مرکز تحقیقات زیست فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

***نویسنده‌ی مسئول**:گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

ایمیل: g_bagherpour@zums.ac.ir ; bagherpour.4631@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۴ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۴

چکیده

مقدمه: برای افزایش IgA موکوزال می‌توان از انتقال آنتی‌ژن به صورت اینترانازال اقدام کرد. یکی از مشکلاتی که در هنگام استفاده از این روش وجود دارد نفوذپذیری پایین مخاط بینی به عوامل آنتی‌ژنیک می‌باشد. در این مطالعه برای رفع این مشکل از c-CPE یا قسمت انتهای کربوکسیلی انتروتوکسین کلستریدیوم پرفرنژنس استفاده گردید. به همین منظور سازه فیوژن RBD-c-CPE در میزبان باکتریایی کلون و برای بیان پروتئین در ژنوم میزبان مخمری درج گردید.

اهداف: هدف نهایی از این مطالعه، ساخت و بیان سازه فیوژنی است که بتوان از آن به عنوان واکسن مخاطی کرونا ویروس جهت ایجاد ایمنی مناسب در میزبان استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: پس از ساخت سازه بیانی، سازه در وکتور مخمری pPICZαA کلون شد. ترانسفورماسیون باکتری TOP10F´ با پلاسمید نوترکیب، استخراج پلاسمید و ترانسفورماسیون مخمر X33 با پلاسمیدهای نوترکیب خطی شده انجام گردید. کلون‌های مثبت پس از کشت شبانه برای مراحل کشت بیانی استفاده شدند. تغلیظ پروتئین و سپس وسترن‌بلات و ECL جهت تایید ترشح پروتئین در محیط کشت مخمر انجام گرفت.

نتایج: الکتروفورز روی ژل آگارز نشان‌دهنده ساخت موفق سازه ژنی RBD-c-CPE بود. نتایج Colony PCR باکتری TOP10F´ و مخمر پیکیاپاستوریس پس از طی مراحل ترانسفورماسیون به ترتیب نشان‌دهنده کلونینگ موفق پلاسمید نوترکیب pPIC-RC در باکتری TOP10F´ و نیز اینتگریشن موفق پلاسمید نوترکیب در ژنوم مخمر بود. وسترن‌بلات تاییدکننده بیان موفق پروتئین فیوژن RBD-c-CPE در مخمر پیکیاپاستوریس بود.

نتیجه‌گیری: سازه RBD-c-CPE بعد از کلون در میزبان باکتریایی با موفقیت در ژنوم میزبان مخمری درج و بیان گردید و می‌توان پس از بهبود بیان پروتئین فیوزشده از آن به‌عنوان یک کاندید واکسن مخاطی 19-COVID برای کارآزمایی پیش‌بالینی بر روی حیوانات استفاده کرد.

کلمات کلیدی: پروتئین نوترکیب فیوژن، کلونینگ، پیکیاپاستوریس، پروتئین اسپایک.

۱. مقدمه

کروناویروس جدید SARS-CoV-2 در ساختار خود حاوی RNA تک رشته با قطبیت مثبت (Positive sense) است که توسط یک غشای دولایه لیپیدی احاطه شده است. قطر این ویروس تقریبا ۲۰۰ - ۵۰ نانومتر، اندازه ژنوم آن ۳۰ کیلوباز و دارای ۱۴ قالب خواندن باز می‌باشد که ۲۹ پروتئین را کد می‌کند. چهار قالب خواندن در انتهای ´۳ ژنوم ویروسی چهار پروتئین ساختمانی شامل پروتئین سطحی اسپایک (S)، پروتئین پوششی (E)، پروتئین غشایی (M)، پروتئین نوکلئوکپسید (N) را کد می‌کنند (۱) که به‌ترتیب، نقش پروتئین S در اتصال به رسپتور سلول میزبان یا ACE2 و ادغام

Copyright © 2024, Behvandi et al. This open-access article is available under the Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY 4.0) International License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows for unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

به غشای سلول میزبان (۲)، پروتئین N مسئول بسته‌بندی ژنوم RNA تک‌رشته‌ای(ssRNA) (۳)، پروتئین E به‌عنوان هدایت‌کننده یون‌ها یا کانال یونی ویروسی(Viroporin) (۴) و پروتئین M که فراوانترین پروتئین ساختاری ویروسی می‌باشد و نقش اصلی را در جمع شدن اجزای ویروس و جوانه‌زدن از غشا به عهده دارند (۵).

پروتئین S ویروس در بین همه کرونا ویروس‌های انسانی به‌شدت حفظ شده است و در شناسایی و اتصال به رسپتور و ورود ویروس به سلول‌های میزبان نقش دارد. اسپایک در SARS-CoV-2 حدود ۱۲۷۳ اسیدآمینه طول دارد که متشکل از یک پپتید نشانه (۱، ۱۳) در ناحیه N-terminal، زیرواحد S1 (685-14) و زیر واحد S2 (1273-686) می‌باشد که دو ناحیه آخر به ترتیب مسئول اتصال به رسپتور و ادغام غشای ویروس و سلول هستند. زیرواحد S1 از یک دومین N-terminal(305-14) و یک دومین متصل‌شونده به رسپتور Receptor binding domain (RBD) (541-319) و زیرواحد S2 از یک پپتید فیوژن (۸۰۶-۷۸۸)، توالی تکراری هپتاپپتید۱ (1163-1213)، HR2، (912-984) (HR1)، دومین بین غشایی (1213-1237) و دومین سیتوپلاسمی (1273-1237) تشکیل شده است.

اتصال زیرواحد S1 پروتئین به گیرنده Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) از طریق دومین‌های متصل‌شونده به گیرنده می‌باشد. ناحیه RBD یک هدف مهم برای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده (nAbs) هستند (۵، ۶). در RBD تعداد ۹ اسیدآمینه که در تماس با ACE2 هستند به‌طور کامل و چهار اسیدآمینه نسبتا حفظ شده‌اند. آنالیز Receptor-binding motif، (RBM) یک قسمت از RBD که به طور مستقیم با ACE۲ تماس برقرار می‌کند، نشان داد که اغلب واحدهای اسیدآمینه ضروری برای اتصال به رسپتور در پروتئین S ویروس SARS-CoV-2 حفظ شده‌اند (۷). در مقایسه با واکسن‌هایی که کل پروتئین S را مورد هدف قرار می‌دهند، استفاده ناحیه RBD به‌عنوان آنتی‌ژن به دلایل مختلف جذابیت زیادی در طراحی واکسن دارد از جمله آسان‌تر بودن بیان آن نسبت به بیان کل پروتئین اسپایک، اتصال آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده قوی به آن با وجود این‌که این پروتئین نسبتا کوچک می‌باشد، دارا بودن اپیتوپ‌های خنثی‌کننده ساختاری چندگانه و نسبتا حفظ‌شده و در نهایت عدم تولید آنتی‌بادی‌های غیرخنثی‌کننده‌های که نواحی غیر از RBD را در اسپایک مورد هدف قرار می‌دهند و ممکن است موجب ایجاد عوارض جانبی به‌دلیل افزایش ایمنی وابسته به آنتی‌ژن گردند. مجموعه این ویژگی‌ها موجب گردید RBD به یکی از اهداف مهم برای ساخت واکسن‌های تولیدشده علیه بیماری SARS-CoV-2 تبدیل گردد (۵، ۸). به نظر می‌رسد ناحیه RBD به‌عنوان یک ایمونوژن نسبتا کوچک، ساختاری شبه هاپتن از خود نشان‌داده و ایمونوژنسیته آن پایین می‌باشد که لزوم استفاده از دوزهای آنتی‌ژن بالاتری را ایجاب می‌کند که در این‌صورت تولید واکسن در حجم زیاد می‌تواند مشکل‌ساز باشد (۶). از سویی دیگر اتصالات محکم (Tight Junctions) در پستانداران هم به‌عنوان یک مسیر ورود مواد و هم به‌عنوان حصار عمل می‌کند. یعنی هم به‌عنوان سد مهمی برای یک اپتلیوم بوده و همچنین نفوذپذیری بین سلولی را تنظیم می‌کند (۹). بنابراین استفاده از یک تسهیل‌کننده ورود آنتی‌ژن می‌تواند در کاهش دوز آنتی‌ژن مفید واقع گردد. نشان داده شده که قسمت انتهای کربوکسیلی انتروتوکسین کلستریدیوم پرفرنژنس (c-CPE) می‌تواند به‌عنوان یک تسهیل‌کننده عبور RBD از اپیتلیوم عمل کند قسمت انتهای کربوکسیلی c-CPE یک ناحیه متصل‌شونده به پروتئین‌های کلودین در اتصالات محکم بوده و فاقد سمیت است (۱۰). از طرف دیگر، اتصالات محکم از پروتئین‌های زیادی تشکیل‌شده است که مهم‌ترین آن‌ها کلودین‌ها هستند.

دومین c-CPE با اتصال به کلودین‌ها باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌های اپیتلیال شده و از این طریق موجب نفوذ بیشتر داروها و همچنین ماکروملکول‌هایی می‌شوند که می‌توانند به‌عنوان دارو یا واکسن استفاده شوند (۱۱). از طرف دیگر، آنتی‌ژن RBD با ۴ باند دی‌سولفید داخلی باعث شده است تا مخمر پیکیاپاستوریس به‌علت دارا بودن قابلیت انجام تغییرات پس از ترجمه به‌عنوان میزبانی بیانی انتخاب گردد.

۲. اهداف

در مطالعه حاضر با بیان c-CPE در مخمر پیکیاپاستوریس به‌عنوان یک تسهیل‌کننده ورود آنتی‌ژن از طریق مخاط و اتصال آن به‌RBD مربوط به اسپایک کرونا ویروس سعی شده است تا یک هدف ساخت واکسن مخاطی به صورت تجربی و آزمایشگاهی دنبال گردد.

۳. مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع آزمایشگاهی و تجربی می‌باشد. مراحل تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان مورد تایید است و تمام کارهای پژوهشی این مقاله با رعایت کامل اصول اخلاقی انجام گرفته است.

۱.۳. تکثیر قطعات RBD وc-CPE و Overlap PCR جهت اتصال قطعات

برای تکثیر ژن RBD شامل اسیدهای آمینه 331-529 از پلاسمید حاوی ژن اسپایک ویروس SARS-CoV-2 سویه

Wuhan-Hu-1 تولیدشده توسط شرکت addgene به نام pGBW-m4046538 به‌عنوان الگو استفاده شد. به‌علاوه برای تکثیر ژن c-CPE از پلاسمید pIP-FG1 که کدونهای ژن c-CPE در آن برای مخمر بهینه‌سازی شده بود و توسط باقرپور و همکاران در سال ۲۰۱۸ تولید (۱۲) و استفاده شد.

جهت طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار SnapGene ۳،۲،۱ ابتدا توالی ژن RBD وc-CPE از پلاسمیدهای ذکرشده استخراج گردید و سپس پرایمرهای رفت‌وبرگشتی کلونینگ برای آن‌ها طراحی شدند به‌گونه‌ای که جایگاه برش آنزیم XhoI در قسمت ابتدایی پرایمر رفتی RBD و جایگاه برش آنزیم XbaI در ابتدای پرایمر برگشتی CPE تعبیه شد. واکنش‌های PCR برای تکثیر قطعات ژنی RBD و c-CPE با استفاده از پرایمرهای رفت‌وبرگشتی به‌ترتیب از روی پلاسمیدهای pGBW و pIP-FG1 با استفاده از آنزیم High Fidelity PCR به‌عنوان یک آنزیم با احتمال خطای پایین به عنوان الگو انجام گردید. توالی پرایمرهای رفت‌وبرگشت در جدول ۱ آورده شده است.

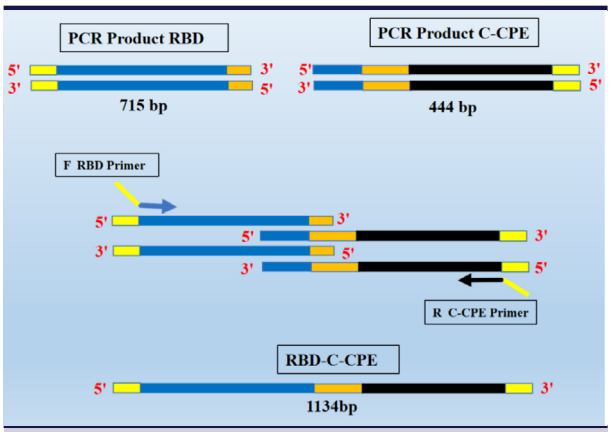
جدول ۱. مشخصات پرایمرها به‌همراه دمای اتصال و طول محصول حاصل از آن‌ها

شماره	نام پرایمر	توالی ’۵ به ’۳	دمای اتصال پرایمر (C°)	طول محصول
۱	F RBD-His-(taq (XhoI	tatCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCATCATCACCATCACCACagagtccaa ccaacagaatctattg	۵۸	۷۱۵ جفت باز
۲	RBD R	AACCTCCACCACCtttgtttttaac	۵۸	
۳	F CPE	gttaaaaacaaaGGTGGTGGAGGT	۵۸	۴۴۴ جفت باز
۴	(R CPE (XbaI	tatTCTAGATCAAAACTTTTGAAACAAAATAGAGTATGGATAGTTTC	۵۸	

۲.۳. واکنش Overlap PCR برای اتصال دو قطعه c-CPE و RBD

واکنش PCR به کمک دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل، یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه‌ی ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دوره‌ی ۳ مرحله ای شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک مرحله ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. الکتروفورز با ژل ۱ درصد انجام شد و سپس به کمک دستگاه عکس‌برداری از ژل (شرکت کیاژن ایران) مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت.

پس از تکثیر قطعات ژنی RBD و c-CPE، این قطعات با استفاده از روش Overlap PCR با همان برنامه دمایی به هم متصل شدند (تصویر ۱). جهت آزادی عملکرد دو دومین، یک توالی ژنی کدکننده یک لینکر قابل انعطاف ۱۵ اسیدآمینه‌ای (G4S)3 با توالی GGGGSGGGGSGGGGS که ساختار ثانویه تشکیل نمی‌دهد و به‌طور طبیعی در پروتئین PIII مربوط به فاژ MM13 وجود دارد در ابتدای ژن c-CPE گنجانده شده بود که همراه با آن از روی پلاسمید pIP-FG1 رونویسی شد. پس از انجام PCR برای تایید ساخت سازه ژنی RBD-c-CPE که RC نامیده شد از روش الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد استفاده شد.



تصویر ۱. طرح شماتیکOverlap PCR . برای اتصال قطعات ژنی RBD (قطعه آبی) و c-CPE (قطعه مشکی) از روشOverlap PCR استفاده گردید. ناحیه لینکر در این تصویر به رنگ نارنجی و بین دو قطعه RBD و c-CPE نمایش داده شده است.

۳.۳. ساخت پلاسمید pPIC-RC و ترانسفورماسیون به درون باکتری TOP10F´

برای حذف ناخالصی‌ها و به‌دست‌آوردن DNA خالص، Clean up محصولات PCR مطابق دستورالعمل کیت تجهیز آزما انجام گردید. برای کلون‌کردن سازه ژنی به درون پلاسمید نیاز به جایگاه‌های برش یکسان در هر دو مورد هست که از قبل این جایگاه‌ها شامل محل برش برای آنزیم XhoI و XbaI در هر دو انتهای سازه ژنی از طریق پرایمرهای اختصاصی گنجانده شده بود و به‌علاوه این جایگاه‌ها درون

پلاسمید pPICZαA) Invitrogen, Whaltham, MA, USA) نیز وجود دارند. جهت انتخاب مقادیر مناسب جهت واکنش و اتصال بهتر این قطعات، غلظت DNA سازه ژنی و پلاسمید استخراج شده توسط کیت با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. کلونینگ قطعه ژنیRBD-c-CPE در وکتورpPICZαA به‌اختصار pPIC-RC نامیده شد.

سلول‌های پذیرا از E. coli TOP10F´ متعلق به شرکت اینویتروژن تهیه و توسط محصول Ligation حاصل از مرحله قبل از طریق روش شیمیایی و با استفاده از محلول کلریدکلسیم مورد ترانسفورماسیون قرار گرفتند (۱۳). همچنین در این مرحله یک تیوب از سلول‌های پذیرا بدون افزودن پلاسمید به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. پس از غنی‌سازی و طی‌شدن دوره آنکوباسیون، در صورت عدم رشد نمونه کنترل منفی و رشد کلونی‌های نمونه مثبت بر روی پلت LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، از تعدادی از کلونی‌ها، پلیت ماتریکس تهیه گردید. غربالگری برای یافتن کلونی‌های حاوی وکتور pPICZαAدربردارنده سازه به‌روش کلونی PCR (با استفاده از هر دو جفت پرایمر)، هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام گردید.

۴.۳. ترانسفورم کردن پلاسمید pPIC-RC به درون مخمر 33X با استفاده از روش الکتروپوریشن

جهت خطی کردن پلاسمید از آنزیم SacI (شرکت فرمنتاز) که دارای محل برش بر روی پلاسمید pPIC-RC است استفاده شد و به این‌ترتیب امکان نوترکیبی پلاسمید درون ژنوم مخمرX۳۳ (شرکت اینویتروژن) فراهم گردید. برش پلاسمید پس از اندازه‌گیری مقدار DNA با دستگاه نانو انجام شد. سپس با استفاده از روش الکتروپوریشن پلاسمیدهای خطی وارد مخمرهای پیکیاپاستوریس گردید. برای این منظور از کووت ۲ میلی‌لیتر، توسط دستگاه الکتروپوریتور (Eppendorf Electroporator، آلمان) پالسی معادل ۲۵۰۰ کیلوولت به مدت ۵ میلی‌ثانیه به سلول‌ها داده شد تا ترانسفورماسیون انجام شود. بعد از انجام الکتروپوریش به‌طور کشت شبانه در محیط مایع YPD قرار داده شد و سپس بعد از سانتریفووژ مخمرها بر روی محیط جامد YPD حاوی زئوسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد. تایید ورود پلاسمید pPIC-RCبه درون کروموزوم مخمر با روش کلونیPCR (با استفاده از هر دو جفت پرایمر) صورت گرفت.

۵.۳. بیان سازه‌های پلاسمیدی در مخمر 33X

تعداد چهار کلونی تهیه شد و برای مراحل بیان ژن و تولید پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. برای کنترل منفی نیز از مخمر X33 بدون پلاسمید استفاده گردید.

برای بیان پروتئین از دستورالعمل کیت بیانی پیکیاپاستوریس (EasySelect™ Pichia Expression Kit) استفاده گردید. به این منظور از محیط‌های Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) جهت تکثیر اولیه مخمرها، (BGMY) Buffered Glycerol-Complex Medium جهت افزایش رشد و تکثیر مخمرها و(BMMY) Buffered Methanol-complex Medium جهت القا و افزایش تولید پروتئین نوترکیب استفاده گردید.

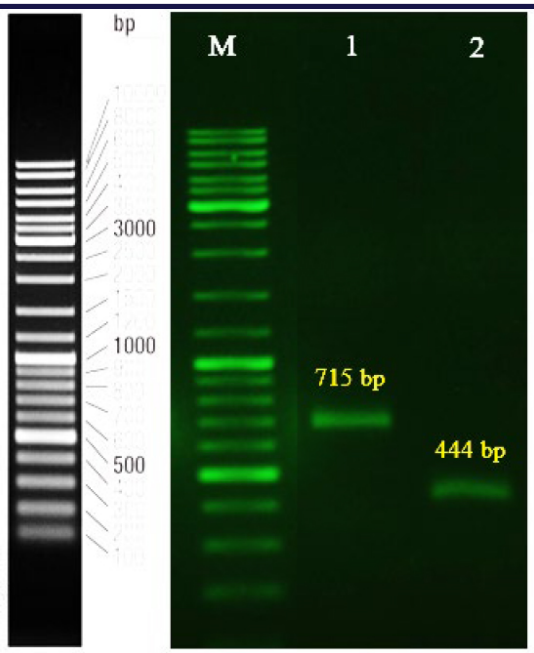
یک کلونی از ماتریکس تهیه شده در ۳ میلی‌لیتر محیط YPDحاوی ۳ میکرولیتر زئوسین میکروگرم برمیلی لیتر به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۵۰ دور در دقیقه آنکوبه گردید. ۳ میلی‌لیتر از کشت شبانه مخمر به ۱۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت BGMY افزوده و در دمای ۳۰ - ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۵۰ دور در دقیقه آنکوبه گردید. پس از جمع‌آوری و سانتریفیوژ محیط کشت‌ها، مایع رویی به‌طور کامل دور ریخته شد و پلت سلولی در ۵۰ میلی‌لیتر محیط BMMY معلق شد و به یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر منتقل و در آنکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و 250 rpm قرار داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر متانول ۱۰۰ درصد (با غلظت نهایی۱ درصد) به هر نمونه جهت القای بیان پروتئین نوترکیب، هر ۲۴ ساعت به مدت ۷۲ ساعت افزوده گردید.

۶.۳. تغلیظ پروتئین و تایید بیان پروتئین

محیط‌های نمونه‌های مثبت و منفی جمع‌آوری و در لوله فالکون‌های ۵۰ سی‌سی به طور جداگانه در ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. محیط‌های رویی جمع‌آوری گردیدند و توسط فیلتر آمیکون ۳ کیلو دالتونی (Cobetter) تا ۲۵۰ میکرولیتر تغلیظ گردیدند. ابتدا نمونه منفی و سپس نمونه‌های مثبت تغلیظ شدند. در انتها نمونه‌ها در میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی در ۲۰- ذخیره گردیدند. جهت تایید بیان ژن و ترشح پروتئین نوترکیب در محیط کشت مخمر ابتدا از روش SDS PAGE و سپس ECL با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد تگ هیستیدینی شرکت سیگما و با رقت ۱/۲۰۰۰ انجام گردید.

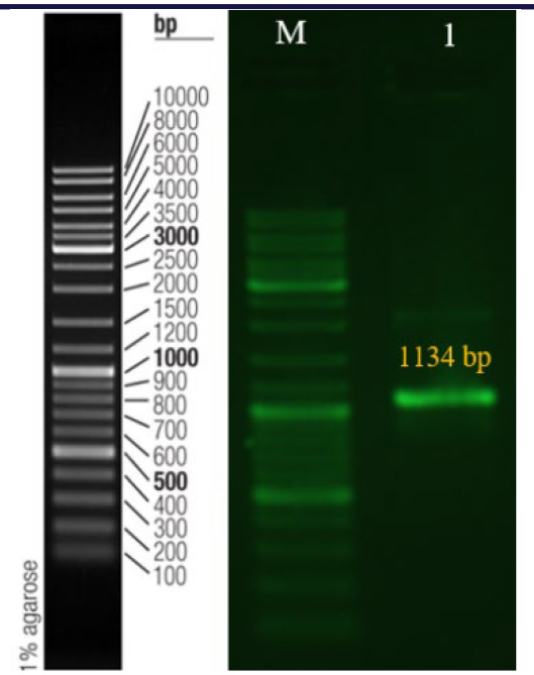
۴. نتایج

PCR قطعات ژنی RBD و c-CPE با استفاده از پلاسمیدهای pGBW و pIP-FG1 استخراج شده، به‌عنوان الگو انجام گرفت و اندازه قطعات حاصل بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. باند ۷۱۵ جفت‌باز مربوط به قطعه RBD و باند ۴۴۴ جفت‌باز مربوط به قطعه c-CPE نمایان‌گر تکثیر موفقیت‌آمیز قطعات مورد نظر بود (تصویر ۲).



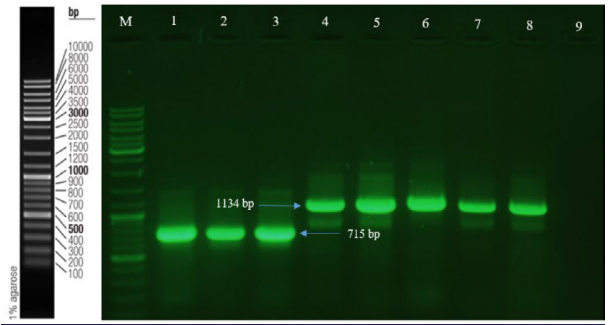
تصویر ۲. الکتروفورز قطعات RBD و c-CPE تکثیر شده با PCR. درردیف ۱ باند مربوط به قطعه ژنی RBD با اندازه ۷۱۵ جفت‌باز و در ردیف ۲ باند مربوط به قطعه ژنی c-CPE با اندازه ۴۴۴ جفت‌باز مشاهده گردید.

ژن‌های RBD و c-CPE پس از کپی‌برداری از پلاسمیدهای مربوطه و با استفاده از پرایمرهای F-RBD وR-CPE و توسط روش Overlap PCR به یکدیگر متصل شدند. در الکتروفورز محصول Overlap PCR با ژل آگارز ۱ درصد باند ۱۱۳۴ کیلوبازی مشاهده شده نمایانگر اتصال موفق قطعات RBD و c-CPE با روش Overlap PCR بود (تصویر ۳).

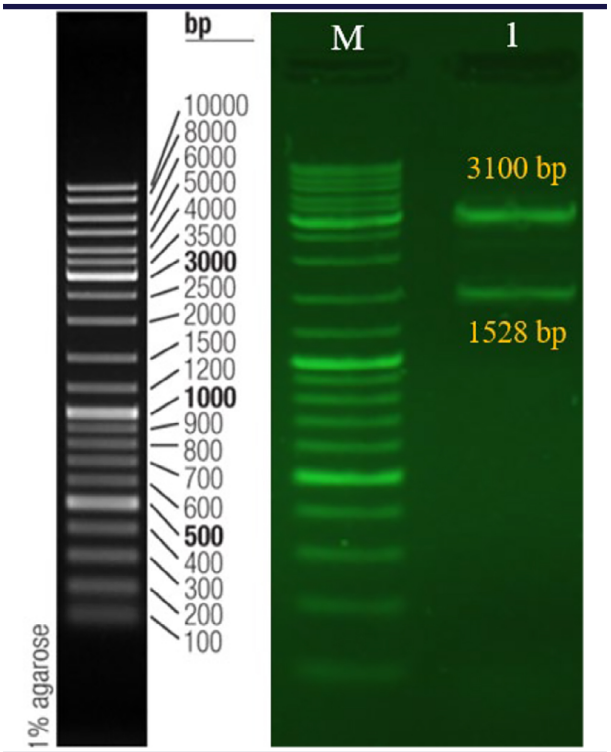


تصویر ۳. الکتروفورز محصول Overlap PCR با ژل آگارز ۱درصد. باند ۱۱۳۴ کیلوبازی مشاهده شده نمایانگر اتصال موفق قطعات RBD و c-CPE با روش Overlap PCR بود.

پس از برش پلاسمید و سازه ژنی با آنزیم‌های *Xho*I و *Xba*I، ترانسفورماسیون محصول Ligation به روش شیمیایی به درون باکتری TOP۱۰F′ و بر روی محیط انتخابی حاوی زئوسین صورت‌گرفت. جهت تایید ورود سازه ژنی به pPICZαA، کلونی PCR (تصویر ۴)، برش آنزیمی با آنزیم‌های *Xho*I و *BamH*I (تصویر ۵) و در نهایت تعیین توالی با کمک پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت که همه آن‌ها تایید‌کننده ورود ژن موردنظر به پلاسمید pPICZαA بود.

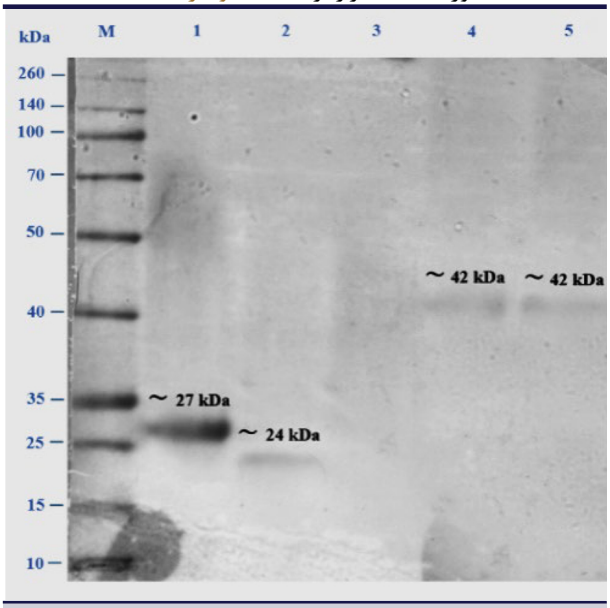


تصویر ۴. کلونیPCR برای تایید کلونینگ ژن در پلاسمید pPICZαA . ردیف ۳-۱ نتیجه PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژن RBD که منجر به تشکیل باند ۷۱۵ جفت‌باز شد و ردیف ۸-۴ نتیجه PCR با پرایمر رفت RBD و پرایمر برگشت c-CPE که منجر به تشکیل باند ۱۱۳۴ جفت‌باز شد. در چاهک ردیف ۹ از باکتری TOP۱۰F′ ترانسفورم نشده به‌عنوان نمونه کنترل منفی همراه با پرایمرهای اختصاصی رفت RBD و برگشت c-CPE در Colony PCR استفاده گردید که باندی مشاهده نگردید.



تصویر ۵. تایید پلاسمید حاوی سازه R-C با هضم آنزیمی. آنزیم‌های *XhoI* و *BamHI* جهت هضم آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند و قطعات حاصل بر روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده گردید. دو قطعه ۳۱۰۰ جفت‌باز و ۱۵۲۸ جفت‌باز حاصل از این هضم آنزیمی تایید‌کننده صحت کلونینگ بود.

مراحل بیان و تغلیظ پروتئین و متعاقبا وسترن‌بلات با آنتی‌بادی اختصاصی علیه برچسب (TAG) هیستیدین انجام گردید و در نهایت حضور باند پروتئین هدف با استفاده از کیت ECL مورد تایید قرارگرفت (تصویر ۶).



تصویر ۶. تایید بیان ژن فیوژن در سوپرناتانت مخمر X۳۳ . ردیف ۱ پروتئین GFP به‌عنوان کنترل مثبت می‌باشد. اندازه ۲۷ کیلودالتون. ردیف ۲ پروتئین RBD به عنوان کنترل مثبت دوم با اندازه ۲۴ کیلودالتون، ردیف ۳ کنترل منفی، ردیف ۴ و۵ پروتئین نوترکیب RBD متصل به c-CPE استخراج شده با وزن مولکولی تقریبی ۴۲ کیلودالتون می‌باشد.

۵. بحث

در این تحقیق حاضر پس از ساخت سازه بیانی RBD-c-CPE با استفاده از PCR همپوشان، از وکتور مخمری pPICZαA برای کلونینگ این ژن فیوژن استفاده گردید. ترانسفورماسیون باکتری TOP10F´ با پلاسمید نوترکیب انجام شد و استخراج پلاسمید و ترانسفورماسیون مخمر X33 با پلاسمیدهای نوترکیب خطی شده انجام گردید. پس از طی مراحل کشت، بیان سازه ساخته شده طی مراحلی در پیکیاپاستوریس انجام شد و در نهایت سوپرناتانت محیط کشت مخمری جمع‌آوری و بعد از تغلیظ پروتئین بر روی آن وسترن‌بلات و ECL جهت تایید ترشح پروتئین در محیط کشت مخمر انجام گرفت.

محققان برای تولید یک پروتئین نوترکیب تحریک‌کننده سیستم ایمنی بدن، دومین RBD را در حالت‌های مختلف از جمله در حالت متصل به یک His-tag، یک پروتئین GST یا یک قطعه Fc در چندین پلت فرم بیانی مختلف شامل باکتری *E. coli* (۱۳)، سلول‌های حشرات (۱۴)، سلول‌های پستانداران (۱۵)، گیاهان (۱۶) و مخمر پیکیاپاستوریس (۱۷) تولید کردند که همگی توانستند در مدل‌های حیوانی مختلف سیستم ایمنی را به خوبی تحریک و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده تولید کنند. در حال حاضر واکسن‌های بر پایه RBD چندتایی درمرحله توسعه کلینیکی هستند و تعدادی از آن‌ها تاثیرات کلینیکی مطلوبی علیه بیماری SARS-CoV-2 از خود نشان داده‌اند (۱۸). به همین دلیل ما نیز در این مطالعه از ناحیه RBD پروتئین اسپایک ویروس به‌عنوان جزو آنتی‌ژنیک کاندید واکسن خود استفاده کردیم.

تاکنون واکسن‌های مختلفی برای کنترل بیماری SARS-CoV-2 پیشنهاد شده است که در این میان می‌توان به واکسن‌های بر پایه اسیدنوکلئیک، واکسن‌های زیرواحدی، واکسن‌های بر پایه وکتور آدنوویروسی، واکسن‌های ذرهای شبه ویروس، واکسن‌های زنده تخفیف حدت‌یافته و واکسن‌های غیرفعال اشاره کرد (۱۹) از مزایای واکسن‌های زیرواحدی می‌توان بی‌خطر بودن برای استفاده در افراد دچار نقص ایمنی، عدم امکان ایجاد حالت بیماری به دلیل نداشتن جز پاتوژنیک و نیز عوارض جانبی کمتر اشاره کرد (۲۰). دومین RBD پروتئین S1 ویروس SARS-CoV-2 مسئول اتصال به رسپتور ACE2 و آغاز فرایند اتصال و ورود ویروس به سلول است و به‌عنوان یک کاندید واکسن مناسب ثابت شده است (۲۱).

امروزه تولید پروتئین‌های نوترکیب از طریق مهندسی زیستی در سیستم‌های بیان مخمری مانند پیکیاپاستوریس به طور قابل‌توجهی گسترش یافته‌است. تحقیقات نشان می‌دهد که پیکیاپاستوریس می‌تواند تا ۳۰-۲۰ گرم بر لیتر پروتئین نوترکیب تولید کند (۲۲). پیکیاپاستوریس میکروارگانیسمی تک سلولی است که به آسانی دستکاری‌شده و کشت داده می‌شود. این میکروارگانیسم یک یوکاریوت است و بسیاری از مزایای سیستم‌های بیان یوکاریوتی مانند پردازش پروتئین، فولدینگ پروتئین، تشکیل باند دی‌سولفیدی، گلیکوزیلاسیون و سایر تغییرات پس از ترجمه‌ای را دارا می‌باشد، این در حالی‌است که مانند سیستم بیانی باکتریایی به‌سادگی قابل دستورزی و قابل‌کشت است. به‌طور کلی پیکیاپاستوریس یک انتخاب ارجح در بیان پروتئین‌هایی است که به دلیل ضعف در سیستم فولدینگ قادر به بیان در اشریشیاکولی نیستند (۲۳). تعداد زیادی از پروتئین‌ها که در سیستم‌های باکتریایی به صورت پروتئین‌های غیرفعال هستند، می‌توانند در پیکیاپاستوریس به صورت مولکول فعال بیولوژیکی تولید شوند. سیستم پیکیاپاستوریس سریع‌تر، آسان‌تر و با هزینه کمتری نسبت به سایر سیستم‌های بیانی دیگر مشتق‌شده از یوکاریوت‌های پیشرفته از جمله سلول‌های کشت سلولی پستانداران و حشرات، مورد استفاده قرار می‌گیرد و معمولا دارای سطح بیان بالاتری هم می‌باشد (۲۴). وجود تکنیک‌های ژنتیکی قدرتمند در دسترس به همراه اقتصادی بودن، پیکیاپاستوریس را به سیستمی بسیار مفید و موثر با پتانسیل صنعتی‌شدن بالا در تولید پروتئین‌های نوترکیب

تبدیل کرده‌است. در یک مطالعه تفاوت‌های بین بیان دومین RBD در مخمر پیکیاپاستوریس و لاین سلولی پستانداری HEK-293T بررسی شد و اثبات شد که علاوه بر تا خوردگی مناسب پروتئین تولید شده در هر دو سیستم مخمری و پستانداری، این دومین‌ها توانستند ایمنی‌زایی مناسبی در موش‌ها ایجاد کنند. علاوه بر این آنتی‌بادی‌های تولید شده در موش پس از تزریق RBD حاصل از پیکیاپاستوریس این توانایی را داشتند که با آنتی‌ژن RBD که توسط HEK-293T بیان شده بود نیز واکنش دهند (۲۵). Hou و همکارانش نیز در سال ۲۰۲۲ کاندید واکسنی برای بیماری SARS-CoV-2 معرفی کردند که اساس آن یک قطعه RBD از ویروس SARS-CoV-2 بودکه RBD5m نامیده شد و شامل ۵ موتاسیون شایع در ناحیه RBD در واریانت‌های مختلف SARS-CoV-2 بود که توانست علیه بسیاری از واریانت‌های SARS-CoV-2 حفاظت خوبی ایجاد کند (۲۶).

از جمله مطالعاتی که منجر به انتخاب RBD به‌عنوان پایه کاندید واکسن مناسب گردید می‌توان به مطالعه‌ای که توسط Chen و همکارانش در سال ۲۰۲۱ انجام گردید، اشاره کرد که آن‌ها پس از تولید یک واکسن بر پایه دومین متصل‌شونده به رسپتور کروناویروس نوع ۲ نوترکیب به نام (RBD203-N1) در مخمر X33 نشان دادند که این ساختار جدید موجب افزایش بیان پروتئین بدون تغییر در خصوصیات بیوفیزیکی، بیوشیمیایی، عملکردی و ایمنی‌زایی پروتئین می‌گردد (۲۷).

علاوه بر این Gattinger و همکارانش نیز در سال ۲۰۲۲ فیوژن پروتئینی متشکل از دو دومین RBD ویروس SARS-CoV-2متصل به نواحی انتهایی آمینی و کربوکسیلی آنتی‌ژن PreS مشتق‌شده از ویروس هپاتیت B ساختند که توانست موجب ایجاد پاسخ‌های ایمنی اختصاصی قوی و بادوام (به دلیل تولید IgG4) علیه RBD در خرگوش شود(۲۸) .

Limonta-Fernández و همکارانش نیز در سال ۲۰۲۲ یک فیوژن پروتئینی به نام C-RBD-H6 PP متشکل از یک دومین RBD مرکزی کروی با توالی‌های لینکر قابل‌انعطاف و قطبی غنی از گلیسین و سرین در انتهای N و C ساختند و در مخمر پیکیاپاستوریس بیان کردند و نشان دادند تزریق این RBD نوترکیب همراه با ادجوانت آلوم سطوح بالایی از آنتی‌بادی‌های اتصالی در موش و پریمات‌های غیرانسانی تولید می‌کند که می‌تواند موجب مهار عفونت لاین سلولی VeroE6 توسط ویروس SARS-CoV-2 از طریق مهار اتصال ویروس به ACE2 گردد (۲۹).

تاکنون استراتژی‌های مختلفی برای افزایش جذب داروها و مواد مختلف از طریق اتصالات محکم توسعه داده شده‌اند، برای مثال اسیدهای چرب مانند CD10، دهنده‌های نیتریک اکساید و شلاته‌کننده‌های یونی برای باز کردن اتصالات محکم و عبور مواد از طریق تاثیر بر اتصالات محکم استفاده شده‌اند (۳۰).

این رویکردها موجب شد اتصالات محکم به‌ویژه یکی از پروتئین‌های اصلی آن‌ها به نام کلودین‌ها به‌عنوان اهدافی برای روش‌های درمانی متعدد پیشنهاد شوند (۳۱, ۳۲).

ثابت شده است که ارائه یک آنتی‌ژن مناسب با یک ادجوانت متناسب به Nasal-associated Lymphoid tissue (NALT) می‌تواند موجب ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال مناسب شود (۳۳). بنابراین انتقال کارآمد آنتی‌ژن به درون NALT یکی از استراتژی‌هایی است که در مورد واکسیناسیون موکوزال موردنظر می‌باشد. کلودین ۴ یا CL-4 به میزان زیادی در Gut-associated Lymphoid Tissues (GALT) و NALT بیان می‌شود (۳۴).

از مزایای ایمن‌سازی از طریق بینی نسبت به سایر روش‌های ایمن‌سازی می‌توان به تحریک ایمن‌سازی موضعی علاوه بر ایمن‌سازی سیستمیک و عدم نیاز به یک محصول استریل یا یک فن دوزینگ استریل (یک مزیت مهم در کشورهای درحال‌توسعه) عدم نیاز به یک فرد مهارت دیده برای استفاده از واکسن اشاره کرد. از واکسن‌های درون‌بینی می‌توان به FluMist® اشاره کرد که یک ویروس آنفولانزا زنده آداپته شده با سرما است (۳۵). در مورد عفونت‌هایی که دستگاه تنفسی را درگیر می‌کنند مانند بیماری SARS-CoV-2 ، علاوه بر لزوم ایجاد ایمنی سیستمیک توسط واکسن، سطح مناسب آنتی‌بادی موضعی در سیستم تنفسی برای مقابله با ورود ویروس نیز می‌تواند در کاهش عفونت‌زایی ویروس موثر باشد. مشکلی که در استفاده از واکسن‌های زیرواحدی پروتئینی تولید شده از طریق مخاطات از جمله مخاط بینی وجود دارد، سختی عبور آن‌ها از دیواره مخاطات می‌باشد. در نتیجه استفاده از آنتی‌ژن پروتئینی در حالت متصل به c-CPE می‌تواند راهکاری برای افزایش پاسخ‌دهی دستگاه ایمنی به آنتی‌ژن موردنظر باشد. از جمله مطالعاتی که منجر به انتخاب c-CPE به‌عنوان تسهیل‌کننده عبور پروتئین از غشا و افزایش ایمنی گردید مطالعه‌ای بود که توسط Kakutani و همکارانش در سال ۲۰۱۲ انجام شد. آن‌ها پس از تولید اووآلبومین متصل شده به c-CPE، آن را از طریق بینی تزریق کردند و نشان دادند که تولید IgG سرمی و نیز IgA بینی، واژینال و مدفوع، اووآلبومین افزایش یافته است در حالی که مخلوط آلبومین و c-CPE پتانسیل تحریک ایمنی را نداشتند (۳۴).

در مطالعه‌ی دیگری نیز Suzuki و همکارانش در سال ۲۰۱۵ یک فیوژن پروتئین (PspA-C-CPE) متشکل از پروتئین سطحی پنوموکوک A تولید کردند. پس از ایمن‌سازی

موش‌ها از طریق بینی با این فیوژن پروتئین تولید IgG اختصاصی در سرم و نیز IgA و IgG اختصاصی در مایع لاواژ برونکوآلوئولار افزایش یافت و موجب ایجاد ایمنی محافظتی علیه عفونت پنوموکوک در موش‌ها شد. این یافته‌ها نشان دادندکه c-CPE می‌تواند به‌عنوان یک حامل آنتی‌ژن موثر در واکسن‌های آئروسول تنفسی جهت حفاظت علیه عفونت پنوموکوکی می‌باشد (۳۶).

باقرپور و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۸ دو نوع مخمر ساکارومایسس بولاردی مهندسی‌شده بیان‌کننده اووآلبومین به تنهایی و در حالت متصل به دومین c-CPE تولید کردند و نشان دادند خوراندن این مخمرها به دو گروه از موش‌ها از طریق خوراکی منجر به افزایش قابل توجه پاسخ ایمنی هومورال و موضعی نسبت به گروه کنترل گردید (۱۲).

صعود و همکارانش در سال ۲۰۲۱ یک فیوژن پروتئین C-CPE-TcpA-CtxB حاوی عامل حدت باکتری ویبریو کلرا تولید کردند و نشان دادند این پروتئین فیوژن توانست در موش‌ها موجب تولید بالاترین سطوح IgA روده ای، IgG سرمی و سایتوکاین‌های IL-5 و IFN-γ در مقایسه با زمانی شود که هر کدام از این پروتئین‌ها به تنهایی برای تحریک سیستم ایمنی مورد استفاده قرار گرفتند (۳۷).

بر اساس همین شواهد و مستندات موجود سازه بیانی RBD در حالت متصل به c-CPE جهت بیان در میزبان مخمری طراحی و ساخته شد تا در مراحل بعد به‌عنوان یک کاندید واکسن مخاطی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین برای اتصال بین دو سکانس RBD و c-CPE از لینکر (G4S)3 استفاده شد. وجود اسیدآمینه‌های کوچک و غیرقطبی (گلیسین) یا قطبی (سرین) در این لینکر منجر به انعطاف‌پذیری بالا شده و امکان تحرک دومین‌های عملکردی متصل‌به‌هم را فراهم می‌آورد (۳۸). در خصوص ایمنی در کاربرد بالینی واکسنی که قرار است کلودین ۴ را مورد هدف قرار بدهد مطالعه‌ای توسط Suzuki و همکارانش بعد از کاربرد پروتئین نوترکیب OVA-C-CPE در موش از طریق بینی انجام شد که نشان داده شد علاوه بر مشاهده پاسخ‌های TH1 وTH2 مناسب، هیچ‌گونه آسیب بافت‌شناسی به مخاط حفره بینی یا Nasal passage مشاهده نگردید که در نتیجه می‌توان هدف قرار دادن کلودین ۴ با استفاده از c-CPE را به‌عنوان یک استراتژی قوی برای واکسیناسیون مخاطی معرفی کرد (۳۹).

در انتها می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین‌ها و پپتیدهای دارویی نفوذپذیری کمی هنگام استفاده آن‌ها به صورت خوراکی یا اینترنازال از طریق اپیتلیال دارند. در همین راستا می‌تواند تحقیقاتی از جمله این تحقیق در جهت پیدا کردن راهکارهایی جهت افزایش جذب مواد از طریق مخاطات طراحی و انجام پذیرد. همچنین پیشنهاد می‌شود تا از مخمرهای پروبیوتیکی خوراکی که توانایی بیان پروتئین‌های پیچیده به صورت ترشحی را دارند در بیان این نوع آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا جهت کاهش هزینه در قسمت تغلیظ و تخلیص پروتئین و همچنین وسیله‌ای برای انتقال آنتی‌ژن از مسیر خوراکی استفاده گردد.

مشارکت نویسندگان:

ا. ب.: جمع‌آوری داده‌ها، نگارش نسخه اول مقاله؛ ق. ب.: مسئول ایده و طراحی، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز و تفسیر نتایج و آماده نمودن مقاله؛ ک. ن. ، س. ک. و ب. ج.: آنالیز و تفسیر نتایج و ویرایش مقاله؛ همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

تضاد منافع:

نویسندگان اظهار داشتند که فاقد هرگونه تضاد منافع هستند.

کد اخلاق:

IR.ZUMS.REC.1400.070.

حمایت مالی /معنوی:

این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی زنجان حمایت شده است.

References

1. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. 2020;579(7798):270-3. [PubMed ID:32015507]. [PubMed Central ID:PMC7095418]. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7.
2. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. Science. 2020;367(6485):1444-8. [PubMed ID:32132184]. [PubMed Central ID:PMC7164635]. https://doi.org/10.1126/science.abb2762.
3. Peng Y, Du N, Lei Y, Dorje S, Qi J, Luo T, et al. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. EMBO J. 2020;39(20):e105938. [PubMed ID:32914439]. [PubMed Central ID:PMC7560215]. https://doi.org/10.15252/embj.2020105938.
4. Mandala VS, McKay MJ, Shcherbakov AA, Dregni AJ, Kolocouris A, Hong M. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. Nat Struct Mol Biol. 2020;27(12):1202-8. [PubMed ID:33177698]. [PubMed Central ID:PMC7718435]. https://doi.org/10.1038/s41594-020-00536-8.

5. Siu YL, Teoh KT, Lo J, Chan CM, Kien F, Escriou N, et al. The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. J Virol. 2008;82(22):11318-30. [PubMed ID:18753196]. [PubMed Central ID:PMC2573274]. https://doi.org/10.1128/JVI.01052-08.
6. Huang WC, Zhou S, He X, Chiem K, Mabrouk MT, Nissly RH, et al. SARS-CoV-2 RBD Neutralizing Antibody Induction is Enhanced by Particulate Vaccination. Adv Mater. 2020;32(50):e2005637. [PubMed ID:33111375]. [PubMed Central ID:PMC7645956]. https://doi.org/10.1002/adma.202005637.
7. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. Nature. 2020;581(7807):215-20. [PubMed ID:32225176]. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5.
8. Wang X, Tu W. A promising vaccine candidate against COVID-19. Mol Biomed. 2020;1(1):8. [PubMed ID:34765993]. [PubMed Central ID:PMC7525074]. https://doi.org/10.1186/s43556-020-00008-x.
9. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. Cancer Res. 2005;65(21):9603-6. [PubMed ID:16266975]. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2782.
10. Robertson SL, Smedley JG, 3rd, Singh U, Chakrabarti G, Van Itallie CM, Anderson JM, et al. Compositional and stoichiometric analysis of Clostridium perfringens enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. Cell Microbiol. 2007;9(11):2734-55. [PubMed ID:17587331]. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00994.x.
11. Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin. J Cell Biol. 1997;136(6):1239-47. [PubMed ID:9087440]. [PubMed Central ID:PMC2132509]. https://doi.org/10.1083/jcb.136.6.1239.
12. Bagherpour G, Ghasemi H, Zand B, Zarei N, Roohvand F, Ardakani EM, et al. Oral Administration of Recombinant Saccharomyces boulardii Expressing Ovalbumin-CPE Fusion Protein Induces Antibody Response in Mice. Front Microbiol. 2018;9:723. [PubMed ID:29706942]. [PubMed Central ID:PMC5908956]. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00723.
13. Rahbar Z, Nazarian S, Dorostkar R, Sotoodehnejadnematalahi F, Amani J. Recombinant expression of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) in Escherichia coli and its immunogenicity in mice. Iran J Basic Med Sci. 2022;25(9):1110-6. [PubMed ID:36246069]. [PubMed Central ID:PMC9526882]. https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.65045.14333.
14. Choque-Guevara R, Poma-Acevedo A, Montesinos-Millan R, Rios-Matos D, Gutierrez-Manchay K, Montalvan-Avalos A, et al. Squalene in oil-based adjuvant improves the immunogenicity of SARS-CoV-2 RBD and confirms safety in animal models. PLoS One. 2022;17(8):e0269823. [PubMed ID:35998134]. [PubMed Central ID:PMC9397949]. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269823.
15. Merkuleva IA, Shcherbakov DN, Borgoyakova MB, Shanshin DV, Rudometov AP, Karpenko LI, et al. Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems. Vaccines (Basel). 2022;10(1). [PubMed ID:35062757]. [PubMed Central ID:PMC8779843]. https://doi.org/10.3390/vaccines10010096.
16. Khorattanakulchai N, Srisutthisamphan K, Shanmugaraj B, Manopwisedjaroen S, Rattanapisit K, Panapitakkul C, et al. A recombinant subunit vaccine candidate produced in plants elicits neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants in macaques. Front Plant Sci. 2022;13:901978. [PubMed ID:36247553]. [PubMed Central ID:PMC9555276]. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.901978.
17. Limonta-Fernandez M, Chinea-Santiago G, Martin-Dunn AM, Gonzalez-Roche D, Bequet-Romero M, Marquez-Perera G, et al. An engineered SARS-CoV-2 receptor-binding domain produced in Pichia pastoris as a candidate vaccine antigen. N Biotechnol. 2022;72:11-21. [PubMed ID:35953030]. [PubMed Central ID:PMC9359770]. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.08.002.
18. Yang S, Li Y, Dai L, Wang J, He P, Li C, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. Lancet Infect Dis. 2021;21(8):1107-19. [PubMed ID:33773111]. [PubMed Central ID:PMC7990482]. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00127-4.
19. Min L, Sun Q. Antibodies and Vaccines Target RBD of SARS-CoV-2. Front Mol Biosci. 2021;8:671633. [PubMed ID:33968996]. [PubMed Central ID:PMC8100443]. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671633.
20. Vartak A, Sucheck SJ. Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers. Vaccines (Basel). 2016;4(2). [PubMed ID:27104575]. [PubMed Central ID:PMC4931629]. https://doi.org/10.3390/vaccines4020012.
21. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez DR, Raut R, Markmann A, et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. Sci Immunol. 2020;5(48). [PubMed ID:32527802]. [PubMed Central ID:PMC7292505]. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc8413.
22. Morrow Jr KJ. Improving Protein Production Processes. 2007. Available from: https://www.genengnews.com/insights/improving-protein-production-processes/.
23. Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast Pichia pastoris. Mol Cell Biol. 1989;9(3):1316-23. [PubMed ID:2657390]. [PubMed Cen-

tral ID:PMC362724]. https://doi.org/10.1128/mcb.9.3.1316-1323.1989.
24. Higgins DR. Overview of protein expression in Pichia pastoris. Curr Protoc Protein Sci. 1995;Chapter 5:Unit5 7. [PubMed ID:18429188]. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0507s02.
25. Argentinian AntiCovid Consortium. Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in Pichia pastoris and mammalian cells. Sci Rep. 2020;10(1):21779. [PubMed ID:33311634]. [PubMed Central ID:PMC7732851]. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78711-6.
26. Hou XC, Xu HF, Liu Y, Sun P, Ding LW, Yue JJ, et al. A Vaccine with Multiple Receptor-Binding Domain Subunit Mutations Induces Broad-Spectrum Immune Response against SARS-CoV-2 Variants of Concern. Vaccines (Basel). 2022;10(10). [PubMed ID:36298518]. [PubMed Central ID:PMC9609383]. https://doi.org/10.3390/vaccines10101653.
27. Chen WH, Pollet J, Strych U, Lee J, Liu Z, Kundu RT, et al. Yeast-expressed recombinant SARS-CoV-2 receptor binding domain RBD203-N1 as a COVID-19 protein vaccine candidate. Protein Expr Purif. 2022;190:106003. [PubMed ID:34688919]. [PubMed Central ID:PMC8529586]. https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.106003.
28. Gattinger P, Kratzer B, Tulaeva I, Niespodziana K, Ohradanova-Repic A, Gebetsberger L, et al. Vaccine based on folded receptor binding domain-PreS fusion protein with potential to induce sterilizing immunity to SARS-CoV-2 variants. Allergy. 2022;77(8):2431-45. [PubMed ID:35357709]. [PubMed Central ID:PMC9111473]. https://doi.org/10.1111/all.15305.
29. Limonta-Fernández M, Chinea-Santiago G, Martín-Dunn AM, Gonzalez-Roche D, Bequet-Romero M, Marquez-Perera G, et al. An engineered SARS-CoV-2 receptor-binding domain produced in Pichia pastoris as a candidate vaccine antigen. New Biotechnol. 2021;72:11-21. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.08.002.
30. Lee NP, Cheng CY. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. Biol Reprod. 2004;70(2):267-76. [PubMed ID:14522829]. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021329.
31. Piontek A, Eichner M, Zwanziger D, Beier LS, Protze J, Walther W, et al. Targeting claudin-overexpressing thyroid and lung cancer by modified Clostridium perfringens enterotoxin. Mol Oncol. 2020;14(2):261-76. [PubMed ID:31825142]. [PubMed Central ID:PMC6998413]. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12615.
32. Pahle J, Kobelt D, Aumann J, Behrens D, Daberkow O, Mokritzkij M, et al. Effective Oncoleaking Treatment of Pancreatic Cancer by Claudin-Targeted Suicide Gene Therapy with Clostridium perfringens Enterotoxin (CPE). Cancers (Basel). 2021;13(17). [PubMed ID:34503203]. [PubMed Central ID:PMC8431234]. https://doi.org/10.3390/cancers13174393.
33. Zuercher AW, Coffin SE, Thurnheer MC, Fundova P, Cebra JJ. Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. J Immunol. 2002;168(4):1796-803. [PubMed ID:11823512]. https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1796.
34. Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, Yagi K. Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. Biomaterials. 2010;31(20):5463-71. [PubMed ID:20398936]. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.047.
35. Kemble G, Greenberg H. Novel generations of influenza vaccines. Vaccine. 2003;21(16):1789-95. [PubMed ID:12686096]. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00074-4.
36. Suzuki H, Watari A, Hashimoto E, Yonemitsu M, Kiyono H, Yagi K, et al. C-Terminal Clostridium perfringens Enterotoxin-Mediated Antigen Delivery for Nasal Pneumococcal Vaccine. PLoS One. 2015;10(5):e0126352. [PubMed ID:26018248]. [PubMed Central ID:PMC4446347]. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126352.
37. Souod N, Kargar M, Hoseini MH, Jafarinia M. Fusion-expressed CtxB-TcpA-C-CPE improves both systemic and mucosal humoral and T-cell responses against cholera in mice. Microb Pathog. 2021;157:104978. [PubMed ID:34022352]. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104978.
38. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(10):1357-69. [PubMed ID:23026637]. [PubMed Central ID:PMC3726540]. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039.
39. Suzuki H, Kakutani H, Kondoh M, Watari A, Yagi K. The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. Pharmazie. 2010;65(10):766-9. [PubMed ID:21105580].

KOOMESH
doi: 10.69107/koomesh-149316
Volume 26, Issue 2, March 2024

Research Article

Expression of Receptor Binding Domain (RBD) from Coronavirus Spike Protein Fused to Carboxylic Terminal of Clostridium perfringens Enterotoxin (c-CPE) in Pichia pastoris

Elham Behvandi [1], Ghasem Bagherpour [1,2*], Keyvan Nedaei [1], Saeid Kaboli [1], Behrooz Johari [2]

[1] *Department of Medical Biotechnology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran*
[2] *Zanjan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran*

**Corresponding Author:* Department of Medical Biotechnology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran. Email: g_bagherpour@zums.ac.ir; bagherpour.4631@gmail.com.

Received 25/11/2023; Accepted 13/05/2024

Abstract

Background: To enhance mucosal IgA, administering intra-nasal antigen transfer may be considered. One challenge with this approach is antigenic factors' limited penetration of nasal mucosa. This research utilized c-CPE, the carboxylic end-section of the enterotoxin Clostridium perfringens. Specifically, the RBD-c-CPE fusion structure was cloned in a bacterial host and integrated into the yeast host genome for protein expression.

Objectives: The primary aim of this investigation is to develop methods: Following the construction of the expression structure, it was then cloned into the yeast vector a coronavirus vaccine that can elicit sufficient immunity in the host.

Methods: Materials pPICZαA: Subsequently, the TOP10F bacterium was transformed with the recombinant plasmid, and plasmid extraction was carried out. This was followed by the transformation of yeast strain X33 with linearized recombinant plasmids. Positive clones obtained from the overnight sowing process were utilized for the expression stages. To confirm protein secretion in the yeast medium, the protein concentration, western blot, and ECL were performed.

Results: Agarose gel electrophoresis results indicated the successful construction of the RBD-c-CPE gene. Colony PCR analysis of both TOP10F bacteria and Pichia pastoris yeast post-transformation confirmed the effective cloning of the recombinant pPIC-RC plasmid in TOP10F bacteria and the successful integration of the recombinant plasmid into the yeast genome, respectively. Moreover, Western blot analysis provided conclusive evidence of the successful expression of the RBD-c-CPE fusion protein in Pichia pastoris yeast.

Conclusions: The RBD-c-CPE has been effectively integrated and produced within the yeast host genome following its cloning in a bacterial host. Further enhancing the fused protein's expression can serve as a potential candidate for preclinical trials on animals for a COVID19- mucosal vaccine.

Keywords: Recombinant Fusion Proteins, Cloning, Spike Protein, Pichia pastoris

Copyright © 2024, Behvandi et al. This open-access article is available under the Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY 4.0) International License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows for unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.