بررسی امکان کلونینگ قطعه آنتی‌ژنیک پیش‌گویی شده توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی آنزیم هیالورونیداز استرپتوکوکوس پایوژن

شبنم صدوق‌عباسیان[۱] (M.Sc)، صفیه صوفیان[۲] (Ph.D)، علی‌رضا ژاپونی‌نژاد[۱] (M.Sc)، حمید ابطحی [*۱] (Ph.D)
۱- مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک ، ایران
۲- *گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، واحد اراک*، اراک ، ایران

چکیده

سابقه و هدف: از مشکلات جدی در تولید آنزیم هیالورونیداز استرپتوکوکوس پایوژنز به صورت نوترکیب، وزن مولکولی بالای این پروتئین می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی جهت پیش‌بینی نواحی با بیش‌ترین خاصیت آنتی‌ژنیک در پروتئین هیالورونیداز، پیش‌گویی ساختار قطعه مورد نظر و ارزیابی کلونینگ آن در وکتور pTZ57R/T می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا جهت به‌دست آوردن توالی مورد توافق در تمامی توالی‌های آمینو اسیدی آنزیم هیالورونیداز، هم‌ترازی چندگانه با استفاده از نرم‌افزار MegAlign و روش Clustal W صورت پذیرفت. آنالیز BlASP صورت پذیرفت. نواحی آنتی‌ژنیک با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین ABCpred، BcePred و Emboss تعیین گردید. ساختمان سه بعدی نواحی آنتی‌ژنیک تعیین شده، با استفاده از نرم‌افزار TASERI پیش‌گویی شد و با استفاده از نرم‌افزار Swiss-PDB Viewer بررسی گردید. در نهایت قطعه پیش‌بینی شده در وکتور pTZ57R/T وارد گردید.

یافته‌ها: توالی مورد توافق به‌دست آمده دارای ۸۶۸ آمینو اسید بود که توالی امینو اسیدی ۲۷۹ تا ۷۷۳ به عنوان منطقه با آنتی‌ژنیک بالا به منظور کوتاه کردن توالی با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین انتخاب شد. در نهایت نتایج نشان داد که بخش‌های آنتی‌ژنیک ژن هیالورونیداز در وکتور pTZ57R/T کلون شده است.

نتیجه‌گیری: توالی مورد توافق به‌دست آمده دارای ۸۶۸ آمینو اسید بود که توالی امینو اسیدی ۲۷۹ تا ۷۷۳ به عنوان منطقه با آنتی‌ژنیک بالا به منظور کوتاه کردن توالی با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین انتخاب شد. در نهایت نتایج نشان داد که بخش‌های آنتی‌ژنیک ژن هیالورونیداز در وکتور pTZ57R/T کلون شده است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم هیالورونیداز، نواحی آنتی‌ژنیک، کلونینگ

مقدمه

استرپتوکوکوس پایوژنز یکی از مطرح‌ترین کوکسی‌های گرم مثبت- کاتالاز منفی می‌باشد. این باکتری بیماری‌های چرکی و غیر چرکی متنوعی از جمله فارنژیت، عفونت پوست و بافت نرم، باکتریمی، تب روماتیسمی و گلومرونفریت حاد را ایجاد می‌کند [۵،۱].

این باکتری انواع مختلفی از فاکتورهای ویرولانس را تولید می‌کند که در اتصال، گسترش، تخریب بافت، کاهش سیستم ایمنی و سمی شدن سلول می‌توانند نقش داشته باشند [۲]. یکی از دلایلی که این باکتری، گستره وسیعی از بیماری‌ها را به‌وجود می‌آورد توانایی تولید اگزوآنزیم‌های مختلف از جمله آنزیم‌های تخریبی مانند استرپتوکیناز، استرپتودورناز،

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۶۳-۴۱۷۳۵۰۲ Email: abtahi@arakmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۹

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

استرپتولیزین و هیالورونیداز می‌باشد [۶،۳]. یکی از فاکتورهای ویرولانس مهم در این باکتری، آنزیم هیالورونیداز است که از نظر فیزیولوژیک و پاتولوژیکی امروزه مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. هیالورونیداز به‌طور کلی به عنوان فاکتور انتشاردهنده برای ارگانیسم تولیدکننده در نظر گرفته می‌شود. هیالورویندار با دپلیمریزه کردن پلیمر هیالورونان (ماده زمینه‌ای بافت پیوندی) مشتقات قندی با وزن مولکولی کم‌تر را ایجاد کرده در نتیجه ویسکوزیته بافتی را کاهش می‌دهد [۴].

اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه آنتی‌ژن‌های استرپتوکوکی در تشخیص عفونت استرپتوکوک‌های گروه A بسیار اهمیت دارند. آنتی‌بادی تولید شده بر علیه هیالورونیداز ارزش تشخیصی دارد. این آنتی‌بادی چندین هفته بعد از آغاز عفونت استرپتوکوکی گسترش می‌یابد، بعد از فروکش کردن التهاب هم‌چنان باقی می‌ماند، و به طور اختصاصی هیالورونیداز استرپتوکوک‌های گروه A را خنثی می‌کند [۷].

علاوه بر تشخیص عفونت‌های استرپتوکوکی به وسیله آنتی‌بادی ضد این آنزیم، به دلیل ویژگی‌های عمل‌کردی بسیار زیاد هیالورونیداز، امروزه استفاده از آن در صنایع دارویی اهمیت زیادی پیدا کرده است. این آنزیم نفوذ واکسن‌ها و توکسین‌های تزریق شده به زیر پوست را تسهیل می‌کند [۸]. از لحاظ درمانی، این آنزیم هم‌راه با داروهای بی‌هوشی‌کننده موضعی و مسکن استفاده می‌شود، هم‌چنین در جراحی قرنیه جهت رساندن داروهای بی‌حس‌کننده به بافت مورد استفاده واقع می‌شود [۹]. بهره‌گیری از فعالیت انتشاردهنده‌ای این آنزیم در درمان سرطان نیز به کار رفته است به طوری‌که باعث نفوذ بیش‌تر داروهای ضد سرطان در بافت می‌گردد، هم‌چنین تومورهای مقاوم به شیمی‌درمانی را نسبت به درمان حساس‌تر می‌کند [۱۱،۱۰]. همه این ویژگی‌ها باعث شده که این پروتئین به عنوان یک کاندید برای تهیه داروهای نوترکیب باشد.

یکی از مشکلات جدی در جهت تولید این پروتئین به صورت نوترکیب وزن مولکولی بالای این پروتئین می‌باشد به طوری‌که در مطالعه صورت پذیرفته توسط مرادخانی و همکاران این موضوع به عنوان یکی از مشکلات اساسی در جهت تولید این پروتئین به صورت نوترکیب ذکر شده است که باعث شکسته شدن آن در حین تولید شده است [۱۲]. در نتیجه در این مطالعه برای برطرف کردن مشکل ذکر شده، با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی پیشگویی نواحی آنتی‌ژنیک، تنها نواحی آنتی‌ژنیک پروتیین جدا گردید و اندازه توالی ژن کدکننده از ۲۶۰۴ bp به ۱۴۸۲ bp کاهش یافت. این موضوع می‌تواند مشکل به وجود آمده در طی انجام مطالعات صورت پذیرفته قبل که در رابطه با سنگین بودن و در نتیجه خرد شدن پروتیین هیالورونیداز نوترکیب بود را بر طرف سازد و باعث کاهش وزن مولکولی پروتیین در زمان بیان گردد.

مواد و روش‌ها

پیشگویی مناطق آنتی‌ژنیک و استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی:

جهت پیشگویی مناطق آنتی‌ژنیک در آنزیم هیالورونیداز ابتدا توالی‌های پروتئینی مربوط به این آنزیم از بانک پروتیینی (NCBI-Protein) استخراج گردیدند، جهت به‌دست آوردن توالی مورد توافق در تمامی توالی‌های آمینواسیدی، هم ترازی چندگانه با استفاده از نرم‌افزار Megalign و روش Clustal W صورت پذیرفت. آنالیز BlastP جهت حصول اطمینان از ماهیت توالی مورد توافق صورت پذیرفت. سپس نواحی آنتی‌ژنیک در توالی مورد توافق به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین Emboss Antigenic به آدرس اینترنتی http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input و ABCpred به آدرس اینترنتی: http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html و Bcepred به آدرس اینترنتی: http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/bcepred_submission.html تعیین گردید [۱۹،۱۸]. مدل تعیین شده با استفاده از نرم‌افزار Swiss-pdb Viewer بررسی گردید.

انجام کلونینگ

جداسازی کروموزوم Streptococcus pyogenes . در این مطالعه از استرپتوکوکوس پایوژنز سویه۴۲۸۳(Mast) جهت استخراج کروموزوم استفاده گردید. استخراج کروموزوم

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

این سویه بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت [۱۴،۱۳].

بررسی کمی و کیفی DNA کروموزومی. به منظور بررسی کیفی محصول استخراج DNA از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد استفاده شد. برای تعیین مقدار (DNA کمی)، جذب نوری محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شد. غلظت DNA نمونه اصلی محاسبه گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) جهت حصول ژن hyaluronidase. DNA ژنومی حاصل به عنوان الگو برای تکثیر بخش‌های آنتی‌ژنیک ژن هیالورونیداز به وسیله آزمون PCRاستفاده گردید. پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی قطعه ژنی با استفاده از نرم‌افزار Gen Runner طراحی گردید و ویژگی‌های ترمودینامیکی و اختصاصیت آن‌ها جهت شناسایی ژن هیالورونیداز با استفاده از نرم‌افزارآنلاین primer-BLAST واقع در NCBI بررسی گردید. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و شرایط واکنش در جدول شماره ۱ شرح داده شده است.

واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام پذیرفت بدین ترتیب که ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر از DNA به عنوان الگو، ۲۵ میکرولیتر از Master mix 2XTaq (Vivantis) و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استفاده گردید. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد صورت پذیرفت. اندازه باند به‌دست آمده در مقایسه با مارکر ۳۰۰۰ bp (Fermentas) مورد بررسی قرار گرفت [۱۳].

آنالیز آنزیمی قطعات تکثیر شده. برای تایید قطعه DNA به‌دست آمده از واکنش PCR از آنالیز آنزیمی قطعه فوق از آنزیم XhoI استفاده گردید و نتیجه هضم قطعاتی به طول (۱۲۰۰ bp+۳۰۰bp) است. برای تایید درستی قطعه DNA به‌دست آمده از واکنش PCR آنالیز آنزیمی قطعه فوق به وسیله آنزیم XhoI صورت پذیرفت. جایگاه‌های آنزیمی با توجه به ترادف ژن تعیین گردید.

جدا کردن محصول PCR از روی ژل. احیای DNA از روی ژل آگارز تکنیکی بسیار حائز اهمیت در بیولوژی و مهندسی ژنتیک است. این تکنیک در کلونینگ و انتقال ژن استفاده می‌شود. برای انجام این روش از کیت تخلیص فراورده PCRشرکت رش (Rosch) طبق پروتکل موجود در Kit ، استفاده شد و محصول PCR ، استخراج و خالص‌سازی گردید. برای اطمینان از درستی واکنش محصولelution به همراه مارکر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد Run شد.

کلون کردن قطعات حاصل از تکثیر ژن هیالورونیداز. محصول PCR استخراج و خالص‌سازی شده توسط کیت InsT/A clone PCR product Cloning (Fermentas) و طبق پروتکل موجود در آن به درون وکتور (fermentas) pTZ57R/T کلون گردید. (Ligation Reaetion) وکتور به کار رفته جز گروه T/A وکتورها می‌باشد که در انتهای ´۳ خود دارای نوکلئوتید T اضافه می‌باشد که این ویژگی باعث می‌شود هنگامی که محصول PCR که به واسطه آنزیم پلی‌مراز مقاوم به حرارت در انتهای ´۳ آن نوکلئوتید A اضافه قرار گرفته در درون وکتور به واسطه آنزیم لیگاز قرار بگیرد و در نهایت یک پلاسمید حلقوی ایجاد می‌شود که می‌تواند در درون سلول‌های باکتری تکثیر شود. مخلوط واکنش جهت الحاق (Ligation) به مدت یک شب در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تهیه سلول‌های مستعد (Competent Cell) و انتقال DNA نوترکیب (Transformation) به میزبان E.coli.(DH5α). تهیه سلول‌های مستعد از باکتری اشرشیاکلی (Strain DH5α) به وسیله روش کلریدکلسیم صورت پذیرف [۱۳]. ناقل نوترکیب حاصل شده(pTZ-hylA) از طریق ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی، به میزبان کلونینگ مستعد شده وارد گردید. در نهایت برای جداسازی کلونی‌های آبی و سفید، از پلیت نوترین آگار حاوی آمپی‌سیلین، (Fermentas) IPTG و X-Gal (Fermentas) استفاده گردید. از سلول‌های مستعد تقویت شده بر روی محیط فوق کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد [۱۳].

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

انتخاب کلون (غربالگری آبی–سفید). انتخاب کلون بر اساس تشکیل کلونی‌های آبی و سفید صورت گرفت. کلون‌هایی که آبی رنگ باشند نوترکیب نیستند چون آنزیم بتاگالاکتوزیداز تولید شده، و x-gal را به محصول رنگی می‌شکند. در صورتی که کلونی‌های سفید نوترکیب هستند، زیرا با وارد شدن insert در cloning site، دیگر آنزیم بتاگالاکتوزیداز تولید نشده و باکتری قادر به استفاده از x-gal نیست لذا کلونی‌ها، سفید رنگ خواهند بود [۱۳]. نهایتاً چندین کلونی سفید و آبی که به صورت تصادفی از هر پلیت آگار انتخاب شده در محیط نوترین براث حاوی آمپی‌سیلین کشت داده و در دمای درجه سانتی‌گراد ۳۷ به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد.

تخلیص پلاسمید. عمل استخراج پلاسمید از کلونی‌های باکتریایی سفید و آبی طبق روش Mini prep صورت گرفت.

تایید کلونی‌های سفید نوترکیب صحیح. بعد از استخراج پلاسمیدها آزمایش‌های زیر برای تایید صحت کلونینگ بخش‌های آنتی‌ژنیک ژن هیالورونیداز به داخل وکتور pTZ57R/T انجام پذیرفت. میکرولیتراز پلاسمیدهای استخراج شده از هر کدام از کلونی‌های باکتریایی سفید (pTZ-hylA) و آبی (pTZ57R/T) بر روی ژل آگاروز ۰/۸درصد بارگزاری شده و الکتروفورز صورت پذیرفت. در نهایت باندهای پلاسمیدی ظاهر شده بر روی ژل آگاروز با هم مقایسه شد. علاوه بر مقایسه الگوی باندهای به‌دست آمده از استخراج پلاسمیدی کلونی‌های باکتریایی آبی و سفید، صحت کلونینگ با استفاده از الگوی هضم آنزیمی (BamH I و EcoR I)، آزمون PCR و توالی یابی مورد بررسی واقع شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی ۳۹ توالی‌های آمینواسیدی مربوط به آنزیم هیالورونیداز در NCBI با استفاده از نرم‌افزار Megalign نشان داد که تمامی توالی‌ها درصد بالایی از مشابهت و همسانی را دارا می‌باشند (۹۳/۳ درصد تا ۱۰۰ درصد) (تعدادی از توالی‌ها به دلیل جلوگیری از تکرارپذیری و مشابهت و نیز سنتزی بودن حذف گردیدند). توالی مورد توافق به‌دست آمده در شکل ۱ نشان داده شده است. مناطق آنتی‌ژنیک توالی پروتئینی ۸۶۸ آمینواسیدی ارائه شده در شکل ۲ با استفاده از سرورهای بیوانفورماتیکی تعیین شد. هر سه سرور نتایج یک‌دیگر را تائید کردند (شکل ۲). با بررسی نتایج، توالی آمینو اسیدی از ۲۷۹ تا ۷۷۳ به عنوان منطقه با آنتی‌ژنیک بالا به منظور کوتاه کردن توالی انتخاب شد و پس از تعیین ساختار، کلونینگ در مورد آن قسمت صورت پذیرفت. در این مطالعه قسمتی از توالی آمینواسیدی آنزیم هیالورونیداز که تجمع بخش‌های آنتی‌ژنیک در آن بیش‌تر بود انتخاب گردید، با توجه به این‌که هدف کوتاه کردن طول پروتئین با حفظ خواص آنتی‌ژنیک بود (سایز توالی ژنی از ۲۶۰۴ bp به ۱۴۸۲bp تقلیل یافت). پیش‌گویی ساختار پروتئینی نواحی آنتی‌ژنیک تعیین شده با استفاده از مشابهت (Identity 51) درصدی آن با پروتئین هیالورونیداز تعیین ساختارشده استرپتوکوکوس پنومونیا موجود در Protein Data Bank (PDB) با استفاده از همولوژی مدلینگ سرور TASER صورت پذیرفت و مدل تعیین شده با استفاده از نرم‌افزار Swiss-pdb Viewer بررسی گردید (شکل ۳).

نتایج کلونینگ

استخراج DNA به روش CTAB/NaCL انجام گرفت. DNA خالص شده از نظر کیفی وکمی مورد بررسی قرار گرفت. OD260 کروموزوم تخلیص شده (در غلظت یک پنجاهم) برابر ۰/۱ بود. با توجه به فرمول ارایه شده در زیر غلظت DNA محاسبه گردید:

غلظت DNA(µg/ml) = OD 260 nm × عکس رقت × 50

(µg/ml)= 0/1 × ۵۰ × ۵۰= ۲۵۰ (µg/ml)

نتیجه آنالیز کیفی DNA بر روی ژل آگارز نیز در شکل ۴ آمده است.

PCR قطعه ۱۴۸۲ bp مورد نظر با به کار بردن DNA استخراج شده از استرپتوکوکوس پایوژنز سویه۴۲۸۳ به عنوان الگو و به کار بردن پرایمرهای اختصاصی به وسیله آزمون PCR تکثیر یافت. درستی قطعه تکثیر یافته به وسیله الگوی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

هضم آنزیمی با آنزیم XhoI و ایجاد قطعات ۱۲۰۰bp و bp ۳۰۰ تایید شد (شکل ۵).

ساخت ناقل نوترکیب و انجام کلونینگ. با ایجاد کلنی‌های آبی و سفید بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک وارد شدن قطعه مورد نظر در وکتور pTZ57R/T، ایجاد پلاسمید نوترکیب (pTZ-hylA) و ترانسفورم شدن آن در سویه مستعد اشرشیاکلی DH5α مورد تایید اولیه واقع شد.

مقایسه باندهای پلاسمیدی استخراج شده از کلونی‌های باکتریایی سفید و آبی نشان داد که باندهای پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های سفید در مقایسه با باندهای استخراج شده از کلنی‌های آبی روی ژل آگاروز بالاتر هستند پس پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های سفید از پلاسمیدهای آبی سنگین‌تر هستند و می‌توان نتیجه گرفت که قطعه ژن مورد نظر در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است. (شکل ۶)

هم‌چنین نتایج حاصل از توالی‌یابی بخش‌های آنتی‌ژنیک ژن هیالورونیداز کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T و هم‌ردیفی آن دال بر صحت ترادف جدا شده بود. نتایج به‌دست آمده از هضم آنزیمی و PCR نشان می‌دهد که قطعه مورد نظر به‌درستی در ناقل پلاسمیدی کلون شده است. نتایج حاصل از برش‌های آنزیمی نشان داد که اگر پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌های کلنی سفید (pTZ- hylA) به وسیله آنزیم‌های (I BamH و I EcoR) بریده شوند، یک باند ۱۵۰۰جفت بازی به دست آمده و جدا می‌شود که همان ژن مورد نظر است. هم‌چنین باند دیگری نیز بریده و جدا می‌شود که همان پلاسمید pTZ57R/T می‌باشد، و واکنش PCR نیز باندی در راستای bp ۱۵۰۰ مارکر داد. بنابراین بخش‌های آنتی‌ژنیک ژن هیالورونیداز درون پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است (شکل۷).

بحث و نتیجه‌گیری

کاربردهای زیاد آنزیم هیالورونیداز در پزشکی، تشخیص بیماری و داروسازی باعث گشته که تولید این پروتئین به صورت نوترکیب مورد توجه باشد. هم‌چنین با توجه به این‌که تولید فرآورده های مختلف از جمله آنزیم‌ها از باکتری‌های بیماری‌زا با خطر انتقال و انتشار باکتری در محیط روبرو می‌باشد، امروزه برای تولید فرآوردههای باکتریایی بیش‌تر از روش‌های بیوتکنولوژی استفاده می‌گردد. آنزیم هیالورونیداز اولین بار در غشائ پلاسمایی اسپرماتوزوئید به عنوان فاکتور پخش‌کننده (Spreading Factor) عوامل ویروسی، توسط Reynol- Duran شناخته شد و با نام فاکتور Duran-Reynol معروف گشت [۱۵].

Meyer و همکاران هم‌چنین، اعلام داشتند که به واسطه فعالیت پنوموکوک‌ها ماده‌ای حاصل می‌گردد که توانایی کاهش ویسکوزیته بافتی را دارد. او نام این ماده را هیالورونیداز نامید چون قادر به تجزیه و تخریب هیالورونان بافت پیوندی است. این آنزیم به لحاظ فیزیکوشیمیایی با نام فاکتور Duran-Reynol مطابقت می‌کرد [۱۶]. در سال ۲۰۱۱ مرادخانی و همکارانش ژن هیالورونیداز خارج سلولی (hylA) استرپتوکوکوس پایوژنز را در باکتری E.coli کلون، بیان و سپس پروتئین تولید شده را تخلیص و آنتی‌ژنیسیته آن را بررسی کردند. پروتئین تولید شده بسیار سنگین بود. و دارای وزن حدود ۱۲۰ کیلو دالتون بود. سنگینی پروتئین سبب شد که پروتئین شکسته شود و در ژل SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ علاوه بر باند اصلی یعنی ۱۲۰ کیلو دالتون باندهای کوچک‌تر نیز مشاهده شد. در نتیجه تخلیص پروتئین با اشکال فراوان روبرو گردید که باعث شد آن‌ها نتوانند قطعه منحصربه‌فرد از آنزیم را در روی ژل به وسیله فرآیند تخلیص تهیه کنند [۱۲]. در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین بیوانفورماتیکی پیش‌گویی مناطق آنتی‌ژنیک پروتئین هیالورونیداز استرپتوکوکوس پایوژنز که در برگیرنده اپی‌توپ‌های مهم این پروتئین می‌باشد صورت پذیرفت. سپس ساختار پروتئینی قطعه پیش‌بینی شده تعیین و در نهایت بخش‌های آنتی‌ژنیک ژن HylA در وکتور pTZ57R/T کلون

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

گردید. نتایج به‌دست آمده از هر سه سرور به کار گرفته شده جهت پیش‌گویی مناطق آنتی‌ژنیکی (ABCpred، Bcepred و Emboss) یک‌دیگر را تائید کردند نتایج سرور Emboss ازاعتماد بیش‌تری برخوردار می‌باشد زیرا نحوه عمل‌کرد سرور EMBOSS به این صورت است که از متد کلاسکار و تونسانکار (Kolaskar and Tongaonkar) استفاده می‌کند. در این متد نیمه تجربی، از خواص فیزیکوشیمیایی اسید آمینه‌ها و فرکانس تکرار آن‌ها در قطعات اپی‌توپی ساختارهای پروتئینی شناخته شده استفاده می‌شود. کاربرد این متد برای تعداد زیادی از پروتئین‌ها نشان داده است که دقت این روش در حدود ۷۵ درصد می‌باشد که از بقیه روش‌ها بهتر است در ضمن این متد خیلی ساده است [۱۸،۱۷]. تعیین ساختار قطعه پیش‌بینی شده با استفاده از سرور TASER، نشان می‌دهد که ساختار سه بعدی این قطعه با وجود کوتاه شدن توالی؛ شباهت بالایی با پروتئین اصلی دارد و به نظر می‌رسد اکتیوسایت پروتئین و قسمت پیوندی آنزیم همان ساختار سه بعدی را حفظ کرده است. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که قطعه انتخاب شده باید خاصیت آنتی‌ژنیک را نشان دهد. هر چه کدون‌های توالی هدف به الگوی کدونی میزبان نزدیک‌تر باشد میزان بیان پروتئین نوترکیب بیش‌تر خواهد شد. استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی در این مطالعه باعث شد که اندازه توالی پروتئینی هیالورونیداز از ۸۶۸ آمینو اسید به ۴۹۴ آمینو اسید کاهش یافته، هم‌چنین توالی ژن کدکننده آن نیز از ۲۶۰۴ bp به ۱۴۸۲ bp کاهش یابد. این موضوع می‌تواند مشکل به وجود آمده در طی انجام مطالعات صورت پذیرفته قبل که در رابطه با سنگین بودن و در نتیجه خرد شدن پروتئین هیالورونیداز نوترکیب بود را برطرف سازد و باعث کاهش وزن مولکولی پروتئین در زمان بیان گردد. نتایج این مطالعه نشان داد که بخش‌های آنتی‌ژنیک ژن هیالورونیداز در داخل پلاسمید pTZ57R/T با موفقیت کلون شده است. هم‌چنین توصیه می‌شود که در مطالعات بعدی قطعه پیش‌بینی شده در این مطالعه در وکتور بیانی کلون گردد و تولید پروتئین حاصل از این قطعه و آنی ژنسیته بودن آن نیز مورد بررسی واقع شود.

استفاده از بانک‌های پروتئینی و اطلاعات موجود در آن‌ها جهت پیش‌بینی ساختار پروتئین‌های کریستالوگرافی نشده و نیز بهره‌گیری از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی جهت تعیین و پیش‌بینی اپی‌توپ‌های مهم و اصلی در آنتی‌ژن‌ها علاوه بر تسهیل کلونینگ به واسطه کوتاه‌تر شدن قطعه مورد نظر می‌تواند کمک شایانی را در جهت تولید پاسخ ایمنی مناسب به واسطه اختصاصی شدن پروتئین تولید شده نماید.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش همکاری کرده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

[1] Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology . McGraw Hill 2004; ISBN 0-8385-8529-9.

[2] Patterson MJ. Streptococcus. In: Baron's Medical Microbiology . Univ of Texas Medical Branch 1996; ISBN 0-9631172-1-1.

[3] Bisno AL, Brito MO, Collins CM. "Molecular basis of group A streptococcal virulence". Lancet Infect Dis 2003;3 (4): 191–200.

[4] Starr C, Engleberg N. "Role of Hyaluronidase in Subcutaneous Spread and Growth of Group A Streptococcus". Infect Immun 2006;74 (1): 40–8.

[5] Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clinical Microbiology Reviews, v.13, Jul 2000.

[6] Hynes W. Virulence factors of the group A streptococci and genes that regulate their expression, Front .Biosci, Sep 2004 ;1;9:3399-433.

[7] Brody, HJ.Use of hyaluronidase in the treatment of granulomatous hyaluronic acid reactions or unwanted hyaluronic acid misplacement. Dermatol Surg,2005 ;(8 Pt 1):893-7. Cite uses deprecated parameters (help)

[8] Scheithauer W, Temsch EM, Stefenelli T, Lathan B .In vitro evaluation of the anticancer drug modulatory effect of hyaluronidase in human gastrointestinal cell lines. Anticancer Res. 1988 ;8(3):3915.

[9] Hamada S, Devys JM, Xuan TH, Ganem S, Sahel JA, Héran F, Plaud B. Role of hyaluronidase in diplopia after peribulbar anesthesia for cataract surgery.Ophthalmology. 2005;112(5):879-82.

[10] Stern, R. Hyaluronidases in cancer biology. Semin Cancer Biol. 2008;18(4):275-80.

[11] Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Isoyama T, Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer: a tumor promoter and suppressor. Cancer Res. 2005 ; 1;65(17):7782-9.

[12] Moradkhani A,Abtahi H,Pakzad I,Karimi M.Antigenic characteristics of recombinant hyaluronidase A of Streptococcus pyogenes expressed in E. coli, Arak Medical University Journal 2011; 14(55): 72-80.

[13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

[14] Mahmoudi S, Abtahi H, Bahador H, Mosayebi H, Salmanian AH. Production of Recombinant Streptokinase in E.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

coli and Reactivity with Immunized Mice. Pak. J. Biol. Sci. 2010;13(8): 380-384.

[15] Duran-Reynals F. Conference Chairman: The Ground Substance of the Mesenchyme and Hyaluronidase. Ann N Y Acad Sci 2010; 52, 943, 1950.

[16] Meyer K, Hoffman P, Linker A. The Enzymes, 2nd Ed. Vol. 4. Academic Press, NY, 447, 1960 .

[17] Kolaskar AS and Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS Letters 1990; 276: 172-174.

[18] Parker JMR, Guo D and Hodges RS . Biochemistry 1986; 25: 5425-5432.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

Investigating the possibility of recombination the predicted antigenic fragment of *Streptococcus Pyogen hyaluronidase* by bioinformatics softwares

Shabnam Sadoogh Abbasian (M.Sc)[1], Safieh Soufian (Ph.D)[2], Ali Reza Japoni Nejad (M.Sc)[1] ,Hamid Abtahi (Ph.D)[*1]

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

2 – Dept. of Biology, Payame Noor University, Arak, Iran

(Received: 9 Feb 2015; Accepted: 29 Apr 2015)

Introduction: One of the main difficulties facing the production of recombinan Streptococcus pyrogenesisa hyaluronidase enzyme is its high molecular weight. The aim of this study was to predict the antigenic regions of hyaluronidase protein, the structure of fragment and evaluating the possibility of cloning the fragment in pTZ57R/T vector by the aid of bioinformatic's software.

Materials and Methods: Multiple hyaluronidase amino acid sequences were aligned, using Clustal W method and MegAlign software, followed by BLASTP analysis. Antigenic regions and important epitopes in consensus sequences were determined by using online softwares ABCpred, BcePred and Emboss. The tertiary structure of determined antigenic regions was predicted by using TASERI and specified model was evaluated by using Swiss-PDB Viewer Software. Finally, intended fragment was inserted in pTZ57R/T vector.

***Results*:** The consensus sequence had 868 amino acids, which the residues 279 to 773 were selected as prominent antigenic region in order to shorten the sequence by using online software. Finally, the result was shown as the proper recombination of antigenic region of hyaluronidase gene with pTZ57R/T.

Conclusion: The utilization of bio informatics tools to predict or determine the prominent antigenepitopic fragments, facilitated the recombinant process due to using the shorter fragments and generating more effective and specific immune response by the enzyme protein.

Keywords: Hyaluronidase enzyme, Antigenic regions, Cloning

* Corresponding author. Tel: +98 86 34173502

abtahi@arakmu.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]