دست‌کاری ژنتیکی باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس به منظور تولید پروتئین OMP10 بروسلا آبورتوس

مهسا کاظمی رودسری [۱](Ph.D)، عباس دوستی [۲*](Ph.D)، محمدسعید جامی [۱](Ph.D)

۱- گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ abbasdoosti@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۲۳

چکیده

هدف: در تمام گونه‌های باکتری بروسلا، توالی ژن Omp10 حفاظت شده است. خاصیت آنتی‌ژنیسیته بالای محصول این ژن می‌تواند باعث تحریک سیستم ایمنی میزبان شود. استفاده از باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان حامل زنده علاوه بر ایمن بودن، برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی مناسب است. OMP10 جزئی از لیپوپروتئین‌های سطحی در غشای خارجی بروسلا با خاصیت ایمنی‌زایی بسیار بالا است که در جذب مواد مغذی، انتقال سیگنال، چسبندگی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش اساسی دارد. این پروتئین دارای خواص آنتی‌ژنیک بوده و می‌تواند به صورت متصل با آنتی‌ژن‌های دیگر، دارای نقش کمکی باشد. لذا هدف از این تحقیق ایجاد باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس به منظور تولید پروتئین OMP10 بروسلا آبورتوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ژن Omp10 باکتری بروسلا آبورتوس همراه با سیگنال پپتید Usp45 به صورت سنتتیک در وکتور pNZ8148 کلون شد. وکتور نوترکیب ابتدا در باکتری اشریشیاکلی سویه‌ی TOP10 تکثیر و سپس توسط کیت استخراج پلاسمید خالص‌سازی شد. غلظت پلاسمید استخراج شده توسط نانودراپ سنجیده شد. pNZ8148-Usp45-Omp10 توسط روش الکتروپوریشن، به درون باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شد. تایید کلونینگ و بررسی بیان ژن Omp10 توسط تکنیک‌های RT-PCR، هضم آنزیمی و SDS-PAGE انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان‌دهنده بیان موفقیت‌آمیز ژن هدف Omp10 در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس بود و پروتئین نوترکیب به خوبی در این باکتری پروبیوتیک بیان شد.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان داد که پروتئین Omp10 در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده توسط الکتروپوریشن با وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 بیان می‌شود. لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده در مطالعه حاضر، می‌تواند در مطالعات آینده به عنوان واکسن زیر واحد خوراکی جهت پیشگیری از بروسلوز، مناسب باشد.

واژه‌های کلیدی: بروسلا آبورتوس، OMP10، لاکتوکوکوس لاکتیس، الکتروپوریشن، کلونینگ

مقدمه

بیماری بروسلوز یا تب مالت نوعی بیماری مشترک بین انسان و دام است که توسط باکتری بروسلا ایجاد می‌شود و سلامت عمومی را درگیر می‌کند. بروسلوز طیف وسیعی از پستانداران اهلی و وحشی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و می‌تواند سلامت انسان‌ها را نیز درگیر کند. این بیماری یک تهدید قابل توجه در ایمنی غذا بوده و باعث خسارات اقتصادی بالایی در بسیاری از کشورهای در حال توسعه در سراسر جهان می‌شود. علی‌رغم تلاش‌های قابل توجهی که برای کنترل بروسلوز انجام شده است، این بیماری هم‌چنان در بسیاری از مناطق مانند خاورمیانه در حال گسترش است و در ایران نیز بروز بالایی دارد [۱،۲].

بروسلوز در انسان یک بیماری مزمن و ناتوان‌کننده است که نیاز به درمان طولانی‌مدت و ترکیبی با آنتی‌بیوتیک دارد. این بیماری در ۱ تا ۵٪ مواقع کشنده بوده و ممکن است منجر به آسیب دائمی شود. از این‌رو نیازمند یک برنامه‌ی پیشگیری و کنترل سازمان‌یافته است [۱،۳].

انسان عمدتاً از طریق مصرف لبنیات غیر پاستوریزه، استنشاق ذرات آئروسل آلوده و تماس نزدیک با حیوانات آلوده به بروسلوز مبتلا می‌شود. بروسلوز معمولاً در حیوانات باعث سقط جنین شده در حالی‌که در انسان علائم متغیر و غیر

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

اختصاصی هم‌چون تب و لرز، بی‌حالی و درد مفاصل ایجاد می‌کند [۴]. عدم درمان باعث ایجاد عفونت‌های مزمن شده و با عوارض شدید سیستم عصبی، اسکلتی عضلانی و قلبی همراه است [۵].

بروسلا باکتری بیماری‌زای گرم منفی، کوکوباسیل، هوازی، درون سلولی اختیاری، غیر متحرک و فاقد اسپور است [۶]. جنس بروسلا بر اساس تنوع آنتی‌ژنی و میزبان اولیه آن به ۹ گونه تقسیم می‌شود. این گونه‌ها شامل بروسلا آبورتوس (Abortus) (در گاو)، بروسلا ملی‌تنسیس (Melitensis) (در گوسفند و بز)، بروسلا سوئیس (Suis) (در خوک)، بروسلا اویس (Ovis) (در گوسفند)، بروسلا کانیس (Canis) (در سگ)، بروسلا نئوتومه (Neotome) (در موش صحرایی)، بروسلا ستی (Ceti) (در سیتوس)، بروسلا پینی پدیالز (Pinnipedialis) (در فوک آبی) و بروسلا میکروتی (Microti) (در حشرات معمولی) می‌باشند. بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس عمده‌ترین گونه‌های عامل بروسلوز در انسان و دام هستند [۷].

کنترل بیماری بروسلوز در دام‌ها بر اصولی استوار است که این اصول شامل: نظارت بر واردات دام‌های کشتارگاهی، کشتن دام‌های آلوده، پاستوریزه کردن محصولات لبنی، واکسیناسیون دام‌ها و افزایش آگاهی عمومی می‌باشد [۸]. در این میان واکسیناسیون بهترین راه برای کنترل بیماری تب مالت است [۲]. در سراسر دنیا واکسن بروسلا آبورتوس (سویه‌های ۱۹، RB51، ۲۰/۴۵ و SR82) در کنترل بیماری تب مالت در حیوانات موثر بوده است [۲،۱۰]. برای مقابله با این بیماری در انسان هنوز واکسن موثر و تأیید شده‌ای وجود ندارد [۱۰]. بنابراین پیشگیری از بروسلوز در انسان، بر پایه‌ی واکسیناسیون دام‌ها استوار است و کنترل عفونت در دام‌ها می‌تواند به کاهش بروز این بیماری در انسان منجر شود [۱۱].

سطوح مخاطی اولین محل ورود عفونت برای اکثر بیماری‌های عفونی از جمله بروسلوز است، بنابراین استفاده از واکسن‌های خوراکی می‌تواند برای کنترل تب مالت در محل ورود پاتوژن سودمند باشد. واکسن‌های خوراکی پاسخ ایمنی سلولی و هومورال را در هر دو سطح سیستمیک و مخاطی تحریک کرده و موجب القاء ایمنی قوی‌تر و طولانی‌مدت می‌شوند [۱۲].

پروبیوتیک‌ها باکتری‌های مفید زنده‌ای هستند که از طریق آب و غذا وارد دستگاه گوارش شده و با برقراری تعادل میکروبی در داخل بدن، سلامتی را ارتقا می‌دهند. باکتری‌های پروبیوتیک، لیزوزیم‌ها، پروتئازها و پراکسیدهای هیدروژنی تولید می‌کنند و از رشد پاتوژن‌های مضر جلوگیری می‌نمایند [۱۳]. بیش‌ترین سویه‌های مورد استفاده در پروبیوتیک‌ها شامل باکتری‌های اسید لاکتیک، بیفیدوباکتری‌ها (Bifidobacteriales) و مخمر ساکارومایسس بولاردی (Boulardii) می‌باشد [۱۴].

پروبیوتیک‌های مهندسی شده، برای تولید پروتئین‌های درمانی و یا سایتوکاین‌ها در داخل بدن مورد استفاده قرار می‌گیرند و به عنوان وکتور برای جابه‌جایی داروها و واکسن‌ها بسیار مفید هستند. در واقع استفاده از داروهای زیستی (واکسن‌هایی مبتنی بر میکروارگانیسم‌های نوترکیب زنده) می‌تواند برای پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌ها موثر واقع شوند [۱۵]. در این میان جنس لاکتوکوکوس، گرم مثبت، غیراسپورزا، بی‌هوازی اختیاری، غیر متحرک و تولیدکننده‌ی لاکتیک اسید می‌باشد. این باکتری توسط تخمیر قند، لاکتیک اسید تولید می‌کند. در دستگاه گوارش کلونیزه نمی‌شود. به همین دلیل، پس از مصرف مخاطی و خوراکی عوارض جانبی کم‌تری را به همراه دارد [۱۶].

باکتری‌های اسید لاکتیک در ایجاد پاسخ‌های ایمنی سیستمیک و مخاطی قوی، بسیار توانا می‌باشند. همین ویژگی استفاده از این باکتری‌ها را در تحقیقات اخیر بسیار محبوب ساخته و از آن‌ها در بسیاری از آزمایشات ایمن‌سازی خوراکی استفاده می‌شود [۱۷].

در سال‌های اخیر ایمنی‌زایی با آنتی‌ژن‌های مختلفی از گونه‌های بروسلا مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. در این راستا شاخص‌های آنتی‌ژنیک دیواره‌ی سلولی بروسلا مثل پروتئین‌های غشاء خارجی یا OMPs (Outer Membrane Protein) مورد توجه هستند. OMPs جزء ترکیبات ساختاری باکتری‌ها هستند و به عنوان فاکتورهای بیماری‌زایی عمل کرده و پاسخ‌های ایمنی را القاء می‌کنند [۱۸].

OMP10 با جرم مولکولی ۱۰kDa (kilodalton)، جزئی از لیپوپروتئین‌های سطحی در غشای خارجی بروسلا است که دارای پیوند کوالانسی با اسیدهای چرب می‌باشد و در جذب مواد مغذی، انتقال سیگنال، چسبندگی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش اساسی دارد. این آنتی‌ژن‌ها در گونه‌های اصلی بروسلا و بیوارهای آن‌ها وجود دارد. بنابراین می‌توان به‌طور بالقوه از آن برای محافظت در برابر گونه‌های بروسلا در میزبان‌های مختلف، از جمله انسان و حیوان استفاده کرد [۲۰،۲۱].

لذا هدف از پژوهش حاضر ایجاد باکتری پروبیوتیک مهندسی شده‌ی لاکتوکوکوس‌لاکتیس تولیدکننده‌ی پروتئین OMP10 بروسلا آبورتوس می‌باشد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه‌ای و تجربیات آزمایشگاهی می‌باشد. لازم به ذکر است که تمام کارهای پژوهشی این مقاله با رعایت کامل اصول اخلاقی (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.1401.003) انجام گرفته است.

Omp10 در مطالعات متعدد به عنوان آنتی‌ژنی ایده‌آل با توانایی آنتی‌ژنیسیته بالا به عنوان کاندیدا جهت ساخت واکسن پروبیوتیک خوراکی نوترکیب علیه بروسلوزیس مطرح شده و ژن کدکننده‌ی این پروتئین در ساخت واکسن نوترکیب پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته است.

اطلاعات مربوط به توالی وکتور بیانی مبتنی بر نیسین pNZ8148 (Nisin)، از سایت www.addgene.org به‌دست آمد و توسط نرم‌افزار Gene Runner جایگاه برش آنزیم‌های محدودکننده مشخص شد. اندازه این وکتور طول ۳۱۶۷ جفت باز بوده و دارای یک مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاخص انتخاب‌گر و یک جایگاه برش چندگانه برای ورود ژن است. یک پروموتر وابسته به القا توسط نیسین بنام Pnisدر بالادست(Multiple Cloning Site) MCS و یک خاتمه‌گر در پایین‌دست آن وجود دارد. Omp10 همراه با یک توالی سیگنال پپتید ۳۱ آمینواسیدی به‌نام Usp45 با کد دسترسی ABY84357 انتخاب و سازواره نهایی طراحی شد. در نهایت سازواره‌ی نوترکیب، ژن Omp10 همراه با سیگنال پپتیدUsp45 به صورت سنتتیک در وکتور pNZ8148 توسط شرکت generay چین کلون شد. از جایگاه‌های برش KpnI- XbaI برای وارد کردن ژن Omp10 با کد دسترسی L27995.1 و تعداد ۳۸۱ نوکلئوتید به درون وکتور استفاده شد. در نهایت وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 با اندازه‌ی ۳۳۹۳ جفت باز ساخته شد (شکل ۱).

برای تایید صحت کلونینگ ژن Omp10 به درون وکتور pNZ8148 و ساخت وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10، از تکنیک‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یا PCR (Polymerase chain reaction)، هضم آنزیمی و توالی‌یابی (Sequencing) استفاده شد. PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت و سپس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. هضم آنزیمی و توالی‌یابی وکتور نوترکیب توسط شرکت generay چین با استفاده از آنزیم‌های برشی KpnI و XbaI انجام شده و نتایج دریافت شدند.

مشخصات پرایمرها. پرایمرهای مورد نیاز برای تایید و تکثیر ژن Omp10 از روی توالی ژن سنتتیک به کمک نرم‌افزارGene Runner version 6.5 طراحی شد و سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناژن صورت پذیرفت. از روش بلاست کردن برای تایید اتصال پرایمرها به توالی ژنی مربوطه استفاده شد. توالی پرایمرهای رفت و برگشت در جدول ۱ مشخص شده است.

جدول۱. مشخصات پرایمرها.

پرایمرها	توالی 5’- 3’	دمای اتصال پرایمر	طول محصول
Omp 10-F	5’-ATGGAAAGTATGGATATGAAAAG -3’	57 ºC	381 bp
Omp 10-R	5’-TTAACCAGCATTACGACGTGTT -3’	57 ºC	

ترانسفورماسیون اشریشیاکلی سویه TOP10 توسط pNZ8148-Usp45-Omp10. جهت تکثیر وکتور نوترکیبpNZ8148-Usp45-Omp10، ترانسفورماسیون باکتری اشریشیاکلی سویه‌ی TOP10 توسط وکتور نوترکیب، انجام شد. روش استاندارد کلسیم کلراید (CaCl2) کوهن و همکاران مورد استفاده قرار گرفت. باکتری اشریشیاکلی سویه‌ی TOP10 (مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران)، به عنوان میزبان کلونینگ برای تکثیر وکتور نوترکیبpNZ8148-Usp45-Omp10 در یک پلیت LB (Luria-Bertani) آگار (Merck، آلمان) فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷°C قرار گرفت. یک کلنی از کشت تازه‌ی اشریشیاکلی در محیط LB براث (Merck، آلمان) فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شد و به مدت ۵ ساعت در ۳۷°C در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. رشد باکتری‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Jenway، انگلستان) سنجیده شد. با افزودن رسوب باکتری به محلول کلسیم کلراید ۰/۱ مولار (Sigma، آلمان) در دمای در ۴°C سوسپانسیونی از باکتری‌های مستعد حاصل شد. میزان ۱۰ میکرولیتر وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 (غلظت ۰/۲ میکروگرم/میکرولیتر) به ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری‌های مستعد (Competent Cell) (OD600=۰/۳) افزوده شد. باکتری‌های مستعد دریافت‌کننده‌ی وکتور نوترکیب یک شوک حرارتی در ۴۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و بلافاصله یک شوک سرد در ۴°C به مدت ۴ دقیقه را دریافت کردند. با گذشت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

۶۰ دقیقه در دمای ۳۷°C، سوسپانسیون فوق روی محیط LBآگار که حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (CM) (Sigma، آلمان) با غلظت ۲۵ میلی‌گرم/میکرولیتر بود، کشت داده شد و ۱۸ساعت در در ۳۷°C قرار گرفت. باکتری‌هایی که وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 را دریافت کردند، به علت داشتن ژن مقاومت به کلرامفنیکل روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل رشد کرده و کلنی تشکیل دادند. تعدادی از کلنی‌های حاصل به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و برای غربالگری وکتورهای نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت خالص‌سازی وکتورها، از Plasmid Extraction Mini kit (FAVORGEN، تایوان) استفاده شد. تایید حضور وکتور توسط رنگ بارگذاری نمونه 6X (Loading Dye 6x) (Yekta Tajhiz، ایران) روی ژل آگارز به همراه مارکر ۱۰۰۰bp انجام گرفت. به منظور تعیین غلظت و خلوص وکتور نوترکیب استخراج شده از دستگاه نانودراپ (ThermoScientific، آمریکا) استفاده شد. پرایمرهای سنتز شده جهت تأیید صحت ترانسفورماسیون در سطح DNA به کمک تکنیک PCR مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش PCR به کمک دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل، یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه‌ی ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴°C، ۳۰ دوره‌ی ۴۵ ثانیه‌ای در دمای ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷°C، ۴۵ ثانیه در ۷۲°C و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و سپس به کمک دستگاه عکس‌برداری از ژل (UVI Tech، انگلستان) مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت.

تهیه و ترانسفورماسیون باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس:

برای ایجاد پروبیوتیک مهندسی شده، باکتری (L.lactis) Lactococcus Lactis subsp.Lactis به شماره‌ی (DSM۲۰۷۲۹) ۱۳۳۶، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران. پژوهشکده بیوتکنولوژی، مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران (PTCC) تهیه شد. بر روی محیط اختصاصی M17 آگار کشت داده شد و پس از تهیه‌ی سلول مستعد، به کمک روش الکتروپوریشن وکتور نوترکیب به درون باکتری لاکتوکوکوس‌لاکتیس ترانسفورم شد.

مستعدسازی لاکتوکوکوس لاکتیس جهت ترانسفورماسیون L.lactis با pNZ8148-Usp45-Omp10:

مستعد کردن باکتری‌های لاکتوکوکوس‌لاکتیس برای انجام الکتروپوریشن، توسط ۲ محلول انجام شد. محلول اول مربوط به مستعدسازی باکتری قبل از انجام الکتروپوریشن و محلول دوم مربوط به بعد از انجام الکتروپوریشن بود. محلول ۱ حاوی ۲۰۰ میلی‌مولار سوکروز، ۷۰ میلی‌مولار EDTA و ۳۰۰ میلی‌مولار گلایسین بود؛ که در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد؛ به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در نهایت توسط اتوکلاو استریل گردید. محلول ۲ حاوی ۷ میلی‌مولار لاکتوز، ۷ میلی‌مولار کلریدکلسیم و ۹۰ میلی‌مولار کلرید منیزیوم بود که در ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت M17 براث حل شد، به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در نهایت توسط فیلتر ۰/۲ استریل شد.

الکتروپوریشن لاکتوکوکوس لاکتیس با pNZ8148-Usp45-Omp10. جهت انجام ترانسفورماسیون رسوب باکتری طی دو مرحله با ۱۰۰۰ و ۷۰۰ میکرولیتر از محلول سرد و استریل شماره ۱ شست‌وشو داده شد. پس از هر بار شست‌وشو، رسوب‌گیری توسط سانتریفیوژ در ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت۴۰۰۰ rpm انجام شد. رسوب باکتری شست‌وشو داده شده در ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۱ حل شد. ۳۹۴ میکرولیتر (Optical Density of 600nm) (OD600 بین ۰/۲ – ۰/۳) از لاکتوکوکوس لاکتیس مستعد به کووت‌های ۰/۴ (Biorad، آمریکا) سرد و استریل مخصوص الکتروپوریشن منتقل شد. سپس به ترتیب مقدار ۶ میکرولیتر از وکتور بیانی مبتنی بر نیسین نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 و هم‌چنین ۶ میکرولیتر وکتور pNZ8148 فاقد ژن Omp10 (با غلظت ۰/۲ میکروگرم/میکرولیتر) به درون ۲ کووت مجزا که حاوی باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس مستعد بود اضافه شد و حجم نهایی کووت‌ها به ۴۰۰ میکرولیتر رسید. پس از قرار گرفتن کووت‌ها روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه، الکتروپوریشن توسط چهار پالس الکتریکی (ظرفیت ۲۵ میکروفاراد، ولتاژ ۳۰۰۰ ولت، مقاومت ۲۰۰ اهم و زمان ۴–۵ میکروثانیه، در کوت‌های ۰/۴ سانتی‌متری) توسط دستگاه Xcell BIO RAD Gene Pulser انجام شد. به عبارت دیگر، هم‌زمان با ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10، در کووت جداگانه‌ای لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتورpNZ8148 فاقد Omp10 نیز ترانسفورم شد. پس از الکتروپوریشن به هر دو کووت حاوی باکتری و وکتور نوترکیب و باکتری و وکتور فاقد ژن هدف، ۱ دقیقه شوک سرد وارد شد و سپس محتویات کووت‌ها به میکروتیوب استریل انتقال یافت. محتویات کووت‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۲ به مدت ۱/۵ ساعت در ۳۰°C درون انکوباتور نگه‌داری شد. در نهایت محلول به‌دست آمده بر روی محیط M17 آگار (Quelab، کانادا) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت ۲۵ میلی‌گرم/ میکرولیتر کشت داده شد و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

در انکوباتور با دمای ۳۰°C به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. (از کشت سوسپانسیون باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس الکتروپوریت شده بدون اضافه کردن وکتور، روی محیط کشت M17 آگار (Quelab، کانادا) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، به عنوان کنترل منفی استفاده شد).

استخراج RNA از لاکتوکوکوس لاکتیس جهت ردیابی Omp10

جهت استخراج RNA از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور pNZ8148-Usp45-Omp10 از YTzol (Yekta Tajhiz، ایران) استفاده شد. جهت ردیابی Omp10 در RNA استخراج شده، از واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای Omp10 استفاده شد. جهت القای بیان ژن Omp10 در وکتور نوترکیب Usp45-Omp10-pNZ8148، کشتی ۱۸ ساعته در محیط GM17 براث از لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب تهیه شد. با رسیدن رشد باکتری به OD_{600} =۰/۳، به منظور بیان ژن Omp10، باکتری با nisin ۱۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر به مدت ۳ ساعت القا شد. پس از سپری شدن ۳ ساعت، باکتری با شرایط ۴°C، در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب باکتری طی ۳ مرحله با PBS شست‌وشو داده شد. در نهایت رسوب باکتری در PBS حل گردید.

سپس تیمار حذف DNA توسط DNaseI (YektaTajhiz، ایران) انجام شد. تیمار حذف DNA به‌صورت زیر انجام پذیرفت:

- اضافه کردن ۰/۵ میکرولیتر DnaseI (۶ واحد/ میکرولیتر) و ۱ میکرولیتر بافر ۱۰ x DNaseI (YektaTajhiz، ایران) به ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده و سپس اضافه کردن ۳/۵ میکرولیتر DEPC Water (Atrmed، ایران).
- رساندن حجم نهایی به ۱۰ میکرولیتر و قرارگیری به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷°C.
- اضافه کردن ۱ میکرولیتر EDTA (EthyleneDiamineTetraAceticAcid) و قرارگیری به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵°C.
- سنتز cDNA توسط کیت سنتز cDNA (YektaTajhiz، ایران) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Omp10 و برنامه دمایی اشاره شده در متن.
- تأیید بیان ژن Omp10 در سطح RNA به‌وسیله تکنیک RT-PCR.

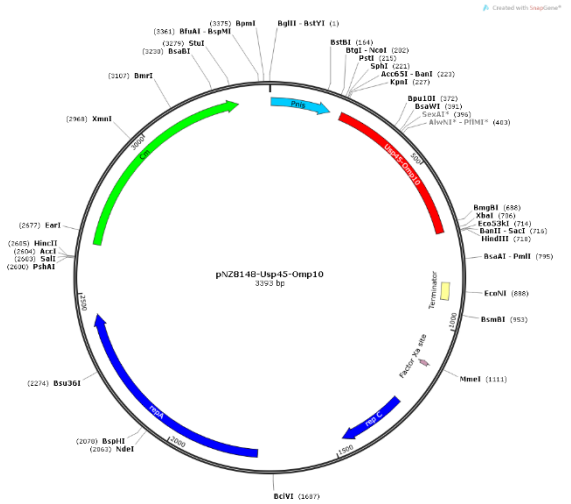
سنجش بیان ژن Omp10 در سطح پروتئین توسط SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

جهت بررسی تولید محصول ژن Omp10 کلون شده در وکتور بیانی مبتنی بر نیسین pNZ8148 در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس از تکنیک الکتروفورز روی ژل عمودی یا SDS-PAGE استفاده شد. به علت وجود سیگنال پپتید Usp45 در وکتور جهت ترشح باکتری، از رسوب و سوپرناتانت باکتری کشت شده در GM17- مایع (M17 broth+0.5% Glucose) و القا شده توسط نیسین به منظور بررسی وجود پروتئین استفاده شد. رسوب و سوپرناتانت باکتری به همراه بافر بارگذاری نمونه در ۱۰۰°C به مدت ۵-۱۰ دقیقه جوشانده شد. سوسپانسیون رسوب و سوپرناتانت حاصل به کمک سرنگ همیلتون به درون چاهک‌های ژل انتقال یافت. به داخل یکی از چاهک‌ها ۵ میکرولیتر نشانگر پروتئین (Cytomatingene، ایران) ریخته شد و سپس الکتروفورز عمودی با ولتاژ ۲۰۰ ولت به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. پس از الکتروفورز، ژل با Coomassie Brilliant Blue G250(Sigma، آلمان) مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت و نهایتاً از ژل عکس‌برداری شد.

ملاحظات اخلاقی. تمام اصول اخلاقی در این مقاله رعایت شده است (شناسه اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1401.003).

نتایج

نقشه ژنی وکتور نوترکیب. شکل شماتیک سازواره نهایی طراحی شده و جایگاه قرارگیری ژن Omp10 بصورت زیر می‌باشد:



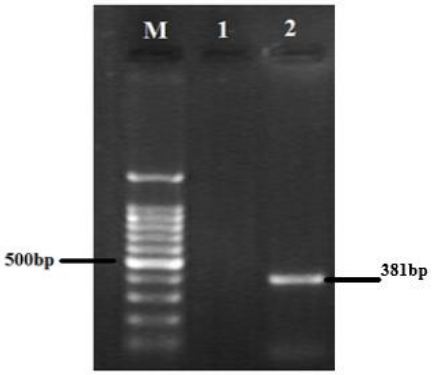
شکل ۱. نقشه‌ی ژنی وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- Omp10 با اندازه‌ی ۳۳۹۳ جفت باز. موقعیت ورود ژن Omp10 به همراه سیگنال پپتید Usp45 بین دو جایگاه برش KpnI و XbaI در پایین دست است و به رنگ قرمز در شکل شماتیک نشان داده شده است.

تایید صحت وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45- Omp10:

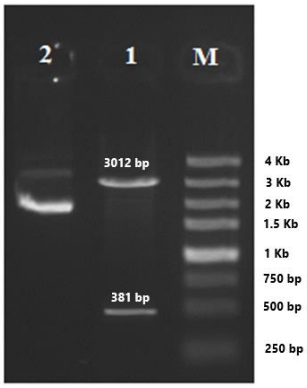
الف-PCR: نتیجه واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن Omp10، به منظور تایید حضور ژن Omp10 در وکتور pNZ8148 مشاهده یک باند bp381 روی ژل آگارز بود که تأییدی بر نوترکیب بودن وکتور pNZ8148 است (شکل۲).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

ب- هضم آنزیمی: صحت قرار گرفتن ژن Omp10 همراه با سیگنال پپتید Usp45 درون وکتور نوترکیب pNZ8148 توسط شرکت GENEray با استفاده از روش هضم آنزیمی دوگانه (با کمک آنزیم‌های محدودکننده XbaI و KpnI) و توالی‌یابی وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45- Omp10 مورد تایید قرار گرفت و نتیجه به‌صورت تصویر ژل و توالی مکمل معکوس ارسال شد (شکل۳).

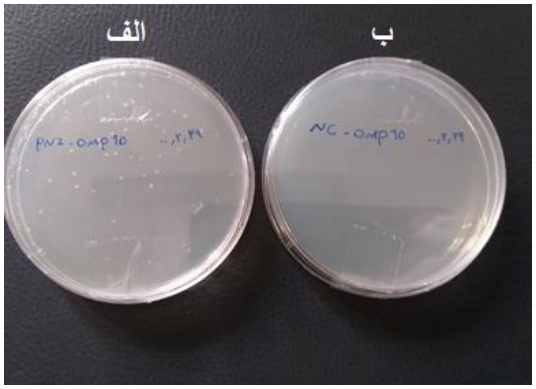


شکل۲. تکثیر ژن Omp10 به روش PCR. M: مارکر ۱۰۰جفت بازی. شماره 1: کنترل منفی. شماره 2: محصولات واکنش PCR مربوط به تکثیر ژن Omp10با باند ۳۸۱ جفت بازی



شکل ۳. هضم آنزیمی دوگانه. M: مارکر 1Kb (Geneaid Biotech Ltd، تایوان). ۱: هضم آنزیمی دوگانه که باند ۳۸۱bp ژن Omp10 را به همراه باند ۳۰۱۲bp مربوط به سیگنال پپتید Usp45 و وکتور pNZ8148 (۲۹۱۹ bp +۹۳bp) نشان می‌دهد. ۲: باندها به ترتیب از بالا به پایین Nicked circular form، Linear form و Circular supercoiled form مربوط به وکتور هستند.

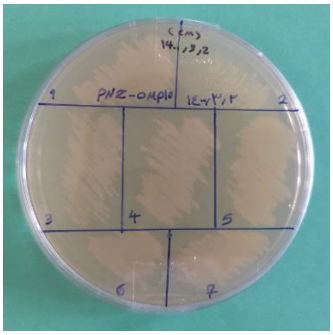
ترانسفورماسیون اشریشیاکلی توسط pNZ8148-Usp45- Omp10. انجام ترانسفورماسیون باکتری اشریشیاکلی سویه‌ی TOP10 توسط وکتور نوترکیب، با موفقیت انجام شد. باکتری‌های ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل غربالگری شدند (به علت وجود ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل در وکتور نوترکیب). از کشت باکتری‌های اشریشیاکلی سویه‌ی TOP10 ترانسفورم نشده و فاقد وکتور روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، به عنوان کنترل منفی استفاده شد؛ که عدم رشد این باکتری‌ها نشانگر عدم مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل می‌باشد (شکل۴).



شکل ۴. ترانسفورماسیون اشریشیا کلی سویه‌ی TOP10. الف: ترانسفورماسیون موفقیت آمیز باکتری E. coli با وکتور نوترکیب و رشد آن روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاخص انتخابی است. ب: کنترل منفی. عدم رشد باکتری ترانسفورم نشده روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک است.

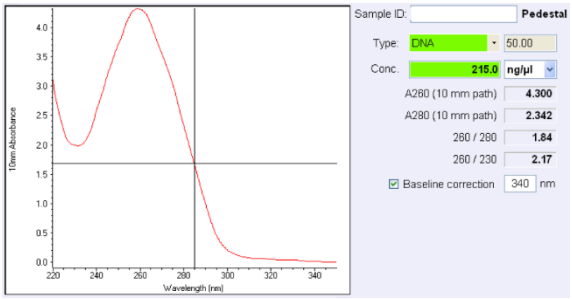
استخراج و خالص‌سازی pNZ8148-Usp45-Omp10 توسط کیت Favorgene. برای تکثیر وکتور نوترکیب، از کلنی‌های باکتری اشریشیاکلی ترانسفورم شده با pNZ8148-Usp45-Omp10 به صورت تصادفی ماتریکس تهیه شد (شکل۵).

اشریشیاکلی ترانسفورم شده، در محیط LB – براث حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت داده شد و سپس استخراج پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید (FAVORGEN، تایوان) انجام شد. غلظت وکتور نوترکیب استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ مورد خوانش قرار گرفت. تعیین غلظت پلاسمیدهای استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ بیانگر کیفیت و میزان مناسب پلاسمیدهای استخراج شده بود (شکل۶).



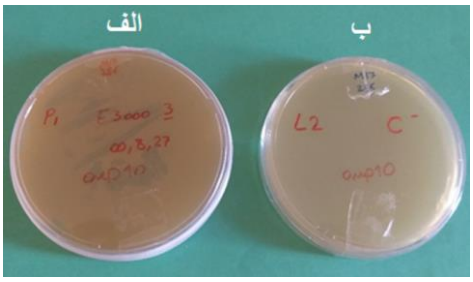
شکل ۵. ماتریکس تهیه شده از باکتری‌های اشریشیا کلی ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- Omp10.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



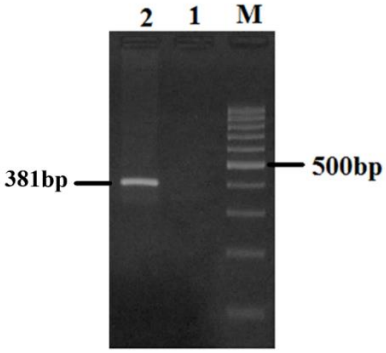
شکل۶- غلظت وکتور نوترکیب استخراج شده از اشریشیا کلی، ۲۱۵ نانوگرم/میکرولیتر و میزان خلوص آن ۱/۸۴ اندازه‌گیری شد.

ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس. ترانسفورماسیون باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس توسط وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 و وکتور pNZ8148 فاقد ژن Omp10 به کمک تکنیک الکتروپوریشن انجام شد. وکتور نوترکیب و وکتور فاقد Omp10، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل را دارا بوده، لذا رشد باکتری ترانسفورم شده با هر دو نوع وکتور، روی محیط کشت M17 آگار حاوی کلرامفنیکل مشاهده شد. در گروه کنترل منفی، رشد باکتری‌های لاکتوکوکوس لاکتیس فاقد وکتور روی محیط کشت M17 آگار حاوی کلرامفنیکل مشاهده نشد (شکل۷).



شکل۷- بررسی ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس. الف: رشد باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- Omp10 روی محیط M17 آگار حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل. ب: کنترل منفی: عدم رشد باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس فاقد وکتور روی محیط کشت M17 آگار حاوی کلرامفنیکل.

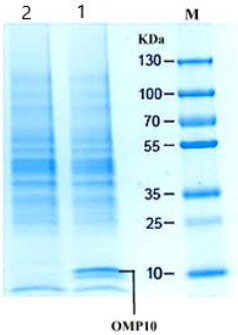
ردیابی pNZ8148-Usp45-Omp10 و تایید بیان OMP10 در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس. جهت تأیید بیان ژن در سطح DNA توسط تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی، باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس دریافت‌کننده وکتور pNZ8148-Usp45-Omp10 و pNZ8148 فاقد ژن هدف از لحاظ حضور ژن Omp10 غربالگری شدند. باند bp381 ژن Omp10 در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با pNZ8148-Usp45-Omp10 توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد و مورد تایید قرار گرفت. در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با pNZ8148 هیچ باندی مشاهده نشد. جهت تأیید بیان ژن در سطح RNA نیز از تکنیک RT-PCR استفاده شد. نتیجه RT-PCR، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Omp10، مشاهده باند bp381 روی ژل بود (شکل ۸).



شکل۸- RT-PCR. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. شماره ۱: لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف. شماره ۲: محصول واکنش PCR مربوط به تکثیر Omp10 با باند ۳۸۱ جفت بازی در لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب.

ج- شناسایی و تایید حضور باند پروتئینی OMP10 توسط تکنیک SDS-PAGE:

نهایتاً پس از الکتروپوریشن و انجام ترانسفورماسیون، باکتری‌های بیان‌کننده‌ی پروتئین OMP10، توسط تکنیک SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. حضور باند kDa10 مربوط به محصول ژن OMP10 در رسوب باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده نشانه‌ی حضور پروتئین OMP10 می‌باشد؛ لذا باکتری ترانسفورم شده با pNZ8148-Usp45-Omp10، دارای یک باند پروتئینی kDa10 اضافه نسبت به باکتری ترانسفورم نشده است در صورتی که باکتری‌های لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم نشده فاقد این باند پروتئینی می‌باشند (شکل۹).



شکل۹. تایید حضور پروتئین نوترکیب OMP10 در رسوب باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- Omp10 به کمک تکنیک SDS-PAGE. M: مارکر Cytomatingene. شماره ۱: باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- Omp10، شماره ۲: باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر انتقال موفق وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 به درون باکتری میزبان لاکتوکوکوس لاکتیس توسط روش الکتروپوریشن صورت پذیرفت و تایید کلونینگ به کمک تکنیک‌های RT-PCR، هضم آنزیمی و SDS-PAGE انجام شد. بیان موفق ژن Omp10 بروسلا آبورتوس به عنوان یک آنتی‌ژن کاندید، در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس می‌تواند رهیافتی امیدبخش جهت تولید واکسن خوراکی علیه تب مالت باشد.

اگر چه سال‌هاست از سویه‌های ضعیف شده بروسلا جهت ایمن‌سازی دام‌ها در مقابل بیماری بروسلوز استفاده می‌شود اما چنین واکسن‌هایی برای انسان غیر ایمن و بیماری‌زا هستند؛ لذا، تقاضای دائمی برای تولید واکسن‌هایی با کارآیی و ایمنی بالا جهت مصرف انسانی وجود دارد [۲۲]. امروزه اهمیت توسعه‌ی واکسن‌های نوترکیب علیه بیماری‌های عفونی به کمک شناسایی آنتی‌ژن‌های ایمونوژنیکی قدرتمند، به همراه سیستم تحویل ایمن و کارآمد بر کسی پوشیده نیست [۲۳].

استفاده از پروبیوتیک‌های مهندسی شده به عنوان حامل زنده‌ی واکسن‌های خوراکی، بسیار ارزشمند است [۱۵]. با پیشرفت ابزارهای ژنتیکی و تعیین توالی کامل ژنوم لاکتوکوکوس لاکتیس، امکان دستکاری‌های گسترده‌ی ژنتیکی روی ژنوم این باکتری برای پژوهشگران امکان‌پذیر شده است. از پروتئین‌های هترولوگ تولید شده به کمک لاکتوکوکوس لاکتیس می‌توان: مولکول‌های گزارشگر، آنتی‌ژن‌های ویروسی، یوکاریوتی و باکتریایی، آلرژن‌ها، اینترلوکین‌ها، باکتریوسین‌ها و آنزیم‌ها را نام برد [۲۴].

مطالعات زین و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشانگر این بود که ایمن‌سازی حاصل از مصرف خوراکی سویه لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده پروتئین پوشش سطحی ویروس HIV همراه با سم کلرا غیرفعال شده به عنوان ادجوانت بالاترین میزان کارایی را به همراه داشته است [۲۵]. بنابراین باکتری غیر بیماری‌زا، غیر تهاجمی و ایمن لاکتوکوکوس لاکتیس با توجه به پتانسیل بالای آن جهت دستکاری ژنتیکی، می‌تواند به عنوان یک سیستم تحویل ایمن برای واکسن‌های نوترکیب مدنظر قرار گرفته شود.

لئو و همکاران در سال ۲۰۲۰ بیان کردند که برخی از سوش‌های LAB مانند لاکتوکوکوس لاکتیس که به عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند و با تحریک سیستم ایمنی همراه هستند، به طور کلی بی‌خطر تلقی می‌شوند که استفاده از آن‌ها را به یک استراتژی واکسیناسیون مخاطی جالب و مؤثر تبدیل می‌کند. سیستم بیان ژن L.lactis به‌وسیله Nisin، که ۲۵ سال پیش کشف شد، کنترل می‌شود. Nisin یک سیستم تولید پروتئین قوی و کاملاً تنظیم شده است که به مکانیسم تنظیم خودکار باکتریسین نیسین بستگی دارد. در حال حاضر، این سیستم بیان ژن به طور گسترده‌ای برای بیان پروتئین‌های برون‌زا در باکتری‌های گرم مثبت استفاده می‌شود. L.lactis در ترکیب با سیستم NICE تنظیم شده، دارای کاربردهای مختلفی از جمله بیان آنتی‌ژن‌های بیماری‌زا (Ags) برای ایمن‌سازی از طریق سطوح مخاطی و تولید سیتوکین‌های دارویی برای درمان‌های پزشکی است [۲۸].

در ۱۹۹۷ تعدادی از پروتئین‌های غشای خارجی بروسلا به عنوان آنتی‌ژن‌های کاندید برای تشخیص سرولوژیکی بروسلوزیس مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نقش کلیدی این پروتئین‌ها در ایجاد پاسخ ایمنی سلولی، تعدادی از آن‌ها از جمله, Omp36, Omp25, Omp10, Omp16 و Omp19 کلون، توالی‌یابی و بیان شدند تا مورد بررسی‌های بیش‌تر قرار بگیرند [۲۹].

مطالعات بیوشیمیایی آنه تیبور و همکارانش روی پروتئین Omp10 نشانگر این بود که این محصول از جنس لیپوپروتئین است [۲۰]. در ادامه این گروه به بررسی اثر حذف omp10 بر خصوصیات غشای خارجی بروسلا آبورتوس و اثر آن در حدت بیماری بروسلوز پرداختند. نتایج حاصل نشان‌دهنده‌ی این بود که حذف ژن omp10 از بروسلا آبورتوس به میزان چشمگیری حدت باکتریایی را کاهش می‌دهد. با ایجاد جهش در ژن omp10 زنده‌مانی و رشد در موش‌ها به میزان زیادی کاهش یافت و جهش omp10 نقص رشد قابل توجهی را به نمایش گذاشت [۳۰]. در سال ۲۰۱۷ تیانسن لی و همکاران جهش حذفی در Omp10 بروسلا آبورتوس را مورد آنالیز قرار دادند و کاهش بقا و بیماری‌زایی را در موش‌های مدل مشاهده کردند [۳۱].

در سال ۲۰۱۸ طی مطالعات ایم و همکاران، آنالیز و مقایسه‌ی پاسخ ایمنی آنتی‌ژن‌های OMP10، OMP19 و OMP28 بروسلا آبورتوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که پروتئین‌های نوترکیب rOMP10، rOMP19 و rOMP28 بروسلا آبورتوس، پاسخ‌های ایمنی شدیدی را در شرایط in vitro و in vivo نشان می‌دهند. لذا این پروتئین‌ها ممکن است به عنوان کاندیداهای احتمالی برای افزایش ایمنی‌زایی در عفونت بروسلا عمل کنند [۳۲].

طی پژوهش‌های دکتر دوستی و همکاران روی واکسن‌های نوترکیب، از DNA پلاسمیدی کدکننده پروتئین‌های آنتی‌ژنی استفاده شد. در این مطالعه پروتئین‌های آنتی‌ژنی مستقیماً به داخل سلول گیرنده تزریق شد و سلول‌های دریافت‌کننده،

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

آنتی‌ژن پروتئین انتقالی را بیان کردند. در این بین هر دو نوع پاسخ ایمنی هومورال و سلولی مشاهده شد. در نهایت DNA واکسن سنتز شده با بیان درازمدت آنتی‌ژن مورد نظر و ساخت سلول‌های ایمنی خاطره، به عنوان واکسنی موثر شناخته شد [۳۳].

لیو و همکاران در سال ۲۰۲۰، به بررسی تأثیر ایمونولوژیکی پلاسمید pNZ8148 رمزکننده‌ی پروتئین FMDV-SPVP1 در یک مدل موش پرداختند. این مطالعه اثرات ایمن‌سازی خوراکی موش‌ها را با استفاده از سیستم نایسین توسط سویه L. lactis NZ9000 بررسی می‌کند. از سیگنال پپتید SPusp45 جهت هدایت ترشح خارج سلولی پروتئین استفاده شد. بیان توالی VP1 توسط pNZ8148 بدون پپتید سیگنال SPusp45 شکست خورد، در حالی‌که با اضافه شدن SPusp45 پایین دست توالی VP1 بیان موفق صورت گرفت. نتایج به طور واضح نشان داد که تجویز خوراکی پروتئین‌های SPVP1 قادر به ایجاد پاسخ‌های مخاطی و سیستمیک بودند [۳۴].

پن و همکاران در سال ۲۰۲۱ به ساخت واکسن خوراکی لاکتوباسیلوس نوترکیب تولیدکننده‌ی HlaH35L، جهت درمان بیماری‌های حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس پرداختند. در این مطالعه از وکتور نوترکیب pNZ8148-Hla استفاده شد. این واکسن با ایجاد ایمنی مخاطی محافظت بالایی را در برابر عفونت‌های ریوی و پوستی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس ارائه کرد. در مجموع، این مطالعه پتانسیل بالایی را برای یک سیستم تحویل مبتنی بر باکتری‌های پروبیوتیک نشان داد و داده‌های تجربی مطلوبی جهت توسعه واکسن‌های مخاطی ارائه شد [۳۵].

رضایی و همکاران، پروتئین Omp16 را به دلیل آنتی‌ژنیسیته بالا، در دسترس بودن و حلقه‌های سطحی که توسط مطالعات جامع بیوانفورماتیک پیش‌بینی شده بود، به عنوان یک کاندید ایمنی‌زا برای تولید واکسن‌های موثر علیه بروسلوز در آینده انتخاب کردند. ویژگی قابل توجه Omp16 انتخاب شده در این مطالعه، این است که به عنوان یک جزء اگزوپروتئوم از باکتری بروسلا، در معرض قرار می‌گیرد و برای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال قابل دسترسی است [۳۶].

لی و همکاران در سال ۲۰۲۱، اثرات سه پروتئین غشایی خارجی ارزیابی شد که شامل پروتئین‌های گونه‌های بروسلا (Omp25، Omp10 و Omp2a) است. اثر این آنتی‌ژن‌ها بر مهار IFN-β توسط ELISA سنجیده شد. هر سه پروتئین Omp25، Omp10، و Omp2a می‌توانند تولید IFN-β را مهار کنند، اما Omp25 مهارکنندگی بسیار بالاتری را نشان داد. این مطالعه IRF3 فسفریله شده را در سیتوپلاسم و هسته شناسایی کرد. نتایج نشان داد که IRF3 فسفریله شده در هسته به طور قابل توجهی در سلول‌های بیان‌کننده Omp25 نسبت به سلول‌های بدون بیان Omp25 کاهش یافت. بنابراین، حدس زده می‌شود که Omp25 با انتقال IRF3 به هسته تداخل ایجاد می‌کند. در نتیجه منجر به مهار رونویسی IFN-β می‌شود [۳۷].

حسینی و همکاران در سال ۲۰۲۲ طی مطالعه‌ای اهمیت میکروبیوتا را چنین توصیف کردند: به طور کلی، فعل و انفعالات میکروبیوتای روده بر سلامت متابولیک میزبان تأثیرگذار است و تعادل انرژی، هضم و جذب غذا، متابولیسم زنوبیوتیک‌ها، مقاومت در برابر کلونیزاسیون پاتوژن‌ها و تکامل ایمونولوژیک را تنظیم می‌کند. از آن‌جا که ترکیب و تنوع میکروبیوتای روده و متابولیت‌های آن از بدو تولد و در طول عمر با توجه به عوامل مختلف محیطی نظیر انواع رژیم غذایی، مصرف داروها و مکمل‌ها، دریافت آنتیبیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها و پره‌بیوتیک‌ها، میزان فعالیت‌های بدنی، شرایط مختلف محیط زندگی و هم‌چنین عواملی هم‌چون ژنتیک و ابتلا به بیماری‌های مختلف تغییر می‌کند، احتمالاً برای هر فرد منحصر است. به نظر می‌رسد تجزیه و تحلیل میکروبیوتای روده و متابولیت‌های مربوطه، به ما این امکان را می‌دهد تا پاسخ‌های فردی به غذاها و داروهای مختلف را پیش‌بینی کنیم و هم‌چنین روش‌های تعدیل میکروبیوتا ممکن است به روش‌های معمول پزشکی فردمحور اضافه شود. شناخت متابولیت‌های میکروبیوتا می‌تواند رویکرد نویدبخشی برای شناسایی نشانگرهای زیستی برای تشخیص زودهنگام و پیش آگاهی و هم‌چنین هدف امیدوارکننده‌ای برای توسعه ابزارهای درمانی جدید برای بیماری‌های مختلف باشد [۳۸].

رحمانی و همکاران در سال ۲۰۲۲ بیان کردند، در ایران حدود ۸۰ الی ۹۰٪ جمعیت دچار کمبود ویتامین D هستند، و شیوع پوکی استخوان در کشور رو به افزایش است. در معرض آفتاب قرار گرفتن، ورزش و مصرف کلسیم و ویتامین D در پیشگیری از پوکی استخوان مؤثر هستند. در این تحقیق مشخص شد باکتری پروبیوتیک Lactobacillus reuteri و L. rhamnosus قادر به تولید ویتامین D هستند. از آن‌جایی که پروبیوتیک‌ها معمولا در غنی‌سازی لبنیات مانند ماست، شیر، پنیر که خود منبع غنی از کلسیم هستند کاربرد دارند، لذا می‌توان با استفاده از لبنیات پروبیوتیک کمبود ویتامین D و پوکی استخوان را برطرف نمود. با استفاده از Lactobacillus reuteri و L. rhamnosus می‌توان نیاز به ویتامین‌های خانواده B، ویتامین E، ویتامین K و ویتامین D را هم‌زمان تأمین نمود. با مصرف مواد غذایی غنی شده با پروبیوتیک می‌توان از فواید دیگر این باکتری‌ها نظیر تنظیم سیستم ایمنی، بهبود مشکلات

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

گوارشی، کاهش جمعیت هلیکوباکترپیلوری نیز بهره‌مند شد [۳۹].

بنابراین با توجه به مطالعات و بررسی‌های ذکر شده، وکتور pNZ8148 پتانسیل خوبی جهت کلونینگ موفق در اختیار محققین قرار می‌دهد. انتقال وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 در مطالعه‌ی حاضر به درون باکتری میزبان لاکتوکوکوس لاکتیس و بیان قطعه‌ی ژنی Omp10 در این باکتری پروبیوتیک حائز اهمیت بوده؛ زیرا امیدبخش ساخت واکسن خوراکی علیه تب مالت جهت مصرف انسانی در آینده خواهد بود.

در پژوهش حاضر انتقال موفقیت‌آمیز وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp10 به باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس به کمک تکنیک الکتروپوریشن انجام شد. با توجه به بیان ژن Omp10 بروسلا آبورتوس به عنوان یک آنتی‌ژن کاندید با خاصیت آنتی‌ژنیسیته بالا در این باکتری پروبیوتیک، پیش‌بینی می‌شود. بعد از سنجش صحت عملکرد پروتئین نوترکیب، استفاده از این آنتی‌ژن در مطالعات مربوط به تولید واکسن خوراکی علیه بیماری تب مالت مفید واقع شود. هم‌چنین استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب به عنوان میزبانی ایمن و با پتانسیل بالا جهت انتقال آنتی‌ژن، افق روشنی از واکسن‌های نوترکیب را پدیدار می‌کند؛ لذا تحقیقات پیرامون ساخت واکسن نوترکیب موثر جهت پیشگیری از تب مالت در انسان، با به کارگیری باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده‌ی آنتی‌ژن OMP10 پیشنهاد می‌شود. در پژوهش حاضر جز محدودیت منابع مالی برای ادامه کار، محدودیت دیگری وجود نداشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله دستاورد پایان‌نامه دکتری می‌باشد. پژوهشگران و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، به‌ویژه دکتر فرانک عالی که ما را در به ثمر رساندن این تحقیق یاری نمودند، به آگاهی برسانند. تمام اصول اخلاقی در این مقاله رعایت شده است (شناسه اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1401.003). نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

مشارکت و نقش نویسندگان

عباس دوستی: ایده و طراحی مطالعه، مهسا کاظمی رودسری: جمع‌آوری داده‌ها و آنالیز و تفسیر نتایج، محمدسعید جامی: بازبینی نقادانه‌ی مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

[1] Mohammadi E, Golchin M. High protection of mice against Brucella abortus by oral immunization with recombinant probiotic Lactobacillus casei vector vaccine, expressing the outer membrane protein OMP19 of Brucella species. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2020; 70: 101470.
https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101470
PMid:32208191

[2] Dadar M, Tiwari R, Sharun K, Dhama K. Importance of brucellosis control programs of livestock on the improvement of one health. Vet Q 2021; 41: 137-151.
https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1894501
PMid:33618618 PMCid:PMC7946044

[3] Seyedalizadeh N, Alesheikh AA, Ahmadkhani M. Spatio-statistical modeling of human brucellosis using environmental parameters: A case study of Northern Iran. Int Arch Photogram Remote Sens Spat Inf Sci 2019; 42: 969-973. (Persian).
https://doi.org/10.5194/isprs-archives-XLII-4-W18-969-2019

[4] Rouzic N, Desmier L, Cariou ME, Gay E, Foster JT, Williamson CH, et al. First case of brucellosis caused by an amphibian-type brucella. Clin Infect Dis 2021; 72: e404-e407.
https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1082
PMid:32719850

[5] Celli J. The changing nature of the Brucella-containing vacuole. Cell Microbiol 2015; 17: 951-958.
https://doi.org/10.1111/cmi.12452
PMid:25916795 PMCid:PMC4478208

[6] Pakzad R, Pakzad I, Safiri S, Shirzadi MR, Mohammadpour M, Behroozi A, et al. Spatiotemporal analysis of brucellosis incidence in Iran from 2011 to 2014 using GIS. Int J Infect Dis 2018; 67: 129-136.
https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.10.017
PMid:29122689

[7] Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol 2009; 9: 1168-1184.
https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.001
PMid:19628055

[8] Al Jindan R. Scenario of pathogenesis and socioeconomic burden of human brucellosis in Saudi Arabia. Saudi J Biol Sci 2021; 28: 272-279.
https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.059
PMid:33424306 PMCid:PMC7783673

[9] Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, et al. Brucella papionis sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.). Int J Syst Evol Microbiol 2014; 64: 4120-4128.
https://doi.org/10.1099/ijs.0.065482-0
PMid:25242540 PMCid:PMC4811636

[10] Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, et al. Bovine brucellosis - a comprehensive review. Vet Q 2021; 41: 61-88.
https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1868616
PMid:33353489 PMCid:PMC7833053

[11] Doostdari S, Mahmoodi P, Mohammadzadeh A, Khafri A. Evaluation of humoral immune responses of sheep vaccinated with Razi institute Rev. 1 Brucellosis Vaccine in Comparison to a Spanish (CZV) Rev. 1 Vaccine. Avicenna J Clin Microbiol Infect 2019; 6: 95-99. (Persian).
https://doi.org/10.34172/ajcmi.2019.17

[12] Jazayeri SD, Lim HX, Shameli K, Yeap SK, Poh CL. Nano and microparticles as potential oral vaccine carriers and adjuvants against infectious diseases. Front Pharmacol 2021; 12: 682286.
https://doi.org/10.3389/fphar.2021.682286
PMid:34149426 PMCid:PMC8206556

[13] El-Saadony MT, Alagawany M, Patra AK, Kar I, Tiwari R, Dawood MA, et al. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. Fish Shellfish Immunol 2021; 117:

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.03.015
PMid:31300122

[27] Bhattacharjee AK, Van de Verg L, Izadjoo MJ, Yuan L, Hadfield TL, Zollinger WD, Hoover DL. Protection of mice against brucellosis by intranasal immunization with Brucella melitensis lipopolysaccharide as a noncovalent complex with Neisseria meningitidis group B outer membrane protein. Infect Immun 2002; 70: 3324-3329.
https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3324-3329.2002
PMid:12065469 PMCid:PMC128042

[28] Liu X, Qi L, Lv J, Zhang Z, Zhou P, Ma Z, et al. The immune response to a recombinant Lactococcus lactis oral vaccine against foot-and-mouth disease virus in mice. Biotechnol Lett 2020; 42: 1907-1917.
https://doi.org/10.1007/s10529-020-02900-6
PMid:32385744 PMCid:PMC7210100

[29] Letesson JJ, Tibor A, van Eynde G, Wansard V, Weynants V, Denoel P, Saman E. Humoral immune responses of Brucella-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant Brucella proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol 1997; 4: 556-564.
https://doi.org/10.1128/cdli.4.5.556-564.1997
PMid:9302205 PMCid:PMC170595

[30] Tibor A, Wansard V, Bielartz V, Delrue RM, Danese I, Michel P, et al. Effect of omp10 or omp19 deletion on Brucella abortus outer membrane properties and virulence in mice. Infect Immun 2002; 70: 5540-5546.
https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5540-5546.2002
PMid:12228280 PMCid:PMC128365

[31] Li T, Huang M, Wang Z, Guo F, Zhang H, Chen C. Construction and characteristic analysis of Omp10 deletion mutant of Brucella abortus. Pak J Zool 2017; 49: 1809-1806.
https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.5.1809.1816

[32] Im YB, Park WB, Jung M, Kim S, Yoo HS. Comparative analysis of immune responses to outer membrane antigens OMP10, OMP19, and OMP28 of Brucella abortus. Jpn J Infect Dis 2018; 71: 197-204.
https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2017.019
PMid:29709972

[33] Mahmoudi Vashian Z, Doosti A. Cloning and gene expression of ureG gene as a DNA vaccine candidate against Helicobacter pylori. J Guilan Univ Med Sci 2017; 26: 20-29. (Persian).

[34] Liu X, Qi L, Lv J, Zhang Z, Zhou P, Ma Z, et al. The immune response to a recombinant Lactococcus lactis oral vaccine against foot-and-mouth disease virus in mice. Biotechnol Lett 2020; 4: 1907-1917.
https://doi.org/10.1007/s10529-020-02900-6
PMid:32385744 PMCid:PMC7210100

[35] Pan N, Liu B, Bao X, Zhang H, Sheng S, Liang Y, et al. Oral delivery of novel recombinant lactobacillus elicit high protection against staphylococcus aureus pulmonary and skin infections. Vaccines (Basel) 2021; 9: 984.
https://doi.org/10.3390/vaccines9090984
PMid:34579221 PMCid:PMC8473125

[36] Rezaei M, Rabbani-Khorasgani M, Zarkesh-Esfahani SH, Emamzadeh R, Abtahi H. Prediction of the Omp16 epitopes for the development of an epitope-based vaccine against brucellosis. Infect Disord Drug Targets 2019; 19: 36-45.
https://doi.org/10.2174/1871526518666180709121653
PMid:29984663

[37] Li R, Liu W, Yin X, Zheng F, Wang Z, Wu X, et al. Brucella spp. Omp25 promotes proteasome-mediated cGAS degradation to attenuate IFN-β production. Front Microbiol 2021; 12: 702881.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.702881
PMid:34394047 PMCid:PMC8358459

[38] Hoseini Tavassol Z, Ejtahed H, Soroush A, Shahriari A, Siadat S, Hasani-Ranjbar S, et al. Clinical application of gut microbiota metabolites: A novel opportunity in personalized medicine. Koomesh 2022; 24: 197-209 (Persian).

[39] Rahmani N, Minuchehr Z, Bambai B, Sarhangi N, Allahyari Fard N. Evaluation of vitamins diversity produced by probiotics in the microbiome and introduction of selected species. Koomesh 2022; 24: 267-275. (Persian).

36-52.
https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007
PMid:34274422

[14] Bajaj BK, Claes IJ, Lebeer S. Functional mechanisms of probiotics. J Microbiol Biotechnol Food Sci 2021; 2021: 321-327.

[15] Kumar M, Yadav AK, Verma V, Singh B, Mal G, Nagpal R, Hemalatha R. Bioengineered probiotics as a new hope for health and diseases: an overview of potential and prospects. Future Microbiol 2016; 11: 585-600.
https://doi.org/10.2217/fmb.16.4
PMid:27070955

[16] Song AA, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on Lactococcus lactis: from food to factory. Microb Cell Fact 2017; 16: 55.
https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x
https://doi.org/10.1186/s12934-017-0754-1

[17] Shirdast H, Ebrahimzadeh F, Taromchi AH, Mortazavi Y, Esmaeilzadeh A, Sekhavati MH, et al. Recombinant lactococcus lactis displaying Omp31 antigen of brucella melitensis can induce an immunogenic response in BALB/c Mice. Probiotics Antimicrob Proteins 2021; 13: 80-89.
https://doi.org/10.1007/s12602-020-09684-1
PMid:32661939

[18] Huy TX, Nguyen TT, Reyes AW, Vu SH, Min W, Lee HJ, et al. Immunization with a combination of four recombinant brucella abortus proteins Omp16, Omp19, Omp28, and L7/L12 Induces T Helper 1 immune response against Virulent B. abortus 544 Infection in BALB/c Mice. Front Vet Sci 2021; 7: 577026.
https://doi.org/10.3389/fvets.2020.577026
PMid:33553273 PMCid:PMC7854899

[19] Attar A, Afkhami H, Khaledi M, Sadati MS. Bactericidal activity of serum by brucella abortus RB51 outer membrane protein's combined by brucella abortus S99 lipopolysaccharide induction. PREPRINT 2021.
https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-231416/v1

[20] Tibor A, Decelle B, Letesson JJ. Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of Brucella spp. are lipoproteins. Infect Immun 1999; 67: 4960-4962.
https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4960-4962.1999
PMid:10456959 PMCid:PMC96837

[21] Tibor A, Saman E, de Wergifosse P, Cloeckaert A, Limet JN, Letesson JJ. Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of Brucella abortus. Infect Immun 1996; 64: 100-107.
https://doi.org/10.1128/iai.64.1.100-107.1996
PMid:8557326 PMCid:PMC173733

[22] Wallach JC, Ferrero MC, Victoria Delpino M, Fossati CA, Baldi PC. Occupational infection due to Brucella abortus S19 among workers involved in vaccine production in Argentina. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 805-807.
https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02029.x
PMid:18727806

[23] Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, Ribeiro LA, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P, Azevedo V. Heterologous expression of Brucella abortus GroEL heat-shock protein in Lactococcus lactis. Microb Cell Fact 2006; 5: 14.
https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-14
https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-S1-P14
PMid:16556312 PMCid:PMC1444932

[24] D'Souza R, Pandeya DR, Hong ST. Lactococcus lactis: an efficient Gram positive cell factory for the production and secretion of recombinant protein. Biomed Res 2012; 23: 1-7.

[25] Xin KQ, Hoshino Y, Toda Y, Igimi S, Kojima Y, Jounai N, et al. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant Lactococcus lactis expressing surface-bound HIV Env. Blood 2003; 102: 223-228.
https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0110
PMid:12649143

[26] Masjedian Jezi F, Razavi S, Mirnejad R, Zamani K. Immunogenic and protective antigens of Brucella as vaccine candidates. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2019; 65: 29-36.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 25, Issue 3 (May and June 2023), 279-289

Genetic manipulation of probiotic bacterium Lactococcus lactis to produce OMP10 protein of Brucella abortus

Mahsa kazemi roudsari (Ph.D)[1], Abbas Doosti (Ph.D)[*2], Mohammadsaeid jami (Ph.D)[1]
1- Dept. of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2 - Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

* Corresponding author. +098 9133838830 abbasdoosti@yahoo.com Received: 5 Oct 20200; Accepted: 13 May 2023

Introduction*:* In all species of Brucella bacteria, the *Omp10* gene sequence is conserved. The high antigenic property of this gene product stimulates the host's immune system. Using the probiotic *Lactococcus lactis* bacterium as a live carrier, in addition to being safe, is suitable for the production of recombinant proteins and gene transfer to eukaryotic cells. *Omp10* is one of the surface lipoproteins in brucella's outer membrane with high immunogenicity which has a substantial role in up-taking nutrition, signaling, adherence, and antibiotic resistance. This protein has antigenic properties and can play an adjuvant role when attached to other antigens. Therefore, the purpose of this research is to create the probiotic bacteria Lactococcus lactis to produce the *Omp10* protein of *Brucella abortus*.

Materials and Methods*: Brucella abortus Omp10* gene with Usp45 peptide signal was synthetically cloned in the pNZ8148 vector. The recombinant vector was first reproduction in Escherichia coli strain TOP10 and then purified by plasmid extraction kit. The concentration of extracted plasmid was measured by nanodrop. The recombinant pNZ8148-Usp45-Omp10 vector was then transformed into Lactococcus lactis bacteria through electroporation. Cloning and gene expression assessment and verification were done by SDS-PAGE, enzyme digestions, and RT-PCR techniques.

Results: The results showed the successful expression of the target gene *Omp10* in the *Lactococcus lactis* probiotic bacteria. The recombinant protein was well expressed in probiotic bacteria.

Conclusion: The present study showed that the *Omp10* protein is expressed in the probiotic bacterium *Lactococcus lactis* transformed by electroporation with the recombinant pNZ8148-Usp45-*Omp10* vector. *Lactococcus lactis* transformed in the present study can be suitable as an oral subunit vaccine to prevent brucellosis in future studies.

Keywords*: Brucella abortus, Omp10, Lactococcus lactis*, Electroporation, Cloning

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]