دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و سوم، شماره ۲، صفحه ۱۵۲ - ۱۴۳ (خرداد و تیر ۱۳۹۹)

Iran South Med J 2020; 23(2): 143-152

مقایسهٔ وکتورهای بیانی pET32a و pET25b در بیان توالی پلی اپیتوپی سنتز شده از آنتی‌ژن‌های انگل *لیشمانیا اینفانتوم*

مرضیه طاهرزاده (PhD) [۱*]، مرادعلی فولادوند (PhD) [۲]، بهرام کاظمی (PhD) [۳]**

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی و علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران
[۲] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۳] مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران۳

(دریافت مقاله: ۹۸/۵/۲۰- پذیرش مقاله: ۹۹/۲/۲۶)

چکیده

زمینه: امروزه از روش‌های مولکولی در تشخیص بیماری‌ها، تولید واکسن‌ها، داروها و تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود، لذا یکی از مراحل مهم انتخاب وکتور مناسب برای کلون و بیان ژن‌های هدف است. از آنجا که بیان پلی‌ژن‌های سنتتیک یا اصطلاحاً آنتی‌ژن‌های کایمریک با وزن مولکولی بالا نیاز به شرایط ویژه‌ای دارد، مطالعهٔ حاضر به هدف ارزیابی میزان اهمیت نوع وکتور برای بیان اینگونه آنتی‌ژن‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها: توالی ۱۲۵۰ جفت بازی متشکل از اپی‌توپ‌های هشت آنتی ژن مهم انگل *لیشمانیا اینفانتوم* طراحی و توسط شرکت بیوماتیک (کانادا) سنتز شد، توالی به‌صورت جداگانه درون دو وکتور بیانی **pET25b** و **pET32a** کلون و سپس به باکتری **E.coli BL21(DE3)** ترانسفورم و تحت شرایط مشابه بیان شدند. لیزابه باکتری توسط **SDS PAGE** بررسی و با وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج **SDS PAGE** و وسترن بلات نشان داد که تولید پروتئین نوترکیب کامل و بی‌نقص توسط وکتور **pET25b** موفقیت‌آمیز نبوده است. این در حالی بود که پروتئین نوترکیب حاصل از بیان توالی پلی‌اپی‌توپی مذکور در وکتور **pET32a** به‌صورت موفقیت‌آمیزی تولید و تأئید گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به بیان موفقیت‌آمیز توالی پلی‌اپی‌توپی درون وکتور **pET32a** و شناسایی و تأئید پروتئین مربوطه، از طرفی عدم موفقیت حصول پروتئین در وکتور **pET25b** نشان داد که در مورد بیان برخی توالی‌های موزائیکی خاص کم بودن ویژگی حلالیت ممکن است به‌طور کلی دستیابی به پروتئین را با مشکل مواجه کند بنابراین انتخاب نوع وکتور بیانی باید با دقت بیشتری صورت گیرد.

واژگان کلیدی: توالی پلی‌اپی‌توپی، *لیشمانیا اینفانتوم*، سطح بیان، وکتور **pET32a**، وکتور **pET25b**

**بوشهر، مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
Email: mfooladvand39@yahoo.com
***ORCID: 0000-0002-3792-2194**
**** ORCID: 0000-0001-7302-6840**

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]

مقدمه

هم اکنون تعداد زیادی پلاسمید جهت انجام کلون و بیان پروتئین نوترکیب به‌صورت تجاری در دسترس قرار دارند که معمولاً انتخاب هر کدام از آن‌ها به هدف مطالعه، کمیت و کیفیت پروتئین نوترکیب مورد نظر وابسته است. مهم‌ترین خصوصیات موجود در اکثر وکتورهای بیانی پروموتر، کلونینگ سایتی که باید ژن مورد نظر در آن کلون شود، تگ‌ها یا توالی‌های نشاندار، جایگاه برش، قطعه ژنی که قرار است درون آن کلون شود، خاتمه دهنده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مبدأ همانندسازی می‌باشد که متناسب با اهداف پروژه می بایست مورد توجه قرار گیرند (۱).

ساختارهای پلی‌ژنی سنتتیک یا قطعات آنتی‌ژنی کایمریک، توالی‌های ژنی مصنوعی هستند متشکل از تعدادی سکانس ژنی کوتاه که به‌وسیلهٔ یک قطعهٔ متصل کننده به یکدیگر وصل شده‌اند و معمولاً برحسب نوع طراحی، وزن‌های مولکولی متفاوتی خواهند داشت (۲). در مطالعاتی که محقق قصد کلون و بیان یک توالی سنتز شده کایمریک برای تولید پروتئین نوترکیب با کمیت و کیفیت مناسب دارد، معمولاً انتخاب نوع وکتور بیانی یکی از دغدغه‌های مهم به‌شمار می‌رود زیرا کلون و بیان این قطعات کایمریک در مقایسه با کلون و بیان توالی های ژنی طبیعی که عموماً از بافت‌های موجودات زنده جدا شده‌اند با چالش‌ها و پیچیدگی‌های بیشتری همراه است. یکی از این چالش‌های مهم، عدم بیان یا بازده پائین آن است که می‌تواند به دلایل مختلفی از قبیل سمی بودن پروتئین قبل یا بعد از القاء و گرایش یا اختلاف کدون‌ها باشد (۲).

در مطالعات سال‌های اخیر انواعی از وکتورهای بیانی با هدف تولید واکسن‌های نوترکیب از آنتی‌ژن‌های سنتتیک مورد آزمایش قرار گرفته‌اند و در اکثر این گزارش‌ها با وجود موفقیت‌آمیز بودن بیان، میزان تولید پروتئین نوترکیب از نظر کمی رضایت بخش نبوده است (۳-۵).

وکتور بیانی pET25b سایزی تقریباً معادل ۵/۵ کیلو باز دارد و پروموترش از نوعlac1 است و مقاوم به آمپیسیلین می‌باشد. دارای دو توالی چسبان HSV یا His در قسمت C-ترمینال بوده و یک توالی نشانهٔ pelB در قسمت N-ترمینال خود دارد که سبب می‌شود توالی کلون شده پس از بیان، مسیر سیتوپلاسم به پری پلاسم را طی کند (Addgene). بنابراین در نهایت پروتئین تولید شده جایگاه پری پلاسمی پیدا خواهد کرد. در واقع همین امر سبب می‌گردد که پروتئین نوترکیب از نظر ساختمان سه بعدی، فولدینگ بهتری نسبت به پروتئین‌های بیانی سیتوپلاسمی داشته باشد (۶). به دلیل اینکه در مقایسه با سیتوپلاسم، محیط پری پلاسم اکسیدکننده بوده و دارای آنزیم‌هایی است که تشکیل و ایزومریزاسیون پیوندهای دی سولفیدی را کاتالیز می‌کند. انتخاب این وکتور زمانی که هدف تولید پروتئین فعال تاخورده با پیوندهای دی سولفیدی است یک امر رایج است (۷ و ۸).

از طرفی حلالیت پروتئین می‌تواند با انتخاب نوع وکتور، جایگاه‌های کلون و یا نوع میزبان تغییر کند. انتخاب وکتور بیانی pET32a نیز با وزنی حدود ۷/۵ کیلو باز و پروموتر T7 که دارای سه تگ Trx، His و S در انتهای N و یک تگ His در انتهای C می‌باشد به همین هدف صورت می‌گیرد (Addgene). در واقع به دلیل اتصال توالی نوترکیب کلون شده به تگ تیوردوکسین A (TrxA)، پروتئین بیان شده توانایی بهتری برای تشکیل پیوندهای دی سولفیدی درون سیتوپلاسم باکتری پیدا می‌کند. بنابراین تجمع آن به‌صورت اینکلوژن بادی کاهش می‌یابد. به عبارتی تگ TrxA در

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]

ساختمان این وکتور به افزایش حلالیت پروتئین نوترکیب کمک کرده و سطح بالاتری از بیان را فراهم می‌کند (۶ و ۹).

در مطالعهٔ حاضر مقایسه‌ای در رابطه با چگونگی بیان یک سازهٔ پلیتوپیک مصنوعی ۱۲۵۰ جفت بازی در دو نوع وکتور بیانی pET25b و pET32a با فراهم کردن شرایط بیان مشابه در میزبان یکسان انجام شده است.

مواد و روش‌ها

طراحی سازهٔ پلی‌اپی‌توپی متشکل از ۸ اپی توپ خطی *لیشمانیا اینفانتوم*

پس از انتخاب ۸ آنتی‌ژن مهم انگل *لیشمانیا اینفانتوم* (Gp63، TRYP، CPA، LACK، H2A، H3، HSP-70 و KMP-11)[1] و بررسی توالی ژنی آن‌ها در NCBI هر کدام به‌طور جداگانه از نظر اپی‌توپ هایی که در سرور IEDB به ثبت رسیده بودند از نظر آنتی‌ژنیسیته، هیدروفوبیسیته، انعطاف‌پذیری، میزان در دسترس بودن، چرخش بتا و خطی بودن مورد بررسی قرار گرفتند. از میان این ۸ آنتی ژن مهم ایمونوژن فقط شش مورد دارای اپی‌توپ شناسایی شده در سرور مذکور بود و برای ۲ آنتی‌ژن دیگر به‌وسیلهٔ ابزارهای موجود در سرور یعنی Bepipred، Ellipro و DiscoTope پیشگویی بعمل آمد. با انتخاب بهترین اپی‌توپ از میان چندین اپی‌توپ شناسایی شده برای هر آنتی ژن در سرور مذکور، و متصل کردن توالی آن ها به‌وسیله قطعات اتصال دهندهٔ پنج اسیدآمینه‌ای انعطاف‌پذیر شامل چهار اسید آمینهٔ گلایسین و یک اسید آمینهٔ سرین (۱۰) بصورت یک سازهٔ چند اپی توپی طراحی گردید.

کلون و بیان سازه چند اپی‌توپی

سنتز سازهٔ طراحی شده با طولی معادل ۱۲۵۰bp توسط شرکت بیوماتیک (کانادا) انجام شد، سپس درون دو وکتور pET25b و pET32a (Novagen) کلون گردید. بدین ترتیب که در جایگاه ورود برای وکتور اول از برش به‌وسیله دو آنزیم محدودالاثر Nde I و BamH I (New England Biolab) و برای وکتور دوم از برش به‌وسیله دو آنزیم Sal I و BamH I استفاده شد. پس از کلونینگ، برای تأیید اولیه جهت کلون شدن سازه ژنی مذکور، وکتورهای کلون شده ابتدا سکانس شدند (Fazabiotech) و سپس با برش آن‌ها به‌وسیله آنزیم های محدودالاثر و الکتروفورز (BioRad) بر روی ژل آگارز ۱ درصد کلون شدن سازه پلی‌اپی‌توپی در وکتورهای فوق‌الذکر مورد تأیید قرار گرفت.

پس از تأئید صحت کلونینگ، هر کدام از وکتورهای کلون شده جداگانه به باکتری BL21 (DE3) ترانسفورم شدند. باکتری ترانسفورم شده در دو محیط Terrific broth و LB broth به‌طور جداگانه کشت داده شد. سپس هر ارلن در دو دمای ۳۷ و ۲۰–۱۸ درجه سانتی‌گراد همراه با چرخش دورانی به مدت یک شب انکوبه و در زمان مناسب یعنی رسیدن به OD=۰/۶ با دو رقت مختلف از IPTG یعنی ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار القاء شدند.

سدیم دو دسیل سولفات پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورزیس (SDS PAGE) و وسترن بلات

پروتئین نوترکیب حاصل از بیان ژن پلی‌اپی توپی در هر دو وکتور به‌وسیله تست SDS-PAGE (۱۱) و با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد

[1] GP63: Glycoprotein 63 or leishmanolysin, TRYP: tryparedoxin peroxidase, CPA: Cysteine Protease-A, LACK: Leishmania-activated C-kinase, Histone 2A, Histone 3, HSP70: Heat Shock Protein 70, KMP-11: kinetoplastid membrane protein-11.

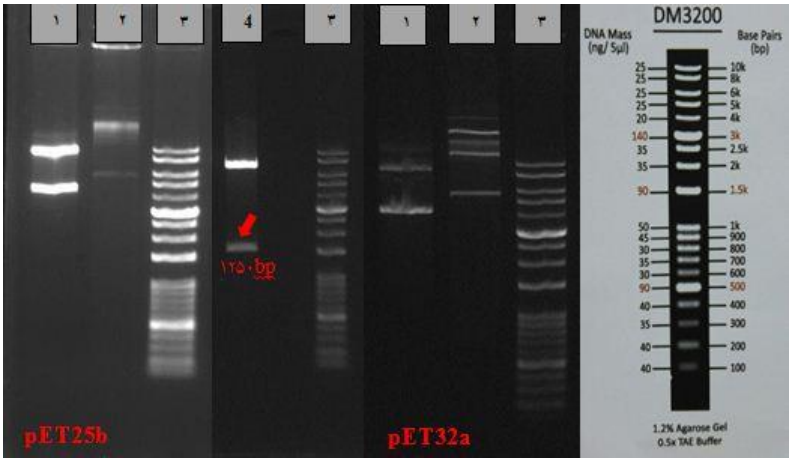
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]

(BioRad mini Protein) مورد بررسی قرار گرفت. از باکتری میزبان دارای وکتور فاقد توالی پلیتوپ به عنوان کنترل استفاده گردید. پس از انجام SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی هر ژل توسط کوماسی بلو G250 ردیفی از پروتئین‌های مختلف موجود در لیزابه باکتری مشاهده گردید که جهت تأئید حضور یا عدم حضور باند پروتئین نوترکیب مورد نظر، وسترن بلات با استفاده از غشاء پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (PVDF) و به روش انتقال مرطوب و در تانک BioRad انجام شد. در این مرحله، بلاتینگ از طریق اتصال اختصاصی آنتی‌بادی نشاندار به تگ هیستیدین (که به‌صورت شش اسید آمینهٔ هیستیدین متصل به توالی اصلی پروتئین نوترکیب در وکتور طراحی شده است) انجام شد.

یافته‌ها

پس از کلون شدن توالی کایمریک درون وکتورهای pET25b و pET32a، برای بررسی و تأیید کلونینگ در وکتور اول، برش قطعهٔ کلون شده با دو آنزیم BamH I و Nco I انجام شد و سپس محصول هضم شده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز و وجود قطعه ژنی ۱۲۵۰ جفت بازی تأیید گردید (پیکان قرمز رنگ) و برای pET32a با مقایسهٔ وزن مولکولی حاصل از وکتور کلون شده و وکتور دست نخورده روی ژل آگاروز ۱ درصد اینکار انجام شد (شکل ۱). برای اطمینان از اینکه سکانس سازه پلی‌اپی توپی سنتز شده همان سکانس سفارش داده شده است، قطعهٔ کلون شده در هر دو نوع وکتور مجدداً تعیین توالی گردیدند. نتیجهٔ مقایسهٔ سکانس تعیین توالی شده با سکانس ارائه شده توسط شرکت سازنده، بیانگر ۹۹ درصد شباهت بود که به علت خوانده نشدن یک یا دو نوکلئوتید طبیعی قلمداد گردید.



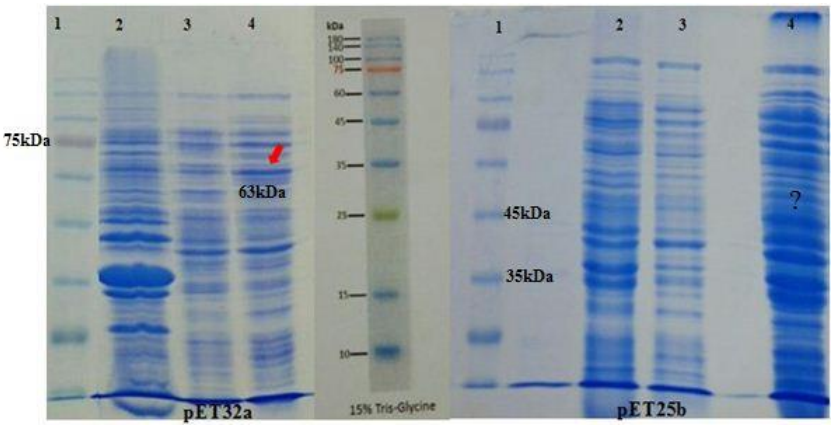
شکل ۱) الکتروفورز ژل آگاروز (۱ درصد) ستون‌های ۱ وکتور سالم، ستون‌های ۲ وکتور کلون شده، ستون‌های ۳ مارکر، ستون ۴ قطعهٔ کلون شده

در مرحلهٔ بهینه کردن شرایط بیان، معلوم شد باکتری ترانسفورم شده در محیط Terrific broth که محیطی غنی‌تر است رشد بهتری داشته و در دمای ۲۰–۱۸ درجهٔ سانتی‌گراد با رقت ۰/۵ میلی‌مولار القاءگر قدرت بیان بیشتری برای دست یافتن به پروتئین نوترکیب خواهد داشت. شکل ۲ که نتیجهٔ بررسی بیان توالی پلی‌اپی توپی

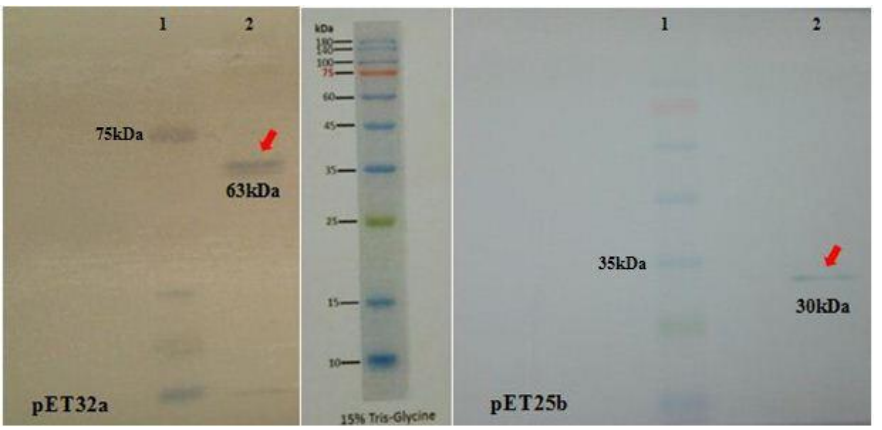
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]

در باکتری BL_{21} به‌عنوان میزبان وکتورهای pET25b و pET32a به‌وسیلهٔ SDS-PAGE را نشان می‌دهد، باندهای ظاهر شده برای وکتور pET25b ابتدا وجود پروتئین ۴۳ کیلودالتونی ناشی از بیان سکانس ژنی کلون شده را تا حدودی نشان داد و ژل حاصل از الکتروفورز لیزابه باکتری حاوی وکتور pET32a، وجود یک پروتئین ۶۳ کیلو دالتونی (مجموع توالی مولتی اپی‌توپ و تگ trx چسبیده به پروتئین اصلی) را به‌صورت تقریبی تأیید کرد (پیکان قرمز رنگ). در مرحلهٔ بعد، برای رفع تردیدها و تأئید باندهای مشاهده شده روی ژل اکریل‌آمید تست وسترن بلات انجام شد (شکل ۳).



شکل ۲) ژل اکریل آمید (۱۲ درصد) سمت راست بررسی بیان در وکتور pET25b (ستون ۱ مارکر، ستون ۲ لیزابه باکتری ترانسفورم شده با وکتور فاقد سکانس سنتز شده، ستون ۳ لیزابه زمان صفر، ستون ۴ لیزابه بیان) و سمت چپ بررسی بیان در وکتور pET32a (ستون ۱ مارکر، ستون ۲ پلت کنترل، ستون ۳ سوپرناتانت کنترل، ستون ۴ سوپرناتانت لیزابه بیان)



شکل ۳) وسترن بلات سمت راست بررسی بیان در وکتور pET25b (ستون ۱ مارکر، ستون ۲ لیزابه بیان) و سمت چپ بررسی بیان در وکتور pET32a (ستون ۱ مارکر، ستون ۲ لیزابه بیان)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]

در این تست که دقیقاً با تکرار ژل اکریل‌آمید مرحلهٔ قبل و با استفاده از آنتی‌بادی نشاندار ضد تگ his انجام شد، به‌صورت واضح باند ۶۳ کیلودالتونی حاصل از بیان ژن کلون شده در وکتور pET32a ظاهر گردید (پیکان قرمز رنگ) و در سمت راست شکل که نتیجه وسترن بلات لیزابه باکتری ترانسفورم شده با وکتور pET25b را نشان می‌دهد، باندی تقریباً ۳۰ کیلودالتونی ظاهر شد که به دلیل عدم تطابق با وزن مولکولی پروتئین نوترکیب مورد انتظار، بیان ناموفق در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است برای اطمینان از صحت نتایج مشاهده شده، تمام مراحل بررسی و تأئید بیان پروتئین نوترکیب در هر دو نوع وکتور سه بار تکرار شده اند.

بحث

در سال‌های اخیر با گسترش رو به رشد آزمایش و تولید واکسن‌های نوترکیب، محققین بنا به ضرورت و اقتضای مطالعات خود انواعی از وکتورهای کلونینگ و بیانی ساخته شده توسط شرکت‌های گوناگون را مورد استفاده قرار داده‌اند. در گزارش‌های به چاپ رسیده در این نوع مطالعات با وجود موفقیت در کلونینگ ژن‌ها و بیان آن ها، میزان تولید پروتئین نوترکیب از نظر کمی و کیفی مبهم است که این خود ممکن است به دلیل حائز اهمیت نبودن ذکر آن در مقاله توسط نویسنده باشد. از آنجا که گزارش تجربیات مختلف هنگام انجام آزمایش‌های بیوتکنولوژی خصوصاً در رابطه با بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌تواند در پیشرفت این زمینهٔ رو به رشد کمک شایان توجهی بکند برآن شدیم مطالعهٔ حاضر، با هدف بررسی اختصاصی دو نوع وکتور بیانی جهت دستیابی به یک پروتئین سنتتیک را انجام دهیم به امید اینکه برای تحقق اهداف دیگر مطالعات بیوتکنولوژی سودمند واقع گردد.

در مطالعهٔ حاضر تولید پروتئینی نوترکیب با عملکرد و ساختار مناسب و در عین حال دارای حلالیت‌پذیری و سهولت در استخراج و جداسازی مورد توجه قرار گرفت، و بر این اساس وکتورهای pET25b و pET32a جهت رسیدن به این اهداف انتخاب و مورد بررسی مقایسه‌ای قرار گرفتند.

در همین راستا روزانو (Rosano) در مقاله‌ای مروری به مسائل موجود در پروسهٔ بیان پروتئین‌های نوترکیب و راه حل‌های غلبه بر آن‌ها در *E.coli* پرداخته و بیان می‌کند حتی پس از انتخاب دقیق پلاسمید و میزبان، نمی توان پیش‌بینی کرد که پروتئین به مقدار زیاد و به شکل فعال محلول در آید (۲) و وجود این احتمال یعنی پیدایش مشکل در رابطه با بیان پروتئین می‌تواند همه چیز را پیچیده کند.

لیو و یانگ (Liu & Yang) نیز در پژوهش خود به این نتیجه رسیده‌اند که انتخاب استراتژی بیان نظیر انتخاب وکتور و میزبان با توجه به مقدار مورد نیاز، خلوص و فعالیت پروتئین باید با دقت زیادی تعیین گردد (۶). در جستجویی که با هدف بررسی تأثیر مستقیم نوع وکتور بر بیان صورت گرفت، مطالعه‌ای بر اساس مقایسهٔ سه نوع وکتور بیانی با پروموترهای اصلاح شده[2] یافت گردید که طی آن بیان پروتئین Green Fluorescent Protein (GFP) در گونه‌های لاکتوباسیلوس روتری مقایسه شده است. در نتیجه‌گیری آن‌ها به مؤثر بودن پروموترهای طراحی شده به عنوان یک جایگزین تأثیرگذار در وکتورهای بیانی قابل القاء با نایسین جهت بیان پروتئین‌های هترولوگ اشاره شده است (۱۲). در رابطه با گرفتن بیان از وکتور pET25b نیز در ریسرچ

[2] Modified

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]

گیت[۳] تبادل نظرهایی وجود داشت و به‌صورت موردی چالش نداشتن بیان با این وکتور توسط تعدادی محقق مورد بررسی و نظرخواهی قرار گرفته است. همان‌طور که در قسمت مقدمه راجع به ساختمان وکتورهای منتخب گفته شد وجه تمایز وکتور pET25b از وکتور pET32a وجود یک توالی نشانه به نام pelB می‌باشد که سبب هدایت پروتئین بیان شده از سیتوپلاسم به فضای پری‌پلاسمی باکتری می‌شود و از آن طرف pET32a دارای یک تگ TrxA اختصاصی برای افزایش حلالیت پروتئین بیان شده است. لذا با توجه به برخورداری مشترک هر دو وکتور از یک نوع پروموتر مشابه یعنی T7 می‌توان به این نتیجه رسید که عدم مشاهدهٔ باند مورد انتظار از پروتئین نوترکیب خصوصاً بعد از انجام آزمایش وسترن بلات برای لیزابه باکتری حاوی وکتور pET25b (شکل ۳ سمت راست)، ناشی از عدم توانایی تولید پروتئینی محلول با ساختار مناسب توسط این وکتور بوده است به‌طوری‌که این محدودیت با اضافه شدن یک تگ با توانایی افزایش حلالیت به پروتئین تا حدود زیادی برطرف شده و منجر به حصول پروتئین نوترکیب در لیزابه باکتری گردیده است (شکل ۳ سمت چپ). با توجه به اینکه در آزمایش وسترن بلات لیزابه باکتری حاوی وکتور pET25b یک باند تقریباً ۳۰ کیلودالتونی ظاهر شد، با استفاده از منابع در دسترس به بررسی این موضوع پرداختیم و جالب اینکه با مقاله‌ای مواجه شدیم که توسط محمود و همکاران نوشته شده و در آن بیان کرده‌اند چنانچه باند غیراختصاصی با استفاده از هیس‌تگ آنتی‌بادی مشاهده شد ممکن است به دلیل وجود پروتئین‌های دیگر حاوی تکرارهای هیستدین درون لیزابه باشد (۱۳). در صفحات عیب‌یابی وسترن‌بلات شرکت Bio-Rad نیز در چنین موردی دلایلی نظیر هضم شدن پروتئین هدف، وجود پروتئین‌های حاصل از اسپلایسینگ mRNA و باز هم وجود پروتئین دیگری با برخورداری از چند تکرار هیستیدین در لیزابه مطرح شده است (۱۴).

به هر حال وکتور pET25b به‌طور کاملاً موفقیت‌آمیزی در مطالعات مختلف برای بیان پروتئین‌های نوترکیب دیگری با ساختار متفاوت مورد استفاده قرار گرفته (۱۷-۱۵) و حتماً به وفور استفاده خواهد شد و این توجه ما را به فاکتور مهم دیگر یعنی نوع توالی طراحی شده در آزمایش معطوف کرد مبنی بر اینکه توالی‌های آنتی‌ژنی کایمریک متشکل از اپی‌توپ‌های مختلف با استفاده از این وکتور احتمالاً با مشکل عدم یا ضعیف بودن بیان مواجه خواهند شد. همان‌طور که روزانو و همکاران نیز معتقدند استراتژی‌های عیب‌یابی در بیان پروتئین نوترکیب بعضی اوقات اختصاصی پروتئین هستند (۲). گرچه بیان اینگونه قطعات ژنی در شرایط نرمال هم به دلیل احتمال سمی بودن آن‌ها برای سلول میزبان خالی از اشکال نیست و روی هم رفته سطح بیان ضعیف‌تری نسبت به بیان ژن‌های طبیعی به‌دست آمده از موجودات زنده دارند (۲۱-۱۸)، اگر این موضوع با مسالهٔ توانایی وکتور برای تولید پروتئین محلول همراه شود یقیناً چالشی جدی به‌وجود خواهد آورد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تولید پروتئین نوترکیب محلول در pET25b با اشکالاتی همراه است که حتی با وسترن‌بلات نیز قابل تشخیص نبود و این احتمالاً به دلیل شرایط خاص سازهٔ طراحی شده که متشکل از اپی توپ‌های مختلف بوده و برای تولید موفق احتیاج به فاکتوری جهت افزایش حلالیتش در سلول باکتری

[۳] یک شبکه اجتماعی علمی برای پژوهشگران، دانشمندان، استادان و دانشجویان سراسر جهان در جهت ارتباط، همکاری، پرسش و پاسخ و مبادله‌های علمی است.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]

میزبان بوده است رخ داده. وکتور بیانی pET32a با افزایش حلالیت پروتئین نوترکیب در موفق بودن بیان و قابل حصول شدن پروتئین مؤثرتر عمل کرد.

همان‌طور که گفته شد در استراتژی‌های عیب‌یابی بیان مسائل زیادی مورد بررسی قرار گرفته است و در این مطالعه، تأثیر نوع وکتور بر بیان ساختار خاصی از پروتئین نوترکیب تا حدودی آشکار گردید. بنابراین پیشنهاد می شود با استفاده از وکتورهای مشابه یا متفاوت همچنین سازه‌های سنتتیک دیگر بررسی‌هایی جهت تأئید یا رد این ادعا صورت گیرد تا با مقایسهٔ نتایج حاصل از مطالعات مختلف به جمع‌بندی معتبرتری برسیم.

این پژوهش در دانشگاه علوم پزشکی بوشهر انجام شده و تحت حمایت مالی هیچ سازمان یا ارگانی نبوده است.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Mesa-Pereira B, Rea MC, Cotter PD, et al. Heterologous Expression Of Biopreservative Bacteriocins With A View To Low Cost Production. Front Microbiol 2018; 9: 1654.

2.Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant Protein Expression In Escherichia Coli: Advances And Challenges. Front Microbiol 2014; 5: 172.

3.Faria AR, De Castro Veloso L, Coura-Vital W, et al. Novel Recombinant Multiepitope Proteins For The Diagnosis Of Asymptomatic *Leishmania Infantum*-Infected Dogs. Plos Negl Trop Dis 2015; 9(1): e3429.

4.Oliveira GG, Magalhães FB, Teixeira MC, et al. Characterization Of Novel *Leishmania Infantum* Recombinant Proteins Encoded By Genes From Five Families With Distinct Capacities For Serodiagnosis Of Canine And Human Visceral Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2011; 85(6): 1025-34.

5.Alibakhshi A, Bandehpour M, Kazemi B. Cloning, Expression And Purification Of A Polytopic Antigen Comprising Of Surface Antigens Of Toxoplasma Gondii. Iran J Microbiol 2017; 9(4): 251-6.

6.Liu ZQ, Yang PC. Construction Of Pet-32 A (+) Vector For Protein Expression And Purification. N Am J Med Sci 2012; 4(12): 651-5.

7.Rietsch A, Belin D, Martin N, et al. An In Vivo Pathway For Disulfide Bond Isomerization In Escherichia Coli. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(23): 13048-53.

8.Mierendorf RC, Morris BB, Hammer B, et al. Expression And Purification Of Recombinant Proteins Using The pET System. Totowa NJ: Humana Press, The Nucleic Acid Protocols Handbook, 2000, 947-77.

9.Geum L, Huber R, Leung N, et al. Construction Of Recombinant Expression Vectors To Study The Effect Of Thioredoxin On Heterologous Protein Solubility. J Microbiol Immunol Infect 2015; 19: 1-5.

10.Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion Protein Linkers: Property, Design And Functionality. Adv Drug Deliv Rev 2013; 65(10): 1357-69.

11.Sadeghi M, Doosti A. Cloning And Study Of Expression Of Helicobacter Pylori FlaAgene In Eukaryotic System. Iran South Med J 2017; 20(3): 245-56. (Persian)

12.Lizier M, Sarra PG, Cauda R, et al. Comparison Of Expression Vectors In Lactobacillus Reuteri Strains. FEMS Microbiol Lett 2010; 308(1): 8-15.

13.Mahmood N, Xie J. An Endogenous 'Non-Specific' Protein Detected By A His-Tag Antibody Is Human Transcription Regulator YY1. Data Brief 2015; 2: 52-5.

14.Western Blot Troubleshooting: Unusual or Unexpected Bands. Western Blot Troubleshooting: Unusual or Unexpected Bands Bio-Rad. (Accessed June 27, 2020, at https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blot-unusual-unexpected-bands-western-blotting.html)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]

15.Tobias AM, Toska D, Lange K, et al. Expression, Purification, And Inhibition Profile Of Dihydrofolate Reductase From The Filarial Nematode Wuchereria Bancrofti. PloS One 2018; 13(5): e0197173.
16.Wang J, LI Y, Guo F, et al. Expression And Activity Identification Of A Human Nasopharyngeal Carcinoma I50 Anti-Idiotype Antibody. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2011; 36(3): 185-91.
17.Lu Q, Li X, Zhao J, et al. Nanobody-Horseradish Peroxidase And-EGFP Fusions As Reagents To Detect Porcine Parvovirus In The Immunoassays. J Nanobiotechnol 2020; 18(1): 7.
18.Lee HB, Piao DC, Lee JY, et al. Artificially Designed Recombinant Protein Composed Of Multiple Epitopes Of Foot-And-Mouth Disease Virus As A Vaccine Candidate. Microb Cell Fact 2017; 16(1): 33.
19.Wang X, Xie G, Liao J, et al. Design And Evaluation Of A Multi-Epitope Assembly Peptide (MEAP) Against Herpes Simplex Virus Type 2 Infection In BALB/c Mice. Virol J 2011; 8: 232.
20.Boarino A, Scalone A, Gradoni L, et al. Development Of Recombinant Chimeric Antigen Expressing Immunodominant B Epitopes Of *Leishmania Infantum* For Serodiagnosis Of Visceral Leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12(5): 647-53.
21.Jaramillo Ortiz JM, Montenegro VN, De La Fournière SA, et al. Development Of An Indirect ELISA Based On A Recombinant Chimeric Protein For The Detection Of Antibodies Against Bovine Babesiosis. Vet Sci 2018; 5(1): 13.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]

Iran South Med J 2020; 23(2): 143-152

Original Article

Comparative Evaluation of Expression Vectors (pET32a and pET25b) in Expression of Polyepitopic Sequence Synthesized from *Leishmania infantum* Antigens

M. Taherzadeh (PhD)[1*], MA. Fouladvand (PhD)[2**], B. Kazemi (PhD)[3]

[1] Department of microbiology, School of Agriculture and Basic Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

[2] The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

[3] Cellular and Molecular Biology Research Center, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received 11 Aug, 2019 Accepted 15 May, 2020)

Abstract

Background: Molecular methods are nowadays used to diagnose diseases, produce vaccines, drugs and recombinant proteins. Therefore, one of the important steps in these procedures is selecting the appropriate vector for cloning and expression of the target genes. Because the expression of synthetic polygenes or so-called chimeric antigens with high molecular weight requires special conditions, the aim of this study was to evaluate the importance of vector type for expression of such antigens.

Materials and Methods: The 1250bp sequence consisting of epitopes from eight important antigens of *Leishmania infantum* parasite was designed and synthesized by Biomatic Company (Cambridge, Canada). The sequence was cloned separately in two expression vectors pET25b and pET32a and then transformed into *E.coli BL21 (DE3)* and expressed under similar appropriate conditions. Bacterial lysates were analyzed by SDS PAGE and evaluated by Western blotting.

Results: of SDS- PAGE and Western blot analysis showed that intact recombinant protein production by pET25b vector was not successful. However, the recombinant protein resulted from the expression of the aforementioned poly-epitope in pET32a vector was successfully produced and confirmed.

Conclusion: According to the successful expression confirmation of the poly-epitopic sequence within the pET32a vector and furthermore the failure to obtain protein in the pET25b vector showed that in the case of some specific mosaic sequences expression, protein isolation will be difficult because of low solubility. So, the expression vector choose should be made more carefully.

Keywords: Poly-epitopic structure, *Leishmania infantum*, Expression level, pET25b vector, pET32a vector

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Taherzadeh M, Fouladvand MA, Kazemi B. Comparative Evaluation of Expression Vectors (pET32a and pET25b) in Expression of Polyepitopic Sequence Synthesized from Leishmania infantum Antigens. Iran South Med J 2020; 23(2): 143-152

Copyright © 2020 Taherzadeh, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[**]*Address for correspondence:* The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
Email: mfooladvand39@yahoo.com
*ORCID: 0000-0002-3792-2194
** ORCID: 0000-0001-7302-6840

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.143]