



مقایسه وکتورهای بیانی pET25b و pET32a در بیان توالی پلی اپیتوپی سنتز شده از آنتی ژن های 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 خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۳ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

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

چکیده

زمینه: امروزه از روش های مولکولی در تشخیص بیماری ها، تولید واکسن ها، داروها و تولید پروتئین های نو ترکیب استفاده می شود، لذا یکی از مراحل مهم انتخاب وکتور مناسب برای کلون و بیان ژن های هدف است. از آنجا که بیان پلی ژن های سنتتیک یا اصطلاحاً آنتی ژن های کایمریک با وزن مولکولی بالا نیاز به شرایط ویژه ای دارد، مطالعه حاضر به هدف ارزیابی میزان اهمیت نوع وکتور برای بیان اینگونه آنتی ژن ها انجام شد. مواد و روش ها: توالی ۱۲۵۰ جفت بازی متشکل از اپی توپ های هشت آنتی ژن مهم انگل لیشمانیا اینفانتوم طراحی و توسط شرکت بیوماتیک (کانادا) سنتز شد. توالی به صورت جداگانه درون دو وکتور بیانی pET25b و pET32a کلون و سپس به باکتری E.coli BL21(DE3) ترانسفورم و تحت شرایط مشابه بیان شدند. لیزاب باکتری توسط SDS PAGE بررسی و با وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته ها: نتایج SDS PAGE و وسترن بلات نشان داد که تولید پروتئین نو ترکیب کامل و بی نقص توسط وکتور pET25b موفقیت آمیز نبوده است. این در حالی بود که پروتئین نو ترکیب حاصل از بیان توالی پلی اپی توپی مذکور در وکتور pET32a به صورت موفقیت آمیزی تولید و تأیید گردید. نتیجه گیری: با توجه به بیان موفقیت آمیز توالی پلی اپی توپی درون وکتور pET32a و شناسایی و تأیید پروتئین مربوطه، از طرفی عدم موفقیت حصول پروتئین در وکتور pET25b نشان داد که در مورد بیان برخی توالی های موزائیکی خاص کم بودن ویژگی حلالیت ممکن است به طور کلی دستیابی به پروتئین را با مشکل مواجه کند بنابراین انتخاب نوع وکتور بیانی باید با دقت بیشتری صورت گیرد.

واژگان کلیدی: توالی پلی اپی توپی، لیشمانیا اینفانتوم، سطح بیان، وکتور pET32a، وکتور pET25b

*بوشهر، مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

Email: mfooladvand39@yahoo.com

*ORCID: 0000-0002-3792-2194

** ORCID: 0000-0001-7302-6840

مقدمه

هم اکنون تعداد زیادی پلاسمید جهت انجام کلون و بیان پروتئین نو ترکیب به صورت تجاری در دسترس قرار دارند که معمولاً انتخاب هر کدام از آن‌ها به هدف مطالعه، کمیت و کیفیت پروتئین نو ترکیب مورد نظر وابسته است. مهم ترین خصوصیات موجود در اکثر وکتورهای بیانی پروموتور، 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 می‌بایست مورد توجه قرار گیرند (۱).

ساختارهای پلی ژنی سنتتیک یا قطعات آنتی ژنی کایمیریک، توالی‌های ژنی مصنوعی هستند متشکل از تعدادی سکانس ژنی کوتاه که به وسیله یک قطعه 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 کایمیریک برای تولید پروتئین نو ترکیب با کمیت و کیفیت مناسب دارد، معمولاً انتخاب نوع وکتور بیانی یکی از دغدغه‌های مهم به شمار می‌رود زیرا کلون و بیان این قطعات کایمیریک در مقایسه با کلون و بیان توالی‌های 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 واکنش‌های نو ترکیب از آنتی ژن‌های سنتتیک مورد آزمایش قرار گرفته‌اند و در اکثر این

گزارش‌ها با وجود موفقیت‌آمیز بودن بیان، میزان تولید پروتئین نو ترکیب از نظر کمی رضایت بخش نبوده است (۳-۵).

وکتور بیانی pET25b سایزی تقریباً معادل ۵/۵ کیلو باز دارد و پروموتورش از نوع lac1 است و مقاوم به آمپیسیلین می‌باشد. دارای دو توالی چسبان HSV یا His در قسمت C-ترمینال بوده و یک توالی نشانه 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 نو ترکیب 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 تاخورد 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 پروموتور T7 که دارای سه تگ His، Trx 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 نو ترکیب 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 به صورت اینکلوزن بادی کاهش می‌یابد. به عبارتی تگ TrxA در

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

در مطالعه حاضر مقایسه‌ای در رابطه با چگونگی بیان یک سازه پلیدیوپیک 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 سازه پلی‌اپی‌تویی متشکل از ۸ اپی توپ خطی لیسمانیا / اینفانتوم

پس از انتخاب ۸ آنتی ژن مهم انگل لیسمانیا / اینفانتوم (GP63, TRYP, CPA, LACK, H2A, H3, HSP-70 و KMP-11)^۱ و بررسی توالی ژنی آنها در NCBI هر کدام به‌طور جداگانه از نظر اپی‌توپ‌هایی 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 آنتی ژن دیگر به‌وسیله 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 آن‌ها به‌وسیله قطعات اتصال دهنده پنج اسید آمینه‌ای انعطاف‌پذیر شامل چهار اسید آمینه گلايسین و یک اسید آمینه سرین (۱۰) بصورت یک سازه چند اپی‌تویی طراحی گردید.

کلون و بیان سازه چند اپی‌تویی

سنتز سازه 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 محدودالتر 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 آنزیم‌های محدودالتر و الکتروفورز (BioRad) بر روی ژل آگارز ۱ درصد کلون شدن سازه پلی‌اپی‌تویی در وکتورهای فوق‌الذکر مورد تأیید قرار گرفت.

پس از تأیید 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

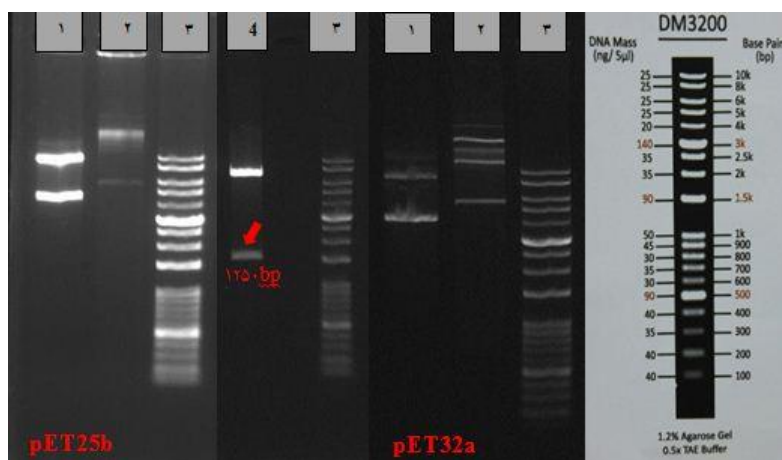
پروتئین نوترکیب حاصل از بیان ژن پلی‌اپی‌تویی در هر دو وکتور به‌وسیله تست SDS-PAGE (۱۱) و با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد

¹ GP63: Glycoprotein 63 or leishmanolysin, TRYP: trypanredoxin 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.

یافته‌ها

پس از کلون شدن توالی کایمربیک درون وکتورهای pET25b و pET32a، برای بررسی و تأیید کلونینگ در وکتور اول، برش قطعه 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 مقایسه 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 پلی‌آپی توپی سنتز شده همان سکانس سفارش داده شده است، قطعه کلون شده در هر دو نوع وکتور مجدداً تعیین توالی گردیدند. نتیجه مقایسه 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.

(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 لیزاب باکتری مشاهده گردید که جهت تأیید 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 به صورت شش اسید آمینه هیستیدین متصل به توالی اصلی پروتئین نوترکیب در وکتور طراحی شده است) انجام شد.



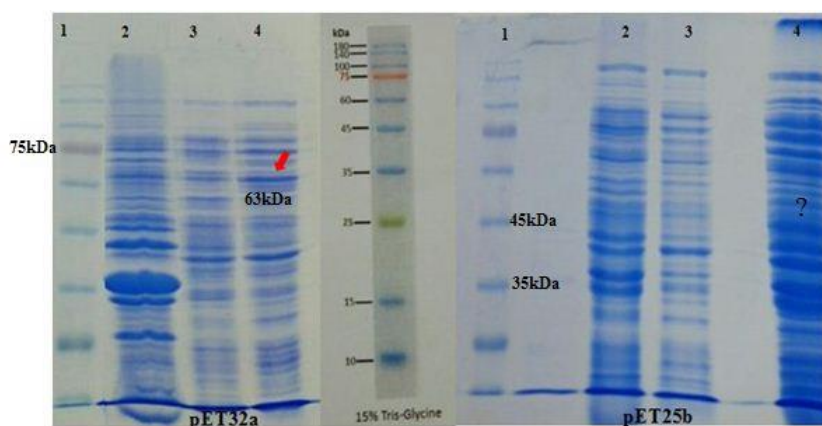
شکل ۱) الکتروفورز ژل آگاروز (۱ درصد) ستون‌های ۱ وکتور سالم، ستون‌های ۲ وکتور کلون شده، ستون‌های ۳ مارکر، ستون ۴ قطعه کلون شده

سانتی‌گراد با رقت ۰/۵ میلی‌مولار القاء گر قدرت بیان بیشتری برای دست یافتن به پروتئین نوترکیب خواهد داشت. شکل ۲ که نتیجه بررسی بیان توالی پلی‌آپی توپی

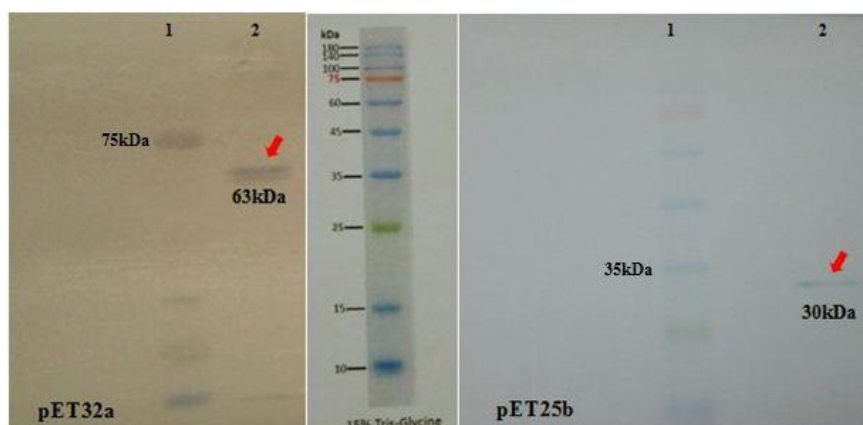
در مرحله بهینه کردن شرایط بیان، معلوم شد باکتری ترانسفورم شده در محیط Terrific broth که محیطی غنی‌تر است رشد بهتری داشته و در دمای ۲۰-۱۸ درجه

پروتئین ۶۳ کیلو دالتونی (مجموع توالی مولتی اپی توپ و تگ *trx* چسبیده به پروتئین اصلی) را به صورت تقریبی تأیید کرد (پیکان قرمز رنگ). در مرحله بعد، برای رفع تردیدها و تأیید باندهای مشاهده شده روی ژل اکریل آمید تست وسترن بلات انجام شد (شکل ۳).

در باکتری BL₂₁ به عنوان میزبان وکتورهای pET25b و pET32a به وسیله SDS-PAGE را نشان می دهد، 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



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)

در این تست که دقیقاً با تکرار ژل اکریل آمید مرحله قبل و با استفاده از آنتی بادی نشاندار ضد تگ his انجام شد، به صورت 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 می دهد، 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 تأیید بیان پروتئین نوترکیب در هر دو نوع وکتور سه بار تکرار شده اند.

بحث

در سال های اخیر با گسترش رو به رشد آزمایش و تولید واکسن های نوترکیب، محققین بنا به ضرورت و اقتضای مطالعات خود انواعی از وکتورهای کلونینگ و بیانی ساخته شده توسط شرکت های گوناگون را مورد استفاده قرار داده اند. در گزارش های به چاپ رسیده در این نوع مطالعات با وجود موفقیت در کلونینگ ژن ها 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 آزمایش های بیوتکنولوژی خصوصاً در رابطه با بیان پروتئین های نوترکیب می تواند در پیشرفت این زمینه رو به رشد کمک شایان توجهی بکند بر آن شدیم مطالعه 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 مطالعه حاضر تولید پروتئینی نوترکیب با عملکرد و ساختار مناسب و در عین حال دارای حلالیت پذیری 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 مقایسه ای قرار گرفتند.

در همین راستا روزانو (Rosano) در مقاله ای مروری به مسائل موجود در پروسه بیان پروتئین های نوترکیب و راه حل های غلبه بر آن ها در *E. coli* پرداخته و بیان می کند حتی پس از انتخاب دقیق پلاسمید و میزبان، نمی توان پیش بینی 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 می تواند همه چیز را پیچیده کند.

لیو و یانگ (Liu & Yang) نیز در پژوهش خود به این نتیجه رسیده اند 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، مطالعه ای بر اساس مقایسه سه نوع وکتور بیانی با پروموتورهای اصلاح شده^۲ یافت گردید که طی آن بیان پروتئین (GFP) Green Fluorescent Protein در گونه های لاکتوباسیلوس روتری مقایسه شده است. در نتیجه گیری آن ها به مؤثر بودن پروموتورهای طراحی شده به عنوان یک جایگزین تأثیرگذار در وکتورهای بیانی قابل القاء با نایسین جهت بیان پروتئین های هترولوگ اشاره شده است (۱۲). در رابطه با گرفتن بیان از وکتور pET25b نیز در ریسرچ

² Modified

گیت^۳ تبادل نظرهایی وجود داشت و به صورت موردی چالش نداشتن بیان با این وکتور توسط تعدادی محقق مورد بررسی و نظرخواهی قرار گرفته است. همان طور 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 می باشد که سبب هدایت پروتئین بیان شده از سیتوپلاسم به فضای پری پلاسمی باکتری می شود 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 پروموتور مشابه یعنی T7 می توان به این نتیجه رسید که عدم مشاهده 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 به طوری که 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 مقاله ای مواجه شدیم که توسط محمود و همکاران نوشته شده و در آن بیان کرده اند چنانچه باند غیراختصاصی با استفاده از هیس تگ آنتی بادی مشاهده شد ممکن است به دلیل وجود پروتئین های دیگر حاوی تکرارهای هیستیدین درون لیزابه باشد (۱۳). در صفحات عیب یابی وسترن بلات شرکت Bio-Rad نیز در چنین

موردی دلایلی نظیر هضم شدن پروتئین هدف، وجود پروتئین های 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 به طور کاملاً موفقیت آمیزی در مطالعات مختلف برای بیان پروتئین های 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 توالی های آنتی ژنی کایمریک متشکل از اپی توپ های مختلف با استفاده از این وکتور احتمالاً با مشکل عدم یا ضعیف بودن بیان مواجه خواهند شد. همان طور که روزانو و همکاران نیز معتقدند استراتژی های عیب یابی در بیان پروتئین نوترکیب بعضی اوقات اختصاصی پروتئین هستند (۲). گرچه بیان اینگونه قطعات ژنی در شرایط نرمال هم به دلیل احتمال سمی بودن آن ها برای سلول میزبان خالی از اشکال نیست و روی هم رفته سطح بیان ضعیف تری نسبت به بیان ژن های طبیعی به دست آمده از موجودات زنده دارند (۲۱-۱۸)، اگر این موضوع با مسأله توانایی وکتور برای تولید پروتئین محلول همراه شود یقیناً چالشی جدی به وجود خواهد آورد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تولید پروتئین نوترکیب محلول در pET25b با اشکالاتی همراه است که حتی با وسترن بلات نیز قابل تشخیص نبود و این احتمالاً به دلیل شرایط خاص سازه طراحی شده که متشکل از اپی توپ های 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 مبادله های علمی است.

ادعا صورت گیرد تا با مقایسه 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.

میزبان بوده است رخ داده. وکتور بیانی pET32a با افزایش حلالیت پروتئین نو ترکیب 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 نو ترکیب تا حدودی آشکار گردید. بنابراین پیشنهاد می‌شود با استفاده از وکتورهای مشابه یا متفاوت همچنین سازه‌های سنتتیک دیگر بررسی‌هایی جهت تأیید یا رد این

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>)

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-Idiotypic 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-Horse-radish 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. *Virology* 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.

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 reserved

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>