ORIGINAL ARTICLE

Cloning, Expression, Purification and Evaluation of Recombinant Lysostaphin using pBAD Cloning System

Alireza Mordadi[1],
Fahimeh Haji Ahmadi[2],
Sara Soleimani Asl[3],
Mohammd Reza Arabestani[4,5],
Piotr Szweda[6]

[1] MSc Student in Medical Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[2] PhD Student in Medical Bacteriology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[5] Assistant Professor, Brucellosis Research Centre, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[6] Assistant Professor, Faculty of Biotechnology, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

(Received April 18, 2015 ; Accepted July 27, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Staphylococcus aureus* is an important nosocomial pathogen which causes some diseases such as endocarditis, osteomyelitis, pneumonia, toxic shock syndrome, and food poisoning. The excessive and inappropriate use of antibiotics in the treatment of these diseases causes resistance to many antibiotics. Lysostaphin is an effective agent in the treatment of staphylococcal infections. The purpose of this study was to produce recombinant lysostaphin using pBAD cloning system.

Materials and methods: In first phase, the recombinant plasmid pBAD was built using pBAD/ Thio-TOPO system (pBAD). Then, the gene expression of lysostaphin was determined by Reverse Transcriptase-test. Afterwards, the gene expression was induced by l (+) - arabinose to a final concentration of 0.2% and the expressed protein was purified by affinity- chromotagraphy using Ni-NTA agarose (Qiagen, Hilden, Germany). Finally, the enzyme activity was evaluated by Mueller Hinton agar medium and inhibition zone was measured.

Results: The results of PCR and sequencing confirmed that the recombinant plasmid pBAD was created successfully. Protein expression using the l (+) - arabinose to a final concentration of 0.2% induced a very high concentration of the recombinant enzyme. Lysostaphin recombinant was found with highly specific activity against *Staphylococcus aureus.*

Conclusion: Lysostaphin recombinant enzyme using pBAD expression system is very cost effective and highly active against *Staphylococcus aureus.*

Keywords: Lysostaphin, recombinant proteins, *Staphylococcus*

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(128): 18-28 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۸ شهریور سال ۱۳۹۴ (۲۸-۱۸)

کلونینگ، بیان، خالص سازی و ارزیابی آنزیم لیزواستافین نوترکیب با استفاده از سیستم کلونینگ pBAD

علیرضا مردادی[۱]
فهیمه حاجی احمدی[۲]
سارا سلیمانی اصل[۳]
محمدرضا عربستانی[۴،۵]
پیوتر ژودا[۶]

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوک اورئوس یک پاتوژن مهم بیمارستانی بوده و باعث ایجاد بیماری‌هایی همچون اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندرم شوک سمّی و مسمومیت غذایی می‌گردد. امروزه استفاده بیش از حد و نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان این بیماری‌ها باعث مقاومت این ارگانیسم به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. لیزواستافین به عنوان یک عامل موثر و اختصاصی در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه تولید لیزواستافین نوترکیب با استفاده از سیستم کلونینگ pBAD می باشد.

مواد و روش‌ها: در مرحله اوّل، ساخت پلاسمید نوترکیب pBAD با استفاده از سیستم pBAD/Thio-TOPO تحت عنوان pBADLys انجام گرفت. سپس به منظور بیان ژن لیزواستافین از آزمون Reverse Transcriptase PCR استفاده گردید. در مرحله بعد، بیان لیزواستافین نوترکیب در سیستم pBAD انجام شد که بیان پروتئین با ال-آرابینوز در غلظت نهایی ۰/۲ درصد القاء گردید. سپس خالص سازی آنزیم با استفاده از ستون Ni-NTA agarose (Qiagene, Hilden, Germany) انجام گرفت و در نهایت بررسی فعالیت آنزیمی با استفاده از محیط مولر هینتون آگار و ایجاد هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با توجه به نتایج حاصل شده از PCR و تعیین توالی، پلاسمید نوترکیب pBAD با موفقیت ساخته شد. بیان پروتئین با استفاده از ال-آرابینوز در غلظت نهایی ۰/۲ درصد به خوبی القاء و غلظت بسیار بالایی از آنزیم نوترکیب با استفاده از سیستم کروماتوگرافی ستونی نیکل حاصل گردید. لیزواستافین نوترکیب دارای فعالیت بسیار اختصاصی بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد.

استنتاج: آنزیم لیزواستافین نوترکیب حاصل شده با استفاده از سیستم بیانی pBAD با توجه به میزان حاصل شده بسیار مقرون به صرفه از نظر هزینه می باشد و همچنین با عملکرد اختصاصی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار موثر است.

واژه های کلیدی: لیزواستافین، پروتئین نوترکیب، استافیلوکوک

مقدمه

استافیلوکوک اورئوس (*Staphylococcus aureus*) یک پاتوژن مهم بیمارستانی است که باعث بیماری‌هایی هم‌چون اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندرم شوک سمّی، مسمومیت غذایی، کربانکل و آبسه می‌شود.

مولف مسئول: محمدرضا عربستانی– همدان: دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبشناسی E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکوب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲. دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳. استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۴. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۶. استادیار، دانشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه گدانسک، گدانسک، لهستان
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۱/۳۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۵/۵

بیماری‌زایی این باکتری بر پایه تولید فاکتورهای ویرولانس بسیاری از جمله پروتئین A، کوآگولاز، کلاژناز، هیالورونیداز، همولیزین‌ها، لیپازها و توکسین‌های مختلف می‌باشد که از میان آن‌ها پروتئین A (SPA)، استافیلوکیناز و مولکول‌های متصل شونده به ایمونوگلوبولین‌ها مهم‌تر هستند.

درمان عفونت‌های استافیلوکوکی به‌طور اختصاصی بسیار مشکل می‌باشد، زیرا این ارگانیسم به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است. به‌همان سرعتی که آنتی‌بیوتیک‌های جدید معرفی می‌شوند به همان سرعت *استافیلوکوک اورئوس* به آن‌ها مقاوم می‌گردد. امروزه استفاده بیش از حد و نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌ها باعث مقاومت پاتوژن‌ها به این ترکیبات شده و آن‌ها را به ترکیباتی کم اثر تبدیل کرده است(۱). هم‌چنین تعداد پاتوژن‌هایی که به چندین نوع دارو مقاومت نشان می‌دهند، افزایش یافته است(۳-۱). مقاوم شدن باکتری‌ها به عوامل ضد باکتریایی مورد استفاده، یکی از نگرانی‌های اصلی در قسمت بالینی می‌باشد. بنابراین، یافتن عوامل ضد باکتریایی یکی از اصلی‌ترین محورهای تحقیقاتی در کل جهان محسوب می‌شود(۱).

از زمانی که میکروارگانیسم‌های مقاوم به داروهایی مانند متی سیلین و ونکومایسین سلامت عموم را به خطر انداخته اند، یک دسته جدید از آنتی‌بیوتیک‌ها با نام آنزیبیوتیک‌ها[1] با یک مکانیسم عمل جدید علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو گسترش پیدا کرده‌اند. آنزیبیوتیک‌ها بربر علیه بیماری‌های باکتریایی یا قارچی با استفاده از ویروس‌ها و یا پپتیدهای ضد میکروبی مقابله می کنند. ویژگی اصلی آنزیبیوتیک‌ها شامل مکانیسم عمل جدید ضد میکروبی، توانایی کشتن میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو و شانس ظهور کم‌تر مقاومت باکتریایی می‌باشد. از میان آنزیبیوتیک‌ها، لیزواستافین و لیزوزیم بیش از سایرین در مقاصد بالینی و موادغذایی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. باکتریوسین‌ها ترکیبات پروتئینی تولید شده توسط باکتری‌ها هستند که معمولاً فعالیت باکتریوسایدی (باکتری‌کشی) علیه سایر گونه‌های باکتریایی نشان می‌دهند(۴). در میان باکتریوسین‌های تولید شده توسط استافیلوکوک‌ها(۵)، لیزواستافین که پروتوتایپ این باکتریوسین‌ها است، بیشترین مطالعه را با توجه به کاربردهای بالینی به خود اختصاص داده است.

لیزواستافین یک آنزیم خارج سلولی است که توسط سویه *استافیلوکوک سیمولانس* بیوار استافیلولیتیکوس[2] [NRRL B-2628lgi/126496] ترشح می‌شود(۶). ژن لیزواستافین بر روی پلاسمید اندوپپتیداز (pACK1) کد شده است(۷).

حالت باکتریوسایدی این پپتید به خاطر توانایی آن در شکستن پیوند پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد. لیزواستافین، متالوآنزیم محتوی روی بوده که شامل ۲۴۶ اسید آمینه است. این آنزیم جرم مولکولی حدودا ۲۷ KDa، pI (Isoelectric point) ۹/۵ و pH بهینه ۷/۵ دارد(۸).

لیزواستافین به‌صورت پرو آنزیم ۴۹۳ اسید آمینه‌ای ساخته می‌شود که از طریق پپتید پیشرو در قسمت انتهای آمین دار با ۳۶ اسیدآمینه وارد مسیر ترشحی می‌گردد. مولکول لیزواستافین دارای دو بخش مجزا می‌باشد: ۱) بخش پپتیداز انتهای آمین که مسئول فعالیت کاتالیتیک پروتئین است(۹)؛ و ۲) بخش هدف انتهای کربوکسیلکه در اتصال به سوبسترای پپتیدوگلیکان دخیل می‌باشد(۱۱،۱۰). ژن اندوپپتیداز لیزواستافین (lss :lysostaphin gene) و ژن دخیل در مقاومت لیزواستافین (lif: lysostaphin immunity factor) بر روی پلاسمید pACK1 قرار دارند(۱۴-۱۲). lss و lif به واسطه توالی‌های ورودی، مجاور یکدیگر قرار می‌گیرند که ممکن است باعث شده باشند که پیشنهاد می‌دهد *استافیلوکوک سیمولانس* بیوار استافیلولیتیکوس این ژن‌ها را از طریق انتقال افقی ژن کسب کرده باشد(۱۲). ژن lss به‌صورت هتروژن در

1. Enzybiotic

2. Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus(

اشریشیا کلی[1] (۱۵)، رده سلول کلیوی میمون(۱۶) و *لاکتوکوکوس لاکتیس*[2](۱۷)، میکروارگانیسم دارای پتانسل بالای بیوتکنولوژیک، کلون و بیان شده است. Mierau و همکاران با استفاده از سیستم NICE [3] براساس مکانیسم تنظیمی اپرون نیسین(۱۸)، لیزواستافین را با بازده ۱۰ میلی‌گرم تولید کرده‌اند(۱۹،۱۷). همولوگ لیزواستافین، ALE-1 حاصل از *استافیلوکوکوس کپیتیس*[4] نیز شرح داده و شناسایی شده است. ساختار مولکولی و مکانیسم هدف‌گذاری آن، علاوه بر مقاومت تولید کننده، به نظر می‌رسد مشابه با موارد شرح داده شده در مورد لیزواستافین باشد(۲۱،۲۰). بنابراین، در تحقیق حاضر، کلونینگ و بیان این پروتئین کارآمد در سیستم pBAD مورد بررسی قرار گرفته است تا به عنوان یک عامل موثر و اختصاصی در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

سویه‌های باکتریایی، پلاسمیدها، آنزیم‌ها و واکنش‌دهنده‌ها

وکتور بیانی pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen, USA) به‌منظور ساخت سیستم‌های بیانی جهت تولید لیزواستافین نوترکیب استفاده شد. پلاسمید نوترکیب pRG5 (ATCC 67076) به‌عنوان منبع ژن لیزواستافین و سویه TOP10F *E.coli* (Invitrogen, USA) برای تهیه پلاسمیدها، کلون و بیان شده و لیزواستافین نوترکیب در سیستم‌های pBAD به کار گرفته شد(۲۲). آنزیم‌های محدود کننده از فرمنتاس (Fermentas) (لیتوانی)، و لیگاز از اپی‌سنتر (Epicentre) (USA) خریداری شدند. DNA پلاسمیدی و قطعات DNA حاصل از ژل آگارز به‌ترتیب با استفاده از کیت Plasmid Prep DNA و کیت Gel-Out جدا شده (A&A Biotechnology, Poland) و واکنش‌گرهای PCR از شرکت فرمنتاز به‌دست آمده‌اند. از محیط‌های LB Agar & LB Broth ساخت شرکت مرک، آلمان استفاده شد. ال- آرابینوز، آگارز، آمپی‌سیلین و تمام واکنش‌گرهای تخلیص پروتئین و بافرها از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شدند.

ساخت پلاسمیدهای بیانی

برای طراحی پرایمر، توالی شناخته شده ژن لیزواستافین از بانک ژنی NCBI (GenBank accession no. M15686) استخراج گردید. سپس براساس توالی ژن، پرایمرها شامل پرایمر روبه‌جلو LTS:

5'CAT CAT CAC CAT CAC CAT *ATA GAG GGC CGC* GCT GCA ACA CAT GAA CAT TCA GCA3'

و پرایمر معکوس LTK:

5'TTT GGT ACC *TCA* CTT TAT AGT TCC CCA AAG AAC ACC3

ساخته شدند(۲۲). این پرایمرها واجد جایگاه برش توسط آنزیم اندوپروتئاز فاکتور 10a (endoprotease Factor Xa) در قسمت‌هایی که به صورت ایتالیک می‌باشند، هستند. توالی پرایمر بالا که به‌صورت پررنگ هستند، مکمل توالی‌های نوکلئوتیدی ژن لیزواستافین می‌باشند. انتهای' ۵ پرایمر LTS حاوی یک توالی DNA کدکننده در هر دو بخش الحاقی His_6 (خط کشیده شده) می‌باشد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱میکرولیتر(۱۰μM) از هر پرایمر، ۱۰ng DNA از پلاسمید نوترکیب pRG5 و ۱۰ میکرولیتر از Master Mix تهیه شده از شرکت فرمنتاز انجام شد. PCR شامل دناتوراسیون اوّلیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون ثانویه برای ۱ دقیقه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر به مدت ۱ دقیقه در ۶۳ درجه سانتی‌گراد، گسترش DNA به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ چرخه و گسترش نهایی ۸ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. گرفت. پس از انجام واکنش PCR ، الکتروفورز محصولات PCR در

3. Escherichia coli
4. Lactococcus lactis
1. NIsin-Controlled gene expression
2. *Staphylococcus capitis*

ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۶۰ دقیقه و ولتاژ ۱۱۰ ولت انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز نتایج در زیر نور UV مشاهده شد.

کلون سازی

ژن لیزواستافین پس از برش با آنزیم‌های محدودالاثر به وسیله آنزیم T4 لیگاز در وکتور pBAD/Thio-TOPO با استفاده از سیستم کلونینگ (TOPO) (Invitrogen, USA)، برطبق دستورالعمل شرکت سازنده، کلون شد. به‌طور مختصر، پس از تکثیر با استفاده از پرایمرهای LTS و LTK، محصول PCR با کیت استخراج از ژل Gel-Out (A&A Biotechnology, Poland) تخلیص شده و میزان ۲ میکرولیتر (۰/۲ µg) آن با ۱ میکرولیتر (۰/۱µg) از محلول وکتور pBAD/Thio-TOPO ، ۱ میکرولیتر از محلول نمک ($MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار و NaCl ۲/۵ میلی مولار) و ۱ میکرولیتر آب استریل مخلوط شد. در نهایت پلاسمیدهای نوترکیب حاصل (pBADLys) با استفاده از محلول نمکی ذکر شده به درون باکتری مستعد شده *E. coli* TOP10F ، به عنوان میزبان بیانی منتقل شدند(۲۲). سپس هویت پلاسمیدهای نوترکیب حاصل از طریق توالی‌یابی ژن لیزواستافین با استفاده از سیستم توالی‌یابی خودکار تایید شد (Perkin-Elmer ABI Prism 377).

آزمون واکنش تکثیری زنجیره پلیمراز- ترانسکریپتاز معکوس[1]

به منظور تایید صحت بیان ژن لیزواستافین کلون شده، آزمون واکنش تکثیری زنجیره پلیمراز- ترانسکریپتاز معکوس با کیت تهیه شده از شرکت فرمنتاز و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. استخراج RNA ژنومی از *E.coli* TOP10F طبق دستور شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج RNA، جهت تکثیر ژن لیزواستافین، در ابتدا لازم بود که از RNA، DNA مکمل (cDNA) تهیه شود. بر این اساس به ۱۱ میکرولیتر از محلول حاصل از استخراج RNA، ۱ میکرولیتر (۵۰ پیکومول) از پرایمر راندوم هگزامر اضافه گردید و ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس این مخلوط بلافاصله بر روی یخ منتقل گردید. پس از گذشت ۵ دقیقه، به مخلوط فوق ۴ میکرولیتر بافر RT (۵x)، ۲ میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی‌مولار dNTPs و ۱ میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase اضافه گردید. در مرحله بعد پس از ۵ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس افزودن ۱ میکرولیتر آنزیم ریوری ترنس کریپتاز، ساخت cDNA به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت و با ۱۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد پایان یافت. جهت تکثیر cDNA ساخته شده واکنش PCR با استفاده از پرایمر و دماهای از پیش گفته شده انجام پذیرفت.

بیان لیزواستافین نوترکیب در سیستم pBAD

برای بیان پروتئین نوترکیب، کلنی تکی از *E. coli* TOP10F واجد پلاسمید نوترکیب در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی ۱۰۰ mg/L آمپی‌سیلین تلقیح داده شد و پس از ۱۰ تا ۱۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوادهی با دور ۱۵۰ rpm، جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ nm به حدود ۱/۲ تا ۱/۵ رسید. متعاقبا ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی به یک لیتر از محیط LB حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰ mg/L انتقال داده شد. سپس مجدد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوادهی با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شد تا جذب نوری آن به حدود ۰/۲ رسید. بیان پروتئین در این زمان با اضافه نمودن ال- آرابینوز ۰/۲ درصد القا گردید و پس از ۱۰ تا ۱۲ ساعت (از لحظه فعال شدن) برداشت شدند. در نهایت بیان پروتئین با روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. برای این عمل ژل پلی‌آکریل آمید جدا کننده ۱۲/۵ درصد مورد استفاده قرار گرفت که در نهایت به وسیله روش کوماسی بلو (R250) رنگ‌آمیزی شد.

1. Reverse Transcriptase PCR

خالص سازی آنزیم لیزواستافین نوترکیب

سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفوژ از ۱ لیتر محیط کشت داده شده جمع‌آوری شدند. سپس به ازای هر گرم سلول باکتری ۵ میلی‌لیتر از بافر شامل ۲۰ میلی‌مولار Tris–HCl، ۵۰۰ میلی‌مولار NaCl در PH= ۷/۵ و ۱ گرم آلومینوم اکساید جهت لیز باکتری اضافه گردید و با دور ۵۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. متعاقبا مایع رویی برای مراحل خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به این که قطعه ژنی کلون شده در ناحیه‌ی انتهایی آمینی خود دارای توالی 6His-tag است، پروتئین بیان شده که همراه با His-tsg می‌باشد، به وسیله کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون دارای رزین نیکل Ni-NTA agarose (Qiagene, Hilden, Germany) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص گردید. سپس پروتیئن خالص شده با استفاده از بافر PBS (PH= ۷/۵) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب دیالیز شد. کیفیت لیزواستافین نوترکیب با استفاده از SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی فعالیت آنزیمی

فعالیت باکتریوسایدی لیزواستافین از طریق اندازه‌گیری اسپکتروفوتومتری کدورت برطبق روش مارووا (Marova) و کووار (Kovar) (۲۳) همراه با اصلاحات جزئی انجام شد. در این روش ۶ میلی لیتر از سوسپانسیون سلول‌های *استافیلوکوک اورئوس* رقیق شده به محیط LB broth تلقیح شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری محیط کشت در طول موج nm ۶۰۰ به ۰/۲۵ رسید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر، ۳۰۰ میکرولیتر و ۱۰۰۰ میکرولیتر از لیزواستافین خالص شده به محیط فوق افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تغییرات کدورت مخلوط واکنش مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین فعالیت باکتریوسایدی لیزواستافین با استفاده از محیط مولر هینتون آگار و ایجاد هاله عدم رشد نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این تست باکتری‌های *استافیلوکوک اورئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*[1]، *اشریشیا کلی* و *انتروکوک فاسیوم*[2] مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از استاندارد نیم مک فارلند(۲۴) سوسپانسیون باکتری‌های ذکر شده تهیه گردید و بر روی محیط مولر هینتون آگار که از قبل چاهک‌هایی بر روی آن ایجاد شده بود کشت داده شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از آنزیم خالص شده به چاهک‌ها افزوده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

ساخت پلاسمیدهای pBADLys نوترکیب

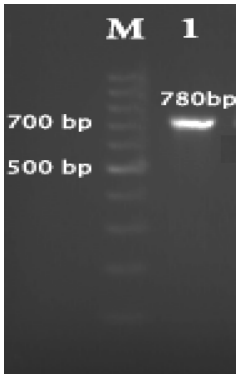
محصولات حاصل از تکثیر پرایمرهای LTS و LTK به درون پلاسمیدهای pBAD/Thio-TOPO همان‌گونه که در بالا شرح داده شد، کلون شدند. پلاسمید حاصل، pBADLys نام گرفت. توالی نوکلئوتیدی این سازه‌ها توسط تعیین توالی تایید شدند تا اطمینان حاصل شود که قالب خوانش صحیح بوده است. پروتئین هدف تولید شده در سیستم pBADLys در انتهای آمین خود واجد شش هیستیدین برای تخلیص آنزیم نوترکیب از طریق کروماتوگرافی تمایل یونی- فلزی بوده است.

آزمون واکنش تکثیری زنجیره پلیمراز - ترانسکریپتاز معکوس (RT-PCR)

بررسی کیفی بیان ژن در سطح RNA به وسیله تکنیک RT-PCR انجام گرفت. مولکول cDNA سنتز شده به عنوان الگوی انجام واکنش PCR در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاصل بر روی ژل آگارز مشاهده گردید. براساس نتایج الکتروفرز مشخص گردید که آزمون RT-PCR با استفاده از پرایمرهای

1. *Staphylococcus epidermidis*
2. *Enterococcus faecium*

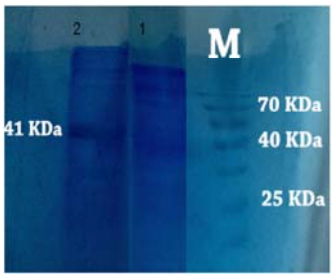
طراحی شده منجر به ساخت یک قطعه ۷۸۰ bp DNA شده بود که با نتایج قابل انتظار همخوانی داشت. بنابراین ژن سازنده لیزواستافین با موفقیت تکثیر داده شده بود (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: نتایج حاصل از RT-PCR. ستون ها به ترتیب از سمت چپ به راست عبارتند از: ستون M: DNA سایز مارکر bp-۱۰۰(شرکت فرمنتاس)؛ ستون۱: باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

ستون ها به ترتیب از سمت راست به چپ عبارتند از: ستون M: سایز مارکر پروتئینی با جرم مولکولی ۲۰۵، ۱۱۶، ۹۷، ۸۴، ۶۶، ۵۵، ۴۵، ۳۶، ۲۹، ۲۴، ۲۰، ۱۴/۲ ۱۴/۲، ۶/۵ کیلو دالتون از شرکت Sigma–Aldrich؛ ستون ۱: نمونه محیط LB broth که باکتری در آن کشت داده شده است (بدون القاء ال– آرابینوز)؛ ستون شماره ۲: نمونه محیط LB broth که باکتری در آن کشت داده شده است (با القاء ال- آرابینوز).

سیستم بیانی ذکر شده باعث تولید بالای لیزواستافین نوترکیب شده است. باندهای منطبق با پروتئین kDa ۴۱ بر روی SDS-PAGE مربوط به *E. coli* TOP10F' + pBADLys مشاهده شد. در این سیستم، لیزواستافین نوترکیب به‌صورت محلول در سیتوزول (بدون اجسام درون سلولی یا آنزیم‌های خارج سلولی) بوده و بیان کاملی داشته است. بهینه‌سازی بیان در مورد سیستم pBAD مشاهده شد که در آن بیان لیزواستافین با آل- آرابینوز در غلظت نهایی ۰/۲ درصد با جذب نوری ۰/۲ تا ۰/۳ در طول موج ۶۰۰nm القا شده است (تصویر شماره ۲). غلظت آل- آرابینوز در محدوده ۰/۱ تا ۱ درصد (۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱) بر سطح بیان لیزواستافین نوترکیب در سیستم pBAD تاثیری نداشته است (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).



تصویر شماره ۲: ژل SDS-PAGE نشاندهنده بیان و تخلیص لیزواستافین نوترکیب در سیستم های pBAD

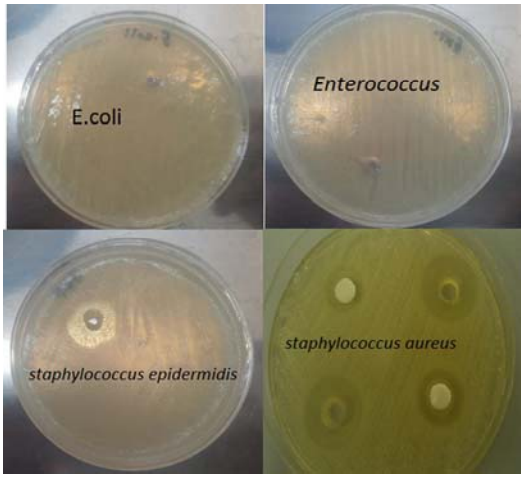
بررسی فعالیت آنزیمی

پس از انکوباسیون باکتری *استافیلوکوک اورئوس* در ml ۶ محیط LB و رسیدن به جذب نوری ۰/۲ در جذب نوری nm ۶۰۰ غلظت‌های لیزواستافین ذکر شده (۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱) به محیط ها افزوده شد. بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون جذب نوری محیط‌های کشت داده شده به این ترتیب بود: لوله حاوی µL ۱۰۰ لیزواستافین دارای جذب نوری ۰/۰۳۳ ، لوله حاوی µL۳۰۰ لیزواستافین دارای جذب نوری ۰/۰۲۹، لوله حاوی µL ۱۰۰۰ لیزواستافین دارای جذب نوری ۰/۰۱۷، و لوله کنترل دارای جذب نوری ۰/۲۷۲. بعد از کشت و انکوباسیون باکتری های ذکر شده در روش انجام کار، هاله عدم رشد فقط در باکتری های *استافیلوکوک اورئوس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* مشاهده شد (تصویر شماره ۳).

خالص سازی آنزیم

لیزواستافین نوترکیب بیان شده با موفقیت توسط کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از رزین‌های Ni-NT خالص‌سازی شد. آنزیم نوترکیب با استفاده از بافر ۵۰۰mM ایمیدازول از ستون خارج گردید؛ مابقی پروتئین‌هایی که در کشت *اشریشیا کلی* وجود داشتند با غلظت کم‌تر ایمیدازول (۲۵ mM -۲) از ستون خارج شدند. نتیجه کروماتوگرافی و دیالیز به دست آوردن

mg ۳۹ لیزواستافین نوترکیب در ۱ لیتر کشت از سویه کلون شده TOPO10F با وکتور بیانی pBAD بود.



تصویر شماره ۳: تصویر بالا از سمت چپ به راست: نتایج بررسی هاله عدم رشد توسط آنزیم لیزواستافین نوترکیب در باکتری های *اشریشیا کلی* و *انتروکوکوس فکالیس*. تصویر پایین از سمت چپ به راست: نتایج بررسی هاله عدم رشد در *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و *استافیلوک اورئوس* توسط آنزیم لیزواستافین نوترکیب با روش دیسک دیفیوژن و ول دیفیوژن.

بحث

لیزواستافین یک عامل ضدمیکروبی متعلق به یک کلاس اصلی از پپتیدهای ضدمیکروبی به نام باکتریوسین می‌باشد. این آنزیم موجب هیدرولیز پل‌های متقاطع پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی دیگر استافیلوکوک‌ها به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس می‌گردد. با توجه به افزایش مقاومت و کاهش اثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی، مطالعات پژوهشی برروی ارزیابی لیزواستافین به عنوان یک عامل درمانی نوین برای عفونت‌های استافیلوکوکی در حال انجام است. امروزه روش‌های مختلفی برای تولید لیزواستافین گزارش شده است؛ با این وجود، تولید این محصول و خلوص آن بسیار محدود می‌باشد. لیزواستافین اوّلین بار توسط Schindler و همکاران در سال ۱۹۶۵ تخلیص شد. خالص سازی در این مطالعه با استفاده از کروماتوگرافی DEAE-Cellulose صورت پذیرفت و ۳/۴ میلی‌گرم از آنزیم در یک لیتر از محیط کشت به دست آمد(۲۵). در چندین مطالعه دیگر، خالص سازی لیزواستافین با کروماتوگرافی تمایلی و ترکیبی از ایزوالکتریک فوکوسینگ همراه با سفادکس انجام شده است(۲۶). خالص سازی لیزواستافین با کیتین- سفاروز نیز گزارش شده است(۲۷). در مطالعه حاضر ژن لیزواستافین در وکتور pBAD/Thio-TOPO با استفاده از سیستم کلونینگ (TOPO) (Invitrogen, USA) کلون شد و در نهایت توسط ستون Ni-NTA خالص‌سازی گردید. در مطالعه حاضر از الحاق پروتئین هیستیدین (6His-tag) با هدف تسهیل در امر خالص‌سازی این پروتئین نوترکیب استفاده شد. الحاق پروتئین هیستیدین دارای ساختار ساده‌تری بوده و استفاده از آن به صورت N و C ترمینال برای تولید و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب بسیار معمول و مقرون به صرفه می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیش از ۳۹mg از آنزیم لیزواستافین نوترکیب در هر ۱ لیتر از محیط کشت با استفاده از سیستم pBAD به دست آمد که نسبت به سایر مطالعات انجام گرفته به میزان قابل توجهی بالاتر می‌باشد. گزارشات زیادی برای بیان لیزواستافین اندوپپتیداز در *اشریشیا کلی* با استفاده از پروموتر لیزواستافین اندوپپتیداز وجود دارد. تولید این ژن در سایر باکتری‌ها هم‌چون *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس اسفاروتیکوس* نیز گزارش شده است(۲۸). با این وجود، *اشریشیا کلی* به عنوان یک میزبان بیانی مطمئن مطرح می‌باشد به طوری که اکثر پروتئین‌های متعدد در این باکتری بیان می‌شوند. در مطالعه حاضر ژن لیزواستافین را در بین سایت‌های برش Xa و تحت پروموتر T7 با استفاده از سیستم pBAD و سلول بیانی BL21(DE3) بیان نمودیم. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط Sharma و همکاران(۲۹) و در سال ۲۰۱۴ توسط Zhang و همکاران(۳۰) انجام پذیرفت، به ترتیب ۲۲mg و ۲۰mg از لیزواستافین نوترکیب خالص شده و در سیستم بیانی pET28a و pET23b به دست آمد که نسبت به نتایج حاصل از این مطالعه میزان

پروتئین خالص شده کم‌تر می‌باشد. در این مطالعات همچون مطالعه حاضر جهت خالص‌سازی از ستون Ni-NTA استفاده شد. در مطالعه دیگری که توسط Szweda و همکاران(۳۱) در سال ۲۰۰۱ انجام پذیرفت، ۶ میلی‌گرم لیزواستافین در ۱ لیتر از محیط کشت با استفاده از سیستم pTYB به دست آمد که نسبت به مطالعه حاضر میزان کم‌تری بود. در این مطالعه ژن لیزواستافین از پلاسمید نوترکیب PRG5 با روش PCR تکثیر شد و به درون وکتور بیانی pTYB12 وارد گردید. در نهایت آنزیم مورد نظر با استفاده از سیستم اتصالی اینتئین-کیتین تخلیص گردید. در مطالعه فرهنگ نیا و همکاران(۳۲) که در سال ۲۰۱۴ انجام شد، لیزواستافین با استفاده از سیستم PET3a در باکتری *اشریشیاکلی* و تحت پروموتر T7 خالص سازی گردید. در این مطالعه لیزواستافین به میزان نسبتاً بالایی (۳۰mg) به دست آمد اما نسبت به نتایج حاصل از این مطالعه میزان پروتئین خالص شده کم‌تر می باشد.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که در مطالعه حاضر روش تخلیص آنزیم توسط کروماتوگرافی تمایلی تک مرحله‌ای با استفاده از سویه‌های موتانت *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت. روش تخلیص حاصل یک روش بسیار آسان و ارزان بوده که نیاز به تخصص و تجهیزات خاصی در جهت تخلیص پروتئین ندارد. به دنبال افزایش گسترده سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین شیوع روزانه عفونت‌های حاصل از این سویه‌های دارای مقاومت، نیاز به یافتن راه حل‌های جایگزین با کارایی بالا و کم هزینه بسیار حیاتی می‌باشد. دستورالعمل تولید لیزواستافین شرح داده شده در اینجا، برای آزمایشگاه‌هایی که تمایل به تولید لیزواستافین دارند، بسیار آسان و کارآمد می‌باشد و از قابلیت تولید در سطح صنعت نیز برخوردار است.

سپاسگزاری

هزینه مطالعه این پایان نامه از محل اعتبارات طرح شماره ۹۳۰۲۲۲۶۵۴ دانشگاه علوم پزشکی همدان پرداخت شده است. بدین وسیله از معاونت‌های آموزشی، و تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی همدان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. The Lancet Infect Dis 2001; 1(3): 147-155.
2. Pai A, Sudhakar GK, Kamath V. Enzybiotics-A Review. Int J Pharm Res 2013; 3(4): 69-71.
3. Chambers HF. The changing epidemiology of Staphylococcus aureus? Emerg Inf Dis 2001; 7(2): 178-182.
4. Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR. Bacteriocins Ecology and Evolution, The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. New York: Springer; 2007.
5. Bastos MC, Ceotto H, Coelho ML, Nascimento JS. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. Curr Pharm Biotechnol 2009; 10(1): 38-61.
6. Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature—Genus *Staphylococcus*. 2010. Available at: http://www.bacterio.cict.fr. Accessed May 2, 2014.
7. Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. 9th ed. In: Manual of Clinical

Microbiology; Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, (eds). USA, Washington DC: ASM Press; 2007.

8. Casey AL, Lambert PA, Elliott TS. Staphylococci. Int J Antimicrob Agents 2007; 29(Suppl 3): 23-32.
9. Schindler CA, Schuhardt VT. Lysostaphin: A new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. Proc Nat Acad Sci USA 1964; 51(3): 414-421.
10. Simmonds RS, Simpson WJ, Tagg JR. Cloning and sequence analysis of *zooA*, a *Streptococcus zooepidemicus* gene encoding a bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin. Gene 1997; 189(2): 255-261.
11. Baba T, Schneewindt O. Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. EMBO J 1996; 15(18): 4789-4797.
12. Thumm G, Götz F. Studies on prolysostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (*Lif*) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. Mol Microbiol. 1997; 23(6): 1251–1265.
13. Heath HE, Heath LS, Nitterauer JD, Rose KE, Sloan GL. Plasmid-encoded lysostaphin endopeptidase resistance of Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus. Biochem Biophys Res Commun 1989; 160(3): 1106-1109.
14. Heath SL, Heath HE, Sloan GL. Plasmid-encoded lysostaphin endopeptidase gene of Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus. FEMS Microbiology Letters 1987; 44(1): 129-133.
15. Recsei PA, Gruss AD, Novick RP. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(5): 1127-1131.
16. Williamson CM, Bramley AJ, Lax AJ. Expression of the lysostaphin gene of *Staphylococcus simulans* in a eukaryotic system. Appl Environ Microbiol 1994; 60(3): 771-776.
17. Mierau I, Leij P, van Swam I, Blommestein B, Floris E, Mond J, et al. Industrial- scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisincontrolled gene expression system NICE: The case of lysostaphin. Microb Cell Fact 2005; 4: 15-24.
18. Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. Curr Pharm Biotechnol. 2009; 10(1): 2-18.
19. Mierau I, Olieman K, Mond J, Smid EJ. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisincontrolled gene expression system NICE for industrial applications. Microb Cell Fact 2005; 4: 16.
20. Sugai M, Fujiwara T, Akiyama T, Ohara M, Komatsuzawa H, Inoue S, et al. Purification and molecular characterization of glycylglycine endopeptidase produced by *Staphylococcus capitis EPK1*. J Bacteriol 1997; 179(4): 1193-1202.
21. Sugai M, Fujiwara T, Ohta K, Komatsuzawa H, Ohara M, Suginaka H. *epr*, which encodesglycylglycine endopeptidase resistance, is homologous to *femAB* and affects serine content of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1997; 179(13): 4311-4318.
22. Szweda P, Kotlowski R, Kur J New effective sources of the Staphylococcus simulans lysostaphin. Journal of Biotechnology 2005; 117: 203-213.
23. Marova I, Kovar J. Spectrophotometric detection of bacteriolytic activity of diluted

lysostaphin solutions. Folia Microbiol 1993; 38(2): 153-158.

24. Sambrook J, Mac Callum P, Russell D. Molecular Cloning, a laboratory manual 3rd ed. New york: Cold Spring Harbor (CHS press); 2001.
25. Schindler CA, Schuhardt V. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the Staphylococcus. Proc Natl Acad Sci U S A 1964; 51(3): 414-421.
26. Sugai M, Fujiwara T, Akiyama T, Ohara M, Komatsuzawa H, Inoue S, et al. Purification and molecular characterization of glycylglycine endopeptidase produced by Staphylococcus capitis EPK1. J Bacteriol 1997; 179(4): 1193-1202.
27. Valisena S, Varaldo P, Satta G. Purification and characterization of three separate bacteriolytic enzymes excreted by Staphylococcus aureus, Staphylococcus simulans, and Staphylococcus saprophyticus. J Bacteriol 1982; 151(2): 636-647.
28. Recsei PA. Expression of the cloned lysostaphin gene. Patent No.4,931; 1990;390.
29. Sharma R, Sharma PR, Choudhary ML, Pande A, Khatri GS. Cytoplasmic expression of mature glycylglycine endopeptidase lysostaphin with an amino terminal hexa-histidine in a soluble and catalytically active form in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 2006; 45(1): 206-215.
30. Zhang B, Shangguan T, Ma H, Huang X, Zhang Y. Lysis of mastitis pathogens isolated from dairy cow milk samples by purified recombinant lysostaphin. African Journal of Biotechnology 2012; 11(20): 4649-4659.
31. Szweda P, Pladzyk R, Kotlowski R, Kur J. Cloning, expression, and purification of the Staphylococcus simulans lysostaphin using the intein-chitin-binding domain (CBD) system. Protein Expr Purif 2001; 22(3): 467-471.
32. Farhangnia L, Ghaznavi-Rad E, Mollaee N, Abtahi H. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Lysostaphin From Staphylococcus simulans. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(5).