



طراحی بیوانفورماتیکی و ساخت کاست ژنی دربردارندهی ژنهای *ctxB*، *blf1* و *stxB*

زهرا مشیری^۱، رحیم حداد^۱، حسین هنری^{۲*}

۱- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین، ایران
۲- مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
مقدمه باکتری بورخولدریا سودومالئی، ویبریوکلا و شیگلا دیسانتری عامل بیماری میلوئیدوزیس، وبا و شیگلوز در انسان می باشند. پروتئین های BLF1 مربوط به <i>CTxB</i>, <i>B. pseudomallei</i> و ویبریوکلا و <i>StxB</i> شیگلا دیسانتری خاصیت آنتی ژنیک، ادجوانتی مخاطی، حاملی و ایمنی زایی دارند. هدف این مطالعه، ساخت کاست ژنی دربردارندهی ژن های <i>ctxB</i>، <i>blf1</i> و <i>stxB</i> و بیان پروتئین آن ها در <i>E. coli</i> می باشد. مواد و روش ها با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک ProtParam و Modeller، حالت های مختلف پروتئین کایمریک ژن های مربوطه بررسی شد. ساختار دوم پروتئین و اپی توپ های خطی و ساختاری نیز تعیین گردید. ژن های <i>blf1</i> و <i>stxB</i> از پلاسمید pET28a-BLF1-STxB، PCR و قطعه ۸۵۰ جفت بازی BLF1-STxB با جایگاه های آنزیمی NotI و SalI در وکتور بیانی pET28a-CTxB زیرهمسانه سازی و به باکتری <i>E. coli</i> سویه BL21(DE3) ترانسفورم شد. پس از توالی یابی، بهینه سازی بیان ژن سنتزی تحت القای IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد انجام و بوسیله تکنیک SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته ها شاخص ناپایداری پروتئین کایمر برابر با ۴۰/۰۶ و نیمه عمر آن در <i>E. coli</i> بیش از ۱۰ ساعت به دست آمد. شاخص سازگاری کدون سازی کایمر به ۰/۹ و محتوای GC آن به ۵۴/۹ درصد افزایش یافت. بهترین ترتیب ممکن برای ساخت واکسن نو ترکیب، ممزوج سه تایی CTxB-BLF1-STxB بدست آمد. بیان پروتئین نو ترکیب از ژن سنتزی تحت القای IPTG، منجر به تولید پروتئینی با وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتون شد. نتیجه گیری با توجه به توانایی توقف پروتئین سازی BLF1، خاصیت حاملی STxB و خاصیت ادجوانتی CTxB، قرار دادن این سه ژن در یک کاست ژنی به بهترین حالت، می تواند به عنوان یک کاندید واکسن مناسب مورد توجه قرار گیرد. کلیدواژه ها بورخولدریاسودومالئی، سم بی ال اف ۱، میلوئیدوزیس، وبا، شیگلوز	تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۳۰ *نویسنده مسئول: دکتر حسین هنری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران. تلفن: +۹۸۲۱۷۴۱۸۹۵۱۴ پست الکترونیک: honari.hosein@gmail.com



مقدمه

Burkholderia pseudomallei، سبب میلوئیدوزیس می‌شود (۱). بورخولدریا سودومالئی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله تعداد زیادی از بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و پلی‌میکسین‌ها (۲) مقاوم است که مقابله با بیماری را دشوار می‌سازد. پروتئین BLF1 بورخولدریا سودومالئی دارای خاصیت آنتی ژنیک بوده و با تعویض Gln339 به Glu339 باعث تغییر (Eukaryotic initiation factor 4A) می‌شود که این عمل یک مهار کننده قوی، ترجمه است (۳). شناخت مکانیسم مولکولی توکسین BLF1 بر روی سلول‌های انسانی، راه را برای استفاده از آن در درمان سلول‌ها، مهیا می‌کند و می‌تواند به عنوان بخشی از درمان ترکیبی با آنتی‌بیوتیک مفید باشد. با غیر فعال کردن توکسین BLF1 نیز می‌توان واکسن برای آن تولید کرد (۴). پروتئین BLF1 به عنوان یک مهار کننده قوی eIF4A، ممکن است به عنوان یک عامل ضد سرطان قوی مورد استفاده قرار گیرد (۵). با مهندسی بیشتر بر روی توکسین BLF1 ممکن است به عنوان یک کاندید مناسب برای شناسایی و واکسن، نیز مورد استفاده قرار گیرد (۶-۸). باکتری شیگلا دیسانتری اکنون، بر علیه fluoroquinolon ها، سفالوسپورین‌ها و آزیترومایسین مقاوم شده‌اند. تعداد زیادی از همه‌گیری‌های شیگلوز، به وسیله‌ی استرین‌های مقاوم گونه‌های شیگلا گزارش شده است (۹). با توجه به اهمیت این باکتری‌ها و بیماری‌هایی که توسط آن‌ها ایجاد می‌گردد، ضرورت تولید واکسن برای پیشگیری از ابتلا به این بیماری‌ها، اجتناب ناپذیر به نظر می‌رسد. STxB تا حدی دارای نقش ایمنی‌زایی، ادجوانتی و حاملی بوده و می‌توان با ممزوج کردن آنتی‌ژن‌های کاندید واکسن با این ادجوانت به تولید واکسن مناسب پرداخت (۱۰)، پیش‌بینی می‌شود که با تولید آنتی‌بادی علیه STxB و

خنثی‌سازی آن می‌توان از اتصال و ورود قسمت سمی (STxA) به درون سلول هدف جلوگیری به عمل آورد. همچنین از این زیرواحد در زمینه‌های مختلفی همچون انتقال‌دهنده‌ی آنتی‌ژن‌ها و داروهای ضدسرطان به سلول‌های سرطانی و همچنین تصویربرداری از تومور به کمک مواد فلورسانت، استفاده می‌گردد (۱۱، ۱۲).

ویبریوکلا، سبب کلرا می‌گردد که یک بیماری اسهالی کشنده می‌باشد. تاثیر اپیدمی کلرا، فقط به میزان گسترش و نرخ مرگ‌ومیر آن محدود نمی‌شود، بلکه تاثیر چشمگیری بر روی اقتصاد کشورهایی که متحمل شیوع می‌شوند، دارد (۱۳). امروزه CTxB، به عنوان یک ایمونوادجوانت قوی در ایمنی‌زایی وابسته به مخاط مطرح است، زیرا یک پروتئین انتقال‌دهنده‌ی بسیار موثر برای ترشح آنتی‌بادی سیستمیک و مخاطی برای آنتی‌بادی ژن‌های کونژوگه شده می‌باشد (۱۴).

هدف از انجام این پروژه، ارزیابی حالت‌های مختلف پروتئین کایمریک ژن‌های *ctxB*، *stxB* و *blf1* مربوط به ویبریوکلا، شیگلادیسانتری و میلوئیدوزیس، توسط روش‌های بیوانفورماتیک و انتخاب بهترین حالت ممکن برای ساخت واکسن نو ترکیب است. به این منظور، ترکیب‌های مختلف دوتایی و سه‌تایی این پروتئین‌ها، از نظر خصوصیات مختلف با یکدیگر مقایسه شدند. دلایلی مختلفی که می‌تواند برای تولید این پروتئین‌های به صورت کایمریک بیان گردد، عبارتند از: ۱- با توجه به این‌که اندازه‌ی پروتئین STxB کوچک است، (۶۹ اسیدآمینو) اتصال آن به پروتئینی مانند CTxB می‌تواند باعث افزایش پاسخ ایمونولوژیک به آن شود، ۲- تولید پروتئین‌های کایمریک باعث صرفه‌جویی در هزینه، خاصیت ادجوانتی، پایداری بیشتر، تولید و القای سطح ایمنی بالا و طولانی‌مدت از محافظت بعد از دوز اولیه می‌شود و ۳- واکسن‌های زیرواحدی به طور قابل توجهی ایمن-



پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین

پیش‌بینی ساختار دوم ترکیبات مختلف پروتئین‌های کایمیریک با استفاده از نرم‌افزار PSI Pred (USA)، که آنالیز ساختار دوم پروتئین را بر اساس موقعیت مکانی University (College London) UCL انجام می‌دهد، صورت گرفت (۲۰). موقعیت فضایی اتم‌های هر کدام از اسیدهای آمینه در حالت پروتئین کایمیریک و در حالت طبیعی، به وسیله‌ی نرم‌افزار Modeller انجام شد.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی و فضایی سلول B

برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی از سرور ABCpred (India) استفاده گردید. سرور ABCpred با استفاده از یک شبکه عصبی مصنوعی، مناطق اپی‌توپ خیز خطی در یک توالی آنتی‌ژن را پیش‌بینی می‌نماید. پیش‌بینی اپی‌توپ‌های فضایی با نرم‌افزار Cbtope انجام شد.

ساخت سازه ژنی نو ترکیب

با طراحی پرایمر اختصاصی، ژن‌های *stxB* و *blf1* از پلاسمید pET28a-BLF1-STxB، توسط PCR تکثیر شدند (۶). قطعه‌ی ۸۵۰ جفت‌بازی BLF1-STxB به وسیله‌ی PCR تکثیر و با جایگاه‌های آنزیمی NotI و SalI در وکتور بیانی PET28a-CtxB زیرهمسازسازی و به باکتری *E. coli* سویه‌ی BL21(DE3) ترانسفورم شد. در نهایت سازه برای توالی‌یابی به شرکت سیناژن ارسال شد.

Forward primer: 5'CATCATCATCATCACAGCAG3'
Reverse primer: 5'GATCTCAGTGGTGGTGGTGGTG3'

بررسی بیان پروتئین کایمر و بهینه‌سازی آن

جهت بیان پروتئین نو ترکیب، کلنی‌های تایید شده در محیط LB حاوی ۸۰ mg/ml کانامایسین تلقیح و به مدت ۱ شب در شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از کشت مجدد، زمانی که جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۶ رسید، با افزودن ماده‌ی القاکننده‌ی IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار در شرایط

تر و اختصاصی‌تر بوده و واکنش‌های غیراختصاصی کمتری را در سیستم ایمنی به راه انداخته و به همین جهت توانایی هدف قراردادن عامل بیگانه را دارند (۱۵).

مواد و روش‌ها

به دست آوردن توالی

برای طراحی سازه‌ی ژنی نو ترکیب، توالی ژن‌های *blf1* و *stxB* از بخش سکانس‌های مرجع سایت NCBI، با شماره‌های دسترسی (NC_006350.1، NC_015209.1 و NC_007607.1) (به ترتیب) استخراج گردید، همچنین توالی‌های آمینواسیدی نیز از پایگاه داده Uni Prot، دانلود و با فرمت FASTA ذخیره گردید. به منظور حفظ انسجام ساختاری پروتئین کایمر و عدم تداخل دومین‌ها، از یک تکرار لینکر (GPGP) شامل اسیدآمینه‌های گلايسین و پرولین در انتهای آمینی پروتئین CtxB استفاده گردید و یک تکرار لینکر (FARRP) شامل اسید آمینه‌های فورین، آرژنین، پرولین بین BLF1 و STxB جای گرفت (۱۶). نرم افزار optimizer (spain)، برای بهینه‌سازی توالی کدکننده و در نتیجه، بهبود بیان پروتئین نو ترکیب کایمر استفاده گردید (۱۷). در ادامه آنالیز توالی‌ها با نرم‌افزار Blast-X صورت گرفت. در این نوع Blast، توالی مورد تقاضا، توالی نوکلئوتیدی است که در ۶ قالب خواندنی (ORF) ترجمه شده و به صورت توالی پروتئینی در پایگاه توالی‌های پروتئینی جست‌وجو می‌شود. نتیجه جست‌وجو، توالی‌های مشابه با توالی الگو است که بر اساس آن می‌توان به توالی جدید (ORF) خود قالب خواندنی و عملکرد را نسبت داد.

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی

ویژگی‌هایی نظیر وزن مولکولی، نیمه‌عمر، شاخص ناپایداری و نقطه‌ی ایزوالکتریک ترکیب‌های مختلف پروتئین کایمیریک به وسیله‌ی نرم‌افزار آنالیز protparam پیش‌بینی گردید (۱۸، ۱۹).



الکتروفورز (polyacrylamide gel electrophoresis) گردیدند.

یافته‌ها

۱-سکانس پروتئین

با استفاده از پایگاه داده Uni Prot، توالی‌های آمینواسیدی زیر برای ژن‌های *stxB*، *ctxB*، *blf1* به دست آمد.

استریل، القا صورت گرفت. محیط‌های فوق در شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ و ۲۵ و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از گذشت ۵ ساعت، سلول‌های محیط با سانتریفوژ دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. سلول‌ها با بافر لیزکننده شکسته و به همراه نشانگر پروتئینی، روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate) قرار داده شدند.

CTxB

EFTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKD
LRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANGTGPGPS

BLF1

PNSLEAQIRQAMKTGSTLTIEFDQALNQKSPGTLNVFLHPANGGVRIIDLDSGNQGEPAKILWLPWKQGELQ
TLQPGSISTVDMLEFFTYLGSCKVFAGDGGPVWHIDAPVEANQFWRMSSDEWMEDWEVGTDRQVAYL
HRAGQSDSLWNLSAYLEGAAPSTYGRDNLGQAVVGIVTGRQQMSLYQYATTSSGSSAWSPLTYTLQQR
KQVD

STxB

ELKLRARTPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKEFTNRWNLQSLLSAQITG M TVTIKTNACHNGG
GFSEVIFR

هنگامی که پروتئین BLF1 در انتهای آمینو قرار می‌گیرد، پروتئین کایمریک ناپایدارترین حالت به همراه کمترین نیمه‌عمر را از خود نشان می‌دهد؛ در این حالت، شاخص ناپایداری برابر با ۴۱/۱۱ می‌باشد که طبق شاخص‌های نرم-افزار جز پروتئین‌های ناپایدار محسوب می‌گردد. نیمه‌عمر این پروتئین در *E. coli* نیز دو دقیقه می‌باشد که کمترین نیمه‌عمر را در بین ترکیبات مختلف از خود نشان می‌دهد. پایدارترین حالت در بین ترکیبات سه‌تایی، هنگامی است که پروتئین CTxB در انتهای آمینو پروتئین نو ترکیب قرار گیرد و این ترکیب پایدار عبارت از CTxB-BLF1-STxB می‌باشد. شاخص ناپایداری در این ترکیب برابر با ۴۰/۰۶ و نیمه‌عمر آن در *E. coli* بیش از ده ساعت می‌باشد. در ترکیب‌های دوتایی، پایدارترین ترکیب STxB-CTxB، با شاخص ناپایداری، ۴۲/۹۲ می‌باشد. نتایج کامل مربوط به

این توالی‌ها در ترکیب‌های مختلف دوتایی و سه‌تایی که در جدول ۱ ذکر شده در کنار هم قرار گرفته و آنالیزهای مربوطه بر روی آن‌ها انجام گرفت.

۲- تعیین میزان پایداری و نیمه‌عمر ترکیبات مختلف پروتئین کایمریک به وسیله نرم‌افزار protparam

خصوصیات بیوشیمیایی ترکیبات مختلف سه پروتئین *CTxB*، *STxB* و *BLF1*، از جمله میزان پایداری، نیمه‌عمر در موجودات مختلف، نقطه‌ی ایزوالکتریک و شاخص آلیفاتیک محاسبه گردید. نیمه‌عمر پروتئین‌ها، تحت شرایط طبیعی رشد، از چند دقیقه تا چند ساعت متغیر است، این تفاوت در پایداری، هم به میزان تشکیل باندهای دی سولفیدی و هم به حضور آمینواسیدهای خاص در انتهای آمینی (N-terminal) بستگی دارد (۲۱، ۲۲). بر اساس نتایج بدست آمده از نرم‌افزار Protparam، در ترکیب‌های سه تایی



شاخص ناپایداری و نیمه‌عمر ترکیبات دوتایی و سه تایی، در جدول ۱ ذکر شده است.

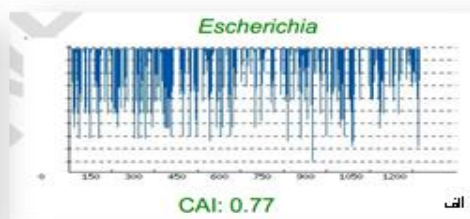
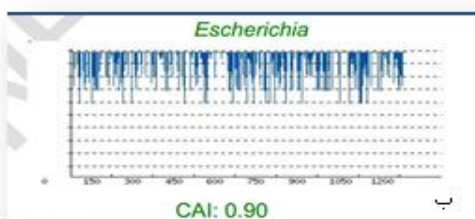
جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی ترکیبات مختلف پروتئین‌های کایمریک

شاخص چربی‌دوستی	شاخص ناپایداری	نیمه‌عمر (E. Coli)	نیمه‌عمر (مخمر)	نیمه‌عمر (پستانداران)	نقطه ایزوالکتریک	پروتئین ترکیبی
۷۰.۷	۴۳.۴۱	۲ دقیقه	بیش از ۲۰ ساعت	بیش از ۲۰ ساعت	۴.۹۷	BLF1- CtxB
۷۱.۵۹	۹۲.۴۲	۲ دقیقه	بیش از ۲۰ ساعت	بیش از ۲۰ ساعت	۴.۹۶	BLF1- StxB
۷۰.۷	۷۲.۴۲	بیش از ۱۰ ساعت	۳۰ دقیقه	۱ ساعت	۴.۹۷	CtxB - BLF1
۷۲.۴۲	۶۳.۳۳	بیش از ۱۰ ساعت	۳۰ دقیقه	۱ ساعت	۶.۲۵	CtxB - StxB
۷۱.۵۹	۵۶.۴۳	بیش از ۱۰ ساعت	۳۰ دقیقه	۱ ساعت	۴.۹۶	StxB - BLF1
۷۲.۹۳	۳.۳۳	بیش از ۱۰ ساعت	۳۰ دقیقه	۱ ساعت	۶.۲۵	StxB - CtxB
۷۱.۵۵	۵۲.۴۰	۲ دقیقه	بیش از ۲۰ ساعت	بیش از ۲۰ ساعت	۵.۱۹	BLF1 - CtxB - StxB
۷۱.۵۵	۱۱.۴۱	۲ دقیقه	بیش از ۲۰ ساعت	بیش از ۲۰ ساعت	۵.۱۹	BLF1 - StxB - CtxB
۷۱.۵۵	۰۶.۴۰	بیش از ۱۰ ساعت	۳۰ دقیقه	۱ ساعت	۵.۱۹	CtxB - BLF1 - StxB
۷۱.۵۵	۹۸.۴۰	بیش از ۱۰ ساعت	۳۰ دقیقه	۱ ساعت	۵.۱۹	CtxB - StxB - BLF1
۷۱.۵۵	۵۲.۴۰	بیش از ۱۰ ساعت	۳۰ دقیقه	۱ ساعت	۵.۱۹	StxB - BLF1 - CtxB
۷۱.۵۵	۱۱.۴۱	بیش از ۱۰ ساعت	۳۰ دقیقه	۱ ساعت	۵.۱۹	StxB - CtxB - BLF1

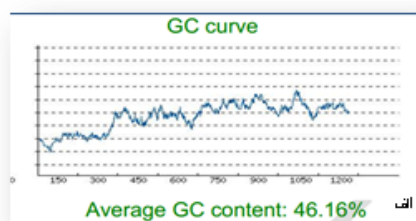
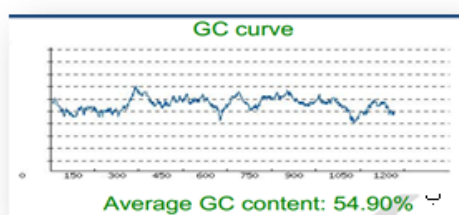
۳- بهینه‌سازی کدون‌ها

پس از مشخص شدن پایدارترین ترکیب سه تایی که از این ترکیب در ساخت کاست ژنی استفاده شد، بهینه‌سازی کدونی بر روی توالی‌های این ترکیب صورت گرفت. بهینه‌سازی در چهار بخش قابل بررسی بود که دربردارنده‌ی انعطاف‌پذیری ساختار پروتئین، تنظیم ترجیحی کدون‌ها، حلالیت و افزایش درصد بازهای آلی نیتروژن‌دار سیتوزین و گوانین می‌شد. افزایش شاخص انطباق‌پذیری کدونی (Codon Adaptive Index (CAI)) به ۱.۰۰، نشان دهنده‌ی میزان انعطاف‌پذیری و افزایش کدون‌های مورد استفاده برای بیان ژن در باکتری اشرشیاکلی می‌باشد. مزیت نسبی در بهینه‌سازی سازه‌ی ژن، الگوی کدونی مناسب برای افزایش

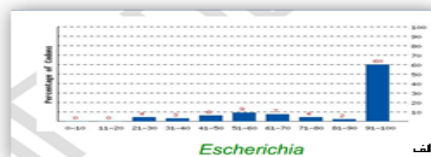
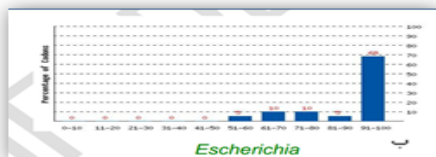
کارایی الگوی انتخابی در متابولیسم باکتری اشرشیاکلی می‌باشد. شاخص انطباق‌پذیری کدونی از ۰/۷۷ به ۰/۹۰ تغییر کرد (نمودار ۱). انتخاب و تغییر کدون مناسب به نحوی بود که محتوای سیتوزین و گوانین از ۴۶/۱۶ درصد به ۵۴/۹ درصد افزایش یافت (نمودار ۲). تعداد کدون‌هایی که از کیفیت مناسبی برای افزایش بیان پروتئین برخوردار هستند از ۶۰ درصد به ۶۸ درصد تغییر پیدا کرد (نمودار ۳). نتایج حاصل از آنالیز توالی کایمر با نرم‌افزار Blast-X تایید نمود که اعمال تغییرات روی ژن و بهینه‌سازی توالی آن بدون هیچ‌گونه تغییری بر روی ردیف اسیدهای آمینه در پروتئین هدف بوده است.



نمودار ۱: شاخص سازگاری کدون (CAI) مربوط به کایمر طبیعی ctxB-BLF1-stxB (الف) و کایمر بهینه سازی شده ctxB-BLF1-stxB (ب).



نمودار ۲: درصد بازهای GC مربوط به کایمر طبیعی ctxB-BLF1-ctxB (الف) و کایمر بهینه‌سازی شده ctxB-BLF1-stxB (ب). تغییر کدونی منجر به افزایش میزان بازهای گوانین و سیتوزین گردید.



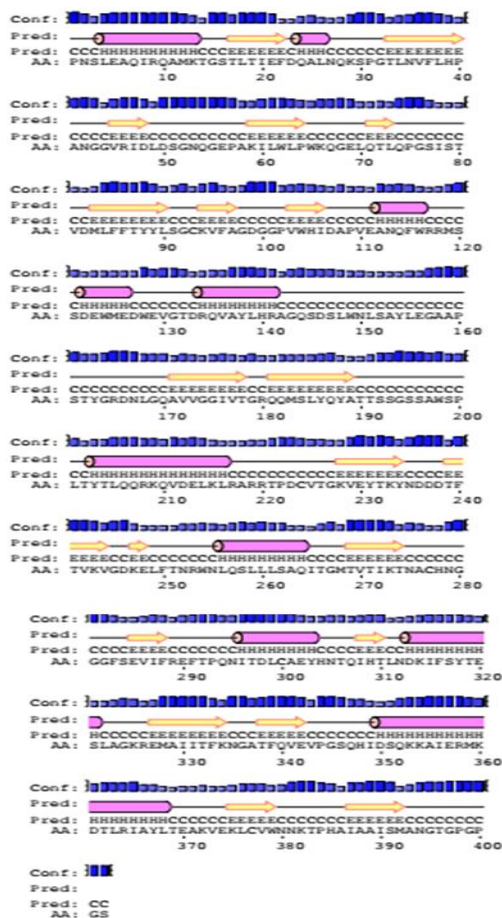
نمودار ۳: درصد توزیع کدون‌های مربوط به کایمر طبیعی ctxB-BLF1-stxB (الف) و کایمر بهینه‌سازی شده ctxB-BLF1-stxB (ب). پس از بهینه‌سازی درصد کدون‌های با شانس بیان بالا افزایش یافته است.

ترکیب‌های دوتایی و سه‌تایی پروتئین‌ها مشخص گردید. با بررسی و مقایسه‌ی نتایج، معلوم شد که ساختار دوم هیچ‌یک از این سه پروتئین در این ترکیب‌ها با ساختار این پروتئین‌ها به صورت منفرد تفاوت چندانی ندارد. در واقع قرار گرفتن این پروتئین‌ها در قالب یک پروتئین کایمریک، ساختار آن‌ها را به میزانی که ساختار دوم آن‌ها تغییر کند، تغییر نمی‌دهد. برای نمونه، ساختار دوم پروتئین BLF1 و ترکیب CTxB-BLF1-STxB در ادامه آورده شده است (شکل ۱ و ۲).

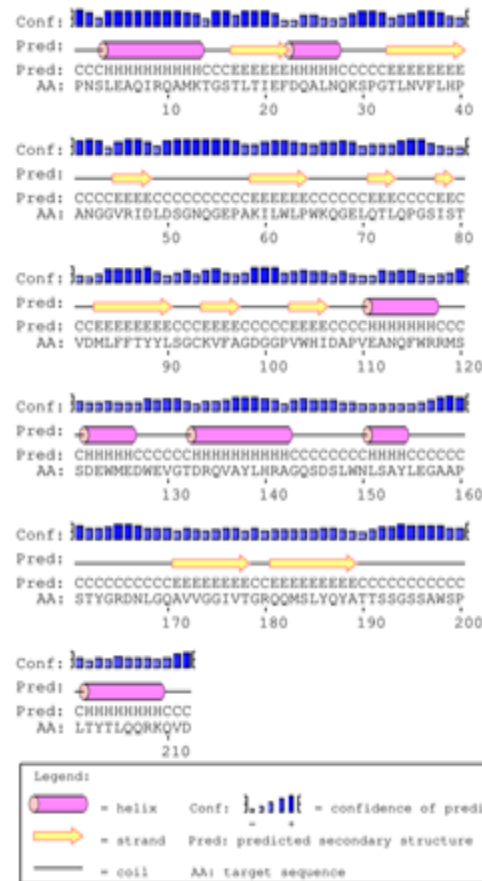
۴- تعیین ساختار دوم ترکیبات مختلف پروتئین‌های

کایمریک به وسیله‌ی نرم‌افزار PSI Pred

نرم‌افزار PSI Pred با بررسی سکانس اسیدآمینیهی یک پروتئین و همچنین اسیدآمینیهی مجاور آن، ساختار دوم یک پروتئین را پیش‌بینی کرده و مشخص می‌کند که در کدام قسمت پروتئین مورد نظر، α -helix، β -sheet یا coil وجود دارد (۲۳). در این تحقیق، ابتدا توسط این نرم‌افزار، ساختار دوم هر یک از پروتئین‌های CTxB، STxB و BLF1 به صورت جداگانه مشخص شد. سپس ساختار دوم تمام



شکل ۱- ساختار دوم پروتئین CTxB-BLF1-STxB



شکل ۲- ساختار دوم پروتئین BLF1

طبیعی مقایسه گردد. نرم افزار Modeller^۱ این کار را انجام می دهد. در این مطالعه از نسخه آنلاین نرم افزار Modeller که Mod Web نام دارد، استفاده شد (۱۵، ۲۳، ۲۴). میزان شاخص ZDOPE به دست آمده توسط این نرم افزار عددی

۵- مقایسه ای موقعیت فضایی اتم های هر کدام از اسیدهای آمینه در حالت پروتئین کایمریک و در حالت طبیعی به وسیله نرم افزار Modeller

یکی از راهکارها برای تشخیص این که در کدام ترکیب، پروتئین ها بهتر حالت طبیعی خود را حفظ می کنند، این است که موقعیت فضایی تک تک اتم های هر اسید آمینه ی پروتئین در حالت ممزوج با بقیه ی پروتئین ها و در حالت

۱ نرم افزار Modeller با مقایسه ی تک تک اتم ها و استاندارد کردن نتایج، عددی به نام شاخص Z DOPE (ZDOPE Score) محاسبه می کند. این عدد، میزان تفاوت حالت طبیعی با حالت ممزوجی هر پروتئین را مشخص می کند. به هر میزان که این عدد کمتر باشد، پروتئین مورد مطالعه شباهت بیشتری به حالت طبیعی خود دارد و اگر این میزان کمتر از ۱ باشد، مشابه پروتئین طبیعی در نظر گرفته می شود.



برابر با ۲/۰۱- به دست آمد که نشان از عدم تفاوت پروتئین در حالت طبیعی و حالت ممزوج دارد.

۶- پیش بینی اپی‌توپ‌های خطی و ساختاری سلول B
پیشگویی اپی‌توپ‌های با ایمونوژنیسیته‌ی بالا همچنان به عنوان یک امر حیاتی و چالش‌برانگیز در بیوانفورماتیک خودنمایی می‌کند. پیشگویی اپی‌توپ‌های خطی (توالی‌هایی با امتیاز بیش از ۰/۴ به عنوان اپی‌توپ مطرح می‌باشند)، با استفاده از میل ذاتی آن‌ها نسبت به آمینواسیدها و

الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی امکان‌پذیر است. اپی‌توپ‌های خطی سلول B موجود در پروتئین کایمر، دارای بهترین ترکیب، که توسط سرور ABCpred پیش‌بینی شده، در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، اپی‌توپ‌های خطی در طول توالی کایمر پراکنده بوده و متعلق به هر سه پروتئین تشکیل دهنده‌ی سازه می‌باشند.

جدول ۲- نتایج پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی

امتیاز	موقعیت شروع	توالی	امتیاز	موقعیت شروع	توالی
۰.۷۱	۱۳۰	TLTIEFDQALNQ	۰.۸۵	۱۷۵	WLPWKQGE LQTL
۰.۷۰	۴۰	AIITFKNGATFQ	۰.۸۱	۸۲	AKVEKLCVWNNK
۰.۶۹	۲۴۹	VAYLHRAGQSDS	۰.۷۹	۱۶۷	QGEPAKILWLPW
۰.۶۹	۱۸۵	TLQPGSISTVDM	۰.۷۷	۲۰۷	KVFAGDGGPVWH
۰.۶۹	۱۱۴	PNSLEAQIRQAM	۰.۷۷	۱۹۹	FTYYLSGCKVFA
۰.۶۸	۱۳۵	FDQALNQKSPGT	۰.۷۶	۳۵	GKREMAITFKN
۰.۶۷	۶۵	KAIERMKDTLRI	۰.۷۶	۱۲۳	QAMKTGSTLTIE
۰.۶۷	۲۷۷	GRDNLGQAVVGG	۰.۷۵	۴۴	FKNGATFQVEVP
۰.۶۷	۲۵۳	HRAGQSDSLWNL	۰.۷۴	۲۰	HTLNDKIFSYTE
۰.۶۷	۲۴۴	GTDRQVAYLHRA	۰.۷۳	۲۹۲	GRQQMSLYQYAT
۰.۶۷	۱۴	YHNTQIHTLNDK	۰.۷۳	۲۶۷	YLEGAAPSTYGR
۰.۶۶	۱۰۶	GTGPGPGSPNSL	۰.۷۱	۸	TDLCAEYHNTQI
۰.۶۵	۱۹۴	VDMLFFTYL S G	۰.۷۱	۲۵	KIFSYTESLAGK
۰.۶۴	۹۳	KTPHAI A A I S M A	۰.۷۱	۲۳۷	WMEDWEVGTDRQ
۰.۶۴	۶۰	IDSQKKAIERMK	۰.۷۱	۲۱۹	DAPVEANQFWR
۰.۶۳	۳	TPQNITDLCAEY	۰.۷۱	۱۵۳	PANGGVRIDLDS
۰.۶۳	۲۵۷	QSDSLWNLSAYL	۰.۶۳	۲۸۶	VGGIVTGRQQMS
۰.۵۷	۲۱۱	GDGGPVWHIDAP	۰.۶۲	۴۸	ATFQVEVPGSQH
۰.۵۷	۱۸۹	GSISTVDMLFFT	۰.۶۲	۱۶۱	DLDSGNQGEPAK
۰.۵۷	۱۷۱	AKILWLPWKQGE	۰.۵۹	۱۴۵	GTLNVFLHPANG
۰.۵۶	۲۶۱	LWNLSAYLEGAA	۰.۵۸	۲۲۹	WRRMSSDEWMED



توالی کایمر پراکنده بوده و متعلق به هر سه پروتئین تشکیل دهنده ی سازه می باشند.

نتایج پیش بینی اپی توپ های ساختاری در جدول ۳ مشاهده می شود. اپی توپ های ساختاری (توالی هایی با امتیاز ۴ و بیش از آن به عنوان اپی توپ مطرح می باشند)، نیز در طول

جدول ۳- نتایج پیش بینی اپی توپ های ساختاری

امتیاز	موقعیت	آمینواسید	امتیاز	موقعیت	آمینواسید	امتیاز	موقعیت	آمینواسید
۴	۱۸۲،۱۸۱	QG	۸	۶۳	S	۴	۳-۷	FTPQNI
۴	۱۸۶-۱۸۷	TL	۵	۶۴	Q	۴	۹-۱۵	TDLCAEY
۵	۱۸۸-۱۸۹	QP	۴	۸۷-۹۰	KLCV	۴	۲۱	H
۴	۱۹۰	G	۴	۱۱۹،۱۱۸	LE	۴	۴۳-۴۶	TFKN
۴	۱۹۴	T	۴	۱۲۲،۱۲۱	QI	۵	۴۷	G
۴	۱۹۶-۲۰۰	MLFF	۴	۱۳۳	T	۶	۴۹،۴۸	AT
۴	۲۰۶-۲۱۰	CKVF	۴	۱۳۸،۱۳۷	DQ	۵	۵۱-۵۳	FQV
۴	۲۲۳-۲۲۷	PVEAN	۴	۱۴۰	L	۶	۵۴	E
۵	۲۲۸	Q	۴	۱۴۱-۱۴۴	NQKS	۸	۵۵-۵۷	VPG
۴	۲۳۰،۲۲۹	FW	۴	۱۵۵-۱۵۹	ANGGV	۷	۵۸	S
۴	۲۳۲	R	۴	۱۶۱	I	۸	۶۰،۵۹	QH
۴	۲۴۶-۲۵۲	TDRQVAY	۴	۱۷۲،۱۷۱	PA	۷	۶۱	I
۴	۲۷۲،۲۷۱	GA	۴	۱۷۵-۱۷۹	LWLWP	۸	۶۲	D
۴	۳۸۵-۳۸۷	TIK	۴	۲۹۱-۳۰۴	TGRQQMSLYQYAT	۴	۲۷۳-۲۷۵	APS
۵	۳۸۸	T	۴	۳۱۰-۳۱۴	SAWSP	۵	۲۷۷،۲۷۶	TY
۷	۳۸۹	N	۴	۳۱۶-۳۲۳	TYTLQQRK	۴	۲۷۸	G
۶	۳۹۰	A	۴	۳۳۱-۳۴۳	VTGKV	۴	۲۸۶-۲۸۸	VVG
			۴	۳۹۲-۳۹۶	HNGGG	۵	۳۹۱	C

۷- ساخت کاست ژنی

قطعه ی ۸۵۰ جفت بازی BLF1-STxB از پلاسمید pET28-BLF1-STxB توسط PCR تکثیر شد (شکل ۳ الف)) و با استفاده از جایگاه های آنزیمی NotI و SalI در وکتور بیانی

pET28-CTxB زیرهمسانه سازی گردید. کاست ژنی pET28-CTxB-BLF1-STxB به دست آمده بوسیله هضم آنزیمی (شکل ۳ ب)) و توالی یابی تایید گردیده و صحت توالی ها بوسیله عمل Blast تایید شد.

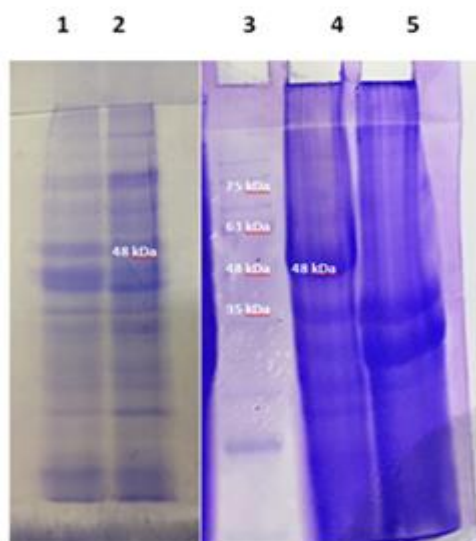


شکل ۳- الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪. (الف). چاهک ۱: محصول PCR روی پلاسمید Pet-28a(+)-blf1-stxB. چاهک ۲: نشانگر اسید نوکلئیک. (ب). چاهک ۱: نشانگر اسید نوکلئیک. چاهک ۲: محصول هضم آنزیمی کاست ژنی.

۸- بررسی و بهینه‌سازی بیان پروتئین کایمر نو ترکیب

پس از القای بیان پروتئین مورد نظر و جمع‌آوری و شکستن سلول‌ها، کل محتوای پروتئینی روی ژل SDS-PAGE، ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه‌های القا شده واجد پلاسمید نو ترکیب دربردارنده ژن کایمر سنتزی، تولید پروتئین نو ترکیب با وزن مولکولی حدود ۴۸ کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۴)، ولی بیان چنین پروتئینی در نمونه-

های القا نشده وجود نداشت. در طی انجام تحقیق مشخص شد هنگامی که پس از القای IPTG، کشت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفتند بیان مطلوب نبود (شکل ۴ سمت چپ)، بنابراین به منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین نو ترکیب، دما به ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد کاهش یافت، که پس از بررسی، شاهد افزایش قابل توجه بیان پروتئین بودیم (شکل ۴ سمت راست).



شکل ۴- الکتروفورز ژل SDS-PAGE به منظور بیان پروتئین مورد نظر. چاهک ۳: مارکر پروتئینی. چاهک‌های ۲ و ۴: محتوای پروتئینی باکتری‌هایی که پس از رسیدن جذب نوری آن‌ها به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا شده‌اند (بافرلیزکننده B). (چاهک ۲ دمای ۳۷ درجه، چاهک ۴ دمای ۲۵ درجه). چاهک‌های ۱ و ۵، کنترل منفی که در آن‌ها باکتری‌ها پس از رسیدن به جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده‌ی IPTG القا نشده‌اند (چاهک ۱: دمای ۳۷ درجه، چاهک ۵: دمای ۲۵ درجه)



بحث

استفاده از STxB به تنهایی برای ایمنی‌زایی از قدرت کافی تحریک پاسخ ایمنی برخوردار نیست. به منظور تقویت پاسخ ایمنی علیه STxB، ژن *stxB* با ژن *ctxB* ترکیب می‌شود تا با تولید پروتئین نو ترکیب کایمیریک حاصل از این ممزوج، قدرت ایمنی‌زایی علیه پروتئین STxB افزایش یابد (۲۵). پروتئین CTxB دارای ساختاری هموپنتامریک و غیرسمی بوده که بر روی کروموزوم بزرگ باکتری ویبریوکلرا قرار گرفته است. پروتئین CTxB علاوه بر اینکه سبب تولید آنتی‌بادی و ایجاد محافظت علیه توکسین کلرا می‌شود، خود به عنوان یک ادجوانت زیستی مهم مطرح است که می‌تواند سبب برانگیختن پاسخ‌های ایمنی از جمله ایمنی مخاطی شود (۲۶). در طراحی کاندیدهای واکسن، امروزه توجه خاصی به پروتئین‌های کایمر می‌شود. پروتئین‌های کایمر، دربردارنده‌ی زیرواحدهای پروتئینی، لینکرها و توالی‌هایی با ویژگی ادجوانتی، می‌توانند سبب افزایش خاصیت ایمنونویسی پروتئین‌های نو ترکیب شوند. استفاده از لینکر مناسب، این امکان را فراهم می‌آورد که سیستم ایمنی بتواند علیه اپی‌توپ‌های خطی و به‌ویژه اپی‌توپ‌های ساختاری هر زیرواحد تشکیل‌دهنده‌ی پروتئین، آنتی‌بادی تولید کند.

در این مطالعه، در انتهای آمینوی پروتئین CTxB از لینکری شامل اسیدآمینه‌های پرولین و گلیسین استفاده شد که پرولین ساختاری سه شاخه داشته و مانع از نزدیک شدن دمین‌های پروتئینی به یکدیگر می‌گردد. میان BLF1 و STxB نیز از لینکر فوری‌نی استفاده شد که سبب حفظ بهتر موقعیت فضایی پروتئین‌ها می‌گردد (۲۷). برای تهیه‌ی واکسن، ابتدا باید مشخص کنیم که بهتر است از ترکیب پروتئین دوتایی یا سه‌تایی استفاده کنیم. برای استفاده از ترکیبات دوتایی باید این نکته را در نظر گرفت که پروتئین STxB اندازه‌ی کوچکی دارد و پاسخ ایمنونولوژیک مناسبی

در بدن در مقابل آن ایجاد نمی‌شود، اما هنگامی که با CTxB همراه شود، پاسخ ایمنونولوژیک بدن در برابر آن افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند (۲۵).

هنگامی که نتایج مربوط به ترکیبات دوتایی و سه‌تایی حاصل از نرم‌افزارهای protparam و Modeller را با هم مقایسه کنیم، متوجه می‌شویم که پایداری، نیمه‌عمر و تغییر در حالت طبیعی در بین ترکیبات دوتایی و سه‌تایی با هم تفاوت چندانی ندارند. شاخص ناپایداری (Instability Index) که بر اساس نوع و ترتیب اسیدآمینه‌های موجود در یک پروتئین محاسبه می‌گردد، بیانگر میزان پایداری پروتئین نو ترکیب می‌باشد. دامنه‌ی شاخص ناپایداری از ۳۰ تا ۵۰ متغیر است، به گونه‌ای که پروتئین‌هایی با شاخص کمتر از ۴۰، جزء پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شوند (۲۸). در این حالت که تفاوتی بین ترکیبات دوتایی و سه‌تایی مشاهده نشود، بهتر است که از یکی از ترکیبات سه تایی استفاده کنیم، به دلیل اینکه هزینه‌ی ساخت آن کمتر است و مزایایی از جمله افزایش پاسخ ایمنونولوژیک بدن را دارا می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از نرم‌افزارهای مختلف و همچنین تحقیقاتی که پیش از این بر روی این پروتئین‌ها و ترکیب آن‌ها برای افزایش پاسخ ایمنونولوژیک صورت گرفته است (۲۹) به نظر می‌رسد بهترین حالت و ترتیب برای ساخت واکسن از این سه پروتئین، این باشد که هر سه این پروتئین‌ها به صورت یک پروتئین کایمیریک و با ترتیب CTxB-BLF1-STxB به یکدیگر متصل گردند. هنری و همکاران (۲۹)، ترکیب‌های مختلف ژن‌های *stxB*، *ipaD* و *ctxB* را در شیگلادیسانتری و ویبریوکلرا به وسیله‌ی بیوانفورماتیک بررسی کردند و بهترین حالت ممکن ممزوج سه‌تایی را به‌دست آوردند. نتایج تحقیق حاضر نیز در راستای نتایج هنری و همکاران (۲۹) می‌باشد که به دلیل خاصیت ایمنوادجوانتی CTxB و اندازه‌ی کوچک STxB، این



دو پروتئین باید در کایمر سه تایی کاندید واکسن حضور داشته باشند تا سبب پاسخ مناسب ایمنولوژیک بدن گردد. در تحقیق اخیر نیز کنار هم قرار گرفتن این دو پروتئین در کنار BLF1، سبب خنثی شدن سمیت BLF1 گردیده تا بتوان از این کاست سه‌تایی به عنوان کاندید واکسن خوراکی استفاده کرد. ترتیب ذکر شده طبق نتایج حاصل از نرم‌افزار ProtParam بیشترین پایداری و طول عمر را خواهد داشت. وقتی که در یک ژن ممزوجی قطعات کوچک در داخل قرار می‌گیرند اپی توپ‌های آنها بوسیله قطعات بزرگ C-ترمینال و N-ترمینال در داخل ساختار سوم پروتئین مخفی مانده و اثر آن در ایمنی‌زایی قابل مشاهده نیست. طبق نتایج حاصل از مطالعات درتزیباگ و همکاران (۳۰)، اضافه کردن پپتید به انتهای آمینوی پروتئین CTxB می‌تواند سبب تغییر ساختار و عملکرد آن گردد. بنابراین بهتر است که پپتید به انتهای آمینوی پروتئین CTxB متصل نشود. از آنجا که توالی ژن‌های *ctxB*، *stxB* و *blf1* دارای کدون نادر هستند، تمامی توالی‌های نوکلئوتیدی پروتئین کایمر، با نرم‌افزار آنالیز، جهت بیان بالا در میزبان *E. coli* بهینه‌سازی گردید. شاخص انطباق‌پذیری کدونی Codon Adaptive Index (CAI) کایمر CTxB-BLF1-STxB، قبل از بهینه‌سازی ۰/۷۷ و بعد از بهینه‌سازی به ۰/۹ افزایش یافت، که نشانگر انتخاب کدون‌هایی است که tRNA بیشتری برای آن‌ها وجود داشته و باعث افزایش بیان در میزبان *E. coli* می‌شود. پس از ساخت کاست ژنی نو ترکیب، میزان بیان پروتئین با استفاده از ژل SDS-PAGE، ۱۲ درصد انجام شد و از آنجا که در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد بیان خوبی نداشتیم، به منظور بهینه‌سازی شرایط، دما به ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد کاهش داده شد که سبب افزایش قابل توجهی در میزان بیان پروتئین نو ترکیب شد. در هر حال با توجه به توانایی توقف پروتئین‌سازی BLF1 و خاصیت ادجوانتی CTxB و

STxB، قرار دادن ژن‌های *ctxB*، *stxB* و *blf1* در یک کاست ژنی، به ترتیبی که بیشترین اثر افزایشی را بر روی هم داشته باشند، می‌توانند به عنوان یک کاندید واکسن مناسب بر علیه بیماری‌های میلوئیدوزیس، وبا و شیگلوزیس مورد توجه قرار گیرد. عامریان و همکاران نیز طراحی بیوانفورماتیکی و ساخت ژن کایمر دربردارنده زیر واحد B کلراتوکسین و زیر واحد A پیلی ویبریوکلرا را انجام داده و نتیجه گرفتند که می‌توان از سازه‌ی ژنی نو ترکیب به عنوان ایمونوژن جهت بررسی‌های ایمنی علیه وبا استفاده کرد (۱۹). اتمام آزمون-های تولید واکسن می‌تواند سبب ثبت قانونی واکسن برای دفاع در برابر اپیدمی‌ها گردد و همچنین ممکن است سبب آزمون کلینیکی بیشتر برای ارزیابی پتانسیل استفاده از این واکسن‌ها در مناطقی از جهان شوند که در آن اندمیک بیماری به صورت طبیعی رخ می‌دهد (۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به توانایی توقف پروتئین‌سازی BLF1، خاصیت حاملی STxB و خاصیت ادجوانتی CTxB و هم افزایشی اثر آنها، قرار دادن این سه ژن در یک کاست ژنی به بهترین حالت ممکن، می‌تواند برای یک واکسن مناسب مورد توجه قرار گیرد. با استفاده از نرم افزارهای مختلف بهترین ترتیب ژن‌ها بدست آمد و کاست آن ساخته و بیان بسیار مناسب در *E. coli* گرفته شد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اساتید، پژوهشگران، کارکنان مرکز و گروه زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در این پژوهش از لحاظ علمی و مالی ما را یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.



References

1. Titball RW, Burtneck MN, Bancroft GJ, Brett P. Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei vaccines: are we close to clinical trials? Vaccine. 2017;35(44):5981-9.
2. Wiersinga WJ, Currie BJ, Peacock SJ. Melioidosis. "N. Engl. J. Med.". 2012; 367(11):1035-44.
3. Chu J, Pelletier J. Targeting the eIF4A RNA helicase as an anti-neoplastic approach. BBA, Gene Regul. Mech. 2015;1849(7):781-91.
4. Cruz-Migoni A, Hautbergue GM, Artymiuk PJ, Baker PJ, Bokori-Brown M, Chang C-T, et al. A Burkholderia pseudomallei toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A. Science. 2011;334(6057):821-4.
5. Malina A, Cencic R, Pelletier J. Targeting translation dependence in cancer. Oncotarget. 2011; 2(1-2): 76-88.
6. Masoudi Kerahroudi M, Honari H, E'temad aubi Sm, Abdollahi M. Comparison of the Titers of Produced Antibodies against BLF1 and BLF1-STxB Recombinant Proteins in Laboratory Rats. SJIMU. 2019;26(6):111-21.
7. Masoudi Kerahroudi M, Honari H, abdollahi m. Expression of Blf1-Stx B Gene Cassette in E. coli and Investigation Antibody Titer in Mice. JSSU. 2017;24(11):876-86.
8. Masoudi Kerahroudi M, Honari H, Minaei ME, Abdollahi M. Expression of blf1 Gene of Burkholderia pseudomallei in Escherichia coli and Assessment of Antibody Titer in Mouse. Qom Univ Med Sci J. 2017;11(10):30-9.
9. Puzari M, Sharma M, Chetia P. Emergence of antibiotic resistant Shigella species: A matter of concern. JIPH. 2018;11(4):451-4.
10. Honari H, Amlashi I, Minaei M, Safaei S. Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein. AMUJ. 2013.
11. Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig K. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. Microbial biotechnology. 2011;4(1):32-46.
12. Lunelli M, Lokareddy RK, Zychlinsky A, Kolbe M. IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. PNAS. 2009;106(24):9661-6.
13. Oladokun MO, Okoh IA. Vibrio cholerae: A historical perspective and current trend. "Asian Pac. J. Trop. Dis.". 2016;6(11):895-908.
14. Odumoso O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. Toxins. 2010;2(7):1612-45.
15. Shen My, Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. Protein Sci. 2006;15(11):2507-24.
16. Nazarian S. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. "J. Microbiol. Methods" 2012:36-45.
17. Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. Nucleic Acids Res. 2007;35(suppl_2):W126-W31.
18. Garg VK, Avashthi H, Tiwari A, Jain PA, Ramkete PW, Kayastha AM, et al. MFPPI-Multi FASTA ProtParam Interface. Bioinformatics. 2016;12(2):74.
19. Amerian M, Nazarian S, Honari H, Minaie ME, KORDBACHEH E. Insilico Design and Construction of a Chimeric Gene Comprising the A Subunit of Vibrio cholera Pilin and the B Subunit of Cholera Toxin. Iran J Med Microbiol. 2017.
20. Barrick JE, Roberts RW. Sequence analysis of an artificial family of RNA-binding peptides. Protein Sci. 2002;11(11):2688-96.
21. Banerjee R, Das B, Nair GB, Basak S. Dynamics in genome evolution of Vibrio cholerae. Infection, Genetics and Evolution. MEEGID. 2014;23:32-41.
22. Baldauf K, Royal J, Hamorsky K, Matoba N. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications, Toxins, 7, 974-996. CrossRef PubMed PubMedCentral Google Scholar. 2015.
23. Jafari D, DEGHAN NF, Honari H, Hoseini R, Jafari R. Bioinformatic analysis of different fusions of ipaD, PA20 and CTxB antigens: a preliminary analysis for vaccine design. Genetics in the Third Millennium. 2016.
24. Eramian D, Shen My, Devos D, Melo F, Sali A, Marti-Renom MA. A composite score for predicting errors in protein structure models. Protein Sci. 2006;15(7):1653-66.



25. Madanchi H, Honari H, Sadraeian M, Hesaraki M. Fusion of CtxB with StxB, Cloning and Expression of in *Escherichia coli*: A challenge for Improvement of Immune Response Against StxB. "Iran. J. Pharm. Sci.". 2011;7(3):185-90.
26. Kundu J, Mazumder R, Srivastava R, Srivastava BS. Intranasal immunization with recombinant toxin-coregulated pilus and cholera toxin B subunit protects rabbits against *Vibrio cholerae* O1 challenge. FEMS IMMUNOL MED MIC. 2009;56(2):179-84.
27. Patwary NIA, Islam MS, Sohel M, Ara I, Sikder MOF, Shahik SM. In silico structure analysis and epitope prediction of E3 CR1-beta protein of Human Adenovirus E for vaccine design. Biomed. J. 2016;39(6):382-90.
28. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. "Microbiol. Mol. Biol. Rev.". 1998;62(4):1301-14.
29. Honari H, Minaei H, Ebrahim M. Analyzing the Various Fusions for ctxB, ipaD and stxB Genes of *Shigella Dysenteriae* and *Vibrio Cholera* by Bioinformatics Tools. Genetics in the 3rd Millennium. 2013;11(2):3070-77.
30. Dertzbaugh M, Elson C. Reduction in oral immunogenicity of cholera toxin B subunit by N-terminal peptide addition. Infect. Immun.. 1993;61(2):384-90.



Bioinformatic Design and Construction of a Chimeric Gene Comprising the *stxB*, *ctxB* and *blf1* Genes

Zahra Moshiri¹, Raheem Haddad¹, Hossein Honari²

1- Department of Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2- Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

Original Article

Received: 23 Aug 2019

Accepted: 19 May 2020

***Corresponding Author:**

Hossein Honari, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

TEL::+982174189514

Email:

honari.hosein@gmail.com

ABSTRACT

Introduction

bacteria species; *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio cholera*, and *Shigella dysenteriae* are the main pathogen causing Melioidosis, Cholera, and Shigella in humans respectively. bacterial species have a protein that has antigenic prosperities along with being a mucus based adjuvant thus easing their delivery and immunogenicity. These proteins were BLF1(*B. pseudomallei*), CTxB (*V. cholera*), and StxB (*S. dysenteriae*). The goal of this study was a chimeric gene composed of Blf1, CTxB, and StxB and expression of these proteins from *E.coli*.

Materials and Methods

Using Bioinformatic tools such as ProtParam and Modeller the different combinations of the chimeric protein were assessed. The blf1 and stxB genes were PCR amplified from pET28a-BLF1-StxB. The 850bp fragment encompassing BFL1-StxB was cloned using SalI and NotI in the pET28a-CTxB vector. The engineered plasmid was transformed in BL21(DE3). The ctxB-stxB-blf1 gene was expressed following induction with IPTG. This induction was then assessed using SDS-PAGE.

Results

Chimeric protein instability index gets 40.06 and the half-life of it in *E. coli* was over 10 hours. Codon Adaptive Index (CAI) rise to 0/9 and GC content increase to 54.9. The optimal vaccine combination for the chimeric protein was determined to be CTxB-BLF1-StxB. Expression of recombinant protein in *E. coli* led to the production of a chimeric protein with 48 kDa molecular weight.

Conclusion

The findings of the current study revealed that this antigen can be raised as a recombinant vaccine candidate which can be due to such factors as a property of the ability to stop protein synthesis in BLF1, CTxB adjuvant, and delivery of StxB protein.

Keywords

Burkholderia pseudomallei, BLF1 toxin, Melioidosis

► Please cite this article as: Moshiri A, Haddad R, Honari H. Bioinformatic Design and Construction of a Chimeric Gene Comprising the *stxB*, *ctxB* and *blf1* Genes. J Neyshabur Univ Med Sci. 2020;8(4):73-87.