کلونینگ ژن P۴۰ مایکوپلاسما آگالاکتیه در سیستم پروکاریوتی

فرشته یاوری[۱*]، سیدعلی پوربخش[۲]، حسین گودرزی[۲]، رمضانعلی خاوری‌نژاد[۱]

چکیده

ژن P۴۰ کد کننده پروتیین چسبندگی مایکوپلاسما است، که باعث اتصال مایکوپلاسما آگالاکتیه به سلول‌های یوکاریوتی، کلونیزه شدن آن در میزبان و شروع بیماری می‌شود. لیپوپروتیین P۴۰ یک آنتیژن تحریک کننده ایمنی و کاندید مناسب برای واکسن‌سازی است. هدف از انجام این مطالعه تولید واکسن نوترکیب زیرواحدی با استفاده از کلونینگ ژن P۴۰ در سیستم پروکاریوتی می‌باشد.

در این تحقیق، ژن P۴۰ از سه سویه واکسینال مایکوپلاسما آگالاکتیه در ایران تکثیر و تعیین توالی شد. توالی ژن P۴۰ منتخب، پس از یک سری تغییرات، سنتز و در پلاسمید کلونینگ کلون شد، سپس به باکتری اشریشیاکلی به روش شوک حرارتی انتقال داده شد. پس از تکثیر، ژن P۴۰ توسط دو آنزیم برش داده شد. ژن تخلیص شده در پلاسمید بیانی، جهت انتقال به باکتری بیانی کلون شد.

نتایج نشان داد که قطعه ۹۲۰ نوکلئوتیدی ژن P۴۰ از سه سویه واکسینال تکثیر شد که نشانه حضور ژن در آنها می‌باشد. توالی کامل این ژن که شامل ۱۰۹۲ نوکلئوتید بود از پلاسمید کلونینگ جدا و در پلاسمید بیانی pET22b+ حاوی شروع کننده و تمام کننده T7 کلون شد. در نهایت پلاسمید نوترکیب در سلول باکتری ترانسفورم شد. کلونینگ ژن P۴۰ اولین قدم در تولید واکسن زیرواحدی نوترکیب برای پیشگیری از آگالاکسی دردام می‌باشد.

واژگان کلیدی: *ژن P۴۰، مایکوپلاسما آگالاکتیه، واکسن نوترکیب، کلونینگ.*

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۰

مقدمه

مایکوپلاسماها در دسته مولی کوتیس و راسته مایکوپلاسماتالس اول طبقه‌بندی می‌شوند. منشاء این باکتری گرم مثبت است (۷).

مایکوپلاسما آگالاکتیه گونه‌ای ازمایکوپلاسماهاست که باعث بیماری مسری آگالاکسی در گوسفند و بز می‌شود که دارای علائم رایجی همچون ورم ملتحمه، ورم مفاصل، ورم پستان می‌باشد (۱). گاهی اوقات این بیماری به فرم مزمن تبدیل می‌شود، که نتیجه فرار میکروارگانیسم از سیستم ایمنی بدن میزبان می‌باشد. این فرار از سیستم ایمنی به دلیل تغییر دادن لیپوپروتیین‌های سطحی مایکوپلاسما می‌باشد. وظیفه دیگر این لیپوپروتیین‌های سطحی مایکوپلاسما اتصال باکتری به سلول میزبان و کلونیزه شدن است. جهت اتصال باکتری به سلول‌های یوکاریوتی میزبان نیاز به مولکول‌های چسبنده‌ایی به نام (adhesion) می‌باشد. نقش دیگر این اتصالات سهولت انتقال متابولیت‌های باکتریایی مانند سوپراکسیدها و پراکسیدها به سلول میزبان بوده که منجر به آسیب اکسیداتیو بافتی می‌شود (٤و ۲).

اگرچه مایکوپلاسما آگالاکتیه پروتئین‌های سطحی زیادی را مانند P۳۰، P۴۰ و P۸۰ بیان می‌کند ولی مهمترین این پروتیین‌ها به عنوان کاندید برای واکسن‌سازی P۴۰ است زیرا با تزریق این پروتیین به بدن میزبان تیتر آنتی‌بادی تولیدی بسیار بالا می رود که این آنتی‌بادی و یا قطعه اتصالی به آنتی‌ژن (Fab) مانع کلونیزاسیون این باکتری می‌شود. فلوری وهمکارانش از نظر ژنتیکی و عملکردی این ژن را بررسی کردند.

بررسی‌های عملکردی P۴۰ با واسطه آنتی‌بادی پلی‌کلونال صورت گرفت و نشان داد که این مولکول باعث اتصال باکتری به سلول‌های غشاء سینوویال گوسفند می‌شود. این لیپوپروتیین غشای سیتوپلاسمی وزنی معادل ٤۰ کیلو دالتون دارا می‌باشد که فقط در مایکوپلاسما آگالاکتیه شناخته شده و در هیچ مایکوپلاسمای دیگری بیان نمی‌شود (١٤و ٤، ۲). تفاوت در ناحیه ۱۰- ناحیه بالا دست ژن منجر به بیان‌های مختلف ژن P۴۰ می‌شود. به غیر از سروتایپ C به علت یک جهش در انتهای ´۵، این ژن در تمام سویه‌های مایکوپلاسما آگالاکتیه بیان شده و تک کپی می‌باشد. از ویژگی‌های دیگر، وجود یک ناحیه ۱۰۰٪ مخصوص مایکوپلاسما آگالاکتیه در ژن P۴۰ می‌باشد. همچنین این ژن کدون TGA_{Trp} مخصوص مایکوپلاسما را به

۱*ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران. f_iavari@yahoo.com
۲ـ آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

جای کدون عمومی TGG_{Trp} استفاده می‌کند (۱۲و ۱۰، ٦، ۹، ٤، ۲). پروتیین P٤٠ حاوی ١٦,٢ درصد لیزین و ١٦,٩ درصد لوسین و ایزولوسین می باشد. از این لحاظ پروتیین P٤٠ مشابه پروتیین P٥٠ مایکوپلاسما هومینیس است. که حاوی موتیف زیپ لوسین می باشد. احتمال دارد در P٤٠ نیز این موتیف وجود داشته باشد (١٦و ٤).

در ایران سه سویه واکسینال مایکوپلاسما آگالاکتیه از نظر وجود ژن P٤٠ مقایسه و بررسی شده‌اند. مقایسه‌ها نشان داده است که بین سویه‌های واکسینال ایران و سویه‌های اروپایی همولوژی وجود دارد نسبت به برخی سویه‌های همولوژی زیاد و به برخی دیگر همولوژی کمتری دارد.

در این مطالعه ژن P٤٠ مایکوپلاسما آگالاکتیه در سویه‌های واکسینال ایران تعیین توالی شده و در مقایسه با سویه PG2 در بانک ژنی ١٠٠-٩٨ درصد همولوژی نشان داد. با توجه به کدون ترجیحی در مایکوپلاسما و پلاسمید بیانی، ژن P٤٠ طراحی شده و در پلاسمید کلون شد که این ساختار ژنی جهت بیان در سیستم ترشحی پروکاریوتی استفاده خواهد شد.

مواد و روش کار

در این مطالعه سه سویه واکسینال مایکوپلاسما آگالاکتیه ایران به نام‌های طالقان، شیراز و لرستان از لیوفیلیزه خارج شده و در محیط کشت PPLO مایع کشت داده شدند و به مدت ١٠ روز در٣٧ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از رشد، ژنوم آنها استخراج شده و PCR جهت تایید گونه، بر روی آنها انجام شد (١٠).

استخراج ژنوم از مایکوپلاسما

برای این عمل ابتدا حدود ٥٠٠ میکرولیتر از سویه‌های واکسینال مایکوپلاسما آگالاکتیه که از موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه شد، ١٥ دقیقه در ١٣٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفوژ شده، مایع رویی را دور ریخته و سپس ١٠٠ میکرولیتر بافر لیزکننده اضافه شد. محلول به خوبی تکان داده شد و در دمای ٥٦ درجه ٣/٥ الی ٤ ساعت انکوبه شد. سپس هم حجم محلول، فنل اشباع شده اضافه کرده و ١٥ دقیقه در ١٣٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. فاز رویی نمونه برداشته شده و به تیوپ جدید منتقل شد و هم حجم با آن مخلوط برابر فنل-کلروفرم اضافه و ١٥ دقیقه در ١٣٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. فاز رویی برداشته و هم حجم با آن کلروفرم اضافه شد، به خوبی شیک و سانتریفوژ شد. محلول رویی به تیوپ جدید منتقل شد و ٠/١ حجم آن سدیم استات ٣ مولار و دو برابر محلول الکل مطلق سرد اضافه شد. ٢٠ دقیقه در فریزر ٢٠- انکوبه و سانتریفوژ شد. مایع خارج شده و ٢٠٠ میکرولیتر الکل ٧٠٪ سرد به آن اضافه و پس از سانتریفوژ، محلول خارج و رسوب خشک شده و ٥٠ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه شد (١٥و ١٠).

واکنش PCR

PCR با هدف تکثیر قطعات مختلف از ژن P40 (با استفاده از دستگاه PeQSTAR 2X) در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر (بافر PCR ١٠X، کلرید منیزیم ٥٠ میلی مولار، دی اکسی ریبونوکلئوتید ١٠ میلی مولار، ژنوم الگو ٣٠ نانو گرم، آنزیم Taq پلی مراز ١/٤ واحد، ٢٠٠ نانومولار از هر پرایمر) جهت تایید گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه با واسطه دو پرایمر MAR و MAF با توالی‌ها و برنامه به شرح زیر صورت پذیرفت (٢).

MAF: TGATGATAAGAACGAAAATTCAC
MAR: ACCAGTGTCTTTTGATTTAAC

الگوی DNA ژنومی به مدت ٢ دقیقه در ٩٤ درجه سانتیگراد جهت دناتوره شدن حرارت داده شد، سپس مرحله تکثیر (٣٠ ثانیه دناتوره شدن در ٩٤ درجه سانتیگراد، ٣٠ ثانیه در ٥٢,٥ درجه سانتیگراد برای آنیلینگ پرایمر به DNA الگو و ٣٠ ثانیه در ٧٢ درجه سانتیگراد) ٣٥ بار تکرار شد و در مرحله آخر جهت ادامه فعالیت پلی‌مرازی ٧ دقیقه در ٧٢ درجه حرارت انکوبه شدند.

محصول PCR روی ژل آگارز ١٪ الکتروفورز شده و قطعات تکثیر شده با دستگاه لومینیتور آشکار سازی شدند.

تخلیص و سکانس محصول PCR

پس از مشاهده قطعه مورد نظر تکثیر یافته محصول PCR روی ژل با دمای ذوب پایین (low melting) الکتروفورز شده و قطعات تکثیر شده طبق کیت استخراج از ژل (خریداری شده از شرکت Roche) تخلیص شدند.

در این مرحله باندهای مشاهده شده بر روی ژل با تیغ استریل برش داده شده و در اپندورف ۱/۵ قرار داده شدند. ۳۵۰ میکرولیتر از بایندینگ بافر به تیوب اضافه شده و به خوبی ورتکس شد. محلول ۱۰ دقیقه در ٥٦ درجه سانتیگراد انکوبه شد، سپس ۱۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه شده و محلول حاصله را به بخش بالایی فیلتر که روی تیوب قرار گرفته است تزریق شد و ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دورسانتریفوژ شد. محلول زیر فیلتر دور ریخته شده و ۵۰۰ میکرولیتر واشینگ بافر اضافه و سانتریفوژ شد. محلول زیری تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر از بافر قبلی دوباره اضافه و سانتریفوژ شد. سپس فیلتر را به روی یک اپندورف ۱,۵ گذاشته و ۵۰ میکرولیتر الوشن بافر ریخته و سانتریفوژشد. محلول حاصله برای سکانس دو طرفه (به شرکت bioneer) فرستاده شد. نتایج حاصل از سکانس در بانک ژنی، با برنامه DNAsis MAX بلاست شد.

طراحی ژن

با هدف بیان ژن در کاست بیانی+pET22b در باکتری اشریشیاکلی سویه DH5α، در ژن P٤٠ انتخابی تغییراتی اعمال شد که شامل تغییر رمز اسیدآمینه تریپتوفان مخصوص مایکوپلاسما (TGA) به کدون عمومی (TGG)، تعبیه سایت برش آنزیم‌های NotI و EcoRI در انتهای ´٥ و ´٣، اضافه کردن یک نوکلئوتید در ابتدای ژن جهت جلوگیری از تغییر در چارچوب و حذف کدون پایانی ژن P٤٠ می‌باشد. ژن سنتز شده در پلاسمید کلونینگ pGEM - B1 کلون شده بود و به باکتری مستعد به روش شوک حرارتی ترانسفورم شد(١٦و ٤، ٢).

دگرسازی باکتری (Transformation)

باکتری به کمک کلسیم کلراید ۲۰ میلی مولار و منیزیم کلراید ۸۰ میلی مولار مستعد و آماده دگرسازی شد. ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید حاوی ژن به باکتری مستعد اضافه و ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. شوک حرارتی به مدت ۲ دقیقه در ٤٢ درجه سانتیگراد به سوسپانسیون وارد شده پس از این مدت نمونه‌ها ٥ دقیقه روی یخ انکوبه شده و سپس ۸۰۰ میکرولیتر محیط لوری ـ برتانی (ال–بی) به اپندورف اضافه شد و ٤٥ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد شیک شد، پس از این مدت روی محیطهای ال ـ بی آگاردار حاوی ۵۰ ماکروگرم در ۱ میلی لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شدند (١٦و ٨).

استخراج پلاسمید

ابتدا باکتری‌ها به مدت یک شب در شیکرانکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد رشد داده شد و در لوله ۱/۵ به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور رسوب داده شدند. محلول رویی خارج شده و ٦٠٠ میکرولیتر بافر STE (سدیم کلراید ٤ مولار، تریس ۱ مولار، ای.دی.تی.ای ۰/۵ مولار) سرد و استریل اضافه، ورتکس و ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ (گلوکز ۵۰ میلی مولار، تریس– کلراید ۲۵ میلی مولار، ای.دی.تی.ای ۰/۵ مولار) اضافه و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس از محلول ۲ (سدیم دودسیل سولفات ۱۰٪ و هیدروکسید سدیم ۱ نرمال) ۲۰۰ میکرولیتر اضافه، ورتکس و ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. ۱۵۰ میکرولیتر از محلول شماره ۳ (پتاسیم استات ۵ مولار و اسید استیک) اضافه ورتکس و ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. به نمونه ۲۲۵ میکرولیتر فنل و ۲۲۵ میکرولیتر کلروفرم اضافه، و ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز رویی را به لوله جدید انتقال داده و ۱ میلی لیتر به آن اتانول ٩٦٪ اضافه شد و پس از ورتکس ۵ دقیقه در ۹۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ سرد اضافه و سانتریفوژ شد. مایع رویی

دور ریخته و رسوب خشک شد و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و در دمای ۲۰- نگهداری شد (۱۵و ۱۰).

جداسازی ژن P۴۰ از پلاسمید pGEM- B1

با استفاده از آنزیم EcoRI ژن P۴۰ از پلاسمید جداسازی شده و روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و مشاهده شد. سپس با استفاده از کیت استخراج از ژل تخلیص شده و برای کلون در پلاسمید بیانی استفاده شد.

هضم آنزیمی ژن و پلاسمید بیانی pET22b+

با وجود اینکه ژن P۴۰ با یک آنزیم از پلاسمید جداسازی شده بود ولی برای کلون کردن در پلاسمید دوم باید با آنزیم NotI نیز برش داده می‌شد.

این پلاسمید و ژن P۴۰ با استفاده از آنزیم‌های NotI و EcoRIبرش داده شده، روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شده و برای الحاق آماده شدند.

الحاق

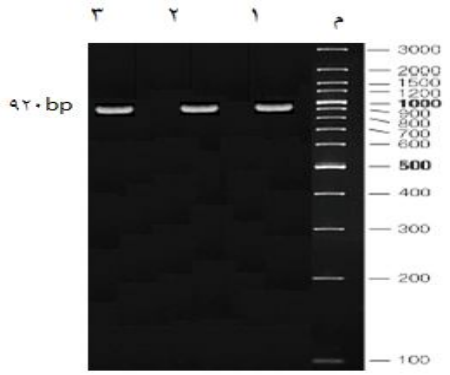
در این مرحله قطعه ژنی تخلیص شده به کمک آنزیم T4 لیگاز در پلاسمید بیانی کلون شد. محلول مورد نظر شامل نسبت ۳ به ۱ ژن به پلاسمید، بافر و آنزیم بوده و به مدت ۱۸ ساعت در ۱۶ درجه سانتیگراد انکوبه شد (۱۵و ۹، ۶).

غربالگری لیگاسیون

پس از رشد باکتری‌های ترانسفورم شده، کلنی‌ها به طور تصادفی جهت غربالگری با PCR انتخاب شدند. برای این عمل کلنی‌های رشد کرده در محیط مایع ال ـ بی کشت داده شده و استخراج پلاسمید شدند سپس محصول الحاق بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. همچنین تکنیک PCR نیز برای انجام این تأیید نیز انجام گرفت. پس از تایید، نمونه‌های لایگت شده برای بیان ژن انتخاب شدند. پلاسمید کلون شده به باکتری مستعد بیانی BL21 ترانسفورم شده و روی محیط ال-بی آگار دار حاوی ۵۰ ماکروگرم در۱ میلی لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شدند (۱۶و ۱۵، ۱۰).

نتایج

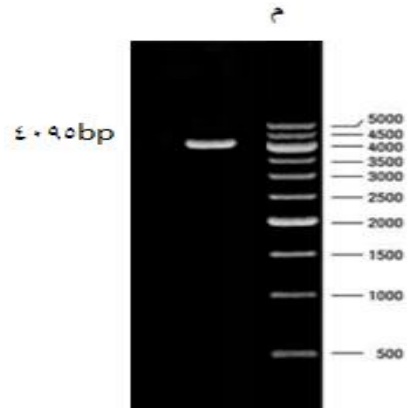
کشت مایکوپلاسما در PPLO مایع و تایید گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه سه سویه مایکوپلاسمای ایران لرستان، طالقان و شیراز در محیط کشت PPLO مایع پس از ده روز رشد کردند. طبق نگاره ۱ پس از استخراج ژنوم و PCR با پرایمرهای MAF و MAR قطعه ۹۲۰ نوکلئوتیدی از ژن P۴۰ تکثیر شد که تایید کننده گونه آگالاکتیه می‌باشد.



نگاره ۱ـ قطعات ۹۲۰ نوکلئوتیدی تکثیر شده توسط PCR از ژن P۴۰ سه سویه واکسینال مایکوپلاسما آگالاکتیه ایران: ۱- سویه طالقان ۲- سویه شیراز ۳- سویه لرستان. م : مارکر ۱۰۰bp.

دگرسازی و استخراج پلاسمید pGEM- B1

باکتری‌های DH5α ترانسفورم شده با این پلاسمید روی محیط آنتی‌بیوتیک‌دار رشد کرده و پس از استخراج پلاسمید از کلنی‌ها روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و پلاسمید با اندازه ۴۰۹۵ نوکلئوتید مطابق با نگاره ۲ مشاهده شد.



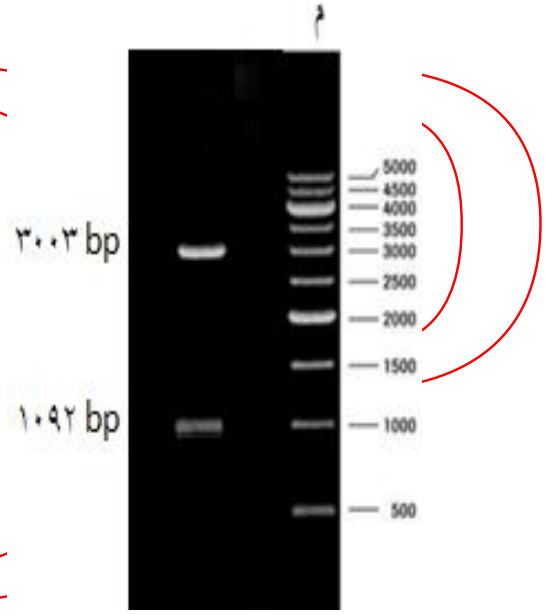
نگاره ۲ـ پلاسمید کلونینگ pGEM- B1 – P40 .م: مارکر bp ۵۰۰.

تایید قطعه ژنی در پلاسمیدpGEM- B1

این عمل توسط PCR با پرایمرهای MAF, MAR صورت پذیرفت و قطعه ۹۲۰ نوکلئوتیدی از ژن P٤٠ تکثیر و روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد.

هضم آنزیمی پلاسمید pGEM- B1

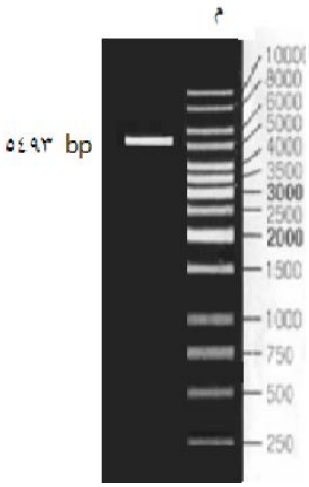
همانطور که در نگاره ۳ مشاهده می‌شود ژن P٤٠ با وزن ۱۰۹۲ نوکلئوتید پس از هضم آنزیمی پلاسمید pGEM- B1 جدا شد و روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و مشاهده شد.



نگاره ۳ـ جداسازی قطعه ژنی P٤٠ از پلاسمید کلونینگ: ژنP٤٠ با اندازه ۱۰۹۲ نوکلئوتید جداسازی شده از پلاسمید pGEM- B1. م: مارکر ۵۰۰bp.

دگرسازی و استخراج پلاسمیدpET22b+

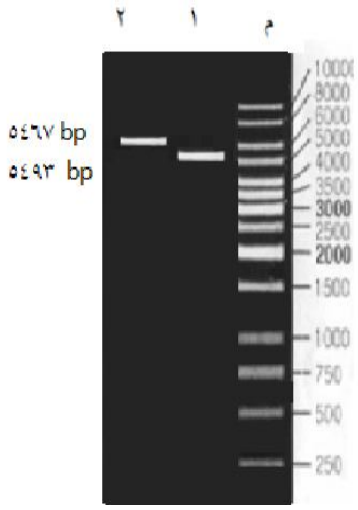
این پلاسمید پس از ترانسفورماسیون در باکتری اشریشیاکلی سویه DH5α روی محیط آنتی‌بیوتیک‌دار رشد کرده و پلاسمید با وزن ٥٤٩٣ نوکئوتید طبق نگاره ٤ روی آگارز ۱٪ الکتروفورز و مشاهده شد.



نگاره ٤ـ پلاسمید بیانی pET22b+ . م: مارکر ۱ kb.

هضم آنزیمی پلاسمید pET22b+

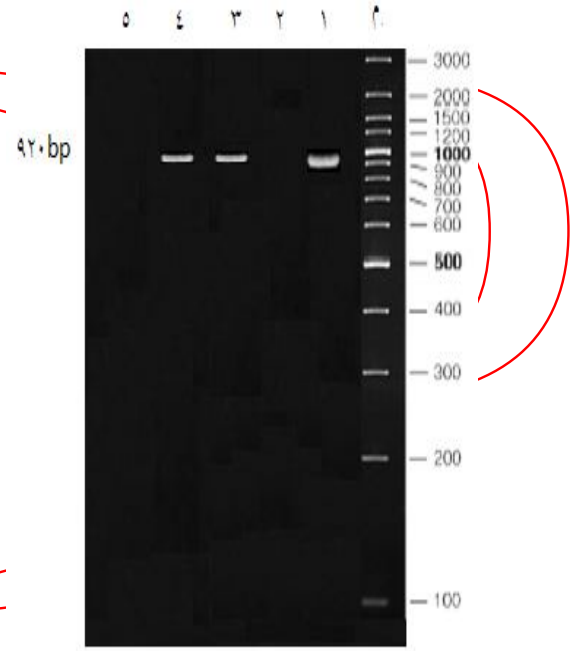
جهت آماده سازی این پلاسمید برای الحاق ژنP٤٠، قطعه ٢٦ نوکلئوتیدی از پلاسمید به کمک آنزیم‌های NotI و EcoRI از پلاسمید جدا و پلاسمید روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و پلاسمید pET22b+ برش نخورده به عنوان کنترل منفی استفاده شد باندهای مختلفی طبق نگاره ٥ مشاهده شد.



نگاره ٥ـ هضم آنزیمی پلاسمید pET22b+: ۱- پلاسمید برش نخورده به عنوان کنترل ۲- پلاسمید برش خورده و خطی شده با دو آنزیم NotI و EcoRI . م: مارکر۱kb.

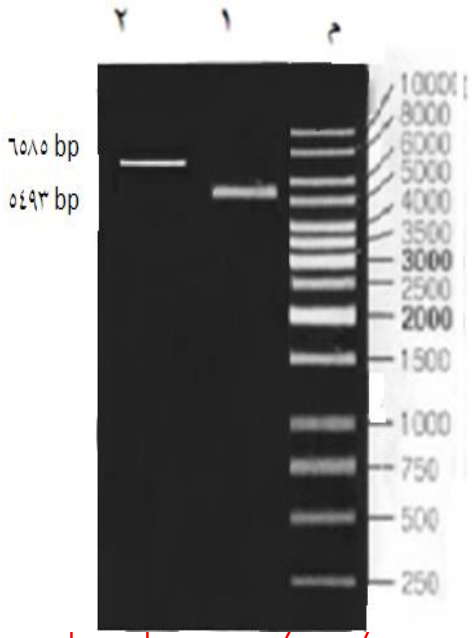
الحاق کردن و تایید ژن P٤٠ در پلاسمید pET22b+ نوترکیب

ژن P٤٠ استخراج شده از پلاسمید pGEM- B1 در پلاسمید بیانی pET22b+ الحاق شد و جهت تأیید این عمل، PCR صورت پذیرفت. نگاره ٦ نشان می دهد که پلاسمید نوترکیب باند ٩٢٠ bp را نسبت به پلاسمید برش نخورده تکثیر داده است. در شماره ٤ باند ٩٢٠ نوکلئوتیدی مشاهده می‌شود که نشانه حضور ژن P٤٠ در پلاسمید نوترکیب است.



نگاره ٦ـ قطعه تکثیر شده از پلاسمید نوترکیب توسط PCR : ١- کنترل مثبت واکنش PCR ٢- کنترل منفی واکنش PCR ٣- قطعه ٩٢٠ نوکلئوتیدی تکثیر شده از ژن P٤٠ تخلیص شده از پلاسمید کلونینگ ٤- قطعات تکثیر شده پلاسمیدهای نوترکیب ٥- قطعات تکثیری توسط PCR حاصل از پلاسمید pET22b+ بدون ژن به عنوان کنترل منفی. م: مارکر ١٠٠ bp.

برای تأیید بیشتر محصول الحاق بر روی ژل آگارز ١٪ الکتروفورز شد. نگاره ٧ باند ٦٥٨٥ bp که پلاسمید نوترکیب حاوی ژن P٤٠ است نشان می‌دهد.



نگاره ٧ـ الحاق ژن P٤٠ در پلاسمید بیانی pET22b+ ١: پلاسمید بدون الحاق به عنوان کنترل منفی ٢: پلاسمید نوترکیب حاوی ژن P٤٠. م: مارکر Kb ١.

ترانسفورماسیون باکتری بیانی BL21

پلاسمید بیانی حاوی ژن، طبق پروتوکل قبل به این باکتری بیانی ترانسفورم و روی محیط آمپی‌سیلین‌دار رشد کرد.

بحث

آگالاکسی بیماری است که سالانه در صنعت دام کشور باعث آسیب‌های اقتصادی بسیاری می شود. این بیماری با کلونیزاسیون باکتری مایکوپلاسما آگالاکتیه درروده بز و گوسفند شروع می‌شود و ژن P٤٠ عامل اصلی این اتصال می‌باشد (١٤و ٥، ٤، ٢، ١). تاکنون کشورهای مختلفی مانند سوئیس، فرانسه و ایران برای پیشگیری از آگالاکسی از واکسن‌های سلولی بهره می‌بردند ولی فلوری و همکارانش بر روی ویژگی‌های ژنتیکی و عملکردی این پروتیین مطالعاتی انجام دادند و نشان دادند که این پروتیین کاندید مناسبی برای واکسن زیرواحدی می‌باشد. در این تحقیق ابتدا ژن

P٤٠ از گونه‌های مثبت آگالاکتیه توسط تکنیک PCR تکثیر داده شد و برای این کار از چندین پرایمر استفاده کردند و در نهایت در پلاسمید بیانی pETHIS-1 به همراه برچسب هیستیدین به باکتری اشریشیاکلی ترانسفورم و در آن بیان شد. این فیوژن پروتیین پس از ترشح از محیط باکتری برداشت شده و در ستون کروماتوگرافی به کمک برچسب هیستیدین تخلیص شد. بررسی‌های ایمونولوژیکی و هیستولوژی که بر روی آن انجام گرفت نشان داد که این باکتری با واسطه P٤٠ می‌تواند به سلول‌های پوششی روده گوسفند و بز متصل شود. آنتی‌بادی‌های تولید شده بر ضد این پروتیین ٤٠ کیلو دالتونی می‌تواند از این اتصال جلوگیری کرده و مانع شروع آلودگی شود (١٤و ١١، ٤).

در سال ٢٠٠٨ نیز Oravcova و همکارانش بر روی ٧٩٧ نمونه شیر کار کردند و توانایی‌های پروتیین P٤٠ را به عنوان یک مارکر تشخیصی برای تعیین آلودگی در گوسفند به کمک تست real- time PCR کیفی بررسی کردند. این مطالعه نشان داد که این تست ١٠٠٪ اختصاصی بوده و و حساسیت تست ١ اکی والان ژنوم باکتری می‌باشد. این نتایج حاکی از این است که می‌توان از P٤٠ در مطالعات و اپیدمیولوژی به عنوان یک وسیله تشخیصی سریع و قابل اطمینان استفاده کرد (١٣).

بیان ژن در سیستم پروکاریوتی از جمله اشریشیاکلی و مایکوپلاسما آگالاکتیه دارای مزایایی مانند تولید محصول بالا، دست ورزی آسان و کم هزینه و ساده بودن پروسه‌های پایین دست می‌باشد. در تحقیقی که توسط بارانوسکی و همکارانش صورت گرفت از پلاسمید p20-Imino به عنوان شاتل وکتور استفاده کردند که ژنهای *nifu, nifs* را تحت کنترل پروموتر P٤٠ مایکوپلاسما آگالاکتیه به موتانتهای مایکوپلاسما آگالاکتیه ترانسفورم کنند. نتایج نشان داد که لوکوس NIF تحت این شرایط به خوبی در مایکوپلاسما آگالاکتیه بیان می‌شود (١).

Cacciotto نیز در سال ٢٠١٣ بر روی کلونینگ و بیان ژن‌های مایکوپلاسما آگالاکتیه کار کرد و ژن نوکلئاز وابسته به منیزیم ٥٠٤٠ -MAG این باکتری را در باکتری اشریشیاکلی بیان کرد. این پروتیین در ترکیب با GST به عنوان فیوژن پروتیین بیان شد. این پروتیین نوترکیب GST – ٥٠٤٠ MAG دارای فعالیت آنزیماتیکی و فیزیولوژی مناسبی بود (٣).

در این تحقیق با توجه به تفاوتی که در سویه‌های مایکوپلاسمای اروپایی وایران وجود دارد ابتدا سویه‌های واکسینال ایران از نظر وجود ژن P٤٠ بررسی شدند و سپس همولوژی آنها با سویه‌های اروپایی بررسی شد. این بررسی تشابه بالایی را در سویه‌های مایکوپلاسما آگالاکتیه ایران و اروپا نشان داد. توالی انتخابی، جهت بیان ژن، توالی سویه اروپایی PG2موجود در بانک ژنی بود که بالاترین تشابه را با سویه‌های ایرانی نشان داده بود. ژن کد کننده P40 در ٢٦ زیرگونه بررسی شده مایکوپلاسما آگالاکتیه تک کپی می‌باشد و در دیگر گونه های مایکوپلاسما دیده نشده است (١٠و ٤).

در این مطالعه ژن P٤٠ انتخابی از سه سویه واکسینال مایکوپلاسما آگالاکتیه ایران در پلاسمید بیانی کلون شد. کاست بیانی ژن حاوی پروموتر T7، سیگنال ترشحی pelB، برچسب هیستیدین، ژن P٤٠ و ترمینیتور T7 می‌باشد. ژن P٤٠ سفارشی در پلاسمید کلونینگ pGEM-B1 کلون شده بود. یکی از ویژگی های این پلاسمید این است که آنزیم EcoRI با برش در این پلاسمید می‌تواند جایگاه برش آنزیم NotI را ایجاد کند که این نوع آنزیم‌ها را ایزوکدومر گویند (١٥).

قطعه ژنی سفارش داده شده با اندازه ١٠٩٢ نوکلئوتیدی دارای دو سر انتهایی EcoRI و NotI بوده که توسط آنزیم EcoRI از پلاسمید جدا و تخلیص شد. تست تاییدی توسط PCR انجام پذیرفت که پرایمرهای به کار برده شده یک قطعه ٩٢٠ بازی را از بخش درونی ژن تکثیر کردند. پلاسمید بیانی pET22b+ نیز با همان آنزیم‌ها برش داده شد و قطعه ٢٦ نوکلئوتیدی از آن جدا و آماده پذیرش ژن ٤٠، ١٠٩٢ بازی شد. پس از کلون شدن، دوباره PCR با همان پرایمرها انجام گرفت و محصول PCR نشان داد که این ژن در پلاسمید لایگیت شده است.

ژن در پلاسمید بیانی کلون شده و آماده بیان در سیستم پروکاریوتی بوده که پس از تخلیص و گذراندن بررسی‌های کیفیت، پایداری و قدرت ایمونولوژیکی‌اش می‌تواند به بازار عرضه گردد.

REFERENCES

1- Baranowski, E., Guiral, S.B. (2010): Critical role of dispensable genes in Mycoplasma agalactiae interaction with mammalian cells. Infec. Immunity. 78: 1542–1551.

2- Bergonier, D. (1997): Contagious agalactia of small ruminants current knowledge concerning epidemiology diagnosis and control. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 16: 848-873.

3- Cacciotto, C. sugar-non specific (2013): Mycoplasma agalactiae MAG_5040 is a Mg2 dependent SNase recognised by the host humoral response during natural infection. Plos One. 2: 1-11.

4- Fleury, B. (2002): Characterization of P40, a cytadhesin of Mycoplasma agalactiae. Infect Immun. 70: 5612-5620.

5- Fusco, M. (2007): Development of a sensitive and specific enzyme linked immunosorbent assay based on recombinant antigens for rapid detection of antibodies against Mycoplasma agalactiae in sheep. Clin Vaccine Immunol. 14: 420-425.

6- Gibson, D.G., Young. L. (2009): Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature Methods. 6: 343–345.

7- Glew, M.D., Papazisi, L. (2000): Characterization of a multigene family undergoing high frequency DNA rearrangements and coding for abundant Variable surface proteins in Mycoplasma agalactiae. Infect. Immun. 68: 4539-4548.

8- Jechlinger, w., chopra Dewasthaly, R. (2004): Mulecular basis of Mycoplasma agalactiae pathogenicity. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 117: 472-479.

9- Kannan, T. R. (2000): Expression of UGA-Containing Mycoplasma Genes in Bacillus subtilis. J. Bact. 182: 2664–2667.

10- Mahdavi, S. (2009): Comparative study of homology of cytoplasmic membrane protein 40 KDa of Mycoplasma agalactiae in isolated strains in Iran. Afric. J. Micro. Res. 3: 528-532.

11- Marenda, M. (2006): A new integrative conjugative element occurs in Mycoplasma agalactiae as chromosomal and free circular forms. J. Bacteriol. 188: 4137-4141.

12- Nouvel, L.X. (2010): Comparative genomic and proteomic analyses of two Mycoplasma agalactiae strains: clues to the macro- and micro-events that are shaping mycoplasma diversity. BMC Genomics.12: 231-236.

13- Oravcova, k. (2009): Mycoplasma agalactiae p40 gene, a novel marker for diagnosis of contagious Agalactia in sheep by Real-Time PCR: assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. J Clin Microbiol.47: 445–450.

14- Pittau, M., Fadda, M. (1990): Triton X-114 phase fractionation of Mycoplasma agalactiae membrane proteins and affinity purification of specific antibodies. Atti Soc. Ital. Sci. Vet. 23: 925-928.

15- Sambrook, J., Russell, D. (2006): Molecular cloning: a laboratory manual 3th edition. Cold spring harbor laboratory press, New york. P: 111-115.

16- Stephen, M. (1990): Multiple translational products from a Mycoplasma hyorhinis gene expressed in Escherichia coli. J. Bact. June: 18: 2986-2995.