مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹
صفحات: ۱۵۴-۱۴۹

Kowsar Medical Journal
Vol. 15, No. 3, Fall 2010
Pages: 149-154

جداسازی، شناسایی و همسانه‌سازی جایگاه انتقال‌دهنده اگزوتوکسین *آسودوموناس آئروژینوزا*

ابراهیم بیات[۱] *MSc*، مهدی کمالی[*] *PhD*، علی زارعی محمودآبادی[۲] *PhD*، یوسف مرتضوی[۳] *PhD*، آزاده ابراهیم حبیبی[۴] *PhD*، بهرام امینی[۱] *MSc*، حمیدرضا جوادی[۵] *MSc*، نیما فرهادی[۵] *MSc*، مهدی حاج اجاق فقیهی[۶] *MSc*

[*]مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۳]گروه ژنتیک و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، زنجان، زنجان، ایران
[۴]مرکز تحقیقات متابولیسم و غدد درون‌ریز، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۵]مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۶]گروه پزشکی بالینی، بیمارستان ولی‌عصر، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

چکیده

اهداف: اگزوتوکسین A *سودوموناس آئروژینوزا* از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی این باکتری است. اگزوتوکسین A از سه دومن اتصال‌دهنده، انتقال‌دهنده و کاتالیتیک تشکیل شده است. این سم از طریق ریبوزیله‌کردن فاکتور EF-2 پروتئین‌سازی باعث مهار سنتز پروتئین در سلول‌های یوکاریوت می‌شود. دومین انتقال‌دهنده نقش مهمی در انتقال سم به داخل سلول دارد. هدف از این مطالعه تولید نوترکیبی دومن انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A جهت تولید آنتی‌بادی علیه آن بود.

مواد و روش‌ها: باکتری از بیماران بستری دچار سوختگی بیمارستان آیت‌ا... موسوی زنجان، جدا و با آزمایشات بیوشیمیایی گونه سودوموناس شناسایی شد. DNA باکتری استخراج و وجود ژن اگزوتوکسین A روی کروموزم باکتری از طریق PCR تایید شد. دومن انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A توسط PCR تکثیر و محصول PCR روی ناقل pET28a کلون شد. کلون‌ها از طریق PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی غربالگری شدند. پروتئین نوترکیب از طریق SDS-PAGE و وسترن‌بلاتینگ با آنتی‌بادی اختصاصی مورد تایید قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج PCR و برش آنزیمی نشان‌دهنده همسانه‌سازی ژن دومن انتقال‌دهنده اگزوتوکسین A بود. همچنین توالی‌یابی بازهای دومن انتقال‌دهنده با اطلاعات بانک ژنی یکسان بود. بیان پروتئین نوترکیب دومن انتقال‌دهنده در غلظت یک میلی‌مولار IPTG، مدت زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از بیان پروتئین نشان‌دهنده بیان بالای پروتئین نسبت به *سودوموناس آئروژینوزا* است و از آنجا که کل سم اگزوتوکسین A جهت تولید واکسن ضروری نیست، پروتئین نوترکیب می‌تواند جهت تولید واکسن استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: *سودوموناس آئروژینوزا*، کلونینگ، اگزوتوکسین A، دومن انتقال‌دهنده

Isolation, determination and cloning of translocation domain of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*

Bayat E.[1] *MSc*, Kamali M.* *PhD*, Zare'ei Mahmoodabadi A.[2] *PhD*, Mortazavi Y.[3] *PhD*, Ebrahim Habibi A.[4] *PhD*, Amini B.[1] *MSc*, Javadi H. R.[5] *MSc*, Farhadi N.[5] *MSc*, Haj Ojagh Faghihi M.[6] *MSc*

*Nano-Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]Department of Biology, Faculty of Basic sciences, Sciences & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Department of Genetics & Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[4]Endocrinology & Metabolism Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5]Nano-Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6]Department of Clinical Medicine, Vali-e-Asr Hospital, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Abstract

Aims: *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A is an important virulence factor of this bacterium. Exotoxin A is made of three domains: binding domain, translocation domain and catalytic domain. Exotoxin A inhibits protein synthesis by ADP-ribosylating EF-2 factor in eukaryote cells. Translocation domain has an important function in translocation of toxin into the cell. Purpose of this study was to product recombinant domain of translocation for antibody production against it.

Materials & Methods: *Pseudomonas aeruginosa* samples were isolated from burnt inpatients of Moosavi Hospital in Zanjan and were identified by biochemistry tests. Bacteria genomic DNA was extracted and Exotoxin A presence was approved by PCR. Translocation domain of Exotoxin A was reproduced by PCR and PCR products were cloned in a pET28a plasmid. Clones were sequenced, screened and enzyme-digested by PCR. Recombinant protein was approved by SDS-PAGE and western blotting with its specific antibody.

Results: PCR and enzyme digestion results approved the cloning of translocation domain of Exotoxin A and results of Exotoxin A translocation domain sequencing was the same as the Gene Bank database. Expression of recombinant translocation domain protein was determined in IPTG 1mM concentration incubated at 37°C for 12 hours.

Conclusion: Expression of recombinant protein is higher than *Pseudomonas aeruginosa.* The whole toxin is not necessary for vaccine production and this recombinant protein can be used instead.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Cloning, Exotoxin A, Translocation Domain

نویسنده مسئول: مهدی کمالی. تمام درخواست‌ها باید به نشانی mehkamali@bmsu.ac.ir فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۹/۱/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۸