

## تعیین نواحی آنتی ژنیک ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل ادهزین Haps هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول

اکرم طباطبایی<sup>۱</sup>، سید داور سیادت<sup>۲</sup>، سید فضل الله موسوی<sup>۳</sup>، محمدرضا آقاصادقی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران  
<sup>۲</sup> دانشیار، دکتری میکروبیولوژی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران  
<sup>۳</sup> استادیار، دکتری میکروبیولوژی و ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران  
<sup>۴</sup> دانشیار، دکتری فرارده های بیولوژیک، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** پروتئین Haps در تداخل اولیه هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول با سلول های اپیتلیال دستگاه تنفس انسان نقش کلیدی را بازی می کند. در حالی که دیگر پروتئین های خارج سلولی هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول از نظر ژنتیکی بسیار متغیر می باشند، Haps به میزان قابل توجهی در میان سویه های هموفیلوس آنفلوانزا حفظ شده است. در مطالعات اخیر اثبات شده است که فعالیت اتصال Haps در ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل (C-Haps) آن قرار دارد و همچنین نشان داده شده است که C-Haps قادر به القاء پاسخ ایمنی محافظت کننده در مقابل استقرار هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول می باشد.

**روش بررسی:** سازه pET24a-chaps حامل سکانس C-Haps هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول PTCC 1766 ساخته شد. سکانس آمینواسیدی C-Haps این مطالعه با سکانس C-Haps ۳ سویه دیگر هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول (P860295, TN106, N187) مقایسه و نواحی آنتی ژنیک آن توسط نرم افزار بیوانفورماتیک تعیین شدند. سازه نوترکیب pET24a-chaps در میزبان اشرشیاکلی سویه BL21(D3E) بیان شد و توسط تکنیکهای SDS-PAGE و وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت. پروتئین نوترکیب C-Haps توسط تکنیک کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد.

**یافته ها:** مقایسه توالی آمینواسیدی rC-Haps مورد مطالعه با سکانس های آمینواسیدی C-Haps موجود در بانک ژن، بیش از ۹۷٪ همسانی را نشان داد و نمودار آنتی ژنیسیته، ۹ جایگاه آنتی ژنیک مشترک و قوی را تعیین کرد که دقیقاً در مناطق حفظ شده بین سویه های مختلف هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول مطالعه شده قرار داشت.

**نتیجه گیری:** به دلیل حضور جایگاه های آنتی ژنیک مشترک بین هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول PTCC 1766 و دیگر سویه های مطالعه شده، بنابراین C-Haps به دست آمده در این مطالعه از نظر تنوری می تواند به عنوان کاندیدای واکسن علیه سویه های مختلف هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول سایر نواحی جغرافیایی نیز به کار رود.

**واژگان کلیدی:** هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول، نواحی آنتی ژنیک، C-Haps.

### مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول یا هموفیلوس آنفلوانزای غیرقابل طبقه بندی، کوکوباسیل های گرم منفی می باشند که

ارگانیزم کامنسال مشترک بین کودکان و افراد بالغ سالم محسوب می شوند. کودکان به طور هم زمان ناقل چندین سویه از هموفیلوس آنفلوانزا می باشند، در حالی که بالغین تنها حامل یک سویه از آن هستند. این دسته از باکتری ها ابتدا در نازوفارنکس مستقر می شوند و در صورت مشکل دار بودن سیستم دفاعی میزبان به نواحی مجاور گسترش می یابند (۱، ۲). هموفیلوس

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دکتر اکرم طباطبایی

(email: akram\_tabatabaee@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۷/۲۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۹/۲۴

(۱۰). با توجه به اهمیت ذکر شده برای این قطعه پروتئینی (C-Haps) و همچنین وجود شواهدی از حضور پاسخ ایمنی علیه آن و کارایی احتمالی آن به عنوان پروتئین حامل در واکنش‌های زیرواحدی علیه هموفیلوس *آنفلوانزا*ی تیپ b تولید فرم نو ترکیب آن و بررسی جایگاه اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک آن از اهداف این تحقیق قرار گرفتند.

## مواد و روشها

### سویه‌های باکتریایی، پلاسمید و مواد مورد استفاده

هموفیلوس *آنفلوانزا*ی بدون کپسول PTCC 1766 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید و در محیط کشت عصاره قلب و مغز (Brain Heart Infusion) broth غنی شده با Hemin-L-Histidine و NAD در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد (۱،۱۲). سویه‌های باکتریایی اشرشیاکلی *E. coli* DH5  $\alpha$  (DE3) و BL21 و پلاسمید pET24a از بانک ملی ژن انستیتوپاستور ایران تهیه شد.

### تکثیر ژن *c-haps*

پس از استخراج و تخلیص ژنوم سویه باکتریایی هموفیلوس *آنفلوانزا*ی بدون کپسول PTCC 1766 با استفاده از تکنیک فنل-کلروفورم (مطابق با روش سمبروک و همکارانش) (۱۳)، این ژنوم به عنوان الگو جهت تکثیر قطعه ژنی تولید کننده ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوسیل پروتئین Haps (۱۰۰۰ جفت باز) با استفاده از تکنیک PCR مورد استفاده قرار گرفت.

بسیار دین منظم ————— اور ————— والی 5' به 3'-TAAGAAGCTTCGCGTTCAGATTGGACAGG-3' عنوان پرایمر پیشرو با جایگاه برش آنزیمی برای *HindIII* و توالی-ATACTCGAGCAGGCTTTGATCAGGCAGG-3' به عنوان پرایمر معکوس با جایگاه برش برای آنزیم *XhoI* توسط نرم افزار Gene runner طراحی و جهت سنتز به شرکت Bioneer سفارش داده شد.

واکنش PCR با حجم نهائی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱.۲۵ واحد آنزیم *Pfu* پلیمرز (Thermo, USA)، بافر *Pfu* حاوی  $MgCl_2$  (۱X)، ۱ میلی مولار dNTPs، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو انجام بود. فرایند PCR مطابق با شرایط ذکر شده در جدول ۱ صورت گرفت.

پس از انجام واکنش PCR، محصول نهایی روی ژل آگارز برده شد و سپس قطعات ژنی مورد نظر توسط کیت استخراج DNA (Extraction Kit, Fermentas, Germany) DNA (GeneJET™ Gel) تخلیص شدند.

*آنفلوانزا*ی بدون کپسول قادرند انواع بیماری‌های حاد و مزمن دستگاه تنفسی از جمله عفونت گوش میانی، سینوزیت، برونشیت، ذات الریه و عفونت بافت ملتحمه چشم را ایجاد کنند (۳، ۴). همچنین هموفیلوس *آنفلوانزا*ی بدون کپسول، از زمان ابداع واکنش‌های کنژوگه پنوموکی به عنوان یک علت عمده پنومونی اکتسابی از جامعه محسوب می‌شوند (۵).

از آنجا که پاتوژن هموفیلوس *آنفلوانزا* با استقرار در نازوفارنکس آغاز می‌شود و به دنبال آن ارگانسیم به قسمت‌های دیگر دستگاه تنفس از جمله گوش میانی، سینوس‌ها و... منتشر می‌شود، بنابراین می‌توان با جلوگیری از اتصال اولیه باکتری با سطح سلول میزبان، مانع بروز عفونت موضعی و در نهایت انتشار آن به سایر قسمت‌های دیگر بدن شد. بر اساس مطالعات روی حیوانات و مطالعات *in vitro* مشخص شده که تعدادی از فاکتورهای باکتریایی در فرآیند استقرار تاثیر دارند. یکی از این فاکتورها پروتئین‌های ادهزین می‌باشند که Hap یکی از مهم‌ترین آنها است که در اتصال اولیه باکتری با سلول‌های اپیتلیال تنفسی انسان و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و همچنین در تشکیل توده‌های باکتریایی و میکروکلنی نقش دارد (۶). این پروتئین برخلاف سایر ادهزین‌های هموفیلوس *آنفلوانزا*، در میان تمامی سویه‌های کپسول‌دار و فاقد کپسول از همسانی بسیار بالایی برخوردار است (۷).

پروتئین Hap به صورت یک پروتئین پیش ساز ۱۵۵ کیلودالتونی سنتز می‌شود که دربرگیرنده سه ناحیه توالی راهنما، ناحیه سرین پروتئازی ۱۱۰ کیلودالتونی داخلی (HapS) و یک پروتئین ۴۵ کیلودالتونی غشاء خارجی ( $Hap\beta$ ) در ناحیه کربوکسیل می‌باشد (۸). ناحیه جابجاشونده پروتئین Hap دربرگیرنده جایگاه اتصال می‌باشد که اتصال به سلول‌های اپیتلیال انسانی، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و باکتری‌های مجاور بیان کننده Hap را افزایش می‌دهد. بررسی‌ها نشان داد که ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps (C-Haps) تداخل بین سلول‌های باکتری با سلول‌های میزبان را به عهده دارد که همان ناحیه متصل شونده Haps به سلول میزبان می‌باشد (۹، ۶). مقایسه توالی‌های آمینواسیدی *C-haps* سه سویه مختلف هموفیلوس *آنفلوانزا* (N187, P860295, TN106) نشان داد که بیش از ۹۷٪ شباهت بین آنها وجود دارد. همچنین مطالعات نشان دادند که ایمنی‌زایی داخل بینی (intranasal immunization) با CHaps نو ترکیب منجر به القاء پاسخ‌های آنتی بادی می‌شود که Haps طبیعی را نیز خنثی می‌کند. در مجموع ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps (CHaps) به عنوان کاندیدای واکنش علیه سویه‌های مختلف هموفیلوس *آنفلوانزا*ی بدون کپسول معرفی شد

## تائید نهایی بیان قطعه پروتئینی CHapS توسط تکنیک وسترن بلات

پس از به دست آوردن پروتئین CHapS تخلیص شده، برای تائید صحت پروتئین مورد نظر، از روش وسترن بلات استفاده گردید. در این مرحله پس از SDS-PAGE پروتئین و انتقال آن به غشاء نیتروسولوزی، پروتئین CHapS با آنتی بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی، Anti-6xHis rabbit antibody (Qiagen Hilden, Germany) مورد بررسی قرار گرفت.

### تعیین توالی سازه ژنی

به منظور تائید سازه ژنی *chapS*-pET24a، پلاسمید استخراج شده برای تعیین توالی به آزمایشگاه تعیین توالی انستیتو پاستور ایران فرستاده شد. تعیین توالی با استفاده از پرایمپیشرو و معکوس عمومی T7 و به صورت دو طرفه صورت گرفت.

### آنالیز توالی پروتئینی CHapS

به منظور دستیابی به درصد تشابه و همسانی توالی پروتئین C-HapS تولید شده در این مطالعه با توالی پروتئین C-HapS سایر سویه های هموفیلوس آنفلوانزا، توالی اسید آمینه ای C-HapS سه سویه مختلف هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول (TN106, P860295, N187) موجود در بانک ژن همراه با توالی پروتئین نوترکیب مطالعه حاضر توسط نرم افزار Jalview، مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین الگوی آنتی ژنیسیته پروتئین C-HapS نوترکیب با استفاده از روش (Tongaonkar و Kolaskar، ۱۹۹۰) و نرم افزار MIFBioinformatic مورد بررسی قرار گرفت و جایگاه‌های آنتی ژنیک آن تعیین شد.

### یافته‌ها

#### ساخت سازه نوترکیب *chapS*-pET24a

ناحیه کربوکسیل پروتئین Haps که مسوول اتصال اولیه باکتری به سلول های میزبان می‌باشد، توسط پرایمرهای اختصاصی و تکنیک PCR تکثیر یافت و الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز، یک باند با اندازه حدود ۱۰۰۰ نوکلئوتید را آشکار ساخت که نشان دهنده تکثیر موفق ژن *c-hapS* از ژنوم سویه باکتریایی موردنظر می‌باشد (شکل ۱).

جدول ۱. برنامه PCR جهت تکثیر قطعه ژنی *c-haps*

مرحل PCR	مدت زمان	دما (°C)
دنا تورا سیون آغازی DNA الگو	۷ دقیقه	۹۴
دنا تورا سیون DNA الگو	۱ دقیقه	۹۴
اتصال پرایمرها	۴۵ ثانیه	۶۰
پلیمریزاسیون	۱ دقیقه	۷۲
پلیمریزاسیون نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

### کلونینگ قطعه ژنی ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل

#### پروتئین Haps

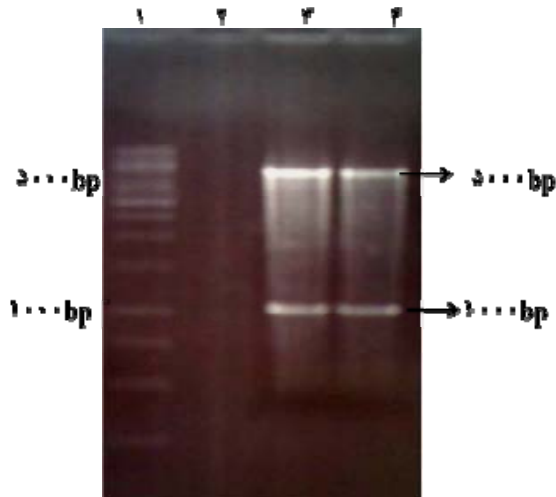
با توجه به جایگاه‌های آنزیمی تعبیه شده در پرایمرها و وجود آنها بر روی پلاسمید موردنظر، محصول PCR (*c-haps*) و پلاسمید pET24a توسط دو آنزیم *XhoI* و *HindIII* (Bobizz, Korea) برش داده شدند و سپس طی فرایند الحاق در حضور آنزیم T4 لیگاز (Fermentas, Germany) به یکدیگر متصل شدند، به طوری که انتهای کربوکسیل پروتئین نوترکیب دربرگیرنده دنباله هیستیدینی بود. سپس ناقل‌های حاصل از طریق فرایند ترانسفورماسیون (Transformation) به میزبان کلونینگ (*E. coli* DH5a) مستعد شده منتقل شدند. تائید صحت فرایند الحاق و تمامیت سازه ژنی *chapS*-pET24a توسط روش‌های Colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی ژن موردنظر صورت گرفت.

### بیان و تخلیص ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل

#### پروتئین Haps (C-Haps)

به منظور بیان ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل پروتئین Haps (C-Haps)، سازه نوترکیب *chapS*-pET24a به میزبان بیانی *E. coli* BL21 (DE3) مستعد شده ترانسفورم شد. سپس چند کلونی برای آنالیز بیان پروتئین در محیط کشت 2xTY حاوی  $50 \mu\text{g/ml}$  کانامایسین کشت داده شد تا زمانی که در طول موج ۶۰۰ نانومتر به جذب نوری ۰/۶ برسد. در این زمان، محلول کشت با ۱mM IPTG القاء شده و آنالیز بیان پروتئین، ۵ ساعت پس از القاء انجام گرفت. همچنین از کشت باکتریایی قبل از القاء به عنوان کنترل منفی نمونه برداری شد. در نهایت محتوای لیز شده سلول های باکتریایی از نظر بیان پروتئین توسط تکنیک SDS-PAGE مورد تائید اولیه قرار گرفت و میزان بیان پروتئین توسط روش دنسیتومتری با نرم افزار Quantity One version 4.4.1 (BioRad) تعیین گردید. در مرحله بعد پروتئین موردنظر به علت وجود دنباله هیستیدینی توسط رزین نیکل (Qiagen, Germany) و کروماتوگرافی تمایلی طبق شیوه نامه شرکت سازنده تخلیص شد.

اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز و ایجاد پلاسمید خطی در محدوده ۵۳۰۰ جفت بازی شد (شکل ۳).



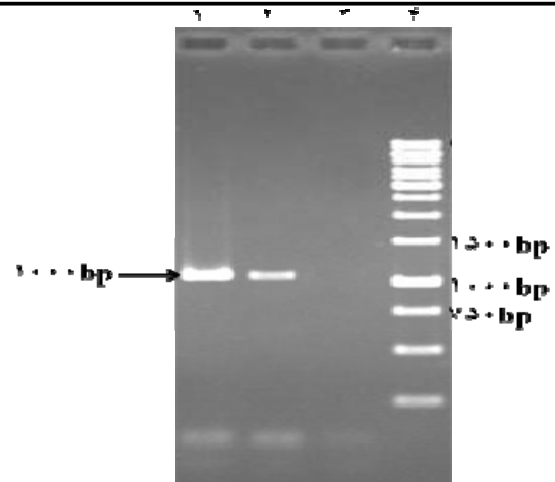
شکل ۳. نتیجه هضم آنزیمی سازه نو ترکیب *chaps*-pET24a. چاهک ۱: سایز مارکر ۱ kb (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)؛ چاهک ۲: هضم دو آنزیمی سازه نو ترکیب *chaps*-pET24a با دو آنزیم *HindIII* و *XhoI* (محصولات حاصل از هضم آنزیمی با فلش نشان داده شده است)

### تائید صحت واکنش الحاق ژن در وکتور با روش تعیین توالی

پلاسمید نو ترکیب با استفاده از پرایمر *T7* و *T7 promoter* terminator تعیین توالی شد. نتایج تعیین توالی، صحت سازه ژنی از لحاظ ورود ژن، جهت صحیح ورود ژن و عدم وجود جهش در توالی ژن را مورد تائید قرار داد.

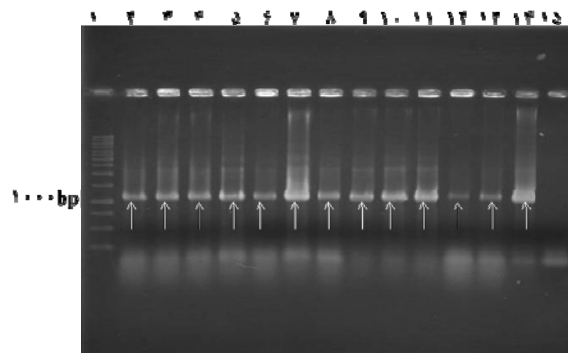
### آنالیز بیان سازه نو ترکیب *chaps*-pET24a

بیان ژن‌های متصل به پروموتورهای *T7* در سلول‌های *E. Coli* BL21(DE3) به وسیله IPTG القاء می‌شود. بنابراین پروتئین‌های بیان شده در این سلول‌ها همراه با سلول‌های القاء نشده، توسط تکنیک SDS-PAGE از یکدیگر مجزأ شدند. پس از رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها توسط کوماسی بریلیانت بلو (R-250) و رنگ‌بری، ظهور یک باند با اندازه حدود ۳۷ کیلودالتون همراه با باندهای دیگر و عدم ظهور آن در نمونه‌های القاء نشده مشاهده شد که انتظار می‌رود نشان دهنده بیان پروتئین مورد نظر باشد (شکل ۴).



شکل ۱. تکثیر ژن *c-haps* با آنزیم *Pfu* پلیمرز؛ چاهک ۱ و ۲: محصول تکثیر ژن *c-haps* (با فلش نشان داده شده است)؛ چاهک ۳: کنترل منفی چاهک؛ ۴: سایز مارکر ۱ kb (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)

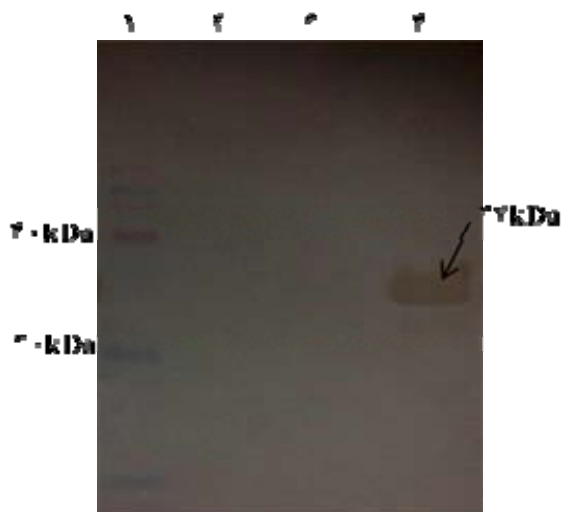
پس از هضم آنزیمی وکتور و قطعه ژنی، واکنش الحاق صورت پذیرفت و محصول این مرحله به باکتری‌های مستعد ترانسفورم شد. کشت این باکتری‌ها روی محیط دارای آنتی بیوتیک کانامایسین، چندین کلونی ایجاد کرد. سپس کلونی‌ها از لحاظ دارا بودن قطعه ژنی با اندازه صحیح توسط تکنیک Colony PCR بررسی شدند (شکل ۲).



شکل ۲. بررسی کلونی‌ها از نظر دارا بودن قطعه ژنی با اندازه صحیح توسط تکنیک Colony PCR. چاهک ۱: سایز مارکر ۱ kb (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)؛ چاهک ۲ تا ۱۴: محصول PCR کلونی‌های ترانسفورم شده با سازه ژنی *chaps*-pET24a (با فلش نشان داده شده است)؛ چاهک ۱۵: کنترل منفی (کلنی ترانسفورم شده پلاسمید *pET24a*)

ورود صحیح قطعه ژنی درون وکتور مورد نظر با هضم آنزیمی سازه *chaps*-pET24a با دو آنزیم *HindIII* و *XhoI* به صورت توام اثبات گردید که منجر به خروج قطعه ژنی با

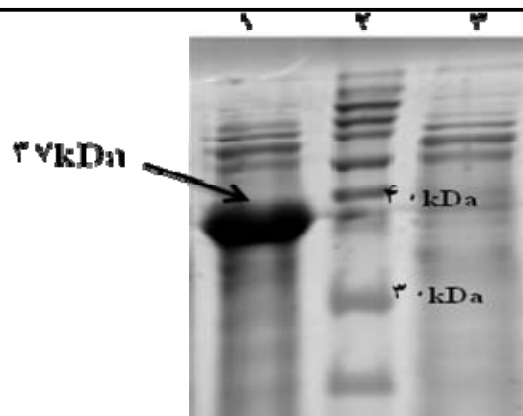
باند پروتئینی ۳۷ کیلودالتونی توسط روش SDS-PAGE مشاهده شد و به عنوان پروتئین C-HapS توسط روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی تأیید نهایی گردید (شکل ۶). میزان بیان پروتئین نوترکیب C-HapS در حدود ۶۲٪ نسبت به کل پروتئین‌های باکتریایی بود.



شکل ۶. بررسی تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب با C-HapS با تکنیک وسترن بلات. چاهک ۱: راهنمای وزنی پروتئین؛ چاهک ۲: عصاره باکتری حاوی وکتور pET24 بدون ژن *chaps*؛ چاهک ۳: عصاره باکتری دارای سازه *chaps*-pET24a قبل از القاء با IPTG؛ چاهک ۴: عصاره باکتری دارای سازه *chaps*-pET24a پس از القاء (فلش باند پروتئین مورد نظر با وزن مولکولی ۳۷ (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) را نشان می‌دهد).

#### تخلیص و تأیید پروتئین C-HapS نوترکیب

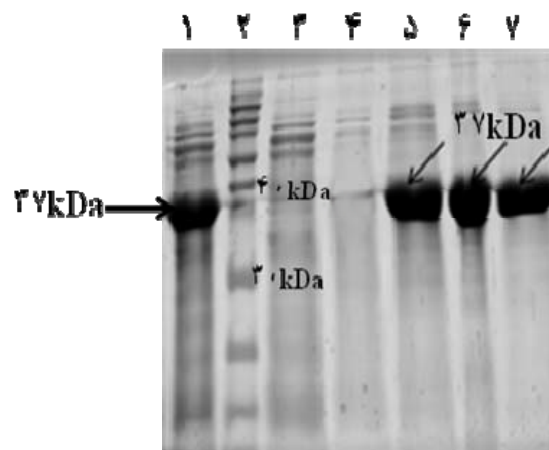
پس از القای بیان پروتئین در وکتور pET24a در میزبان بیانی *E. coli* BL21(D3E)، مایع رویی کشت و رسوب حاصل از تخریب سلول‌ها از نظر وجود پروتئین نوترکیب توسط تکنیک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند و بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب در محلول رویی نشان داده شد. پروتئین نوترکیب موردنظر تحت شرایط دناتوره کننده توسط تکنیک کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA تخلیص گردید. به صورت تئوری توسط نرم افزار Gene Runner وزن مولکولی پروتئین نوترکیب ۳۷ کیلودالتون تخمین زده شد (شکل ۵). باند پروتئینی ۳۷ کیلودالتونی توسط روش SDS-PAGE مشاهده شد و به عنوان پروتئین C-HapS توسط روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی تأیید نهایی گردید (شکل ۶). میزان بیان



شکل ۴. نتیجه بیان سازه نوترکیب *chaps*-pET24a. چاهک ۱: نمونه القاء شده با IPTG؛ چاهک ۲: راهنمای وزنی پروتئین (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)؛ چاهک ۳: نمونه القاء نشده با IPTG. (باند پروتئین موردنظر با فلش نشان داده شده است)

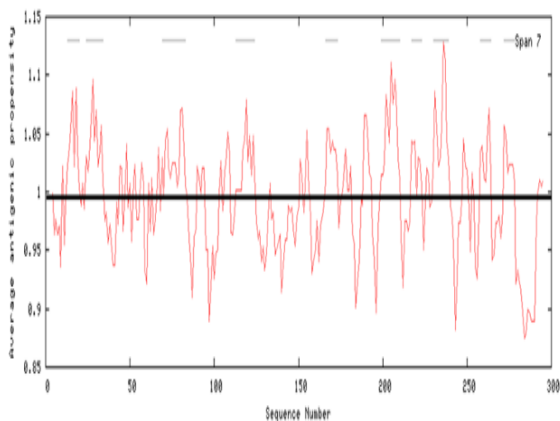
#### تخلیص و تأیید پروتئین C-HapS نوترکیب

پس از القای بیان پروتئین در وکتور pET24a در میزبان بیانی *E. coli* BL21(D3E)، مایع رویی کشت و رسوب حاصل از تخریب سلول‌ها از نظر وجود پروتئین نوترکیب توسط تکنیک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند و بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب در محلول رویی نشان داده شد. پروتئین نوترکیب موردنظر تحت شرایط دناتوره کننده توسط تکنیک کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA تخلیص گردید. به صورت تئوری توسط نرم افزار Gene Runner وزن مولکولی پروتئین نوترکیب ۳۷ کیلودالتون تخمین زده شد (شکل ۵).



شکل ۵. تخلیص پروتئین نوترکیب C-HapS. چاهک ۱: عصاره سلولی؛ چاهک ۲: راهنمای راهنمای وزنی پروتئین (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)؛ چاهک ۳ و ۴: نمونه حاصل از مرحله شستشو (Washing)؛ چاهک ۵ تا ۷: نمونه حاصل از جدا سازی پروتئین موردنظر (Elution) از ستون. (باند پروتئین موردنظر با فلش نشان داده شده است).

نواحی کمتر آنتی ژنیک، در زیر نمودار که با اعداد منفی نشان داده شده‌اند هستند. این نمودار براساس الگوریتم روش Tongaonkar و Kolaskar که یکی از روش‌های مناسب برای پیش بینی ویژگی آنتی ژنسیسته پروتئین‌ها می‌باشد، رسم گردید (شکل ۸).



شکل ۸. نمودار آنتی ژنسیسته پروتئینی CHapS به دست آمده در این مطالعه براساس الگوریتم روش Tongaonkar و Kolaskar. قسمت بالای نمودار که با اعداد مثبت نشان داده شده است، مناطق هیدروفیلیک یا آنتی ژنیک پروتئین می‌باشد.

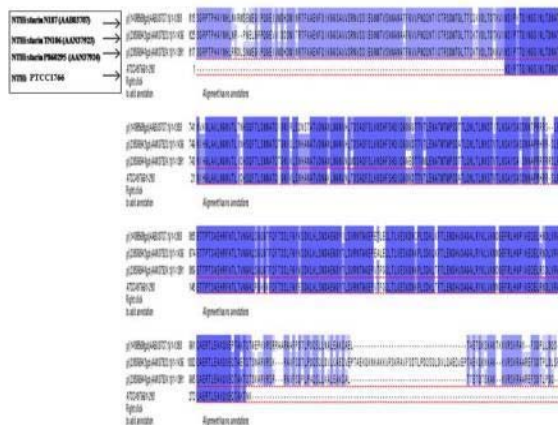
### بحث

در میان پروتئین‌های اتورنسپورتر هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول، به نظر می‌رسد که ادهزین Hap نقش کلیدی را در اتصال اولیه باکتری به سلول‌های میزبان بازی می‌کند. مطالعات روی ساختار و عملکرد آن آشکار کرد که این پروتئین دارای فعالیت اتصال می‌باشد و تداخل با سلول‌های میزبان و همچنین تشکیل میکروکلنی را تا هنگامی که به سطح سلول باکتری متصل است میانجیگری می‌کند (۷، ۱۴، ۱۵). مطالعات اخیر نشان دادند توالی آمینواسیدی بسیاری از پروتئین‌های سطحی هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول در میان سویه‌های مختلف آن حفظ شده نمی‌باشد و به میزان قابل توجهی متنوع است. در صورتی که مطالعات Cutter و همکارانش نشان دادند ناحیه جابجا شونده ادهزین Hap (Haps) با وجود آن که در سطح سلول باکتری بیان می‌شود، برخلاف سایر ادهزین‌های هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول، توالی آن در سویه‌های مختلف به میزان زیادی حفظ شده است و ایمنی‌زایی با آن از استقرار هموفیلوس آنفلوانزای بدون کپسول در مدل حیوانی و در نهایت عفونت متعاقب آن جلوگیری می‌کند (۱۶).

پروتئین نوترکیب C-HapS در حدود ۶۲٪ نسبت به کل پروتئین‌های باکتریایی بود.

### نتایج آنالیز توالی پروتئینی

همتاسازی توالی پروتئینی C-HapS به دست آمده در این مطالعه با توالی پروتئینی C-HapS سه سویه N187, TN106, P860295 هموفیلوس آنفلوانزای غیرقابل طبقه بندی نشان داد که بیش از ۹۷ درصد همسانی بین توالی‌ها وجود دارد (شکل ۷).



شکل ۷. همتاسازی توالی پروتئینی CHapS به دست آمده در این مطالعه با توالی پروتئینی CHapS سه سویه N187, TN106, P860295 (NCBI GeneBank) هموفیلوس آنفلوانزای غیرقابل طبقه بندی (database cession numbers در شکل نشان داده شده است)

همچنین نمودار آنتی ژنسیسته مربوط به توالی پروتئینی C-HapS تولید شده در این مطالعه، ۹ جایگاه آنتی ژنیک (اپی توپ) را مشخص کرد (جدول ۲).

جدول ۲. جایگاه‌های آنتی ژنیک (اپی توپ) موجود در قطعه پروتئینی CHapS

n	Start Position	Sequence	End Position
1	13	TVNIHGLA	20
2	24	GNVTLIDHSQF	34
3	69	DSAQFSLKNSHFSHQ	83
4	113	NNSTVTLNSAYS	124
5	166	QFTSSLFG	173
6	199	EPVTFGQLTLVE	210
7	217	LSDKLT	223
8	230	VDAGALRYKL	239
9	258	RNDLVRA	264
10	272	EAKQVEQ	278

در این نمودار، ناحیه بالای نمودار که به صورت اعداد مثبت نشان داده شده است مناطق با آنتی ژنسیسته بالا می‌باشند و

آنفلوآنزای بدون کپسول به میزان قابل توجهی حفظ شده است. همچنین در این تحقیق، سازه pET24a-chaps به سلول‌های *E. coli* BL21(DE3) منتقل شد و قطعه پروتئین مورد نظر در نتیجه رشد سلول‌ها در محیط کشت 2xTY، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و القاء توسط ۱ mM IPTG در OD600 معادل ۰/۶ بیان گردید. نتایج مربوط به بررسی میزان بیان پروتئین توسط روش دنسیتومتری نشان داده که نسبت چگالی باند پروتئینی مورد نظر نسبت به کل باندهای پروتئینی باکتری القاء شده ۶۲٪ می‌باشد، در صورتی که در مطالعه قبلی بالاترین میزان بیان ۴۲٪ گزارش شده است. البته شرایط بیان پروتئین در مطالعه ذکر شده به این صورت بود که ژن *c-haps* ۳ سویه N187، P860295، TN106 به طور جداگانه تحت کنترل پروموتور T7 و کتور pET17b قرار داده شده و پس از ورود سازه مورد نظر به میزبان بیانی *E. coli* BL21(DE3) pLysS، سلول‌های باکتریایی در محیط کشت SOB غنی شده با ۱٪ گلوکز رشد داده شدند و القاء سلول‌ها با ۱ mM IPTG در OD600 معادل ۱/۵-۱ صورت گرفت (۱۹). به طور کلی مقایسه نتایج نشان می‌دهد که مقدار بیان C-Haps در مطالعه کنونی حدوداً ۲ برابر بالاتر از مقدار بیان آن در مطالعه قبلی می‌باشد.

به دلیل حضور اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک بسیار حفظ شده میان C-Haps هموفیلوس آنفلوآنزای بدون کپسول PTCC ۱۷۶۶ و سایر سویه‌های هموفیلوس آنفلوآنزای بدون کپسول، پیش بینی می‌شود که پاسخ ایمنی علیه C-Haps به دست آمده در این تحقیق علیه سویه‌های مختلف هموفیلوس آنفلوآنزای بدون کپسول نیز محافظت کننده باشد و بتوان از آن به عنوان یک گزینه مطلوب در تحقیقات واکسنی استفاده کرد. همچنین شرایط به کار گرفته شده در این مطالعه که منجر به بیان بالای پروتئین مورد نظر شد بتواند راه را برای توسعه واکسن‌های در برگیرنده C-Haps علیه سویه‌های مختلف هموفیلوس آنفلوآنزای بدون کپسول هموار سازد. لازم به ذکر است که هم اکنون بررسی ویژگی ایمونولوژیسیته پروتئین مورد نظر در مدل حیوانی در حال انجام می‌باشد.

### تقدیر و تشکر

با تشکر از همکاران بخش باکتری شناسی و هیپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران که در انجام این تحقیق همکاری نمودند.

بررسی‌های بعدی نشان داد که بخشی از پروتئین Haps، ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps، تداخل بین سلول-های باکتری با سلول‌های میزبان را به عهده دارد که همان ناحیه متصل شونده Haps به سلول میزبان (C-Haps) می‌باشد (۱۷). مقایسه توالی‌های آمینواسیدی C-Haps سه سویه مختلف هموفیلوس آنفلوآنزا (N187، P860295، TN106) نشان داد که بیش از ۹۷/۱٪ شباهت بین آنها وجود دارد. همچنین مطالعات نشان دادند که ایمنی زایی داخل بینی (Intranasal immunization) با C-Haps نوترکیب منجر به القاء پاسخ‌های آنتی‌بادی می‌شود که Haps طبیعی را نیز خنثی می‌کند. در مجموع ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps به عنوان کاندیدای واکسن علیه سویه‌های مختلف هموفیلوس آنفلوآنزای بدون کپسول معرفی شد (۱۸). یافته‌های به دست آمده مربوط به این پروتئین (C-Haps) و همچنین وجود شواهدی از حضور پاسخ ایمنی علیه آن موجب شد در مطالعه حاضر نیز ویژگی ایمونوژنیسیته C-Haps سویه دیگری از هموفیلوس آنفلوآنزای بدون کپسول و همچنین تشابه و همسانی توالی آن با C-Haps سایر سویه‌ها مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps هموفیلوس آنفلوآنزای بدون کپسول PTCC ۱۷۶۶ به صورت نوترکیب تولید شد.

در این تحقیق، سازه pET24a-chaps حامل قطعه ژنی *c-haps* مربوط به ناحیه کربوکسیل پروتئین Haps (C-Haps) هموفیلوس آنفلوآنزای بدون کپسول PTCC ۱۷۶۶ ساخته شد و صحت آن توسط روش‌های بیولوژی مولکولی و تعیین توالی تایید گردید. مقایسه سکانس آمینواسیدی C-Haps به دست آمده در این تحقیق با سکانس آمینواسیدی C-Haps‌های ثبت شده در بانک ژن (N187، P860295، TN106) ۹۷ درصد همسانی را نشان دادند و همچنین بر اساس نمودار آنتی ژنیسیته پروتئین C-Haps که توسط الگوریتم Kolaskar و Tongaonkar و برنامه Antigen peptide prediction (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) به دست آمده است، مشخص شد که این پروتئین دارای ۹ جایگاه آنتی ژنیک مشترک با C-Haps سایر سویه‌های هموفیلوس آنفلوآنزای بدون کپسول بوده و قابل توجه این که جایگاه‌های آنتی‌ژنیک دقیقاً در مناطق حفظ شده بین این ۴ سویه قرار دارد. همان طور که در مطالعات پیشین مشخص شد و در یافته‌های مطالعه کنونی نیز نشان داده شد، ۳۱۱ آمینواسید ناحیه کربوکسیل Haps در میان سویه‌های مختلف هموفیلوس

## REFERENCES

1. Howard AJ, Dunkin KT, Millar GW. Nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in healthy children. *J Epidemiol Infect* 1988; 100:193-203.
2. Kuklinska D, Kilian M. 1984. Relative proportions of *Haemophilus* species in the throat of healthy children and adults. *Eur J Clin Microbiol* 1984; 3:249-252.
3. Giebink GS. The microbiology of otitis media. *J Pediatr Infect Dis* 1989; 8:S18-20.
4. Hallstrom T, Singh B, Resman F, Blom A. *Haemophilus influenzae* Protein E Binds to the Extracellular Matrix by Concurrently Interacting With Laminin and Vitronectin. *The J Infectious* 2011; 204:1065-74.
5. Wiertsema SP, Kirkham LA, Corscadden KJ, Mowe EN, Bowman JM, Jacoby P, et al. Predominance of nontypeable *Haemophilus influenzae* in children with otitis media following introduction of a pneumococcal conjugate vaccine schedule. *Vaccine* 2011; 29:5163-70.
6. Doran L, Fink DL, Buscher AZ, Green B, Fernsten Ph, St. Geme JW. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell Microbiol* 2003; 5:175-86.
7. Cutter D, Mason K, Howell A, Fink D, Green B, Geme J. Immunization with *Haemophilus influenzae* Hap adhesin protects against nasopharyngeal colonization in experimental mice. *J Infect Dis* 2002; 186:1115-21.
8. Hardy GG, Tudor SM, St Geme JW III. The pathogenesis of disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae*. In: Herbert MA, Hood DW, Moxon ER, Editors. *Haemophilus influenzae* protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2003. P.1-28.
9. Dubendorff JW, Studier FW. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with Lac repressor. *J Mol Biol* 1991; 219:45-59.
10. Adhikari P, Kirby SD, Nowalk AJ, Veraldi KL, Schryvers AB, Mietzner TA. Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. *J Biol Chem* 1995; 270:25142-49.
11. West-Barnette S, Rockel A, Edward W. Biofilm growth increases phosphorylcholine content and decreases potency of nontypeable *Haemophilus influenzae* endotoxins. *J Infect Immun* 2006; 74: 1828.
12. Hannah N, Dayle A, Jarisch J. Chemically defined media for growth of *Haemophilus influenzae* strains. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4408.
13. Sambrook J, Russell DW. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: Janssen K, Editor. *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001. P.213-26.
14. Hendrixon DR, St Geme JW 3rd. The *Haemophilus influenzae* Hap serin protease promotes adherence and microcolony formation potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell* 1998; 2: 841-50.
15. St Geme JW 3rd. Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *J Cell Microbiol* 2002; 4:191-200.
16. Murphy TF, Sethi S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1067-83.
17. Fink DL, Green B, St Geme JW 3rd. The *Haemophilus influenzae* hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. *J Infect Immun* 2002; 70:4902-907.
18. Liu DF, Mason KW, Mastro M, Pazirandeh M, Cutter D, Fink DL, et al. The C-terminal fragment of the internal 110-kilodalton passenger domain of the Hap protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potential vaccine candidate. *J Infect Immun* 2004; 72:6961-68.
19. Odolf DF, Mason KW, Mastro M, Pazirandeh M, Cutter D, St Geme JW 3rd. The C-terminal fragment of the internal 110- kilodalton passenger domain of the Hap protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potential vaccine candidate. *J Inf Immun* 2004; 29: 6961-68.