AUMJ
نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز،پاییز ۱۴۰۰، سال ۱۰، شماره ۴، صفحه‌های ۴۹۱-۵۰۰
مقاله تحقیقی

بررسی پایداری بیان پروتئین غشای سطحی Lipl41به صورت فیوژن با پروتئین کوچک چاپرون Lepدر لپتوسپیرا

نـرگس گـلاب[1]، ناصـر هرزنـدی [1*]، پژواک خـاکی[2]، مجیـد تبیانیـان[3]، مجید اسمعیلی زاد[4]

[1] گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
[2] بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[3] بخش ایمنی شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[4] بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۷/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/٤

چکیده

زمینه و هدف: لپتوسپیروزیس یک بیماری باکتریایی مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی می‌باشد که توسط اسپیروکت بیماریزایی به نام لپتوسپیرا ایجاد می‌گردد. متاسفانه تشخیص این بیماری بدلیل علائم متعدد بالینی بسیار مشکل و دارای محدودیت است. LipL41 یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های غشای خارجی لپتوسپیرا ست که فقط در سویه های بیماریزا وجود دارد. ژن کوچکی بنام *lep*در فاصله بسیار نزدیک با ژن *lipl41* بر روی کروموزوم باکتری قرار دارد که کمک کننده بیان آن می‌باشد. در این مطالعه برای اولین بار بررسی بیان و تخلیص پروتئین فیوژن Lipl41-Lep بر روی سویه های بومی رایج لپتوسپیرای بیماریزا در سیستم پروکاریوتی صورت گرفت.

مواد و روش ها: توالی ژنی بر مبنای الگوی سروارهای ایران پس از جمع آوری کلیه اطلاعات موجود در سایتNCBI طراحی و ساخته شد. سپس با کلونینگ در وکتوربیانی pET32a+ در*E.coli*BL21(DE3) انتقال و توسط القاء کننده IPTG بیان انجام شد. پس از لیز سلولی با روش دناتوراسیون خالص سازی صورت گرفت. روش وسترن بلات برای تایید حضور پروتئین فیوژن نوترکیب استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج آنالیز PCR وجود باند واضح حدود۲۰۰۰جفت باز را روی ژل آگارز تأیید کرد. مقادیر زیادی از پروتئین فیوژن نوترکیب ٦٠ کیلودالتونی در دمای ۳۷°C، با غلظت ۰/۱mM از IPTG و زمان ٤ ساعت پس از القا به صورت نامحلول تولید، استخراج و خالص سازی شد.

نتیجه گیری:یافته‌ها نشانگر مقدار کافی از بیان و تخلیص این پروتئین نوترکیب بصورت فیوژن بود. بنابراین از آن می‌توان در آینده بعنوان کاندیدای مناسبی در جهت تستهای تشخیص سرولوژیک مانند الایزا و همچنین برای واکسن های نوترکیب بر علیه لپتوسپیروز استفاده شود.

کلمات کلیدی : لپتوسپیرای بیماریزا، پروتئین فیوژن نوترکیب Lipl41-lep، بیان، تخلیص

نویسنده مسئول:
استادیار گروه میکروبیولوژی تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۰۹۱۲۳۸۴۱۶۷۶
Email:nasharzan@gmail.com

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]

مقدمه

لپتوسپیروز یا یرقان اپیدمیک که عامل آن باکتری لپتوسپیرا می‌باشد در سال‌های اخیر در سطح جهان به عنوان یکی از شایع‌ترین بیماریهای مشترک بین انسان و حیوان مطرح گردیده که باعث خسارت‌های اقتصادی زیادی بهمراه مرگ و میر شده است.[۱،۲] این بیماری در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل و مرطوب که دارای بارندگی زیاد می باشد، بیشتر رخ می دهد.[۳] انتقال آن از راه غیر مستقیم به انسان، از طریق آب یا خاک آلوده به ادرار حیوان صورت می پذیرد. لپتوسپیروز شامل علائم بالینی متعددی می‌باشد از جمله تب خفیف مشابه آنفلوانزا و در بیماریهای بسیار جدی تر هموراژی، یرقان، سستی ماهیچه ها، از کار افتادن کلیه و منتژیت آسپتیک که منجر به مرگ بیمار می‌گردد که همین امر تشخیص آنرا مشکل کرده است.[۴] بنابراین تشخیص صحیح و بموقع این بیماری حائز اهمیت است. پیشگیری از لپتوسپیروزیس، بدون واکسیناسیون بسیار مشکل می‌باشد، لذا واکسیناسیون از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در واکسن های لپتوسپیرایی موجود از جسم کامل باکتری کشته شده استفاده می‌گردد که این گونه واکسن ها، برای انسان به علت LPS موجود درآن، عوارض جانبی به همراه داشته و ایمنی کوتاه مدتی را ایجاد می‌کنند.[۵،۶] با توجه به ناکارآمدی این واکسنها در کنترل لپتوسپیروزیس و همچنین وجود مشکلات در تشخیص، استفاده از روشهای نوین جهت کنترل سلامت عمومی جامعه و شناسایی دقیق سروارهای غالب در هر منطقه حائز اهمیت می باشد.[۷،۸] پروتئین های غشای بیرونی (OMPs) لپتوسپیرا، اعضای خانواده بزرگی از پروتئین‌ها هستند که ارتباط مستقیمی با بیماریزایی یا ویرولانس دارند و می‌توانند نقش مهمی را در اتصال، عفونت اولیه و در نتیجه در ایجاد بیماری ایفا کنند، مانند پروتئین های LipL32, LigB ,LipL21.OmpL1 ,LipL41[۹،۱۰،۱۱]

یکی از مهمترین آنها LipL41 است که سومین پروتئین فراوان در سطح لپتوسپیرا است. این لیپوپروتئین با وزن مولکولی ۴۱ کیلودالتون در سویه های بیماریزا حفاظت شده است و در سویه های غیر بیماریزا وجود ندارد و بعنوان یک فاکتور بیماریزای مفروض در نظر گرفته شده است.[۱۲،۱۳،۱۴] همچنین مطالعات نشان می‌دهد که LipL41 توانایی باند شدن با مولکول Heme را در سطح غشا دارد که فراوانترین شکل آهن آلی و فاکتور ضروری برای رشد و ویرولانس اکثر باکتریهای بیماریزا است.[۱۵]

ژن *lipl41* به طول ۱۰۶۷ جفت باز می‌باشد که روی کروموزوم با فاصله ۲۸ جفت باز در بالادست یک ژن کوچک بنام *lep* به طول۳۳۳جفت باز قرار دارد. هر دو ژن منحصراً در سویه های بیماریزای لپتوسپیرا وجود دارند و در سویه های غیر بیماریزا حضور ندارند. ژن *lep* که بصورت متصل به *lipl41* می باشد، بعنوان چاپرون در افزایش بیان و افزایش حلالیت *lipl41* نقش دارد.[۱۶] با توجه به خصوصیات فوق الذکر و نیز بخاطر ایمونوژیک بودن این آنتی ژن و اهمیت ژن *lep* در بیان *lipl41*، لازم است جهت استفاده تشخیصی در روشهای سرولوژیکی مانند الایزا یا در واکسن نوترکیب مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به اینکه هیچ مطالعه ای تاکنون مبنی بر بیان ژن بصورت فیوژن *lipl41lip*- درسروارهای واکسینال و بومی لپتوسپیرا در ایران انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر بیان و تخلیص ژن *lipl41* بصورت فیوژن با ژن کمک کننده *lep* بود.

مواد و روش‌ها

مطالعات بیوانفورماتیک

مرحله اول در این مطالعه طراحی و ساخت سازه ژنی *lipl41-lep* از باکتری بیماریزای لپتوسپیرا اینتروگانس بود. برای این منظورمطالعات بیوانفورماتیکی ژن مورد نظر برروی تمام توالی های سروارهای شایع بیماریزای لپتوسپیرا در ایران که در سایت NCBI موجود بود، صورت گرفت (جدول شماره ۱). سپس توالی های بدست آمده با توالی های سروارهای لپتوسپیرا در کشورهای دیگر توسط نرم افزارهای بیوانفورماتیک مورد مقایسه قرار گرفتند.

پس از برش با آنزیم های محدودالاثر *IEcoRI ,Sal* به منظور کلونینگ سازه ژنی از وکتور pET32a+ استفاده شد. وزن مولکولی پروتئین نوترکیب(TRX- Lipl41-lep) 60KDa تخمین زده شد. بهینه سازی کدون برای بیان بهتر در سیستم باکتری *E.coli* انجام و توالی ژن مورد نظر بر مبنای الگوی سروارهای ایران طراحی و ساخته شد.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]

ترانسفورماسیون

پلاسمید نوترکیب حاصل به روش شوک حرارتی به درون باکتری مستعد (*E.coli*BL21(DE3 انتقال یافت.[۱۷] جهت تایید ایجاد پلاسمید نوترکیب واکنشPCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (مقدار ۲ میکرولیتر از DNA (۱۰۰نانوگرم)، ۱ واحد آنزیم PolymerasePfu DNA ، مقدار۲ میکرولیتر از پرایمرهای یونیورسال T7 (فوروارد و ریورس) حاوی ۱۰پیکومول، ۰/۲ میلی مولار dNTPs mix، buffer10x Pfu بهمراه ۲ میلی مولار (MgSO4) انجام شد.

بیان ژن

یک میلی لیتر از کشت شبانه باکتری واجد پلاسمید نوترکیب به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع 2YT (2× Yeast Extract Tryptone) حاوی ۵۰ میکرولیتر آمپی سیلین انتقال داده شد. سپس تارسیدن رشد باکتری به فاز لگاریتمی درطول موج ۶۰۰ نانومتر (کدورت حدود ۰/۸) درانکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سلسیوس، زمان ٤-۳ ساعت قرار گرفت. به منظورالقای بیان، مقادیر مختلفی از IPTG (ایزوپروپیل تیو گالاکتوزید) به سوسپانسیون اضافه و در ساعتهای مختلف پس از القا یک میلی لیتر از نمونهها برداشت شد. جهت بهینه سازی شرایط القای بیان سه فاکتور زمان (۱ تا ٤ و ١٦ ساعت)، غلظت های مختلف IPTG (۰/۵تا ۰/۱ میلی مولار) و دما (۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس) در نظر گرفته شد. سپس رسوب سلولهای BL21 دارای پلاسمید نوترکیب در معرض لیز سلولی توسط دستگاه سونیکاتور قرار گرفت که به صورت ۵ سیکل یک دقیقه ای با فواصل ۱ دقیقه با توان۵۰ وات انجام شد. نمونهها به مدت ۱۵ دقیقه، دور ۲۵۰xg در دمای ٤درجه سلسیوس سانتریفیوژ و رسوب و مایع رویی از هم جدا شد. بررسی کیفی حلالیت پروتئین نوترکیب، در ژل به روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت .

تخلیص و تایید پروتئین نوترکیب

پروتئین نامحلول نوترکیب Lipl41-lep به روش رقت های سریالی اوره ۱ تا ۸ مولار به صورت محلول در آمد و تخلیص گردید. در این مرحله نیز مدت زمان انکوباسیون محلول سازی و غلظت های مناسب اوره بهینه سازی شد. برای بررسی کیفیت حلالیت پروتئین، ابتدا اوره از محلول توسط دیالیز خارج و سپس وجود پروتئینها توسط SDSPAGE بررسی گردید. روش وسترن بلات برای تایید تخلیص پروتئین نوترکیب انجام شد که از آنتی بادی Anti His tag/HRP Conjugated(۵۰۰۰ :۱) و جهت ظهور باندها ازمحلول٤-کلرونفتول استفاده شد. تعیین غلظت کمی پروتئین با روش برادفورد انجام شد.

یافتهها

محصول PCR بدست آمده یک قطعه ۲۰۰۰ جفت بازی را نشان داد که بیانگر تکثیر ژن *lipl41-lep* بود (سایز ژن فیوژن 1400bp بهمراه پروموتور T7600bp جمعاً حدود 2000bp بود). پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ در کنار مارکر 100bp plus (Bio Fact) مورد تایید واقع شد که در شکل شماره ۱ قابل مشاهده است.

پس از ترانسفورماسیون سویه بیانی *E.coli* BL21(DE3) با پلاسمید نوترکیب pET32a+ Lipl41-lep و کشت کلنی های حاصل القای بیان با غلظت های مختلف IPTG و دمای مختلف انکوباسیون انجام شد.

بررسی نتایج برروی ژل SDS PAGE حاصل از بهینه سازی شرایط بیان نشان داد، بیان بیشتر پروتئین در دمای ۳۷درجه سلسیوس نسبت به ۲۵درجه سلسیوس بود و غلظت ۰/۱ میلی مولار نسبت به غلظت های کمتر از آن بیان بالاتری را نشان داد. بعلاوه نتایج نشان داد که بیان پروتئین در زمان ٤ ساعت نسبت به زمان های ۱ ،۲، ۳و ١٦ ساعت بعد از القا بیشتر است.

شکل شماره ۲ نتایج الکتروفورز روی ژل ۱۲/۵ درصد SDS PAGE وجود باند واضح در حدود ٦۰ کیلودالتون را در زمان های مختلف نشان میدهد. به طور کلی پروتئین Lipl41-lep در دمای ۳۷درجه سلسیوس و غلظت ۰/۱ میلی مولار از IPTG و زمان ٤ ساعت پس از القا بیشترین بیان را داشت.

نتایج حاصل از لیز سلولی که توسط دستگاه سونیکاتور انجام شد، حاکی از وجود مقدار بالای پروتئین در رسوب و مقدار بسیار

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]

ناچیز در سوپ رویی بود که بیان پروتئین بصورت نامحلول و انکلوژن بادی انجام شد.

تخلیص پروتئین از روش دناتوراسیون و محلول سازی توسط رقت های سریالی اوره ۱ تا ۸ مولار صورت گرفت. نتایج SDS PAGE در این مرحله بیانگر تخلیص پروتئین در غلظتهای ٦ تا ۸ مولار پروتئین بود که در غلظت ٦ مولار بالاترین غلظت نسبت به تخلیص با اوره ۷ و ۸ مولار مشاهده شد. تایید حضور پروتئین نوترکیب در کنار مارکر با روش وسترن بلات تک باند واضح با وزن مولکولی ٦۰ کیلودالتون را مشخص کرد (شکل شماره ۳).

نتایج حاصل از بررسی جذب نوری نمونه تخلیص شده با استفاده از روش کمی برادفورد، پس از رسم منحنی استاندارد، مقدار کل پروتئین فیوژن نوترکیب تخلیص شده ۲۱/٥٤ میلی گرم در میلی لیتر تخمین زده شد.

بحث

یکی از مهمترین بیماریهای قابل انتقال از دام به انسان لپتوسپیروزیس است که دارای انتشار جغرافیایی وسیع در سطح جهان است.[۵، ۱۸] تشخیص صحیح این بیماری در انسان بدلیل علائم بالینی متعدد و مشابه با برخی از بیماریها از جمله منتژیت، انفلوانزا، تب دانگ و هپاتیت بسیار مشکل است.[۲، ۱۹] روش های آزمایشگاهی متداول و موجود در تشخیص این بیماری هریک دارای ارزش خاصی هستند، اما محدودیت هایی نیز دارند.[٤، ۲۰] همچنین علیرغم واکسیناسیون بر علیه لپتوسپیروز در برخی از نقاط کشور بیماری در کشور وجود دارد.[۵] در سال های اخیر مطالعات زیادی در مورد شناسایی پروتئین های غشای خارجی لپتوسپیرا صورت گرفته که این پروتئین‌ها پایه و اساس رابط بین میزبان و باکتری می‌باشند، که ابزاری در راستای یافتن کاندیداهایی مناسب جهت استفاده از آنها در کیت های تشخیصی مانند ELISA و ساخت واکسن پروتئینی نوترکیب معرفی کرده اند.[۱۰، ۲۱، ۲۲]

LipL41 یکی از مهمترین پروتئین های غشایی مهم لپتوسپیراست که فقط در سروارهای بیماریزای لپتوسپیرا وجود دارد.[۱۲، ۱۳] ژن کوچک *lep* متصل به ژن کننده Lipl41 قرار دارد و بعنوان چاپرون باعث بیان و حلالیت بیشتر این ژن می‌شود. بر طبق مطالعات قبلی بیان با هم Lipl41 و Lep باعث حلالیت بیشتر Lipl41 می‌شود، جرم مولکولی این دو باهم حدود ٦۰ کیلودالتون است. تعداد زیاد چاپرون های باکتریایی دیگری نیز شناخته شده است.[۱٦] یکی از معروف ترین آنها چاپرون SseA در سرووارهای *Salmonella* می‌باشدکه برای پایداری بیانSseB و SseD ضرورت دارد.[۲۳]

در این تحقیق تعداد ۱۱ سروار بومی و ۱٦ سروار غیر بومی از سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا وارد شدند. سپس با کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیک این توالی ها با یکدیگر مقایسه و درصد شباهت و تفاوت‌ها بررسی شد. این مطالعه از آن جهت حائز اهمیت است که تاکنون مطالعه منتشرشده ای در زمینه بیان و تخلیص آنتی ژن نوترکیب Lipl41 بصورت فیوژن با ژن کمک‌کننده *lep* لپتوسپیرا در ایران انجام نشده و این کار برای اولین بار صورت گرفته است.

براساس نتایج آنالیز بیوانفورماتیک می‌توان گفت سازه طراحی شده ژن مورد نظر دارای هم پوشانی مطلوبی نسبت به تمامی سرووارهای بیماریزای لپتوسپیراست که می‌توان در آینده در روش‌های تشخیصی لپتوسپیروزیس یا واکسن نوترکیب از آن استفاده نمود.

در تحقیق Mariya و همکاران در سال ۲۰۰٦ در هند، بیانLipl41در وکتور بیانی pPROEXHTb و ترانسفورماسیون در سلول*E.coli* BL21با میزان 1mM از IPTG صورت گرفت.[۲٤]در مطالعه دیگری Lin و همکاران در سال ۲۰۱۳ بمنظور بررسی Lipl41 در لپتوسپیرا باکلونینگ در وکتور+pRSETو ترانسفورماسیون در *E.coli* BL21(DE3) انجام دادند که مقادیر زیادی از بیان پروتئین نوترکیبLipL41در دمای ۲۰°C، با غلظت ۰/٥mM از IPTG و زمان ۱٦ ساعت پس از القا بدست آمد.[۱٥] این نتایج با یافته های این تحقیق با کلونینگ در وکتورpET32a +و ترانسفورماسیون در *E.coli* BL21(DE3)مقادیر بالایی از پروتئین فیوژن در دمای ۳۷°C، با غلظت ۰/۱mM از IPTG و زمان ٤ ساعت پس از القا بدست آمد، مطابقت دارد. همچنین دیگر محققانی مانند Megudeswaran (۲۰۱٤)[۱۳]و Lin (۲۰۱٦)[۲٦] این پروتئین نوترکیب را در وکتورهای بیانی سری pET مانند تحقیق حاضر با مقادیر کافی تولید کردند.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]

قرار دادن توالی His- tag و توالی محلول ساز به نام برچسب TRX به وکتور بیانی باعث افزایش حلالیت می گردد.[۲۷] علی رغم استفاده از این برچسب در این پروژه مقادیر بیشتر پروتئین نوترکیب به صورت نامحلول یعنی در قسمت رسوب بیان شد. این نتیجه تحقیق مانند سایر محققین نیز حاکی از تخلیص پروتئین Lipl41 در شرایط دناتوراسیون می‌باشد که پروتئینLipl41 با اتصال به توالی polyhistidine (6X-His) tagged بصورت دناتوره و نامحلول تخلیص شد.[۱۵، ۱۶، ۲۴]

در تخلیص پروتئینهای نوترکیب در صنعت حالت محلول و نامحلول بودن هر یک دارای مزایا و معایبی است. بعنوان مثال محلول بودن روند تخلیص را آسان تر میکند، اما هزینه استفاده از رزین نیکل در آن بالاست. همچنین پروتئین در فرآیند محلول سازی با استفاده از اوره، دچار تغییرات ساختاری ناخواسته نمی شود و فعالیت بیولوژیکی خود را به نحو مناسبی ایفا می‌کند.[۲۸] در پروتئین نامحلول بعد از لیز کردن سلول پروتئینهای تجمع یافته می‌توانند با درصد خلوص تقریباً بالایی تخلیص شوند. در حین تاخوردگی و تخلیص از رسوب، غلظت پروتئین در رسوب نیز اهمیت دارد و بر میزان پروتئین بازیابی شده تاثیر دارد. [۲۹] خوشبختانه در مورد پروتئین مورد تحقیق که دارای غلظت بالایی در رسوب بود، تخلیص به طور موفقیت آمیزی انجام شد. در روند بیان و تخلیص پروتئینها، مشاهده شده که پروتئینی که در فاز رسوب حاصل از سانترفیوژ بعد از سونیکاسیون باشد، با استفاده از حلال‌های آلی مثل اوره، گوانیدین هیدروکلراید و... از فاز رسوب خارج شده و در محلول اوره حل می‌شود. در تحقیق حاضر نیز جهت تخلیص پروتئین نامحلول نوترکیب Lipl41-lep در غلظتهای مختلف اوره ۱ تا ۸ مولار به صورت محلول در آورده شد، که در غلظتهای ۶-۸ مولار پروتئین مورد بررسی تخلیص شد و در غلظت ۶ مولار بالاترین غلظت مشاهده شد.

مشابه این نتایج Haake و همکاران برای حلالیت پروتئین نامحلولLipl41 از گوانیدین ۶ مولار استفاده کردند.[۳۰] بدین ترتیب مراحل خالص سازی نیز بهینه سازی شد تا بیشترین میزان پروتئین و حداکثر خلوص پروتئین بدست آید. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پروتئین فیوژن نوترکیب حاصله در میزبان اشرشیا کلی (DE3) BL21 به صورت نامحلول قابل تولید و به شکل دناتوره قابل خالص سازی است. بیشترین تولید زمانی بدست آمد که فاکتورهای بیان و تخلیص بهینه سازی شدند.

با توجه به موارد فوق، نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از بیان، تولید و تخلیص موفقیت آمیز پروتئین Lipl41در لپتوسپیرا بصورت فیوژن با پروتئین چاپرونLep می‌باشد که صحت نتایج با تکنیک وسترن بلات تایید گردید.

بدین ترتیب می‌توان گفت پروتئین فیوژن نوترکیب بدست آمده در این مطالعه هم برای مقاصد تشخیص و هم بعنوان کاندید در تولید واکسن نوترکیب بر علیه لپتوسپیروزیس در آینده می‌تواندمورد استفاده قرارگیرد.

سپاسگزاری

این مطالعه با طرح مصوب (شماره ۱۲-۱۸-۱۸ -۱۰۶-۹۶۰۴۵-۹۶۱۰۲۳) در مؤسسه تحقیقاتی واکسن وسرم سازی رازی کرج انجام شد. بدینوسیله از پرسنل گرامی بخش میکروب شناسی این موسسه تشکر و قدردانی می شود.

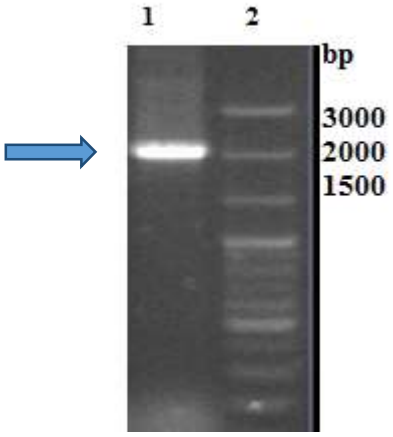
[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]

جدول ۱: فهرست سروارهای بومی لپتوسپیرا اینتروگانس مورد مطالعه در این تحقیق

Accession No	Serovar	Protein Id	Strain	Source
KJ398165	Autumnalis	AHW80383.1	2802	RTCC
KJ398169	Canicola	AHW80387.1	2824	RTCC
KJ409447	Canicola	AHX26958.1	2805	RTCC
KJ398166	SejroeHardjo	AHW80384.1	2810	RTCC
KJ409451	SejroeHardjo	AHX26962.1	2821	RTCC
KJ398168	Icterohaemorrhagiae	AHW80386.1	2823	RTCC
KJ409449	Icterohaemorrhagiae	AHX26960.1	2812	RTCC
KJ398167	Pomona	AHW80385.1	2822	RTCC
KJ409450	Pomona	AHX26961.1	2815	RTCC
KJ398170	Grippotyphosa	AHW80388.1	2825	RTCC
KJ409448	Grippotyphosa	AHX26959.1	2808	RTCC

RTCC: Razi Type Culture Collection



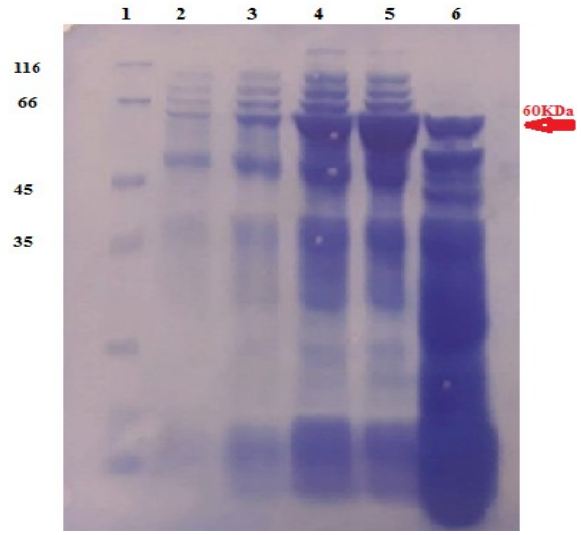
شکل ۱ : تایید حضور پلاسمید نوترکیب بروش کلنی PCR با استفاده از پرایمر یونیورسال T7

چاهک ۱: ژن فیوژن Lipl41-lep ، چاهک۲: مارکر(Bio Fact) plus 100bp

سایز مولکولی ژن1400bpو پروموتور T7 600bpکه جمعاً حدود 2000bp را تشکیل می دهد.

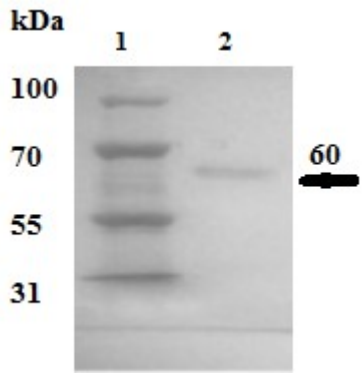
[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]



شکل۲: نتایج ژل SDS-PAGE بیان پروتئین نوترکیب Lep- Lipl41 در ۳۷ درجه سلسیوس و غلظت ۰/۱mM از IPTGدر زمانهای مختلف

چاهک ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین (Thermo, scientific)Unstanied Protein Molecular Weight Marker ،
چاهک۲: ۱ ساعت پس از القای بیان پروتئین نوترکیب Lipl41-lep،
چاهک۳: ۲ ساعت پس از القای بیان پروتئین نوترکیب Lipl41-lep،
چاهک٤: ۳ ساعت پس از القای بیان پروتئین نوترکیبLipl41-lep ،
چاهک٥: ٤ ساعت پس از القا پروتئین نوترکیب Lipl41-lep ،
چاهک٦: ١٦ ساعت پس از القا پروتئین نوترکیبLipl41-lep



شکل ۳ : نتایج ژل وسترن بلاتینگ و تایید پروتئین نوترکیبLep-Lipl41

چاهک ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین (Thermo, scientific) –Prestained Protein Molecular WeightMarker.
چاهک ۲: پروتئین فیوژن نوترکیب Lipl41-lep

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]

References

1. Adler B, De La Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol.2010; 140(3):287-96. Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
2. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. Vet Microbiol. 2011; 153(1):73-81. 52.
3. Vijayachari P, Sugunan A, Shriram A. Leptospirosis: an emerging global public health problem. J biosciences 2008; 33(4):557-69.
4. Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Smythe LD, Symonds ML, et al. Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. J clin microbiol. 2007; 45(4):1363-5.
5. Khaki P. Clinical Laboratory Diagnosis of Human Leptospirosis. Int J Enteric Pathog. 2016; 4(1): e31859.doi: 10.17795/ijep31859.
6. Sohini Dey C, Madhan Mohan P, Ramadass K. Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. Indian J Med Res. 2008; 128, 172-177.
7. Luo D, Xue F, Ojcius D M, Zhao J, Mao Y, et al. Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity. J Vac. 2009; 28(1):243-55.
8. Dellagostin O A, Grassmann A A, Hartwig D D, Felix S R, et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. Hum. Vaccin. 2011; 7: 1215-24. Doi: 10.4161/hv.7.11.17944.
9. Hoseinpur R, Khaki P, Noofeli M, Moradi Bidhendi S. Molecular detection of pathogenic leptospiral serovars byPCR, based on *lipL21* gene. Arch Razi Inst. 2015; 70 (4): p 223-227.
10. Pinne M, Matsunaga J, Haakeb D A. Leptospiral Outer Membrane Protein Microarray, a Novel Approach to Identification of Host Ligand-Binding Proteins. J Bacteriol. 2012; 194: 6074–6087.
11. Vedhagiri K, Natarajaseenivasan K, Chellapandi P, Prabhakaran S G, et al. Evolutionary implication of outer membrane lipoprotein-encoding genes ompL1, lipL32 and lipL41 of pathogenic *Leptospira* species. Genom proteom bioinf. 2009; 7(3):96-106.
12. Golab N, Khaki P, Harzandi N, Esmaelizad M, Tebianian M. Expression and purification of the Lipl41, a surface-exposed lipoprotein antigen of pathogenic Leptospira spp. Vet Arhiv. 2020; 90 (3): 297-305
13. Magudeswaran S K, Parthiban M, Saranya S, et al. Evidence of cross reaction potential of recombinant *Leptospira* LipL41 Protein. Indian J Biotechnol.2014; 13:57-61.
14. 14-Senthilkumar T M A, Subathra M, Ramadass P. Evaluation of recombinant leptospiral antigen LipL41 in enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination test for serodiagnosis of canine leptospirosis. Vet arhiv. 2007; 77(6):475
15. Lin M H, Chang Y C, Hsiao C D, et al, LipL41, a Hemin Binding Protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. PLOS ONE .2013; 8: 12,e 83246.
16. King A M, Bartpho T, Sermswan R W, et al. Leptospiral Outer Membrane Protein LipL41 Is Not Essential forAcute Leptospirosis but Requires a Small Chaperone Protein, Lep, forStable Expression. Infect Immuni J. 2013; 81: 2768–2776.
17. Sambrook J, RUSSEL D W. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. Press, Heatshock. 2001.
18. Villumsen, S, Pedersen, R, Borre M B, Ahrens P, et al. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. J microbiol methods. 2012; 91: 184-190.
19. Cullen P A, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y,et al. Surfaceome of*Leptospira* spp. Infect. Immun. 2005; 73: 4853-4863. Doi: 10.1128/IAI.73.8.4853-4863.
20. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect Immun. 2001; 69: 4958-4968. Doi: 10.1128/IAI.69.8.4958-4968.2001.
21. Flannery B, Costa D, Carvalho F P, Guerreiro H, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based Enzyme-Linked Immunosorbent assays for the serodiagnosis of Leptospirosis. J Clin Microbiol. 2001;39: 3303-3310. Doi: 10.1128/JCM.39.9.3303-3310.2001.
22. Zhang X, Yu Y, He Y, Zhang P, et al. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires, Acta biochimica et biophysica Sinica. 2005; 37: 649-656.
23. Zurawski DV, Stein MA**.** SseA acts as the chaperone for the SseB component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 translocon. Mol. Microbiol. 2003; 47**:**1341–1351.
24. Mariya R, Chaudhary P, Kumar A A, Thangapandian E, et al. Evaluation of a

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]

recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine Leptospirosis Comparative. Immunology, Microbiol Infect Dis. 2006; 29: 269–277.

25. Lin X A, Sun A, Ruan P, Zhang Z, Yan J. Characterization of conserved combined T and B cellepitopes in *Leptospira* interrogans major outer membrane proteins ompL1and lipL41. BMC Microbiol. 2011; 11: 21.
26. Lin X, Xiao G, Luo D, Kong L, et al. Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs. BMC Microbiol. 2016; 16, 241.
27. CostaS, AlmeidaA, CastroA, DominguesL. Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. Front. Microbiol. 2014; 5: 63. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00063.
28. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J Biosci Bioeng .2005; 99(4): 303-310.
29. Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK. et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli*using mild solubilization process. Microb Cell Fact 2015; 14, 41.
30. Haake DA, Mazel MK, Mccoy AM, Milward F, et al. Leptospiral outer membrane proteins Ompl1 and Lipl41exhibit synergistic immune protection. Infect Immun. 1999; 67, 6572-6582.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]

AUMJ Alborz University of Medical Sciences Journal

Alborz University of Medical Sciences Journal, October 2021, Vol. 10, No. 4: 491-500 *Original Article*

Narges Golab[1], Naser Harzandi[1*], Pejvak Khaki[2], Majid Tebianian[3], Majid Esmaelizad[4]

[1]Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
[2]Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education andExtension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[3]Department of Immunology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education andExtension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[4]Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

***Corresponding Author:**

Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Tel:09123841676
E-mail:nasharzan@gmail.com

The Evaluation of the Stability of Lipl41 Outer Membrane Protein Expression in Fusion with Lep, a Small Chaperone Protein, inLeptospira

Received: 18 Oct 2020 ; Accepted: 24 Nov 2020

Abstract

Aim and objective: Leptospirosis is a zoonotic disease caused by pathogenic spirochete called Leptospira that has worldwide distribution. Unfortunately, due to the variety of clinical symptoms, its diagnosis has many limitations. LipL41 is among the most abundant outer membrane proteins in *Leptospira* and is exclusively found in pathogenic species. A small gene called *lep* is located very close to *lipl41* gene on the bacterial chromosome, which facilitates its expression. In this study, the expression and purification of LipL41-Lep fusion protein among prevalent pathogenic isolates in Iran was performed in a prokaryotic system for the first time.

Methods:All collected Lipl41 and Lep protein sequences were analyzed from the NCBI database. Complete codon sequences of the pattern of the Iranian serovars were designed and synthesized then sub-cloned into a pET32a+ and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) to expression by using IPTG inducer. Thefusion recombinant protein was purified by denaturation and confirmed by western blot.

Results:The results of PCR analysis showed a clear band of ~ 2000 bp in Agarose gel.

Optimal expression of fusion recombinant protein (60kDa) was achieved post-induction at 4 h at 37 °C in the presence of 0.1 mM IPTG. Then it was purified in the insoluble form.

Conclusion:The results demonstrated that adequate amounts of this fusion recombinant protein were expressed andpurified to be used as a fusion antigen in serological testing, such as ELISA, or for the development of subunit vaccines against Leptospirosis in the future.

Keywords:Pathogenic Leptospira, LipL41-Lepfusion recombinant protein, Expression, Purification

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.491]