

طراحی و ساخت پلاسمید نو ترکیب حاوی ترکیب ژن های Ag85B و TB10.4 مایکوباکتریوم توبرکولوزیس

رقیه سامانی پور^۱، مجید تیبانیان^۲، نادر مصوری^۳، سلمان احمدی اسپچین^۴، مرتضی تقی زاده^۵، کیومرث سلیمانی^۶

تاریخ دریافت 1394/04/21 تاریخ پذیرش 1394/06/22

چکیده

پیش زمینه و هدف: علی رغم استفاده از واکسن ب.ث.ژ از سال ۱۹۲۱ تا به حال، هنوز بیماری سل به عنوان دومین عامل مرگومیر در بین بیماری های عفونی محسوب می گردد. با افزایش مقاومت عامل مولد سل (مایکوباکتریوم توبرکولوزیس) به آنتی بیوتیک های معمول و وسیع الطیف و همچنین با ظهور HIV و عفونت این ویروس با مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، مقابله با این بیماری بیشتر به چالش کشیده شده است. شناخت آنتی ژن های مؤثر در ایمنی زایی محافظتی می تواند به عنوان کاندیدی برای طراحی واکسن های نوین باشد. از جمله این آنتی ژن ها Ag85B و TB10.4 می باشد که با وزن مولکولی به ترتیب ۳۰ و ۱۰ کیلودالتون توسط لنفوسیت های T شناخته شده و سبب القاء پاسخ قوی Th1 و در نتیجه بالا بردن تولید IF- γ می گردند. هدف از این تحقیق، ساخت کاست ژنی حاصل از تلفیق دو ژن فوق در درون وکتور pcDNA3 می باشد.

مواد و روش ها: DNA متعلق به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس سویه H37Rv به روش روتین استخراج گردید. ژنوم کدکننده این دو آنتی ژن توسط پرایمرهای اختصاصی به روش PCR تکثیر و سپس تلفیق گردید و پس از هضم آنزیمی درون وکتور یوکاریوتی pcDNA3 کلون گردید. پلاسمید نو ترکیب فوق در باکتری E.coli DH5 α ترانسفورم گردید و پس از تخلیص، توسط آنالیز آنزیمی و توالی یابی مورد تأیید واقع شد.

یافته ها: نتایج تعیین توالی و آنالیز آنزیمی تأیید نمود که کلونینگ با موفقیت انجام شده است.

بحث و نتیجه گیری: قطعات TB10.4 و Ag85B ترکیب گردید و در وکتور pcDNA3 با موفقیت کلون گردید. در مطالعات بعدی می توان بیان ژن را در رده سلولی ارزیابی نمود و از این کاست ژنی به عنوان واکسن DNA استفاده نمود. **واژگان کلیدی:** کاست ژنی، TB10.4 و Ag85B، مایکوباکتریوم توبرکولوزیس

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره هفتم، ص 609-616، مهر 1394

آدرس مکاتبه: کرج، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، تلفن: ۰۹۱۲۵۴۳۳۶۸۴

Email: m.tebianian@rvsri.ir

مقدمه

و داروهای وسیع الطیف به معضل بزرگ تری تبدیل شده است. واکسن مورد استفاده در سراسر جهان علیه این بیماری، ب.ث.ژ می باشد و طی مطالعات مختلف نشان داده شده است که تأثیر ایمنی محافظتی واکسن ب.ث.ژ از ۰ تا ۸۰ درصد متغیر می باشد (۳). با توجه به این معضلات و کارایی پایین ب.ث.ژ، نیاز به ایجاد ایمنی بیشتر وجود دارد. معرفی واکسن های مؤثرتر می تواند به ترکیبی ضروری برای کنترل این بیماری در آینده مبدل شود (۴).

مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به عنوان عامل بیماری سل، میکروارگانسمی داخل سلولی و هوازی می باشد که سبب مرگ بیش از ۱/۷ میلیون فرد در سال می گردد (۱). با وجود درمان و پیشگیری در برابر بیماری سل به مدت بیش از ۵۰ سال، هنوز این بیماری به عنوان یکی از کشنده ترین بیماری های عفونی محسوب می گردد (۲). این وضعیت با پیدایش عفونت همراه با ویروس مولد ایدز و پیدایش سویه های مقاوم به داروهای معمول

^۱ کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

^۲ دکترای ایمونولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ دکترای میکروبیولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

^۴ دکترای میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

^۵ دکترای ویروس شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

^۶ دکترای دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، پلاسمید و محیط‌های کشت:

مایکوباکتریوم توبرکولوزیس سویه H37Rv، اشریشیاکلی سویه DH5 α به‌عنوان میزبان کلونینگ، پلاسمید pcDNA3 به‌عنوان وکتور بیانی یوکاریوتی حامل ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و نئومایسین، محیط‌های کشت لوون اشتاین جانسون گلیسرول دار، Luria Bertani Broth و Luria Bertani Agar حاوی 50 μ g/ml آمپی‌سیلین جهت انتخاب آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده واقع گردید.

استخراج DNA و PCR:

مایکوباکتریوم توبرکولوزیس H37Rv در محیط کشت شیب‌دار لوون اشتاین جانسون گلیسرول دار کشت داده شد و به مدت ۱۴ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. از کلنی باکتری در بافر TE، سوسپانسیون تهیه گردید و DNA به روش استاندارد ون‌سولینگن استخراج گردید. جهت تأیید کمی و کیفی ژنوم استخراج‌شده از اسپکتروفوتومتری با دستگاه نانودراپ و الکتروفورز استفاده گردید. توالی مربوط به ژن‌های Ag85B و TB10.4 از اطلاعات ثبت شده در بانک ژن استخراج گردید. طراحی پرایمر توسط نرم افزار Oligo صورت پذیرفت. سایت برشی EcoRI در پرایمر پیشرو، سایت برشی BamHI در پرایمر برگشتی Ag85B، سایت برشی BamHI در پرایمر پیشرو و سایت برشی HindIII در پرایمر برگشتی TB10.4 جای داده شد که به‌صورت پررنگ نشان داده شده است (جدول ۱).

با توجه به این مشکل، بسیاری از محققین در مورد آنتی‌ژن‌های ایمونوژنیک به‌منظور گسترش واکنش‌های مؤثر در حال مطالعه می‌باشند (۵). از جمله این آنتی‌ژن‌ها، کمپلکس Ag85، TB10.4، ESAT-6، MPT64، Cfp-10، HSP65، PST-S ... می‌باشد که به‌منظور طراحی واکنش‌های نو ترکیب و DNA مورد استفاده واقع گردیده است (۶).

TB10.4، پروتئین ترشحی با جرم مولکولی ۱۰ کیلودالتون متعلق به خانواده ESAT-6 می‌باشد که از منطقه Rv0288 با نام ژن esxH کد می‌گردد و به نظر می‌رسد جهت بیماری‌زایی باکتری مولد سل ضروری می‌باشد (۷). طی تحقیقات انجام‌شده مشخص گردیده است که این آنتی‌ژن به‌عنوان هدفی برای پاسخ‌های ایمنی ضد میکروبی محسوب می‌گردد و در بیماران مبتلا به سل به‌طور قوی توسط سیستم ایمنی شناخته‌شده و باعث القاء سطح بالایی از ترشح اینترفرون گاما در این اشخاص می‌گردد (۸،۹).

Ag85B، پروتئین پیوندی فیبرونکتین با جرم مولکولی ۳۰ کیلودالتون و فعالیت مایکولیل ترنسفرازی می‌باشد و یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های ترشحی باسیل سل است که در فاز اولیه بیماری ترشح می‌گردد و در ماکروفاژهای عفونی‌شده یافت می‌گردد (۱۰). طی ارزیابی‌های صورت گرفته در بیماران مبتلا به سل فعال و نهفته مشخص شده است که این آنتی‌ژن به‌عنوان یک ایمونوژن قوی سبب القاء پاسخ ایمنی سلولی و هومورال می‌گردد (۱۱،۱۲).

تحقیق حال حاضر طراحی واکنش DNA با استفاده از ترکیب ژن‌های مربوط به این دو آنتی‌ژن و ژن فیوزن جدید

جدول (۱): ترتیب توالی پرایمرهای پیشرو و برگشتی

ژن کدکننده	توالی پرایمر
Ag85BF	۵'-GTTGAGGAATTCATCAAGGTTTCAGTTCC-3' (EcoRI)
Ag85BR	5'-CGCGACGGATCCATCAAGGTTTCAGTTCC-3' (BamHI)
TB10.4F	5' -TACGCAAAGCTTAACTACCCCGCG-3' (BamHI)
TB10.4R	5' -CATGATAGGGGATCCCCGCACCAA-3' (HindIII)

واکنش PCR جهت تکثیر TB10.4: واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، واسرشتگی ثانویه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط اولیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

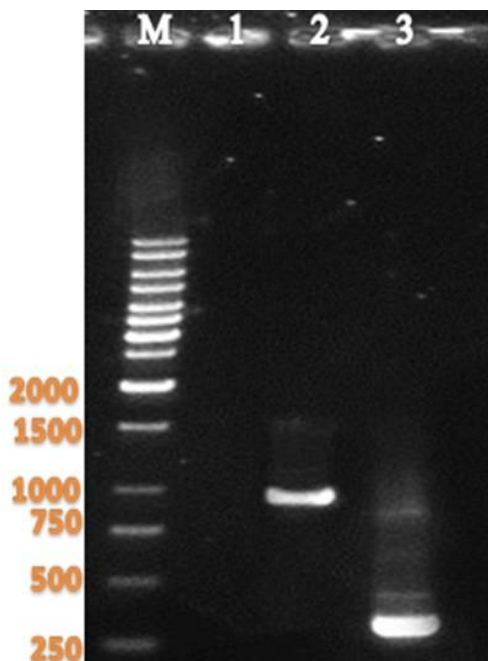
واکنش PCR جهت تکثیر Ag85B: واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، واسرشتگی ثانویه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط اولیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

پرایمر پیشرو Ag85B و پرایمر برگشتی TB10.4، PCR انجام شد و پس از تأیید کلونینگ با الکتروفورز، پلاسمید استخراج گردید و به منظور توالی‌یابی مورد استفاده واقع گردید.

یافته‌ها

استخراج DNA و تکثیر ژن‌های کد کننده Ag85B و TB10.4:

پس از کشت باکتری، استخراج DNA صورت گرفت. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوطه انجام شد و پس از الکتروفورز محصول PCR، باند مربوطه از روی ژل آگارز تخلیص گردید. باند ۹۷۸bp مشاهده شده مربوط به Ag85B و باند ۲۹۱bp مشاهده شده متعلق به TB10.4 می‌باشد (شکل ۱).



شکل (۱): محصول PCR ژن کد کننده Ag85B و TB10.4

M: مارکر وزن مولکول 1Kb، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: باند 978bp متعلق به Ag85B، ستون ۳: باند 291bp متعلق به TB10.4 به تلفیق دو آنتی‌ژن:

تلفیق دو آنتی‌ژن توسط هضم آنزیمی با BamHI و لایگیشن توسط T4 DNA Ligase صورت پذیرفت. سپس به منظور تکثیر ژن مذکور، PCR انجام گرفت و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد گردید و باند ۱۲۶۹ bp مشاهده شده حاکی از تلفیق صحیح دو قطعه می‌باشد (شکل ۲).

سپس از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید.

تلفیق دو قطعه TB10.4-Ag85B و PCR:

پس از تخلیص محصول PCR از روی ژل آگارز، فیوژن مستقیم دو آنتی‌ژن TB10.4-Ag85B صورت پذیرفت. بدین منظور دو قطعه تخلیص شده از روی ژل، توسط آنزیم BamHI مورد هضم آنزیمی قرار داده شد و لایگیشن توسط T4 DNA Ligase صورت پذیرفت.

واکنش PCR جهت تکثیر آنتی‌ژن ترکیبی (فیوژن): واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، واسرشتگی ثانویه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط اولیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه

سپس از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید.

ساخت وکتور نو ترکیب حاوی Ag85B-TB10.4:

خالص‌سازی محصول PCR از روی ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت و محصول مذکور توسط آنزیم‌های EcoRI و HindIII مورد هضم آنزیمی قرار داده شد. وکتور pcDNA3 نیز به همین ترتیب مورد هضم آنزیمی واقع گردید. با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase، عمل لایگیشن بین وکتور هضم شده و قطعه آنتی‌ژنی برش خورده، انجام شد.

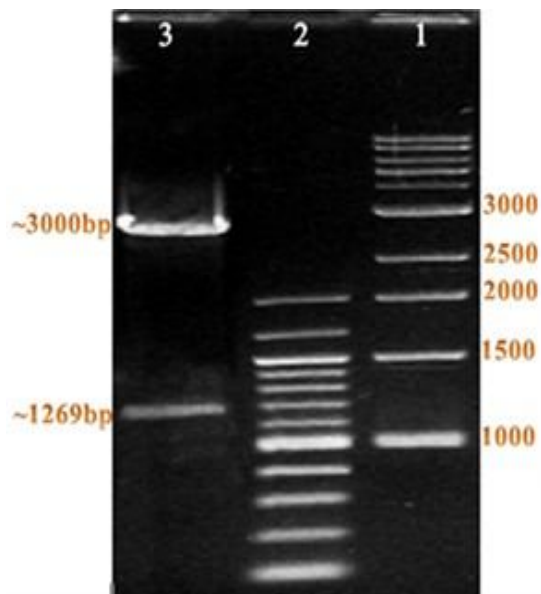
استخراج پلاسمید:

ترنسفورماسیون به روش تغییر یافته کوهن مورد استفاده واقع گردید. برای ترنسفورماسیون اولیه از اشریشیاکلی سویه DH5α استفاده شد. باکتری مذکور به روش بیوشیمیایی کلرید کلسیم به حالت مستعد درآورده شد، سپس تحت تأثیر شوک حرارتی قرار گرفت و در محیط کشت LB Agar حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. برای استخراج پلاسمید از کلنی‌های رشد یافته از کیت تجاری تخلیص پلاسمید (شرکت Gene All) استفاده گردید. پس از استخراج، به منظور تعیین کلنی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب الکتروفورز انجام گرفت و از سایز قطعات به دست آمده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، کلنی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب شناسایی گردید.

تأیید کلونینگ توسط هضم آنزیمی و PCR:

به منظور تأیید کلونینگ، هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم‌های EcoRI و HindIII صورت گرفت. همچنین توسط

M: مارکر 100bp، ستون ۱: وکتور نرمال، ستون ۲: وکتور حاوی قطعه Ag85B-TB10.4، ستون ۳: پلاسمید استخراج شده به صورت سوپرکویل، ستون ۴: کنترل منفی
هضم آنزیمی دوگانه و تعیین توالی:
هضم آنزیمی دوگانه بر روی وکتور نو ترکیب صورت گرفت و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد. دو قطعه (DNA وارد شده در وکتور و وکتور بدون قطعه داخل شده) مشاهده گردید. سایز قطعه جدانشده از وکتور (1269 bp) حاکی از صحت کلونینگ می باشد (شکل ۴).



شکل (۴): هضم آنزیمی دوگانه پلاسمید نو ترکیب

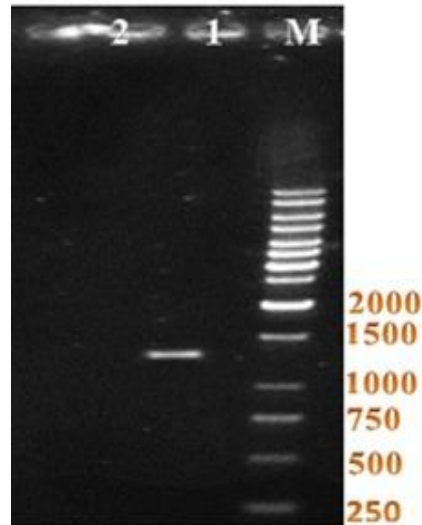
ستون ۱: مارکر 1Kb، ستون ۲: مارکر 100bp، ستون ۳: پلاسمید نو ترکیب هضم شده با دو آنزیم EcoRI و HindIII (دو قطعه مشاهده گردید. یک قطعه ~1269bp مربوط به DNA وارد شده در وکتور و دیگری وکتور بدون قطعه مورد نظر ~3000bp می باشد).

نتایج تعیین توالی نشان داد توالی ژن های مذکور با توالی ثبت شده در بانک ژن به شماره:

Ag85B: TB10.4 :ACCESSION: P0A568 و
ACCESSION: AY207396.1 صد در صد همولوژی دارد.

تشکر و قدردانی

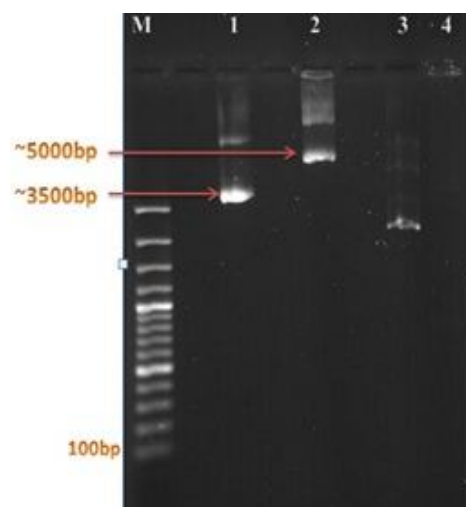
بدین وسیله از تمامی کارکنان موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی که در اجرای این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر را دارم.



شکل (۲): تلفیق دو قطعه Ag85B-TB10.4

M: مارکر وزن مولکولی 1Kb، ستون ۱: باند 1269bp مربوط به فیوژن دو قطعه، ستون ۲: کنترل منفی کلونینگ:

پس از خالص سازی محصول PCR، هضم آنزیمی توسط آنزیم های EcoRI و HindIII بر روی وکتور pcDNA3 و قطعه مورد نظر به طور جداگانه صورت پذیرفت و لایگیشن انجام شد. با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و مقایسه وزن مولکولی وکتور نرمال و نو ترکیب (وکتور حاوی قطعه مورد نظر دارای وزن مولکولی بیشتر از وکتور بدون قطعه می باشد)، صحت کلونینگ تأیید گردید (شکل ۳). پس از ترنسفورماسیون و استخراج پلاسمید از کلنی های رشد یافته بر روی محیط LB Agar حاوی آمپی سیلین، الکتروفورز انجام پذیرفت و کلنی های حاوی وکتور نو ترکیب شناسایی گردید.



شکل (۳): الکتروفورز وکتور نرمال و نو ترکیب

بحث و نتیجه‌گیری

شیوع بالای سل در جهان و تأثیر پایین واکسن ب.ت.ژ باعث شده است پژوهشگران برای واکسنی مؤثرتر یا درمان مناسب بیماری سل به جستجو بپردازند (۱۳،۱۴). اخیراً گزارش شده است که استفاده از پروتئین تقویت کننده ایمنی برای واکسن DNA یا ب.ت.ژ نو ترکیب می‌تواند به‌طور قابل ملاحظه‌ای سیستم ایمنی را تحریک نموده و سبب القاء پاسخ مناسب‌تر گردد. علاوه بر این برخی ترکیبات پروتئینی به تنهایی یا در ترکیب با پروتئین‌های دیگر یا ادجوانت‌های مختلف سبب ایجاد پاسخ ایمنی محافظتی می‌گردند. به همین منظور استفاده از آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به‌عنوان فاکتورهای ایمونوژنیک برای طراحی انواع واکسن‌های نو ترکیب و نوین ضروری به نظر می‌رسد (۱۷،۱۵).

بین آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه، کمپلکس آنتی‌ژن Ag85 جزء یکی از بیشترین موارد مورد تحقیق به‌منظور طراحی واکسن گزارش شده است. کمپلکس Ag85 نقش حیاتی در سنتز دیواره سلولی مایکوباکتریایی دارند. نتایج ایمنی‌زایی این کمپلکس در مدل حیوانی کوچک هندی نشان می‌دهد که این آنتی‌ژن‌ها می‌توانند به‌عنوان کاندید مؤثری در طراحی واکسن، تشخیص و درمان سل پیشنهاد گردند (۱۸،۱۹). هر دو آنتی‌ژن Ag85B و Ag85A قادر به القاء پاسخ ایمنی Th1 با بالا بردن تولید IL-2، TNF- α و IF- γ می‌باشند. در حالی که Ag85C آنقدر مؤثر نمی‌باشد (۱۸،۱۹). همچنین ارزش ایمنی حفاظتی پروتئین ۳۰ کیلودالتونی (Ag85B) در مدل حیوانی کوچک هندی مبتلا به سل ریوی شناخته شده است (۲۰).

TB10.4 برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط Skjot و همکارانش از فیلترای کشت شناسایی گردید (۸). این پروتئین

به‌طور قوی باعث القاء پاسخ Th1 در پی عفونت در هر دو مدل انسانی و حیوانی می‌گردد (۹،۲۱). استفاده از واکسن چند جزئی می‌تواند باعث تولید پاسخ ایمنی قوی و وسیع‌تری گردد (۲۲). در این تحقیق از ترکیب دو آنتی‌ژن به‌منظور طراحی واکسن DNA استفاده گردید. طی تحقیق انجام شده بر روی چندین نمونه توسط Jose Davila و همکاران نشان داده شد که در ژن کد کننده آنتی‌ژن TB10.4 هیچ پلی‌مورفیسمی مشاهده نگردید و در ژن کدکننده آنتی‌ژن Ag85B فقط یک مورد تغییر نوکلئوتیدی هم‌معنی مشاهده گردید و این نتایج پیشنهاد می‌دهد که در طراحی واکسن‌های مبتنی بر این دو آنتی‌ژن تنوع ژنتیکی غیرمحمول است (۲۳). همچنین تأثیر ایمنی‌زایی محافظتی ترکیب این دو آنتی‌ژن نیز در مدل حیوانی اثبات شده است (۲۴،۲۵). بنابراین می‌تواند کاندید مناسبی جهت طراحی واکسن باشد.

وکتور مورد استفاده پلاسمیدی است با وزن مولکولی ۴/۵ کیلوباز به نام pcDNA3 که یک وکتور بیانی یوکاریوتی می‌باشد و برای طراحی واکسن DNA مناسب می‌باشد. میزان مورد استفاده E.coli DH5 α می‌باشد که به‌منظور تکثیر پلاسمید نو ترکیب به کار گرفته شد. نتایج تعیین توالی نشان داد که کلونینگ با موفقیت انجام گردیده است و صد در صد هم‌مولوژی با توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی دارد. در تحقیقات بعدی می‌توان بیان ژن را رده سلولی بررسی نموده و در مرحله بعد ایمنی‌زایی در مدل حیوانی ارزیابی گردد. از این ترکیب می‌توان به‌عنوان تقویت کننده ایمنی پس از تزریق ب.ت.ژ استفاده کرد و یا همراه با پروتئین‌های نو ترکیب ایمونوژن در مدل حیوانی ایمنی‌زایی آن را ارزیابی نمود.

References:

1. Ingolotti M, Kawalekar O, Shedlock DJ, Muthumani, K, Weiner DB. DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Rev Vaccines* 2012; 9(7): 747-63.
2. Arnold C. Molecular evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:120-8.
3. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994; 271: 698-702.
4. Liu J. New vaccines against Tuberculosis: Current Developments and Future Challenges. *IOPscience* 2009; 17(2): 51-8.
5. Barker LF, Brennan MJ, Rosenstein PK, Sadoff JC. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 331-8.
6. Delogu G, Fadda G. The quest for a new vaccine against tuberculosis. *J Infect Developing Countries* 2009; 3(1): 5-15.
7. Kato Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, et al. Comparing

- genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 2001; 11: 547–54.
8. Skjot RLV, Oettinger T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S, et al. Comparative evaluation of low molecular mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T cell antigens, *Infect Immun* 2000; 68: 214-20.
 9. Skjot RLV, Brock I, Arend SM, Munk ME, Theisen M, Ottenhoff THM, et al. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9 which constitute a subfamily of the *esat6* gene family. *Infect Immun* 2002; 70: 5446-53.
 10. Anderson DH, Harth G, Horwitz MA, Eisenberg D. An interfacial mechanism and a class of inhibitors inferred from two crystal structures of the *Mycobacterium tuberculosis* 30 kDa major secretory protein (Antigen 85B), a mycolyl transferase. *J Mol Biol* 2001; 307 (2): 671-68.
 11. Boesen H, Jensen BN, Wilcke T, Andersen P. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63(4):1491–7.
 12. Mehra V, Gong JH, Iyer D, Lin Y, Boylen CT, Bloom BR, et al. Immune response to recombinant mycobacterial proteins in patients with tuberculosis infection and disease. *J Infect Dis* 1996;174(2):431–4.
 13. Jassal MS, Bishai WR. Epidemiology and challenges to the elimination of global tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 156- 64.
 14. Mori T, Leung CC. Tuberculosis in the global aging population. *Infect Dis Clin North Am* 2010; 24 (3): 751-68.
 15. Brooks JV, Frank AA, Keen MA, Bellisle JT, Orme IM. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun* 2001; 69 (4): 2714-7.
 16. Lu J, Wang C, Zhou Z, Zhang Y, Cao T, Shi C, et al. Immunogenicity and protective efficacy against murine tuberculosis of a prime-boost regimen with BCG and a DNA vaccine expressing ESAT-6 and Ag85A fusion protein. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:617892.
 17. Dietrich J, Aagaard C, Leah R, Olsen AW, Stryhn A, Doherty M, et al. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: Efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol* 2005; 174: 6332- 9.
 18. Harth G, Lee BY, Wang J, Clemens DL, Horwitz MA. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996;64(8):3038–47.
 19. Dsouza S, Rosseels V, Romano M, Tanghe A, Denis O, Jurion F, et al. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003; 71: 483-93.
 20. Horwitz MA, Lee BW, Dillon BJ, Harth G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(5):1530-4.
 21. Majlessi L, Rojas MJ, Priscille B, Leclerc C. CD8+ T-cell responses of mycobacterium infected mice to a newly identified major histocompatibility complex class I -restricted epitope shared by proteins of the ESAT-6 family *Infect Immun* 2003; 71: 7173-7.
 22. Martín Montañés C, Gicquel B. New tuberculosis vaccines. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29 Suppl 1:57–62.
 23. Davila J, Zhang L, Marrs CF, Durmaz R, Yang Z. Assessment of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* *esxA*, *esxH*, and *fbpB* genes among clinical isolates and its implication for the future immunization by new

- tuberculosis subunit vaccines Ag85B-ESAT-6 and Ag85B-TB10.4. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:208371.
24. Olsen AW, Williams A, Okkels LM, Hatch G, Andersen P. Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model. *Infection and Immunity* 2004; 72(10): 6148-50.
25. Langermans JAM, Doherty TM, Vervenne RAW, et al. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* 2005; 23(21): 2740-50.

DESIGN AND CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMID CONTAINING FUSION AG85B AND TB10.4 GENES OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Roghayeh Samanipour¹, Majid Tebianian^{*2}, Nader Mosavari³, Salman Ahmady Asbchin⁴, Morteza Taghizadeh⁵, Kiomars Soleimani⁶

Received: 12 Jul, 2015; Accepted: 13 Sep, 2015

Abstract

Background & Aims: Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), remain as a leading causes of mortality among infectious diseases. The only current vaccine, bacillus Calmette-Gue´rin (BCG), displays highly variable efficiency for preventing tuberculosis. Thus, identification of protective antigens could be mentioned for designing new vaccines. Among different Mtb antigens, TB10.4 and Ag85B have been identified as immune stimulator antigens which induce strong cellular responses and increase production of IFN- γ . In this study, we aimed to clone the fusion form of these antigens into a eukaryotic vector (pcDNA3).

Materials & Methods: After extraction of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv genome, the selected genes were amplified by specific primers with PCR method. The gene segments were fused and cloned into eukaryotic pcDNA3 vector. Recombinant plasmid was transformed into *E.coli* DH5 α and after purification was confirmed with restriction enzyme analysis and sequencing.

Results: The results of sequencing and digestion demonstrated that TB10.4 & Ag85B genes were successfully fused and cloned into pcDNA3 vector

Conclusion: The recombinant plasmid was successfully constructed. In the future studies, the immunogenicity of this cassette could be assessed as a DNA vaccine.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, TB 10.4, Ag 85B, Fusion Gene

Address: Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran, Tel: +98 2634552005-8

Email: m.tebianian@rvsri.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2015; 26(7): 616 ISSN: 1027-3727

¹ Master in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Ilam, Ilam, Iran

² Ph.D in Immunology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran (Corresponding Author)

³ Ph.D of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

⁴ Ph.D of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Ilam, Ilam, Iran

⁵ Ph.D of Virology, Razi Vaccine & Serum Research Institute Karaj, Iran

⁶ DVM, Razi Vaccine & Serum Research Institute Karaj, Iran