مجله علوم آزمایشگاهی، دوره هشتم(شماره ۳)پاییز ۹۳

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

طراحی، بهینه سازی و ساخت سازه ژنی کدکننده پروتئین اصلی میلین متصل به قسمت ایمونوژن توکسین کلرا

نادر هاشمی
دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

یعقوب یزدانی
استادیار ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: یعقوب یزدانی

پست‌الکترونیک:yaghobyazdani59@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۲۵۷۵۷۲۹۲

آدرس: دانشکده فن آوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

دریافت:۹۳/۲/۳۱
ویرایش پایانی:۹۳/٤/٦
پذیرش:۹۳/٤/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: *مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری خودایمن التهابی مزمن است. تزریق مخاطی پروتئین اصلی میلین متصل به قسمت ایمونوژن توکسین کلرا می تواند شدت پاسخ ایمنی در بیماران مالتیپل اسکلروزیس را کاهش دهد. برای تولید این پروتئین نوترکیب در مقیاس انبوه، انتخاب میزبان بیانی مناسب، نوع ترکیب بندی شاخص های پروتئینی، ساختار فضایی دو پروتئین در حالت متصل شده، بهینه کردن توالی نوکلئوتیدی از لحاظ سازگار بودن کدون های خوانش(CAI) و محتوای GC، بسیار حائز اهمیت می باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه با استفاده از نرم افزارهای DNA2، PSIPRED و ProtParam بهترین حالت ممکن برای تولید پروتئین نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه براین، خوانش صحیح پروتئین اصلی میلین متصل به قسمت ایمونوژن توکسین کلرا نیز مورد توجه قرار گرفت. پس از حصول اطمینان ازکارآمدی قطعه کدکننده به روش نرم افزاری، قطعه کدکننده برای سنتز سفارش داده شد .به منظور ارزیابی قطعه طراحی شده آزمون تکثیرژنی با استفاده از پرایمرهای T7 انجام گرفت. درنهایت قطعه طراحی شده درمحل کلونینگ وکتور بیانی pET28 جای گرفت.*

یافته ها : *بعداز بهینه سازی قطعه کدکننده مهندسی شده، میزان CAI از ۶۴ درصد به ۸۰درصد و محتوای GC از ۴۱درصد به ۴۹ درصد ارتقا پیدا کرد. حضور باند حدود 700bp در الگوی الکتروفورز حاصل از بررسی وکتور نو ترکیب ساخته شده به روش تکثیرژنی، نشان دهنده کلونینگ صحیح قطعه مورد نظر درمحل کلونینگ وکتور بیانی pET28 می باشد.*

نتیجه گیری: *مطالعات نرم افزاری و آزمایشگاهی نشان می دهد قطعه طراحی شده احتمالا در بهترین حالت ممکن قادر به کدکردن پروتئین نوترکیب مربوطه است.*

واژه های کلیدی: *مالتیپل اسکلروزیس، توکسین کلرا، پروتئین اصلی میلین*

آدرس مقاله:
هاشمی ن، یزدانی ی" طراحی، بهینه سازی و ساخت سازه ژنی کدکننده پروتئین اصلی میلین متصل به قسمت ایمونوژن توکسین کلرا" مجله علوم آزمایشگاهی، پاییز ۱۳۹۳، دوره هشتم(شماره۳):۸-۱۴

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس یکی از بیماری های خودایمنی التهابی مزمن مربوط به سیستم ایمنی است که در آن غشای میلین سطح سلول های عصبی دچار تخریب می شود(۱). یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده این بیماری آسیب پروتئین اصلی میلین (MBP) می باشد. در این پروتئین اسید آمینه های ۸۳ تا ۹۹ قسمت ایمونوژنیک شناخته شده است که لنفوسیت هایT و B به آن قسمت متصل شده و باعث القای واکنش های خودایمنی می شوند(۳). تاکنون درمان قطعی برای بیماری مالتیپل اسکلروزیس شناخته نشده و بیشتر درمان های حاضر که به تایید FDA رسیده اند به صورت علائم درمانی و با سرکوب سیستم ایمنی باعث بهبودکیفیت زندگی بیماران می شود. سرکوب سیستم ایمنی معایب عمده ایی چون کاهش توانایی سیستم ایمنی در مقابله با دیگر بیماری ها و عفونت ها را به دنبال دارد(۴). یکی از جنبه های بسیار نوین در کنترل این بیماری ایجاد حالت بی پاسخی یا تحمل نسبت به عامل ایجاد کننده این بیماری یا همان آنتی ژن MBP می باشد. از مزیت های مهم این روش درمانی نسبت به روش های علائم درمانی، اختصاصی بودن و حالت پیشگرانه این نوع درمان است که معایب داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی را ندارد(۵). برای القای بی پاسخی افزایش سلول های تنظیم گر و کاهش فعالیت سلول های Th1 و میزان آنتی بادی های خودی از جمله مهمترین رویکردها می باشد. از جنبه های دیگر، منحرف کردن پاسخ ایمنی به سمت سلول های Th2 می باشد. این سلول ها باترشح سایتوکاین های TGF-B، IL-4 وIL10 باعث کاهش پاسخ سلول های مخرب Th1 و سلول های سیتوتوکسیک می شود(۶،۷). قسمت B توکسین کلرا یکی از بهترین آنتی ژن های تعدیل کننده پاسخ ایمنی به سمت سلول های Th2می باشد. توکسین کلرا از باکتری ویبریو کلرا ترشح می شود این توکسین دارای دو زیر واحد A و B می باشد. قسمت A زیر واحد عملکردی و مسمومیت زا و B که به صورت پنتامر است به عنوان زیرواحد غیر توکسیک شناخته می شود. هر زیر واحد از قسمت B توکسین کلرا دارای ۱۲۴ اسید آمینه می باشد. مشاهده گردیده هنگامی که این پروتئین با آنتی ژن های دیگر کونژوگه شود و به صورت خوراکی به حیوانات تزریق شود باعث ایجاد تحمل نسبت به آن آنتی ژن می گردد(۸). یکی از رویکردهای مطرح شده برای اتصال پروتئین ها در پروتئین نوترکیب، بهره گیری ازروش های شیمیایی می باشد. اتصال شیمیایی پروتئین ها معایبی چون امکان به وجود آمدن حالت آنتی ژنیک در پروتئین و ناپایدار بودن اتصال را به همراه دارد(۹). برای غلبه بر این مشکلات می توان این دو پروتئین را به صورت پروتئین نوترکیب تولید کرد. این کار با اتصال قطعات ژنی این دو ژن و تولید پروتئین در میزبان مناسب انجام می گیرد. برای تولید پروتئین در مقیاس انبوه می توان از باکتری ها استفاده کرد. برای اینکار توالی ژنی پروتئین نوترکیب بایستی برای بیان در میزبان بهینه گردد(۱۰). یکی از بهترین باکتری های مهندسی شده باکتریE.coli BL21(DE3) است که با حامل های بیانی pET سازگاری دارد. در این مطالعه با بررسی نرم افزاری و در نظر گرفتن متغیر هایCAI(Codon Adaptation Index)، محتویGC و انتخاب اتصال دهنده، قطعه کدکننده ای طراحی شد که در الگوی خوانش مناسب می تواند شاخص های اپی توپی مورد نظر را برای تغییر پاسخ ایمنی به سمت پاسخ تنظیمی فراهم نماید.

روش بررسی

در ابتدا توالی اسیدآمینه ای پروتئین اصلی میلین و قسمت بتا توکسین کلرا از سایت NCBI و UNIPROT اخذ شد. سپس قسمت ایمونوژنیک پروتئین اصلی میلین که توسط لنفوسیت های B و T مورد تهاجم قرار می گرفت مشخص گردید. در طراحی صورت پذیرفته قطعه کدکننده مربوط به توالی راهنمای توکسین کلرا از توالی مورد نظر حذف شد. به منظور حفظ ساختار فضایی شاخص‌ها از اتصال‌دهنده های سخت که ساختار

آلفاهلیکس تشکیل می دهد استفاده گردید (AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK). به منظور تخلیص پروتئین بر پایه ستون کروماتوگرافی جذبی(ستون نیکل) ۶ عدد توالی هیستیدین در قسمت N ترمینال اضافه گردید. بعد از توالی های هیستیدین توالی مربوط به جایگاه برش آنزیم انتروکیناز قرارگرفت. برای برش توالی نوکلئوتیدی هنگام قراردادن در حامل، آنزیم های محدود کننده Nco1 در قسمت N ترمینال و Xho1 در انتهای C ترمینال اضافه شد. با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیکی DNA2بهینه کردن توالی نوکلئوتیدی صورت گرفت. برای این کار کدون هایی را که در باکتری مورد نظر بیشتر مورد استفاده قرار می گرفت انتخاب شد همچنین توالی های تکراری GC نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و جایگاه های برش آنزیمی در توالی نیز بررسی شد. نرم افزارpsipred برای پیش بینی ساختار ثانویه پروتئین و نرم افزار ProtParam برای تعیین میزان پایداری پروتئین نوترکیب استفاده شد. سنتز ژن بهینه شده، توسط شرکت ShineGene چین انجام گردید. قطعه سنتز شده دارای طولی به اندازه ۴۹۸جفت باز بود. این ژن به صورت کلون شده در وکتور pUC57 دریافت شد. پس از دریافت حامل سفارش داده شده، طی فرآیند شوک حرارتی(Heat shock transformation) حامل به درون باکتری مستعد XL1blueمنتقل گردید. با توجه به حضور ژن مقاومت به آمپی سیلین در حامل مورد نظر و حضور آمپی سیلین در محیط کشت رشد باکتری، کلونی هایی که به طرز صحیح انتقال شده بود انتخاب گردید. سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید(شرکت کیاژن)، پلاسمیدهای تکثیر یافته استخراج شدند. پس از اطمینان از کیفیت مناسب پلاسمید استخراج شده، واکنش هضم آنزیمی با آنزیم هایNcoI و XhoI (شرکتvivantis) بر روی پلاسمیدها انجام شد. پس از برش قطعه طراحی شده، پلاسمید pET28 نیز با استفاده از آنزیم های اشاره شده به صورت خطی درآمد. سپس قطعه برش خورده شده و حامل خطی شده بر روی ژل آگارز یک درصد جداسازی شد. در پایان قطعه ژنی و حامل خطی شده با استفاده از کیت شرکت کیاژن از روی ژل آگاروز یک درصد تخلیص گردید. سپس اتصال قطعه طراحی شده به درون جایگاه کلونینگ حاملpET28 انجام گرفت. جهت انتقال محصول اتصال pET28a به درون سلول های صلاحیت دارEcoliBL21 از روش شوک حرارتی استفاده شد. باکتری های انتقال شده بر روی پلیت LB حاوی کانامایسین کشت داده شدند (پلاسمید pET28a دارای ژن مقاومت به کانامایسین است). برای انجام واکنش تکثیرژنی، حامل نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید از باکتری های‌انتقال شده جدا شد. این حامل ها به عنوان الگوی ژنی در واکنش تکثیر ژنی مورد استفاده قرار گرفت. واکنش تکثیر تحت شرایط دمایی: واسرشتی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد برای یک دور، و به تعداد ۳۰ دور به مدت۵۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه در۴۶ درجه سانتیگراد، ۶۰ ثانیه در ۷۲درجه سانتیگراد و در پایان ۵ دقیقه در ۷۲ درجه به عنوان گسترش نهایی قرارگرفت. جهت انجام‌واکنش‌تکثیرژنی، از پرایمرهای T_7 استفاده شد.

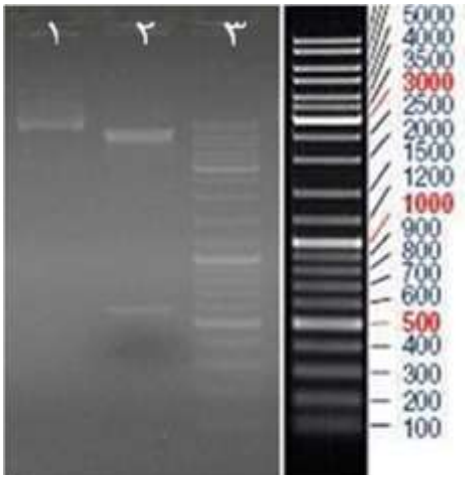
یافته ها

نتایج نشان دهنده حضور همه قطعات ژنی لازم در الگوی خوانش صحیح در میزبان باکتریایی می باشد(جدول۱). پس از طراحی و دریافت حامل نوترکیب PUC57، حامل های نوترکیب به درون باکتری های صلاحیت دارXL1blue انتقال داده شدند. باکتری های انتقال شده روی محیط آگار حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. کلنی های سفید حاصل از باکتری های انتقال شده و مقاوم به آمپی سیلین احتمالاً قطعه ژنی را به عنوان یک ژن خارجی پذیرفته اند. بررسی حامل نوترکیب با استفاده از آنزیم های محدودالاثر NcoI و XhoI و حضور باند حدود ۵۰۰ جفت بازی تایید کننده حضور قطعه ژنی طراحی شده است(شکل۱). پس از برش آنزیمی و استخراج توالی ژنی مورد نظر از ژل، ساب کلونینگ قطعه طراحی شده به درون حامل pET28 صورت گرفت. سپس باکتری های انتقال شده با حامل نوترکیب روی پلیت آگار

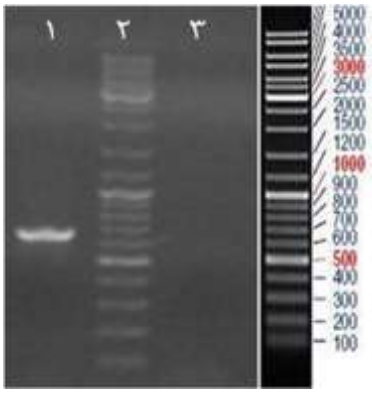
حاوی کانامیسین کشت داده شدند. پلاسمیدحاصل ازکلنی های رشدیافته با استفاده از روش تکثیر ژنی و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. حضور باند ۷۰۰ جفت بازی در الگوی الکتروفورز نشان دهنده فرآیند صحیح ساب کلونینگ می باشد(شکل۲).

جدول۱-توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ایی کامل فیوژن پروتئین طراحی شده

	توالی نوکلئوتیدی قبل از بهینه کردن	توالی نوکلئوتیدی بعد از بهینه کردن	توالی اسید امینه
انزیم محدودالاثر NCO1	5’---C CATGG---3’ 3’---GGTAC C---5’	5’---C CATGG---3’ 3’---GGTAC C---5’	M
توالی هیستیدین	CACCATCATCACCACCAC	CACCATCATCACCACCAC	HHHHHH
جایگاه برش انزیم انتروکیناز	GACGACGACGACAAA	GACGACGACGACAAA	DDDDK
قسمت ایمونوژن توکسین کلرا (CTXB)	ACCCCGCAGAACATCACCGACCTGTGCG CTGAATACCACAACACCCAGATATACACC CTGAACGACAAAATCTTCTCTTACACCGA ATCTCTGGCTGGTAAACGTGAAATGGCT ATCATCACCTTCAAAAACGGTGCTATCTT CCAGGTTGAAGTTCCGGGTTCTCAGCAC ATCGACTCTCAGAAAAAAGCTATCGAAG TATGAAAGACACCCTGCGTATCGCTTACC TGACCGAAGCTAAGTTGAAAAACTGTGC GTTTGGAACAACAAAACCCCGCACGCTA TCGCTGCTATCTCTATGGCTAAC	ACCCCGCAGAACATCACCGACCTGTGCG CTGAATACCACAACACCCAGATATACACC CTGAACGACAAAATCTTCTCTTACACCGA ATCTCTGGCTGGTAAACGTGAAATGGCTA TCATCACCTTCAAAAACGGTGCTATCTTCC AGGTTGAAGTTCCGGGTTCTCAGCACATC GACTCTCAGAAAAAAGCTATCGAACGTAT GAAAGACACCCTGCGTATCGCTTACCTGA CCGAAGCTAAAGTTGAAAAACTGTGCGTT TGGAACAACAAAACCCCGCACGCTATCGC TGCTATCTCTATGGCTAAC	TPQNITDLCAEYHNTQI YTLNDKIFSYTESLAGK RE MAIITFKNGAIFQVEVP GS QHIDSQKKAIERMKDTL RI AYLTEAKVEKLCVWNN KTPHAIAAISMAN
لینکر	GCTGAGGCTGCCGCTAAGGAAGCAGCA GCAAAGGAAGCGGCGGCTAAAGAAGCT GCTGCTAAAGCT	GCTGAGGCTGCCGCTAAGGAAGCAGCAG CAAAGGAAGCGGCGGCTAAAGAAGCTGC TGCTAAAGCT	AEAAAKEAAA KEAAAKEAAAKA
پروتئین اصلی میلین (MBP)	GAAAACCCGGTTGTTCACTTCTTCAAAAA CATCGTTACCCCGCGTACCCCG	GAAAACCCGGTTGTTCACTTCTTCAAAAACA TC GTTACCCCGCGTACCCCG	ENPVVHFFKNIVTPRTP
کدون پایان	TAATGA	TAATGA	
انزیم محدودالاثر XHO1	5’---C TCGAG---3’ 3’---GAGCT C---5’	5’---C TCGAG---3’ 3’---GAGCT C---5’	LE



شکل ۱-هضم آنزیمی پلاسمید PET28 با آنزیم هایNcoI وXhoI بر روی ژل آگاروز ۱ درصد
۱) پلاسمید هضم نشده ۲) پلاسمید برش خورده ۳) مارکر DNA



شکل ۲-بررسی صحت درج سکانس ژن توسط پرایمرهای T7و به روشPCR. ۱) باند۷۰۰ جفت بازی نشان دهنده حضورقطعه کدکننده است. ۲) مارکر DNA. ۳) کنترل منفی

بحث

ترکیب قسمت بتا توکسین کلرا و پروتئین اصلی میلین می تواند برای جلوگیری از پاسخ بیش از حد خود ایمنی در بیماران مالتیپل اسکلروزیس مورد استفاده قرار گیرد. برای تولید پروتئین در مقیاس انبوه نیاز به یک میزبان مناسب می باشد. باکتری BL21 یکی ازجدایه های مهندسی شده برای تولید پروتئین نوترکیب می باشد. پروتئازهای این باکتری جهش یافته شده و در نتیجه آسیبی به پروتئین تولید شده نخواهد داشت. این جدایه با حامل های PETسازگاری دارد. یکی ازانواع این حامل ها PET28a می باشد که دارای ژن مقاومت به کانامایسین برای غربالگری آسان، پروموترT7 برای تولید انبوه پروتئین و His tag درانتهای C و N ترمینال برای خالص سازی آسان می باشد. حامل PET28a به علت نداشتن tag های ترشحی پروتئین نوترکیب را به صورت انکلوزیون بادی تولید می نماید(۱۱). مطالعات قبلی نشان می دهد که اضافه کردن پپتید به انتهای آمینی قسمت بتا توکسین کلرا می تواند باعث تغییر ساختار و عملکرد آن گردد(۱۲). بنابراین توالی مربوط به قسمت بتا توکسین کلرا در قسمت Nترمینال پروتئین نوترکیب قرار گرفت. همچنین برای خالص سازی بهتر از توالی ۶تایی هیستیدین در سمت N ترمینال استفاده شد. برای جداکردن توالی هیستیدین بعد از خالص سازی جایگاه برش آنزیم انتروکیناز قرار داده شد.این آنزیم بسیار اختصاصی عمل می کند و قدرت جدا کردن توالی هیستیدین را دارا می باشد. به منظور حفظ فاصله و عدم تداخل در عملکرد بین شاخص های پروتئین نوترکیب شده از اتصال دهنده های پپتیدی استفاده شد. محققان اتصال دهنده ها را به سه نوع تقسیم می کنند. اتصال دهنده های انعطاف پذیر(flexible)، سفت (rigid) و اتصال دهنده های قابل شکست (cleavable). اتصال دهنده های انعطاف پذیر زمانی که شاخص های پروتئینی بخواهند با همدیگر تداخل و اینتراکشن داشته باشند کاربرد دارد. این اتصال دهنده زمانی که در پروتئین ها ی نوترکیب استفاده بشود ممکن است باعث تداخل شاخص ها با هم و در نتیجه عدم شناسایی اپی توپ های شاخص ها توسط آنتی بادی ها شود. اتصال دهنده های قابل شکست نیز در محیط in vivo باعث جدایی شاخص ها از همدیگر می شود. حفظ فاصله بین دو پروتئین برای عدم تداخل در روند شناسایی با سلول های ایمنی لازم است. اتصال دهنده های پپتیدی سخت (rigid) ساختار آلفاهلیکس تشکیل می دهند و به خوبی باعث حفظ فاصله شاخص ها در پروتئین نوترکیب می شود(۱۳). با استفاده از نرم افزار psipred صحت تشکیل ساختار آلفا هلیکس این اتصال دهنده تایید شد. توالی نوکلئوتیدی مربوط به پروتئین نوترکیب با نرم افزارDNA2 بهینه گردید. با استفاده از این نرم افزار سازگاری کدون های خوانش(CAI) و محتوای GC مربوط به قطعه کدکننده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج CAI هر چقدر به ۱۰۰درصد نزدیک باشد برای بیان در میزبان مناسب تر است. مورد دوم محتوای GC توالی است. هر چقدر درصد

GC بالا باشد به انرژی بیشتری برای بازکردن دو رشته DNA از هم نیاز است(۱۴). بنابراین بهتر است مقدارGC زیر۷۰ درصد باشد. قبل از بهینه کردن میزان CAI توالی نوترکیب در حالت طبیعی ژن، ۶۴ درصد بود که بعد از بهینه کردن به میزان بسیار مناسب ۸۰ درصد بهبود پیدا کرد و مقدار GC از ۴۲ درصد به ۴۹ درصد افزایش یافت. نرم افزارProtParam برای تعیین پایداری پروتئین استفاده شد. پارامتر Instability Index(II) برای قطعه طراحی شده مقدار عددی ۳۲ را نشان می دهد که این میزان برای پایداری قطعه طراحی شده مناسب است(۱).

نتیجه گیری

برپایه بررسی منابع علمی موجود، این مطالعه نخستین گزارش درخصوص طراحی، بهینه سازی و ساخت حامل نوترکیب دارای قطعات کد کننده مربوط به پروتئین اصلی میلین ترکیب شده با قسمت بتا توکسین کلرا می باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از محل حمایت مالی صورت گرفته توسط دانشگاه علوم پزشکی گلستان به شماره نامه ۳۵/۱۷۹۰ صورت پذیرفته است. همچنین از زحمات همکاران عزیز سرکار خانم دکتر آیلر جمالی، خانم ساره ژند و آقای اسماعیل صمدیان که در انجام کار، کمک شایانی نمودند تشکر و قدردانی می نماییم.

References

1. Goldenberg MM. *Multiple sclerosis review*. Pharmacy and Therapeutics. 2012; 37(3): 175-184.

2. Flachenecker P. *Epidemiology of neuroimmunological diseases*. Journal of neurology. 2006; 253(Suppl 5): v2-v8.

3. Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, et al. *Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83–99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand*. Nature medicine. 2000; 6(10): 1167-75.

4. Loma I, Heyman R. *Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment.* Current neuropharmacology. 2011; 9(3): 409-416.

5. Turley DM, Miller SD. *Prospects for antigen-specific tolerance based therapies for the treatment of multiple sclerosis.* Results Probl Cell Differ. 2010; 51: 217-35.

6. Holmøy T. *Immunopathogenesis of multiple sclerosis: concepts and controversies*. Acta neurologica scandinavica. 2007; 115(s187): 39-45.

7. Weiner HL. *The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease?* Annals of neurology. 2009; 65(3): 239-48.

8. Olivera N, Cédola M, Gómez RM. *The Cholera Toxin as a Biotechnological Tool.* 2012; DOI: 10.5772/36708.

9. Frankel AE. *Immunotoxins*. Springer. 1988.

10. Sørensen HP,Mortensen KK. *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli.* Journal of biotechnology. 2005; 115(2): 113-28.

11. Marisch K, Bayer K, Cserjan-Puschmann M, Luchner M, Striedner G. *Evaluation of three industrial Escherichia coli strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production*. Microbial cell factories. 2013; 12(1): 58.

12. Dertzbaugh M, Elson C. *Reduction in oral immunogenicity of cholera toxin B subunit by N-terminal peptide addition*. Infection and immunity. 1993; 61(2): 384-90.

13. Chen X, Zaro JL, Shen W-C. *Fusion protein linkers: Property, design and functionality.* Advanced drug delivery reviews. 2013; 65(10): 1357-69.

14. Welch M, Govindarajan S, Ness JE, Villalobos A, Gurney A, Minshull J, et al. *Design parameters to control synthetic gene expression in Escherichia coli*. PloS one. 2009; 4(9): e7002.

15. Guruprasad K, Reddy BB, Pandit MW. *Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence.* Protein Engineering. 1990; 4(2): 155-61.

Original Article

Designing, Optimization and Construction of Myelin Basic Protein Coding Sequence Binding to the Immunogenic Subunit of Cholera Toxin

Hashemi, N. (BSc)
MSc Student of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran

Yazdani, Y. (PhD)
Assistant Professor of Immunology, Infectious Diseases Research Center and Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Corresponding Author: Yazdani, Y.

Email: yaghobyazdani59@yahoo.com

Received: 21 May 2014
Revised: 27 Jun 2014
Accepted: 1 Jul 2014

Abstract

Background and Objectives: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease. Mucosal feeding of myelin basic protein binding to the cholera toxin B subunit can reduce the intensity of the immune response in MS patients. Expression system, the domain composition of the fusion protein, accessibility of two domains, codon adaptation index (CAI) and GC contents are very important for the large scale production of fusion protein.

Material and Methods: we used DNA2, PSIPRED and ProtParam softwares for designing the best form to produce fusion protein. Moreover, the correct open reading frame of myelin basic protein was also considered. First the coding sequence was verified and then synthesized. For confirmation of the recombinant vector, PCR test was carried out using T7 primers. Finally it was inserted into the cloning site of pET28 expression vector.

Results: After coding optimization, the CAI rate was increased from 64 % to 80% and GC content from 41 % to 49%. The presence of a band near 700bp resulted from PCR amplification test demonstrates the correct cloning of recombinant vectors in the cloning site of pET28 expression vector.

Conclusion: According to software and experimental analysis, the designed sequence probably in the best form could be used for production of recombinant protein.

Keywords: Multiple Sclerosis, Cholera Toxin, Myelin Basic Protein

This paper should be cited as: Hashemi N, Yazdani Y. [Designing, Optimization and Construction of Myelin Basic Protein Coding Sequence Binding to the Immunogenic Subunit of Cholera Toxin]. MLJ. 2014; 8(3):8-14 [Article in Persian]