نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دوره ۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۵، صفحات ۳۰- ۴۸

همسانه‌سازی، بیان و تخلیص پروتئین ESAT۶- از سویه‌ی AN۵ *مایکوباکتریوم بوویس* و ارزیابی ایمنی‌زایی دو پروتئین نوترکیب ESAT۶- و CFP۱۰- در خوکچه‌ی هندی

رضا عارف پژوهی[۱]، تقی زهرائی صالحی*[۲]، نادر مصوری[۳]، زهرا صالحی نجف آبادی[۴]، رامک یحیی رعیت[۲]

۱. بخش تولید توبرکولین و مالئین، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
۲. عضو هیات علمی گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران
۳. بخش میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
۴. عضو هیات علمی بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج -ایران

* نویسنده مسئول: تقی زهرائی صالحی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: ir.ac.tsalehi@ut

دریافت مقاله: ۰۱ آذر ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۲۳ اردیبهشت ۱۴۰۵

10.22034/nfvm.2026.560371.1303

چکیده

مایکوباکتریوم بویس عامل مسبب سل گاوی است که در زمره بیماری‌های زئونوز بوده و می‌تواند تاثیرات مهمی از نظر اقتصادی و بهداشت عمومی در جهان داشته باشد. تشخیص این بیماری در گاو مبتنی بر استراتژی تست و کشتار است. از معایب این تست واکنش‌های متقاطع با سایر مایکوباکتریوم‌ها و ایجاد واکنش مثبت کاذب که جهت فائق آمدن بر آن استفاده از پروتئین‌هایی با ویژگی بالاتر توصیه می‌گردد. در این مطالعه ژن *esat۶-* با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. محصول PCR به‌دست آمده با دو آنزیم EcoRI و HindIII هضم مضاعف شده و در ناقل پلاسمیدی pET23a(+) کلون گردید و پس از ترانسفورماسیون در اشریشیاکلی α5 DH تکثیر شد. به‌منظور بیان از اشریشیاکلی BL ۲۱ استفاده گردید و صحت همسانه‌سازی ژن ذکر شده با روش تعیین توالی مورد تایید قرار گرفت. در ادامه‌ی تحقیق، پروتئین نوترکیب ESAT۶- طی عملیاتی با رزین نیکل تخلیص گردید و با روش وسترن بلاتینگ، بیان پادگنی پروتئین آن با استفاده از پادتن‌های تک‌بنیانی اختصاصی تائید شد. به‌منظور ارزیابی ایمنی، دو پپتید ESAT-۶ و CFP-۱۰ که قبلاً تهیه گردیده بود، در خوکچه‌های هندی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج ایمنی‌زایی در خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم بویس*، پوتنسی ESAT-۶ در مقایسه با توبرکولین گاوی را ۶ درصد و پوتنسی CFP-۱۰ در مقایسه با توبرکولین گاوی را ۶۱٪ نشان داد.

واژگان کلیدی: *مایکوباکتریوم بویس سویه‌ی AN۵، توبرکولین گاوی، ایمنی‌زایی پروتئین های ESAT-۶ و CFP-۱۰*

مقدمه

در جنس مایکوباکتریوم بیش از ۱۷۰ گونه‌ی شناخته شده وجود دارد که تعداد زیادی از این گونه‌ها در محیط پخش و پراکنده هستند ولی برخی از گونه‌های این جنس در انسان و حیوانات بیماری‌زا بوده و باعث بیماری‌های مزمن از جمله بیماری سل می‌گردند. دسته‌ای از این گونه‌های بیماری‌زا را که باعث بیماری سل در میزبانان مشخصی می‌شوند را اصطلاحاً مجموعه‌ی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*Mycobacterium tuberculosis* complex; MTBC) می‌نامند که شامل گونه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*M. tuberculosis*)، *مایکوباکتریوم بوویس* (*M. bovis*)، *مایکوباکتریوم کاپره* (*M. caprae*)، *مایکوباکتریوم آفریکانوم* (*M. africanum*)، *مایکوباکتریوم میکروتی* (*M. microti*)، *مایکوباکتریوم کنتی* (*M. canettii*) و *مایکوباکتریوم پینیپدی* (*M. pinipedii*) است (۱, ۲). از مهم‌ترین و شایع‌ترین گونه‌های این مجموعه، *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* عامل اصلی سل انسانی و *مایکوباکتریوم بوویس* عامل اصلی سل گاوی می‌باشد. *مایکوباکتریوم بوویس* علاوه‌بر گاو در طیف وسیعی از میزبان‌ها از جمله گوزن، اپاسوم، راکون و انسان نیز ایجاد بیماری می‌کند. *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* در گاوها به ندرت سل پیش‌رونده ایجاد می‌کند در حالی که گزارش‌های متعددی مبنی‌بر آلودگی انسان با *مایکوباکتریوم بوویس* وجود دارد(۳). *مایکوباکتریوم بوویس* از راه‌های مختلف به‌ویژه شیر گاوهای آلوده به انسان منتقل می‌شود و در انسان معمولا سل خارج ریوی ایجاد می‌کند. بنابراین کنترل و ریشه‌کنی سل گاوی به‌طور بالقوه ارتباط مستقیمی با بهبود وضعیت بهداشت جوامع انسانی دارد و از جمله زئونوزهای قابل توجه در فهرست بیماری‌های OIE می‌باشد(۴).

روش اولیه‌ی تشخیص سل گاوی آزمایش داخل جلدی مقایسه‌ای (Comparative Intradermal Tuberculin Skin Test) است که به‌طور گسترده به‌عنوان آزمون تشخیصی جهت شناسایی عفونت و آلودگی با *مایکوباکتریوم بوویس* در گاوها استفاده می‌شود. در این آزمون مشتق پروتئینی تخلیص شده یا همان PPD (Purified Protein Derivative) تهیه شده از *مایکوباکتریوم بوویس* و *مایکوباکتریوم آویوم* از راه داخل جلدی در ناحیه‌ی گردن گاوها به فاصله‌ی معینی از هم تزریق می‌شود و پس از ۷۲ ساعت واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری در محل‌های تزریق PPD پستانداری و مرغی مورد سنجش، مقایسه و ارزیابی قرار می‌گیرد. این آزمون که نمودی از نوع چهارم واکنش‌های ازدیاد حساسیت (Hypersensivity type IV) است، به واسطه‌ی فعالیت یاخته‌های T حساس شده رخ می‌دهد. بدین ترتیب که به‌دنبال تزریق داخل جلدی PPD به گاو آلوده، واکنش التهابی موضعی ناشی از شناسایی پپتیدهای مایکوباکتریوم توسط یاخته‌های T حساس ظرف ۴۸ ساعت پس از تزریق شکل می‌گیرد(۵, ۶).

یکی از مهم‌ترین معضلات فعلی در گاوداری‌ها در ارتباط با بیماری سل، آلودگی همزمان گاوها با چندین گونه‌ی مایکوباکتریوم می‌باشد، به نحوی که در بسیاری از مواقع گله‌ها به شکل توأمان با عامل بیماری یون (*مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه‌ی پاراتوبرکلوزیس*)، مایکوباکتریوم‌های محیطی و *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس* درگیر هستند که منجر به مداخله در تفسیر آزمایش می‌گردد و از اشکالات عمده در شناسایی دام‌های آلوده در گله به‌شمار می‌رود. از جمله پادگن‌های مشترک بین مایکوباکتریوم‌ها که باعث واکنش متقاطع در آزمون توبرکولین می‌گردد می‌توان به ترکیبات مختلف و متنوع پیکر *مایکوباکتریوم بوویس* از جمله کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها اشاره نمود که همگی می‌توانند نقش بسزائی در کاهش ویژگی آزمون داشته باشند. در نهایت این موضوع باعث ایجاد موارد توبرکولین مثبت فاقد ضایعه‌ی کشتارگاهی (Non visible lesion; NVL) در دام‌ها می‌شود که باعث خسارت اقتصادی به دامداران به‌خصوص در مناطقی که بروز بیماری نسبتاً پائین است می‌گردد(۷, ۸, ۹).

در مرحله‌ی اول فرآیند تولید PPD غیرفعال سازی

باکتری با حرارت صورت می‌گیرد و در مراحل بعد، از مواد شیمیایی مختلف نظیر اسید تری‌کلرواستیک (TCA) جهت ترسیب، تغلیظ و تخلیص پروتئین‌های محلول استفاده می‌شود. از این‌رو در طی مراحل تولید PPD برخی از پادگن‌هایی که نقش بسیار مهمی در تشخیص آلودگی گاوها با مایکوباکتریوم‌ها با آزمون توبرکولین دارند، از جمله تعدادی از پروتئین‌های ترشحی تخریب و یا دچار تغییر در ساختار فضایی می‌گردند(۱۰,۱۱ , ۱۲).

دو پروتئین کوچک ایمنی‌زا ۶ کیلو دالتونی ESAT-۶ (KDa Early Secretory Antigenic Target6) و ۱۰ کیلو دالتونی CFP(۱۰-10 KDa Culture Filtrate Protein) با ویژگی نسخه‌برداری همگام و بیان همزمان در *مایکوباکتریوم بوویس* هستند که به‌عنوان عامل حدت و پادگن محافظت‌کننده اهمیت دارند. پروتئین‌های ESAT۶- و CFP۱۰- در مراحل اولیه‌ی عفونت با این باکتری بیان و تولید می شوند و جهت ادامه‌ی بقاء باکتری و انتشار آن در بدن ضروری‌اند(۱۳, ۱۴). نشان داده شده است که تزریق داخل جلدی PPD پاسخ ایمنی هومورال و یاخته‌ای را علیه پروتئین ESAT۶- در گاوهای آلوده تقویت می‌کند. این دو پروتئین به‌عنوان پادگن‌های مناسب در اهداف تشخیصی نوین به‌شمار آمده و به‌طور مجزا توسط مناطق ژنی (6ESAT-*esxA*) و (CFP10 *esxB*) رمز می‌شوند و به‌دنبال هم در ناحیه‌ی تمایزی ۱ RD (Region of Differentiation) ژنوم *مایکوباکتریوم بوویس* قرار دارند. سویه‌ی *مایکوباکتریوم بوویس* موجود در واکسن تخفیف حدت یافته‌ی BCG (Bacillus Calmette–Guérin) و اکثر مایکوباکتریوم‌های محیطی فاقد ناحیه‌ی ژنومی RD۱ بوده از اینرو از این دو پروتئین جهت تمایز گله آلوده با مایکوباکتریوم‌های محیطی نیز بکار می رود (۱۴و ۱۵). پروتئین ترشحی ESAT۶- که توسط ناحیه‌ی ژنی *Rv*۳۸۷۵ رمز می‌شود در عصاره صاف شده‌ی کشت مایکوباکتریوهای مجموعه‌ی مایکوباکتریوم *توبرکلوزیس*، *مایکوباکتریوم کانزاسی* (*M. kansasi*) و *مایکوباکتریوم مارینوم* (*M marinum*) نیز یافت شده‌است و پادگن قوی برای تحریک لنفوسیت T محسوب می‌شود که باعث آزادسازی مقادیر زیاد IFN-γ می‌گردد. محققان با بررسی اپی‌توپ‌های پروتئین ESAT۶- متوجه شدند که این پادگن واجد چندین اپی‌توپ لنفوسیت T در سرتاسر توالی آمینو اسیدی خود است که این اپی‌توپ‌ها توسط لنفوسیت‌های T ترشح کننده‌ی IFN قابل شناسایی هستند. این مطالعات در واقع پایه اصلی استفاده از ESAT-۶۶ به‌عنوان جزئی از واکسن‌های زیر واحدی (Subunit) سل را ایجاد نمود و از این رو محققین مختلف اقدام به استفاده و همسانه‌سازی و بیان این پروتئین به‌صورت تکی و یا فیوژن با پروتئین‌های دیگر نموده‌اند (۱۰,۱۲ , ۱۵).

با توجه به اهمیت بیماری سل گاوی در صنعت گاوداری کشور و همچنین در بهداشت عمومی به‌نظر می‌رسد، کنترل بیماری با ارائه‌ی روش‌های تشخیصی مطمئن‌تر با استفاده از پروتئین‌های با ویژگی بالا همانند پروتئین ESAT۶- می‌تواند در بهبود کارایی آزمون‌های تشخصی سل و در نهایت افزایش تشخیص درست و تمایز گاوهای آلوده به *مایکوباکتریوم بوویس* خواهد شد. در طی این تحقیق که در بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (کرج-ایران) انجام شد نیز ارزیابی روی دو پروتئین ESAT۶- و CFP۱۰- از طریق همسانه‌سازی و بیان ژن‌های *esat۶*- و ۱۰ *cfp*-*مایکوباکتریوم بوویس* سویه‌ی A۵ که سویه‌ی مناسب جهت تهیه‌ی PPD برای انجام تست توبرکولین است انجام گرفت که نتایج مربوط به پروتئین CFP۱۰- به غیر از قسمت ارزیابی ایمنی‌زایی آن قبلاً در سال ۱۴۰۰ طی مقاله‌ای در مجله‌ی تحقیقات دامپزشکی چاپ شده است و از این رو در مقاله‌ی حاضر نتایج مربوط به پروتئین ESAT۶- همراه با ارزیابی ایمنی‌زایی این دو پروتئین آورده شده است.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA ژنومی مایکوباکتریوم بوویس سویه‌ی AN۵: در این تحقیق از سویه‌ی AN۵ *مایکوباکتریوم* بوویس موجود در بخش تولید توبرکولین و

مالئین مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی جهت استخراج DNA استفاده گردید. بدین ترتیب که از باکتری کشت داده شده در محیط اختصاصی لوانشتاین جانسون پیروات دار (Lowenstein Jensen Pyruvate Medium; LJP) ، یک لوپ برداشت گردید و پس از حل نمودن باکتری در TE Buffer 1X، در بن ماری C°80 به‌مدت ۳۰ دقیقه غیر فعال شد. در ادامه با استفاده از پروتکل ون سولینگن (Van Soolingen) عملیات استخراج DNA صورت گرفت. بررسی کیفی و کمی با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و نانودراپ انجام شد(۱۶).

انتخاب حامل پلاسمیدی و باکتری جهت همسانه‌سازی ژن esat۶-: از پلاسمید pET23a(+) اخذ شده از بخش بیوتکنولوژی مؤسسه‌ی تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی به‌عنوان حامل (Vector) جهت عملیات همسانه‌سازی ژن *esat۶*- سویه‌ی AN5 *مایکوباکتریوم بوویس* و به‌منظور ترانسفورماسیون ژن همسانه شده *esat۶*- از *اشریشیاکلی α5DH* اخذ شده از بخش تولید واکسن تب برفکی همین مؤسسه استفاده گردید. برای استخراج پلاسمید، از دو کیت ساخت شرکت Roche و MBST استفاده شد.

طراحی پرایمر اختصاصی ژن esat۶- حاوی مناطق برش برای آنزیم‌های تعیین حدودی EcoRI و HindIII: در ابتدا توالی ژن مورد نظر در سایت Bovilist جستجو و سپس پرایمر مورد استفاده در کلونینگ که می‌بایست حاوی جایگاه برش آنزیم‌های تعیین حدودی مد نظر، با توجه به ساختار وکتور و مشخصاً Multiple Cloning Site باشد انتخاب گردید. آنزیم‌های تعیین حدودی مد نظر EcoRI و HindIII از شرکت Scientific Thermo Fisher تهیه شدند) جدول ۱). طراحی پرایمرها توسط نرم افزار Vector NTI Advance 11 انجام گردید و پس از آنالیز، توسط کمپانی Macrogen کره‌ی جنوبی سنتز گردید. پرایمرها با توجه به اطلاعات فنی شرکت سازنده با غلظت نهایی mM20 رقیق سازی و پس از تقسیم در فریزر C°20- نگهداری گردید. دیگرمواد مولکولی مصرفی از دو شرکت Sinaclone و Sigma تهیه شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای کلونینگ جهت تکثیر ژن *esat۶*-

طول قطعه تکثیری (bp)	توالی پرایمر	پرایمر
288	ttatcgaattcatgacagagcagcagtgg	F(*EcoRI*)
	Atataagctttgcgaacatcccagtgacg	R(*Hind III*)

واکنش زنجیری پلی مراز (PCR) جهت تکثیر ژن esat۶-: مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR جهت تکثیر ژن *esat۶*- با حجم نهایی µl100 و همچنین برنامه چرخه‌های دمایی PCR در دستگاه Eppendorf Gradiant به‌ترتیب در جداول ۲ و ۳ آمده است. ژن تکثیر یافته *esat۶*- در آگارز ۱٪ در ولتاژ ۹۰ ولت به‌مدت یک ساعت الکتروفورز گردید. محصول PCR به‌دست آمده مطابق توصیه PCR product purification Kit ساخت شرکت Roche تخلیص شدند.

جدول ۲- اجزاء تشکیل دهنده‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر ژن *esat۶*- *مایکوباکتریوم بوویس* سویه‌ی AN۵

مواد	حجم مورد نیاز
M.Q	µl3/71
PCR Buffer 10x	µl10
mM10dNTPs	µl2
DMSO 100%	µl5
Primer F	µl5
Primer R	µl5
DNA Template	µl1
pfu polymerase	µl7/0
Total	µl100

جدول ۳- برنامه دمایی و زمان مربوط به دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن *esat۶*- مایکوباکتریوم بوویس سویه‌ی AN۵

دناتوراسیون اولیه	95 ˚C	دقیقه 5	یک سیکل
دناتوراسیون	95 ˚C	ثانیه 45	سیکل 35
آنیلینگ	62 ˚C	ثانیه 45	
بسط زنجیره	72˚C	دقیقه 1	
بسط نهایی	72˚C	دقیقه 10	یک سیکل

همسانه‌سازی ژن esat۶- در حامل پلاسمیدی pET23a(+) و ترانسفورماسیون آن در اشریشیا کلی α5DH به‌منظور همسانه‌سازی ژن esat۶- در ناقل پلاسمیدی pET23a(+)، هضم آنزیمی دوگانه‌ی محصول PCR با دو آنزیم تعیین حدودی HindIII و EcoRI در دمای C37˚ به‌مدت یک شبانه روز انجام شد. همزمان عملیات هضم آنزیمی دوگانه روی ناقل pET23a(+) نیز انجام گرفت. پلاسمید خطی شده پس از برش، مطابق با توصیه‌ی PCR product purification Kit ساخت کمپانی Roche از داخل ژل تخلیص شد. پس از ارزیابی کمی و کیفی صورت‌گرفته بر روی پلاسمید و محصول PCR هضم شده، با استفاده از نرم افزار NEB ligation calculator بهترین غلظت جهت عملیات الحاق محاسبه گردید. الحاق ژن esat۶- با پلاسمید خطی شده با استفاده از آنزیم ۴ Ligase T در دستگاه ترموسایکلر در دمای C˚ 16 به‌مدت یک شبانه روز انجام گرفت. به‌منظور تکثیر ژن esat۶- در میزبان زنده‌ی پروکاریوتی، عملیات ترانسفورماسیون ناقل پلاسمیدیِ همسانه شده حاوی ژن esat۶- در *اشریشیاکلی α5DH* که با روش کلرید کلسیم سرد، مستعد پذیرش شده بود، صورت گرفت. سپس *اشریشیاکلی α5DH* به محیط آب‌گوشت لوریا برتانی(Luria Bertani broth) حاوی غلظت مناسب آمپی‌سیلین 100 (µg/mL) در دمای C˚37 تلقیح شد. عملیات استخراج پلاسمید از اشریشیاکلی *α5DH* با روش لیز قلیایی انجام گرفت. غربالگری پلاسمیدهای این مطالعه با انجام پرگنه‌ی PCR (Colony PCR) تائید شد. جهت تائید نهایی تعیین توالی به‌صورت خوانش دو طرفه با پرایمرهای یونی‌ورسال (Universal) صورت گرفت. برای آنالیز توالی‌ها از نرم افزار Chromas version ۲,۶,۴ استفاده گردید.

بیان ژن esat۶- در اشریشیا کلی BL ۲۱: به‌منظور بیان پروتئین ESAT۶-، پلاسمیدهای تکثیر یافته حاوی ژن esat۶- در *اشریشیاکلی BL ۲۱* مستعد شده به‌عنوان

یاخته‌ی بیانی ترانسفورم گردیده و بذرکاری به‌طور جداگانه دو ارلن محتوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع لوریا برتانی و آنتی‌بیوتیک مناسب، افزوده گردید. عمل هوادهی ارلن‌ها در دمای ۳۷C° با سرعت 144 rpm انجام گرفت. جهت القاء بیان پروتئین ESAT۶- از ایزوپروپیل-بتا-دی - تیوگالاکتوپیرانوزید ((Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; IPTG استفاده شد. به محض رسیدن جذب نوری به حدود ۰.۶ در طول موج 600nm، ۱میلی‌لیتر نمونه‌ی زمان صفر(قبل از افزودن IPTG) برداشت گردید. به‌منظور بهینه‌سازی، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار در حجم نهایی محیط LB Broth محاسبه شد و فالکون‌ها در دمای C °37 و C °22 انکوبه و هوادهی شدند. از هر یک از فالکون‌ها در فواصل زمانی T2 ، T۲،۳ T ۴،T و T۱۸ ساعت به میزان یک میلی‌لیتر نمونه برداری شد. مایع رویی و پلت باکتریایی هر یک از نمونه‌ها از نظر بیان پروتئین با ژل SDS-PAGE (گرادیان ٪۱۲-۴) با ولتاژ ۱۰۰ به‌مدت ۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند. رنگ آمیزی ژل پلی‌آکریل‌آمید با کوماسی‌بلو G۲۵۰- انجام گرفت (۱۷).

استحصال و تخلیص پروتئین ESAT۶- بیان شده در اشریشیاکلی BL ۲۱: جهت استحصال پروتئینESAT۶- بیان شده که به‌صورت گرانول در داخل سیتوپلاسم یاخته‌های *اشریشیاکلی* BL۲۱ تجمع پیدا می‌کند لازم است جدار این یاخته‌های باکتریایی با امواج فراصوت تخریب شود که این کار با استفاده از دستگاه اولترا سونیکاتور Hieischer ultrasound technology با دامنه‌ی ۸۰ میکرومتر و با فواصل زمانی یک دقیقه ضربان و یک دقیقه استراحت با ۵ بار توالی صورت گرفت. محلول کدر به‌دست آمده‌ی فوق در دور 13000 rpm به‌مدت ۲۰ دقیقه در C°4 سانتریفوژگردید و در مرحله‌ی بعد رسوب با محلوطی شامل 50Tris-HCl mM، 10EDTA mM، 100NaCl mM و ۰/۵٪ Triton X -۱۰۰ شسته شد و به‌منظور آنالیز در فریزر C°۲۰- نگهداری شد.

تخلیص پروتئین ESAT۶- با استفاده از ستون Nickle Nitrilotriacetic acid:

الف) محلول ساختن پلت باکتریایی محتوی گنجیدگی پروتئینESAT۶- با اوره‌ی ۸ مولار: با توجه به این‌که پروتئین بیان شده با انتهایHis-Tagged واجد وزن مولکولی پایین بوده و به فرم نامحلول (Incluson body) وجود دارد، به هنگام تخلیص با رزین Ni-NTA (Thermo Co.) جهت محلول ساختن آن‌ها اوره‌ی ۸ مولار(Merck Co.) به بافرPBS مورد استفاده اضافه گردید. همچنین در راستای بهینه‌سازی تخلیص و کاهش باندهای غیر اختصاصی سریال غلظتی از ایمیدازول به بافرها اضافه گردید. در نهایت متناسب با حجم نهایی مورد استفاده‌ی هر بافر مقادیر لازم از پروتئاز عاری از EDTA به هر یک از محلول‌های مورد استفاده افزوده شد. به ازای ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت اولیه، یک میلی‌لیتر از محلول Inclusion body Solublization محتوی اوره‌ی ۸ مولار را به دو میکروتیوب افزوده و بعد از پیپت کردنِ آهسته و حل شدن رسوب، سوسپانسیون به‌دست آمده به شیکر اربیتالی با دور 160 rpm در دمای آزمایشگاه به‌مدت ۴ ساعت منتقل شد. در مرحله بعدInclusion body محلول شده در 13000 rpm به‌مدت ۴۰ دقیقه در دمای C°4 سانتریفیوژ و مایع رویی جهت تخلیص جمع‌آوری گردید.

ب) خالص سازی پروتئین His-Tagged مطابق دستورالعمل Thermo Co. به‌ترتیب مراحل زیر انجام شد:

۱- بطری محتوی رزین به آهستگی و با حرکات اربیتالی در ظرف مخصوص خود همگن گردید.

۲- تحت شرایط استریل µl100 رزین به دو میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری افزوده شد و در 3000 rpm به‌مدت ۲ دقیقه در C°۴ سانتریفیوژگردید.

۳- مایع رویی به‌دقت دور ریخته شد.

۴- دو برابر حجم رزین از Equilibration Buffer به رزین افزوده شد و پس از شیک به‌مدت ۵ دقیقه در دمای

آزمایشگاه در ۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۲ دقیقه در ۴C° سانتریفیوژگردید و مایع رویی دور ریخته شد.

۵-حجم مساوی از عصاره‌ی پروتئینی سونیکه شده مربوط به پروتئین ESAT-۶ با Equilibration Buffer مخلوط شدند به نحوی که حجم نهایی فوق حداقل دو برابر رزین گردید.

۶- حداقل µl200 از نمونه‌ی تهیه شده به میکروتیوپ مرحله‌ی ۴ افزوده شد و به‌مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه به‌خوبی شیک گردید.

۷- میکروتیوب در rpm3000 به‌مدت ۲ دقیقه در ۴C° سانتریفیوژگردید. مایع رویی در فریزر ۲۰C° - نگهداری شد.

۸- به رزین مرحله قبل ، یک میلی‌لیتر از Wash Buffer افزوده شد. پس از شیک به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه ، میکروتیوب در rpm 3000 به‌مدت ۲ دقیقه در ۴C° سانتریفیوژگردید. مایع رویی در فریزر ۲۰C° - نگهداری شد.

۹- مرحله‌ی شستشو دو بار تکرار گردید.

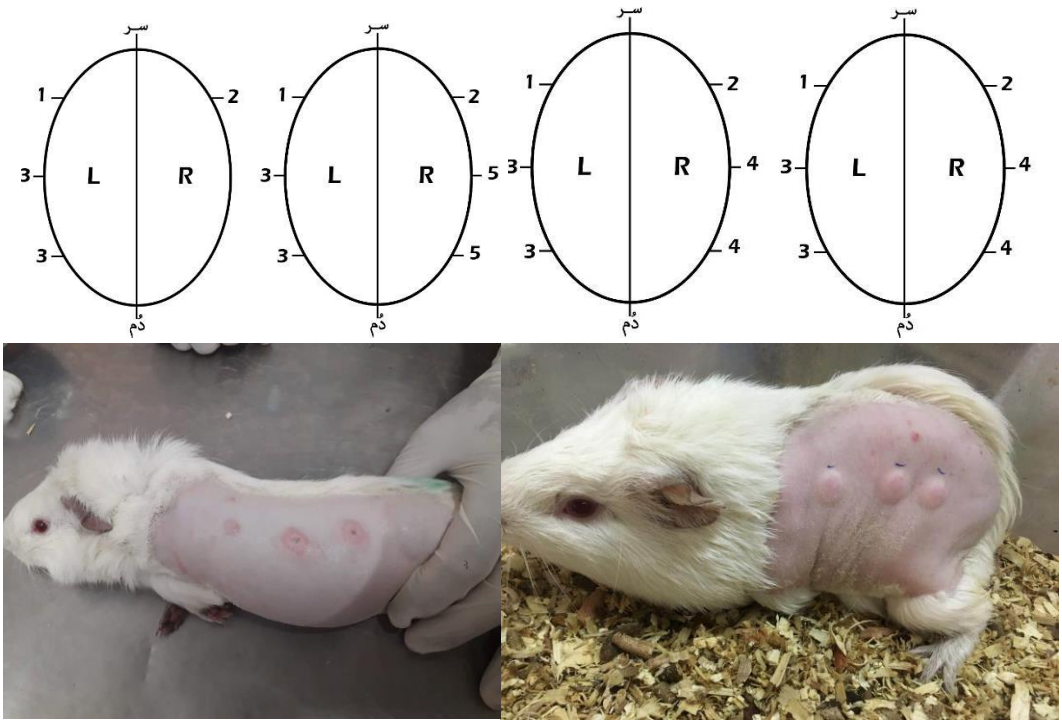
۱۰-هم حجم رزین اولیه، µl100 محلول mM 250 Elution Buffer افزوده شد و پس از شیک به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، میکروتیوب در rpm3000 به‌مدت ۲ دقیقه در ۴C° سانتریفیوژگردید. مایع رویی جمع آوری شد و همین عملیات مجدداً با mM 400 Elution Buffer تکرار شد.

دیالیز محلول پروتئینی به‌منظور حذف اوره: به‌منظور رفولدینگ پروتئین ESAT-۶ و حذف اوره با گرادیان کاهشی و با استفاده از ممبران KDa10 انجام شد. محلول مورد استفاده محتوی mM5 Tris-HCl با pH۷/۴= به همراه اوره با غلظت‌های ۶، ۴ ، ۲ ، ۱ و ۰ بود که به‌عنوان محلول اطراف کیسه‌ی دیالیز استفاده گردید. این محلول هر ۱۲ ساعت در دمای ۴C° با غلظت‌های پایین‌تر از خود تعویض گردید. جهت حذف ایمیدازول از میکروتیوپ تجاری His Trap ساخت کمپانی Amicon استفاده گردید. پروتئین استحصالی با روش لوری (Lowry) ارزیابی شد.

ارزیابی تولید پروتئین ESAT-۶ با روش‌های SDS-PAGE و Western blating: مقدار ۱۵ میکرولیتر از پروتئین‌های تخلیص شده‌ی ESAT-۶ در دو کاست جداگانه‌ی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲/۵درصد در ولتاژ ۹۰ ولت به‌مدت ۳ ساعت در دستگاه Bio-Rad الکتروفورز شد. یک ژل جهت مشاهده‌ی باندهای پروتئینی با کوماسی بلو ۲۵۰-R رنگ‌آمیزی گردید و از ژل دوم جهت وسترن‌بلات استفاده شد. جهت عملیات وسترن بلاتینگ، باندهای پروتئینی با استفاده از سیستم Bio-Rad Miniprotein II System مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور تائید تولید پروتئین نوترکیب ESAT-۶ از روش ایمونوبلاتینگ استفاده گردید(۶). بدین ترتیب که پس از الکتروفورز پروتئین نوترکیب تخلیص شده به روی ژل پلی‌آکریل‌آمید، ژل و کاغذهای واتمن و غشاء پلی وینی‌لیدین فلوراید (Polyvinylidene fluoride ; PVDF) در کاست مخصوص قرار داده شدند. مجموعه به تانک محتوی بافر انتقال یافت و جریان با شدت mA400 به‌مدت یک ساعت برقرار گردید. بلاک نمودن کاغذ PVDF با غوطه‌ور سازی کاغذ در محلول سرم آلبومین گاوی ۳ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از شستشوی کاغذ PVDF با بافر تریس نمکی (Tris-Buffered Saline with Tween; TBST)، آنتی بادی اولیه با رقت ۱/۵۰۰۰(یک پنج هزارم) به‌مدت یک ساعت روی ممبران افزوده شد. مجدداً کاغذ با بافر TBST شستشو گردید. سپس آنتی‌بادی ثانویه‌ی کنژوگه با HRP (Horse raddish peroxidase) با غلظت ۱/۵۰۰۰ به ممبران افزوده شد و کاغذ به‌مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه شیک گردید. ممبران پس از شستشو در مجاورت یک درصد DAB (Diaminobenzidine) به همراه آب اکسیژنه ۳۰ درصد و X1PBS به‌مدت ۳ دقیقه قرار گرفت.

ارزیابی پاسخ ایمنی پروتئین‌های نوترکیب ESAT-۶ و CFP-۱۰ در خوکچه‌ی هندی: در این مطالعه ارزیابی ایمنی‌زایی دو پروتئین نوترکیب ESAT-۶ و CFP-۱۰ در مقایسه با توبرکولین گاوی و مرغی ساخت

مؤسسه‌ی رازی انجام شد. برای این‌کار تعداد ۱۰سر خوکچه‌های هندی نر سفید آلبینو با وزن ۴۰۰ الی ۶۰۰ گرم برای آزمایشات انتخاب شدند. خوکچه‌ها در ۴ گروه دوتایی تقسیم گردیدند. در هرگروه یک خوکچه به‌عنوان تیمار و دیگری شاهد در نظر گرفته شد. تیمارهای هر گروه به‌طور جداگانه به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون محتوی پودر سنگ پا، پارافین و پودر کشته‌شده‌ی *مایکوباکتریوم بوویس*، *مایکوباکتریوم آویوم*، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم فلئی* به‌صورت تزریق داخل عضلانی در پشت ران دریافت نمودند. پس از گذشت ۴۲ روز، طبق الگوی از قبل طراحی شده به همه‌ی حیوانات تحت آزمایش، ۰/۱ میلی‌لیتر توبرکولین گاوی (PPD-B) ، توبرکولین مرغی (PPD-A)، توبرکولین استاندارد (PPD-S) و پروتئین‌های نوترکیب ESAT-۶ و CFP-۱۰ به‌صورت داخل جلدی تزریق شد. مقدار پپتیدها µg5 در ۰.۱ میلی‌لیتر برای هر آنتی‌ژن و با بافر PBS استریل با pH۸-۶= در نظر گرفته شد.در زمان انجام آزمایش طبق پروتکل OIE دو طرف شکمی خوکچه می‌بایست کاملاً شیو و بدون مو گردد تا اندازه‌گیری واکنش در خوکچه‌ی هندی بعد از ۲۴ ساعت با کم‌ترین خطا باشد چنانچه بعد از ۴۸ یا ۷۲ ساعت به‌دلیل بلند شدن موی بدن خوکچه در محل تزریق شده ، اندازه گیری دقیق اریتم با خطا خواهد بود که علت توصیه منابع بین‌المللی جهت قرائت ظرف ۲۴ ساعت در خوکچه این موضوع می باشد .خوکچه‌ی هندی پس از تزریق فاقد تورم می‌باشد. بنابراین آنچه که ملاک اندازه‌گیری است ، قرمزی است. اندازه‌گیری راکسیون‌ها بر اساس میانگین دو قطر عمود بر هم و با استفاده از کولیس دیجیتال و بر اساس میلی‌متر صورت گرفت. تزریقات با الگوی تصادفی و به‌صورت کور در هر گروه انجام شد .



شکل ۱. محل‌های تزریق خوکچه‌های هندی تحت آزمایش

گروه	حیوان حساس شده	پروتئین‌های تزریقی
۱	*M. bovis*	ESAT-6
		CFP-10
		PPD-B
		PPD-S
۲	*M. avium*	ESAT-6
		CFP-10
		PPD-B
		PPD-S
۳	*M. tuberculosis*	ESAT-6
		CFP-10
		PPD-B
		PPD-S
۴	*M. phlei*	ESAT-6
		CFP-10
		PPD-B
		PPD-S
۵	شاهد	ESAT-6
		CFP-10
		PPD-B
		PPD-S

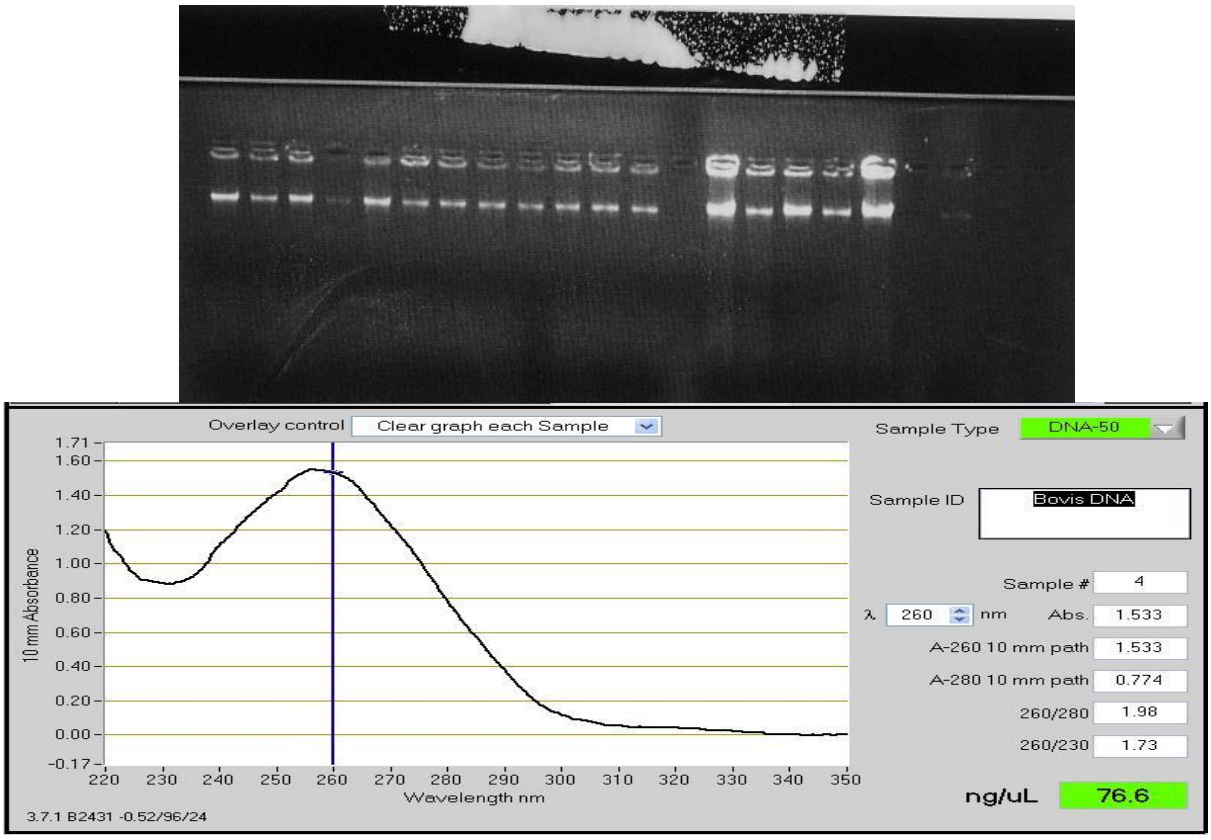
جدول ۴ – گروه‌بندی خوکچه‌های هندی تزریق شده با پروتئین‌های نوترکیب، توبرکولین‌های گاوی، مرغی و استاندارد

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها از طریق آزمون آماری Parallel Line Model برای دو پروتئین نوترکیب ESAT۶- و CFP-۱۰ انجام شد. برای آنالیز آماری نتایج و رسم نمودارها از نرم افزار Bioassay Test استفاده شد. به‌صورت عملیاتی جهت ارزیابی پوتنسی توبرکولین دامی و انسانی از روش parallel line model استفاده می‌گردد چنانچه در مورد توبرکولین انسانی ارزیابی پوتنسی محصول نهایی دارای پروتکل جهانی و با رقت ۱۰و ۵ و ۲/۵ واحدی در خصوص استاندارد ۵ و ۲/۵ واحدی جهت تست می‌باشند. در این مطالعه، هدف اصلی از به‌کارگیری چارچوب آماری PLM برآورد نسبی پاسخ ایمنی و مقایسه عملکرد آنتی‌ژن‌ها در یک دز ثابتِ از پیش بهینه‌شده بوده است، نه تعیین پوتنسی کلاسیک مبتنی بر منحنی کامل دوز–پاسخ. به همین دلیل، برای ESAT۶- و CFP-۱۰ تنها «رقت اصلی» (دز واحد) مورد استفاده قرار گرفت.

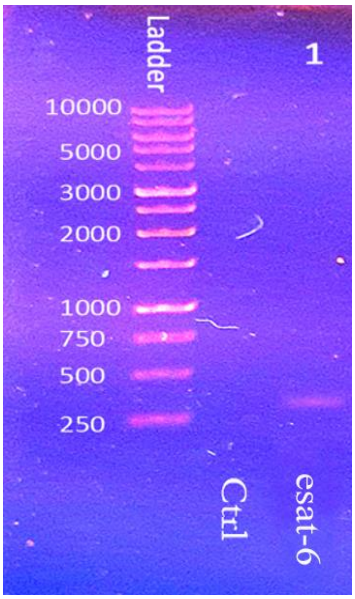
نتایج

استخراج DNA ژنومی مایکوباکتریوم بوویس سویه‌ی AN۵: ارزیابی کیفی و کمّی DNA ژنومی استخراج شده از *مایکوباکتریوم بوویس* سویه‌ی AN۵ با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه نانودراپ انجام شد. همان طوری‌که در ارزیابی کیفی DNA استخراج شده در ژل در تصویر ۲ کاملا مشخص است کیفیت DNA استخراج شده بسیار مناسب است. هم چنین در نمودار ترسیمی به‌وسیله‌ی دستگاه نانودراپ و تعین نسبتOD در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ این نسبت ۱/۹۸ است که نشان دهنده‌ی خلوص DNA استخراج شده است. جهت آزمون PCRبه‌دلیل بالا بودن غلظت DNA ژنوم استحصالی به نسبت ۱ به ۳ رقیق گردید (شکل ۲).



شکل۲.-باندهای واضح DNAاستخراج شده از ژنوم *میکوباکتریوم بوویس*(بالا)، اندازه‌گیری غلظت DNA استخراج شده با استفاده از نانو دراپ(پایین).

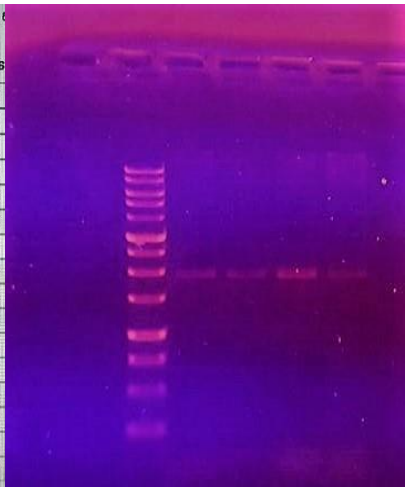
تکثیر ژن ESAT-۶ با PCR : محصول PCR که بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید، نشان داد که تکثیر ژن ESAT-۶ که با ۲۸۸ جفت‌باز در تصویر ۳ مشاهده می‌شود با پرایمر طراحی شده به‌خوبی انجام شده است.



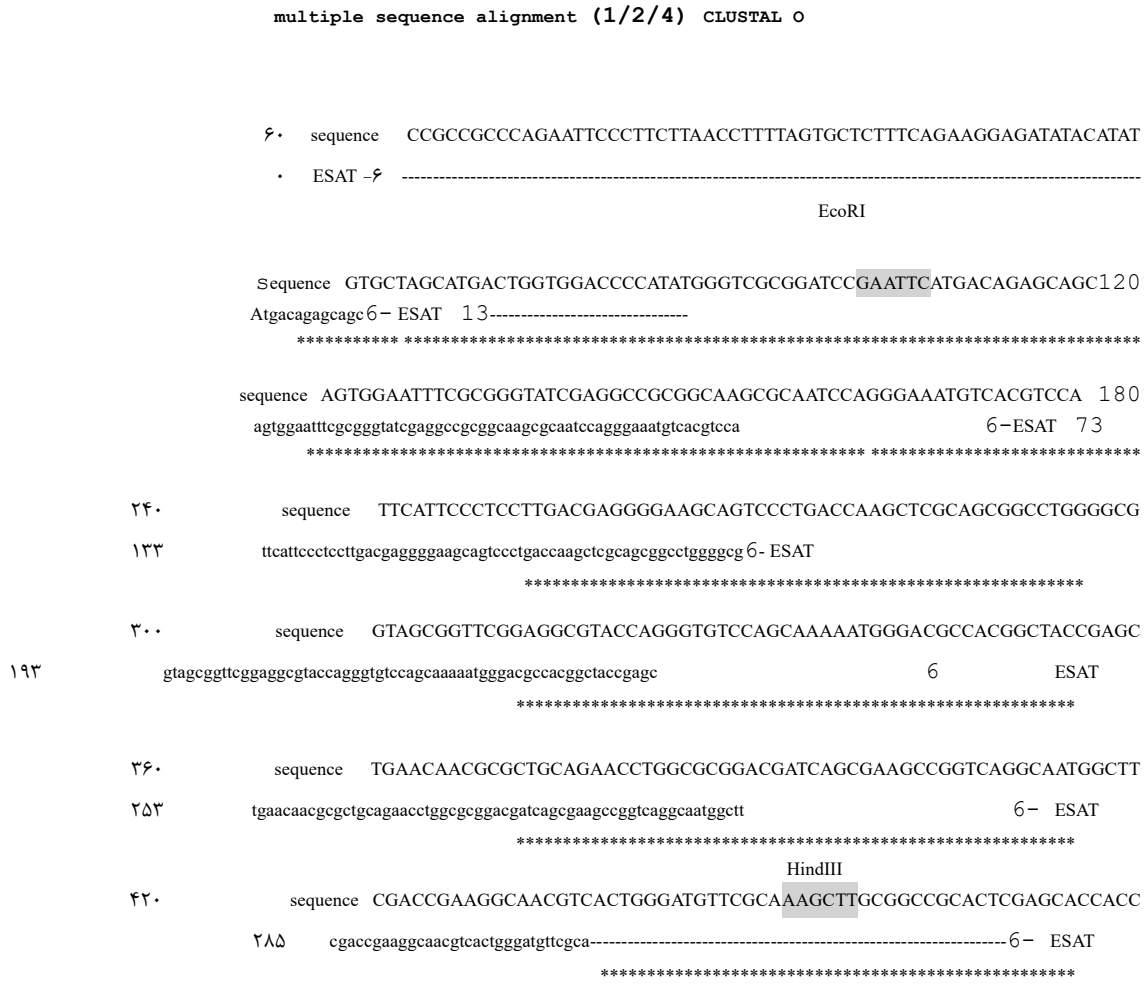
تصویر ۳-تکثیر ژن ESAT-۶ *مایکوباکتریوم بوویس* با روش PCR. مارکر مولکولی ۱ Ctr1،Kb(Bioneer) کنترل منفی، ژن ESAT-۶

استخراج پلاسمید pET23a(+)از اشریشیاکلی α5 DH ، هضم و الحاق آن با ژن ESAT-۶: پس از ترانسفورماسیون پلاسمید فوق به *اشریشیا کلی* α5 DH ، عملیات تکثیر در محیط LB محتوی آنتی بیوتیک مناسب صورت گرفت. در ادامه عملیات استخراج پلاسمید pET23a(+) از با کتری α5 DH انجام شد و مقدار ۳ میکرولیتر از محصول تخلیص شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی گردید (شکل۴ چپ). عدم داشتن اسمیر و شفافیت باندها، نشان دهنده‌ی کیفیت مناسب پلاسمید استخراج شده بود. غلظت پلاسمید با استفاده از نانودراپ در محدوده ۱۰۰-۳۰۰ng/µl اندازه‌گیری شد(شکل ۴ راست). هضم پلاسمید pET23a(+) با استفاده از آنزیم‌های برشی *Hind* III و *EcoRI* با موفقیت انجام شد. عملیات تخلیص پلاسمید هضم شده به خوبی پس از برش از روی ژل، توسط کیت انجام گردید. عملیات الحاق بین ژن *esat-۶* با ناقل پلاسمیدی pET23a(+) با موفقیت انجام شد. تعیین توالی و آنالیز نرم افزاری حاکی از آن بود که هیچ‌گونه جهشی در ژن‌های کلون شده رخ نداده است (تصویر ۴, ۵).

Sample ID	ng/	A260	260/230	260/280	Cons
pET28-1	87.56	1.751	0.70	1.33	50
pET28-1*	59.41	1.188	0.69	1.37	50
pET28-2	179.13	3.583	0.55	1.38	50
pET28-3	47.13	0.943	0.43	1.02	50
pET28-4	97.60	1.952	0.35	1.17	50
pET28-5	86.83	1.737	0.39	1.19	50
G-1	153.48	3.070	0.59	1.36	50
G-3	111.89	2.238	0.60	1.43	50
G-4	202.08	4.042	0.90	1.33	50
G-5	NaN	NaN	NaN	NaN	50
G-5*	88.48	1.770	0.52	1.20	50
pET23-1	178.66	3.573	0.74	1.50	50
pET23-2	96.54	1.931	0.36	1.11	50
pET23-3	140.40	2.808	0.73	1.46	50
pET23-4	155.78	3.116	0.76	1.43	50
pET23-5	268.39	5.368	0.71	1.56	50

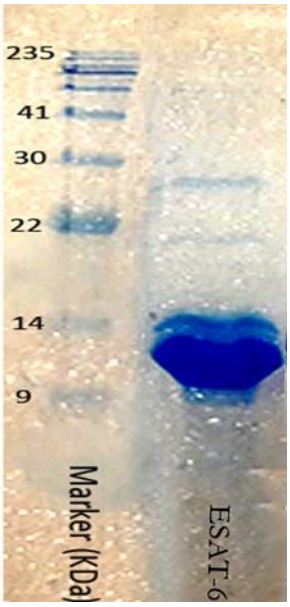


تصویر ۴- بررسی کیفی پلاسمید pET23a(+) استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸درصد (راست) و اندازه‌گیری غلظت پلاسمید با نانو دراپ (چپ)



تصویر۵. تجزیه و تحلیل ژن ۶- ESAT پس از الحاق در پلاسمید pET23a(+) با نرم افزار chromas Clustal Omega

SDS-PAGE و Western blotting پروتئین نوترکیب ۶- ESAT: ترانسفورماسیون ناقل پلاسمیدی pET23a(+) تکثیر یافته حاوی ژن *esat*-۶ در *اشریشیاکلی* BL21 مستعد شده صورت گرفت . به‌منظور بهینه‌سازی از دمای ۲۲C ° و ۳۷C ° و از غلظت‌های سری IPTG با زمان‌های مختلف استفاده گردید که در نهایت بهترین نتیجه در دمای ۳۷C ° با غلظت Mm5/0 طی ۴ ساعت کسب شد. غلظت پروتئین بیانی ۶-ESAT با روش **لوری** حدود µg/ml500 برآورد گردید. بیان پروتئین فوق با عملیات وسترن بلاتینگ با پادتن تک‌بنیانیِ اختصاصیِ ضد پروتئین ۶- ESAT در وزن مولکولیِ مورد نظر تائید گردید. سایز مولکولی حدود KDa14 در SDS-PAGE با گرادیان ۱۲٪ بیانِ موفقیت‌آمیز پروتئین نو ترکیب فوق را در *اشریشیاکلی* BL۲۱ به‌خوبی نشان داد. با وجود ماهیت کوچک پپتید و این‌که غنی از اسیدهای آمینه هیدروفوب می‌باشد ، سایز مولکولی KDa14 در SDS-PAGE احتمالاً مرتبط با رفتار مهاجرتی غیر خطی پپتید می‌باشد که وزن ظاهری بالاتر از وزن واقعی دیده می‌شود. البته تجمع توالی‌های اضافی وکتور و His-tag هم می‌تواند باعث جابه‌جایی در ژل گردد.



تصویر ۶. الگوی الکتروفورتیک پروتئین تخلیص شده ۶- ESAT با رزین نیکل با روش SAD- PAGE . 1- مارکر پروتئینی استاندارد شرکت سیناکلون، ۲- پروتئین تخلیص شده ۶- ESAT

ایمنی‌زایی پروتیپین‌های نوترکیب ۶- ESAT و ۱۰-CFP: مطابق استانداردهای جهانی ارزیابی محصول تولیدی به‌عنوان توبرکولین بر اساس توان و قدرت اثر یا پوتنسی (Potency) انجام می‌گیرد. در مورد توبرکولین گاوی بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی دام، پوتنسی محصول تولیدی می‌بایست در محدوده‌ی ٪۱۵۰-۶۶ قرار گیرد.

نتایج پوتنسی ESAT-۶ در مقایسه با توبرکولین گاوی در گروه‌های تحت آزمایش به‌شرح ذیل بود: در خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم بوویس* ۶ درصد، در خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم فلئی* ۹ درصد، در خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ۱۲ درصد به‌دست آمد. این داده‌ها در مورد CFP-۱۰ در مقایسه با توبرکولین گاوی نتایج زیر را نشان داد. در خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم بویس* ٪۶۱، در خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم فلئی* ۹ درصد، در خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ۱۴ درصد محاسبه گردید.

جدول ۵. نتایج واکنش‌های پوستی خوکچه‌ها بر حسب میلی‌متر بعد از تزریق دو نوع پروتئین نو ترکیب و سه نوع توبرکولین

ماده‌ی موثره	خوکچه‌ی حساس به *مایکوباکتریوم بوویس*		خوکچه‌ی حساس به *مایکوباکتریوم اویوم*		خوکچه‌ی حساس به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*		خوکچه‌ی حساس به *مایکوباکتریوم فلئی*	
	شماره ۱	شماره ۲	شماره ۱	شماره ۲	شماره ۱	شماره ۲	شماره ۱	شماره ۲
ESAT6- (1)	15	5/12	8	7	8	5/7	5/3	3
CFP10- (2)	5/13	8	8	11	10	5/11	3	4
PPD-B (3)	5/19	19	5/11	12	5/13	15	14	14
	17	21	5/11	5/12	15	5/15	5/13	14
PPD-A (4)	5/10	8	21	18	-	-	-	-
	5/10	7	5/22	19				
PPD-H (5)	-	-	-	-	16	17	-	-
					15	5/12		

بحث و نتیجه‌گیری

دو گونه‌ی *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* و *مایکوباکتریوم بوویس* در مجموعه‌ی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (MTC) که به‌ترتیب عامل سل انسانی و گاوی هستند در مقایسه با سایر گونه‌ها گسترش و شیوع بیش‌تری دارند و از نظر بهداشت عمومی و مسائل اقتصادی حائز اهمیت‌اند. سل انسانی از مهم‌ترین مشکلات عمده‌ی بهداشت عمومی جهانی است که میزان ابتلا و مرگ‌ومیر بالایی در انسان دارد و تا قبل از زمان همه‌گیری کووید-۱۹، علت اصلی مرگ و میر انسان ناشی از یک عامل عفونی منفرد بود و حتی رتبه‌ی بالاتری نسبت به نشانگان نقصان ایمنی اکتسابی (Acquired immune deficiency syndrome; AIDS) داشت.

هرچند که *مایکوباکتریوم بوویس* در درجه‌ی اول گاو را آلوده می‌کند، ولی این باکتری از بسیاری از دام‌ها و گونه‌های حیوانی اهلی و وحشی دیگر جدا شده است و بنابراین خطر انتقال از طرق مختلف به انسان وجود دارد و می‌تواند بر بهداشت عمومی تأثیر بسزایی بگذارد. مشکل سل گاوی زمانی پیچیده‌تر می‌شود که عفونت در انسان با سویه‌های مقاوم به چند دارویی یا MDR (Multi Drug Resistant) *مایکوباکتریوم بوویس* باشد که در این صورت درمان سل ناشی از این سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک را در انسان با مشکل عمده‌ای مواجه می‌سازد (۱۸). از این رو یکی از مهم‌ترین رهیافت‌های کنترل، مراقبت و پیش‌گیری از سل ناشی از *مایکوباکتریوم بوویس* در انسان، کنترل بیماری سل ناشی از این باکتری در گاو است. جهت دست‌یابی به این هدف، کنترل بیماری در حیوانات به‌ویژه گاو به‌عنوان میزبان اصلی و عمده‌ی *مایکوباکتریوم بوویس* ضروری است. تشخیص بیماری در گله‌های گاو، مراقبت و حذف گاوهای آلوده مبتنی بر سیاست آزمایش- کشتار (Slaughter Test) از موارد به‌کار گرفته شده در این زمینه در بسیاری از کشورها از جمله ایران است.

روش‌های زیادی برای تشخیص زود هنگام سل گاوی، استفاده شده است که هر کدام مزایا و محدودیت‌هایی دارند. برنامه‌های ریشه‌کنی در گاوها عمدتاً مبتنی بر استفاده از آزمایش پوستی توبرکولین (Tuberculin skin test; TST) برای تشخیص بیماری و کشتار حیوانات واکنش‌دهنده است. آزمایش پوستی توبرکولین که در واقع نوعی واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری مبتنی بر پاسخ در برابر تلقیح داخل جلدیِ مشتقِ پروتئینِ تخلیص شده (PPD-B) *مایکوباکتریوم بوویس* است، همچنان ابزار اصلی نظارت برای تشخیص سل گاوی است که بیش از ۱۰۰ سال است در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار گرفته است. با این‌حال، این آزمایش زمانی که حیوانات به مایکوباکتریوم‌های محیطی آلوده و حساس شده باشند فاقد ویژگی است (۱۹). حساسیت این آزمایش داخل پوستی در گاو با استفاده از مشتق پروتئین خالص یا همان PPD تهیه شده از *مایکوباکتریوم بوویس* (PPD گاوی) از ٪۶۳/۲ تا ٪۱۰۰ (میانگین ۸۳/۹ درصد) و ویژگی بین٪۷۵/۵ تا ٪۹۹ (میانگین ۹۶/۸ درصد) متغیر بوده است.PPD گاوی ترکیبی از پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها است که از *مایکوباکتریوم بوویس* سویه‌ی AN۵ تهیه می‌شود و برخی از این ترکیبات در مایکوباکتری‌های محیطی غیر بیماری‌زا نیز وجود دارند. بنابراین و برای افزایش حساسیت و اختصاصیت TST، تحقیقاتی برای استفاده از برخی آنتی‌ژن‌ها به جای PPDها انجام شده است که از آن جمله می‌توان به چهار پروتئین مایکوباکتریایی ۶- ESAT، CFP۱۰، c 3615 Rv و c 3020 Rv اشاره نمود(۲۰).

در مطالعه‌ای توسط **Buddle** و همکاران در سال ۲۰۰۳ تعدادی از پادگن‌های مایکوباکتریال شامل MPB۵۹،MPB ۶۴،MPB۷۰، MPB۸۳، ESAT۶- و ۱۰- CFP به شکل پروتئین‌های نو ترکیب یا سنتتیک در گروه‌هایی شامل حیوانات غیر آلوده، حیوانات واکسینه شده با بون و حیوانات واکنش مثبت با PPD، با سنجش IFN-γ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاکی از آن بود که استفاده از دو ترکیب پادگنی ۶-ESAT و ۱۰-CFP ، میزان واکنش مثبت کاذب را به‌طور معناداری در میان گاوهای آلوده

کاهش می‌دهد که این نتایج در مقایسه با سایر پادگن‌ها، فراوانی بالاتری از تشخیص گاوهای آلوده را در بر می‌گرفت. در این مطالعه ESAT-۶ حاوی ۸ پپتید که تقریباً تمام توالی ESAT-۶ را در بر می‌گیرد، نسبت به ESAT-۶ حاوی پنج پپتید بسیار ایمونوژن‌تر بوده و به‌شکل معناداری توسط اکثریت گاوهای مبتلا به *مایکوباکتریوم بوویس* شناسایی شد.

در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۰۳ توسط **Alito** و همکاران به‌منظور تشخیص پادگن‌های *مایکوباکتریوم بوویس* براساس آنالیز پاسخ سلول T بعد از عفونت صورت گرفت، عصاره‌ی سلولی و پروتئین‌های مایع رویی کشت *مایکوباکتریوم بوویس* ۲۴ روزه استخراج شد و در ادامه ارزیابی با تکنیک FPLC، وجود پنج پیک مختلف پروتئینی را متمایز نمود . آنالیز SDS-PAGE از این بین بیش‌ترین مجموعه‌ی تحریک‌پذیر که در ارزیابی تکثیر لنفوسیتی شاخص تحریک بالایی را نشان داد متعلق به فراکسیون ۲۵-۲۸ بود که مشتمل بر پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کمتر از kDa10 و تا حد کم‌تری kDa20 بود. این قطعات تحریک‌پذیر محتوی TRB-B B, 85, Ag 70MPB , 6-ESAT و CFP-۱۰ بودند که به‌خوبی قابلیت تحریک سلول Tرا داشتند. نتایج این تحقیق به‌خوبی این نظر را حمایت می‌کند که پروتئین‌های سبک وزن از قبیل ۶-ESAT نقش مهمی را در پاسخ ایمنی گاو به *مایکوباکتریوم بوویس* بازی می‌کند.

در مطالعه‌ای **Stavri** و همکاران در سال ۲۰۱۲ واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری حاصل از تزریق سه پروتئین نو ترکیب ۶- ESAT، CFP۱۰- وMPT۶۴ را در خوکچه‌های هندی حساس شده به BCG و *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* سویه‌ی Rv 37 H مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که در گروه واکسن خورده با BCG نتایج واکنش‌ها صفر بود و در حیوانات تزریق شده با سوسپانسیون *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به‌خوبی تمایز حاصل شد که این نتایج در خصوص ESAT-۶ و CFP-۱۰ تزریق شده به خوکچه‌های حساس به *مایکوباکتریوم فلئی* مشابه بود.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر به روی حیوانات تحت آزمایش نشان داد که پاسخ‌های پروتئین نوترکیب ۶-ESAT نسبت به توبرکولین گاوی در سطح پائین‌تری قرار داشت که در خصوص CFP-۱۰ نتایج نسبتاً قابل قبول بود. این یافته‌ها با سایر مطالعات همخوانی دارد به‌طوری که در تحقیقات دیگر نیز استفاده از این دو پروتئین همزمان با پپتیدهای نوترکیب یا سنتتیک دیگر در مقایسه با توبرکولین گاوی در سطح پایین‌تری قرار گرفت که علت آن به‌جهت تنوع بالای پروتئین‌ها در مورد توبرکولین گاوی نسبت به پروتئین نوترکیب می‌باشد که طبعاً قابلیت تحریک بالاتری از سلول های T را داشته بنابراین پاسخ قوی‌تری مورد نظر است و نتیجتاً پوتنسی بالاتری خواهند داشت و هدف CFP-۱۰ و ESAT-۶ جایگزینی کامل PPD نیست بلکه افزایش ویژگی آزمون است در نتایج اخذ شده از تحقیق حاضر فراکسیون‌های به‌دست آمده روی بدن خوکچه‌های حساس شده با *مایکوباکتریوم فلئی* به‌طور محسوسی نسبت به حیوانات حساس شده با دیگر مایکوباکتریوم‌های پاتوژن پایین‌تر قرائت شد که این موضوع نشان می‌دهد دو پپتید فوق می‌توانند حیوان آلوده با مایکوباکتریوم محیطی از حیوان آلوده به مایکوباکتریوم‌های پاتوژن را به‌خوبی تفریق دهند. در مطالعات انجام گرفته توسط سایر محققان ترکیب دو پپتید فوق به همراه ۲ الی ۳ پادگن پروتئینی، فرکانس بالاتری از تشخیص را جهت شناسایی حیوانات مبتلا داشت. تنها بخش کوچکی از حیوانات عفونی به یک آنتی‌ژن پاسخ می‌دهند که این امر نشان می‌دهد که استفاده انحصاری از یک آنتی‌ژن جهت تشخیص موفقیت‌آمیز حیوانات عفونی، انتظاری غیر واقع بینانه است. بنابراین استفاده از مجموعه‌ی پروتئینی باعث پوشش گسترده‌ای از جمعیت حیوانات تحت آزمایش می‌شود. همچنین استفاده از کوکتل پپتیدی منجر به ایجاد سیگنالی با دوام بالاتر خواهد شد که این امر باعث خواهد شد تا در تست تشخیصی، امکان فرار موتانت‌ها که در یک یا چند ژن دچار جهش شده‌اند به طرز چشم‌گیری کاهش یابد. از دلایل واکنش‌های ضعیف و شناسایی پایین‌تر در

حیوانات این مطالعه استفاده تکی از این پپتیدها بود که به‌دلیل کمبود و محدودیت منابع امکان طراحی گروه تزریقی که شامل فیوژن دو پپتید فوق باشد صرف‌نظر گردید. با این وجود استفاده از CFP-۱۰ به تنهایی نتیجه‌ی قابل قبولی در مقایسه با توبرکولین گاوی داشت. این امید می‌رود که با فرمولاسیون ESAT-۶ به همراه دیگر پپتیدها، بتوان نتایج بهتری کسب کرد. با توجه به اینکه *مایکوباکتریوم بویس* جزء میکروارگانیسم‌های سطح ۳ خطر طبقه‌بندی می‌شود و کار با آن توسط پرسنل آزمایشگاه یا چالش بر روی حیوانات تحت آزمایش ، نیازمند به دارا بودن ASL ۳، BSL۳ و ملزومات سختگیرانه‌ی پرسنل می‌باشد و با توجه به این‌که در پروتکل OIE هم در کشورهایی که امکانات لازم را ندارند، این روش توصیه گردیده است لذا در این تحقیق از سوسپانسیون کشته‌ی باکتری برای تحریک سیستم ایمنی حیواناتِ مدل استفاده گردید حال آن‌که در اکثر مطالعات از حیوانات آلوده‌ی عفونیِ مزرعه یا عفونی تجربی در ارزیابی خود استفاده نمودند که خود می‌تواند نتایج معناداری در ارزیابی‌های پادگن‌ها ذکر شده داشته باشد. در کلیه‌ی مطالعات استفاده‌ی ترکیبی از این دو آنتی‌ژن در میزان شناسایی حیوانات غیر آلوده، به‌طور معناداری در سطح پائین‌تری قرار گرفت. با توجه به این‌که توالی این دو ژن در مایکوباکتریومِ پاتوژن وجود دارد و نه در میکوباکتریوم‌های محیطی یافته‌ها نیز با موارد فوق منطبق است، با توجه به محدودیت منابع از یک سو و پایین بودن بازده پروتئین نوترکیب قهراً تعداد حیوانات طراحی شده برای هر گروه به تعداد دو سر در هر گروه آزمایشی کاهش پیدا نمود تا طبق الگوی تزریق ، حداقل پروتئین مورد نظر در دسترس باشد.البته با توجه به تعداد پایین حجم نمونه، تکرار در مقیاس بزرگ‌تر نتایج قابل تکرار پذیرتری خواهد داشت. لازم به ذکر است که خوکچه هندی و گاو تنها ابزار بررسی ایمنی سلولی است و در بازار کیت‌های معمول تشخیص سل گاوی، بر پایه PPD گاوی و مرغی هستند(Bovigam) و نسخه‌های ESAT /10--۶ CFP به‌صورت تجاری در دسترس نیستند و در مرحله تحقیق و توسعه می باشند. از نظر ژنومی ژن‌های esat -۶ و cfp-۱۰ هر دو در منطقه‌ی RD۱ قرار داشته و esx-A و esx-B به‌طور هم‌زمان بیان می‌شوند و با احتمال بالا نوع چین‌خوردگی در حالت طبیعی زمانی که هر دو پپتید با هم بیان می‌شوند در شناسایی و تحریک سیستم ایمنی قابلیت بالاتری خواهد داشت و از این‌رو به‌نظر می‌رسد بیان این دو پپتید به شکل فیوژن ترکیب مناسب‌تری فراهم نماید. هم چنین استفاده توأمان ترکیبی از کوکتل پادگن‌های پروتئینی از قبیل Rv۰۲۸۸ و c 3020Rv همراه با پروتئین‌های ESAT-۶ و CFP-۱۰ قابلیت تحریک بالاتری از سلول‌های T را فراهم می‌نماید. اگرچه هدف طراحی این مطالعه، بررسی توان تحریک ایمنی مستقل هر پپتید بوده است تا نقش اختصاصی هر کدام در القای پاسخ ایمنی مشخص شود. علاوه بر این تزریق جداگانه این آنتی‌ژن‌ها این امکان را فراهم کرد که اثرات مستقل ۶-ESAT و CFP-۱۰ بدون مداخله متقابل آن‌ها ارزیابی شود؛ موضوعی که در مطالعات مبتنی بر کمپلکس طبیعی قابل تفکیک نیست. علاوه‌بر این، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که هر یک از این پروتئین‌ها به‌تنهایی نیز قادر به القای پاسخ‌های ایمنی سلولی قابل‌تشخیص هستند، هرچند شدت پاسخ ممکن است نسبت به حالت کمپلکس کاهش یابد.

با توجه به نتایج مناسب به‌دست آمده در طی این تحقیق و هم چنین نتایج تحقیقات سایر محققان در مورد استفاده از پروتئین‌های نوترکیب ESAT-۶ و CFP-۱۰ در آزمایشات بالینی داوطلبین انسانی جهت تشخیص بیماری سل، می‌توان به استفاده از این پروتئین‌های نوترکیب در بهبود تشخیص سل دامی و با هدف افزایش ویژگی آزمون جلدی توبرکولین امیدوار بود. در صورت تحقق این موضوع و در اثر کاهش واکنش‌های متقاطع با مایکوباکتریوم‌های محیطی خسارات ناشی از کشتار گاوهای دارای واکنش‌های مثبت کاذب، کاهش پیدا خواهد نمود.

سپاسگزاری:

بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را از جناب آقای دکتر اسماعیل‌زاد عضو هیأت علمی بخش تحقیق و توسعه مؤسسه‌ی رازی که کمک شایان و قابل توجهی در انجام این طرح و پایان‌نامه‌ی تخصصی داشتند و تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز را در اختیار گذاشتند اعلام می‌دارند. این مقاله بخشی از پایان نامه‌ی Ph.D باکتری‌شناسی است و با کمک‌ها و حمایت‌های مالی مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران انجام گرفته است.

تعارض منافع:

بین نویسندگان تعارضی در منافع وجود ندارد.

References

1-Forbes BA. Mycobacterial Taxonomy. J Clin Microbiol. 2017 Feb;55(2):380-383

2-Borham M, Oreiby A, El-Gedawy A, Hegazy Y, Khalifa HO, Al-Gaabary M ,et al. Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant Mycobacterium Species. Pathogens. 2022 Jun 21;11(7):715.

3-OIE Terrestrial manual (2017), Bovine tuberculosis, Chapter 2.4.7

4- Khairullah AR, Moses IB, Kusala MKJ, Tyasningsih W, Ayuti SR, Rantam FA, et al. Unveiling insights into bovine tuberculosis: A comprehensive review. Open Vet J. 2024 Jun;14(6):1330-1344.

5- Rua-Domenech R, Goodchild A T, Vordermeier H M, Hewinson R G, Christiansen K H, Clifton-Hadley R S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res. Vet.Sci. 2006; 81: 190-210.

6- Yang H, Kruh-Garcia NA, Dobos KM. Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012 Dec;66(3):273-80.

7- Arefpajoohi R, Zahraei Salehi T, Mosavari N, Salehi Najafabadi Z, YahyaRaeyat R. Cloning and Expression of Virulent Protein CFP-10 from Mycobacterium bovis Strain AN5. J Vet Res. 2021; 76 (1): 124-132 [In Persian].

8- Fifis T, Corner L A, Rothel J S, Wood P R. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified Mycobacterium bovis antigens. Scand J.Jmmunol . 1994; 39: 267-274.

9-B.M.Buddle,A.R.McCathy,T.J.Ryan,J. M.Pollock,H.M.Vordermeier,R.G.Hewinson, et al. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle, The Veterinary Record. 2003;15:615-620.

10-Arefpajoohi R, Zahraei Salehi T, Mosavari N, Salehi Najafabadi Z, YahyaRaeyat R. Cloning and Expression of Virulent Protein CFP-10 from Mycobacterium bovis Strain AN5. J Vet Res. 2021; 76 (1): 124-132[In Persian].

11- Arefpajoohi R, Uses of recombinant antigens ESAT-6 and CFP-10 from Mycobacterium bovis for diagnosis bovine tuberculosis. Faculty of Veterinary Med., University of Tehran; 2019. [In Persian].

12- Mojgani N, Babaie M , Shakibamehr N, Mohammad Taheri M., Mosavari N, Ghaempanah A, et al. 'Purification and biological analysis of specific antigens (ESAT6/CFP10) from Mycobacterium tuberculosis', Iranian J of Vety Sci and Tec. 2020;. 12(2): 59-67.

13- Whelan AO, Clifford D, Upadhyay B, Breadon EL, McNair J, Hewinson GR, et al. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. J Clin Microbiol. 2010; 48(9):3176-81.

14- Frigui W, Bottai D, Majlessi L, Monot M, Josselin E, Brodin P, et al. Control of M tuberculosis ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. PLoS.Pathog. 2008; 4: e33.

15- Palmer M V, Waters W R, Thacker T C, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko K P. Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis. Clin. Vaccine Immunol. 2006; 13: 387-394.

16-Van Soolingen, D., de Haas, P.E.W., Kremer, K. (2001). Restriction Fragment Length

Polymorphism Typing of Mycobacteria. In: Parish, T., Stoker, N.G. (eds) Mycobacterium tuberculosis Protocols. Methods in Molecular Medicine,2001; vol 54. Humana Press.

17- Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. Protein J. 2013; 32(6):419-25.

18- Borham M, Oreiby A, El-Gedawy A, Hegazy Y, Khalifa HO, Al-Gaabary M, et al. Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant Mycobacterium Species. Pathogens. 2022; 21;11(7):715.

19- Mon ML, Moyano RD, Viale MN, Colombatti Olivieri MA, Gamietea IJ, Montenegro VN, et al. Evaluation of cocktails with recombinant proteins of Mycobacterium bovis for a specific diagnosis of bovine tuberculosis. Biomed Res Int. 2014;2014:140829. doi: 10.1155/2014/140829.

20- Parlane NA, Chen S, Jones GJ, Vordermeier HM, Wedlock DN, Rehm BH, Buddle BM. Display of Antigens on Polyester Inclusions Lowers the Antigen Concentration Required for a Bovine Tuberculosis Skin Test. Clin Vaccine Immunol. 2015; 28;23(1):19-26. doi: 10.1128/CVI.00462-15.

21- Buddle BM, McCarthy AR, Ryan TJ, Pollock JM, Vordermeier HM, Hewinson et al. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle, The Vet Rec. 2003;15:615-620.

22- Alito A, McNair J, Girvin RM, Zumarraga M, Bigi F, Pollock JM, Cataldi A. Identification of Mycobacterium bovis antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. Braz J Med Biol Res. 2003; 36(11):1523-31.

23- Stavri H, Bucurenci N, Ulea I, Costache A, Popa L, Popa MI. Use of recombinant purified protein derivative (PPD) antigens as specific skin test for tuberculosis. Indian J Med Res. 2012;136(5):799-807.

New Findings in Veterinary Microbiology
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Quarterly - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 9, Issue 1, Spring 2026, pages: 30-48

Cloning, expression and purification of ESAT-6 protein from *Mycobacterium bovis* strain AN5 and evaluation of immunogenicity of two recombinant proteins ESAT-6 and CFP-10 in guinea pigs

Reza Arefpajoohi[1], Taghi Zahraei Salehi*[2], Nader Mosavari[3], Zahra Salehi Najafabadi[4], Ramak Yahyaraeyat[2]

1. Department of Research and Production of Tuberculin and Mallein, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran,Iran
3. Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension 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:** Taghi Zahraei Salehi, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: tsalehi@ut.ac.ir

Receive: November 22, 2025; Accept: May 13, 2026

10.22034/nfvm.2026.560371.1303

Abstract

Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Bovine Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. *Mycobacterium bovis* is an important species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex group that causes tuberculosis in domestic and wild animals as well as humans in addition to cattle, and therefore the surveillance, control, and eradication of bovine tuberculosis can have important economic and public health impacts in the world. The basis for achieving this important goal is to diagnose cattle infection with this disease by skin test or tuberculin test, slaughter positive cows, and quarantine infected cows. However, the presence of false positive cases in this skin test due to the occurrence of cross-reactions of PPD prepared from the AN5 strain of *Mycobacterium bovis* with other mycobacteria is considered one of its disadvantages, which is why the use of proteins with higher specificity is recommended to overcome it. One of the objectives of this study was to clone, express, and purify the recombinant ESAT-6 protein and evaluate its immunogenicity as an important antigen of *Mycobacterium bovis* in the prokaryotic system. In this study, the *esat*-6 gene encoding the secretory protein ESAT-6 was amplified using the polymerase chain reaction method. Then, the obtained PCR product was digested with two restriction endonuclease enzymes EcoRI and HindIII and then cloned in the plasmid vector pET23a(+) and amplified after transformation in *Escherichia coli* DH5α. In order to express the recombinant ESAT-6 protein, the above vector containing the cloned *esat*-6 gene was transferred to *Escherichia coli* expressing BL21. The correctness of the gene cloning was confirmed by sequencing. In the following study, the recombinant ESAT-6 protein was purified using nickel resin and its antigenic expression was confirmed by Western blotting using specific monoclonal antibodies. The results of gene sequencing along with Western blotting indicated that the obtained recombinant protein was well expressed and purified and could be used in challenge experiments and diagnostic tests like the recombinant CFP-10 protein.

Keywords: *ESAT-6 protein, CFP-10 protein, Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis complex*