



همسانه سازی، بیان و تخلیص پروتئین ESAT-۶ از سویه ی AN۵ مایکوباکتریوم بوویس و ارزیابی ایمنی زایی دو پروتئین نو ترکیب ESAT-۶ و CFP-۱۰ در خو کچه ی هندی

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

۱. بخش تولید توپرکولین و مالین، 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 میکروپزشناسی، 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، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

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

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

doi 10.22034/nfvm.2026.560371.1303

چکیده

مایکوباکتریوم بوویس عامل مسبب سل گاوی است که در زمره بیماری های زئونوز بوده و می تواند 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 واکنش های متقاطع با سایر مایکوباکتریوم ها و ایجاد واکنش مثبت کاذب که جهت فائق آمدن بر آن استفاده از پروتئین هایی با ویژگی بالاتر توصیه می گردد. در این مطالعه ژن ۶-esat با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز تکثیر شد. محصول PCR به دست آمده با دو آنزیم EcoRI و HindIII هضم مضاعف شده و در ناقل پلاسمیدی pET23a(+) کلون گردید و پس از ترانسفورماسیون در اشریشیا کلی DH5α تکثیر شد. به منظور بیان از اشریشیا کلی BL21 استفاده گردید و صحت همسانه سازی ژن ذکر شده با روش تعیین توالی مورد تایید قرار گرفت. در ادامه ی تحقیق، پروتئین نو ترکیب ESAT-۶ طی عملیاتی با رزین نیکل تخلیص گردید و با روش وسترن بلاتینگ، بیان پادگنی پروتئین آن با استفاده از پادتن های تک بنیانی اختصاصی تایید شد. به منظور ارزیابی ایمنی، دو پپتید ESAT-۶ و CFP-۱۰ که قبلاً تهیه گردیده بود، در خو کچه های هندی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج ایمنی زایی در خو کچه های حساس به مایکوباکتریوم بوویس، پوتنسی ESAT-۶ در مقایسه با توپرکولین گاوی را ۶ درصد و پوتنسی CFP-۱۰ در مقایسه با توپرکولین گاوی را ۶۱٪ نشان داد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم بوویس سویه ی AN۵، توپرکولین گاوی، ایمنی زایی 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 کنٹی (*M. canettii*) و مایکوباکتریوم پینیپدی (*M. pinipedii*) است (۱، ۲). از مهم‌ترین و شایع‌ترین گونه‌های این مجموعه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل اصلی سل انسانی و مایکوباکتریوم بوویس عامل اصلی سل گاوی می‌باشد. مایکوباکتریوم بوویس علاوه بر گاو در طیف وسیعی از میزبان‌ها از جمله گوزن، اپاسوم، راکون و انسان نیز ایجاد بیماری می‌کند. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در گاو‌ها به ندرت سل پیش‌رونده ایجاد می‌کند در حالی که گزارش‌های متعددی مبنی بر آلودگی انسان با مایکوباکتریوم بوویس وجود دارد (۳). مایکوباکتریوم بوویس از راه‌های مختلف به‌ویژه شیر گاو‌های آلوده به انسان منتقل می‌شود و در انسان معمولاً 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 (Hypersensitivity 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 توبرکلین می‌گردد می‌توان به ترکیبات مختلف و متنوع پیکر مایکوباکتریوم بوویس از جمله کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها اشاره نمود که همگی می‌توانند نقش بسزایی در کاهش ویژگی آزمون داشته باشند. در نهایت این موضوع باعث ایجاد موارد توبرکلین 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 (۱۱، ۱۲).

دو پروتئین کوچک ایمنی‌زا ۶ کیلو دالتونی ESAT-۶ (Early Secretory Antigenic Target) ۶ KDa و ۱۰ کیلو دالتونی CFP-۱۰ (Culture Filtrate Protein) 10 KDa با ویژگی نسخه‌برداری همگام و بیان همزمان در مایکوباکتریوم بوویس هستند که به‌عنوان عامل حدت و پادگن محافظت‌کننده اهمیت دارند. پروتئین‌های ESAT-۶ و CFP-۱۰ در مراحل اولیه‌ی عفونت با این باکتری بیان و تولید می‌شوند 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 ESAT-۶ در گاوهای آلوده تقویت می‌کند. این دو پروتئین به‌عنوان پادگن‌های مناسب در اهداف تشخیصی نوین به‌شمار آمده و به‌طور مجزا توسط مناطق ژنی *esxA* (ESAT-۶) و *esxB* (CFP10) رمز می‌شوند و به‌دنبال هم در ناحیه‌ی تمایزی RD۱ (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 می‌رود (۱۴ و ۱۵). پروتئین ترشحی ESAT-۶ که توسط ناحیه‌ی ژنی *Rv۳۸۷۵* رمز می‌شود در عصاره صاف شده‌ی کشت مایکوباکتریوهای مجموعه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم کانزاسی (*M. kansasii*) 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 ESAT-۶ متوجه شدند که این پادگن واجد چندین اپی‌توپ لنفوسیت T در سرتاسر توالی آمینو اسیدی خود است که این اپی‌توپ‌ها توسط لنفوسیت‌های T ترشح‌کننده‌ی IFN قابل شناسایی هستند. این مطالعات در واقع پایه اصلی استفاده از ESAT-۶ به‌عنوان جزئی از واکسن-های زیر واحدی (Subunit) سل را ایجاد نمود و از این‌رو محققین مختلف اقدام به استفاده و همسانه‌سازی و بیان این پروتئین به‌صورت تکی و یا فیوژن با پروتئین‌های دیگر نموده‌اند (۱۲، ۱۰، 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 ESAT-۶ می‌تواند در بهبود کارایی آزمون‌های تشخیصی 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 ESAT-۶ و CFP-۱۰ از طریق همسانه‌سازی و بیان ژن‌های *esat-۶* و *cfp-۱۰* مایکوباکتریوم بوویس سویه‌ی A۵ که سویه‌ی مناسب جهت تهیه‌ی PPD برای انجام تست توبرکولین است انجام گرفت که نتایج مربوط به پروتئین CFP-۱۰ به غیر از قسمت ارزیابی ایمنی‌زایی آن قبلاً در سال ۱۴۰۰ طی مقاله‌ای در مجله‌ی تحقیقات دامپزشکی چاپ شده است و از این‌رو در مقاله‌ی حاضر نتایج مربوط به پروتئین ESAT-۶ 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

MBST استفاده شد.

طراحی پرایمر اختصاصی ژن *esat-6* 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 Thermo Fisher Scientific 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 ۲۰mM رقیق سازی و پس از تقسیم در فریزر -20°C نگهداری گردید. دیگر مواد مولکولی مصرفی از دو شرکت Sinaclone و Sigma تهیه شدند.

استخراج DNA استفاده گردید. بدین ترتیب که از باکتری کشت داده شده در محیط اختصاصی لوانشتاین جانشون پیرووات دار (Lowenstein Jensen Pyruvate Medium; LJP)، یک لوپ برداشت گردید و پس از حل نمودن باکتری در TE Buffer 1X، در بن ماری 80°C به مدت 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 *esat-6* از پلاسمید pET23a(+) اخذ شده از بخش بیوتکنولوژی مؤسسه‌ی تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی به‌عنوان حامل (Vector) جهت عملیات همسانه‌سازی ژن *esat-6* سویه‌ی AN5 مایکوباکتریوم بوویس و به‌منظور ترانسفورماسیون ژن همسانه شده *esat-6* از اشریشیاکلی *DH5α* اخذ شده از بخش تولید واکسن تب برفکی همین مؤسسه استفاده گردید. برای استخراج پلاسمید، از دو کیت ساخت شرکت Roche و

جدول ۱- توالی پرایمرهای کلونینگ جهت تکثیر ژن *esat-6*

پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر (bp)
F(<i>EcoRI</i>)	ttatcgaattcatgacagcagcagctgg	
R(<i>Hind III</i>)	Atataagcttgcgaacatcccagtgacg	۲۸۸

به‌ترتیب در جداول ۲ و ۳ آمده است. ژن تکثیر یافته *esat-6* در آگارز ۱٪ در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز گردید. محصول PCR به دست آمده مطابق توصیه PCR product purification Kit ساخت شرکت Roche تخلیص شدند.

واکنش زنجیری پلی‌مرز (PCR) جهت تکثیر ژن

esat-6: مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR جهت تکثیر ژن *esat-6* با حجم نهایی ۱۰۰μl و همچنین برنامه چرخه‌های دمایی PCR در دستگاه Eppendorf Gradient

همسانه‌سازی، بیان و تخلیص پروتئین ESAT-6- از سویه‌ی AN5 مایکوباکتریوم بوویس و ...

جدول ۲- اجزاء تشکیل دهنده‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر ژن *esat-6* مایکوباکتریوم بوویس سویه‌ی AN5

حجم مورد نیاز	مواد
۷۱/۳ μl	M.Q
۱۰ μl	PCR Buffer ۱۰x
۲ μl	dNTPs ۱۰mM
۵ μl	DMSO ۱۰۰٪
۵ μl	Primer F
۵ μl	Primer R
۱ μl	DNA Template
۰/۷ μl	<i>pfu</i> polymerase
۱۰۰ μl	Total

جدول ۳- برنامه دمایی و زمان مربوط به دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن *esat-6* مایکوباکتریوم بوویس سویه‌ی AN5

یک سیکل	۵ دقیقه	۹۵ °C	دنا تورا سیون اولیه
۳۵ سیکل	۴۵ ثانیه	۹۵ °C	دنا تورا سیون
	۴۵ ثانیه	۶۲ °C	آنیلینگ
	۱ دقیقه	۷۲ °C	بسط زنجیره
یک سیکل	۱۰ دقیقه	۷۲ °C	بسط نهایی

Ligase T در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۱۶ °C به مدت یک شبانه روز انجام گرفت. به منظور تکثیر ژن *esat-6* در میزبان زنده‌ی پروکاریوتی، عملیات ترانسفورماسیون ناقل پلاسمیدی همسانه شده حاوی ژن *esat-6* در *شریشیاکلی DH5α* که با روش کلرید کلسیم سرد، مستعد پذیرش شده بود، صورت گرفت. سپس *شریشیاکلی DH5α* به محیط آب‌گوشت لوریا برتانی (Luria Bertani broth) حاوی غلظت مناسب آمپی‌سیلین (۱۰۰ μg/mL) در دمای ۳۷ °C تلقیح شد. عملیات استخراج پلاسمید از *شریشیاکلی DH5α* با روش لیز قلیایی انجام گرفت. غربالگری پلاسمیدهای این مطالعه با انجام پرگنه‌ی PCR (Colony PCR) تأیید شد. جهت تأیید نهایی تعیین توالی به صورت خوانش دو طرفه با پرایمرهای یونی‌ورسال (Universal) صورت گرفت. برای آنالیز توالی‌ها از نرم افزار Chromas version ۲,۶,۴

همسانه‌سازی ژن *esat-6* در حامل پلاسمیدی *pET23a(+)* و ترانسفورماسیون آن در *شریشیاکلی DH5α* به منظور همسانه‌سازی ژن *esat-6* در ناقل پلاسمیدی *pET23a(+)* هضم آنزیمی دوگانه‌ی محصول PCR با دو آنزیم تعیین حدودی *EcoRI* و *HindIII* در دمای ۳۷ °C به مدت 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 صورت گرفته 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 *esat-6* با پلاسمید خطی شده با استفاده از آنزیم ۴

استفاده گردید.

بیان ژن ۶-esat در اشریشیا کلی BL۲۱: به منظور

بیان پروتئین ۶-ESAT، پلاسمیدهای تکثیر یافته حاوی ژن ۶-esat در اشریشیا کلی BL۲۱ مستعد شده به عنوان 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 37°C با سرعت ۱۴۴rpm انجام گرفت. جهت القاء بیان پروتئین ۶-ESAT 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 ۶۰۰nm، ۱ میلی‌لیتر نمونه‌ی زمان صفر (قبل از افزودن IPTG) برداشت گردید. به منظور بهینه‌سازی، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار در حجم نهایی محیط LB Broth محاسبه شد و فاکتورهای در دمای 37°C و 22°C انکوبه و هوادهی شدند. از هر یک از فاکتورهای فواصل زمانی ۲T، ۲T، ۴T و ۱۸T 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 (گردان ۱۲-۴) با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند. رنگ آمیزی ژل پلی‌آکریل‌آمید با کوماسی بلو G-۲۵۰ انجام گرفت (۱۷).

استحصال و تخلیص پروتئین ۶-ESAT بیان شده

در اشریشیا کلی BL۲۱: جهت استحصال پروتئین ۶-ESAT بیان شده که به صورت گرانول در داخل سیتوپلاسم یاخته‌های اشریشیا کلی 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 ضربه و یک دقیقه استراحت با ۵ بار توالی صورت گرفت. محلول کدر به دست آمده‌ی فوق در دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه در 4°C سانتریفیوژ گردید و در مرحله‌ی بعد رسوب با

مخلوطی شامل ۵۰ mM Tris-HCl، ۱۰ mM EDTA، ۱۰۰ mM NaCl و ۵٪ Triton X-۱۰۰ شسته شد و به منظور آنالیز در فریزر 20°C - نگهداری شد.

تخلیص پروتئین ۶-ESAT با استفاده از ستون

Nickle Nitrilotriacetic acid

الف) محلول ساختن پلت باکتریایی محتوی گنجیدگی پروتئین ۶-ESAT با اورهی ۸ مولار: با توجه به این که پروتئین بیان شده با انتهای His-Tagged واجد وزن مولکولی پایین بوده و به فرم نامحلول (Inclusion body) وجود دارد، به هنگام تخلیص با رزین Ni-NTA (Thermo Co.) جهت محلول ساختن آن‌ها اورهی ۸ مولار (Merck Co.) به بافر PBS مورد استفاده اضافه گردید. همچنین در راستای بهینه‌سازی تخلیص و کاهش باند های 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 Solubilization محتوی اورهی ۸ مولار را به دو میکروتیوب افزوده و بعد از پیپت کردن آهسته و حل شدن رسوب، سوسپانسیون به دست آمده به شیکر اربیتالی با دور ۱۶۰rpm در دمای آزمایشگاه به مدت ۴ ساعت منتقل شد. در مرحله بعد Inclusion body محلول شده در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۴۰ دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ و مایع رویی جهت تخلیص جمع‌آوری گردید.

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

- ۱- بطری محتوی رزین به آهستگی و با حرکات اربیتالی در ظرف مخصوص خود همگن گردید.
- ۲- تحت شرایط استریل ۱۰۰μl رزین به دو میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری افزوده شد و در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه در 4°C سانتریفیوژ گردید.

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 blotting: مقدار ۱۵ میکرولیتر از پروتئین‌های تخلیص شده‌ی ESAT-۶ در دو کاست جداگانه‌ی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲/۵ درصد در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۳ ساعت در دستگاه Bio-Rad الکتروفورز شد. یک ژل جهت مشاهده‌ی باندهای پروتئینی با کوماسی بلو R-۲۵۰ رنگ‌آمیزی گردید و از ژل دوم جهت وسترن بلات استفاده شد. جهت عملیات وسترن بلاتینگ، باندهای پروتئینی با استفاده از سیستم Bio-Rad Miniprotein II System مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تأیید تولید پروتئین نو ترکیب ESAT-۶ از روش ایمونوبلاتینگ استفاده گردید (۶). بدین ترتیب که پس از الکتروفورز پروتئین نو ترکیب 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 ۴۰۰ mA به مدت یک ساعت برقرار گردید. بلاک نمودن کاغذ PVDF با غوطه‌ور سازی کاغذ در محلول سرم آلبومین گاوی ۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از شستشوی کاغذ PVDF با بافر تریس نمکی (TBST; Tris-Buffered Saline with Tween)، آنتی بادی اولیه با رقت ۱/۵۰۰۰ (یک پنج هزارم) به مدت یک ساعت روی ممبران افزوده شد. مجدداً کاغذ با بافر TBST شستشو گردید. سپس آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه با HRP (Horse raddish peroxidase) با غلظت ۱/۵۰۰ به ممبران افزوده شد و کاغذ به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه شیک گردید. ممبران پس از شستشو در مجاورت یک درصد DAB (Diaminobenzidine) به همراه آب اکسیژنه ۳۰ درصد و PBS ۱X به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت.

۳- مایع رویی به دقت دور ریخته شد.

۴- دو برابر حجم رزین از Equilibration Buffer به رزین افزوده شد و پس از شیک به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه در 3000 rpm به مدت ۲ دقیقه در ۴°C سانتریفیوژ گردید 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 ۲۰۰ μl از نمونه‌ی تهیه شده به میکروتیوپ مرحله‌ی ۴ افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه به خوبی شیک گردید.

۷- میکروتیوب در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه در ۴°C سانتریفیوژ گردید. مایع رویی در فریزر ۲۰°C - نگهداری شد.

۸- به رزین مرحله قبل، یک میلی‌لیتر از Wash Buffer افزوده شد. پس از شیک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، میکروتیوب در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه در ۴°C سانتریفیوژ گردید. مایع رویی در فریزر ۲۰°C - نگهداری شد.

۹- مرحله‌ی شستشو دو بار تکرار گردید.

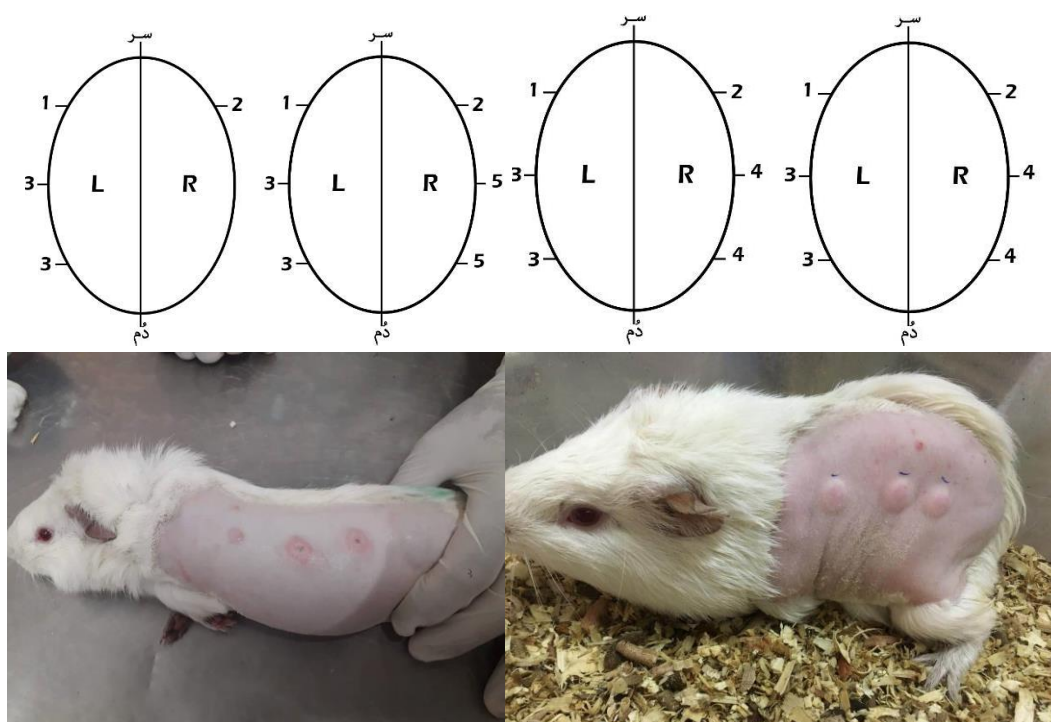
۱۰- هم حجم رزین اولیه، ۱۰۰ μl محلول ۲۵۰ mM Elution Buffer افزوده شد و پس از شیک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، میکروتیوب در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه در ۴°C سانتریفیوژ گردید. مایع رویی جمع آوری شد و همین عملیات مجدداً با ۴۰۰ mM Elution Buffer تکرار شد.

دیالیز محلول پروتئینی به منظور حذف اوره:

به منظور رفلودینگ پروتئین ESAT-۶ و حذف اوره با گرادیان کاهشی و با استفاده از ممبران ۱۰ KDa انجام شد. محلول مورد استفاده محتوی ۵ mM Tris-HCl با pH=۷/۴ به همراه اوره با غلظت‌های ۴، ۶، ۲، ۱ و ۰ بود که به عنوان محلول اطراف کیسه‌ی دیالیز استفاده گردید. این محلول هر ۱۲ ساعت در دمای ۴°C با غلظت‌های پایین‌تر از خود

توبرکولین مرغی (PPD-A)، توبرکولین استاندارد (PPD-S) و پروتئین‌های نوترکیب ۶-ESAT و ۱۰-CFP به صورت داخل جلدی تزریق شد. مقدار پیتیدها ۵۰۱ μg در میلی‌لیتر برای هر آنتی‌ژن و با بافر PBS استریل با pH=۸ 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 به دلیل بلند شدن موی بدن خوکچه در محل تزریق شده، اندازه‌گیری دقیق اریتم با خطا خواهد بود که علت توصیه منابع بین‌المللی جهت قرائت ظرف ۲۴ ساعت در خوکچه این موضوع می‌باشد. 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 دیجیتالی و بر اساس میلی‌متر صورت گرفت. تزریقات با الگوی تصادفی و به صورت کور در هر گروه انجام شد.

ارزیابی پاسخ ایمنی پروتئین‌های نوترکیب ۶-ESAT و ۱۰-CFP در خوکچه‌ی هندی: در این مطالعه ارزیابی ایمنی‌زایی دو پروتئین نوترکیب ۶-ESAT و ۱۰-CFP در مقایسه با توبرکولین گاوی و مرغی ساخت مؤسسه‌ی رازی انجام شد. برای این کار تعداد ۱۰ سر خوکچه‌های هندی نر سفید آلبینو با وزن ۴۰۰ الی ۶۰۰ گرم برای آزمایشات انتخاب شدند. خوکچه‌ها در ۴ گروه دوتایی تقسیم گردیدند. در هر گروه یک خوکچه به عنوان تیمار و دیگری شاهد در نظر گرفته شد. تیمارهای هر گروه به طور جداگانه به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون محتوی پودر سنگ پا، پارافین و پودر کشته‌شده‌ی مایکوباکتریوم بوویس، مایکوباکتریوم آویوم، مایکوباکتریوم نوبرکلوزیس و مایکوباکتریوم فلئو به صورت 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)،



شکل ۱. محل‌های تزریق خوکچه‌های هندی تحت آزمایش

گروه	حیوان حساس شده	پروتئین‌های تزریقی
۱	<i>M. bovis</i>	ESAT-۶
		CFP-۱۰
		PPD-B
		PPD-S
۲	<i>M. avium</i>	ESAT-۶
		CFP-۱۰
		PPD-B
		PPD-S
۳	<i>M. tuberculosis</i>	ESAT-۶
		CFP-۱۰
		PPD-B
		PPD-S
۴	<i>M. phlei</i>	ESAT-۶
		CFP-۱۰
		PPD-B
		PPD-S
۵	شاهد	ESAT-۶
		CFP-۱۰
		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 ESAT-۶ و CFP-۱۰ انجام شد. برای آنالیز آماری نتایج و رسم نمودارها از نرم افزار Bioassay Test استفاده شد. به صورت عملیاتی جهت ارزیابی پوتنسی توبرکولین دامی و انسانی از روش parallel line model

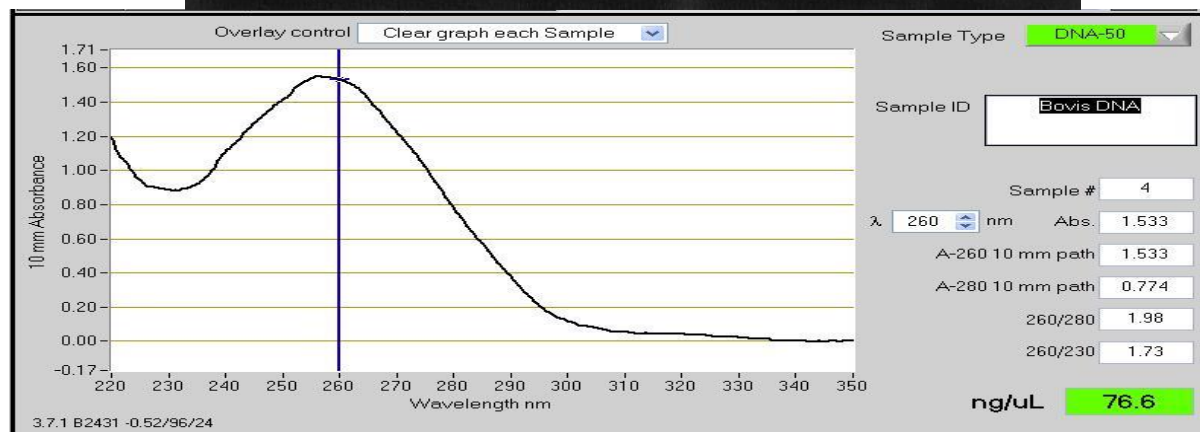
استفاده می‌گردد چنانچه در مورد توبرکولین انسانی ارزیابی پوتنسی محصول نهایی دارای پروتکل جهانی و با رقت ۱۰ و ۵ و ۲/۵ واحدی در خصوص استاندارد ۵ و ۲/۵ واحدی جهت تست می‌باشند. در این مطالعه، هدف اصلی از به کارگیری چارچوب آماری PLM برآورد نسبی پاسخ ایمنی و مقایسه عملکرد آنتی‌ژن‌ها در یک دز ثابت از پیش

استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه نانودراپ انجام شد. همان طوری که در ارزیابی کیفی DNA استخراج شده در ژل در تصویر ۲ کاملاً مشخص است کیفیت DNA استخراج شده بسیار مناسب است. هم چنین در نمودار ترسیمی به وسیله‌ی دستگاه نانودراپ و تعیین نسبت OD در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ این نسبت ۱/۹۸ است که نشان دهنده‌ی خلوص DNA استخراج شده است. جهت آزمون PCR به دلیل بالا بودن غلظت DNA ژنوم استحصال به نسبت ۱ به ۳ رقیق گردید (شکل ۲).

بهینه‌شده بوده است، نه تعیین پوتنسی کلاسیک مبتنی بر منحنی کامل دوز-پاسخ. به همین دلیل، برای ESAT-۶ و CFP-۱۰ تنها «رقت اصلی» (دز واحد) مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

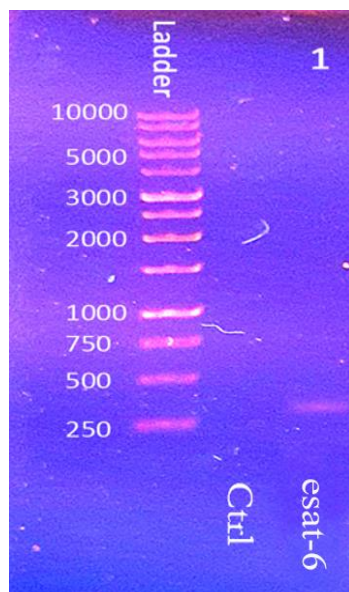
استخراج DNA ژنومی مایکوباکتریوم بوویس سویه‌ی AN5: ارزیابی کیفی و کمی DNA ژنومی استخراج شده از مایکوباکتریوم بوویس سویه‌ی AN5 با



شکل ۲- باندهای واضح DNA استخراج شده از ژنوم مایکوباکتریوم بوویس (بالا)، اندازه‌گیری غلظت DNA استخراج شده با استفاده از نانو دراپ (پایین).

ژن ESAT-۶ که با ۲۸۸ جفت‌باز در تصویر ۳ مشاهده می‌شود با پرایمر طراحی شده به‌خوبی انجام شده است.

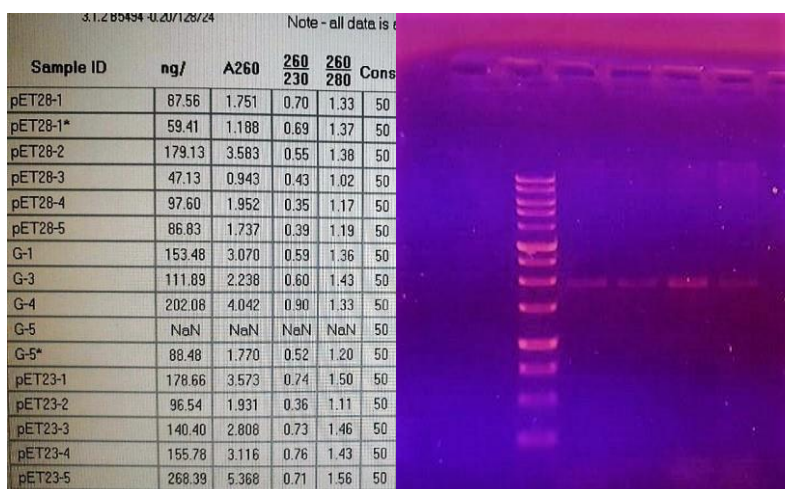
تکثیر ژن ESAT-۶ با PCR: محصول PCR که بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید، نشان داد که تکثیر



تصویر ۳- تکثیر ژن ESAT-۶ مایکوباکتریوم بویس با روش PCR. مارکر مولکولی (Bioneer) 1 Kb، Ctrl1 کنترل منفی، ژن ESAT-۶

شده بود. غلظت پلاسمید با استفاده از نانودراپ در محدوده ۱۰۰-۳۰۰ ng/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-6* 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).

استخراج پلاسمید pET23a(+) از اشریشیا کلی DH۵α، هضم و الحاق آن با ژن ESAT-۶ پس از ترانسفورماسیون پلاسمید فوق به اشریشیا کلی DH۵α، عملیات تکثیر در محیط LB محتوی آنتی بیوتیک مناسب صورت گرفت. در ادامه عملیات استخراج پلاسمید pET23a(+) از باکتری DH۵α انجام شد و مقدار ۳ میکرولیتر از محصول تخلیص شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی گردید (شکل ۴ چپ). عدم داشتن اسمیر و شفافیت باندها، نشان دهنده‌ی کیفیت مناسب پلاسمید استخراج



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

CLUSTAL O(۴/۲/۱) multiple sequence alignment

```

۶۰ sequence CCGCCGCCCAGAATTCCTTCTTAACCTTTTAGTGCTCTTTCAGAAGGAGATATACATAT
• ESAT-۶ -----
EcoRI

۱۲۰ Sequence GTGCTAGCATGACTGGTGGACCCCATATGGGTGCGGGATCCGAATTCATGACAGAGCAGC
۱۳ ESAT-۶ -----Atgacagagcagc
*****

۱۸۰ sequence AGTGAATTTTCGCGGTATCGAGGCCGCGCAAGCGCAATCCAGGAAATGTCACGTCCA
۷۳ ESAT-۶ agtggaatttcgcggtatcgagccgcgcaagcgcaatccagggaatgtcacgtcca
*****

۲۴۰ sequence TTCATTCCTCCTTGACGAGGGGAAGCAGTCCCTGACCAAGCTCGCAGCGCCTGGGGCG
۱۳۳ ESAT-۶ ttcatcctccttgacgaggggaagcagtcctgaccaagctcgagcgccctggggcg
*****

۳۰۰ sequence GTAGCGTTTCGAGGCGTACCAGGGTGTCAGCAAAAATGGGACGCCACGGCTACCGAGC
۱۹۳ ESAT-۶ gtagcggttcgagcgctaccagggtgtccagcaaaaatgggacgccacggctaccgagc
*****

۳۶۰ sequence TGAACAACGCGCTGCAGAACCTGGCGCGGACGATCAGCGAAGCCGGTCAGGCAATGGCTT
۲۵۳ ESAT-۶ tgaacaacgcgctgcagaacctggcggcgacgatcagcaagccggtcaggcaatggctt
*****

HindIII
۴۲۰ sequence CGACCGAAGGCAACGTCAGTGGGATGTTGCAAAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACC
۲۸۵ ESAT-۶ cgaccgaaggcaacgtcaggatgttcgca-----
*****

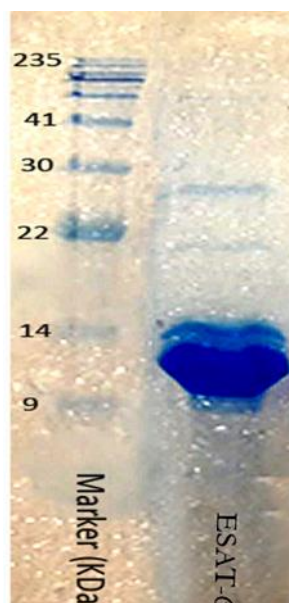
```

تصویر ۵. تجزیه و تحلیل ژن ESAT-۶ پس از الحاق در پلاسمید pET23a(+) با نرم افزار Clustal Omega chromas

Western blotting و SDS-PAGE پروتئین

نو ترکیب ESAT-۶: ترانسفورماسیون ناقل پلاسمیدی pET23a(+) تکثیر یافته حاوی ژن *esat-۶* در *BL21* شریشیالکی مستعد شده صورت گرفت. به منظور بهینه سازی از دمای 22°C و 37°C و از غلظت های سری IPTG با زمان های مختلف استفاده گردید که در نهایت بهترین نتیجه در دمای 37°C با غلظت 0.5Mm طی ۴ ساعت کسب شد. غلظت پروتئین بیانی ESAT-۶ با روش **لوری** حدود $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ برآورد گردید. بیان پروتئین فوق با عملیات وسترن بلاتینگ با پادتن تک بنیانی اختصاصی

ضد پروتئین ESAT-۶ در وزن مولکولی مورد نظر تأیید گردید. سائز مولکولی حدود 14KDa در SDS-PAGE با گرادیان ۱۲٪ بیان موفقیت آمیز پروتئین نو ترکیب فوق را در *BL21* شریشیالکی به خوبی نشان داد. با وجود ماهیت کوچک پپتید و این که غنی از اسیدهای آمینه هیدروفوب می باشد، سائز مولکولی 14KDa در SDS-PAGE احتمالاً مرتبط با رفتار مهاجرتی غیر خطی پپتید می باشد که وزن ظاهری بالاتر از وزن واقعی دیده می شود. البته تجمع توالی های اضافی و کتور و His-tag هم می تواند باعث جابه جایی در ژل گردد.



تصویر ۶. الگوی الکتروفورتیک پروتئین تخلیص شده ESAT-۶ با رزین نیکل با روش SAD-PAGE. ۱- مارکر پروتئینی استاندارد شرکت سیناکلون، ۲- پروتئین تخلیص شده ESAT-۶

ایمنی‌زایی پروتئین‌های نو ترکیب ESAT-۶ و

CFP-۱۰: 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 ۶۶-۱۵۰٪ 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 فلئوی 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 بوویس ۶۱٪، در خوکچه‌های حساس به مایکوباکتریوم فلئوی 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 توپرکولین

ماده‌ی موثره		خوکچه‌ی حساس به مایکوباکتریوم بوویس		خوکچه‌ی حساس به مایکوباکتریوم/اویوم		خوکچه‌ی حساس به مایکوباکتریوم توپرکلوزیس		خوکچه‌ی حساس به مایکوباکتریوم فلئو	
شماره ۱	شماره ۲	شماره ۱	شماره ۲	شماره ۱	شماره ۲	شماره ۱	شماره ۲	شماره ۱	شماره ۲
ESAT-۶ (1)	۱۵	۱۲/۵	۸	۷	۸	۷/۵	۸	۳/۵	۳
CFP-۱۰ (۲)	۱۳/۵	۸	۸	۱۱	۸	۱۱/۵	۱۰	۳	۴
PPD-B (۳)	۱۹/۵	۱۹	۱۱/۵	۱۲	۱۱/۵	۱۵	۱۳/۵	۱۴	۱۴
	۱۷	۲۱	۱۱/۵	۱۲/۵	۱۱/۵	۱۵/۵	۱۵	۱۳/۵	۱۴
PPD-A (۴)	۱۰/۵	۸	۲۱	۱۸	۲۱	-	-	-	-
	۱۰/۵	۷	۲۲/۵	۱۹	۲۲/۵	-	-	-	-
PPD-H (۵)	-	-	-	-	-	۱۷	۱۶	-	-
	-	-	-	-	-	۱۲/۵	۱۵	-	-

بحث

دو گونه‌ی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس در مجموعه‌ی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس (MTC) که به ترتیب 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 (Test Slaughter) 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 توپرکولین (Tuberculin skin test; TST) برای تشخیص بیماری و کشتار حیوانات واکنش‌دهنده است. آزمایش پوستی توپرکولین که در واقع نوعی واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری مبتنی بر پاسخ در برابر تلقیح

داخل جلدی مشتق پروتئین 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 این حال، 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 AN5 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 PPD ها انجام شده است که از آن جمله می‌توان به چهار پروتئین مایکوباکتریایی ESAT-۶، CFP-۱۰، Rv۳۶۱۵ c و Rv۳۰۲۰ c اشاره نمود (۲۰).

در مطالعه‌ای توسط Buddle و همکاران در سال ۲۰۰۳ تعدادی از پادگن‌های مایکوباکتریال شامل MPB۵۹، MPB۶۴، MPB۷۰، MPB۸۳، ESAT-۶ و CFP-۱۰ به شکل پروتئین‌های نو ترکیب یا سنتتیک در گروه‌هایی شامل حیوانات غیر آلوده، حیوانات واکسینه شده با یون 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 ESAT-۶ و CFP-۱۰، 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 ۱۰ kDa و تا حد کم‌تری ۲۰ kDa بود. این قطعات تحریک‌پذیر محتوی MPB۷۰، Ag ۸۵ B، TRB-B، ESAT-۶ و CFP-۱۰ بودند که به‌خوبی قابلیت تحریک سلول T را داشتند. نتایج این تحقیق به‌خوبی این نظر را حمایت می‌کند که پروتئین‌های سبک وزن از قبیل ESAT-۶ 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 ESAT-۶، CFP-۱۰ و MPT۶۴ را در خوکچه‌های هندی حساس شده به BCG و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه‌ی H۳۷ Rv 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 فلئو مشابه بود.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر به روی حیوانات تحت آزمایش نشان داد که پاسخ‌های پروتئین نو ترکیب ESAT-۶ 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 نو ترکیب یا سنتتیک دیگر در مقایسه با توبرکولین گاوی در سطح پایین‌تری قرار گرفت که علت آن به جهت تنوع بالای پروتئین‌ها در مورد توبرکولین گاوی نسبت به پروتئین نو ترکیب می‌باشد که طبقاً قابلیت تحریک بالاتری از سلول‌های T را داشته بنابراین پاسخ قوی‌تری مورد نظر است و نتیجتاً پوتنسی بالاتری خواهند داشت و هدف ۱۰-CFP و ۶-ESAT جایگزینی کامل PPD نیست بلکه افزایش ویژگی آزمون است در نتایج اخذ شده از تحقیق حاضر فراکسیون‌های به دست آمده روی بدن خوکی‌های حساس شده با میکوباکتریوم فلئو به طور محسوسی نسبت به حیوانات حساس شده با دیگر میکوباکتریوم‌های پاتوژن پایین‌تر قرائت شد که این موضوع نشان می‌دهد دو پپتید فوق می‌توانند حیوان آلوده با میکوباکتریوم محیطی از حیوان آلوده به میکوباکتریوم‌های پاتوژن را به خوبی 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 به دلیل کمبود و محدودیت منابع امکان طراحی گروه تزریقی که شامل فیوژن دو پپتید فوق باشد صرف‌نظر گردید. با این وجود استفاده از ۱۰-CFP به تنهایی نتیجه‌ی قابل قبولی در مقایسه با توبرکولین گاوی داشت. این امید می‌رود که با فرمولاسیون ۶-ESAT به همراه دیگر پپتیدها،

بتوان نتایج بهتری کسب کرد. با توجه به اینکه میکوباکتریوم 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 BSL۳، ASL۳ و ملزومات سختگیرانه‌ی پرسنل می‌باشد و با توجه به این که 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 حیوانات مدل استفاده گردید حال آن که در اکثر مطالعات از حیوانات آلوده‌ی عفونی 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، به طور معناداری در سطح پائین‌تری قرار گرفت. با توجه به این که توالی این دو ژن در میکوباکتریوم 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 نو ترکیب 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 خوکی‌های 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 ۶-ESAT / ۱۰-CFP به صورت تجاری در دسترس نیستند و در مرحله تحقیق و توسعه می‌باشند. از نظر ژنومی ژن‌های ۶-esat و ۱۰-cfp هر دو در منطقه‌ی RD۱ قرار داشته و esx-A و esx-B به طور 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 این رو به نظر می‌رسد بیان این دو

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 پایان‌نامه‌ی D.Ph 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.

پیتید به شکل فیوژن ترکیب مناسب‌تری فراهم نماید. هم‌چنین استفاده توأمان ترکیبی از کوکتل پادگن‌های پروتئینی از قبیل Rv۰۲۸۸ و Rv۳۰۲۰ c همراه با پروتئین‌های ESAT-6 و CFP-10 قابلیت تحریک بالاتری از سلول‌های T را فراهم می‌نماید. اگرچه هدف طراحی این مطالعه، بررسی توان تحریک ایمنی مستقل هر پیتید 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 ESAT-6 و CFP-10 بدون مداخله متقابل آن‌ها ارزیابی شود؛ موضوعی که در مطالعات مبتنی بر کمپلکس طبیعی قابل تفکیک نیست. علاوه بر این، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که هر یک از این پروتئین‌ها به‌تنهایی نیز قادر به القای پاسخ‌های ایمنی سلولی قابل تشخیص هستند، هرچند شدت پاسخ ممکن است نسبت به حالت کمپلکس کاهش یابد.

با توجه به نتایج مناسب به‌دست آمده در طی این تحقیق و هم‌چنین نتایج تحقیقات سایر محققان در مورد استفاده از پروتئین‌های نوترکیب ESAT-6 و CFP-10 در آزمایشات بالینی داوطلبین انسانی جهت تشخیص بیماری سل، می‌توان به استفاده از این پروتئین‌های نوترکیب در

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- Arefpajooi 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 Immunol*. 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, Ghaempnah 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 Soelingen, 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.



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

۴۸

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 Arefpajoohi¹, Taghi Zahraei Salehi^{*2}, Nader Mosavari³, Zahra Salehi Najafabadi⁴,
Ramak Yahyaraeyat²

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