

زیرهمسانه‌سازی و بیان ژن SO9 گیاه غاسول صابونی در باکتری *E. coli* و بررسی تیترا آنتی‌بادی آن در موش‌های سوری

امیرحسین برقی^۱، حسین هنری^{۲*}، محمدعلی ابراهیمی^۳، غلامرضا بخشی‌خانیک^۴، سیدمجتبی آقایی^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، مرکز علوم و تکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. دانشیار ژنتیک، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۳. دانشیار علوم کشاورزی، مرکز علوم و تکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۴. استاد سیستماتیک گیاهی، مرکز علوم و تکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۵. دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۶

زمینه و هدف غاسول صابونی دارای ایزوفرم‌های مختلف پروتئین ساپورین است. ساپورین جزو پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزومی (RIPs) است. ایزوفرم SO9 ساپورین‌ها، آدنین ۴۳۲۴ موجود در توالی حفاظت‌شده GAGA را دپورینه می‌کند و باعث اختلال در پروتئین‌سازی می‌شود. در این مطالعه، بیان ایزوفرم SO9 در باکتری *E. coli* و بررسی تیترا آنتی‌بادی آن در موش سوری انجام شد.

مواد و روش‌ها ژن SO9 سنتز شده از پلاسمید pUC57-SO9 نوترکیب توسط آنزیم‌های محدودکننده BamHI و SalI جدا گردید و در وکتور بیانی pET28a(+) زیرهمسانه‌سازی شد. بیان پروتئین نوترکیب با IPTG القا گردید. پروتئین SO9 نوترکیب به وسیله کروماتوگرافی تمایلی نیکل خالص‌سازی شد. برای تأیید پروتئین نوترکیب از تکنیک وسترن بلات^۱ استفاده شد. واکنش‌های سوری با پروتئین تخلیص‌شده به صورت صفاقی انجام و تیترا IgG سرم به وسیله ELISA بررسی شد.

یافته‌ها زیرهمسانه‌سازی ژن SO9 در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله واکنش PCR و هضم آنزیمی تأیید شد. حضور باند پروتئینی ۲۹ کیلودالتون در SDS-PAGE، بیان بالای پروتئین نوترکیب را نشان داد. پروتئین نوترکیب SO9 به وسیله آنتی‌بادی پلی‌کلونال شناسایی شد. بعد از تزریق پروتئین در گروه‌های تست نسبت به گروه‌های کنترل، میزان تیترا آنتی‌بادی تولید شده به وسیله تست ELISA اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌گیری خاصیت ادجوانتی و ایمونوژنی آنتی‌ژن SO9 نوترکیب تخلیص‌شده سبب می‌شود از این آنتی‌بادی برای شناسایی میزان حضور SO9 در گیاه غاسول صابونی، به‌عنوان کاندید واکسن، تهیه کیت تشخیصی و در مطالعات ضدسرطانی سلول‌های انسانی استفاده گردد.

کلیدواژه‌ها:

غاسول صابونی، غیرفعال‌کننده ریبوزوم، بیان SO9.

* نویسنده مسئول: حسین هنری

نشانی: تهران، اتوبان شهید بابایی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، دانشکده علوم پایه

تلفن: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۴ همراه: ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷ نمابر: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۵

رایانه: honari.hosein@gmail.com

شناسه ORCID: 0000-0002-4247-2730

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-7584-0755

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۷، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹، ص ۱۱۲-۱۰۳

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

۱. مقدمه

ساپورین SO6 [۱۵] به دست آمده است. پروتئین بالغ ساپورین S9 دارای ۲۵۳ اسید آمینه است. توالی کامل ساپورین S6 در سال ۱۹۹۰ شناسایی شد و تقریباً ۱۰ درصد اسیدهای آمینه را در ساپورین S6، اسید آمینه لیزین تشکیل داده است. (۱۴) پس از آن در سال ۲۰۰۰، ساختار اسیدهای آمینه ساپورین S9 شناسایی شد که فقط در ۲۲ آمینو اسید نسبت به ساپورین S6 تفاوت داشتند. [۳]

ساپورین SO9 دارای ۲۵۳ آمینو اسید و با وزن مولکولی ۲۸۴۹۲،۹۹ دالتون است. [۳] این پروتئین با IC₅₀ (غلظت مناسب برای ۵۰ درصد بازدارندگی تولید پروتئین) ۰/۰۳۷ نانومول، قوی ترین سم به دست آمده از این گیاه است. [۱۶]

چندین روش برای مرگ سلولی با پروتئین ساپورین S6 وجود دارد. سازوکار مرگ سلولی به گونه‌ای است که زمانی که ساپورین S6 به سیتوپلاسم یا شبکه آندوپلاسمی یا هسته رسید، می‌تواند سبب فعال شدن آپوپتوز (به هر دو شکل وابسته و غیروابسته به کاسپاز)، اتوفازی، نکروزیس و استرس اکسیداتیو شود و سنتز پروتئین را مهار کند. [۱۷-۱۸] ایزوفورم SO9 دقیقاً مانند ایزوفورم شش عمل می‌کند؛ با این تفاوت که دارای IC₅₀، شانزده برابر قوی تر از ایزوفورم شماره ۶ است. [۱۵] پروتئین‌های این گیاه علاوه بر فعالیت ضدویروسی و ضدقارچی [۱۹-۲۰]، توانایی کشتن سلول‌ها از طریق اختلال در سنتز پروتئین‌ها را دارند و از همین رو می‌توانند به عنوان عوامل فعال بیولوژیک و ضدسرطان استفاده شوند. هدف این مطالعه بیان ژن SO9 در *E. coli* و بررسی میزان تیترا آنتی‌بادی در موش سوری بود که با موفقیت حاصل شد.

۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی توالی کامل ژن SO9 گیاه غاسول صابونی از بانک ژن NCBI (با شماره Accession No: X69135.1) استخراج گردید. توالی ژن صناعی مورد نظر به منظور بهینه‌سازی، استفاده صحیح از کدون‌ها برای میزبان مورد نظر، تصحیح مقدار محتوای GC، ایجاد ساختمان ثانویه صحیح برای mRNA، تصحیح نواحی پیرایشی و تعدیل جایگاه‌های برش برای جلوگیری از تداخل در کلونینگ بررسی شد و با در نظر گرفتن جایگاه‌های برش آنزیمی BamHI و Sall در وکتور pUC57 جهت سنتز به شرکت ندای فن سفارش داده شد.

سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α از آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع) با روش کلرید

گیاهان در طبیعت همواره در معرض عوامل بیماری‌زا قرار دارند. برای مقابله با این عوامل، هر گیاه مکانیسم منحصر به فرد خود را دارد. یکی از این مکانیسم‌ها در گیاه غاسول صابونی^۱ به صورت تولید پروتئین‌هایی است که با از کار انداختن پروتئین‌سازی عامل بیماری‌زا، باعث مرگ سلول شده، از پخش شدن بیشتر عامل بیماری‌زای جلوگیری می‌کند. این پروتئین‌ها با نام ساپونین‌ها یا پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریوزومی^۲ شناخته می‌شوند. [۱] RIPها از لحاظ ساختاری به دو گروه اصلی تک‌زنجیره‌ای و دوزنجیره‌ای تقسیم می‌شوند. [۲] این پروتئین‌ها با اختلال در فعالیت ریوزوم‌ها مانع سنتز پروتئین‌ها می‌شوند. این پروتئین‌ها با فعالیت آنزیمی N-گلیکوزیدی، منحصر به فرد عمل می‌کنند و با هیدرولیز پیوند N-گلیکوزید در آدنین (A4324) 28SrRNA در زیر واحد 60s ریوزوم، باعث توقف فعالیت ریوزوم‌ها می‌شوند. [۳] RIPها با وجود داشتن ساختار مشابه و حضور در بافت گیاه، دارای خصوصیات متفاوتی هستند. [۴-۵] تفاوت‌های گزارش شده در مسمومیت برای سلول [۶]، در فعالیت آدنوزین گلیکوزیدی در سوبسترای پلی نوکلئوتیدی [۷] و حساسیت در بازدارندگی RNA آپتامرها است. [۸] ساپونین‌های استروئیدی در تک‌لپه‌ای‌ها و ساپونین‌های تری ترپنوئیدی در دولپه‌ای‌ها حضور دارند. [۹] ساپونین‌ها را می‌توان به وسیله حمل‌کننده‌هایی که آنتی‌بادی‌های خاص را شناسایی می‌کنند، به سلول‌های هدف در بافت‌های جانوری انتقال داد. [۱۰] این پروتئین‌ها دارای خاصیت ضدسرطانی، ضدانگلی، ضدقارچی، ضدباکتریایی و حشره‌کشی هستند. [۱۱] ساپورین‌های زیادی از غاسول صابونی به دست آمده است. [۴] ساپورین دارای خانواده چندژنی است که حداقل ده ایزوفورم پروتئینی متفاوت از بخش‌های مختلف گیاه مانند دانه، برگ و ریشه استخراج شده است. [۴] سمی ترین ایزوفورم‌های ساپورین، ایزوفورم ۵، ۶ و ۹ است. نتایج تطبیق توالی ایزوفورم‌ها به صورت ایزوفورم ۱: ۹۵ درصد، ایزوفورم ۲: ۹۵ درصد، ایزوفورم ۳: ۹۰ درصد، ایزوفورم ۴: ۹۸ درصد، ایزوفورم ۵: ۹۸ درصد، ایزوفورم ۶: ۱۰۰ درصد، ایزوفورم ۷: ۹۸ درصد، ایزوفورم ۸: ۹۸ درصد و ایزوفورم ۹: ۹۱ درصد بوده و بیشترین افتراق با ایزوفورم ۶ مربوط به ایزوفورم ۹ است. این پروتئین در سرتاسر اندام‌های این گیاه وجود دارد؛ ولی بیشترین تجمع آن مربوط به بذر گیاه است. [۴] ساختار اولیه بسیاری از ساپورین‌های غاسول صابونی^۳ از طریق توالی یابی ژنی، کلون‌های cDNA [۱۲-۱۴] و از طریق خالص‌سازی

2. *Saponaria officinalis* L.

1. Ribosome-Inactivating Protein

جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر، ولتاژ ۳۰۰ ولت). برای مشاهده باندهای پروتئین، از روش رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو (R-۲۵۰) استفاده شد. [۲۲] پروتئین‌های نوترکیب به کمک توالی His-tag در انتهای N-terminal خود به وسیله ستون کروماتوگرافی با رزین Ni-NTA تخلیص و توسط ژل الکتروفورز بررسی شدند.

برای تأیید پروتئین نوترکیب و پروتئین طبیعی تخلیص شده از گیاه، از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. بلاتینگ نمونه‌ها روی کاغذ نیتروسولوز انجام شد. ۲۰ میکروگرم از پروتئین در الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد لود شد و از پروتئین آلومین سرم گاوی^۴ (BSA) (سیناژن) به همان مقدار پروتئین هدف به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس ژل از کاست الکتروفورز جدا شده، در بافر بلاتینگ شامل تریس ۲۵ میلی‌مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی‌مولار و اتانول ۲۰ درصد شست‌وشو داده شد. پس از شست‌وشو، ژل در ساندویچ وسترن بلات بسته‌بندی و در تانک وسترن قرار داده شد. فرایند بلاتینگ در آمپر ۱۲۰ و ولتاژ ۷۰ ولت به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. به‌منظور پر کردن جایگاه‌های خالی، کاغذ نیتروسولوز پس از اتمام عمل بلاتینگ به مدت یک شب در محلول ۳ درصد شیرخشک در PBST^۴ در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سه مرتبه با PBST شست‌وشو داده شد. کاغذ با آنتی‌بادی پلی‌کلونال موش سوری با رقت ۱:۵۰۰۰ در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت گرماگذاری شد. فرایند شست‌وشو با PBST سه بار انجام گرفت. کونژوگه موش سوری با رقت ۱:۲۰۰۰ به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه تشخیص دهنده به کار رفت. همانند مرحله قبل گرماگذاری انجام شد. فرایند شست‌وشو نیز همانند مراحل پیشین صورت گرفت. نهایتاً کاغذ نیتروسولوز در محلول سوبسترای رنگ‌زای DAB^۵ (۶۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۸) تا ظهور باند پروتئینی قرار داده شد. برای توقف واکنش، آب مقطر اضافه شد. [۲۲] غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از BSA به‌عنوان استاندارد تعیین شد.

به‌منظور بررسی پاسخ ایمنی، با توجه به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات، از ۶ سر موش سوری (جنس ماده با وزن حدود ۲۳ گرم از دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه بقیه‌الله) به‌عنوان تست و ۴ سر به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر موش سوری، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده با PBS

کلسیم تهیه و ۱۰۰ نانوگرم از پلاسמיד واجد ژن با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد تراخت گردید. سلول‌های واجد پلاسמיד نوترکیب بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غربالگری شد. [۲۱] ۳۷

برای زیرهمسانه‌سازی واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده BamHI و SalI بر روی پلاسמיד pUC57 و وکتور بیانیی pET-28a(+) انجام شد. قطعه ژنی SO9 و pET28a(+) برش‌خورده از روی ژل آگاروز به‌وسیله کیت استخراج DNA تخلیص گردید. [۲۱] ژن SO9 که توسط آنزیم‌های محدودکننده BamHI و SalI برش‌خورده و به وکتور بیانیی pET28a(+) که با همین آنزیم‌ها برش‌خورده و استخراج شده بود، الحاق گردید. واکنش الحاق ژن SO9 و وکتور بیانیی pET28a(+) به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد توسط آنزیم T4 DNA Ligase (شرکت فرمنتاز) صورت گرفت. محصول الحاق با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E. coli* BL21 (DE3) تراخت شد. [۲۱] کلونی‌های نوترکیب با آنتی‌بیوتیک کانامایسین غربال شد و حضور پلاسמיד حاوی ژن SO9 با PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت. برای بیان ژن SO9 از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به پنج میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح و پس از رسیدن OD^۶ به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ماده القاکننده IPTG^۷ با غلظت یک میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. [۲۲]

سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده B حاوی اوره ۸ مولار یک‌نواخت و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با سمپلر بافر دارای غلظت ۵X مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. درنهایت نمونه‌های تیمار شده توسط ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) ۱۲ درصد از لحاظ بیان پروتئین بررسی شدند. [۲۲] نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند (غلظت ژل ۱۲ درصد،

۴. Phosphat-Buffered Salin- Tween
5. Diaminobenzidine

1. Optical Density
۲. Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside
3. Bovine Serum Albumin

میکرولیتر درون هر چاهک ریخته شد. به منظور کنترل اجزای واکنش، در دو چاهک کنترل (فاقد آنتی ژن و فاقد آنتی سرم) نیز کانژوگه اضافه شد تا واکنش با آنتی ژن و نیز کانژوگه با آنتی بادی مشخص گردد. سپس پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انکوبه گردید. ۶. افزودن سوستر و توقف آزمایش: سوستر حاوی محلول OPD^2 حاوی ۳ میلی گرم OPD ، ۵ میلی لیتر بافر سیترات فسفات و ۳ میکرولیتر H_2O_2 بود که به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به هر چاهک اضافه و میکروپلیت به محل تاریکی منتقل شد تا واکنش انجام گیرد. به محض ظهور رنگ در نمونه های کنترل، واکنش با اسید سولفوریک ۲/۵ مولار متوقف و جذب نوری چاهکها در طول موج ۴۹۵ نانومتر خوانده شد. [۲۳-۲۲]

۳. یافته‌های پژوهش

برای بیان قطعه ژنی موجود در وکتور pUC57، قطعه ژنی $SO9$ به پلاسمید بیانی pET28a(+) منتقل گردید. به منظور زیرهمسانه سازی، قطعه مورد نظر در وکتور pUC57 با استفاده از آنزیمهای محدودکننده BamHI و SalI تحت هضم آنزیمی دوگانه قرار گرفت و ژن مورد نظر با طول توالی ۷۵۹ جفت باز از وکتور خارج گردید (شکل ۱، چاهک ۴) و باند وکتور pUC57 قابل مشاهده است. برای قرار دادن قطعه ژنی $SO9$ در وکتور pET28a(+), پلاسمید با آنزیمهای محدودکننده SalI و BamHI خطی شد. بعد از برش آنزیمی، پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص شد. پلاسمید تکباندشده در جریان الکتروفورز در راستای باند ۵۳۶۹ جفت بازی ایستاد. برای قرار دادن قطعه ژنی $SO9$ در پلاسمید pET28a(+) واکنش اتصال با کمک آنزیم T4 لیگاز انجام شد. پس از الحاق ژن و وکتور، وکتور واجد ژن مورد نظر ($SO9$) به سلولهای $E. coli$ BL21 (DE3) تراریخت شد. برای تأیید زیرهمسانه سازی، PCR و برش هضم آنزیمی انجام گرفت. پس از تکثیر ژن $SO9$ به روش PCR، محصول روی ژل ۱ درصد آگاروز مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعه مورد نظر (۷۵۹ جفت باز) در شکل ۱، چاهک ۲ از لحاظ اندازه همخوانی داشت. همچنین پلاسمیدهای pET28a(+) حاوی قطعه ژنی $SO9$ با دو آنزیم محدودکننده BamHI و SalI هضم شدند که قطعات به دست آمده (۷۵۹ جفت باز و ۵۳۶۹ جفت باز، شکل ۱، چاهک ۵) از لحاظ اندازه همخوانی داشت.

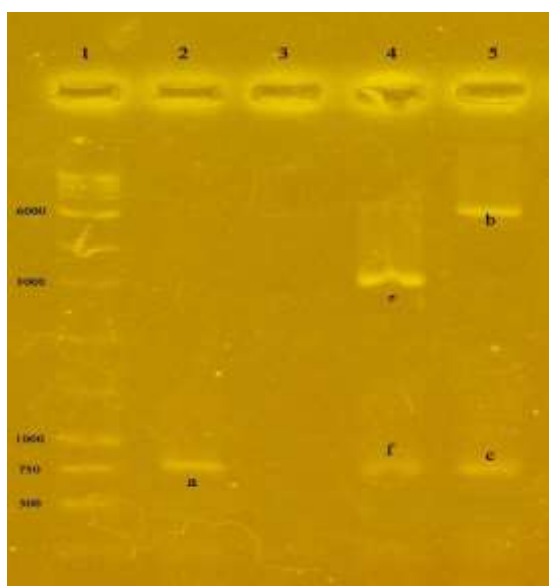
استریل به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. جهت آماده سازی نمونه‌ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوانت روغن در آب^۱ اضافه گردید (حجم نهایی ۱ میلی لیتر) و سپس محتویات همگن گردید. در پایان، به هر موش سوری تست ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده که حاوی ۲۰ میکروگرم آنتی ژن مورد نظر بود، به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

تعیین تیتراژ آنتی بادی به روش الایزای غیرمستقیم:

۱. تثبیت پروتئین به عنوان آنتی ژن در کف میکروپلیت: مقدار ۵ میکروگرم پروتئین نو ترکیب محلول در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ^۲ داخل هر یک از چاهکهای الایزا ریخته و دو چاهک جهت کنترل در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه قرار داده شد. ۲. شست و شوی چاهکها با PBST: این عمل پس از هر مرحله اصلی آزمایش الایزا و پس از تخلیه مواد هر مرحله صورت گرفت و سپس با ضربه زدن روی تنظیف پارچهای خشک شد. ۳. مسدود کردن محل های خالی از آنتی ژن در کف چاهکها: محلول ۵ درصد شیر خشک در PBST به چاهکها اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. این عمل جهت جلوگیری از واکنشهای ناخواسته سرم و کانژوگه با میکروپلیت صورت گرفت. ۴. تهیه سریال رقت از سرم حیوانات تست و کنترل: جهت تهیه سریال رقت از سرم حیوانات، ابتدا از هر سرم موش ۳ میکرولیتر برداشته و در ۳۰۰ میکرولیتر بافر PBST ریخته و به خوبی پیمت گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به درون چاهک اول (A) و دوم (A) منتقل شد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBST نیز به درون چاهکهای دوم (B) تا ششم (F) ریخته شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر سرم رقیق شده از درون چاهک دوم به چاهک سوم منتقل شد و به کمک سمپلر با پیمت کردن کاملاً مخلوط گردید (حدود هشت بار پیمت شد). بدین ترتیب، چاهک دوم نسبت به چاهک اول ۱/۲ رقیق شد و این عمل تا چاهک ششم ادامه یافت و هر چاهک نسبت به چاهک قبل از خود به میزان ۱/۲ رقیق گردید. به چاهک کنترل حاوی آنتی ژن، ۱۰۰ میکرولیتر PBST و به چاهک کنترل حاوی آنتی بادی، ۱۰۰ میکرولیتر از سرم با رقت چاهک اول افزوده شد. سپس میکروپلیت به مدت یک ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. ۵. افزودن کانژوگه: رقت ۱:۱۵۰۰ از کانژوگه موش سوری در PBST تهیه و از آن به میزان ۱۰۰

3. O-Phenilenediamine

1. oil in water
2. Cotting Buffer

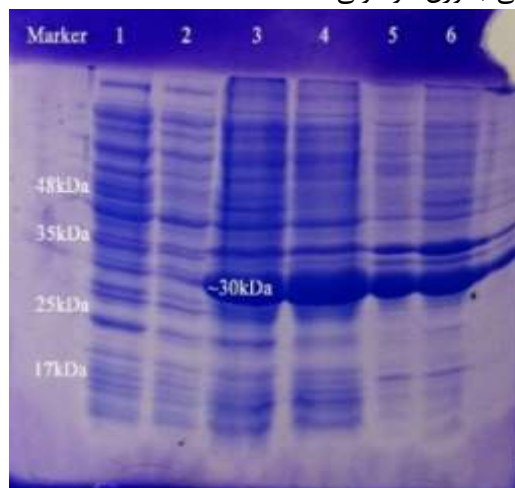


شکل ۱. تأیید زیرهمسانه‌سازی ژن هدف در **pET28a(+)**

چاهک ۱: نشانگر DNA ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک ۲: باند حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن *SO9* در جایگاه ۷۵۹ جفت بازی؛ چاهک ۳: کنترل منفی؛ چاهک ۴: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی وکتور **pUC57** (جفت باز ۳۰۰۰، ۷۵۹ جفت باز؛ چاهک ۵: باند های حدود ۵۳۶۹ جفت باز و ۷۵۹ جفت بازی مربوط به خطی شدن پلاسمید **pET28a(+)** پس از واکنش هضم آنزیمی دوگانه است.

۲۹/۵ کیلودالتون مشاهده گردید (شکل ۲). برای رهاسازی پروتئین نوترکیب *SO9* چند بار سونیکاسیون ضروری است.

پس از تأیید زیرهمسانه‌سازی، بیان سلول‌های مورد تأیید انجام گرفت و بررسی بیان بر روی ژل الکتروفورز ۱۲ درصد اعمال شد. پس از رنگ‌آمیزی، باند پروتئینی با وزن مولکولی

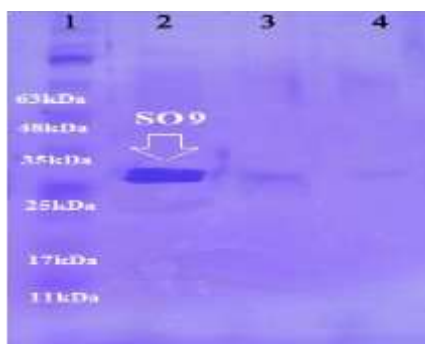


شکل ۲. تصویر الکتروفورز **SDS-PAGE** ۱۲ درصد حاصل از بیان پروتئین نوترکیب

ستون ۱: شاهد، ستون ۲: نمونه با القای **IPTG** در محلول **PBS**، ستون ۳-۶: رسوب حاصل از سونیکاسیون اول، دوم، سوم و چهارم نمونه با القای **IPTG**

شد که پروتئین تک‌باند حاصل در راستای ۲۹/۵ کیلودالتون قرار داشت و تخلیص پروتئین نوترکیب مورد تأیید بود (شکل ۳).

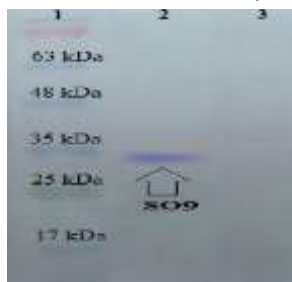
پس از تأیید بیان ژن *SO9* به وسیله ژل الکتروفورز، پروتئین نوترکیب مورد نظر با استفاده از ستون **Ni-NTA** تخلیص و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز



شکل ۳. تصویر الکتروفورز حاصل از تخلیص پروتئین از ستون نیکل با استفاده از ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE ستون ۱: مارکر شماره ۳۱۰۰۰۳، ستون ۲: بافر Elu100، ستون ۳: بافر Elu250، ستون ۴: بافر MES

در نزدیکی ۲۹/۵ کیلوالتون مشاهده شد. در ستون شاهد که تحت القای IPTG نبود، باندی مشاهده نشد (شکل ۴).

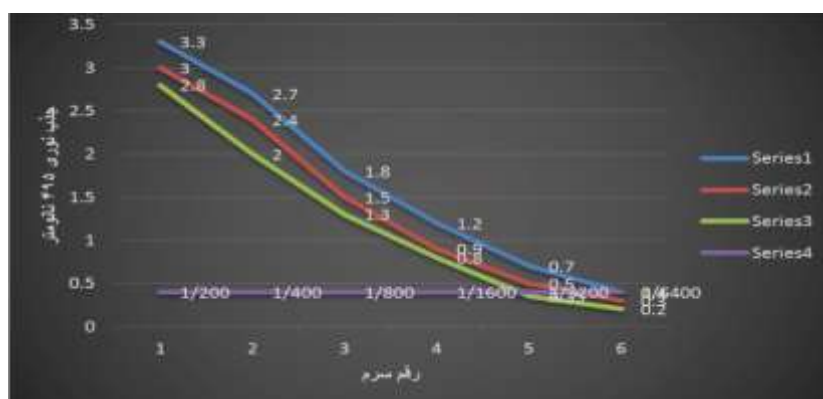
به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. در این روش، آنتی بادی پلی کلونال به کار رفت. در ستون تست که مربوط به نمونه القاشده با IPTG است، یک باند



شکل ۴. تایید پروتئین نو ترکیب بیان شده با استفاده از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال ستون ۱: مارکر با شماره ۳۱۰۰۰۳، ستون ۲: نمونه القاشده با IPTG، ستون ۳: کنترل بدون القای IPTG

ایمن شده و شاهد، الایزا برای بررسی تیتر آنتی بادی انجام شد. نمودار ایمن سازی پس از هر بار خون گیری رسم گردید. تزریق آنتی ژن باعث تحریک ایمنی هومورال گردید و افزایش تیتر آنتی بادی به ازای هر بار تزریق مشاهده شد (شکل ۵).

برای پروتئین طبیعی تخلیص شده از کالوس گیاه نیز وسترن انجام شد و در راستای ۲۹/۵ کیلوالتون، باند پروتئینی مشاهده شد. [۴۷] برای بررسی تیتر آنتی بادی، پس از خون گیری از حیوانات



شکل ۵. بررسی تیتر آنتی بادی با استفاده از تکنیک الایزا سری ۱ تا ۳ تیمار و سری ۴ شاهد است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

غاسول صابونی یکی از گیاهان کمیاب در ایران است که در مناطق معتدل و مرطوب خزری، در کنار جاده‌ها و رودخانه‌ها می‌روید. ساپونین یکی از ترکیبات فعال زیستی تولیدشده توسط این گیاه است و کاربردهای متعددی در حوزه پزشکی (شیمی‌درمانی)، کشاورزی (تولید سم) و بهداشت (تولید مواد شوینده و پاک‌کننده) دارد. [۲۳] ساپورین را می‌توان از ریشه، برگ، کالوس و بذر گیاه غاسول صابونی استخراج کرد. [۴] ساپورین دارای حداقل ۱۰ ایزومر است و ایزومر ۹ آن یکی از سمی‌ترین ایزوفرم‌هاست. ایزوفرم‌های ۳، ۴، ۶ و ۹ از دانه جدا شده است. پروتئین ساپورین SO9 خانواده‌ای از این آنزیم‌های سمی با ماهیت پروتئینی است که در یوکاریوت‌ها با اختلال در کار ریبوزوم‌ها و دیگر اندام‌های سیتوپلاسمی در تولید پروتئین‌ها وقفه ایجاد می‌کند و در نهایت موجب مرگ سلول می‌شود. غلظت مهارکنندگی^۱ در ایزوفرم‌های مختلف متفاوت است. ایزوفرم‌های ۵، ۶ و ۹ جزو قوی‌ترین ایزوفرم‌هاست؛ به صورتی که این غلظت برای سه ایزوفرم نام‌برده به ترتیب ۰/۰۵ نانومولار، ۰/۰۶ نانومولار و ۰/۰۳۷ نانومولار است. [۱۵] مقایسه عملکرد دو ایزوفرم از دانه ساپورین (ایزوفرم ۵ و ۶) نشان می‌دهد که ایزوفرم ۶، به دلیل داشتن IC₅₀ کمتر، خاصیت آنزیمی و فعالیت سمی بیشتری از ایزوفرم ۵ دارد. [۳۰] بر همین اساس، ساپورین S9 با داشتن کمترین میزان IC₅₀ (۰/۰۳۷ نانومول) دارای بیشترین میزان سمیت است. اثر سمیت ساپورین S9 توسط مهار سنتز پروتئین شروع می‌شود؛ اما مشاهده غیرفعال‌کنندگی ریبوزوم با دپورینه کردن DNA و دیگر نوکلئیک اسیدهایی که از یکدیگر واسرشت شده‌اند، آغاز می‌گردد. اولین توصیفی که از ساپورین می‌توان گفت، توانایی کشتن سلول‌ها با آپوپتوز است که در سال ۱۹۹۶ کشف شد. برخی از ویژگی‌های آپوپتوز مانند قطعه‌قطعه شدن کروماتین، اجسام آپوپتوتیک، سلول‌های هیپودیپلوئید در لنفوسیت‌ها و بسیاری از رده‌های سلولی سرطان خون پیدا شده‌اند. [۳۱-۳۲] ساپورین S9 مانند ورود مایعات به صورت غیرفعال و به شکل پینوسیتوز [۳۳-۳۴] و یا از طریق گیرنده‌های α₂-macroglobulin وارد شده و در نتیجه سمیت نسبتاً کمتری از نوع دو غیرفعال‌کننده‌ها دارند. با این حال، اگر آن‌ها را وارد لیبوزوم‌ها کنیم [۳۵] و یا در بطن گلبول‌های قرمزی که می‌توانند به سلول‌های دیگر اتصال یابند [۳۶-۳۹] وارد کنیم، خاصیت سمی غیرفعال‌کننده‌های نوع یک، قوی‌تر از نوع دو می‌شوند. این گیاه در دسته RIP قرار دارد. RIPها فعالیت N-

گلیکودازی دارند؛ یعنی یک آدنین خاص را از حلقه سارسین/رایسین زیرواحد بزرگ rRNA حذف می‌کند. [۲۴-۲۵، ۴۰] RIPها با فعالیت N-گلیکودازی، پیوند بین آدنین و گوانین در توالی حفاظت‌شده GAGA واقع در حلقه آلفا - سارسین/رایسین (Sarin-Ricin Loop (R/S)) زیرواحد 28SrRNA را جدا (دپورینه) می‌کنند. این جدا کردن آدنین^۲ از حلقه S/R، از ایجاد فاکتور شماره ۲ طولیل شدن در ریبوزوم (یعنی اتصال GTP به EF-2) و ادامه طولیل شدن رشته پروتئینی جلوگیری کرده، باعث توقف سنتز پروتئین می‌شود. [۲۶، ۳۷-۳۸] گزارش شده است که RIPها آدنین را نیز از زیرگونه‌های مختلف، به‌ویژه از اشکال مختلف DNA، حذف می‌کنند. [۷، ۲۷، ۴۲] این آنزیم‌ها ممکن است اهمیت درمانی بسیاری در ساخت سموم شیمیایی مانند ایمونوتوکسین‌ها داشته باشند که برای درمان انواع مختلف سرطان، بیماری‌های خودایمنی و عفونت اچ‌آی‌وی مفید هستند. [۲۸-۲۹، ۴۱]

ورود RIPها به سلول‌ها را می‌توان توسط پالس‌های الکتریکی [۴۴]، امواج [۴۵] و یا ورود فتوشیمیایی [۴۶] تسهیل کرد. RIPها علاوه بر فعالیت N-گلیکودازی دارای چندین فعالیت آنزیمی دیگر مانند فعالیت کیتینازی، سوپراکسید دیسموتازی، Dnase و لیپازی هستند. [۱۵] از آنجایی که این ترکیبات بسیار پایدار بوده و فعالیت آنزیمی قوی از خود نشان می‌دهند، توانایی از بین بردن سلول‌ها از طریق اختلال در سنتز پروتئین‌ها را دارند و از آنتی‌بادی این ترکیبات به‌عنوان کیت تشخیصی عامل بیوتروریستی سم گیاهی غاسول صابونی در جنگ‌های بیولوژیک و همچنین به عنوان یک ترکیب ضدسرطان قوی می‌توان استفاده کرد. [۲۵] تولید RIPها در میزبان باکتری دارای مشکلات عدیده‌ای است. به دلیل سمی بودن RIPها برای خود میزبان، باکتری مجبور به غیر مجلول کردن پروتئین نوترکیب بوده که محلول نمودن آن برای جداسازی به چندین سونیکاسیون نیاز دارد. برای خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب یو کاریوتی ضرورت دارد تا ۱۲ بار عمل سونیکاسیون بر روی لاشه باکتری انجام گیرد. ساپونین‌ها دارای خاصیت اجوانتی بوده که با یک یا دو بار تزریق به حیوان آزمایشگاهی آنتی‌بادی مورد نظر به‌دست خواهد آمد. [۴۷، ۲۳]

با توجه به اینکه ساپورین توانایی غیرفعال کردن ریبوزوم‌ها را دارد و همچنین با توجه به تولید آنتی‌بادی در موش سوری می‌توان از آن به‌عنوان کاندید واکسن و همچنین در درمان تومورهای سرطانی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام

حسین(ع)، جهت مساعدت در اجرای پروژه سپاس‌گزاری می‌شود.

References

- [1]. Stirpe F, Battelli M. Ribosome-Inactivating Proteins: Progress and Problems. Cellular and Molecular Life Sciences 2006; 63(16): 1850-66.
- [2]. Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase Activity of Ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. Journal of Biological Chemistry 1987; 262(17): 8128-30.
- [3]. Maro AD, Ferranti P, Mastronicola M, Polito L, Bolognesi A, Stirpe F. Reliable Sequence Determination of Ribosome-Inactivating Proteins by Combining Electrospray Mass Spectrometry and Edman degradation. Journal of mass spectrometry 2001; 36(1): 38-46.
- [4]. Ferreras J, Barbieri L, Gírbés T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ. Distribution and Properties of major Ribosome-Inactivating Proteins (28 S rRNA N-Glycosidases) of the Plant *Saponaria Officinalis* L.(Caryophyllaceae). BBA 1993; 1216(1): 31-42.
- [5]. Massiah AJ, Hartley MR. Wheat Ribosome-Inactivating Proteins: Seed and Leaf forms with different Specificities and Cofactor Requirements. Planta. 1995; 197(4): 633-40.
- [6]. Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants. BBA 1993; 1154(3-4): 237-82.
- [7]. Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F. Polynucleotide: Adenosine Glycosidase Activity of Ribosome-Inactivating Proteins: effect on DNA, RNA and poly (A). Nucleic acids research 1997; 25(3): 518-22.
- [8]. Hirao I, Madin K, Endo Y, Yokoyama S, Ellington AD. RNA Aptamers that Bind to and Inhibit the Ribosome-Inactivating Protein, Pepocin. Journal of Biological Chemistry 2000; 275(7): 4943-8.
- [9]. Bruneton I. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. 2nd Edition. Lavoisier publishing; 1995: 1136 .
- [10]. Frankel AE. Immunotoxins. 1st ed. Springer Science & Business Media. 2012: 100.
- [11]. Sparg S, Light M, Van Staden J. Biological Activities and Distribution of Plant Saponins. Journal of ethnopharmacology 2004; 94(2): 219-43.
- [12]. Benatti L, Saccardo MB, Dani M, Nitti G, Sassano M, Lorenzetti R. Nucleotide Sequence of cDNA Coding for Saporin-6, A type-1 Ribosome-Inactivating Protein from *Saponaria Officinalis*. FEBS 1989; 183(2): 465-70.
- [13]. Fabbrini MS, Rappocciolo E, Carpani D, Solinas M, Valsasina B, Breme U. Characterization of a Saporin Isoform with lower Ribosome-Inhibiting Activity. Biochemical Journal 1997; 322(3): 719-27.
- [14]. Maras B, Ippoliti R, De Luca E, Lendaro E, Bellelli A, Barra D. The Amino Acid Sequence of a Ribosome-Inactivating Protein from *Saponaria Officinalis* Seeds. Biochemistry international 1990; 21(5): 831-8.
- [15]. Schrot J, Weng A, Melzig MF. Ribosome-Inactivating and Related Proteins. Toxins 2015; 7(5): 1556-615.
- [16]. Fordham-Skelton AP, Taylor PN, Hartley MR, Croy RR. Characterisation of Saporin Genes: in Vitro Expression and Ribosome Inactivation. MGG 1991; 229(3): 460-6.
- [17]. Daniels-Wells TR, Helguera G, Rodríguez JA, Leoh LS, Erb MA, Diamante G. Insights into the Mechanism of Cell Death induced by Saporin Delivered into Cancer Cells by an Antibody Fusion Protein Targeting the Transferrin Receptor 1. Toxicology in Vitro 2013; 27(1): 220-31.
- [18]. Kroemer G, Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC. To Die or not to Die: That is the Autophagic Question. Current Molecular Medicine 2008; 8(2): 78-91.
- [19]. Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J. Biochemical and Molecular Characterization of Three Barley Seed Proteins with Antifungal Properties. Journal of Biological Chemistry 1991; 266(3): 1564-73.
- [20]. Duggar BM, Armstrong JK. The Effect of Treating the Virus of Tobacco Mosaic with the Juices of Various Plants. Ann Mo Bot Garden 1925; 12(4): 359-66.
- [21]. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edition. ColdSpring-Harbour Laboratory Press, UK. 2001.
- [22]. Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. Recombinant and Truncated Tetanus Neurotoxin light chain: Cloning, Expression, Purification, and Proteolytic Activity. Protein Expr Purif 1999; 15(2): 221-7.
- [23]. Abdollahi M, Honari H, Nazarian SH, Masoudi KM. Subcloning and Expression of SO6 Gene, *Saponaria Officinalis* Plant in E. coli and Investigation of Antibody Titer in Rats. J of Med Sci 2017; 24(12): 1024-1033. (persian)
- [24]. Nielsen K, Boston RS. Ribosome-Inactivating Proteins: A Plant Perspective. Annu Rev Plant Biol 2001; 52(1): 785-816.
- [25]. Stirpe F. Ribosome-Inactivating proteins. Toxicon 2004; 44(4): 371-83.
- [26]. Walsh MJ, Dodd JE, Hautbergue GM. Ribosome-Inactivating Proteins: Potent Poisons and Molecular Tools. Virulence 2013; 4(8): 774-84.
- [27]. Gírbés T, Ferreras JM, Arias FJ, Stirpe F. Description, Distribution, Activity and Phylogenetic Relationship of Ribosome-Inactivating Proteins in Plants, Fungi and Bacteria. Mini-Rev. Med. Chem 2004; 4(5): 461-76.
- [28]. Qi L, Nett TM, Allen MC, Sha X, Harrison GS, Frederick BA. Binding and Cytotoxicity of Conjugated and Recombinant Fusion Proteins Targeted to the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. Cancer Res 2004; 64(6): 2090-5.
- [29]. Bolognesi A, Polito L, Tazzari PL, Lemoli RM, Lubelli C, Fogli M. In Vitro Anti-Tumour Activity of Anti-CD80 and anti-CD86 Immunotoxins Containing Type 1 Ribosome-Inactivating Proteins. Br. J. Haematol 2000; 110(2): 351-61.
- [30]. Bagga S, Seth D, Batra JK. The Cytotoxic Activity of Ribosome-Inactivating Protein Saporin-6 is Attributed to its rRNA N-glycosidase and Internucleosomal DNA Fragmentation Activities. J. Biol. Chem 2003; 278(7): 4813-20.
- [31]. Bolognesi A, Tazzari PL, Olivieri F, Polito L, Falini B, Stirpe F. Induction of Apoptosis by Ribosome-Inactivating Proteins and Related Immunotoxins. J. Biol. Chem 1996; 68(3): 349-55.
- [32]. Bergamaschi G, Perfetti V, Tonon L, Novella A, Lucotti C, Danova M. Saporin, a Ribosome-Inactivating Protein used to Prepare Immunotoxins, Induces Cell Death via Apoptosis. Br. J. Haematol 1996; 93(4): 789-94.
- [33]. Colaço M, Bapat M, Misquith S, Jadot M, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R. Uptake and Intracellular Fate of Gelonin, a Ribosome-Inactivating Protein, in Rat Liver. Biochem. Biophys. Res. Commun 2002; 296(5): 1180-5.
- [34]. Cavallaro U, Nykjaer A, Nielsen M, Soria MR. α 2-Macroglobulin Receptor Mediates Binding and Cytotoxicity of Plant Ribosome-Inactivating Proteins. The FEBS Journal 1995; 232(1): 165-71.
- [35]. McIntosh DP, Heath TD. Liposome-Mediated Delivery of Ribosome Inactivating Proteins to Cells in Citro. BBA-BIOMEMBRANES 1982; 690(2): 224-30.
- [36]. Foxwell B, Long J, Stirpe F. Cytotoxicity of Erythrocyte Ghhosts Loaded with Ribosome-Inactivating Proteins following Fusion with CHO cells. Chem. Biochem 1984; 8(6): 811-9.
- [37]. Spooner RA, Watson PD, Marsden CJ, Smith DC, Moore KA, Lord JM. Protein Disulphide-Isomerase Reduces Ricin to its A and B Chains in the Endoplasmic Reticulum. Biochem J 2004; 383(2): 285-93.
- [38]. Roberts LM, Lord JM. Ribosome-Inactivating Proteins: Entry into Mammalian Cells and Intracellular Routing. Mini-Rev. Med. Chem 2004; 4(5): 505-12.

- [40]. Spooner RA, Hart PJ, Cook IP, Pietroni P, Rogon C, Höhfeld J. Cytosolic Chaperones Influence the Fate of a Toxin Dislocated from the Endoplasmic Reticulum. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105(45): 17408-13.
- [41]. Polito L, Bortolotti M, Mercatelli D, Battelli MG, Bolognesi A. Saporin-S6: A Useful Tool in Cancer Therapy. *Toxins* 2013; 5(10): 1698-722.
- [42]. Bagga S, Hosur M, Batra JK. Cytotoxicity of Ribosome-Inactivating Protein Saporin is not Mediated Through $\alpha 2$ -macroglobulin receptor. *FEBS lett* 2003; 541(1-3): 16-20.
- [43]. Vago R, Marsden CJ, Lord IM, Ippoliti R, Flavell DJ, Flavell SU. Saporin and Ricin A Chain follow different Intracellular Routes to enter the Cytosol of Intoxicated Cells. *The FEBS journal* 2005; 272(19): 4983-95.
- [44]. Rust A, Hassan HH, Sedelnikova S, Niranjani D, Hautbergue G, Abbas SA. Two Complementary Approaches for Intracellular Delivery of Exogenous Enzymes. *Sci. Rep* 2015; 5: 1244.
- [45]. Mir LM, Banoun H, Paoletti C. Introduction of Definite Amounts of Nonpermeant Molecules into Living Cells after Electroporation: Direct Access to the Cytosol. *Exp. Cell Res* 1988; 175(1): 15-25.
- [46]. Kodama T, Doukas AG, Hamblin MR. Delivery of Ribosome-Inactivating Protein Toxin into Cancer Cells with Shock Waves. *Cancer lett* 2003; 189(1): 69-75.
- [47]. Selbo PK, Høgset A, Prasmickaite L, Berg K. Photochemical Internalisation: A Novel Drug Delivery System. *Tumor Biol* 2002; 23(2): 103-12.
- [48]. Honari H, E'temad Aubi SM, Esmaili F, Abdollahi M. Evaluation of SO6 Protein in *Saponaria Officinalis* L. Callus. *Rangeland Ecol. Manage* 2018; (51): 23-31.

Sub Cloning and Expression of *SO9* gene, *Saponaria Officinalis* L Plant in *E. Coli* and Investigation of Antibody Titer in Mouse

Amir Hossein Barghi¹, Hosein Honari^{2*}, Mohamad Ali Ebrahimi³, Gholam Reza Bakhshi Khaniki⁴, Seyed Mojtaba Aghaie⁵

1. MSc in Plant Biotechnology, Science and Technology Center, Payam Noor University, Tehran, Iran
2. Associate Professor of Genetics, Center for Science and Technology of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
3. Associate Professor of Agricultural Sciences, Science and Technology Center, Payam Noor University, Tehran, Iran
4. Master of Systematic Vegetation, Science and Technology Center, Payam Noor University, Tehran, Iran
5. PhD. student of Bacteriology, Center for Science and Technology of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: *Saponaria officinalis* have various saponin isoforms. Saponin is a ribosome-inactivating protein (RIP). The *SO9* isoform of saponins depurinates the adenine 4324 in the preserved GAGA sequence resulting in impairment of protein production. In this study, the *SO9* isoform was expressed in *E. coli* and its antibody titers were evaluated in Mouse.

Materials and Methods: The *SO9* gene was synthesized and isolated from the pUC57-*SO9* recombinant plasmid using the restriction enzymes BamH1 and Sal1, and then cloned in the expression vector pET28a(+). Expression of the new recombinant protein was induced by IPTG. The recombinant *SO9* protein was purified by Ni affinity chromatography. The recombinant protein was confirmed through western blotting. The Mouse were vaccinated through intraperitoneal injection of the purified protein and serum IgG titer was measured through ELISA.

Results: Subcloning of *SO9* gene in the pET28a (+) expression vector was confirmed by PCR and enzymatic digestion. The presence of 29 kDa protein band in SDS-PAGE showed the high expression of recombinant protein. The recombinant *SO9* protein was detected by polyclonal antibody. After injection of the protein to the test groups, the antibody titer was measured by ELISA.

Conclusion: The adjuvant property and immunogenicity of the purified recombinant *SO9* antigen showed that this antibody can be used to detect the presence of *SO9* in *Saponaria officinalis*, as a candidate for vaccine, for production of diagnostic kits, and in human cells anticancer studies.

Received: 2019/03/11

Accepted: 2019/05/06

Keywords: *Saponaria officinalis* L, RIP, expression *SO9*.