Journal of Marine Medicine
Winter 2025, Volume 6, Issue 4
Pages: 293-300
10.30491/6.4.293

Cloning, expression, and proliferation of the S2 Gene of SARS-CoV-2 in *Lactococcus lactis* for recombinant vaccine design

Fatemeh Afshar [1], Mehrdad Memarian [3], Morteza Mahdavi [2], Mohammad Jalil Zorriehzahra [3], Seyed Davood Hosseini [2 *]

[1] *Islamic Azad University, Gom Branch, Gom, Iran*
[2] *Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural, Research Education and Extension Organization (AREEO), Arak, Iran*
[3] *Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran*

Received: 15 September 2024 **Accepted:** 29 January 2025

Abstract

Background and Aim: The widespread and persistent COVID-19 pandemic, caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), remains a serious global health threat and continues to place a heavy burden on humanity. Currently, several intramuscular vaccines have been successfully developed, and mass vaccination programs have progressed in many countries. There is growing evidence supporting the use of recombinant probiotics, particularly lactic acid bacteria (LAB), as vaccine carriers. Given the crucial role of the SARS-CoV-2 spike (S) glycoprotein in viral attachment, entry, and induction of neutralizing antibodies, the S protein has been widely targeted for vaccine development. This study aimed to clone and express the S2 subunit gene of the spike protein in *Lactococcus lactis*.

Methods: In this study, the S2 gene, which had been previously amplified and cloned into the *pWPI* plasmid, was used. The gene was amplified by PCR and subsequently isolated and cloned into the *pJET-1.2/blunt* plasmid as an intermediate step, then transferred to *E. coli* DH5α for improved preservation. The S2 gene was then excised from *pJET-1.2/blunt*, cloned into the *pNZ8149* plasmid, and transferred to *Lactococcus lactis* NZ39000 for gene amplification and expression.

Results: The results demonstrated that the S2 gene (1432 bp) was successfully amplified, isolated, and cloned into the *pNZ8149* plasmid. Following its transfer to *L. lactis* NZ39000, the S2 protein was expressed and detected as a **51 kDa** band on SDS-PAGE.

Conclusion: The findings suggest that transferring pathogenic viral genes into beneficial gut bacteria (LAB) may provide a promising strategy for developing oral vaccine candidates.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Gene Expression, Recombinant Protein, Cloning, S2 Gene

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-09-12]

[DOI: 10.30491/6.4.293]

[*] **Corresponding author:** Seyed Davood Hosseini**, Email**: hosseinida@yahoo.com
Address: Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural, Research Education and Extension Organization, Arak, Iran.

مجله طب دریا
دوره ۶، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۳
صفحات: ۳۰۰-۲۹۳
10.30491/6.4.293

تکثیر و کلونینگ و بیان ژن S2 کروناویروس در باکتری *Lactococcus lactis* به منظور طراحی واکسن های نوترکیب

فاطمه افشار[۱]، مرتضی مهدوی[۲]، مهرداد معماریان[۱]، سید محمد جلیل ذریه زهرا [۳]، سید داوود حسینی[۲*]

[۱] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
[۲] موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی، اراک، ایران
[۳] موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۶/۲۵ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: همه‌گیری گسترده و تداوم کووید-۱۹، ناشی از SARS-CoV-2، یک تهدید جدی برای عموم مردم جهان است و همچنان تهدیدی برای سلامتی عموم و بار سنگینی بر کل جامعه بشری تحمیل می‌کند. در حال حاضر، چندین واکسن عضلانی با موفقیت ساخته شده است و واکسیناسیون انبوه در بسیاری از کشورها پیشرفت کرده است. اغلب شواهدی در مورداستفاده از پروبیوتیک‌های نوترکیب، به‌ویژه باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) به‌عنوان حامل واکسن ارائه می گردد. باتوجه به نقش حیاتی گلیکوپروتئین SARS-CoV-2 spike (S) در اتصال ویروس، ورود و القای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، پروتئین S به طور گسترده به‌عنوان هدفی برای ساخت واکسن مورداستفاده قرار گرفته است. در این پژوهش تلاش بر این بوده است که ژن S2 زیر واحد اسپایک در باکتری *Lactococcus lactis* کلون و بیان شود.

روش ها: در این مطالعه، ژن S2 که در پژوهش قبلی تکثیر و در پلاسمید PWPI کلون شده بود مورد استفاده قرار گرفت، این با واکنش PCR تکثیر و پس از جداسازی ژن در پلاسمید واسط PJET-1.2blunt کلون و برای نگهداری بهتر به باکتری *E.Coli* DH5α منتقل شد سپس ژن S2 از پلاسمیدPJET-1.2blunt بریده، در پلاسمید PNZ8149 کلون و برای تکثیر و بیان پلاسمید کلون شده به باکتری *Lactococcus lactis* سویه NZ39000 منتقل شد.

یافته ها: با توجه به یافته های پژوهش، ژن S2 با سایز 1432bp بخوبی تکثیر و جدا سازی و در پلا سمید pNz8149 کلون و پس از انتقال به باکتری L.lactis NZ39000 بیان شد پروتئین S2 در اندازه۵۱ کیلودالتون بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده شد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده، انتقال ژن ویروس های بیماریزا به باکتریهای سودمند روده ای (LAB) می توانند به عنوان حامل وکاندید واکسن خوراکی باشند.

کلیدواژه‌ها: کووید-۱۹، SARS-COV-2، بیان ژن، پروتئین نوترکیب، کلون‌سازی، ژن S2

*نویسنده مسئول: **سید داوود حسینی**. پست الکترونیک: hosseinida@yahoo.com
آدرس: موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی ، اراک، ایران.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-09-12]

[DOI: 10.30491/6.4.293]

مقدمه

از دسامبر ۲۰۱۹، بیماری عفونی جدید به نام کووید-۱۹ یک بیماری همه گیر مداوم بوده و زندگی همه انسان ها را تهدید می کند. SARS-CoV-2 به عنوان عضو جدید بتاکرونا ویروس، قابلیت انتقال بسیار بالایی در بین افراد نشان می دهد. که شباهت بالایی با SARS-CoV خفاش دارد (۱).

این بیماری اپیدمیک ویروسی همچنان در دنیا گسترش داشته و موجب بروز تلفات گسترده ای در کشورهای مختلف دنیا شده است. بر اساس آخرین آمار دریافتی از سایت https://www.worldometers.info/coronavirus/ میزان مبتلایان به این بیماری در جهان تاکنون ۷۰۴،۷۵۳،۸۹۰ نفر تا تاریخ ۲۴ آوریل ۲۰۲۴ بوده است که از این میان تاکنون ۷،۰۱۰،۶۸۱ در اثر این بیماری در جهان جان باخته اند.

ژنوم RNA کروناویروس تک رشته ای با سنس مثبت است که حداقل ۴ پروتئین ساختاری و ۷ پروتئین غیرساختاری را کد میکند. پروتئین اسپایک یک پروتئین سطحی در ویروس کرونا است که در اتصال به گیرنده ها و تسهیل همجوشی غشاء نقش دارد. پروتئین اسپایک SARS- CoV-2 (S) از دو زیر واحد S1 و S2 تشکیل شده است که زیرواحد S1 در تشخیص گیرنده های سلول میزبان تخصص دارد و به طور معمول از نظر توالی بین CoV های مختلف نسبت به زیرواحد S2 متفاوت تر است (۲). پروتئین اسپایک ویروس کرونا علاوه بر واسطه ورود ویروس، عامل مهم تعیین کننده طیف میزبان و گرایش سلولی/ بافتی است (۳).این نتایج نشان می دهد که پروتئین S به عنوان هدف اصلی آنتی بادی ها عمل می کند.در حالی که زیرواحد S2 با تولید یک بسته نرم افزاری ۶ مارپیچی از طریق دامنه دو هپتاد، همجوشی غشای سلولی ویروسی را تقویت می کند. پروتئین S2 همجوشی بین ویریون و غشای سلولی را تسهیل می کند(۴). این تحقیقی برای انتخاب ناحیه بسیار حفاظت شده پروتئین اسپایک S2 به عنوان کاندیدای واکسن کرونا است که یک منطقه بسیار حفاظت‌شده پروتئین اسپایک است (۵). زیرواحد S2 بخش غشایی پروتئین S است که کمتر باعث تغییرات موتاسیون می‌شود و از نظر تغییرات آنتی ژنتیکی نقش کمتری دارد. زیر واحد S2 شامل پپتید الحاق (Fusion peptide)، دو ناحیه تکراری هفت تایی (به نام HR1 و HR2) و ناحیه گذرنده از غشا است (۶). زیرواحد S2 با تولید یک بسته نرم‌افزاری شش مارپیچی از طریق دامنه دو هپتاد، همجوشی غشای سلولی ویروسی را تقویت می‌کند. پروتئین S2 همجوشی بین ویریون و غشای سلولی را تسهیل می‌کند (۷). پروتئولیز در جایگاه محافظت شده دوم یعنی جایگاه برشی S2 برای فعال سازی الحاق کلیه پروتئین های S کروناویروس ضروری است و می تواند در غشای میز بان یا در محفظه های داخل سلولی (آندوزوم) سلول هدف اتفاق بیفتد (۸).

جنس لاکتوکوکوس، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری غیراسپورزا و غیرمتحرک و جزء گروه باکتری‌های تولیدکننده لاکتیک اسید محسوب می‌شود. این باکتری‌ها با تخمیر قند، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. باکتری‌های هتروفرمانتاتیو مزوفیل (دمای بهینه رشد حدود ۳۰ درجه) و غیر کومنسال هستند که در دستگاه گوارش سیطره پیدا نمی‌کنند (کلونیزه نمی‌شوند) (۹،۱۰).

بنابراین خطر عوارض جانبی طی استفاده دهانی آن‌ها را کاهش می‌دهد (۱۱).به دلیل ایمن بودن آن‌ها کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی و لبنی دارند (۱۲). با تولید یکسری ترکیبات ضد میکروبی از قبیل اسیدهای آلی، باکتریوسین و پپتیدهای ضد قارچی در فراوری و نگهداری مواد غذایی نقش بسزایی دارند. همچنین به عنوان مایه آغازگر تولید پنیر، ماست، خمیرترش نان و دیگر غذاهای تخمیرشده (به عنوان مثال سبزیجات، ماهی و سوسیس) و جهت پیشگیری از فساد سبزی استفاده می‌شوند (۱۳). سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا، این باکتری‌ها را به عنوان «عموماً سالم قلمدادشده (GRAS) طبقه‌بندی کرده است (۱۴)

باکتری های اسید لاکتیک به یک ناقل باکتریایی دهانی بالقوه برای تحویل DNA و پروتئین تبدیل شده اند، زیرا آنها به طور معمول در روده انسان و اکثر حیوانات وجود دارند و نقش های مفیدی در اختلالات مختلف گوارشی و التهابی دارند. باکتری های اسید لاکتیک معمولاً در شرایط گوارشی انسان ایمن و پایدار هستند، با تحمل نسبتاً قوی اسید معده و نمک صفراوی، و می توانند به خوبی به سلول های اپیتلیال کولون بچسبند. این باکتری ها همچنین از چسبندگی و رشد پاتوژن ها جلوگیری می کنند و سیتوکین را القا می کنند (۱).لاکتوکوکوس لاکتیس یک باکتری گرم مثبت و هموفرمنتاتیو است و به عنوان میزبان بیان ژن برای پروتئین های نوترکیب به ویژه پروتئین های خوراکی مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). لاکتوکوکوس لاکتیس به دلیل تولید پروتئاز کمتر، عدم وجود اندوتوکسین توانایی تحریک هر دو نوع پاسخ های ایمنی عمومی و مخاطی جایگزین بهتری محسوب می شود (۱۶, ۱۷).تحقیقات نشان می دهد که زیر واحد S2 می تواند برای تولید آنتی بادی و واکسن های خنثی کننده علیه SARSCOV-2 استفاده شود.

در این پژوهش سعی شده است تا با جدا سازی ژن S2 که حاوی پروتیین های spike است از ویروس کووید ۱۹ و انتقال آن به یک باکتری غیر بیماری زا (فراسودمند) جهت بیان و تولید پروتیین نوترکیب مربوطه بعنوان یک واکسن خوراکی معرفی شود.

روش‌ها

پلاسمیدها و سویه های باکتری: در این تحقیق پلاسمیدpJET1.2/blunt موجود در باکتری سویه E. coli DH5α به‌عنوان سویه کلون ساز و پلاسمید pNZ8149 در باکتری

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-09-12]

[DOI: 10.30491/6.4.293]

(L.lactis) سویه NZ3900 به‌عنوان سویه بیانی مورداستفاده قرار گرفت.

کشت باکتری: برای کشت سویه E.ColDH5 α در مراحل کلونینگ از محیط کشت LB مایع و جامد حاوی ۵۰ ماکروگرم آنتی بیوتیک آمپی سیلین و یا کاناماسین در هر میکرولیتر استفاده شد. در مراحل بیان برای رشد (L.lactis)از محیط کشت M17(مرک آلمان)حاوی ۵/. درصد گلوکز یا لاکتوز و برای انتخاب کلنی‌های Lac(L.lactis)+ از محیط کشت Elliker و مطابق دستور العمل استفاده شد.

پرایمرها: ازآنجاکه ژن S2 باید از پروتئین کامل اسپایک جدا شود آغازگرها طوری طراحی شدند که محصول PCR تولیدی بخش بیشتری از قسمت S2 را شامل شوند و دارای دو سایت برشی NCOI و XbaI در آغازگرهایForward و Revers است. واکنش PCR با این آغازگرها محصولی با اندازه 1432bp تولید می‌کند (جدول-۱).

جدول-۱. مشخصات پرایمرها

Forward primer	5'- TCC ATG GGT GCA GAA AAT TCA GTT GCT T -3'
Reverse primer	5'- TTC TAG ATT AAT GCC AGA GAT GTC ACC T -3'

p JET PCR Cloning: ژنوم اسپایک ویروس SARS-COV-۲ به‌عنوان منبع و نمونه اولیه جهت تکثیر قطعه موردنظر S2 حاصل از پروژه قبلی تهیه و مورداستفاده قرار گرفت و به کمک آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای این ناحیه به روش PCR تکثیر شد. برای انجام کلونینگ قطعه S2 درون pJET1.2 /blunt مقدار ۵ul بافر را با 3ul محصول pcr، 1ul نوکلئوفری و 1ul آنزیم برشی را مخلوط کرده و ۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد سپس ادامه واکنش بر روی یخ یا اضافه کردن 1ul وکتور pJET1.2/blunt و ۱ul آنزیم T4 به مخلوط انجام شد. مخلوط اتصال ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. محصولات حاصل از واکنش اتصال (pJET1.2/blunt+S2) به باکتری E.coli سویه DH5α از روش مستعدسازی و انتقال کلرید کلسیم انتقال داده شد و در محیط کشت LB کشت دادیم. برای انتخاب کلونی‌های مثبت از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در محیط کشت LB استفاده شد. برای ارزیابی انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری از واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی S2 استفاده شد.

کلون کردن قطعه S2 در پلاسمید PNZ8149: هضم آنزیمی به کمک دو آنزیم برشی NCOI و XbaI برای پلازمید PNZ8149 و همچنین قطعه S2+ pJET1.2 /blunt انجام شد و در نهایت برای اتصال ژن S2 به پلاسمید PNZ8149 از آنزیم T4 DNA Ligase(Thermo scientific) و طبق پروتکل کیت استفاده شد.

انتقال (Transformation): به‌منظور آماده‌سازی سلول مستعد جهت انتقال پلاسمیدهای نوترکیب از باکتری گرم مثبت (L.lactis)سویه NZ39000 استفاده شد. باکتری را در محیط کشت G-SGM17B کشت دادیم و مستعد سازی بر اساس روش مؤسسه بیوتکنولوژی مولکولی GmbH (۲۰۱۵) آلمان انجام گردید. به‌منظور انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری (L.lactis) مستعد شده از روش الکتروپروشین استفاده شد. پلاسمید نوترکیب PNZ8149 درون کوویت الکتروپوریشن ریخته و با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن با ولتاژ ۲۰۰۰ ولت، پتانسیل الکتریکی ۲۵ میکروفاراد و مقاومت ۲۰۰ اهم به ۴۰ ماکرو لیتر سلول مستعد شده و پذیرا (L.lactis) سویه NZ39000 منتقل شدند و باکتری‌های الکتروپوریشن شده را بر روی محیط کشت M17 با لاکتوز کشت دادیم. برای انتخاب کلونی‌های مثبت از محیط کشت الیکر (Elliker) استفاده شد. از باکتری‌های رشد کرده ۱۰۰ ماکرو لیتر در هر پلیت محیط کشت Elliker-agar کشت داده شده به مدت یک شب در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. از کلنی‌های دارای رنگ زرد در پلیت‌های کشت شده مجدداً کشت تهیه گردید. در نهایت مجدداً برای اطمینان از نوترکیبی آزمون‌های تأییدی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی S2 انجام شد. همچنین واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی NCOI و XbaI نیز صورت گرفت. در نهایت برای بیان پروتئین‌های ژن S2 از روش القا بیان ژن با استفاده از نیسین استفاده شد.

القا بیان ژن با استفاده از نیسین: باکتری در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت M17-S/G در طی یک شب کشت و ۳۰ درجه سانتیگراد رشد داده شد.سپس کشت مجدد در دو عدد فالکون انجام شد.بیان ژن در یکی از فالکون های ۱۰ میلی لیتری با اضافه کردن ۱ نانوگرم در میلی لیتر نیسین انجام شد و فالکون دیگر به عنوان کنترل منفی نگهداری شد. هر دو فالکون در انکوباتور قرار گرفتند تا OD600 در هر دو فالکون القا شد. و برای بررسی آزمون تولید پروتئین از روش (SDS-PAGE) استفاده شد.

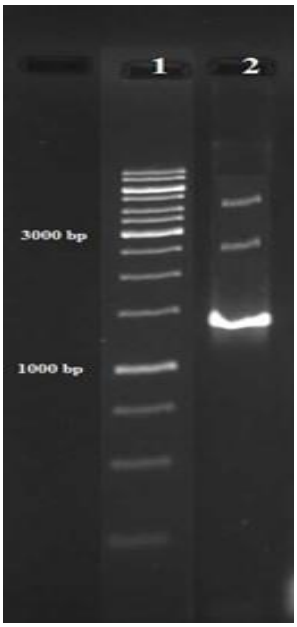
ملاحظات اخلاقی: در این مطالعه تمامی مراحل پژوهش با رعایت اصول اخلاقی و دستوالعمل های موسسات معتبر و مراجع قانونی مرتبط موجود انجام شده است.استفاده از سویه های باکتری در شرایط کاملا کنترل شده و ایمن صورت گرفته است. همچنین اطمینان حاصل شده است تا هیچ گونه خطری برای پژوهشگران و محیط زیست وجود ندارد.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-09-12]

[DOI: 10.30491/6.4.293]

نتایج

پس از تکثیر قطعه ژن S2 و مشاهده باند موردنظر در اندازه 1432bpخلوص نمونه با کمک دستگاه نانودراپ ۱,۹۵ گزارش شد.سپس کلون کردن ژن S2 در پلاسمید PJET 1.2 blunt به درستی انجام شد (شکل۱) و انتقال پلاسمید به دست آمده به سلول پذیرا *E.Coli* DH5α و کشت سلول ها برروی محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین به عنوان مارکر رشد،تعدادی پرگنه بر روی محیط کشت رشد کرد (شکل۲) که برای تایید کلونینگ و وجود قطعه ژن مورد نظر(ژن S2) برروی آنها پرگنه PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی S2 انجام شد.

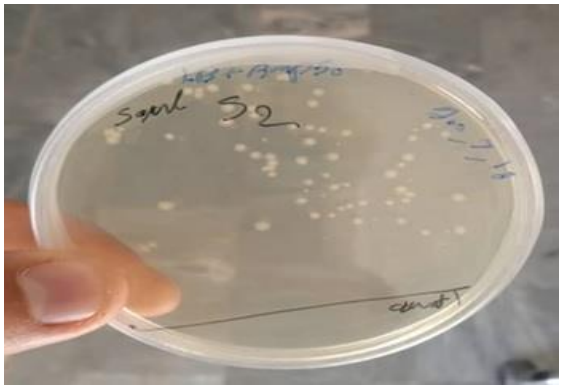


شکل ۱– نتیجه ژل الکتروفورز محصولات ژنS2 واکنش اتصال در Clone JET PCR Cloning، ستون اول: مارکرkb۱ DNA برند Fermatas غلظت 1ng/µl(۱,۵ ماکرو لیتر). ستون دوم محصول واکنش اتصال pJET1.2/blunt خطی با S2(۲ ماکرو لیتر)که باتوجه به سایز S2 (1432bp)وسایز پلاسمیدpJET1.2/blunt (2974bp) باندی در اندازه 4406bp دیده شد که نشان دهنده اتصال درست S2 بهpJET1.2/blunt است.

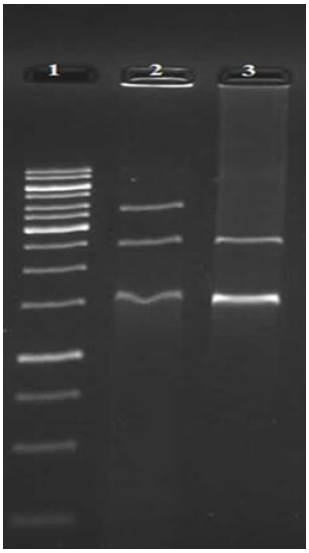
پس از آن استخراج پلاسمید نوترکیب PJET 1.2 blunt+S2 از کشت مجدد پرگنه های واجد ژن بر روی محیط LB broth با کمک کیت استخراج انجام شد، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی NCOIو XbaI صورت گرفت همچنین هضم آنزیمی پلاسمید PNZ8149 با کمک این دو آنزیم (NCOIو XbaI) نیز انجام شد. سپس ژن S2 را با کمک آنزیم T4 به پلاسمید PNZ8149 وارد شد. نتایج نشان داد که ژن S2 به طور صحیح در پلاسمیدPNZ8149 بیان شده است (شکل ۳).

بعد از واردکردن پلاسمید درون باکتری (*L.lactis*) NZ39000 مستعد شده با کمک روش الکتروپوریشن برای اطمینان از وجود پلاسمید نوترکیب درون باکتری (*L.lactis*) از سه روش ۱-PCR بر روی پرگنه‌ها با کمک آغازگرهای اختصاصی S2 ، ۲-کشت بر روی محیط کشت الیکر (شکل ۴) و ۳-هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های هضمی NCOI و XbaI انجام شد.

در نتیجه تأیید القای بیان پروتئین S2 با نیسین به کمک روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و تأیید شدکه باتوجه به اندازه ژن S2 (۱۴۳۲bp) پروتئین S2 در اندازه ۵۱ کیلودالتون به درستی بیان شده است (شکل۵).



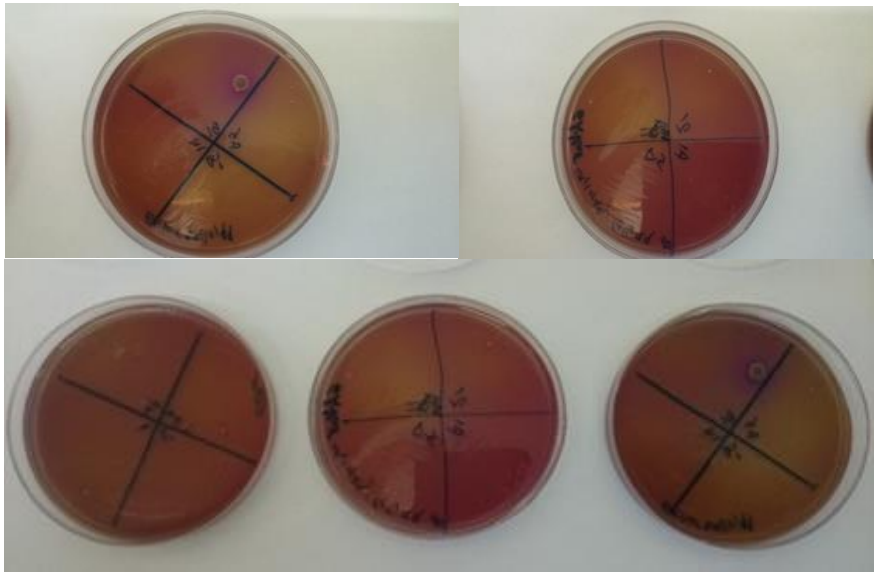
شکل-۲. نتایج کشت باکتری های نوترکیب شده *E.Coli* سویه DH5α بر روی محیط کشت LB حاوی ۵۰ماکرو گرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک آمپی سیلین به عنوان مارکر کشت. کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیب با توجه به تخریب ژن کشنده در هنگام واکنش اتصال در فرآیند نوترکیبی رشد کردند.



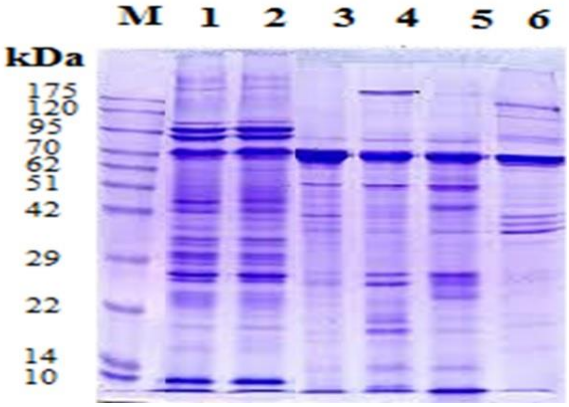
شکل ۳– نتایج ژل الکتروفورز محصولات واکنش اتصال . ستون اول: مارکر kb DNA ۱ برند Fermatas غلظت۱ ng/µl (۱,۵ ماکرو لیتر) –ستون دوم و سوم: محصول واکنش اتصال pNZ8149 و S2 (۲ ماکرو لیتر) که اتصال در محصول مربوط به ستون سوم اتفاق نیفتاده است اما در ستون اول با مشاهده باند در اندازه ۳۹۸۲ نشان دهنده این است که در محصول شماره یک مربوط به ستون دوم اتصال اتفاق افتاده است.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-09-12]

[DOI: 10.30491/6.4.293]



شکل ۴- محیط کشت Elliker Agar بعد آلوده‌شدن با باکتری‌های الکتروپور شده با پلاسمید نوترکیب که قسمت های که به رنگ زرد در آمده نشان دهنده این است که باکتری های (*L.lactis*) دارای پلاسمید نوترکیب شده PNZ۸۱۴۹ هستند.



شکل-۵. نتایج ژل SDS-PAGE بیان ژن S2. ستون M : مارکر پروتئین برند Fermatas غلظت (۱ ماکرولیتر). ستون ۳،۴،۵ : محصول بیان کلنی های نوترکیب S2 به ترتیب ۲،۱، و ۳ ساعت بعد از القاء توسط ۱ ماکروگرم نیسین (۱۰ ماکرو لیتر). ستون ۲،۱ کنترل بیان در پرگنه نوترکیب بدون القاء توسط نیسین (۱۰ ماکرولیتر). ستون ۶ کنترل بیان در پرگنه تیپ وحشی (۱۰ ماکرولیتر).

بحث

کووید-۱۹ بیماری عفونی تنفسی است که از سال ۲۰۱۹ شایع و خسارات جانی، و اقتصادی بسیاری را به جامعه جهانی تحمیل نمود و پیامدهای منفی زیادی در حوزه سلامت و اقتصاد را به دنبال داشت. ایجاد ایمنی پایدار و نیز غربالگری از راهکارهای اصلی کنترل و پیشگیری از این بیماری است. پروتئین‌های غشای خارجی ویروس عامل بیماری خصوصاً دو پروتئین S1, S2 وRBD در طراحی واکسن و نیز تولید آنتی‌ژن‌های موردنیاز در تشخیص‌های سرمی دارای اهمیت زیادی هستند. تولید بی‌خطر پروتئین‌های نوترکیب که دارای قدرت ایمنی‌زایی مناسبی باشند و هم چنین بتواند به طور اقتصادی تولید شود دارای اهمیت ویژه ای است. انتخاب سیستم بیانی مناسب و نیز میزبان مناسب برای بیان این پروتئین‌های نوترکیب که قادر به تولید بی‌خطر و انبوه و اقتصادی باشد از اولویت‌های بعدی در زمینه تولید واکسن و آنتی‌ژن‌های مورد استفاده است.

پروتئین S برای عفونی بودن و بیماری‌زایی ویروس کرونا مهم است. پروتئین‌های S هدف اصلی آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در برخی از ویروس‌های کرونای حیوانی هستند و همچنین می‌توانند لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک را القا کنند. به طور گسترده پذیرفته شده است که پروتئین SARS-CoV-2 S یک ایمنوژن امیدوارکننده برای تولید ایمنی محافظتی است (۱۸, ۱۹).

در این مطالعه با توجه به اینکه سیستم بیان ژن قابل‌کنترل توسط نیسین که توسط مؤسسه تحقیقاتی غذایی NIZO توسعه‌یافته است ویک سیستم بیانی است که به‌آسانی قابل‌اجرا است و مزایای زیادی دارد مورد استفاده قرار گرفته است. این سیستم منجر به بیان زیاد ژن‌های همولوگ و هترولوگ در مطالعات بررسی عملکرد ژن می‌گردد و برای به‌دست‌آوردن مقدار زیادی از محصول یک ژن در کلاس مواد غذایی انسانی و نیز کلاس خوراک مورداستفاده در دام مناسب است (۱۴, ۲۰).

در این پژوهش بدلیل اهمیت بیماری کووید و نقش حیاتی پروتئین غشایی ویروس SARS-COV-2 در ایمنی‌زایی و ریشه‌کنی بیماری و همچنین استفاده از مزایای بی‌نظیر سیستم بیانی قابل‌کنترل نیسین، اقدام به جدا سازی و کلون ژن کدکننده پروتئین S2 در وکتور pNZ8149 گردید تا با انتقال به باکتری میزبان (*L.lactis*) سویه NZ3900 و بیان این پروتئین با استفاده از سیستم بیانی نیسین پروتیین نوترکیب همزمان ضمن تکثیر باکتری فراسودمند L.lactis تولید و در اختیار سیستم ایمنی افراد گیرنده جهت تحریک سیستم دفاعی بر علیه ویروس عامل قرار بگیرد.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-09-12]

[DOI: 10.30491/6.4.293]

در این تحقیق قطعه ژن S2 با طراحی آغازگرهای اختصاصی تکثیر، و با استفاده از کیت pJET1.2/blunt Cloning در پلاسمید کلون گردید. پس از کلون قطعه در pJET1.2 هضم آنزیمی و جداسازی قطعه و خالص‌سازی و واکنش اتصال آن با پلاسمیدهای pNZ8149 هایی که با هضم آنزیمی در دو سایت برشی NcoI و XbaI خطی شده بودند، انجام شد. آزمون‌های تأییدی جهت اطمینان از انجام درست کلونینگ انجام شد که حاکی از جای‌گذاری درست ژن در وکتور است.

وکتور نوترکیب با استفاده از الکتروپوریشن به باکتری *L.lactis*(NZ3900) معرفی شد و سویه نوترکیب حاصل جهت مراحل تکمیلی مطالعه در دمای ۸۰- نگهداری شد. این سویه نوترکیب باتوجه‌به دارابودن سیستم بیان نیسین پتانسیل بیان پروتئین S2 را به فضای بین سلولی به صوت ترشحی دارد. در این پژوهش به عملکرد بیان پروتئین S2 نیز به طور محدود پرداخته شد که مقدار و خلوص و خاصیتایمیونوژنی آن بایستی طی مطالعات تکمیلی مورد آزمون قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

باکتری‌های فراسودمند LAB ضمن داشتن پتانسیل تولید مواد ضروری برای تامین سلامت بدن انسان و دام همچنین می‌توانند بعنوان حامل و تولید کننده پروتیین های ایمیونوژن بر علیه بسیاری از عوامل بیماریزا مانند کووید-۱۹ مورد استفاد قرار گیرند.این باکتریها همچنین بعنوان ناقل می توانند در فرآیند تولید واکسن های خوراکی بکار گرفته شوند. در این مطالعه صرفاً بخش اول تکثیر و کلونینگ و جاگذاری و بیان ژن در مقیاس آزمایشگاهی اجرا شد.و نیاز به تحقیقات تکمیلی دارد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمامی همکاران دخیل در پروژه بخصوص همکاران ارزشمند موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم ابراز می دارد.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Koksoy Vayisoglu S, Aydin Besen M, Oncu E. Perspectives of midwifery and nursing students on recommending the COVID-19 vaccine to women of reproductive age and factors influencing counseling competency: a cross-sectional study. J Prev Complement Med. 2024; 3(1): 1-11. doi: 10.22034/ncm.2023.418212.1133
2. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. Advances in virus research. 2006;66:193-292. doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3
3. Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. Annual review of virology. 2016;3:237-61. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301
4. Yurina V, Adianingsih OR, Widodo N. Oral and Intranasal Immunization with Recombinant Food-Grade Lactococcus Lactis Expressing High Conserved Region of SARS-CoV-2 Spike Protein Triggers Immunity Responses in Mice. 2021. doi:10.21203/rs.3.rs-951426/v1
5. Yurina V. Coronavirus epitope prediction from highly conserved region of spike protein. Clinical and experimental vaccine research. 2020;9(2):169. doi:10.7774/cevr.2020.9.2.169
6. Ghavamipour F, Nasrollahi P, Dabirmanesh B, Jalili H, KHAJEH K. The evil role of spike in the coronaviruses: structure, function and evolution. 2020.
7. Huang Y, Yang C, Xu X-f, Xu W, Liu S-w. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. Acta Pharmacologica Sinica. 2020;41(9):1141-9. doi:10.1038/s41401-020-0485-4
8. Gordon DL. Meningitis and Encephalitis. PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective. 2010:63-6. doi:10.1007/978-90-481-9039-3_4
9. Rezaei M, Rabbani Khorasgani M, Aliramaei MR. Recombinant lactococcus, a new approach to oral vaccines. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2020;23(6):786-805. doi:10.32598/jams.23.6.5030.3
10. Song AA-L, In LL, Lim SHE, Rahim RA. A review on Lactococcus lactis: from food to factory. Microbial cell factories. 2017;16:1-15. doi:10.1186/s12934-017-0669-x
11. AiLian S, In L, Swee Hua E, Raha Abdul Rahim RAR. A review on lactococcus lactis: from food to factory. 2017.
12. Khorasgani MR, Shafiei R. Traditional yogurt as a source of lactobacilli and other lactic acid bacteria in Iran. Yogurt in health and disease prevention: Elsevier; 2017. p. 285-94. doi:10.1016/B978-0-12-805134-4.00016-X
13. D'Silva I. Recombinant technology and probiotics. Int J Eng Technol. 2011;3(4): 288-93.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-09-12]

[DOI: 10.30491/6.4.293]

14. Novotny R, Scheberl A, Giry-Laterriere M, Messner P, Schäffer C. Gene cloning, functional expression and secretion of the S-layer protein SgsE from Geobacillus stearothermophilus NRS 2004/3a in Lactococcus lactis. FEMS microbiology letters. 2005;242(1):27-35. doi:10.1016/j.femsle.2004.10.036
15. Laden L, Arslan H, Mohammad Hadi A. Cloning of prochymosin gene in Lactococcus lactis bacteria. 2012.
16. Yaser R, Mohammad Rukh, Seyed Hamidza, Rahman Az, Hossein Ka, Marzieh R. Cloning of the immunogenic region of Clostridium difficile toxin B in Lactococcus lactis with the aim of developing a Lactococcus-based oral vaccine against Clostridium difficile colitis. 2019.
17. Pontes DS, De Azevedo MSP, Chatel J-M, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A. Lactococcus lactis as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. Protein expression and purification. 2011;79(2):165-75. doi:10.1016/j.pep.2011.06.005
18. Zhao P, Ke J-S, Qin Z-L, Ren H, Zhao L-J, Yu J-G, et al. DNA vaccine of SARS-Cov S gene induces antibody response in mice. Acta biochimica et biophysica Sinica. 2004;36(1):37. doi:10.1093/abbs/36.1.37
19. Ebrahimirad, B., Payandeh, H. Transient loss of consciousness without cerebral origin following injection of Sinopharm vaccine. J Prev Complement Med. 2024; 3(3): 145-148. doi: 10.22034/ncm.2023.403217.1091
20. Kunji ER, Slotboom D-J, Poolman B. Lactococcus lactis as host for overproduction of functional membrane proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2003;1610(1):97-108. doi:10.1016/S0005-2736(02)00712-5

[Downloaded from jmarmed.ir on 2026-09-12]

[DOI: 10.30491/6.4.293]