

کلونینگ و بیان دومن لکتینی پروتئین FimH به عنوان کاندید ایمونوژن علیه عفونت ادراری

مسعود زندی^{۱*}، جلیل فلاح مهرآبادی^۲

چکیده

زمینه و هدف: عفونت دستگاه ادراری، یکی از شایع ترین عفونت ها در انسان محسوب می شود و سویه های /شریشیا کلی یوروپاتوژن به عنوان شایع ترین عامل آن شناخته شده است. این سویه ها در مثانه کلونیزه شده و باعث سیستمیت می شوند که می توانند با حرکت به سمت کلیه ها عامل پیلونفریت شوند. از آنجایی که پروتئین FimH در کلونیزاسیون سویه های UPEC و ایجاد عفونت، نقش بسیار مهمی دارد این مطالعه با هدف تهیه پروتئین FimH به عنوان کاندید ایمونوژن علیه عفونت ادراری صورت گرفت.

روش بررسی: در تحقیق حاضر، ادهسین *fimH* به عنوان کاندید ایمونوژن انتخاب شد. از /شریشیا کلی سویه ۳۵۲۱۸، DNA ژنومی استخراج و سپس ژن *fimH* با PCR تکثیر گردید. محصول PCR در وکتور pBlueScript SK کلون شده و با توالی یابی مورد تأیید قرار گرفت. سپس دومین لکتین ژن *fimH* با PCR تکثیر و در وکتور بیانی pET23a وارد شد.

یافته ها: کلون به دست آمده *pET/fimH* با توالی یابی تأیید و در /شریشیا کلی سویه (DE3) Origami وارد شد. بیان پروتئین نو ترکیب FimH در باکتری با SDS-PAGE و western blot مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه گیری: طبق نتایج این مطالعه پروتئین حاصل می تواند برای ارزیابی ایمنی زایی در حیوان بررسی گردد.

کلید واژه ها: عفونت ادراری؛ /شریشیا کلی یوروپاتوژن؛ واکسن نو ترکیب، پروتئین FimH؛ /شریشیا کلی.

^۱مربی میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تویسرکان، تویسرکان، ایران.

^۲استادیار میکروب شناسی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

مسعود زندی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تویسرکان، تویسرکان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

mzandi49@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۶

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

ZandiM, Fallah Mehrabadi J. Cloning and expression of FimH lectin domain as an acandidate immunogenagainst urinary infection. Qom Univ Med Sci J 2014;8(3):24-32. [Full Text in Persian]

مقدمه

اشریشیا کلی، جزء گونه‌ای از باکتری‌ها است که توانایی کلونیزه شدن و دوام در زیستگاه‌های متعدد محیطی و میزبان‌های جانوری را دارد. برخی سویه‌های اشریشیا کلی از محل زندگی خود خارج شده و توانایی ایجاد بیماری در میزبان را به دست می‌آورند. این سویه‌های بیماری‌زا به عنوان اشریشیا کلی اسهال‌زا یا اشریشیا کلی بیماری‌زای خارج روده‌ای (ExPEC) (Extraintestinal Pathogenic *E. coli*) می‌شوند. سویه‌های اشریشیا کلی بیماری‌زای خارج روده‌ای می‌توانند در محل‌هایی مانند خون، سیستم اعصاب مرکزی و لوله ادراری کلونیزه شده و سبب بیماری شوند. در بین سویه‌های اشریشیا کلی بیماری‌زای خارج روده‌ای، سویه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژن (Uropathogenic *E. coli*, UPEC) شایع‌ترین سویه‌های عامل بیماری در انسان هستند. این باکتری‌ها عامل عفونت مجرای ادراری (UTI) (Urinary Tract Infection) (۹۵-۷۰٪) و بخش عمده‌ای از عفونت ادراری بیمارستانی (۵۰٪) می‌باشند (۱). عفونت ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در انسان محسوب می‌شود که تحت تأثیر جنسیت و سن قرار دارد. اشریشیا کلی، باکتری غالب در ایجاد عفونت ادراری است. همچنین این باکتری یوروپاتوژن، دارای مجموعه‌ای از ژن‌های کدکننده فاکتورهای بیماری‌زا بوده که آن را قادر به غلبه بر سدهای دفاعی دستگاه ادراری و کلونیزاسیون در این ناحیه از میزبان می‌کند (۲). اتصال، مرحله ضروری در آغاز کلونیزاسیون سطوح مخاطی میزبان است و مقدمه عفونت تهاجمی محسوب می‌شود (۳). مهم‌ترین خصوصیت این سویه‌ها توانایی کلونیزه شدن آنها در سطح سلول‌های یورواپیتلیوم میزبان به واسطه داشتن ادھسین است (۴-۶). باکتری‌ها، ادھسین‌هایی را بر روی سطح خود بیان می‌کنند که می‌تواند ساختار منومر، اولیگومرهای ساده و یا ساختار فیبری به نام فیمبریه (Fimbriae) یا پیلی (Pili) داشته باشد (۷). بر روی سطح اشریشیا کلی یوروپاتوژن دو نوع

فیمبریه مهم قابل تشخیص است. این فیمبریه‌ها که فیمبریه تیپ ۱ و P نام دارند، حمل‌کننده لیگاندها یا ادھسین‌ها بوده و به گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌ها متصل می‌شوند (۸). برای بیان و مونتاژ پیلی تیپ ۱، حداقل ۹ ژن که در دسته ژنی *fim* قرار دارند نیاز است (۹، ۱۰). این پیلی دارای ساختاری پیچیده بوده و در آن یک ساختار فیبریلی کوچک در نوک که حاوی *fimG* و ادھسین FimH و احتمالاً ترکیب جزئی از FimF می‌باشد، به ساختار میله‌ای حاوی زیرواحدهای FimA متصل شده است. مطالعات نشان می‌دهند FimH برای جذب باکتری به داخل سلول اپی‌تلیال مثانه لازم است (۱۱). از آنجایی که پیلی تیپ ۱ و در رأس آن پروتئین FimH در اتصال باکتری نقش مهمی دارند، لذا تهیه پروتئین نو ترکیب آن و ایمن‌سازی براساس این پروتئین می‌تواند به عنوان یک کاندید ایمونوژن مطرح شود (۱۲). این مطالعه با هدف تهیه پروتئین FimH به عنوان کاندید ایمونوژن علیه عفونت ادراری صورت گرفت تا بتوان از آن برای مطالعات ایمونولوژی استفاده نمود.

روش بررسی

استخراج DNA ژنومیک و PCR: در این مطالعه از سویه اشریشیا کلی ۳۵۲۱۸ حاوی ژن *fimH* برای تهیه ژن مورد بررسی استفاده شد. این سویه از بانک میکروب انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سپس باکتری در محیط نوترینت براث کشت داده شد و DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت Bioneer، کره جنوبی) به دست آمد. برای بررسی کیفیت DNA، از روش ژل الکتروفورز و اسپکتروفتومتر استفاده گردید. برای انجام PCR، پرایمرهای مورد نیاز طراحی شدند (جدول شماره ۱). توالی نوکلئوتیدی ژن *fimH* / اشریشیا کلی سویه UTI89، از بانک ژنی NCBI به دست آمد. این توالی دارای ۹۰۳ جفت باز می‌باشد و ۳۰۱ اسید آمینه را کد می‌کند (پروتئینی با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای ژن *fimH*

عنوان	توالی
Forward primer	5'-TCCCGTTACAGGTCAGAGC-3'
Reverse primer	5'-GTGCAGGTTTTAGCTTCAGG-3'

غربالگری و انتخاب کلنی حاوی ناقل نو ترکیب:

از رشد کلنی‌ها، پلیت‌ها به روش غربالگری کلنی‌های سفید - آبی بررسی شدند. بدین ترتیب که تعدادی از کلنی‌های سفید و آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمپی‌سلین انتخاب شدند. سفید بودن رنگ کلنی نیز دلیل بر این بود که ناقل واجد DNA خارجی می‌باشد. کلنی‌های انتخاب شده برای مرحله استخراج DNA پلاسمیدی و در پی آن آنالیز آنزیمی آماده شدند. استخراج DNA پلاسمیدی و انجام آنالیز آنزیمی به منظور تأیید و انتخاب کلنی صحیح (کلنی حاوی وکتور نو ترکیب صحیح) با آنزیم‌های EcoRI و HindIII و در نتیجه تأیید صحت انجام کلونینگ صورت گرفت.

تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن *fimH* کلون شده:

از پلاسمیدهای استخراج شده در مرحله قبل، نمونه‌ای که دارای پلاسمید نو ترکیب بود، انتخاب و برای تعیین توالی ژن کلون شده به خارج از کشور ارسال شد.

ساب کلون کردن ژن *fimH* در وکتور بیانی:

ساب کلون کردن دومن لکتینی *fimH* در وکتور بیانی pET23a پرایمر به شرح شکل شماره ۱ طراحی شد.

تکثیر ژن *fimH* با آنزیم pfu DNA polymerase:

دارای خاصیت Proof Reading بوده و طی فرآیند PCR، از اشتباه کمتری برخوردار است. بدین دلیل، ژن *fimH* با آنزیم pfu DNA polymerase در درون دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) تکثیر شد. برنامه سیکل‌های حرارتی به صورت: دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه، دماهای موجود در لوپ با ۳۵ سیکل شامل دمای دناتوراسیون ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۷۵°C به مدت ۱ دقیقه و دمای طولی سازی، ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بود که در نهایت، دمای طولی سازی نهایی شامل ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام سیکل‌ها، محصول PCR در کنار مارکر وزن مولکولی و نمونه کنترل PCR، بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و بر روی دستگاه ترانس لومیناتور، باندهای مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفت. بقیه محصول PCR نیز در ۲۰°C- نگهداری شد.

کلون کردن محصول PCR درون وکتور

(pBluescript IISK): پس از برش آنزیمی وکتور pBluescript IISK توسط آنزیم محدودگر EcoRV، DNA خارجی به آن اتصال یافت و انتقال ناقل نو ترکیب تولید شده به درون سلول‌های مستعد از باکتری TOP10F انجام گرفت.

CATATGTTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAA
ACCTTGCCTGCGCTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAACGA
TTACCCAGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTGCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAGTTTT
TCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTTGTTTATA
ATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCGGTGAGCAGTGCGGGGGGAGTGCGCA
TTAAAGCTGGCTCATTAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACCTATAACAGCGATGATTTCCAGTTT
GTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCACCACCACCACCACCTAATGAGAATTC

شکل شماره ۱: توالی قطعه لکتین از ژن *fimH* که برای تکثیر استفاده شده است. سایت‌های برش آنزیمی،

توالی نشانه هیستیدین و کدون‌های خاتمه با زیر خط مشخص شده‌اند.

CATATG: NdeI restriction site (ATG used as start codon), *fimH* lectin domain sequence (رنگ سبز),
CACCACCACCACCACCAC: His-tag sequence, TAATGA: Two stop codons, GAATTC: EcoRI restriction site, Total sequence:
504 bp

کشت و القای سوبه نو ترکیب (*E. coli* Origami(DE3)):

بیان پروتئین‌های نو ترکیب با انتقال ناقل نو ترکیب به سلول میزبان و القای تولید پروتئین در این سلول‌ها صورت می‌گیرد. در سیستم‌های pET تحت القای با لاکتوز یا IPTG، RNA پلیمراز T7 Polymerase تولید می‌شود و در نهایت، این RNA پلیمراز از روی ژن مورد نظر که در روی این وکتور قرار گرفته است

کلونینگ *fimH* در pET23a:

محصول PCR پس از هضم آنزیمی در وکتور برش خورده pET23a وارد و با آنزیم T4 DNA Ligase تیمار شد. سپس از باکتری *E. coli* Top10F، سلول مستعد تهیه و محصول لیگاسیون به آن منتقل گردید. در ادامه، از کلون‌های حاصل، پلاسمید استخراج شد. کلون‌های مورد نظر برای تأیید آنزیمی استفاده شدند.

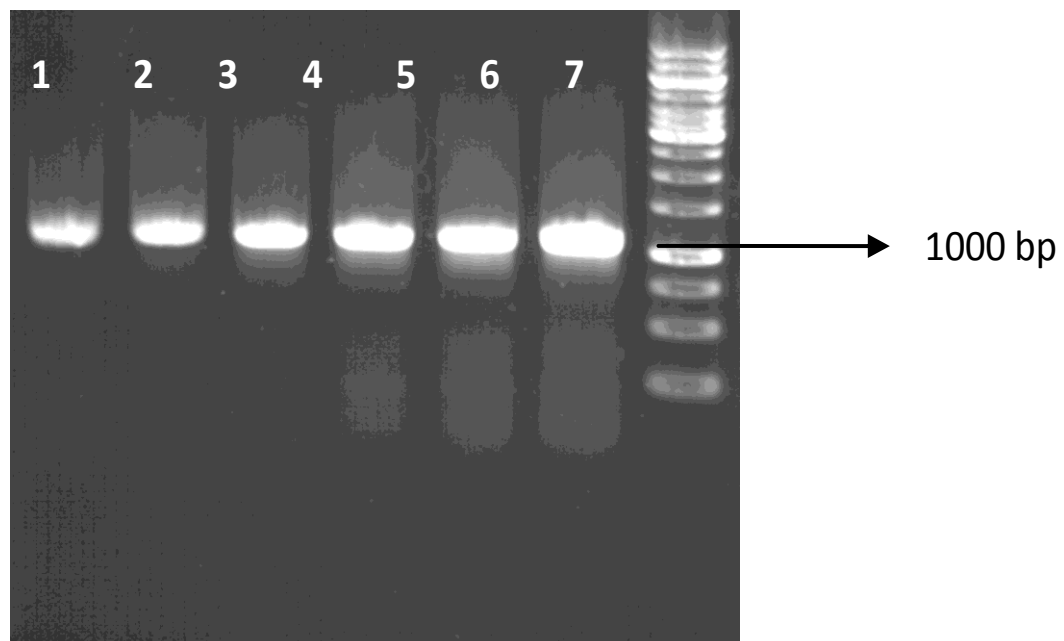
رونویسی می کند، سپس RNA رونویسی شده به پروتئین مورد نظر ترجمه می شود.

تأیید بیان پروتئین نو ترکیب قطعه لکترین: با روش SDS-PAGE، سپس Western blotting، بیان پروتئین قطعه لکترین تأیید شد.

یافته ها

تکثیر ژن *fimH* با روش PCR: در این مطالعه، از تکنیک

PCR و آنزیم pfu برای تکثیر ژن استفاده گردید. به منظور بهینه سازی شرایط PCR و به دست آوردن دمای اتصال مناسب، PCR در دماهای متفاوت انجام گرفت که بهترین دما با توجه به باند مشاهده شده روی ژل آگارز انتخاب شد. در نهایت، پروسه تکثیر در دمای اتصال ۵۷°C، به تعداد ۳۵ سیکل انجام شد. شکل شماره ۲ نتیجه الکتروفورز محصول PCR (ژن *fimH*) با آنزیم pfu را روی ژل آگارز ۰/۸٪ نشان می دهد. اندازه مورد نظر 1074 bp بوده است.



شکل شماره ۲: نتیجه الکتروفورز محصول PCR (ژن *fimH*). ۱-۶: دماهای ۵۲-۵۷: ۷: مارکر 1kb

پس از دریافت نتیجه، با استفاده از نرم افزار ClustalW که در سایت اینترنتی EBI موجود می باشد، توالی قرائت شده با ترادف ژنی *fimH* مربوط به *E. coli* UT189 مقایسه و هم تراز شدند (شکل شماره ۳).

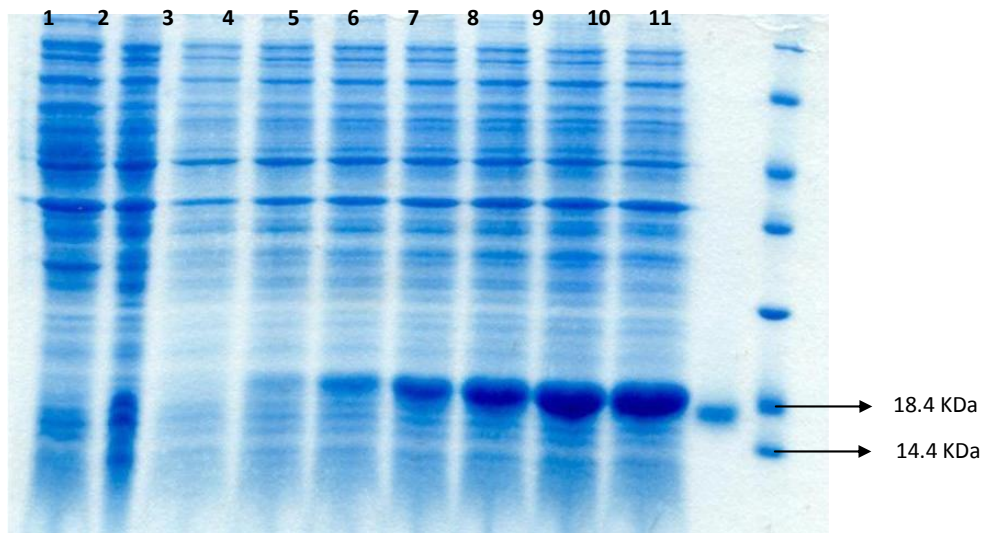
نتیجه حاصل از مقایسه نشان داد این دو توالی در ۷ نوکلئوتید با یکدیگر اختلاف دارند. این اختلافات قابل انتظار بود؛ زیرا ژن *fimH* دارای تنوع می باشد.

ATGAAACGAGTTATTACCCTGTTTGCTGTACTGCTGATGGGCTGGTCGGT
 fimH 1 ATGAAACGAGTTATTACCCTGTTTGCTGTACTGCTGATGGGCTGGTCGGT
 4913555-49144 51 AAATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTA
 fimH 51 AAATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTA
 4913555-49144 101 TTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAAT
 fimH 101 TTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAAT
 4913555-49144 151 GTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAA
 fimH 151 GTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAA
 4913555-49144 201 CGATTACCCAGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTGCGG
 fimH 201 CGATTACCCGGAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCGG
 4913555-49144 251 CTTATGGCGGCGTGTTATCTAGTTTTTCGGGACCGTAAAATATAATGGC
 fimH 251 CTTATGGCGGCGTGTTATCTAGTTTTTCGGGACCGTAAAATATAATGGC
 4913555-49144 301 AGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTTGTTTATAA
 fimH 301 AGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTTGTTTATAA
 4913555-49144 351 TTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCGGTGA
 fimH 351 TTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCGTGA
 4913555-49144 401 GCAGTGCGGGGGGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAATTGCCGTGCTT
 fimH 401 GCAGTGCGGGGGGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAATTGCCGTGCTT
 4913555-49144 451 ATTTTGCGACAGACCAACAACCTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG
 fimH 451 ATTTTGCGACAGACCAACAACCTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG
 4913555-49144 501 GAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCTGCGATG
 fimH 501 GAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCTGCGATG
 4913555-49144 551 TTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGACTACCCTGGTTCAGTG
 fimH 551 TTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTTTGCCGACTACCCTGGTTCAGTG
 4913555-49144 601 CCGATTCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTA
 fimH 601 CCGATTCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTA
 4913555-49144 651 CCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTCACCAATACCG
 fimH 651 CCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTCACCAATACCG
 4913555-49144 701 CGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGT
 fimH 701 CGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGT
 4913555-49144 751 ACGATTATTCAGCGAATAACACGGTATCGTTAGGAGCAGTAGGGACTTC
 fimH 751 ACGATTATTCAGCGAATAACACGGTATCGTTAGGAGCAGTAGGGACTTC
 4913555-49144 801 GGCGGTAAGTCTGGGATTAACGGCAAATTACGCACGTACCGGAGGGCAGG
 fimH 801 GGCGGTAAGTCTGGGATTAACGGCAAATTACGCACGTACCGGAGGGCAGG
 4913555-49144 851 TGA CTGCAGGGAATGTGCAATCGATTATTGGCGTGACTTTTGT TTTATCAA
 fimH 851 TGA CTGCAGGGAATGTGCAATCGATTATTGGCGTGACTTTTGT TTTATCAA
 4913555-49144 901 TAA 903
 fimH 901 TAA 903

شکل شماره ۳: نتیجه Alignment نوکلئوتیدی ژن کلون شده با توالی ژن *fimH* موجود در بانک ژنی NCBI: اختلافات نوکلئوتیدی به صورت زیر خط نشان داده شده اند.

SDS-PAGE و وسترن بلات انجام شد. شکل شماره ۴ نتایج را نشان می‌دهد.

نتایج بیان ژن *fimH* در *E. coli*: پس از ترانسفورم نمودن باکتری *E. coli origami*، انجام کشت و القای باکتری‌های دارای وکتور pET/fimH و نمونه‌گیری در زمانهای قبل و بعد از القای



شکل شماره ۴: نتیجه SDS-PAGE. ۱- باکتری *E. coli* فاقد وکتور pET23a؛ ۲- باکتری *E. coli* دارای وکتور pET23a؛ ۳- باکتری *E. coli* دارای وکتور pET/fimH زمان T_0 ؛ ۴- باکتری *E. coli* دارای وکتور pET/fimH زمان $T_{0.5}$ ؛ ۵- باکتری *E. coli* دارای وکتور pET/fimH زمان T_1 ؛ ۶- باکتری *E. coli* دارای وکتور pET/fimH زمان T_2 ؛ ۷- باکتری *E. coli* دارای وکتور pET/fimH زمان T_3 ؛ ۸- باکتری *E. coli* دارای وکتور pET/fimH زمان T_4 ؛ ۹- باکتری *E. coli* دارای وکتور pET/fimH زمان T_5 ؛ ۱۰- پروتئین تخلیص شده با وزن 17.2 KDa ؛ ۱۱- مارکر پروتئینی

بحث

شیوع عفونت‌های ادراری در جوامع مختلف بسیار بالا می‌باشد. به عنوان مثال در ایالات متحده، ۴۰٪ زنان بزرگسال حداقل تجربه یک بار ابتلا به عفونت ادراری را در طول زندگی خود داشته‌اند و برای حدود ۷ میلیون مورد عفونت ادراری در سال که به مراکز درمانی در آمریکا مراجعه می‌کنند بیش از یک میلیارد دلار هزینه می‌شود. /شریشیا کلی عامل اصلی UTI بوده و علت بیش از ۸۵٪ سیستیت و پیلونفریت حاد، بیش از ۶۵٪ سیستیت‌های عودکننده و علت حداقل ۳۵٪ پیلونفریت عودکننده است. از طرفی، مخزن سویه‌های UPEC فلور مدفوعی است که باکتری در ناحیه مخاطی ادراری تناسلی منتشر شده و به صورت بالارونده با رسیدن به مثانه، به اپی‌تلیال ناحیه متصل می‌شود. پس از اتصال باکتری که با واسطه آدهسین‌های پیلی صورت می‌گیرد، تکثیر یافته و عفونت موضعی سیستیت می‌دهد. در صورتی که باکتری حرکت بالارونده داشته باشد و به بافت کلیه برسد می‌تواند سبب ایجاد پیلونفریت شود.

یکی از راههای کاهش و محدود نمودن عفونت‌های حاد ادراری، استفاده از آنتی‌بیوتیک بوده که در حال حاضر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال افزایش است. راهکار دیگر، تهیه واکسن علیه این عفونت‌ها می‌باشد. از آنجایی که مرحله اتصال در کلونیزاسیون و در پی آن ایجاد عفونت بسیار مهم است؛ یکی از استراتژی‌های کاربردی، مهار اتصال باکتری است. از این رو تهیه واکسن حاوی آدهسین‌های سویه‌های UPEC مورد توجه است (۱۳).

در سال ۱۹۹۵ واکسنی به نام Solco-uovac که حاوی سویه‌های یوروپاتوژن غیرفعال بود، به صورت داخل عضله‌ای به ۱۰ دختر ۵-۱۱ ساله که UTI عودکننده داشتند تلقیح شد، سپس یک بوستر نیز پس از ۶ ماه تزریق گردید. این واکسیناسیون سبب کاهش عود عفونت و افزایش sIgA در ادرار شد. گروه شاهد هیچ‌یک از این علائم را نشان ندادند (۱۴). در سال ۱۹۹۷ واکسنی که حاوی آدهسین نوک پیلی تیپ ۱ (FimH) بود تهیه گردید.

آنتی‌بادی ضد این واکسن از اتصال سویه‌های UPEC به کشت سلول‌های مثانه انسانی جلوگیری و پس از ایمن‌سازی مدل حیوانی موش، کلونیزاسیون باکتری تا ۹۹٪ کاهش می‌یافت و در ادرار آنها نیز IgG-fimH قابل‌شناسایی بود (۱۵). این محققین در سال ۲۰۰۰ نیز این واکسن را روی مدل حیوانی میمون انجام دادند و از ۴ میمون ایمن‌شده، ۳ میمون نسبت به تلقیح سویه پاتوژن عامل سیستیت، مقاومت نشان دادند و IgG محافظ بخش در مخاط ناحیه ادراری تناسلی شناسایی شد (۱۶). در سال ۲۰۰۳ واکسنی تهیه گردید که محتوی ۱۰ باکتری یوروپاتوژن بود و روی ۵۴ زن به‌صورت واژینال تلقیح شد. نتایج واکسن در تمام این افراد به مدت ۶ ماه پیگیری و نشان داد این واکسن هیچ عارضه‌ای نداشته و باعث ایمنی در آنها شده است (۱۷). در سال ۲۰۰۶، Suhk-Neung و همکاران پروتئین FimH را با CTXA2B و LTxA2B به‌صورت فیوژن تهیه کردند تا ایمنی‌زایی FimH افزایش یابد و این پروتئین‌های ادغامی را به‌صورت دهانی به موش تلقیح کردند. همچنین نشان دادند این موش‌ها نسبت به موش‌های گروه کنترل، IgG بیشتری در خونشان داشته‌اند و مقدار IgA ترشحی آنها در مخاط افزایش یافته است (۱۸). Naber و همکاران در سال ۲۰۰۸، واکسن‌های متعددی را که علیه عفونت ادراری ساخته شده و دارای علامت تجاری نیز بود گزارش کردند که شامل این موارد بود:

۱- کپسول OM-89 که حاوی ۵ سروتیپ کشته‌شده با حرارت از UPEC است.

۲- StroVac و SolcoUrovac که به ترتیب به‌صورت داخل عضله و از راه واژن استفاده می‌شوند و حاوی ۱۰ باکتری کشته‌شده عامل UTI هستند. اینها شامل ۶ سروتیپ مختلف از UPEC، پرتئوس ولگاریس، کلبسیلا پنومونیه، مورگانلا مورگانگی و انتروکوک فکالایس نیز می‌باشند.

۳- Urostim که حاوی چهارگونه باکتری عامل UTI؛ یعنی /شریشیا کلی مولد پیل تیپ ۱ و /شریشیا کلی موتانت RC، کلبسیلا پنومونیه، پرتئوس میرابیلیس و انتروکوک فکالایس به‌همراه عصاره سلولی آنها است.

۴- Urvakol که شامل UPEC، کلبسیلا پنومونیه، پرتئوس میرابیلیس، سودوموناس آئروجینوزا و انتروکوک فکالایس بوده و

از پروپیونی‌باکتریوم اکته نیز به‌عنوان ادجوانت استفاده شده است. اما نکته قابل‌توجه آن است که این واکسن‌ها بعضاً بایستی با دوزهای شش تا یک‌ساله مصرف شوند (۱۹). با طراحی پرایمرهای حاوی سایت، برش آنزیمی و PCR با آنزیم DNA polymerase pfu ژن مورد نظر در وکتور بیانی پروکاریوتی، ساب‌کلون شد. از نکات قابل‌توجه این مرحله، در نظرگرفتن توالی کدکننده ۶ هیستیدین در پرایمر بیان در سیستم پروکاریوتی بود؛ چراکه آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین FimH در دسترس نبود و از طرفی، اگر از توالی هیستیدینی وکتور استفاده می‌شد یک توالی اضافی پروتئینی به پروتئین FimH اضافه می‌گردید. ویژگی‌های یک میزبان مناسب برای ژن‌های کلون‌شده عبارتند از: تکثیر سریع، توانایی رشد در محیط کشت‌های ارزان قیمت، مضر یا بیماری‌زا نبودن قابلیت ترانسفورمه‌شدن به‌وسیله DNA و پایداری در کشت.

مناسب‌ترین میزبان‌ها برای کلون‌کردن، میکروارگانیسم‌هایی هستند که به‌خوبی رشد کرده و اطلاعات ژنتیکی زیادی در مورد آنها در دسترس است. از باکتری‌های مناسب می‌توان به /شریشیا کلی و باسیلوس سوتیلیس اشاره نمود (۲۰). سویه بیانی DE3 (*E. coli* Origami) دارای موتاسیون‌ها و ژن‌های خاصی به‌منظور بیان ژن‌های کلون‌شده درون وکتورهای pET می‌باشد.

این سویه‌ها دارای یک باکتریوفاژ لامبدای ناقص می‌باشند که در این فاژ ژن T7 RNA Polymerase تحت پروموتور Lac قرار داده شده است و تحت القای با لاکتوز یا IPTG، این RNA پلیمراز را سنتز می‌کند و این پلیمراز رونویسی از ژن مورد نظر در روی وکتور را به عهده دارد. استفاده از /شریشیا کلی به‌عنوان میزبان برای تولید فرآورده‌های نو ترکیب به این دلایل صورت می‌گیرد: سادگی ساختار؛ سرعت رشد بالا (زمان تکثیر نسل حدود ۲۰ دقیقه)؛ عدم پاتوژنیسته؛ قابلیت بیان میزان بالایی از پروتئین‌ها. سویه بیانی Origami از *E. coli* K-12 مشتق شده است. این سوش بیانی واجد موتاسیون در ژن‌های تیوردوکسین ردوکتاز (trxB) و گلوکاتایون ردوکتاز (gor) می‌باشد. این دو موتاسیون این امکان را برای باکتری فراهم می‌کند که پروتئین‌های ساخته‌شده در سیتوپلاسم واجد پیوندهای دی‌سولفیدی باشند. همچنین این دو موتاسیون به ترتیب باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین

نتیجه گیری

با توجه به بررسی واکسن‌های متعددی که برای درمان عفونت ادراری مورد استفاده قرار گرفته‌اند، می‌توان پی به اهمیت درمان عفونت ادراری برد، لذا در مطالعه حاضر تلاش گردید پروتئین FimH به‌طور کامل بیان شود تا هم ایمنی‌زایی خوبی ایجاد کند و هم به گیرنده‌های اپی‌تلیال متصل شود، همچنین از اتصال باکتری یوروپاتوژن نیز ممانعت به عمل آورد. در این مطالعه بیان پروتئین نوترکیب FimH انجام گرفت؛ زیرا واکسن‌های نوترکیب، فواید بیشتری نسبت به واکسن‌های سنتی دارند و آنها به آسانی قابل تولید، بی‌خطر و ارزان هستند و فاقد هرگونه اجزای دیگر عامل بیماری‌زا نیز می‌باشند که غالباً موجب اثرات جانبی نامطلوب می‌شود. مزیت دیگر این واکسن‌ها در این است که مطلقاً فاقد هرگونه عامل بیماری‌زا به حالت زنده هستند. لذا در مطالعه حاضر با بیان این پروتئین نوترکیب، گام مهمی برای درمان عفونت‌های ادراری برداشته شد که بررسی این پروتئین برای ارزیابی ایمنی‌زایی در حیوان از موارد ضروری است.

و تتراسایکلین می‌شوند. بنابراین، Origami برای استفاده از پلاسمیدهایی که مقاومت به کانامایسین و تتراسایکلین را کد می‌کنند طراحی نشده است. در واقع، این سویه با پلاسمیدهایی سازگار است که به آمپی‌سیلین مقاوم باشند. این سویه همچنین از نظر ژن‌های *ompT* و *lon protease* منفی است که این موتاسیون‌ها حلالیت پروتئین نوترکیب بیان‌شده در این باکتری را به‌شدت افزایش می‌دهد.

علاوه بر این، تحقیقات نشان داده است بیان بعضی از پروتئین‌های نوترکیب در این باکتری تا ۱۰ برابر بیشتر از سایر سویه‌های بیانی معمول می‌باشد. سری وکتورهای pET به‌صورت تجاری از سوی شرکت Novagen تولید شده است و راهنمای کارکردن با انواع این سری وکتورها، شیوه‌های بهینه کلونینگ، بیان، نگهداری و تخلیص پروتئین‌های تولیدی آنها در کاتالوگی با نام pET Manual System از سوی این شرکت ارائه شده است. با توجه به خصوصیات ذکرشده در مورد این سویه، در تحقیق حاضر از آن استفاده شد.

References:

1. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon* 2003 Feb; 49(2):53-70.
2. Wullt B. Erratum to the role of P fimbriae for Escherichia coli establishment and mucosal inflammation in human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents* 2003 Jun; 21(6):605-21.
3. Lomberg H, Cedergren B, Leffeler H, Nilsson B. Influence of blood group on the availability of receptors for attachment of uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 1986 Mar; 51(3):919-26.
4. Roberts JA. Actors predisposing to urinary tract infections in children. *Pediatr Nephrol* 1996 Aug; 10(4):517-22.
5. Iwahi T, Imada A. Interaction of Escherichia coli with polymorphonuclear leukocytes in pathogenesis of urinary tract infection in mice. *Infect Immun* 1988 Apr; 56(4):947-53.
6. Funfstuck R, Smith JW, Tschape H, Stein G. Pathogenic aspects of uncomplicated urinary tract infection: Recent advances. *Clin Nephrol* 1997 Jan; 47(1):13-8.
7. Mulvey A, Schilling D, Martinez J, Hultgren J. Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic Escherichia coli and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Aug 1; 97(16):8829-35.
8. Salyers A, Whitt D. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. 2nd ed. Washington DC: ASM press; 2002. p. 422-436.
9. Schilling JD, Matthew A, Mulvey M, Hultgren SJ. Structure and function of Escherichia coli type 1 pili: New insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *J Infect Dis* 2001 Mar 1; 183(Suppl 1):S36-40.

10. Bouckaert J, Berglund J, Schembri M, De Genst E, Cools L, Wuhler M, et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli fimH adhesion. *Mol Microbiol* 2005 Jan; 55(2):441-55.
11. Johnson JR. Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991 Jan; 4(1):80-128.
12. Mulvey M, Dodson K, Soto G, Hultgren J, Fimbriae P. *Encyclopedia of microbiology*. 2nd ed. USA: Elsevier Inc Publication; 2000. p. 361-78. (Vol 2)
13. Langermann S, Ballou WR. Vaccination utilizing the fimCH complex as a strategy to prevent Escherichia coli urinary tract infection. *J Infect Dis* 2001 Mar 1;183(Suppl 1):S84-6.
14. Emre SNA, Sirin A, Bulut A, Alpay H, Tanman F. The effect of vaccination with inactivated uropathogenic bacteria in recurrent urinary tract infections of children. *Vaccine* 1995 Aug; 13(11):987-90.
15. Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlein J. Prevention of mucosal Escherichia coli infection by fimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 1997 Apr 25;276(5312):607-11.
16. Langermann S, Mollby R, Burlein JE, Palaszynski SR, Auguste CG, De Fusco A. Vaccination with fimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic Escherichia coli. *J Infect Dis* 2000 Feb; 181(2):774-8.
17. Uehling DT, Hopkins WL, Elkahwaji JE, Schmidt DM, Levenson GE. Phase 2 clinical trial of a vaginal mucosal vaccine for urinary tract infections. *J Urol* 2003 Sep; 170(3):867-9.
18. Suhk-Neung P, Yong-Hwa L. Recombinant DNA, plasmid, transformed microorganism and vaccine protein for prevention and therapy of urinary tract infection. USPTO Patent 7001744, 2006.
19. Naber KG, Cho YH, Matsumoto T, Schaeffer AJ. Immunoactive prophylaxis of recurrent urinary tract infections: A meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents* 2009 Feb; 33(2):111-9.
20. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. *Microbiol Rev* 1996 Sep; 60(3):512-38.