مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره نهم، شماره هفتم، مهر ۹٤
صفحه ۱ الی ۱۰

مقاله پژوهشی
(Original Article)

همسان‌سازی و بیان نوترکیب دُمین انتهای کربوکسیل پروتئین اینتیمین پاتوژن EHEC در باکتری *اشرشیا کلی* سویه BL21(DE3)

مصطفی بخشی[۱]، فیروز ابراهیمی[۲*]، وحیده شیخ‌زاده[۳]

چکیده

زمینه و هدف: بخشی از عفونت‌های روده‌ای به‌واسطه پاتوژن‌هایی به‌وجود می‌آیند که با مصرف مواد غذایی آلوده وارد سیستم گوارش انسان می‌شوند. در لانه‌گزینی باکتری *E. coli* O157:H7 در روده بزرگ مجموعه‌ای از پروتئین‌ها که برخی از آنها شروع‌کننده این فرآیند بوده و فقدان آنها مانع از این پدیده می‌شود، دخیل هستند. هدف از انجام این پژوهش همسان‌سازی و بیان نوترکیب پلی‌پپتید انتهای کربوکسیل پروتئین اینتیمین به طول ۳۱۱ اسید آمینه به‌عنوان کاندید واکسن علیه *E. coli* O157:H7 بوده است.

روش بررسی: طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن *eae* با استفاده از نرم‌افزار Oligo نسخه ۷ انجام شد و تکثیر ژن به‌وسیله واکنش PCR از روی DNA الگو صورت گرفت. واکنش‌های هضم آنزیمی و الحاق ژن، درون وکتور pET28a(+) انجام شد. پس از تأیید همسان‌سازی ژن، بیان نوترکیب پروتئین اینتیمین با استفاده از القاگر IPTG صورت گرفت. برای تأیید پروتئین اینتیمین، آنالیز وسترن بلات انجام شد.

یافته‌ها: همسان‌سازی ژن *eae* درون وکتور pET28a(+) به شکل مناسب بین جایگاه‌های مطلوب انجام شد و پروتئین اینتیمین پس از القا، بیان نوترکیب مناسب و قابل‌توجهی را نشان داد. آنتی‌بادی مورد استفاده در وسترن بلات نیز توانست به شکل مناسبی اینتیمین را شناسایی کند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، سازه پایدار محتوی ژن *eae* ساخته شد که بیان نوترکیب قابل‌توجهی از پروتئین اینتیمین را از خود نشان داد. بنابراین، این سازه را می‌توان برای تولید پروتئین اینتیمین جهت مطالعات ایمنی‌زایی علیه *E. coli* O157:H7 به‌کار برد.

کلید واژه‌ها: *اشرشیا کلی*؛ انتهای کربوکسیل اینتیمین؛ همسان‌سازی؛ پروتئین نوترکیب.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Bakhshi M, Ebrahimi F, Sheikhzade V. Cloning and recombinant expression of intimin c-terminal domain of EHEC pathogen in *E. coli* BL21(DE3) strain. Qom Univ Med Sci J 2015;9(7):1-10. [Full Text in Persian]

[۱]دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران.

[۲]استادیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران.

[۳]کارشناس ارشد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
فیروز ابراهیمی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
febrhimi@ihu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۳

مقدمه

اسهال حاد توسط بسیاری از عوامل عفونی ویروسی، باکتریایی و انگلی به‌وجود آمده و از عوامل اصلی مرگ و میر، به‌خصوص در کودکان محسوب می‌شود. شیوع اسهال ناشی از سویه‌های *اشرشیا کلی* در سراسر جهان، به‌ویژه در مناطقی که از سطح بهداشت پایین‌تری برخوردارند، بالا می‌باشد. باکتری *E. coli* O157:H7 عاملی بیماری‌زا است که از طریق غذاهای آلوده وارد لوله گوارش انسان می‌شود (۳-۱). باکتری پس از لانه‌گزینی (Colonization) و تکثیر، مشکلات عدیده‌ای را برای فرد آلوده از قبیل اسهال خونی، Hemolytic Uremic Syndrome و Hemorrhagic Colitis ایجاد می‌کند (۴،۳). این ارگانیسم اولین بار در سال ۱۹۸۲ در جریان شیوع ورم مخاط خونریزی‌کننده در ایالات متحده شناسایی شد (۵).

در بین سویه‌های بیماری‌زای گونه *E. coli*، پاتوژن EHEC (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*) به دلیل همه‌گیری و قابلیت لانه‌گزینی سریع در دستگاه گوارش انسان، همچنین قابلیت تولید توکسین شیگا از اهمیت خاصی در مقوله مقابله با عفونت‌های روده‌ای برخوردار است (۶،۵).

تمام ژن‌های ضروری برای بروز آسیب‌های اتصال/زدودن (Attachment/effacement) در یک جزیره پاتوژنیسیته کروموزومی با طول ۳۶-۳۵ کیلوجفت باز تحت‌عنوان لوکوس زدودن انتروسیت (Locus of Enterocyte Effacement) کد می‌شوند (۶). LEE را می‌توان به تعدادی نواحی مجزا تقسیم کرد. در یک انتها، ژن‌های *espB, espA* و *espD* قرار گرفته‌اند که پروتئین‌های ترشحی را کد کرده و برای انتقال پیام و آسیب‌های اتصال/زدودن مورد نیاز هستند. در انتهای دیگر ژن‌هایی قرار دارند که دستگاه ترشحی نوع ۳ را کد می‌کنند و برای ترشح پروتئین‌ها از قبیل محصولات ژن‌های مذکور مورد نیاز است. ناحیه سوم بین این دو ناحیه حاوی ژن‌های *eae* و *tir* بوده که به ترتیب اینتیمین (یک پروتئین خارج غشایی مورد نیاز برای آغاز اتصال) و پروتئین Tir (Translocated intimin receptor) که عملکرد آن به‌صورت یک گیرنده برای اینتیمین است کد می‌کنند (۷). پروتئین اینتیمین جزء این گروه از فاکتورها بوده و نقش مهم و بی‌بدیل آن در فرآیند مذکور نیز به اثبات رسیده است، به‌نحوی‌که این پروتئین به همراه پروتئین EspA، جزء شاخص‌های بیماری‌زایی *E. coli* O157:H7 تلقی می‌گردد (۹،۸). این پروتئین دارای دو ناحیه عملکردی است که عبارتند از: ناحیه انتهای آمین که به شدت در بین سویه‌های EPEC و EHEC حفظ شده و درون غشای خارجی باکتری قرار می‌گیرد و ساختاری شبه بشکه‌ای بتا را شکل داده و دیمریزاسیون را تسهیل می‌کند. ۲۸۰ آمینواسید انتهای کربوکسیل اینتیمین (Int280) متغیر بوده و معرف چند نوع اینتیمین است که نقش اصلی در اتصال پروتئین به گیرنده اختصاصی‌اش برای اتصال به سطح سلول اپی‌تلیوم روده را دارا می‌باشد (۱۰). این ناحیه از ۳ بخش کروی تشکیل شده است، بخش شبه ایمنوگلوبولین، بخش شبه لکتین ناحیه C و بخش انتهایی که به همراه بخش شبه ایمنوگلوبولین دربرگیرنده جایگاه اتصال به گیرنده می‌باشد (۶).

در بین سروتایپ‌های EHEC، عمده زیرنوع‌های اینتیمین که منجر به HUS (Hemolytic Uremic Syndrome) و HC (Hemorrhagic Colitis) می‌شوند عبارتند از: زیرنوع‌های آلفا، بتا و گاما (۱۱،۶). در این پژوهش با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب، اقدام به همسان‌سازی و بیان نوترکیب پلی‌پپتید انتهای کربوکسیل پروتئین اینتیمین متشکل از ۳۱۰ باقیمانده آمینواسیدی به وزن مولکولی ۳۴ کیلودالتون شد تا بتوان در مطالعات آینده از این محصول به‌عنوان یک کاندید واکسن علیه پاتوژن *E. coli* O157:H7 استفاده کرد.

روش بررسی

توالی آمینواسیدی انتهای کربوکسیل اینتیمین از پایگاه NCBI با عدد دسترسی WP_001412022.1 استخراج شد و پس از بررسی اطلاعات مربوط به شکل عملکردی این ناحیه از پروتئین اینتیمین مانند پپتید نشانه (Signal Peptide)، اپی‌توپ‌های خطی و فضایی، برگرداندن توالی آمینواسیدی به توالی نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزار ترجمه معکوس صورت پذیرفت (۱۲). تکثیر ۹۳۰ نوکلئوتید انتهای '۳ ژن *eae* (کدکننده دُمین انتهای کربوکسیل اینتیمین) به‌وسیله تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده با استفاده از نرم‌افزار Oligo نسخه ۷ انجام شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: طولی پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر ژن *eae*

طول توالی تکثیرشده	Tm	توالی پرایمر	
۹۳۰ نوکلئوتید	۵۶/۷°C	TAAGAATTCAAATCTTCTACCCCGGGT	پرایمر پیشرو
	۵۵/۵°C	TAGAAAGCTTTTATTCAACGCAAACAGC	پرایمر پیرو

خط زیرین در بخشی از توالی پرایمر پیشرو، نمایانگر جایگاه شناسایی آنزیم EcoRI و در پرایمر پیرو، نمایانگر جایگاه شناسایی آنزیم HindIII می‌باشد.

پس از آنالیز توالی نوکلئوتیدی قطعه مذکور توسط نرم‌افزار تحت شبکه NEBcutter (http://nc2.neb.com/NEBcutter2) (۱۳)، جایگاه‌های برشی EcoRI و HindIII به ترتیب در انتهای '۵ پرایمرهای پیشرو و پیرو در نظر گرفته شدند. همچنین به‌منظور پایان فرآیند ترجمه، توالی مربوط به کدون خاتمه بر روی پرایمر پیرو قرار گرفت.

برای تکثیر قطعه ژنی توسط تکنیک PCR از پلاسمیدی که دارای یک ژن کایمر محتوی ۹۳۰ نوکلئوتید انتهای '۳ ژن *eae* که در بانک مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین(ع) ذخیره شده بود، به‌عنوان الگو استفاده گردید. پلاسمید مذکور به روش لیز قلیایی استخراج شد و میزان ۰/۵ میکرولیتر از محلول محتوی پلاسمید به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط آنزیم Taq DNA پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از پرایمرهای پیشرو و پیرو هرکدام با غلظت اولیه ۱۰ میکرومولار، نمک $MgSO_4$ با غلظت ۲ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی‌مولار و ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم پلیمراز با غلظت 10X برای حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد. گرادیان دمایی ۶۵-۵۵ درجه سانتیگراد برای فرآیند اتصال پرایمرها (دمای Annealing) برای بهینه‌سازی واکنش PCR انجام شد. پس از بهینه‌سازی PCR، از آنزیم Pfu DNA پلیمراز برای تکثیر ژن مذکور، به‌منظور جلوگیری از جهش‌های ناخواسته استفاده گردید.

چرخه‌های PCR به شرح زیر انجام شد:

واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه طی ۵ دقیقه، واسرشتگی ثانویه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به رشته الگو در دمای ۶۰ درجه طی ۴۰ ثانیه، گسترش رشته جدید به‌واسطه فعالیت آنزیم پلیمراز در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵۵ ثانیه و در نهایت یک مرحله گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه.

لازم به ذکر است که تعداد چرخه‌ها برای تکثیر از مرحله واسرشتگی ثانویه تا مرحله گسترش رشته در حال سنتز، ۳۴ تکرار بود (۱۴).

برای همسان‌سازی (Cloning) محصول PCR در وکتور pET28a(+)، پس از تکثیر قطعه ژنی و تخلیص آن به‌وسیله تیوب‌های دارای سیلیکا (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، واکنش هضم آنزیمی به‌صورت دوگانه بر روی محصولات PCR، همچنین پلاسمید pET28a(+) توسط آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI و HindIII (شرکت Thermo SCIENTIFIC، لیتوانی) انجام شد و واکنش‌های برشی به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از اتمام زمان هضم آنزیمی، فرآیند مذکور با انتقال تیوب‌های محتوی اجزای واکنش به دمای ۸۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه غیرفعال شدند. پلاسمید برش‌خورده بر روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین الکتروفورز شد تا باند برش‌خورده پلاسمید به شکل اختصاصی استخراج شود. پس از تخلیص محصولات حاصل از واکنش‌های هضم آنزیمی بر روی رشته‌های DNA و پلاسمید با کیت تخلیص از ژل (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، واکنش الحاق ژن درون وکتور با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (شرکت Thermo SCIENTIFIC، لیتوانی) و در نظر گرفتن غلظت حداقلی پلاسمید به میزان ۵۰ نانوگرم و با به‌کارگیری فرمول ۱ برای محاسبه غلظت ژن مورد استفاده با حجم ۳ برابر برای واکنش الحاق انجام شد. اجزای واکنش باهم ترکیب و واکنش به‌صورت شبانه در دمای ۸ درجه سانتیگراد انکوبه گردید (۱۴).

فرمول شماره ۱:

= غلظت ژن مورد استفاده در واکنش الحاق برحسب نانوگرم

$$50\times \frac{number\ of\ gene\ base\ pair}{number\ of\ vector\ base\ pair} \times 3$$

سلول‌های میزبان مستعد باکتری *E. coli* BL21(DE3) به روش شیمیایی با استفاده از نمک‌های $Mgcl_2$ و $Cacl_2$ به ترتیب با غلظت‌های ۱۰۰ میلی‌مولار و ۸۵ میلی‌مولار تهیه شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش الحاق به‌صورت شوک حرارتی با قراردادن تیوب‌های حاوی مخلوط سلول‌های مستعد و پلاسمیدهای نوترکیب در حمام آب گرم با درجه حرارت ۳۷ درجه به مدت ۵ دقیقه و متعاقب آن قرار دادن تیوب‌ها در حمام یخ به مدت ۲۰ دقیقه، به این سلول‌ها منتقل شد و سلول‌های میزبان تراریخت‌شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (نظر به اینکه ژن مقاومت آنتی‌بیوتیک بر روی وکتور pET28a(+) کانامایسین می‌باشد) کشت داده شد و به‌صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید (۱۴).

برای تأیید همسان‌سازی ژن چند کلونی از کلون‌های رشدیافته بر روی محیط انتخابی LB آگار، انتخاب و به محیط LB براث حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منتقل گردید. پس از اینکه جذب نوری سلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۸ رسید، استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انجام شد. برای تأیید همسان‌سازی قطعه ژنی مورد نظر درون وکتور pET28a(+)، از سه تکنیک PCR، واکنش هضم آنزیمی، همچنین توالی‌یابی توسط پرایمرهای عمومی T7 اپراتور و ترمیناتور (Operator and Terminator T7 Universal Primers) استفاده گردید.

پس از تأیید همسان‌سازی قطعه ژنی، از کلون‌های رشدکرده در محیط LB براث به‌صورت شبانه، میزان ۵۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB براث تازه و استریل حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منتقل شد.

نظر به اینکه بیان ژن در سویه BL21(DE3) تحت کنترل اپرون lac می‌باشد پس از اینکه جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۵ رسید از ماده القاگر مصنوعی ایزوپروپیل-β-D-۱-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت ۱ میلی‌مولار برای القای بیان ژن مورد نظر استفاده شد و سپس سلول‌ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در دستگاه شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شدند.

نتایج بیان بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ بررسی گردید (۱۵). به‌منظور تأیید پروتئین اینتیمین نوترکیب از روش ایمنوبلات وسترن با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولیدشده در مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین (ع) علیه یک آنتی‌ژن کایمر دربرگیرنده انتهای کربوکسیل اینتیمین به‌عنوان یکی از زیرواحدهای آن استفاده گردید.

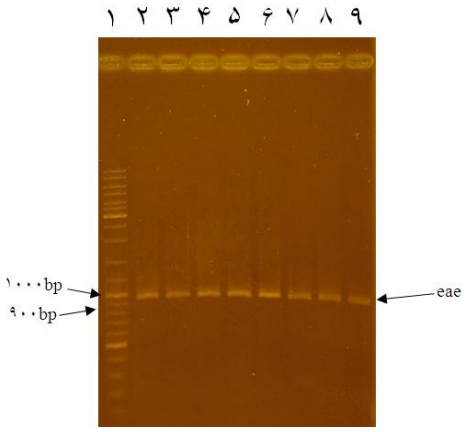
ابتدا عصاره سلولی نمونه القاشده و القانشده، همچنین پروتئین BSA بر روی ژل SDS-PAGE 12% الکتروفورز شدند. سپس فرآیند لکه‌گذاری وسترن بر روی کاغذ نیتروسلولز با استفاده از سیستم لکه‌گذاری Bio Rad و بافر مخصوص آن (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS 1% و متانول ۲۰٪ با pH =۸/۳) صورت پذیرفت. بلاک نمودن کاغذ نیتروسلولز به‌صورت شبانه با استفاده از محلول بلاکینگ (محتوی ۵٪ شیر خشک در بافر PBST) انجام شد. نمونه پس از ۳ بار شست‌وشو در بازه‌های زمانی ۱۰ دقیقه‌ای توسط بافر PBST، در معرض آنتی‌بادی پلی‌کلونال مذکور با رقت ۱/۳۵۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. فرآیند شست‌وشو مانند قبل تکرار شد و این‌بار از آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی کونژوگه به آنزیم HRP در غلظت ۱/۱۵۰۰ برای پوشاندن سطح کاغذ در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۱ ساعت استفاده شد. پس از تکرار فرآیند شست‌وشو، واکنش رنگ‌پذیری باند مربوط به اینتیمین با افزودن سوبسترای آنزیم کونژوگه HRP {(تریس ۵۰ میلی‌مولار، ۶ میلی‌گرم DAB (Diaminobenzidine) و ۱۰ میکرولیتر H_2O_2)} انجام شد. در نهایت، برای توقف واکنش رنگ‌پذیری، محلول محتوی سوبسترا از محیط با شست‌وشوی کاغذ توسط ddH_2O حذف گردید (۱۵).

یافته‌ها

با انجام BLAST از پایگاه بیوانفورماتیک NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)، میزان اختصاصیت پرایمرها برای بخش مورد نظر ژن *eae* بررسی و مشخص گردید هر دو پرایمر با اختصاصیت بالا، قطعه مورد نظر را در بانک ژنی شناسایی می‌کنند. پس از دریافت پرایمرها و آماده‌سازی آنها، بهینه‌سازی واکنش PCR برای تکثیر ژن در دماهای مختلف اتصال

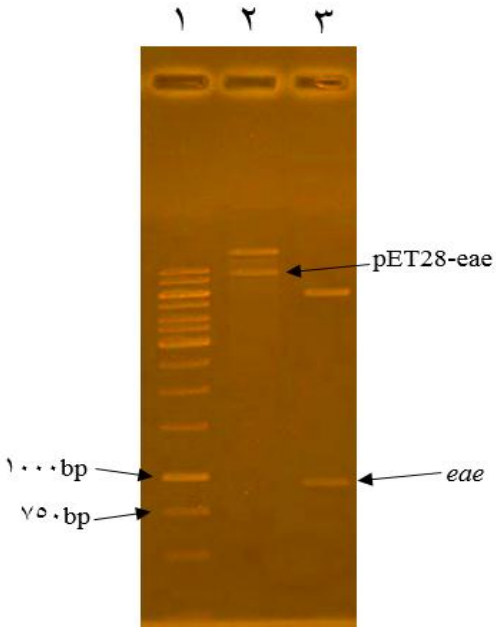
پرایمر به رشته الگو (که در بخش قبل به آن اشاره شد) به‌وسیله آنزیم Taq DNA پلیمراز (شرکت کوثر، ایران) صورت پذیرفت (شکل شماره ۱).

نظر به اینکه آنزیم مذکور صحت همسان‌سازی بالایی ندارد، لذا تکثیر نهایی رشته الگو به‌وسیله آنزیم Pfu DNA پلیمراز (شرکت Vivantis، چین) انجام شد.



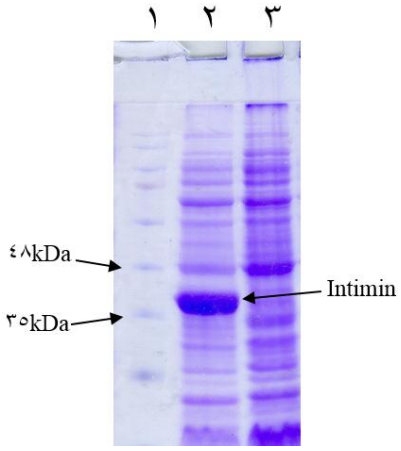
شکل شماره ۱: الکتروفورز ژن *eae* بر روی ژل آگارز ۱٪: ردیف ۱: نشانگر مولکولی DNA (100bp DNA size marker.ThermoSIENTIFIC. # SM0331). ردیف‌های ۹-۲: محصول PCR در گرادیان دمایی ۶۵-۵۵ درجه سانتیگراد. با بررسی شکل مشخص است که کیفیت باند مربوط به ژن *eae* در تمام دماها مناسب است. لذا دمای میانی این گرادیان؛ یعنی دمای ۶۰ درجه به‌عنوان دمای بهینه برای باقی فرآیندهای تکثیری ژن مدنظر قرار گرفت.

با فراهم آمدن پایانه‌های چسبنده برای ژن و وکتور از طریق برش آنزیمی دوگانه، فرآیند الحاق ژن درون MCS (Multiple Cloning Site) وکتور به‌وسیله آنزیم T4 DNA لیگاز انجام شد. پس از انتقال کلون‌های تراریخت‌شده توسط حامل نوترکیب به محیط کشت مایع و استخراج پلاسمید، با استفاده از واکنش‌های هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدودالاثر (شکل شماره ۲) مشخص گردید که ژن با موفقیت درون وکتور همسان‌سازی شده است.



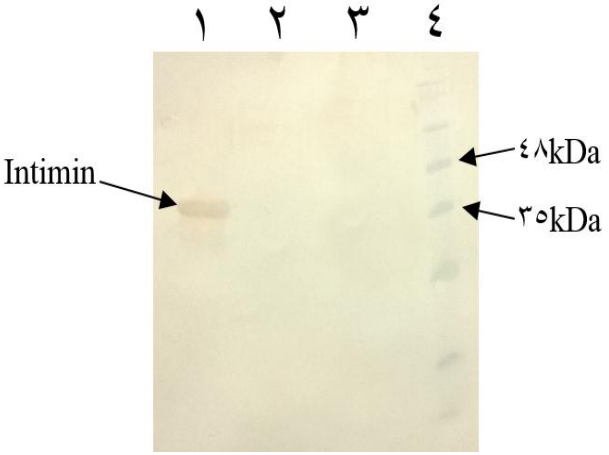
شکل شماره ۲: الکتروفورز هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pET28a-*eae* بر روی ژل آگارز ۱٪: ردیف ۱: نشانگر مولکولی DNA DNA (1kb DNA size marker.ThermoSIENTIFIC. # SM0313). ردیف ۲: وکتور pET28a-*eae* برش نخورده. ردیف ۳: هضم دوگانه وکتور توسط آنزیم‌های EcoRI و HindIII. قطعه برش‌خورده مربوط به ژن *eae* با نشانگر مشخص شده است و مطابق اندازه دقیق آن برحسب تعداد جفت باز در مقابل نشانگر مولکولی قرار گرفته است.

با القای بیان پروتئین تحت کنترل اپرون lac در شرایط انکوباسیون استاندارد، سلول‌های القاشده و القانشده جمع‌آوری و توسط بافر لیزکننده (محتوی NaH_2PO_4، ۱۰۰ میلی‌مولار؛ Nacl، ۲۰۰ میلی‌مولار و Tris-Hcl، ۱۰ میلی‌مولار با pH= ۸) شکسته شدند و پس از افزودن بافر نمونه حاوی 10% SDS بر روی ژل 12% SDS-PAGE الکتروفورز شدند. نتایج نشان داد بیان نوترکیب دُمین انتهای کربوکسیل اینتیمین در نمونه القاشده در مقایسه با نمونه القانشده بسیار مناسب و چشمگیر است (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: الگوی بیان پروتئین اینتیمین بر روی ژل 12% SDS-PAGE. ردیف ۱: نشانگر مولکولی پروتئین (Prestained Protein Ladder, (10- 250 (KDa).Sinaclon. PR911641. ردیف ۲: نمونه القاشده توسط IPTG. ردیف ۳: نمونه القانشده (کنترل منفی). باند بیانی مربوط به پروتئین اینتیمین در محدوده ۳٤ کیلودالتونی در ردیف ۲ در قیاس با باندهای نشانگر پروتئینی مشخص است. در این محدوده باندی در ردیف ۳ که مربوط به الکتروفورز نمونه القانشده (کنترل منفی) می‌باشد دیده نمی‌شود.

در پایان، به‌منظور بررسی صحت پروتئین نوترکیب انتهای کربوکسیل اینتیمین از آنالیز وسترن بلات استفاده شد. برای این منظور باند رنگ‌گرفته بر روی کاغذ نیتروسلولز در مقایسه با نمونه القانشده و نمونه کنترل آنتی‌بادی (پروتئین BSA) بررسی و مشخص گردید باند رنگی مربوط به پروتئین در جایگاه متناسب با وزن مولکولی خود؛ یعنی در مقابل باند ۳۴ کیلودالتونی، نشانگر مولکولی پروتئین قرار گرفته است (شکل شماره ۴).



شکل شماره ٤: الگوی وسترن بلاتینگ پروتئین اینتیمین بر روی کاغذ نیتروسلولز. ردیف ۱: نمونه القاشده توسط IPTG؛ ردیف ۲: نمونه القانشده؛ ردیف ۳: پروتئین BSA به‌عنوان کنترل واکنش ایمنوبلات؛ ردیف ٤: نشانگر مولکولی پروتئین (Prestained Protein Ladder, (10- 250 (KDa).Sinaclon. PR911641، در ردیف ۱ باند مربوط به اینتیمین طی واکنش وسترن رنگ گرفته است و در هنگام قیاس با باندهای نشانگر مولکولی در جایگاه صحیح خود؛ یعنی محدوده ۳٤ کیلودالتون قرار گرفته است.

بحث

باکتری‌های پاتوژن روده‌ای عوامل خطرناکی هستند و چنانچه تمهیداتی مناسب برای مقابله با آنها در نظر گرفته نشود می‌توانند عواقب جدی و جبران‌ناپذیری را در فرد آلوده ایجاد کنند (۱۷،۱۶). مرگ و میر ناشی از مصرف غذاهای آلوده به سویه‌های بیماری‌زای *E. coli* سهم به‌سزایی از نگرانی‌های کلینیکی را به خود اختصاص داده است (۱۹،۱۸). *E. coli* سویه O157:H7 نیز با تولید توکسین منجر به آسیب‌های جدی به دیواره لوله گوارش و در شکل وخیم‌تر منجر به آسیب کلیه افراد آلوده به آن می‌شود (۱۹). مطالعات گسترده‌ای در سطح کشور برای بررسی بروز و شیوع سویه‌های بیماریزای این پاتوژن انجام شده است که از جمله آن می‌توان به مطالعه سلطان دلال و همکاران (۲۰)، تهمتن و همکاران (۲۱) و کارگر و همایون (۲۲) اشاره کرد که به ترتیب به بررسی آلودگی نمونه آب چاه‌های تهران، بخشی از احشام شیراز و نمونه‌های جداشده از همبرگر پرداختند. تکنولوژی DNA نوترکیب، شرایطی را فراهم می‌سازد که می‌توان با بهره‌گیری از تکنیک‌های آن، بخش‌هایی از این عوامل را که در بروز بیماری‌زایی به‌واسطه آنها نقش اساسی دارند، به‌عنوان آنتی‌ژن همسان‌سازی کرده و پس از بیان نوترکیب به‌عنوان کاندید واکسن، میزان ایمن‌سازی آنها علیه آن پاتوژن مورد بررسی قرار گیرد (۲۳). لذا در این مطالعه با هدف بررسی فاکتورهای دخیل در لانه‌گزینی پاتوژن مذکور در لوله گوارش، تلاش گردید تا کاندیدی مناسب از بین فاکتورهای بیماری‌زای آن انتخاب شده و به شکل نوترکیب تولید و در مطالعات آینده به‌عنوان کاندید واکسن مورد ارزیابی قرار گیرد. باکتری *E. coli* یکی از اولین و وسیع‌ترین میزبان‌هایی است که برای تولید پروتئین به شکل نوترکیب استفاده می‌شود و دارای مزایای فراوانی از جمله بیان سریع، راندمان بالای محصول و هزینه تولید کم می‌باشد (۲۴). نظر به اینکه در مطالعه حاضر باکتری *E. coli* BL21(DE3) به‌عنوان میزبان برای بیان نوترکیب پروتئین اینتیمین مدنظر قرار گرفته بود، لذا از وکتور pET28a(+) که با سیستم بیانی میزبان سازگار است استفاده گردید. همچنین لازم به ذکر است با توجه به اینکه بیان پروتئین در این دسته از وکتورها تحت کنترل اپرون قوی lac می‌باشد، لذا با به‌کارگیری آنالوگ مصنوعی آلولاکتوز (IPTG)، بیان پروتئین اینتیمین به مقدار بسیار مطلوب در قیاس با نمونه القانشده (کنترل منفی) با موفقیت همراه بوده است. Gu و همکاران نیز از سامانه وکتورهای خانواده pET برای همسان‌سازی اینتیمین استفاده کردند و به نتایج مطلوبی برای بیان نوترکیب آن دست یافتند (۲۶،۲۵). در مطالعه انجام‌شده توسط این گروه از ۳۰۰ اسیدآمینه انتهای کربوکسیل اینتیمین به‌عنوان کاندید واکسن استفاده شد، درصورتی‌که در آنالیز بیوانفورماتیکی صورت‌گرفته در این پژوهش مشخص گردید ۱۱ باقیمانده ابتدایی دُمین کربوکسیل این پروتئین دارای اپی‌توپ‌های خطی بوده که توسط سیستم ایمنی شناسایی می‌شوند. Peng و همکاران نیز اقدام به همسان‌سازی و بیان نوترکیب پروتئین اینتیمین به شکل کامل نمودند؛ به‌نحوی‌که محصول نهایی آنها پروتئینی با وزن مولکولی ۹۷ کیلودالتون بود، درصورتی‌که تنها بخش دخیل از این پروتئین که در فرآیند لانه‌گزینی باکتری شرکت می‌کند دُمین انتهای کربوکسیل آن می‌باشد (۲۷). همسان‌سازی و بیان این پروتئین به‌صورت کایمر با سایر فاکتورهای دخیل در بیماریزایی عامل EHEC به شکل موفقیت‌آمیز انجام شده و منجر به شکل‌گیری ساختارهای مناسبی برای بیان پایدار آن شده است (۲۶). در نهایت، به‌منظور اطمینان از صحت پروتئین بیان‌شده، از واکنش کیفی لکه‌گذاری وسترن با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آنتی‌ژنی کایمر که اینتیمین جزء زیرواحدهای آن می‌باشد استفاده شد و مشخص گردید آنتی‌بادی مذکور می‌تواند به‌خوبی اینتیمین را شناسایی کند. در سایر پژوهش‌های صورت‌گرفته در این حوزه نیز به دلیل عدم وجود آنتی‌بادی مونوکلونال تجاری علیه اینتیمین، از آنتی‌بادی پلی‌کلونال استفاده شده است. به‌عنوان نمونه Gu و همکاران در تحقیقات خود از آنتی‌بادی پلی‌کلونال (تولیدشده علیه اینتیمین در خرگوش) برای تأیید بیان نوترکیب اینتیمین استفاده کردند (۲۶). Peng و همکاران نیز در پژوهشی که انجام دادند از آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولیدشده علیه باکتری *E. coli* O157:H7 برای تأیید این پروتئین استفاده کردند که این خود از دقت و صحت کار می‌کاهد (۲۷).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، ساخت سازه‌های ژنی و دستیابی به

ساختارهای پایدار و مناسب برای بیان نوترکیب آنتی‌ژن‌های کاندید واکسن علیه پاتوژن‌های عفونی، یکی از بهترین روش‌ها برای انجام مطالعات پیشگیرانه علیه آنها می‌باشد. در این پژوهش نیز با همسان‌سازی موفقیت‌آمیز و بیان انتهای کربوکسیل پروتئین اینتیمین به شکل نوترکیب، ساختاری پایدار و مطمئن برای تولید این آنتی‌ژن به‌منظور انجام مطالعات بعدی حاصل گردید.

تشکر و قدردانی

نتایج این پژوهش حاصل از پایان‌نامه دوره دکتری نانوبیوتکنولوژی می‌باشد که هزینه اجرای آن توسط دانشگاه امام حسین (ع) تأمین شده است. بر خود لازم می‌دانم از تمام اساتید مرکز زیست‌شناسی و مسئولان محترم حوزه پژوهش دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را ابراز دارم.

References:

1. Evans J, Knight H, McKendrick IJ, Stevenson H, Varo Barbudo A, Gunn GJ, et al. Prevalence of Escherichia coli O157:H7 and serogroups O26, O103, O111 and O145 in sheep presented for slaughter in Scotland. J Med Microbiol 2011;60(5):653-60.

2. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Alerasol M, Bagheri S, Alipoor SD. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic Escherichia coli among Iranian children. Jpn J Infect Dis 2014;67(2):78-85.

3. Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, toxigenic Vibrio cholerae, and Salmonella typhimurium by multiplex PCR. Iran J Clin Infect Dis 2009;4(2):97-103.

4. Larrie-Bagha SM, Rasooli I, Mousavi-Gargari SL, Rasooli Z, Nazarian S. Passive immunization by recombinant ferric enterobactin protein (FepA) from Escherichia coli O157. Iran J Microbiol 2013;5(2):113-19.

5. Eklund M. Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) Findings from Humans in Finland. Finland: Publications of the National Public Health Institute; 2005.

6. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: Translocation, Translocation, Translocation. Infect Immun 2005;73(5):2573-85.

7. Elliott SJ, Sperandio V, Girón JA, Shin S, Mellies JL, Wainwright L, et al. The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and Non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. Infect Immun 2000;68(11):6115-26.

8. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microbiol Rev 2008;21(1):134-56.

9. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2010;8(1):26-38.

10. Khaloie F, Porfarzam P, Rasooli I, Amani J, Nazarian S, Mousavi SL. In silico analysis of chimeric recombinant immunogen against three diarrhea causing bacteria. J Cell Mol Res 2013;5(2):65-74.

11. Ramachandran V, Brett K, Hornitzky MA, Dowton M, Bettelheim KA, Walker MJ, et al. Distribution of intimin subtypes among Escherichia coli Isolates from ruminant and human sources. J Clin Microbiol 2003;41(11):5022-32.

12. Stothard P. The sequence manipulation suite: Java Script programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. Biotechniques 2000;28(6):1102-4.

13. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res 2003;31(13):3688-91.

14. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: CSHL Press; 2001.

15. Bollag DM, Michel DR, Edelstein SJ. Protein methods. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1996.

16. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiol Res 2014;169(2-3):205-12.

17. Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. J Microbiol Methods 2012;90(1):36-45.

18. Bakhshi M, Ebrahimi F, Zargan J, Nazarian S, Sheikhzade V. Cloning and recombinant expression of EspA as a virulence factor of E. coli O157:H7. J Mazandaran Univ Med Sci 2014;24(117):12-20. [Full Text in Persian]

19. Gyles CL. Shiga toxin-producing Escherichia coli: An overview. J Anim Sci 2007;85(13 Suppl):45-62.

20. Soltan Dallal MM, Sepehri S, Tabatabaei Bafrouei A, Deilami Khiabani Z. Determination of genotype variation of Escherichia coli in well water of Tehran's parks by Multiplex PCR. Pejouhandeh 2011;16(5):226-33. [Full Text in Persian]

21. Tahamtan Y, Pourbakhsh SA, Hayati M, Namdar N, Shams Z, Namvari MM. Prevalence and molecular characterization of verotoxin-producing Escherichia coli O157:H7 in cattle and sheep in Shiraz-Iran. Arch Razi Ins 2011;66(1):29-36.

22. Kargar M, Dianati P, Homayoon M, Jamali H. Isolation, Characterization and antibiotic resistance of shiga toxin-producing Escherichia coli in hamburger and evolution of virulence genes stx1, stx2, eaeA and hly by Multiplex PCR. J Fasa Univ Med Sci 2013;3(3):208-14. [Full Text in Persian]

23. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv 2009;27(3):297-306.

24. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 1999;10(5):411-21.

25. Gu J, Liu Y, Yu S, Wang H, Wang Q, Yi Y, et al. Enterohemorrhagic Escherichia coli trivalent recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. Microbes Infect 2009;11(10-11):835-41.

26. Gu J, Ning Y, Wang H, Xiao D, Tang B, Luo P, et al. Vaccination of attenuated EIS-producing Salmonella induces protective immunity against enterohemorrhagic Escherichia coli in mice. Vaccine 2011;29(43):7395-403.

27. Peng LJ, Zhou Y, Yang Y, Hui CY, Zhao W, Wan CS. Gene cloning, prokaryotic expression and functional evaluation of intimin from enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2009;29(4):707-210.

Cloning and Recombinant Expression of Intimin C-Terminal Domain of EHEC Pathogen in E. coli BL21(DE3) Strain

Mostafa Bakhshi[1], Firouz Ebrahimi[2*], Vahide Sheikhzade[3]

[1]PhD Student of Nanobiotechnology, Biology Research Center, Faculty & Institute of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

[2]Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Biology Research Center, Faculty & Institute of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

[3]Master of Sciences in Food Technology, Department of Food Science & Technology, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

Corresponding Author:
Firouz Ebrahimi, Biology Research Center, Faculty & Institute of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Email:
febrhimi@ihu.ac.ir

Received: 30 Nov, 2014

Accepted: 2 Feb, 2015

Abstract

Background and Objectives: Some intestinal infections are caused by pathogens that enter the gastrointestinal tract of humans by consumption of contaminated food. A set of proteins are involved in colonization of *E. coli* O157:H7 in the large intestine, some of which initiate this phenomenon and their absence prevents it. The aim of this study was cloning and recombinant expression of C-terminal polypeptide of intimin, with a length of 300 amino acids, as a vaccine candidate against *E. coli* O157:H7.

Methods: Specific primers for *eae* gene were designed using Oligo software version 7.0 and gene amplification was performed by PCR from template DNA. Enzymatic digestion and gene ligation were performed in pET28a(+) vector. Recombinant expression of intimin was done by IPTG inducer following the cloning confirmation. Western blotting analysis was performed to confirm the intimin protein.

Results: Cloning of *eae* gene in the pET28a (+) vector was performed appropriately among desired sites, and intimin protein had a proper and significant recombinant expression after the induction. Also, the antibody used in western blotting could identify intimin.

Conclusion: In this study, a stable construct containing *eae* gene was synthetized, which showed an appropriate recombinant expression of intimin protein. Therefore, this construct can be used to produce intimin protein for immunization studies against *E. coli* O157:H7.

Keywords: *Escherichia coli*; C-terminal domain of intimin; Cloning; Recombinant protein.