

کلونینگ و بیان ژن MOMP217 کلامیدیا تراکوماتیس در اشرشیا کولی

راضیه بیتازر: کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران. Bitazar1984@gmail.com
رضوان باقری: مرکز تحقیقات دندانپزشکی، پژوهشکده علوم دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران. Rezvan_b1980@yahoo.com
علی سلیمی: کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال، پژوهشکده فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران. Ali.salimi.maraghi@gmail.com
*** دکتر بهاره حاجی خانی:** استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول). B.hajikhani@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: کلامیدیا تراکوماتیس باکتری خاموش، مواج و متاسفانه فراموش شده ای است که باعث آسیب و اختلال در عملکرد دستگاه تناسلی می باشد. این باکتری گرم منفی و داخل سلولی اجباری با چرخه ی زندگی منحصر به خود و ایمنوپاتوژن ویژه منجر به عوارض شدید من جمله اندومتريت، بیماری التهابی لگن (PID) و ناباروری می شود. این باکتری عامل تسهیل کننده ی انتقال ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) و همچنین کوفاکتور ویروس پاپیلوما ی الفاء کننده ی نئوپلازی دهانه ی رحم است. برای غلبه بر این ناهنجاری ها واکسیناسیون بهترین راه برای کنترل عفونت است. بر این اساس پروتئین اصلی غشاء خارجی (MOMP) به عنوان کاندیدای بالقوه ی واکسن مطرح می باشد.

روش کار: در این مطالعه ژن MOMP217 در وکتور بیانی⁺ pET-28b کلون و در باکتری E.coli بیان شد. بیان پروتئین با ژل SDS-PAGE ۱۰٪ رنگ شده با رنگ کوماسی بلو تایید شد.

یافته ها: در کنار مطالعات *In silico*، به دلیل وجود مناطق مهم اپی توپیک در این قطعه ژنی محافظت شده، MOMP217 نوترکیب می تواند پپتید مناسبی برای ایجاد ایمنی زایی معرفی گردد.

نتیجه گیری: با استفاده از تست های تاییدی بیشتر و مطالعات حیوانی به منظور بررسی و ارزیابی وضعیت پاسخ سیستم ایمنی، این پروتئین می تواند به عنوان کاندیدی برای مطالعات واکسنی مطرح شود. قطعاً مطالعه ی پیش رو نیازمند انجام آزمایشات و تست های تکمیلی بیشتری می باشد.

کلیدواژه ها: واکسن، کلامیدیا تراکوماتیس، پروتئین اصلی غشاء خارجی MOMP

مقدمه

میان بانوان مراجعه کننده به کلینیک ناباروری در تهران ۱۲٫۶٪ برآورد شده است (۶). این پاتوژن دارای دو چرخه زندگی دو فاز و دو فرم مرفولوژیک منحصر به خود یعنی اجسام ابتدایی (Elementary Bodies) و اجسام مشبک (Reticulate Bodies) است که به ترتیب فرم عفونی و غیر عفونی این باکتری را می باشند (۷). به علاوه، عفونت کلامیدیایی بستری مناسب جهت تسهیل انتقال عفونت ویروس نقص ایمنی (HIV) و همچنین کوفاکتور نئوپلازی القایی گردن رحم با پاپیلوما ویروس می شود (۸). سایت اولیه ی عفونت کلامیدیایی سلول های پوششی استوانه ای، اندوسرویکس زنان و اپی تلیال ناحیه ی اورورنیتال در مردان است (۹). در صورت ایجاد یک واکسن

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) کلامیدیا تراکوماتیس مسئول بیش از ۹۲ میلیون از ۳۴۰ میلیون عفونت تناسلی در سراسر دنیا می باشد (۱). شیوع بالای چنین عفونت های منتقله از راه جنسی در اروپا و آمریکا (۳۲) این باکتری را به عنوان یکی از مهم ترین عوامل ایجاد بیماری التهابی لگنی (Pelvic Inflammatory Disease-PID)، سالپنژیت، حاملگی نا به جا و ناباروری معرفی می کند (۴). در ایران، کلامیدیا شیوع قابل توجهی دارد. طی مطالعه ی انجام شده در سال ۲۰۱۰، شایع ترین ژنوتیپ ها (E,F & G) با شیوع حدود ۶۸٪ گزارش شده اند (۵). همچنین در سال ۲۰۰۷ شیوع کلامیدیا تراکوماتیس در

روش کار

پلاسمید و سویه های باکتری: سویه استاندارد کلامیدیا تراکوماتیس L1 شماره ۴۴۰، اشرشیا کولی DH5 و BL21(DE3) به ترتیب به عنوان میزبان کلونینگ و بیان و همچنین وکتور بیانی pET28 ساخت شرکت نوآژن از پژوهشگاه ابن سینا تامین گردید.

طراحی پرایمر برای ژن MOMP217 و انجام PCR:

برای طراحی پرایمر توالی ژن مورد نظر از بانک ژنی (NCBI National Center For Biotechnology Information) استخراج و توسط نرم افزار Gene Runner پرایمر مناسب طراحی گردید. پرایمرهای پیش رو و معکوس واجد جایگاه برش آنزیم های BamHI و HindIII به ترتیب به صورت زیر می باشد:

5'-GTTGGGGATCCTGGAGATAATGA
AAAT-3'

و

5'-ACTCTAAGCTTCTCAACTGTAAC
TGCGTATTT-3'

جایگاه برش دو آنزیم محدود الاثر پر رنگ می باشد. در ابتدای هر دو پرایمر پیش رو و معکوس چندین نوکلئوتید اضافی طراحی شده است. تعبیه ی این نوکلئوتید ها به دستیابی به دمای چسبندگی ایده آل پرایمر ها و تنظیم جایگاه برش کمک می کند. جدول ۱ توالی پرایمر ها را نشان می دهد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲،۵ میکرولیتر بافر (۵ x) PCR، ۱،۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار، ۰،۲ میکرولیتر آنزیم ۵ واحد بر میکرولیتر Taq polymerase و ۱ میکرولیتر از DNA الگو انجام شد. شرایط PCR به صورت ابتدا ۵ دقیقه در ۹۵ درجه و سپس ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۳،۵ درجه، یک دقیقه و سی ثانیه در ۷۲ درجه برای ۴۰ سیکل و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه انجام گرفت. پس از انجام واکنش، محصولات PCR روی ژل آگاروز برده شده و سپس قطعه ژنی مورد نظر از ژل بریده و توسط کیت استخراج

با ایمنی کامل عفونت کلامیدیایی طی ۲۰ سال ریشه کن خواهد شد. واکسیناسیون بیش از هر مداخله ی بیومدیكال دیگری در کنترل اپیدمی عفونت کلامیدیایی مؤثر می باشد (۱۰). با وجود طیف وسیعی از انواع آنتی بیوتیک ها به عنوان سد دفاعی علیه باکتری ها، نابودی قطعی باکتری در گرو برنامه ی صحیح و مدون واکسیناسیون می باشد. ساخت واکسن از موارد اورژانس بهداشت عمومی است زیرا که سالانه بلیون ها دلار صرف درمان این عفونت می شود (۱۱). واکسیناسیون علیه کلامیدیا تراکوماتیس با مدل های حیوانی متعدد، به وسیله ی ارگانسیم کامل یا به صورت واکسن های ساب یونیتی صورت گرفته است. استفاده از مدل های حیوانی به دلیل توانایی در تقلید عفونت به همان شکل آسیب رسان در انسان، مطالعات صورت گرفته را واقعی تر نشان می دهد (۱۲). پروتئین های سطحی محافظت شده ی متعددی در میان سروتیپ های گوناگون کلامیدیا تراکوماتیس کاندیدای بالقوه ای برای توسعه ی برنامه های جدید واکسیناسیون می باشند (۱۳). از میان آن ها پروتئین اصلی غشاء خارجی، MOMP، کاندیدای امید بخش مورد نظر است. MOMP غنی از اسید آمینه ی سیستمین، ۶۰٪ پروتئین غشاء خارجی را به خود اختصاص می دهد. همینطور تحت حمایت چنین پروتئینی اپی توپ های خاص جنس، گونه و سروتیپ موجب القای پاسخ سلول T و تولید آنتی بادی می شود (۱۴). هدف از مطالعه ی حاضر، تهیه ی یک پروتئین نو ترکیب از ژن MOMP از سکانس آمینو اسیدی ۱۶۰ تا ۳۷۶ می باشد. در این تحقیق با استفاده از تکنیک های کلونینگ و بیان پروتئین در سیستم پروکاریوتی روند بیان این قطعه ی ژنی با استفاده از تکنیک SDS-PAGE ارزیابی و همچنین، استفاده از نرم افزار های پیش گویی کننده ی دومن های آنتی ژنی و حضور چنین مناطقی در قطعه مورد مطالعه بر ارزش این قطعه ی ژنی می افزاید. این مطالعه به منظور معرفی این ناحیه به عنوان کاندیدای بالقوه ی واکسن نیازمند مراحل و تست های تکمیلی می باشد.

لودینگ بافر پروتئین به همراه حل شد. وزن ملکولی و محل قرار گیری پروتئین نو ترکیب با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد. دمای انکوباسیون در فواصل زمانی ۲، ۴ و ۶ ساعت ۳۷ درجه و برای کشت شبانه به ۲۵ درجه تقلیل یافت.

بیوانفورماتیک: سکانس آمینو اسیدی ژن MOMP به شکل FASTA از پایگاه اطلاعاتی بانک پروتئین (Protein Data Bank) استخراج گردید. تاکنون هیچ اطلاعات ثبت شده ای مبنی بر وجود ساختار سوم این پروتئین گزارش نشده است. پیشگویی نواحی آنتی ژنیک با استفاده از روش Kolaskar and Tonaonkar انجام پذیرفت (۱۵). همچنین، پیشگویی ساختار ثانویه ژن MOMP با روش Garnier (GOR) (Osguthorpe-Robson) بررسی شد (۱۶). ترکیب و ساختار آمینو اسیدی این قطعه ی ژنی با استفاده از منابع آن لاین در زمینه ی پروتئین شیمی مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

یافته‌ها

انجام PCR و ساخت پلاسمید نو ترکیب: واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. باند مربوط به ژن تکثیر شده روی ژل آگاروز ۱ درصد مشاهده و اندازه آن از طریق مقایسه با نشانگر (Marker) استاندارد تایید شد. باند مورد انتظار با در نظر گرفتن چندین نوکلئوتید اضافی در ابتدای پرایمرها ۶۷۴ جفت باز می باشد. پس از وارد سازی قطعه MOMP217 به درون وکتور pET28b و ایجاد پلاسمید نو ترکیب، pET28b-MOMP217، با هضم آنزیمی توسط آنزیم های BamHI و HindIII و PCR با پرایمر های وکتور و قطعه ی ژنی تایید شد.

بیان پروتئین: پس از انتقال پلاسمید نو ترکیب pET28b MOMP217 به سلول های مستعد شده ی باکتری E. coli BL21(DE3) به منظور بیان پروتئین القاء با IPTG انجام شد و تولید پروتئین مورد نظر با وزن ۲۴ کیلو دالتون با انجام SDS-PAGE تایید شد. نتیجه در شکل ۱ آمده است. همان طور که ملاحظه می شود باند ۲۴ کیلو

DNA (ساخت شرکت کیاژن، آلمان) خالص شد. کلون سازی ژن MOMP217 با توجه به جایگاه های آنزیمی تعبیه شده در پرایمرها، قطعه ی ژنی در شرایط بافری هر آنزیم برش خورده و سپس از روی ژل آگارز توسط کیت استخراج خالص سازی شد. وکتور pET28b نیز با استفاده از همان آنزیم ها و در شرایطی مشابه برش خورده و به شکل خطی درآمد و سپس واکنش الحاق بین وکتور و قطعه برش خورده با استفاده از آنزیم لیگاز صورت پذیرفت. پلاسمید های نو ترکیب حاصل به صورت ترانسفورماسیون (Transformation) به میزبان کلونینگ (E. coli DH5) مستعد شده وارد شد. پس از رشد کلونی ها استخراج پلاسمید از آن ها توسط کیت استخراج پلاسمید (ساخت شرکت کیاژن، آلمان) انجام گرفت و صحت کلونینگ به دو روش PCR و هضم آنزیمی تایید شد. در مرحله ی بعد پلاسمید نو ترکیب pET28b-MOMP217 که صحت آن تایید شده است برای مرحله ی بیان پروتئین وارد میزبان بیانی E. coli BL21(DE3) گردید.

بیان پروتئین نو ترکیب: انتقال ناقل نو ترکیب به میزبان بیانی طی مراحل کشت و صلاحیت دار کردن باکتری، ترانسفورماسیون و تایید آن مشابه موارد ذکر شده در مرحله ی قبل صورت گرفت. باکتری حاوی ناقل نو ترکیب در محیط LB برات (Luria-Bertani Broth) حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (Kanamycin) به میزان ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر کشت (۱۰۰ میلی لیتر) کشت داده شد و پس از رسیدن به جذب نوری ۰٫۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (فاز رشد ثابت، Stationary)، توسط IPTG-β (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار القا شد. علاوه بر این به عنوان کنترل هم زمان با این روند از یک نمونه ی کشت ۱۰۰ میلی لیتری بدون IPTG استفاده شد. سپس به فواصل ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت، از کشت های القا غیر القا نمونه گیری انجام و کدورت با اسپکت سنجیده شد. از همه ی نمونه گیری ها در زمان های مختلف از طریق سانتریفیوژ ۶۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه رسوب سلولی تهیه و آن ها را در

جدول ۱- پرایمرهای ژن MOMP217 و جایگاه عمل آنزیمی

Forward (5'-3')	GTTGG GGATCC TGGAGATAATGAAAATC BamHI
Reverse (5'-3')	ACTCT AAGCTT CTCAACTGTAAGTGCCTATT HindIII

جدول ۲- پیش گویی مناطق آنتی ژنیک ژن MOMP کلامیدیا تراکوماتیس سرووار L1

	10	20	30	40	50
epitope	MKLLKSVLVFAALSSASSLQALPVGNP	AEPSLMIDGILWEGFGGDP	CDP		
	60	70	80	90	100
epitope	CTTWCDALSMRMGYGDFVDRVLQTDVNKEFQMGAKPTATTGNAAAPST				
	110	120	130	140	150
epitope	CTARENPAYGRHMQDAEMFTNAAYMALNIWDRFDVFC	TLGATSGYLKGN			
	160	170	180	190	200
epitope	ASFNVLVGLFGDNENQSTVKKDAVPNMSFDQSVVELYTD	TTFAWSVGARAA			
	210	220	230	240	250
epitope	LWECGCATLGASFQYAQSKPKVEELNVL	CNAAEFTINKPKGYVGKEFLD			
	260	270	280	290	300
epitope	LTAGTDAATGTKDASIDYHEWQASLALS	YRLNMF	TPYIGVKWSRASFDAD		
	310	320	330	340	350
epitope	TIRIAQPKLATAIFDTTTLNPTIAGAGEV	KANAEGQLGDTMQIVSLQLNK			
	360	370	380	390	
epitope	MKSRKSCGIAVGTIIVDADKYAVTVETRLI	DERAAHVNAQFRF			

دسته بندی بر اساس ماهیت هیدروفوب و هیدروفیلی را فراهم می آورد. همچنین در جدول ۳ تعدادی از بانک های اطلاعاتی مهم در زمینه ی مناطق اپی توپیک قابل تشخیص سلول B و T مشخص شده است.

بحث و نتیجه گیری

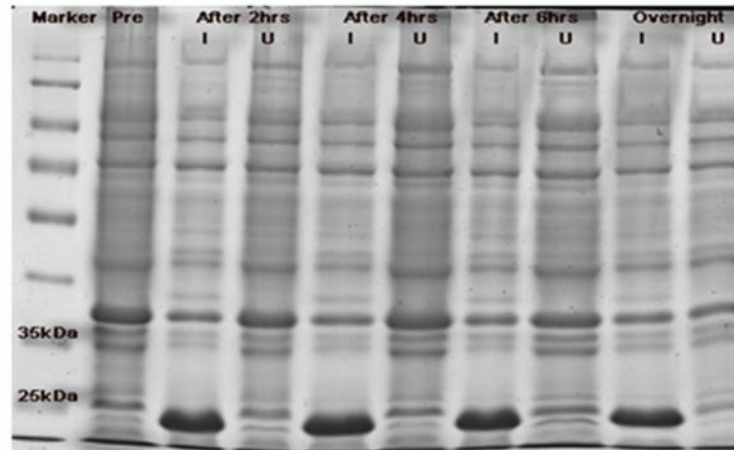
STDs یا همان بیماری های منتقله از راه جنسی از مهم ترین نگرانی های سازمان بهداشت جهانی به شمار می آید. کلامیدیا تراکوماتیس از مهم ترین عوامل این بیماری ها ست که سالانه میلیون ها نفر را دچار می کند. به علاوه اینکه عفونت با کلامیدیا تراکوماتیس باعث تسهیل انتقال عفونت و بروس نقص ایمنی در انسان و

دالتونی حاصل از بیان ترکیب پروتئینی در نمونه ی غیر القاء وجود ندارد اما در نمونه های القاء شده به خوبی قابل مشاهده است.

بیوانفورماتیک و پیشگویی مناطق آنتی ژنیک: پیشگویی مناطق آنتی ژنیک با استفاده از روش Kolaskar and Tonaonkar انجام و نتیجه ی آن در جدول ۲ آمده است. دومن های آنتی ژنیک طبق جدول با علامت مثبت نشان داده شده است که موید وجود مناطق آنتی ژنیک از آمینو اسید ۱۶۰ تا آمینو اسید ۳۷۶ می باشد. در بررسی ساختار دوم مناطقی با انعطاف پذیری بالا (Random coil) دیده شد. وجود چنین مناطقی ایمن زایی قطعه ی مورد بررسی را افزایش می دهد. ترکیب آمینو اسید ها امکان آنالیز آن ها و

جدول ۳- بانک‌های اطلاعاتی، پیشگویی مناطق اپی‌توپیک سلول T.B.

بانک اطلاعاتی	آدرس	
B-cell epitopes	IEDB	http://www.iedb.org
	FRED	http://www.bs.informatik.unituebingen.de/Software/FRED
T-cell Epitopes	CEP	http://bioinfo.ernet.in/cep.htm
	IEDB	http://www.immuneepitope.org



شکل ۱- ارزیابی بیان MOMP17 نوترکیب در میزبان بیانی E.coli BL21 (DE3)

U: لیزات باکتریایی حاصل از کلون نوترکیب القا نشده (کنترل بیان)

I: لیزات باکتریایی حاصل از کلون نوترکیب القا شده با IPTG در زمانهای مختلف

ی دامپزشکی و استفاده از مدل‌های حیوانی متفاوت برای ارزیابی کارایی این واکسن، هنوز دستیابی به واکسن انسانی کارآمد محقق نشده است (۱۹). ارتقاء دانش بشر در حیطه‌ی تکنولوژی امیکس (OMICS) مانند واکسینو میکس یا پروتئومیکس ارائه دهنده‌ی خط مشی‌های جدید برای ساخت واکسنی با قابلیت بالای تحریک سیستم ایمنی علیه عفونت کلامیدیایی می‌باشد (۲۰). تا به حال، مطالعه و تحقیق واکسن کلامیدیایی معطوف به ساخت واکسن‌های نوع ساب یونیتی بوده است (۲۱). واکسن‌های نسل اول که در آن‌ها از ارگانیسیم به شکل کامل استفاده می‌شود دارای معایبی من جمله خاصیت برگشت به فرم ویروانیت باکتری و خطر زای بودن آن جایگاه خود را به واکسن‌های نوع ساب یونیتی داده اند (۲۲). واکسن‌های ساب یونیتی مستلزم استفاده از ادجوانت و سیستم‌های تحویلی (Delivery System) می‌باشد ولی با این حال در افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند و

همچنین کوفاکتور نئوپلازی القایی گردن رحم با پاپیلوما ویروس است. ناباروری در زنان از برجسته‌ترین پیامدهای آلودگی با این باکتری می‌باشد و نیاز به واکسن در جهت محدود سازی عوارض ناشی از این عفونت از مدت‌ها پیش مطرح شده است. عدم درمان عفونت در نهایت آسیب‌های جدی ارگان‌های تولید مثلی را به دنبال دارد. برای مبارزه با سطح بالای عفونت و بیماری تولید یک واکسن کارآمد امری بس ضروری و حیاتی است. آنتی ژن‌های باکتریایی جهت استفاده در تهیه واکسن بر اساس خصوصیات مختلفی از جمله سطحی بودن که باعث دستیابی آسان تر سیستم ایمنی به آن‌ها می‌شود، ایمونوژن قوی بودن، حفاظت شدگی بین تمام ایزوله‌های مربوطه و دخالت آن‌ها در پاتوژن انتخاب می‌شوند. پروتئین اصلی غشائی (MOMP) جزء غشایی در دسترس با ایمونوژنی سیتی بالا و دارای مناطق اپی‌توپیک حائز ارزش سلول B و T می‌باشد (۱۸). با این حال، علی‌رغم تمام پیشرفت‌های لازم در زمینه

مسئله دیگر مربوط به طراحی وکتور، وجود برچسب هسیتیدینی در ابتدای محصول است. در واقع وجود چنین برچسبی امکان خالص سازی بسیار آسان محصول تولید شده را بدون توجه به نوع پروتئین فراهم می نماید. وجود چنین برچسبی سبب می شود که به راحتی محصول پروتئین تولید شده در یک مرحله توسط ستون های تمایلی نیکل خالص سازی گردد. در مطالعه حاضر نیز محل قرار گیری ژن ها درون وکتور به گونه ای طراحی شد که پس از بیان، برچسب هسیتیدینی (6-His tag) در ابتدای پروتئین های نو ترکیب واقع شود. از مزایای این برچسب ایجاد پلی پپتید های محلول و افزایش حلالیت پروتئین میباشد. استفاده از pET28b از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می باشد چرا که برای حذف برچسب هسیتیدینی ذکر شده به ترومبین نیازمند می باشد و این در حالی است که وکتور های دیگر به عنوان مثال pET32a با برچسب هسیتیدین و تیورودوکسینی (Trx-His-tag) نیازمند آنزیمی پر هزینه مانند انتروکیناز می باشد. برچسب هسیتیدینی به دلیل وزن ملکولی پایین در طول تخلیص به راحتی حذف می شود و به دلیل تعلق آن به گروه آمینو اسید هایی با ایمنی زایی پایین، تاثیر محدودی بر فعالیت پروتئین خواهد داشت (۲۶). بالاترین میزان بازده بیان هموگلوبین II نو ترکیب از *Lucina pectinata* در دمای ۳۰ درجه بوده است (۲۷). طی مطالعه ی دیگری، شرایط بهینه ی بیان پروتئین *PsA mature* سودوموناس آروژینوزا در اشرشیا کلی با ۰٫۱ میلی مولار IPTG در دمای ۲۵ درجه گزارش شده است (۲۸). پروتئین در دمای بالا در حین بیان تمایل به سمت ایجاد رسوب و تشکیل انکلوژن بادی دارد، بر این اساس با کاهش دما میل به رسوب کم و فرم محلول پروتئین به دست می آید. کاهش دما کمک می کند تا انکلوژن بادی به میزان کمتری تولید شود. در دمای ۲۵ درجه مصرف باکتری و تقسیم آن کاهش یافته و تمام انرژی مانده از باکتری صرف بیان پروتئین می شود. در نتیجه اینکه، القاء شبانه روزی بی نیاز از پیگیری در دمای ۲۵ درجه میزان بازده بیان پروتئین را افزایش می دهد. در تحقیق

همچنین زنان باردار منع مصرف ندارد. تا به امروز واکسن های ساب یونیتی علیه مننگوکوک، هموفیلوس آنفولانزا، هپاتیت B و پنوکوکک عرضه شده است (۲۳). برای ساخت واکسنی موثر علیه کلامیدیا دانشی کامل در زمینه ایمنولوژی پیامد ابتلا به عفونت بسی لازم و ضروری است، زیرا که واکسن مناسب نیازمند تحریک هر دو سلول T و B و پاسخ آنتی بادی می باشد. در مطالعه ی پیش رو که برای اولین بار در ایران انجام گرفته است، با استفاده از نرم افزارهای پیش گویی کننده ی مناطق آنتی ژنیک قطعه ی انتخابی ۲۱۷ آمینو اسیدی از آمینو اسید ۱۶۰ تا ۳۷۶ ژن MOMP به عنوان پروتئین کوتاه شده (Truncated) مورد بررسی قرار گرفت. در این حالت کوتاه تر شدن قطعه و اختصاصی تر شدن آن باعث سهولت کار و احتمالاً افزایش حفاظت بخشی می شود. همچنین ترکیب آن با سایر آنتی ژن ها برای ساخت پروتئین فیوژن از دیگر مزایای آن می باشد. از آن گذشته تولید پروتئین نو ترکیب نسبت به پروتئین طبیعی راحت و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می باشد. Lifang Zhang در سال ۲۰۱۰ اپی توپ های سلول را B شناسایی و ایمنی زایی آن را در مدل موشی مورد بررسی قرار دادند. این مناطق شامل (MOMP73-81, MOMP161, MOMP217-225, MOMP261-270 و MOMP377-386) می باشد که از میان آن ها MOMP377-386 به عنوان اپی توپ ایمنودومینانت شناسایی شده است (۲۴). بدون شک پاسخ سلول B برای حفاظت علیه این عفونت ضروری می باشد اما نقش برجسته ی سلول T به دلیل عملکرد ارزشمند سلول T سیتو توکسیک و T-helper قابل توجه است. Murtada A.taha و همکاران در سال ۲۰۱۱ با کشف و شناسایی اپی توپ های لئوسیت T و کلون کردن یک پپتید ۳۱KDa، ایمنوژنی سیتی را در موش بررسی و پتانسیل بالقوه ی آن را به عنوان کاندید واکسن بررسی کردند. یافته های این مطالعه نشان داد که تزریق داخل عضلانی rMOMP278 باعث القای پاسخ سیستمیک و مخاطی آنتی بادی می شود (۲۵).

host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 1991;55:143-90.

8. Yu H, Jiang X, Shen C, Karunakaran KP, Brunham RC. Novel Chlamydia muridarum T cell antigens induce protective immunity against lung and genital tract infection in murine models. *J Immunol.* 2009;182:1602-8.

9. Brunham, RC. and Rey-Ladino J. Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:149-61.

10. Gray RT, Beagley KW, Timms P, Wilson DP. Modeling the impact of potential vaccines on epidemics of sexually transmitted Chlamydia trachomatis infection. *J Infect Dis.* 2009;199:1680-8.

11. Dean D, Millman K. Molecular and mutation trends analyses of omp1 alleles for serovar E of Chlamydia trachomatis. Implications for the immunopathogenesis of disease. *J Clin Invest.* 1997;99:475-83.

12. Pal S, Fielder TJ, Peterson EM, de la Maza LM. Protection against infertility in a BALB/c mouse salpingitis model by intranasal immunization with the mouse pneumonitis biovar of Chlamydia trachomatis. *Infect Immun.* 1994; 62:3354-62.

13. Swanson KA, Taylor LD, Frank SD, Sturdevant GL, Fischer ER, Carlson JH, et al. Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is an oligomeric autotransporter with a higher-order structure. *Infect Immun.* 2009;77:508-16.

14. Hoelzle LE, Hoelzle K, Wittenbrink MM. Expression of the major outer membrane protein (MOMP) of Chlamydia abortus, Chlamydia pecorum, and Chlamydia suis in Escherichia coli using an arabinose-inducible plasmid vector. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50:383-9.

15. <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/antigenic.html.secondary>.

16. <http://www.expasy.org/tools>.

17. http://molbiol-tools.ca/Protein_Chemistry.htm.

18. Cambridge Chino D, Shree RS, Alain B. Waffo, Stacie J. Fairley, and Vida A. Dennis. "Formulation, characterization, and expression of a recombinant MOMP Chlamydia trachomatis DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles." *International journal of nanomedicine* 8 (2013): 1759.

19. Igietseme JU, Francis OE, and Carolyn M. Black. "Chlamydia vaccines: recent developments and the role of adjuvants in future formulations." (2011): 1585-1596.

20. Brunham RCRR. Chlamydia trachomatis control requires a vaccine. *Vaccine.* 2013;31:1892-7.

21. Carey AJ, and Beagley KW. Chlamydia

انجام شده نتایج SDS-PAGE حاکی از شرایط ایده آل بیان و ساخت پروتئین نو ترکیب PET28b-MOMP217-BL21 (DE3) در سیستم پروکاریوتی می باشد. با استفاده از نرم افزارهای ایمونو انفورماتیک و پیشگویی کننده ی آنتی ژنی انتظار می رود که این ترکیب قادر به تحریک پاسخ ایمنی مناسب و حفاظت بخشی در مدل حیوانی باشد. بدین سان معرفی این پروتئین به عنوان کاندیدایی مناسب جهت ساخت واکسن علیه کلامیدیا نیازمند تست های تکمیلی بیشتری می باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بر گرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته ی میکروب شناسی پزشکی در پژوهشگاه ابن سینا است. از پژوهشگاه ابن سینا به دلیل همکاری صمیمانه در پیشبرد این پژوهش قدردانی می شود.

منابع

1. WHO, Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overviews and estimates;1996.

2. Kløvstad H, et al. "Systematic screening with information and home sampling for genital Chlamydia trachomatis infections in young men and women in Norway: a randomized controlled trial." *BMC infectious diseases* 13.1 (2013): 30.

3. Ze-yu Wang GYF, Shan-mei W, Dong-chun Q, Zhong-quan W and Jing C. Rapid screening for Chlamydia trachomatis infection by detecting -mannosidase activity in urogenital tract specimens. *BMC infectious diseases*; 2013.

4. Kohli R, et al. "Prevalence of genital chlamydia infection in urban women of reproductive age, Nairobi, Kenya." *BMC research notes* 6.1 (2013): 44.

5. Taheri Beni B, Motamedi H, Ardakani MR. Genotyping of the prevalent Chlamydia trachomatis strains involved in cervical infections in women in Ahvaz, Iran. *J Med Microbiol.* 2008;59:1023-8.

6. Ghanaat J, Afshari JT, Ghazvini K, Malvandi M. Prevalence of genital Chlamydia in Iranian males with urethritis attending clinics in Mashhad. *East Mediterr Health J.* 2008;14:1333-7.

7. Moulder JW. Interaction of chlamydiae and

trachomatis, a Hidden Epidemic: Effects on Female Reproduction and Options for Treatment." *American Journal of Reproductive Immunology* 63.6 (2010): 576-586.

22. Schautteet K, De Clercq E, Vanrompay D. Chlamydia trachomatis vaccine research through the years. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*;2011.

23. Lu, Chunxue, et al. "Induction of protective immunity against Chlamydia muridarum intravaginal infection with the chlamydial immunodominant antigen macrophage infectivity potentiator." *Microbes and Infection* 15.4 (2013): 329-338.

24. Shanli Zhu JC, Zheng M, Gong W, Xue X, Li W, Zhang L. Identification of immunodominant linear B-cell epitopes within the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2010;24:771-8.

25. Murtada A, et al. "A peptide containing T-cell epitopes of Chlamydia trachomatis recombinant MOMP induces systemic and mucosal antibody responses in mice." *World Journal of Vaccines* 2011 (2011).

26. Pei YA, N G, et al. "Prokaryotic expression, purification and activity assay of recombinant vascular endothelial growth factor." (*J South Med Univ*) 26: 1264.

27. Ramos CPR, Lorenzo W, Roman E, Granell LB, Cadilla CL, López-Garriga J. Recombinant hemoglobin II from *Lucina pectinata*: a large-scale method for hemeprotein expression in *E. coli*. *Protein J*. 2010;29:143-51.

28. Larentis AL AA, Esteves Gdos S, Jessouron E, Galler R, Medeiros MA. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expr Purif*. 2011 Jul;78(1):38-47.

Cloning and expression of *Chlamydia trachomatis* MOMP217 in *E. coli*

Razieh Bitazar, MSc of Microbiology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran and Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran. Bitazar1984@gmail.com

Rezvan Bagheri, Dental Research Center, Dentistry Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Rezvan_b1980@gmail.com

Ali Salimi, Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran. Ali.Salimi.Maraghi@gmail.com

***Bahareh Hajikhani**, Assistant Professor, Microbiology Department, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). B.hajikhani@gmail.com

Abstract

Background: *Chlamydia trachomatis* is a silent, turbulent and unfortunately neglected bacterium which impairs human genital tract function. This Gram-negative obligate intracellular bacterium with unique life cycle and immunopathogenesis result in serious complications, such as Endometritis, pelvic inflammatory disease (PID), infertility, ability to ease HIV transmission and cofactor in human papilloma virus (HPV)-induced cervical neoplasia. To dominate these problems, vaccination is the best way of controlling the infection. Accordingly, MOMP has been implicated as a potential vaccine candidate through the years.

Methods: In this study, MOMP217 gene was cloned in PET28b+ and expressed in *E. coli* and the protein expression confirmed by SDS-PAGE 10% Gel stained with Coomassie Blue dye.

Result: Beside the in silico experiments and the epitopic important regions in this conserved fragment, rMOMP217 may be a valuable peptide for immunization study.

Conclusion: Conclusively, with approach to animal model study for evaluation of immune system response ability, this truncated protein may be introduced as a candidate in vaccine study. Absolutely, this attempt needs more experimental works.

Keywords: Vaccine, chlamydia trachomatis, MOMP (Major Outer Membrane Protein)