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 می‌باشد. این باکتری گرم منفی و داخل سلولی اجباری با چرخه ی زندگی منحصر به خود و ایمنوپاتوژنز ویژه منجر به عوارض شدید من جمله اندومتریت، بیماری التهابی لگن (PID) و ناباروری می‌شود. این باکتری عامل تسهیل کننده ی انتقال ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) و همچنین کوفاکتور ویروس پاپیلومای القاء کننده‌ی نئوپلازی دهانه‌ی 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 بالقوه‌ی واکسن مطرح می‌باشد.

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.

یافته‌ها: در کنار مطالعات In silico، به دلیل وجود مناطق مهم اپی‌توپیک در این قطعه ژنی محافظت شده، MOMP217 نوترکیب می‌تواند 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 می‌تواند به عنوان کاندیدی برای مطالعات واکسنی مطرح شود. قطعا مطالعه‌ی پیش رو نیازمند انجام آزمایشات و تست های تکمیلی بیشتری می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: واکسن، کلامیدیا تراکوماتیس، پروتئین اصلی غشاء خارجی MOMP

مقدمه

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) کلامیدیا تراکوماتیس مسئول بیش از ۹۲ میلیون از ۳۴۰ میلیون عفونت تناسلی در سراسر دنیا می‌باشد (۱). شیوع بالای چنین عفونت های منتقله از راه جنسی در اروپا و آمریکا (۲و۳) 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 میان بانوان مراجعه کننده به کلینیک ناباروری در تهران ۱۲,۶٪ برآورد شده است (۶). این پاتوژن دارای دو چرخه زندگی دو فازی 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 اوروژنیتال در مردان است (۹). در صورت ایجاد یک واکسن

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-29]

با ایمنی کامل عفونت کلامیدیایی طی ۲۰ سال ریشه کن خواهد شد. واکسیناسیون بیش از هر مداخله ی بیومدیکال 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 می‌باشد. ساخت واکسن از موارد اورژانس بهداشت عمومی است زیراکه سالانه بیلیون ها دلار صرف درمان این عفونت می شود (۱۱). واکسیناسیون علیه کلامیدیا تراکوماتیس با مدل های حیوانی متعدد، به وسیله ی ارگانیسم 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 آمینه‌ی سیستئین، 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 Tو تولید آنتی بادی می شود (۱۴). هدف از مطالعه ی حاضر، تهیه ی یک پروتئین نوترکیب 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 می‌باشد.

روش کار

پلاسمید و سویه های باکتری: سویه استاندارد کلامیدیا تراکوماتیس L1 شماره ۴۴۰، اشرشیا کلی DH5α و BL21(DE3) به ترتیب به عنوان میزبان کلونینگ و بیان و همچنین وکتور بیانی pET28 ساخت شرکت نواژن از پژوهشگاه ابن سینا تامین گردید.

طراحی پرایمر برای ژنMOMP217 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. پرایمر های پیش رو و معکوس واجد جایگاه برش آنزیم های BamHI وHindIII به ترتیب به صورت زیر می‌باشد:

5´-GTTGG**GGATCC**TGGAGATAATGA AAAT-3´

و

5´-ACTCT**AAGCTT**CTCAACTGTAAC TGCGTATTT-3´

جایگاه برش دو آنزیم محدود الاثر پر رنگ می‌باشد. 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 رانشان می دهد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲,۵ میکرولیتر بافر PCR (۵ x)، 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-29]

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 درآمده 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 DH5α) 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 براث (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 نانو متر (فاز رشد ثابت، Stationary) ، توسط IPTG -ß (Isopropyl 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 و غیر القا نمونه گیری انجام و کدورت با اسپکت سنجیده شد. از همه ی نمونه گیری ها در زمان های مختلف از طریق سانتریفیوژ ۶۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه رسوب سلولی تهیه و آن ها را در لودینگ بافر پروتئین به همراه حل شد. وزن ملکولی و محل قرار گیری پروتئین نوترکیب 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 مشاهد و اندازه آن از طریق مقایسه با نشانگر (Marker) استاندارد تایید شد. باند مورد انتظار با در نظر گرفتن چندین نوکلئوتید اضافی در ابتدای پرایمر ها 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 شده‌ی 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-29]

جدول ۱- پرایمرهای ژن MOMP217 و جایگاه عمل آنزیمی

Forward (5′-3′)	GTTGG GGATCC TGGAGATAATGAAAATC BamHI
Reverse (5′-3′)	ACTCT AAGCTT CTCAACTGTAACTGCGTATTT HindIII

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

```
      .   10    .   20    .   30    .   40    .   50
        MKKLLKSVLVFAALSSASSLQALPVGNPAEPSLMIDGILWEGFGGDPCDP
epitope   ++++++++++++++++++++++++ +++++++++      ++++++
          .   60    .   70    .   80    .   90    .  100
        CTTWCDAISMRMGYYGDFVFDRVLQTDVNKEFQMGAKPTATTGNAAAPST
epitope +++++++        ++++++++++++
          .  110    .  120    .  130    .  140    .  150
        CTARENPAYGRHMQDAEMFTNAAYMALNIWDRFDVFCTLGATSGYLKGNS
epitope                                +++++++++
          .  160    .  170    .  180    .  190    .  200
        ASFNLVGLFGDNENQSTVKKDAVPNMSFDQSVVELYTDTTFAWSVGARAA
epitope   +++++++                    ++++++++     +++++++++
          .  210    .  220    .  230    .  240    .  250
        LWECGCATLGASFQYAQSKPKVEELNVLCNAAEFTINKPKGYVGKEFPLD
epitope +++++++++++++++++++++++++++++++++       +++++++
          .  260    .  270    .  280    .  290    .  300
        LTAGTDAATGTKDASIDYHEWQASLALSYRLNMFTPYIGVKWSRASFDAD
epitope                    ++++++++++     ++++++++
          .  310    .  320    .  330    .  340    .  350
        TIRIAQPKLATAIFDTTTLNPTIAGAGEVKANAEGQLGDTMQIVSLQLNK
epitope  ++++++++++++                      ++++++++
          .  360    .  370    .  380    .  390
        MKSRKSCGIAVGTTIVDADKYAVTVETRLIDERAAHVNAQFRF
epitope     ++++++++++++++++++++++++      +++++++
```

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

بیوانفورماتیک و پیشگویی منـاطق آنتـی ژنیـک: پیشگویی مناطق آنتی ژنیـک بـا اسـتفاده از روش Kolaskar and Tonaonkar انجام و نتیجـه ی آن در جدول۲ آمده اسـت. دومـن هـای آنتـی ژنیـک طیق جدول با علامت مثبت نشان داده شده اسـت که موید وجود مناطق آنتی ژنیـک از آمینـو اسـید ۱۶۰ تا آمینـو اسـید ۳۷۶ مـی باشـد. در بررسـی سـاختار دوم منـاطقی بـا انعطـاف پـذیری بـالا (Random coil) دیده شد. وجود چنـین منـاطقی ایمن زایی قطعه ی مـورد بررسـی را افـزایش مـی دهد. ترکیب آمینو اسید ها امکان آنـالیز آن هـا و دسـته بنـدی بـر اسـاس ماهیـت هیـدروفوب و هیدروفیلی را فراهم می آورد. همچنین در جـدول ۳ تعدادی از بانک های اطلاعاتی مهم در زمینه ی مناطق اپی توپیـک قابـل تشـخیص سـلول B و T مشخص شده است.

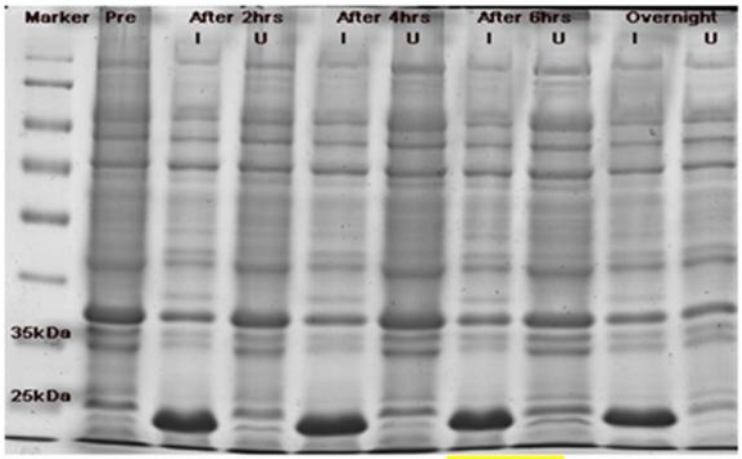
بحث و نتیجه گیری

STDs یـا همـان بیمـاری هـای منتقلـه از راه جنسی از مهم ترین نگرانی های سازمان بهداشـت جهانی به شمار مـی آید.کلامیـدیا تراکومـاتیس از مهم ترین عوامل این بیماری ها سـت کـه سـالانه میلیون ها نفر را دچار می کنـد. بـه عـلاوه اینکـه عفونـت بـا کلامیـدیا تراکومـاتیس باعـث تسـهیل انتقال عفونـت ویـروس نقـص ایمنـی در انسـان و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-29]

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

بانک اطلاعاتی	آدرس	
B-cell epitopes	IEDB	http://www.iedb.org
	FRED	http://wwwbs.informatik.uni-tuebingen.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

همچنین کوفاکتور نئوپلازی القایی گردن رحم با پاپیلوما ویروس است. ناباروری در زنان از برجسته ترین پیامد های آلودگی با این باکتری میباشد و نیاز به واکسن در جهت محدود سازی عوارض ناشی از این عفونت از مدت ها پیش مطرح شده است. عدم درمان عفونت در نهایت آسیب های جدی ارگان های تولید مثلی را به دنبال دارد. برای مبارزه با سطح بالای عفونت و بیماری تولید یک واکسن کارآمد امری بس ضروری و حیاتی ست. آنتی ژن های باکتریایی جهت استفاده در تهیه واکسن بر اساس خصوصیات مختلفی از جمله سطحی بودن که باعث دستیابی آسان تر سیستم ایمنی به آن ها می شود، ایمونوژن قوی بودن، حفاظت شدگی بین تمام ایزوله های مربوطه و دخالت آن ها در پاتوژنز انتخاب می شوند. پروتئین اصلی غشائی (MOMP) جزء غشایی در دسترس با ایمنوژنی سیتی بالا و دارای مناطق اپی توپیک حائز ارزش سلول B و T می باشد (۱۸). با این حال، علی رغم تمام پیشرفت های لازم در زمینه ی دامپزشکی و استفاده از مدل های حیوانی متفاوت برای ارزیابی کارایی این واکسن، هنوز دستیابی به واکسن انسانی کارآمد محقق نشده است (۱۹). ارتقاء دانش بشر در حیطه ی تکنولوژی امیکس (OMICS) مانند واکسینو میکس یا پروتئومیکس ارائه دهنده ی خط مشی های جدید برای ساخت واکسنی با قابلیت بالای تحریک سیستم ایمنی علیه عفونت کلامیدیایی می باشد (۲۰). تا به حال، مطالعه و تحقیق واکسن کلامیدیایی معطوف به ساخت واکسن های نوع ساب یونیتی بوده است (۲۱). واکسن های نسل اول که در آن ها از ارگانیسم به شکل کامل استفاده می شود دارای معایبی من جمله خاصیت برگشت به فرم ویرولانت باکتری و خطر زا بودن آن جایگاه خود را به واکسن های نوع ساب یونیتی داده اند (۲۲). واکسن های ساب یونیتی مستلزم استفاده از ادجوآنت و سیستم های تحویلی (Delivery System) می باشد ولی با این حال در افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-29]

همچنین زنان باردار منع مصرف ندارد. تا به امروز واکسن های ساب یونیتی علیه مننگوکک، هموفیلوس آنفولانزا، هپاتیت B وپنوکوکک عرضه شده است (۲۳). برای ساخت واکسنی موثر علیه کلامیدیا دانشی کامل در زمینه ایمنولوژی پیآمد ابتلا به عفونت بسی لازم و ضروری است، زیرا که واکسن مناسب نیازمند تحریک هر دو سلول T وB 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 (175, MOMP73-81,MOMP161 MOMP217-225, MOMP261-270 و MOMP 377-386) 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 سلولT 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 لنفوسیت 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 عضلانیrMOMP278 باعث القای پاسخ سیستمیک و مخاطی آنتی بادی می شود (۲۵).

مسئله دیگر مربوط به طراحی وکتور، وجود بر چسب 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 حاضرا نیز محل قرار گیری ژن ها درون وکتور به گونه ای طراحی شد که پس از بیان، بر چسب هیستیدینی (6-His tag) در ابتدای پروتئین های نوترکیب 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 می‌باشد چرا که برای حذف برچسب هیستیدینی ذکر شده به ترومبین نیازمند می باشد و این در حالی است که وکتور های دیگر به عنوان مثال pET32a با برچسب هیستیدین و تیورودوکسینی (Trx-His-tag) نیازمند آنزیمی پر هزینه مانند انتروکیناز می باشد. برچسب هیستیدینی 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 هموگلوبینII نوترکیب از Lucina pectinata در دمای ۳۰ درجه بوده است (۲۷). طی مطالعه ی دیگری، شرایط بهینه ی بیان پروتئین mature PsaA سودوموناس آئروژینوزا 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-29]

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 ایمنو 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 می‌شود.

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 α-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 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 Chlamydophila abortus, Chlamydophila 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-29]

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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-29]

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 Comassie 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)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-29]