مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۸، شماره ۱۲، اسفند ۱۴۰۰ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

همسلنه سازی و توالی‌یابی ژن پروتئین غشای خارجی ompf سالمونلا تیفی‌علمل حصبه درباکتری اشریشیاکلی اوراگامی

منصوره حیدرعلیزاده: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران

بهروز شجاعی سعدی: استادیار، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران

کیومرث امینی: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (*نویسنده مسئول) dr_kumarss_amini@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سالمونلا تیفی از خانواده انتروباکتریاسه، باسیل گرم منفی و عامل ابتلا به بیماری‌های گوارشی از جمله حصبه می‌باشد. این باکتری دارای ساختار ویژه و ژن‌های مختلف از جمله ژن پروتئین غشای خارجی (ompf) می‌باشد. مطالعات اخیر امکان استفاده از ompf را در ساخت واکسن حصبه تشخیصی نشان داده است. به همین جهت هدف از انجام این تحقیق همسانه سازی و توالی یابی ژن ompf سالمونلا تیفی عامل حصبه در باکتری اشرشیاکلی اوراگامی به منظور دستیابی به واکسن می‌باشد.

روش کار: نمونه برداری از افراد مبتلا به حصبه طی ۴ ماه از بخش عفونی مراکز درمانی در استان تهران انجام شد. پس از شناسایی و انجام تست‌های اختصاصی بیوشیمیایی، سالمونلا تیفی جداسازی و استخراج DNA صورت گرفت. سپس از طریق آزمون PCR سویه‌های سالمونلا تیفی واجد ژن ompf استخراج شد. ژن ompf سویه‌های مثبت از طریق وکتور به باکتری میزبان اشرشیاکلی الحاق و از طریق تکنیک TA کلونینگ کلون شدند. در پایان از طریق تکنیک Real time PCR میزان بیان ژن‌ها در اشرشیا کلی اوراگامی سنجیده شد. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار clustalX و Mega5 استفاده شد.

یافته‌ها: از مطالعه تحقیقی-مقطعی نمونه‌های بالینی ارسالی به آزمایشگاه که براساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شده بودند در مجموع ۱۲ ایزوله سالمونلا تیفی جداسازی شد و از این تعداد تنها یک ایزوله دارای ژن ompf بود. پس از کلونینگ، ژن‌های ompf، سویه‌های کلون شده کلنی سلکشن (آبی/سفید) جداسازی شدند. به منظور تایید نتایج کلونینگ DNA، از کلنی‌های مشکوک استخراج و توسط آزمون Real time PCR گردید. تصاویر توالی یابی، m13 و منحنی تکثیر، بیان ژن در باکتری اشریشیاکلی اوریگامی را تایید کرد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه با ارزیابی ژنومی سالمونلا تیفی جدا شده از افراد مبتلا به حصبه، ژن ompf با پتانسیل ایمن سازی و به منظور ساخت واکسن از این باکتری استخراج گردید و کلونینگ با موفقیت صورت گرفت. در نهایت با بررسی درخت فیلوژنی رسم شده در این مطالعه میزان تشابه و خویشاوندی گونه سالمونلا تیفی با سایر گونه‌ها نشان داده شد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

سالمونلا تیفی،

ompf،

کلونینگ،

Real time PCR

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۰

تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱

شیوه استناد به این مقاله:

Heidar Alizadeh M, Shojaei Saadi B, Amini K. Cloning and Sequencing of ompf Salmonella typhimurium Salmonella ompf Gene in Escherichia coli Origami. Razi J Med Sci. 2021;28(12):1-14.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]

Razi Journal of Medical Sciences. 2021;28(12):1-14. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Cloning and Sequencing of ompf Salmonella typhimurium Salmonella ompf Gene in Escherichia coli Origami

Mansoureh Heidar Alizadeh: Graduated from the Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran
Behrooz Shojaei Saadi: Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran
Kumarss Amini: Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (* Corresponding author) dr_kumarss_amini@yahoo.com

Abstract

Background & Aims: Salmonella Typhimurium belongs to the family Enterobacteriaceae, gram-negative bacilli and causes gastrointestinal diseases such as typhoid. This bacterium has a special structure and various genes, including the ompf gene (outer membrane protein). Recent studies have shown the possibility of using ompf in the development of a diagnostic tuberculosis vaccine. Therefore, the aim of this study was to clone and sequence the ompf gene of Salmonella typhimurium, the causative agent of typhoid in Escherichia coli Oragami, in order to obtain a vaccine.

Purines are the outer membrane proteins of gram-negative bacteria, which act as receptors for bacteriophages and are effective in a variety of functions such as solution transport, pathogenicity, and immunity. Salmonella typhi purines show heterologous epitopes on their loops, giving them the potential for diagnosis and vaccination. The outer membrane proteins of Salmonella typhi allow ions to pass through. Omp (outer membrane protein) is a member of the purine family, which is highly expressed in gram-negative bacteria.

OmpC, D Omp, and F Omp purines of Escherichia coli and Salmonella typhi are ternary proteins that create pores on both outer membrane surfaces. The presence of protein pores makes this membrane permeable to low molecular weight solutes. Large molecules of antibiotics slowly perforate the membrane, which is one of the reasons that gram-negative bacteria are resistant to many antibiotics.

Methods: Sampling of people with salmonellosis was performed during 4 months from the infectious ward of medical centers in Tehran province. After identifying and performing specific biochemical tests, Salmonella typhi was isolated and DNA was extracted. Salmonella typhi strains with ompf gene were then extracted by PCR. The ompf gene of the positive strains was transfected into the Escherichia coli bacterium by vector and cloned by TA technique. Finally, the expression of genes in Escherichia coli Oregami was measured by Real time PCR technique. ClustalX and Mega5 software were used to draw the phylogenetic tree. After visiting the following site and studying and searching in various articles, suitable primers for Ompf gene were selected. The primers were compared and blasted at the site (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) and ordered from Sinagen. The primers were diluted with distilled water to a concentration of 100 picomoles and then to a suitable concentration of 10 picomoles. According to studies, 3 suitable pairs of primers were selected and ordered from Bioneer.

Keywords
Salmonella typhi,
ompf,
Cloning,
Real Time PCR

Received: 02/10/2021
Published: 20/02/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]

In order to clone the PCR product faster and more efficiently, the TA-Cloning method is used. The TA-Cloning PCR kit was prepared by Sina Gene Company. As stated in the kit protocol, this method uses a linear vector called PTG19-T with the thymine base at the end ´3. The use of PTG19-T linear vector, which has a thymine base at the end of 3, leads to direct, fast and easy binding of the PCR product to the cloning vector. As a result, a cyclic molecule containing the gene we want is formed, which has the ability to reproduce spontaneously in a suitable host such as E. coli. In this method, no enzymatic digestion step is required and this step has been eliminated

Results: A total of 12 Salmonella typhi isolates were isolated from the screening of clinical specimens sent to the laboratory, which were identified based on morphological characteristics, microscopy and biochemical tests. Of these, only one wasolate had the ompf gene. After cloning, ompf genes, cloned selection colony strains (blue / white) were isolated. In order to confirm the results of DNA cloning, it was extracted from suspicious colonies and analyzed by Real time PCR. Sequence, m13 and proliferation curves confirmed gene expression in Escherichia coli origami. In order to determine the molecular identity of Salmonella typhi, 16s general primers were used (PCR result in Figure 7) and finally the PCR product was sent to Bioneer for sequencing and BLAST.

Conclusion: In this study, by genomic evaluation of Salmonella typhimurium isolated from patients with tuberculosis, ompf gene with immunization potential was extracted from this bacterium in order to make a vaccine and cloning was successful. Finally, by examining the phylogenetic tree drawn in this study, the degree of similarity and kinship of Salmonella typhi with other species was shown.

Typhoid is an infectious disease caused by Salmonella typhi and is considered an important protein in immunological research due to the ability of the Ompf gene. This gene has the potential to stimulate immune responses by isolating and cloning the ompf gene separately. Salmonella typhimurium in Escherichia coli can be used to meet treatment needs and achieve an effective vaccine. Out of 12 Salmonella typhi isolates, only one strain carried the ompf gene. The gene was transferred to the host bacterium via the ptg19 plasmid and cloning was successful. This recombinant protein has the potential to be used in immunization and vaccine development. The phylogenetic tree drawn in this study showed the similarity and kinship of Salmonella typhi with other species.

In addition, S. typhi induces the expression of excitatory molecules on antigen-containing cells through conventional signaling pathways. However, the main potential of S. Typhi for use as vaccine compounds is unknown. Here, the characteristics of S. typhi against a range of related laboratory and clinically antigens were investigated. Co-immunization of S. Typhi with ovalbumin protein (OVA), in addition, immunization of S. Typhi protein, generates anti-influenza IgG elements, changes antibody class and matures. In general, OmpF proteins are versatile vaccine compounds, which can be used to enhance cellular immune responses and improve antibody responses.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Heidar Alizadeh M, Shojaei Saadi B, Amini K. Cloning and Sequencing of ompf Salmonella typhimurium Salmonella ompf Gene in Escherichia coli Origami. Razi J Med Sci. 2021;28(12):1-14.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]

مقدمه

عامل بیماری حصبه باکتری *سالمونلا تیفی* Typhi Salmonella بوده که معمولاً از طریق خوراکی وارد بدن می‌شود (دهانی- مدفوعی) و از فرد بیمار به فرد دیگر به صورت غیرمستقیم مثلاً از طریق آب و غذای آلوده منتقل می‌گردد. افرادی که از آب‌های نامطمئن و غیربهداشتی استفاده می‌کنند، باعث ابتلای آن‌ها به حصبه می‌شود. البته با توجه به اینکه در سال‌های اخیر مساله ی دفع فاضلاب تقریباً بهداشتی شده است، موارد این بیماری نیز کاهش پیدا کرده است (۱). این باکتری مقاومت زیادی در برابر گرما و همچنین عوامل فیزیکی و شیمیایی دارد. محل اصلی باکتری *سالمونلا* در سیستم گوارشی بوده و آن را درگیر می‌کند سلول‌های اپیتلیوم مخاط روده است. این باکتری وارد واکوئل و اتصالات جانبی بین سلولی می‌شود و سپس تکثیر و ایجاد کلنی می‌نماید. آنچه که باکتری *سالمونلا* را خطرناک‌تر می‌کند توانایی عبور آن از میان سلول‌ها است. با این گذر، خون فرد مبتلا به *سالمونلا* آلوده شده و باعث تشدید علائم به شکل یک بیماری عفونی و شوک سپتیک می‌شود (۲).

از جمله پروتئین‌های غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی، پروتئین‌های منفذدار (پورین‌ها) هستند که به‌عنوان رسپتورهایی برای باکتریوفاژها بوده و در عملکردهای مختلفی همچون انتقال محلول‌ها، بیماری‌زایی و ایمنی مؤثر است. پورین‌های *سالمونلا تیفی* اپی‌توپ‌های هترولوکوسی را در میان لوپ‌هایشان نشان می‌دهند که بواسطه آن پتانسیل لازم برای تشخیص و واکسیناسیون دارند. پروتئین‌های غشای خارجی باکتری *سالمونلا تیفی* امکان عبور یون‌ها را میسر می‌سازند (۳).

پورین‌های OmpC، Omp D و Omp F *سالمونلا تیفی* پروتئین‌های سه گانه هستند که در هر دو سطح غشای بیرونی، منافذی ایجاد می‌کنند. وجود روزنه‌های پروتئینی باعث می‌شود که این پرده نسبت به املاح با وزن مولکولی کم نفوذپذیر گردد. مولکول‌های بزرگ آنتی‌بیوتیک این پرده را به آهستگی سوراخ می‌کنند که این مسئله یکی از دلایل حساسیت باکتری‌های گرم منفی نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌هاست (۳، ۴).

واکسن بعنوان فرآورده‌ی بیولوژیکی است که در برابر یک بیماری میکروبی مشخص، ایمنی فعالِ اکتسابی تولید می‌کند. در واقع سوسپانسیونی است از میکروارگانیسمهای کشته یا ضعیف‌شده ویروس، باکتری ویا پروتئین‌های آنتی‌ژنیک به‌دست‌آمده از آن‌ها برای پیشگیری یا بهبود یا درمان بیماری‌های عفونی تجویز می‌شود. واکسن معمولاً برای پیشگیری از بیماری‌ها و ایجاد ایمنی در برابر آن‌ها کاربرد دارد. واکسن‌ها علاوه بر سیستم ایمنی هومورال، سیستم ایمنی سلولی را نیز تحریک می‌نمایند، این نوع واکسن‌ها تمایل دارند واکنش‌های مشابه شکل طبیعی بیماری به خصوص در افراد با نقص ایمنی را ایجاد کنند. با واکسن‌های کشته شده، ایمنی کافی و به مدت طولانی به‌دست می‌آید، بایستی این واکسن‌ها ابتدا در چند نوبت تزریق گردند و برای جلوگیری از کاهش سطح آنتی‌بادی و ادامه ایمنی اغلب لازم است که تزریق واکسن در آینده یادآوری گردد (۵، ۶).

از *اشریشیاکلی اوراگامی* به عنوان یک ارگانیسم مدل در پژوهش‌های ژنتیکی استفاده می‌شود. ساخت پروتئین‌های نوترکیب با روش های مهندسی ژنتیک همراه با ادجوانت از یک طرف می تواند باعث پاسخ بهتر سیستم ایمنی شود و از طرف دیگر از عوارض ناخواسته واکسن های کشته شده که به علت اجزای مختلف پیکره باکتری است پیشگیری کند. برای سنجش میزان آنتی‌ژنیسیته‌ی پروتئین نوترکیب غشای خارجی باکتری *سالمونلا تیفی* عامل حصبه، از فضای بیوانفورماتیک استفاده شد. omp جزء ترکیبات ساختاری باکتریها بوده و به عنوان فاکتورهای بیماری زایی عمل کرده و پاسخ های ایمنی را القاء می‌کنند. حضور و یا عدم حضور این ژن می تواند در برنامه های واکسیناسیون، درمان، کنترل و پیشگیری موفقیت های بزرگی را حاصل نماید. مطالعات متعددی امکان استفاده از ompf را در ساخت واکسن حصبه تشخیصی نشان داده است (۷،۸).

به همین جهت هدف از انجام این تحقیق همسانه سازی و توالی یابی ژن ompf *سالمونلا تیفی* عامل حصبه در باکتری *اشرشیاکلی اوراگامی* به منظور تهیه واکسن می باشد.

روش کار

نمونه برداری: در مطالعه حاضر جهت پیشبرد پروژه طی ۴ ماه ۶۰ نمونه بالینی (مدفوع) از افراد مبتلا به حصبه جمع آوری شد و در ظرف استریل و درپوش دار

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی باکتری *سالمونلا تیفی* (۱۳)

تولید اندول منفی	حرکت در ۳۶ ºc +
MR متیل رد +	فنیل آلانین دآمیناز -
VP -	تخمیر لاکتوز -
مصرف سیترات +	تخمیر گلوکز +
سولفید هیدروژن +	رشد در ۳۷ ºc +
هیدرولیز اوره -	تخمیر مانیتول +

مخصوص در شرایط دمایی ۴ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل شد. در آزمایشگاه جهت آماده سازی، نمونه ها با محلول فسفات بافرسالین یکنواخت و سپس ذرات جامد و مواد خشبی موجود در نمونه ها، با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد و مایع فوقانی در ظرف استریل و در ۴ درجه سانتی گراد جهت آزمایشات بعدی نگهداری شد (۹).

کشت، جداسازی و تعیین هویت باکتری: بعد از کشت و رشد نمونه ها در محیط های انتخابی افتراقی مک کانکی آگار (MC) *سالمونلا-شیگلا* (SS) آگار، هکتون آگار، بیسموت سولفیت آگار انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۱۰). پرگنه های مشکوک به *سالمونلا* (کلنی های سبز با هاله سیاه و یا بدون هاله سیاه) را جهت تایید تشخیص به روش تست های بیوشیمیایی و محیط های افتراقی مختلف سیمون سیترات، اوره آز، TSI، SIM، MRVP، لیزین ایرون آگار، مالونات براث صورت گرفت و پس ازکشت در محیط BHI آگار در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. باکتری‌های جدا شده که دارای واکنش + - - + در آزمایش IMViC و واکنش آلکالین/اسید در محیط TSI بودند انتخاب شدند. با تست اکسیداز و ONPG کلنی مشکوک به *سالمونلا* را جدا کرده (۱۱) و نتایج بدست آمده در جداول بیوشیمیایی، تایید باکتری صورت گرفت (جدول ۱) (۱۲).

استخراج DNA با استفاده از کیت: جهت استخراج سویه های جمع آوری شده، از کیت استخراج DNA ژنومی باکتری‌های گرم منفی شرکت (GTP) پیشگامان انتقال ژن به شماره LOT:808288 استفاده شد.

ارزیابی کمی و کیفی DNA: غلظت DNA در نمونه‌های استخراج شده با استفاده از روش فلورومتر (Quamus) ساخت کشور آلمان بررسی شد. زمان اندازه گیری سریع در کمتر از ۵ ثانیه، قابلیت اندازه گیری مقادیر بسیار کم DNA و تعیین غلظت‌های بالاتر بدون نیاز به رقیق سازی صورت گرفت.

آماده سازی پرایمرها: پس از مراجعه به سایت (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) و مطالعه و جستجو در مقالات مختلف پرایمرهای مناسب برای ژن Ompf انتخاب شدند. پرایمر ها در سایت فوق مقایسه و بلاست شدند و به شرکت سیناژن سفارش داده شدند. پرایمرها توسط آب مقطر دیونیزه به غلظت ۱۰۰ پیکومول و سپس به غلظت مناسب که ۱۰ پیکومول بود، رسانده شد. در جدول ۲ توالی پرایمر و طول قطعه تکثیری آورده شده است. طبق مطالعات انجام شده، ۳ جفت پرایمر مناسب انتخاب و جهت تهیه به شرکت Bioneer سفارش داده شد.

مقادیر مواد اولیه PCR برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (Amplicon)، ۱ میکرولیتر از هرکدام یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ۴ میکرولیتر آب مقطر بود. مراحل دمایی واکنش PCR بدین شکل انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد Ompf به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]

جدول ۲- پرایمرهای ژن *ompf* مورد مطالعه در این تحقیق (۱۴)

پرایمر	توالی ۵′ →۳′	اندازه پرایمر(bp)
Ompf (F)	CGCAGAATTCATGGCAGAAATTTATAATAA AGA	۲۴۱
Ompf (R)	AGTCAAGCTTTCAGAACTGGTAAGTAATACCG AC	

جدول ۳- برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل *PCR*

مرحله	دما (درجه سیلسیوس)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۱۸۰	–
واسرشت	۹۵	۳۰	–
اتصال	۵۵	۳۰	–
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۶۰	۳۵
بازآرایی نهایی	۷۲	۳۰۰	–

گراد به مدت ۶ دقیقه انجام پذیرفت.

برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR: بعد از PCR جهت شناسایی *سالمونلا تیفی* از محصول PCR جهت توالی یابی استفاده گردید جدول ۳).

آماده کردن سلول های باکتریایی پذیرنده E.coli وکتور: باکتری E.coli سویه اوریگامی که از دانشگاه تهران تهیه گردید در محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۱۷-۱۶ ساعت کشت داده می‌شود و سپس در دستگاه سانتریفوژ لوله ای بمدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باکتری بدست آمد. می توان آن ها را در حجم دلخواه (معمولا ۷۵ میکرولیتر) در تیوب های ۱/۵ میلی لیتری در پیچ دار مخصوص ذخیره و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد بصورت بلند مدت نگهداری کرد (۱۴).

کلون کردن ژن ompf درباکتری اشریشیاکلی اوریگامی: به منظور کلونینگ سریع تر و موثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning استفاده می‌شود که کیت PCR TA-Cloning از شرکت سینا ژن تهیه گردید. همانطور که در پروتکل کیت آمده در این روش از یک وکتور خطی بنام PTG19-T که در انتهای ′۳ آن باز تیمین قرار دارد استفاده می‌شود. استفاده از وکتور خطی PTG19-T که در انتهای ′۳ خود دارای باز تیمین است منجر به اتصال مستقیم و سریع و آسان محصول PCR به وکتور کلونینگ می گردد، سپس آنزیم T4 DNA ligase با تشکیل پیوند کووالان اتصال DNA مورد نظر به وکتور خطی را محکم میکند، در نتیجه یک مولکول حلقوی که حاوی ژن مورد نظر ماست تشکیل شده که توانایی تکثیر خود بخود را در میزبان مناسب مانند E.coli دارا می باشدودر این روش نیاز به مرحله هضم آنزیمی نمی باشد (۱۴، ۱۵).

کلونینگ ژن ompf: آزمون کلونینگ با استفاده از ناقل pTG19 با استفاده از کیت Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA) و با استفاده از روش شوک حرارتی در باکتری مستعد *اشریشیا کلی* سویه E.coli اوراگامی انجام گردید. در آزمون کلونینگ و در شکل ۳ نتیجه کلونینگ را بر روی آگار نشان داده شده است. پس از کلون کردن ژن های ompf توسط کلنی سلکشن (آبی/ سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند (شکل ۳).

غربالگری سفید/آبی به منظور تایید صحت کلونینگ: همانطور که پیش تر نیز گفته شد وکتور کلونینگ بکار رفته در این روش PTG19-T دارای ژن Lac z می باشد، چون MCS وسط Lac z قرار گرفته است اگر قطعه ای وارد وکتور شود ژن Lac z تخریب می‌شود. در محیط کشت X-gal که آنالوگ لاکتوز است و IPTG که القاگر پروموتور Lac z وجود دارد، در نتیجه ژن ompf باکتری فعال بوده و از X-gal استفاده کرده و کلنی آبی تشکیل می‌شود. اگر ژن مورد نظر ما وارد وکتور شده باشد ژن Lac z تخریب شده و آنزیم ompf غیرفعال شده است در نتیجه باکتری نتوانسته از X-gal استفاده کند و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]

کلنی‌های سفید در محیط کشت تشکیل می‌شود. در نتیجه تشکیل کلنی‌های سفید نشان دهنده این است که ژن مورد نظر ما با موفقیت کلون شده است. بعلاوه چون محیط دارای آمپی سیلین می باشد، کلنی هایی که می توانند در محیط رشد کنند در حقیقت نشان دهنده دریافت پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین است (۱۶).

انجام تست مولکولی: در روش Real time PCR یک مرحله ای از سنتز cDNA و تکثیر آن در یک تیوب انجام شده و در واکنش ۲ مرحله ای نسخه برداری معکوس و تکثیر در تیوب های جداگانه صورت می گیرد. به طور کلیReal Time PCR تکنیکی برای مشاهده بی وقفه ی پیشرفت واکنشPCR در طول زمان بوده و با این روش می‌توان مقادیر تولیداتDNA ، cDNA و RNA را نیز اندازه گیری نمود (۱۶).

استخراج RNA: برای این منظور از RNA کلی برای واکنش های تکثیر پرایمر استفاده شد. برای استخراج RNAاز میکروکیتRNeasy شرکت Qiagen استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی باکتری سالمونلا تیفی واجد ژن ompf بودند که در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند مورد استفاده قرار گرفت. برای حذف DNA ژنومی از کیت DNase Qiagenاستفاده شد (۱۷، ۱۸).

ارزیابی کمی RNA استخراج شده: برای بررسی کمی RNA استخراج شده از روش جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد. در این روش ۲ میکرولیتر از RNA استخراج شده در دستگاه نانو دراپ قرار داده شد و جذب طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت بین این دو طول موج و همچنین نسبت ۲۳۰/۲۶۰ هم بررسی شد (۱۹).

سنتز cDNA: سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Reverse AMVبا غلظت 25 lµ/unit شرکت Roche انجام شد. بدین ترتیب RNA استخراج شده برای مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس نسخه برداری معکوس (RT) در در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه با ۲ میکرولیتر Random Primer، ۰/۸ میکرولیتر از آنزیم AMV Reverse Transcriptase، ۲ میکرولیتر از dNTP 10 میلی مولار، ۱ میکرولیتر Rnase inhibitor و ۲ میکرولیتر بافر ۱۰ xآنزیم AMV انجام شد. سپس آنزیم AMV در دمای ۹۹ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه و غیرفعال شد (۱۹).

یافته‌ها

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی جهت جداسازی: در این مطالعه از بین ۶۰ نمونه بالینی مدفوع بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی مورد بررسی ۱۲ سویه *سالمونلا تیفی* به دست آمد که نتایج تستها بصورت زیر است (جدول ۴):

نتایج تایید استخراج DNA: بعد از شناسایی سویه *سالمونلا تیفی* استخراج DNA توسط کیت استخراج صورت گرفت و از طریق الکتروفورز بلندهای ژن Ompf مشاهده و تایید شد (شکل ۱).

نتایج آزمونPCR: واکنش PCR بر روی ایزوله های *سالمونلا تیفی* برای شناسایی ژن کدکننده ompf با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. همچنین سویه *سالمونلا تیفی* دارای ژن مورد نظر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی ژن ompf

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است و بر اساس آزمایش PCR جهت شناسایی ژن ompf مشخص گردید که این ژن با ۲۴۱ نوکلئوتید در نمونه های اخذ شده قابل مشاهده شد.

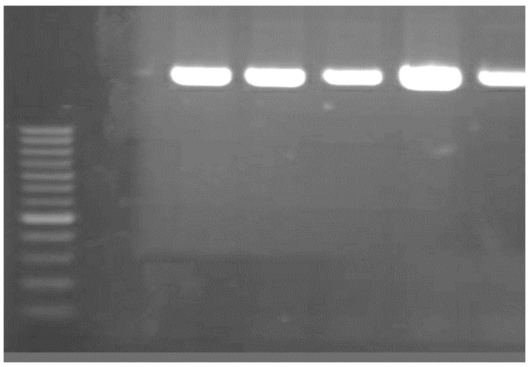
همانطور که در مارکر تصاویر حاصل از PCR مشاهده می‌شود باند ۲۴۱bp که نشان دهنده ژن ompf است و از ۱۲ سویه *سالمونلا تیفی* جدا شده تنها یک ۱ (۸/۴٪)

جدول ۴- نتایج بیوشیمیایی تست ها جهت شناسایی سویه *سالمونلا تیفی*

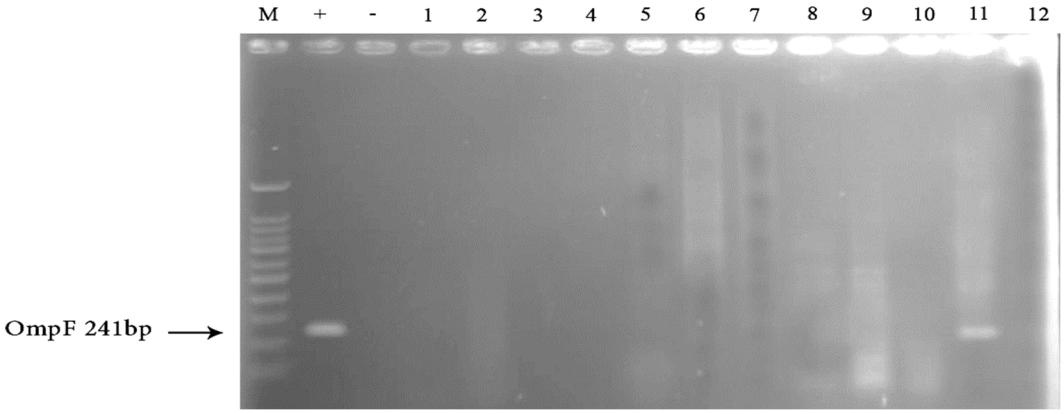
تست	اوره آز	سیمون سیترات	اندول	حرکت	تخمیر قندی سه گانه	متیل رد	وگس پرسکوئر
سالمونلا تیفی	−	+	−	+	Alk/A+H2S	+	−

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]



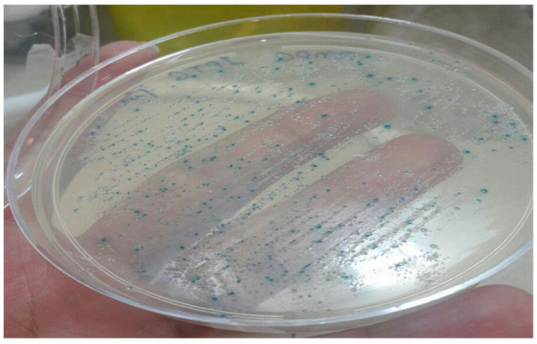
شکل ۱- تایید استخراج DNA از باکتری سالمونلا تیفی واجد ژن *Ompf* بصورت باند قابل مشاهده است



شکل ۲- نتیجه آزمایش PCR بر روی تعدادی از جدایه‌های *ompf* مثبت از نمونه ۱ تا ۱۲، به ترتیب از چپ به راست (Ladder DNA:۱۰۰-۱۰۰۰) ، + کنترل مثبت، - کنترل منفی (باند ژن موردنظر بین ۳۰۰ و ۴۰۰ باز نوکلئوتید قرار داشته)

سویه واجد ژن ompf بود (شکل ۲).

نتایج حاصل از کلونینگ ژن ompf آزمون کلونینگ با استفاده از ناقل pTG19 با استفاده از کیت Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA) و با استفاده از روش شوک حرارتی در باکتری مستعد *اشریشیا کلی* سویه E.coli اوراگامی انجام گردید. در آزمون کلونینگ و در شکل ۳ نتیجه کلونینگ را بر روی آگار نشان داده است. پس از کلون کردن ژن‌های ompf توسط کلنی سلکشن (آبی/ سفید) سویه‌های کلون شده جداسازی شدند (شکل ۳).



شکل ۳- نتایج کلون سلکشن (کلنی آبی و سفید) ژن آنزیم *ompf*

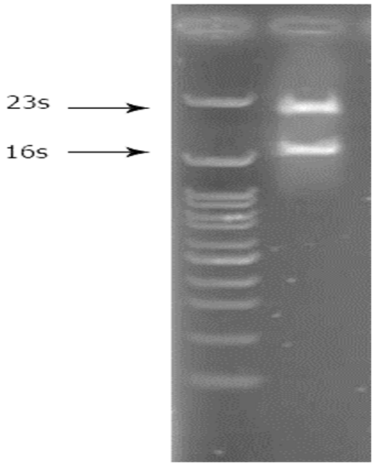
نتایج مربوط به آزمون Real time PCR

نتایج بررسی بیان ompf کلون شده بوسیله PCR Real time: به منظور تایید نتایج کلونینگ، RNA کلنی‌های مشکوک استخراج شده و cDNA ساخته شد و توسط آزمون Real time PCR بیان ژن ompf بررسی شد (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).

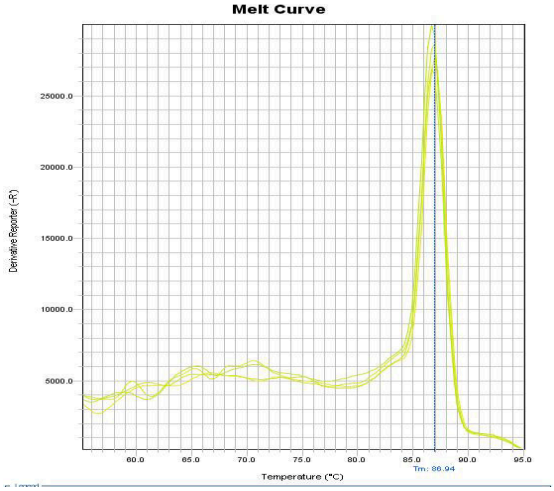
تعیین هویت مولکولی جنس سالمونلا تیفی

به منظور تعیین هویت مولکولی جنس *سالمونلا تیفی* از پرایمرهای عمومی srDna۱۶ استفاده گردید (نتیجه PCR در شکل ۷).

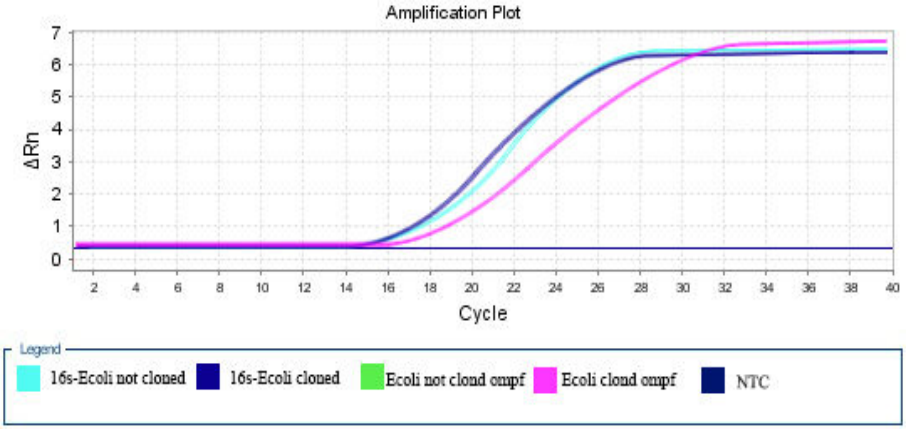
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]



شکل ۴- نتیجه استخراجRNA از ژن کنترل داخلی



شکل ۵- منحنی ذوب بدست آمده در انجام آزمایشات



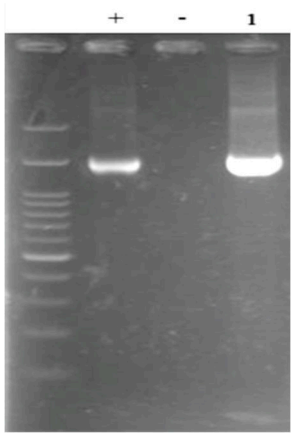
شکل ۶- نتایج منحنی تکثیر Real Time PCR

نتایج تعیین توالی نوکلئوتیدی حاصل از کلونینگ ژن ompf

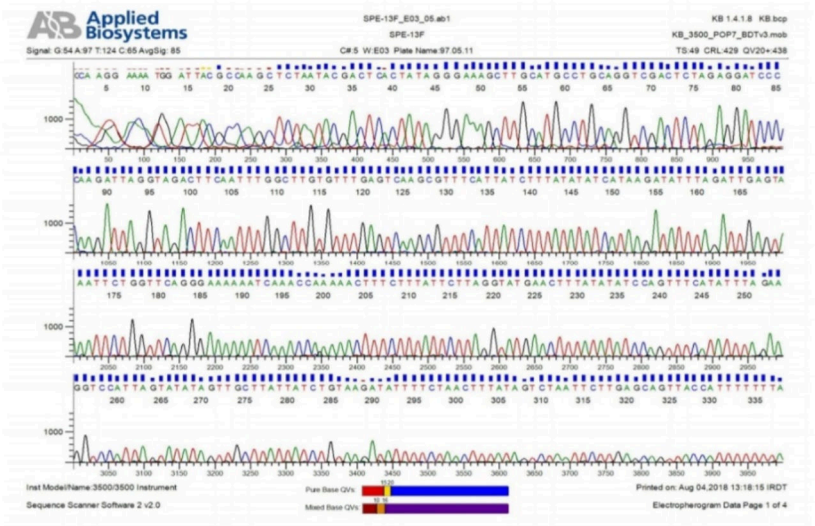
با توالی نوکلئوتیدی محصـول PCR بیان ژن ompf در باکتری *اشریشیاکلی اوراگامی* تایید شد (شکل ۸ و ۹).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

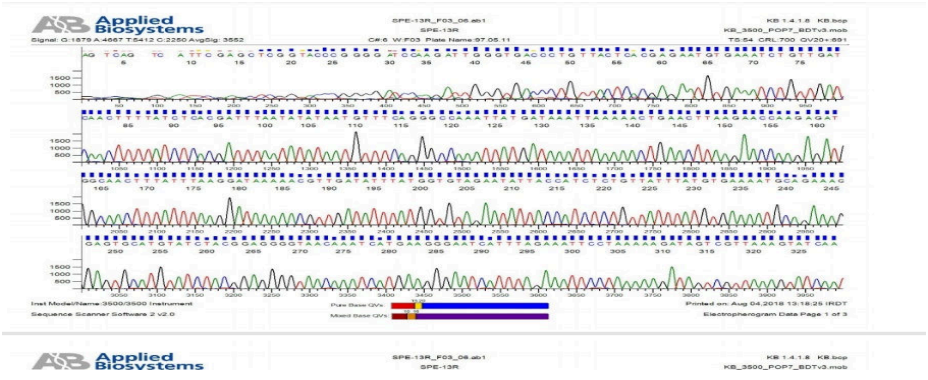
[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]



شکل ۷- نتیجه آزمون PCR با پرایمرهای عمومی 16s به منظور تعیین هویت مولکولی جنس *سالمونلا تیفی* (کنترل مثبت – کنترل منفی – نمونه شماره ۱ که حاوی ژن کنترل داخلی)



شکل ۸- نتیجه حاصل از توالی یابی نوکلئوتیدی و بلاست *ompf*



شکل ۹- نتیجه حاصل از توالی یابی نوکلئوتیدی و بلاست *ompf*

بحث

پورین‌های *سالمونلا تیفی* بواسطه وجود آن پتانسیل لازم را برای تشخیص و واکسیناسیون دارند. پروتئین Omp یکی از اعضای خانواده‌ی پورین‌هاست که به میزان زیادی در باکتری‌های گرم منفی بیان می‌شود. حضور و یا عدم حضور این ژن می‌تواند در برنامه های واکسیناسیون،

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]

درمان، کنترل و پیشگیری موفقیت‌های بزرگی را حاصل نماید. بر این اساس در این تحقیق با استفاده از یک جفت آغازگر به روش PCR به بررسی حضور ژن ompf پرداخته و کلونینگ آن در باکتری *اشرشیاکلی* اوراگامی صورت گرفت (۱۳، ۲۰).

پژوهش Hoda Toobak و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که پروتئین‌های غشاء خارجی OmpA، OmpC و OmpF مربوط به سویه *سالمونلا انتریکا سروار تیفی* (۱۶۰۹PTCC) در وکتور ۲۸pET (+)a کلون شده و در باکتری ۲۱E.coli BL بیان گردید. داده‌های حاصل نشان می‌دهد که واکسیناسیون با پورین‌های نوترکیب فوق منجربه تولید پاسخ ایمنی قوی در موش می‌شود اما این پاسخ های ایمنی حفاظتی نیستند (۲۱). در راستای تحقیق فوق نیز جداسازی وکلونینگ ژن ompf از سالمونلا تیفی و کلونینگ آن در باکتری *اشرشیاکلی* صورت گرفته تا بتوان به منظور دستیابی به واکسن موثر از آن بهره جست. این پروتئین نوترکیب، پس از بررسی‌ها و آزمایشات بیشتر پتانسیل استفاده در ایمنی‌زایی و ساخت واکسن را دارا می باشد. برای افزایش پاسخ های ایمنی سلول و پاسخ های آنتی بادی را بهبود می بخشد.

بیدمشکی و همکاران هدف از این مطالعه معرفی یک پروتئین ترکیبی، به‌عنوان نسل جدیدی از واکسن‌های تیفوئیدی است .در این مطالعه پروتئینی ترکیبی از سه پروتئین OmpF، OmpA و OmpC براساس نواحی حفاظت شده، سطحی و آنتی‌ژنیک طراحی شد (۲۲). در راستای تحقیق فوق نیز جداسازی وکلونینگ ژن ompf از سالمونلا تیفی و کلونینگ آن در باکتری *اشرشیاکلی* صورت گرفته تا بتوان به منظور دستیابی به واکسن موثر از آن بهره جست. این پروتئین نوترکیب، پس از بررسی‌ها و آزمایشات بیشتر پتانسیل استفاده در ایمنی‌زایی و ساخت واکسن را دارا می باشد. برای افزایش پاسخ های ایمنی سلول و پاسخ‌های آنتی بادی را بهبود می بخشد.

Aich و همکاران در سال ۲۰۱۲ در پژوهشی برای سنجش میزان آنتی‌ژنیسیته‌ی پروتئین نوترکیب غشای خارجی باکتری *سالمونلا تیفی* عامل حصبه، از فضای بیوانفورماتیک استفاده شد. علاوه بر سنجش بیان پروتئین نوترکیب شامل اپی‌توپ‌هایی از ompF/ompA/ompC توسط SDS و وسترن بلات پروتئین نوترکیب شامل اپی‌توپ‌هایی از پروتئین‌های ompA و ompC در وکتور بیانی (+pET32a) همسانه سازی شد و به میزبان بیانی یعنی باکتری مورد نظر منتقل شد (۲۳). در راستای تحقیق فوق نیز جداسازی وکلونینگ ژن ompf از سالمونلا تیفی و کلونینگ آن در باکتری *اشرشیاکلی* صورت گرفته تا بتوان به منظور دستیابی به واکسن موثر از آن بهره جست. این پروتئین نوترکیب، پس از بررسی‌ها و آزمایشات بیشتر پتانسیل استفاده در ایمنی‌زایی و ساخت واکسن را دارا می باشد (۲۸). در تحقیق حاضر نیز کلونینگ ژن ompf به منظور تهیه واکسن صورت گرفت.

در تحقیق Nimisha soman که در سال ۲۰۱۹ انجام شد و پروتئین غشای خارجی Salmonella F (OmpF) typhimurium کلون شده، توالی یابی شده و در سیلیکونالیز برای بررسی خصوصیات ساختاری و ایمنی آن ترکیب شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پروتئین OmpF از Salmonella typhimuriumis یک ساختار بیولوژی قوی برای تولید واکسن نوترکیب علیه سالمونلوز در طیور است (۲۴، ۲۵).

Preze Toledo M و همکاران در سال ۲۰۱۷ چندین جزء میکروبی مانند DNA باکتریایی و فلاژین، به دلیل دارا بودن توانایی ذاتی برای فعال کردن کارآمد پاسخ های ایمنی ذاتی، به عنوان داروهای تجربی واکسن مورد استفاده قرار گرفته اند. پروتئین‌های غشایی بیرونی *سالمونلا تیفی* (OmpF) آنتی ژن محافظ بسیار ایمنی هست که در صورت عدم وجود ترکیبات اگزوژن، پاسخ‌های ایمنی ذاتی و سازگار را تحریک می‌کنند. در اینجا، ویژگی‌های S. Typhi در برابر طیف وسیعی از آنتی‌ژن‌های آزمایشگاهی و بالینی مرتبط بررسی گردید. ایمن سازی مشترک S. Typhi با پروتئین اووالبومین (OVA)، علاوه بر این، ایمن سازی پروتئین S. Typhi، باعث ایجاد عناصر IgG در آن می‌شود (۲۶). در راستای تحقیق فوق نیز جداسازی وکلونینگ ژن ompf از سالمونلا تیفی و کلونینگ آن در باکتری *اشرشیاکلی* صورت گرفته تا بتوان به منظور دستیابی به واکسن موثر از آن بهره جست. این پروتئین نوترکیب، پس از بررسی‌ها و آزمایشات بیشتر پتانسیل استفاده در ایمنی‌زایی و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]

ساخت واکسن را دارا می باشد (۲۸). برای افزایش پاسخ‌های ایمنی سلول و پاسخ های آنتی بادی را بهبود می‌بخشد.

Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۹ پروتئین‌های پورین باکتری‌های گرم منفی که به عنوان گیرنده برای باکتریوفاژها عمل می‌کنند و در عملکردهای مختلفی مانند حمل و نقل املاح، پاتوژنز و ایمنی درگیر هستند. نشان دادند که پورین S. Typhi نقش مهمی در تشخیص و واکسیناسیون دارد. در تحقیق حاضر، پروتئین‌های غشای اصلی OmpF و OmpC از S. Typhi در وکتور pQE30UA کلون شده و در E. coli بیان شد و به اثبات رسید که ژن های نوترکیب OmpF و OmpC تولید شده در این کار ممکن است برای مطالعات بیشتر در مورد واکسیناسیون و تشخیص استفاده شود که با تحقیق فعلی مطابقت دارد (۲۷).

Malickbasha و همکاران در سال ۲۰۱۰ از مجموع ۵۰ نمونه مدفوع از نگهدارندگان مواد غذایی برای غربال گری ناقل‌های بدون علامت حصبه جمع آوری شد، جدایه‌های *سالمونلا* بر اساس ویژگی‌های محیط کشت بر اساس BSA، MacConkey آگار، XLD و فیلوژنتیک شناسایی شدند. ژن ompR از این دو سویه جداسازی، توالی یابی و یک درخت فیلوژنی از ompR رسم شد. از *سالمونلا* وحشی و جهش یافته برای جداسازی پروتئین غشای خارجی جدا و با یکدیگر مقایسه شد (۲۸). در راستای تحقیق فوق نیز جداسازی وکلونینگ ژن ompf از سالمونلا تیفی و کلونینگ آن در باکتری اشرشیاکلی صورت گرفته تا بتوان به منظور دستیابی به واکسن موثر از آن بهره جست. این پروتئین نوترکیب، پس از بررسی‌ها و آزمایشات بیشتر پتانسیل استفاده در ایمنی‌زایی و ساخت واکسن را دارا می‌باشد.

Xiao Wang و همکاران در مطالعه سال ۲۰۱۷ با بررسی فیلوژنیکی نشان دادند که OmpF از E. coli CVCC 1515 دارای رابطه خویشاوندی بالایی (۱۰۰٪) با حدود نیمی از گونه های E. coli (۴/۷ ٪) و (۵۲/۸ ٪) Shigella است. سپس در نتیجه کلونینگ ژن مذکور، OmpF نوترکیب به عنوان یک واکسن همه کاره جهت جلوگیری از عفونت E.coli تهیه شد و هدف از تحقیق حاضر کلونینگ ژن ompf به منظور دستیابی به واکسن علیه بیماری حصبه است(۲۹).

نتیجه‌گیری

حصبه یک بیماری عفونی است که باکتری *سالمونلا تیفی* سبب شده و با توجه به توانایی ژن Ompf، بعنوان یک پروتئین مهم از نظر تحقیقات در زمینه ایمونولوژی مطرح است. این ژن دارای قدرت بالقوه برای تحریک پاسخ‌های ایمنی می‌باشد، جداسازی وکلونینگ ژن ompf از *سالمونلا تیفی* و کلونینگ آن در باکتری اشرشیاکلی صورت گرفته تا بتوان به منظور تأمین نیازهای درمانی و دستیابی به واکسن موثر از آن بهره جست. این پروتئین نوترکیب، پس از بررسی ها و آزمایشات بیشتر پتانسیل استفاده در ایمنی‌زایی و ساخت واکسن را دارا می باشد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر مطالعه‌ای در زمینه میکروبیولوژی است که از پایان نامه کارشناسی ارشد ۹۹۰۳۵۹۸۷۴۵۶۳۲۱ اقتباس شده است. بدینوسیله از آزمایشگاه میکروبی پاسارگاد و بویژه از کارشناس ارشد میکروب شناسی جناب آقای مجید صادق پور و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1. Shaigan nia Sh, Rostami F, Safarpour dehkordi F, Rahimi E, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, et al. Isolation and evaluation of virulence factors of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis species in milk and dairy products. Iran J Med Microbiol. 2014;8(1):54-61.

2. Zahedi M, Rahimi E, Zahedi M, Momtaz H. Prevalence of Salmonella enteritidis and S. typhimurium in marketed meat in Shahrekord in 2014. J Shahrekord Uuniv Med Sci. 2017;19.

3. López D, Kolter R. Functional microdomains in bacterial membranes. Genes Dev. 2010;24(17):1893-902.

4. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]

pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol. 2012;13(6):614-29.

5. Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. Virus Genes. 2012;44(2):167-75.

6. Ahmer BM, Tran M, Heffron F. The virulence plasmid of Salmonella typhimurium is self-transmissible. J Bacteriol. 1999;181(4):1364-8.

7. Soomeh J, Amin S, Amini, Kiomars. Molecular identification of spv plasmid viruses in Salmonella enteritidis isolated from poultry samples in Saveh. Vet Res Biol Products. 2016;29(2):2-7.

8. Nakaya HI, Hagan T, Duraisingham SS, Lee EK, Kwissa M, Rouphael N, et al. Systems analysis of immunity to influenza vaccination across multiple years and in diverse populations reveals shared molecular signatures. Immunity. 2015;43(6):1186-98.

9. Ahmadi M, Dalirnaghadeh B, Aski HS, Khoshbakht R. Comparison of polymerase chain reaction (PCR) and conventional cultivation methods for detection of carriers of Salmonella spp. in cattle and buffalo. Compar Clin Pathol. 2010;19(3):251-5.

10. Jamshidi AE, Basami M, Afshari NS. Identification of Salmonella spp. and Salmonella typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad-Iran. 2009.

11. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes H. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol. 2007;15(7):301-9.

12. Carroll EC, Jin L, Mori A, Muñoz-Wolf N, Oleszycka E, Moran HB, et al. The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. Immunity. 2016;44(3):597-608.

13. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2018.

14. Kirthika P, Senevirathne A, Jawalagatti V, Park S, Lee JH. Deletion of the lon gene augments expression of Salmonella Pathogenicity Island) SPI)-1 and metal ion uptake genes leading to the accumulation of bactericidal hydroxyl radicals and host pro-inflammatory cytokine-mediated rapid intracellular clearance. Gut Microbes. 2020;11(6):1695-712.

15. Atyabi N, Zahraei ST, Ghazisaeedi F, Ashrafi I. The molecular investigation of widespread Salmonella serovars, S. typhimurium and S. enteritidis, involved in salmonellosis of cattle and sheep in farms around Tehran, Iran. 2012.

16. Chadt A, Scherneck S, Joost HG, Al-Hasani H. Molecular links between obesity and diabetes:"diabesity". Endotext [Internet]: MDText. com, Inc.; 2018.

17. Abdo OM. Gaber H. Alsayed Ahmed M. Alzohairy Rania. BM Amer Mohammed M. Saleh. Appl Math Model. 2013;37(8):5962-78.

18. Khoshbakht R, Tabatabaei M, Aski HS, Shayegh H. Distribution of Salmonella, Arcobacter, and thermophilic Campylobacter spp. among Persian fallow deer (Dama mesopotamica) population in Dasht-e-Arzhan Wildlife refuge, southern Iran. Compar Clin Pathol. 2015;24(4):777-81.

19. Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. Light-induced carotenogenesis in Streptomyces coelicolor A3 (2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. J Bacteriol. 2005;187(5):1825-32.

20. Oliveira SDd, Rodenbusch CR, Michael GB, Cardoso MI, Canal CW, Brandelli A. Detection of virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from different sources. Brazil J Microbiol. 2003;34:123-4.

21. Toobak H, Rasooli I, Talei D, Jahangiri A, Owlia P, Astaneh SDA. Immune response variations to Salmonella enterica serovar Typhi recombinant porin proteins in mice. Biologicals. 2013;41(4):224-30.

22. Reza M, Mustafa M, Mohammad Reza Z, Ali Bap. Identification, cloning and study of the structure of beta 1 and 3 glucanase (bgnI) genes of fungal isolates (Trichoderma virens 10).

23. Aich P, Patra M, Chatterjee AK, Roy SS, Basu T. Calcium chloride made E. coli competent for uptake of extraneous DNA through overproduction of OmpC protein. Protein J. 2012;31(5):366-73.

24. Pratheesh PT, Nimisha S, Jess V, Asha K, Agarwal RK. Expression and purification of an immunogenic SUMO-OmpC fusion protein of Salmonella Typhimurium in Escherichia coli. Biologicals. 2019;62:22-6.

25. Soman N. development of recombinant ompf protein based indirect elisa for the detection of salmonella antibodies in poultry: college of veterinary and animal sciences, pookode wayanad.

26. Pérez-Toledo M, Valero-Pacheco N, Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Perez-Shibayama C, Moreno-Eutimio MA, et al. Salmonella Typhi porins OmpC and OmpF are potent adjuvants for T-dependent and T-independent antigens. Front Immunol. 2017;8:230.

27. Verma SK, Gautam V, Balakrishna K, Kumar S. Overexpression, purification, and immunogenicity of recombinant porin proteins of Salmonella enterica Serovar Typhi (S. Typhi). J Microbiol Biotechnol. 2009;19(9):1034-40.

28. Malickbasha M, Arunachalam R, Senthilkumar B, Rajasekarapandian M, Annadurai G. Effect of ompR gene mutation in expression of ompC and ompF of Salmonella typhi. Interdisciplin Sci: Comput Life Sci. 2010;2(2):157-62.

29. Wang X, Teng D, Guan Q, Mao R, Hao Y, Wang X, et al. Escherichia coli outer membrane protein F (OmpF): an immunogenic protein induces cross-reactive antibodies against Escherichia coli and Shigella. AMB Express. 2017;7(1):155.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-06]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.8.4]