



Cloning, Expression and Purification of the Outer Membrane of Tir Protein from *E.coli* O157: H7 and Evaluation its Structure

Shilla Phalsaphi¹, Jafar Amani², Seyed Ali Mirhosseini^{2*}

1. Department of Biochemistry, Pharmaceutical Sciences Branch, Faculty of New Technologies, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7 is an important human and animal pathogen that causes hemolytic uremic hemorrhagic diarrhea in humans. The binding to host cells is the first step in stabilizing this bacterium through the secretion system of the type (T3SS) III and through the interactions between secretory proteins. Tir is a protein that is transferred to the host cells after expression in the bacterium and via T3SS and is located in the membrane and plays an important role in the bacterial binding to the host. The purpose of this research is to clone a gene construct that has Tir virulence factors.

Materials and Methods: Specific primer design for *tir* gene was performed using oligo softwares and gene amplification was performed by PCR reaction on a DNA template. After the enzyme digestion, the gene was inserted into expression vector pET28a; the construct was transformed to the expression host. After confirmation of gene cloning, the Tir recombinant protein was expressed by induced IPTG induction. The western blot analysis was carried out to confirm Tir protein. The gene of *tir* was cloned inside pET28a vector.

Results: Cloning of *tir* gene in pET28a vector was performed appropriately between desired sites and after induction protein, the Tir recombinant protein showed appropriate and significant expression. The antibody used in Western blot was also able to properly detect Tir. **Conclusion:** After the induction, the protein of Tir showed a remarkable expression of the recombinant protein. As a result, this structure can be used to produce Tir protein for immunological studies against *E.coli* O157: H7.

Keywords: *E.coli* O157: H7, Recombinant protein, Cloning, Tir, Iau Science.

Corresponding author:

Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: ali.mirh@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

همسانه سازی، بیان و تخلیص بخش خارج غشایی پروتئین Tir از باکتری *E. coli* O157:H7 و ارزیابی ساختاری آن

شیلا فلسفی^۱، جعفر امانی^۲، سیدعلی میرحسینی^{۲*}

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده فناوری های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری اشرشیاکلی انتروهموراژیک (*Enterohemorrhagic E. coli*) سویه O157:H7 یک پاتوژن مهم انسان و حیوان است که در انسان موجب بروز اسهال خونریزی دهنده و سندروم اورمی همولیتیک می شود. اتصال به سلول های میزبان اولین گام در تثبیت این باکتری است که به واسطه سیستم ترشحی نوع III (T3SS) و از طریق میان کنش بین پروتئین های ترشحی صورت می گیرد. Tir پروتئینی است که پس از بیان در باکتری و از طریق T3SS به سلول میزبان منتقل و در غشای آن مستقر می شود و نقش مهمی در اتصال باکتری به میزبان دارد. هدف از این تحقیق ساخت سازه ژنی است که دارای فاکتورهای ویروالانس Tir است.

مواد و روش ها: طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن *tir* با استفاده از نرم افزار Oligo انجام شد و تکثیر ژن به وسیله واکنش PCR از روی DNA الگو صورت گرفت. پس از واکنش های هضم آنزیمی و الحاق ژن درون ناقل بیانی pET28a، انتقال ناقل به درون میزبان بیانی انجام شد. پس از تأیید همسان سازی ژن، بیان نو ترکیب پروتئین Tir با استفاده از القاگر IPTG صورت گرفت. برای تأیید پروتئین Tir آنالیز وسترن بلات انجام شد.

یافته ها: همسان سازی ژن *tir* درون وکتور pET28a به شکل مناسب بین جایگاه های مطلوب انجام شد و پروتئین Tir پس از القا، پروتئین نو ترکیب بیان مناسب و قابل توجهی نشان داد. آنتی بادی مورد استفاده در وسترن بلات نیز توانست به شکل مناسبی Tir را شناسایی کند.

نتیجه گیری: در این مطالعه، سازه پایدار محتوی ژن *tir* ساخته شد که بیان نو ترکیب قابل توجهی از پروتئین Tir را از خود نشان داد. بنابراین این سازه را می توان برای تولید پروتئین Tir جهت مطالعه های ایمنی زایی علیه *E. coli* O157:H7 بکاربرد.

واژه های کلیدی: اشرشیاکلی O157:H7، پروتئین نو ترکیب، همسان سازی، Tir، Iau Science.

مقدمه

بیماری زای منتقله از مواد غذایی بوده و به عنوان یک عامل اصلی و مهم در ایجاد اسهال و بیماری های سیستمیک شناخته می شود. سالانه بیش از ۵ میلیون مرگ و میر به خصوص در کودکان زیر ۵ سال به واسطه آلودگی به این پاتوژن گزارش می شود (۲،۱). در بین عوامل مولد اسهال، اشرشیاکلی انتراهموراژیک مولد شینگاتوکسین به عنوان گروه هتروژنی از باکتری های به شدت بیماری زا با دوز عفونی بسیار پایین معرفی شده است که حتی ۱۰۰-۱ سلول آن هم توانایی تولید بیماری را دارند (۴،۳).

اشرشیاکلی انتروهموراژیک O157:H7 یک عامل

نویسنده مسئول:

انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
پست الکترونیکی: ali.mirh@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۶

Tir به این صورت است که پس از انتقال و ورود به داخل سلول میزبان، کانفورماسیون حلقه سنجاقل سری را در غشاء پلاسمائی سلول میزبان به خود می‌گیرد که دارای دامین‌های داخل سلولی انتهای آمینو و انتهای کربوکسیلی و یک دامین خارج سلولی مرکزی بوده و به پروتئین غشاء خارجی باکتری، اینتیمین، متصل می‌شود. تجمع و دسته‌بندی پروتئین Tir در غشاء سلول میزبان و متعاقب اتصال با اینتیمین، سیگنالینگ‌های آبشاری را به راه می‌اندازد که در نهایت سبب شکل‌گیری ساختار پایه اکتین می‌شود. هم‌چنین، کمپلکس Intimin/Tir موجب ارسال پیام‌هایی به سلول میزبان شده و تغییرهای بعدی را در آن به وجود می‌آورد (۱۱،۳). به‌علاوه، پروتئین Tir یک عامل ایمونوژنیک است و آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه این پروتئین، کاهش اتصال /شرشیاکلی انتروهموراژیک به سلول‌های میزبان را سبب می‌شود. از این‌رو، این پروتئین دارای آنتی‌ژن‌های مناسب و کاندید ایمونوژنیک جهت جلوگیری از فرآیند اتصال و همسانه‌سازی /شرشیاکلی سویه O157:H7 است (۱۰). هدف از این تحقیق سنتز و بیان نو ترکیب پروتئین Tir در میزبان کلونینگ پروکاریوتی و ارزیابی ساختار پروتئینی آن است.

مواد و روش‌ها

تهیه سازه ژنی *tir* - pET28a

مطالعه حاضر از نوع پژوهش تجربی- توصیفی است که به‌منظور بیان نو ترکیب بخش خارج غشایی پروتئین Tir باکتری *E. coli* O157:H7 در میزبان انجام شد. توالی ژن *tir* استخراج شده از سایت <https://www.uniprot.org/help/uniprotkb> برای سنتز به شرکت ژن فن‌آوران سفارش داده شد. جهت تسهیل در همسانه‌سازی ژن *tir* در pET28a و ایجاد انتهای چسبان، برای توالی DNA دو پرایمر رفت حاوی توالی جایگاه برش برای آنزیم محدودگر *EcoRI* و پرایمر بازگشت حاوی توالی جایگاه برش برای آنزیم محدودگر *HindIII* (سیگما-آلمان) در نظر گرفته شد (سیناکلون-ایران). با روش PCR با استفاده از مخلوط واکنش حاوی ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها رفت و بازگشت، ۲/۵ میلی‌مولار از هر یک از چهار دزوکسی ریبونوکلوئیدها، ۵ میلی‌لیتر از بافر PCR، ۱/۵ میلی‌مولار از $MgCl_2$ ، ۲۵ میلی‌مول بر لیتر $MgSO_4$ ، ۵ واحد از آنزیم DNA پلیمراز *Pfu* (فرمنتاز- آمریکا) و ۵۰ نانوگرم DNA الگو (حجم نهائی ۳۰ میلی‌لیتر) تحت برنامه ۱ دقیقه در دمای

/شرشیاکلی انتروهموراژیک نخستین بار به‌عنوان عامل بیماری‌زای انسانی در آمریکا و در اوایل دهه ۱۹۸۰ طی شیوع گسترده التهاب روده خونریزی دهنده و سندروم اورمی همولیتیک پدیدار شد که مشخص شد عامل آن سویه مولد شیگاتوکسین و غیرتخمیرکننده سوربیتول (NSF) به‌نام /شرشیاکلی O157:H7 است و هنوز هم این باکتری از نظر اپیدمیولوژی، بالینی و میکروبیولوژی اهمیت جهانی دارد (۵). این باکتری جزء خانواده attaching and effacing باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی روده‌ای هستند و به‌علت ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک وخیم در اپیتلیال روده به این نام خوانده می‌شوند. این ضایعات براساس از دست دادن میکروویلی، اتصال محکم و آسان باکتری به سلول میزبان و تشکیل ساختار پایه غنی از فیلامان‌های اکتین F در زیر غشاء سلولی میزبان در جایگاه‌های محل اتصال باکتریایی تشخیص داده می‌شوند (۶،۷). توانایی ایجاد این ضایعات هیستوپاتولوژیک با قدرت کلونیزه شدن باکتری در روده مرتبط بوده و سبب بیماری می‌شود. تکمیل ساختار پایه اکتینی توسط /شرشیاکلی O157:H7 به انتقال پروتئین-های افکتور باکتریایی به داخل سلول‌های میزبان توسط سیستم ترشحی نوع III وابسته است (۸). از جمله پروتئین‌های افکتور دخیل در تشکیل پایه اکتینی گیرنده اینتیمین انتقال دهنده (Tir) است (۹).

Tir یک پروتئین غیرفسفریله است که در اپرون LEE5 کنار ژن *eae* قرار دارد و در سویه /شرشیاکلی انتروهموراژیک تحت عنوان *EspE* خوانده می‌شود. در /شرشیاکلی انتروپاتوژنیک اندازه این پروتئین ۷۸ کیلودالتون بوده و مشاهده شده است که بخش انتهای کربوکسیلی پروتئین Tir، تفاوت زیادی با سویه‌های /شرشیاکلی انتروپاتوژنیک و سویه /شرشیاکلی مولد شیگاتوکسین وجود دارد (۱۰). پروتئین Tir بعد از ساخته شدن در باکتری، توسط آنزیم‌های پروتئین کیناز A و تیروزین کیناز سلول میزبان، در سرین و تیروزین انتهای کربوکسیل خود دچار فسفریلاسیون شده و وزن آن به ۹۰ کیلودالتون می‌رسد و به آن HP90 گفته می‌شود. پروتئین Tir فسفریله شده، سپس به کمک دیگر پروتئین‌های ترشحی مانند EspA، EspB، EspD و در حضور پروتئین چاپرون III و در حضور پروتئین چاپرون کدشده توسط جزیره پاتوژنیسیته LEE به‌نام CesT به غشای سلول میزبان منتقل می‌شود (۳). عملکرد پروتئین

۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت شدن، ۱ دقیقه در دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمر، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت پلی‌مر شدن برای ۳۰ سیکل تکثیر شد. به منظور بررسی اندازه و کیفیت، محصول PCR از روش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد بعد از ۳۰ دقیقه الکتروفورز با ولتاژ ۸۰، ژل توسط اتیدیوم برمایند رنگ‌آمیزی شد و توسط دستگاه geldoc (Biorad, USA) مشاهده شد.

همسانه‌سازی سازه ژن *tir*

جهت همسانه‌سازی سازه ژن *tir*، محصول PCR استخراج شده از ژل آگارز و وکتور pET28a به صورت جداگانه به کمک آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* و در مخلوط واکنش حاوی بافر ۲X، ۱/۵ میکروگرم از DNA، ۱۷/۵ واحد از آنزیم *EcoRI*، ۱۷/۵ واحد از آنزیم *HindIII* پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جایگاه‌های اختصاصی برش داده شدند. به منظور توقف هضم آنزیمی، نمونه‌ها در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. جهت بررسی عملکرد هضم آنزیم‌ها، محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. سپس جهت الحاق، ۶۰۰ نانوگرم از ژن *tir*، ۲۰۰ میلی‌گرم از وکتور بیانی خطی شده pET28a، بافر T4 DNA لیگاز 1X و ۱۰ واحد از آنزیم T4 DNA لیگاز در میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از زمان سپری شدن انکوباسیون، وکتور نو ترکیب به داخل سلول‌های مستعد *E. coli* BL21(DE3) به روش شوک حرارتی ترانسفرم شد. سپس باکتری‌های ترانسفرم شده بر روی محیط LB آگاردار حاوی ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین کشت داده و به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلونی‌های رشد کرده روی این محیط جهت تأیید حضور وکتور حاوی نو ترکیب در باکتری توسط دو روش هضم آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* و انجام واکنش PCR با پرایمرهای ذکر شده در قسمت قبل آنالیز شد.

بیان پروتئین نو ترکیب *Tir*

جهت بیان پروتئین *Tir*، ۵۰ میکرولیتر از باکتری ترانسفرم شده حاوی وکتور نو ترکیب در ۵ میلی‌لیتر محیط مایع LB حاوی ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

کانامایسین تلقیح شد. پس از رسیدن کدورت رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ IPTG با غلظت نهایی ۱ mM به محیط کشت اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و رسوب سلولی جمع‌آوری شد. در مرحله بعد به منظور تهیه لیزات سلولی، رسوب سلول باکتریایی دو با بافر فسفات سالین شستشو داده و به آن بافر لیز کننده سلولی به آن افزوده و توسط ۱۰ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای سونیکاسیون، سلول‌ها لیز شدند. سلول‌های لیز شده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی و رسوب حاصله جهت آنالیز بیان پروتئین محلول و نامحلول جمع‌آوری شد و با ژل اکریل امید دنا توره ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز و توسط رنگ کوماسی بلو G250 رنگ‌آمیزی شد. به منظور تأیید صحت توالی ژن همسانه‌سازی شده، بعد از تخلیص پلاسمید میزان ۲۰ میکرولیتر حاوی ۲۰۰ نانوگرم پلاسمید به شرکت ژن فناوران ارسال شد.

تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA

پس از بیان پروتئین *Tir*، تخلیص پروتئین تحت شرایط دنا توره و با استفاده از ستون Ni-NTA با کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام شد که در آن ذرات نیکل موجود در ستون کروماتوگرافی به دنباله هیستیدین پروتئین نو ترکیب متصل شده و سبب جداسازی آن از محلول شد. نمونه‌های حاصل توسط ژل الکتروفورز ۱۲ درصد بررسی گردیدند. برای تعیین غلظت پروتئین تخلیص شده از روش برادفورد استفاده شد. جذب محلول حاوی پروتئین در طول موج ۵۹۵ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

تأیید پروتئین نو ترکیب توسط وسترن بلائینگ

یکی از نمونه‌های تخلیص شده توسط ستون کروماتوگرافی و نمونه شاهد (بدون القا) مربوط به آن بر روی ژل اکریل امید دنا توره ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند و سپس پروتئین‌ها به غشاء نیتروسولولز منتقل شد. سپس غشاء نیتروسولولز توسط محلول ۵٪ شیرخشک به مدت یک شبانه روز در ۴ درجه سانتی‌گراد بلوکه می‌شود. سپس با بافر PBS-Tween شستشو داده شد. آنتی‌بادی Anti His-Tag با رقت ۱:۲۰۰۰ در بافر PBS-Tween روی کاغذ

tir و وکتور خالی است و نشان‌دهنده الحاق ژن *tir* به داخل وکتور بیانی است.

نتیجه آنالیز همسانه‌های حاوی DNA نوترکیب (Tir)

به‌منظور دست‌یابی به همسانه صحیح از روش کلنی PCR استفاده شد. این روش مانند روش واکنش زنجیره پلی‌مرز که برای تکثیر ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت با این تفاوت که به جای الگو DNA، از کلنی باکتری استفاده می‌شود. همسانه‌هایی که حاوی ژن موردنظر باشند با پرایمر اختصاصی تکثیر شده و ازدیاد پیدا می‌کنند. نتایج PCR را بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز در شکل ۳ نشان داده شده است. نتیجه کلنی PCR نشان‌دهنده این است که همه همسانه‌های مورد آزمایش وکتور ما را دریافت کرده‌اند.

بیان پروتئین نوترکیب

به‌منظور بررسی بیان پروتئین نوترکیب، سلول باکتری لیز شد و عصاره محلول و رسوب‌های به‌دست آمده، در بافر نمونه پروتئینی حل شده و با الکتروفورز بر روی ژل دناتوره کننده پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. تصویر ژل مؤید بیان پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli* BL21DE3 به‌صورت مجتمع‌های محلول است. باند ۱۶ کیلودالتونی مرتبط با بیان پروتئین Tir است (شکل ۴).

تخلیص پروتئین نوترکیب

جهت تخلیص پروتئین نامبرده، از ستون نیکل (-Ni) NTA استفاده شد. جهت شستشو پروتئین متصل‌به‌ستون، از محلول شستشو متشکل از ایمیدازول ۳۰ میلی‌مولار و اوره ۸ مولار استفاده شد. جهت ترسیب پروتئین نوترکیب نیز از محلول ترسیب متشکل از ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار همراه با اوره ۸ مولار استفاده شد. در نهایت پروتئین‌های جدا شده از ستون بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲٪ الکتروفورز شد. همان‌طور که در شکل ۵ دیده می‌شود پروتئین نوترکیب، در فاز محلول بیان شده است.

نتیجه آنالیز پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلات

نیتروسولوز ریخته شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. جهت ظهور پروتئین موردنظر، رنگ کروموزنیک DAB استفاده شد.

آنالیز ساختاری پروتئین نوترکیب

ساختار ثانویه پروتئین نوترکیب توسط دستگاه CD در ناحیه دور (۲۵۰-۱۹۰ نانومتر) مورد بررسی قرار گرفت. برای تخمین درصد ساختار دوم حاضر در پروتئین نوترکیب Tir، از غلظت ۰/۲۵ mg/ml از پروتئین نوترکیب در بافر فسفات استفاده شد تا میزان θ (degcm²/dmol) موج الکترومغناطیسی که از نمونه عبور می‌کند مورد اندازه‌گیری قرار بگیرد. طیف CD از بافر حاوی پروتئین نوترکیب و هم‌چنین بافر فسفات فاقد پروتئین نوترکیب ثبت و اعداد حاصل از هم تفریق شدند. برای محاسبه درصد ساختارهای ثانویه از نرم‌افزار Estimation Program J-800 Protein Secondary Structure استفاده شد.

نتایج

نتایج طراحی و آنالیز نرم‌افزاری پرایمرها

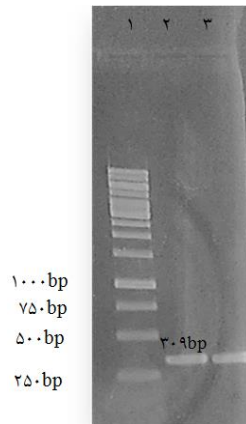
پس از آنالیز ژن قطعه Tir و مشخص کردن آنزیم‌های محدودکننده مورد استفاده، یک جفت پرایمر برای تکثیر ژن طراحی گردید که به‌منظور همسانه‌سازی، سایت برش آنزیم‌های فوق‌الذکر در سر پرایمرها قرار داده شدند. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آنزیم‌های *Taq* DNA Polymerase و *pfu* توسط پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *tir* محصول واکنش به‌دست آمده به‌منظور بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. شکل ۱ نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن *tir* را نشان می‌دهد. همان‌طور که انتظار می‌رفت قطعه‌ای با اندازه ۳۰۹ جفت باز بر روی ژل مشاهده شد.

نتیجه هضم آنزیمی پلاسمید pET28a و ژن *tir*

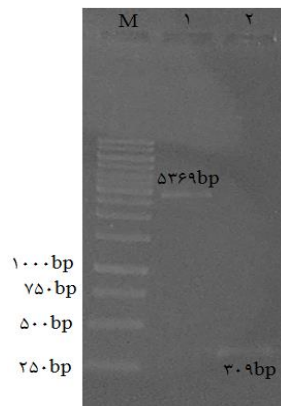
پس از تکثیر ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) و تخلیص پلاسمید، به‌منظور اتصال قطعه هدف با حامل به کمک آنزیم T4 DNA Ligase واکنش Ligation صورت گرفت. در ادامه جهت تأیید تولید وکتور نوترکیب، برش آنزیمی توسط دو آنزیم *HindIII* و *EcoRI* انجام شد و محصول‌های هضم آنزیمی الکتروفورز شد. همان‌طور

Taq کوچکترین واکنشی با دیگر پروتئین‌های موجود در سوپ سلولی که تمام پروتئین‌های بیان شده در باکتری است، را نداشت. باند ۱۶ کیلودالتونی مرتبط با بیان پروتئین Tir است (شکل ۶).

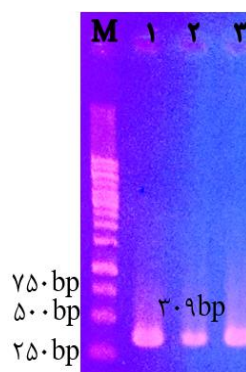
پروتئین نوترکیب خالص شده و سوپ سلولی حاوی پروتئین نوترکیب به‌طور هم‌زمان در دو چاهک کنار هم بارگیری شدند. با انجام وسترن بلات مشخص شد که آنتی His-Taq به‌طور اختصاصی به His-Taq پروتئین نوترکیب واکنش می‌دهد. این در حالی است که آنتی His-



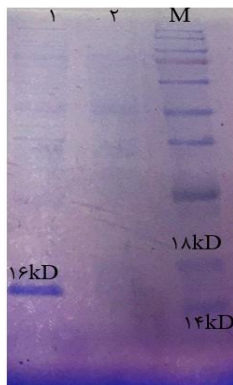
شکل ۱. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با دو آنزیم Taq و Pfu. ستون ۱، نشانگر DNA. ستون ۲ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز ژن *tir* با آنزیم Taq پلی‌مرز و ستون ۳ محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آنزیم Pfu را نشان می‌دهد.



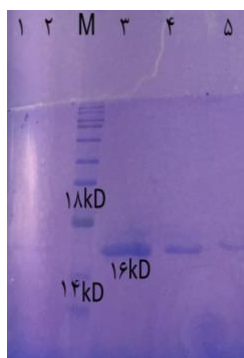
شکل ۲. هضم آنزیمی ناقل حاوی ژن *tir*. ستون M، نشانگر DNA. ستون ۱، ناقل برش خورده به‌صورت خطی. ستون ۲، ژن *tir*.



شکل ۳. نتیجه آنالیز همسانه‌های حاوی DNA حاصل از Colony PCR. M، نشانگر DNA. ستون ۱، ۲، ۳، محصول PCR ژن *tir*



شکل ۴. بیان ژن نوترکیب به کمک SDS-PAGE. ستون M، نشانگر اندازه مولکولی. ستون ۱، پروتئین نوترکیب Tir ستون ۲، نمونه قبل از القا به- عنوان کنترل



شکل ۵. نتیجه تخلیص پروتئین نوترکیب Tir. ستون ۱، نمونه قبل از القا به عنوان کنترل. ستون ۲، خروجی ستون (نشانگر پروتئین). ستون M، نشانگر اندازه مولکولی. ستون ۳، شستشوی ستون با بافر استخراج (Elution Buffer) با بافر ایمیدازول ۳۰۰ میلی مولار همراه با گلیسرول ۵ درصد. ستون ۴، شستشوی ستون با بافر استخراج (Elution Buffer) با بافر ایمیدازول ۳۰۰ میلی مولار همراه با گلیسرول ۵ درصد. ستون ۵، شستشوی ستون با بافر احیا کننده (MES).

برای بیمار ایجاد می کند (۱). در بین عوامل مولد اسهال، *اشرشیاکلی انترهموراژیک سویه O157:H7* از عوامل عمده و مهم مسمومیت غذایی و بیماری های روده ای در دنیا است و به عنوان گروه هتروژنی از باکتری های به شدت بیماری زا با دوز عفونی بسیار پایین معرفی شده است که حتی ۱۰۰-۱ سلول آن هم توانایی تولید بیماری را دارند. با توجه به فرآیند بیماری زائی *اشرشیاکلی انترهموراژیک O157:H7*، پروتئین های اینتیمین، Esp و Tir در هنگام بروز عفونت، قادر به ایجاد لانه گزینی و آسیب های تخریبی شدید در سلول های اپیتلیال روده میزبان هستند.

در مطالعه انجام شده توسط Fan و همکاران در سال ۲۰۱۲ موش با پروتئین Tir نوترکیب به دو صورت زیرجلدی و داخل بینی واکسینه شدند. و بعد از ایمن زایی، موش ها با *اشرشیاکلی O157:H7* عفونی شدند. موش های ایمن زایی شده به صورت داخل بینی تیترا بالاتری از ایمونوگلوبولین A و G را در سرم و مدفوع نشان

نتیجه آنالیز ساختاری با استفاده از پیش بینی های بیوانفورماتیکی و CD

براساس پیش بینی انجام شده در سایت Expasy به آدرس https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl ساختار دوم پروتئین دارای ۴۶/۸۱ درصد آلفا هلیکس (Alpha helix) و ۹/۹۳ درصد صفحات بتا (Extended strand) و ۴۳/۲۶ درصد پیچ های تصادفی (Random coil) است. نتایج به دست آمده از Circular dichroism نشان می دهد ساختار دوم پروتئین دارای ۴۰/۳ درصد آلفا هلیکس (Alpha helix) و ۶/۹ درصد صفحات بتا (Extended strand) و ۵۲/۸ درصد پیچ های تصادفی (Random coil) است (شکل ۷).

بحث

سویه های بیماری زای باکتری *اشرشیاکلی* پاتوژن های خطرناکی هستند که ابتلا به آنها آسیب های متعددی را

دادند و مدت زمان زنده‌مانی بیش‌تری در مقایسه با دیگر گروه‌ها داشتند. که مؤید پتانسیل مناسب فرمولاسیون‌های مخاطی از پروتئین Tir برای واکسن بر علیه باکتری /شرشیاکلی انتراهموراژیک است (۱۳،۱۲). در مطالعه که توسط Amani و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد، پروتئین نوترکیب کایمر متشکل از سه قسمت اینتیمین، Esp و Tir طراحی و بیان شد و ایمنی‌زایی آن در مدل موشی مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که واکسن کایمر قادر به ایمن‌زایی در موش عفونی شده با 10^{10} cfu بوده و بعد از دو هفته میزان باکتری در موش به صفر رسیده است (۱۴). به‌علاوه، Nagano و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند اتصال /شرشیاکلی O157:H7 تولید کننده پروتئین‌های اینتیمین، Esp و Tir به سلول‌های اپیتلیال روده جهت تحریک و تولید آنتی‌بادی ترشحی IgA در سطوح مخاطی لازم است اما تأثیری بر تولید IgM و IgG در سرم ندارد (۱۵).

میکروگرم بر میلی‌لیتر تولید و ساختمان آن جهت کاربردهای درمانی و تشخیصی باکتری /شرشیاکلی انتروهموراژیک و بیماری‌های حاصله از آن، بررسی و مطالعه شد. به‌منظور اطمینان از صحت تعیین ساختار دوم انجام شده به کمک رویکرد بیوانفورماتیکی، ساختار دوم پروتئین نوترکیب Tir پس از سنتز به کمک تکنیک CD نیز مورد بررسی قرار گرفت. این تکنیک بر اساس تفاوت در جذب نور قطبیده حلقوی چپگرد و نور قطبیده حلقوی راستگرد توسط ترکیب‌های کروموفور کایرال موجود در مولکول کار می‌کند. از طیف CD در ناحیه دور نور UV (زیر ۲۶۰ nm) برای تعیین درصد ساختارهای دوم استفاده می‌شود. میزان ساختار دوم تعیین شده به کمک CD تا حد زیادی نتایج میزان ساختار دوم به‌دست آمده به کمک رویکرد تئوری را تأیید می‌کند.

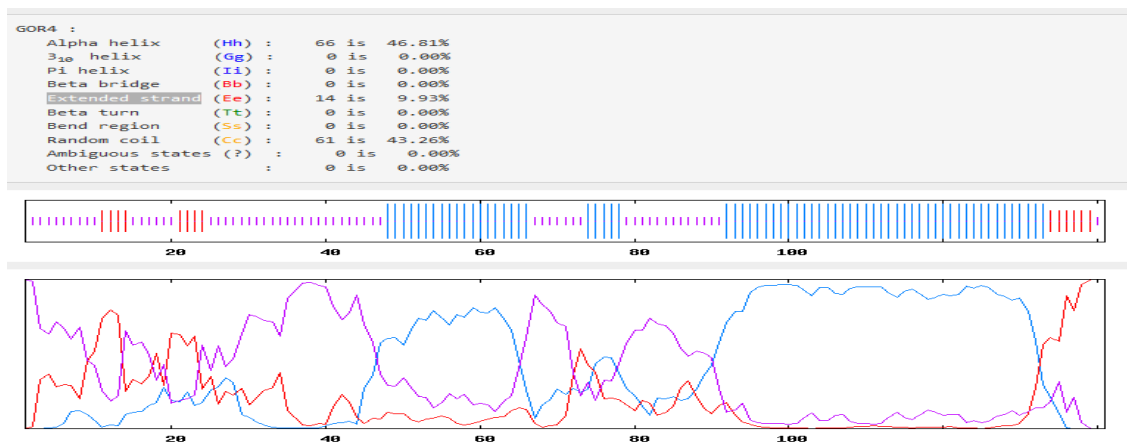
نتیجه‌گیری

در این مطالعه، سازه پایدار محتوی ژن *tir* ساخته شد که بیان نوترکیب قابل توجهی از پروتئین Tir را از خود نشان داد. بنابراین این سازه را می‌توان برای تولید پروتئین Tir جهت مطالعه‌های ایمنی‌زایی علیه *E.coli* O157:H7 بکار برد.

در مطالعه حاضر، ژن *tir* /شرشیاکلی انتروهموراژیک O157:H7 سنتز و در وکتور بیانی کلون شد. پس از تخلیص پروتئین مربوطه از نظر ساختار پروتئینی مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به مطالعه‌های صورت گرفته قبلی در مورد پروتئین نوترکیب Tir و کاربردهای آن، در این پژوهش پروتئین نوترکیب مذکور با غلظت ۲۳۶



شکل ۶. وسترن بلائینگ پروتئین نوترکیب. ستون ۱، نشانگر اندازه مولکولی. ستون ۲، نمونه سوپ سلولی بعد از بیان پروتئین نوترکیب. ستون ۳، نمونه قبل از القاء به‌عنوان کنترل.



شکل ۷. آنالیز ساختاری پروتیین نو ترکیب Tir. پیش بینی های بیوانفورماتیکی و CD

1. 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.
2. Fatima R, Aziz M. Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* (EHEC). StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2019.
3. Abe A, de Grado M, Pfuetzner RA, Sanchez-Sanmartin C, Devinney R, Puente JL, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Mol Microbiol*. 1999;33(6):1162-75.
- Schwidder M, Heinisch L, Schmidt H. Genetics, toxicity, and distribution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin. *Toxins*. 2019;11(9):502.
5. Eklund M. ENTEROHEMORRHAGIC *Escherichia coli* (EHEC) FINDINGS FROM HUMANS IN FINLAND University of Helsinki,; 2005.
6. Cepeda-Molero M, Berger CN, Walsham ADS, Ellis SJ, Wemyss-Holden S, Schuller S, et al. Attaching and effacing (A/E) lesion formation by enteropathogenic *E. coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors. *PLoS Pathog*. 2017;13(10):e1006706.
7. Scaletsky ICA. Enteropathogenic *Escherichia coli*. The Universe of *Escherichia coli*: IntechOpen; 2019.
8. Dey S, Chakravarty A, Guha Biswas P, De Guzman RN. The type III secretion system needle, tip, and translocon. *Protein Science*. 2019;28(9):1582-93.
9. Gaytan MO, Martinez-Santos VI, Soto E, Gonzalez-Pedrajo B. Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:129.
10. Paton AW, Manning PA, Woodrow MC, Paton JC. Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity. *Infect Immun*. 1998;66(11):5580-6.
11. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1989;57(4):1290-8.
12. Fan HY, Wang L, Luo J, Long BG. Protection against *Escherichia coli* O157:H7 challenge by immunization of mice with purified Tir proteins. *Mol Biol Rep*. 2012;39(2):989-97.
13. Kordbacheh E, Nazarian S, Hajizadeh A, Fasihi-Ramandi M, Fathi J. Recombinant HcpA-EspA-Tir-Stx2B chimeric protein induces immunity against attachment and toxicity of *Escherichia coli* O157: H7. *Microbial pathogenesis*. 2019;129:176-82.
14. Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine*. 2010;28(42):6923-9.
15. Nagano K, Taguchi K, Tokoro S, Tatsuno I, Mori H. Adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to the intestinal epithelia is essential for inducing secretory IgA antibody production in the intestine of mice. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(3):409-16.