



Scan online to view this article

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.



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^{۳*}

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 شیگاتوکسین 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 سنجاق سری را در غشاء پلاسمائی سلول میزبان به خود می گیرد که دارای دامین های داخل سلولی انتهای آمینو و انتهای کربوکسیلی و یک دامین خارج سلولی مرکزی بوده و به پروتئین غشاء خارجی باکتری، اینتیمین، متصل می شود. تجمع و دسته بندی پروتئین Tir در غشاء سلول میزبان و متعاقب اتصال با اینتیمین، سیگنالینگ های آبشاری را به راه می اندازد که در نهایت سبب شکل گیری ساختار پایه اکتین می شود. هم چنین، کمپلکس Intimin/Tir موجب ارسال پیام هایی به سلول میزبان شده و تغییرهای بعدی را در آن به وجود می آورد (۱۱،۳). به علاوه، پروتئین Tir یک عامل ایمونوژنیک است و آنتی بادی پلی کلونال علیه این پروتئین، کاهش اتصال /شرشیاکلی انتروهموراژیک به سلول های میزبان را سبب می شود. از این رو، این پروتئین دارای آنتی ژن های مناسب و کاندید ایمونوژنیک جهت جلوگیری از فرآیند اتصال و همسانه سازی /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 روش ها

تهیه سازه ژنی *tir* - pET28a

مطالعه حاضر از نوع پژوهش تجربی- توصیفی است که به منظور 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 فن آوران سفارش داده شد. جهت تسهیل در همسانه سازی 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 هریک از پرایمرها رفت و بازگشت، ۲/۵ میلی مولار از هریک از چهار دزوکسی ریبونوکلوئید ها، ۵ میلی لیتر از بافر PCR، ۱/۵ میلی مولار از $MgCl_2$ ، ۲۵ میلی مول بر لیتر $MgSO_4$ ، ۵ واحد از آنزیم DNA پلیمرز *Pfu* (فرمنتاز- آمریکا) و ۵۰ نانوگرم DNA الگو (حجم نهائی ۳۰ میلی لیتر) تحت برنامه ۱ دقیقه در دمای

/شرشیاکلی انتروهموراژیک نخستین بار به عنوان عامل بیماری زای 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) به نام /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 باکتری های بیماری زای گرم منفی روده ای هستند و به علت ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک وخیم در اپیتلیال روده به این نام خوانده می شوند. این ضایعات براساس از دست دادن میکروویلی، اتصال محکم و آسان باکتری به سلول میزبان و تشکیل ساختار پایه غنی از فیلامان های اکتین F در زیر غشاء سلولی میزبان در جایگاه های محل اتصال باکتریایی تشخیص داده می شوند (۷،۶). توانایی ایجاد این ضایعات هیستوپاتولوژیک با قدرت کلونیزه شدن باکتری در روده مرتبط بوده و سبب بیماری می شود. تکمیل ساختار پایه اکتینی توسط /شرشیاکلی O157:H7 به انتقال پروتئین- های افکتور باکتریایی به داخل سلول های میزبان توسط سیستم ترشحی نوع III وابسته است (۸). از جمله پروتئین های 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 می شود. در /شرشیاکلی انتروپاتوژنیک اندازه این پروتئین ۷۸ کیلودالتون بوده و مشاهده شده است که بخش انتهای کربوکسیلی پروتئین Tir، تفاوت زیادی با سویه های /شرشیاکلی انتروپاتوژنیک و سویه /شرشیاکلی مولد شیگاتوکسین وجود دارد (۱۰). پروتئین Tir بعد از ساخته شدن در باکتری، توسط آنزیم های پروتئین کیناز A و تیروزین کیناز سلول میزبان، در سرین و تیروزین انتهای کربوکسیل خود دچار فسفریلاسیون شده و وزن آن به ۹۰ کیلودالتون می رسد و به آن HP90 گفته می شود. پروتئین Tir فسفریله شده، سپس به کمک دیگر پروتئین های ترشحی مانند *EspB*، *EspD*، *EspA* و سیستم ترشحی تیپ III و در حضور پروتئین چاپرون کدشده توسط جزیره پاتوژنیسیته LEE به نام CesT به غشای سلول میزبان منتقل می شود (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. به‌منظور 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 gel doc (Biorad, USA) مشاهده شد.

همسانه‌سازی سازه ژن *tir*

جهت همسانه‌سازی سازه ژن *tir*، محصول PCR استخراج شده از ژل آگارز و وکتور pET28a به‌صورت 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. به‌منظور توقف هضم آنزیمی، نمونه‌ها در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 به‌مدت 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 به‌مدت 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 به‌مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سوسپانسیون باکتری به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و رسوب سلولی جمع‌آوری شد. در مرحله بعد به‌منظور تهیه لیزات سلولی، رسوب سلول باکتریایی دو با 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 آمید دنا توره ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز و توسط رنگ کوماسی بلو G250 رنگ‌آمیزی شد. به‌منظور 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 بلا تینگ

یکی از نمونه‌های تخلیص شده توسط ستون کروماتوگرافی و نمونه شاهد (بدون القا) مربوط به آن بر روی ژل اکریل آمید دنا توره ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند و سپس پروتئین‌ها به غشاء نیتروسلولز منتقل شد. سپس غشاء نیتروسلولز توسط محلول ۵٪ شیر خشک به‌مدت 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 نشان دهنده الحاق ژن *tir* به داخل وکتور بیانی است.

نتیجه آنالیز همسانه های حاوی DNA نوترکیب (Tir)

به منظور دستیابی به همسانه صحیح از روش کلنی PCR استفاده شد. این روش مانند روش واکنش زنجیره پلی مرز که برای تکثیر ژن ها مورد استفاده قرار گرفت با این تفاوت که به جای الگو DNA، از کلنی باکتری استفاده می شود. همسانه هایی که حاوی ژن مورد نظر باشند با پرایمر اختصاصی تکثیر شده و ازدیاد پیدا می کنند. نتایج PCR را بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز در شکل ۳ نشان داده شده است. نتیجه کلنی PCR نشان دهنده این است که همه همسانه های مورد آزمایش وکتور ما را دریافت کرده اند.

بیان پروتئین نوترکیب

به منظور بررسی بیان پروتئین نوترکیب، سلول باکتری لیز شد و عصاره محلول و رسوب های به دست آمده، در بافر نمونه پروتئینی حل شده و با الکتروفورز بر روی ژل دناتوره کننده پلی اکریل آمید ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. تصویر ژل مؤید بیان پروتئین های نوترکیب در *E. coli* BL21DE3 به صورت مجتمع های 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 متصل به ستون، از محلول شستشو متشکل از ایمیدازول ۳۰ میلی مولار و اوره ۸ مولار استفاده شد. جهت ترسیب پروتئین نوترکیب نیز از محلول ترسیب متشکل از ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار همراه با اوره ۸ مولار استفاده شد. در نهایت پروتئین های جدا شده از ستون بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪ الکتروفورز شد. همان طور که در شکل ۵ دیده می شود پروتئین نوترکیب، در فاز محلول بیان شده است.

نتیجه آنالیز پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلات

نیتروسولوز ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. جهت ظهور پروتئین مورد نظر، 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 ۰ degcm²/dmol موج الکترومغناطیسی که از نمونه عبور می کند مورد اندازه گیری 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 نرم افزار Estimation Program J-800 Protein Secondray Structure استفاده شد.

نتایج

نتایج طراحی و آنالیز نرم افزاری پرایمرها

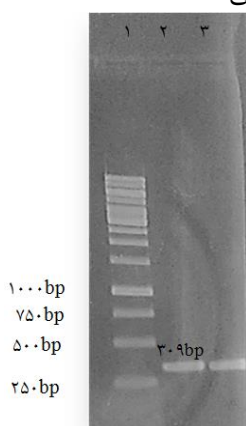
پس از آنالیز ژن قطعه Tir و مشخص کردن آنزیم های محدود کننده مورد استفاده، یک جفت پرایمر برای تکثیر ژن طراحی گردید که به منظور همسانه سازی، سایت برش آنزیم های فوق الذکر در سر پرایمرها قرار داده شدند. پس از انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز با آنزیم های Taq DNA Polymerase و pfu توسط پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *tir*، محصول واکنش به دست آمده به منظور بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. شکل ۱ نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن *tir* را نشان می دهد. همان طور که انتظار می رفت قطعه ای با اندازه ۳۰۹ جفت باز بر روی ژل مشاهده شد.

نتیجه هضم آنزیمی پلاسمید pET28a و ژن *tir*

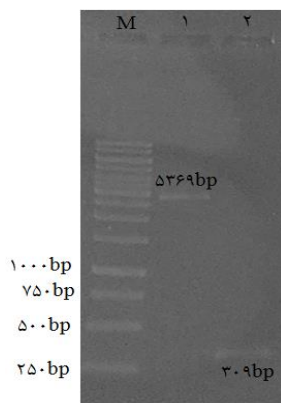
پس از تکثیر ژن توسط واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) و تخلیص پلاسمید، به منظور اتصال قطعه هدف با حامل به کمک آنزیم T4 DNA Ligase واکنش Ligation صورت گرفت. در ادامه جهت تأیید تولید وکتور نوترکیب، برش آنزیمی توسط دو آنزیم HindIII و EcoRI انجام شد و محصول های هضم آنزیمی الکتروفورز شد. همان طور

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

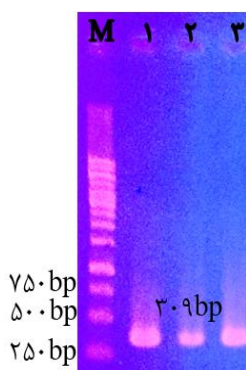
پروتئین نوترکیب خالص شده و سوپ سلولی حاوی پروتئین نوترکیب به‌طور هم‌زمان در دو چاهک کنار هم بارگیری شدند. با انجام وسترن بلات مشخص شد که آنتی His-Taq به‌طور اختصاصی به His-Taq پروتئین نوترکیب واکنش می‌دهد. این در حالی است که آنتی His-



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.



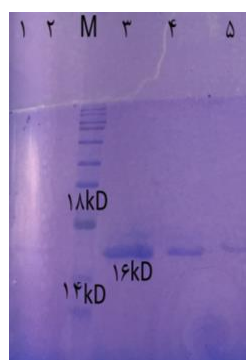
شکل ۲. هضم آنزیمی ناقل حاوی ژن *tir*. ستون M، نشانگر DNA. ستون ۱، ناقل برش خورده به‌صورت خطی. ستون ۲، ژن *tir*.



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، /شرشیاکلی انتراهموراژیک 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 /شرشیاکلی انتروهموراژیک 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 /شرشیاکلی 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 /شرشیاکلی 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 (۱۲، ۱۳). 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 ترشیی IgA در سطوح مخاطی لازم است اما تأثیری بر تولید IgM و IgG در سرم ندارد (۱۵).

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

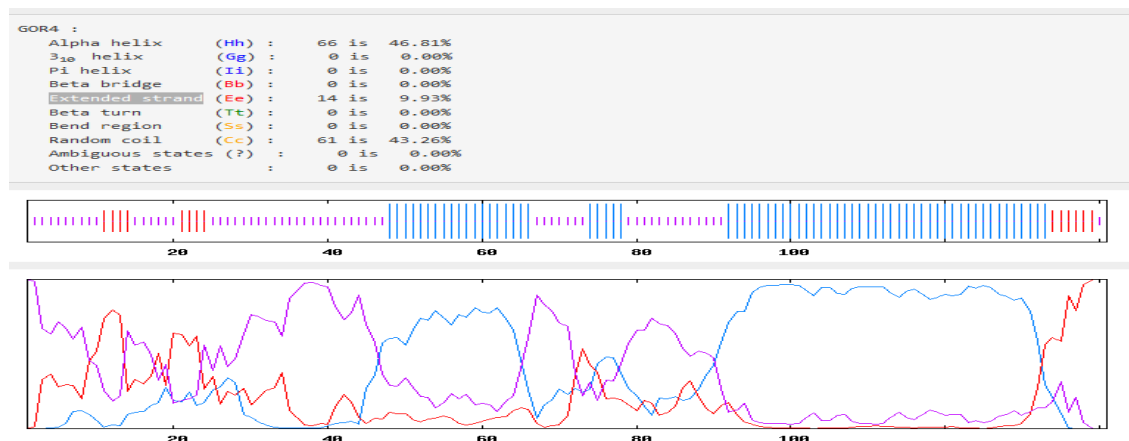
میکروگرم بر میلی‌لیتر تولید و ساختمان آن جهت کاربردهای درمانی و تشخیصی باکتری /شرشیاکلی انتروهموراژیک و بیماری‌های حاصله از آن، بررسی و مطالعه شد. به‌منظور اطمینان از صحت تعیین ساختار دوم انجام شده به کمک رویکرد بیوانفورماتیکی، ساختار دوم پروتئین نوترکیب Tir پس از سنتز به کمک تکنیک CD نیز مورد بررسی 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.



شکل ۶. وسترن بلاتینگ 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

منابع

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.