ORIGINAL ARTICLE

Cloning and Recombinant Expression of EspA as a Virulence Factor of E. coli O157:H7

Mostafa Bakhshi[1],
Firouz Ebrahimi[2],
Jamil Zargan[2],
Shahram Nazarian[2],
Vahideh Sheikhzade[3]

[1] PhD Student in Nanobiotechnoligy, Biology Research Center, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
[3] MSc in Food Science and Technology, Islamic Azad University, Quchan Branch, Quchan, Iran

(Received June 18, 2014 ; Accepted September 21, 2014)

Abstract

Background and purpose: *E. coli* O157:H7 is one of the intestinal pathogens that mediate serious damages in gastrointestinal track. The bacterium attachment in large intestine is mediated via some colonization factors mainly Type III secretion proteins that are involved in this process. Among these factors, EspA protein plays an important role in system foundation. The aim of this study was cloning and recombinant expression of EspA in order to achieve a stable construct for the protein production and using it as a vaccine candidate in future investigations.

Materials and methods: Specific primers were designed by Oligo 7 software and gene amplification was performed by PCR technique on template DNA. Enzymatic digestion and ligation were done by restriction enzymes and T4 ligase enzyme, respectively. Recombinant expression of EspA was induced by IPTG following cloning confirmation. Protein confirmation was done by Western blotting analyze.

Results: Results showed that cloning of *espA* in pET28a (+) vector was performed in an appropriate mode between expected sites. Also, EspA had good and remarkable recombinant expression after induction and the antibody used in western blotting could recognize EspA on nitrocellulose membrane.

Conclusion: Stable recombinant construct containing *espA* gene was fabricated that showed appropriate recombinant expression of protein. So, this protein could be used in future studies as a vaccine candidate against *E. coli* O157:H7.

Keywords: Intestinal pathogen, *espA* gene cloning, Recombinant expression, Western blotting

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(117): 12-20 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۷ مهر سال ۱۳۹۳ (۲۰-۱۲)

همسان سازی و بیان نوترکیب فاکتور بیماریزای EspA مربوط به باکتری *E. coli*O157:H7

مصطفی بخشی[۱]
فیروز ابراهیمی[۲]
جمیل زرگان[۲]
شهرام نظریان[۲]
وحیده شیخ زاده[۳]

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *E. coli*O157:H7 جزء پاتوژن‌های روده‌ای می‌باشد که آسیب‌های جدی در دستگاه گوارش پدید می‌آورد. اتصال باکتری در روده بزرگ به واسطه یک سری از فاکتورهای بیماری زا صورت می‌پذیرد که پروتئین‌های ترشحی نوع ۳ نیز جزء این فاکتورها دسته‌بندی می‌شوند. در بین پروتئین‌های موجود در سیستم مذکور، پروتئین EspA نقش اصلی و مهم را در پیکره شکل‌گیری این سیستم ایفا می‌کند. هدف از انجام این تحقیق همسان‌سازی و بیان این پروتئین به شکل نوترکیب جهت دستیابی به یک ساختار و منبع پایدار برای تولید آن به منظور بررسی‌های آینده به عنوان کاندید واکسن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن *espA* توسط نرم‌افزار Oligo 7 انجام شد و تکثیر ژن توسط واکنش PCR از روی DNA الگو صورت پذیرفت. واکنش‌های هضم آنزیمی و الحاق ژن درون وکتور بیانی pET28a(+) انجام شد. پس از تأیید همسان سازی ژن مورد نظر، بیان نوترکیب پروتئین EspA با استفاده از القاءگر مصنوعی IPTG صورت پذیرفت. آنالیز وسترن بلات نیز برای تأیید پروتئین EspA صورت پذیرفت.

یافته‌ها: همسان سازی ژن *espA* درون وکتور pET28a(+) به شکل مناسب بین جایگاه های مربوطه صورت پذیرفت و پروتئین EspA پس از القا، بیان نوترکیب مناسب و قابل توجهی را نشان داد. آنتی‌بادی مورد استفاده در وسترن بلات نیز توانست به شکل مناسبی EspA را شناسایی کند.

استنتاج: ساختار نوترکیب پایدار محتوی ژن *espA* تولید گردید که بیان نوترکیب قابل توجهی از پروتئین را نشان داد. بنابراین پروتئین EspA را می‌توان در مطالعات آینده برای بررسی میزان ایمن‌سازی علیه *E. coli* O157:H7 مورد بررسی قرار داد.

واژه های کلیدی: پاتوژن روده‌ای، همسان سازی ژن *espA*، بیان نوترکیب، وسترن بلات

مقدمه

سویه‌های بیماری زای باکتری *E.coli* پاتوژن‌های خطرناکی هستند که ابتلا به آن‌ها آسیب‌های متعددی را برای بیمار ایجاد می‌کند(۲،۱). باکتری *E. coli*O157:H7 جزء دسته پاتوژن‌های EHEC محسوب می‌شود و میکروارگانیسمی است که از طریق فرآورده‌های غذایی آلوده و شیر غیر پاستوریزه به انسان منتقل می‌شود(۴،۳).

مولف مسئول: فیروز ابراهیمی– تهران: اتوبان شهید بابایی، دانشگاه امام حسین(ع)، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی E-mail: febrhimi@ihu.ac.ir
۱. دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳. کارشناسی ارشد تکنولوژی و علوم غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، گروه علوم و صنایع غذایی، قوچان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۳/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۴/۱۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۶/۳۰

سالانه بیش از ۵ میلیون مرگ و میر خصوصاً در کودکان زیر ۵ سال به واسطه آلودگی به این پاتوژن گزارش می‌شود(۵). لانه گزینی باکتری مذکور در لوله گوارش به واسطه یک سری از عوامل و فاکتورها تحت کنترل جزایر پاتوژنیسیته انجام می‌شود(۶،۵). این جزایر دسته‌جات ژنتیکی خارج کروموزومی هستند که حاوی عوامل بیماری‌زای مختلفی از قبیل ژن های تهاجم/ اتصال و سیستم ترشحی نوع III و IV می‌باشند. پاتوژن از این سیستم‌ها برای ترشح مولکول‌های مجری که سلول میزبان را متأثر می‌سازند استفاده می کند(۷). سیستم ترشحی نوع III در ترشح پروتئین‌های مختلف از جمله Tir، EspA، EspB و EspD نقش ایفا می کند(۵). بسیاری از این فاکتورهای بیماری‌زا مستقیماً به سلول میزبان تحویل داده می‌شوند. به عنوان مثال EspA با ایجاد ساختار رشته‌ای روی سطح باکتری به سلول میزبان پل می‌زند(۶). EspA توسط ژن *espA* کد می‌شود و روی سطح باکتری ساختاری فیلامنتی برای تزریق EspB، EspD و Tir تشکیل می‌دهد(۳). بر طبق گزارشات، بیماری‌زایی موتانت های *espA* و *espB* بسیار کاهش می‌یابد(۸). چسبندگی اولیه باکتری به سلول‌های اپی تلیال توسط پیلی تشکیل‌دهنده دسته (Bundle forming pilus) انجام می‌شود که آن را پلاسمید کد می کند. سپس پروتئین EspA با شکل دادن یک کانال شرایط را برای انتقال سایر فاکتورهای دخیل در لانه‌گزینی باکتری فراهم می کند(۶). به دلیل اهمیت اینتیمین و EspA در روند بیماری‌زایی، این دو پروتئین به‌عنوان شاخص‌های بیماری‌زایی EHEC محسوب می‌شوند(۹).

مطالعات متعددی برای تولید این پروتئین به شکل نوترکیب به تنهایی(۱۰) و هم چنین به صورت کایمر با سایر عوامل دخیل در لانه گزینی(۱۱،۱۰) و بیماری‌زایی باکتری(۱۲-۱۰) صورت پذیرفته است. با توجه به نقش پروتئین EspA در بیماری‌زایی باکتری *E. coli* O157:H7، می‌توان آن را به عنوان کاندیدی مناسب برای واکسیناسیون علیه عامل مذکور در نظر گرفت. در این پژوهش با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب، اقدام به همسان‌سازی و بیان نوترکیب پروتئین EspA شد.

مواد و روش‌ها

طراحی پرایمر برای ژن espA مربوط به باکتری E. coli o157:H7

توالی آمینواسیدی EspA از پایگاه NCBI با عدد دسترسی (ZP_02797355) استخراج شد و پس از برگرداندن توالی آمینواسیدی به توالی نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزار ترجمه معکوس(۱۳) و بررسی توالی ژن در نرم‌افزار NEBcutter(۱۴)، جایگاه‌های برشی *Bam*HI و *Hin*dIII به ترتیب در انتهای ´۵ پرایمرهای پیشرو و پیرو در نظر گرفته شد. پرایمرهای اختصاصی برای این ژن با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 طراحی شد. توالی پرایمرها عبارت بودند از:

پرایمر پیشرو:

TAATGGATCCATGGCTGACATGAAC

پرایمر پیرو:

CTTCAAGCTTTTACTTACCCAGAGAGTAGC

دمای ذوب (Tm) پرایمرهای پیشرو و پیرو به ترتیب ۶۸/۵ و ۶۸/۹ درجه سانتی‌گراد بود. نظر به این که برش مستقیم محصول PCR توسط آنزیم‌های محدودالأثر مد نظر بود، لذا تعداد ۴ نوکلئوتید نیز در پایانه‌های ´۵ هر دو پرایمر مد نظر قرار گرفت. هم‌چنین به منظور پایان فرآیند ترجمه از روی mRNA ژن مذکور، توالی مربوط به کدون خاتمه نیز بر روی پرایمر پیرو قرار گرفت.

تکثیر ژن espA توسط تکنیک PCR

از پلاسمیدی که دارای یک ژن کایمر محتوی توالی *espA* بود، به عنوان الگو استفاده گردید. پلاسمید مذکور به روش لیز قلیایی استخراج شد و پس از تعیین غلظت آن توسط دستگاه پیکودراپ، میزان ۰/۵ میکرولیتر از محلول محتوی پلاسمید به عنوان الگو در واکنش

زنجیره‌ای پلیمراز توسط آنزیم *Taq* DNA پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین پرایمرهای پیشرو و پیرو هر کدام به میزان ۰/۴ پیکومول، نمک MgSO4 با غلظت ۲ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی‌مولار و ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم پلیمراز با غلظت 10X برای حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتری مورد استفاده واقع شدند. گرادیان دمایی ۵۵ تا ۶۵ درجه برای فرآیند اتصال پرایمرها (دمای Annealing) برای بهینه‌سازی واکنش PCR انجام شد. پس از بهینه‌سازی PCR، از آنزیم *Pfu* DNA پلیمراز برای تکثیر ژن مذکور به منظور جلوگیری از جهش‌های ناخواسته استفاده گردید.

چرخه‌های PCR به شرح زیر بود: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه طی ۵ دقیقه، واسرشتگی ثانویه در دمای ۹۴ درجه ظرف ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به رشته الگو در دمای ۶۲ درجه طی ۴۰ ثانیه، گسترش رشته جدید به واسطه فعالیت آنزیم پلیمراز در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتاً یک مرحله گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. لازم به ذکر است که تعداد چرخه‌ها برای تکثیر از مرحله واسرشتگی ثانویه تا مرحله گسترش رشته در حال سنتز ۳۴ تکرار بود(۱۵).

همسان سازی محصول PCR در وکتور pET28a(+)

پس از تکثیر قطعه ژنی و تخلیص آن توسط کیت شرکت Bioneer، واکنش هضم آنزیمی به صورت دوگانه بر روی محصولات PCR و هم‌چنین پلاسمید pET28a(+) توسط آنزیم‌های محدودالأثر *Bam*HI و *Hin*dIII انجام شد و واکنش‌های برشی به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از اتمام زمان هضم آنزیمی، فرآیند مذکور با انتقال تیوپ‌های محتوی اجزای واکنش به دمای ۸۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه غیرفعال شدند. پلاسمید برش خورده بر روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین الکتروفورز شد تا باند برش خورده پلاسمید به شکل اختصاصی استخراج گردد.

پس از تخلیص محصولات حاصل از واکنش‌های هضم آنزیمی بر روی رشته‌های DNA و پلاسمید، واکنش الحاق ژن درون وکتور با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase با در نظر گرفتن غلظت حداقلی پلاسمید به میزان ۵۰ نانوگرم و با به کارگیری فرمول ۱ برای محاسبه غلظت ژن مورد استفاده با حجم ۳ برابر برای واکنش الحاق صورت پذیرفت. اجزای واکنش با هم ترکیب شدند و واکنش به صورت شبانه در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد(۱۵).

فرمول ۱:

غلظت ژن مورد استفاده در واکنش الحاق برحسب نانوگرم $= 50 \times \frac{\text{number of gene base pair}}{\text{number of vector base pair}} \times 3$

تراریخت نمودن سلول های میزبان بیانی توسط کاست ساخته شده:

سلول‌های میزبان مستعد باکتری *E.coli* BL21(DE3) استاندارد به روش شیمیایی با استفاده از نمک‌های $Mgcl_2$ و $Cacl_2$ تهیه شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش الحاق به صورت شوک حرارتی به سلول‌های مستعد منتقل شد و سلول‌های میزبان تراریخت شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۸۰µg/ml) کشت داده شدند و به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند(۱۵).

تأیید همسان سازی ژن

تعداد ۳ کلونی از کلون‌های رشد یافته بر روی محیط انتخابی LB آگار انتخاب شدند و به محیط LB براث حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۸۰µg/ml) منتقل شدند. پس از این که جذب نوری سلول‌ها در طول موج ۶۰۰nm به ۰/۸ رسید، استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی صورت پذیرفت. برای تأیید همسان‌سازی ژن *espA* درون وکتور pET28a(+)، از سه تکنیک PCR، واکنش هضم آنزیمی و هم‌چنین توالی یابی توسط پرایمرهای عمومی T7 اپراتور و ترمیناتور استفاده گردید.

بررسی بیان پروتئین espA:

پس از تأیید همسان سازی ژن *espA*، از کلون‌های

رشد کرده در محیط LB براث به صورت شبانه، میزان ۵۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB براث تازه و استریل حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۴۰µg/ml) منتقل گردید. نظر به این که بیان ژن در سویه BL21(DE3) تحت کنترل اپرون lac می‌باشد، پس از این که جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰nm به حدود ۰/۵ رسید، از ماده القاءگر مصنوعی ایزوپروپیل-β-D-۱-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) برای القای بیان ژن مورد نظر استفاده شد. نتایج بیان بر روی ژل SDS-PAGE ۱۴درصد بررسی گردید (۱۶).

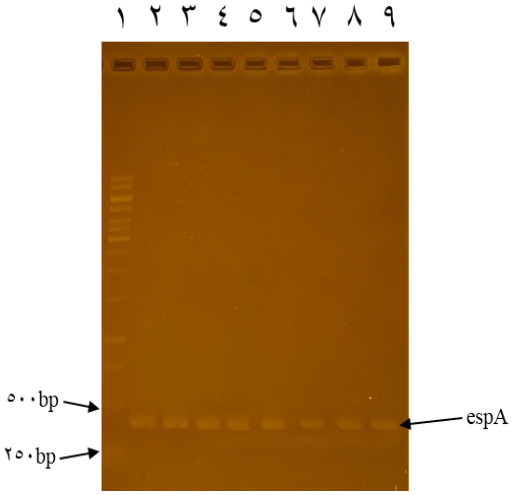
تأیید پروتئین نوترکیب EspA توسط لکه گذاری وسترن:

به منظور تأیید پروتئین EspA نوترکیب از روش ایمنوبلات وسترن با استفاده از آنتی‌بادی پلی کلونال علیه یک آنتی ژن کایمر در برگیرنده پروتئین EspA به عنوان یکی از زیر واحدهای آن استفاده گردید. ابتدا عصاره سلولی نمونه القاء شده و القاء نشده و هم چنین پروتئین BSA بر روی ژل SDS-PAGE ۱۴ درصد الکتروفورز شدند. سپس فرآیند لکه گذاری وسترن بر روی کاغذ نیتروسلولز با استفاده از سیستم لکه‌گذاری BioRad و بافر مخصوص آن (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۱ درصد و متانول ۲۰ درصد با pH=8.3) صورت پذیرفت. بلاک نمودن کاغذ نیتروسلولز به صورت شبانه با استفاده از محلول بلاکینگ حاوی ۵ درصد شیر خشک انجام شد. نمونه پس از ۳ بار شستشو در بازه‌های زمانی ۱۰ دقیقه‌ای توسط بافر PBST، در معرض آنتی‌بادی پلی کلونال مذکور با رقت ۱/۳۵۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فرآیند شستشو مانند قبل تکرار شد و این بار از آنتی‌بادی پلی کلونال موشی کانجوگه با غلظت ۱/۱۵۰۰ برای پوشاندن سطح کاغذ در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۱ ساعت استفاده گردید. پس از تکرار فرآیند شستشو، واکنش رنگ‌پذیری باند مربوط به EspA با افزودن سوبسترای آنزیم کانجوگه HRP (تریس ۵۰ میلی مولار، ۶ میلی‌گرم DAB و ۱۰ میکرولیتر H_2O_2) انجام شد. در نهایت برای توقف واکنش رنگ‌پذیری، محلول محتوی سوبسترا از محیط با شستشوی کاغذ توسط ddH_2O حذف گردید(۱۶).

یافته ها

واکنش زنجیره ای پلیمراز ژن espA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی:

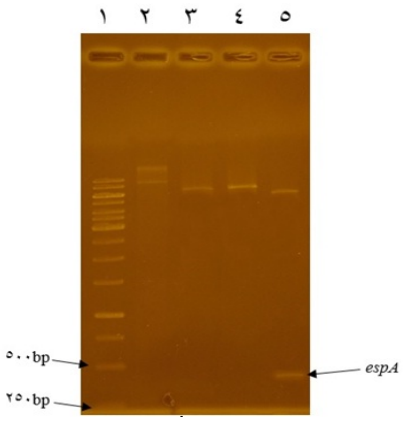
پس از این که پرایمرهای پیشرو و پیرو برای ژن مورد نظر توسط نرم‌افزار Oligo 7 طراحی شد، با استفاده از نرم افزار Blast میزان اختصاصیت آن‌ها برای ژن *espA* بررسی شد و مشخص گردید که هر دو پرایمر با اختصاصیت بالا ژن مورد نظر را در بانک ژنی شناسایی می‌کنند. پس از دریافت پرایمرها و آماده‌سازی آن‌ها، بهینه‌سازی واکنش PCR برای تکثیر ژن *espA* در دماهای اتصال مختلف پرایمر به رشته الگو توسط آنزیم *Taq* DNA پلیمراز صورت پذیرفت (تصویر شماره ۱). نظر به این که آنزیم مذکور صحت همسان‌سازی بالایی ندارد، لذا تکثیر نهایی رشته الگو توسط آنزیم *Pfu*DNA پلیمراز انجام شد.



تصویر شماره ۱: نتیجه تکثیر ژن *espA* بر روی ژل آگارز ۱ درصد: ردیف ۱: نشانگر مولکولی DNA. ردیف های ۲ تا ۹: محصول PCR در گرادیان دمایی ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد.

الحاق ژن espA در وکتور بیانی pET28a(+)

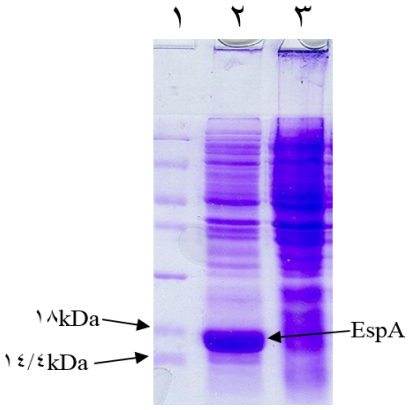
با انجام واکنش‌های هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Hin*dIII بر روی محصولات PCR و وکتور pET28a(+)، با فراهم آمدن پایانه‌های چسبنده برای ژن و وکتور، فرآیند الحاق ژن درون MCS وکتور توسط آنزیم T4 DNA لیگاز انجام شد. پس از انتقال کلون های تراریخت شده توسط حامل نوترکیب به محیط کشت مایع و استخراج پلاسمید، با استفاده از واکنش‌های هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدودالاثر مذکور (تصویر شماره ۲)، PCR توسط پرایمرهای اختصاصی ژن و توالی یابی مشخص گردید که ژن با موفقیت درون وکتور همسان‌سازی شده است.



تصویر شماره ۲: بررسی هضم آنزیمی بر روی وکتور نوترکیب pET28a-espA: ردیف ۱: نشانگر مولکولی DNA. ردیف ۲: وکتور pET28a-espA برش نخورده. ردیف ۳: هضم وکتور توسط آنزیم *Bam*HI. ردیف ۴: هضم وکتور توسط آنزیم *Hin*dIII. ردیف ۵: هضم دوگانه وکتور توسط آنزیم های *Bam*HI و *Hin*dIII.

بررسی بیان نوترکیب پروتئین EspA:

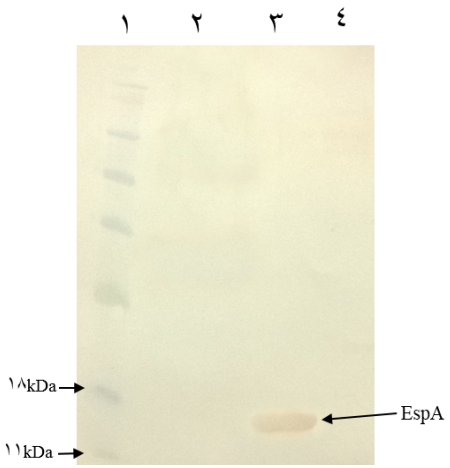
با القای بیان پروتئین تحت کنترل اپرون lac در شرایط انکوباسیون استاندارد، سلول‌های القاء شده و القاء نشده جمع‌آوری و شکسته شدند و پس از افزودن بافر نمونه حاوی ۱۰SDS درصد بر روی ژل SDS-PAGE ۱۴ درصد الکتروفورز شدند. نتایج نشان داد که بیان پروتئین EspA در نمونه القا شده در مقایسه با نمونه القا نشده بسیار مناسب و چشمگیر می‌باشد (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: نتیجه بیان پروتئین EspA بر روی ژل SDS-PAGE ۱۴ درصد. ردیف ۱: نشانگر مولکولی پروتئین. ردیف ۲: نمونه القاء شده توسط IPTG. ردیف ۳: نمونه القاء نشده (کنترل منفی).

آنالیز وسترن بلاتینگ:

در پایان به منظور بررسی صحت پروتئین نوترکیب EspA از آنالیز وسترن بلات استفاده شد. برای این منظور باند رنگ گرفته بر روی کاغذ نیتروسلولز در مقایسه با نمونه القاء نشده و نمونه کنترل آنتی‌بادی (پروتئین BSA) بررسی شد و مشخص گردید که باند رنگی مربوط به پروتئین EspA در جایگاه درست خودش در مقابل باند ۱۸ کیلودالتونی نشانگر مولکولی پروتئین قرار گرفته است (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۴: نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین EspA بر روی کاغذ نیتروسلولز. ردیف ۱: نشانگر مولکولی پروتئین. ردیف ۲: نمونه القاء نشده. ردیف ۳: نمونه القاء شده توسط IPTG. ردیف ۴: پروتئین BSA به عنوان کنترل واکنش ایمنوبلات

بحث

باکتری‌های پاتوژن روده‌ای عوامل خطرناکی هستند و چنانچه تمهیداتی مناسب برای مقابله با آن‌ها در نظر گرفته نشود، می‌توانند عواقب جدی و جبران ناپذیری را در فرد آلوده ایجاد کنند(۱۹-۱۷). با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب می‌توان بخش‌هایی از این عوامل که در بروز بیماری زایی به واسطه آن‌ها نقش اساسی دارند، را کلون و بیان نمود تا به عنوان کاندید واکسن میزان ایمن سازی آن ها علیه آن پاتوژن مورد بررسی قرار گیرند(۲۰). *E. coli* سویه O157:H7 نیز با تولید توکسین منجر به آسیب‌های جدی به دیواره لوله گوارش و در شکل وخیم‌تر آسیب به کلیه افراد مبتلا به آن می‌شود(۲۱). لذا در این مطالعه با بررسی فاکتورهای دخیل در لانه گزینی پاتوژن مذکور مشخص گردید که پروتئین EspA شالوده مجرایی را شکل می‌دهد که منجر به انتقال سایر فاکتورهای بیماری‌زا به سلول میزبان می‌شوند. از جمله فاکتورهای بیماری‌زای دیگر از باکتری *E. coli*O157:H7 که به شکل نوترکیب تولید و به‌عنوان کاندید واکسن بررسی شده‌اند، می‌توان به فاکتور FepA، اینتیمین، زیر واحدهای مختلف توکسین‌های شیگا و Tir اشاره نمود(۲۳،۲۲). به منظور تولید پروتئین EspA به شکل نوترکیب نیاز به طراحی و تهیه کاست ژنی بود. لذا توالی دقیق پروتئین EspA از بانک ژنی اقتباس گردید و پس از برگرداندن توالی آمینو اسیدی به توالی نوکلئوتیدی، طراحی پرایمرهای اختصاصی برای آن انجام شد. پس از تهیه پرایمرها، تکثیر ژن مذکور به کمک تکنیک PCR صورت پذیرفت و در ادامه با انجام واکنش‌های هضم‌آنزیمی بر روی محصول PCR و وکتور، فرآیند الحاق ژن درون وکتور با موفقیت انجام شد.

باکتری *E. coli* یکی از اولین و وسیع‌ترین میزبان‌هایی است که برای تولید پروتئین‌های هترولوگ استفاده می‌شود و دارای مزایای فراوانی از جمله بیان سریع، راندمان بالای محصول و هزینه تولید کم می‌باشد(۲۴). نظر به این که میزبانی که برای بیان نوترکیب پروتئین EspA مد نظر قرار گرفته بود، باکتری *E. coli* BL21(DE3) بود، لذا از وکتور pET28a(+) که با سیستم بیانی میزبان سازگار است استفاده گردید(۲۴). لازم به ذکر است که بیان پروتئین در این دسته از وکتورها تحت کنترل اپرون قوی lac می‌باشد که با به‌کارگیری آنالوگ مصنوعی آلولاکتوز (IPTG) موفق به بیان پروتئین EspA در مقدار بسیار مناسب در قیاس با نمونه القا نشده شدیم. Gu و همکاران نیز از همین سامانه برای همسان سازی و بیان EspA استفاده کردند و نتایج خوبی را به‌دست آوردند(۱۱،۱۰). همسان‌سازی و بیان این پروتئین به صورت الحاق شده با سایر فاکتورهای دخیل در بیماری‌زایی عامل EHEC به شکل موفقیت‌آمیز انجام شده و منجر به شکل‌گیری ساختارهای مناسبی برای بیان پایدار آن شده است(۱۲،۱۱). در پایان به منظور اطمینان از صحت پروتئین بیان شده از واکنش کیفی لکه‌گذاری وسترن با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آنتی ژنی کایمر که EspA جزء زیر واحدهای آن می‌باشد، استفاده گردید و مشخص گردید که آنتی‌بادی مذکور توانست به خوبی و بدون هیچ‌گونه واکنش کراس EspA را شناسایی کند.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه دوره دکترای تخصصی رشته نانوبیوتکنولوژی مصطفی بخشی می‌باشد که هزینه‌های آن توسط دانشگاه امام حسین(ع) تأمین گردیده است. لازم می‌دانم از تمامی اساتید و مسئولین محترم حوزه پژوهش دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را بیان دارم.

References

1. Jafari A, Aslani MM, Bouzari S. Escherichia coli: a brief review of diarrheagenic

pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. Iran J Microbiol 2012; 4(3): 102-117.
2. 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.
3. Bidet P, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, et al. Characterization of Escherichia coli O157: H7 isolates causing haemolyticuraemic syndrome in France. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 1): 71-75.
4. Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, toxigenic Vibrio cholerae, and Salmonella typhimurium by multiplex PCR. Iran J Clin Infect Dis 2009; 4(2): 97-103.
5. Eklund M. Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) Findings from Humans in Finland. Helsinkh Publications of the National Public Health Institute. 2005.
6. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of Echerichia coli pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2010; 8(1): 26-38.
7. Mecsas JJ, Strauss EJ. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence: Type III Secretion and Pathogenicity Islands. Emerg Infect Dis 1996; 2(4): 270-288.
8. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, et al. Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective. Mol Microbiol 2006; 60(5): 1136-1151.
9. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microbiol Rev 2008; 21(1): 134-156.
10. Gu J, Liu Y, Yu S, Wang H, Wang Q, Yi Y, et al. Enterohemorrhagic Escherichia coli trivalent recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. Microbes Infect 2009; 11(10-11): 835-841.
11. Gu J, Ning Y, Wang H, Xiao D, Tang B, Luo P, et al. Vaccination of attenuated EIS-producing Salmonella induces protective immunity against enterohemorrhagic Escherichia coli in mice. Vaccine 2011; 29(43): 7395-7403.
12. Cheng Y, Feng Y, Luo P, Gu J, Yu S, Zhang W, et al. Fusion expression and immunogenicity of EHEC EspA-Stx2A1 protein: implications for the vaccine development. J Microbiol 2009; 47(4): 498-505.
13. Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: Java Script programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. Biotechniques 2000; 28(6): 1102-1104.
14. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res 2003; 31(13): 3688-3691.
15. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laborator manual. 3th ed. NewYork: CSHL Press; 2001.
16. Bollag DM, Rozycki DM, Edelstein SJ. Protein Methods. 2th ed. New York: Wiley-Liss; 1996.
17. Reis RS, Horn F. Enteropathogenic Escherichia coli, Samonella, Shigella and Yersinia: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. Gut Pathog 2010; 2(1): 1-12.
18. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence

and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiol Res 2014; 169(2-3): 205-212.

19. Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. J Microbiol Methods 2012; 90(1): 36-45.
20. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv 2009; 27(3): 297-306.
21. Gyles CL. Shiga toxin-producing Escherichia coli: An overview. J Anim Sci 2007; 85(13supp): 45-62.
22. Larrie-Bagha SM, Rasooli I, Mousavi-Gargari SL, Rasooli Z, Nazarian S. Passive immunization by recombinant ferric enterobactin protein (FepA) from Escherichia coli O157. Iran J Microbiol 2013; 5(2): 113-119.
23. Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG. Advances in the development of enterohemorrhagic Escherichia coli vaccines using murine models of infection. Vaccine 2013; 31(32): 3229-3235.
24. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 1999; 10(5): 411-421.