



The Study of the Stable Expression of IpaB, the Virulence Factor in *Shigella Sonnei*, in Terms of Simultaneous Expression of Chaperone IpgC

Fateme Nasrollahi Boroujeni¹, Ali Asghar Deldar^{2*}

1. MSc in Molecular Biotechnology, Department of Genetic Engineering, Research Centre for Sciences and Biotechnology, Malek-Ashtar Industrial University, Tehran, Iran
2. PhD in Molecular Genetics, Assistant Professor, Department of Genetic Engineering, Research Centre for Sciences and Biotechnology, Malek-Ashtar Industrial University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2018/05/05
Accepted: 2018/10/22
Available online: 2018/11/23

Article Subject:

Microbial Biotechnology

IJMM 2018; 12(4): 260-268

Corresponding author:

Ali Asghar Deldar
PhD in Molecular Genetics,
Assistant Professor, Department
of Genetic Engineering,
Research Centre for Sciences
and Biotechnology, Malek-
Ashtar Industrial University,
Tehran, Iran

Email:

aad.phd.gene@gmail.com

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: The virulence plasmid of the Gram negative pathogen *Shigella* generates many virulence factors within the Ipa-mxi-spa region. *Shigella* spreads via fecal-oral and person-to-person transmission which causes human bloody diarrhea. In Asia alone, it is estimated that there are 125 million infections and 14,000 deaths due to shigellosis annually. IpaB is essential for *Shigella* infection and pathogenicity.

Materials and Methods: Expression plasmid based on the araBAD promoter is designed for tight control of background expression and l-arabinose dependent graded expression of the target proteins. IpgC and IpaB genes were amplified using polymerase chain reaction (PCR) with designed primers. In the next step, the products were then cloned into pBAD/myc-HisB expression vector. The presence of the insert was confirmed by restriction digestion. In order to confirm the chaperone role of IpgC on IpaB protein stability, the 300-bp is removed from the N-terminal portion of IpaB and His6-tagged CPD is fused to the C-terminus of target proteins in the pET28b.

Results: The construction of IpaB gene expression plasmid and expression of IpaB protein was achieved. Also, expression of the gene truncation of IpaB along with the His6 tag sequence in the absence of the IpgC gene in *Escherichia coli* revealed that the role of the IpgC chaperone gene on IpaB expression can be considered as an appropriate strategy for expression of IpaB.

Conclusions: In the present study IpgC and IpaB genes were successfully cloned and expressed under the control of arabinose-dependent promoters to provide IpaB expressing plasmid. The role of the IpgC as a chaperone protein on IpaB expression and stability can be considered as an appropriate strategy for expressing IpaB. The induced vector can be used for future analysis of *Shigella* vaccine development.

Keywords: *Shigella sonnei*, IpaB, IpgC, Recombinant DNA, Chaperone

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Nasrollahi Boroujeni F, Deldar A A. The Study of the Stable Expression of IpaB, The Virulence Factor in *Shigella Sonnei*, In Terms of Simultaneous Expression of Chaperone IpgC. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (4):260-268



بررسی بیان پایدار فاکتور بیماری‌زای شیگلا سونئی، IpaB، در میزبان پروکاریوتی در شرایط بیان همزمان با عامل چپرونی IpgC

فاطمه نصراللهی بروجنی^۱، علی اصغر دلدار^{۲*}

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲. دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، استادیار، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: شیگلا، یک باسیل گرم منفی متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه است و موجب شیگلوزیس می‌شود که نوعی عفونت حاد روده‌ای است. برآورد می‌شود فقط در آسیا، سالانه ۱۲۵ میلیون عفونت و ۱۴۰۰۰ مرگ‌ومیر ناشی از شیگلوز وجود دارد. شیگلا سونئی عامل اصلی اپیدمی در کشورهای در حال توسعه است. IpaB فاکتور بیماری‌زای ضروری و چندمنظوره‌ای در روند عفونت به شمار می‌رود. دستیابی به بیان پروتئین IpaB و انتقال پلاسمید حامل ژن IpaB به باکتری ضعیف‌شده، ساخت واکسن ژنی کارآمد را علیه شیگلوز میسر می‌سازد.

مواد و روش کار: ژن‌های کدکننده IpaB و IpgC از ژنوم سویه شیگلا سونئی به روش PCR جدا شده و با هضم آنزیمی به داخل ناقل pBAD/myc-His B وارد شد. سپس به داخل میزبان‌های کلون‌سازی و بیانی وارد شده و پس از تأیید بیان، آنتی ژنیسیته آن به روش لکه‌گذاری وسترن بررسی شد.

یافته‌ها: ساخت سازواره‌های بیانی حامل ژن IpaB و بیان پروتئین IpaB صورت گرفت. همچنین بیان ژن ترانکیت IpaB در کنار دنباله هیستیدینی در غیاب ژن IpgC در باکتری E. Coli مؤید نقش چپرونی ژن IpgC بر بیان و پایداری IpaB است که می‌تواند استراتژی مناسبی در راستای بیان IpaB تلقی شود.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه تاکنون بیان IpaB در سیستم‌های پروکاریوتی موفقیت‌آمیز نبوده است و در عین حال این پروتئین در رفتار تهاجمی باکتری نقشی محوری دارد؛ با بیان کنترل‌شده IpaB، امکان دستیابی به یک سویه تحت کنترل در مطالعات رفتارشناسی باکتری و نیز کاندید احتمالی برای تحریک سیستم ایمنی فراهم شد.

کلمات کلیدی: شیگلا سونئی، IpaB، IpgC، DNA نوترکیب، چپرون

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۱۵

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۳۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۹/۰۲

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM1397;12(4): 260-268

نویسنده مسئول:

علی اصغر دلدار

دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی،
استادیار، پژوهشکده فناوری زیستی،
دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

پست الکترونیک:

aad.phd.gene@gmail.com

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

اولین هدف باکتری به شمار می‌رود. IpaB یک فاکتور بیماری‌زای چندمنظوره و ضروری در روند عفونت است که در شکل‌گیری ساختار سیستم ترشحی نوع III (T3SS) دخالت دارد (۱،۲). باکتری از طریق سیستم ترشحی نوع III خود و با واسطه IpaB رشته‌های لکتین (CD44) واقع در سطح سلول‌های اپی‌تلیال روده متصل می‌شود. همچنین IpaB در شکل‌گیری منفذ در غشای سلول هدف و از بین بردن فاگوزوم‌ها و القای نکروز یا آپوپتوز سلول‌های ایمنی نقش دارد. باکتری شیگلا از طریق تولید چهار

شیگلا یک باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک و بدون اسپور است. این پاتوژن روده انسان به خانواده آنتروباکتریاسه متعلق است؛ باکتری‌هایی که قسمت‌های تحتانی روده بزرگ را آلوده می‌کنند و موجب اسهال خونی باسیلی و نوعی کولیت التهابی عفونی می‌شوند. شیگلا با توجه به ویژگی‌های جنس و سرولوژی به چهار گونه طبقه‌بندی می‌شود؛ در میان چهار گونه، شیگلا سونئی در کشورهای توسعه‌یافته شایع‌تر است. سلول‌های اپی‌تلیال روده و به‌ویژه سلول‌های میکروفولد (M-cell)

پروتئین به نام‌های IpaA، IpaB، IpaC و IpaD سبب به‌هم‌ریختگی در غشای سیتوپلاسمی می‌شود. IpaB آنتی‌ژنی بالقوه برای توسعه واکسن شیگلا است (۱،۸).

ساختار T3SS که مانند مجموعه‌ای سوزنی‌شکل به نظر می‌رسد، زمانی که سلول میزبان با این باکتری آلوده می‌شود، مانند سیستم انتقالی مهمی برای منتقل کردن فاکتورهای بیماری‌زای شیگلا عمل می‌کند. این مجموعه سوزنی‌شکل متشکل از یک پایه سیتوپلاسمی، ساختار ترانس ممبران و ساختار سوزنی‌شکل توخالی واقع در خارج از سطح سلول باکتریایی است. پروتئین IpaB در رأس ساختار T3SS قرار دارد و می‌تواند سیستم ترشح دیگر پروتئین‌های بیماری‌زا را کنترل کند (۴،۱۰). مطالعات Guichon و همکاران اطلاعاتی درباره ناحیه ضروری IpaB برای بیماری‌زایی، فرار فاگوزومی، اتصال به کاسپاز-۱ و سمیت سلولی ارائه داده است. این بررسی‌ها نشان می‌دهد ناحیه‌ای از دومین آب‌گریز IpaB (اسیدآمینئ ۳۳۰ - ۳۱۰) برای حمله به سلول‌های اپی‌تلیال، فرار فاگوزومی و القای آپوپتوز لازم است (۹،۱۴).

همچنین دو ناحیه با رزجوه‌های ۲۳۶ - ۲۲۷ و ۳۰۶ - ۲۹۷ برای حفظ IpaB در رأس ساختار سوزنی‌شکل T3SS، تنظیم ترشح و شکل‌گیری ساختار طبیعی منافذ لازم است. همچنین طبق تحقیقات صورت‌گرفته نشان می‌دهد، پروتئین IpgC در شکل‌گیری ساختار ثانویه پروتئین IpaB نقش دارد که از طریق سه دومین شامل دومین اتصالی پروتئین IpgC (رزجوه ۷۲-۵۱)، دومین coiled-coil (رزجوه ۱۷۰-۱۱۰ و ۵۸۰-۵۱۴) و دومین helix (رزجوه ۲۸۰-۲۴۰) باعث تاخوردگی و پایداری IpaB در باکتری می‌شود. IpgC در واقع یک چپرون است که با اتصال به دومین اتصال به چپرون (CBD:Chaperone Binding domain) IpaB (۴،۳) موجب پایداری آن شده و با جلوگیری از پیوستن بی‌موقع آن به پروتئین‌های دیگر (IpaC و IpaD) مانع تخریب IpaB در سیتوپلاسم شیگلا می‌شود (۴). همچنین به‌عنوان گیرنده IpgC به اتصال IpaC در رأس ساختار سوزنی‌شکل منجر می‌شود. پس از اتصال، منافذی با مجموعه IpaB و IpaC در غشای سلول میزبان ایجاد می‌شود که از طریق آن دیگر پروتئین‌های بیماری‌زا به داخل سلول هدف منتقل خواهند شد.

مواد و روش‌ها

واکنش PCR

برای تکثیر ناحیه کلاستر ژنی IpgC و IpaB از یک نوع پرایمر پیشرو (F) و یک نوع پرایمر پسرو (R) استفاده می‌شود (شکل ۱). پرایمرهای استفاده‌شده در این پژوهش با نرم‌افزار SnapGene طراحی، و سپس در سرویس تحت وب OligoAnalyzer ارزیابی شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ مشخص شده است. ابتدا واکنش PCR با استفاده از پرایمرها انجام شد و پس از تغییر شرایط واکنش، از جمله تغییر سیکل‌گردان، گرادیان دمای اتصال، غلظت $MgCl_2$ و تغییر کمیت DNA الگوی شرایط بهینه ایجاد شد. شرایط دمایی واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به این صورت تنظیم شد. شرایط PCR برای هر دو ژن به صورت یکسان و ابتدا به صورت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه و سپس ۲۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۳ درجه، ۴ دقیقه در ۷۲ درجه برای ۱۰ چرخه و بلافاصله ۲۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه و ۴ دقیقه در ۷۲ درجه برای ۱۵ چرخه و در نهایت ۴ دقیقه در ۷۲ درجه انجام گرفت. پس از انجام واکنش محصولات PCR روی ژل آگارز برده شد. در بررسی نتیجه، باند ۲۲۷۶ نوکلئوتیدی مربوط به قطعه ژنی به‌رمزدرآورنده IpgC-IpaB

پروتئین به نام‌های IpaA، IpaB، IpaC و IpaD سبب به‌هم‌ریختگی در غشای سیتوپلاسمی می‌شود. IpaB آنتی‌ژنی بالقوه برای توسعه واکسن شیگلا است (۱،۸).

ساختار T3SS که مانند مجموعه‌ای سوزنی‌شکل به نظر می‌رسد، زمانی که سلول میزبان با این باکتری آلوده می‌شود، مانند سیستم انتقالی مهمی برای منتقل کردن فاکتورهای بیماری‌زای شیگلا عمل می‌کند. این مجموعه سوزنی‌شکل متشکل از یک پایه سیتوپلاسمی، ساختار ترانس ممبران و ساختار سوزنی‌شکل توخالی واقع در خارج از سطح سلول باکتریایی است. پروتئین IpaB در رأس ساختار T3SS قرار دارد و می‌تواند سیستم ترشح دیگر پروتئین‌های بیماری‌زا را کنترل کند (۴،۱۰). مطالعات Guichon و همکاران اطلاعاتی درباره ناحیه ضروری IpaB برای بیماری‌زایی، فرار فاگوزومی، اتصال به کاسپاز-۱ و سمیت سلولی ارائه داده است. این بررسی‌ها نشان می‌دهد ناحیه‌ای از دومین آب‌گریز IpaB (اسیدآمینئ ۳۳۰ - ۳۱۰) برای حمله به سلول‌های اپی‌تلیال، فرار فاگوزومی و القای آپوپتوز لازم است (۹،۱۴).

همچنین دو ناحیه با رزجوه‌های ۲۳۶ - ۲۲۷ و ۳۰۶ - ۲۹۷ برای حفظ IpaB در رأس ساختار سوزنی‌شکل T3SS، تنظیم ترشح و شکل‌گیری ساختار طبیعی منافذ لازم است. همچنین طبق تحقیقات صورت‌گرفته نشان می‌دهد، پروتئین IpgC در شکل‌گیری ساختار ثانویه پروتئین IpaB نقش دارد که از طریق سه دومین شامل دومین اتصالی پروتئین IpgC (رزجوه ۷۲-۵۱)، دومین coiled-coil (رزجوه ۱۷۰-۱۱۰ و ۵۸۰-۵۱۴) و دومین helix (رزجوه ۲۸۰-۲۴۰) باعث تاخوردگی و پایداری IpaB در باکتری می‌شود. IpgC در واقع یک چپرون است که با اتصال به دومین اتصال به چپرون (CBD:Chaperone Binding domain) IpaB (۴،۳) موجب پایداری آن شده و با جلوگیری از پیوستن بی‌موقع آن به پروتئین‌های دیگر (IpaC و IpaD) مانع تخریب IpaB در سیتوپلاسم شیگلا می‌شود (۴). همچنین به‌عنوان گیرنده IpgC به اتصال IpaC در رأس ساختار سوزنی‌شکل منجر می‌شود. پس از اتصال، منافذی با مجموعه IpaB و IpaC در غشای سلول میزبان ایجاد می‌شود که از طریق آن دیگر پروتئین‌های بیماری‌زا به داخل سلول هدف منتقل خواهند شد.

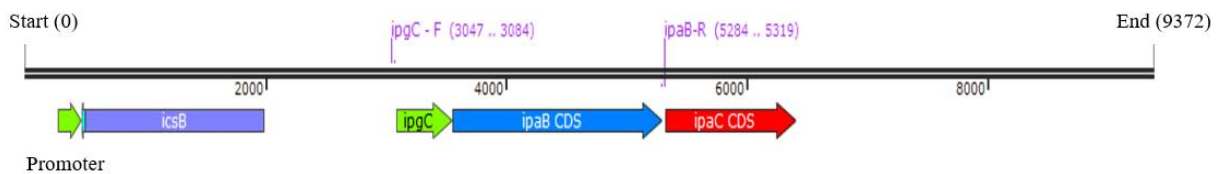
Barta و همکاران ساختار سه‌بعدی کریستال موتیف سیم‌پیچ IpaB (اسیدآمینئ ۲۲۴-۱۰۴) را معرفی کردند که به میزان زیادی با دومین Colicin (Col Ia و Col E3) همسانی ساختاری دارد؛ باکتریوسینی که در برخی سویه‌های *E.coli* تولید می‌شود و در تشکیل منافذ نقش دارد (اسیدآمینئ ۶۱۱-۵۷۹ در

آنزیم‌های NcoI و SacI به ترتیب روی پرایمر F و R، قطعات سنتز شده این دو جایگاه را در دو سوی خود دارند.

مشاهده شد و سپس قطعات ژنی مدنظر از ژل بریده و با کیت استخراج DNA که به صورت دست ساز در آزمایشگاه تهیه شده بود، خالص شد. به دلیل وجود توالی جایگاه، برش اختصاصی

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای قطعه ژنی IpgC-IpaB

نام پرایمر	توالی	طول محصول (جفت باز)
IpgC-F	5'-CTTATACTTACCATGGTAAAGCAGACAAAAAGGAGACC-3'	۲۲۷۶
IpaB-R	5'-CATTCTCCTTATGCTCGAGCTAAGCAGTAGTTTGTTC-3'	



شکل ۱. تصویر شماتیک از اپرون Ipa و نحوه قرارگیری پرایمرها

همسانه سازی و ساخت پلاسمید

محصول PCR به دست آمده (IpgC-IpaB) از مرحله قبل در وکتور pGEM 5zf شرکت Promega (کشور آمریکا) همسانه سازی، و پلاسمید نوترکیب حاصل با عنوان pGCB نامگذاری شد. این پلاسمید به باکتری مستعد شده E. coli سویه DH5- α انتقال یافت، سپس باکتری‌ها روی پلیت آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، IPTG (۱ میکرومولار) و Xgal (۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کشت داده شد. در ادامه کلونی‌های سفید و آبی حامل پلاسمید، جداسازی، و از نظر حضور ژن بررسی شد. برای این منظور تعدادی کلونی سفید و آبی از روی پلیت برداشته شد و به طور جداگانه در محیط کشت LB broth حاوی آمپی سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد. سپس پلاسمید هر نمونه استخراج شد. به دلیل وجود جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده NcoI و SacI روی پرایمر F و R و در نتیجه انتقال این دو جایگاه به توالی قطعات کلون شده، برش آنزیمی پلاسمید با استفاده از این آنزیم‌های محدود الاثر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید و آبی انجام گرفت و نتیجه روی ژل مشاهده و مقایسه شد. در این بررسی کلونی‌های آبی به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده است. در نهایت تعدادی از کلونی‌های مثبت (سفید رنگ) برای تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران فرستاده شد.

پلاسمید بیانی pBAD از سیستم‌هایی است که برای کلون و بیان پروتئین‌های نوترکیب در E.Coli کاربرد دارد و تحت پروموتور araBAD است که برای کنترل شدید بیان پس زمینه و بیان تدریجی پروتئین هدف و با استفاده از الفاگر غیر رسمی آرابینوز طراحی شده است. برای انتقال توالی تأیید شده به وکتور بیانی pBAD ابتدا پلاسمید نوترکیب pGCB و پلاسمید بیانی pBAD/myc-His B، به طور جداگانه با آنزیم‌های محدود کننده NcoI و SacI هضم آنزیمی شد. سپس پلاسمید pBAD/myc-His B برش خورد و توالی ژن‌های IpaC و IpaB حاصل از هضم PgcB با استفاده از ژل آگارز استخراج و خالص سازی شد. در ادامه پس از تعیین غلظت نمونه‌ها، قطعه برش داده شده با استفاده از آنزیم لیگاز به درون پلاسمید pBAD/myc-His B وارد شد. این سازواره بیانی pBaCB نامیده شد و در ادامه به سلول‌های مستعد شده باکتری E. coli سویه DH5- α منتقل شد. برای تأیید فرایند و پس از کشت باکتری‌ها و انتخاب کلونی‌های واجد شرایط، پلاسمید نوترکیب حاصل با روش هضم آنزیمی و به وسیله آنزیم‌های NcoI و SacI برش خورد و قطعه DNA تعیین توالی شد.

بیان ژن‌های IpaB و IpgC

پلاسمید نوترکیب حاصل pBaCB نامیده شد و به سلول‌های مستعد شده باکتری E. coli سویه DH5- α به روش کلسیم کلراید انتقال یافت. انتقال پلاسمید pBAD/myc-HisB به سلول‌های E.Coli به عنوان شاهد منفی به کار رفت. سلول‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت LB agar حاوی ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر

BL21(DE3) با الفاکر IPTG با غلظت ۱ میکرومولار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس صورت گرفت. پس از چهار ساعت، تولید پروتئین ترانکیت IpaB در باکتری با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌امید ارزیابی شد.

یافته‌ها

همسانه‌سازی قطعه ژنی IpaC-IpaB

به منظور تکثیر ژن‌های کدکننده IpaC و IpaB، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به کمک پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. در بررسی نتیجه، باند ۲۲۷۶ نوکلئوتیدی مربوط به قطعه ژنی کدکننده IpaC-IpaB تکثیر شد. پس از هضم پلاسمید pGEM5zf و قطعه ژنی IpaC-IpaB با آنزیم‌های NcoI و EcoRI، محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز برده شد و باندهای مربوط به پلاسمید pGEM5zf و ژن IpaC-IpaB هضم‌شده از روی ژل استخراج شد و ۷ μl از نمونه‌های استخراج‌شده روی ژل آگارز برده شد. باند ۳۰۰۱ bp مربوط به پلاسمید pGEM5zf خطی‌شده و باند ۲۲۷۶ bp مربوط به ژن IpaC-IpaB مشاهده شد (شکل ۲). پس از ورود قطعه ژنی IpaC-IpaB به پلاسمید pGEM5zf، پلاسمید حاصل درون باکتری مستعدشده *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شد و روی محیط کشت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، IPTG (۱ میکرومولار) و Xgal (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد و پس از یک شبانه روز کلنی‌های آبی-سفید حاوی پلاسمید pGCB رشد یافت. رشد کلنی‌های سفید روی آگار حاوی Amp، X-gal و IPTG نشان‌دهنده حضور پلاسمید pGCB است، اما برای تأیید نهایی حضور ژن، پس از استخراج پلاسمید pGCB هضم پلاسمید با آنزیم‌های NcoI و SacI صورت گرفت و قطعه‌ای با اندازه ۲۳۰۷ bp از پلاسمید خارج شد (شکل ۲). باند مربوط به این قطعه به کمک کیت از روی ژل استخراج شد. پس از هضم پلاسمیدهای pBAD/myc-His B و pGCB با آنزیم‌های NcoI و SacI، محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز برده شد و باندهای مربوط به پلاسمید pBAD/myc-His B و قطعه ژنی IpaC-IpaB هضم‌شده از روی ژل استخراج شد و ۷ μl از نمونه‌های استخراج‌شده روی ژل آگارز برده شد. باند ۴۰۸۰ bp مربوط به پلاسمید pBAD/myc-His B خطی‌شده و باند ۲۳۰۷ bp مربوط به قطعه ژنی IpaC-IpaB مشاهده شد. پس از انتقال پلاسمید pBaCB درون باکتری مستعد شده *E. coli* سویه DH5-α، از کلنی‌های به‌دست‌آمده کشت داده شد و پس از استخراج پلاسمید، هضم پلاسمید pBaCB با آنزیم‌های NcoI و SacI صورت گرفت. قطعه‌ای به طول ۲۳۰۷ bp

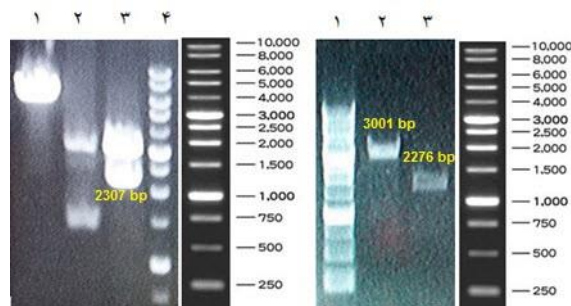
آمپی‌سیلین شرکت Roche (کشور آلمان) و در ۳۷ درجه سلسیوس رشد داده شدند. سپس یکی از کلون‌ها در ۵ میلی‌لیتر محیط LB تلقیح شد. پس از کشت شبانه، ۲۰۰ میکرولیتر از آن به فالکون حاوی ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB تازه و حاوی آمپی‌سیلین انتقال داده شد. همچنین کلون حاوی pBAD/myc-His B فاقد ژن نوترکیب به‌عنوان کنترل منفی کشت داده شد. محیط‌های کشت سلولی تا زمانی که جذب نوری به ۰/۸-۰/۷ در طیف جذبی ۶۰۰ نانومتر برسند، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه شد. سپس جهت بیان بالای پروتئین نوترکیب، بیان ژن با افزودن آرابینوز با غلظت ۰/۲ درصد القا شد. محیط‌های کشت دوباره در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه، و جذب نوری آنها در طیف جذبی ۶۰۰ نانومتر طی فواصل ۱ تا ۴ ساعت اندازه‌گیری شد. در فواصل زمانی صفر، ۳۰ دقیقه پس از القا، یک ساعت پس از القا، چهار ساعت پس از القا و ۱۶ ساعت پس از القا، ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت به‌عنوان نمونه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب‌های میکروبی حاصل در مقادیر محاسبه‌شده از بافر S.B سوسپانسیون شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس حرارت دید. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه روی ژل ۱۲/۵ درصد پلی‌اکریل‌امید الکتروفورز شد.

بیان ژن ترانکیت IpaB

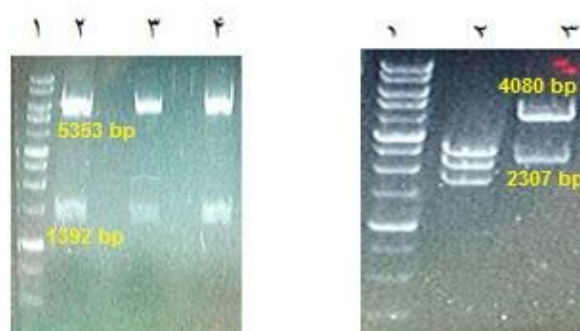
پس از استخراج پلاسمید pET28a و به منظور همسانه‌سازی ژن ترانکیت IpaB در آن، هضم پلاسمید به کمک دو آنزیم EcoRI و XhoI صورت گرفت. قطعه ژنی ترانکیت IpaB نیز با کمک این دو آنزیم از پلاسمید pBaCB استخراج شد. پس از هضم پلاسمیدهای pET28a و pBaCB با آنزیم‌های EcoRI و XhoI، محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز برده شد و باندهای مربوط به پلاسمید pET28a و ژن ترانکیت IpaB هضم‌شده از روی ژل استخراج شد. ۷ μl از نمونه‌های استخراج‌شده و با هدف بررسی فرایند جداسازی و خالص‌سازی روی ژل آگارز برده شد. در ادامه با مجاورت‌دادن قطعه ژنی ترانکیت IpaB و پلاسمید برش‌خورده pET28a در حضور آنزیم لیگاز، سازه بیانی نوترکیب pET28-IpaB_T به دست آمد. پس از انتقال پلاسمید pET28-IpaB_T به باکتری مستعدشده *E. coli* سویه DH5-α، با هدف تأیید حضور ژن ترانکیت IpaB درون پلاسمید pET28a از کلنی‌های به‌دست‌آمده، کشت داده شد و پس از استخراج پلاسمید، هضم pET28-IpaB_T با استفاده از آنزیم‌های EcoRI و XhoI صورت گرفت. القای بیان ژن ترانکیت IpaB در باکتری *E. coli*

DH5- α در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به کمک القاگر Arabinose صورت گرفت. این سویه موتاسیون endA دارد که به صورت غیراختصاصی DNA endonuclease I را غیرفعال می‌کند. این موتاسیون سبب افزایش میزان DNA پلاسمیدی می‌شود و کیفیت آن را بهبود می‌بخشد. در بررسی ژل SDS-PAGE پروتئین IpgC حدوداً به اندازه ۱۶ kDa و پروتئین IpaB با اندازه ۶۳ kDa تولید، و در نتیجه بیان پروتئین IpgC و IpaB آشکارا مشاهده شد (شکل ۴).

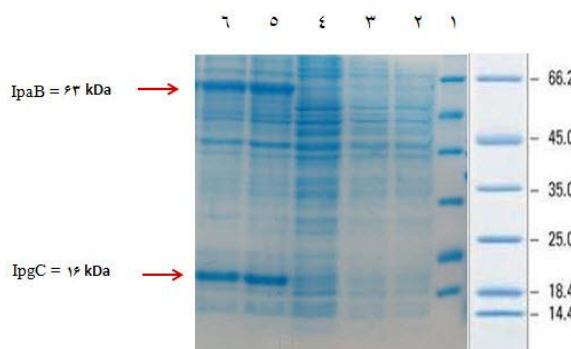
روی ژل آگار قابل مشاهده شد که نشان‌دهنده حضور قطعه ژنی IpgC-IpaB درون پلاسمید pBAD است (شکل ۳). با توجه به اثبات نقش چپرونی پروتئین IpgC در محافظت از پروتئین‌های IpaB در باکتری شیگلا، عملکرد چپرونی آن بر تولید IpaB به صورت بیان همزمان بررسی و مطالعه شد. پلاسمید نو ترکیب pBaCB درون باکتری *E. coli* (DH5- α) انتقال داده شد و روی محیط کشت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. پس از یک شبانه روز کلنی‌های حاوی پلاسمید pBaCB رشد یافتند. بیان پروتئین‌های IpgC و IpaB در باکتری *E. coli* سویه



شکل ۲. استخراج ژن IpgC-IpaB و پلاسمید pGEM5zf هم‌شده از ژل آگار. ۱- ژن IpgC-IpaB. ۲- پلاسمید pGEM5zf. ۳- پلاسمید pGEM5zf. ۴- مارکر وزنی DNA (1kb). ب: پلاسمید pGCB هم‌شده از ژل آگار. ۱- پلاسمید pGCB. ۲- پلاسمید pGEM5zf. ۳- پلاسمید pGEM5zf-IpgC-IpaB هم‌شده با آنزیم‌های NcoI و SacI - مارکر وزنی DNA (1kb)



شکل ۳. الف. تأیید کلونینگ قطعه نهایی pBaCB با هضم آنزیمی ۱- مارکر وزنی DNA (1Kb). ۲- pBaCB هم‌شده با NdeI. ۳- pBaCB هم‌شده با دو آنزیم NcoI و SacI. ب. تأیید کلونینگ قطعه نهایی با هضم آنزیمی pET28-IpaB با دو آنزیم EcoRI و XhoI. ۱- مارکر وزنی DNA (1Kb). ۲، ۳- pET28-IpaB هم‌شده.

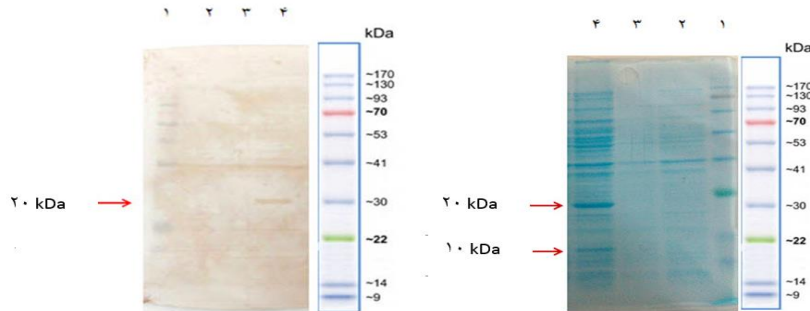


شکل ۴. بیان پروتئین‌های IpgC و IpaB در باکتری *E. coli* سویه DH5- α . ۱- مارکر وزنی پروتئین. ۲- بیان در زمان صفر. ۳- بیان ۳۰ دقیقه پس از القا. ۴- بیان یک ساعت پس از القا. ۵- بیان چهار ساعت پس از القا. ۶- بیان ۱۶ ساعت پس از القا

بررسی بیان ژن ناقص IpaB

با توجه به طراحی اولیه توالی به‌رمزدرآورنده دنباله هیستیدینی در انتهای ژن ترانکیت IpaB قرار گرفت و به منظور تأیید بیان پروتئین ترانکیت IpaB، آزمایش وسترن بلات با

استفاده از آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدینی صورت گرفت و قطعه ناقص باند پروتئینی IpaB با اندازه‌ای حدود ۲۰ kDa مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵. الف. بیان قطعه ۲۰ kDa حاصل از هضم آنزیمی تأییدکننده بیان پروتئین IpaB ترانکیت در پی متصل‌نشدن چپرون پروتئین IpgC در باکتری *E. Coli* BL21(DE3). ۱- مارکر وزنی پروتئین. ۲- کنترل منفی. ۳- بیان در زمان صفر. ۴- بیان چهار ساعت پس از القا. ب. تأیید بیان پروتئین IpaB ترانکیت به کمک وسترن بلات. ۱- مارکر وزنی پروتئین. ۲- کنترل منفی. ۳- بیان در زمان صفر. ۴- بیان چهار ساعت پس از القا.

بحث و نتیجه‌گیری

شیگلا یکی از باکتری‌هایی است که عامل ایجاد اسهال خونی باسیلی در سراسر جهان به شمار می‌رود. با توجه به همه‌گیری و طبیعت بیماری‌زای شیگلا، این باکتری به مشکل جدی سلامت عمومی تبدیل شده است. حضور پلاسمید بیماری‌زا در انسان آلوده، که در آن بسیاری از فاکتورهای بیماری‌زا بیان و رهاسازی شده است، اهمیت دارد. در کار توأمان بسیاری از فاکتورهای بیماری‌زا، شیگلا می‌تواند با موفقیت میزبان را آلوده کند. IpaB یک فاکتور بیماری‌زای چندمنظوره و ضروری برای حمله شیگلا به سلول‌های اپی‌تلیال است. مطالعات پیشین نشان‌دهنده ناموفق بودن بیان IpaB در باکتری *E. coli* است که به نظر می‌رسد به ویژگی‌های ژن و پروتئین بیان‌شده در سیتوپلاسم مرتبط باشد؛ بیان پروتئین IpaB به سبب اثر تمایل کدونی سلول میزبان به صورت کم و حداقل مقداری که فرایند بیماری‌زایی را فراهم کند، تولید می‌شود و همین مقدار کم هم احتمالاً به دلیل تحمل‌نداشتن سلول، لازم است به سرعت از سیتوپلاسم حذف شود که به وسیله پروتئازهای سلولی از بین می‌رود. تصور می‌شود از میان راهکارهای مختلف استفاده‌شده در این پژوهش و برای سنتز پروتئین IpaB، بیان همزمان آن با چپرون IpgC راهکار مناسبی جهت تولید و ماندگاری به منظور مشاهده در مطالعه با ژل آکریل‌امید باشد، که در این پژوهش محقق شد و وکتور بیانی

حاصل می‌تواند با وارد شدن به میزبان نهایی یعنی شیگلا، رفتاری مشابه رفتار بیانی در اشریشیاکلی داشته و بیان تحت کنترل IpaB و در نتیجه رفتار کنترل‌شده بیماری‌زایی با سلول را در پی داشته باشد. یکی از روش‌های بررسی تأثیر بیان ژن‌ها، بیان آنها در سیستم‌های غیرهمسان یا هترولوگ است که می‌تواند روش مؤثری برای تعیین عملکرد ژن‌ها باشد. تجزیه و تحلیل ژنومی نشان داده است گونه‌های شیگلا رابطه تکاملی نزدیکی با اشریشیا کلی دارد. از دیدگاه تکاملی، حتی می‌توان شیگلا را نوعی *E. coli* به حساب آورد. بنابراین نقش چپرونی ژن IpgC بر بیان و پایداری IpaB ابتدا در باکتری *E. coli* به صورت هترولوگ بررسی شد. با دستیابی به بیان پروتئین IpaB، امکان انتقال پلاسمید حامل ژن IpaB به منظور ردیابی اثر بیان بر پاتوژن باکتری نوترکیب ضعیف‌شده *S. sonnei*ΔIpaB که در بانک سلولی دانشگاه صنعتی مالک اشتر وجود دارد، تسهیل شد. با توجه به اینکه پروتئین IpaB نقشی محوری در رفتار تهاجمی باکتری دارد، بیان کنترل‌شده آن برای دستیابی به باکتری کاندید واکسن، راهکار امیدوارکننده‌ای است و بررسی‌های بیشتر می‌تواند دستیابی به یک سوپه تحت کنترل و نیز یک کاندید احتمالی را برای تحریک سیستم ایمنی فراهم کند. بررسی مطالعات دیگر محققان نشان داد، در پژوهش‌های گذشته گزارشی از بیان پروتئین IpaB در سیستم‌های پروکاریوتی ارائه نشده است. ناپایداری پروتئین IpaB به دلیل اثر پروتئازهای

پروتئین و در نتیجه نبود دومین اتصال IpgC روی ژن ترانکیت IpaB و در نهایت تولید پروتئین ۲۰ kDa با تأیید آزمایش وسترن بلات انجام شد.

در این مطالعه ژنهای IpaB و IpgC با استفاده از پروموتور araBAD با موفقیت، کلون و بیان شد. در نهایت با دستیابی به تولید گسترده این پروتئین در شرایط بیان هترولوگ و نیز تعمیم شرایط بیانی اعم از وکتور و پروموتور مناسب به باکتری غیربیماری زای *S. sonnei* ΔIpaB، امکان دستیابی به کاندید احتمالی واکسن شیگلا سونئی برای مطالعات آتی فراهم آمد (۵).

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب شورای آموزشی دانشگاه صنعتی مالک اشتر است. از گروه مهندسی ژنتیک دانشگاه صنعتی مالک اشتر به‌خاطر فراهم‌سازی امکانات و حمایت‌های پژوهشی سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Gorden J, Small PL. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* 1993;61(1):364-7.
- Payne SM, Wyckoff EE, Murphy ER, Oglesby AG, Boulette ML, Davies NM. Iron and pathogenesis of *Shigella*: iron acquisition in the intracellular environment. *Biomaterials.* 2006;19(2):173-80. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-4577-x> PMID:16718602
- Page AL, Fromont-Racine M, Sansonetti P, Legrain P, Parsot C. Characterization of the interaction partners of secreted proteins and chaperones of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol.* 2001;42(4):1133-45. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02715.x> PMID:11737652
- Shen D-K, Saurya S, Wagner C, Nishioka H, Blocker AJ. Domains of the *Shigella flexneri* Type III Secretion System IpaB Protein Involved in Secretion Regulation. *Infection and Immunity.* 2010; 78(12): 4999-5010. <https://doi.org/10.1128/IAI.00470-10> PMID:20937761 PMID:PMC2981331
- Deldar AA, Yakhchali B. The influence of riboflavin and nicotinic acid on *Shigella sonnei* colony conversion. *Iranian journal of microbiology.* 2011 Mar;3(1):13.
- درون سلولی وقوع می‌یابد. بررسی‌ها نشان می‌دهد IpgC چپرونی است که به دومین اتصال به چپرون (CBD) در ریزجو ۷۲-۵۱ می‌چسبد. IpgC مانع از تخریب IpaB در سیتوپلاسم شیگلا می‌شود و از پیوستن نابه‌هنگام آن به دیگر پروتئین‌های دخیل در پاتوژنز جلوگیری کرده و IpaB را پایدار می‌کند (۴). در مقالات سال ۲۰۰۹، از IpgC به‌عنوان چپرونی یاد شده است که با مهار پروتئین‌هایی که می‌توانند سبب تخریب پروتئین‌های تولیدشده در باکتری شوند، موجب افزایش پایداری این پروتئین در سلول می‌شود (۳). در پژوهش بیان همزمان ژن‌های به‌رمزدرآورنده IpaB و IpgC، به منظور بررسی اثر چپرونی پروتئین IpgC بر بیان IpaB در دمای ۳۷ درجه صورت گرفت و بیان هر دو ژن به‌وضوح مشاهده شد.
- توالی به‌رمزدرآورنده IpgC با هدف افزایش پایداری IpaB استفاده شد و همانگونه که انتظار می‌رفت، حضور همزمان IpgC و IpaB در باکتری *E. coli* تحت پروموتور القاپذیر پلاسمید pBaCB بیان IpaB را با وزن مولکولی ۶۳ kDa و IpgC با وزن مولکولی ۱۶ kDa در پی داشت. نقش چپرون پروتئین IpgC در بیان
- Niyogi SK, Vargas M, Vila J. Prevalence of the sat, set and sen genes among diverse serotypes of *Shigella flexneri* strains isolated from patients with acute diarrhoea. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(6):574-6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00897.x> PMID:15191388
- Thompson CN, Duy PT, Baker S. The Rising Dominance of *Shigella sonnei*: An Intercontinental Shift in the Etiology of Bacillary Dysentery. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003708>
- 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):134-56. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-07> PMID:18202440 PMID:PMC2223840
- Guichon A, Hersh D, Smith MR, Zychlinsky A. Structure-function analysis of the *Shigella* virulence factor IpaB. *J Bacteriol.* 2001;183(4):1269-76. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1269-1276.2001> PMID:11157939 PMID:PMC95000
- Blocker A, Komoriya K, Aizawa S. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3027-30.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0535335100>

PMid:12631703 PMCID:PMC152238

11. Roehrich AD, Guillosoou E, Blocker AJ, Martinez-Argudo I. Shigella IpaD has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. *Mol Microbiol.* 2013;87(3):690-706.

<https://doi.org/10.1111/mmi.12124>

PMid:23305090 PMCID:PMC3575693

12. Wong MR, Reddy V, Hanson H, Johnson KM, Tsoi B, Cokes C, et al. Antimicrobial resistance trends of Shigella serotypes in New York City, 2006–2009. *Microbial Drug Resistance.* 2010; 16(2): 155-61.

<https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0130> PMid:20438349

13. Sperandio V, Pacheco AR. Shiga toxin in enterohemorrhagic E. coli: regulation and novel anti-virulence strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2012; 2: 81.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00081>

PMid:22919672 PMCID:PMC3417539

14. Yang F, Yang J, Zhang X, Chen L, Jiang Y, Yan Y, et al. Genome dynamics and diversity of Shigella species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic acids research.* 2005;33(19):6445-58.

<https://doi.org/10.1093/nar/gki954>

PMid:16275786 PMCID:PMC1278947

15. Barta ML, Dickenson NE, Patil M, Keightley A, Wyckoff GJ, Picking WD, Picking WL, Geisbrecht BV. The structures of coiled-coil domains from type III secretion system translocators reveal homology to pore-forming toxins. *Journal of molecular biology.* 2012;417(5):395-405.

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.026>

PMid:22321794 PMCID:PMC3304007