Archive of SID

مقاله پژوهشی

کلون و بیان ژن fliC به‌عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری تیفوئید

زهرا عادلی[۱]، نجمه فراهانی[۲]، سید احمد موسوی[۳]، سیدیعقوب صهری[۴]، حکمت الله مرادی موگرمون[۵]، سیدمحمد غیبی حیات[۶*]

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۶/۰۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سالمونلا انتریکا یک پاتوژن زئونوز است که می‌تواند باعث تب تیفوئید در انسان و حیوان شود. این باکتری یکی از علل مهم عفونت‌های ناشی از مواد غذایی در انسان در سراسر جهان است. از مطالعات اخیر تخمین زده می‌شود که سالانه حدود ۲۲ میلیون مورد ابتلا به این بیماری گزارش می‌شود که از این تعداد ۲۰۰ هزار نفر را به کام مرگ می‌کشاند. فلاژلینی که توسط fliC کد می‌شود نقش مهمی در بیماری‌زایی دارد و می‌تواند به‌عنوان آنتی‌ژنی قوی در واکسن مورداستفاده قرار گیرد. این مطالعه باهدف تولید پروتئین نوترکیب fliC به‌عنوان یکی از کاندیداهای واکسن علیه بیماری سالمونلوز انجام شد.

مواد و روش کار: توالی پروتئین fliC از پایگاه داده NCBI اخذ شد. برای بیان حداکثری، ژن موردنظر با توجه به ترجیح کدونی *E. coli* ساخته شد. ژن سنتتیک از وکتور pUC57 به وکتور بیانی pET28a+ زیرهمسانه‌سازی شد و سپس به میزبان *E. coli* BL21DE3 تراریخت شد. پروتئین نوترکیب با القاء IPTG بیان شد. برای بیان حداکثری، سه پارامتر شامل غلظت IPTG، زمان و دما بهینه‌سازی گردید. پروتئین نوترکیب حاوی His-Tag به‌وسیله ستون کروماتوگرافی تعویض یون Ni-NTA Agarose خالص‌سازی شد. پروتئین خالص‌شده با آزمایش وسترن بلات تائید شد.

یافته‌ها: وکتور نوترکیب با واکنش PCR و نیز آنالیز آنزیم‌های تحدیدی تائید شد. آزمایش SDS-PAGE وجود یک پروتئین ۵۱ کیلو دالتونی با خلوص مناسب را نشان داد. همچنین آزمایش وسترن بلات با آنتی‌بادی His-tag پروتئین مدنظر را تائید نمود.

بحث و نتیجه‌گیری: امروزه استفاده از واکسن‌های نوترکیب بسیار موردتوجه قرار گرفته است. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر ژن یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی باکتری سالمونلا همسانه‌سازی و پروتئین مربوط به آن تولید و تخلیص شده است. این پروتئین می‌تواند به‌عنوان یکی از کاندیداهای مناسب در واکسن‌های نوترکیب علیه تیفوئید مورداستفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: سالمونلا، واکسن نوترکیب، fliC، کلون و بیان

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره هشتم، ص ۶۹۱-۶۸۳، آبان ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه زیست فناوری پزشکی، تلفن: ۰۹۱۶۸۴۵۶۹۰۷

Email: gheibi65@yahoo.com

مقدمه

حصبه یا تب تیفوئید، یک بیماری حاد باکتریال است که در اثر یک باسیل گرم منفی به نام سالمونلاتیفی از خانواده انتروباکتریاسه ایجاد می‌شود. اولین مورد مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا توسط شخصی بنام Gartner در سال ۱۸۸۸ در آلمان گزارش شد(۱). شایع‌ترین علامت بیماری حصبه، تب مداوم است. از دیگر علائم می‌توان به خستگی، ضعف، دل‌درد، سردرد، بی‌اشتهایی و برخی اوقات التهابات پوستی اشاره نمود. این باکتری در اثر خوردن آب آلوده به مدفوع یا ادرار انسان مبتلا وارد بدن می‌شود و چون این میکروب به همین طریق از بدن بیمار خارج می‌شود می‌تواند توسط دست ناقلینی که در تهیه و توزیع میوه‌ها و سایر غذاها دخالت دارند

[۱] دپارتمان میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

[۲] دپارتمان ژنتیک و زیست ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

[۳] دپارتمان بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

[۴] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، بیمارستان نجمیه، تهران، ایران

[۵] مرکز تحقیقات ارتقاء کیفیت آموزش بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

[۶] کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

Archive of SID

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

آب و غذا را آلوده می‌کند. از دیگر منبع دیگر عفونت، خوردن صدف و حلزون آب‌های آلوده است(۲).

بهترین راه تشخیص، کشت خون است. البته کشت مغز استخوان دقیق‌تر است، ولی هم مشکل و هم دردناک است. هم‌چنین از کشت مدفوع و ادرار هم برای تشخیص استفاده می‌شود. برای تشخیص می‌توان از گاواژ ترشحات دئودنوم (دوازدهه) نیز استفاده کرد، ولی متداول‌ترین روش کشت خون است. آزمون ویدال در تشخیص بیماری حصبه در شرایط کنونی ارزش کم‌تری دارد و جایگاه خوبی برای تشخیص ندارد(۳-۴).

تب حصبه یک بیماری مناطق گرمسیری بوده و با بهداشت عمومی و شرایط بهداشتی آب و محیط رابطه مستقیم دارد. تب حصبه بیشتر در آسیا، آسیای مرکزی و جنوب آمریکا شایع است و گاهی مواقع به‌صورت همه‌گیر و در سطح گسترده شیوع پیدا می‌کند(۵). سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است حصبه تاکنون ۲۱ میلیون نفر را در سراسر جهان مبتلا و حدود ۲۰۰ هزار نفر را به کام مرگ کشانده است. سالیانه ۱۷ میلیون نفر به این بیماری دچار شده و ۶۰۰ هزار نفر نیز درنتیجه این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. بسیاری از این بیماران در کشورهای آسیایی زندگی می‌کنند. اگر تب حصبه درمان نشود ممکن است فرد بیمار با سوراخ شدن روده و یا خونریزی شدید از مخاط روده مواجه شود و می‌تواند ۳۰ درصد از افراد مبتلا را نیز بین ببرد(۶،۷).

به‌طورکلی عوامل حدت در سالمونلا را بر اساس کنترل ژنتیک آن‌ها می‌توان به دو گروه عمده تقسیم نمود: عوامل حدت‌زای کروموزومی و پلاسمیدی. دراین‌بین اهمیت فلاژل به‌عنوان عامل مهم حرکت، کموتاکسی و استقرار باکتری در بافت‌ها و همچنین نقش فلاژلین در تحریک مستقیم سیستم ایمنی ذاتی از طریق Toll like receptor حائز اهمیت است(۸-۱۰). پروتئین FliC زیر واحدی از فلاژله سالمونلا است که به میزان زیادی بر سطح این باکتری بیان می‌شود. نقش و ساختار این پروتئین در مطالعات زیادی به‌خوبی به تائید رسیده است(۱۱-۱۴).

تابه‌حال دو نوع واکسن برای این بیماری معرفی‌شده است. واکسن غیرفعال (کشته‌شده) که باید تزریق شود و واکسن زنده ضعیف شده که به‌صورت دهانی مصرف می‌شود. عوارض آلرژیک مصرف این واکسن‌ها از خفیف تا شدید می‌تواند وجود داشته باشد. از واکنش‌های ملایم در مورد واکسن تزریقی حصبه می‌توان به تب (۱ درصد)، سردرد (بیش از ۳ درصد)، قرمزی و تورم در محل تزریق (بیش از ۶۵ درصد) اشاره نمود. همچنین در رابطه با واکنش‌های ناخواسته واکسن دهانی می‌توان تب یا سردرد (۵ درصد)، دل‌درد، حالت تهوع، استفراغ و التهابات پوستی را ذکر نمود. گذشته از این عوارض، عدم ایمنی کامل شخص پس از واکسیناسیون را نیز باید در نظر گرفت و واکسن‌های تهیه‌شده از جسم سلولی باکتری‌های کشته‌شده در القاء پاسخ‌های ایمنی محافظت بخش قابل‌توجه و پایدار چندان موفق نیستند(۱۵-۱۸). ولی ساخت پروتئین‌های نوترکیب کایمر با روش‌های مهندسی ژنتیک همراه با ادجوانت(۱۹) ازیک‌طرف می‌تواند باعث پاسخ بهتر و سیستم ایمنی بشود و از طرف دیگر از عوارض ناخواسته واکسن‌های کشته‌شده که به علت اجزای مختلف پیکره باکتری است پیشگیری کند؛ بنابراین هدف ما در این مطالعه تولید پروتئین نوترکیب FliC به‌عنوان کاندیدای مناسب برای واکسن سالمونلوزیس است.

مواد و روش کار

مواد:

گونه باکتریایی *E. coli Bl21DE3* از شرکت سیناژن ایران خریداری شدند. آنزیم‌های باکتریایی، پرایمرها، مواد شیمیایی و پلاسمیدها، مواد مورداستفاده در SDS-PAGE (Sodium dodecyle sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) و دیگر آنزیم‌ها و مواد مورداستفاده از شرکت Fermentase خریداری شدند. پرایمرهای مورداستفاده در واکنش زنجیری پلیمرازی (Polymerase chain reaction) یا PCR از فناوری کوثر ایران خریداری شدند.

طراحی و بهینه‌سازی ژن FliC:

توالی پروتئینی ژن FliC با عدد دسترسی AY353376 از پایگاه داده‌ی نوکلئوتیدی NCBI در http://www.ncbi.nlm.nih.gov به دست آمد و در فرمت FASTA ذخیره شد. جهت بیان بالا در میزبان E.coli با استفاده از نرم‌افزار بیوانفورماتیک Optimum Gene TM Algorithm بهینه‌سازی صورت گرفت و در انتها نیز عدم حضور جایگاه برش برای آنزیم‌های EcoRI و HindIII (جهت همسانه‌سازی ژن درون وکتور موردنظر) بررسی و جایگاه برشی آنزیم E.coRI و HindIII به دو طرف قطعه طراحی‌شده اضافه شد. توالی نوکلئوتیدی حاصل با استفاده از برنامه Translate موجود در سایت (http://web.expasy.org/translate) ترجمه شد. آنتی‌ژنیسیته پروتئین FliC با استفاده از سرور آنلاین VaxiJen در http://www.darrenflower.info/VaxiJen/ انجام گرفت، این سرور از یک روش مستقل از هم‌ترازی با استفاده از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین به‌پیش بینی می‌پردازد. پس از اتمام مطالعات بیوانفورماتیکی توالی مذکور جهت سنتز به شرکت کانادایی Biomatik تحویل داده شد.

زیرهمسانه‌سازی ژن FliC:

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

ژن سفارش داده‌شده در وکتورpUC57 دریافت شد؛ بنابراین باید این ژن در وکتور بیانی pET28a زیرهمسانه‌سازی می‌شد. بدین منظور واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های E.coRI و HindIII به‌صورت جداگانه بر روی وکتورهای pET28 و pUC57 انجام شد. ژن *FliC* از محصول هضم آنزیمی وکتور pUC57 به‌وسیله کیت استخراج ژل (Fermentase) از ژل تخلیص شد و سپس اتصال بین وکتور pET28a خطی و ژن *FliC* به‌وسیله آنزیم T4 DNA لیگاز و در دمای اتاق انجام گرفت. در ادامه ۵ میکرو لیتر از محصول اتصال برای تاریخت کردن باکتری‌های مستعد *E. coli* BL21DE3 به روش شوک حرارتی استفاده شد. مرحله تاریخت کردن به‌وسیله شوک حرارتی به‌این‌ترتیب بود: قرار دادن باکتری مستعد شده بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه، انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل این باکتری، قرار دادن باکتری *E. coli* BL21DE3 حاوی وکتور بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه، شوک حرارتی در ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه، اضافه کردن محیط کشت LB مایع به ویال حاوی باکتری به میزان 100ul، شیکر کردن به مدت یک ساعت، سپس کشت دادن باکتری نوترکیب بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، انکوبه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول شب. درنهایت تعداد ۵ عدد از کلونی‌ها انتخاب شدند و با استفاده از روش لیز قلیایی، پلاسمید این کلونی‌ها جهت تأیید زیرهمسانه‌سازی استخراج شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمر طراحی‌شده و آنزیمTaq DNA Polymerase صورت گرفت و سپس محصول PCR روی ژل آگارز 1 درصد الکتروفورز شد. واکنش هضم آنزیمی نیز به‌صورت جداگانه بر روی پلاسمید استخراج‌شده و با استفاده از آنزیم‌های E.coRI و HindIII نیز انجام شد.

بیان پروتئین:

از کلنی حاوی پلاسمید در محیط ناترینت براث حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط لوریا برتانی براث اضافه و بر روی انکوباتور شیکردار و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده تا به OD ۰،۵ در طول‌موج 600 نانومتر رسید. سپس ۵۰ میکرو لیتر IPTG را به محیط کشت اضافه کرده و تا ۶ ساعت OD آن مورد محاسبه قرار گرفت. پس از القاء با شرایط فوق‌الذکر، سلول‌ها رسوب داده شد. پس از شکستن سلول‌ها با سونیکاسیون و رسوب اجزای سلولی، محلول رویی که حاوی پروتئین موردنظر بود، جدا گردید.

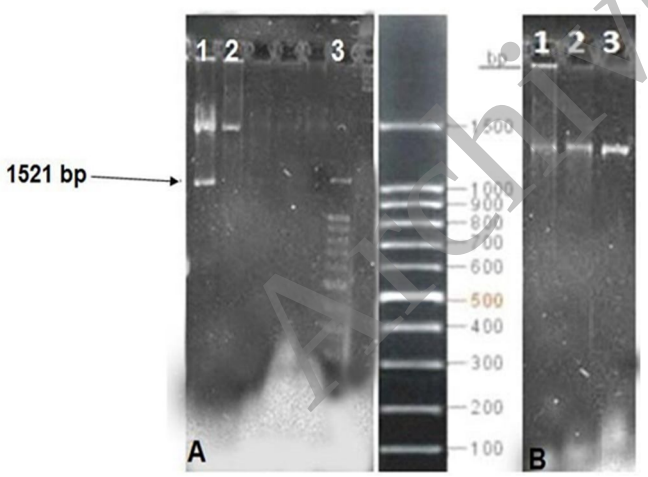
تخلیص پروتئین:

برای جداسازی پروتئین موردنظر که دارای دنباله His-tag است از ستون کروماتوگرافی نیکل (Ni-NTA) استفاده شد. در این مرحله از شیب غلظت ایمیدازول (به ترتیب از غلظت‌های ۵۰-۱۰۰-۲۵۰ میلی‌مولار) در pH=8 برای خالص‌سازی پروتئین FliC استفاده گردید. در ادامه پروتئین خالص‌شده با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

زیرهمسانه‌سازی ژن FliC از وکتور pUC57 به وکتور pET28a:

برای زیرهمسانه‌سازی ژن سنتتیک FliC از وکتور pUC57 به وکتور بیانی pET28a ابتدا می‌بایست ژن موردنظر را از وکتور pUC57 جدا و سپس وارد وکتور pET28 گردد. بدین منظور وکتور pUC57 حاوی ژن *FliC* و پلاسمید pET28a در دو میکروتیوپ جداگانه با دو آنزیم HindIII و E.coRI مورد هضم قرارگرفته و سپس هرکدام بر روی ژل آگاروز 1 درصد، الکتروفورز شدند. همان‌طور که در شکل ۱ قسمت A۱ مشاهده می‌شود ژن *FliC* براثر هضم آنزیمی از وکتورpUC57 خارج‌شده و در جایگاه صحیح نسبت به نشانه اندازه مولکولی DNA قرارگرفته. در قسمت B پلاسمید PET-28a برش خورده و به‌صورت تک باند درآمده که نشان از کامل بودن واکنش هضم هست.

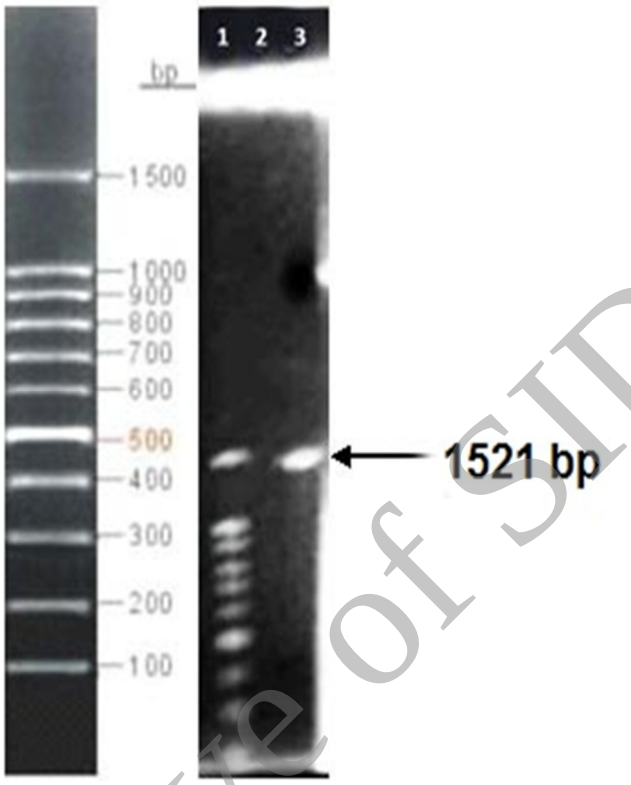


شکل (۱): A) هضم آنزیمی پلاسمید pUC57 ردیف ۱: پلاسمید pUC57 برش خورده که ژن *FliC* از آن خارج‌شده است. ردیف 3 نشانگر اندازه مولکولی B) وکتور pET28a برش خورده که به‌صورت خطی درآمده است. ردیف ۱، ۲ و ۳: وکتور برش خورده که خطی شده است.

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

پلاسمیدهای برش خورده pUC57 روی ژل آگاروز ۱ درصد با دمای ذوب پائین الکتروفورز شدند. سپس ژن *FliC* از روی ژل بریده‌شده و با استفاده از کیت تخلیص شد. همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود. کیفیت تخلیص جهت واکنش الحاق مناسب بود.



شکل (۲): وکتور pUC57 برش خورده، ردیف ۱: نشانگر اندازه مولکولی، ردیف ۳: قطعه‌ی FliC خارج‌شده

واکنش اتصال ژن *FliC* و پلاسمید pEt28 به‌وسیله آنزیم T4 DNA ligase انجام گردید و فرآورده واکنش الحاق، با روش شوک حرارتی در سلول‌های مستعد اشریشیا کلی سویه BL21DE3 تراریخت گردید و روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد (شکل ۳).

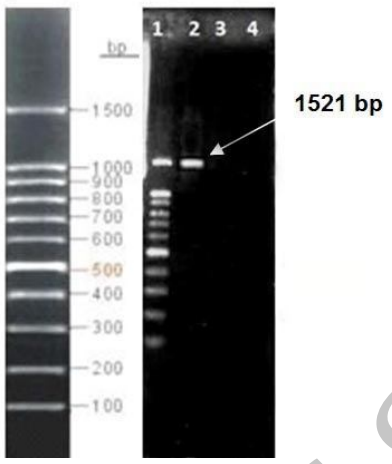
شکل (۳): کلونی‌های نوترکیب *E. coli* BL21DE3 رشد یافته بر روی پلیتLB آگار

www.SID.ir
www.SID.ir

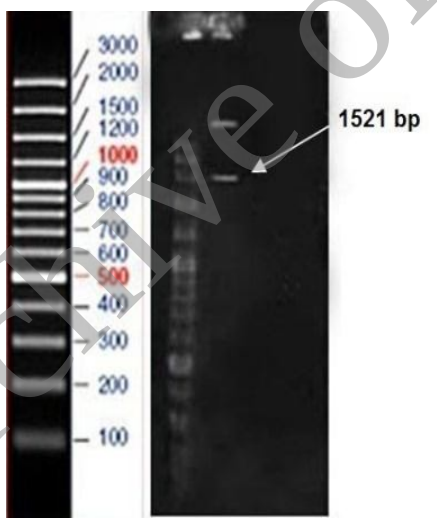
Archive of SID

بررسی صحت زیرهمسانه‌سازی:

به‌منظور صحت همسانه‌سازی، از واکنش PCR و هضم آنزیمی استفاده گردید. الکتروفورز محصولات واکنش PCR واکنش نشان داد که ژن *FliC* با اندازه ۱۵۲۱ bp به‌درستی در محل پیش‌بینی‌شده در ژل الکتروفورز قرارگرفته (شکل ۴). واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های E.coRI و HindIII نیز تائید کننده محل قرارگیری ژن *FliC* در وکتور pET28a است (شکل ۵).



شکل (۴): آنالیز کلون‌ها به روش PCR، ردیف ۱(نشانگر اندازه مولکولی. ردیف ۲) ژن (1521 باز) *FliC*. ردیف ۳ و ۴ کنترل منفی واکنش



PCR

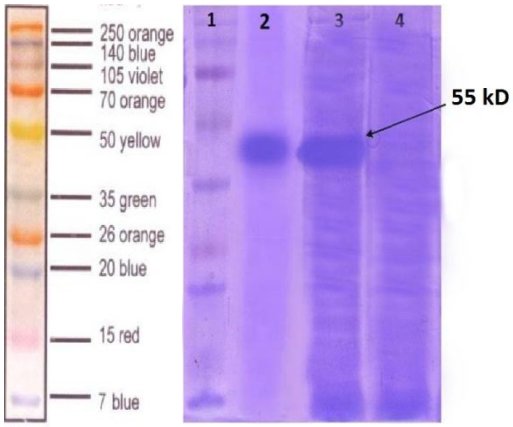
شکل (۵): هضم آنزیمی پلاسمید کلون موردنظر با آنزیم‌های EcoRI و HindIII

بیان پروتئین FliC:

القاء سویه‌ها به‌منظور تولید پروتئین FliC انجام شد و نمونه‌های القاء شده در مقایسه با نمونه‌های کنترل بیان‌کننده یک پروتئین ۵۵ کیلودالتونی بود (با در نظر گرفتن پروتئین فیوژن ۲ کیلودالتونی pEt28). بعد از تغییر پارامترهای مختلف مانند دمای القا، زمان انکوباسیون و نیز غلظت IPTG غلظت پروتئین بیان‌شده در نمونه‌های القاشده به‌شدت افزایش یافت (شکل ۶).

www.SID.ir
www.SID.ir

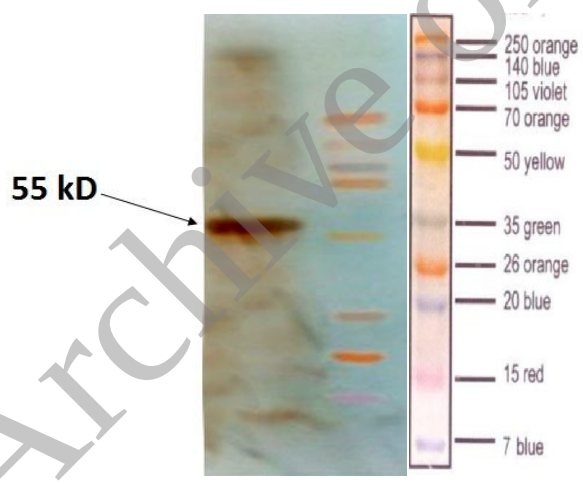
Archive of SID



شکل (۶): بررسی بیان ژن FliC ردیف ۱: نشانگر پروتئینی Fermentas ردیف ۲: پروتئین تخلیص شده با ستون نیکل (Ni-NTA) ردیف ۳: کلون‌های القاء شده با IPTG ردیف (۵۵ کیلو دالتون) ۴: کلون القا نشده با IPTG

تخلیص و تائید پروتئین FliC:

تخلیص پروتئین نوترکیب در شرایط دناتوره و بر روی ستون نیکل انجام شد. پروتئین تخلیص شده بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده می‌شود (شکل ۷). برای اطمینان از صحت پروتئین‌های نوترکیب تولیدشده، از روش وسترن بلات استفاده شد. برای انجام وسترن بلات پروتئین نوترکیب خالص‌شده، الکتروفورز گردید و سپس به کاغذ نیترو سلولز منتقل شد. با انجام وسترن بلات مشخص شد که آنتی HisTag به‌طور اختصاصی با HisTag پروتئین نوترکیب واکنش می‌دهد.



شکل (۷): تائید پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلات با استفاده از آنتی his tag(۵۵ کیلو دالتون)

بحث و نتیجه گیری

سالمونلا تیفی باسیل گرم منفی درون‌سلولی اختیاری است که در جنس سالمونلا و خانواده انتروباکتریاسه قرار دارد. سالمونلوزیس از بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است و افزایش شیوع آن به‌ویژه در دو دهه اخیر اهمیت تحقیقات بر روی این بیماری را دوچندان می‌نماید(۲۰). واکسن‌های تهیه‌شده از جسم سلولی باکتری‌های کشته‌شده در القاء پاسخ‌های ایمنی محافظت بخش قابل‌توجه و پایدار چندان موفق نیستند و همچنین دارای عوارض بسیاری هستند. ساخت پروتئین‌های نوترکیب کایمر با روش‌های مهندسی ژنتیک همراه با ادجوانت ازیک‌طرف می‌تواند باعث پاسخ بهتر و سیستم ایمنی بشود و از طرف دیگر از عوارض ناخواسته واکسن‌های کشته‌شده که به علت اجزای مختلف پیکره باکتری است پیشگیری کند(۲۱-۲۲). در این مطالعه ژن بیان‌کننده پروتئین FliC در وکتور pET28a زیرهمسانه‌سازی و به میزبان E.coli BL21DE3 تراریخت شد تولید و در انتها بیان پروتئین نوترکیب القا و با ستون نیکل تخلیص گردید.

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات انجام‌شده بر روی مدل‌های حیوانی مانند جوجه، نشان داد که پروتئین FliC به‌خوبی می‌تواند پاسخ هومورال قوی تولید کند و علیه عفونت ایجادشده توسط سالمونلا اینتریدیس محافظت ایجاد نماید (۱۳، ۱۶، ۲۳). در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۲ توسط Chaturvedi و همکاران انجام گرفت از پروتئین‌های پرده بیرونی (پورین) سالمونلا دابلین برای بررسی ایمنی‌زایی آن‌ها در خرگوش استفاده کردند (۲۴). همچنین Kostromitinov و همکاران واکسن حاوی پیکره کشته‌شده باکتری سالمونلاتیفی موریوم، انتریتیدیس و کلراسویس را به‌صورت داخل عضلانی به موش، خرگوش و کبوتر تزریق نمودند و ایمنی‌زایی این واکسن پلی والآن غیرفعال را مورد ارزیابی قرار دادند(۲۵). واکسن‌های کشته تزریقی هرچند ممکن است ایمنی مخاطی را در روده تحریک نمایند اما با تحریک ایمنی هومورال می‌توان از بروز باکتریمی و سپتی سمی که اغلب کشنده است پیشگیری نمود(۲۶).

با توجه به اینکه پروتئین FliC یکی از مهم‌ترین عوامل ویرولانس بیماری تیفوئید بوده و دارای خواص ایمونوژنیسیتی بالایی است می‌تواند به‌عنوان یکی از کاندیداهای مناسب در واکسن‌های نوترکیب علیه تیفوئید مورداستفاده قرار گیرد؛ بنابراین استفاده از آن در مراکز پژوهشی مانند انستیتو پاستور ایران و انستیتو رازی به‌منظور تهیه واکسن انسانی علیه سالمونلا پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر رحیم نصرتی بابت نظرات ارزشمند ایشان قدردانی می‌نماییم.

References:

1. Humphrey T. Public-health aspects of Salmonella infection. Salmonella in domestic animals; 2000. P.245–63.
2. Feldman R. Bacterial enteric diseases. Guidelines for Analysis of Communicable Disease Control Planning in Developing [Internet]. 2009 [cited 2016 Nov 8]. Available from: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNAAH127.pdf
3. Miller SI, Hohmann E, Pegues D. Salmonella (including Salmonella typhi). Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995.
4. Dhawan A, Marwaha RK. Acute glomerulonephritis in multi-drug resistant Salmonella typhi infection. Indian Pediatr 1992;29(8):1039–41.
5. Van Oye E. The world problem of salmonellosis. Springer Science & Business Media; 2013.
6. Hollinger K. Epidemiology and salmonellosis. Salmonella in Domestic Animals; 2000.P. 341-54.
7. Böhme G, Kühn H, Tschäpe H, Rabsch W. Epidemiology of salmonellosis. Z Gesamte Hyg 1989;35(11):638–40..
8. Gulig PA, Curtiss R. Plasmid-associated virulence of Salmonella typhimurium. Infect Immun 1987;55(12): 2891-901.
9. Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. Int J Med Microbiol 2002;291(8): 605-14.
10. Milan C, Timm C. Virulence factors associated with biofilm formation by Salmonella enterica: mini-review. Sci Animal Health 2015;3(1): 94-102.
11. Boyd S. Design and Production of a Recombinant FliC-Antigen Co-Expression Platform for Increased Vaccine Efficacy. 2014 [cited 2016 Nov 8]; Available from: http://scholarworks.gsu.edu/biology_diss/142/
12. Hayat SMG, Mogarmon HAM, Elyasifar B, Yazdansetad S. Designing and in silico analysis of a chimeric protein containing fimh and flic as a candidate vaccine against uropathogenic E. COLI (UPEC). Iran Public Health 2014;43(2): 260.
13. Okamura M, Matsumoto W, Seike F, Tanaka Y, Teratani C, Tozuka M, et al. Efficacy of soluble recombinant FliC protein from Salmonella enterica serovar enteritidis as a potential vaccine candidate against homologous challenge in chickens. Avian diseases 2012;56(2): 354-8.

Archive of SID
www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

14. Hayat SMG, Mogarmon HAM, Elyasifar B, Yazdansetad S, Azimi T. Three dimentional structure prediction of chimeric protein comprising Fimh and Flic. Iran Public Health 2014;43(2): 261.
15. Holmgren J, Svennerholm AM. Bacterial enteric infections and vaccine development. Gastroenterol Clin North Am 1992;21(2):283–302.
16. Kajikawa A, Igimi S. Development of recombinant vaccines in lactobacilli for elimination of salmonella. Bioscience and microflora 2011;30(4): 93.
17. Black RE, Levine MM, Clements ML, Losonsky G, Herrington D, Berman S, et al. Prevention of shigellosis by a Salmonella typhi-Shigella sonnei bivalent vaccine. J Infectious Diseases 1987;155(6): 1260-5.
18. Desin TS, Köster W, Potter AA. Salmonella vaccines in poultry: past, present and future. Expert Rev Vaccines 2013;12(1): 87-96.
19. Gheibi hayat SM, Sadeghinia A, Nazarian S, Adeli Z. Mechanisms and Performances of Adjuvants in Vaccine Immunogenicity. J Appl Biotechnol Reports 2015;2(3): 257-64.
20. Tauxe RV. Salmonella: a postmodern pathogen. J Food Protection 1991;54(7): 563-8.
21. Anwar E, Goldberg E, Fraser A, Acosta CJ, Paul M, Leibovici L. Vaccines for preventing typhoid fever. Cochrane Database Syst Rev 2014;(1):CD001261.
22. Date KA, Bentsi-Enchill A, Marks F, Fox K. Typhoid fever vaccination strategies. Vaccine 2015;33: C55-C61.
23. Kajikawa A, Satoh E, Leer RJ, Yamamoto S, Igimi S. Intragastric immunization with recombinant Lactobacillus casei expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against Salmonella enterica serovar Enteritidis. Vaccine 2007;25(18): 3599-605.
24. Rai T, Chaturvedi G, Kaura Y, Minakshi T. Immune responses of mice and cow-calves immunized with sonicated preparation of Salmonella dublin. Vaccine 1992;10(4): 279-80.
25. Kostromitinov N, Domskii, IA, Boyarintsev, L.E. polyvalent, inactivated, aluminium hydroxide vaccine against salmonella in farm animals. vet 1989;71: 66-72.
26. Mastroeni P, Chabalgoity J, Dunstan S, Maskell D, Dougan G. Salmonella: immune responses and vaccines. Veterinary J 2001;161(2): 132-64.

Archive of SID

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

COLONING AND EXPRESSION OF *FLIC* AS A VACCINE CANDIDATE AGAINST TYPHOID

Zahra Adeli [1], Najmeh Farahani[2], Seyed Ahmad Mosavi[3], Seyed Yaghoob Sehri[4], Hekmat allah Moradi Mogarmoon[5], Seyed Mohammad Gheibi Hayat[6]*

Received: 10 Jun, 2016; Accepted: 23 Aug, 2016

Abstract

Background & Aims: *Salmonella enterica* is a zoonotic pathogen causing typhoid fever in humans and animals. It is an important cause of food borne infections in humans throughout the world. A recent study estimated approximately 22 million cases of typhoid each year with at least 200,000 deaths. FliC encoding flagellin plays a role in pathogenesis and is an important antigen in vaccination. In this study, recombinant protein fliC as a candidate vaccine against salmonellosis was produced and purified.

Materials & Methods: The protein sequence of fliC was obtained from NCBI database. For high level expression of protein, the gene was synthesized with codon bias of *E. coli*.; synthetic gene in pUC57 was sub coloned into pET32 expression vector and then transferred into *E. coli* BL21DE3. The recombinant protein was express by IPTG induction. For high expression, three parameters including IPTG concentration, time and temperature of induction were optimized. The recombinant protein was purified by ion exchange chromatography with His-Tag. The purified protein was confirmed by western blotting.

Results: Recombinant vector was approved by PCR and restriction analysis. SDS-PAGE showed a 51 kDa protein with proper purity and western blotting with his-tag antibody confirmed the intend protein.

***Conclusion*:** The use of recombinant vaccines is highly regarded, since one of the major virulence factors of Salmonella gene was cloned and the protein was produced and purified in this study. This protein can be used in candidate vaccine against typhoid.

Keywords: Salmonella, Recombinant Vaccine, fliC, Cloning and expression

Address: Student Research Committee, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Tel: 09168456907
Email: gheibi65@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(8): 691 ISSN: 1027-3727

Archive of SID

[1] *Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran*
[2] *Department of Genetics and Molecular Biology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran*
[3] *Assistant Professor, Department of Health and Community Medicine, Faculty of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran*
[4] *Faculty of Medicine, Najmiyeh Hospital, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[5] *Education Development Center, School of Medicine, Medical University of Shiraz, Shiraz, Iran*
[6] *Student Research Committee, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran (Corresponding Author)*

www.SID.ir
www.SID.ir