کلون، بیان، تخلیص و بررسی آنتی‌ژنیسیته نواحی آنتی‌ژنیک پروتئین MOMP کلامیدیا تراکوماتیس

سجاد مالمیر [۱](M.Sc)، احسان رئوفی [۲](M.Sc)، حمید ابطحی [۳*](Ph.D)

۱- گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

چکیده

هدف: کلامیدیا تراکوماتیس انگل داخل سلولی اجباری، گرم منفی و یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های جنسی می‌باشد. پروتئین MOMP بیش از ۶۰٪ پروتئین‌های خارج غشایی را شامل می‌باشد که نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین برای شناسایی باکتری کلامیدیا تراکوماتیس می‌باشد. هدف از مطالعه، تولید پروتئین نوترکیب متشکل از نواحی آنتی‌ژنیک پروتئین MOMP از ژن omp1 و بررسی آنتی‌ژنیسیته آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، قطعه‌های دارای بالاترین خاصیت آنتی‌ژنیک ژن omp1 به طول bp674 بر اساس برنامه‌های بیوانفورماتیکی به دست آمد و با لینکر انعطاف‌پذیر به هم متصل شدند. سپس در ناقل پلاسمیدی pET32a کلون و بیان شد پس از خالص‌سازی پروتئین نوترکیب، آنتی‌ژنیسیته آن با استفاده از وسترن‌بلات با سرم افراد آلوده به کلامیدیا بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به دست آمده، در تمام نمونه‌های سرمی بیماران مبتلا به عفونت‌های کلامیدیایی، باندهای مربوط به واکنش آنتی‌ژن با آنتی‌بادی در کاغذ نیتروسلولز مشاهده می‌شود. در عین حال هیچ باندی مبنی بر واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در نمونه‌های سرم افراد سالم مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: داده‌ها نشان می‌دهد که ناحیه آنتی‌ژنیک پروتئین MOMP در اشریشیاکلی بیان می‌شود. این پروتئین توسط سرم افراد مبتلا به عفونت کلامیدیا تراکوماتیس شناسایی می‌شود. بنابراین پروتئین نوترکیب دارای اپیتپ‌های مشابهی با پروتئین طبیعی است.

واژه‌های کلیدی: کلامیدیا تراکوماتیس ، پروتئین غشاء خارجی ۱، پروتئین‌های نوترکیب

مقدمه

کلامیدیا تراکوماتیس انگل داخل سلولی اجباری، گرم منفی و میله‌ای شکل می‌باشد [۱]. کلامیدیا تراکوماتیس بر اساس پروتئین غشای خارجی (MOMP) که اختصاصی گونه می‌باشد، به سرووارهای مختلفی تقسیم می‌شود. این باکتری از رایج‌ترین باکتری‌های منتقله از راه جنسی می‌باشد. از جمله بیماری‌هایی که توسط کلامیدیا تراکوماتیس ایجاد می‌شود می توان به تراخم، عفونت‌های چشمی، التهاب ملتحمه انکلزیونی در بزرگسالان و نوزادان و عفونت‌های ادراری و تناسلی (اندومتریت وسالپنژیت) اشاره کرد [۲]. از آن‌جایی که بیش از ۵۰٪ مردان و ۸۰٪ زنان بدون علایم هستند، درصدهای بالایی از عفونت‌های بدون علامت باعث شیوع بالای ناقلین در جامعه می‌گردد، که ناآگاهانه این عامل بیماری‌زا را انتقال داده و اگر بدون تشخیص و درمان بمانند، موجب ایجاد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۴۱۷۳۵۰۲-۰۸۶

Email: abtahi@arakmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۹

عفونت‌های مزمن مانند ناباروری می‌شوند [۴،۳]. در ایالات متحده آمریکا سالیانه ۴ میلیون نفر به عفونت‌های کلامیدیایی مبتلا می‌شوند [۴]. شیوع کلامیدیا در ایران طی مطالعه‌ی انجام شده در سال ۲۰۱۰، شایع‌ترین ژنوتیپ‌ها (E,F&G) با شیوع حدود ۶۸٪ گزارش شده‌اند [۵]. عفونت کلامیدیایی بستری مناسب جهت تسهیل انتقال عفونت ویروس نقص ایمنی (HIV) و هم‌چنین کوفاکتور نئوپلازی القایی گردن رحم با پاپیلوما ویروس می‌شود [۶]. بهترین راه جهت ریشه‌کن کردن عفونت کلامیدیایی، ایجاد ایمنی کامل از طریق تهیه یک واکسن می‌باشد. واکسیناسیون بیش از هر مداخله‌ی بیومدیکال دیگری در کنترل اپیدمی عفونت کلامیدیایی مؤثر می‌باشد [۷].

دستیابی به واکسن‌های جدید نیازمند بررسی شاخص‌های آنتی‌ژنیک است [۸]. اطلاع از نوع پاسخ ایمنی مؤثر در حفاظت علیه باکتری، شناسایی آنتی‌ژن‌های مناسب باکتری در تحریک ایمنی و پاسخ ایمنی ناشی از آن‌ها از جمله نکات اصلی در راستای دستیابی به واکسن‌های کارآمد به شمار می‌آید [۹]. مطالعات بسیاری جهت تولید کیت‌های تشخیصی و واکسنی با ایمنی کامل علیه این باکتری صورت گرفته که در اکثر این مطالعات از ژن OMP1 استفاده شده است که این ژن مسئول ساخت پروتئین MOMP می‌باشد. ولی در مطالعات گذشته از کل این ژن جهت ساخت پروتئین استفاده کرده‌اند. کل توالی ژن مربوط به یک پروتئین که شامل اپی‌توپ‌های غیر ضروری نیز می‌باشد کار با آن را مشکل می‌کند که این امر به دلیل زیاد بودن وزن مولکولی پروتئین و بلند بودن ژن آن است که منجر دشوارتر انجام گرفتن مراحل کلون، بیان و تخلیص پروتئین می‌شود [۱۱،۱۰]. استفاده از برخی اپی‌توپ‌های یک پروتئین به جای کل آن می‌تواند باعث افزایش حساسیت و اختصاصیت پاسخ‌های سیستم ایمنی به اپی‌توپ‌های خاص یک عامل بیماری‌زا می‌گردد [۱۲]. لذا هدف از مطالعه حاضر، تولید پروتئین نوترکیبی می‌باشد که حاصل اتصال چهار قطعه از ژن که مسئول ساخت نواحی آنتی‌ژنیک پروتئین MOMP می‌باشند، تخلیص پروتئین نوترکیب حاصل و بررسی آنتی‌ژنیسیته آن با سرم افراد مبتلا به عفونت‌های کلامیدیایی به عنوان کاندید مناسبی برای طراحی کیت‌های تشخیصی و طراحی واکسن علیه کلامیدیا تراکوماتیس است. که قبلاً در هیچ مطالعه‌ای این کار صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها

تعیین ناحیه آنتی‌ژنیک و سنتز توالی نهایی حاوی نواحی آنتی‌ژنیک. توالی نوکلئوتیدی چهار ناحیه آنتی‌ژنیک ژن omp1با برنامه‌های بیوانفورماتیکی مختلفی شناسایی شد و این توالی‌ها به وسیله لینکرهای انعطاف‌پذیر (ttggctgaggctgctgctaaggaggctgctgctaaggct) به هم متصل شدند. که هدف از قرار دادن این لینکرها ایجاد فاصله بین اپی‌توپ‌ها در جهت ایجاد شکل فضایی اصلی آن‌ها بود که منجر به حفظ ساختار اصلی نقاط آنتی‌ژنیک می‌شود هم‌چنین این امکان را به وجود می‌آورد که پروتئین نوترکیب تولید شده توانایی تحریک لنفوسیت‌های B را به طور بالاتری داشته باشد.

پیش‌بینی مناطق آنتی‌ژنیک با نرم‌افزار IEDB با پنج متد مختلف انجام گرفت.

روش اول: Emini Surface Accessibility Prediction می‌باشد که در سطح بودن اپی‌توپ‌ها را نشان می‌دهد.

روش دوم: Kolaskar and Tongaonkar Antigenicity می‌باشد که میزان آنتی‌ژنیسیته اپی‌توپ‌ها را بررسی می‌کند.

روش سوم: Chou and Fasman beta turn prediction می‌باشد که Betaternهایی که خاصیت آنتی‌ژنیک دارند را شناسایی می‌کند.

روش چهارم: Karplus and Schulz flexibility scale اپی‌توپ‌هایی که انعطاف‌پذیری بالایی دارند را شناسایی می‌کند.

روش پنجم: Ellipro –Epitope prediction based upon structural protrusion است که اپی‌توپ‌های فضایی موجود را پیش‌بینی می‌کند.

نرم‌افزار بعدی که برای تعیین مناطق آنتی‌ژنیک استفاده شد نرم‌افزار IgPred می‌باشد که این نرم‌افزار اپی‌توپ‌هایی که توسط آنتی‌بادی‌های IgG, IgE, IgA شناسایی می‌شود را نشان می‌دهد [۱۴،۱۳].

پس از تعیین نهایی نواحی آنتی‌ژنیک ژن omp1 و قرار دادن لینکر انعطاف‌پذیر بین آن‌ها، توالی مورد نظر توسط شرکت بیوماتیک کانادا ساخته شد و قطعه‌ی ژنی در وکتور پلاسمیدی pBSK، دریافت شد. طول قطعه‌ی سنتز شده bp ۷۲۳ می‌باشد.

کلونینگ نواحی آنتی‌ژنیک ژن OMP1

قطعه‌ی ژن مورد نظر که حاوی توالی مربوط به نواحی آنتی‌ژنیک بود را برش داده و از پلاسمید pBSK جدا گردید، که این کار با استفاده از آنزیم‌های BamH1 و Xho1 صورت گرفت. سپس قطعه حاصل که دارای نواحی چسبنده بود به داخل pET32a انتقال داده شد. برای انجام عمل لیگیشن (اتصال) قطعه و پلاسمید برش‌خورده همراه با آنزیم لیگاز به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه گشت. و محصول به داخل سلول‌های کامپتنت DH5α و BL21(DE3) pLysS E.coli فرستاده شد.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب. از کلونی‌های E.coli BL21(DE3) pLYsS_حامل پلاسمیدهای pET32a-omp1 در ۱۰۰ cc محیط نوترینت براث دارای آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلرآمفنیکل کشت داده شد. آن‌گاه در حرارت °C ۳۷ بر روی شیکر با دور ۲۲۰ قرار گرفت. پس از این که OD بین ۰/۵-۰/۶ قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول یک مولار IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactosidase Fermentas)، آلمان) به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. چهار ساعت پس از افزودن IPTG، محیط القا به درون فالکون ریخته شد سپس سانتریفیوژ (۶۰۰۰ دور ۱۰ دقیقه) گردید. در نهایت رسوب باکتری جهت تخلیص پروتئین برداشته شد. برای تخلیص پروتئین با توجه به دنباله هیستیدینی موجود در پروتئین از روش کروماتوگرافی تمایلی (Ni-NTA) استفاده شد و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Qiagen-آمریکا) تخلیص شد. در آخر پروتئین خالص شده از نظر کمی و کیفی با استفاده از ژلSDS-PAGE بررسی شد [۱۵].

بررسی آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب

جهت بررسی آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب تولید شده، ما نیازمند سرم افراد مبتلا به کلامیدیا تراکوماتیس بودیم که برای این امر تعداد ۵۰ نمونه از خون افراد مشکوک به این عفونت که دارای فعالیت جنسی کنترل نشده بودند را به روش الایزا و با کیت تشخیصی کلامیدیا تراکوماتیس (شرکت یورو ایمیون، آلمان) و طبق پروتکل مربوطه بررسی کردیم که از این تعداد ۱۳ سرم مثبت و مابقی منفی بودند.

در پایان برای تایید آنتی‌ژنیسیته از تکنیک وسترن‌بلات (ایمنوبلاتینگ) استفاده گردید. برای انجام تست وسترن‌بلات پس از الکتروفورز رسوب باکتری‌های القاءیافته بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪، باندهای پروتئینی به دست آمده بر روی ژل پلی‌آکریل آمید به کاغذ نیترو سلولز منتقل گردید. کاغذ نیتروسلولز به مدت یک ساعت در سرم بیمار مبتلا به کلامیدیا (۱/۱۰۰) قرار داده شد. پس از انکوباسیون یک ساعته با نمونه‌های سرم، نوارهای کاغذ نیتروسلولز سه مرتبه با بافر TBS (Tris-Buffered Saline) شستشو شده و به مدت یک ساعت با آنتی‌هیومن کونژوگه با پراکسیداز (۱/۲۰۰۰) انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها با بافر TBS، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در کاغذ نیتروسلولز، کاغذ در محلول دی‌آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت [۱۱].

نتایج

نواحی آنتی‌ژنیک ژن omp1 که به وسیله نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک شناسایی شد در شکل ۱ آورده شده است.

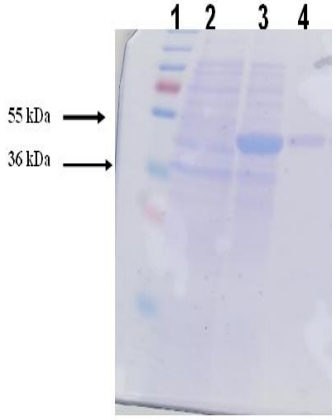
OD مربوط به تخلیص پروتئین mg/ml 2/0 بود. نتایج مربوط به القاء تولید پروتئین و تخلیص پروتئین در شکل ۲ آمده است.

نتایج مربوط به آزمون وسترن‌بلات در شکل ۳ و ۴ قابل مشاهده می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، در تمام

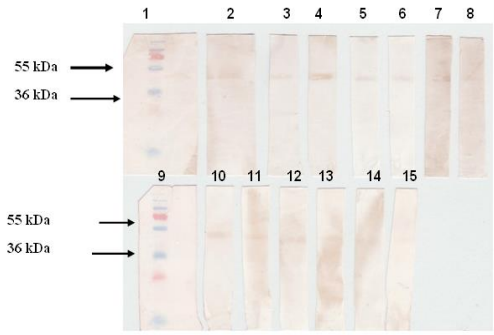
نمونه‌های سرمی بیماران مبتلا بـه عفونـت‌هـای کلامیـدیایی، باندهای مربوط به واکـنش آنتـی‌ژن بـا آنتـی‌بـادی در کاغـذ نیتروسلولز مشاهده می‌شـود (شـکل ۳). در عـین حـال هـیچ باندی مبنی بر واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در نمونه‌های سـرم افراد سالم مشاهده نگردید (شکل ۴).

```
1    atgaaaaaac tcttgaaatc ggtattagtg tttgccgctt tgagttctgc ttcctccttg
61    caagctctgc ctgtggggaa tcctgctgaa ccaagcctta tgatcgacgg aattctatgg
121  gaaggtttcg gcggagatcc ttgcgatcct tgcaccactt ggtgtgacgc tatcagcatg
181  cgtatgggtt actatggtga ctttgttttc gaccgtgttt tgcaaacaga tgtgaataaa
241  gaattccaaa tgggtgccaa gcctacagct gctacaggca atgctgtagc tccatccact
301  tgtacagcaa gagagaatcc tgcttacggc cgacatatgc aggatgctga gatgtttaca
361  aatgctgctt acatggcatt gaatatttgg gatcgttttg atgtattctg tacattagga
421  gccaccagtg gatatcttaa aggaaattca gcatctttca acttagttgg gttattggga
481  gataatgaaa atcaaagcac ggtcaaaaag gatgctgtac caaatatgag cttagatcaa
541  tctgttgttg agttgtatac agatactact tttgcttgga gtgctggagc tcgtgcagct
601  ttgtgggaat gtggatgcgc gactttaggc gcttctttcc aatacgctca atccaagcct
661  aaagtcgaag aattaaacgt tctctgtaac gcagctgagt ttactatcaa taagcctaaa
721  ggatatgtag ggcaagaatt ccctcttgat cttaaagcag gaacagatga tgtgacagga
781  actaaggatg cctctattga ttaccatgaa tggcaagcaa gtttagctct ctcttacaga
841  ctgaatatgt tcactcccta cattggagtt aaatggtctc gagcaagttt tgatgcagac
901  acgattcgta ttgctcagcc gaagtcagct acaactgtct ttgatgttac cactctgaac
961  ccaactattg ctggagctgg cgatgtgaaa gctagcgcag agggtcagct cggagatacc
1021 atgcaaatcg tttccttgca attgaacaag atgaaatcta gaaaatcttg cggtattgca
1081 gtaggaacaa ctattgtgga tgcagacaaa tacgcagtta cagttgagac tcgcttgatc
1141 gatgagagag ctgctcacgt aaatgcacaa ttccgcttct aa
```

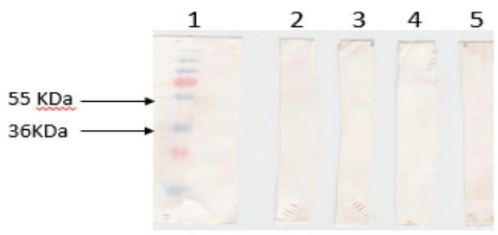
شکل ۱. نواحی آنتی‌ژنیک ژن omp1، چهار اپی‌توپ مختلف کـه هـم در بین تمامی گونه‌های کلامیدیا تراکوماتیس اختصـاص بـوده و هـم دارای خاصیت آنتی‌ژنیک می‌باشند. هم‌چنین این توالی‌ها در سطح قرار دارند.



شکل ۲. ستون ۱ : مارکر پروتئینی ، ستون ۲ : قبل از القاء تولید پروتئین ، ستون ۳ : القای تولید پروتئین ، ستون ۴ : تخلیص پروتئین



شکل ۳. ستون ۱ و ۹ : مارکر پروتئینی ، ستون های ۲ تا ۸ و ۱۰ تا ۱۵ : باند مربوط به واکنش پروتئین نوترکیب با سرم افراد مبتلا به عفونت های کلامیدیا تراکوماتیس



شکل ۴. ستون ۱ : مارکر پروتئینی ، ستون ۲ تا ۵ : باندی که مبنی بر واکنش پروتئین نوترکیب با سرم افراد سالم پر خطر باشد مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نـواحی آنتـی‌ژنیـک پـروتئین MOMP بـا اسـتفاده از نرم‌افزارهای مختلف بیوانفورماتیک شناسایی، و توالی مربـوط به چهار ناحیه آنتی‌ژنیک با لینکرهـای انعطـاف‌پـذیر بـه هـم متصل شدند. پروتئین نوترکیـب تولیـد و تخلـیص گشـت. در پایان باند مربوط به واکنش نواحی آنتی‌ژنیک فیوژن شـده بـا آنتی‌بادی‌های موجود در سـرم افـراد مبـتلا بـه عفونـت‌هـای کلامیدیایی مشاهده شد.

کلامیدیا تراکومـاتیس شـایع‌تـرین بـاکتری منتقلـه از راه جنسـی در سراسـر جهـان اسـت [۱۶]. ایـن بـاکتری باعـث اورتریت در مردان و عفونت گردن رحـم، انـدومتریت و ... در زنان می‌باشد [۱۷].

استفاده از وکتور بیـانی pET32a باعـث بیـان ژن (تولیـد پروتئین)، در سطح بالا می‌شود. این پلاسمید باعث می‌شود که ژن کلون شده به‌طور بالقوه "خاموش" باشـد؛ هـم‌چنـین ایـن پلاسمید، رونویسی و ترجمه ژن‌های هدف توسط سیگنال‌های قوی پروموتور باکتریوفاژ T7 کـه در نـواحی بـالا دسـت ژن هدف قرار دارد انجام می‌شود [۱۸].

مزیت اصـلی سـویه pLysS بـاکتری E.coli کـه در ایـن مطالعه استفاده شد کمبود پروتئاز LON و OmpT در pLysS اشاره کرد که باعث افزایش ثبات پروتئین بیان شده می گـردد [۱۵].

تست‌های سرولوژی به علت حساسیت بـالا بـه آنتـی‌ژن خاص معمولاً به عنوان تست‌های آزمایشـگاهی رایـج جهـت تشخیص پاتوژن‌ها مـورد اسـتفاده قـرار مـی‌گـردد .پـروتئین MOMP در فرم اصلی خود یک پروتئین سه جزئی بـا عمـده

ساختار β-sheet بوده و دارای عمل‌کرد پورینی می‌باشد [۱۹] و از آن‌جایی‌که این پروتئین برای گونه‌ی کلامیدیا تراکوماتیس دارای نواحی اختصاصی می‌باشد [۲۰]. لذا جهت شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس توسط تست‌های آزمایشگاهی سرولوژیک انتخاب گردید. هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی آنتی‌ژنیسیته نواحی آنتی‌ژنیک پروتئین MOMP کلامیدیا تراکوماتیس می‌باشد که به منظور آن در ابتدا نواحی آنتی‌ژنیک پروتئین MOMP با استفاده از سایت‌ها و نرم‌افزارهای تخصصی پیش‌بینی نواحی اپی‌توپیک و به‌خصوص با توجه به خارج سلولی بودن آنتی‌ژن‌های پروتئین MOMP، اپی‌توپ‌های فضایی و ناپیوسته MOMP که شاخص لنفوسیت‌های B می‌باشند، شناسایی شد. نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی به‌کار برده شده در این زمینه کاملاً تخصصی می‌باشند و برای اطمینان از نتایج، نواحی آنتی‌ژنیک مورد توافق نرم‌افزارهای مختلف تجزیه تحلیل و انتخاب گردید، و در ادامه اپی‌توپ‌های فضایی مورد توافق پروتئین MOMP به وسیله لینکرهای انعطاف‌پذیر متصل شدند که در حین حفظ ساختارهای نواحی آنتی‌ژنیک مانع از ممانعت‌های فضایی بین نواحی آنتی‌ژنیک می‌شوند و شرایط را برای شناسایی آن‌ها توسط سیستم ایمنی فراهم می‌کنند، هم‌چنین استفاده از این لینکرهای آمینواسیدی در ادغام نواحی آنتی‌ژنیک و ایجاد پروتئین فیوژن نوترکیب و کاهش مراحل کلونینگ، بیان و تخلیص مفید می‌باشند. بر اساس یافته‌های حاصل از آزمون وسترن‌بلات، پروتئین فیوژن نوترکیب تولید شده توانایی اتصال به آنتی‌بادی‌های موجود در سرم افراد مبتلا به عفونت‌های کلامیدیایی را دارد، به طوری که سرم افراد مشکوک به عفونت کلامیدیای را با کیت الایزا (شرکت یورو ایمیون، آلمان) مورد بررسی قرار دادیم و نمونه‌های مثبت شناسایی شدند؛ لذا سرم تمامی این افراد را با پروتئین مورد نظر از طریق آزمون وسترن‌بلات مواجه کردیم و نشان داده شد که پروتئین مذکور توانایی اتصال با آنتی‌بادی‌های موجود در سرم این افراد را دارا می‌باشد، هم‌چنین یافته‌های ما با نتایج مطالعه بنده‌پور و همکاران که از ژن کامل مربوط به پروتئین MOMP استفاده کرده‌اند، همخوانی دارد به‌طوری‌که آن‌ها دریافتند که می‌توان از اختصاصیت پروتئین MOMP جهت تشخیص آزمایشگاهی باکتری کلامیدیا بهره برد [۱۳]. هم‌چنین این پروتئین هیچ‌گونه اتصالی با آنتی‌بادی‌های موجود در سرم افراد سالم پرخطر دیده نشد که این امر نشان‌دهنده اختصاصیت پروتئین تولید شده می‌باشد. نتایج مطالعات مشابه نیز نشان داد که پروتئین MOMP دارای حساسیت و اختصاصیت بالا در واکنش با آنتی‌بادی‌های ضد باکتری جهت تشخیص باکتری کلامیدیا تراکوماتیس می‌باشد [۲۱-۲۳]. از کاستی‌های این تحقیق عدم استفاده از این پروتئین در تست الیزا است. به‌طوری‌که لازم است در تحقیقات دیگری کارآیی این پروتئین در تست الیزا مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج طرح حاضر نشان می‌دهد که از اختصاصیت نواحی آنتی‌ژنیک پروتئین نوترکیب MOMP می‌توان جهت کارهای تشخیصی مانند کیت ELISA بهره برد. از آن‌جا که آنتی‌ژن تولید شده توانایی ایجاد ایمنی‌زایی در انسان را دارد ممکن است بتوان جهت ساخت واکسن و کیت تشخیصی الیزا استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در بردارنده بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای سجاد مالمیر در دانشگاه علوم پزشکی اراک بوده که هزینه آن به‌وسیله معاونت تحقیقات و فناوری تأمین گردیده است. بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم در آزمایشگاه میکروبیولوژی مولکولی و آزمایشگاه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک اعلان می‌دارند.

منابع

[1] Maraynes ME, Chao JH, Agoritsas K, Sinert R, Zehtabchi S. Screening for asymptomatic chlamydia and gonorrhea in adolescent males in an urban pediatric emergency department. World J Clin Pediatr 2017; 6: 154-160.

[2] Vishwanathan SA, Aubert RD, Morris MR, Zhao C, Philips C, Khalil GM, et al. A macaque model for rectal lymphogranuloma venereum and non-lymphogranuloma

[14] Abbasian S, Soufian S, Nejad A, Abtahi H. Investigating the possibility of recombination the predicted antigenic fragment of Streptococcus pyogen hyaluronidase by bioinformatics softwares. Koomesh 2015; 17. (Persian).

[15] Farhangnia L, Ghaznavi-Rad E, Mollaee N, Abtahi H. Cloning, expression, and purification of recombinant lysostaphin from staphylococcus simulans. Jundishapur J Microbiol 2014; 7: e10009. (Persian).

[16] Organization WH. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. 2001.

[17] O'Meara CP, Andrew DW, Beagley KW. The mouse model of Chlamydia genital tract infection: a review of infection, disease, immunity and vaccine development. Curr Mol Med 2014; 14: 396-421.

[18] Hwang PM, Pan JS, Sykes BD. Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in Escherichia coli. FEBS lett 2014; 588: 247-252.

[19] Sun G, Pal S, Sarcon AK, Kim S, Sugawara E, Nikaido H, et al. Structural and functional analyses of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. J Bacteriol 2007; 189: 6222-6235.

[20] Hayes L, Pickett M, Conlan J, Ferris S, Everson J, Ward M, et al. The major outer-membrane proteins of Chlamydia trachomatis serovars A and B: intra-serovar amino acid changes do not alter specificities of serovar-and C subspecies-reactive antibody-binding domains. Microbiology 1990; 136: 1559-1566.

[21] Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand J, Scieux C, Vischer T. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. J Clin Microbiol 2001; 39: 1368-1377.

[22] Pal S, Barnhart KM, Wei Q, Abai AM, Peterson EM, de la Maza LM. Vaccination of mice with DNA plasmids coding for the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein elicits an immune response but fails to protect against a genital challenge. Vaccine 1999; 17: 459-465.

[23] Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Detection of chlamydia trachomatis-specific antibodies in human sera by recombinant major outer-membrane protein polyantigens. J Med Microbiol 2000; 49: 457-465.

venereum chlamydia trachomatis: impact on rectal simian/human immunodeficiency virus acquisition. Sex Transm Dis 2017; 44: 551-556.

[3] Kim JK. Epidemiological trends of sexually transmitted infections among women in Cheonan, South Korea, 2006-2012. J Microbiol Biotechnol 2013; 23: 1484-1490.

[4] Nwankwo EO SM. Prevalence of chlamydia trachomatis infection among patients attending infertility and sexually transmitted diseases clinic (STD) in Kano. Afr Health Sci 2014; 14: 672-678.

[5] Taheri BB, Motamedi H, Ardakani M. Genotyping of the prevalent Chlamydia trachomatis strains involved in cervical infections in women in Ahvaz, Iran. J Med Microbiol 2010; 59: 1023-1028. (Persian).

[6] Yu H, Jiang X, Shen C, Karunakaran KP, Brunham RC. Novel Chlamydia muridarum T cell antigens induce protective immunity against lung and genital tract infection in murine models. J Immunol 2009; 182: 1602-1608.

[7] Gray RT, Beagley KW, Timms P, Wilson DP. Modeling the impact of potential vaccines on epidemics of sexually transmitted Chlamydia trachomatis infection. J Infec Dis 2009; 199: 1680-1688.

[8] Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol 2002; 90: 81-110.

[9] Yan J, Mao YF, Shao ZX. Frequencies of the expression of main protein antigens from Helicobacter pylori isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. World J Gastroenterol 2005; 11: 421-425.

[10] Molaee N, Abtahi H, Mosayebi G. Expression of recombinant streptokinase from streptococcus pyogenes and its reaction with infected human and murine sera. Iran J Basic Med Sci 2013; 16: 985-989.

[11] Bonyadi M, Ghaznavi-Rad E, Mosayebi G, Rafiei M, Molaee N, Abtahi H. Development of an arCagA antigen-based assay for the detection of helicobacter pylori in stool specimens. Jundishapur J Microbiol 2016; 10: 39119. (Persian).

[12] Farjadi V, Abtahi H, Zolfaghari MR, Soufian S, Hasanzadeh L. Expression, purification and evaluation of antigenicity of CagA antigenic fragment of helicobacter pylori. Jundishapur J Microbiol 2013; 6. (Persian).

[13] Tong JC, Tan TW, Ranganathan S. Methods and protocols for prediction of immunogenic epitopes. Brief Bioinform 2007; 8: 96-108.

Cloning, expression, purification and antigenicity of antigenic region of MOMP protein from Chlamydia trachomatis

Sajad Malmir (M.Sc)[1], Ehsan Raoufi (M.Sc)[2], Hamid Abtahi (Ph.D)[*3]

1. Dept. of Microbiology and Immunology , Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2. Dept. of Medical Biotechnology, School of Allied medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received: 5 Feb 2017; Accepted: 12 Nov 2017)

Introduction*:* Chlamydia trachomatis is an obligate intracellular parasites, gram-negative bacteria and also is one of the most common sexually transmitted infections. Correspondingly, the MOMP protein contains more than 60% of the extra-membrane proteins, which indicates the importance of this protein for the detection of Chlamydia trachomatis. The purpose of the study is to produce recombinant protein composed of antigenic regions of the MOMP protein and its antigenicity.

Materials and Methods*:* In this study, the regions with the highest antigenic property of the omp1 gene, with a length of 674 bp, were obtained based on bioinformatics software's and linked with flexible linker. Then, it was cloned and expressed in plasmid vector pET32a. After purification of the recombinant protein, its antigenicity was evaluated using Western blot technique with serum of infected people with Chlamydia**.**

Results*:* Based on the results, in all serum samples of patients with chlamydial infections, antibody response bands were observed in nitrocellulose paper. Anyway, no antibody response band was detected in the serum samples of healthy people.

.***Conclusion****:* Data showed that antigenic region of MOMP protein can be expressed by in E. coli

This protein was recognized by sera patients suffering from Chlamydia trachomatis infection. Conclusively, the recombinant protein has similar epitopes and close antigenic properties to the natural form of this antigen.

Keywords*:* Chlamydia trachomatis, outer membrane protein 1, Recombinant Proteins.

* Corresponding author. Tel: +98 8634173502

abtahi@arakmu.ac.ir