مقاله پژوهشی

همسانه سازی، بررسی بیان و تخلیص ژن کد کننده پروتئین نوترکیب متشکل از زیرواحدهای اتصالی آنتی‌ژن‌های سطحی CS1 و CS2 از *اشرشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC)

درنا خوب بخت[۱]، جعفر امانی[۲*]، شهره زارع[۳]، زهرا نورمحمدی[۱]

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
۳- گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: باکتری *اشرشیا کلی* انتروتوکسیژنیک از عوامل شایع اسهال است. فاکتورهای کلونیزاسیون و انتروتوکسین‌ها از عوامل اصلی حدت زا در این ارگانیسم هستند. باکتری مذکور از طریق فاکتورهای کلونیزاسیون به سطح سلول‌های اپیتلیال روده متصل می‌شود و انتروتوکسین‌ها را تولید می‌کند که این سموم باعث ترشح بیش‌ازحد مایعات و الکترولیت‌ها در لومن روده می‌شوند که درنهایت منجر به اسهال می‌گردند. به دلیل درمان مشکل و شیوع بالای این بیماری طراحی واکسن علیه این ارگانیسم یکی از اهداف سازمان بهداشت جهانی است. پروتئین CooD – CotD به‌عنوان زیر واحدهای رأسی CS1 و CS2 نقش مهمی را در اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده ایفا می‌کنند. در این مطالعه بیان و تخلیص ژن کد کننده پروتئین کایمریک CooD – CotD به‌عنوان کاندیدای واکسن‌های زیرواحدی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، بهینه‌سازی کدونی ژن کایمریک *cooD – cotD* با نرم‌افزار Gene Designer انجام شد. ژن موردنظر با روش PCR تکثیر و در وکتور کلونینگ pJET1.2/blunt همسانه سازی گردید و به‌منظور بیان در وکتور بیانی pET28a زیرهمسانه‌سازی شد. پروتئین با روش کروماتوگرافی نیکل تخلیص و با وسترن بلات ارزیابی شد.

نتایج: حضور باند ۸۲ کیلودالتونی در ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد بیان پروتئین کایمریک CooD – CotD را نشان داد که با روش وسترن بلات تأیید گردید. میزان پروتئین تخلیص شده در این تحقیق ۱۲۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: مطالعات بیان و تخلیص پروتئین نشان داد که این پروتئین دارای بیان در میزبان همولوگ است.

کلمات کلیدی: انتروتوکسیژنیک *اشرشیا کلی*، CS1، CS2، بیان نوترکیب

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

مقدمه

اشرشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) یکی از علل عمده‌ی اسهال عفونی نوزادان و مسافران کشورهای درحال‌توسعه است. شیوع اسهال ناشی از سویه‌های *اشرشیاکلی* در سراسر جهان به‌ویژه در مناطقی که از سطح بهداشت پایین‌تری برخوردار هستند بالا است (۱). عوامل بیماری‌زای خاص ازجمله، انتروتوکسین‌ها و عوامل کلونیزه کننده، ETEC را از سایر دسته‌های *E. coli* متمایز می‌کند (۲) و به ارگانیسم اجازه می‌دهد تا با اتصال ساختارهای پروتئینی(CFs) به گیرنده اختصاصی گلیکولیپید یا گلیکو پروتئین سطح سلول‌های اپیتلیال، روده‌ی کوچک میزبان کلونیزه شده و منجر به اسهال شود (۳). به دنبال مصرف آب و غذای آلوده باکتری ETEC پس از اتصال، انتروتوکسین‌های LT (سم حساس به حرارت) و ST (سم مقاوم به حرارت) را ترشح می‌کند. این سموم باعث افزایش بیش‌ازحد ترشح مایعات و الکترولیت‌ها و درنتیجه اسهال می‌شوند (۴). کاهش آب بدن منجر به خشکی دهان، تند شدن

*نویسنده مسئول: **جعفر امانی**، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
Email: jafar.amani@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-5155-4738

نبض، کاهش فشارخون، گرفتگی عضلات و در موارد شدید منجر به شوک می‌شود (۵). تاکنون تعداد زیادی از آنتی‌ژن‌های عوامل کلونیزاسیون (CFAs) شناخته شده است که شامل: CFA/ I، CFA/II، CFA/ IV است (۶). گروه CFA/II دارای ۳ آنتی‌ژن سطحی کولی متفاوت ازجمله: CS1، CS2،CS3 است (۷). بیان ۴ ژن *cooABCD* برای سرهم کردن فیمبریه‌ی CS1 ضروری است (۸). ژن‌های *coo* روی یک پلاسمید بزرگ pcoo واقع‌شده‌اند (۸). آنتی‌ژن سطحی CS1 متشکل از صدها زیر واحد اصلی CooA (۹)، یک پروتئین چاپرون پری پلاسمیک (CooB)، پروتئین خارج غشایی (CooC) و پروتئین رأسی CooD است (۱۰) که این زیر واحد رأسی برای چسبندگی موردنیاز است (۱۱). آنتی‌ژن سطحی CS2 یکی از شایع‌ترین عوامل کلونیزاسیون مرتبط با ETEC است که اپرون آن برخلاف عوامل کلونیزاسیون دیگر روی کروموزوم ETEC قرار گرفته است (۸). بیان ۴ ژن *cot ABCD* برای تولید پیلی CS2 موردنیاز است. به‌علاوه جستجوی پایگاه داده با نرم‌افزار Blast نشان داده که *cotB*، *cotA*، *cotC*، *cotD* شباهت قابل‌توجهی با محصولات ژنی دسته‌های CS1 و CFA/I دارند (۱۲). چهارمین ژن در چارچوب خوانش (ORF) که به‌عنوان زیر واحد فرعی در رأس قرار داشته و به پروتئین CotD ترجمه می‌شود، دارای ۳۶۴ اسیدآمینه است؛ که ۱۸ اسیدآمینه ابتدایی آن را پپتید راهنما تشکیل می‌دهد (۱۳). CotD با پروتئین کد شده توسط ژن‌های چهارم از دسته‌ی CS1(CooD) و CFA/I(CFaE) همسان است (۱۴). ازآنجایی‌که اتصال ETEC به روده برای ایجاد بیماری لازم است، جلوگیری از اتصال باکتری و فعال‌سازی سم‌زدایی از طریق گیرنده اتصالی راهکار اصلی برای پیشگیری و کنترل بیماری ETEC است (۱). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که یکی از چالش‌های موجود در توسعه‌ی واکسن علیه ETEC، وجود سویه‌های مختلف با عوامل کلونیزاسیون متنوع است که کارایی ایمونوژن‌های مجزا را کاهش می‌دهد (۱۵). در مطالعات پیشین برای ایجاد پاسخ ایمنی هم‌زمان علیه عوامل اتصالی CFA/I و CS_2 اپرون هیبریدی متشکل از ژن‌های *cotA* و *cafB* را طراحی کردند که درنتیجه ایمنی‌زایی از طریق خوراکی تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه هر دو آنتی‌ژن‌های CFA/I و CS_2 مشاهده شده است (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای دیگر از رویکرد MEFA (آنتی‌ژن ترکیبی چند اپی توپی) برای ادغام اپی‌توپ‌ها از زیرواحدهای اتصالی CS1, CS2, CS3, CS4، CS6، CFA/I،CS21 و ادهسین‌های ETPA برای ساخت یک ادهسین رأسی MEFA استفاده کردند که درنتیجه‌ی ایمن‌سازی حیوان مدل، پاسخ آنتی‌بادی IgG به تمام ۹ ادهسین مرتبط به ETEC ایجاد شد (۱۷). لذا در این تحقیق همسانه سازی و بیان ژن کایمریک *cooD – cotD* به‌منظور تولید پروتئین نوترکیب بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

۱- سویه‌ی *Enterotoxigenic E.coli*، *E. coli* BL21(DE3)، *E. coli* TOP10 از دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) و محیط لوریا برتونی (LB) مایع و آگار (تکاپو زیست) جهت کشت استفاده شد.

۲- بهینه‌سازی ژن کایمریک *cooD – cotD* و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR)

بهینه‌سازی کدونی ژن کایمریک *cooD – cotD* با نرم‌افزار Gene designerانجام گرفت و توالی ژن توسط شرکت Shign gene چین سنتز شد. سپس بر اساس توالی سنتز شده آغازگرهای رفت‌وبرگشت طراحی شد. آغازگر رفت دارای جایگاه برش آنزیم *Eco*RI:

(5́-ATCATA GAATTC ATGGGCCGTTATCCGGAAAC- 3́) و

آغازگر برگشت واجد جایگاه برش آنزیم *Hin*dIII:

(5́-ATCATAT AAGCTT TTACAGGCTCGATGAGGACG - 3́) بود.

دمای ذوب آغازگر رفت‌وبرگشت به ترتیب ۶۶/۹۳ و ۶۷ درجه سانتی‌گراد در هنگام طراحی تنظیم گردید و ازنظر عدم تشکیل حلقه (loop) و جفت شدن (Dimer) بررسی شدند. آغازگرهای موردنظر توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. به‌منظور تکثیر ژن کایمر واکنش PCR با آنزیم *Pfu* دارای خاصیت تصحیح کنندگی (شرکت Fermentas) در شرایط غلظت ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۲۰۰ ماکرومولار از dNTP، ۱ ماکرولیتر از پلاسمید pBAD حاوی سازه موردنظر و بافر PCR (1X) به همراه کوفاکتور $MgSO_4$ در دمای اتصال ۶۵ درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی شد. محصول واکنش با DNA نشانگر 1Kb روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید.

۳- همسانه سازی ژن کایمریک *cooD – cotD* در ناقل pJET1.2/blunt

برای محصول PCR و ناقل pJET/ blunt به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد طبق کیت cloneJET PCR cloning (شرکت Thermo scientific) واکنش الحاق تنظیم

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

گردید. سپس سازه نوترکیب (pJET-*cooD-cotD*) طبق روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *اشرشیاکلی سویه* TOP10 انتقال داده شد و کلونی‌ها روی پلیت‌های LB حاوی آمپی‌سیلین (غلظت ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) ظاهر شدند. برای تأیید همسان‌سازی ژن *cooD – cotD* از کلونی‌های تشکیل‌شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی کلونی PCR انجام شد و از کلون‌های مثبت تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی طبق پروتکل کیت استخراج پلاسمید (شرکت Genet bio) انجام شد و به‌عنوان الگو در واکنش PCR و هضم آنزیمی با *Eco*RI و *Hin*dIII مورداستفاده قرار گرفت.

۴- زیر همسان‌سازی ژن کایمریک *cooD – cotD* در ناقل pET28a

به‌منظور انجام زیرهمسان سازی ابتدا واکنش هضم آنزیمی بروی پلاسمید نوترکیب pJET-*cooD-cotD* و ناقل بیانی pET28a تخلیص شده توسط دو آنزیم محدودالاثر *Eco*RI و *Hin*dIII به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. قطعه جداشده از pJET با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل خالص‌سازی شد و برای محصول و pET28a هضم شده به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد واکنش الحاق انجام گرفت. سپس با روش شوک حرارتی به میزبان *اشریشیا کلی* سویه TOP10 انتقال داده شد. بر روی کلونی‌های TOP10 تراریخت شده با pET28a نوترکیب واکنش کلونی PCR در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد با آغازگرهای T7 انجام شد، (توالی آغازگر رفت: 3́ -TAATACGACTCACTATAGGG- 5́ و توالی آغازگر برگشت: 3́ -CCGCTGAGCAATAACTAGC- 5́) و به منظور تأیید صحت زیر همسان‌سازی از کلون‌های تأییدی تخلیص پلاسمید نوترکیب صورت گرفت و به‌عنوان الگو در واکنش PCR و هضم آنزیمی با *Eco*RI و *Hin*dIII مورداستفاده قرار گرفت. سپس پلاسمید نوترکیب pET28a- *cooD-cotD* به‌منظور بیان ژن کایمریک به میزبان بیانی *E.coli* BL21(DE3) انتقال داده شد و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی واکنش کلونی PCR انجام شد.

۵- بیان پروتئین کایمریک

کلونی‌های نوترکیب حاوی ژن کایمر در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین (غلظت ۵۰µg/ml) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. پس‌ازاینکه میزان رشد باکتری به جذب نوری ۰/۷ در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر رسید القا با استفاده از IPTG (۱ میلی‌مولار) (Fermentas) انجام و دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ و ۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت.

۶- بررسی محلول بودن پروتئین بیانی یا تجمع پروتئین به شکل اجسام انکلوژن

در این مرحله به‌منظور تخریب دیواره‌ی سلولی روش‌های: شیمیایی (بافر لیز کننده)، مکانیکی (freeze-thaw, glass beads) و آنزیمی (لیزوزیم) اعمال شد. سپس رسوب سلولی حاصل از بیان را با ۲ میلی‌لیتر از بافر A (کلرید سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار، سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار) (pH:8) و آنزیم لیزوزیم (غلظت۱ mg/ml) حل شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد و پس ورتکس با glass beads و شکسته شدن سلول‌ها، نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ و محلول رویی به‌عنوان فاز محلول (Native) جمع‌آوری شدند. سپس به رسوب حاصل از مرحله قبل بافر B (بافر حاوی اوره ۸ مولار، تریس – HCL ۱۰ میلی‌مولار، سدیم دی هیدروژن فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار) (pH:8) اضافه شد. یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون انجام شد سپس محلول رویی به‌عنوان فاز نامحلول (Denature) پس از ۳ دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ جمع‌آوری شد. هر ۲ نمونه روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد الکتروفورز شد.

۷- تخلیص پروتئین نوترکیب

به‌منظور تخلیص پروتئین بیان ژن در مقیاس بالاتر (۵۰ میلی‌لیتر) انجام شد. تخلیص پروتئین نوترکیب به‌وسیله ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA با روش دناتوره (Qaigen) با کمک His-tag انتهای آمینی (که به دنبال کلون کردن ژن در جایگاه آنزیم‌های *Hin*dIII/*Eco*RI در ناقل pET28a به ابتدای آمینی پروتئین اضافه می‌شود، انجام گرفت. شرایط دناتوره با استفاده از بافرهای حاوی اوره‌ی ۸ مولار با شیب pH اعمال شد.

۸- بهینه‌سازی تخلیص پروتئین نوترکیب

در این روش کشت باکتری در مقیاس زیاد انجام شد و مقادیر متفاوت اوره ۸ مولار و گرادیان pH مربوط به بافر D (بافر شستشو) مورداستفاده در ستون Ni-NTA به کار گرفته شد: رسوب حاصل از سانتریفیوژ سوسپانسیون باکتری با ۲ میلی‌لیتر اوره ۸ مولار (pH:8) همگن‌سازی شد و بعد از ورتکس با glass beads محلول رویی با بافر شستشو (pH:5.7) روی ستون Ni-

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

NTA انتقال داده شد. مراحل بعد نیز مشابه مرحله ذکرشده اعمال گردید، با این تفاوت که ۴ میلی‌لیتر از بافر حاوی اوره ۸ مولار استفاده شد و محلول رویی به ترتیب با بافر شستشو (pH:5.5) و (pH:5.6) روی ستون نیکل منتقل شد.

۹- تعیین غلظت پروتئین

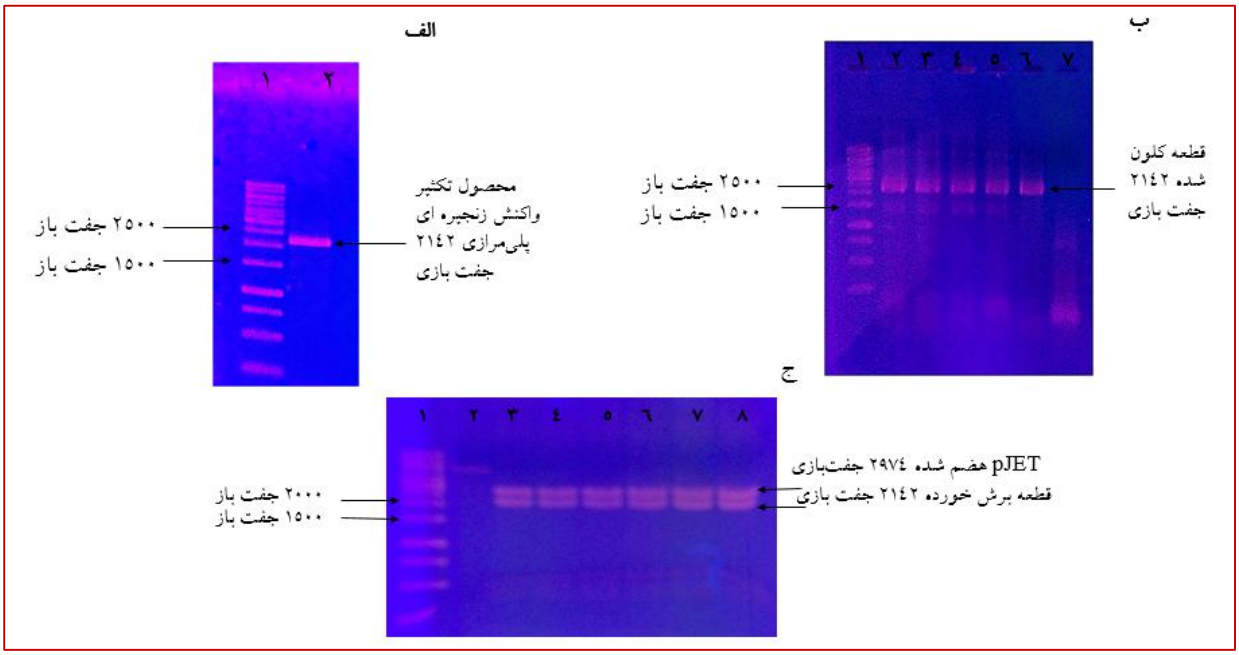
غلظت پروتئین بیان‌شده به روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان پروتئین استاندارد انجام گرفت.

۱۰- وسترن بلات

بیان پروتئین تولیدشده با روش وسترن بلات و با استفاده ازآنتی بادی Anti-His tag متصل با HRP (شرکت سیگما) تأیید شد. پروتئین طی الکتروفورز و با استفاده از بافر انتقال (گلایسین ۳۹ میلی‌مولار، تریس ۴۸ میلی‌مولار، اتانول ۲۰ درصد) بر روی غشای نیترو سلولز منتقل شدند. به‌منظور پوشش نواحی آزاد و فاقد پروتئین، کاغذ نیتروسلولز در داخل بافر بلوکه کننده (۵ گرم skim milk در ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS (1X)) به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجاور شد، کاغذ نیتروسلولز در هر مرحله با بافر PBST (بافر PBS واجد ۰/۰۵ توئین ۲۰) شستشو داده شد. در مرحله بعد آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-His tag (شرکت سیگما) با رقت ۱:۲۰۰۰ در داخل بافر PBS(1X) تهیه گردید و روی غشای PVDF اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس (H_2O_2 (٪۳۰) به‌عنوان کاتالیزور و محلول DAB (دی آمینو بنزیدین) به‌عنوان سوبسترا روی غشای نیتروسلولز اضافه شد و پس از ظهور باندها واکنش با آب مقطر مهار گردید.

نتایج

ژن کایمریک کدکننده‌ی زیر واحد رأسی آنتی‌ژن‌های سطحی کولی CS1 و CS2 با استفاده از آغازگرهای رفت‌وبرگشت سنتز شده تکثیر شد. محصول PCR روی ژل با اندازه‌ی ۲۱۴۲ جفت باز مشاهده شد. ژن موردنظر در ناقل pJET/ blunt همسان‌سازی شد و به میزبان *اشریشیا کلی* TOP10 انتقال یافت. سپس به‌منظور تأیید همسان‌سازی ژن کایمریک *cooD – cotD* واکنش کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام شد. به‌منظور تائید



شکل ۱- محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن کایمریک *cotD -cooD*، آنالیز اولیه کلون، واکنش هضم آنزیمی

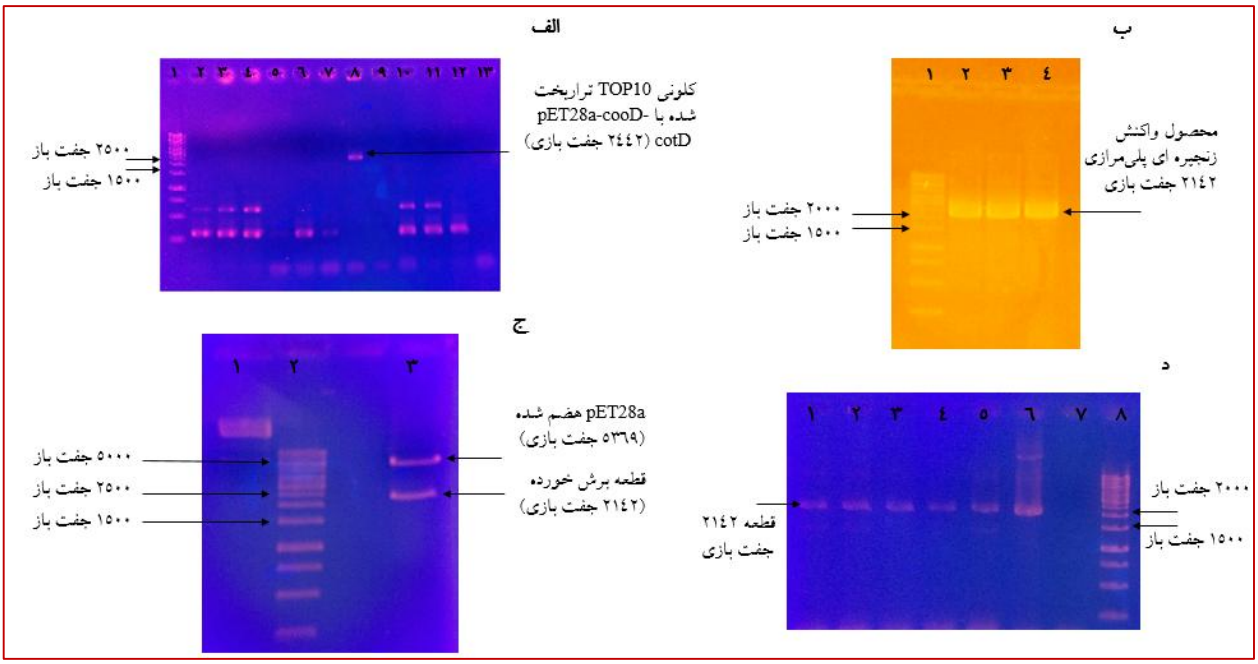
الف: محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن کایمریک *cotD -cooD* با آنزیم *Pfu*: ستون ۱) نشانگر اندازه DNA (1kb Ladder)، ستون ۲) محصول PCR ژن ۲۱۴۲ جفت بازی *cooD-cotD*. ب: آنالیز اولیه کلون‌ها توسط آزمایش کلونی PCR: ستون ۱) نشانگر اندازه DNA (1kb Ladder)، ستون ۲ تا ۵) واکنش PCR کلونی‌های نوترکیب واجد ژن *cotD-cooD*، ستون ۶) کنترل مثبت (پلاسمید pBAD حاوی ژن *cotD-cooD*)، ستون ۷) کنترل منفی (فاقد DNA الگو). ج: واکنش هضم آنزیمی برای تأیید کلونی‌های نوترکیب: ستون ۱) نشانگر اندازه DNA (1kb Ladder)، ستون ۲) پلاسمید pET28a هضم شده، ستون ۳ تا ۸) هضم پلاسمید نوترکیب pJET- *cotD-cooD*.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

همسانه سازی، روی کلونی‌های نوترکیب واکنش هضم با دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*dIII انجام شد (شکل ۱). سپس قطعه جداشده از پلاسمید pJET خالص‌سازی شد.

همان‌طور که در قسمت ج از شکل ۱ مشاهده می‌شود، کلون-های حاوی ناقل نوترکیب pJET- *cotD-cooD* در اثر هضم آنزیمی دو باندی (باند ناقل و قطعه الحاقی) دیده می‌شوند که نشان‌دهنده جدا شدن قطعه الحاقی از پلاسمید است. قطعه خارج‌شده از وکتور با اندازه ژن *cotD-cooD* مطابقت دارد.

واکنش اتصال بر روی محصول هضم تخلیص شده و پلاسمید pET28a برش خورده اعمال شد و محصول الحاق به میزبان TOP10 انتقال یافت. واکنش کلونی PCR روی کلونی‌های TOP10 تراریخت شده با ناقل نوترکیب pET28a-*cooD-cotD* انجام شد. جهت تأیید زیرهمسان‌سازی واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی و واکنش هضم با دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*dIII روی پلاسمید نوترکیب اعمال شد. پس‌ازآنکه زیرهمسانه‌سازی قطعه ۲۱۴۲ جفت بازی در ناقل pET28a تأیید شد، پلاسمید نوترکیب به میزبان *اشرشیا کلی* سویه BL21(DE3) انتقال یافت. روی کلونی‌های تراریخت‌شده حاوی pET28a-*cooD-cotD* کلونی PCR انجام گردید (شکل ۲).



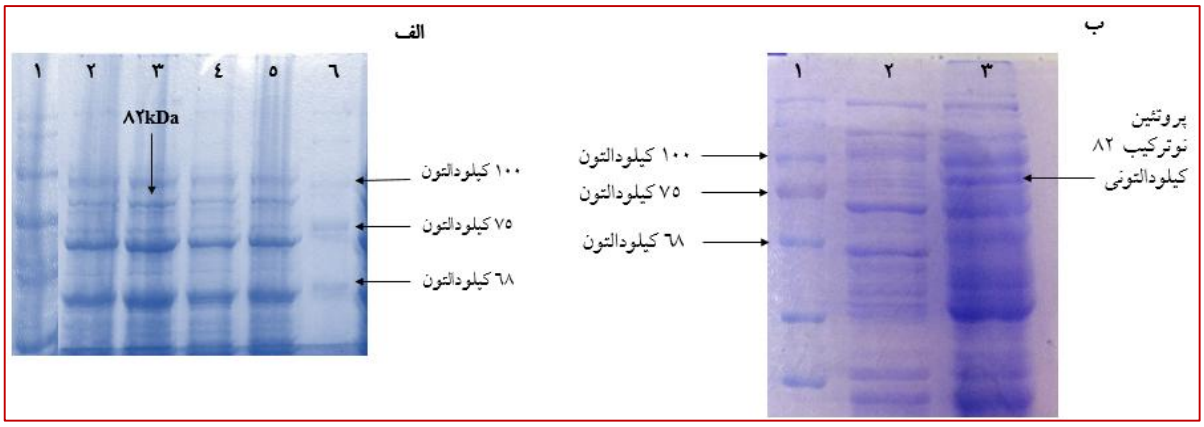
شکل ۲- واکنش کلونی PCR کلونی‌های TOP10 تراریخت شده و تأیید آن به دو روش PCR و هضم آنزیمی و واکنش کلونی PCR از سویه‌های *E.coli* BL21(DE3)

الف: واکنش کلونی PCR کلونی‌های TOP10 واجد ناقل نوترکیب pET28a-*cooD-cotD*: ستون ۱) نشانگر اندازه DNA (1kb Ladder)، ستون ۸) کلونی مثبت TOP10 حاوی pET28a-*cooD-cotD*، ستون ۱۳) کنترل منفی (فاقد DNA الگو). ب: تائید کلونی‌های تراریخت با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: ستون ۱) نشانگر اندازه DNA (1kb Ladder)، ستون ۲ تا ۴: محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از پلاسمید نوترکیب pET28a-*cooD-cotD*. ج: تائید کلون‌های به‌دست‌آمده با استفاده از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET28a-*cooD-cotD*: ستون ۱) تخلیص پلاسمید pET28a، ستون ۲) نشانگر اندازه DNA (1kb Ladder)، ستون ۳) قطعه ۲۱۴۲ جفت بازی و ناقل هضم شده. د: مشاهده‌ی کلونی PCR از سویه‌ی *E.coli* BL21(DE3). حاوی pET28a-cooD-cotD: ستون ۱ تا ۵) کلونی‌های مثبت *coli* *E.*BL21(DE3)، ستون ۶) کنترل مثبت (حاوی الگو پلاسمید استخراج‌شده pET28a-*cooD-cotD*)، ستون ۷) کنترل منفی (فاقد DNA الگو)، ستون ۸: نشانگر اندازه DNA (1kb Ladder).

بیان ژن کایمریک *cooD-cotD* پس از کشت کلونی‌های واجد پلاسمید نوترکیب و القای آن توسط IPTG روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد بررسی شد (شکل ۳). نتایج بیان پروتئین روی ژل SDS-PAGE نشان‌دهنده حضور یک باند در محدوده‌ی ۸۲ کیلودالتون بود که با اندازه‌ی قطعه‌ی ۲۱۴۲ جفت بازی و همچنین با احتساب بخش الحاقی (حدود ۴ کیلودالتون) مربوط به pET28a مطابقت داشت. سپس با استفاده از بافرهای لیزکننده‌ی فاقد ایمیدازول (بافر A) و واسرشت کننده حاوی اوره ۸ مولار، محلول بودن یا تجمع آن در اجسام انکلوژنی مشخص شد که به دلیل عدم مشاهده‌ی باند قوی در نمونه حاصل از بافر A و وجود پروتئین CooD-CotD بیشتر در نمونه مرتبط با بافر

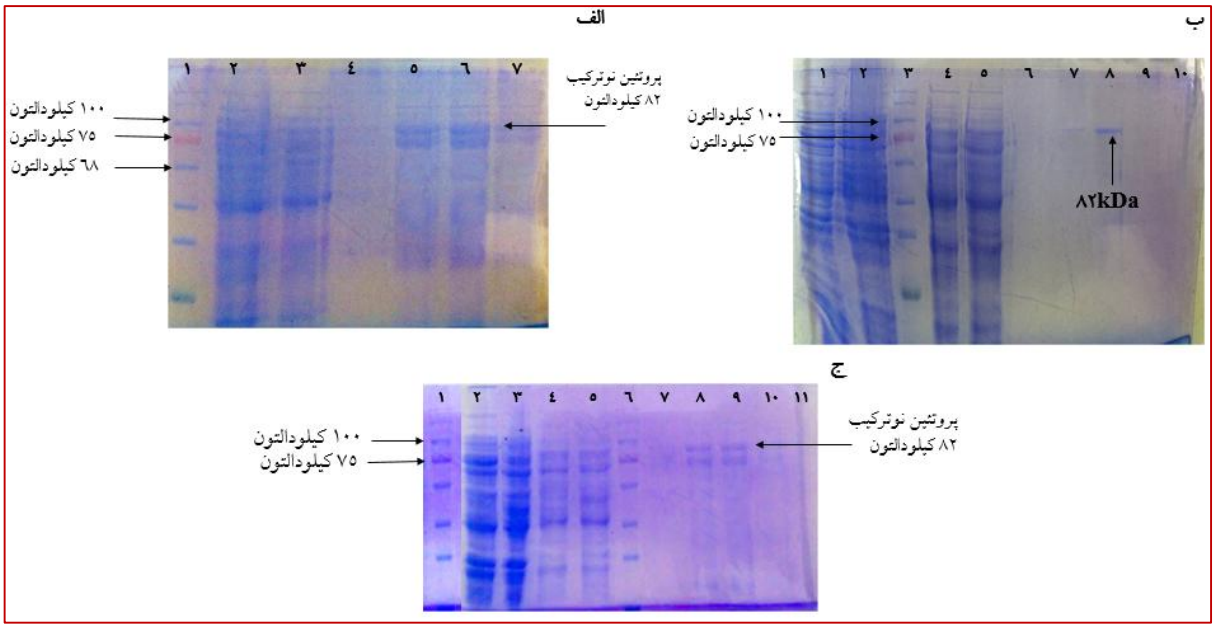
[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

B، غیر محلول بودن پروتئین بیانی نشان داده شد ازاین‌رو بیانگر آن است که پروتئین موردنظر تشکیل اجسام انکلوژنی می‌دهد (شکل ۳). پس از لیز سلول‌ها با مقدارهای متفاوت بافر لیزکننده حاوی اوره ۸ مولار، تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA در گرادیان pH بافر شستشو به‌منظور حذف باندهای غیراختصاصی انجام شد و نمونه‌های خروجی از



شکل ۳- بررسی بیان پروتئین CooD-CotD بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد

الف: الکتروفورز بیان نمونه‌های ۵ ساعت: ستون ۱) نمونه قبل از القا، ستون ۲ تا ۵) کلون‌های القاء شده با IPTG، ستون ۶) نشانگر اندازه پروتئین. ب: بررسی حلالیت پروتئین نوترکیب: ستون ۱) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۲) پروتئین نوترکیب بیان‌شده در فاز محلول، ستون ۳) محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های لیز شده و حل‌شده در بافر حاوی اوره ۸ مولار.



شکل ۴- بررسی تخلیص پروتئین‌های نوترکیب CooD-CotD بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد

الف: لیز سلول‌ها با ۲ میلی‌لیتر اوره ۸ مولار و ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS- PAGE: ستون ۱) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۲) نمونه خروجی از ستون قبل از شستشو، ستون ۳) نمونه خروجی از ستون پس از شستشو با بافر D (pH:5.7)، ستون ۴ تا ۷) پروتئین تخلیصی خارج‌شده از ستون با بافر استخراج E .

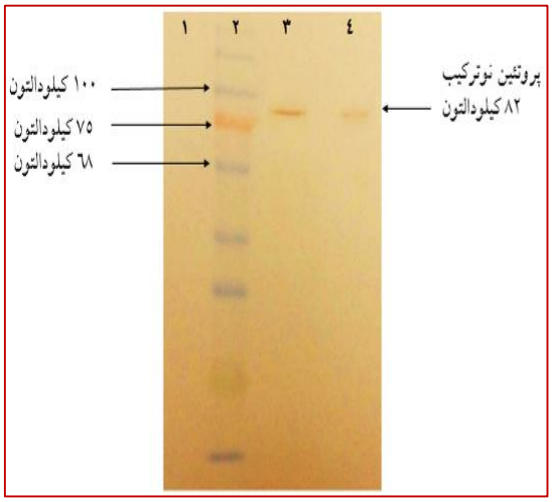
ب: لیز سلول‌ها با ۴ میلی‌لیتر اوره ۸ مولار: ستون ۱) نمونه‌ی قبل از القا، ستون ۲) پروتئین تولیدشده توسط باکتری *E.coli* BL21(DE3) قبل از تخلیص. ستون ۳) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۴) نمونه خروجی از ستون قبل از شستشو، ستون ۵) نمونه خروجی از ستون پس از شستشو با بافر D (pH:5.5)، ستون ۶ تا ۹) پروتئین تخلیصی خارج‌شده از ستون با بافر استخراج E، ستون ۱۰) نمونه خارج‌شده از ستون با بافر MES.

ج: لیز سلول‌ها با ۴ میلی‌لیتر اوره ۸ مولار: ستون ۱ و ۶) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۲) نمونه‌ی قبل از القا، ستون ۳) نمونه‌ی شاهد، ستون ۴) نمونه خروجی از ستون قبل از شستشو، ستون ۵) نمونه خروجی از ستون پس از شستشو با بافر D (pH:5.6)، ستون ۷ تا ۱۰) پروتئین تخلیصی خارج‌شده از ستون با بافر استخراجE ، ستون ۱۱) نمونه خارج‌شده از ستون با بافر MES.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

ستون جمع‌آوری گردید (شکل ۴). صحت پروتئین نوترکیب تولیدشده با روش وسترن بلات و آنتی‌بادی ضد هیستیدین بررسی شد (شکل ۵).

بعد از انجام مراحل تخلیص، تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد صورت گرفت که بر اساس نمودار استاندارد برادفورد میزان پروتئین تخلیص شده ۱۲۱ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. صحت پروتئین نوترکیب تولیدشده و عدم مشاهده باند غیراختصاصی با روش وسترن بلات بررسی شد. آنتی‌بادی ضد هیستیدین توالی شش آمینواسیدی هیستیدین پروتئین نوترکیب را شناسایی و با آن واکنش داد (شکل ۵).



شکل ۵- تأیید پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلاتینگ با استفاده از anti-His-Tag

ستون ۱) نمونه‌ی قبل از القا، ستون ۲) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۳ و ۴) نمونه‌ی بعد از القا

بحث و نتیجه‌گیری

در میان سویه‌های متفاوت *E. coli*، ETEC علت عمده‌ی اسهال کودکان کشورهای درحال‌توسعه و اسهال مسافرتی است که سالانه منجر به مرگ حدود ۳۸۰۰۰۰ نفر می‌شود که معمولاً از طریق خوراکی یا تماس با مدفوع آلوده به عفونت مبتلا شده‌اند (۱۸). ازاین‌رو، جهت کنترل عفونت ETEC ۲ روش مسدود کردن اتصال باکتری‌ها به گیرنده‌های CF و حذف فعالیت‌های انتروتوکسین در سلول‌های اپیتلیال روده وجود دارد (۱۹). ازآنجایی‌که ETEC دارای سویه‌های مختلفی است که عوامل کلونیزاسیون نمایان شده در سطح آن متفاوت است، لذا تلاش در این راستا است تا واکسن‌هایی طراحی شود که طیف وسیعی از سویه‌ها را پوشش داده و بتواند علیه آن‌ها ایمنی ایجاد کند (۲۰). واکسن‌های آزمایشی شامل سویه‌های تمام سلولی *E. coli* که یک توکسین و یک آنتی‌ژن چسبنده یا ترکیب هر دو آنتی‌ژن را به‌عنوان واکسن زیرواحدی بیان می‌کنند، ایمنی ضد عامل چسبنده و ضد توکسین را در میزبان دریافت‌کننده ایجاد می‌کنند (۲۱). در طراحی کاندیدای واکسن توجه بسیاری به پروتئین‌های کایمر می‌شود. پروتئین‌های کایمر دارای زیرواحدهای پروتئینی، لینکرها و توالی‌هایی با خاصیت ادجوانتی هستند که نه‌تنها سبب افزایش ایمونوژنیسیتی پروتئین نوترکیب می‌شود، بلکه منجر به بروز پاسخ ایمنی سلولی و هومورال می‌شود (۲۲). معصومه آل رسول و همکاران عملکرد آنتی‌ژن CS3 ترکیب‌شده با توکسوئید LT را موردبررسی قراردادند که در مطالعه آن‌ها توالی‌های کدکننده cstH و eltB توسط یک لینکر مناسب با یکدیگر ترکیب شدند. یافته‌های معصومه آل رسول و همکاران نشان داد که پروتئین کایمر شامل CstH و LTB پاسخ ایمنی بهتری را نسبت به CstH به‌تنهایی ایجاد می‌کند که درنتیجه پروتئین نوترکیب باعث ایجاد آنتی‌بادی ضد چسبندگی علیه ETEC می‌شود (۲۳). نرگس زینال‌زاده در مطالعه‌ی خود از استراتژی آنتی‌ژن فیوژن به‌منظور ساخت یک پروتئین نوترکیب چهار ظرفیتی به نام 3CL تشکیل‌شده از cfaB زیر واحد ساختاری CFA/I و زیر واحد ساختاری CS6، توکسوئید LTB و STa از ETEC استفاده کرد و بعدازآن ایمنی‌زایی ضد CF و ضد توکسین را بررسی کرد. نتایج نشان داد که آنتی‌بادی‌های القاء شده ضد چسبندگی (anti-cfaB) و ضد سم (anti-STa و anti-LT) نه‌تنها خنثی‌کننده هستند بلکه در برابر اسهال ETEC محافظ هستند (۱۹). مولکول *cooD* و *cotD* به‌عنوان زیرواحدهای رأسی فیمبریه‌های CS1 وCS2 در تعامل این ساختارهای سطحی با گیرنده روی سلول هدف نقش مهمی دارند. ازاین‌رو در این مطالعه توالی کدکننده دو پروتئین CooD, CotD به‌منظور جلوگیری از تداخل شکل فضایی هریک از پروتئین‌ها توسط یک لینکر به هم متصل شدند. در این مطالعه با موردتوجه قرار دادن استراتژی تولید یکی از کاندیدای واکسن‌های زیرواحدی، روند انجام کار با دو رویکرد همسانه سازی و زیرهمسانه‌سازی به‌منظور بررسی بیان ژن کایمریک صورت پذیرفت. در اولین رویکرد به‌منظور همسانه سازی قطعه موردنظر، پس از سنتز ژن کایمریک *cotD -cooD* و طراحی

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

پرایمر اختصاصی آن، به‌منظور تکثیر ژن، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از آنزیم *pfu* انجام شد. قطعات حاصل از واکنش PCR با آنزیم *pfu* دارای انتهای صاف هستند که همسانه سازی مستقیم آن‌ها را به ناقل کلونینگ pJET1.2/blunt مقدور می‌سازد. مزیت کیت pJET1.2/ blunt این است که می‌توان هر قطعه‌ای را با انتهای صاف (blunt) یا چسبنده (Sticky) در آن کلون کرد. این وکتور دارای یک ژن کشنده eco47IR است که بااتصال قطعه‌ی موردنظر به داخل جایگاه کلونینگ مختل می‌شود. در این تحقیق پس از طی مراحل زیرهمسانه‌سازی در ناقل بیانی pET28aبه‌منظور بیان پروتئین نوترکیب CooD-CotD از میزبان *اشرشیا کلی* سویه بیانی BL21(DE3)استفاده گردید. سویه‌ی بیانی BL21(DE3) به دلیل عدم وجود پروتئازهای سلولی ompT و Lon و کاهش فعالیت پروتئازی برای تولید پروتئین نوترکیب مناسب است. وکتورهای سری خانواده pET به‌نوعی پیشرفته‌ترین وکتورهایی هستند که درزمینه‌ی کلونینگ و بیان در سیستم پروکاریوتی مورداستفاده قرار می‌گیرند. در این سیستم توالی کدکننده پروتئین موردنظر در پایین‌دست پروموتر T7 کلون می‌شود که ناقل بیانی با داشتن پروموتر T7 قادر به بیان توالی ژنی پایین‌دست است و بعد از بیان پروتئین نوترکیب به انتهای آمین آن نشانگر 6HisTag را می‌افزاید سپس به سویه *E. coli* انتقال می‌یابد. این نشانگر همراه قطعه‌ی پروتئینی به ستون نیکل متصل می‌شود و هیچ‌گونه تغییر در ساختار پروتئین ایجاد نمی‌کند و موجب تسهیل در تشخیص و خالص‌سازی پروتئین‌ها می‌شود؛ اما یک مشکل بالقوه در تخلیص پروتئین عدم دسترسی نشانگر پروتئین به دلیل مسدودشدن در پروتئین پیچ‌خورده است (۲۴). مسئله‌ی دیگر در استفاده از نشانگرهای پلی‌هیستیدین اتصالات غیراختصاصی پروتئین فاقد برچسب است. اگرچه تنها ۲٪ از اسیدآمینه‌های پروتئین دارای هیستیدین هستند، اما برخی از پروتئین‌های سلولی دارای ۲ یا بیشتر از اسیدآمینه‌های هیستیدین مجاور می‌باشند (۲۵). لذا به دنبال اتصال پروتئین‌های محلول نشان‌دار شده می‌توان ستون نیکل را به‌منظور حذف پروتئین‌های غیراختصاصی دارای اتصالات ضعیف به ستون با گنجاندن ایمیدازول در بافر (D) شستشو داد و در روش دیگر به دنبال اتصال پروتئین‌های نامحلول نشان‌دار شده، کاهش pH بافر شستشو نسبت به بافر اتصالی می‌تواند باعث حذف اتصال پروتئین‌های غیراختصاصی شود (۲۶). در این مطالعه نیز به‌منظور حذف باندهای غیراختصاصی از گرادیان pH مربوط به بافر شستشو حاوی اوره استفاده شد و با اعمال تغییر pH از 5.7 به 5.5 باندهای غیراختصاصی حذف شدند. ازآنجایی‌که بیان و تخلیص پروتئین نقش مهمی را در زیست‌شیمی دارد و سیستم *E. coli* میزبان مناسب برای بیان پروتئین نوترکیب است بااین‌حال بیان پروتئین‌های غشایی و پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بیش از ۶۰ کیلودالتون در آن دشوار است (۲۷)؛ بنابراین بیان بالای پروتئین از طریق بررسی پارامترهای متعدد ازجمله شرایط مولکولی و فیزیولوژیکی حاصل می‌شود که شایع‌ترین روش‌ها برای افزایش بیان پروتئین نوترکیب در *E. coli* عبارت‌اند از: انتخاب و طراحی پروموتر مناسب، مهندسی تنظیم‌کننده رونویسی و پروموتر، تنظیم تعداد کپی وکتور، افزایش طول عمر mRNA، بهینه‌سازی کدون است (۲۸). در این مطالعه بیان پروتئین نوترکیب CotD-CooD با استفاده از *E. coli* BL21(DE3)، وکتورpET28-a مبنی بر پروموتر کارآمد T7، بهینه‌سازی کدون DNA سنتزی موردبررسی قرار گرفت که با توجه به داده‌های حاصل از این مطالعه، پروتئین CotD- CooD به‌خوبی بیان و خالص‌سازی گردید و همچنین با توجه به عدم مشاهده باند غیراختصاصی در آزمون وسترن بلات، به نظر می‌رسد که ابن پروتئین می‌تواند آماده بهره‌برداری درزمینه‌ی ایمنی‌زایی باشد و به‌عنوان جزئی از کاندیدای واکسن علیه عفونت ETEC استفاده شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک (با کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1397.065) مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

References

1. Qadri F, Svennerholm A-M, Faruque A, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: pidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clinical microbiology reviews. 2005;18(3):465-83.
2. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic Escherichia coli infection. Microbes and Infection. 2010;12(2):89-98.
3. Jansson L, Tobias J, Jarefjäll C, Lebens M, Svennerholm A-M, Teneberg S. Sulfatide recognition by colonization factor antigen CS6 from enterotoxigenic Escherichia coli. PloS one. 2009;4(2):e4487.
4. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of Escherichia coli. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2009;73(4):750-74.
5. Marchou B. Traveller's diarrhea: epidemiology, clinical practice guideline for the prevention and treatment. Presse medicale (Paris, France: 1983). 2013;42(1):76-81.
6. Liaqat I. Biofilm formation and binding specificities of CFA/I, CFA/II and CS2 adhesions of enterotoxigenic Escherichia coli and Cfae-R181A mutant. Brazilian Journal of Microbiology. 2012;43(3):969-80.
7. Cravioto A, Gross R, Scotland S, Rowe B. Mannose-resistant haemagglutination of human erythrocytes by strains of Escherichia coli from extraintestinal sources: lack of correlation with colonisation factor antigen (CFA/I). FEMS Microbiology Letters. 1979;6(1):41-4.
8. Perez-Casal J, Swartley JS, Scott JR. Gene encoding the major subunit of CS1 pili of human enterotoxigenic Escherichia coli. Infection and immunity. 1990;58(11):3594-600.
9. Galkin VE, Kolappan S, Ng D, Zong Z, Li J, Yu X, et al. The structure of the CS1 pilus of enterotoxigenic Escherichia coli reveals structural polymorphism. Journal of bacteriology. 2013;195(7):1360-70.
10. Voegele K, Sakellaris H, Scott JR. CooB plays a chaperone-like role for the proteins involved in formation of CS1 pili of enterotoxigenic Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997;94(24):13257-61.
11. Sakellaris H ,Penumalli VR, Scott JR. The level of expression of the minor pilin subunit, CooD, determines the number of CS1 pili assembled on the cell surface of Escherichia coli. Journal of bacteriology. 1999;181(5):1694-7.
12. Jordi BJ, van Vliet AH, Willshaw GA ,van der Zeijst BA, Gaastra W. Analysis of the first two genes of the CS1 fimbrial operon in human enterotoxigenic Escherichia coli of serotype 0139: H28. FEMS microbiology letters. 1991;80(2-3):265-70.
13. Froehlich BJ, Karakashian A, Sakellaris H, Scott JR. Genes for CS2 pili of enterotoxigenic Escherichia coli and their interchangeability with those for CS1 pili. Infection and immunity. 1995;63(12):4849-56.
14. roehlich BJ, Karakashian A, Meisen LR, Wakefield JC, Scott JR. CooC and CooD are required for assembly of CS1 pili. Molecular microbiology. 1994;12(3):387-401.
15. Nazarian S, Amani J. Pathogenesis and Vaccines against Enterotoxigenic Escherichia Coli. JBUMS. 2017;19(6):13-21.
16. Tobias J, Svennerholm A-M, Holmgren J, Lebens M. Construction and expression of immunogenic hybrid enterotoxigenic Escherichia coli CFA/I and CS2 colonization fimbriae for use in vaccines. Applied microbiology and biotechnology. 2010;87(4):1355-65.
17. Nandre RM, Ruan X, Duan Q, Sack DA, Zhang W. Antibodies derived from an enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) adhesin tip MEFA (multiepitope fusion antigen) against adherence of nine ETEC adhesins: CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS21 and EtpA. Vaccine. 2016;34(31):3620-5.
18. Hayat S-MG, Gargari S-LM, Nazarian S . Construction and immunogenic properties of a chimeric protein comprising CfaE, CfaB and LTB against Enterotoxigenic Escherichia coli. Biologicals. 2016;44(6):503-10.
19. Zeinalzadeh N, Salmanian AH, Goujani G, Amani J, Ahangari G, Akhavian A, et al. A Chimeric protein of CFA/I, CS6 subunits and LTB/STa toxoid could protect immunized mice against enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiology and Immunology. 2017;61(7):272-9.
20. Svennerholm A-M, Lundgren A. Recent progress toward an enterotoxigenic Escherichia coli vaccine. Expert review of vaccines. 2012;11(4):495-507.
21. Zhang W, Zhang C, Francis DH, Fang Y, Knudsen D, Nataro JP, et al. Genetic fusions of heat-labile (LT) and heat-stable (ST) toxoids of porcine enterotoxigenic Escherichia coli elicit neutralizing anti-LT and anti-STa antibodies. Infection and immunity. 2010;78(1):316-25.
22. Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. Nature Reviews Immunology. 2001;1(3):209-19.
23. Alerasol M ,Gargari SLM, Nazarian S, Bagheri S. Immunogenicity of a fusion protein comprising coli surface antigen 3 and labile B subunit of enterotoxigenic Escherichia coli. Iranian biomedical journal. 2014;18(4):212.
24. Crowe J, Dobeli H, Gentz R, Hochuli E, Stiiber D, Henco K. 6xffis-ni-nta chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. Protocols for gene analysis. 1994;31:371-87.
25. Schmitt J, Hess H, Stunnenberg HG. Affinity purification of histidine-tagged proteins. Molecular biology reports. 1993;18(3):223-30.
26. Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. Methods in enzymology. 2000;326:245-54.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

27. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli :advances and challenges. Frontiers in microbiology. 2014;5:172.

28. Choi T-J, Geletu TT. High level expression and purification of recombinant flounder growth hormone in E. coli. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2018;in press, doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.006.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]

Oiginal Article

Cloning and the Evaluation of Gene Expression and Purification of Gene Encoding Recombinant Protein Containing Binding Subunit of Coli Surface Antigens CS1 and CS2 from Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Khobbakht D[1], Amani J[2*], Zare S[3], NourMohammadi Z[1]

1. Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Research Branch, Tehran, Iran
2. Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva, Branch Islamic Azad University, Varamin, Iran

Received: 27 Jun 2018 Accepted: 10 Dec 2018

Abstract

Background & Objective: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is a major causative agent of diarrhea. Enterotoxins and the colonization factors (CFs) are major virulence factors in ETEC infections. The bacterium binds to the intestinal epithelial cell surface through colonization factors and produces enterotoxins that cause excessive fluid and electrolyte secretion in the lumen of the intestine, which ultimately leads to diarrhea. Due to the difficulty of treatment and the high prevalence of this disease, the design of the vaccine against this organism is one of the goals of the World Health Organization. The CooD-CotD protein, as adhesion tip subunits of CS1 and CS2, plays an important role in bacterial attachment to the intestinal epithelial cells. In this study, the expression and purification of chimeric protein CooD-CotD was carried out with the aim of investigating as candidate vaccine.

Materials & Methods: In this study, codon optimization of *cooD-cotD* chimeric gene was performed by Gene Designer software. The gene was amplified by PCR and cloned into pJET1.2 / blunt then it was subcloned into pET28a to express chimeric protein. Recombinant protein was purified following expression, using Ni-NTA affinity chromatography and confirmed by western blotting analysis.

Results: The presence of 82kDa in the SDS-PAGE gel showed that expression of CooD-CotD chimeric protein and confirmed by western blotting analysis. Yield of purified protein was 121 mg/ml.

Conclusions: Expression and protein purification studies showed that this protein has expression in the homologous host.

Keywords: Enterotoxigenic Escherichia coli, CS1, CS2, Recombinant expression

***Corresponding Author: : Amani Jafar,** Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: jafar.amani@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-5155-4738

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 1025-1035

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-10]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.16.2]