

## کلون و بیان ژن fliC به عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری تیفوئید

زهرآ عادل<sup>۱</sup>، نجمه فراهانی<sup>۲</sup>، سید احمد موسوی<sup>۳</sup>، سید یعقوب صهری<sup>۴</sup>، حکمت الله مرادی موگرمون<sup>۵</sup>، سید محمد غیبی حیات<sup>۶\*</sup>

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

## چکیده

**پیش زمینه و هدف:** سالمونلا انتریکا یک پاتوژن زئونوز است که می تواند باعث تب تیفوئید در انسان و حیوان شود. این باکتری یکی از علل مهم عفونت های ناشی از مواد غذایی در انسان در سراسر جهان است. از مطالعات اخیر تخمین زده می شود که سالانه حدود ۲۲ میلیون مورد ابتلا به این بیماری گزارش می شود که از این تعداد ۲۰۰ هزار نفر را به کام مرگ می کشاند. فلاژلینی که توسط fliC کد می شود نقش مهمی در بیماری زایی دارد و می تواند به عنوان آنتی ژنی قوی در واکسن مورد استفاده قرار گیرد. این مطالعه باهدف تولید پروتئین نوترکیب fliC به عنوان 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 مورد نظر با توجه به ترجیح کدون E. coli ساخته شد. ژن سنتتیک از وکتور pUC57 به وکتور بیانی pET28a+ زیرهمسانه سازی 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 بهینه سازی گردید. پروتئین نوترکیب حاوی His-Tag به وسیله ستون کروماتوگرافی تعویض یون Ni-NTA Agarose خالص سازی شد. پروتئین خالص شده با آزمایش وسترن بلات تأیید شد.

**یافته ها:** وکتور نوترکیب با واکنش PCR و نیز آنالیز آنزیم های تحدیدی تأیید شد. آزمایش SDS-PAGE وجود یک پروتئین ۵۱ کیلو دالتونی با خلوص مناسب را نشان داد. همچنین آزمایش وسترن بلات با آنتی بادی His-tag پروتئین مدنظر را تأیید نمود.

**بحث و نتیجه گیری:** امروزه استفاده از واکسن های نوترکیب بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر ژن یکی از مهم ترین فاکتورهای بیماری زایی باکتری سالمونلا همسانه سازی و پروتئین مربوط به آن تولید و تخلیص شده است. این پروتئین می تواند به عنوان یکی از کاندیداهای مناسب در واکسن های نوترکیب علیه تیفوئید مورد استفاده قرار گیرد.

**کلیدواژه ها:** 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

می توان به خستگی، ضعف، دل درد، سردرد، بی اشتها و برخی اوقات التهابات پوستی اشاره نمود. این باکتری در اثر خوردن آب آلوده به مدفوع یا ادرار انسان مبتلا وارد بدن می شود و چون این میکروب به همین طریق از بدن بیمار خارج می شود می تواند توسط دست ناقلینی که در تهیه و توزیع میوه ها و سایر غذاها دخالت دارند

حصبه یا تب تیفوئید، یک بیماری حاد باکتریال است که در اثر یک باسیل گرم منفی به نام سالمونلا تیفی از خانواده انتروباکتریاسه ایجاد می شود. اولین مورد مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا توسط شخصی بنام Gartner در سال ۱۸۸۸ در آلمان گزارش شد (۱). شایع ترین علامت بیماری حصبه، تب مداوم است. از دیگر علائم

<sup>۱</sup> دپارتمان میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

<sup>۲</sup> دپارتمان ژنتیک و زیست ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۳</sup> دپارتمان بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

<sup>۴</sup> دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، بیمارستان نجمیه، تهران، ایران

<sup>۵</sup> مرکز تحقیقات ارتقاء کیفیت آموزش بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

<sup>۶</sup> کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

در نظر گرفت و واکسن‌های تهیه‌شده از جسم سلولی باکتری‌های کشته‌شده در القاء پاسخ‌های ایمنی محافظت بخش قابل توجه و پایدار چندان موفق نیستند (۱۵-۱۸). ولی ساخت پروتئین‌های نو ترکیب کایمر با روش‌های مهندسی ژنتیک همراه با ادجوانت (۱۹) از یک طرف 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 نو ترکیب FliC به عنوان 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 مورد استفاده در SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) و دیگر آنزیم‌ها و مواد مورد استفاده از شرکت Fermentase خریداری شدند. پرایمرهای مورد استفاده 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 *HindIII* و *EcoRI* (جهت همسانه‌سازی ژن درون وکتور مورد نظر) بررسی و جایگاه برشی آنزیم *HindIII* و *E. coli* به دو طرف قطعه طراحی شده 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 به پیش بینی می‌پردازد. پس از اتمام مطالعات بیوانفورماتیکی توالی مذکور جهت سنتز به شرکت کانادایی Biomatik تحویل داده شد.

### زیر همسانه‌سازی ژن FliC:

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 گاوآژ 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 به صورت 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. سالانه ۱۷ میلیون نفر به این بیماری دچار شده و ۶۰۰ هزار نفر نیز در نتیجه 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).

به‌طور کلی عوامل حدت در سالمونلا را بر اساس کنترل ژنتیک آن‌ها می‌توان به دو گروه عمده تقسیم نمود: عوامل حدت‌زای کروموزومی و پلاسمیدی. در این بین اهمیت فلاژل به عنوان 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 به خوبی به تأیید رسیده است (۱۱-۱۴).

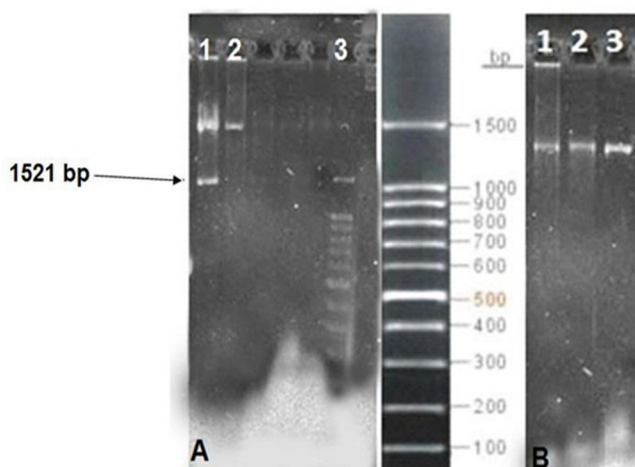
تابه حال دو نوع واکسن برای این بیماری معرفی شده است. واکسن غیرفعال (کشته‌شده) که باید تزریق شود و واکسن زنده ضعیف شده که به صورت دهانی مصرف می‌شود. عوارض آلرژیک مصرف این واکسن‌ها از خفیف تا شدید می‌تواند وجود داشته باشد. از واکنش‌های ملایم در مورد واکسن تزریقی حصبه می‌توان به تب (۱ درصد)، سردرد (بیش 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

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 pET28a گردد. بدین منظور وکتور pUC57 حاوی ژن FliC و پلاسمید pET28a در دو میکروتیوپ جداگانه با دو آنزیم HindIII و E.coRI مورد هضم قرار گرفته و سپس هرکدام بر روی ژل آگاروز 1 درصد، الکتروفورز شدند. همان‌طور که در شکل ۱ قسمت A مشاهده می‌شود ژن FliC بر اثر هضم آنزیمی از وکتور pUC57 خارج شده و در جایگاه صحیح نسبت به نشانه اندازه مولکولی DNA قرار گرفته. در قسمت B پلاسمید pET-28a برش خورده و به صورت 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 خارج شده است. ردیف 3 نشانگر اندازه مولکولی (B) وکتور pET28a برش خورده که به صورت خطی درآمده است. ردیف ۱، ۲ و ۳: وکتور برش خورده که خطی شده است.

ژن سفارش داده شده در وکتور pUC57 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 به صورت جداگانه بر روی وکتورهای pET28 و pUC57 انجام شد. ژن FliC از محصول هضم آنزیمی وکتور pUC57 به وسیله کیت استخراج ژل (Fermentase) از ژل تخلیص شد و سپس اتصال بین وکتور pET28a خطی و ژن FliC به وسیله آنزیم T4 DNA لیگاز و در دمای اتاق انجام گرفت. در ادامه ۵ میکرو لیتر از محصول اتصال برای تراریخت کردن باکتری‌های مستعد *E. coli* BL21DE3 به روش شوک حرارتی استفاده شد. مرحله تراریخت کردن به وسیله شوک حرارتی به این ترتیب بود: قرار دادن باکتری مستعد شده بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه، انتقال پلاسمید نو ترکیب 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 نو ترکیب بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، انکوبه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول شب. در نهایت 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 طراحی شده و آنزیم Taq DNA Polymerase صورت گرفت و سپس محصول PCR روی ژل آگاروز 1 درصد الکتروفورز شد. واکنش هضم آنزیمی نیز به صورت جداگانه بر روی پلاسمید استخراج شده و با استفاده از آنزیم‌های E.coRI و HindIII نیز انجام شد.

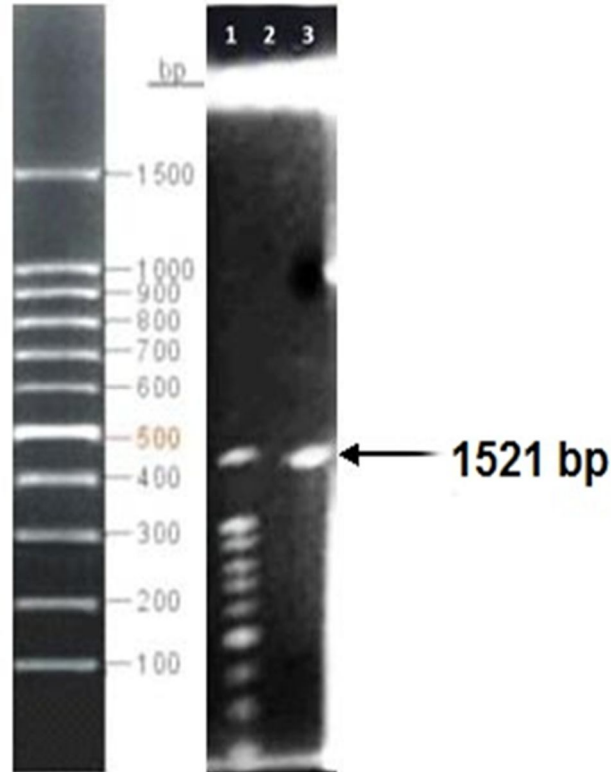
### بیان پروتئین:

از کلنی حاوی پلاسمید در محیط ناترینت برات حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط لوریا برتانی برات اضافه و بر روی انکوباتور شیکردار و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده تا به OD ۰.۵، در طول موج 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:

۲ مشاهده می‌شود. کیفیت تخلیص جهت واکنش الحاق مناسب بود.

پلاسمیدهای برش خورده pUC57 روی ژل آگاروز ۱ درصد با دمای ذوب پائین الکتروفورز شدند. سپس ژن *FliC* از روی ژل بریده شده و با استفاده از کیت تخلیص شد. همان گونه که در شکل



شکل (۲): وکتور pUC57 برش خورده، ردیف ۱: نشانگر اندازه مولکولی، ردیف ۳: قطعه *FliC* خارج شده

BL21DE3 تراریخت گردید و روی محیط آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شد (شکل ۳).

واکنش اتصال ژن *FliC* و پلاسمید pEt28 به وسیله آنزیم T4 DNA ligase انجام گردید و فرآورده واکنش الحاق، با روش شوک حرارتی در سلول‌های مستعد اشریشیا کلی سویه

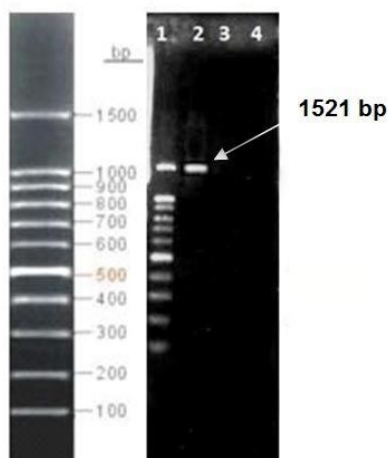


شکل (۳): کلونی‌های نوترکیب *E. coli* BL21DE3 رشد یافته بر روی پلیت آگار LB

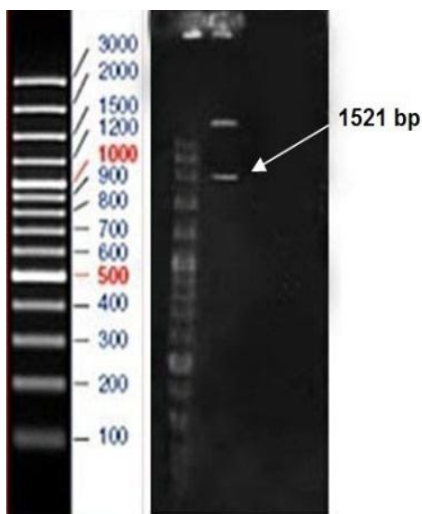
## بررسی صحت زیرهمسانه‌سازی:

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

پیش‌بینی شده در ژل الکتروفورز قرار گرفته (شکل ۴). واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *E.coRI* و *HindIII* نیز تأیید 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



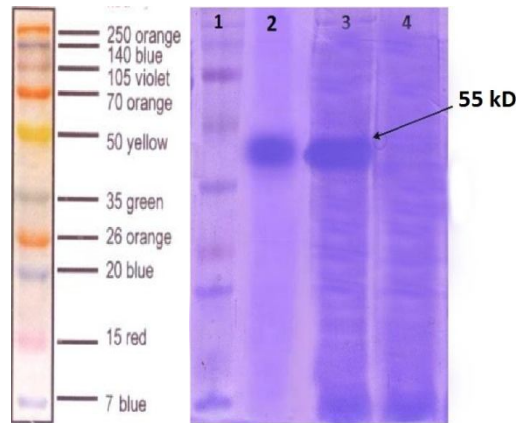
PCR

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 فیلوژن ۲

کیلودالتونی pEt28). بعد از تغییر پارامترهای مختلف مانند دمای القاء، زمان انکوباسیون و نیز غلظت IPTG غلظت پروتئین بیان‌شده در نمونه‌های القاشده به‌شدت افزایش یافت (شکل ۶).

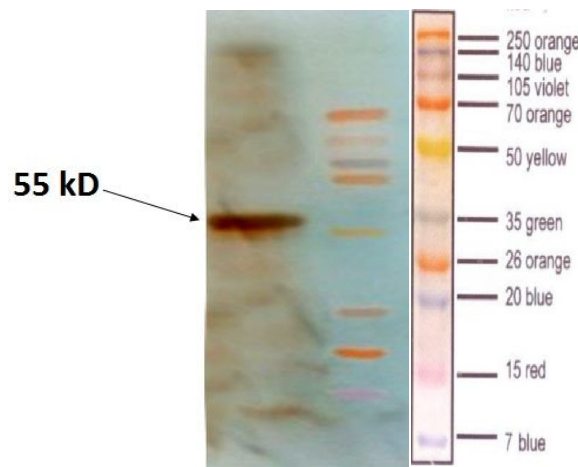


**شکل (۶):** بررسی بیان ژن FliC ردیف ۱: نشانگر پروتئینی Fermentas ردیف ۲: پروتئین تخلیص شده با ستون نیکل (Ni-NTA) ردیف ۳: کلون‌های القاء شده با IPTG ردیف (۵۵ کیلو دالتون) ۴: کلون القا نشده با IPTG

### تخلیص و تأیید پروتئین FliC:

تخلیص پروتئین نوترکب 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 نوترکب تولیدشده، از روش وسترن بلات استفاده شد. برای انجام

وسترن بلات پروتئین نوترکب 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 نوترکب واکنش می‌دهد.



**شکل (۷):** تأیید پروتئین نوترکب به روش وسترن بلات با استفاده از آنتی his tag (۵۵ کیلو دالتون)

### بحث و نتیجه گیری

سالمونلا تیفی باسیل گرم منفی درون سلولی 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 قابل توجه و پایدار چندان موفق نیستند و همچنین دارای عوارض

بسیاری هستند. ساخت پروتئین‌های نوترکب کایمر با روش‌های مهندسی ژنتیک همراه با ادجوانت از یک‌طرف 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 زیرهمسازسازی و به میزبان E.coli BL21DE3 تراریخت شد تولید و در انتها بیان پروتئین نوترکب القا و با ستون نیکل تخلیص گردید.

هومورال می‌توان از بروز باکتری می و سپتی سمی که اغلب کشنده است پیشگیری نمود (۲۶).

با توجه به اینکه پروتئین FliC یکی از مهم‌ترین عوامل ویروانس بیماری تیفوئید بوده و دارای خواص ایمونوژنسیستی بالایی است می‌تواند به‌عنوان یکی از کاندیداهای مناسب در واکسن‌های نو ترکیب علیه تیفوئید مورد استفاده 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 می‌نمایم.

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 پلی‌والن غیرفعال را مورد ارزیابی قرار دادند (۲۵). واکسن‌های کشته تزریقی هرچند ممکن است ایمنی مخاطی را در روده تحریک نمایند اما با تحریک ایمنی

### References:

- Humphrey T. Public-health aspects of Salmonella infection. *Salmonella in domestic animals*; 2000. P.245–63.
- 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](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNAAH127.pdf)
- Miller SI, Hohmann E, Pegues D. Salmonella (including Salmonella typhi). Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995.
- Dhawan A, Marwaha RK. Acute glomerulonephritis in multi-drug resistant Salmonella typhi infection. *Indian Pediatr* 1992;29(8):1039–41.
- Van Oye E. The world problem of salmonellosis. Springer Science & Business Media; 2013.
- Hollinger K. Epidemiology and salmonellosis. *Salmonella in Domestic Animals*; 2000. P. 341-54.
- Böhme G, Kühn H, Tschäpe H, Rabsch W. Epidemiology of salmonellosis. *Z Gesamte Hyg* 1989;35(11):638–40..
- Gulig PA, Curtiss R. Plasmid-associated virulence of Salmonella typhimurium. *Infect Immun* 1987;55(12): 2891-901.
- Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002;291(8): 605-14.
- Milan C, Timm C. Virulence factors associated with biofilm formation by Salmonella enterica: mini-review. *Sci Animal Health* 2015;3(1): 94-102.
- 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/](http://scholarworks.gsu.edu/biology_diss/142/)
- Hayat SMG, Mogarmon HAM, Elyasifar B, Yazdantetad 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.
- 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.

14. Hayat SMG, Mogarmon HAM, Elyasifar B, Yazdansetad S, Azimi T. Three dimensional 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, Domsikii, 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.



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

Zahra Adeli<sup>1</sup>, Najmeh Farahani<sup>2</sup>, Seyed Ahmad Mosavi<sup>3</sup>, Seyed Yaghoob Sehri<sup>4</sup>, Hekmat Allah Moradi Mogarmoon<sup>5</sup>, Seyed Mohammad Gheibi Hayat<sup>6\*</sup>

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 cloned 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

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

<sup>2</sup> Department of Genetics and Molecular Biology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Health and Community Medicine, Faculty of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran

<sup>4</sup> Faculty of Medicine, Najmiyeh Hospital, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Education Development Center, School of Medicine, Medical University of Shiraz, Shiraz, Iran

<sup>6</sup> Student Research Committee, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran (Corresponding Author)