کلونینگ و تعیین توالی ناحیه N- ترمینال ژن IpaD شیگلا دیسانتری بومی ایران و مقایسه آن با گونه‌های ثبت شده در پایگاه‌های داده ژنی

محمد هیئت[1]، مجتبی سعادتی[2*]، بابک براتی[3]، شهرام نظریان[3]، حسین هنری[4]، مرضیه اقتدار دوست[3]، فاطمه ملایی[3]

1. کارشناس ارشد مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی- پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)-دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)
2. دانشیار گروه علوم زیستی-دانشکده علوم ومهندسی- دانشگاه امام حسین(ع)
3. کارشناس ارشد گروه علوم زیستی- دانشکده علوم و مهندسی- دانشگاه امام حسین(ع)
4. استادیار گروه علوم زیستی-دانشکده علوم ومهندسی- دانشگاه امام حسین(ع)

* **نشانی برای مکاتبه**: تهران، دانشگاه امام حسین(ع)، گروه علوم‌زیستی، دانشکده علوم ومهندسی، تلفن77104934، Saadati_m@yahoo.com

دریافت مقاله: دی هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: اسفند هشتاد و نه

چکیده

سابقه‌وهدف: *از مهم‌ترین عوامل اسهال حاد باکتریایی باسیل شیگلا می‌باشد. در فرایند تهاجم شیگلا عوامل آنتی‌ژنی متعددی دخیل هستند. IpaD یکی از این عوامل است که در اولین گام تهاجم با عملکرد منحصر به فرد ناحیه N-ترمینال خود مستقلاً در تنظیم ترشح و ورود برخی آنتی‌ژن‌ها به درون سلول میزبان مورد نیاز می‌باشد. این تحقیق با هدف کلونینگ و تعیین توالی ناحیه N-ترمینال ژن IpaD باکتری شیگلا دیسانتری بومی ایران و مقایسه بیوانفورماتیکی آن با گونه‌های ثبت شده در پایگاه‌های ژنی جهت هموارسازی مطالعاتی نظیر بیان و بررسی ایمنی‌زایی این ناحیه انجام گرفت.*

روش‌کار: *پس از تهیه یک جفت پرایمر مناسب برای ناحیه N-ترمینال، با استفاده از تکنیک PCR اقدام به تکثیر ژن گردید، محصولات PCR پس از تأیید به وکتور pGEM منتقل و با استفاده از دستگاه توالی‌یاب، توالی نوکلئوتیدی آن شناسایی و با نرم افزارهای مختلف آنالیز شد.*

یافته‌ها: *کلونینگ IpaD با استفاده از برش آنزیمی، PCR و تعیین توالی نوکلئوتیدی تأیید شد. بررسی‌ها نشان دادند که توالی ناحیه N-ترمینال ژن IpaD در سویه‌های بومی مورد مطالعه، دارای تشابه زیادی با نمونه‌های ثبت شده در پایگاه‌های داده ژنی بودند.*

نتیجه‌گیری: *اختلاف بسیار اندک توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی این ناحیه از آنتی‌ژن IpaD با نمونه‌های ثبت‌شده در پایگاه‌های ژنی نشان‌گر آن است که این ناحیه از نقشی بسیار مهم در فرایند بیماری‌زایی برخوردار است و امکان دارد که در صورت تخریب و یا سرکوب این جایگاه قسمت اعظمی از قدرت بیماری‌زایی باکتری کاسته شود. این تحقیق راهبردی مسیری را برای مطالعات ایمونولوژیکی بر روی آنتی ژن IpaD می‌گشاید.*

واژه های کلیدی: *IpaD، N- ترمینال، شیگلا دیسانتری، بیوانفورماتیک*

مقدمه

باکتری شیگلا با چهار گونه شامل شیگلا سونئی، فلکسنری، دیسانتری و بوئیدی، سبب اسهال خونی باسیلی می‌شود. این گونه‌ها براساس خصوصیات آنتی‌ژنی قسمت O پلی‌ساکارید Lps دیواره سلولی خود به سروتیپ‌های متعددی تقسیم‌بندی می‌شود. شیگلا سونئی عامل 77 درصد از گزارشات شیگلوز در کشورهای صنعتی است. شیگلا فلکسنری در کشورهای در حال توسعه اندمیک بوده و شیوع آن در سراسر دنیا حدود 60 درصد نسبت به سایر سوش‌ها بیشتراست. شیگلا دیسانتری تیپ یک (Sd_1) عامل اسهال خونی اپیدمیک بوده و در کشورهای جهان سوم، به ویژه در کشورهای آسیایی شیوع بیشتری دارد. شیگلا بوئیدی به طور کلی از شیوع کمتری نسبت به سایر گونه‌ها برخوردار است. اما اخیراً در بنگلادش و پاکستان شیوع پیدا کرده‌است(2،1).

بیماری‌زایی شیگلا در نتیجه فعالیت ژن‌های زیادی که اکثر آن‌ها بر روی پلاسمید بسیار بزرگ شیگلا مستقر هستند صورت می‌پذیرد(3). با بررسی مدل تهاجمی این باکتری به وضوح می‌توان دریافت شیگلا از طریق ترانس‌سیتوز در سلول‌های M به اپی‌تلیوم کولون میزبان حمله کرده و سپس از طریق سیستم ترشحی نوع سوم پروتئین‌های ناقل و مؤثر خود را به بیرون ترشح می‌کند(4).

در فرایند تهاجم شیگلا عوامل آنتی‌ژنی متعددی دخیل هستند که نوبت به نوبت وارد عمل می‌شود و نقش خود را ایفا می‌نمایند. از جمله پروتئین‌های اولیه و بسیار مهم در آغاز تهاجم شیگلا پروتئین IpaD می‌باشد(5). IpaD یکی از پروتئین‌های مؤثر در فرایند تهاجم می‌باشد که در تجمع سایر پروتئین‌های تهاجمی بر روی سطح اپیتلیوم نقش اساسی را ایفا می‌نماید(6). پروتئین IpaD، 332 اسیدآمینه و 37 کیلودالتون وزن دارد (7). ژن IpaD با 999 جفت باز یکی از ژن‌های موجود در اپرون Ipa (اپرون Ipa شامل چهار ژن IpaA,B,C,D می‌باشد)می‌باشد(8). نقش کلیدی این ژن که تا چند سال پیش ناشناخته بود اکنون به وضوح شرح داده شده است. در یک جمله می‌توان این‌گونه بیان نمود که IpaD در حضور نمک‌های صفراوی نظیر دزوکسی کولات مستقلاً در تنظیم ترشح و ورود کارآمد IpaB و IpaC به درون سلول میزبان مورد نیاز می‌باشد. (6،8،9). دو پروتئین ترشح شده توسط سیستم ترشحی نوع سوم (TTSS) یعنی IpaB وIpaC با تمایل زیاد به گیرنده‌های خود بر روی سطح سلول اپیتلیال، مانند CD44 متصل می‌شوند(10) و با ایجاد یک منفذ در غشاء سلول‌های اپی‌تلیال روده سبب تشکیل کیسهٔ ماکروپینوسیتیک شده که این کیسه اجازه ورود باکتری به سیتوپلاسم سلول را می‌دهد(11،12). بررسی‌های انجام شده بر روی نواحی مختلف IpaD نشان دادند که مهم‌ترین ناحیه عمل کننده در پروتئین IpaD ناحیه N-ترمینال نزدیک به مرکز یعنی ناحیه بین رزیدوها 72 تا 161 می‌باشد همچنین مطالعات نشان داده‌اند که ناحیه‌ای غنی از اپی‌توپ در این منطقه وجود دارد. این ناحیه از IpaD دقیقاً همان ناحیه‌ای است که با نمک‌های صفراوی موجود در دستگاه گوارش واکنش داده، فعال می‌شود و عملکرد منحصر به فرد خود یعنی ترشح برخی دیگر از آنتی‌ژن‌ها را انجام می‌دهد(8). هرگونه تغییر در توالی، دستکاری، تخریب و سرکوب این ناحیه می‌تواند منجر به از دست رفتن فعالیت IpaD و در نتیجه بیماری‌زا نبودن شیگلا گردد از این رو حفاظت از این ناحیه برای باکتری حیاتی می‌باشد(13،14). این تحقیق با هدف کلونینگ و مقایسه بیوانفورماتیکی ناحیه N-ترمینال ژن IpaD در باکتری شیگلا دیسانتری بومی ایران جهت سنجش میزان قرابت و حفاظت این ناحیه در مقایسه با گونه‌های ثبت شده در پایگاه‌های داده ژنی و همچنین هموارسازی مطالعاتی بعدی نظیر بیان و بررسی ایمنی‌زایی این ناحیه انجام گرفت تا در صورت ایمنی‌زایی مناسب این ناحیه بتوان از آن به عنوان یک کاندیدای مناسب برای واکسن علیه شیگلا استفاده نمود.

روش کار

باکتری شیگلا دیسانتری تهیه شده از بیمارستان میلاد-تهران، محیط کشت‌های مناسب باکتریایی، آنزیم‌های پلیمراز، محدودگر و اتصال دهنده از مهم‌ترین مواد مورد نیاز برای این تحقیق بودند. برای به انجام رساندن این طرح تحقیقاتی ابتدا می‌بایست سوش‌های کلینیکال تهیه شده را مورد آزمایش قرار داد تا از صحت آن‌ها اطمینان حاصل گردد. به این منظور از دو روش بیوشیمیایی و تست آنتی‌بیوگرام بهره گرفته شد و صحت سوش‌ها مورد تأیید قرار گرفت. پس از احراز صحت گونه‌ها سکانس ژنی IpaD شیگلا دیسانتری از پایگاه‌های داده ژنی مختلف (نظیر SRS و Gene Bank) استخراج گردید. در ادامه با استفاده از نرم افزار Oligo اقدام به طراحی پرایمرهای پیشرو و پیرو گردید. بدین ترتیب که از درون ژن IpaD و در ناحیه N-ترمینال نزدیک به مرکز آن یک ناحیه 344 جفت بازی که در همه گونه‌های شیگلا وجود داشت و از یک همسانی ویژه برخوردار بود انتخاب و با مشخص نمودن قسمت‌های ابتدایی و انتهایی آن پرایمرها زیر طراحی شدند.: پرایمرپیشرو ´۵ ATCAGAACAACAAATCAG´۳ :پرایمر پیرو´۵ CGTTAGTACTTCTTAAGTATATGAACTTAAG CTTTCTTA´۳

در پرایمرهای فوق، نواحی برش نیز طراحی شدند بدین ترتیب که در انتهای ´۵ پرایمر پیشرو ناحیه برش EcoRI و در انتهای ´۵ پرایمر پیرو ناحیه برش HindIII قرار داده شد. در پرایمر پیرو نیز علاوه بر ناحیه برش آنزیمی یک کدون خاتمه دهنده بیان (TTA) در نظر گرفته شد. این دو مورد در حقیقت پیش‌بینی برای ادامه کار یعنی بیان ژن بود. برای تهیه الگوی PCR از دو روش مستقیم و غیر مستقیم استفاده گردید. در روش مستقیم از گونه‌های مختلف باکتری شیگلا دیسانتری رشد یافته در محیط مایع LB به عنوان الگوی PCR استفاده شد. در روش غیر مستقیم از ژنوم استخراج شده شیگلا دیسانتری با روش CTAB/NaCl (15) (با اعمال اندکی تغییرات) به عنوان الگوی PCR استفاده شد. پس از انجام عمل PCR که بر اساس دستور العمل‌های مندرج درجداول 1و2 انجام شد.

مواد	غلظت نهایی	مقدار مورد نیاز برای یک واکنش 50 میکرولیتری
آب دوبار تقطیر	-	35.5 میکرولیتر
X (10MgSO4)	X 1	میکرولیتر 5
mM(10dNTP)	برای هر کدام mM1	5 میکرولیتر
پرایمر پیرو	Pmol0.2	1میکرولیتر
پرایمر پیشرو	Pmol0.2	1میکرولیتر
الگو	µg/µl1	2میکرولیتر(روش مستقیم) 1 میکرولیتر (روش غیر مستقیم)
Pfu پلی مرازDNA	u/µl0.5 -1.25	0/5 میکرولیتر

جدول 1. برنامه دستگاه ترموسایکلر

چرخه	نام مرحله	دما	زمان	تکرار چرخه
اول	دناتوراسیون اولیه	c94°	5 دقیقه	1 بار
دوم	دناتوراسیون	c94°	1دقیقه	30 بار
	اتصال	c58°	1 دقیقه	
	تکثیر	c72°	2/20 دقیقه	
سوم	تکثیر نهایی	c72°	5 دقیقه	1 بار

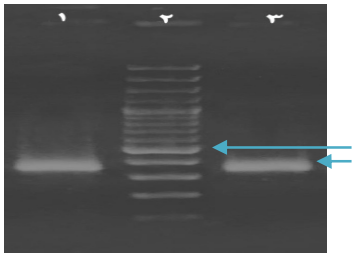
جدول شماره2. نسبت های مواد برای انجام یک آزمایش PCR

برای تایید محصولات نهایی از روش برش آنزیمی محصولات PCR بهره گرفته شد. برای انجام این تست تأییدی ابتدا سایت‌های برش آنزیمی سکانس مورد نظر با استفاده از نرم افزار تحت شبکه webcuttre شناسایی شد. مشخص گردید که اگر محصول PCR با آنزیم EcoRV هضم شود، دو قطعه 234و 110 جفت بازی ایجاد می‌گردد. پس از برش محصولات PCR با آنزیم EcoRV محصولات برش برای مشاهدات دقیق‌تر بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید 12 درصد الکتروفورز گردید. به منظور الحاق محصولات PCR به وکتور pGEM به کمک آنزیم Taq پلیمراز یک باز dATP به انتهای `3 آن‌ها اضافه گردید این کار با هدف ایجاد لنگرگاه برای اتصال محصول PCR به انتهای `5 وکتور pGEM که دارای تیمین آزاد می‌باشد انجام می‌پذیرد(16). سپس طی واکنش اتصال (لیگیشن) ژن IpaD به وکتور pGEM وارد گردید. در این واکنش 12 ساعته که در دمای 14 درجه سانتی گراد انجام پذیرفت قطعه تکثیر یافته حاصل از فرایند PCR توسط آنزیم T4-لیگاز به وکتورpGEM الحاق یافت. مرحله انتهایی فرایند کلونینگ انتقال سازه نوترکیب pGEM-IpaD به درون یک میزبان مستعد بود(17). انتقال سازه pGEM-IpaD به درون سلول‌های مستعد E. coli.DH5α از طریق فرایندهای شیمیایی-شوک حرارتی انجام شد(18). نکته قابل ذکر اینکه نشانگر انتخابی وکتورpGEM، ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد و می‌بایست جهت انتخاب باکتری‌های نوترکیب در محیط‌های کشت از غلظت‌های مناسب این آنتی‌بیوتیک استفاده گردد. برای تأیید کلونینگ در E. coli از سه روش استفاده گردید: 1) تأیید کلونینگ با استفاده از PCR که در این روش وجود قطعه هدف بر روی پلاسمید نوترکیب بررسی و تأیید شد. در این روش در مرحله نخست به عنوان روش مستقیم از خود باکتری‌های کلون شده و در مرحله دوم از پلاسمید تخلیص شده از کلون‌ها به عنوان الگو استفاده شد. 2) هضم پلاسمیدpGEM-IpaD به منظور بررسی باکتری‌های E. coli حاوی DNA نوترکیب که در این روش به منظور اطمینان از صحت کلونینگ، بر روی پلاسمیدهایی که PCR آن‌ها مثبت شده بود واکنش هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های HindIII و EcoRI انجام پذیرفت. 3) روش سوم تأیید فرایند کلونینگ، تعیین توالی با استفاده از دستگاه توالی یاب بود که در مرکز ژنتیک انسانی پژوهشگاه بقیه‌الله (عج) به انجام رسید. توالی‌های بدست آمده با استفاده از آنالیزهای نرم‌افزار BLAST با سایر توالی‌های موجود در بانک‌های ژنی همردیف گردید و میزان شباهت و قرابت آن‌ها ارزیابی شد هم‌چنین توالی بدست آمده با Megalign مورد ارزیابی قرار گرفت و با گونه‌های ثبت شده مقایسه گردید و نواحی اپی‌توپیک آن با نرم افزار Protean آنالیز شد.

یافته‌ها

پس از تخلیص ژنوم شیگلا از آن به عنوان الگو در فرایند PCR با آنزیم Pfu استفاده شد و محصول 344 جفت بازی PCR پس از برش آنزیمی با آنزیم EcorV و الکتروفورز آن بر روی پلی‌اکریل‌امید 12درصد مورد تایید قرار گرفت. آنزیم EcoRV قطعه 344 جفت‌بازی را در یک ناحیه برش داد و مطابق با انتظار دو قطعه 110 و 234جفت بازی حاصل از برش بر روی ژل پلی اکریل آمید مشاهده شد(تصویر 1).

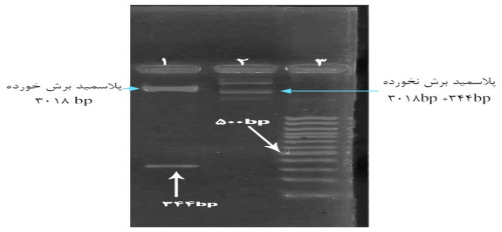
تصویر 1. الکتروفورز محصولات PCR هضم شده با استفاده از آنزیم EcoRV بر روی ژل پلی اکریل آمید 12درصد ا



ستون شماره 1. نشان‌گر DNA 100جفت بازی ،
ستون شماره 2. محصول PCR قبل از برش آنزیمی که در راستای باند 344 جفت بازی قرار گرفته است.
ستون شماره 3. محصول PCR پس از برش آنزیمی را نشان می‌دهد که طبق پیش بینی به دو قسمت 234 جفت بازی و 110 جفت بازی تقسیم شده‌است.

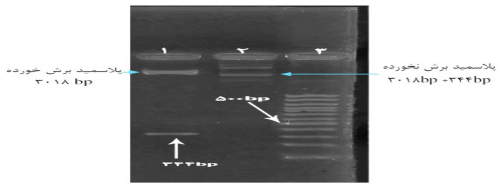
لحاق محصول PCR به درون وکتورpGEM و انتقال آن به باکتری E. coli که در اصطلاح کلونینگ نامیده می‌شود با استفاده از سه روش زیر تأیید گردید. الف) PCR مستقیم (استفاده مستقیم از باکتری به عنوان الگو) و PCR غیرمستقیم (تخلیص پلاسمید و استفاده از آن به عنوان الگو) (تصویر 2). ب) برش آنزیمی پلاسمید تخلیص شده که طی آن ناحیه 344 جفت بازی مورد نظر از پلاسمید جدا گردید (تصویر 3). ج) تعیین توالی ناحیه مورد نظر از پلاسمید نوترکیب با استفاده از پرایمرهای مذکور.

تصویر شماره 2. الکتروفورز محصولات PCR با روش مستقیم و غیر مستقیم



ستون شماره 1. محصولات PCR ناحیه N-ترمینال ژن IpaD می‌باشد.(روش مستقیم)
ستون شماره 2. نشان‌گر DNA 100 جفت بازی
ستون شماره 3. محصولات PCR ناحیه N-ترمینال ژن IpaD . (روش غیر مستقیم)

تصویر3. الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی سازه pGEM-IpaD بر روی ژل آگارز 1 درصد



ستون شماره 1. پلاسمید نوترکیب برش خورده. یک قطعه 344 جفت‌بازی که قطعه ژنی مورد نظر است و یک باند3018جفت‌بازی در ابتدای ستون وجود داردکه پلاسمید pGEM خطی شده می‌باشد.
ستون شماره 2.پلاسمید نوترکیب pGEM-IpaD بدون هضم آنزیمی
ستون شماره 3. نشان‌گر DNA 100جفت بازی.

در این تحقیق که ناحیه مابین نوکلئوتید 163 تا 483 ژن IpaD، (معادل اسیدآمینه‌های 55 الی 161 پروتئین IpaD) کلون و تعیین توالی گردید، پس از آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار BLAST مشخص گردید که این ناحیه در گونه ایرانی 98.11 درصد با 4 گونه شیگلا دیسانتری ثبت شده در پایگاه‌های داده ژنی مشابهت دارد. اختلاف در توالی‌ها تنها در 7 نوکلئوتید مشاهده گردید که 4 نوکلئوتید آن در خارج از محدوده عملکردی IpaD بودند. ادامه بررسی توالی‌ها با نرم‌افزار Megalign نشان دادند که اختلاف 3 نوکلئوتیدی در ناحیه عملکردی میان گونه بومی و گونه استاندارد باعث ایجاد تنها یک تغییر در توالی پپتیدی شده‌است. این داده‌های حاکی از آن است که ناحیه عملکردی IpaD به نسبت نواحی دیگر به طرز مناسبی حفاظت شده و این خود گویای اهمیت این ناحیه می‌باشد. مطالعات در جهت یافتن نواحی اپی‌توپیک (نواحی محرک سیستم ایمنی) با استفاده از نرم افزار Protean ادامه یافت و مشخص گردید که 4 ناحیه اپی‌توپیک درتوالی‌های عملکردی وجود دارد که نشان‌دهنده تناسب این جایگاه برای تحریک سیستم ایمنی میزبان می‌باشد. لازم به ذکر است که این نرم‌افزار نواحی اپی‌توپیک را تنها بر اساس ترتیب اسیدآمینه‌ها تعیین می‌نماید و توانمندی پیشگویی ساختار فضایی اپی‌توپ‌ها را ندارد.

بحث

باکتری شیگلا یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه و عامل ایجاد اسهال خونی می‌باشد. در باکتری شیگلا آنتی‌ژن‌های متعددی وجود دارد که باکتری با استفاده از آن‌ها روند تهاجمی خود را پایه‌ریزی می‌نماید. محققان تلاش‌های زیادی را برای کنترل این عامل بیماری‌زا از طریق ایمونیزه کردن افراد نموده‌اند اما طبق آخرین آمار تاکنون هیچ واکسن پایدار نوترکیب علیه این عامل به تأیید سازمان جهانی بهداشت نرسیده است(19). بیشترین مطالعات در حوزه واکسن بر روی سه فاکتور VirG، Ipa و Lps صورت پذیرفته است. مطالعه بر روی این سه فاکتور بر اساس یک پشتوانه منطقی می‌باشد. در باکتری شیگلا ده‌ها فاکتور ایمونوژنیک تولید می‌گردد. اما بدن انسان تنها به این سه فاکتور پاسخ ایمونولوژیک می‌دهد(20،21). یکی از اولین پروتئین‌هایی که در مسیر تهاجمی شیگلا ایفای نقش می‌نماید پروتئین IpaD است. IpaD یک پروتئین 37 کیلودالتنی می‌باشد و جایگاه آن بر روی پلاسمید بزرگ و مهاجم شیگلا است. توربیفیل و همکارانش بر روی دومین‌های مختلف IpaD نشان دادند که مهمترین ناحیه این پروتئین از لحاظ آنتی‌ژنیسیته ناحیه N-ترمینال نزدیک به مرکز می‌باشد. آن‌ها همچنین عنوان نمودند که این ناحیه غنی از اپی‌توپ‌های در دسترس برای سیستم ایمنی میمون می‌باشد که این خاصیت برای نواحی دیگر وجود ندارد. همچنین آن‌ها دریافتند که آنتی‌بادی‌هایی که این ناحیه را شناسایی می‌نمایند توانایی شیگلا را برای ایجاد منفذ در سلول‌های میزبان سرکوب می‌نمایند(22). همچنین کنت اف استنسرود و همکارانش با مطالعه بر روی این پروتئین ناحیه N-ترمینال نزدیک به مرکز یعنی رزیدوهای مابین 72الی162 را به عنوان اصلی‌ترین ناحیه عملکردی IpaD معرفی نمودند(8). بر اساس تحقیقات این دانشمندان ایجاد هرگونه اختلال در این ناحیه منجر به از دست رفتن عملکرد IpaD می‌گردد. جانسون و همکارانش با مطالعات گسترده‌ای که بر روی دومین‌های مختلف IpaD انجام دادند متوجه شدند برخلاف ناحیه N-ترمینال نزدیک مرکز دو ناحیه ابتدایی N-ترمینال و ناحیه C-ترمینال IpaD نقش چندانی در عملکرد این پروتئین ندارند و نقش آن‌ها به ترتیب در خود-اتصالی و اتصال IpaD به باکتری خلاصه می‌شود(23). محققین WIPO طی تحقیقی که در سال 2008 انجام دادند نشان دادند که پروتئین IpaD و مشتقات عملکردی آن مانند ناحیه N-ترمینال نزدیک به مرکز می‌توانند منجر به تولید آنتی‌بادی Anti-IpaD گردد. آن‌ها همچنین با طراحی آزمایشاتی نشان دادند که قبل از بکارگیری سایر افکتورهای پروتئینی بر روی سطح باکتری، این آنتی‌بادی‌ها با تداخل در عملکرد IpaD، آن را بلوکه کرده و مانع انجام عملکرد آن می‌گردد(13).

در مطالعه حاضر که برای اولین بار در ایران به انجام رسید پس از تأیید بیوشمیایی باکتری‌های کلینیکال شیگلا دیسانتری با استفاده از فرایند PCR قطعه 344جفت بازی مورد انتظار مربوط به ناحیه N-ترمینال IpaD این گونه باکتریایی تکثیر گردید و با تست تأییدی هضم آنزیمی صحت توالی محصولات PCR تأیید و سپس نواحی تکثیر شده به وکتور pGEM ملحق گردید و به باکتری E. coli DH5α منتقل شد و با تست‌های مختلف این فرایند تأیید گردید و در ادامه توالی بدست‌آمده با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مورد آنالیز قرار گرفت. این تحقیق با محوریت شناسایی ناحیه N-ترمینال و مقایسه آن با گونه مشابه ثبت شده در پایگاه ژنی به انجام رسید تفاوت عمده تحقیق ما با سایر آزمایشات از این دست در این بود که در این تحقیق تنها ناحیه‌ای ویژه از ژن انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت تا در ادامه نیز محققین دیگر اثرات ایمونولوژیکی پپتید حاصل از بیان این ناحیه را به طور ویژه بررسی نمایند. در حال حاضر محققینی در مرکز تحقیقات دانشگاه امام حسین(ع) پیرامون این موضوع و موارد مشابه در آنتی ژن‌های IpaC و IpaB فعالیت می‌نمایند.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر رهبر، مهندس میرزایی و مهندس منصوری به جهت همکاری در انجام این تحقیق تشکر می‌نماییم.

REFERENCES

1. Key B, Clemens J, Kotloff. Generic protocol to estimate the burden of shigella diarrhoea and dysenteric mortal. Tex Book. 1999;pp 146-151.

2. Johnson J, Alverez CM, Sanz JC, Ramiro R. Late detection of a shigellosis outbreak in a school in Madrid. Euro Surveillance. 2005;10: 268-70.

3. Hale TL. Genetic basis of virulence in Shigella species. Microbiol.Rev. 1991;55:206–224.

4. Clerc P, Sansonetti PJ. Entry of Shigella flexneri into HeLacells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization andmyosin accumulation. Infect. Immun. 1987. 55:2681–2688.

5. Hale TL, Oaks EV, Formal SB. Identification and antigenic characterization of virulence-associated, plasmid-coded proteins of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli. Infect Immun.1985. 50: 620-629.

6. Picking WL, Nishioka H, Hearn PD, Baxter MA, Harrington AT, Blocker A, Picking WD.IpaD of Shigella flexneri Is Independently Required for Regulation of Ipa Protein Secretion and Efficient Insertion of IpaB and IpaC into Host Membranes. Infection and Immunity, Mar. 2005;73:1432–1440.

7. Venkatesan MM, Buysse JM, kopecko DJ.Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from Shigella flexneri. Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 1988;85: 9317-9321.

8. Stensrud, K.F., Adam, P.R., La mar, C.D., Olive, A.R., Lushington, G.H. Sudharsan, R., Shelton, N.L., Givens, R.S., Picking, W.L. and Picking, W,D. Deoxycholate Interacts with IpaD of Shigella flexneri inInducing the Recruitment of IpaB to the Type III Secretion Apparatus Needle Tip. Biological Chemistry .238: 27, 18646-18654. 2008.

9. Espina M, Olive AJ, Kenjale R, Moore DS, Ausar F, Kaminski RW, Oaks EV, Middaugh CR, Picking WD and. Picking WL. IpaD Localizes to the Tip of the Type III Secretion System Needle of Shigella flexneri. Infect Immun. 2006;74(8): 4391–4400.

10. Skoudy A, Mounier J, Aruffo A, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti P and Guy Tran Van Nhieu. CD44 binds to the Shigella IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. Cell. Microbiol. 2000;2: 19–33.

11. Blocker A, Gounon P, Larquet E, Niebuhr K, Cabiaux V, Parsot C and Sansonetti P . The Tripartite Type III Secretion of Shigella Flexneri Inserts IpaB and IpaCinto Host Membranes. J. Cell Biol. 1999;147: 683–693.

12. Adam T, Arpin M, Prevost MC, Gounon P and, Sansonetti PJ.Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin duringentry of Shigella flexneri into HeLa cells. J. Cell Biol.1995;129: 367–381.

13. Patent services data base, World Intellectual property Organization (WIPO) Title of patent: shigella ipaD protein and its use as a vaccine against shigella infection, 2008.patent IP: WO 2008044149 20080417.

14. Sani, M. Weapons of Mass Secretion:The Type III Secretion System of Shigella flexneri, Printed in the Netherlands by Gildeprint Drukkerijen BV, Enschede. paper version ISBN: 90-367-2933-5.

15. Bando SY, Valle GR, Luiz MM, Trabulsi R and Moreira Filho CA. characterization of enteroinvasive Esherichia coli and shigella strains by RAPD analysis. FEMS Microbiology Letters: 1998 165: 159-165

16. Promega instructions for use of products A1360, A1380, A3600 and A3610. pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems, technical manual printed in USA, N; 042,pp 1-8

17. Laboratory Protocols Cimmyt, Applied Molecular Genetics Laboratory Third Edition. ISBN:968-6923-30-6.2008,P:71-72

18. Sambrook J and Russell D. MolecularCloning, A Laboratory Manual. The Hanahan Method forpreparation and Transformation of competent E.coli high-efficiency Transfomation. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

19. Agerberth B, Sweden S.A, Kane A, Bardhan PK and et al. text book. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to Shigella dysenteriae type 1. Printed by the WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland. ISBN 92 4 159233. 2005. Pp.9-11.

20. Kevin R, Turbyfill K, Sam W, Joseph B And Edwin V. Recognition of Three Epitopic Regions on Invasion Plasmid Antigen C by Immune Sera of Rhesus Monkeys Infected with Shigella flexneri 2a. Infection and Immunity, 1995.63: 3927–3935.

21. Lingling Z, Wang Yu, Andrew J, Olive N, Smith D, William D. Picking R.N. Guzman D. and Wendy L. Identification of the MxiH Needle Protein Residues Responsible for Anchoring Invasion Plasmid Antigen D to the Type III Secretion Needle Tip. J. Biological Chemistry, 2007. 282: 44, pp. 32144–32151.

22. Turbyfill K.R, Jennifer A.M, Corey P.M, and Edwin V.O. Identification of Epitope and Surface-Exposed Domains of Shigella flexneri Invasion Plasmid Antigen D (IpaD). Infection and Immunity,1998. 66:1999–2006.

23. Johnson S, Roversi P, Espina M, Olive A, Deane JE, Birket S, Fieldd T, Picking WD, Blocker A,. Galyov EE, Picking WL, Lea SM. Self-Chaperoning of the Type III Secretion System needle tip proteins IpaD and BipD. J Biol Chem. 2007;282(6): 4035-4044.