

کومش - جلد ۲۰، شماره ۱ (پیاپی ۶۹)، زمستان ۱۳۹۶

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

سجاد مال میر<sup>۱</sup> (M.Sc)، احسان رفوفی<sup>۲</sup> (M.Sc)، حمید ابطحی<sup>۳\*</sup> (Ph.D)

۱- گروه میکروپ‌شناسی 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 خارج‌غشایی را شامل می‌باشد که نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین برای شناسایی باکتری کلامیدیا تراکوماتیس می‌باشد. هدف از مطالعه، تولید پروتئین نو ترکیب متشکل از نواحی آنتی‌ژنیک پروتئین MOMP از ژن omp1 و بررسی آنتی‌ژنیسته 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 نو ترکیب، آنتی‌ژنیسته 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 نیتروسولوز مشاهده می‌شود. در عین حال هیچ باندهایی 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 نو ترکیب دارای اپیتپ‌های مشابهی با پروتئین طبیعی است.

واژه‌های کلیدی: کلامیدیا تراکوماتیس، پروتئین غشاء خارجی ۱، پروتئین‌های نو ترکیب

### مقدمه

توان به تراخم، عفونت‌های چشمی، التهاب ملتحمه انکلیزیونی در بزرگسالان و نوزادان و عفونت‌های ادراری و تناسلی (اندومتری و سالیپتیت) اشاره کرد [۲]. از آنجایی که بیش از ۵۰٪ مردان و ۸۰٪ زنان بدون علائم 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

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 سروارهای مختلفی تقسیم می‌شود. این باکتری از رایج‌ترین باکتری‌های منتقله از راه جنسی می‌باشد. از جمله بیماری‌هایی که توسط کلامیدیا تراکوماتیس ایجاد می‌شود می

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 omp1 برنامه‌های بیوانفورماتیکی مختلفی شناسایی شد و این توالی‌ها به وسیله لینکرهای انعطاف‌پذیر (ttggctgaggtgctgctaaggaggctgctgctaagct) 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 نو ترکیب تولید شده توانایی تحریک لئوسیت‌های 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.

عفونت‌های مزمن مانند ناباروری می‌شوند [۳، ۴]. 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 و بروس نقص ایمنی (HIV) و هم‌چنین کوفاکتور نوپلازوی القایی گردن رحم با پایلوما و بروس می‌شود [۶]. بهترین راه جهت ریشه‌کن کردن عفونت کلامیدیایی، ایجاد ایمنی کامل از طریق تهیه یک واکسن می‌باشد. واکسیناسیون بیش از هر مداخله‌ی بیومدیكال 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 [۱۰، ۱۱]. 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 نو ترکیبی می‌باشد که حاصل اتصال چهار قطعه از ژن که مسئول ساخت نواحی آنتی‌ژنیک پروتئین MOMP می‌باشند، تخلیص پروتئین نو ترکیب حاصل و بررسی آنتی‌ژنیسیته آن با سرم افراد مبتلا به

تخلیص شد. در آخر پروتئین خالص شده از نظر کمی و کیفی با استفاده از ژل SDS-PAGE بررسی شد [۱۵].

#### بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نو ترکیب

جهت بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نو ترکیب 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 الیزا 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 آنتی ژنیسیته از تکنیک وسترن بلات (ایمنوبلاتینگ) استفاده گردید. برای انجام تست وسترن بلات پس از الکتروفورز رسوب باکتری‌های القاء یافته بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪، باندهای پروتئینی به دست آمده بر روی ژل پلی آکریل آمید به کاغذ نیترو سلولز منتقل گردید. کاغذ نیترو سلولز 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 نیترو سلولز سه مرتبه با بافر TBS (Tris-Buffered Saline) شستشو شده و به مدت یک ساعت با آنتی هیومن کونژوگه با پراکسیداز (۱/۲۰۰۰) انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها با بافر TBS، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ نیترو سلولز، کاغذ در محلول دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت [۱۱].

## نتایج

نواحی آنتی ژنیک ژن omp1 که به وسیله نرم افزارهای بیوانفورماتیک شناسایی شد در شکل ۱ آورده شده است.

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

نتایج مربوط به آزمون وسترن بلات در شکل ۳ و ۴ قابل مشاهده می باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، در تمام

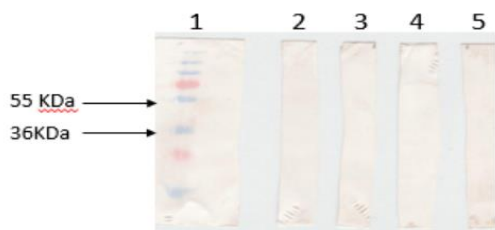
نرم افزار بعدی که برای تعیین مناطق آنتی ژنیک استفاده شد نرم افزار IgPred می باشد که این نرم افزار اپی توپ‌هایی که توسط آنتی بادی‌های IgG, IgE, IgA شناسایی می شود را نشان می دهد [۱۳، ۱۴].

پس از تعیین نهایی نواحی آنتی ژنیک ژن omp1 و قرار دادن لینکر انعطاف پذیر 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 می باشد.

#### کلونینگ نواحی آنتی ژنیک ژن OMP1

قطعه‌ی ژن مورد نظر که حاوی توالی مربوط به نواحی آنتی ژنیک 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 برش خورده همراه با آنزیم لیگاز به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد انکوبه گشت. و محصول به داخل سلول‌های کامپنتنت DH5α و BL21(DE3) pLysS E.coli فرستاده شد.

بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب. از کلونی‌های E.coli BL21(DE3) pLYsS\_ حامل پلاسمیدهای pET32a-omp1 در ۱۰۰ cc محیط نوترینت برات دارای آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و کلرآمفنیکل کشت داده شد. آن‌گاه در حرارت ۳۷ بر روی شیکر با دور ۲۲۰ قرار گرفت. پس از این که OD بین ۰/۵-۰/۶ قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر 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 فالكون ریخته شد سپس سانتریفیوژ (۶۰۰ 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)



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

## بحث و نتیجه گیری

نواحی آنتی ژنیک پروتئین MOMP با استفاده از نرم افزارهای مختلف بیوانفورماتیک شناسایی، و توالی مربوط به چهار ناحیه آنتی ژنیک با لینکرهای انعطاف پذیر به هم متصل شدند. پروتئین نوترکیب تولید و تخلیص گشت. در پایان باند مربوط به واکنش نواحی آنتی ژنیک فیوزن شده با آنتی بادی های موجود در سرم افراد مبتلا به عفونت های کلامیدیایی مشاهده شد.

کلامیدیا تراکوماتیس شایع ترین باکتری منتقله از راه جنسی در سراسر جهان است [۱۶]. این باکتری باعث اورتریت در مردان و عفونت گردن رحم، اندومتریت و ... در زنان می باشد [۱۷].

استفاده از وکتور بیانی pET32a باعث بیان ژن (تولید پروتئین)، در سطح بالا می شود. این پلاسمید باعث می شود که ژن کلون شده به طور بالقوه "خاموش" باشد؛ هم چنین این پلاسمید، رونویسی و ترجمه ژن های هدف توسط سیگنال های قوی پروموتور باکتریوفاژ T7 که در نواحی بالا دست ژن هدف قرار دارد انجام می شود [۱۸].

مزیت اصلی سویه pLysS باکتری E.coli که در این مطالعه استفاده شد کمبود پروتئاز LON و OmpT در pLysS اشاره کرد که باعث افزایش ثبات پروتئین بیان شده می گردد [۱۵].

تست های سرولوژی به علت حساسیت بالا به آنتی ژن خاص معمولاً به عنوان تست های آزمایشگاهی رایج جهت تشخیص پاتوژن ها مورد استفاده قرار می گردد. پروتئین MOMP در فرم اصلی خود یک پروتئین سه جزئی با عمده

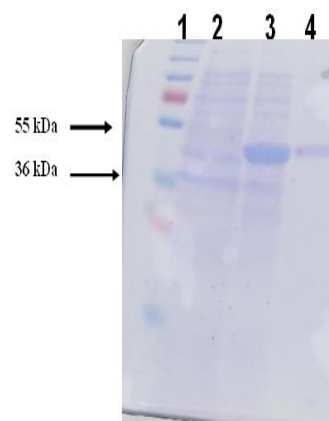
نمونه های سرمی بیماران مبتلا به عفونت های کلامیدیایی، باندهای مربوط به واکنش آنتی ژن با آنتی بادی در کاغذ نیتروسولوز مشاهده می شود (شکل ۳). در عین حال هیچ باندی مبنی بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه های سرم افراد سالم مشاهده نگردید (شکل ۴).

```

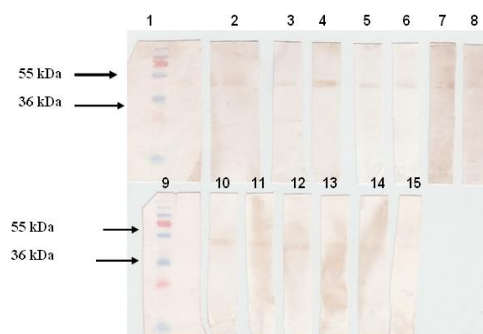
1 atgaaaaaac tottgaaac ggtattagtg ttgtgcgctt tgagttctgc ttctctcttg
61 caagctctgc ctgtgggaa tootgctgaa caaagcotta tgatgaagg aattctatgg
121 gaagtttgc gggagatcc ttgcatactb tgcaccactt ggttgagcg taccagatgg
181 cgtatgggtt actatgggtg ctttgttttc gaccgtgttt tgoaaacaga tgtgataaaa
241 gaattcoaaa tgggtgcoaa goctacagct gotacagga atgtgtagc toactcoact
301 tgtacagaaa gagagaatcc tgottaagcg cgaatagtg aggatgtga gatgtttaca
361 aatgctgctt acatggcatt gaattattgg ctacgttttg atgtattctg tacattagga
421 gcoacogtg gatatactaa aggaattca gaacttttca acttagttgg gttattogga
481 gataatgaa ataaagcac ggtocaaag gatgtgttca caaatagag ottagatcaa
541 totgttgggt agttgtatac agatactact ttgtctgga gtgtgtgagc togtgcagct
601 ttgtgggaa ttggatgagc gaacttagcg gttcttttcc aatacgtcca atcgaagct
661 aaagtcgaag aattaaactg toctgtaac gaagctgagt ttaactcaaa taagctcaaa
721 ggatagtag ggcaagaatt coctctgat cttaaagoc gaaocagatg tgtgacagga
781 actaagtagt cctctattga ttaocagaa tggcaagaa gtttagctct ctattacaag
841 otgaatagt toactcoota oattggagtt aaatgtgtcc gagaaagttt tgatgocagc
901 aogattogta ttgtcagcc gaagtaoact aactctctct ttgatgttac caactctgac
961 caaactattg otggagctgg cgtgtgaaa gotagcagc aggtcagctc cggagatacc
1021 atgcaaatog ttctctgca atgaaacag atgaaactca gaaactctg cggattatgca
1081 tgaggaaocaa otattgtgga tgoagacaaa taocagatga caagttgagac tocttggatc
1141 gatgagagag ctgctcagct aaatgcacaa ttccgctctc aa

```

شکل ۱. نواحی آنتی ژنیک ژن omp1، چهار ایبی توپ مختلف که هم در بین تمامی گونه های کلامیدیا تراکوماتیس اختصاص بوده و هم دارای خاصیت آنتی ژنیک می باشند. هم چنین این توالی ها 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

کرده‌اند، همخوانی دارد به طوری که 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. به طوری که 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 نو ترکیب 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 مالیر در دانشگاه علوم پزشکی اراک بوده که هزینه آن به وسیله 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

ساختار sheet- $\beta$  بوده و دارای عمل‌کرد پورینی می‌باشد [۱۹] و از آن‌جایی که 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 به خصوص با توجه به خارج سلولی بودن آنتی‌ژن‌های پروتئین MOMP، اپی‌توپ‌های فضایی و ناپیوسته MOMP که شاخص لنفوسیت‌های B می‌باشند، شناسایی شد. نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی به کار 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 اعطاف‌پذیر 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 نو ترکیب و کاهش مراحل کلونینگ، بیان و تخلیص مفید می‌باشند. بر اساس یافته‌های حاصل از آزمون وسترن‌بلات، پروتئین فیوژن نو ترکیب تولید شده توانایی اتصال به آنتی‌بادی‌های موجود در سرم افراد مبتلا به عفونت‌های کلامیدیایی را دارد، به طوری که سرم افراد مشکوک به عفونت کلامیدیایی را با کیت الیزا (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

- [14] Abbasian S, Soufian S, Nejad A, Abtahi H. Investigating the possibility of recombination the predicted antigenic fragment of *Streptococcus pyogenes* hyaluronidase by bioinformatics softwares. *Koomesh* 2015; 17. (Persian).
- [15] Farhangnia L, Ghaznavi-Rad E, Mollae 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 polyanitigens. *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 Infect 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)<sup>1</sup>, Ehsan Raoufi (M.Sc)<sup>2</sup>, Hamid Abtahi (Ph.D)<sup>\*3</sup>

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