

## بیان پروتئین نوترکیب استرپتولیزین O استرپتوکک پیوژن در باکتری اشیشیاکلی

دکتر حمید ابطحی<sup>1\*</sup>، دکتر قاسم مسیبی<sup>1</sup>، دکتر علی هاتف سلمانیان<sup>2</sup>

1- استادیار گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

2- دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری

تاریخ دریافت ۸۵/۱۱/۱۶، تاریخ پذیرش ۸۶/۴/۱۳

### چکیده

**مقدمه:** استرپتولیزین O از جمله پروتئین‌های ترشحی استرپتوکک پیوژن بوده که دارای قدرت آنتی ژنیک می‌باشد. امروزه با ردیابی آنتی‌بادی‌های ضد این پروتئین روند عفونت ناشی از این باکتری پی‌گیری می‌شود. تاکنون تولید نوترکیب این پروتئین با استفاده از ناقلین بیانی دارای پروتئین الحاقی صورت گرفته است. در این تحقیق سعی گردیده تا تولید پروتئین با استفاده از ناقلین بدون پروتئین الحاقی انجام پذیرد.

**روش کار:** در این تحقیق تجربی با طراحی پرایمر اختصاصی و استفاده از روش PCR، ژن استرپتولیزین O از استرپتوکک پیوژن تکثیر گردید. پس از تخلیص، ژن فوق در ناقل پلاسمیدی pET28a جهت بیان کلون گردید. سپس ساختار پلاسمیدی pET28a-SLO وارد باکتری اشیشیا کلی سویه BL21- DE3-plySs شد. تولید پروتئین با القا توسط IPTG و بهینه سازی شرایط صورت گرفت. پروتئین نوترکیب با استفاده از کیت Ni-NTA خالص و میزان پروتئین با استفاده از روش براد فورد اندازه گیری شد. آزمایش وسترن بلات برای تایید پروتئین نوترکیب انجام شد.

**نتایج:** ترادف نوکلئوتیدی ژن تکثیر شده توسط روش PCR با ژن استرپتولیزین O استرپتوکک پیوژن یکسان بود. تولید پروتئین نوترکیب استرپتولیزین O با القا پلاسمید pET28a-SLO توسط IPTG انجام گردید. تخلیص پروتئین با روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از کیت Ni-NTA انجام شد. میزان پروتئین خالص شده برابر 100 میکرو گرم در میلی لیتر به دست آمد. سرم موش واجد آنتی استرپتولیزین O در روش وسترن بلات با پروتئین تولید شده واکنش داد.

**نتیجه گیری:** تولید پروتئین نوترکیب استرپتولیزین O بدون استفاده از پروتئین الحاقی در میزبان اشیشیا کلی نیز امکان پذیر است. پروتئین تولید شده خاصیت آنتی ژنیک خود را به خوبی حفظ می‌کند. بنابر این می‌توان از آن در تشخیص آنتی بادی ضد استرپتولیزین O در بیماران مبتلا به عفونت استرپتوککی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** استرپتوکک پیوژن، ژن استرپتولیزین O، بیان ژن، اشیشیا کلی

\*نویسنده مسئول: اراک، سردشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی

Email: [h\\_abtahi2@yahoo.co.uk](mailto:h_abtahi2@yahoo.co.uk)

## مقدمه

استرپتوکک‌های گروه A عامل بسیاری از عفونت‌های چرک‌زا از جمله گلو درد چرکی، تب زایمان و عفونت زخم‌ها می‌باشند. این باکتری باعث دو عارضه مهم پس از عفونت یعنی تب روماتیسمی و گلوبولونفریت؛ به خصوص پس از گلو درد چرکی و عفونت زخم می‌شود (1). تشخیص اصلی در عفونت‌های ناشی از این باکتری بر اساس جدا سازی آن از بافت یا اندام آلوده است. ولی بررسی روند پیشرفت بیماری یا موفقیت درمان بر پایه رد یابی و تعیین تیتراژ آنتی بادی بر علیه آنتی ژن‌های مهم باکتری از جمله استرپتولیزین O می‌باشد (2,3).

استرپتولیزین O آنزیمی است حساس به ملکول اکسیژن با وزن ملکولی حدود 68 کیلو دالتون که پس از ترشح از سلول باکتری و با حذف ترادف نشانه، وزن آن به حدود 60 کیلو دالتون کاهش می‌یابد (4,5). استرپتولیزین O از جمله سیتولیزین‌های ترشح شده از استرپتوکک پیوژن به شمار می‌آید. این آنزیم با ایجاد سوراخ در غشای سیتوپلاسمی سلول‌های یوکاریوتیک باعث لیز سلول می‌گردد. در بیماران آلوده شده با استرپتوکک‌های گروه A افزایش تیتراژ آنتی بادی بر علیه این پروتئین دیده می‌شود. با تعیین میزان تیتراژ آنتی بادی می‌توان روند عفونت ناشی از این باکتری را تعیین نمود. در روش متداول برای تعیین آنتی بادی بر علیه استرپتولیزین O از پروتئین طبیعی تهیه شده از استرپتوکک پیوژن استفاده می‌شود (2). محصول بسیار ناچیز این پروتئین از باکتری استرپتوکک پیوژن و خطر آلودگی محیط موجب گردیده از شکل نوترکیب این پروتئین استفاده شود. ناقلین استفاده شده برای تولید این آنزیم از جمله pMALC2 و pGEX دارای ترادف نوکلئوتیدی مربوط به یک پروتئین الحاقی هستند (6,7). وجود این پروتئین‌ها که اغلب وزن نسبتاً بالایی را دارند، سبب تولید استرپتولیزین O با وزن مولکولی بیشتر و صرف انرژی سلول برای تولید پروتئین الحاقی (گلوکاتایون ترانسفرآز و مالتوز بایدینگ پروتئین) می‌شود (8). لذا در این تحقیق سعی

گردید با استفاده از ناقل پلاسمیدی pET28a تولید استرپتولیزین O بدون پروتئین الحاقی انجام گردد.

## روش کار

تولید پروتئین نوترکیب استرپتولیزین O یک مطالعه تجربی است. باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل استرپتوکک پیوژن (تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس)، اشیریشیا کلی سویه DH5 $\alpha$  و اشیریشیا کلی سویه BL21-DE3-plySs (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران، ایران) می‌باشند. برای کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه، از پلاسمید + pSK (شرکت استراتاژن، آمریکا) و جهت تولید استرپتولیزین O از پلاسمید pET28a (شرکت نواژن، آمریکا) استفاده شد. این پلاسمیدها از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه گردید.

تخلیص کروموزوم استرپتوکک پیوژن بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا استرپتوکک پیوژن در محیط تریپتی کیس سوی برات<sup>1</sup> در دمای 37 درجه سانتی گراد کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE<sup>2</sup> حل گردید و با استفاده از آنزیم لیزوزیم و سپس با اثر SDS و آنزیم پروتئیناز K لیز شد. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/NaCl<sup>3</sup> استخراج گردید. پروتئین‌ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل/کلروفرم/ایزوامیل الکل به نسبت 25/24/1 و سانتریفیوژ (13000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه) حذف گردید. DNA به دست آمده با استفاده از یک حجم ایزوپروپانول رسوب داده شد و سپس توسط اتانول 70 درصد شستشو گردید. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز آن در ژل آگارز 0/8 درصد در بافر TBE بررسی گردید. مقدار DNA تخلیص شده نیز با

<sup>1</sup> - Trypticase Soy Broth.

<sup>2</sup> - Tris 10mM , EDTA 1 mM , pH 8.

<sup>3</sup> - CTAB 10% , NaCl 0.7 M.

محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت رش<sup>4</sup> براساس دستور العمل آن انجام گرفت.

برای کلون سازی ژن استرپتولیزین O در دو پلاسمید pSK و pET28a به این ترتیب عمل گردید. ابتدا محصول PCR با آنزیمهای BamHI و XhoI برش داده و سپس در ناقلین مورد نظر که با همان آنزیمها بریده شده بود، وارد شد. عمل اتصال ژن استرپتولیزین O در این پلاسمیدها با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در حرارت 16 درجه سانتی گراد به مدت یک شب انجام گرفت. پلاسمیدهای pSK<sup>+</sup>-SLO و pET28a-SLO به ترتیب در سلولهای مستعد اشیریشیا کلی سویه DH5α و سویه BL21-DE3-plySs وارد گردید.

برای تأیید صحت ترادف نوکلئوتید ژن به دست آمده از محصول PCR، ساختار پلاسمیدی pSK<sup>+</sup>-SLO با کتری اشیریشیا کلی سویه DH5α وارد گردید. پس از آن جهت تعیین ترادف به شرکت MWG آلمان ارسال شد. ترادف نوکلئوتیدی محصول PCR با استفاده از روش سنگر<sup>5</sup> تعیین شد.

برای تولید پروتئین SLO، باکتریهای اشیریشیا کلی تراریخت شده با پلاسمید pET28a-SLO در محیط نوترین برات کشت داده و در حرارت 37 درجه سانتی گراد بر روی شیکر با حداقل 170 دور در دقیقه قرار گرفت. پس از این که تعداد باکتریها به حد مناسب رسید (OD=0/6)، از محلول یک مولار IPTG به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی IPTG به یک میلی مولار برسد. چهار ساعت پس از افزودن IPTG، رسوب باکتریها با سانتریفیوژ در 4000 دور در دقیقه به مدت نیم ساعت جمع آوری شد. برای بررسی نتیجه القا از روش الکتروفورز پروتئینهای حاصل از رسوب باکتری بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE استفاده گردید.

اندازه گیری جذب نور در طول موجهای 260 و 280 نانومتر به دست آمد.

با استفاده از ترادف استاندارد ژن استرپتولیزین O<sup>1</sup> طراحی پرایمرهای رفت<sup>2</sup> و برگشت<sup>3</sup> انجام شد. پرایمر رفت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر برگشت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم XhoI می باشد (ترادف آنزیمها با زیر خط مشخص شده اند).

تکثیر ژن استرپتولیزین O با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرآز در حجم 50 میکرولیتر انجام شد. غلظت عوامل PCR شامل 500 نانو گرم از DNA الگو، یک میلی مولار از هر پرایمر، 2/5 میلی مولار از یون منیزیم، 200 میلی مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5 واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر PCR با غلظت IX است. برنامه PCR استفاده شده به این صورت است: مرحله اول حرارت اولیه در 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه (یک چرخه) و مرحله دوم PCR متشکل از 30 چرخه که هر یک از سه قسمت تشکیل شده است: قسمت اول دناتور کردن (94 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (47 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (72 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه). در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه و برای یک چرخه است. بررسی نهایی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز 1 درصد در بافر تریس - اسید بوریک - EDTA (TBE) با pH:8 انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت. تخلیص

<sup>1</sup> - M18638.

<sup>2</sup> - Forward: 5' GCCGGATCCATGGGCGCCTGTTGCCAA 3'.

<sup>3</sup> - Reverse: 5' CCGCCTCGAGTTATTTTGGCGGCTTCAA 3'.

<sup>4</sup> - Roche.

<sup>5</sup> - Sanger.

واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ نیتروسلولوز، کاغذ مزبور در محلول دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت.

### نتایج

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری استرپتوکک پیوژن برابر 500 میکروگرم در میلی لیتر برآورد گردید. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن استرپتولیزین O استفاده گردید. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر 100 جفت بازی حدود 1700 جفت باز بود (شکل 1).

نتیجه مقایسه انجام شده بین ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pSK کلون گردیده بود، با ترادف ارائه شده برای ژن استرپتولیزین O که در بانک ژن ثبت شده است، یکسان بود.

پروتئین نو ترکیب استرپتولیزین O پس از 4 ساعت از القا با IPTG تولید گردید. وزن پروتئین تولید شده در حدود 70 کیلو دالتون بود. نتیجه القای پروتئین استرپتولیزین O در شکل 2 آمده است.

خالص سازی پروتئین SLO با استفاده از کیت Ni-NTA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت (شکل 2). غلظت پروتئین با استفاده از روش براد فورد سنجیده شد. مقدار پروتئین موجود در محلول برابر 100 میکروگرم در میلی لیتر بود.

نتایج مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در آزمون وسترن بلات در شکل 3 آمده است. براساس نتایج به دست آمده، در نمونه سرمی موش تلقیح شده با استرپتولیزین O تجارتي، باند مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ نیتروسلولوز مشاهده می شود. در عین حال هیچ باندي دال بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه سرم موش نرمال دیده نشد (شکل 3).

تخلیص پروتئین با استفاده از کیت Ni-NTA براساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیژن، آمریکا) انجام گرفت. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش براد فورد اندازه گیری گردید و کیفیت آن نیز با استفاده از روش الکتروفورز پروتئین بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE بررسی گردید.

برای تأیید صحت پروتئین تولید شده و تعیین ویژگی آنتی ژنتیک آن از آزمون وسترن بلات استفاده شده است. برای این منظور ابتدا به یک موش درسه نوبت به فاصله سه هفته به صورت داخل جلدی استرپتولیزین O تجارتي به همراه آدجوانت فروند تزریق گردید (در تزریق اول از آدجوانت کامل و در تزریق های بعدی از آدجوانت ناقص استفاده شد). پس از بالا رفتن تیتراژ آنتی بادی بر علیه این پروتئین، سرم حیوان تهیه گردید.

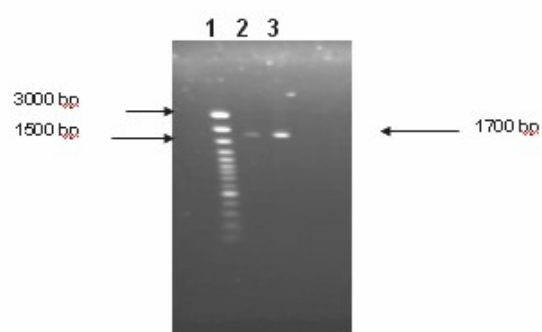
برای انجام آزمون وسترن بلات پس از الکتروفورز پروتئین های حاصل از رسوب باکتری های القا یافته بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به دست آمده به کاغذ نیترو سلولوز منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری 25 میلی مولار تریس، 192 میلی مولار گلیسین و 20 درصد متانول به مدت یک ساعت و در شدت جریان 90 ولت انجام گرفت. مرحله مسدود سازی کاغذ نیترو سلولوز با قرار دادن کاغذ در محلول 2/5 درصد آلومین سرم گاوی به مدت یک ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدود سازی، کاغذ نیترو سلولوز به مدت یک ساعت در مجاورت سرم موش تلقیح شده با استرپتولیزین O تجارتي (1/100) و یک نمونه سرم موش تلقیح نشده (کنترل منفی) قرار داده شد. پس از انکوباسیون یک ساعته با نمونه های سرم، نوارهای کاغذ نیتروسلولوز سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل NaCl نیم مولار، 0/02 Tris pH 8.5، 0/05 tween20 در صد) شستشو شده و به مدت یک ساعت با آنتی بادی ضد موش متصل با پراکسیداز با رقت 1/2500 انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشوی نمونه ها با بافر TBS-T، برای مشاهده باندهای مربوط به

### بحث

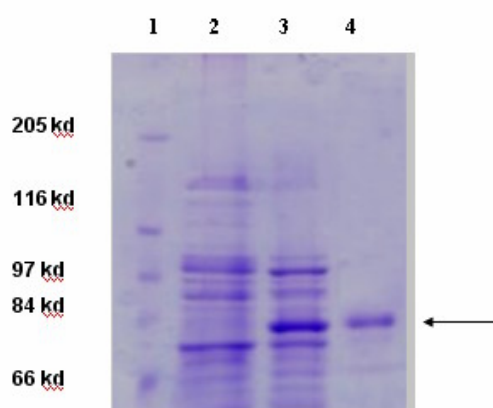
در این تحقیق از ناقل pET28a برای تولید استرپتولیزین O استفاده گردید. سیستم pET از جمله قوی ترین سیستم ها برای بیان ژن و تولید پروتئین های نو ترکیب در باکتری اشریشیا کلی می باشد. در این سیستم ژن هدف تحت کنترل پروموتور قوی T7 بوده و در ژنوم میزبان (سویه BL21-pLysS اشریشیا کلی) رونویسی از ژن تحت کنترل این پروموتور توسط RNA پلیمرآز فاژ T7 که در سلول باکتری کلون شده است، انجام پذیرفت. بنابر این به علت استقلال سیستم رونویسی ژن از سلول میزبان، تولید mRNA و در نهایت تولید پروتئین در این سیستم متأثر از عوامل سلولی دخیل در سنتز پروتئین نمی باشد. به همین علت تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم هایی است که رونویسی وابسته به پلیمرآزهای سلول میزبان است (9). چنان که در این تحقیق میزان پروتئین تا حدود 100 میکروگرم در میلی لیتر بر آورد شده که در مقایسه با نتیجه سایر مطالعات قابل توجه است.

در مطالعات قبلی از دو ناقل pMAL و pGEX جهت تولید آنزیم استرپتولیزین O استفاده شده است. این دو ناقل دارای ترادف نوکلئوتیدی مربوط به یک پروتئین الحاقی (گلوکاتایون ترانسفرآز و مالتوز بایندینگ پروتئین) می باشند که به پروتئین نو ترکیب متصل است. وجود این پروتئین های اضافی علاوه بر این که در عرضه ساختار آنتی ژنیک به خصوص در تست های تشخیصی اختلال ایجاد می کند، در میزان محصول پروتئین نو ترکیب تولید شده نیز اثر دارد (5,6).

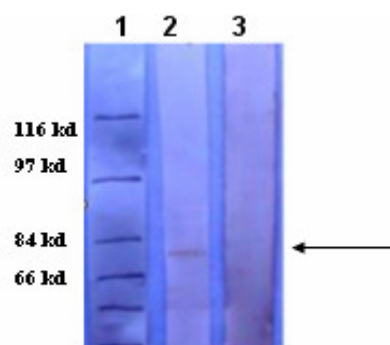
جهت مقایسه آنتی ژنیسیته پروتئین نو ترکیب تولید شده در این تحقیق با استرپتولیزین O تجارتي، از آزمون وسترن بلات استفاده گردید. نتایج نشان می دهد که پروتئین تولید شده در مطالعه حاضر دارای خاصیت آنتی ژنیک بوده و قادر به شناسایی با آنتی بادی های ضد استرپتولیزین O تجارتي می باشد.



شکل ۱. ستون اول مارکر ۱۰۰۰ bp، ستون دوم با ند ۱۶۰۰ bp مربوط به ژن SLO (با ۲ میلی مولار منیزیم)، ستون سوم با ند ۱۶۰۰ مربوط به ژن SLO (با ۲/۵ میلی مولار منیزیم)



شکل ۲. تخلیص پروتئین SLO؛ ستون ۱: پروتئین مارکر، ستون ۲: نمونه قبل از القا، ستون ۳: نمونه بعد از القا، ستون ۴: پروتئین خالص شده



شکل ۳. آزمون ایمنوبلات با سرم موش تلقیح شده با استرپتولیزین O (ستون ۲) و موش طبیعی (ستون ۳) ستون ۱: پروتئین مارکر

3. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic Microbiology. 11<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby; 2002.p. 298-314.
4. Rose NR, Conway de Macario E, Fahey JL, Friedman H, Penn GM. Manual of clinical laboratory immunology. ASM: Washington; 1992. p.427.
5. Novel genomic rearrangement that affects expression of the Streptococcus pyogenes Streptolysin O (slo) gene. J Bac 2003; 185(6): 1857-1869.
6. Weller U, Muller L, Messner M, et al. Expression of active streptolysin O in Escherichia coli as a maltose-binding-protein--streptolysin-O fusion protein. The N-terminal 70 amino acids are not required for hemolytic activity. Eur J Biochem 1996;236:34-39.
7. Valazquez B, Massaldi H, Battistoni J, Chabalgoity AJ. Construction and expression of recombinant Streptolysin-o and reevaluation of its use in immunoassays. Clin Diag Lab Imm 2005; 12(5):683-684.
8. Pinkney, M. Kapur, V, Smith. J, et al. Different forms of Streptolysin O produced by Streptococcus pyogenes and by Escherichia coli expressing recombinant toxins: cleavage by Streptococcal Cysteine Protease. Infect Immun 1995; 63 (7): 2776-2779.
9. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning, a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. Vol 3. Cold Spring New York: Harbor Laboratory Press 2001.

در تولید پروتئین استرپتولیزین O با استفاده از سیستم‌های القا پروتئین نظیر pGEX، باندهای پروتئینی اضافی دیده می‌شود. وجود این باندها به خصوص در نتایج تست‌هایی نظیر وسترن بلات تداخل ایجاد می‌کند(6). ولی همان طور که در شکل 2 دیده می‌شود پروتئین تولید شده در این تحقیق تنها در یک باند دیده می‌شود که نتیجه وسترن بلات (شکل 3) وجود یک باند را تأیید می‌کند.

با توجه به واکنش استرپتولیزین O نو ترکیب به دست آمده با آنتی بادی ضد استرپتولیزین O تجارتي می‌توان از این پروتئین برای تشخیص عفونت ناشی از استرپتوکوک پیوژن بهره برد. با استفاده از روش‌های تشخیصی کمی نظیر الیزا می‌توان حتی میزان آنتی‌بادی ضد این پروتئین را نیز تعیین نمود که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

### نتیجه گیری

ژن کلون شده در این تحقیق از نظر سکانس، همولوژی با ژن استرپتولیزین O داشت. تولید این پروتئین با استفاده از ناقلین بدون ترادف مربوط به پروتئین الحاقی انجام شد و مقدار مناسبی پروتئین به دست آمد. این پروتئین خاصیت آنتی ژنیک مشابه با فرم تجارتي داشته و می‌توان از آن جهت تشخیص آنتی بادی ضد استرپتولیزین O در افراد مبتلا نیز استفاده نمود.

### منابع

1. Murray PR, Rosenthal SK, Kobayashi SG, Pfaller MA. Medical Microbiology. 4<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby;2002.p: 217-232.
2. Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley and Wilson Microbiology and Microbial infections. 10<sup>th</sup> ed. London:Hodder Arnold; 2005. p. 833.



## Expression of recombinant streptolysin O by Escherichia coli

Abtahi H<sup>9</sup>, Mossayebi Gh<sup>1</sup>, Salmanian AH<sup>10</sup>

### Abstract

**Introduction:** Streptolysin O is an antigenic protein that is secreted by Streptococcus pyogenes. Streptococcal infections are diagnosed with anti streptolysin O. At present, streptolysin O is produced by vectors that have fusion protein. In this study we produced streptolysin O without fusion protein vectors.

**Materials and Methods:** In this experimental study, we amplified Streptolysin O gene by Polymerase chain reaction (PCR) method and subcloned it to prokaryotic expression vector pET28a. Escherichia coli BL21-DE3-plySs were transformed with pET28a-SLO and gene expression was induced by IPTG. Then it was purified by Ni-NTA kit. The concentration of SLO was assayed by Bradford method. To confirm recombinant SLO Western Blot was used.

**Results:** The sequencing result was confirmed by Sanger method and was the same as SLO gene. Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS was transformed with pET28a-SLO and gene expression was induced by IPTG. The expressed protein was purified by affinity chromatography by Ni-NTA resin. The concentration of purified protein was 100µg/ml. The integrity of product was confirmed by Western Blot analysis using a mouse anti streptolysin O.

**Conclusion:** Our data showed that recombinant SLO protein can be produced by pET28a in Escherichia coli. This protein maintains its antigenic effect very well. Therefore, recombinant SLO has same epitopes with natural form of this antigen.

**Key words:** Streptococcus pyogenes, streptolysin O gene, gene expression, Escherichia coli

<sup>9</sup> - Assistant professor, department of microbiology and immunology, Arak University of medical sciences.

<sup>10</sup> - Associate professor, National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran.



This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.