بیان پروتئین نوترکیب استرپتولیزین O استرپتوکک پیوژن در باکتری اشریشیاکلی

دکتر حمید ابطحی[1*]، دکتر قاسم مسیبی[1]، دکتر علی هاتف سلمانیان [2]

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

2 - دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری

تاریخ دریافت۸۵/۱۱/۱۶ ، تاریخ پذیرش۸۶/۴/۱۳

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 استرپتولیزینO 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 اشریشیا کلی سویه BL21- DE3-plySs شد. تولید پروتئین با القا توسط IPTG و بهینه سازی شرایط صورت گرفت. پروتئین نوترکیب با استفاده از کیتNi-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 استرپتولیزینO 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 اشریشیا کلی نیز امکان‌پذیر است. پروتئین تولید شده خاصیت آنتی‌ژنیک 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، اشریشیا کلی

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

Email: h_abtahi2@yahoo.co.uk

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:27 +0330 on Wednesday January 17th 2018

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:27 +0330 on Wednesday January 17th 2018

مقدمه

استرپتوکک‌های گروه A عامل بسیاری از عفونت‌های چرک زا از جمله گلو درد چرکی، تب زایمان و عفونت زخم‌ها می‌باشند. این باکتری باعث دو عارضه مهم پس از عفونت یعنی تب روماتیسمی و گلومرولونفریت؛ 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 تیتر 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 تیتر آنتی بادی بر علیه این پروتئین دیده می‌شود. با تعیین میزان تیتر این آنتی بادی می‌توان روند عفونت ناشی از این باکتری را تعیین نمود. در روش متداول برای تعیین آنتی بادی برعلیه استرپتولیزین O از پروتئین طبیعی تهیه شده از استرپتوکک پیوژن استفاده می‌شود(2). محصول بسیار ناچیز این پروتئین از باکتری استرپتوکک پیوژن و خطرآلودگی محیط موجب گردیده از شکل نوترکیب این پروتئین استفاده شود. ناقلین استفاده شده برای تولید این آنزیم از جمله pGEX وpMALC2 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 (گلوتاتیون ترانسفرآز و مالتوز بایدینگ پروتئین) می شود(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)، اشریشیا کلی سویه DH5α و اشریشیا 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 وتکنولوژی 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[1] در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE[2] حل گردید و با استفاده از آنزیم لیزوزیم و سپس با اثر SDS وآنزیم پروتئیناز K لیز شد. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/NaCl[3] استخراج گردید. پروتئین‌ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل/ کلروفرم/ ایزوآمیل 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

[1] - Trypticase Soy Broth.

[2] - Tris 10mM , EDTA 1 mM , pH 8.

[3] - CTAB 10% , NaCl 0.7 M.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:27 +0330 on Wednesday January 17th 2018

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

با استفاده از ترادف استاندارد ژن استرپتولیزین O[1] طراحی پرایمرهای رفت[2] و برگشت[3] 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 زنجیره‌ای 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 منیزیوم، 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 سانتی‌گراد 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 دناتورکردن (94 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (47 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه). در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد 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 محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت رش[4] 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^+-SLO و pET28a -SLO به ترتیب در سلول‌های مستعد اشریشیا کلی سویه DH5α و سویه BL21- DE3-plySs وارد گردید.

برای تأئید صحت ترادف نوکلئوتید ژن به دست آمده از محصول PCR، ساختار پلاسمیدی pSK^+-SLO به باکتری اشریشیا 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[5] تعیین شد.

برای تولید پروتئین SLO ، باکتری‌های اشریشیا کلی تراریخت شده با پلاسمید pET28a –SLO در محیط نوترین برات کشت داده و در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد 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 جمع‌آوری شد. برای بررسی نتیجه القا ازروش الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE استفاده گردید.

[1] - M18638.
[2] - **Forward:** 5' GCCGGATCCATGGGCGCCTGTTGCCAA 3'.
[3] - **Reverse:** 5' CCGCCTCGAGTTATTTTGCGGCTTCAA 3'.
[4]- Roche.
[5] - Sanger.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:27 +0330 on Wednesday January 17th 2018

تخلیص پروتئین با استفاده از کیت Ni-NTA براساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش براد فورد اندازه‌گیری گردید و کیفیت آن نیز با استفاده از روش الکتروفورز پروتئین بر روی ژل10 درصد SDS-PAGE بررسی گردید.

برای تأئید 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 تجارتی به همراه آدجوانت فروند تزریق گردید (در تزریق اول از آدجوانت کامل و در تزریق‌های بعدی از آدجوانت ناقص استفاده شد). پس از بالا رفتن تیتر آنتی بادی بر علیه این پروتئین، سرم حیوان تهیه گردید.

برای انجام آزمون وسترن بلات پس از الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری‌های القا یافته بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به دست آمده به کاغذ نیترو سلولز منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری 25 میلی مولار تریس، 192 میلی مولار گلایسین و 20 درصد متانول به مدت یک ساعت و در شدت جریان 90 ولت انجام گرفت. مرحله مسدود سازی کاغذ نیترو سلولز با قرار دادن کاغذ در محلول 2/5 درصد آلبومین سرم گاوی به مدت یک ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدود سازی، کاغذ نیترو سلولز به مدت یک ساعت در مجاورت سرم موش تلقیح شده با استرپتولیزین O تجارتی (1/100) و یک نمونه سرم موش تلقیح نشده (کنترل منفی) قرار داده شد. پس از انکوباسیون یک ساعته با نمونه‌های سرم، نوارهای کاغذ نیتروسلولز سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل NaCl نیم مولار، Tris pH 8.5 0/02 مولار، tween20 0/05 در صد) شستشو شده و به مدت یک ساعت با آنتی بادی ضد موش متصل با پراکسیداز با رقت1/2500 انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها با بافر TBS-T، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی‌ژن در کاغذ نیتروسلولز، کاغذ مزبوردرمحلول 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 مارکر100 جفت بازی حدود 1700 جفت باز بود (شکل 1).

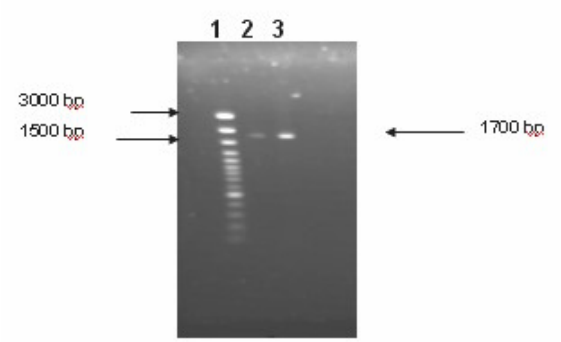
نتیجه مقایسه انجام شده بین ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pSK کلون گردیده بود، با ترادف ارائه شده برای ژن استرپتولیزین O که در بانک ژن ثبت شده است، یکسان بود.

پروتئین نوترکیب 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.

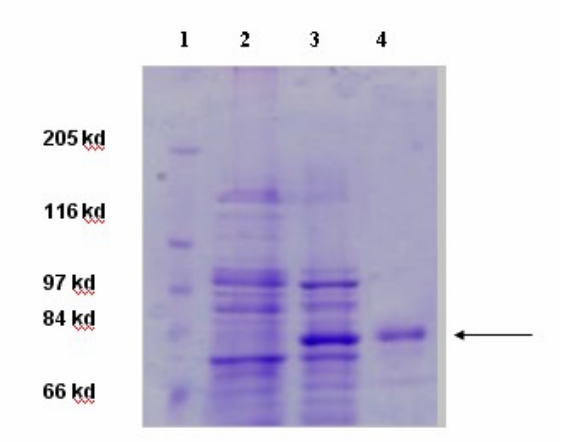
خالص سازی پروتئین SLO با استفاده ازکیت Ni-NTA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت(شکل 2). غلظت پروتئین با استفاده از روش براد فورد سنجیده شد. مقدار پروتئین موجود در محلول برابر 100 میکروگرم در میلی لیتر بود.

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 تجارتی، باند مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ نیتروسلولز مشاهده می‌شود. در عین حال هیچ باندی دال بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه سرم موش نرمال دیده نشد(شکل 3).

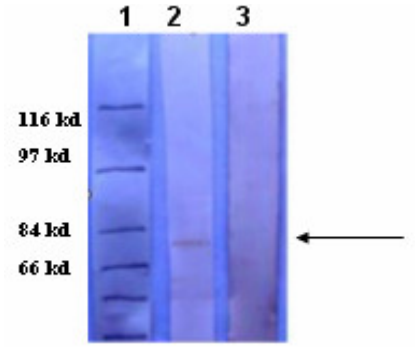
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:27 +0330 on Wednesday January 17th 2018



شکل ۱. ستون اول مارکر bp ۱۰۰ ، ستون دوم با ند bp ۱۶۰۰ مربوط به ژنSLO (با ۲ میلی مولار منیزیم) ، ستون سوم با ند bp ۱۶۰۰ مربوط به ژن SLO (با ۲/۵ میلی مولار منیزیم)



شکل ۲. تخلیص پروتئینSLO ؛ 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

بحث

در این تحقیق از ناقل pET28a برای تولید استرپتولیزین O استفاده گردید. سیستم pET از جمله قوی‌ترین سیستم‌ها برای بیان ژن و تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری اشریشیا کلی می‌باشد. 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 دراین سیستم متأثر از عوامل سلولی دخیل در سنتز پروتئین نمی‌باشد. به همین علت تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم‌هایی 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 pGEX و pMAL جهت تولید آنزیم استرپتولیزین O استفاده شده است. این دو ناقل دارای ترادف نوکلئوتیدی مربوط به یک پروتئین الحاقی (گلوتاتیون ترانسفرآز و مالتوز بایدینگ پروتئین) می‌باشند که به پروتئین نوترکیب متصل است. وجود این پروتئین‌های اضافی علاوه بر این که در عرضه ساختار آنتی‌ژنیک به خصوص در تست‌های تشخیصی اختلال ایجاد می‌کند، در میزان محصول پروتئین نوترکیب تولید شده نیز اثر دارد(5،6).

جهت مقایسه آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب تولید شده در این تحقیق با استرپتولیزین O تجارتی، از آزمون وسترن بلات استفاده گردید. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین تولید شده در مطالعه حاضر دارای خاصیت آنتی ژنیک بوده و قادر به شناسایی با آنتی بادی‌های ضد استرپتولیزین O تجارتی می‌باشد.

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 تأئید می‌کند.

با توجه به واکنش استرپتولیزین O نوترکیب به دست آمده با آنتی بادی ضد استرپتولیزین O تجارتی می‌توان از این پروتئین برای تشخیص عفونت ناشی ازاسترپتوکک 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 تجارتی 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. 4th ed. St. Louis: Mosby;2002.p: 217-232.
2. Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley and Wilson Microbiology and Microbial infections. 10th ed. London:Hodder Arnold; 2005. p. 833.
3. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic Microbiology. 11th 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. 3rd ed. Vol 3. Cold Spring New York: Harbor Laboratory Press 2001.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:27 +0330 on Wednesday January 17th 2018

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:27 +0330 on Wednesday January 17th 2018

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:27 +0330 on Wednesday January 17th 2018

Expression of recombinant streptolysin O by Escherichia coli

Abtahi H[9], Mossayebi Gh[1], Salmanian AH[10]

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

[9] - Assistant professor, department of microbiology and immunology, Arak University of medical sciences.
[10] - Associate professor, National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 10:27 +0330 on Wednesday January 17th 2018

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.