فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال شانزدهم، شماره ۳، صفحه ۱۹۷ - ۱۸۹ (پاییز ۱۳۹۲)

ISMJ 2013; 16(3): 189-97

کلونینگ ژن *fimH* اشریشیاکلی یوروپاتوژن و بررسی تنوع توالی آن

سمانه استادمحمدی[۱]، محمد حسن شیرازی[۲*]، جلیل فلاح‌مهرآبادی[۳]، محمدرضا پورمند[۲]، فائزه حمیدیه[۱]، هدروشا ملاآقامیرزایی[۱]، داود افشار[۲]

[۱] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان
[۲] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشکدهٔ علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران

(دریافت مقاله: ۹۰/۷/۱۳- پذیرش مقاله: ۹۰/۹/۶)

چکیده

زمینه: اشریشیا کلی یوروپاتوژن، شایع‌ترین پاتوژن جدا شده از مجاری ادراری محسوب می‌شود، که اغلب از فلور روده‌ای خود فرد منشأ می‌گیرد. عفونت مجاری ادراری، یکی از بیماری‌های شایع عفونی در انسان است. از آنجایی‌که، مرحله اتصال در کلونیزاسیون باکتری نقش مهمی دارد و سپس عفونت ایجاد می‌گردد، یکی از راه‌کارهای مهم مهار عفونت، مهار اتصال باکتری می‌باشد. به دلیل اینکه، پروتئین**FimH** به‌عنوان ادهسین عمل می‌نماید، برای تهیه واکسن کاندیدی مناسب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا استخراج **DNA** ژنومیک باکتری اشریشیا کلی سویه **ATCC** ۳۵۲۱۸ انجام شد. پس از طراحی پرایمر برای ژن ***fimH***، واکنش **PCR**، ابتدا با آنزیم **Taq DNA Polymerase** و سپس با آنزیم **pfu DNA Polymerase** صورت گرفت. از پلاسمید **pBluescript (SK-)**، برای کلون محصول **PCR** استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار **ClustalW** و **MEGA4** توالی به‌دست آمده با توالی ژنی موجود با تک ژن همترازگردید و تنوع ژنی آن بررسی گردید.

یافته‌ها: پس از توالی یابی ژن ***fimH*** کلون شده، با استفاده از نرم‌افزار **ClustalW** و **MEGA4** نتیجه این سکانس با توالی سویه‌های اشریشیا کلی واجد ژن ***fimH*** موجود در بانک ژن همتراز شدند و بر اساس این همترازی، ناحیه **N** ترمینال در سطح پروتئین و **DNA** حفاظت شده می‌باشد.

نتیجه‌گیری: ناحیه‌ی **N** ترمینال ***FimH*** در بین سویه‌های بالینی یک توالی حفاظت شده است و می‌توان از آن برای طراحی واکسن علیه عفونت ادراری استفاده نمود.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی یوروپاتوژن، پیلی‌تیپ **I**، ژن ***fimH***، کلونینگ

* تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه میکروب‌شناسی
E-mail: mhshirazi@tums.ac.ir

مقدمه

اشریشیا کلی جنس خانواده انتروباکتریاسه[1] بوده و شامل باکتری‌هایی است که توانایی رشد هوازی و بی‌هوازی را دارا می‌باشد. هنگامی‌که اشریشیا کلی وارد دستگاه ادراری می‌شود، می‌تواند بیماری‌های مختلفی از یک اورتریت ساده تا سیستیت و پیلونفریت و حتی باکتریمی را ایجاد نماید (۱).

سویه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژن شایع‌ترین سویه‌های بیماری‌زا در انسان می‌باشند. مهم‌ترین خصوصیت سویه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژن، توانایی کلونیزه شدن آنها در سطح سلول‌های یورواپیتلیوم میزبان می‌باشد (۲ و ۳).

عفونت‌های دستگاه ادراری، در زمره متداول‌ترین عفونت‌های شایع در انسان می‌باشد. جنس مؤنث در هر سنی، به‌جز دوران نوزادی بیشتر از جنس مذکر در خطر عفونت دستگاه ادراری می‌باشد. این عفونت در زنان جوان بسیار شایع بوده، به‌طوری که ۲۰ تا ۲۵ درصد از زنان عفونت مجاری ادراری عود کننده را دارند (۴). در سویه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژن اعضای ادهسین شامل، پیلی S، ادهسین‌های خانواده Dr، پیلی P و پیلی‌تیپ I هستند (۵).

اتصال حساس به مانوز، در سویه‌های اشریشیا کلی دارای فیمبریه تیپ I انجام می‌گردد. این ادهسین‌ها در شناسایی گیرنده‌های حاوی α- مانوز نقش دارد. اشریشیاکلی واجد پیلی MS یا همان پیلی‌تیپ I سلول‌های مخمری و اریتروسیت خوکچه هندی را آگلوتینه می‌کند. برای بیان و مونتاژ پیلی‌تیپ I، حداقل ۹ ژن که در دسته ژنی fim قرار دارند، نیاز است (۵ و ۶).

در نوک پیلی‌تیپ I، ساختار فیبریلی کوچکی قرار دارد که شامل FimG و ادهسین FimH و ترکیب جزئی از FimF می‌باشد که به ساختار میله‌ای زیر واحد FimA متصل شده است. *fimH* برای جذب باکتری به داخل سلول‌های اپیتلیال مثانه لازم است. *fimH* می‌تواند مشابه مولکول پروتئینی اینویزین در یرسینیا سودوتوبرکلوزیس و اینترنالین A در لیستریا مونوسایتوژنز عمل نماید. تهاجم به واسطه *fimH* به سلول‌های اپی‌تلیال مثانه نیاز به فعال‌سازی آبشار سیگنال ترانس داکشن با استفاده از پروتئین تیروزین کیناز، فسفواینوزیتید ۳ کیناز و بازآرایی اکتین اسکلت سلولی در میزبان دارد (۷). ادهسین FimH یوروپلاتین‌های مانوزیلاته و گیرنده‌های اینتگرین β-۱ و α-۳ را از روی سطح لومنی سلول‌های یوروتلیال مثانه شناسایی می‌کنند (۸).

از آنجایی‌که مرحله اتصال در کلونیزاسیون باکتری نقش مهمی دارد و سپس عفونت ایجاد می‌شود، یکی از راه‌کارهای مهم مهار عفونت، مهار اتصال باکتری می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین نوک پیلی *fimH* برای جذب باکتری به داخل سلول‌های اپیتلیال مثانه ضروری است.

یکی از راه‌های محدود کردن عفونت‌های حاد ادراری، تهیه واکسن علیه این عفونت‌ها است. پروتئینی کاندید مناسب برای تهیه واکسن است که قدرت تحریک ایمنی‌زایی بالایی داشته باشد، در بین ایزوله‌های بیماری‌زا تنوع زیادی نداشته باشد و فاقد تغییر آنتی‌ژنتیکی و تشابه آنتی‌ژنی باشد. از آنجایی‌که این پروتئین به‌عنوان ادهسین عمل می‌نماید و واجد ویژگی‌های مذکور می‌باشد، برای تهیه واکسن کاندیدی مناسب است. این تحقیق با هدف کلونینگ ژن مورد نظر انجام شد تا در تحقیقات آتی از آن

[1] Entrobacteriaceae

برای تهیه‌ی پروتئین نوترکیب FimH استفاده شود (۹).

مواد و روش‌ها

جهت کشت باکتری اشریشیا کلی سویه استاندارد ۳۵۲۱۸ATCC از محیط LB براث استفاده گردید. محیط کشت حاوی باکتری تلقیح شده یک شب در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از رشد باکتری در محیط کشت، DNA ژنومیک با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی) استخراج گردید. یک جفت پرایمر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزارهای ژن رانر و الیگو طراحی شدند.

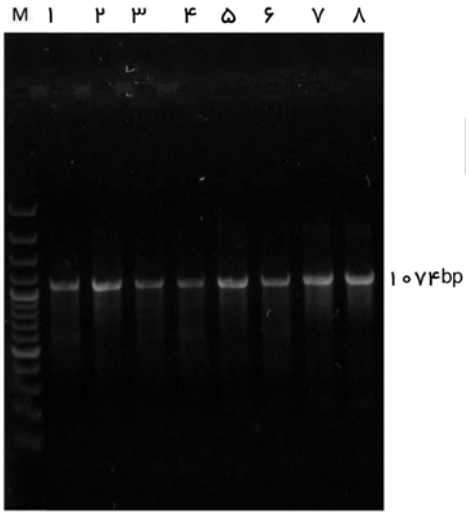
Forward:5'TCCCGTTACAGGTCAGAGC 3'
Reverse:5'GTGCAGGTTTTAGCTTCAGG 3'

از آنجایی که برای کلونینگ ژن از روش کلونینگ با انتهای صاف[2] استفاده شد. بنابراین در پرایمرها توالی برش آنزیم در نظر گرفته نشد. ابتدا *ژن fimH* طی فرآیند PCR با استفاده از آنزیم Taq DNA Polymerase تکثیر گردید و سپس تکثیر ژن *fimH* با استفاده از آنزیمPfu DNA Polymerase دنبال شد. محصول PCR در کنار مارکر وزن مولکولی، بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید. با استفاده از آنزیم محدودگر EcoR V، وکتور pBluescript(SK-) برش داده شد و در ادامه اتصال ژن *fimH* به وکتور pBluescript(SK-) خطی شده، توسط آنزیم DNA Ligase T4 صورت گرفت.

وکتور نوترکیب به میزبان باکتریایی *E.coli* DH5α اینسرت و سلول‌های ترانسفورم شده، روی پلیت‌های اگار حاوی مقدار مناسبی از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، IPTG و X-gal کشت داده شدند. انتخاب کلونی سفید حاوی ناقل نوترکیب به‌روش غربالگری کلونی‌های سفید – آبی صورت گرفت. پس از استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، جهت تأیید نهایی توالی یابی انجام گردید. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار ClustalW و MEGA4 نتیجه این سکانس با توالی سویه‌های اشریشیا کلی دارای ژن *fimH* موجود در بانک ژن همتراز شدند.

یافته‌ها

پس از رشد باکتری اشریشیاکلی سویه ۳۵۲۱۸ATCC در محیط LB براث[3] استخراج DNA ژنومیک انجام شد. یک جفت پرایمر اختصاصی، در ابتدا و انتهای ژن طراحی شدند. واکنش PCR به‌منظور تکثیر ژن *fimH* انجام گرفت (شکل ۱).



شکل ۱) نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آنزیم *Pfu* DNA Polymerase

محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد. اتصال ژن *fimH* در وکتور pBluescript(SK-)

[2] Blunt cloning

[3] Luria-Bertani medium (LB)

خطی شده، با آنزیم Ligase T4 DNA انجام و کلون گردید. به‌منظور تأئید صحت ایجاد کلونی، توالی‌یابی انجام گرفت و توالی پروتئینی به‌دست آمده با توالی پروتئینی ژن *fimH* مربوط به *E.coli* UTI89 موجود در بانک ژن مقایسه گردید و شباهت فراوانی را نشان داد (شکل ۲).

```
fal-T                    MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVN 50
gi|91209055_4913555-4914457 MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVN 50
                         **************************************************

fal-T                    VGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNG 100
gi|91209055_4913555-4914457 VGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGAAYGGVLSSFSGTVKYNG 100
                         **********************************:***************

fal-T                    SSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVL 150
gi|91209055_4913555-4914457 SSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVL 150
                         **************************************************

fal-T                    ILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSV 200
gi|91209055_4913555-4914457 ILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSV 200
                         **************************************************

fal-T                    PIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNG 250
gi|91209055_4913555-4914457 PIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNG 250
                         **************************************************

fal-T                    TIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ 300
gi|91209055_4913555-4914457 TIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ 300
                         **************************************************
```

شکل ۲) نتیجه همترازی پروتئینی ژن کلون شده با توالی ژن *fimH* موجود در بانک ژن

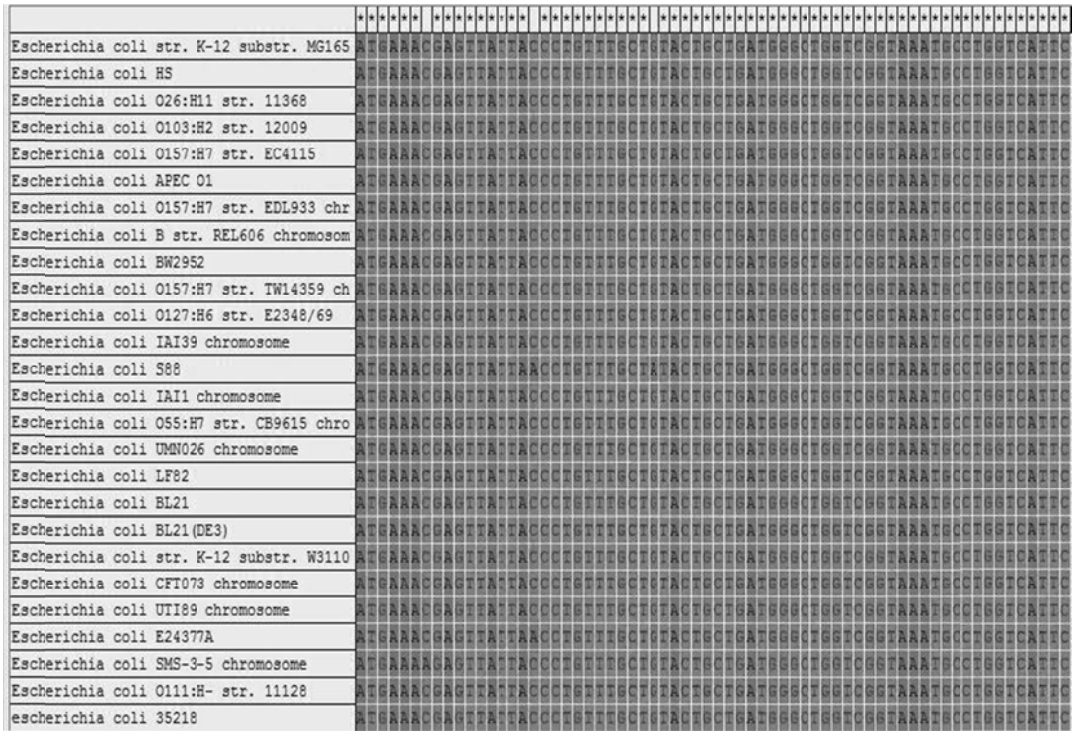
در ادامه با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 سویه‌های اشریشیا کلی واجد ژن *fimH* موجود در بانک ژن در سطح پروتئین و نوکلوتیدی، همترازی متعدد شدند و مشخص گردید ناحیه N ترمینال ژن *fimH* در سویه‌های فوق حفاظت شده می‌باشد (شکل ۳ و ۴).

در بررسی همترازی پروتئینی انجام شده، موتاسیون Ala(۵۱) → Val در ۷ ژن، Ser(۱۰۲) → Asn در ۴ ژن، Asn(۹۴) → Ser در ۴ ژن، Val(۱۴۲) → Gly در ۳ ژن، Ala(۱۴۳) → Val در ۲ ژن، Gly(۹۰) →Ser در۲ ژن مشاهده گردید (جدول ۱). از آنجایی‌که ۲۱ اسید آمینه اول سیگنال پپتید محسوب می‌شوند، موتاسیون‌های نقطه‌ای در سویه‌های اشریشیا کلی واجد ژن *fimH* از اسید آمینه ۲۱ الی ۷۵ به‌دلیل دخالت و اهمیت این ناحیه در اتصال باکتری، مورد بررسی قرار گرفتند و موتاسیون‌های نقطه‌ای Ala(۵۱)→Val در ۷ ژن مشاهده گردید (جدول ۲).

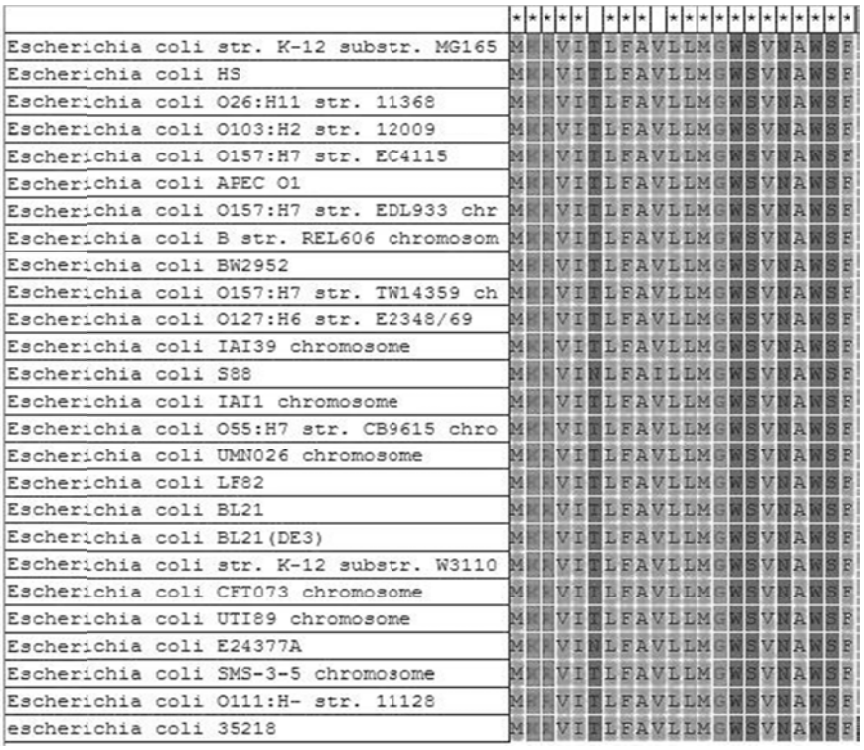
نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که در سویه‌های واجد ژن *fimH* ناحیه N ترمینال در سطح پروتئین و DNA حفاظت شده بوده ولی در ناحیه C ترمینال دارای اختلاف می‌باشد. در تحقیقات آینده جهت تهیه واکسن ناحیه N ترمینال به‌دلیل حفاظت شده بودن پیشنهاد می‌گردد.

جدول ۱) نتیجه Multiple Alignment توالی‌های پروتئینی FimH در سویه‌های اشریشیا کلی واجد ژن *fimH* با استفاده از نرم‌افزار MEGA4

سویه‌های باکتریایی اشریشیا کلی حاوی ژن *fimH*	شماره دسترسی	شماره دسترسی
Escherichia coli str. K-12 substr. MG165	NC – 000913.2	Ala (51) → Val
Escherichia coli HS	NC – 009800.1	Gly (90) → Ser Tyr (106) → Isp Ala (226) → Val
Escherichia coli O26:H11 str. 11368	NC – 013361.1	
Escherichia coli O103:H2 str. 12009	NC – 013353.1	Asn (94) → Ser Ser (102) → Asn
Escherichia coli O157:H7 str. EC4115	NC – 011353.3	
Escherichia coli APEC O1	NC – 008563.1	
Escherichia coli O157:H7 str. EDL933chr	NC – 002655.2	Asn (159) → Lys
Escherichia coli B str. REL606 chromosom	NC – 012967.1	Ala (51) → Val Val (142) → Gly
Escherichia coli BW2952	NC – 012759.1	Ala (51) → Val
Escherichia coli O157:H7 str.TW14359 ch	NC – 013008.1	Val (152) → Met Gly (268) →Glu
Escherichia coli O127:H6 str. E2348/69	NC – 011601.1	
Escherichia coli IAI39 chromosome	NC – 011750.1	Gly (90) → Ser
Escherichia coli S88	NC – 011742.1	Thr (9) → Asn Val (13) → Ile Ala (143) → Val
Escherichia coli IAI1 chromosome	NC – 011741.1	Ala (51) → Val
Escherichia coli O55:H7 str. CB9615 chro	NC – 013941.1	
Escherichia coli UMN026 chromosome	NC – 011751.1	
Escherichia coli LF82	NC – 011993.1	Asn (94) → Ser Ser (102) → Asn Thr (182) →Pro
Escherichia coli BL21	NC – 012892.1	Ala (51) → Val Val (142) → Gly Leu (221) → Pro
Escherichia coli BL21(DE3)	NC – 012971.1	Ala (51) → Val Val (142) → Gly
Escherichia coli str. K-12 substr. W3110	AC – 000091.1	Ala (51) → Val
Escherichia coli CFT073 chromosome	NC – 004431.1	Asn (94) → Ser Ser (102) → Asn Val (187) → Ala
Escherichia coli UTI89 chromosome	NC – 007964.1	Asn (94) → Ser Ser (102) → Asn Ser (86) → Ala
Escherichia coli E24377A	NC – 0098801.1	Thr (9) → Asn Ala (143) → Val Gly (297) → Ala
Escherichia coli SMS-3-5 chromosome	NC – 010498.1	Asn (94) → Ser Ser (102) → Asn
Escherichia coli O111:H- str. 11128	NC – 013364.1	
Escherichia coli 35218	JF-289169.1	



شکل ۳) همترازی متعدد نوکلئوئیدی توالی ژنی *fim*H در سویه‌های اشریشیا کلی موجود در بانک ژن



شکل ۴) همترازی متعدد پروتئینی توالی ژنی *fim*H در سویه‌های اشریشیا کلی موجود در بانک ژن

جدول ۲) بررسی موتاسیون‌ها از اسیدآمینه ۲۱ الی ۷۵ در سویه‌های اشریشیا کلی واجد ژن *fimH* موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA4

سویه‌های باکتریایی اشریشیا کلی حاوی ژن*fimH*	موتاسیون نقطه ای (21aa-75aa)
Escherichia coli str. K-12 substr. MG165	Ala (51) → Val
Escherichia coli BW2952	Ala (51) → Val
Escherichia coli UMN026 chromosome	Ala (51) → Val
Escherichia coli BL21	Ala (51) → Val
Escherichia coli BL21(DE3)	Ala (51) → Val
Escherichia coli str. K-12 substr. W3110	Ala (51) → Val
Escherichia coli B str. REL606 chromosom	Ala (51) → Val

بحث

اشریشیا کلی یوروپاتوژن (UPEC) به‌عنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت مجاری ادراری (UTI) شناخته می‌شود. عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی است که ۲۰ درصد از زنان بین ۲۰ تا ۵۶ ساله به آن مبتلا می‌شوند. پیلی در اشریشیا کلی یوروپاتوژن، عامل بیماری‌زایی مهمی برای باکتری می‌باشد که همراه با سایر عوامل بیماری‌زایی مثل همولیزین و مقاومت سرمی عمل می‌کند. پیلی به‌عنوان عضو چسبنده در باکتری با برقراری اتصال اولیه به سطح سلول‌های مثانه‌ای نقش اولیه و مهمی در کلونیزاسیون و تهاجم به مثانه توسط باکتری را ایفا می‌کند. بنابراین برای شروع عفونت، باکتری‌های پاتوژن ابتدا باید توانایی کلونیزه نمودن بافت‌های هدف در میزبان را داشته باشند. کلونیزاسیون با اتصال باکتری به گیرنده‌های بیان شده توسط سلول‌های پوشاننده بافت مخاط میزبان آغاز می‌شود. اتصال، مرحله ضروری در آغاز کلونیزاسیون سطوح مخاطی میزبان است و مقدمه عفونت تهاجمی محسوب می‌شود (۱۰ و ۱۱).

تحقیقات نشان داده‌اند که آنتی بادی‌های ضدپروتئین Fim از اتصال اشریشیاکلی به بافت‌های مثانه در شرایط آزمایشگاهی ممانعت می‌کند این آنتی‌بادی‌ها از کلاس IgG می‌باشند. آنتی بادی‌های ضد پروتئین Fim قادرند حفاظت خوبی علیه عفونت ادراری توسط سویه‌های اشریشیا کلی، در موش ایجاد کنند. تخلیص مقدار زیاد ادهسین‌های پیلی بسیار دشوار است و بیان ادهسین به‌طور مستقل از پیلی باعث تجزیه پروتئولیتیک آنها می‌شود. اما تحقیقات نشان داد که، ادهسین پروتئین FimH از طریق چاپرون FimC به یک ساختار فعال و ثابت تبدیل می‌شود و به این طریق می‌توان آن را از بقیه اجزای پیلی جدا نمود. لانگرمن (Langerman) و همکاران از FimH برای واکسیناسیون استفاده کردند. مطالعه روی سرم حیوانات واکسینه با FimH نشان داد که، این واکسن می‌تواند از اتصال باکتری یوروپاتوژن به سلول‌های مثانه انسان در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند. پس از ایمن‌سازی مدل حیوانی، کلونیزاسیون باکتری تا ۹۹ درصد در موش‌ها در شرایط آزمایشگاهی کاهش یافت (۱۲).

مطالعات تانکاول (Thankavel) و همکاران روی FimH نشان داده است که واکسن حاصل از FimH توانسته موش‌های ایمن شده به‌صورت فعال و غیرفعال را در مقابل باکتری یوروپاتوژن محافظت کند. وجود مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های مولد عفونت ادراری باعث شده که تلاش برای تولید واکسن جلوگیری کننده از عفونت ادراری حائز اهمیت باشد. تاکنون واکسن موفقی برای جلوگیری از عفونت‌های ادراری شناسایی نشده است و عفونت ادراری غالباً توسط آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شوند. استفاده از پیلی سطحی، در باکتری‌ها به‌عنوان واکسن، موفقیتی در جلوگیری از طیف وسیع

پاتوژن‌های ادراری حاصل نموده است. به‌جهت اهمیتی که پیلی P و تیپ I به‌عنوان اعضای اصلی ادهسیو اشریشیاکلی یوروپاتوژن در بیماری‌زایی عفونت‌های ادراری دارند، استفاده از ادهسین FimH و PapG در ساخت واکسن‌های دو ظرفیتی در تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود (۱۲ و ۱۳).

سپاس و قدردانی

از همکاری‌های صمیمانه تمامی اساتید و دوستانی که در این تحقیق مرا یاری نمودند سپاسگزارم.

References:

1.Kargar M, Daneshvar M, Homayoun M. Surveillance of Virulence Markers and Antibiotic Resistance of Shiga toxin Producing *E.coli* O157:H7 Strains from Meats Purchase in Shiraz. ISMJ 2011; 14: 76-83.
2.Wilson BA, Salyers AA, Whitt DD, editors. Bacterial Pathogenesis: a Molecular Approach. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2010: p. 91-112.
3.Welinder-Olssoni C, Kaijser B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Scand J Infect Dis 2005; 37: 405-416 .
4.Johnson JR, Owens K, Gajewski A, et al. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *E.coli* isolates from women with an acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J Clin Microbiol 2005; 43: 6064-72.
5.Schilling JD, Mulvey MA, Hultgren SJ. Structure and Function of *Escherichia coli* Type 1 Pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. J Infect Dis 2001; 183: S36-40.
6.Bouckaert J, Berglund J, Schembri M, et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesion. Mol Microbiol 2005; 55: 441-55.
7.Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, et al. Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic Escherichia coli and innate host defenses. Proc Natl Acad Sci 2000; 97: 8829-35.
8.Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, et al. Integrin- mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. PLoS Pathog 2007; 3: e100.
9.Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. Cell Microbiol 2007; 9: 2230-41.
10.Jodal U, Ahlstedt S, Carlsson B, et al. Local antibodies in childhood urinary tract infection: a preliminary study. Int Arch Allergy Appl Immunol 1974; 47: 537-46.
11.Hacker J. Role of fimbrial adhesions in the pathogenesis of *E.coli* infections. Can J Microbioal 1992; 38: 7207.
12.Langermann S, Palaszynski S, Branhart M, et al. Prevention of mucosal *E.coli* infection by FimH-adhesion-based systemic vaccination. Science 1997; 276: 607-11.
13.Thankavel KB, Madison B, Ikeda T, et al. Localization of a domain in the FimH adhesion of *E.coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. J Clin Invest 1997; 100: 1123-36.

ISMJ 2013; 16(3): 189-97

Original Article

fimH gene cloning, of Escherichia coli uropathogen and examination of its subsequence diversity

S. Ostad Mohammadi [1], MH. Shirazi [2*], J. Fallah Mehrabadi [3], MR. Pourmand [2], F. Hamidieh [1], H. Molla Agha Mirzaie [1], D. Afshar [2]

[1]Department of Microbiology, School of Basic Sciences & Medicine, Islamic Azad University, Zanjan, IRAN
[2]Department of Microbiology, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN
[3]Department of Genetic Engineering, Biology and Biotechnology Institute, Malek Ashtar University, Tehran, IRAN

(Received 5 Oct, 2011 Accepted 27 Nov, 2011)

Abstract

Background: *Escherichia coli* uropathogen is the most prevalent pathogen separated from urinary tract that often is originated from intestinal flora of the own person. Urinary tract infection is one of the most prevalent infectious diseases in Human. Whereas binding stage has an important role in bacteria colonization and then the infection is created, one of the most important strategies for inhibiting the infection is inhibiting the bacterial binding. As FimH protein is acting as adhesion it could be an appropriate candidate for producingvaccine.

Material and Methods: First, genomic DNA of *Escherichia coli* bacteria extracted from strain 35218 ATCC. Upon designing primer for fimH gene, the PCR reaction has been applied with Taq DNA Polymerase and then pfu DNA polymerase enzymes. pBluescript (SK-) plasmid has been applied for cloning the product of PCR. Using ClustalW and MEGA4 software, the subsequence was alignmented with the gene subsequence existing in gene bank and its gene diversity was examined.

Results: After sequencing the cloned *fimH* gene using ClustalW and MEGA4 software, the result of this subsequence were alignmented with the subsequence of *Escherichia coli* containing *fimH* gene existing in gene bank and based on this alignment, N terminal on the protein surface and DNA are protected.

Conclusion: N terminal domain of FimH is a conserved sequence among clinical isolates and it could be used for designing a vaccine against urinary tract infection.

Keywords: *Escherichia coli* uropathogens, type I pili, *fimH* gene, cloning

***Address for correspondence*: Department of Microbiology, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN; E-mail: mhshirazi@tums.ac.ir