ORIGINAL ARTICLE

Designing a Recombinant Vaccine Containing Three Bacterial Proteins of EHEC, ETEC, and shigella Dysentery Antigens in E. coli and Evaluation of its Humoral Immunity in Mic

Vahid Ebadi[1],
Firouz Ebrahimi[2],
Abbas Hajizadeh[3],
Yosuf Tarverdizadeh[4],
Mustafa Bakhshi[5]

[1] MSc Student in Molecular Cell Biology, Biology Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biochemistry, Biology Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
[3] Professor of Biological Research Center, Biology Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
[4] MSc in Microbiology, Biology Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
[5] Ph.D Student in Nanobiotechnology, Biology Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

(Received February 8, 2017 Accepted September 5, 2017)

Abstract

Background and purpose: Different genera of enterobacteriaceae have important roles in gastrointestinal diseases such as diarrhea. Among these, Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), and *Shigella* are three main bacteria which are transmitted via contaminated food and water. Vaccination is a good strategy to combat these pathogens. In the present study, a chimeric antigen, containing the main antigens of these three bacteria was designed, expressed in *E. coli* host, and tested for protection against EHEC strain.

Materials and methods: Specific primers were designed to fuse these antigens. The properties of the chimeric antigen, including physical and chemical properties, secondary and tertiary structures, and B cell and T cell epitopes were obtained via in *silico* analysis. After the fusion of the genes, the resulting recombinant pET28a(+) vector was transferred into the competent *E. coli* cells. Expression was induced and the protein was purified. Then, the animals were immunized through subcutaneous administration of the antigen. Finally, the immunized animals were challenged by live *E. coli* O157:H7 cells.

Results: In *silico* analysis showed that the chimeric antigen had appropriate physical and chemical properties which could be expressed in various expression systems. In addition, the antigen has potent B- and T-cell epitopes. Experimental results showed that the antigen has efficiently provoked the mice's humoral immune system. Challenging the immunized mice by live bacterial cells showed that the chimeric antigen was able to protect the mice against *E. coli* O157:H7 strain.

Conclusion: Both in *silico* analysis and experimental results showed that the chimeric antigen has appropriate properties which can be considered as a proper candidate vaccine against the three bacteria mentioned.

Keywords: enterobacteriaceae, chimeric antigen, design, challeng, immunization, in *silico* analysis, candidate vaccine

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (157): 1 - 16 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۷ بهمن سال ۱۳۹۶ (۱۶ - ۱)

طراحی یک کاندید واکسن نوترکیب حاوی پروتئین هایی از سه باکتری EHEC، ETEC و *شیگلا دیسانتری* در باکتری *E.coli* و بررسی ایمنی هومورال آن در موش

وحید عبادی[۱]
فیروز ابراهیمی[۲]
عباس حاجی زاده[۳]
یوسف تاروردی زاده[۴]
مصطفی بخشی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: جنس‌های مختلف انتروباکتریاسه نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های گوارشی، از جمله اسهال دارند. از این میان، *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک، *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک و *شیگلا* سه باکتری مهمی هستند که از طریق آب و غذا منتقل می‌شوند. واکسیناسیون یکی از استراتژی‌های مناسب برای مقابله با این پاتوژن‌ها می‌باشد. در مطالعه حاضر یک آنتی‌ژن کایمر، حاوی آنتی‌ژن‌های اصلی از این سه باکتری، طراحی و در میزبان بیانی *اشریشیاکلی* بیان گردید و برای بررسی ایجاد محافظت در برابر باکتری EHEC مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: پرایمرهای اختصاصی برای ترکیب این آنتی‌ژن‌ها طراحی گردید. خصوصیات آنتی‌ژن کایمر، از جمله خواص فیزیکی و شیمیایی، ساختار دوم و سوم و اپی‌توپ‌های سلول B و T از طریق تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی تعیین گردید. پس از ترکیب این ژن ها، وکتور نوترکیب pET28a(+) حاصل، به سلول‌های مستعد منتقل شد. سپس پروتئین کایمر در باکتری بیان و پروتئین تولید شده تخلیص گردید. پس از آن، حیوانات از طریق تجویز زیر جلدی از آنتی‌ژن ایمن شدند. در نهایت، حیوانات ایمن شده با باکتری زنده *E. coli* O157:H7 مورد چالش قرار گرفتند.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی نشان داد که آنتی‌ژن کایمر دارای خواص فیزیکی وشیمیایی مناسبی بوده که می‌تواند به خوبی در میزبان‌های بیانی مختلف بیان شود. هم‌چنین این آنتی‌ژن، دارای اپی‌توپ‌های ویژه سلول‌های B و T می‌باشد. نتایج تجربی نشان داد که این آنتی‌ژن پاسخ ایمنی هومورال مناسبی را در موش برمی‌انگیزد. چالش موش‌های ایمن شده نشان داد که آنتی‌ژن فوق توانایی لازم برای محافظت موش‌ها در برابر سویه باکتریایی *E. coli* O157:H7 را دارد.

استنتاج: آنالیزهای بیوانفورماتیکی و نیز آزمایشات تجربی نشان داد که این پروتئین می‌تواند یک کاندید واکسن مناسب علیه سه باکتری مذکور باشد.

واژه های کلیدی: انتروباکتریاسه، آنتی‌ژن کایمر، طراحی، ایمن سازی، چالش، آنالیز بیوانفورماتیکی، کاندید واکسن

مقدمه

بیماری‌های اسهالی یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در سطح جهان و ایران می‌باشد. اسهال ناشی از باکتری *اشریشیاکلی* در ایران سهم بیش‌تری از اسهال را به خود اختصاص می‌هد (۱) به طوری‌که ۳۰ الی ۷۰ درصد موارد اسهال ناشی از عفونت‌های باکتریایی می‌باشد(۲). با توجه به اهمیت این بیماری

مولف مسئول: فیروز ابراهیمی– تهران، اتوبان شهید بابایی، بعد از پل لشکرک، دانشگاه امام حسین(ع). Email: Febrhimi@ihu.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲. استادیار، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳. استاد، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۴. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۵.دانشجوی دکتری نانو بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۱/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۲/۱۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۶/۲۰

در ایجاد تلفات انسانی و زیان‌های اقتصادی زیاد در جوامع، سازمان بهداشت جهانی درصدد تولید واکسن مناسب علیه این میکروارگانیسم است(۳). از میان پاتوژن‌های مولد اسهال، *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک[1] مولد شیگاتوکسین[2] (Stx) یاEHEC ، *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک[3] یا (ETEC) و گونه‌های *Shigella* به عنوان گروه هتروژنی از باکتری‌های شدیداً بیماری‌زا بوده که از اهمیت زیادی برخوردار هستند(۴).

E. coli O157:H7 یکی از سروتیپ‌های بسیار مهم باکتری *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک (EHEC) است(۵). آلودگی انسان با EHEC می‌تواند منجر به اسهال آبکی، اسهال خونی یا سندرم اورمیک همولایتیک (HUS) گردد(۶،۷). این پروتئین توسط ژن *espA* ساخته می‌شود و روی سطح باکتری ساختاری را برای تزریق ژن‌های *eae* ، *espD* و *espB* ایجاد می‌کند(۸). به دلیل اهمیت پروتئین اینتیمین و EspA در روند بیماری‌زایی، این دو پروتئین به عنوان شاخص‌های بیماری زایی برای EHEC محسوب می‌شوند(۹). EspA از اجزای سیستم ترشحی نوع III می‌باشد. EspA یک عامل ایمونوژنیک برای میزبان بوده و می‌تواند به عنوان کاندیدای واکسن جهت جلوگیری از اتصال EHEC باشد(۱۰). پروتئین EspA در ساخت کانال ارتباطی نقش داشته و مانند یک رابط سبب انتقال پروتئین Tir به سلول میزبان می‌شود و پروتئین اینتمین که در غشای باکتری جای گرفته است، با متصل شدن به پروتئین Tir به غشای سلول میزبان منتقل و منشا اصلی آن نیز باکتری مهاجم است، سبب اتصال محکم و اختصاصی باکتری به سلول میزبان می‌شود. این اتصال باعث ایجاد ضایعه در دیواره سلول میزبان و تخریب آن می‌شود. *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک یکی از عوامل شایع اسهال در کشورهای در حال توسعه است. اسهال ایجاد شده به وسیله ETEC ، از حالت خفیف تا شدید و به صورت آبکی ایجاد می‌شود(۱۲،۱۱).

ETEC/*شریشیاکولی* انتروتوکسین حساس به حرارت نوع I و II را تولید می‌کند که از لحاظ خصوصیات ژنتیکی، بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی با هم متفاوت هستند. توکسین حساس به حرارت نوع I(LT-1) بسیار شبیه به‌کلرا توکسین بوده، با وزن معادل ۸۶ کیلودالتون، مولکولی هتروهگزامری متشکل از ۵ زیر واحد B و یک زیر واحد A است (۱۳، ۱۴). زیر واحد A با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون، بخش سمی این سم محسوب می‌شود و خاصیت ADP - ریبوزیل ترانسفرازی دارد و می‌تواند آدنیلات سیکلاز را فعال نموده و موجب افزایش cAMP شود که این عامل باعث از دست رفتن آب و الکترولیت‌ها از سلول‌های اپی‌تلیال می‌گردد(۱۵). زیر واحد B با وزن مولکولی ۱۱/۸ کیلودالتون به صورت پنتامر و غیرکوالان به زیر واحد A متصل می‌شود(۱۶). نقش این زیر واحد، اتصال توکسین به گیرنده‌های GM1 در سطح سلول‌های روده می‌باشد(۱۷). با توجه به نقش این توکسین در ایجاد بیماری‌زایی، گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از این جزء به عنوان واکسن وجود دارد. این جزء از توکسین به تنهایی از طریق دهانی، خوراکی، تنفسی و جذب پوستی به عنوان واکسن استفاده شده است. ژن *sta* به رسپتور گوانیلات سیکلاز از سلول های هدف روده ای متصل می‌شود و باعث فعالیت‌گوانیلات سیکلاز حلقوی می‌گردد. در نتیجه فعالیت آن، گوانیلات سیکلاز حلقوی، جذب NaCl را مهار می‌کند که در نتیجه این عمل اسهال اتفاق می‌افتد(۱۸).

شیگلا از جمله عوامل اصلی بروز اسهال حاد خونی به شمار می‌آید. چهار سروتیپ مهم *شیگلا* از نظر بیماری زایی و بروز اپیدمی‌ها عبارتند از *شیگلا دیسانتری*[4]، *شیگلا فلکسنری*[5]، *شیگلا سونئی*[6] و *شیگلا بویدی*.[7]

[1] Enterohemorrhagic *E. coli*
[2] Shigaa toxine
[3] Enterotoxigenic *E. coli*
[4] *Shigella dysentery*
[5] *Shigella flexneri*
[6] *Shigella sonnei*

اسهال خونی با عامل *شیگلا* در بیش‌تر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان به موقع به مرگ می‌انجامد. در نتیجه WHO توسعه واکسن‌های ایمن و کارا در مقابل *شیگلا* را در اولویت قرار داده است(۲۰،۱۹). باکتری *شیگلا دیسانتری* پس از ورود به بدن میزبان، راست روده و کولون در دستگاه گوارش را مورد تهاجم قرار می‌دهد(۲۱). مطالعات انجام گرفته نشان دادند که آنتی بادی‌هایی که ناحیه N-ترمینال پروتئین IpaD را شناسایی می‌کنند، توانایی برهم کنش این پروتئین با نمک‌های صفراوی به ویژه دی اکسی کولات را سرکوب می‌نمایند، بنابراین این ناحیه از پروتئین IpaD یک فاکتور لازم در جهت ورود باکتری *شیگلا* به سلول‌های میزبان است و از این رو به عنوان یک آنتی‌ژن بالقوه در طراحی واکسن مطرح است(۲۲).

هدف از این مطالعه، طراحی یک پروتئین کایمر شش ظرفیتی ۱۰۰ کیلو دالتونی بود. به نحوی که این پروتئین متشکل از شش ایمونوژن مربوط به سه سویه انتروپاتوژن ETEC، EHEC و *شیگلا* بوده و می‌تواند کاندید مناسبی جهت ایمنی زایی علیه هر سه سویه باشد.

مواد و روش ها

پلاسمید و سوش‌های باکتری

پلاسمیدهای pET28a(+)، pET28a-*esi*، pET28a-*isl* و هم‌چنین باکتری *اشریشیا کلای* سویه های(DE3) BL21، DH5α و O157:H7 از مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه امام حسین (ع) تهیه گردید.

آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها و مواد شیمیایی

آنزیم‌های برش دهنده *Eco*RI، *Bam*HI و *Hin*dIII و آنزیم T4 DNA Ligase از شرکت Thermofischer کشور آمریکا تهیه شدند.

آنزیم‌های Taq DNA polymerase و Pfu DNA polymerase به همراه dNTPs Mix، dATP 10x، $MgSO_4$Buffer، $MgCl_2$ نشانگرهای DNA و پروتئین از شرکت سیناکلون خریداری شد. کیسه دیالیز سوبسترای مولد رنگ OPD[8]، DAB[9] و کونژوگه موشی از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد. کاغذ نیتروسلولز از شرکت QIAGENE (آمریکا) خریداری شد. مواد شیمیایی از قبیل Tris base، sucrose، EDTA، Tris Hcl، کلروفرم، فنل، اسید بوریک، استات سدیم، استات پتاسیم، استیک اسید، آلبومین سرم گاوی، آمونیوم پرسولفات، برومو فنل بلو، ۲- مرکاپتو اتانول، هیدروکسید سدیم، اسید استیک گلاسیال، گلایسین، اتانول، اتیدیوم بروماید، لیزوزیم، H_2O_2، HCl، RNaseA، IPTG، DAB، SDS، ایزوپروپانل، ایزو آمیل الکل، آکریل آمید، بیس آکریل آمید وTEMED از شرکت Merk کشور آلمان تهیه شد.

کیت‌های تخلیص

کیت تخلیص از ژل و کیت تخلیص پلاسمید از شرکت Bioneer (کره جنوبی) و کیت تخلیص محصول PCR، از شرکت Thermofischer(آمریکا) خریداری شد.

حیوانات آزمایشگاهی و فرآورده‌های زیستی

موش‌های آزمایشگاهی سوری نر از انیستیتو پاستور ایران و ادجوان‌های کامل و ناقص فروند از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه گردید.

[7] *Shigella boydii*

[8] O-phenilenediamine

[9] Diaminobenzidine

پرایمرها

پرایمرهای فرادست و فرودست پس از طراحی و آنالیز با نرم افزارهای Oligo7 و DNASIS جهت سنتز به شرکت سیناژن ایران سفارش داده شد.

۱- استخراج توالی ژن‌ها

توالی ژن‌های *eae*، *stx*2B، *espA* به ترتیب از پایگاه داده NCBI با شماره دسترسی‌های WP_001412022، ZP_02777320، ZP_02797355 و توالی ژن‌های *ltb* ، *sta* ، *ipa*D از پایگاه داده NCBI با شماره دسترسی‌های NC_013507 ، NC_007607 ، NC_018998 کسب گردید. کاست ژنی *isl*(*ltb* ، *sta* ، *ipaD*)توسط شرکت Shingene چین و کاست ژنی *esi* (*eae*، *stx*2B ، *espA*)توسط شرکت Biomatik کانادا سنتز گردید.

۲- طراحی پرایمر

جهت تکثیر قطعه ژنی *isl* پرایمرهای اختصاصی برای دو سر این قطعه طراحی شدند و سپس با نرم افزار Oligo7 مورد آنالیز قرار گرفتند. پرایمرهای طراحی شده جهت سنتز به شرکت سیناژن سفارش داده شدند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی پرایمر پیشرو و پیرو

پرایمر پیشرو	Tm: ۷۰،۵	F:5'ATTCGGATCCATTCGGCCGACCAACCAGG CGCTGAAAAAAG 3
پرایمر پیرو	Tm: ۷۱،۶	5'GTGATGGAATTCTTTAGGTGCGGCTTCTTTC GCAGCTGCTTCGTTTTCCATAG3'

۳- تکثیر و کلونینگ قطعه ژنی isl

برای انجام کلونینگ و تایید قطعات ژنی، ابتدا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوطه و آنزیم Pfu، که دارای خاصیت غلط‌گیری[10] است، واکنش PCR انجام شد. الگوی DNA مورد استفاده، پلاسمید تخلیص شده pET28a(+) حامل ژن *esi-isl* بود. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در لوله های اپندروف طبق جدول شماره ۲ تهیه شد. پس از تهیه نمونه‌ها برای انجام پروسه PCR با در نظر گرفتن طول قطعات حاصل از تکثیر و هم‌چنین دمای اتصال آغازگرها، چرخه دمایی تنظیم و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرایط دمایی مورد نظر اعمال شد. سپس این قطعه با استفاده از دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و در پایان قطعه هضم شده با استفاده از کیت تخلیص DNA خالص سازی شد. جدول شماره ۳ چگونگی برنامه دمایی انتخاب‌شده برای انجام PCR را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۲: ترکیب واکنش برای هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب استخراج شده

پلاسمید استخراج شده	۱۰ میکرولیتر
بافر Tango 2X	۴ میکرولیتر
آنزیم *Eco*RI	۱ میکرولیتر
آنزیم *Hin*dIII	۱ میکرولیتر
آب دو بار تقطیر	۴ میکرولیتر
حجم کلی واکنش	۲۰ میکرولیتر

جدول شماره ۳: برنامه PCR مورد استفاده برای تکثیر ژن توسط واکنش PCR با آنزیم Taq DNA Polymerase

تعداد سیکل	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	نوع عملیات	مرحله
۱	۳۶۰S	۹۵	دناتوراسیون اولیه	۱
۳۰	۳۰S	۹۴	دناتوراسیون	۲
	۴۵S	۶۰	اتصال	
	۶۰S	۷۲	تکثیر	
۱	۳۰۰S	۷۲	تکثیر نهایی	۳

۴- الحاق قطعه ژنی isl به وکتور pET28a-esi و ساخت کاست ژنی

در گام بعدی، قطعه ژنی *isl* که توسط آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و *Eco*RI برش خورده و به وکتور بیانی pET28a-*esi* که با همان آنزیم‌ها برش خورده بود، الحاق گردید. واکنش الحاق به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به منظور کلونینگ و تکثیر، سلول‌های مستعد باکتری *اشریشیاکلی* سویه DH5α(تهیه شده از شرکت Novagen) براساس پروتکل استاندارد روش کلرید

[10] Proof Reading

کلسیم تهیه شدند. پلاسمیدهای(+)pET28a حاوی ژن‌های کایمری *isl* و *esi* با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد انتقال دادهشد. سلولها بر روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت چمنی کشت داده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. حضور پلاسمید حاوی ژن کایمر و تشکیلکاست ژنی *esi-isl*توسط واکنش هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت.

۵- بیان نوترکیب آنتی‌ژن کایمر شش ظرفیتی و تایید آن

برای بیان ژن کایمر pET28a- *esi-isl* از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت انتخابی جامد چند کلونی انتخاب و به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح شد و پس از آن که OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ رسید، IPTG با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت اضافه و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده مخلوط و از طریق سونیکاسیون (قدرت ۷۰ درصد و ۴ سیکل، ۱۵ ثانیه سونیکاسیون و ۴۵ ثانیه درون یخ) شکسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با بافر نمونه ترکیب و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. در نهایت نمونه‌های تیمار شده به همراه نمونه کنترل با استفاده از SDS -PAGE ، ۱۲ درصد از لحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب بررسی شدند. برای تائید پروتئین نوترکیب، از تکنیک وسترن بلاتینگ[11] استفاده شد. برای این منظور، عصاره سلولی پس از بیان بر روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. به منظور پرکردن جایگاه‌های خالی (بلاکینگ)، کاغذ به مدت یک شب در محلول ۳ درصد شیرخشک در PBST[12] و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شستشوی کاغذ توسط بافرPBST ، آنتی بادی‌های پلی کلونال موشی با رقت ۱:۲۰۰۰ به آن اضافه و به مدت ۰/۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از شستشوی مجدد باPBST، کونژوگه موشی با رقت ۱:۱۰۰۰۰ به کاغذ اضافه شد و همانند مرحله قبل گرماگذاری انجام گردید. پس از شستشو، کاغذ نیتروسلولز در محلول سوبسترای رنگ زای (۶۰ میلی‌گرم در صد میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار با ۸ = pHقرار گرفت) تا باند پروتئینی ظاهر گردد. در پایان برای توقف واکنش، کاغذ در آب مقطر قرار داده شد.

۶- ایمن نمودن موش‌های سوری توسط آنتی‌ژن کایمر شش ظرفیتی

به منظور بررسی پاسخ ایمنی، از ۶ عدد موش سوری به عنوان تست و ۵ عدد موش سوری به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. جهت آماده سازی نمونه‌ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوانت فروند اضافه گردید (حجم نهایی ۱ میلی لیتر) و سپس محتویات همگن گردید. در پایان، به هر موش تست، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده که حاوی ۱۰ میکروگرم آنتی‌ژن مورد نظر بود، به صورت زیرجلدی تزریق شد و پس از پایان دوره ایمن‌سازی (طبق جدول شماره ۴)، بررسی تیتر آنتی بادی توسط آزمایش الایزا انجام گرفت.

جدول شماره ٤: زمان و مقادیر پروتئین نوترکیب در مراحل ایمن سازی

گروه موش های تست	۶ سر	تزریق اول	۰	۲۰µg	ادجوانت کامل فروند	زیر جلدی
		تزریق دوم	۱۴	۱۰µg	ادجوانت ناقص فروند	زیر جلدی
		تزریق سوم	۲۸	۱۰µg	ادجوانت ناقص فروند	زیر جلدی
		تزریق چهارم	۴۲	۱۰ µg	ادجوانت ناقص فروند	زیر جلدی
گروه موش های کنترل	۵ سر	تزریق اول	۰	PBS	ادجوانت کامل فروند	زیر جلدی
		تزریق دوم	۱۴	PBS	ادجوانت ناقص فروند	زیر جلدی
		تزریق سوم	۲۸	PBS	ادجوانت ناقص فروند	زیر جلدی
		تزریق چهارم	۴۲	PBS	ادجوانت ناقص فروند	زیر جلدی

۷- آزمون چالش موش ایمن شده توسط باکتری E. coli O157:H7

[11] Western blotting
[12] Phosphat-Buffered Salin- Tween

به ۶ موش سوری نر به عنوان تست در یک گروه و ۵ عدد موش سوری نر شاهد در گروه دیگر تعداد 10^{10}cfu/ml باکتری زنده *اشریشیاکلی* سویه O157:H7 به صورت خوراکی تجویز شد و به مدت ۱۵ روز نمونه‌برداری از مدفوع موش‌ها به صورت یک روز در میان انجام گردید. مقدار ۰/۱ گرم از مدفوع در محیط LB مایع کشت داده شد و از مایع رویی در محیط سوربیتول مک‌کانکی آگار حاوی تلوریت پتاسیم سریال (۵/۲ میلی گرم بر لیتر) و سفکسیم(۰,۵ میلی گرم بر لیتر) رقت کشت داده شد و سپس کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت مورد شمارش قرار گرفتند.

یافته ها

۱- مطالعات بیوانفورماتیکی طراحی سازه شش ظرفیتی و بررسی ساختارهای mRNA و پروتئین حاصل از آن

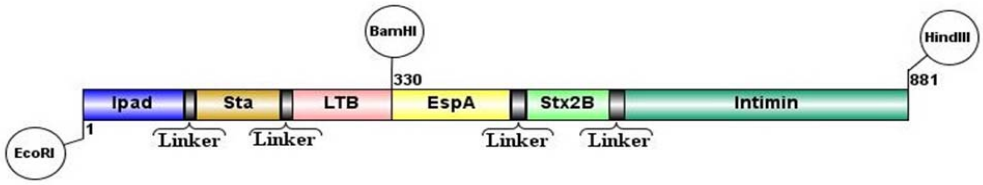
در این مطالعه، شش آنتی‌ژن شامل سه آنتی‌ژن Intimin ، StxB و EspA مربوط به باکتری EHEC ، در یک کاست ژنی تحت عنوان *esi* و دو آنتی‌ژن دیگر شامل LTB و STa مربوط به ETEC و آنتی ژن IpaD مربوط به *شیگلا* در کاست ژنی جداگانه تحت عنوان *isl* مورد استفاده قرار گرفتند. توالی پروتئینی هر کدام از این پروتئین ها، که از پایگاه داده Uniprot گرفته شد، در جدول شماره ۵ آمده است. بعد از انتخاب ایموژن‌های مناسب، حالات احتمالی ترتیب این ایمونوژن‌ها در سازه نهایی با دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت تا ترتیب بهینه به دست آید:

۱. میزان آنتی ژنیسیته ساختار نهایی ۲. میزان شباهت بین ساختارهای دوم و سوم هرکدام از ایمونوژن ها (به صورت تکی) با ساختارهای دوم و سوم آن‌ها در پروتئین کایمر. آنتی‌ژنیستیه کلی[13] ساختارهای مختلف با استفاده از نرم افزار VaxiJen با آدرس اینترنتی (http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen) بدست آمد. با بررسی‌های بیوانفورماتیکی صورت گرفته، در آخر این نتیجه حاصل شد که ترتیب N- IpaD -Sta – LTB - EspA - Stx2b-Iintimin-C- به همراه لینکر (EAAAK)3 منجر به ساختاری می‌شود که در آن آنتی ژن‌های منفرد، خصوصیات ساختاری خود را حفظ می‌کنند و کم‌ترین تداخل را با یکدیگر دارند. ساختار نهایی آنتی‌ژن کایمر در شکل شماره ۱ ارائه شده است.

[13] Overall Antigenicity

جدول شماره ۵: توالی پروتئینی هر کدام از این پروتئین های موجود در آنتی ژن کایمر

پروتئین	شماره دسترسی	باکتری	توالی
StxB	ZP_02777320	EHEC	ADCAKGKIEFSKYNENDTFTVKVAGKEYWTSRWNLQPLLQSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFNND
EspA	ZP_02797355	EHEC	NEASKASTTAQKMANLVDAKIADVQSSTDKNAKAKLPQDVIDYINDPRNDISVTGIRDLSGDLSAGDLQTVKAAISAKANNLTTVVNNSQLEIQQMSNTLNLLTSARSDVQSLQYRTISAISLGK
IpaD	NC_013507	شیگلا	IRTTNQALKKDLSQKTLTKTSLEEIALHSSQISMDVNKSAQLLDILSNKEYPINKDARELLHSAPKEAELDGYEMISHRELWDKIAKSINNINEQYLKVYEHAVSSYT
STa	NC_007607	ETEC	NSSNYCCELCCNPACTGCY
LTB	NC_018998	ETEC	APQSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMVIITFKSGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAISMEN
Intimin	WP_001412022	EHEC	KDTALGIAGNQASSQLQAWLQHYGTAEVNLQSGNNFDGSSLDFLLPFYDSEKMLAFGQVGARYIDSRFTANLGAGQRFFLPANMLGYNVFIDQ



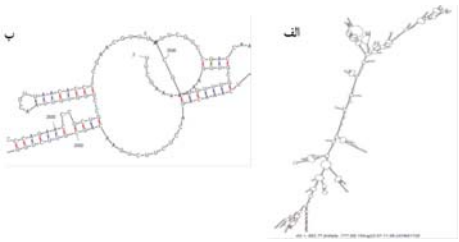
شکل شماره ۱: تصویر سازه طراحی شده آنتی ژن شش ظرفیتی ESI-ISL با نرم افزار I-¬TASSER را نشان می دهد.

پس از آن، آنالیز توالی توسط نرم افزار تحت شبکه ProtParam انجام گرفت و مشخص گردید که کایمر طراحی شده در دسته پروتئین‌های پایدار قرار می‌گیرد و به سبب میانگین هیدروپاتی منفی، قابل محلول در آب می‌باشد. منفی و مثبت بودن این شاخص به ترتیب نشان دهنده هیدروفیل و هیدروفوب بودن یک پروتئین است. سایر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین کایمر در جدول شماره ۶ ارائه شده است.

جدول شماره ٦: بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین کایمر ESI-ISL با نرم افزار ProtParam

طول توالی	۹۱۷ آمینواسید
وزن مولکولی	۹۹/۵ کیلو دالتون
pI نظری	۹/۴۰
نیمه عمر در سلول های پستاندار	۳۰ ساعت
نیمه عمر در باکتری	۱۰ ساعت
نیمه عمر در مخمر	۲۰ساعت
شاخص ناپایداری	۲۸/۷۳
میانگین هیدروپاتی	-۰٫۵

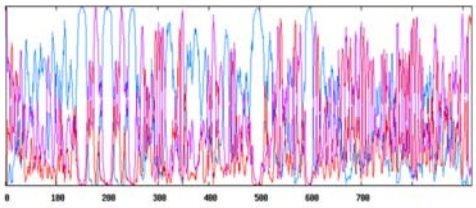
بررسی ساختار دوم mRNA ژن *esi-isl* با نرم افزار Mfold نشان داد که جایگاه آغاز از لحاظ کنفورماسیون مناسب بوده و هیچ مانعی برای دسترسی ریبوزم به توالی شاین دالگارنو وجود ندارد و در محل آغاز ترجمه بر روی mRNA ، ساختار سنجاق‌سری پایداری وجود ندارد. انرژی آزاد گیبس ساختار mRNA برابر با ۶۶۲/۷۷- می‌باشد که نشان دهنده پایداری مناسب این مولکول می‌باشد (شکل شماره ۲ الف – ب).



شکل شماره ۲: الف) نمایشی از ساختار mRNA حاصل از رونویسی سازه پروتئین کایمر شش ظرفیتی .ESI-ISL. ب) ΔG = -۶۶۲,۷۷ بزرگنمایی انتهای ۵' ساختار mRNA بعد از تعیین ساختار با نرم افزار Mfold

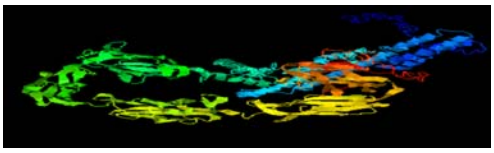
پیش بینی ساختار دوم پروتئین کایمر با استفاده از نرم افزار GOR4 نشان داد که در ساختار دوم این

پروتئین، مارپیچ آلفا به میزان زیادی حضور دارد (۴۳/۹۵ درصد) که این نشان‌دهنده پایداری بالای این پروتئین است. میزان صفحات گسترده بتا و پیچش‌های تصادفی به ترتیب ۱۸/۶۵ و ۳۷/۴۰ درصد می‌باشد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: نمایشی از ساختار دوم پروتین کایمر ESI-ISL که با نرم افزار GOR4 پیش‌بینی شده است. رنگ آبی نمایانگر α هلیکس، رنگ بنفش نشان دهنده پیچ‌های تصادفی و رنگ قرمز صفحات بتا را نشان می‌دهد.

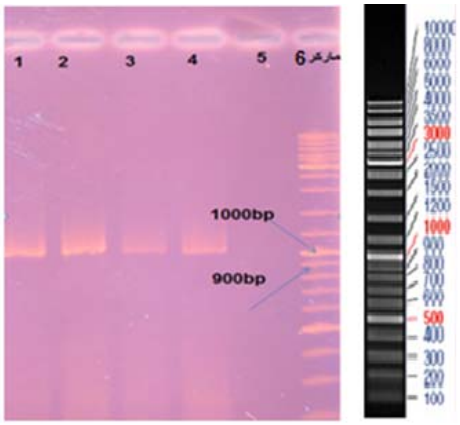
پس از پیش‌بینی ساختار سوم کایمر مورد نظر با استفاده از نرم افزار I-TASSER مشخص گردید پروتئین کایمر نوترکیب ESI-ISL غنی از آلفا هلیکس بوده و دومین‌های مختلف پروتئینی به خوبی توسط لینکرها از هم جدا شده‌اند (شکل شماره ۴).



شکل شماره ٤: ساختار سوم پروتئین کایمر که با روش I-TASSER پیش بینی شده است. ساختار پیش بینی شده نشان می‌دهد که دومین‌های مختلف پروتئینی ISL-ESI به خوبی توسط لینکرها از هم جدا شده‌اند.

۲. تکثیر و کلونینگ قطعه ژنی isl

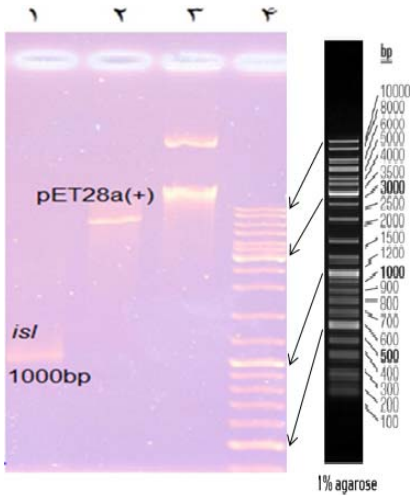
برای انجام فرآیند تکثیر ژن *isl*، لازم بود غلظت مناسبی از محصول PCR به دست آید. لذا واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر با آغازگرهای اختصاصی مربوطه و آنزیم Pfu DNA polymerase و با استفاده از پلاسمید تخلیص شده pET28a(+) حاوی ژن *isl*، به عنوان الگو، انجام شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه GeneRuler DNA Ladder Mix الکتروفورز و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ژل در زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفت. پس از تکثیر قطعه ژنی *isl* به روش PCR، محصول روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعه مورد نظر (۱۰۰۰ جفت باز) از لحاظ اندازه با ژن هدف ما هم‌خوانی داشت (شکل شماره ۵).



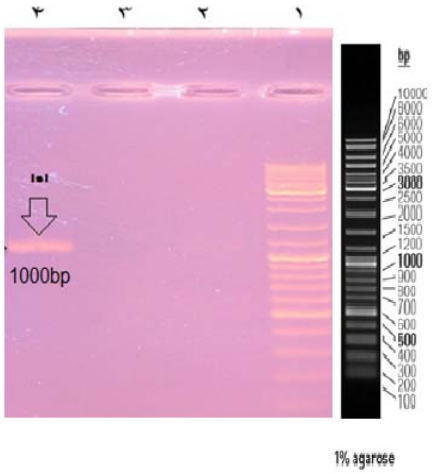
شکل شماره ۵: محصول PCR ژن بر روی ژل آگارز ۱ درصد، چاهک ۱،۲،۳،۴: محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *isl* با آنزیم DNA پلیمراز Taq. چاهک ۵: کنترل منفی (که در آن از آب مقطر به عنوان الگو استفاده شد. چاهک ۶: نشانگر مولکولی DNA.

الف- هضم آنزیمی محصولات PCR

پس از خالص سازی محصولات PCR و استخراج pET28a-*isl*، واکنش‌های هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI انجام شد و سپس به کمک مارکر، اندازه قطعه خارج شده از وکتور تایید شد. بررسی‌ها بر روی ژل الکترفورز قطعه ژنی ۱۰۰۰ جفت بازی را تایید نمود (شکل شماره ۶). خالص‌سازی نمونه‌های هضم شده توسط کیت انجام شد و الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت (شکل شماره ۷).



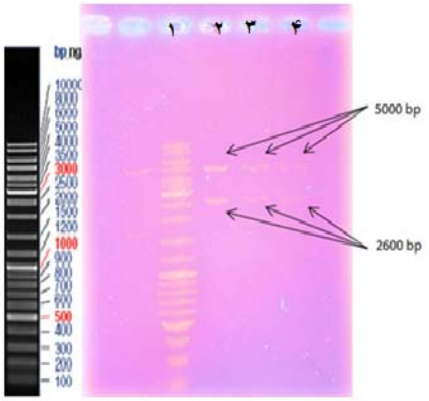
شکل شماره ٦: الگوی الکتروفورزی حاصل از برش آنزیمی ژن و وکتور به وسیله آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI بر روی ژل آگارز. چاهک ۱: برش ژن. چاهک ۲: برش وکتور. چاهک ۳: پلاسمید بدون برش. چاهک ۴: نشانگر مولکولی DNA.



شکل شماره ۷: الگوی الکتروفورز pET28a(+) نوترکیب و قطعه ژنی *isl* پس از هضم آنزیمی و استخراج از ژل. چاهک ۱: نشانگر مولکولی DNA، چاهک ۴: هضم دوگانه پلاسمید pET28a(+) نوترکیب حاوی ژن *isl* با آنزیم های *Eco*RI و *Hind*III و خروج ژن *isl*.

ب- انجام واکنش الحاق و صحت انجام کلونینگ در باکتری E.coli BL21(DE3)

برای اتصال قطعه ژنی *isl* و پلاسمید pET28a-*esi* که هر دو مورد هضم آنزیمی قرار گرفته بودند، واکنش الحاق با کمک آنزیم DNAT4 لیگاز انجام شد و بعد از الحاق وکتور نوترکیب، به سلول‌های *اشریشیاکلی* سویه BL21(DE3) منتقل شد. پس از استخراج پلاسمید، غربالگری کلنی‌ها به روش هضم آنزیمی صورت پذیرفت. محصول روی ژل ۱ درصد آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعه مورد نظر (۲۶۰۰ جفت بازی) از لحاظ اندازه با ژن هدف مورد نظر هم‌خوانی داشت (شکل شماره ۸).

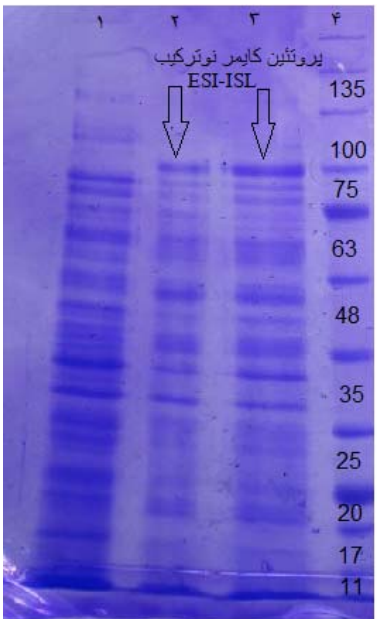


شکل شماره ۸: بررسی کلون‌ها با هضم آنزیمی جهت تایید زیرهمسانه‌سازی. چاهک ۱: نشانگر مولکولی DNA. چاهک های ۲، ۳، ۴: پلاسمید pET28a(+) که به وسیله ی آنزیم *Hind*III و *Bam*HI بریده شده است و قطعه ای به طول ۲۶۰۰ جفت باز از آن خارج شده است (این قطعه، مجموع قطعه موجود در وکتور و قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی است که به آن الحاق شده است).

۳- بررسی بیان نوترکیب آنتی ژن شش ظرفیتی و تایید آن

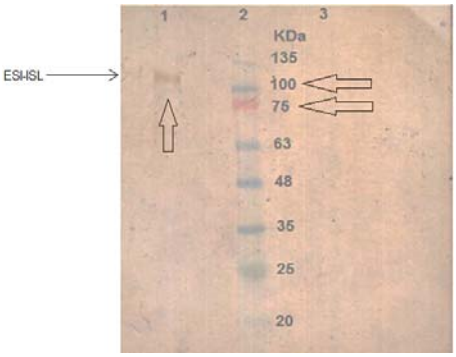
برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب ESI-ISL، از ژل SDS-PAGE، ۱۲ درصد استفاده شد. همانطور که در شکل شماره ۹ دیده می‌شود، در ناحیه حدود ۱۰۰

کیلودالتون باند مربوط به پروتئین کایمر نوترکیب ESI ISL به وضوح قابل مشاهده است.



شکل شماره ۹: بررسی بیان پروتئین نوترکیب کایمر شش ظرفیتی در باکتری *E. coli* روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. ردیف ۱: نمونه القا نشده. ردیف ۲ و ۳: نمونه های القا شده توسط IPTG از دو کلنی مجزا. ردیف ۴: نشانگر پروتئینی.

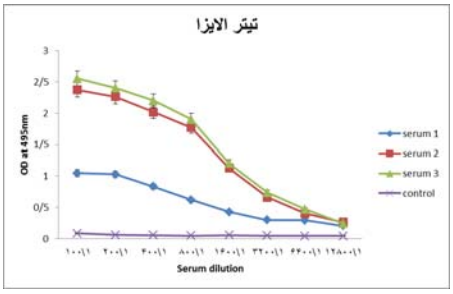
به منظور تأیید صحت پروتئین کایمر از تکنیک وسترن بلاتینگ استفاده شد. این کار با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی علیه پروتئین IpaD، که یکی از پروتئین‌های حاضر در پروتئین کایمر نوترکیب می‌باشد، انجام شد. در ستون تست که مربوط به نمونهٔ القا شده با IPTG است، یک باند در نزدیکی 100 KDa مشاهده می‌شود که در ستون شاهد که تحت القای IPTG قرار نگرفته، دیده نمی‌شود (شکل شماره ۱۰).



شکل شماره ۱۰: تایید بیان پروتئین ESI-ISL با آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی علیه یکی از پروتئین‌های به کار رفته در پروتئین مورد نظر. ستون ۱: نمونه تست (القاء شده توسط IPTG)، ستون ۲: نشانگر پروتئینی. ستون ۳: نمونه کنترل منفی (القاء نشده).

۴- تولید آنتی بادی علیه پروتئین کایمر نوترکیب در موش

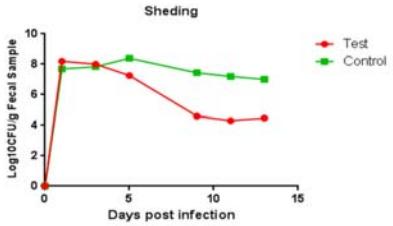
پس از تولید پروتئین نوترکیب و تخلیص آن، جهت تولید آنتی‌بادی علیه آن، این پروتئین به صورت زیرجلدی و در ترکیب با ادجوانت فروند در ۴ نوبت و در فواصل ۱۴ روزه به موش‌ها تجویز شد. به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله، از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هربار تزریق (به استثنای تزریق اول) از موش‌های تست و شاهد خونگیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها، مقدار ۴ میکروگرم از پروتئین ESI-ISL در کف پلیت نشانده شد و آزمایش الایزا انجام گرفت (با توالی رقت ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۲۸۰۰). نتایج نشان می‌دهد آنتی‌ژن کایمر باعث تحریک ایمنی هومورال شده است و آنتی‌بادی از نوع IgG در سرم به میزان مناسبی تولید شده است (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: بررسی تیترآنتی بادی تولیدی علیه آنتی ژن ESI-ISL با استفاده از تکنیک الایزا.

۵- چالش موش‌های ایمن با باکتری زنده EHEC (O157:H7)

دو هفته بعد از تجویز چهارم، برای بررسی این که آیا آنتی‌بادی تولید شده علیه آنتی‌ژن کایمر توانسته است ایمنی محافظتی را ایجاد نماید، موش های گروه‌های تست و شاهد با باکتری‌های زنده EHEC مورد چالش قرار گرفتند و میزان دفع باکتری در مدفوع آن‌ها در فاصله زمانی ۱۵ روزه محاسبه شد که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. روند نزولی نمونه تست از روز پنجم کشت از مدفوع موش‌ها به خوبی نشان دهنده این است که ایمنی‌زایی موش‌ها در برابر آنتی‌ژن موفقیت آمیز بوده است (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: بررسی دفع EHEC در مدفوع موش‌ها

بحث

باکتری‌های پاتوژن روده‌ای باعث بیماری اسهال خصوصا در کودکان زیر ۵ سال هستند. سویه‌های ETEC ، EHEC و شیگلا از عوامل مهم اسهال بوده و توسعه واکسن یکی از استراتژی‌هایی است که برای پیشگیری از ابتلا به این عفونت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. اگرچه واکسن‌های زیادی برای هرکدام از این عوامل به تنهایی یا با هم طراحی و ساخته شده است، با این حال، تعداد کمی از آن ها وارد مراحل کارآزمایی بالینی شده است(۲۶، ۲۴، ۲۳). برای این منظور، به عنوان اولین قدم، انتخاب آنتی‌ژن‌های مناسب مربوط به هر باکتری بود که بتوانند در ترکیب با هم به عنوان یک ایمونوژن مناسب عمل کرده و علیه باکتری مربوطه ایمنی محافظتی ایجاد نمایند. در این مطالعه از ناحیه -N ترمینال پروتئین IpaD ، از زیر واحد B سم LT(LTB) و نیز فرم جهش یافته سم STa به عنوان ایمونوژن باکتری ETEC و زیرواحد B سم Stx ، پروتئین اینتیمین و پروتئین EspA به عنوان ایمونوژن باکتری EHEC استفاده شد(۲۵،۲۴). پروتئین IpaD یک پروتئین غشایی است که در نوک سوزن ترشحی خارجی، که قسمتی از سیستم ترشحی است، قرار می‌گیرد و ورود پروتئین‌های IpaB و IpaC به داخل غشای سلول هدف را کنترل می‌نماید. به علاوه ایمونوژن بودن این آنتی‌ژن قبلا به اثبات رسیده بود(۲۶). باکتری‌های بیماری‌زای ETEC حداقل یکی از دو سم LTو STa را بیان می‌کنند (۱۱) که در این جا زیرواحد B سم LT و شکل جهش‌یافته‌ای از STa که هر دو با وجود ایمونوژن بودن، ایمن و بی‌خطر می‌باشند، انتخاب شدند. شیگاتوکسین‌های مربوط به باکتری EHEC، (Stx1- Stx-2)، فلاژلین (Flic-H7) ، LPS و فاکتورهای ویرولانسی که در LEE رمزگذاری شده و توسط سیستم ترشحی نوعIII (TTSS) ترشح می‌شوند (از جمله Tir، اینتیمین، EspA ، EspB و EspD برای ارزیابی ایمونوژنیسیته مورد مطالعه قرار گرفته‌اند).در این جا، زیرواحد B سم Stx و دو فاکتور ویرولانس اینتیمین و EspA ، که نشان داده شده بود که آنتی‌بادی علیه آن‌ها در افرادی که به صورت طبیعی با این آنتی‌ژن آلوده می‌شوند بالا می‌رود، برای ورود در آنتی‌ژن کایمر مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌چنین نحوه قرار گیری ژن‌ها در کنار هم براساس نوع فعالیت هر آنتی

ژن و هم‌چنین بالاترین نیمه عمر در بین ترتیبات مختلف سه آنتی‌ژن انتخاب شد. با استفاده از نرم افزار VaxiJen ساختارهایی که آنتی‌ژنیسیته پایینی را نشان می‌داد، حذف گردید و آن‌هایی که آنتی‌ژنیسیته بالاتری داشتند جهت آنالیز ساختار دوم و سوم انتخاب شدند. میزان آنتی ژنتیسیته و ساختار سوم پروتئین کایمر، تعیین کننده ترتیب آنتی‌ژن‌ها در پروتئین کایمر بودند. میزان آنتی‌ژنیسیته در ساختارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت ولی ترتیب آنتی‌ژن‌ها و به کار بردن لینکرهای پپتیدی مختلف به شدت بر روی ساختار سوم پروتئین کایمر اثر می‌گذاشت. بعد از انتخاب آنتی‌ژن‌های مناسب، رابط‌های پپتیدی مختلفی برای اتصال این آنتی‌ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. یک رابط مناسب باید به نحوی آنتی‌ژن‌های منفرد را به هم متصل نماید که در ساختار نهایی، این آنتی‌ژن‌ها کاملاً از هم مجزا باشند، به‌طوری‌که ساختار فضایی آنتی ژن ها در آنتی‌ژن کایمر، تا حد امکان تغییر نکند. انتخاب لینکر با ساختار آلفاهلیکس به این سبب بود که تمام زیرواحدها از هم جدا شده و با هم هم‌پوشانی نداشته باشند تا همه اپی توپ‌ها در معرض APC ها قرار بگیرند. هم‌چنین استفاده از این نوع لینکر، پایداری و فولدینگ پروتئین کایمر نوترکیب را افزایش داد، به طوری‌که این لینکر نمی‌شکند و توسط پروتئازها هضم نمی‌شود. بررسی‌های ساختار دوم و سوم پروتئین کایمر به ترتیب با نرم افزارهای GOR IV و I-TASSER نشان داد که آنتی‌ژن‌های منفرد به خوبی از هم جدا شده‌اند و تمام آنتی‌ژن‌ها در معرض سیستم ایمنی بدن قرار دارند. در مرحله بعد، ساختار دوم RNA حاصل از رونویسی از ژن کایمر، با استفاده از سرور Mfold به دست آمد و از جهت پایداری، در دسترس بودن جایگاه اتصال ریبوزوم[14]، عدم وجود ساختارهای دوم نامطلوب مانند سنجاق سرهای طولانی و میزان انرژی آزاد ساختار مورد بررسی قرار گرفت. بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین کایمر نیز نشان داد که این پروتئین در شرایط فیزیولوژیک دارای بار مثبت بوده و می‌تواند در سیستم‌های بیانی مختلف بیان گردد. برای حصول اطمینان از صحت پروتئین بیان شده از واکنش کیفی لکه‌گذاری وسترن با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آنتی‌ژن IpaD استفاده گردید و آنتی‌بادی مذکور توانست به خوبی آنتی‌ژن مورد نظر را شناسایی کند. پروتئین کایمر نوترکیب از روی ژل SDS-PAGE تخلیص شد و در چهار نوبت از طریق زیر جلدی به موش‌ها تزریق گردید. پس از خون‌گیری از موش‌ها و جداسازی سرم، تست الایزا انجام شد. در سال ۲۰۱۳، هنری و همکاران از پروتئین امتزاجی IpaD-StxB به منظور ایمن سازی خوکچه استفاده کردند و نشان دادند که خوکچه‌ها قادرند ۲۸ برابر LD50 سم *شیگلا فلکسنری* ۲aرا تحمل نمایند(۲۷). همین گروه در سال ۲۰۱۴ از همین فرمولاسیون برای ایمن سازی موش‌ها استفاده کردند و نشان دادند که موش‌ها تا ۷/۵ برابر LD50 ، سم *شیگلا فلکسنری* ۲aرا تحمل می‌نمایند(۲۸). باران وند و همکاران در سال ۲۰۱۵ با امتزاج قسمت انتهای آمین پروتئینIpaD با پروتئین StxB ، یک پروتئین امتزاجی ساختند و نشان دادند که این آنتی‌ژن کایمر می‌تواند رت‌ها را با کارایی بیش‌تری در برابر *E. coli* O:157 H:7 ایمن نماید(۲۹). در سال ۲۰۱۶، کاظمی و همکاران یک پروتئین امتزاجی سه قسمتی متشکل از LTB (مربوط به باکتری ETEC)، Stx2B (مربوط به باکتری EHEC) و CTB (مربوط به ویبریوکلرا) را طراحی و مورد ارزیابی ایمنی‌زایی قرار دادند. نتایج کار آن‌ها نشان داد که این ترکیب می‌تواند ایمنی محافظتی را در برابر و سه سویه فوق ایجاد نماید(۳۰). در سال ۲۰۱۶، Nandre و همکاران پروتئینی امتزاجی متشکل از LT و STa (با فرمولاسیون 3XSTaN12S - dmLT) را تولید کردند و نشان دادند که این ترکیب می‌تواند باعث ایجاد مصونیت در برابر ETEC گردد(۳۱). Chitradevi و همکاران در سال

[14] Ribosome Binding Site

۲۰۱۶، آنتی‌ژن IpaD شیگلا را با پروتئین GroEL سالمونلا تیفی ممزوج کردند و ایمنی‌زایی این پروتئین امتزاجی را در برابر شیگلا مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این پروتئین قادر است در برابر گونه‌های مختلف شیگلا ایمنی محافظتی ایجاد نماید(۳۲). تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از چالش دهانی با باکتری‌های زنده EHEC نشان داد که این پروتئین قادر است به خوبی سیستم ایمنی موش را تحریک کرده و ایمنی محافظتی در برابر پاتوژن‌های مورد نظر (ETEC، EHEC و شیگلا *دیسانتری*) را ایجاد نماید به طوری که آنتی‌بادی تولیدی علیه کایمر شش ظرفیتی در بدن موش‌های ایمن شده در برابر لانه گزینی باکتری زنده را به اثبات رساند.

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که نتایج In *silico* یا حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی نشان داد که کایمر نوترکیب طراحی شده یک آنتی‌ژن مناسب بوده و این قابلیت را دارد که به عنوان یک کاندید واکسن مورد آزمایش قرار گیرد. موش‌های ایمن شده با این آنتی‌ژن، ایمنی نسبتا مناسبی را در برابر چالش با باکتری بیماری‌زای سویه EHEC، از خود نشان دادند.

سپاسگزاری

از تمامی اساتید، پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Jafari F1, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR.Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. Jpn J Infect Dis, 2008. 61(4): 269-273.
2. Black RE. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. Rev Infect Dis. 1990. 12(Supplement 1): S73-S79.
3. Svennerholm AM. Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. Expert review of vaccines. Expert Rev Vaccines. 2008. 7(6): 95-804.
4. Gohar A, Abdeltawab NF, Fahmy A, Amin MA. Development of safe, effective and immunogenic vaccine candidate for diarrheagenic Escherichia coli main pathotypes in a mouse model. BMC Research Notes. 2016; 9(1): 1.
5. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol. 2005; 115(2): 113-128.
6. Cordero L, Rau R, Taylor D, Ayers LW. Enteric gram-negative bacilli bloodstream infections: 17 years' experience in a neonatal intensive care unit. Am J Infect Control. 2004; 32(4): 189-195.
7. Tserenpuntsag B, Chang HG, Smith PF, Morse DL. Hemolytic uremic syndrome risk and Escherichia coli O157: H7. Emerg Infect Dis. 2005;11(12): 1955-1957.
8. Bidet P1,Mariani-Kurkdjian P,Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, et al. Characterization of Escherichia coli O157: H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in

France. J Med Microbiol. 2005; 54(1): 71-75.

9. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microbiol Rev. 2008. 21(1): 134-156.
10. La Ragione RM, Patel S, Maddison B, Woodward MJ, Best A, Whitelam GC, et al. Recombinant anti-EspA antibodies block Escherichia coli O157: H7-induced attaching and effacing lesions in vitro. Microbes Infect. 2006; 8(2): 426-433.
11. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev. 2005. 18(3): 465-483.
12. Svennerholm AM, Lundgren A. Recent progress toward an enterotoxigenic Escherichia coli vaccine. Expert Rev Vaccines. 2012; 11(4): 495-507.
13. Jobling MG, Holmes RK. Type II heat-labile enterotoxins from 50 diverse Escherichia coli isolates belong almost exclusively to the LT-IIc family and may be prophage encoded. PloS One. 2012; 7(1): e29898.
14. Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, Wartna ES, van Zanten BA, Witholt B, et al. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from E. coli. Nature.1991; 351(6325):371-377.
15. Hajishengallis G, Arce S, Gockel CM, Connell TD, Russell MW. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections. J Dent Res. 2005; 84(12): 1104-1116.
16. Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Gotenborg University : Inst of Biomedicine Dept of Medical Microbiology and Immunology.2008.
17. Leong J, Vinal AC, Dallas WS. Nucleotide sequence comparison between heat-labile toxin B-subunit cistrons from Escherichia coli of human and porcine origin. Infect Immun. 1985; 48(1): 73-77.
18. Svennerholm AM, Tobias J.Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. Expert Rev Vaccines. 2008;7(6): 795-804.
19. Word Health Organization(WHO). Clemens J, Kotloff K, Kay B. Generic protocol to estimate the burden of Shigella diarrhoea and dysenteric mortality. Field test version .1999.
20. Safaei S, Honari H, Mousavi SJ, Esmaeili A, Ghofrani M. Isolation, cloning and Fusion of N-terminal Region of ipaD Shigella dysenteriea and Ricin toxin B Subunit. Genetics In The 3rd Millennium. 2013; 10(4): 2880-2889.(persian)

21. Yao R, Palchaudhuri S. Nucleotide sequence of the ipaBCD structural genes of Shigella dysenteriae. Mol Microbiol. 1991; 5(9): 2217-2221.
22. Turbyfill KR, Hartman AB, Oaks EV. Isolation and characterization of a Shigella flexneri invasin complex subunit vaccine. Infect Immun. 2000; 68(12): 6624-6632.
23. Amani J, Mousavi Sl, Rafati S, Salmanian AH. Immunogenicity of a plant-derived edible chimeric EspA, Intimin and Tir of Escherichia coli O157: H7 in mice. Plant Sci. 2011; 180(4): 620-627.
24. Hajizade A, Ebrahimi F, Amani J, Arpanaei A. Design and in silico analysis of pentavalent chimeric antigen against three enteropathogenic bacteria: enterotoxigenic E. coli, enterohemorragic E. coli and Shigella. Biosci Biotech Res Comm.2016; 9(2): 229-243.
25. Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. J Microbiol Methods. 2012; 90(1): 36-45.
26. Jahantigh D, Saadati M, Fasihi Ramandi M, Mousavi M, Zand AM. Novel intranasal vaccine delivery system by chitosan nanofibrous membrane containing N-terminal region of IpaD antigen as a nasal Shigellosis vaccine, Studies in Guinea pigs. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2014; 24(1): 33-39.
27. Honari H, Amlashi I, Ebrahim Minaee M, Safaee S. Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein. Arak Med Univ J. 2013; 16(4): 83-93.(persian)
28. Honari H, Amlashi I, Ebrahim Minaee M, Safaee S. Expression of recombinant proteins IpaD-STxB and immunogenicity STxB in the mice. J Mazandaran Univ Med Sci. 2014; 23(109): 183-193.(persian)
29. Baranvand M, Honari H. Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats. Koomesh. 2015; 16(3): Pe397-Pe403.(persian)
30. Kazemi R1, Akhavian A2, Amani J3, Salimian J4, Motamedi MJ5, Mousavi A6. Immunogenic properties of trivalent recombinant protein composed of B-subunits of LT, STX-2, and CT toxins. Microbes Infect. 2016; 18(6): 421-429.
31. Nandre R1, Ruan X1, Duan Q1, Zhang W2. Enterotoxigenic Escherichia coli heat-stable toxin and heat-labile toxin toxoid fusion 3xSTaN12S-dmLT induces neutralizing anti-STa antibodies in subcutaneously immunized mice. FEMS Microbiol Lett. 2016;363(21): fnw246.
32. Chitradevi STS1, Kaur G1, Sivaramakrishna U2, Singh D1, Bansal A3. Development of recombinant vaccine candidate molecule against Shigella infection. Vaccine. 2016; 34(44): 5376-5383.