ORIGINAL ARTICLE

Expression of Recombinant Proteins IpaD-STxB and Immunogenicity STxB in the Mice

Hossein Honari[1],
Iman Amlashi[2],
Mohammad Ebrahim Minaei[3]

[1] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran
[2] MSc Molecular Cell Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran
[3] Ph.D Student of Nanobiotechnology, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran

(Received June 9, 2013 ; Accepted September 8, 2013)

Abstract

Background and purpose: The most common cause of diarrhea is *Shigella* and no vaccine has been found so far. IpaD and STxB proteins (B subunit of Shiga toxin) play an important role in invasion, infection and pathogenesis caused by *Shigella*. To evaluate the immunogenicity of each of the proteins IpaD and STxB can using of two animal models mice and guinea pigs and could be determined role of each recombinant protein IpaD-STxB for appropriate vaccine.

Materials and methods: In this experimental study, the gene sequences of *stxB & ipaD* were obtained from gene bank and was purchased the synthetic gene. This gene transferred to *E. coli BL21DE3* and produced the protein by the bacterium. The level of recombinant protein expression was evaluated and confirmed by techniques of Western bloting. Recombinant proteins were purificated using column chromatography, and were injected into mice four times consecutively. After the second injection (first booster), a week after each injection, were collected blood samples and was performed ELISA.

Results: The results showed that was raised antibody titers against IpaD-STxB protein in the mice. The immunogenicity was evaluated using active toxin *E. coli: O157:H7*. The challenge results showed that immunized mice could endure 7.5 times the LD50 Shiga toxin *E. coli O157: H7*.

Conclusion: The protein obtained of the fusion ipaD and stxB genes could protect mice against Shiga toxin. Consequently, STxB proteins were induced immunogenicity in an animal model mice and recombinant protein obtained can be a suitable candidate for the production of recombinant vaccine against *Shigella* types.

Keywords: *Shigella dysenteriae type 1*, Shiga toxin B-subunit (STxB), IpaD protein, *E. coli O157: H7*

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(109): 183-193 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۹ بهمن سال ۱۳۹۲ (۱۹۳-۱۸۳)

بیان پروتئین نوترکیب IpaD-STxB و بررسی ایمنی زایی آن در موش سوری

حسین هنری[۱]
ایمان املشی[۲]
محمد ابراهیم مینایی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: باکتری شیگلا، شایع ترین عامل اسهال بوده و تاکنون واکسن موثری علیه آن یافت نشده است. پروتئین IpaD و انتروتوکسین شیگلا یا B subunit of Shiga toxin (STxB) نقش مهمی در تهاجم، بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط شیگلا دارد. برای بررسی ایمنی‌زایی هر یک از پروتئین‌های ممزوج IpaD و STxB می‌توان از دو مدل حیوانی موش و خوکچه هندی استفاده نمود و نقش هر یک از پروتئین‌های نوترکیب IpaD-STxB را در تهیه واکسن مناسب مشخص نمود.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از نوع مطالعه تجربی می باشد که در آن اطلاعات مربوط به توالی ژنی *ipaD* و *stxB* از بانک ژنی استخراج و به صورت صناعی تهیه شد. این ژن به درون باکتری *E. coli BL21 DE3* منتقل و پروتئین مورد نظر توسط باکتری تولید شد. میزان بیان پروتئین نوترکیب مورد ارزیابی و با استفاده از تکنیک لکه‌گذاری وسترن، تأیید شد. پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی، تخلیص و در چهار نوبت متوالی به موش سوری تزریق شد. از تزریق دوم (یادآور اول) به بعد، یک هفته پس از انجام تزریق، خون‌گیری انجام و مورد آزمایش الایزا قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاکی از افزایش محسوس تیتر آنتی بادی علیه پروتئین IpaD-STxB در موش بود. ایمنی‌زایی آن با استفاده از سم فعال *E. coli O157:H7* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که موش‌های ایمن شده توانستند ۷/۵ برابر LD_{50} شیگا توکسین *E. coli O157:H7* را تحمل نمایند.

استنتاج: پروتئین حاصل از ترکیب ژن‌های *ipaD* و *stxB* می‌تواند موش سوری را نسبت به شیگا توکسین مصون نماید. در نتیجه، پروتئین STxB در مدل حیوانی موش سوری موجب ایمنی زایی شده و پروتئین نوترکیب تولید شده می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا باشد.

واژه های کلیدی: شیگلا دیسانتری تیپ ۱، زیر واحد B سم شیگا (STxB)، پروتئین IpaD ، E. coli O157:H7

مقدمه

باکتری شیگلا دیسانتری تیپ ۱ جزء خانواده انتروباکتریاسه، گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور است. شیگلوزیس به عنوان یک اسهال خونی باسیلی حاد شناخته می‌شود که با مدفوع آبکی همراه با خون و موکوس توأم با علایم بالینی نظیر تب، کرامپ‌های شکمی مشخص می‌گردد و ممکن است همراه با سندرم

مولف مسئول: حسین هنری- تهران: دانشگاه جامع امام حسین(ع)، گروه زیست شناسی E-mail: honari.hosein@gmail.com
۱. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲. کارشناسی ارشد سلولی ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
۳. دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۳/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۵/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۶/۱۷

همولیتیک اورمیک باشد. از طرفی شیگا توکسین می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروتوکسیک ایجاد نماید. امروزه تلاش‌های زیادی برای ساخت واکسن علیه شیگلا و سم آن انجام شده و کاندیداهای زیادی گزارش شده است. جالب این‌که هیچ کدام از این کاندیداها به دلایل مختلف تا امروز مورد تأیید سازمان جهانی سلامت WHO و FDA قرار نگرفته است. اما تلاش‌ها برای ساخت واکسن علیه شیگلوز به طور جدی ادامه دارد. نتایج پژوهش‌های منتشر شده در خصوص شیوع شیگلا در ایران، نشان می‌دهد که تا چند سال پیش *شیگلا فلکسنری* بیش‌ترین شیوع را در ایران دارا بوده است. در رتبه‌های بعدی به ترتیب *شیگلا سونئی و شیگلا دیسانتری* قرار دارند و مقدار کمی *شیگلا بوئیدی* مشاهده شده است. اما مطالعات جدید نشان از شیوع بیش‌تر *شیگلا سونئی* در مقابل *شیگلا فلکسنری* می‌دهد. تقریباً همین ترتیب شیوع شیگلا در کشورهای همسایه ایران (عربستان و پاکستان) نیز گزارش شده است(۱).

چهار سروتیپ مهم از نظر بیماری زایی و بروز اپیدمی ها عبارتند از: *شیگلا دیسانتری (S.dysenteria)*، *شیگلا فلکسنری (S.flexneri)*، *شیگلا سونئی (S.sonneii)*، *شیگلا بویدی (S.boydii)*. اسهال خونی با عامل *شیگلا* در بیشتر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان به موقع به مرگ می‌انجامد. فراوانی بالای *شیگلا* در کشورهای در حال توسعه به طور کلی به فقدان آب سالم، مراعات ضعیف اصول بهداشتی، سوء تغذیه و درمان آنتی بیوتیکی گران نسبت داده می‌شود. مقاومت آنتی بیوتیکی در *شیگلا* به طور چشمگیری در حال افزایش است، در نتیجه WHO توسعه واکسنهای ایمن و کارا در مقابل *شیگلا* را در اولویت قرار داده است(۴-۲). از این لحاظ واکسیناسیون علیه *شیگلا* دارای اهمیت فراوانی است، علاوه بر این هنوز واکسن مناسبی علیه شیگلوزیس وجود ندارد.

سالیان زیادی است که شیگا توکسین یا STx به عنوان یکی از عوامل ویرولانس *شیگلا دیسانتری تیپ ۱* در ایجاد اسهال خونی و دیسانتری مطرح است. شیگا توکسین یک پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلودالتون بوده که از یک زیرواحد منومریک سمی و آنزیماتیک به نام STxA و از یک زیرواحد متصل شونده به رسپتور هموپنتامریک به نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیر سمی STxB، برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری می‌باشد. STxB ساختار هموپنتامریک (۵ زیر واحدی) دارد. هر منومر آن از ۶۹ اسید آمینه (۲۰۷ جفت باز) تشکیل شده و وزن ملکولی حدود ۷/۷ کیلودالتون دارد. هرمونومر از یک مارپیچ آلفا (α helix) و ۶ صفحه β (β sheet) تشکیل شده است. این ۵ منومر به طریقی تاخوردگی پیدا می‌کنند که صفحات β در سطح خارجی و مارپیچ‌های آلفا در داخل قرار می‌گیرند. STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb_3 متصل می‌گردد که روی اکثر سلولهای بدن بیان می‌شود. بنابراین با تولید آنتی بادی علیه STxB و خنثی سازی آن می‌توان از اتصال و ورود قسمت سمی (STxA) به درون سلول هدف جلوگیری به عمل آورد. علاوه بر این، از این زیر واحد در زمینه‌های مختلفی همچون انتقال دهنده آنتی ژن‌ها و داروهای ضد سرطان به سلول سرطانی و هم چنین تصویر برداری از تومور به کمک مواد فلوروسنت استفاده می‌گردد(۵).

باکتری شیگلا دیسانتری پس از ورود به بدن میزبان، راست روده و کولون در دستگاه گوارش را مورد تهاجم قرار داده و حتی قادر است این تهاجم را به سلول‌های پوششی غیر فاگوسیتی نیز گسترش دهد. این عمل از طریق پروتئین‌هایی که در تمام سویه‌های بیماری‌زا به شدت حفاظت شده و توسط یک پلاسمید تهاجمی بزرگ ۱۸۶ کیلوبازی کد می‌شود، انجام می‌گیرد. پس از ورود باکتری به بدن میزبان، در تماس با سلول های اپی تلیال روده شروع به ترشح فاکتورهای تهاجمی می‌کند. پروتئین‌های IpaA, B, C, D از جمله این فاکتورهای تهاجمی می‌باشند. پروتئین IpaD که ۳۷

کیلودالتون وزن دارد با به کارگیری IpaB روی سطح باکتری باعث آغاز فرآیند تهاجم می‌شود. باکتری درون یک واکوئل اندوسیتوزی بلعیده می‌شود و موجب پاره شدن واکوئل و در نتیجه رها شدن باکتری درون سیتوپلاسم سلول پوششی می‌شود. باکتری در سیتوپلاسم سلول پوششی تکثیر و شروع به مهاجرت سلول به سلول و تخریب جداره روده می‌کند و در نهایت موجب اسهال خونی می‌شود(۶). پروتئین IpaD یکی از حیاتی‌ترین و مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای موجود در انواع شیگلا می‌باشد. به نحوی که سرآغاز و گذرگاه تمام فعالیت های تهاجمی شیگلا مرهون فعالیت کلیدی IpaD می‌باشد. سیستم ایمنی بدن انسان و میمون پروتئین IpaD را به عنوان یک عامل آنتی‌ژنیک قوی شناسایی کرده و علیه آن پاسخ می‌دهد(۷).

هدف از این مطالعه، مشخص کردن نقش هر کدام از پروتئین‌های ترکیبی IpaD-STxB در ایجاد ایمنی‌زایی برای تهیه واکسن مناسب می‌باشد. لذا به منظور تعیین نقش هر کدام ضرورت دارد تا ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب IpaD-STxB در دو مدل حیوانی موش و خوکچه هندی مورد بررسی قرار گیرد. برای رسیدن به این هدف پس از ترکیب دو ژن *ipaD–stxB* و بیان پروتئین نوترکیب آن به دو حیوان آزمایشگاهی موش و خوکچه هندی تزریق و آنتی‌بادی علیه آن تولید شد. ساب کلونینگ کاست ژنی *ipaD–stxB* و بررسی بیان و ایمنی‌زایی آن در خوکچه هندی و موش سوری به عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری شیگلوزیس انجام شده است

مواد و روش‌ها

طراحی کاست ژنی

در این مطالعه تجربی، توالی کامل ژن‌های *stxB* و *ipaD* از بانک ژن (Gen-Bank Accession number NC_007607.1, NC_AJ271153.1) استخراج شد. طراحی کاست ژنی با استفاده از نرم افزار GenScript انجام شد. سکانس اسیدآمینه‌های هر کدام از پروتئین‌ها از سایت NCBI دریافت و پس از حذف توالی‌های مربوط به سیگنال پپتیدها و توالی‌های که برای ایجاد پاسخ ایمنولوژیک بدن ضروری نبودند، ساختارهای دوم و سوم هر کدام از این پروتئین‌ها و خصوصیات شیمیایی و فیزیکی آن‌ها به وسیله نرم افزارهای بیوانفورماتیکی موجود مورد مقایسه قرار گرفتند. تعیین میزان پایداری و نیمه عمر ترکیب‌های مختلف پروتئین کایمریک به وسیله نرم افزار آنلاین ProtParam، تعیین ساختار دوم ترکیبات مختلف پروتئین های کایمریک به وسیله نرم افزار psipred و مقایسه موقعیت فضایی اتم‌های هر کدام از اسیدهای آمینه در حالت پروتئین کایمریک و در حالت طبیعی به وسیله نرم‌افزار Modeller انجام شد(۸). با توجه به نوع طراحی، جایگاه‌های برشی و نیز لینکر فورینی برای این کاست تعبیه و به صورت صناعی در وکتور pET-28a(+) تهیه گردید. کاست طراحی شده به طور شماتیک NdeI-ipaD-linker-stxB-taa-XhoI دارای جایگاه‌های برشی و کدون پایان بود.

تأیید ژن‌های صناعی stxB و ipaD با روش PCR و بیان آن

وکتور بیانی pET28a(+) دارای ژن‌های *stxB* و *ipaD* صناعی در سلول‌های مستعد *E.coli* سویه BL21(DE3) (stratagen) با روش شوک حرارتی منتقل شد و غربال‌گری همسانه‌های حاصل روی محیط LB آگار حاوی ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین انجام شد. همسانه‌های انتخابی به کمک PCR تکثیر و توسط هضم آنزیمی تایید شد(۹،۱۰).

از کشت شبانه همسانه‌های جداسازی شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور (Shaker Incubator) با ۲۰۰ دور در دقیقه هوادهی شد و پس از رسیدن به جذب نوری (Optical Density: OD) ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، با ایزوپروپیل تیو بتا- دی گالاکتوزید فرمنتاز (Isopropyl βD1 thiogalactopyranosid: IPTG)

با غلظت ۰/۷ میلی‌مولار القاء و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت در شیکر انکوباتور با ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هوادهی و انکوبه شد. در ادامه سلول‌ها با سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شد.

الکتروفورز SDS-PAGE

نمونه‌ها قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی(PR0602) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بود(۱۰،۱۱).

تأیید و تخلیص پروتئین نوترکیب

برای تأیید حضور پروتئین نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی‌مولار، KCl ۲/۷ میلی‌مولار، $Na_2HPO_4.7H_2O$ ۴/۳ میلی‌مولار، توین ۲۰ درصد و pH: ۷/۲) حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست و شو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی‌ضد His-tag (ebcam) کانژوگه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شست و شو با بافر PBST، برای آشکار سازی از سوبسترا (بافر تریس ۵۰ میلی مولار و pH:۷/۸ حاوی ۶ میلی‌گرم DAB، ۱۰ میکرو لیتر H_2O_2) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولزی، واکنش با استفاده از H_2O متوقف گردید(۱۰-۱۲).

رسوب باکتریایی جمع‌آوری شده از مرحلهٔ قبل در بافر لیزکننده (NaH2PO4 ۱۰۰ میلی‌مولار، Tris ۱۰۰ میلی‌مولار و اوره ۸ میلی‌مولار) با pH=۸ حل شده و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک با قدرت رزونانس ۷۰ درصد و آمپیلافیکاسیون ۰/۶ در ۶ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای و در حمام یخ، لیز شد. سلول‌های لیزشده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۸۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل در بافر لیزکننده حاوی اوره ۸ مولار به‌خوبی حل شد. پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره، با استفاده از ستون میل ترکیبی Ni-NTA پس از شست و شو با بافرهای شست و شو دهنده جداسازی و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد. غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد انجام گرفت(۱۰-۱۲).

تولید آنتی بادی علیه پروتئین IpaD- STxB

به میزان ۲۰ و ۵۰ میکروگرم (با توجه به مطالعاتی که در همین مرکز انجام شده بود) از پروتئین IpaD- STxB در چهار نوبت، بار اول همراه با ادجوانت کامل (Freund's complete adjuvant) و در نوبت‌های بعدی با ادجوانت ناقص فروند به ترتیب به موش‌های سوری و خوکچه‌های هندی تزریق و در نهایت از آن‌ها خون‌گیری و توسط آزمایش الایزا تیتر آنتی‌بادی اندازگیری شد(۱۰-۱۲).

چالش حیوانات شاهد و ایمن شده با عصاره سلولی E. coli سویه O157:H7

کلونی‌های خالص *E. coli O157:H7* به درون ۵ میلی‌لیتر آبگوشت BHI(Brain-Heart infusion) تلقیح و یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰rpm انکوبه شدند. سپس ۱ درصد از حجم این محیط به ml ۳۰۰ محیط BHI تازه تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت با شرایط بالا انکوبه و پس از آن، سانتریفیوژ شد و سلول‌ها با سرعت g۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شدند. توده سلولی حاصل،

دوبـاره در Tris-HCl (۵۰ mM) بـا pH=۸ شـناور و بـه مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهـداری شد. سپس بافر لیزکننده اضافه و در مرحله بعد، سلول‌هـا با استفاده از سونیکاسیون لیز شـدند و سـپس سـانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقـه در دمـای ۴ درجـه سانتی گراد، انجام شد. محلـول رویـی حاصـل، محتـوی شیگا توکسین می‌باشد کـه بـا اسـتفاده از فیلتـر ۰/۲۲µm (میلی پور)، تخلـیص شـد(۶). بـا تزریـق عـصاره سـلولی فوق (با نسبت‌های ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰) بـه موش‌ها و خوکچه‌های شاهد، میزان LD۵۰ آن از فرمـول Y=A+bX محاسبه گردید.

بعد از ایمن‌سـازی حیوانـات، بیـست و هـشت برابـر LD50 عـصاره سـلولی *E. coli* سـویه O157:H7 بـه خوکچه‌ها و هفت و نیم برابر آن نیز به موش‌ها تزریـق و بعد از ۲/۵ روز نتایج آن مورد بررسی و حیوانـات تـا ۱۰ روز تحت نظر قرار گرفتند(۱۳).

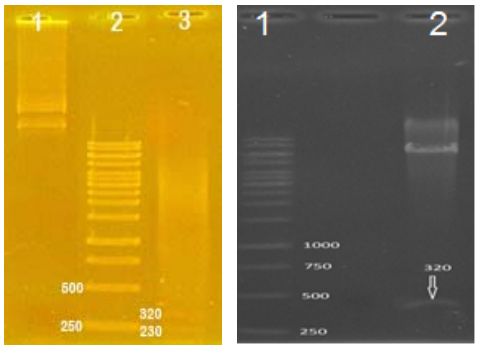
یافته ها

هضم وکتور pET28a(+) *نوترکیب با آنزیم‌های با اثـر محدود*

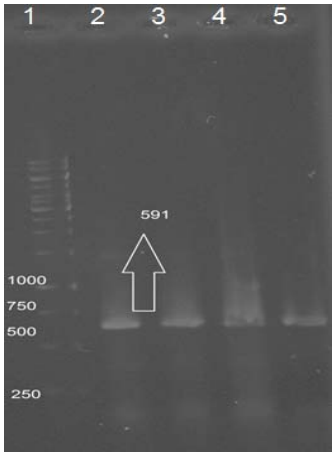
پلاسـمید نوترکیـب خریـداری شـده بـه بـاکتری *E. coli* BL21DE3 ترانـسفورم شـد. بـه منظـور تأییـد حضور قطعه مورد نظـر در وکتـور بیـانی pET28a(+) از هـضم آنزیمـی توسـط آنـزیم بـا اثـر محـدود BamH I استفاده شد کـه در ایـن حالـت ژن ipaD کـه حـدودbp ۳۲۰ طول دارد، از وکتور خارج شد. بـا هـضم آنزیمـی، وکتور مورد نظر توسط آنزیم‌های با اثر محـدود BamH I و Xho I ژن‌های ipaD و که حدود bp ۳۲۰ و ۲۳۰ طول دارد، از وکتور خارج شدند (تصویر شماره ۱).

تأیید حضور ژن سنتتیک توسط PCR

پس از استخراج پلازمید، بـرای اطمینـان از حـضور ژن سنتتیک درون آن، روی محصول اسـتخراج واکـنش PCR انجـام گرفـت (تـصویر شـماره ۲). (لازم بـه ذکـر است پرایمرها از نواحی pET طراحی شـده‌انـد، بنـابراین حدود ۴۴ باز به قطعه ژنی اضافه می شود).



تـصویر شـماره ۱: تـصویر حاصـل از پلاسـمید ژن صـناعی روی ژل آگاروز ۱ درصد. الف) تصویر سمت راست. ستون۱: نشانگر مولکـولی 10000 bp. سـتون ۲: بـرش آنزیمـی pET بـا آنـزیم *I* BamH. ب) تصویر سمت چپ. ستون۱: پلاسـمید اسـتخراج شـده ژن صـناعی. ستون۲: نشانگر مولکولی 10000bp. ستون ۳: برش آنزیمـی pET بـا دو آنزیم BamH I و Xho I به طور هم زمان



تـصویر شـماره ۲: تـصویر حاصـل از ژن صـناعی روی ژل آگـاروز ۱درصد. ستون۱: نشانگر مولکـولی 10000 bp. سـتون ۲، ۳، ۴، ۵: باند حاصل از PCR ژن سنتتیک و مشاهده قطعه ۵۹۱ جفت بازی

بیان پروتئین IpaD- STxB و تخلیص آن

کلـونی انتخـابی در محـیط کـشت LB مـایع در ۳۷ درجه سانتی گراد کـشت داده شـد و پـس از رسـیدن بـه رشـد کـافی بـه منظـور بیـان پـروتئین توسـط IPTG ۱ میلی‌مولار القاء گردید و برای بررسی بیان و کیفیـت آن روی ژل SDS-PAGE برده شد (تصویر شماره ۳). بانـد

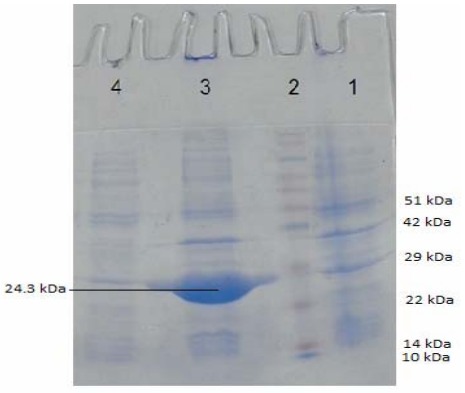
پروتئینی مدنظر در جایگاه صحیح ۲۴/۳kDa قرار گرفت، در حالی که در کنترل‌ها هیچ باندی دیده نشد. پروتئین نوترکیب به کمک ستون نیکل خالص‌سازی گردید و غلظت پروتئین تولیدی به روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

آنالیز لکه گذاری وسترن با آنتی بادی ضد His-tag

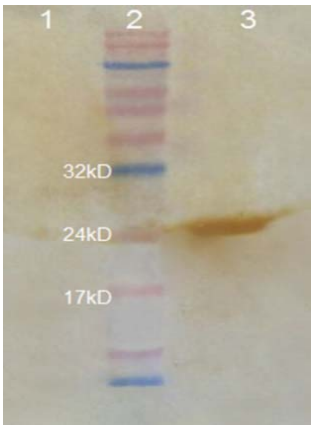
بیان پروتئین مورد نظر به دلیل داشتن توالی His-tag به کمک تکنیک لکه‌گذاری وسترن و به‌کارگیری آنتی‌بادی علیه His-tag مورد تأیید قرار گرفت و باند وسترن در جایگاه صحیح مدنظر قرار گرفت اما در ستون کنترل هیچ باندی دیده نشد (تصویر شماره ۴).

ارزیابی تیتر آنتی بادی ضد پروتئین نوترکیب به روش الایزای غیر مستقیم

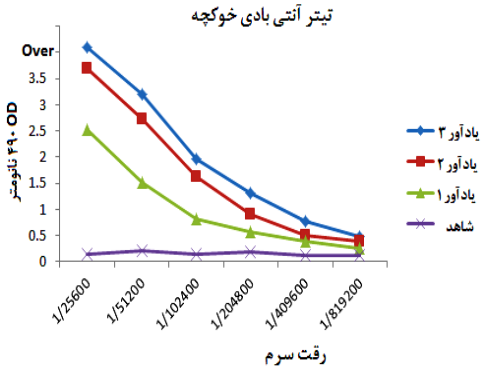
به منظور ارزیابی آنتی بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر بار تزریق (به استثنای تزریق اول) از موش‌ها و خوکچه‌های تست و شاهد خونگیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها، آزمایش الایزا انجام شد که نمودار میانگین تیتر آنتی بادی در هر مرحله در نمودارهای شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است.



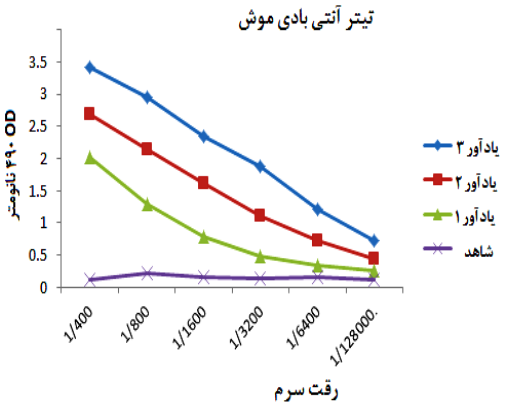
تصویر شماره ۳: تصویر الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲ درصد حاصل از بیان پروتئین نوترکیب. ستون۱: نمونه کنترل بدون القای IPTG ستون۲: نشانگر پروتئینی شماره PR0602 ستون ۳:رسوب حاصل از سونیکاسیون نمونه القا شده IPTG ستون ۴:محلول رویی حاصل از سونیکاسیون



تصویر شماره ۴: تأیید پروتئین نوترکیب بیان شده با استفاده از روش لکه گذاری وسترن در خوکچه هندی. با استفاده از آنتی بادی ضد برچسب هیستیدین. ستون۱.پروتئین مورد نظر که از نظر اندازه، در جای صحیح ظاهر شده است ستون۲. نمونه کنترل بدون القای IPTG ستون۳. نشانگر مولکولی PR0602



نمودار شماره ۱: تیتراسیون سرم خوکچه هندی پس از هر تزریق. جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر یادآور سوم در رقت ۱/۲۵۶۰۰، در حد over (بالاتر از ۳/۵) بوده است.



نمودار شماره ۲: تیتراسیون سرم موش ها پس از هر تزریق. جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر

چالش موش‌ها و خوکچه‌های هندی با استفاده از عصاره سلولی حاوی شیگا توکسین

به منظور انجام چالش مورد نظر، ۵ سر خوکچه توسط شیگا توکسین با غلظت ۲۸ برابر LD_{50} و نیز ۵ سر موش با غلظت ۷/۵ برابر LD_{50} مورد چالش قرار گرفتندکه حیوانات ایمن شده قادر به تحمل شیگا توکسین با غلظت‌های فوق بودند و در مدت ۵۰ روز، زنده و سالم ماندند.

بحث

ناحیه N- ترمینال IpaD به عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری شیگلوزیس مورد توجه محققین می‌باشد. از طرفی، نتایج تحقیقات انجام شده نقش آنتی‌ژنی، حاملی و ادجوانتی STxB را اثبات کرده‌اند. در این تحقیق، برای اثبات ایمنی‌زایی اختصاصی آنتی‌ژن STxB از حیوان آزمایشگاهی موش (موش به بیماری شیگلوزیس مبتلا نمی‌شود) استفاده شد. پروتئین حاصل از امتزاج ژن‌های *ipaD* و *stxB*، می‌تواند خوکچه هندی و موش سوری را نسبت به شیگا توکسین مصون نماید. با انجام این مطالعه، مشخص شد که پروتئین STxB در مدل حیوانی موش سوری موجب ایمنی زایی شده و پروتئین نوترکیب تولید شده می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن نوترکیب علیه انواع *شیگلا* باشد. پس از امتزاج دو ژن *stxB-ipaD* و بیان پروتئین نوترکیب آن، به منظور بررسی پاسخ سیستم ایمنی همورال پروتئین نوترکیب، به موش و خوکچه هندی تزریق شد و بعد از خون گیری، نتایج آزمایش الایزا نشان داد که تیتر آنتی بادی (IgG) سرمی مناسبی تولید شده است. این پروتئین نوترکیب می‌تواند به عنوان ایمونوژن برای تحریک سیستم ایمنی همورال و تولید آنتی بادی عمل نماید که در بررسی مدل حیوانی، افزایش در تیتر آنتی‌بادی به طور محسوس در خوکچه هندی بیشتر از موش می‌باشد(۱۴).

تحقیقات صورت گرفته مشخص کردند که مقدار آنتی ژنی که در حالت فیوژن شده با یک ادجوانت برای مصرف ضروری است، کمتر از مقداری می‌باشد که به صورت تجویز همزمان (Co-Administrated) برای ایمنی‌زایی استفاده می‌گردد که این نشان دهنده مزیت متصل کردن آنتی‌ژن‌ها با ادجوانت‌های مختلف است. امروزه توجه خاصی به واکسن‌هایی شده است که دارای این مزیت هستند(۱۵). توضیحاتی که ارائه گردید نشان می‌دهد که به منظور تقویت اثر واکسن و رفع محدودیت عمده آن یعنی میزان ایمنی‌زایی پایین آنتی‌ژن‌های محلول، بایستی که ناحیه N- ترمینال *IPaD* به عنوان آنتی‌ژن کاندیدای واکسن شیگلوز با یک ایمونو ادجوانت مناسب همراه شود که برای این منظور در این مطالعه ژن *stxB* انتخاب گردید. در مطالعات آینده می‌توان بررسی کرد که با اضافه کردن آنتی‌ژن دیگری به آنتی‌ژن STxB در تیتر آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی آن چه تغییراتی ایجاد خواهد شد.

در رابطه با ژن *stxB* در سراسر جهان، مطالعات و بررسی‌های گوناگونی به عمل آمده است. این ژن در موجودات مختلفی، از *E. coli* گرفته تا انواع گیاهان مثل کاهو و ... همسانه سازی شده است. در سال ۲۰۰۵ به منظور افزایش ایمنی زایی مخاطی علیه STxB تلاشی انجام شد که در طی آن پروتئین تخلیص شده STxB را به کمک میکروسفرهای لیپیدی سنتتیک به صورت نازال تلقیح کردند که نتایج آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی را نشان می‌داد(۱۶). در این راستا در سال ۲۰۰۸ در یک پروژه تحقیقاتی ژن *stxB* در باکتری *E. coli* کلون شده و بیان آن بررسی گردید و ایمنی‌زایی آن صورت پذیرفت که البته ژن این پروتئین به صورت سنتتیک بود(۱۷). در یک مطالعه جداگانه در همین سال تلاش برای ساخت یک واکسن نازال از طریق خالص سازی پروتئین STxB و تلقیح آن صورت پذیرفت(۱۸). در کل مطالعات نشان می‌دهد که به خاطر وزن مولکولی پایین STxB پاسخ ایمنی ناچیزی علیه آن دیده می‌شود و این امر لزوم استفاده ادجوان به STxB را کاملاً شرح می‌دهد. از

طرفی STxB به خاطر اتصال اختصاصی اش با گیرنده Gb3 روی اکثر سلول‌های سرطانی، امروزه برای انتقال داروهای ضد سرطان به این سلول‌ها و کاهش اثرات سوء شیمی درمانی، توجه دانشمندان زیادی را به خود جلب کرده است(۱۹،۱۸).

با توجه به گزارشات محققان ایرانی مبنی بر فراوانی وقوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *شیگلا*، این باکتری می‌تواند به عنوان یک عامل ناتوان کننده مورد توجه قرار گیرد. بنابراین لازم است که سوش‌های بومی ایران به منظور تهیه واکسن، مورد مطالعه قرار گیرند(۱،۴). به صورت رایج هیچ‌گونه واکسنی برای *شیگلا* در دسترس نیست. هر چند که سلول‌های T در حفاظت علیه *شیگلا* نقش دارند اما برای ایمن شدن ضروری نیستند. داده‌های حاصل از چندین مطالعه نشان دادند که پاسخ ایمنی هومورال نقش مهم‌تری را در ایمنی علیه *شیگلا* با هر دو پاسخ سیستمیک و مخاطی علیه LPS و تعدادی از پروتئین‌های کد شده توسط پلاسمید بیماری زا، از جمله پروتئین‌های IpaD دارد.

شیگلا دیسانتری تیپ۱ هنوز هم، عمده‌ترین علت اصلی اپیدمی اسهال، در صد سال اخیر می‌باشد و نسبت مرگ ومیر آن در کشورهای جهان متفاوت است(۱،۲۰). مکانیسم بیماری زایی این باکتری شامل دو مرحله کلیدی است: مرحله اول شامل اتصال و به دنبال آن کلونیزاسیون باکتری به سطح سلول‌های اپی تلیال روده کوچک به وسیله فاکتورهای کلونیزاسیون است که باعث تورم و ایجاد زخم‌های سطحی، تجمع پلی نوکلئورها و بالاخره نکروز و خونریزی می‌گردد و به صورت بلغم و خون همراه با مدفوع دفع می‌شود. مرحله دوم که باکتری تولید شیگا توکسین می‌نماید و به سلول‌های اپیتلیال روده بزرگ حمله نموده و سبب تورم و زخم‌هایی روی دیواره روده می‌گردد که نتیجه آن اسهال خونی است. باکتری *شیگلا* با به کار گیری سیستم ترشحی نوع ۳، فاکتورهای بیماری زای خود را به سلول میزبان انتقال می‌دهد. IpaD فاکتوری است که در رأس این سیستم برای تهاجم باکتری به سلول میزبان ضروری است. IpaD یک پروتئین چند کاره است که ترشح و عرضه پروتئین‌های IpaB و IpaC را در حد فاصل سلول میزبان- باکتری و همچنین نفوذ صحیح ناقل‌های پروتئینی به داخل سلول میزبان را کنترل می‌کند. ناحیه N-ترمینال نزدیک به مرکز، در تمامی مطالعات یک ناحیه عملکردی و بسیار مهم در IpaD تلقی می‌شود. در مطالعاتی که به منظور شناسایی اپی‌توپ‌های IpaD صورت پذیرفت غالب اپی‌توپ‌های در دسترس IpaD، در این ناحیه قرار داشتند. همچنین عملکرد IpaD به عملکرد این ناحیه بستگی دارد، به نحوی که اگر فعالیت آن سرکوب گردد، به طور کلی قابلیت تهاجم *شیگلا* سرکوب می‌گردد(۷،۹).

مطالعات انجام گرفته نشان دادند که آنتی‌بادی‌هایی 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. در این حالت باکتری قادر به انجام فعالیت ویژه خود برای فراخوانی و به کارگیری IpaB نخواهد بود. در نتیجه توان *شیگلا* برای ایجاد منفذ در سلول یوکاریوتی از بین رفته و پروسه ورود باکتری به درون سلول میزبان سرکوب می‌شود. این نتایج به طور ویژه‌ای نشان می‌دهد که پروتئین IpaD و به ویژه ناحیه N– ترمینال این پروتئین یک فاکتور لازم در ورود باکتری *شیگلا* به سلول‌های میزبان است و از این رو به عنوان یک آنتی ژن بالقوه در طراحی واکسن مطرح است(۱۵).

تحقیقاتی برای ساخت واکسن علیه باکتری شیگلا دیسانتری در سال ۲۰۰۸ انجام شد که در آن گروهی از محققین نشان دادند که پلی پپتید IpaD و مشتقات عملکردی آن می‌تواند منجر به تولید آنتی‌بادی Anti-IpaD گردد. آن‌ها هم چنین با طراحی آزمایشاتی نشان دادند که قبل از به کار گیری سایر پروتئین‌های مؤثر بر روی سطح باکتری، این آنتی‌بادی با تداخل در عملکرد IpaD که در رأس سوزن قرار گرفته است، آن را بلوکه

کـرده و بـه ایـن ترتیـب مـانع انجـام عملکـرد آن مـی‌گـردد(۲۱). ایـن گـروه کـه در سـازمان WIPO (World intellectual property organization) از آن‌ها با عنوان مخترعان یاد می‌شود، در آزمایشی پس از تولید آنتی‌بادی Anti-IpaD برای تعیین صحت کار در محیط درون شیشه، یک گروه از باکتری‌های شیگلا را با آنتی‌بادی‌های Anti-IpaD و گروه دیگری از آن‌ها را با Anti-IpaB ترکیب کردند و سپس این باکتری‌ها را در مجاورت سلول‌های هلا قرار دادند. نتیجه به این ترتیب بود که باکتری‌هایی که در مجاورت Anti-IpaB قرار گرفته بودند، همچنان قابلیت تهاجم به سلولهای هلا را داشتند، در صورتی که فعالیت باکتری‌هایی که در مجاورت Anti-IpaD قرار گرفته بودند، به طور کامل بلوکه شده بود(۲۱). این موضوع با تحقیقات دیگر در این زمینه که عنوان می‌کند آنتی‌بادی علیه IpaD می‌تواند توانایی باکتری را برای تهاجم ساقط نماید، همخوانی دارد. آزمایشات در محیط in vivo نیز با استفاده از روده خرگوش (Rabbit Intestinal iliac loops) انجام شد. به این ترتیب که پس از تهیه آنتی‌بادی Anti-IpaD با روش ایمونیزه کردن خرگوش‌ها، آنتی‌بادی‌ها را در رقت‌های مختلف با باکتری شیگلا مخلوط نموده و از آن در آزمایش استفاده شد. نتایج این گونه بود که در غلظت‌های اولیه آنتی‌بادی، هیچ‌گونه ضایعه‌ای در روده ایجاد نشد. درصورتی که در آزمایش کنترل منفی که باکتری بدون حضور آنتی‌بادی درون روده خرگوش قرار گرفت، سرتاسر روده دچار ضایعه شد(۱۵).

توسعه تولید واکسن‌های جدید بر پایه آنتی ژن‌های حفاظتی خالص شده برای مدت زیادی است که به علت ایمنی زایی پایین آنتی ژن‌های محلول و نبودن ادجوانت مخاطی مؤثر و ایمن، دچار اختلال گردیده است. در این تحقیق خاصیت آنتی ژنی STxB و خاصیت ادجوانتی آن و تفکیک اثر ناحیه N- ترمینال IpaD در موش و خوکچه هندی مد نظر بوده است که بتوان در ورود باکتری به سلول‌های میزبان و برای مقابله با شیگا توکسین‌ها به طور همزمان عمل نمود. به منظور بررسی پاسخ سیستم ایمنی هومورال پروتئین نوترکیب، این پروتئین به موش و خوکچه تزریق شد و بعد از خون گیری نشان داده شد که تیترآنتی‌بادی (IgG) سرمی مناسبی تولید کرده است و این افزایش در نتایج آزمایش الایزا مشهود می‌باشد. ثابت شد که این پروتئین می‌تواند به عنوان ایمونوژن برای تحریک سیستم ایمنی هومورال و تولید آنتی‌بادی عمل نماید که افزایش در تیتر آنتی‌بادی به‌طور محسوس در خوکچه هندی بیش‌تر از موش می‌باشد. به نظر می‌رسد که این اختلاف ناشی از تفاوت وزن بین دو موجود و نیز اختلاف در میزان آنتی‌ژن دریافتی و جدا شدن آنتی‌ژن‌ها به‌وسیله عمل آنزیم‌های شبه فورین دو حیوان مورد مطالعه باشد. در هر صورت برای پاسخ‌گویی دقیق به این سؤال، آزمایشات بیش‌تر با در نظر گرفتن حیوانات بیش‌تر و نیز مقادیر آنتی‌ژنی متفاوت مورد نیاز می‌باشد. نتایج چالش نشان داد که موش‌ها و خوکچه‌های هندی ایمن شده، توانستند شیگا توکسین *E. coli O157:H7* را تحمل نمایند.

بنابراین نتیجه این تحقیق بیانگر آن است که پروتئین حاصل از امتزاج ژن‌های *ipaD* و *stxB*، می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن نوترکیب علیه *شیگلا* باشد.

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. Ranjbar R, Soltan dallal MM, Pourshafie MR, Aslani MM, Majdzadeh R. Serogroup Distribution of *Shigella* in Tehran. Iranian Journal Public Health 2004; 33(3): 32-35.

2. Clemens J, Kotloff K, Kay B. Generic protocol to estimate the burden of *shigella diarrhoea* and dysenteric mortal. WHO. Geneva: Tex Book; 1999. p. 146-151.
3. Swapan KN. Shigellosis. The Journal of Microbiology 2005; 43(2): 133-143.
4. Safaei S, Honari H, Mousavy J, Esmaeli A, Ghofrani M. Isolation, cloning and Fusion of N-terminal Region of ipa DShigella dysenteriea and Ricin toxin B Subunit. Genetics in the 3rd Millennium 2013; 10(4): 2880-2889.
5. Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig K. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. Microbial Biotechnol 2011; 4(1): 32-46.
6. De Magistris MT. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58(1): 52-67.
7. Lunelli M, Lokareddy RK, Zychlinsky A, and Kolbe M. IpaB–IpgC interaction defines binding motif for typeIII secretion translocator. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106(24): 1-6.
8. Honari H, Minaei ME, Dehghani AR. Analyzing the various Fusion for *ctxB, ipaD* and *stxB* genes of *Shigella dysenteriae* and *Vibrio cholera* by Bioinformatics tools. Genetics in the 3rd Millennium 2013; 11(2): 3070-3077.
9. Hromockyj AE, Maurelli AT. Identification of Shigella invasion genes by isolation of temperature-regulated *inv*: *lacZ* operon fusions. Infect Immun 1989; 57(10): 2963-2970.
10. Sambrook J, Rusell D. Molecular cloning: A laboratory Manual. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
11. Bollag Daniel M, Edelstein S. Protein methods. 3th ed. New York: Wiley-Liss; 1992.
12. Madanchi H, Honari H, Hesaraki H, Sayadnanesh A. Cloning and expression of stxB gene from *shigella dysenteria* type I in E. coli Rosseta DE3. Genetics in the 3rd Millennium 2012; 10(1): 2641-2647.
13. Gupta P, Singh MK, Singh Y, Gautam V, Kumar S, Kumar O, et al. Recombinant shiga toxin B subunit elicits protection against shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. Vaccine 2011; 29(45): 8094-8100.
14. Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaei S. Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein. Arak Medical University Journal (AMUJ). 2013; 16(73): 83-93
15. Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang PL, Chang HW, et al. The immunogenicity of DNA constructs co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus conjugated by GPGP linker in pigs. Vet Microbiol 2010; 146(3-4): 189-199.
16. Kurohane K, Kobayashi C, Imai Y. Facilitated production of secretory IgA against Shiga toxin B subunits by intranasal application of antigen-coated polystyrene microspheres. Microbiol Immunol 2005; 49(2): 149-154.
17. Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B, et al. Protection against Shiga toxin-producing Escherichia coli infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B. Clin Vaccine Immunol 2008; 15(2): 359-366.
18. Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga toxin B-subunit thermodynamic and Structural considerations for function and biomedical applications. Toxicon 2005; 45(4): 389-393.
19. Esmaeili A, Honari H, Hamedian M, Safaei S, Ghofrani M. Targeted cloning of GFP as a

tracker and its fusion mediated by PRARR flexible linkers to CTB-STB chimerical vaccine genes. Genetics in the 3rd Millennium 2012; 10(1): 2657-2665.

20. Ranjbar R, Haghi-Ashtiani MT, Jonaidi Jafari N, Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. Iranian J Publ Health 2009; 38(2): 134-138.

21. Stensrud KF, Adam PR, La Mar CD, Olive AJ, Lushington GH, Sudharsan R, et al. Deoxycholate Interacts with IpaD of *Shigella flexneri* in inducing the Recruitment of IpaB to the Type III Secretion Apparatus Needle Tip. The Journal of Biological Chemistry 2008; 283(27): 18646–18654.