

ارزیابی میزان ایمنی زایی آنتی ژن IpaD متصل شده به لیگاندهای Co1 و STxB به صورت نازال بر علیه باکتری *E. coli* سویه O157:H7 در موش سوری

Immunogenic evaluation of nasal administration of conjugated IpaD with Co1 and STxB ligands against *E.coli* O157: H7 in mice

مجتبی زمانی فردانیه^۱، عبدالهادی حسینزاده^۱، حسین هنری^۱، هوشنگ علیزاده^{۱*}

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،
کرج، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

Zamani Faradonbe M¹, Hosseinzade A¹, Honari H², Alizade H^{*1}

1- PhD Student, Associate Professors, Department of Agronomy and plant
Breeding, Agricultural College, university of Tehran, Karaj, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam
Hosein University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: halizade@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

باکتری شیگلا، شایع‌ترین عامل اسهال بوده و تاکنون واکسن موثری علیه آن یافت نشده است. پروتئین IpaD و زیر واحد B انتروتوکسین شیگلا (STxB) نقش مهمی در تهاجم، بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط شیگلا دارد. از طرفی، لیگاند Co1 به عنوان یکی از سیستم‌های انتقالی آنتی ژن‌ها به سلول‌های M در لایه مخاطی، شناخته شده است. برای بررسی و مقایسه میزان ایمنی‌زایی هر یک از پروتئین‌های IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 از مدل حیوانی موش سوری و روش نازال استفاده شد. توالی کدکننده این پروتئین‌ها در ناقل pET28a کلون و به درون باکتری *E. coli* BL21 (DE3) منتقل شد. بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از تکنیک لکه‌گذاری و سترن، مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتئین نو ترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی جذبی تخلیص و در چهار نوبت متوالی به موش سوری به صورت نازال داده شد. از نوبت دوم (یادآور اول) به بعد، یک هفته پس از دادن آنتی ژن، خون‌گیری انجام و سرم مورد آزمایش الایزا قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان تولید آنتی بادی IgG علیه پروتئین IpaD-STxB بیش‌ترین و پروتئین IpaD-Co1 بعد از آن قرار داشت. چالش ایمنی‌زایی این پروتئین‌ها با استفاده از سم فعال باکتری *E. coli* سویه O157:H7 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که موش‌های ایمن شده توانستند در گام اول پنج برابر LD50 شیکا توکسین *E. coli* O157:H7 را تحمل نمایند؛ اما با تزریق ۱۰ برابری LD50، پس از ۲۴ ساعت موش‌های ایمن شده با IpaD و IpaD-Co1 و پس از ۷۲ ساعت موش‌های ایمن شده با IpaD-STxB از بین رفتند. بر طبق نتایج مشخص شد که پروتئین IpaD-STxB در قیاس با فیوژن IpaD-Co1 قدرت ایمنی‌زایی بیش‌تری در موش سوری نسبت به شیکا توکسین دارد.

واژه‌های کلیدی

سلول‌های M

نازال

IpaD-Co1

IpaD-STxB

مقدمه

شیگلوز آلودگی روده‌ای می‌باشد که علائم آن می‌تواند از اسهال خفیف تا دیستری حاد و گرفتگی عضلات شکمی، تب و وجود خون و بلغم در مدفوع همراه باشد (Schroeder and Hilbi, 2008). بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۲ حدود ۱/۵ میلیون مورد مرگ در سراسر جهان به واسطه انواع شیگلوز گزارش شده است (The et al. 2016). باکتری گرم منفی شیگلا (*shigella*) عامل بیماری شیگلوز، در سال ۱۸۹۸ توسط کیوشی شیگا در ژاپن جداسازی و نام‌گذاری شد. مهم‌ترین شیگلایهایی که در سال‌های بعد بر اساس بیماری‌زایی و بروز اپیدمی‌ها، شناسایی شدند در چهار سروتیپ بودند که بر اساس پلی ساکارید اختصاصی O لیپولی ساکارید طبقه‌بندی می‌شوند و به نام‌های شیگلا دیسانتری (*S.dysenteria*)، شیگلا سونئی (*S.sonnei*)، شیگلا فلکسنری (*S.flexneri*) و شیگلا بویدی (*S.boydii*) که عامل اسهال خونی است، نام‌گذاری شدند (Kahsay and Muthupandian 2016). مکانیسم بیماری‌زایی این باکتری شامل دو مرحله کلیدی است. در مرحله اول اتصال باکتری و تکثیر آن در سطح سلول‌های اپی تلیال روده کوچک صورت می‌گیرد. این امر باعث تورم و ایجاد زخم‌های سطحی، تجمع گرانولوسیت‌ها در ناحیه آلودگی و بالاخره مرگ سلول‌های آلوده شده و خون‌ریزی می‌شود. در مرحله دوم باکتری تولید شیگا توکسین کرده و به سلول‌های اپیتلیال روده بزرگ حمله و سبب تورم و زخم‌هایی روی دیواره روده می‌شود که نتیجه آن اسهال خونی است. پروتئین Invasion plasmid antigen (IpaD) به همراه بقیه Ipaها کمپلکس ترشح پروتئین نوع III را در این باکتری به وجود می‌آورد. این کمپلکس در اتصال به سلول میزبان و ایجاد مجرای ورودی پروتئین‌های باکتری به درون سلول میزبان، نقش ایفا می‌کند (Martinez et al. 2012). ناحیه N-ترمینال IpaD که در ورود باکتری به سلول‌های میزبان نقش دارد، به عنوان کاندیدای واکسن مورد توجه محققین می‌باشد. شیگا توکسین‌ها (STxs) گروهی از پروتئین‌های سمی AB5 باکتریایی هستند که حدود ۷۰ کیلو دالتون وزن داشته و در سلول‌های یوکاریوتی حساس، موجب ممانعت سنتز پروتئین می‌شوند. زیر واحد A این توکسین‌ها باعث حذف یک آدنین از مولکول 28S

rRNA در زیر واحد 60s ریبوزوم و در نتیجه باعث بلوکه شدن سنتز پروتئین می‌شود. ساختار پپتامر زیر واحدهای B این توکسین‌ها به گیرنده سلولی globotriaosylceramide (Gb3) در سطح سلول متصل می‌شود (Melton-Celsa AR. 2014). اتصال زیر واحد B شیگا توکسین به آنتی ژن در تحقیقات زیادی منجر به موفقیت شده است (Batisse et al. 2015).

واکسیناسیون را می‌توان مهم‌ترین روش مؤثر در مبارزه با بیماری‌های واگیردار و عفونی دانست. لایه مخاطی به دلیل رویارویی با حجم بالایی از عوامل بیماری‌زا و میکروب‌ها، در خط مقدم مقابله با این عوامل می‌باشد، همین امر باعث شده است که واکسیناسیون این ناحیه از بدن، به عنوان یک هدف ایده‌آل مطرح شود. از طرفی واکسیناسیون از طریق لایه مخاطی می‌تواند در قیاس با سیستم‌های رایج تزریق، علاوه بر تحریک سیستم دفاعی بدن، سیستم دفاع مخاطی را نیز تحریک کند. از طرفی تزریق با سرنگ واکسن دارای معایب و خطراتی می‌باشد. از جمله این خطرات انتقال آلودگی از بیمار به کادر مراقبتی بیماران در اثر فرورفتن سوزن به صورت ناخواسته به بدن پرستاران و دیگر کادر مراقبتی را می‌توان نام برد. به همین دلیل امروزه بر انواع روش‌های رساندن واکسن به بدن بر پایه لایه مخاطی توجه فراوان می‌شود. این روش‌ها شامل به کارگیری خوراکی، نازال (دماغی)، چشمی، ریوی، واژینال و رکتال می‌باشند (Karande and Mitragotri. 2010). نمونه‌های موفق فراوانی از کاربرد خوراکی واکسن‌ها و یا نازال در حال حاضر وجود دارد. باکتری عامل بیماری و *Vibrio cholera* به صورت باکتری کشته شده به صورت خوراکی و با نام تجاری Dukoral و Shanchol در دسترس بوده و استفاده می‌شود. از دیگر نمونه‌های موفق واکسن‌های خوراکی، واکسن تیفوئید (عامل بیماری *Salmonella typhi*) با نام تجاری Vivotif را می‌توان نام برد. روتاویروس و پولیوویروس دو عامل بیماری دیگر هستند که بر ضد آن‌ها واکسن خوراکی معرفی شده است. FluMist و Nasovac دو داروی مؤثر معرفی شده برای بیماری آنفولانزا می‌باشند که به صورت نازال مورد استفاده قرار می‌گیرند (Azegami et al. 2014). از میان واکسن‌های مخاطی موجود، سیستم واکسیناسیون خوراکی به دلیل سهولت و هزینه

سازه‌ها در سیستم باکتریایی BL 21(DE3) و مقایسه میزان کارایی ادجوانت‌های STxB و Co1 در تحریک سیستم دفاعی مخاطی با روش نازال (دماغی) بوده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه کاست ژنی IpaD-STxB که در ناقل pET28a کلون شده بود از دانشگاه امام حسین(ع) تهیه شد. در انتهای ۵ پریم این کاست ژنی نوکلئوتیدهای ۱۶۳ تا ۴۸۳ IpaD با شماره دسترسی GQ201921.1 (یعنی ناحیه N ترمینال توالی کامل با طول ۳۲۱ نوکلئوتید، و سپس لینکر فورینی (RARR) و در سمت ۳ پریم هم ۲۰۷ نوکلئوتید از توالی STxB قرار دارد. برای الحاق قطعه ۳۶ نوکلئوتیدی Co1 (Kim et al. 2010) به انتهای -C ترمینال IpaD، این توالی به صورت انتهای آویزان در آغازگر پیرو اضافه و سنتز شد (شرکت سیناکلون، جدول ۱). برای ساخت سازه مربوط به IpaD (بدون لیگاند) نیز از پرایمرهای پیرو و پیشره موجود در جدول ۱ استفاده شد. سایت‌های برشی EcoRI و XhoI به ترتیب بر روی پرایمرهای پیشره و پیرو اضافه شدند. این PCR قطعات با آنزیم Pfu (شرکت توپاز ژن کاوش) و واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو (پلاسمید pET28a حاوی قطعه سنتزی IpaD-STxB)، ۰/۴ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، یک واحد آنزیم (Pfu DNA polymerase) و ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه، ۳۲ چرخه شامل ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بود. قطعات حاصل از PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و باندهای مربوطه جداسازی و به روش Glass milk (شرکت sigma به شماره کد S5631) طبق پروتکل شرکت تخلیص شدند. پس از تخلیص به کمک آنزیم Taq و در حضور dATP قطعات آدین‌دار شده و بر روی ژل ران و قطعات مربوطه جدا و به روش Glassmilk تخلیص شدند. اتصال قطعات تخلیص شده به تی- وکتور pTG19

پایین‌تر نسبت به بقیه سیستم‌های واکسیناسیون، جذاب‌تر است. اما در این روش هم به دلیل میزان زیاد القاء مقاومت بر ضد آنتی ژن خوراکی و نیز کم بودن جذب این آنتی ژن‌ها به درون لنف سطوح مخاطی، میزان تحریک پاسخ ایمنی معمولاً ضعیف می‌باشد (Kim et al. 2012). سطح داخلی لوله گوارش انسان، همواره با عوامل بیماری‌زا در تقابل است. لذا ساختار اختصاصی برای مقابله با این عوامل در این ناحیه ایجاد شده که gut-associated lymphoid tissue (GALT) نامیده می‌شود. در بین سلول‌های لایه مخاطی GALT، حدود ۵ تا ۱۰ درصد سلول‌ها به صورت تخصص یافته برای جذب آنتی ژن‌ها به لنف و تحریک سیستم ایمنی مخاطی به کار می‌روند. این سلول‌ها را M-cell می‌نامند. این سلول‌های تخصص یافته دارای لیزوزیم کمتر بوده و به همین خاطر می‌توانند آنتی ژن را بدون تجزیه کردن به سیستم لنفاوی منتقل کنند. وجود این ویژگی‌ها باعث شده است تا این سلول‌ها به عنوان کاندید مناسب برای جذب واکسن‌های خوراکی، مطرح شده و امروزه بیش‌ترین تمرکز تحقیقاتی بر روی آن‌ها می‌باشد (Ohno 2016). اما همان طور که ذکر شد، با وجود جذب آنتی ژن‌های کوچکی مانند IpaD، پاسخ ایمنی ضعیفی دیده می‌شود که این امر استفاده از لیگاندهای ادجوانتی را ضروری می‌کند. به کارگیری آنتی ژن حفاظتی خالص شده مانند IpaD به عنوان واکسن، به علت ایمنی‌زایی پایین آنتی ژن‌های محلول و نبودن ادجوانت مخاطی موثر و ایمن، دچار اختلال شده است. برای برطرف کردن این نقص و بالا بردن خاصیت آنتی ژنی، آن را با ادجوانت همراه می‌کنند.

در راستای تهیه ادجوانت مناسب برای انتقال دارو به صورت خوراکی و از طریق سلول‌های M در اپیتلیال روده و بافت‌های مخاطی (Kim et al. 2010) به کمک روش نمایش فاژی موفق به معرفی پپتید کوتاه Co1 به عنوان لیگاندی کارا برای انتقال مولکول‌های متصل شده به آن به سلول‌های شبه M-Cell در محیط کشت آزمایشگاهی شدند (Kim et al. 2010). بر اساس نتایج تحقیقات متعدد در سال‌های اخیر، STxB به صورت موفقیت آمیزی در انتقال دارو و آنتی ژن فیوژ شده با آن، به صورت نازال و یا گاوژ استفاده شده است (Honari et al. 2013). لذا هدف از انجام این تحقیق، بررسی میزان و امکان بیان هر یک از این

میلی مولار $\text{pH}=7.4 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ بر روی ژل پلی اکریلامید ۱۰ درصد برده شد (Daniel 1992; Sambrook and Russell 2001). غلظت پروتئین کل استخراج شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد انجام شد. تخلیص پروتئین های نو ترکیب حاصل تحت شرایط واسرشت شده و با استفاده از ستون Ni-NTA آگارز شرکت کیاژن و طبق پروتکل شرکت انجام شد. برای تایید بیان و وجود ۳ پروتئین نو ترکیب مورد نظر از تکنیک ایمنوبلات با آنتی بادی ضد IpaD استفاده شد. پروتئین کل استخراج شده با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن Mini Protean ساخت شرکت Bio-rad و با بافر انتقال (گلیسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، ۰/۱ درصد SDS و متانول ۲۰ درصد با $\text{pH}=8.5$) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. جهت بلاک کردن کاغذ نیتروسولوزی، از بافر PBS-T (PBS به همراه ۵۰ میکرو لیتر پروتئین ۲۰ در ۱۰۰ میلی لیتر) به همراه ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد، استفاده شد. سپس نمونه به مدت ۱ ساعت با آنتی بادی اختصاصی با رقت ۱/۴۰۰ در بافر PBS-T در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت کاغذ وسترن با HRP کانزوگه موشی به غلظت ۱/۲۵۰۰ در PBS-T پوشانده شده و پس از یک ساعت، برای آشکار شدن باند پروتئین از سوبسترای DAB (۵۰ میلی مولار بافر Tris با $\text{pH}=7.8$ حاوی ۶ میلی گرم DAB و ۱۰ میکرو لیتر H_2O_2) استفاده شد. پس از ظاهر شدن باند، واکنش با H_2O متوقف شد (Daniel 1992; Madanchi et al. 2012; Tonello et al. 1999).

(TA010) شرکت Vivantis و طبق دستورالعمل شرکت صورت گرفت. آنزیم T4 لیگاز شرکت فرمتاز جهت اتصال قطعات به پلاسمید به کار رفت. واکنش اتصال به سلول های مستعد *E.coli* سویه DH5 α انتقال یافت. کلون های حاصل، کشت شبانه و سپس به روش لیز قلیایی پلاسمید استخراج و چک کردن پلاسمیدها به کمک هضم آنزیمی با BamHI و PCR انجام شد (Sambrook and Russell 2001). در نهایت دو سازه حاصل برای توالی یابی ارسال شد. سازه های تایید شده به سویه *E.coli* BL21 DE3 منتقل شد. از کشت شبانه کلون های حاصل در محیط LB مایع در دمای ۳۷ درجه، به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق سازی انجام شد و رشد باکتری رقیق شده تا رسیدن به OD=0.6 در ۶۰۰ نانومتر ادامه یافت. علاوه بر ۳ سازه مورد نظر، سویه ترانسفرم نشده نیز به عنوان کنترل منفی کشت شد. پس از رسیدن به غلظت مورد نظر، IPTG (شرکت سیناکلون) به غلظت ۰/۸ میلی مولار به محیط کشت LB اضافه شد. پس از ۴ ساعت رسوب دهی باکتری و استخراج پروتئین با بافر اوره و PBS انجام شد. از باکتری های رقیق شده قبل از القاء نیز نمونه گیری شد (Daniel 1992; Sambrook and Russell 2001). پس از القاء تولید پروتئین در سویه BL21 (DE3) ترانسفرم شده با هر کدام از ۳ سازه مورد ارزیابی، پروتئین کل به روش استخراج شد. پروتئین کل بوسیله بافر اوره با انکوباسیون در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه و در بافر PBS با کمک امواج فراصوت، استخراج شد. پروتئین حاصل از استخراج هر یک از سازه ها در دو زمان قبل و بعد از القا با IPTG و دو حالت استخراج با اوره و PBS (۱۳۷ میلی مولار NaCl، ۲/۷ میلی مولار KCl، ۱۰ میلی مولار Na_2HPO_4 و ۱/۸

جدول ۱- توالی آغازگرهای مربوط برای تکثیر و جداسازی IpaD و اتصال Co1 به IpaD. توالی *XhoI* بر روی پرایمر پیرو و توالی *EcoRI* بر روی پرایمر پیشرو قرار گرفته است.

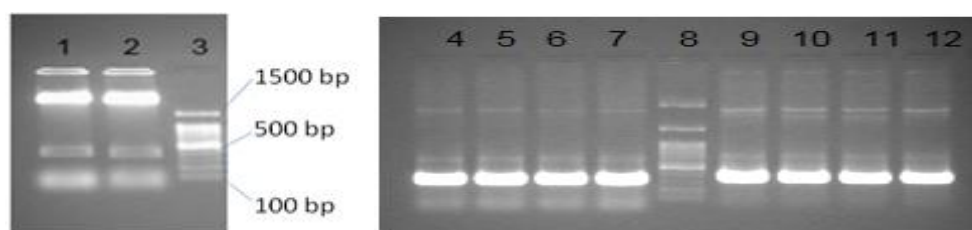
ردیف	نام آغازگر	توالی
۱	R-Ipcol	AAACTCGAGATTACGGCAGAGGCGACCGCGCCGCGCAGCTGATGAAACGAACGACGAGCACGG GTGTAAGAAGACACCGCGTGC
۲	Ipad-R	AACTCGAGGGTGTGAAGAAGACACCGCGTGCTC
۳	Ipad-F	AAGAATTCCGTACCACCAACCAGGCGCTG

رسم نمودارها توسط نرم افزارهای SAS 9.1.3 و Excel 2007 انجام شد.

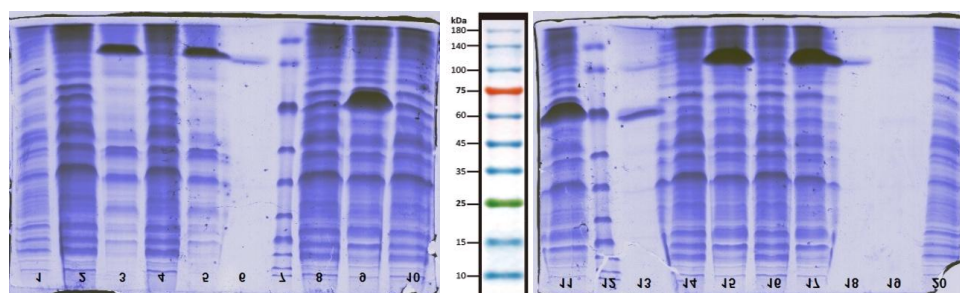
نتایج

شکل ۱ نشان دهنده محصول واکنش PCR جهت تکثیر IpaD و co1 با آنزیم *pfu* در دمای ۶۰ درجه و قطعات حاصل بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد می باشد. با توجه به این شکل، قطعات ۳۲۱ نوکلئوتیدی مربوط به IpaD و ۳۶۹ نوکلئوتیدی IpaD-Co1 تکثیر شدند. تایید وجود قطعات یاد شده در ناقل pET28a نیز در این شکل آورده شده است. قطعات با آنزیم های *EcoRI*, *XhoI* تی و کتور به ناقل نهایی منتقل و سپس تایید شد. نتایج توالی یابی قطعه IpaD-Co1 و IpaD توالی مورد انتظار (توالی IpaD موجود بر روی پلاسمید pET28a دریافتی از دانشگاه امام حسین (ع) و توالی Co1 برگرفته از مقاله Kim et al. 2010) به وسیله برنامه برخط CLUSTAL.W مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده تطابق کامل این توالی ها با یکدیگر بود.

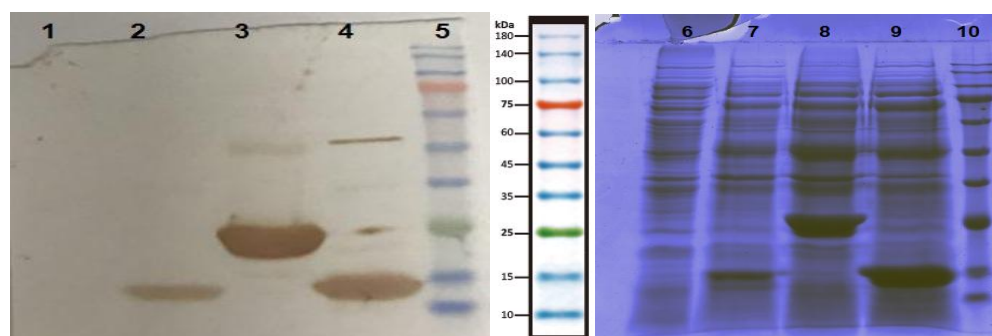
تصاویر ژل ها نشان داد که در سویه BL21 و با ناقل pET28a به عنوان وکتور بیانی، قبل از اضافه نمودن IPTG به محیط کشت باکتری، بیان پروتئین هدف به میزان قابل تشخیص بر روی ژل را در هیچ یک از سازه های IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 نشان ندادند. و به عبارت دیگر نشت پروموتوری قابل تشخیص برای این پروتئین ها مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱- نتایج هضم آنزیمی پلاسمید pET28a حاوی قطعات IpaD و IpaD-Co1 و قطعات تکثیر شده آن ها با PCR توسط آنزیم *pfu* پلیمرز، بر روی ژل آگارز: هضم آنزیمی *EcoRI*, *XhoI* سازه pET28a حاوی قطعات IpaD-co1 (چاهک ۱) و IpaD (چاهک ۲) و چاهک شماره ۳ سایز مارکر SL7031 (شرکت سیناکلون). تکثیر IpaD و IpaD-Co1 توسط آنزیم *pfu* پلیمرز در دمای ۶۰ درجه جهت اتصال پرایمرها. ۴ چاهک از شماره ۴ تا ۷ مربوط به IpaD، سایز مارکر SL7031 (شرکت سیناکلون) در چاهک شماره ۸، ۴ چاهک از شماره ۹ تا ۱۲ مربوط به IpaD-Co1.



شکل ۲- تصویر مربوط به ژل SDS-PAGE نمونه‌های پروتئینی استخراج شده از باکتری‌های BL واجد پلاسمید: چاهک شماره ۱ پروتئین کل باکتری BL21(DE3) بدون سازه، استخراج شده با بافر اوره، چاهک‌های شماره ۲ و ۴ پروتئین کل باکتری واجد پلاسمید pET28a حاوی قطعه IpaD-Co1 قبل از القاء با IPTG و به ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS، چاهک‌های شماره ۳ و ۵ پروتئین کل همان باکتری ۵ ساعت پس از القاء با IPTG و به ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS. ستون ۶ مربوط به پروتئین خالص شده IpaD-Co1 با ستون Ni-NTA؛ ستون ۷ سایز مارکر پروتئینی PM2500 (شرکت SMOBIO). ستون‌های ۸ و ۱۰ پروتئین کل باکتری واجد پلاسمید pET28a حاوی قطعه IpaD-STxB قبل از القاء با IPTG و به ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS، چاهک‌های شماره ۹ و ۱۱ پروتئین کل همان باکتری ۵ ساعت پس از القاء با IPTG و به ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS. چاهک شماره ۱۲ سایز مارکر پروتئینی، چاهک شماره ۱۳ پروتئین خالص شده IpaD-STxB با ستون Ni-NTA. ستون‌های ۱۴ و ۱۶ پروتئین کل باکتری دارای پلاسمید pET28a حاوی قطعه IpaD قبل از القاء با IPTG و به ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS. چاهک‌های شماره ۱۵ و ۱۷ پروتئین کل همان باکتری ۵ ساعت پس از القاء با IPTG و به ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS. چاهک شماره ۱۸ پروتئین خالص IpaD. چاهک شماره ۱۹ پروتئین BL21 (DE3) بدون سازه که از ستون Ni-NTA عبور داده شده است. و چاهک ۲۰ پروتئین کل باکتری BL21 (DE3) بدون سازه، استخراج شده با بافر PBS. میزان ۲۰ میکرولیتر (با غلظت حدود ۱۰ تا ۱۲ میکروگرم در میکرولیتر) از پروتئین در هر چاهک بارگذاری شده است.

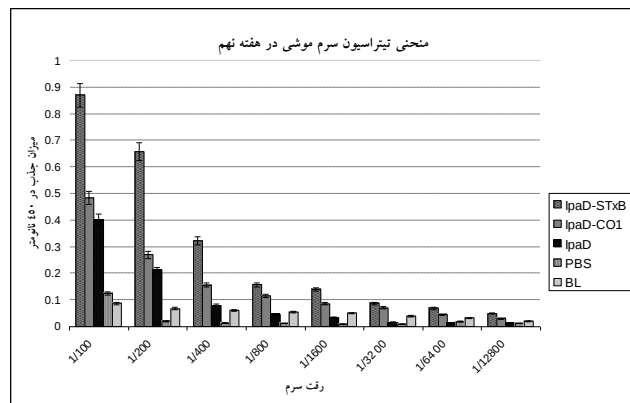


شکل ۳- تصویر کاغذ وستر (سمت چپ) مربوط به پروتئین‌های IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 و ژل کوماسی همین نمونه‌ها (سمت راست): چاهک شماره ۱ مربوط به پروتئین کل باکتری BL21 (DE3) بدون پلاسمید، چاهک شماره ۲ حاوی پروتئین کل باکتری حاوی پلاسمید کدکننده IpaD، چاهک شماره ۳ مربوط به پروتئین باکتری حاوی پلاسمید کدکننده IpaD-STxB، چاهک شماره ۴ مربوط به پروتئین کل باکتری حاوی پلاسمید pET28a کد کتنده IpaD-Co1 و چاهک ۵ سایز مارکر پروتئینی. تصویر سمت چپ به ترتیب از چاهک شماره ۶ تا ۱۰ تکرار نمونه‌های مربوط به وسترن بلاتینگ.

۲۲,۱۶ کیلودالتون محاسبه شد. نتایج حاصل از ژل‌های اکرلامید سایز مورد انتظار پروتئین‌های بیان شده را نشان می‌دهد. پس از نمونه‌گیری و جداسازی سرم خون موش‌ها، تیتراسیون سرم حاصل با روش الایزای غیر مستقیم صورت گرفت. رقت ۱ به ۱۰۰ در همه زمان‌ها بیش‌ترین جذب را در ۴۵۰ نانومتر به خود اختصاص داده و در ادامه تیتراسیون روند نزولی یکنواخت بین تمامی تیمارهای پروتئینی مشاهده شد. از آنجایی که چالش موش‌ها پس از خون‌گیری چهارم (هفته نهم) صورت پذیرفت،

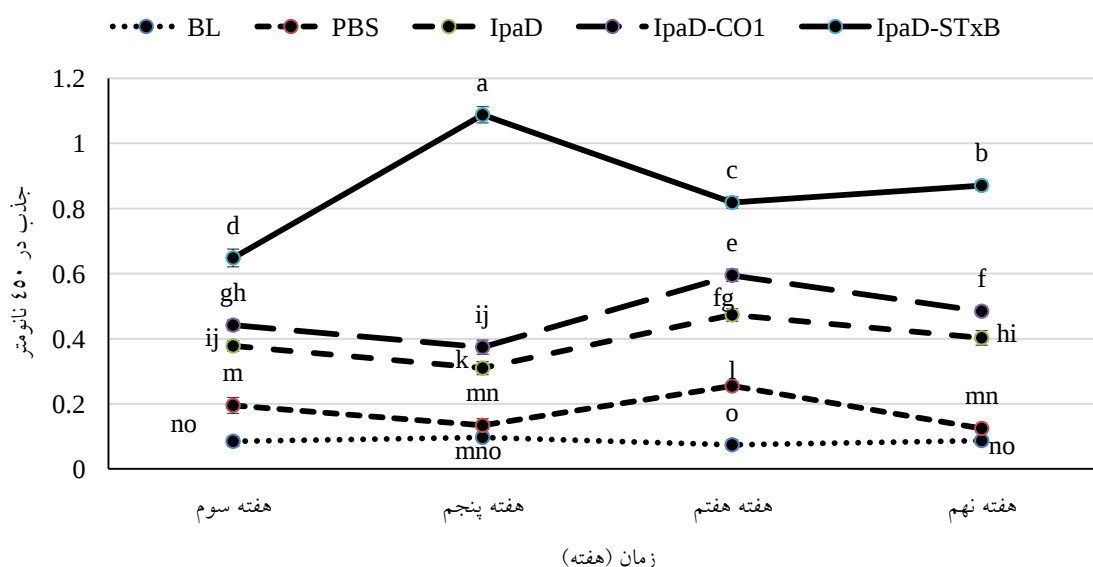
واسترن بلاتینگ ۳ پروتئین مورد نظر به همراه پروتئین BL21(DE3) بدون پلاسمید انجام شد. شکل ۳ نتیجه رنگ‌آمیزی کاغذ وستر را نشان می‌دهد که تایید کننده توالی صحیح این پروتئین‌ها و فعال بودن آن‌ها در برهم‌کنش با آنتی ژن می‌باشد. با توجه به طول مربوط به هر یک از قطعات، وزن مولکولی پروتئین IpaD به صورت *in silico* در حدود ۱۲,۶۵ کیلودالتون و IpaD-Co1 در حدود ۱۴,۴۵ کیلودالتون و IpaD-STxB در حدود

موش‌ها، تیتراژ آنتی بادی در IpaD-Co1 نسبت به هفته سوم افزایش مختصری را نشان می‌دهد اما در این زمان موش‌های تیمار شده با IpaD نسبت به هفته سوم تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد.



شکل ۴- نمودار ستونی تیتراسیون IgG سرم گروه‌های تیماری موشی در هفته نهم پس از شروع دادن پروتئین‌های IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 به صورت نازال.

نمونه تیتراسیون مربوط به این زمان آورده شده است (شکل ۴). نتایج مقایسات میانگین و تجزیه آماری در رقت ۱/۱۰۰ سرم، نشان داد که سطح آنتی بادی موشی بر ضد پروتئین‌های تزریق شده تفاوت معنی‌داری را در زمان‌های مختلف و بین ۳ نوع پروتئین IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 را داراست. برطبق این نتایج بیش‌ترین سطح آنتی بادی مربوط به هفته پنجم و مربوط به تیمار پروتئینی IpaD-STxB بوده و در کل تیتراژ آنتی بادی این ترکیب پروتئینی در تمام زمان‌های نمونه‌گیری از بقیه تیمارها به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است. در مورد این پروتئین در طی ۹ هفته نمونه‌گیری بعد از هفته سوم از تاریخ شروع تزریق روند تولید آنتی بادی افزایشی بوده است با این تفاوت که بین هفته سوم تا هفتم یک روند افزایش شدید و سپس کاهش دیده می‌شود اما در کل در زمان چالش موش‌ها با سم باکتریایی، میزان آنتی بادی افزایش داشته است (شکل ۵). اما در مورد دو پروتئین IpaD-Co1 و IpaD روند تا هفته هفتم به‌صورت مشابه بوده و با یک افت و سپس افزایش آنتی بادی همراه بوده است. در زمان اعمال چالش



شکل ۵- نمودار مربوط به تیتراسیون سرم گرفته شده از موش‌های تیمار شده با پروتئین‌های خالص IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1. زمان برحسب هفته نسبت به زمان شروع تیمار موش‌ها با آنتی ژن می‌باشد. منحنی مربوط به PBS تیتراژ آنتی بادی ضد IpaD در گروه موش‌هایی است که به جای دریافت پروتئین، فقط PBS به صورت نازال بر آن‌ها اعمال شده است. در تیمار BL نیز پروتئین باکتری BL21 (DE3) بدون سازه از ستون نیکل عبور داده شده و در هر یادآور به موش‌ها داده شد.



شکل ۶- بالاسمت چپ: تصویری از موش‌ها قبل از چالش با شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 در هفته نهم. بالا سمت راست: خونگیری از موش‌ها به کمک پیت پاستور از چشم موش. پایین تصویر: پنج گروه تیماری موش‌ها پس از اتمام چالش با شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 در روز ۱۴ پس از شروع چالش که تمام گروه‌های تیماری موش‌ها با ۱۰ برابر دوز LD50 شیگا توکسین از بین رفتند.

نتایج چالش موشی نشان داد که موش‌های ایمن شده توانستند در گام اول ۵ برابر LD50 شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 را به مدت ۱۰ روز تحمل نمایند؛ موش‌های شاهد (گروه PBS و گروه BL) با این میزان از سم کاملاً از بین رفته و در ۲۴ ساعت اول مردند. به موش‌های زنده مانده پس از ۱۰ روز، میزان ۱۰ برابری LD50 تزریق شد. پس از ۲۴ ساعت موش‌های ایمن شده با IpaD و IpaD-Co1 و پس از ۷۲ ساعت موش‌های ایمن شده IpaD-STxB از بین رفتند.

(Honari et al. 2013). از طرف دیگر در سال ۲۰۰۵ در تحقیقی بر روی STxB نشان داده شد که این پروتئین قادر است تحریک سیستم ایمنی را موجب شده و تقویت نسبی سیستم ایمنی را بر ضد باکتری شیگلا نشان داد (Kurohane et al. 2005). همچنین در سال ۲۰۰۸ تلاشی برای استفاده از پروتئین خالص STxB که در باکتری کلون و بیان شده بود صورت گرفت (Zhu et al. 2008). امروزه از STxB به خاطر میل ترکیبی با گیرنده Gb3 در انتقال دارو به سلول‌های خاص مانند سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. اما براساس مطالعات صورت گرفته این پروتئین به دلیل وزن کم، به تنهایی قادر به تحریک شدید سیستم ایمنی نمی‌باشد (Honari et al. 2013). در سال‌های اخیر به منظور ایجاد واکسن مناسب برای شیگلا پروتئین شایمیریک IpaD-STxB و نیز پروتئین STxB تولید شده و به عنوان واکسن خوراکی و همچنین تزریق مورد استفاده و مطالعه قرار گرفته است. (2016) Baranvand and Honari ۴۰ میکروگرم برای هر سر موش در روش خوراکی و نیز ۲۰ میکروگرم در روش تزریقی در نوبت اول به کار بردند. در یادآورهای بعدی مقادیر پروتئین مصرفی کاهش داده شد. اما در تحقیق حاضر تمام یادآورها با میزان ۴۰ میکروگرم و به صورت نازال به مصرف موش‌ها رسید. نتایج تحقیق حاضر با نتایج این تحقیق مشابهت داشته و در هر دو تحقیق فیوژن IpaD-STxB از دیگر تیمارها تیر آنتی بادی

بحث

تحقیقات زیادی برای یافتن واکسن موثر بر ضد شیگلوز تا به امروز انجام شده است. در سال ۲۰۰۵ در طی تحقیقی که توسط Picking و همکاران صورت گرفت برنقش کلیدی IpaD در حمله باکتری شیگلا به سلول میزبان، ایجاد منفذ ورودی برای انتقال عوامل بیماری‌زا به سلول میزبان و بیماری‌زایی توسط باکتری تاکید شده و این گروه ثابت کردند ناحیه N-ترمینال پروتئین IpaD نقش کلیدی در این فرآیندها بر عهده دارد (Picking et al. 2005). به همین دلیل بعد از آن به این پروتئین برای تولید واکسن کارا بر ضد شیگلا اهمیت زیادی داده شده است. اما مشکلی که این ناحیه از این پروتئین برای سنتز واکسن مناسب برای مبارزه با شیگلوز دارد ایمنی‌زایی پایین و تحریک کم سیستم ایمنی می‌باشد

بیش‌تری را ایجاد کرد. در مطالعه انجام شده توسط این محققین نتایج چالش موشی نیز همانند تحقیق حاضر بوده و گروه IpaD-STxB کیتوزان خوراکی با اعمال ۱۰ برابر LD50 پس از ۷۲ ساعت مردند اما گروه تزریقی موش‌ها با این پروتئین تا ۵۰ روز بعد از چالش موش‌ها با شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 زنده ماندند. تیتراژ آنتی بادی در روش تزریقی نیز به شدت بالاتر از روش خوراکی بود (Baranvand and Honari 2016). در سال ۲۰۱۳ هنری و همکاران توالی پروتئین IpaD-STxB را در پلاسمید pET28a کلون ودر باکتری BL21 (DE3) تولید کردند. نتایج SDS-PAGE در این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت داشته و پروتئین با حدود وزن ۲۴ کیلودالتون را مشاهده کرده و با تکنیک وسترن بلاتینگ وجود پروتئین را اثبات کردند. هنری و همکاران پروتئین خالص شده حاصل را به همراه ادجوانت فروند و به میزان ۲۵ میکروگرم به هر خوکچه هندی تزریق و تیتراژ آنتی بادی را در زمان‌های مختلف انجام دادند. نتایج مطالعه حاضر با نتایج آن‌ها همخوانی دارد چالش خوکچه‌ها با شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 (تزریق سم) و باکتری شیگلا فلکسنری تیپ ۱ (آلوده کردن چشم) صورت گرفت نتایج نشان‌دهنده این بود که خوکچه‌های ایمن شده تا ۲۸ برابر LD50 را تحمل کردند. منحنی تیتراسیون IgG در خوکچه هندی میزان بسیار بالاتری را نسبت به حالت مصرف نازال در تحقیق حاضر نشان داد (Honari et al. 2013). یکی از دلایل این امر هم ورود حجم بالای آنتی ژن در روش تزریقی نسبت به خوراکی و نازال می‌باشد. استفاده از لیگاند Co1 با هدف افزایش جذب آنتی ژن توسط سلول‌های M سطوح مخاطی در تحقیق حاضر وارد شد تا مقایسه‌ای بین سیستم مبتنی بر STxB و این لیگاند جدید صورت پذیرد. لیگاند Co1 با گیرنده C5aR در سطح سلول‌های M در موش و سلول‌های شبه M در انسان برهم کنش کرده و موجب جذب آنتی ژن فیوژ شده با آن و تحریک سیستمیک و مخاطی سیستم ایمنی می‌شود (Kim et al. 2012). اولین مورد پس از معرفی Co1 به عنوان لیگاند جهت انتقال پروتئین فیوژ شده به بدن در سال ۲۰۱۳ و برای Dengue virus (DENV) صورت گرفت نتایج این تحقیق نشان داد که تیتراژ IgG در بدن موش به طور معنی‌داری افزایش داشته است (Kim et al. 2013). در تحقیق

حاضر نیز افزایش سطح تیتراژ آنتی بادی IpaD-Co1 نسبت به شاهد دیده می‌شود. اما این افزایش در قیاس با IpaD-STxB بسیار کمتر می‌باشد. دلایل احتمالی عملکرد بهتر STxB نسبت به Co1 در تحقیق حاضر را می‌توان در دو مورد بیان نمود. اولین مورد ماهیت آنتی ژنیک بودن STxB می‌باشد (Zhu et al. 2008). آنالیز اپی‌توپ‌های IpaD-STxB و IpaD-Co1 نشان داد که در پروتئین فیوژن IpaD-STxB ۲ توالی اپی‌توپیک با امتیاز بالا وجود دارد (sysbio.unl.edu/SVMTriP). اسید آمینه ۱۵۸ تا ۱۷۷ (توالی QSLLSAQITGMTVTIKTNA) مربوط به STxB و گروه دیگر در موقعیت ۲۵ تا ۴۴ و با توالی ALHSSQISMDVKNKSAQLLDI قرار دارد. اما آنالیز اپی‌توپ‌های پروتئین IpaD-Co1 تنها اپی‌توپ موقعیت ۲۵ تا ۴۴ را نشان می‌دهد که متعلق به ناحیه IpaD می‌باشد. دومین دلیل احتمالی نیز می‌تواند مربوط به فراوانی سلول‌های M در مخاط باشد که سلول‌های هدف Co1 هستند. حدود ۱۰ درصد سلول‌های اپیتلیال روده در موش M-Cell هستند. اما تمام سلول‌های مخاطی می‌توانند هدف ساختار پتامری STxB و در نتیجه انتقال آنتی ژن هدف به درون لنف باشند. به طور کلی با وجود اینکه تعداد معدودی گزارش از کارایی مناسب لیگاند Co1 در انتقال آنتی ژن فیوژ شده به صورت خوراکی به بدن موش وجود دارد، اما در این تحقیق فیوژن IpaD-STxB نسبت به فیوژن IpaD-Co1 کارایی بهتری در تحریک سیستم ایمنی و ایجاد مقاومت به شیگا توکسین را نشان داد.

نتیجه گیری کلی

واکسیناسیون به عنوان مهمترین روش در مبارزه با عوامل بیماری‌زای عفونی در انسان مطرح می‌باشد. اما رساندن دارو و محتویات واکسن با روش تزریق از پوست معایب و خطرات مختص به خود را داراست. انواع روش‌های واکسیناسیون مخاطی امروزه مورد توجه پژوهشگران قرار دارد. اما یکی از معایب این روش‌ها عدم تحریک شدید سیستم ایمنی با این روش‌ها می‌باشد. برای غلبه بر این مشکل از ادجوانت‌ها کمک گرفته شده‌است. در این تحقیق ادجوانت STxB که از شیگا توکسین باکتری شیگلا جداسازی شده‌است با ادجوانت Co1 که در سال‌های اخیر معرفی شده‌است به آنتی ژن IpaD فیوژ شد تا میزان موفقیت هر یک از

نشان داد. انجام تحقیقات دیگر در آینده با کمک سایر روش‌های مبتنی بر واکسیناسیون مخاطی ممکن است پاسخ‌های مناسب‌تری را در مورد ادجوانت‌های STxB و Co1 نشان داده و گامی روبه جلو برای ساخت واکسن مناسب برای بیماری شیگلا در آینده را موجب شود.

این ادجوانت‌ها برای تحریک سیستم ایمنی به روش نازال مورد بررسی قرار گیرد. به‌طور کلی برتری STxB نسبت به Co1 در تحریک سیستم ایمنی بر ضد شیگا توکسین در موش‌های تیمار شده، با تیتراسیون IgG و نیز چالش موشی، مشاهده شد. لیگاند Co1 نیز در قیاس با آنتی‌ژن بدون لیگاند تیترا IgG بالاتری را

منابع

- Azegami T, Yuki Y, Kiyono H (2014) Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. *International Immunology* 26:517-28.
- Baranvand M, Honari H (2015) Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats. *Koomesh* 16:397-403. (In Farsi)
- Baranvand M, Honari H (2016) Evaluation of Immunogenicity of Chitosan Nanoparticles Containing STxB and STxB-IpaD Antigens of Shigella Dysenteriae Type 1 in Mice. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 23:688-697. (In Farsi).
- Batisse C, Dransart R, Ait Sarkouh R, Brulle L, Bai SK, Godefroy S, Johannes L, Schmidt F (2015) A new delivery system for auristatin in STxB-drug conjugate therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* 95: 483-491.
- Daniel M, Bollag S, Edelstein G. *Protein methods*: Wiley-Liss New York; 1992.
- Donohue-Rolfe A, Acheson DWK, Keusch GT (1991) Shiga Toxin: Purification, Structure, and Function. *Keusch Reviews of Infectious Diseases* 13: 293-S29.
- Gupta P, Singh MK, Singh Y, Gautam V, Kumar S, Kumar O, Dhaked RK (2011) Recombinant Shiga toxin B subunit elicits protection against Shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. *Vaccine* 29:8094-100.
- Honari H, Amlashi I, Minaei ME (2014) Expression of Recombinant Proteins IpaD-STxB and Immunogenicity STxB in the Mice. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 23: 183-193. (In Farsi)
- Kahsay AG, Muthupandian S (2016) A review on Sero diversity and antimicrobial resistance patterns of Shigella species in Africa, Asia and South America, 2001-2014. *BMC Research Notes* 9: 422.
- Karande P, Mitragotri S (2010) Transcutaneous immunization: an overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 1:175-201.
- Kim SH, Lee KY, Jang YS (2012) Mucosal Immune System and M Cell-targeting Strategies for Oral Mucosal Vaccination. *Immune Netw* 12: 165-175.
- Kim SH, Seo KW, Kim J, Lee KY, Jang YS (2010) The M cell-targeting ligand promotes antigen delivery and induces antigen-specific immune responses in mucosal vaccination. *The Journal Immunology* 185: 5787-5795.
- Kim SH, Jung DI, Yang IY, Jang SH, Kim J, Truong TT, Pham TV, Truong NU, Lee K, Jang YS (2013) Application of an M-cell-targeting ligand for oral vaccination induces efficient systemic and mucosal immune responses against a viral antigen *International Immunology* 25:623-632.
- Kurohane K, Kobayashi C, Imai Y (2005) Facilitated production of secretory IgA against Shiga toxin B subunits by intranasal application of antigen-coated polystyrene microspheres. *Microbiol Immunol* 49: 149-154.
- Madanchi H, Honari H, Hesarakhi H, Sayadnanesht A (2012) Cloning and expression of stxB gene from shigella dysenteriae type I in *E. coli* Rosetta DE3. *Genetics in the 3rd millennium*. P2641-7. (In Farsi)
- Martinez-Becerra FJ, Kissmann JM, Diaz-McNair J, Choudhari SP, Quick AM, Mellado-Sanchez G, Clements JD, Pasetti MF, Picking WL (2012) Broadly protective Shigella vaccine based on type III secretion apparatus proteins. *Infection and immunity* 80: 1222-31.
- Melton-Celsa AR (2014) Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2:EHEC-0024-2013.
- Ohno H (2016) Intestinal M cells. *The Journal of Biochemistry* 159: 151-160.
- Picking WL, Nishioka H, Hearn PD, Baxter MA, Harrington AT, Blocker A, Picking WD (2005) IpaD of Shigella flexneri is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infection and Immunity* 73: 1432-40.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 1-3 Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- The HC, Thanh DP, Holt KE, Thomson NR, Baker S (2016) The genomic signatures of Shigella evolution, adaptation and geographical spread. *Nature Reviews Microbiology* 14: 235-250.
- Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C (1999) Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: Cloning, expression, purification, and proteolytic activity. *Protein Expression and Purification*. 15:221-7.
- Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B (2008) Protection against Shiga toxin-producing Escherichia coli infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B. *Clin Vaccine Immunol* 15: 359-366.