بررسی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌های STxB و STxB-IpaD به‌صورت نازال در رت‌های آزمایشگاهی

مهدی باران‌وند (M.Sc)، حسین هنری *(Ph.D)

دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه، گروه و مرکز تحقیقات علوم زیستی، آزمایشگاه واکسن

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های شیگلا و ایشرشیاکلی شایع‌ترین عامل اسهال است و واکسن موثری علیه آن‌ها تولید نشده است. پروتئین IpaD نقش مهمی در تهاجم، بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط شیگلاها دارد. یکی دیگر از فاکتورهای بیماری‌زای اصلی در شیگلا دیسانتری تیپ ۱ و E. coli O157:H7 انتروتوکسین شیگلا یا (STxB) می‌باشد. با ممزوج پروتئین IpaD با STxB می‌توان کاندیدای واکسن مناسب تهیه نمود. در این مطالعه تیتر آنتی‌بادی پروتئین‌های نوترکیب STxB-IpaD ممزوجی و STxB نازالی و ایمنی‌زایی آن‌ها در رت با یک‌دیگر مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، وکتورهای (pET28-ipaD-stxB), (pET28-stxB) از مرکز زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین (ع) تهیه گردید. با ترانسفورم این وکتورها به درون باکتری E.coli BL21 DE3، به‌وسیله PCR و برش آنزیمی تایید شدند. پروتئین‌های نوترکیب تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن مورد تایید قرار گرفتند. بیان ژن‌های STxB-IpaD ممزوجی و STxB تحت القای IPTG انجام و بعد از تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی، آنتی‌ژن‌های حاصل در چهار نوبت متوالی به‌صورت نازال به رت‌ها در گروه پنج تایی تجویز شدند. آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده در سرم رت‌ها اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: نتایج الایزا نشان داد که آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن STxB در رت‌ها تولید شده و با ممزوج شدن IpaD به STxB میزان تیتر آنتی‌بادی نسبت به تیتر آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن STxB افزایش یافته است. رت‌های ایمن‌شده با آنتی‌ژن STxB توانستند تا ۶ برابر LD50 و رت‌های ایمن‌شده با آنتی‌ژن STxB-IpaD تا ۱۰ برابر LD50 شیگا توکسین E. coli O157:H7 را تحمل نمایند.

نتیجه‌گیری: پروتئین حاصل از امتزاج ژن‌های IpaD و STxB، می‌تواند اثر ایمنی‌زایی آنتی‌ژن STxB را افزایش دهد. پروتئین‌های ممزوجی با پروتئین نوترکیب STxB را به‌صورت نازالی و بدون ادجوانت شیمیایی به‌عنوان کاندید مناسب برای تولید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا و ایشرشیاکلی می‌توان توصیه نمود.

واژه‌های کلیدی: شیگلا دیسانتری، اشریشیاکولی او ۱۵۷، سم شیگلا ۲، موش‌های صحرایی

مقدمه

شیگلا دیسانتری و E. coli O157:H7 از خانواده انتروباکتریاسه‌ها می‌باشند. شیگا توکسین یا STx عامل اسهال خونی شیگلا است. STx از سم‌های دو قسمتی A و B است که قسمت غیر سمی STxB برای ورود و عمل‌کرد قسمت سمی یا STxA ضروری می‌باشد. هم‌چنین پروتئین‌های IpaA/B/C/D/H محصول پلاسمید تهاجمی شیگلا می‌باشند که پروتئین IpaD در گونه‌های شیگلا شباهت زیادی باهم

* نویسنده مسئول، تلفن:

Email: honari.hosein@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۸

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

دارد. مهم‌ترین شیگلاها از نظر بیماری‌زایی و بروز اپیدمی‌ها چهار سروتیپ هستند که بر اساس پلی‌ساکارید اختصاصی O شان (osp) در LPS طبقه‌بندی می‌شوند و به‌نام شیگلا دیسانتری (S.dysentry)، شیگلا فلکسنری (S.flexeneri)، شیگلا سونئی (S.sonneii)، شیگلا بویدی (S.boydii) نام‌گذاری شدند. اسهال خونی با عامل شیگلا در صورت عدم درمان به مرگ می‌انجامد [۱]. شیگا توکسین یا STx به عنوان یکی از عوامل ویرولانس شیگلا دیسانتری تیپ یک در ایجاد اسهال خونی و دیسانتری مطرح است. توکسین شیگا STx، انتروتوکسین شیگلا دیسانتری، یک پروتئین هموپنتامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ kDa کیلودالتون بوده که از یک زیرواحد منومریک سمی و آنزیماتیک به‌نام STxA و از یک زیرواحد متصل‌شونده به رسپتور هموپنتامریک به‌نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیر سمی STxB برای ورود و عمل‌کرد قسمت سمی یا STxA ضروری می‌باشد [۳،۲]. هر منومر STxB از ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و وزن ملکولی حدود ۷/۷ kDa دارد [۲،۳]. STxB به گیرنده سطح سلولی خود به‌نام Gb3 متصل می‌گردد که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود [۴]. مطالعات نشان داده است که بیان Gb3 در سطح سلول‌های سرطانی انسان فراوانی بسیار زیادی دارد. Gb3 بیان زیادی در سطح سلول‌های سرطانی مثل لنفوما، کارسینوماهای تخمدان، سینه و کلون دارد. هم‌چنین این فراوانی در سطح سلول‌های دندریت (DC) انسانی و موش نیز دیده می‌شود [۵]. با تزریق زیر پوستی یا تجویز نازالی آنتی‌ژن STxB آنتی‌بادی علیه STxB تولیدشده و با خنثی‌سازی آن می‌توان از اتصال و ورود قسمت سمی (STxA) به درون سلول هدف جلوگیری کرد. هم‌چنین یکی دیگر از عواملی که در بیماری‌زایی شیگلا نقش دارد پروتئین‌های IpaA/B/C/D/H هستند که محصول پلاسمید تهاجمی شیگلا می‌باشند. کمپلکس ایجاد شده از سه پروتئین IpaB/C/D نقش بسیار مهمی در اتصال به سلول‌های اپیتلیالی روده (M-cell) و فرار از فاگوزوم ماکروفاژها بازی می‌کند [۷،۶]. توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای IpaD در بین گونه‌های شیگلا شباهت زیادی نسبت به هم دارد. به این صورت که توالی IpaD در شیگلا دیسانتری سروتیپ I با شیگلا بوئیدی ٪۹۸، شیگلا سونئی ٪۹۵، شیگلا فلکسنری ٪۹۴ کاملاً همولوژی دارد [۸]. با تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG علیه IpaD می‌توان از بیماری‌زایی شیگلاها جلوگیری کرد. با تولید آنتی‌ژن‌های STxB، STxB-IpaD در باکتری E. coli BL21 و بررسی بیان و ایمنی‌زایی آن در موش و خوکچه هندی به عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری شیگلوزیز مطرح می‌باشد [۱۰،۹]. با توجه به ایمنی‌زا بودن آنتی‌ژن‌های STxB، STxB-IpaD در حیوانات آزمایشگاهی ضرورت دارد تا اشکال مختلف تجویز آنتی‌ژنی و حیوانات آزمایشگاهی دیگر مورد مطالعه قرار گیرد. هدف از انجام این تحقیق تخلیص بیان، تجویز نازالی آنتی‌ژن‌های STxB، STxB-IpaD به حیوان رت، مقایسه تیتر آنتی‌بادی پروتئین‌های نوترکیب STxB-IpaD ممزوجی و STxB و ایمنی‌زایی آن‌ها در رت علیه E. coli O157:H7 مد نظر بود.

مواد و روش‌ها

تهیه کاست‌های ژنی STxB و STxB-IpaD در pET28a(+): کاست‌های ژنی STxB و STxB-ipaD در pET28a(+) از گروه و مرکز زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شد [۱۱،۹].

تایید ژن‌های نوترکیب STxB و STxB-ipaD با روش PCR وکتورهای بیانی pET28a(+) دارای ژن‌های نوترکیب STxBو STxB-ipaD در سلول‌های مستعد E. coli سویه BL21(DE3)(stratagen) ترانسفورم شد. کلون‌های انتخابی به کمک PCR تایید شدند.

بیان ژن‌های STxB و STxB-IPaD از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن OD ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به‌دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتر (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی‌مولار به

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

محیط کشت افزوده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد [۹].

الکتروفورز SDS-PAGE: نمونه‌ها قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (SM0671) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲٪ با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بود.

تایید پروتئین نوترکیب: برای تایید 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٪ و متانول ۲۰٪ و pH ۸/۳: روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST(37NaCl) میلی‌مولار، KCl ۲/۷ میلی‌مولار، Na2HPO4.7H2O ۳/۴ میلی‌مولار، توین ۲۰٪ و pH ۷/۲: حاوی ۵٪ شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شستشو با بافرPBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی ضد His-tag (ebcam) کانژوگه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شستشو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سوبسترا (بافر تریس ۵۰mM و pH ۷/۸: حاوی DAB6 mg، H2O2 ۱۰µl) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولزی، واکنش با استفاده از H2O متوقف گردید [۹].

تخلیص پروتئین نوترکیب: پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NTA جداسازی و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲٪ الکتروفورز شد [۱۰].

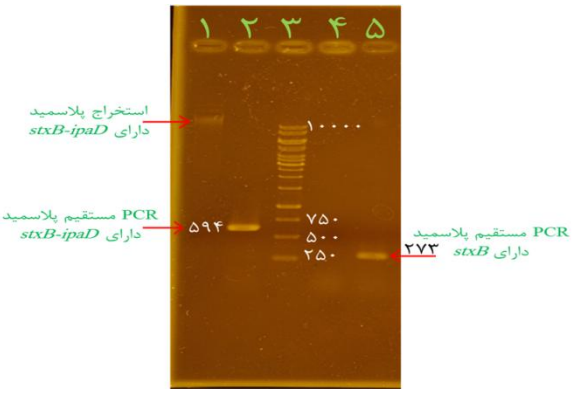
تعیین غلظت پروتئین: غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) سیناژن به عنوان استاندارد انجام گرفت [۹].

تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های STxB و STxB-IpaD: به میزان µg ۲۰، ۱۰، ۱۰، ۱۵ از پروتئین نوترکیب STxB و STxB-IpaD در چهار نوبت به رت‌ها تجویز و در نهایت از رت‌ها خون‌گیری و توسط آزمایش الایزا تیتر آنتی‌بادی آن اندازه‌گیری شد.

چالش حیوانات ایمن‌شده با عصاره سلولی E. coli سویه: O157:H7 بعد از ایمن‌سازی حیوانات، شش برابر LD50 عصاره سلولی E. coli سویه O157:H7 به رت‌های ایمن‌شده با STxB و ده برابر آن نیز به رت‌های ایمن شده با STxB-IpaD تزریق و بعد از ۲/۵ روز نتایج آن مورد بررسی و حیوانات تا ۱۰ روز تحت نظر قرار گرفتند [۹،۱۰].

نتایج

تایید حضور ژن سنتتیک توسط PCR: پس از استخراج پلاسمید از باکتری E. coli- BL21DE3 واکنش PCR انجام گرفت (لازم به ذکر است پرایمرها از نواحی pET طراحی شده که حدود ۴۴ باز به قطعه ژنی اضافه می‌شود) (شکل ۱).

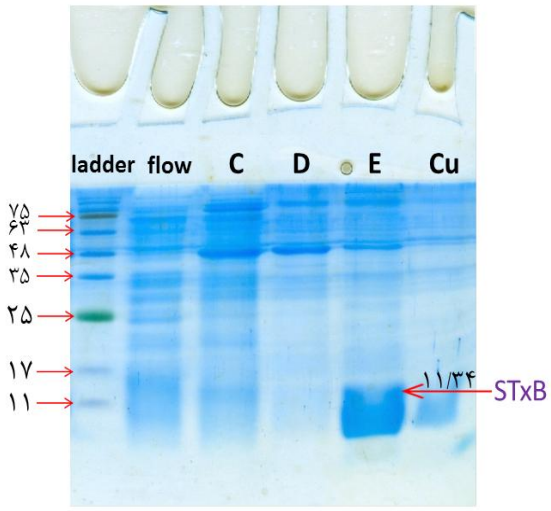


شکل ۱. تصویر حاصل از ژنهای نوترکیب روی ژل آگاروز ۱درصد. ستون ۱: استخراج پلاسمید دارای ژن stxB-ipaD ستون ۲: باند حاصل از PCR مستقیم ژن سنتتیک stxB-ipaD و مشاهده قطعه ۵۹۱ جفت بازی ستون۳: نشانگر مولکولی ۱۰۰۰۰ bp. ستون ۵: باند حاصل از PCR مستقیم ژن stxB و مشاهده قطعه ۲۷۳ جفت بازی

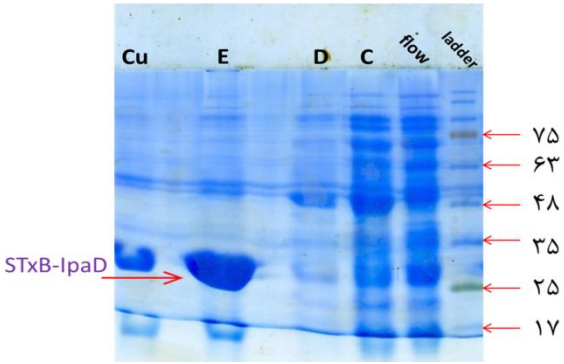
بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب STxB و STxB-IPAD: کلنی انتخابی در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از رسیدن به رشد کافی به منظور بیان پروتئین توسط IPTG یک میلی‌مولار القاء گردید و برای بررسی بیان و کیفیت آن روی ژل SDS-PAGE برده شد (شکل ۲ و ۳). باند پروتئینی STxB و STxB-IPAD به

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

ترتیب در جایگاه صحیح ۱۱/۳۴ kDa و ۲۴/۳ قرار گرفت در حالی‌که در کنترل‌ها هیچ باندی دیده نشد. پروتئین‌های نوترکیب به کمک ستون نیکل خالص‌سازی گردید و غلظت پروتئین‌های تولیدی به روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

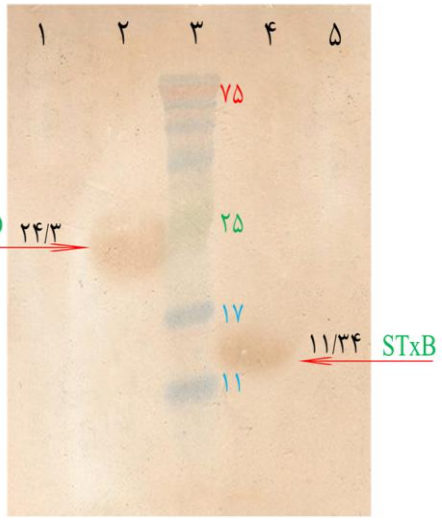


شکل ۲. بیان پروتئین StxB توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل: لدر پروتئینی، محلول فلو دارای pH=۸، محلول C دارای pH=۶/۳، محلول D دارای pH=۵/۹، محلول E دارای pH=۴/۵ که پروتین StxB دارای وزن مولکولی ۱۱/۳ KD از ستون جدا شد. و محلول آخر Cu دار غلظت ۲۰ mM



شکل۳. بیان پروتئین STxB-IpaD توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل: لدر پروتئینی، محلول فلو دارای pH=۸، محلول C دارای pH=۶/۳، محلول D دارای pH=۵/۹، محلول E دارای pH=۴/۵ که پروتئین STxB-IpaD دارای وزن مولکولی ۲۴/۳ kDa از ستون جدا شد. و محلول آخر Cu دار غلظت ۲۰ mM

تایید پروتئین‌های نوترکیب با روش وسترن‌بلات: در این روش از آنتی‌بادی STxB-IpaD برای تایید پروتئین‌های نوترکیب STxB و STxB-IpaD استفاده شد (شکل ۴).



شکل ۴. وسترن بلات. ستون ۱: نمونه کنترل منفی بیان نشده STxB-IpaD ستون ۲: نمونه بیانی STxB-IpaD دارای IPTG ستون ۳: نشانگر پروتئینی ستون ۴: نمونه بیانی STxB ستون ۵: نمونه کنترل منفی بیان نشده

ارزیابی تیتر آنتی‌بادی ضد پروتئین نوترکیب به روش الایزای غیر مستقیم: به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تجویز از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از تزریق سوم و چهارم به‌صورت تصادفی از رت‌های تست و شاهد خونگیری به‌عمل آمد (جدول ۱). و بعد از جداسازی سرم آن‌ها آزمایش الایزا انجام شد که نمودار میانگین تیتر آنتی‌بادی در هر مرحله در شکل ۵ نشان داده شده است.

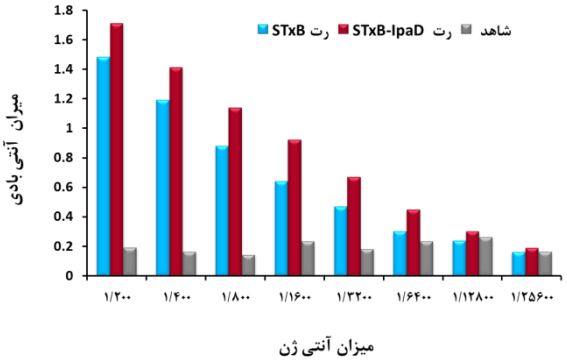
جدول ۱. تجویز نازالی آنتی‌ژن به رت

شماره تجویز	روز تجویز	تجویز نازال آنتی‌ژن بدون ادجوانت		
		STxB	STxB-IpaD	PBS
۱	۱	۲۰ µg	۲۰ µg	۲۰۰ µl
۲	۷	۱۵ µg	۱۵ µg	۲۰۰ µl
۳	۱۴	۱۰ µg	۱۰ µg	۲۰۰ µl
۴	۲۱	۱۰ µg	۱۰ µg	۲۰۰ µl

چالش رت‌ها با استفاده از عصاره سلولی حاوی شیگا توکسین: به منظور انجام چالش مورد نظر، رت‌های ایمن شده با آنتی‌ژن STxB با غلظت شش برابر LD50 و رت‌های ایمن‌شده با آنتی‌ژن STxB-IpaD با غلظت ده برابر LD50

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

مورد چالش قرار گرفتند که حیوانات ایمن شده قادر به تحمل شیگا توکسین با غلظت‌های فوق بودند و در مدّت ۵۰ روز، زنده و سالم ماندند. همان‌طوری‌که نتایج آماری نشان می‌دهد گروه‌های ایمن‌شده نازالی اختلاف معنی‌داری با گروه‌های شاهد ایمن‌نشده دارند (جدول ۲).



شکل ۱. تیتر آنتی بادی

جدول ۱. نتایج چالش گروه‌های موشی با عصاره سلولی باکتری *E.coli* O157 ; H7

ردیف	گروه‌های رت	عصاره سلولی تزریق شده	میزان تحمل	مقایسه گروه ها	مقایسه آماری
۱	STxB بدون ادجوانت	۱۸۰۰ µg	زنده	۳با۱	P<۰/۰۰۱
۲	STxB-IpaD بدون ادجوانت	۳۰۰۰ µg	زنده	۳با۲	P<۰/۰۰۱
۳	PBS	۳۰۰µg	مرده		

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری شیگلوزیز همیشه به عنوان یک اسهال خونی باسیلی حاد شناخته می‌شود که با مدفوع آبکی همراه با خون و موکوس توام با علائم بالینی چون تب، کرامپ‌های شکمی مشخص می‌گردد که ممکن است به همراه سندروم اورمیک همولیتیک 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 تائید 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 [۱۳،۱۲،۸،۹].

با توجه به گزارشات محققان ایرانی مبنی بر فراوانی وقوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی شیگلا این باکتری می‌تواند به عنوان یک عامل ناتوان‌کننده مورد توجه قرار گیرد. بنابراین لازم هست که سوش‌های بومی ایران به منظور تهیه واکسن مورد مطالعه قرار گیرند [۱۳]. 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 بیماری‌زا، از جمله پروتئین‌های Ipa دارد. شیگلا دیسانتری تیپ ۱ هنوز هم عمده‌ترین علت اصلی اپیدمی اسهال، در صد سال اخیر می‌باشد و نسبت مرگ ومیر آن در کشورهای جهان متفاوت است [۱]. مکانیسم بیماری‌زایی این باکتری شامل دو مرحله کلیدی است: مرحله اول شامل اتصال و به دنبال آن کلونیزاسیون باکتری به سطح سلول‌های اپی‌تلیال روده کوچک به وسیله فاکتورهای کلونیزاسیون که باعث تورم و ایجاد زخم‌های سطحی، تجمع پلی‌نوکلئورها و بالاخره نکروز و خون‌ریزی می‌گردد و به صورت بلغم و خون همراه با مدفوع دفع می‌شود. در مرحله دوم باکتری تولید شیگا توکسین کرده و به سلول‌های اپیتلیال روده بزرگ حمله و سبب آماس و زخم‌هایی روی دیواره روده می‌گردد که نتیجه آن اسهال خونی است. باکتری شیگلا با به کارگیری سیستم ترشحی نوع ۳

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

فاکتورهای بیماری‌زای خود را به سلول میزبان انتقال می‌دهد. پروتئین IpaD فاکتوری است که در راس این سیستم برای تهاجم باکتری به سلول میزبان ضروری است. IpaD یک پروتئین چندکاره 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. پروتئین IpaD یک پروتئین ۳۷ kDa بوده و در بین سایر پروتئین‌های اپرون Ipa تنها پروتئین IpaD آب دوست می‌باشد. 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 می‌شود [۱۵،۱۴].

مطالعات انجام گرفته نشان دادند که آنتی‌بادی‌هایی که ناحیه N- ترمینال پروتئین IpaD را شناسایی می‌کنند توانایی برهمکنش این پروتئین با نمک‌های صفراوی به ویژه دی‌اکسی 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 این پروتئین به عنوان یک آنتی‌ژن بالقوه در طراحی واکسن مطرح است [۱۴].

آنتی‌بادی علیه IpaD می‌تواند توانایی باکتری را برای تهاجم ساقط نماید هم‌خوانی دارد. آزمایشات در محیط in vivo نیز با استفاده از روده خرگوش انجام شد. بدین 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 Rabbit Intestinal iliac loops استفاده شد. نتایج این گونه بود که در غلظت‌های اولیه آنتی‌بادی هیچ‌گونه ضایعه‌ای در روده ایجاد نشد. در صورتی که در آزمایش کنترل منفی که باکتری بدون حضور آنتی‌بادی درون روده خرگوش قرار گرفت سرتاسر روده دچار ضایعه شد [۱۴].

تحقیقات صورت گرفته مشخص کردند که مقدار آنتی‌ژنی که در حالت فیوژن شده با یک ادجوانت برای مصرف ضروری است، کم‌تر از مقداری می‌باشد که به صورت تجویز هم‌زمان برای ایمنی‌زایی استفاده می‌گردد که این نشان از مزیت متصل کردن آنتی‌ژن‌ها با ادجوانت‌های مختلف دارد. امروزه توجه خاصی به واکسن‌هایی شده است که دارای این مزیت هستند [۱۶]. 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 ایمنوادجوانت مناسب هم‌راه شود که برای این منظور در این مطالعه stxB انتخاب گردید. ژن stxB در باکتری E. coli کلون شده و بیان آن بررسی گردید و ایمنی‌زایی آن به اثبات رسید [۱۷]. مطالعات نشان می‌دهد که به خاطر وزن مولکولی پایین STxB پاسخ ایمنی ناچیزی علیه آن دیده می‌شود. از طرفی STxB به خاطر اتصال اختصاصی‌اش با گیرنده Gb3 روی اکثر سلول‌های سرطانی امروزه برای انتقال داروهای ضد سرطان به این سلول‌ها و کاهش اثرات سوء شیمی‌درمانی توجه دانشمندان زیادی را به خود جلب کرده است [۱۵،۱۸]. با توجه به خصوصیات آنتی‌ژن STxB ارسال دارو از طریق بینی به سلول‌های سرطانی می‌توان پیشنهاد کرد.

به منظور افزایش ایمنی‌زایی 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. با ممزوج کردن STxB- IpaD میزان ایمنی‌زایی آن با استفاده از سم فعال O157:H7 E. coli در خوکچه هندی تا ۲۸ برابر افزایش یافته است [۱۹،۱۶،۹]. نتایج الایزا نشان داد که

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن STxB در رت‌ها تولید شده و با ممزوج شدن IpaD به STxB میزان تیتر آنتی‌بادی نسبت به تیتر آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن STxB افزایش یافته است. رت‌های ایمن شده با StxB توانستند تا ۶ برابر LD50 و رت‌های ایمن‌شده با STxB-IpaD تا ۱۰ برابر LD50 شیگا توکسین E. coli O157:H7 را تحمل نمایند.

ژن‌های شیگا توکسین Shiga toxin 1A subunit (stx1A) and Shiga toxin 1B subunit (stx1B) در سویه‌های مختلف Escherichia coli, Bacteriophage و Shigella sonnei و S.dysenteriae type 1 و Enterobacteria phage VT1 و ژن ipaD در سویه‌های مختلف Escherichia coli و گونه‌های مختلف Shigella و سویه مختلف Shigella, flexneri و Shigella boydii و Shigella sonnei و Shigella dysenteria وجود دارد. این باکتری‌ها به‌عنوان عوامل ناتوان‌کننده مطرح بوده و ممکن است در جنگ‌های بیولوژیک استفاده گردد. نتایج تحقیقات انجام شده نقش دلیوری، آنتی‌ژنی و ادجوانتی STxB را اثبات کرده‌اند. با تجویز نازالی آنتی‌ژن‌ها به کمک پروتئین نوترکیب StxB استفاده از واکسن‌ها سهل‌الوصول‌تر خواهد بود.

تشکر و قدردانی

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.

منابع

[1] Niyogi SK. Shigellosis. The Journal of Microbiology. 2005; 45: 133-143.

[2] Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. Toxins 2010; 2: 1612-1645.

[3] Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. Toxicon 2005; 45: 389-393.

[4] Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, van Effenterre D. Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites. Biol Cell 2008; 100: 717-725.

[5] Janssen KP, Vignjevic D, Boisgard R, Falguie T, Bousquet G, Decaudin D, et al. In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. Cancer Res 2006; 66: 7230-7236.

[6] Sani M. Botteaux A, Parsot C, Sansonetti P, Boekema EJ, Allaoui A. IpaD is localized at the tip of the shigella flexneri type III secretion apparatus. Biochim Biophys Acta (BBA) 2007; 1770: 307-311.

[7] Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C. Improving M-cell-mediated transport across mucosal barriers. Immunology 2004; 113: 15-22.

[8] Heiat M, Saadati M, Nazarian S, Barati B, Honari H, Doroudian M, Hesaraki M. Cloning and exparession of N-terminal region of IpaD from shigella dysenteriae in E. coli. J Paramed Sci 2010; 1: 12-17.

[9] Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaei S. Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein. Arak Med Univ J 2013; 16: 83-93.

[10] Honari H, Amlashi I, Minaei M. Expression of recombinant proteins IpaD-STxB and immunogenicity STxB in the mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 23: 196-206.

[11] Madanchi H, Honari H, Hesaraki H, Sayadnanesh A: Cloning and expression of stxB gene from shigella dysenteria typeI in E. coli Rosseta DE3. Genetics in the 3rd Millennium 2012; 1: 2641-2647.

[12] Ranjbar R, Soltan dallal MM, Pourshafie MR, Aslani MM, Majdzadeh R. Serogroup distribution of shigella spp in Tehran. J Iranian Publ Health 2004; 33: 32-35.

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

[14] 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: 189-199.

[15] Hromockyj AE, Maurelli AT. Identification of Shigella invasion genes by isolation of temperature-regulated inv: lacZ operon fusions. Infect Immun 1989; 57: 2963-2970.

[16] De Magistris MT. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58: 52-67.

[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: 359-366.

[18] Gupta P, Singh MK, Singh Y, Gautam V, Kumar S, Kumar O, Dhaked RK. Recombinant shiga toxin B subunit elicits protection against shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. Vaccine 2011; 29: 8094-8100.

[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: 2657-2665.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats

Mahdi baranvand (M.Sc), hosein honari (Ph.D)*
Vaccine Laboratory, Department and Center of Biosciences Research, Faculty of Basic Sciences, University of Imam Hussain (AS), Tehran, Iran

(Received: 11 Jun 2014; Accepted: 29 Nov 2014)

Introduction: *Shigella* and *E. coli* bacteria are the most common cause of Diarrhea, though as yet no effective vaccine against them has been produced. IpaD protein plays an important role in invasion and infection caused by *Shigella*. Another major virulence factor in *Shigella dysenteriae* type 1 and *E. coli* O157: H7 is *Shigella* enterotoxin or (STxB). IpaD protein in combination with STxB can produce a suitable candidate vaccine. In this study, the nasal STxB and STxB-IpaD fused recombinant proteins antibody titers and their immunogenicity were assessed and compared in rats.

Materials and Methods: (pET28- stxB) and (pET28-ipaD-stxB) vectors were prepared at Biology center of the Imam Hussein University (AS). Transformation of these plasmids into *E. coli* BL21 DE3 bacteria were confirmed by PCR and enzymatic digestion. Production of recombinant proteins were confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. Expression of fused STxB-IpaD and STxB antigens were performed under induction of IPTG. After protein purifications, using affinity chromatography, antigens were prescribed nasally to five groups of rats in four consecutive sessions. Later the polyclonal antibodies produced in rat sera were measured.

***Results*:** ELISA showed that antibody titers were increased by the combination of IpaD to STxB compared to that produced against single STxB antigen. The immunized Rats with StxB antigen were able to tolerate up to six fold of LD50, while rats that were immunized with STxB-IpaD combined antigens were able tolerate up to tenfold of LD50 for *E. coli* O157: H7 Shiga toxin.

Conclusion: The protein produced from the fusion of *ipaD* and *stxB* genes, can increase the effect of single STxB antigen immunogenicity. Recombinant proteins fused with STxB protein without chemicals adjuvants can be recommended in the form of nasal drops as possible candidates for vaccines against *E. coli* and *Shigella* types.

Keywords: *Shigella dysenteriae*, Escherichia coli O157, Shiga Toxin 2, Rats

* Corresponding author. Tel: +98 9123848187
honari.hosein@gmail.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]