Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(73): 83-93

Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein

Honari H[1*], Amlashi I[1], Minaei ME[1], Safaei S[1]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

Received:6.Feb.2013, Accepted: 29.May.2013

Abstract

***Background*:** Shigellosis is a major global issue of human health. To date, no effective vaccine has been found against Shigella. One of the major virulent factors in Shigella dysenteriae type 1 is Shigella enterotoxin or STx. STxB has immunogenic, adjuvant, or carrier properties. Vaccine candidate antigens can be coupled with this adjuvant for production of an appropriate vaccine. IpaD has a key role in invasion, virulence, and infection by Shigella.

***Materials and Methods*:** In this study, the gene sequences of STXB and ipaD were obtained from gene bank and corresponding genes were prepared as synthetic construct and then transferred to *E. coli BL21DE3*. By PCR amplification and enzymatic digestion, protein expression levels were assessed. Its protein expression was confirmed by Western blot technique. After extraction by affinity chromatography, the recombinant protein was injected four times to guinea pigs. The pigs were, then, challenged by Shigella felexneri 2a and active toxin of *E. coli O157:H7*.

***Results*:** The results showed that groups of guinea pigs challenged with $28\times LD_{50}$ of toxin completely survived. Furthermore, guinea pigs were challenged by inducing Shigella felexneri 2a in their eyes. The results showed that the control pigs got cataracts, whereas the immune pigs were in health.

***Conclusion*:** The findings of this study suggest that this recombinant protein is a good candidate for production of a recombinant vaccine against Shigella family.

***Keywords*:** Invasion plasmid antigen D (IpaD), Shiga toxin B (STXB), Shigella dysenteriae type 1

*Corresponding author:
Address: Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
Honari.hosein@gmail.comEmail:

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 4 (شماره پیاپی 73)، تیر 1392، 83-93

ایمنی زایی خوکچه هندی با پروتئین نوترکیبIpaD-StxB

حسین هنری[1*]، ایمان املشی[2]، محمد ابراهیم مینایی[3]، صادق صفایی[2]

1- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
2- کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
3- دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/12/15تاریخ پذیرش: 92/03/08

چکیده

زمینه و هدف: شیگلوزیس یک مسئله جهانی مهم برای سلامتی بشر محسوب شده و تا به امروز واکسن موثری علیه شیگلا یافت نشده است. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای اصلی در شیگلا دیسانتری تیپ 1، انتروتوکسین شیگلا یا STx می‌باشد. STxB دارای نقش ایمنی زایی، ادجوانتی و حاملی بوده و می‌توان با ممزوج کردن آنتی ژن‌های کاندیدای واکسن با این ادجوانت به تولید واکسن مناسب پرداخت. پروتئین IpaD نقش مهم و کلیدی در تهاجم، بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط شیگلا دارد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، توالی ژنی ipaD و stxB از بانک ژنی استخراج و به صورت صناعی تهیه گردید و با انتقال این ژن به درون باکتری *E. coli BL21 DE3*، به‌وسیله PCR و برش آنزیمی تایید و میزان بیان پروتئین مذکور مورد ارزیابی و با استفاده از تکنیک وسترن بلات، بیان آن مورد تایید قرار گرفت. بعد از تخلیص پروتئین نوترکیب با ستون کروماتوگرافی، چهار نوبت متوالی به خوکچه هندی تزریق شد و ایمنی‌زایی آن با استفاده از باکتری *شیگلا فلکسنری* 2a و سم فعال *E.coli O157:H7* مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج چالش نشان داد که خوکچه‌های هندی ایمن شده توانستند 28 برابر LD_{50} شیگا توکسین *E. coli O157:H7* را تحمل نمایند. در ضمن، چالش خوکچه‌ها توسط القای باکتری شیگلا فلکسنری در چشم نیز انجام شد که نتیجه آن حاکی از ابتلای خوکچه‌های شاهد به آب مروارید(کاتاراکت) و سالم ماندن خوکچه‌های ایمن شده بود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این تحقیق بیان‌گر آن است که پروتئین حاصل از امتزاج ژن‌های ipaD و stxB، می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن نوترکیب علیه انواع *شیگلا* باشد.

کلمات کلیدی: آنتی ژن D پلاسمید تهاجمی IpaD، زیر واحد B سم شیگا (STxB)، شیگلا دیسانتری تیپ 1

0

* **نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، گروه زیست شناسی

Email: Honari.hosein@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

مقدمه

باکتری شیگلا(Shigella) اولین بار توسط آقای کیوشی شیگا در سال 1898 در ژاپن از افراد مبتلا به دیسانتری جداسازی و به افتخار ایشان "باسیل شیگا" نامیده شد. شیگلاهای زیادی در طی سال‌های بعد شناسایی شدند اما مهم‌ترین آنها از نظر بیماری‌زایی و بروز اپیدمی‌ها، چهار سروتیپ بودند که بر اساس پلی ساکارید اختصاصی O در لیپوپلی ساکارید(Lipopolysaccharides- LPS) طبقه‌بندی می‌شوند و به نام‌های شیگلا دیسانتری(S.dysenteria)، شیگلا فلکسنری(S.flexneri)، شیگلا سونئی(S.sonneii)، شیگلا بویدی (S.boydii) نام‌گذاری شدند. اسهال خونی با عامل شیگلا در بیشتر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان سریع 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 سازمان سلامت جهانی توسعه واکسن‌های ایمن و کارا در مقابل شیگلا را در اولویت قرار داده است(1- 3).

مکانیسم بیماری‌زایی این باکتری شامل دو مرحله کلیدی است: مرحله اول شامل اتصال و به دنبال آن کلونیزاسیون باکتری به سطح سلول‌های اپی تلیال روده کوچک که باعث تورم و ایجاد زخم‌های سطحی، تجمع پلی نوکلوئرها 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. سالیان زیادی است که شیگا توکسین یا STx به عنوان یکی از عوامل ویرولانس شیگلا دیسانتری تیپ 1 در ایجاد اسهال خونی و دیسانتری مطرح است(4، 5). توکسین شیگا STx یک پروتئین هگزامر با وزن مولکولی 70/5 کیلودالتون بوده که از یک زیرواحد منومریک سمی و آنزیماتیک به نام STxA و از یک زیر واحد متصل شونده به گیرنده هموپنتامریک به نام(B subunit of Shiga toxin (StxB تشکیل شده است. قسمت غیرسمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری می‌باشد. STxB ساختار هموپنتامریک(5 زیر واحدی) دارد. هر منومر آن از 69 اسید آمینه(207 جفت باز) تشکیل شده و وزن ملکولی حدود 7/7 کیلودالتون دارد. هرمونومر از یک مارپیچ آلفا(α helix) و 6 صفحه β (β sheet) تشکیل شده است. این 5 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. پیش‌بینی می‌شود که با تولید آنتی بادی علیه STxB و خنثی‌سازی 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 همچنین تصویر برداری از تومور به کمک مواد فلوروسنت استفاده می‌گردد(4، 5). پروتئین Invasion plasmid antigen D (IpaD) یکی از حیاتی‌ترین و مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای موجود در انواع شیگلا می‌باشد به نحوی که سرآغاز و گذرگاه تمام فعالیت‌های 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. پروتئین IpaD دارای 3 ناحیه اصلی N-ترمینال، ناحیه مرکزی، ناحیه C-ترمینال می‌باشد. ناحیه C- ترمینال IpaD یک ناحیه هیدروفوب بوده و در دسترس محیط نمی‌باشد. IpaD توسط ناحیه گلوبولار N- ترمینال خود در راس سوزن و در ضلع بیرونی آن، با محیط اطراف باکتری در تعامل است(1، 3 ،6). هدف از این مطالعه، ساب کلونینگ کاست ژنی stxB- ipaD به عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری شیگلوزیس و بررسی بیان و ایمنی‌زایی آن در خوکچه هندی می‌باشد.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، جهت طراحی کاست ژنی ipaD- stxB توالی کامل ژن‌های stxB و ipaD از بانک ژن(NCBI-007607.1) استخراج شد. بهترین ناحیه ژن ipaD (ناحیه N- ترمینال) از نوکلئوتید 163 تا 483 یعنی 320 نوکلئوتید و ناحیه‌ای از ژن stxB با 207 نوکلئوتید، انتخاب گردید. 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 به‌طور شماتیک به‌صورت NdeI- ipaD- linker(RKKR)- stxB-uaa-XhoI بود که 591 نوکلئوتید دارد.

تایید ژن‌های صناعی stxB و ipaD با روش PCR

وکتور بیانی pET28a(+) دارای ژن‌های صناعی stxB و ipaD در سلول‌های مستعد *E. coli* سویه BL21(DE3) (stratagen) ترانسفورم شد. کلون‌های انتخابی به کمک PCR و هضم آنزیمی تایید شد(7، 8). پرایمرهای آغازین و پایانی به ترتیب در زیر آورده شده است.

For pET285' AGCGGCCTGGTGCCGCG3'
Rev pET285'GCAGCCGGATCTCAGTGGT3'

بیان ژن‌های صناعی stxB و ipaD

از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان 100 میکرولیتر به 5 میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن OD 0/6 در طول موج 600 نانومتر(برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموترIPTG (شرکت فرمنتاز) با غلظت 1 میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت 3 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (8، 9).

الکتروفورز SDS -PAGE

نمونه‌ها قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی(SM0671) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل 12 درصد با جریان ثابت 25 میلی‌آمپر بود(8، 9).

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 192 میلی‌مولار، تریس 25 میلی‌مولار، SDS 0/1 درصد و متانول 20 درصد و pH: 8/3) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl 37 میلی‌مولار، KCl 2/7 میلی‌مولار، $Na_2HPO_4.7H_2O$ 4/3 میلی‌مولار، توین20 درصد وpH: 7/2) حاوی 5 درصد شیر خشک به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست شو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت 1/10000 آنتی‌بادی ضد(His- tag(ebcam کانژوگه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شست شو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سوبسترا(50 میلی‌مولار بافر تریس و pH:7/8 حاوی 6 میلی‌گرم DAB، 10 میکرولیتر H2O2) 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(8-10).

تخلیص پروتئین نوترکیب

پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NTA جداسازی و نمونه‌های حاصل بر روی ژل 12 درصد الکتروفورز شد(8 -10).

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(8 -10).

تولید آنتی بادی علیه پروتئین IpaD- STxB

به میزان 25 میکروگرم از پروتئین IpaD- STxB در چهار نوبت، بار اول همراه با ادجوانت کامل و در نوبت‌های بعدی با ادجوانت ناقص فروند به ترتیب به خوکچه هندی تزریق و در نهایت از خوکچه‌های هندی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

خون‌گیری و توسط آزمایش الایزا تیتر آنتی بادی آن اندازه‌گیری شد(8 -10).

چالش حیوانات شاهد با عصاره سلولی *E. coli* سویه O157 :H7 برای مشخص کردن LD50

کلونی‌های خالص *E. coli O157:H7* به درون 5 میلی‌لیتر آب‌گوشت Brain-Heart infusion (BHI) تلقیح و یک شب در 37 درجه سانتی‌گراد و 200rpm انکوبه شدند. سپس 1 درصد از حجم این محیط به 300 میلی‌لیتر محیط BHI تازه تلقیح و به مدت 24 ساعت با شریط بالا انکوبه و پس از آن، سانتریفیوژ انجام شد و سلول‌ها با سرعت 10000g به مدت 10 دقیقه در 4 درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شدند. توده سلولی حاصل، دوباره در Tris-HCl(50 میلی‌مولار) با pH=8 شناور و به مدت یک ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس بافر لیز کننده اضافه و در مرحله بعد، سلول‌ها با استفاده از سونیکاسیون لیز شدند و سپس سانتریفیوژ با سرعت 10000g به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد، انجام شد. محلول رویی حاصل، محتوی شیگا توکسین می‌باشد که با استفاده از فیلتر 0/22 میکرون(میلی‌پور)، تخلیص شد(4). با تزریق عصاره سلولی فوق(با نسبت‌های 1000، 200، 300، 500، 750، 100) به خوکچه‌های شاهد، میزان LD50 آن از فرمول Y=A+bX محاسبه گردید. خوکچه‌های هندی 30 روزه که حدود 75 تا 100 گرم وزن داشتند برای تزریق انتخاب شدند.

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

بعد از ایمن‌سازی حیوانات، بیست و هشت برابر LD50، عصاره سلولی *E. coli* سویه *O157:H7* به حیوانات تزریق و بعد از 2/5 روز نتایج آن مورد بررسی و حیوانات تا 10 روز تحت نظر قرار گرفتند(11).

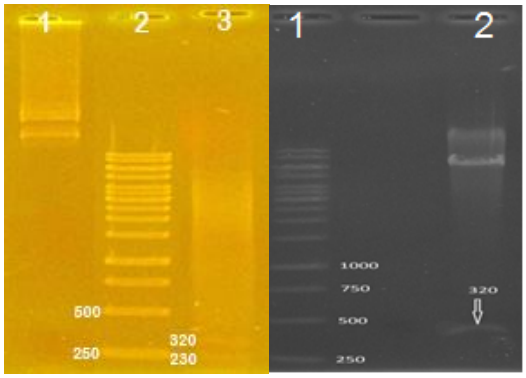
چالش حیوانات شاهد و ایمن شده با شیگلافلکسنری

بعد از ایمن‌سازی حیوانات، از سویه حاد شیگلافلکسنری(مورد تایید بیمارستان بقیه ا... اعظم) برای چالش استفاده شد. بر طبق منابع(IEO) حداقل دوز آلودگی برای خوکچه هندی از سوش حاد مقدار CFU 6×10^8 بود. در این مطالعه غلظتی از باکتری تهیه گردید که هر 25 میکرولیتر آن حاوی CFU 6×10^8 باکتری باشد. در انتها در چشم هر 6 خوکچه هندی(تست و کنترل) 25 میکرولیتر از نمونه باکتری(با غلظت مشخص) ریخته شد و سپس حیوانات به مدت 8 روز تحت کنترل قرار گرفتند و تغییرات حاصله بر روی آنها ثبت گردید(11).

یافته‌ها

هضم وکتور(+)pET28a نوترکیب باآنزیم‌های محدودالأثر

پلاسمید نوترکیب خریداری شده به باکتری *E. coli BL21DE3* ترانسفورم شد. به منظور تایید حضور قطعه مورد نظر در وکتور بیانی (+)pET28a از هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالأثر BamH I استفاده شد که در این حالت ژن ipaD که حدودbp 320 طول دارد، از وکتور خارج شد. با هضم آنزیمی وکتور مورد نظر توسط آنزیم‌های محدودالأثر BamH I و Xho I ژن‌های ipaD و StxB که حدود 320 و bp230 طول دارد، از وکتور خارج شدند(شکل 1).

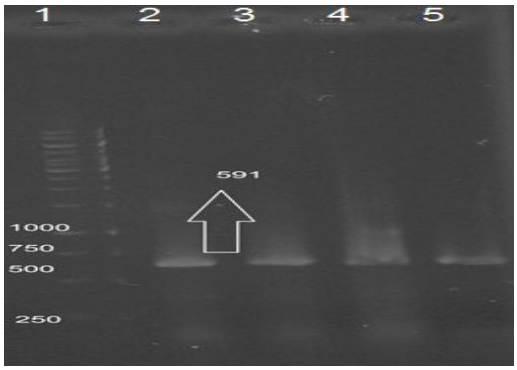


شکل1- تصویر حاصل از پلاسمید ژن صناعی روی ژل آگاروز 1 درصد. الف) تصویر سمت راست. ستون1: نشان‌گر مولکولیbp 10000. ستون 2: برش آنزیمی pET با آنزیم BamH I. ب) تصویر سمت چپ. ستون1: پلاسمید استخراج شده ژن صناعی.ستون2: نشان‌گر مولکولیbp10000. ستون 3: برش آنزیمی pET با دو آنزیم BamH I و Xho I به‌طور همزمان

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

تایید حضور ژن سنتتیک توسط PCR

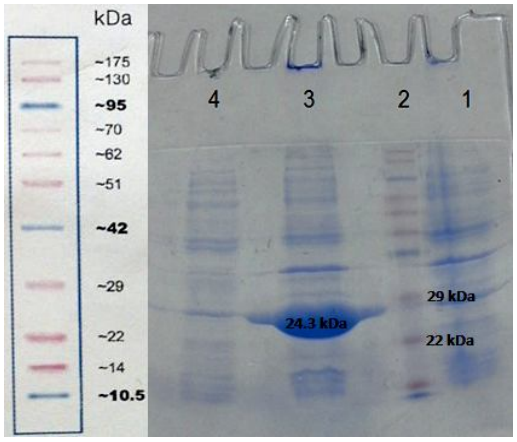
پس از استخراج پلاسمید، برای اطمینان از حضور ژن سنتتیک درون آن، روی محصول استخراج واکنش PCR انجام گرفت(شکل 2) (لازم به ذکر است پرایمرها از نواحی pET طراحی شده که حدود 44 باز به قطعه ژنی اضافه می‌شود).



شکل 2.تصویر حاصل از ژن صناعی روی ژل آگاروز 1درصد. ستون1: نشانگر مولکولی 10000 bp. ستون 2، 3، 4، 5: باند حاصل از PCR ژن سنتتیک و مشاهده قطعه 591 جفت بازی

بیان پروتئین STxB-IpaD و تخلیص آن

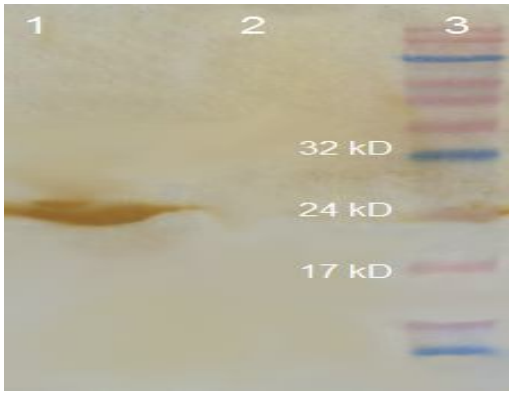
کلنی انتخابی در محیط کشت LB مایع در 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و پس از رسیدن به رشد کافی به منظور بیان پروتئین توسط IPTG یک میلی‌مولار القاء گردید و برای بررسی بیان و کیفیت آن روی ژل SDS-PAGE برده شد(شکل 3). باند پروتئینی مد نظر در جایگاه صحیح 24/3 کیلودالتون قرار گرفت در حالی که در کنترل‌ها هیچ باندی دیده نشد. پروتئین نوترکیب به کمک ستون نیکل خالص‌سازی گردید و غلظت پروتئین تولیدی به روش برادفورد اندازه‌گیری شد.



شکل 3. تصویر الکتروفورز SDS- PAGE 12 درصد حاصل از بیان پروتئین نوترکیب. ستون1: نمونه کنترل بدون القای IPTG. ستون2: نشانگر پروتئینی شماره PR0602. ستون 3: رسوب حاصل از سونیکاسیون نمونه القا شده IPTG. ستون 4: محلول‌رویی حاصل از سونیکاسیون.

آنالیز وسترن بلاتینگ با آنتی بادی ضد His-tag

بیان پروتئین مورد نظر به دلیل داشتن توالی His-tag به کمک وسترن بلات و به کارگیری آنتی بادی علیه His- tag مورد تائید قرار گرفت و باند وسترن در جایگاه صحیح مد نظر قرار گرفت اما در ستون کنترل هیچ باندی دیده نشد(شکل 4).

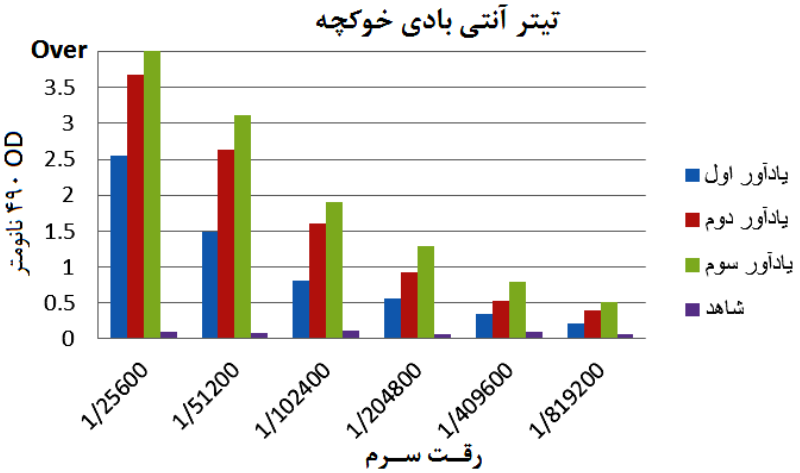


شکل 4. تاییدپروتئین نوترکیب بیان شده با استفاده ازروش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد برچسب هیستیدین. ستون1: پروتئین مورد نظر با القایIPTG، ستون2: نمونه کنترل بدون القای IPTG. ستون 3: نشانگر مولکولی PR0602

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

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

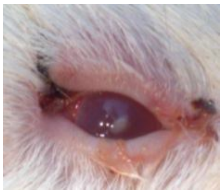
به منظور ارزیابی آنتی بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر بار تزریق از خوکچه‌های تست و شاهد، خون‌گیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آنها آزمایش الایزا انجام شد که نمودار میانگین تیتر آنتی بادی در هر مرحله در نمودار 1 نشان داده شده است. تیتر آنتی بادی در رقت‌های بسیار پایین(کمتر از 1/819200) نسبت به شاهد مثبت است که نشان می‌دهد امتزاج این دو پروتئین نقش آنتی‌ژنی و ادجوانتی را تشدید می‌کند.



نمودار 1. تیتراسیون سرم خوکچه هندی پس از هر تزریق. جذب در طول موج 490 نانومتر یادآور سوم در رقت 1/25600، در حد over (بالاتر از 3/5) بوده است.

چالش خوکچه‌های هندی با استفاده از باکتری شیگلا فلکسنری بیماری‌زا و نیز عصاره سلولی حاوی شیگا توکسین

به منظور انجام چالش مورد نظر، توسط قطره چکان، باکتری شیگلا فلکسنری 2a بیماری زا به درون چشمان حیوانات هر دو گروه تلقیح شد. نتایج نشان داد که تمامی حیوانات شاهد، به علت التهاب همزمان قرنیه و ملتحمه چشم(Keratoconjunctivitis)، بینایی خود را از دست دادند. این در حالی بود که در حیوانات ایمن شده، در مدت 6 -1 روز، فقط قرمز شدگی قرنیه چشم مشاهده شد(شکل 5، 6 و 7). علاوه بر این، 5 سر خوکچه توسط شیگا توکسین با غلظت 28 برابر LD50 نیز مورد چالش قرار گرفتند که در مدّت مشابه ذکر شده در بالا، زنده و سالم بودند.



شکل5. نمونه چشم خوکچه شاهد. پس از 48 ساعت

شکل 6. نمونه چشم خوکچه شاهد پس از 6 روز

شکل 7. نمونه چشم خوکچه ایمن شده پس از 6 روز

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

بحث

با توجه به اهمیت ناحیه N- ترمینال IpaD در ورود باکتری به سلول‌های میزبان، این ناحیه به عنوان کاندیدای واکسن مورد توجه محققین می‌باشد. توسعه تولید واکسن‌های جدید بر پایه آنتی ژن‌های حفاظتی خالص شده به علت ایمنی‌زایی پایین آنتی ژن‌های محلول و نبودن ادجوانت مخاطی موثر و ایمن، دچار اختلال گردیده است. برای برطرف کردن این نقص و بالا بردن میزان ایمنی زایی IpaD، آن را با ادجوانت همراه می‌کنند. نتایج تحقیقات انجام شده نقش حاملی(delivery)، آنتی ژنی و ادجوانتی STxB را اثبات کرده‌اند. در این تحقیق، خاصیت ایمنی زایی پروتئین IpaD و خاصیت آنتی ژنی و ادجوانتی STxB به طور هم‌زمان مد نظر بوده است.

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 شده‌است. 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 شده‌است(3، 12).

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. بنابر این لازم است که سوش‌های بومی ایران به منظور تهیه واکسن مورد مطالعه قرار گیرند(13، 14). به صورت رایج هیچ‌گونه واکسنی برای شیگلا در دسترس نیست. هر چند که سلول‌هایT 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* تیپ1 هنوز هم عمده‌ترین علت اصلی اپیدمی اسهال، در صد سال اخیر می‌باشد و نسبت مرگ ومیر آن در کشورهای جهان متفاوت است(13، 14). باکتری شیگلا با به کارگیری سیستم ترشحی نوع 3 فاکتورهای بیماری‌زای خود را به سلول میزبان انتقال می‌دهد. IpaD فاکتوری است که در راس 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 عملکردIpaD به عملکرداین ناحیه بستگی دارد به نحوی که اگر فعالیت آن سرکوب گردد به طور کلی قابلیت تهاجم شیگلاسرکوب می‌شود(5، 6).

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 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 فرایند 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 آنتی ژن بالقوه در طراحی واکسن مطرح است(15).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

آخرین تحقیقات برای ساخت واکسن علیه باکتری شیگلا دیسانتری به سال 2008 برمی‌گردد 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 همچنین با طراحی آزمایشاتی نشان دادند که قبل از به کارگیری سایر پروتئین‌های موثر بر روی سطح باکتری، این آنتی‌بادی با تداخل در عملکرد IpaD که در راس سوزن قرار گرفته است آن را بلوکه کرده و بدین ترتیب مانع انجام عملکرد آن می‌گردد(15). این گروه که در سازمان (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 ممزوج 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. 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 بیولوژیکی داخل بدن نیز با استفاده از روده خرگوش(Intestinal iliac loops Rabbit) 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، درصورتی که در آزمایش کنترل منفی که باکتری بدون حضور آنتی‌بادی درون روده خرگوش قرار گرفت سرتاسر روده دچار ضایعه شد(15).

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 از مزیت متصل کردن آنتی ژن‌ها با ادجوانت‌های مختلف دارد. امروزه توجه خاصی به واکسن‌هایی شده است که دارای این مزیت هستند(15).

در رابطه با ژن stxB در سراسر جهان مطالعات و بررسی‌های گوناگونی به عمل آمده، ژن نام‌برده در موجودات مختلفی از E. coli گرفته تا انواع گیاهان مثل کاهو و ... همسانه‌سازی شده است(16، 17) در سال 2005 به منظور افزایش ایمنی‌زایی مخاطی علیه STxB تلاش شد که در طی آن پروتئین تخلیص شده STxB را به کمک میکروسفرهای لیپیدی سنتتیک به صورت نازال تلقیح کردند و نتایج آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی را نشان می‌داد. در این راستا در سال 2008 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(18). در یک مطالعه جداگانه در همین سال تلاش برای ساخت یک واکسن نازال (دماغی) از طریق خالص سازی پروتئین STxB و تلقیح آن صورت پذیرفت. در کل مطالعات نشان می‌دهد که به خاطر وزن مولکولی پایین STxB پاسخ ایمنی ناچیزی علیه آن دیده می‌شود و این امر استفاده STxB به عنوان ادجوانت را کاملا شرح می‌دهد(10، 11).

نتیجه‌گیری

نتایج چالش خوکچه‌های هندی ایمن شده با پروتئین نوترکیب IpaD-StxB نشان داد که آنها می‌توانند شیگا توکسین *E. coli O157:H7* و باکتری شیگلا فلکسنری را تحمل نمایند. پروتئین IpaD خاصیت ایمنی‌زایی و پروتئین StxB خاصیت ادجوانتی و آنتی‌ژنی در مقابل شیگا توکسین دارند، از امتزاج ژن مربوط به این دو

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

پروتئین و بررسی ایمنی‌زایی هم‌زمان آنها، پاسخ مثبت مناسب گرفته شد. بنابر این نتیجه این تحقیق بیانگر آن است که پروتئین حاصل از امتزاج ژن‌های ipaD و stxB، می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا و *E. coli O157:H7* باشد.

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. Key B, Clemens J. Generic protocol to estimate the burden of shigelladiarrhea and dysenteric mortal. Tex Book. 1999. P. 146-51.
2. Swapan KN. Shigellosis. The Journal of Microbiology. 2005. 133-43.
3. Safaei S, Honari H, Mousavy M, Aghil 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):10-25.
4. Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig K. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. Microbial biotechnology. 2011;4(1):32-46.
5. Lunelli M, Lokareddy RK, Zychlinsky A, Kolbe M. IpaB–IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106(24):9661-6.
6. Hromockyj A, Maurelli A. Identification of Shigella invasion genes by isolation of temperature-regulated inv: lacZ operon fusions. Infection and immunity. 1989;57(10):2963-70.
7. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 1-3. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
8. Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: Cloning, expression, purification, and proteolytic activity. Protein expression and purification. 1999;15(2):221-7.
9. Daniel M, Bollag S, Edelstein G. Protein methods: Wiley-Liss New York; 1992.
10. Madanchi H, Honari H, Hesaraki H, Sayadnanesh A. Cloning and expression of stxBgene from shigella dysenteria typeI in *E. coli* Rosseta DE3.Genetics in the 3rd millennium. 2012.P.2641-7.
11. 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):8094-100.
12. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clinical microbiology reviews. 2008;21(1):134-56.
13. Ranjbar R, Dallal MS, Pourshafie M, Aslani M, Majdzadeh R. Serogroup distribution of shigella in Tehran. Iranian Journal of Public Health. 2004;33(3):32-5.
14. Ranjbar R, Haghi-Ashtiani M, Jafari NJ, Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. Iranian Journal of Public Health. 2009;38(2):134-8.
15. Chia M-Y, Hsiao S-H, Chan H-T, Do Y-Y, Huang P-L, Chang H-W, 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. Veterinary microbiology. 2010;146(3):189-99.
16. De Magistris MT. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. Advanced drug delivery reviews. 2006;58(1):52-67.
17. 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):2657-65.
18. 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. Clinical and Vaccine Immunology. 2008;15(2):359-66.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 23:38 +0330 on Wednesday November 22nd 2017