

## Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein

Honari H<sup>1\*</sup>, Amlashi I<sup>1</sup>, Minaei ME<sup>1</sup>, Safaei S<sup>1</sup>

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 flexneri 2a and active toxin of *E. coli* O157:H7.

**Results:** The results showed that groups of guinea pigs challenged with 28×LD<sub>50</sub> of toxin completely survived. Furthermore, guinea pigs were challenged by inducing Shigella flexneri 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:

## ایمنی زایی خوکچه هندی با پروتئین نو ترکیب IpaD-StxB

حسین هنری<sup>1\*</sup>، ایمان املشی<sup>2</sup>، محمد ابراهیم مینایی<sup>3</sup>، صادق صفایی<sup>2</sup>

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 نانویوتکنولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/12/15 تاریخ 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 ایمنی‌زایی، 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 صناعتی تهیه گردید و با انتقال این ژن به درون باکتری *E. coli BL21 DE3*، به وسیله 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 نو ترکیب 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<sub>50</sub> شیگلا 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 نو ترکیب علیه انواع شیگلا باشد.

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

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

Email: Honari.hosein@gmail.com

## 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. شیگلایهای زیادی در طی سالهای بعد شناسایی شدند اما مهم ترین آنها از نظر بیماری زایی و بروز اپیدمیها، چهار سروتیپ بودند که بر اساس پلی ساکارید اختصاصی O در لیپوپلی ساکارید (Lipopolysaccharides- LPS) طبقه بندی می شوند و به نامهای شیگلا دیسانتری (*S.dysenteriae*)، فلیکسنری (*S.flexneri*)، شیگلا سونئی (*S.sonnei*)، شیگلا بویدی (*S.boydii*) نام گذاری شدند. اسهال خونی با عامل شیگلا در بیشتر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان سریع به مرگ می انجامد. 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 می شود. مقاومت آنتی بیوتیکی در شیگلا به طور چشم گیری 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 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 که باعث تورم و ایجاد زخمهای سطحی، تجمع پلی نوکلوترها و بالاخره نکروز و خونریزی می گردد و به صورت بلغم و خون همراه با مدفوع دفع می شود. در مرحله دوم باکتری تولید شیگا توکسین کرده و به سلولهای اپیتلیال روده بزرگ حمله و سبب آماس و زخمهایی روی دیواره روده می گردد که نتیجه آن اسهال خونی است. سالیان زیادی است که شیگا توکسین یا STx به عنوان یکی از عوامل ویروالانس 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 زیر واحد مونومریک 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 می باشد. STxB ساختار هموپنتامریک (5 زیر واحدی) دارد. هر مونومر آن از 69 اسید آمینه (207 جفت باز) تشکیل شده و وزن ملکولی حدود 7/7 کیلودالتون دارد. هر مونومر از یک مارپیچ آلفا ( $\alpha$  helix) و 6 صفحه  $\beta$  ( $\beta$  sheet) تشکیل شده است. این 5 مونومر به طریقی تاخوردگی پیدا می کنند که صفحات  $\beta$  در سطح خارجی و مارپیچهای آلفا در داخل قرار می گیرند. STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb<sub>3</sub> متصل می گردد که روی اکثر سلولهای بدن بیان می شود. پیش بینی می شود که با تولید آنتی بادی علیه STxB و خنثی سازی آن می توان از اتصال و ورود قسمت سمی (STxA) به درون سلول هدف جلوگیری به عمل آورد. علاوه بر این از این زیر واحد در زمینه های مختلفی همچون انتقال دهنده آنتی ژن ها و داروهای ضد سرطان به سلول سرطانی و همچنین تصویر برداری از تومور به کمک مواد فلوروسنت استفاده می گردد (4، 5). پروتئین Invasion plasmid antigen D (IpaD) یکی از حیاتی ترین و مهم ترین فاکتورهای بیماری زای موجود در انواع شیگلا می باشد به نحوی که سرآغاز و گذرگاه تمام فعالیت های تهاجمی شیگلا مرهون فعالیت کلیدی IpaD می باشد. سیستم ایمنی بدن انسان و میمون پروتئین IpaD را به عنوان یک عامل آنتی ژنیک قوی شناسایی کرده و علیه آن پاسخ می دهد. پروتئین IpaD دارای 3 ناحیه اصلی N-ترمینال، ناحیه مرکزی، ناحیه C-ترمینال می باشد. ناحیه C-ترمینال IpaD یک ناحیه هیدروفوب بوده و در دسترس محیط نمی باشد. 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 IpaD- stxB به عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری شیگلوزیس و بررسی بیان و ایمنی زایی آن در خوکیه هندی می باشد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، جهت طراحی کاست ژنی ipaD- stxB توالی کامل ژن‌های ipaD و stxB 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 صنعتی در وکتور pET-28a(+) تهیه گردید. کاست طراحی شده به‌طور شماتیک به‌صورت ipaD- NdeI- linker(RKKR)- stxB-uaa-XhoI بود که 591 نوکلئوتید دارد.

### تایید ژن‌های صنعتی ipaD و stxB با روش PCR

وکتور بیانی pET28a(+) دارای ژن‌های صنعتی ipaD و stxB 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 صنعتی ipaD و stxB

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 پرموتور IPTG (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 دنا توره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل 12 درصد با جریان ثابت 25 میلی‌آمپر بود (8، 9).

### تایید پروتئین نو ترکیب

برای تایید پروتئین نو ترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن (Mini Protean) Bio-rad و بافر انتقال (گلاسیسین 192 میلی‌مولار، تریس 25 میلی‌مولار، SDS 0/1 درصد و متانول 20 درصد و pH: 8/3) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. کاغذ نیتروسولوز با استفاده از بافر PBST (37 NaCl) میلی‌مولار، 2/7 KCl میلی‌مولار، 4/3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O میلی‌مولار، 2/7 KCl میلی‌مولار، 5 درصد شیر خشک به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست‌شو 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 شست‌شو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سوبسترا (50 میلی‌مولار بافر تریس و pH: 7/8 حاوی 6 میلی‌گرم DAB، 10 میکرولیتر H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیتروسولوزی، واکنش با استفاده از H<sub>2</sub>O متوقف گردید (8-10).

### تخلیص پروتئین نو ترکیب

پروتئین حاصل تحت شرایط دنا توره 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 آنتی‌بادی علیه پروتئین IpaD-STxB

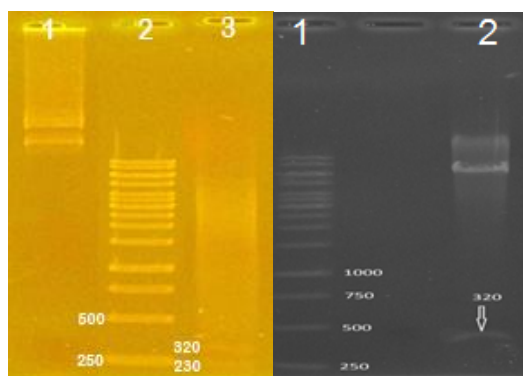
به میزان 25 میکروگرم از پروتئین IpaD-STxB در چهار نوبت، بار اول همراه با ادجوانت کامل و در نوبت‌های بعدی با ادجوانت ناقص فروند به ترتیب به خوکیچه هندی تزریق و در نهایت از خوکیچه‌های هندی

برای خوکیه هندی از سوش حاد مقدار  $6 \times 10^8$  CFU بود. در این مطالعه غلظتی از باکتری تهیه گردید که هر 25 میکرولیتر آن حاوی  $6 \times 10^8$  CFU باکتری باشد. در انتها در چشم هر 6 خوکیه 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).

#### یافته ها

#### هضم وکتور (+) pET28a نو ترکیب با آنزیم های محدود الاثر

پلاسمید نو ترکیب 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 محدود الاثر BamH I استفاده شد که در این حالت ژن ipaD که حدود 320 bp طول دارد، از وکتور خارج شد. با هضم آنزیمی وکتور مورد نظر توسط آنزیم های محدود الاثر BamH I و Xho I ژن های ipaD و StxB که حدود 320 و 230 bp طول دارد، از وکتور خارج شدند (شکل 1).



شکل 1- تصویر حاصل از پلاسمید ژن صنعتی روی ژل آگاروز 1 درصد. الف) تصویر سمت راست. ستون 1: نشانگر مولکولی 10000 bp. ستون 2: برش آنزیمی pET با آنزیم BamH I. ب) تصویر سمت چپ. ستون 1: پلاسمید استخراج شده ژن صنعتی. ستون 2: نشانگر مولکولی 10000bp. ستون 3: برش آنزیمی pET با دو آنزیم BamH I و Xho I به طور همزمان

خون گیری و توسط آزمایش ایزا تیترا آنتی بادی آن اندازه گیری شد (8-10).

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

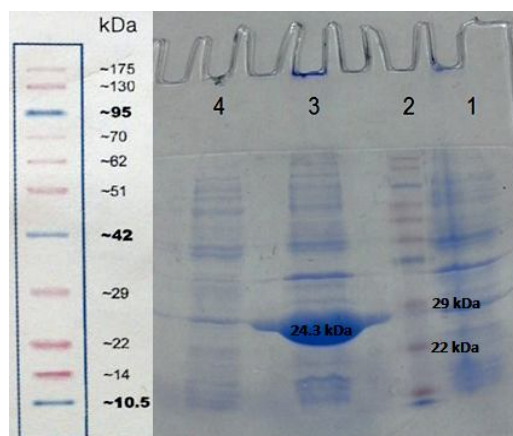
کلونی های خالص *E. coli* O157:H7 به درون 5 میلی لیتر آب گوشت Brain-Heart infusion (BHI) تلقیح و یک شب در 37 درجه سانتی گراد و 200rpm انکوبه شدند. سپس 1 درصد از حجم این محیط به 300 میلی لیتر محیط BHI تازه تلقیح و به مدت 24 ساعت با شریط بالا انکوبه و پس از آن، سانتریفیوژ انجام شد و سلول ها با سرعت 10000g به مدت 10 دقیقه در 4 درجه سانتی گراد جمع آوری شدند. توده سلولی حاصل، دوباره در 50 میلی مولار) با pH=8 شناور و به مدت یک ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس بافر لیز کننده اضافه و در مرحله بعد، سلول ها با استفاده از سونیکاسیون لیز شدند و سپس سانتریفیوژ با سرعت 10000g به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد، انجام شد. محلول رویی حاصل، محتوی شیگا توکسین می باشد که با استفاده از فیلتر 0/22 میکرون (میلی پور)، تخلیص شد (4). با تزریق عصاره سلولی فوق (با نسبت های 1000، 200، 300، 500، 750، 100) به خوکیه های شاهد، میزان LD50 آن از فرمول  $Y=A+bX$  محاسبه گردید. خوکیه های 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 ایمن سازی 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

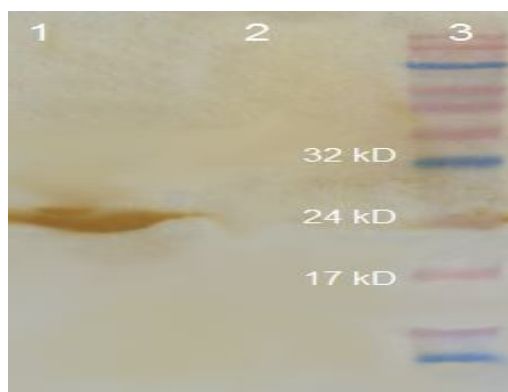
بعد از ایمن سازی حیوانات، از سویه حاد شیگلافلکسنری (مورد تایید بیمارستان بقیه اعظم) برای چالش استفاده شد. بر طبق منابع (IEO) حداقل دوز آلودگی



شکل 3. تصویر الکتروفورز SDS-PAGE 12 درصد حاصل از بیان پروتئین نو ترکیب. ستون 1: نمونه کنترل بدون القای IPTG. ستون 2: نشانگر پروتئینی شماره PR0602. ستون 3: رسوب حاصل از سونیکاسیون نمونه القا شده IPTG. ستون 4: محلول رویی حاصل از سونیکاسیون.

#### آنالیز وسترن بلائینگ با آنتی بادی ضد His-tag

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

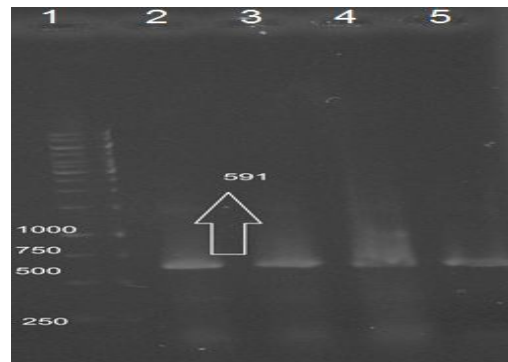


شکل 4. تایید پروتئین نو ترکیب بیان شده با استفاده از روش وسترن بلائینگ با استفاده از آنتی بادی ضد برچسب هیستیدین. ستون 1: پروتئین مورد نظر با القای IPTG، ستون 2: نمونه کنترل بدون القای IPTG. ستون 3: نشانگر مولکولی PR0602

ارزیابی تیتراژ آنتی بادی ضد پروتئین نو ترکیب به روش الایزای غیر مستقیم

#### 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 می شود).



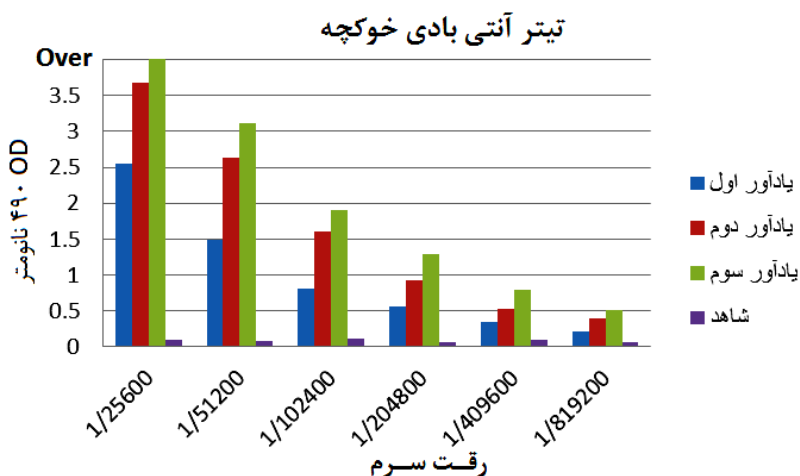
شکل 2. تصویر حاصل از ژن صناعی روی ژل آگاروز 1 درصد. ستون 1: نشانگر مولکولی 10000 bp. ستون 2، 3، 4، 5: باند حاصل از PCR ژن سنتتیک و مشاهده قطعه 591 جفت بازی

#### بیان پروتئین STxB-IpaD و تخلیص آن

کلنی انتخابی در محیط کشت LB مایع در 37 درجه سانتی گراد کشت داده شد و پس از رسیدن به رشد کافی به منظور بیان پروتئین توسط IPTG یک میلی مولار 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 کیلوالتون قرار گرفت در حالی که در کنترلها هیچ بانندی دیده نشد. پروتئین نو ترکیب به کمک ستون نیکل خالص سازی گردید و غلظت پروتئین تولیدی به روش برادفورد اندازه گیری شد.

آنتی بادی در هر مرحله در نمودار 1 نشان داده شده است. تیتراژ 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.

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 تیتراژ

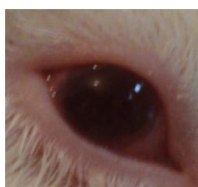


نمودار 1. تیتراژیون سرم خوکچه هندی پس از هر تزریق. جذب در طول موج 490 نانومتر یادآور سوم در رقت 1/25600، در حد over (بالاتر از 3/5) بوده است.

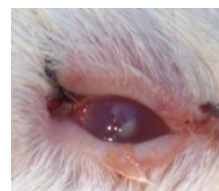
دست دادند. این در حالی بود که در حیوانات ایمن شده، در مدت 6-1 روز، فقط قرمز شدگی قرنیه چشم مشاهده شد (شکل 5، 6 و 7). علاوه بر این، 5 سر خوکچه توسط شیگا توکسین با غلظت 28 برابر LD50 نیز مورد چالش قرار گرفتند که در مدت مشابه ذکر شده در بالا، زنده و سالم بودند.

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

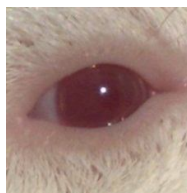
به منظور انجام چالش مورد نظر، توسط قطره چکان، باکتری شیگلا فلکسنری 2a بیماری‌زا به درون چشمان حیوانات هر دو گروه تلقیح شد. نتایج نشان داد که تمامی حیوانات شاهد، به علت التهاب هم‌زمان قرنیه و ملتحمه چشم (Keratoconjunctivitis)، بینایی خود را از



شکل 6. نمونه چشم خوکچه شاهد پس از 6 روز



شکل 5. نمونه چشم خوکچه شاهد. پس از 48 ساعت



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

## 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 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 بوئییدی 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 (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 سلول‌های T در حفاظت علیه شیگلا نقش دارند اما برای ایمن شدن ضروری نیستند. داده‌های حاصل از چندین

مطالعه نشان دادند که پاسخ ایمنی همورال 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 1 هنوز هم عمده‌ترین علت اصلی اپیدمی اسهال، در صد سال اخیر می‌باشد و نسبت مرگ و میر 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 عملکرد IpaD به عملکرد این ناحیه بستگی دارد به نحوی که اگر فعالیت آن سرکوب گردد به طور کلی قابلیت تهاجم شیگلا سرکوب می‌شود (5، 6).

مطالعات انجام گرفته نشان دادند که آنتی‌بادی‌هایی که ناحیه N- ترمینال پروتئین IpaD را شناسایی می‌کنند توانایی برهم کنش این پروتئین با نمک‌های صفراوی و 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).



تحقیقات صورت گرفته مشخص کردند که مقدار آنتی ژنی که در حالت فیوژن شده با یک ادجوانت برای مصرف ضروری است، کمتر از مقداری می باشد که به صورت تجویز همزمان (Co-Administered) برای ایمنی زایی استفاده می گردد که این نشان از مزیت متصل کردن آنتی ژن ها با ادجوانت های مختلف دارد. امروزه توجه خاصی به واکسن هایی شده است که دارای این مزیت هستند (15).

در رابطه با ژن *stxB* در سراسر جهان مطالعات و بررسی های گوناگونی به عمل آمده، ژن نام برده در موجودات مختلفی از *E. coli* گرفته تا انواع گیاهان مثل کاهو و ... همسانه سازی شده است (16، 17) در سال 2005 به منظور افزایش ایمنی زایی 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 می داد. در این راستا در سال 2008 در یک پروژه تحقیقاتی ژن *stxB* در باکتری *E. coli* کلون شده و بیان آن بررسی گردید و ایمنی زایی 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 می دهد که به خاطر وزن مولکولی پایین *STxB* پاسخ ایمنی ناچیزی علیه آن دیده می شود و این امر استفاده *STxB* به عنوان ادجوانت را کاملاً شرح می دهد (10، 11).

### نتیجه گیری

نتایج چالش خوکی هندی ایمن شده با پروتئین نو ترکیب *IpaD-StxB* نشان داد که آنها می توانند شیگا توکسین *E. coli O157:H7* و باکتری شیگلا فلکسنری را تحمل نمایند. پروتئین *IpaD* خاصیت ایمنی زایی و پروتئین *StxB* خاصیت ادجوانتی و آنتی ژنی در مقابل شیگا توکسین دارند، از امتزاج ژن مربوط به این دو

آخرین تحقیقات برای ساخت واکسن علیه باکتری شیگلا دیسانتری به سال 2008 برمی گردد که در آن گروهی از محققین نشان دادند که پلی پپتید *IpaD* و مشتقات عملکردی آن می تواند منجر به تولید آنتی بادی *Anti-IpaD* گردد. آن ها همچنین با طراحی آزمایشاتی نشان دادند که قبل از به کارگیری سایر پروتئین های موثر بر روی سطح باکتری، این آنتی بادی با تداخل در عملکرد *IpaD* که در راس سوزن قرار گرفته است آن را بلوکه کرده و بدین ترتیب مانع انجام عملکرد آن می گردد (15). این گروه که در سازمان World intellectual (WIPO) property organization از آن ها با عنوان مخترعان یاد می شود در آزمایشی پس از تولید آنتی بادی *Anti-IpaD* برای تعیین صحت کار در محیط درون شیشه، یک گروه از باکتری های شیگلا را با آنتی بادی های *Anti-IpaD* و گروه دیگری از آن ها را با *Anti-IpaB* ممزوج کردند و سپس این باکتری ها را در مجاورت سلول های هلا قرار دادند. نتیجه به این ترتیب بود که باکتری هایی که در مجاورت *Anti-IpaB* قرار گرفته بودند هم چنان قابلیت تهاجم به سلول های هلا را داشتند در صورتی که فعالیت باکتری هایی که در مجاورت *Anti-IpaD* قرار گرفته بودند به طور کامل بلوکه شده بود. این موضوع با تحقیقات دیگر در این زمینه که عنوان می کند آنتی بادی علیه *IpaD* می تواند توانایی باکتری را برای تهاجم ساقط نماید هم خوانی 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 آنتی بادی *Anti-IpaD* با روش ایمونیزه کردن خرگوش ها، آنتی بادی ها را در رقت های مختلف با باکتری شیگلا مخلوط نموده و از آن در آزمایش *Rabbit Intestinal iliac loops* استفاده شد. نتایج این گونه بود که در غلظت های اولیه آنتی بادی هیچ گونه ضایعه ای در روده ایجاد نشد، در صورتی که در آزمایش کنترل منفی که باکتری بدون حضور آنتی بادی درون روده خرگوش قرار گرفت سرتاسر روده دچار ضایعه شد (15).

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, Sayadnanes A. Cloning and expression of stxB gene from shigella dysenteria type I 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

پروتئین و بررسی ایمنی زایی همزمان آنها، پاسخ مثبت مناسب گرفته شد. بنابر این نتیجه این تحقیق بیانگر آن است که پروتئین حاصل از امتزاج ژن های ipaD و stxB می تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن نو ترکیب 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 می شود.

### 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 dysenteria and Ricin toxin B Subunit. Genetics in the 3<sup>rd</sup> 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.

toxin-producing *Escherichia coli* infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008;15(2):359-66.

GFP as a tracker and its fusion mediated by PRARR flexible linkers to CTB-STB chimerical vaccine genes. *Genetics in the 3<sup>rd</sup> millennium*. 2012;10(1):2657-65.

18. Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B, et al. Protection against Shiga