مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۵، شماره ۱۱، بهمن ۱۳۹۷ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:03 IRDT on Saturday May 11th 2019

بیان کاست ژنی *SO6-STxB* در باکتری اشرشیا کلی و بررسی تیتر آنتی‌بادی

مسعود عبدالهی: کارشناس ارشد زیست‌شناسی، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

حسین هنری: دانشیار و متخصص ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران (*نویسنده مسئول)
hhonari@ihu.ac.ir

سید مسیح اعتماد ایوبی: دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: یکی از راه‌های تقویت اثر واکسن‌ها استفاده از یاورها می‌باشد. *STxB* باکتری *شیگلا* دارای نقش یاوری و حاملی بوده و می‌توان با ترکیب کردن آنتی‌ژن‌های کاندیدای واکسن با این یاور به تولید واکسن مناسب پرداخت. غاسول صابونی گیاهی دارای فعالیت ان-گلیکوزیداز می‌باشد. ایزوفرم ۶ این گیاه (SO6)، آذنین 4324 را در توالی حفاظت شده GAGA در 28SrRNA پورین‌زدایی کرده و سنتز پروتئین را مختل می‌کند. هدف این مطالعه، بیان ژن *SO6-STxB* در باکتری اشرشیا کلی و بررسی تیتر آنتی‌بادی آن در موش می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی ژن *SO6* با جایگاه‌های آنزیمی BamHI و SalI از پلاسمید pUC57 جداسازی گردید و در وکتور بیانی pET28a(+) حاوی ژن *STxB* زیرهمسانه‌سازی و به باکتری اشرشیا کلی سویه BL21(DE3) ترانسفورم شد. بیان پروتئین نوترکیب SO6-STxB توسط IPTG القا و تخلیص به وسیله کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل انجام گردید. تأیید پروتئین نوترکیب با استفاده از وسترن بلات انجام گرفت. موش‌ها به صورت صفاقی با پروتئین تخلیص شده واکسینه شدند و تیتر IgG سرم به روش ELISA مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: زیرهمسانه‌سازی ژن *SO6-STxB* در وکتور بیانی pET28a(+) به‌وسیله واکنش PCR و هضم آنزیمی، تائید شد. پروتئین نوترکیب ۳۷/۵ کیلودالتونی تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن تأیید شد. سپس آنتی‌بادی تولید شده از سرم موش جداسازی و توسط الایزا اندازه‌گیری گردید.

نتیجه‌گیری: آنتی‌ژن SO6-STxB نوترکیب تخلیص شده می‌تواند برای تحقیقات ضد سرطانی و کاندید واکسن استفاده شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

STxB،
شیگلا،
غاسول صابونی،
فعالیت N-glycosidase،
SO6

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۲۲

شیوه استناد به این مقاله:

Abdollahi M, Honari H, E'temad Ayubi SM. Expression of *SO6-STxB* gene cassette in *Escherichia coli* and investigation of antibody titer. Razi J Med Sci.2019;25(11):52-60.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 1.0 صورت گرفته است.

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:03 IRDT on Saturday May 11th 2019

Razi Journal of Medical Sciences.2019;25(11):52-60. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Expression of *SO6-STxB* gene cassette in *Escherichia coli* and investigation of antibody titer

Masoud Abdollahi, MSc, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran, Iran
Hossien Honari, PhD, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran Iran (*Corresponding author) hhonari @ihu.ac.ir
Seyed Masih E'temad Ayubi, PhD Student of Nanobiotechnology, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran, Iran

Abstract

Background: One of the ways to strengthen the effect of vaccines is the use of adjuvant. STxB has a carrier role and can act as an adjuvant; thus it can be fused with vaccine candidate antigens in order to produce efficient vaccines. *Saponaria officinalis* is a plant that has shown N-glycosidase activity. *SO6* isoform of this plant, depurinates the adenine 4324 in the conserved sequence GAGA in 28SrRNA and disrupts protein synthesis. The aim of this study was expression of *SO6-STxB* gene in *Escherichia coli* (*E. coli)* and investigation of antibody titer in mice.

Methods: In this study *SO6* gene with *Bam*HI and S*al*I restriction enzyme sites were isolated from pUC57 plasmid and subcloned into pET28a (+) -*STxB* expression vector and transferred to *E. coli* BL21 (DE3). Expression of *SO6-STxB* gene cassette was induced by IPTG and purified by nickel affinity chromatography. The recombinant protein was confirmed by western blotting. Mice were immunized intraperitoneally with purified protein and serum IgG titers were measured by ELISA.

Results: Subcloning of *SO6–STxB* gene in pET28a (+) expression vector was confirmed by PCR and enzyme digestion reaction. A 37/5 kDa recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and western blotting. The antibody generated from mouse serum was isolated and confirmed by ELISA.

Conclusion: Purified recombinant antigen STxB-SO6 can be used for research and be a suitable anti-cancer vaccine candidates.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Keywords
STxB,
Sigella,
Saponaria Officinalis, N-glycosidase activity, SO6

Received: 06/09/2018
Accepted: 13/12/2018

Cite this article as:
Abdollahi M, Honari H, E'temad Ayubi SM. Expression of *SO6-STxB* gene cassette in *Escherichia coli* and investigation of antibody titer. Razi J Med Sci.2019;25(11):52-60.

This work is published under CC BY-NC-SA 1.0 licence.

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:03 IRDT on Saturday May 11th 2019

مقدمه

گیاهان مجموعه‌ای از مکانیسم‌های دفاعی القایی و ساختمانی برای حفاظت در مقابل بیماری‌زایی ویروسی، باکتریایی و قارچی را در طول دوره تکامل کسب کرده‌اند. یکی از این سازوکارهای دفاعی، به‌کارگیری مواد شیمیایی است که ماهیت پروتئینی با وزن مولکولی کم داشته و پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم (Ribosome Inactivating Proteins-RIP) نامیده می‌شوند. این پروتئین‌ها می‌توانند به میزان زیاد و در پاسخ به آلودگی‌ها و دیگر تنش‌ها در گیاهان جمع شوند و با غیرفعال کردن ریبوزوم‌ها فرآیند پروتئین‌سازی را متوقف کنند. پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم اولین بار در سال ۱۹۸۳ شناسایی و جداسازی شدند. این ترکیب‌ها دارای گروه‌های متنوعی هستند و از منابع مختلف گیاهی، باکتریایی و قارچ سنتز می‌شوند. RIPهای نوع I پروتئین‌های مونومری با وزن مولکولی تقریباً ۳۰ کیلودالتون هستند که دارای فعالیت آنزیمی RNA- آن گلیکوزیدازی می‌باشند. در مقابل، ترکیبات دسته دوم هستند که شامل پروتئین‌های مشتق شده از ۲ رشته شامل زنجیر A با فعالیت آنزیمی RNA N-glycosidas و یک یا چند زنجیره B بوده که این زنجیره سبب ورود راحت‌تر این پلی‌پپتید به سیتوپلاسم می‌شود. وزن مولکولی این نوع از پلی‌پپتیدها تقریباً ۳۵ کیلودالتون می‌باشند. معمولاً زنجیرهای B از پپتیدهای شبه لکتین تشکیل شده‌اند. یکی از این پروتئین‌ها، ساپورین SO6 می‌باشد که جز خانواده نوع I بوده و بیشتر از دانه گیاه غاسول صابونی (Saponaria Officinalis) استخراج می‌شود (۱). در مورد ساپورین خانواده چند ژنی وجود دارد که حداقل ۱۰ ایزوفرم پروتئینی متفاوت از بخش های مختلف گیاه، مانند دانه، برگ، ریشه استخراج شده است (۲). سمی ترین ایزوفرم‌های ساپورین ایزوفرم ۵، ۶ و ۹ می‌باشد. نتایج تطبیق توالی ایزوفرم‌ها به صورت: ایزوفرم ۱: ۹۵٪، ایزوفرم ۲: ۹۵٪، ایزوفرم ۳: ۹۰٪، ایزوفرم ۴: ۹۸٪، ایزوفرم ۵: ۹۸٪، ایزوفرم ۶: ۱۰۰٪، ایزوفرم ۷: ۹۸٪، ایزوفرم ۸: ۹۸٪ و ایزوفرم ۹: ۹۱٪ بوده و بیشترین افتراق با ایزوفرم ۶ مربوط به ایزوفرم ۹ می‌باشد. پروتئین بالغ ساپورین S6 دارای ۲۵۳ اسید آمینه است. توالی کامل ساپورین S6 در سال ۱۹۹۰ شناسایی شد و تقریباً ۱۰ درصد اسیدهای آمینه را در ساپورین S6 اسید آمینه لیزین تشکیل داده است (۳). این پروتئین علاوه برفعالیت ضدویروسی و ضدقارچی(۴و ۵)، توانایی از بین بردن سلول‌ها را از طریق اختلال در سنتز پروتئی آن‌ها داشته و می‌توانند به عنوان عوامل فعال بیولوژیک و ضد سرطان استفاده شوند. از آنجایی‌که پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزومی ایمنی زایی قوی را ایجاد می‌کند برای کاهش این پدیده می‌توان آن‌ها را با اضافه کردن پلی-اتیلن‌گلیکول یا اضافه کردن دکستران ترکیب کرد (۶).

شیگلا برای انسان بیماری‌زا می‌باشد. شیگلا یک باکتری دراز، بدون کپسول، غیر متحرک، فاقد اسپور و تاژک می‌باشد (۷). توکسین شیگلا (STx) یک پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلودالتون بوده که از یک زیرواحد منومریک سمی وآنزیماتیک به نام STxA و از یک زیرواحد متصل شونده به رسپتور هموپنتامریک به نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیر سمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری می‌باشد (۸). STxB ساختار هموپنتامریک دارد که هر منومر آن از ۲۰۷ نوکلئوتید و ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و وزن ملکولی حدود ۷/۷ کیلودالتون دارد. هر منومر از یک مارپیچ آلفا و ۶ صفحه β تشکیل شده است (۹). STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb3 متصل می‌گردد که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود (۷). 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 (۹). در سال ۲۰۰۵، ناک وون چوی و همکاران، ایمنی-زایی خوراکی STxB فیوژ شده با ویروس NSP490 را به اثبات رساندند (۱۰). در سال ۲۰۰۵ به منظور تقویت ایمنی‌زایی علیه STxB این پروتئین را با پروتئین هموسیانین کانجوگه کرده در بررسی ایمنی زایی

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:03 IRDT on Saturday May 11th 2019

پروتئین کایمریک پاسخ ایمنی به طور ناچیزی بهبود یافت و IgG1 ترشحی قوی‌تری ایجاد گردید (۱۱). هدف این مطالعه بیان ژن SO6-STxB در اشرشیا کلی و بررسی تیترآنتی‌بادی آن در موش سوری بود که با موفقیت انجام شد. در آینده می‌توان آنتی ژن تولید شده را جهت بررسی‌های بیشتر به عنوان تولید کاندید واکسن و داروی ضد سرطان مورد استفاده قرار داد.

روش کار

در این مطالعه جهت ساخت کاست ژنی SO6-STxB ژن SO6 گیاه غاسول صابونی و ژن STxB کلون شده در pET-28a(+) ازآزمایشگاه مولکولی دانشگاه جامع امام حسین (ع) دریافت شد (۱۵-۱۲). کاست طراحی شده به طور شماتیک به صورت BamHI-SO6-Linker(RARR)-STxB-uaa-XhoI می‌باشد.

برای ساخت کاست ژنی ابتدا واکنش هضم آنزیمی با آنزیم BamHI و SalI برروی پلاسمید pUC57 انجام گرفت و وکتور بیانی pET-28a(+)-STxB نیز به منظور ساخت کاست ژنی با آنزیم‌های BamHI و SalI برش خورده شد (۱۲). پس از هضم آنزیمی، قطعه ژنی SO6 و pET-28a(+)-StxB برش خورده، از روی ژل آگارز به وسیله کیت استخراج DNA تخلیص گردید (۱۶). ژن SO6 که توسط آنزیم‌های BamHI و SalI برش خورده، به وکتور بیانی pET-28a(+)STxB که با همین آنزیم‌ها برش خورده و استخراج شده بود، الحاق گردید. واکنش الحاق به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد توسط آنزیم T4 DNA Ligase شرکت فرمنتاز صورت گرفت. محصول الحاق، با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد شده (تهیه شده به روش کلرید کلسیم) BL21(DE3) اشرشیا کلی تراریخت گردید. کلنی‌های نوترکیب با آنتی بیوتیک کانامایسین، PCR و هضم آنزیمی غربالگری شدند (۱۶).

برای بیان کاست ژنی SO6-STxB از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القا کننده پروموتر (IPTG) (فرمنتاز) با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۷). سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده مخلوط و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با نسبت یک (بافر نمونه) به پنج (نمونه) با سمپل بافر دارای غلظت 5x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. در نهایت نمونه‌های تیمار شده توسط ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) از لحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب بررسی شدند (۱۷). نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲٪ و جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر بود. برای مشاهده باندهای پروتئین، از روش رنگ آمیزی با کوماسی بلو استفاده شد (۱۷).

برای تائید پروتئین نوترکیب، از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰٪ و pH=۸/۳) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. به منظور پرکردن جایگاه‌های خالی (بلاکینگ)، کاغذ به مدت یک شب در محلول ۳ درصد شیرخشک در بافر فسفات و سالین-تویین (Phosphat-Buffered Salin- Tween- PBST) در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سه مرتبه با PBST شستشو داده شد. کاغذ با آنتی‌بادی‌های پلی کلونال موشی (۱۵) با رقت ۱:۲۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. فرآیند شستشو با PBST سه بار انجام گرفت. کونژوگه موشی با رقت ۱:۵۰۰۰ به عنوان آنتی‌بادی تشخیص دهنده به کار رفت. همانند مرحله قبل گرماگذاری انجام شد. فرآیند شستشو نیز همانند مراحل قبلی انجام شد. نهایتاً، کاغذ نیتروسلولز در محلول سوبسترای رنگ‌زای دی آمینوبنزیدین (Diaminobenzidine-DAB) (۶۰ میلی گرم در صد میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۸) تا ظهور باند پروتئینی، قرار گرفت. برای توقف واکنش، کاغذ در آب مقطر قرار داده شد (۱۷). برای تخلیص پروتئین نوترکیب، پروتئین حاصل تحت

Archive of SID
www.SID.ir

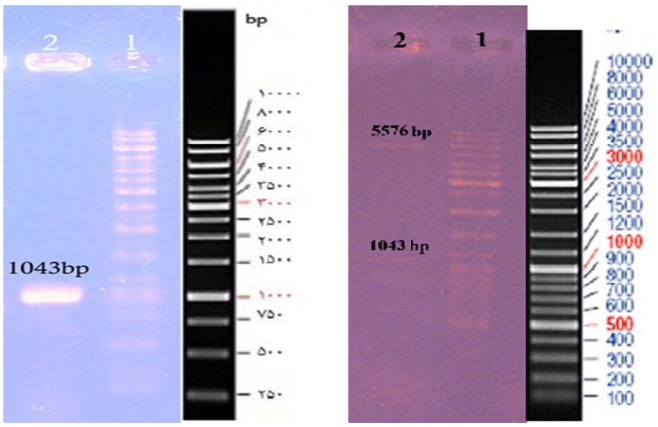
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:03 IRDT on Saturday May 11th 2019

شـرایط دنـاتوره و بـا اسـتفاده از سـتون Ni-NTA جداسازی و نمونـه‌هـای حاصـل بـرروی ژل ۱۲ درصـد الکتروفورز شد. غلظت پـروتئین بیـان شـده بـه کمـک برادفورد و با استفاده از آلبومین سـرم گـاوی (Bovine Serum Albumin-BSA) به عنوان استاندارد انجام شد.

به منظور بررسی پاسخ ایمنی، از ۵ عدد موش سوری به عنوان تست و ۴ عدد به عنوان نمونه کنترل اسـتفاده شد. برای هر مـوش، ۲۰ میکروگـرم پـروتئین تخلـیص شده SO6-STxB با یاور (adjuvant) روغن در آب (oil in water) به هر موش به صورت داخل صـفاقی در سـه نوبت و با فاصـله ۱۵ روز تزریـق شـد و تیترآنتـی‌بـادی آن‌ها توسط آزمایش الایزا اندازه‌گیری شد.

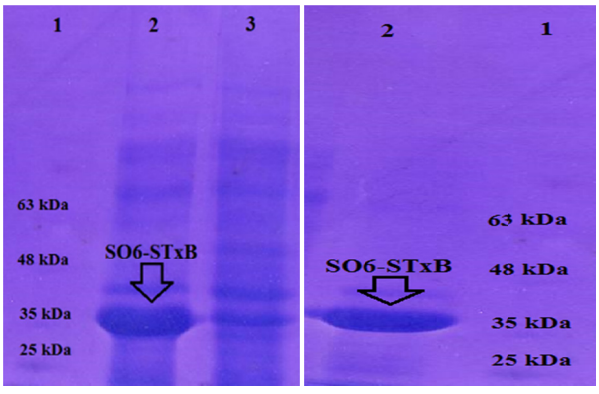
یافته‌ها

به منظـور سـاخت کاسـت ژنـی SO6-STxB، قطعـه SO6 در وکتور pUC57 با هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم های برشی SalI و BamHI استفاده شد کـه ژن مورد نظر با طول توالی ۷۵۹ جفت باز از وکتور خـارج و تخلـیص گردیـد. بـرای قـراردادن قطعـه ژنـی SO6 در وکتور pET-28a(+)-STxB، این پلاسمید با آنزیم‌هـای برشی SalI و BamHI خطی شد. بعد از بـرش آنزیمـی، پلاسمید تخلیص شد. پلاسمید تک باند شده در جریان الکتروفـورز در راسـتای بانـد حـدود ۵۵۷۶ جفـت بـاز ایستاد. بعد از الحاق ژن، وکتور به سـلول‌هـای (DE3) BL21 اشرشـیا کلـی تراریخـت شـد. بـرای تأییـد زیـر همسانه سازی از کلنی‌های کشت داده شده به روش لیز قلیایی استخراج پلاسمید انجام شـد. بـرای پلاسـمیدها PCR و برش هضم آنزیمی گذاشته شد. پـس از تکثیـر ژن SO6-STxB بـه روش PCR، محصـول روی ژل ۱٪ آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعه مورد نظر (۱۰۴۳



(ب) (الف)

شکل ۱- تأیید زیرهمسانه‌سازی ژن هدف در pET-28a(+) . شکل ۱-الف) ۱: مارکر DNA 100 جفت بازی تا 10 kb، ۲: محصول PCR روی پلاسمید pET-28a(+). ب) ۱: مارکر DNA 100 جفت بازی تا 10 kb، ۲: محصول برش آنزیمی روی pET-28a(+).



(ب) (الف)

شکل ۲- بیان پروتئین مورد نظر و تخلیص آن. الف) بیان پروتئین مورد نظر: ۱) نشانگر پروتئین، ۲) سلول تحت القا IPTG، ۳) نمونه شاهد، سلول بدون القا بـا IPTG. ب) تخلیص پروتئین مورد نظر: ۱) نشانگر پروتئین، ۲) پروتئین نوترکیب تخلیص شده از ستون.

www.SID.ir

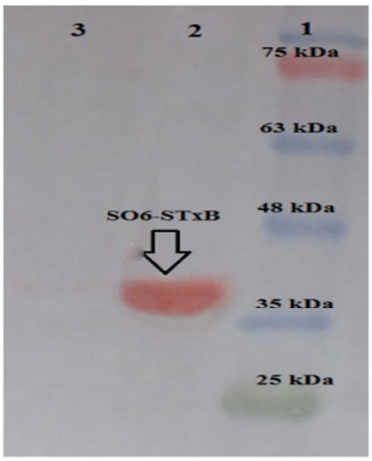
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:03 IRDT on Saturday May 11th 2019

جفت باز) از لحاظ اندازه با ژن هدف ما همخوانی داشت (شکل ۱- الف). همچنین پلاسمیدها با دو آنزیم‌های برشی BamHI و XhoI برش داده شدند. سپس به کمک نشانگر، اندازه قطعه خارج شده از وکتور تأیید شد (شکل ۱- ب).

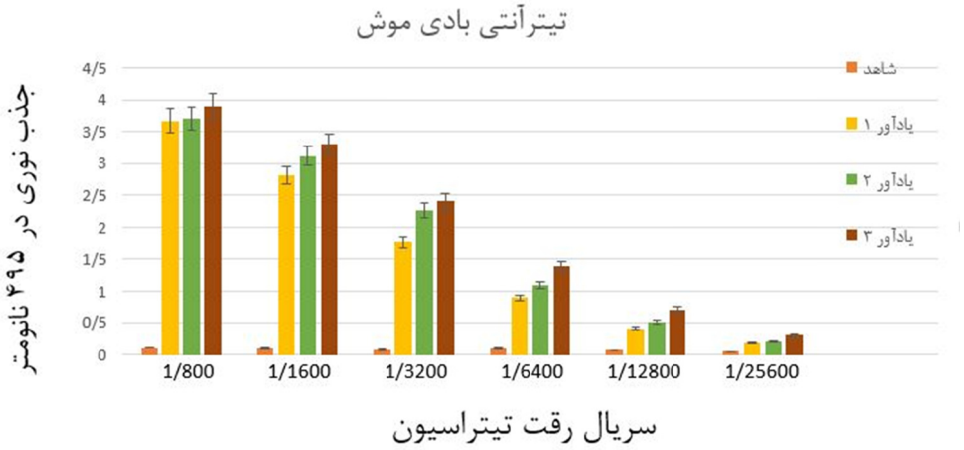
برای بررسی بیان ژن SO6-STxB در وکتور pET28a(+) پس از کشت سلول‌ها و القاء با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت و پس از تیمار خام، برروی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب از ژل ۱۲ درصد استفاده شد (شکل ۲- الف). پس از تأیید بیان، پروتئین نوترکیب مورد نظر با استفاده از ستون Ni-NTA تخلیص و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شد که پروتئین تک باند حاصل در راستای ۳۷/۵ کیلودالتون قرار داشت و تخلیص پروتئین نوترکیب مورد تأیید بود (شکل ۲- ب).

به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی (۱۵) استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونهٔ القا شده با IPTG است، یک باند در ۳۷/۵ کیلودالتون مشاهده شد. در ستون شاهدکه تحت القای IPTG نبوده باندی مشاهده نشد (شکل ۳).

به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولیدشده و محاسبه میزان آن در هر مرحله از تزریق، از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. تولید آنتی‌بادی نشان‌دهنده تحریک سیستم ایمنی حیوان آزمایشگاهی می‌باشد. یک هفته بعد از هربار تزریق (به استثنای تزریق اول) و ۶۰ روز بعد از تزریق اول، از موش‌های تست و شاهد خونگیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها، تست الایزا انجام شد که نمودار تیترآنتی‌بادی در هر



شکل ۳- وسترن بلاتینگ پروتئین مورد نظر. ۱: نشانگر پروتئین ۲: سلول القاء شده با IPTG ۳: نمونه شاهد، سلول بدون القا با IPTG.



نمودار ۱- بررسی تیترآنتی بادی با استفاده از تکنیک الیزا

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:03 IRDT on Saturday May 11th 2019

مرحله در نمودار ۱ نشان داده شده است. با توجه به تیترآنتی‌بادی، ایمونوگلوبولین G (IgG) سرمی مناسبی تولید شده است و آنتی ژن، باعث تحریک ایمنی هومورال شده است و نشان دهنده کارایی مناسب کاندید واکسن تولیدی می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

توسعه تولید واکسن‌های جدید بر پایه آنتی ژن‌های حفاظتی خالص شده به علت ایمنی‌زایی پایین آنتی-ژن‌های محلول و نبودن یاور مخاطی موثر و ایمن، دچار اختلال گردیده است. برای برطرف کردن این نقص و بالا بردن میزان ایمنی‌زایی SO6، آن را با یاور همراه می‌کنند. نتایج تحقیقات انجام شده نقش حاملی و یاوری STxB را اثبات کرده است. تحقیقات صورت گرفته مشخص کردند که مقدار آنتی‌ژنی که در حالت فیوژن شده با یک یاور 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 یاورهای مختلف دارد (۱۸). امروزه تلاش‌های زیادی برای ساخت واکسن علیه شیگلا و سم آن انجام شده و کاندیدهای زیادی همانند IPaD, IPaB, IPaC, STxB و غیره گزارش شده است. جالب اینکه هیچ کدام از این کاندیدها 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 (۱۹).

در سال ۲۰۱۳ هنری و همکاران ایمنی زایی خوکچه هندی با پروتئین نوترکیب IpaD-StxB را بررسی و نتایج چالش نشان داد که خوکچه‌های هندی ایمن شده توانستند ۲۸ برابر LD50 شیگا توکسین اشرشیا کلی O157:H7 را تحمل نمایند (۱۹). در سال ۲۰۱۴ هنری و همکاران بیان پروتئین نوترکیب IpaD-STxB و بررسی ایمنی زایی آن در موش سوری را انجام و مشاهده نمودند که تیتر آنتی بادی علیه پروتئین IpaD-STxB در موش افزایش محسوسی داشته و نتایج نشان داد که موش‌های ایمن شده توانستند ۷/۵ برابر LD50 شیگلا توکسین O157:H7 اشرشیا کلی را تحمل نمایند (۲۰). در سال ۲۰۱۵ باران وند و همکاران ایمنی زایی آنتی‌ژن‌های STxB و STxB-IpaD را به صورت نازال در موش های آزمایشگاهی بررسی و مشاهده کردند که با ترکیب شدن IpaD به STxB میزان تیتر آنتی‌بادی نسبت به تیتر آنتی بادی علیه آنتی‌ژن STxB افزایش یافته است (۲۱). عبدالهی و همکاران در سال ۲۰۱۷ بیان ژن SO6 گیاه غاسول صابونی را در باکتری اشرشیا کلی مورد بررسی قرار دادند. در نتیجه این پژوهش میزان بیان بالایی از پروتئین نوترکیب به دست آمد. همچنین در ادامه پروتئین حاصل شده به حیوان آزمایشگاهی تزریق و تیتر آنتی‌بادی تولیدی اندازه‌گیری شد، بر اساس نتایج به دست آمده تیتر آنتی‌بادی بالایی پس از خون گیری دوم مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده یک تزریق در این پژوهش کاهش داده شد که باز هم تیتر آنتی‌بادی به شدت افزایش داشته است، این احتمال وجود دارد که خود آنتی‌ژن SO6 دارای خاصیت یاوری باشد (۲۲). پروتئین StxB اندازه کوچکی دارد و پاسخ ایمنولوژیک مناسبی در بدن در مقابل آن ایجاد نمی‌شود ولی هنگامی که با SO6 همراه شود پاسخ ایمنولوژیک بدن در برابر آن افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند. نتایج پژوهش ما نشان دهنده تولید تیترآنتی‌بادی، ایمونوگلوبولین G (IgG) سرمی مناسبی بود که نشان دهنده کارایی مناسب آنتی‌ژن تولیدی ما در تحریک سیستم ایمنی حیوان آزمایشگاهی می‌باشد.

پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزومی با فعالیت ان-گلیکوزیدازی مانند ساپورین زیر واحد 28SrRNA را جدا کرده و باعث توقف سنتز پروتئین می‌شوند (۲۳). غلظت مهارکنندگی (Inhibitory concentration) در ایزوفرم‌های مختلف پروتئین‌های ساپورین متفاوت است. ایزوفرم های ۵، ۶ و ۹ جز قوی ترین ایزوفرم‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:03 IRDT on Saturday May 11th 2019

می‌باشند، به صورتی که این غلظت برای سه ایزوفرم نامبرده شده به ترتیب ۰،۰۵ نانو مولار، ۰،۰۶ نانو مولار و ۰،۰۳۷ نانو مولار می‌باشد (۲۴). مقایسه عملکرد دو ایزوفرم از دانه ساپورین «ایزوفرم ۵ و ۶» نشان می‌دهد که ایزوفرم ۶، خاصیت آنزیمی و فعالیت سمی بیشتری نسبت به ایزوفرم ۵ دارد (۲۵). شروع اثر سمیت ساپورین S6 توسط مهار سنتز پروتئین شروع اما مشاهده غیرفعال‌کنندگی ریبوزوم با دپورینه کردن DNA و دیگر نوکلئیک اسیدهایی است که از یکدیگر واسرشت شده اند آغاز می‌گردد. اولین توصیفی که از ساپورین S6 می‌توان گفت توانایی کشتن سلول‌ها با آپوپتوز است که در سال ۱۹۹۶ کشف گردید. برخی از ویژگی‌های آپوپتوز مانند قطعه قطعه شدن کروماتین، اجسام آپوپتوتیک، سلول‌های هیپودیپلوئید در لنفوسیت‌ها و بسیاری از رده‌های سلولی سرطان خون پیدا شده‌اند (۲۷ و ۲۶). با اضافه کردن پلی‌اتیلن گلیکول یا دکستران، ایمنی زایی پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزومی را می‌توان کاهش داد و در سرکوب سلول‌های سرطانی استفاده کرد (۶). ورود پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزومی به سلول‌ها را می‌توان توسط پالس‌های الکتریکی (۲۸)، امواج (۲۹) و یا ورود فتوشیمیایی (۳۰) تسهیل کرد. پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزومی علاوه بر فعالیت ان-گلیکوزیدازی دارای چندین فعالیت آنزیمی دیگر مانند فعالیت کیتیناز، سوپراکسید دیسموتازی و لیپازی می باشند (۲۴).

از آنجا که پروتئین غیرفعال‌کننده ریبوزومی SO6 بسیار پایدار بوده و با توجه به فعالیت حاملی و یاوری STxB و احتمال خاصیت یاوری پروتئین نوترکیب SO6، پروتئین به دست آمده فعالیت آنزیمی قوی از خود نشان می‌دهند و توانایی از بین بردن سلول‌ها از طریق اختلال در سنتز پروتئین‌ها را دارند (۳۱). در آینده می‌توان از آنتی‌بادی این ترکیبات به عنوان کیت تشخیصی عامل بیوتروریستی سم گیاهی غاسول صابونی در جنگ‌های بیولوژیک و همچنین آنتی‌ژن تولیدی را به عنوان یک ترکیب ضد سرطان قوی و کاندید واکسن جهت بررسی‌های بیشتر پیشنهاد نمود.

تقدیر و تشکر

از تمامی اساتید، پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Stirpe F, Battelli M. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. Cell Mol Life Sci; 2006. 63(16):1850-66.
2. Ferreras J, Barbieri L, Girbés T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ, et al. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant Saponaria officinalis L.(Caryophyllaceae). Biochim Biophys Acta; 1993. 1216(1):31-42.
3. Maras B, Ippoliti R, De Luca E, Lendaro E, Bellelli A, Barra D, et al. The amino acid sequence of a ribosome-inactivating protein from Saponaria officinalis seeds. Biochem Int; 1990. 21(5):831-8.
4. Duggar BM, Armstrong JK. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants. Ann Missouri Bot Gard; 1925. 12(4):359-66.
5. Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. J Biol Chem; 1991. 266(3):1564-73.
6. Wang S, Li Z, Li S, Di R, Ho CT, Yang G. Ribosome-inactivating proteins (RIPs) and their important health promoting property. RSC Adv; 2016. 6(52):46794-805.
7. Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, Effenterre D. Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites. J Cell Biol; 2008. 100(12):717-28.
8. Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. Toxicon; 2005. 45(4):389-93.
9. Janssen KP, Vignjevic D, Boisgard R, Falguières T, Bousquet G, Decaudin D, et al. In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. J Cancer Res; 2006. 66(14):7230-6.
10. Choi NW, Estes MK, Langridge WH, Oral immunization with a shiga toxin B subunit: rotavirus NSP4 90 fusion protein protects mice against gastroenteritis. Vaccine 2005;23(44): 5168-5.
11-Marcato P, Thomas P, Griener, George L, Mulvey, Glen D. Armstrong2. Recombinant Shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. Infect Immun; 2005. 73(10):6523-9.
12. Honari H, Amlashi I, Minaee ME, Safaee S. [Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:03 IRDT on Saturday May 11th 2019

recombinant protein]. AMUJ; 2013. 16(4):83-93. [Persian].

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

14. Honari H, Minaei HH, Ebrahim M. [Analyzing the various fusions for ctxB, ipaD and stxB genes of Shigella dysenteriae and Vibrio cholera by bioinformatics tools]. Genetics in the 3rd Millennium; 2013. 11(2):3070-7. [Persian].

15. Abdollahi M, Honari H, Nazarian S, Masoudi Kerahroudi M. [Subcloning and expression of SO6 gene, Saponaria officinalis plant in E. coli and investigation of antibody titer in rats]. JSSU; 2017. 24(12):1024-33. [Persian].

16. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition. Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK. 2001.

17. 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 Expr. Purif; 1999. 15(2):221-7.

18. 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 Dec 15. 146(3):189-99.

19. Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaei S. [Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein]. AMUJ; 2013. 83-93. Persian.

20. Honari H, Amlashi ????, Minaei ME. [Expression of recombinant proteins IpaD-STxB and immunogenicity STxB in the mice]. J Mazandaran Univ Med Sci; 2014. 183-93. [Persian].

21. Baranvand M, Honari H. [Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats]. Koomesh; 2015. 397-403. [Persian].

22. Abdollahi M, Honari H, Nazarian SH, Masoudi Kerahroudi M. [Subcloning and expression of SO6 gene, Saponaria officinalis plant in E. coli and investigation of antibody titer in laboratory rat]. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 2017. 24(12):1024-33. [Persian].

23. Walsh MJ, Dodd JE, Hautbergue GM. Ribosome-inactivating proteins: Potent poisons and molecular tools. Virulence; 2013. 4(8):774-84.

24. Schrot J, Weng A, Melzig MF. Ribosome-inactivating and related proteins. Toxins; 2015. 7(5):1556-615.

25. Bagga S, Hosur M, Batra JK. Cytotoxicity of ribosome-inactivating protein saporin is not mediated through α2-macroglobulin receptor. FEBS Lett; 2003. 541(1-3):16-20.

26. Bergamaschi G, Perfetti V, Tonon L, Novella A, Lucotti C, Danova M, et al. Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis. Br J Haematol; 1996. 93(4):789-94.

27. Bolognesi A, Tazzari PL, Olivieri F, Polito L, Falini B, Stirpe F. Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. Int J Cancer; 1996. 68(3):349-55.

28. Mir LM, Banoun H, Paoletti C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization: direct access to the cytosol. Exp Cell Res; 1988. 175(1):15-25.

29. Kodama T, Doukas AG, Hamblin MR. Delivery of ribosome-inactivating protein toxin into cancer cells with shock waves. Cancer Lett; 2003. 189(1):69-75.

30. Selbo P, Kristian al, Høgset A, Prasmickaite L, Berg K. Photochemical internalisation: a novel drug delivery system. Tumor Biol; 2002. 23(2):103-12.

31. Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. Toxicon; 2004. 44(4):371-83.

Archive of SID

www.SID.ir