

## بررسی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌های STxB و STxB-IpaD به صورت 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 تیتراژ 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، به وسیله 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 به صورت 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 تیتراژ آنتی‌بادی نسبت به تیتراژ آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن STxB افزایش یافته است. رت‌های ایمن شده با آنتی‌ژن STxB توانستند تا ۶ برابر LD50 و رت‌های ایمن شده با آنتی‌ژن STxB-IpaD تا ۱۰ برابر LD50 شیگلا 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 به صورت نازالی و بدون ادجوانت شیمیایی به عنوان کاندید مناسب برای تولید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا و ایشرشیاکلی می‌توان توصیه نمود.

واژه‌های کلیدی: شیگلا دیسانتری، ایشرشیاکولی او ۱۵۷، سم شیگلا ۲، موش‌های صحرائی

### مقدمه

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

شیگلا دیسانتری و E. coli O157:H7 از خانواده انتروتوکسین‌ها می‌باشند. شیگلا توکسین یا STx عامل اسهال خونی شیگلا است. STx از سم‌های دو قسمتی A و B است

شبهات زیادی نسبت به هم دارد. به این صورت که توالی IpaD در شیگلا دیسانتری سروتیپ I با شیگلا بوئیدی ۹۸٪، شیگلا سونتی 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-IpaD، STxB و بررسی بیان و ایمنی‌زایی آن در موش و E. coli BL21 و بررسی هندی به عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری شیگلوزیز مطرح می‌باشد [۹، ۱۰]. 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 تیتراژ آنتی‌بادی پروتئین‌های نوترکیب STxB-IpaD مزوجی 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 [۹، ۱۱].

تایید ژن‌های نوترکیب STxB و STxB-*ipaD* با روش PCR و کتورهای بیانی pET28a(+) دارای ژن‌های نوترکیب STxB و 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 به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتور (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی‌مولار به

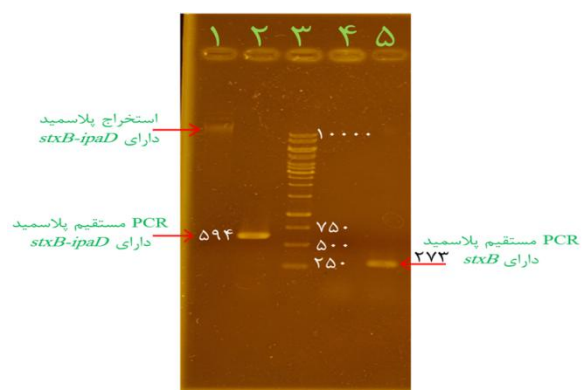
دارد. مهم‌ترین شیگلاها از نظر بیماری‌زایی و بروز اپیدمی‌ها چهار سروتیپ هستند که بر اساس پلی‌ساکارید اختصاصی O شان (osp) در LPS طبقه‌بندی می‌شوند و به نام شیگلا دیسانتری (S. dysentri)، شیگلا فلکسنری (S. flexeneri)، شیگلا سونتی (S. sonneii)، شیگلا بوئیدی (S. boydii) نام‌گذاری شدند. اسهال خونی با عامل شیگلا در صورت عدم درمان به مرگ می‌انجامد [۱]. شیگا توکسین یا STx به عنوان یکی از عوامل ویروالانس 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 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 [۲، ۳]. هر منومر STxB از ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و وزن ملکولی حدود ۷/۷ kDa دارد [۳، ۲]. STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام 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 تولید شده 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 ماکروفازها بازی می‌کند [۶، ۷]. توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای IpaD در بین گونه‌های شیگلا

رت‌ها خون‌گیری و توسط آزمایش الیزا 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 ایمن‌شده 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 ۱ درصد. ستون ۱: استخراج پلاسمید دارای ژن *stxB-ipaD* ستون ۲: باند حاصل از PCR مستقیم ژن سنتتیک *stxB-ipaD* و مشاهده قطعه ۵۹۴ جفت بازی ستون ۳: نشانگر مولکولی ۱۰۰۰ 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

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 دنا توره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲٪ با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بود.

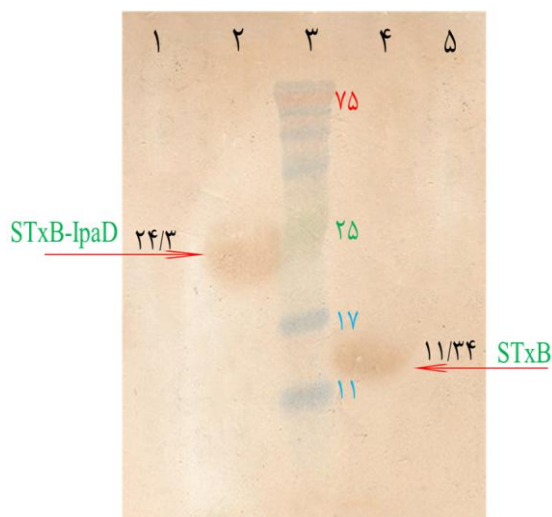
تایید پروتئین نوترکیب: برای تایید پروتئین نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن (Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گالیسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱٪ و متانول ۲۰٪ و pH ۸/۳: روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST(37NaCl) میلی‌مولار، KCl ۲/۷ میلی‌مولار، Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 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 بافر PBST، به مدت یک

ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰ آنتی‌بادی ضد His-tag (ebcam) کائز و گه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شستشو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سوبسترا (بافر تریس ۵۰ mM و pH ۷/۸: حاوی ۶ mg DAB6 و ۱۰ μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کائز و گه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولزی، واکنش با استفاده از H<sub>2</sub>O متوقف گردید [۹].

تخلیص پروتئین نوترکیب: پروتئین حاصل تحت شرایط دنا توره 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 ۲۰، ۱۰، ۱۰، ۱۵، ۱۰ و ۱۵ μg از پروتئین نوترکیب STxB و STxB-IpaD در چهار نوبت به رت‌ها تجویز و در نهایت از



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

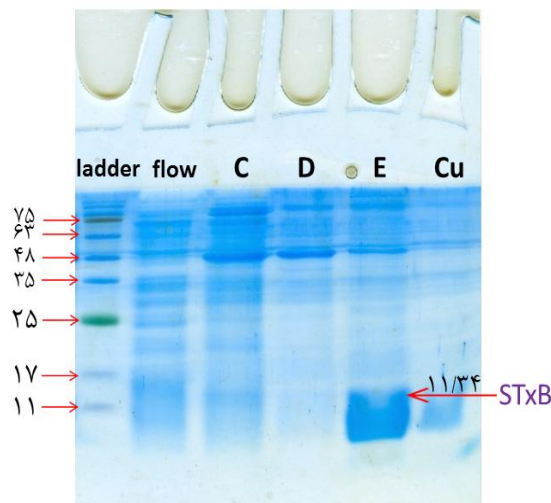
ارزیابی تیتراژ آنتی‌بادی ضد پروتئین نوترکیب به روش  
الایزای غیر مستقیم: به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولید شده و  
محاسبه میزان آن در هر مرحله تجویز از روش الایزای غیر  
مستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از تزریق سوم و چهارم  
به صورت تصادفی از رت‌های تست و شاهد خونگیری به عمل  
آمد (جدول ۱). و بعد از جداسازی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

جدول ۱. تجویز نازالی آنتی‌ژن به رت

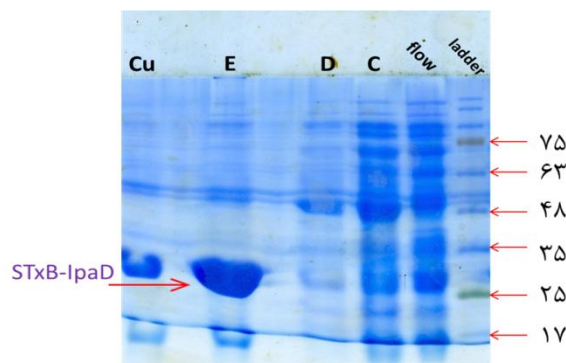
شماره تجویز	روز تجویز	تجویز نازالی آنتی‌ژن بدون ادجوانت		
		PBS	STxB-IpaD	STxB
۱	۱	۲۰۰ µl	۲۰ µg	۲۰ µg
۲	۷	۲۰۰ µl	۱۵ µg	۱۵ µg
۳	۱۴	۲۰۰ µl	۱۰ µg	۱۰ µg
۴	۲۱	۲۰۰ µl	۱۰ µg	۱۰ µg

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  
ایمن شده با آنتی‌ژن STxB-IpaD با غلظت ده برابر LD50

ترتیب در جایگاه صحیح ۱۱/۳۴ kDa و ۲۴/۳ قرار گرفت  
در حالی که 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 پروتئین StxB دارای  
وزن مولکولی ۱۱/۳۴ kDa از ستون جدا شد. و محلول آخر Cu دار غلظت  
۲۰ mM



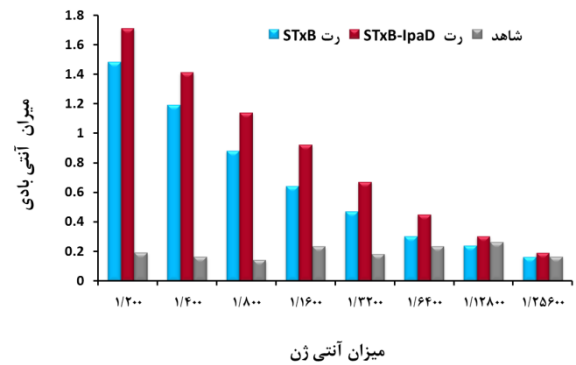
شکل ۳. بیان پروتئین STxB-IpaD توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی  
نیکل: لدر پروتئینی، محلول فلو دارای pH=۸، محلول C دارای  
pH=۶/۳، محلول D دارای pH=۵/۹، محلول E دارای pH=۴/۵ که  
پروتئین STxB-IpaD دارای وزن مولکولی ۲۴/۳ kDa از ستون جدا  
شد. و محلول آخر Cu دار غلظت ۲۰ mM

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

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 همورال نقش مهم‌تری را در ایمنی علیه شیگلا با هر دو پاسخ سیستمیک و مخاطی علیه LPS و تعدادی از پروتئین‌های کد شده توسط پلاسמיד بیماری‌زا، از جمله پروتئین‌های Ipa دارد. شیگلا دیسانتری تیپ ۱ هنوز هم عمده‌ترین علت اصلی آپیدمی اسهال، در صد سال اخیر می‌باشد و نسبت مرگ و میر 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 شیگلا 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

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



شکل ۱. تیتراژ آنتی‌بادی

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

O157 : H7

ردیف	گروه‌های رت	عصاره سلولی تزریق شده	میزان تحمل	مقایسه گروه‌ها	P
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 شیگلوزیس 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 شیگلا توکسین می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروٹوکسیک ایجاد نماید. امروزه تلاش‌های زیادی برای ساخت واکسن علیه شیگلا و سم آن انجام شده و کاندیداهای زیادی گزارش شده است. جالب این‌که هیچ‌کدام 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.

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 خوکیه هندی تا ۲۸ برابر افزایش یافته است [۱۹، ۱۶، ۹]. نتایج الایزا نشان داد که

- [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, Sayadnesh A. Cloning and expression of stxB gene from shigella dysenteria type1 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.

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 ایمن شده با STxB-IpaD تا ۱۰ برابر LD50 شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 را تحمل نمایند.

ژن‌های شیگا توکسین (stx1A) Shiga toxin 1A subunit (stx1A) and Shiga toxin 1B subunit (stx1B) در سویه‌های مختلف *Escherichia coli*, *Bacteriophage Shigella sonnei* و *Enterobacteria phage VT1* و *S.dysenteriae type 1* در گونه‌های مختلف *Escherichia coli* و *Shigella* 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 نو ترکیب 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.

## 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 to 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