Archive of SID



# Production of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against Recombinant LTB of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) and Evaluation of Its Protective Effect in Animal Model

**Maryam Mafi[1], Seyed Latif Mousavi Gargari[2], Shahram Nazarian[3], Fatemeh.Mohammad khani[4]**

1-Ms.C Microbial Biotechnology, Departmant of Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran. ORCID ID:0000-0002-8442-020X

2-Ph.D Biochemistry Departmant of Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel:021-51212232, Email:slmousavi@shahed.ac.ir. ORCID ID:0000-0002-4635-8716

3-Ph.D Microbiology, Biology Research Centere, Basic Science Faculty, Imam Hossein University, Tehran, Iran.ORCID ID:0000-0002-4693-877X

4- Ms.C Microbial Biotechnology, Departmant of Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran. ORCID ID:0000-0002-8802-471X

## ABSTRACT

**Background and Aim:** Enterotoxigenic Escherichia coli is one of the most common bacterial causes of diarrhea worldwide. One of the most important ETEC colonization factors is B subunit of the heat labile enterotoxin, which forms the connecting part of the toxin. In the present study, egg yolk immunoglobulin (IgY) against recombinant LTB protein was produced and its protective effect was evalutated in the animal model.

**Material and methods:** Hens were injected intramuscularly with 100 µg of recombinant LTB protein. Antibody titers of the sera were estimated and the eggs were collected. IgYs were purified from egg yolk and the antibody titers were subsequently estimated by ELISA method. Effecacy of different concentrations of IgY against the effect of LT toxin on Y1 cells was also studied. In order to investigate the effect of IgY-treated bacteria on intestinal epithelial cells we used standard Ileal loop technique.

**Results:** Induction of protein expression led to the production of recombinant LTB with molecular weight of about 14 kDa. Concentration of purified protein was 4.5mg/ml. Immunization of the hens induced serum antibody rise. IgY against LTB was purified from egg yolk at a concentration of 12mg/ml. 125 µg per ml of IgY against LTB prevented the effects of heat labile enterotoxin on Y1. In the Ileal loop test, 1.5 mg / ml of IgY neutralized the toxin effect of LTB on the intestine. Accumulation of fluid in the test loops decreased by 74.8% compared to that in the untreated control loops.

**Conclusion:** The results obtained indicated that specific egg yolk immunoglobulin was effective against recombinant LTB protein and can be used as a preventive antibody to inhibit the heat labile enterotoxin function of ETEC bacteria.

**Keywords:** Enterotoxigenic Escherichia coli, Heat labile enterotoxin, Passive immunity, Egg yolk immunoglobulin,Virulance factor

**Received:** April 20, 2020 **Accepted:** Jan 11, 2021

**How to cite the article:** M.Mafi ,S.L.Mousavi Gargari,Sh.Nazarian ,F.Mohammad khani. Production of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against Recombinant LTB of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) and Evaluation of Its Protective Effect in Animal Model.SJKU2021;26(6):107-123.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و شش / آذر و دی ۱۴۰۰/۱۲۳-۱۰۷

# تولید ایمونوگلوبولین مرغی (IgY) علیه پروتئین نوترکیب LTB از اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) و ارزیابی اثر محافظتی آن در مدل حیوانی

**مریم مافی[1]، سید لطیف موسوی گرگری[2]، شهرام نظریان[3]، فاطمه محمد خانی[4]**

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۴۴۲-۰۲۰X

۲.دکتری تخصصی بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. پست الکترونیک: slmousavi@shahed.ac.ir، تلفن: ۵۱۲۱۲۲۳۲-۰۲۱ ، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۴۶۳۵-۸۷۱۶

۳.دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۴۶۹۶-۸۷۷X

۴.دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۸۰۳-۴۷۱X

## چکیده

**زمینه و هدف:** اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک یکی از رایج‌ترین عوامل باکتریایی مولد اسهال در جهان است. از مهم‌ترین فاکتورهای حدت‌زا Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)، می‌توان به زیر واحد B توکسین حساس به حرارت اشاره کرد که قسمت اتصالی توکسین را شکل می‌دهد. در مطالعه پیش رو آنتی‌بادی مرغی علیه پروتئین نوترکیب Lymphotoxin Beta (LTB) تولید و اثر محافظتی آن در مدل حیوانی مورد آزمایش قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** ۱۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB به صورت داخل عضلانی به مرغ‌ها تزریق شد. تیتر آنتی‌بادی در سرم مرغ‌ها اندازه‌گیری و تخم‌مرغ‌ها جمع‌آوری و Immunoglobulin Y (IgY) ها از زرده تخم‌مرغ با کمک سدیم کلراید تخلیص و تیتر آنتی‌بادی با روش ELISA بررسی شد. توانایی IgY در ممانعت از عملکرد LT توکسین بر سلول‌های Y1 در رقت‌های متفاوت IgY سنجیده شد. به منظور بررسی اثر باکتری تیمار شده با IgY بر سلول‌های اپیتلیال روده، از روش استاندارد لوپ ایلئال استفاده گردید.

**یافته‌ها:** القاء بیان پروتئین منجر به تولید LTB نوترکیب با وزن تقریبی ۱۴ کیلو دالتون شد. غلظت پروتئین تخلیص شده ۴/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر بود. با ایمن‌سازی مرغ‌ها تیتر آنتی‌بادی سرمی افزایش یافت. آنتی‌بادی مرغی علیه پروتئین LTB با غلظت ۱۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر از زرده تخم مرغ تخلیص شد. IgY علیه پروتئین نوترکیب LTB در رقت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات توکسین حساس به حرارت LT بر سلول‌های Y1 را خنثی کرد. در تست لوپ ایلئال خنثی سازی توکسین با رقت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر IgY، مانع از عملکرد توکسین در روده شد. تجمع مایع درون لوپ ۷۴/۸ درصد در مقایسه با لوپ های کنترل کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده بیانگر آن است که می‌توان از آنتی‌بادی مرغی اختصاصی علیه پروتئین نوترکیب LTB به عنوان آنتی‌بادی پیشگیرانه جهت جلوگیری از عملکرد توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC استفاده نمود.

**کلمات کلیدی:** اشیرشیاکلی انتروتوکسیژنیک، انتروتوکسین حساس به حرارت، ایمنی غیرفعال، ایمنوگلوبولین، فاکتوربیماری‌زایی

وصول مقاله: ۹۹/۲/۱ اصلاحیه نهایی: ۹۹/۱۰/۱۱ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۲

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID



**مقدمه**

عفونت‌های روده‌ای و بیماری‌های اسهالی هنوز هم یکی از اساسی‌ترین مشکلات و معضلات درمانی-بهداشتی جامعه جهانی به ویژه در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌آیند. بر اساس آمارهای جهانی، پس از بیماری‌های سرطان و قلبی-عروقی، این بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین علل مرگ انسان‌ها به حساب می‌آیند(۱)، چنانچه اسهال عفونی حاد در سال جان تقریباً ۱/۶-۲/۵ میلیون کودک را در سراسر جهان می‌گیرد(۲, ۳). باکتری اشیرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) رایج‌ترین علت اسهال مسافران و همچنین عامل نسبتاً رایج اسهال در بره‌ها و گوساله‌ها و خوک‌ها است. ETECدارای عوامل حدت‌زا است که از جمله آن‌ها می‌توان به فاکتورهای کلونیزاسیون، توکسین مقاوم به حرارت و حساس به حرارت اشاره نمود. ETEC از طریق فاکتورهای کلونیزاسیون به سطح سلول‌های اپیتلیال روده اتصال پیدا کرده و با ترشح توکسین حساس به حرارت (LT )و مقاوم به حرارت (ST ) باعث ایجاد بیماری می‌شود(۴) ETEC به طور معمول نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت از جمله تتراسایکلین، اریترومایسین، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، نئومایسین، سولفونامیدها و تری‌متوپریم حساس می‌باشد. اگرچه این آنتی‌بیوتیک‌ها برای اسهال شدید تجویز می‌شوند؛ اما مقاومت آنتی‌بیوتیکی و سویه‌های مقاوم، به دلیل توانایی زیاد این باکتری در تبادل پلاسمیدهای مقاوم، هر روزه افزوده می‌شوند(۱، ۶-۴). مطالعات نشان می‌دهد که ۷۹ تا ۹۰ در صد سویه‌های ETEC به آمپی‌سیلین و ۲۸ تا ۳۷ در صد به تری‌متوپریم و تعداد اندکی هم به افلوکساسین مقاوم هستند (۷). همچنین، این سویه‌ها در حال مقاوم شدن در برابر اریترومایسین هستند. استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک ها تهدیدی واقعی برای جوامع بشری است که روش‌های جدید درمانی باید جایگزین آن‌ها شود، این موضوع باعث بالا رفتن آمار مرگ و میر به جهت ناکارآمد بودن درمان شده است(۸). اصلی‌ترین تهدید، افزایش میکروب‌ها در سراسر جهان است. به این منظور سازمان بهداشت جهانی به دنبال ساخت داروهای جدید می‌باشد(۸). آنتی‌بادی‌های پرندگان می‌توانند جایگزین ارزشمند آنتی‌بیوتیک‌ها برای کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ضد میکروبی باشند(۹). یکی از راه‌های ممکن جهت پیشگیری و درمان این عفونت ، تولید آنتی‌بادی مرغی (IgY) کارآمد است که توانایی القای ایمنی در برابر اغلب سویه‌های باکتریایی را داشته باشد. IgYبا اتصال به باکتری مانع از اتصال به سلول‌های میزبان و در نهایت مانع از کلونیزاسیون و حمله به سلول‌های هدف و ایجاد ایمنی غیرفعال می‌شود(۱۰،۱۱). تجویز خوراکی IgY برای درمان موفقیت‌آمیز باکتری ETEC، اثبات شده است (۱۲). ویژگی‌های IgY مانند تولید آسان و ارزان، حفاظت از حقوق حیوانات، عدم واکنش با سیستم کمپلمان و عدم پاسخ به فاکتورهای روماتوئیدی، راه را برای استفاده از آن بر علیه عفونت‌های روده‌ای در پستانداران باز کرده است. برای طراحی IgY از مولکول‌های کاندیدای واکسنی استفاده می‌شود که علاوه بر ویژگی ایمنی زایی و بی‌ضرر بودن، شیوع زیادی بین انواع سویه‌ها داشته و همچنین دارای اپی توپ های مشترک و محافظت شده باشند .یکی از اصلی‌ترین کاندیدای واکسنی برایETEC، ژن زیر واحد B توکسین حساس به حرارت است که قسمت اتصالی توکسین را شکل داده و به گیرنده‌های monosialotetrahexosylganglioside (GM1) سطح سلول‌های اپیتلیالی روده اتصال می‌یابد. گزارش‌های زیادی مبنی بر استفاده از زیرواحد LTB به عنوان کاندید واکسن وجود دارد(۱۶-۱۳). با توجه به نکات ذکر شده در بالا، هدف از این مطالعه تولید IgY علیه پروتئین نوترکیب LTB و ارزیابی تیتر آنتی‌بادی و بررسی اثر حفاظت بخشی IgY تولید شده بر مهار کلونیزاسیون و اثرات توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC در مدل حیوانی و محیط In vitro است.

## مواد و روش ها

نوع مطالعه



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID



در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۸ با کد اخلاق ۹۶۷۵۸۶۴۰۰ در دانشگاه شاهد انجام شد، سازه ژنی وکتور بیانی pET28a واجد ژن کد کننده LTB اهدا شده توسط دکتر نظریان (۱۶)، میزبان بیانی اشریشیاکلی ( E.coli BL21-DE3)، جفت پرایمرهای طراحی شده جهت تائید سازه ژنی، محیط‌های کشت واجد و فاقد آنتی‌بیوتیک برای کشت میزبان بیانی، محیط کشت‌های سلولی برای رشد سلول‌های Y1 و آنتی‌بادی کانژوگه برای روش الایزا مورد استفاده قرار گرفت.

انتقال سازه ژنی به میزبان بیانی E.coli:

با استفاده از روش شوک حرارتی(۱۷)، پلاسمید حاوی ژن LTB به سلول‌های مستعد(E.coli BL21(DE3 منتقل گردید. در نهایت سلول‌های E.coli نوترکیب بر روی محیط‌کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت نهایی ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت داده و مرحله انکوباسیون به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. از میان کلون‌های به‌دست‌آمده، تعدادی کلنی انتخاب و به طور جداگانه در محیط LB مایع حاوی ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. پس از جمع‌آوری سلول‌ها، واکنش PCR با استفاده از سوسپانسیون سلول باکتری و پرایمرهای اختصاصی TGTGCAGAATTCGCTCCTCAGTC و TTACAAGCTTCTAGTTTCCATACTGA TTG در حجم ۲۵ میکرو لیتر شامل ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولارdNTPs، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۲/۵ میکرو لیتر از بافر 10X PCR انجام شد. شرایط چرخه دمایی واکنش شامل مرحله واسرشته شدن اولیه در دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، که با۳۰ سیکل با شرایط دمای واسرشته شدن ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سیکل پایانی مربوط به مرحله طویل شدن در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اجرا گردید.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب LTB:

بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب با سه متغیر زمان، دما و غلظت IPTG (کالازیست، ایران) انجام گردید. بیان مطلوب پروتئین نوترکیب LTB با اضافه کردن ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین(کالازیست،ایران) به محیط کشت، افزودن IPTGبا غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار در۰/۶= $OD_{600}$ و دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت انجام گرفت(۱۸). جهت بررسی بیان و خلوص پروتئین، از الکتروفورز SDS-PAGE (Bio-Rad،امریکا) استفاده شد(۱۹). تخلیص پروتئین نوترکیب LTB از فاز نامحلول عصاره سلولی به علت خلوص بالای ۹۰ درصد در این فاز بدون نیاز به ستون و تنها از طریق شستشوی اجسام‌توده‌ای(inclusion bodies) صورت پذیرفت. در این روش به رسوب سلولی به ازای هر میلی‌لیتر، ۸۰ میکرولیتر بافر TE ($NaH_2PO_4$، Tris- HCl؛ pH=۸) اضافه گردید، سپس ۶ بار عمل سونیکاسیون (قدرت ۷۰ درصد، پالس ۰/۵) به مدت ۴۵ ثانیه هر بار همراه با ۴۵ ثانیه استراحت در یخ، روی نمونه انجام گرفت. سلول‌های لیز شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی جمع‌آوری شد. رسوب حاصل بار دیگر مانند مرحله قبل در بافر TE یکنواخت و سانترفیوژ گردید. رسوب به دست آمده از مرحله دوم به ازای هر میلی لیتر در ۸۰ میکرولیتر بافر B حاوی اوره ۸ مولار حل شده و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای محیط روی شیکر اوربیتال(vision، هند) قرار داده شد و در نهایت سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی پروتئین نوترکیب LTB جدا و به میکروتیوب جدید منتقل شد. تعیین غلظت پروتئین موجود در محلول های حاصل از تخلیص، با روش برادفورد صورت گرفت. به منظور رسم منحنی استاندارد، از محلول‌های حاوی پروتئین آلبومین گاوی(BSA) با



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID



غلظت‌های معیّن استفاده شد. جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد، سپس از داده‌های به‌دست‌آمده منحنی استاندارد رسم گردید و معادله‌ی حاصل از آن برای محاسبه‌ی میزان پروتئین در نمونه‌های مجهول مورد استفاده قرار گرفت. برای باز کردن اجسام‌توده‌ای و فولد مجدد پروتئین نوترکیب LTB، از غلظت‌های مختلف محلول اوره (کاسپین، ایران) و کیسه دیالیز با قطع ۱۲ کیلودالتون (کالازیست،ایران) استفاده شد. در این روش محلول پروتئین داخل کیسه دیالیز، درون بشر حاوی محلول اوره ۶ مولار قرار داده شد و به مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد روی همزن قرار گرفت، مشابه همین عمل به ترتیب در محلول‌های اوره ۴، ۲ و PBS خالص انجام گرفت تا بافر اوره به تدریج با PBS جایگزین شده و پروتئین ساختار اصلی خود را باز یابد.

تائید پروتئین نوترکیب LTB:

برای تائید پروتئین تخلیص شده از Anti CTxB (سیگما،آمریکا) و تکنیک الایزا استفاده شد(۱۷). پروتئین LTB تخلیص شده با سریال رقت ۵ میکروگرم تا ۱۲۵ نانوگرم بر چاهک‌های اول تا آخر به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تثبیت شد. چاهک‌ها با بافر شستشو(PBS حاوی ۵ درصد توئین۲۰) سه مرتبه شستشو داده شدند. در این مرحله داخل تمام چاهک‌ها به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر بافر بلاکینگ (۵ درصد شیر خشک بدون چربی) در بافر شستشو ریخته و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از شستشوی چاهک ها از رقت ۱/۵۰۰۰ آنتی بادی ضد CTxB و رقت ۱/۲۵۰۰ آنتی‌بادی کانژوگه موشی در الایزا استفاده گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۵ دقیقه مهار واکنش با اسید سولفوریک صورت گرفت. پس از توقف کامل واکنش، جذب نوری چاهک‌ها توسط قرائت‌گر الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

ایمنی زایی مرغ‌ها:

برای ایمنی‌زایی در مرغ‌ها (مرغ مادر پیوند،ایران)، مقدار ۱۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB به ازای هر مرغ با بافر PBS استریل، به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد و با ۵۰۰ میکرولیتر از ادجوانت مونتانايد(Seppic، فرانسه)، هموژن و به صورت داخل عضلانی به چهار قسمت از عضله سینه مرغ تزریق گردید. مرغ کنترل مخلوطی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS به همراه ۵۰۰ میکرولیتر از ادجوانت مورد نظر را دریافت کرد. تزریق در سه نوبت با فاصله دو هفته در یک گروه دوتایی مرغ لگهورن سفید و یک گروه دوتایی مرغ کنترل انجام گردید. جمع‌آوری تخم‌مرغ با فاصله زمانی ۱۰ روز بعد از هر تزریق انجام شد. این کار تا ۴۵ روز بعد از آخرین تزریق نیز ادامه پیدا کرد.

تخلیص IgY :

در این تحقیق از روش ترقیق اسیدی و ترسیب نمکی برای تخلیص آنتی بادی مرغی از زرده تخم مرغ استفاده شد(۲۰). به منظور تخلیص IgY و تجزیه و تحلیل خواص آن، بخش محلول در آب با روش رقیق سازی از زرده تخم‌مرغ جدا شد، در این روش زرده تخم‌مرغ در شرایط اسیدی (pH=4) توسط آب رقیق شده و ۳ روز در ۴- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس برای جداسازی IgY پس از عبور محلول فریز شده زرده تخم‌مرغ از کاغذ صافی، IgY توسط سدیم کلراید(کاسپین،ایران)، تغلیظ و به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۳۴۰۰ gرسوب داده شد.خلوص IgY توسط SDS-PAGE بررسی گردید.

بررسی تیتر آنتی بادی مرغی علیه پروتئین LTB:

برای سنجش اختصاصیت IgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیبLTB از روش الایزا استفاده گردید(۲۱). در این تست پس از بهینه سازی رقت ها، ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB که با بافر تثبیت کننده به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شده بود در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. پلیت(کالازیست،ایران) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، برای جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته آنتی‌بادی مرغی و آنتی‌بادی مرغی



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID



کانژوگه با کف چاهک‌های میکروپلیت، مناطق خالی از آنتی‌ژن بلاک گردید. برای این کار، ۲۰۰ میکرولیتر از بافر بلاکینگ ۵ درصد شیر خشک بدون چربی (کاسپین،ایران) در هر چاهک ریخته شد و به مدّت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در این تست ۵ میکروگرم IgY و رقت ۱/۲۰۰۰ آنتی‌بادی کانژوگه(Sigma،امریکا) به عنوان آنتی‌بادی اولیه و ثانویه مورد استفاده قرار گرفت. چاهک ها در فواصل هر مرحله سه بار و هر بار با ۴۰۰ میکرولیتر بافر PBST شستشو داده شده و در نهایت با ضربه زدن روی دستمال خشک گردید. در ادامه سوبسترای TMB به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۵ دقیقه مهار واکنش با اسید سولفوریک صورت گرفت. پس از توقف کامل واکنش، جذب نوری چاهک‌ها توسط قرائت‌گر الایزا (Perlong، انگلستان) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. نتایج الایزا و تیتر آنتی‌بادی گروه اصلی با گروه کنترل مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

بررسی ممانعت آنتی بادی از عملکرد توکسین بر سلول Y1: روش کشت سلول Y1(انیستیتوپاستور،ایران) برای سنجش فعالیت IgY در مهار عملکرد توکسین حساس به حرارت باکتریETEC مورد استفاده قرار گرفت(۲۲). در این روش برای کشت سلول Y1 از محیط کشت Dulbecco's ModifiedEagleMedium(DMEM) (کالازیست، ایران) و ۱۰FBS درصد استفاده شد. تعداد $10^5$سلول تریپسینه شده Y1 به درون چاهک ها اضافه گردید. پلیت تا مدت زمان تشکیل تک لایه‌سلولی در گرمخانه $CO_2$ دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، پس از آن به مدت ۱۸ساعت در مجاورت رقت‌های ۳۵۰-۲۷۵-۲۰۰-۱۲۵-۵۰-۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر IgY قرار گرفت و سپس با ۱ نانوگرم توکسین LT به مدت یک ساعت انکوبه شد. در نهایت چاهک ها با PBS سترون، سه بار شستشو و با یک میلی‌لیتر از الکل متانول به مدت ۵ دقیقه ثابت شدند. سلول‌ها با استفاده از رنگ گیمسا(کاسپین،ایران) به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و با بافر PBS شسته شدند. شکل ظاهری سلول‌های مجاور شده با نمونه‌های مرغ ایمن و غیر ایمن بررسی گردید. از توکسینLT و PBS به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

بررسی ممانعت آنتی بادی از عملکرد توکسین در لوپ‌ایلئال: به منظور سنجش توانایی آنتی‌بادی در ممانعت از عملکرد توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC در روده خرگوش(موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی،ایران) از روش لوپ‌ایلئال استفاده شد(۲۳). به منظور انجام آزمایش، ۳۶ ساعت قبل از جراحی، غذای یک سر خرگوش سفید نیوزیلندی قطع و تنها با آب دارای گلوکز(کاسپین،ایران) ۱۰ درصد تغذیه شد.خرگوش با تزریق ۶۰۰ و ۸۰۰ ماکرولیتر زایلزین و کتامین(داروخانه دامپزشکی دانشگاه تهران،ایران)، درون عضله بیهوش شد. پس از شکافتن شکم از بخش ایلیوم روده کوچک حیوان ۸ لوپ به طول میانگین ۳ سانتی‌متر به وسیله نخ بخیه (داروخانه دامپزشکی دانشگاه تهران،ایران) جدا گردید. به لوپ‌های ایجاد شده ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی $5\times10^6$ باکتری ETEC H10408 ۱ساعت انکوبه با رقت‌های ۵/. و ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیترIgY تلقیح گردید. پس از گذشت ۱۸ ساعت از جراحی، لوپ‌ها با دقت از بدن حیوان بیرون آورده و وزن هر لوپ و میزان ترشحات موجود در آن اندازه‌گیری شد و در نهایت با تقسیم وزن هر لوپ براندازه آن ضریب تجمع مایع محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری:

برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلموکراف-ایرنوزوف استفاده شد و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از انوای یک طرفه و مقایسه میانگین گروه های تست و کنترل با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزارSPSS 22 انجام شد.

## یافته ها

با استفاده از روش شوک حرارتی، پلاسمید حاوی ژن LTB به سلول‌های مستعد E.coli BL21(DE3) منتقل گردید.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

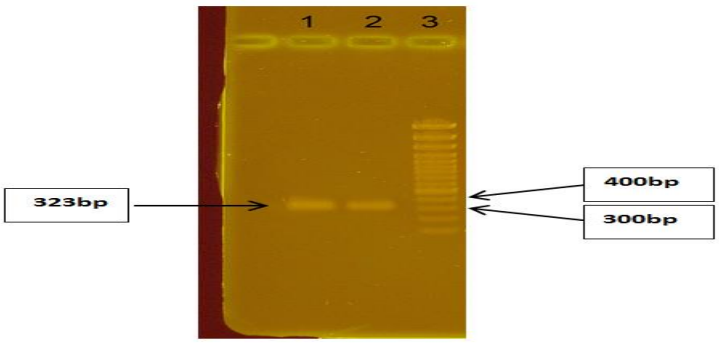
[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID



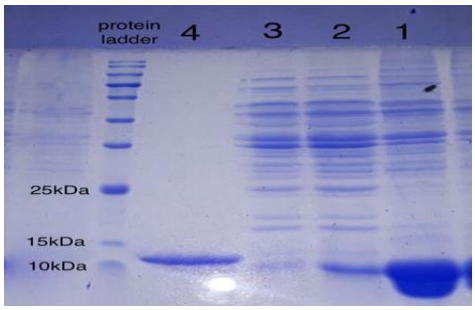
با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن کد کننده LTB، کلونی‌های رشد یافته باکتری بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود محصول PCR با اندازه ۳۲۳ جفت باز تائید کننده سازه ژنی pET28a-ltb بود.




**شکل ۱ . الکتروفورز محصولات PCR تکثیر شده جهت بررسی کلون‌های نوترکیب**

ردیف۳: نشانگر اندازه DNA( 100bp DNA ladder plus)، ردیف‌های ۱و۲: محصول PCR تکثیر شده ژن ltb از کلون‌های نوترکیب. تکثیر قطعه ژنی ۳۲۳ جفت بازی تائید کننده وجود قطعه ژنی کد کننده ltb در وکتور بیانی pET28a بود.

بهینه سازی بیان پروتئین نوترکیب LTB با وزن ملکولی ۱۴ کیلودالتون در فاز نامحلول، بیان و خلوص آن روی ژل SDS-PAGE بررسی گردید. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود ستون ۳ و ۴ مربوط به بیان پروتئین نوترکیب LTB در فاز نامحلول است. وجود نشانگر پروتئینی در کنار ستون ۴ بیانگر وزن ملکولی پروتئین بیان شده می‌باشد.




**شکل ۲. بررسی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب LTB بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو.**

ردیف۱: عصاره سلولی واجد پلاسمید نوترکیب pET28a-ltb القاء شده با غلظت ۱ میلی مولار IPTG، ردیف۲: عصاره سلولی فاقد پلاسمید نوترکیب pET28a-ltb القاء شده با غلظت ۱ میلی مولار IPTG، ردیف۳: عصاره حاصل از لیز رسوب سلول‌های القاء شده با IPTG در بافر TE، ردیف۴: پروتئین نوترکیب LTB تخلیص شده. (نشانگر اندازه پروتئین PM2600)

برای تائید پروتئین نوترکیب از روش الایزا و آنتی‌بادی ضد کلرا توکسین که بیش از ۸۵ درصد با پروتئین LTB همخوانی آمینواسیدی دارد استفاده شد. همان طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود با کاهش رقت‌های متوالی غلظت آنتی‌ژن نوترکیب از ۵۰۰۰ نانوگرم به ۱۵۶ نانوگرم، جذب نوری واکنش الایزا از ۲/۶ واحد به ۰/۹۵ واحد کاهش یافت. نتایج نشان داد که آنتی‌بادی ضد کلرا توکسین توانسته پروتئین نوترکیب LTB را شناسایی و با آن واکنش دهد.



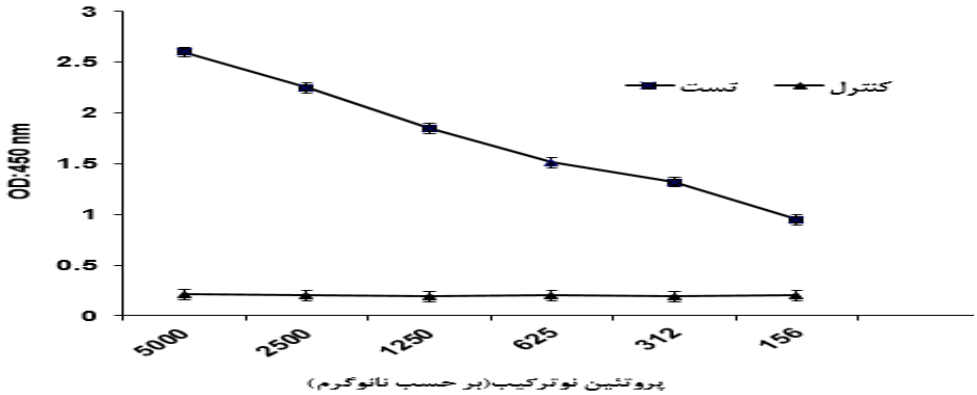
[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID

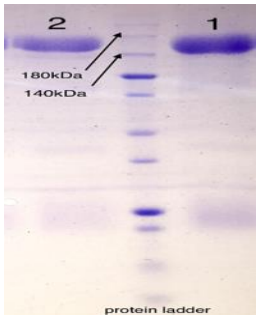





**نمودار ۱. تائید پروتئین نوترکیب LTB به روش الایزا با استفاده از آنتی‌بادی استاندارد ضد کلرا توکسین.**

با کاهش غلظت آنتی‌ژن نوترکیب از ۵۰۰۰ نانوگرم به ۱۵۶ نانوگرم، جذب نوری واکنش آنتی‌بادی اختصاصی و آنتی‌ژن نیز از ۲/۶ به ۰/۹۵ کم می‌شود که تائید کننده اتصال اختصاصی آنتی‌بادی با پروتئین نوترکیب است.

به منظور ارزیابی آنتی‌بادی مرغی تولید شده، تخم مرغ‌های ایمن شده ده روز پس از هر تزریق و ۴۵ روز پس از تزریق نهایی جمع‌آوری و فرایند تخلیص از زرده تخم مرغ‌ها انجام شد. شکل ۳ الگوی الکتروفورز IgY ضد پروتئین نوترکیب LTB تخلیص شده از زرده تخم مرغ با استفاده از کلرید سدیم بر روی SDS PAGE ۱۰ درصد با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو را نشان می‌دهد. باند قطور مولکول کامل IgY خالص شده در شکل دیده می شود. آنتی‌بادی مرغی علیه پروتئین LTB با غلظت ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تخلیص شد.




**شکل ۳. الکتروفورز IgY ضد پروتئین نوترکیب LTB تخلیص شده از زرده تخم‌مرغ با استفاده از کلرید سدیم بر روی SDS PAGE ۱۰ درصد با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو.**

ردیف ۱و۲: نمونه IgY تخلیصی تیمار شده با سمپل بافر فاقد ۲ – مرکاپتواتانول. در این حالت IgY به صورت تک باند با وزنی در حدود ۱۸۰ کیلودالتون مشاهده می‌شود. (نشانگر مولکولی پروتئین PM2600)

از آنتی‌بادی‌های تخلیص شده در واکنش الایزا استفاده گردید. نمودار۲ واکنش الایزا مربوط به پروتئین نوترکیب تخلیص شده و آنتی‌بادی مرغی را نشان می‌دهد. بعد از تجویزهای اول، دوم، سوم و تخم‌مرغ‌های تست و شاهد جمع‌آوری و بعد از تخلیص آنتی‌بادی آن‌ها، آزمایش الایزا انجام گرفت. تجزیه واریانس اثرات تعداد دفعات تجویز بر تیتر آنتی‌بادی انجام شد. بر این اساس طرح آماری برای فاکتورهای مورد ارزیابی در این تحقیق، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p<0.05$).



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

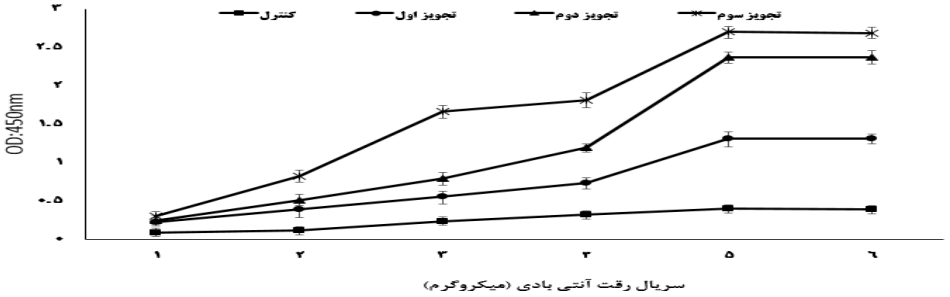
[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID

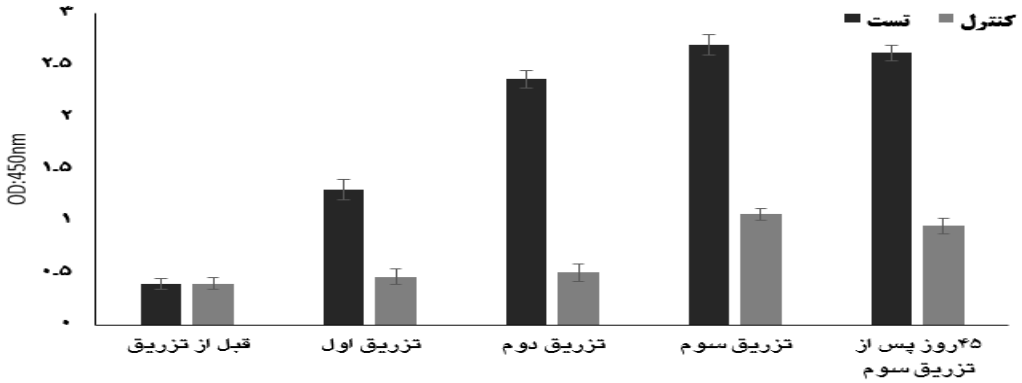


نتایج به‌دست‌آمده از تیتر آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در مرغ‌های ایمن شده تیتر آنتی‌بادی به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل($p <0.01$) بود. در هر مرحله از تزریق شاهد افزایش تیتر آنتی‌بادی بودیم به نحوی که بیش‌ترین میزان جذب نوری مربوط به غلظت ۵ میکروگرم آنتی‌بادی در تزریق سوم ۲/۶۹ واحد بود. بر اساس نتایج به دست آمده تفاوت معنی‌دار تیتر آنتی‌بادی تجویز اول با دوم و سوم مشاهده شد($p<0.01$)، در حالی که تیتر آنتی بادی تجویز دوم و تجویز سوم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p>0.01$). همچنین بر اساس نمودار شماره ۳ تیتر آنتی‌بادی پس از گذشت ۴۵ روز از تجویز آنتی‌ژن تفاوت معنی داری با تیتر آنتی‌بادی پس از تجویز دوم و سوم نداشت ($p>0.01$).




**نمودار۲. تیتر سریال رقت آنتی‌بادی IgY تخلیص شده علیه ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB در فواصل زمانی تزریق‌های اول،دوم،سوم و قبل از تزریق.**

در مرغ‌های ایمن شده تیتر آنتی‌بادی به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل ($p <0.01$) بود. در هر مرحله از تزریق تیتر آنتی‌بادی افزایش یافت به نحوی که بیش‌ترین میزان جذب نوری مربوط به غلظت ۵ میکروگرم آنتی‌بادی در تزریق سوم ۲/۶۹ واحد بود.




**نمودار۳. تیتر آنتی‌بادی IgY تخلیص شده علیه ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB در فواصل زمانی تزریق‌های اول،دوم،سوم و ۴۵ روز پس از تزریق سوم.**

بررسی تیتر آنتی‌بادی IgY تخلیص شده علیه پروتئین نوترکیب LTB در گروه ایمن و غیر ایمن. همان‌طور در نمودار دیده می‌شود در مرغ‌های ایمن شده تیتر آنتی‌بادی به صورت معنی داری بالاتر از گروه کنترل ($p<0.01$) بود. در هر مرحله از تزریق تیتر آنتی‌بادی مرغی افزایش یافت به



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

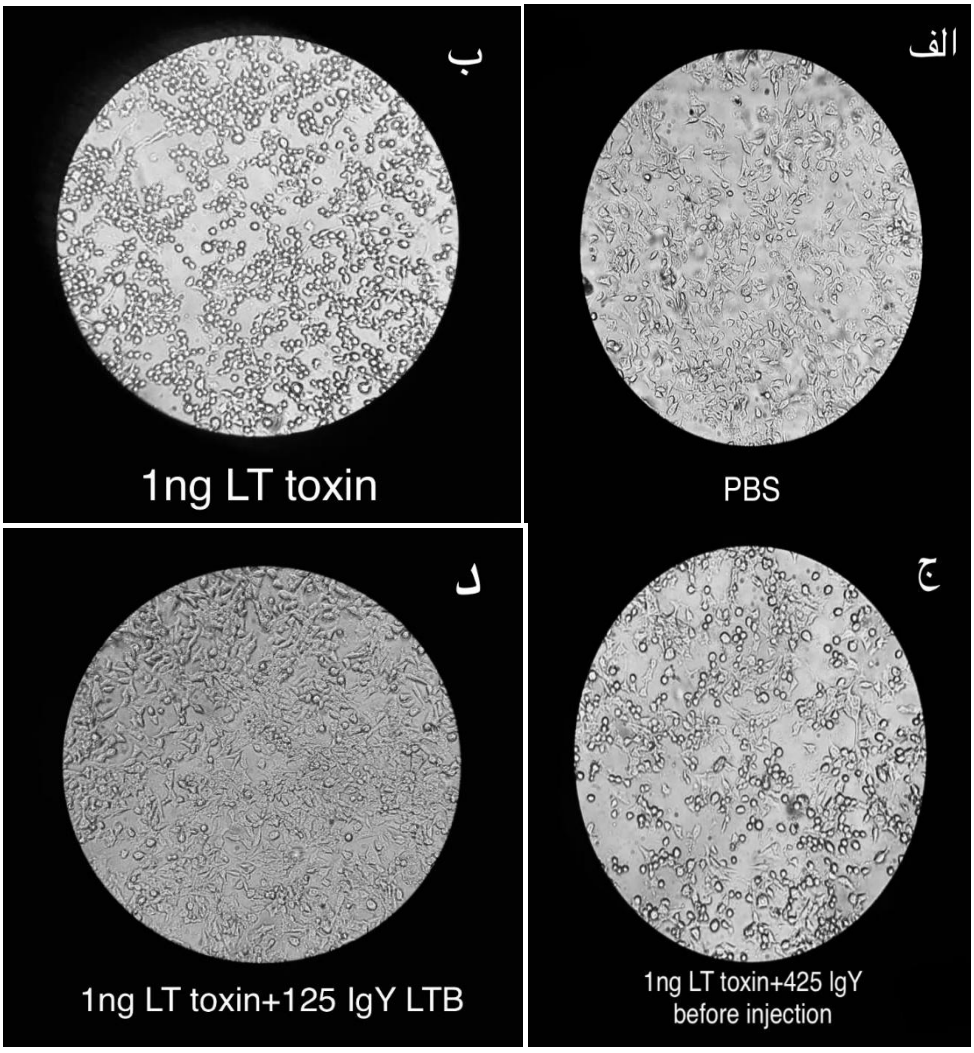
Archive of SID



نحوی که بیشترین میزان OD مربوط به تزریق سوم و به میزان ۲/۶۹۷۲ واحد بود.

فعالیت آنتی‌بادی IgY در ممانعت از عملکرد توکسین بر سلول Y1:

آنتی‌بادی‌های ایجاد شده بر علیه پروتئین نوترکیب LTB توانست از اثرات توکسین حساس به حرارت LT جلوگیری نماید و مانع از گرد شدن سلول‌های Y1 و حفظ شکل دوکی و طبیعی سلول‌ها شود. همان‌طور که در شکل‌های شماره ۴ مشاهده می‌شود رقت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB دارای حفاظت‌بخشی علیه اثرات ۱ نانوگرم توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC بر روی سلول Y1 است. در حالی که رقت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB نتوانست به صورت مؤثری شکل طبیعی سلول‌ها را حفظ کند.




**شکل ۴. بررسی ممانعت آنتی‌بادی IgY از عملکرد توکسین LT بر سلول Y1**

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]



www.SID.ir

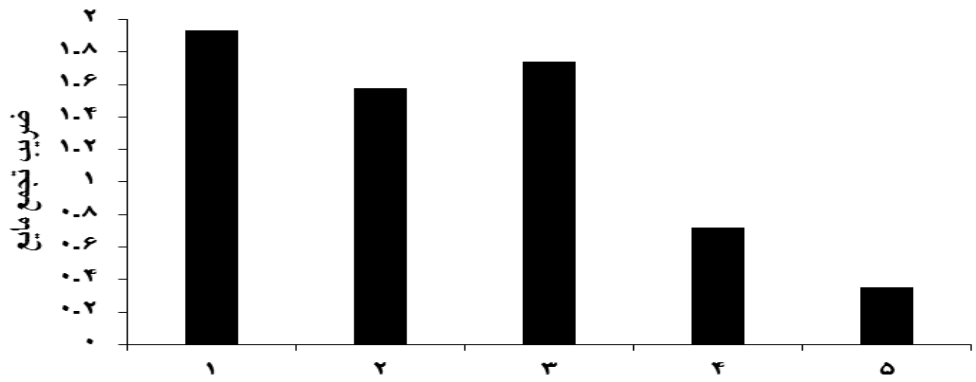
Archive of SID



الف: سلول Y1 طبیعی در مجاورت PBS ( ترکیبات موجود در PBS و یا محیط تخلیص توکسین باعث گرد شدن سلول‌ها نمی‌شوند). ب: گرد شدن سلول Y1 بر اثر مجاورت با ۱نانوگرم توکسینLT. ج: سلول Y1 در مجاورت با ۱نانوگرم توکسین LT و ۴۲۵ میکروگرم IgY نمونه کنترل که توانایی مهار اثر توکسین را ندارد و نمی‌تواند مانع از گرد شدگی سلول ها شود. د: سلول Y1 در مجاورت با ۱ نانوگرم توکسین LT و ۱۲۵ میکروگرم IgY تولید شده LTB. ممانعت آنتی‌بادی از عملکرد توکسین و باقی ماندن سلول‌ها به شکل دوکی و کشیده در شکل د به وضوح دیده می شود.

سنجش لوپ روده ای:

برای ارزیابی اثرات محافظتی، تجمع مایع در لوپ‌های روده خرگوش مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت و ضریب تجمع مایع که از تقسیم وزن هر لوپ به گرم به اندازه آن لوپ به سانتی‌متر به دست می‌آید، محاسبه شد (نمودار شماره ۴).ضریب تجمع مایع در لوپ‌های روده خرگوشی که رقت ۱/۵ میلی‌گرم IgY را بعد یک ساعت انکوبه کردن با $۵\times۱۰^{۶}$ cfu باکتری ETEC دریافت کرده بودند،۰/۷۲۲ بود که به طور چشمگیری کمتر از میزان تجمع مایع در لوپ‌های روده خرگوشی که هیچ IgY دریافت نکرده بود با ضریب ۱/۹۳۵ یا IgY تخم‌مرغ قبل تزریق با ضریب ۱/۵۷۵، بود. بر این اساس تجمع مایع درون لوپ‌های حاوی IgY تا حدود ۶۵ درصد کاهش داشته است.(شکل شماره۵)




**نمودار ۴. سنجش لوپ روده‌ای خرگوش بعد از تزریق IgY و باکتری انکوبه شده**

۱: ضریب تجمع مایع در لوپ خرگوش حاوی $۵\times۱۰^{۶}$ cfu باکتری ETEC. ۲: ضریب تجمع مایع در لوپ خرگوش حاوی ۱/۵ میلی‌گرم IgY نمونه کنترل به همراه $۵\times۱۰^{۶}$ cfu باکتریETEC. ۳: ضریب تجمع مایع در لوپ خرگوش حاوی۰/۵میلی‌گرمIgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB + $۵\times۱۰^{۶}$ cfu باکتریETEC. ۴: لوپ حاوی ۱/۵ میلی‌گرم IgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB به همراه $۵\times۱۰^{۶}$ cfu باکتریETEC. ۵: ضریب تجمع مایع در لوپ خرگوش حاوی PBS به عنوان کنترل منفی.



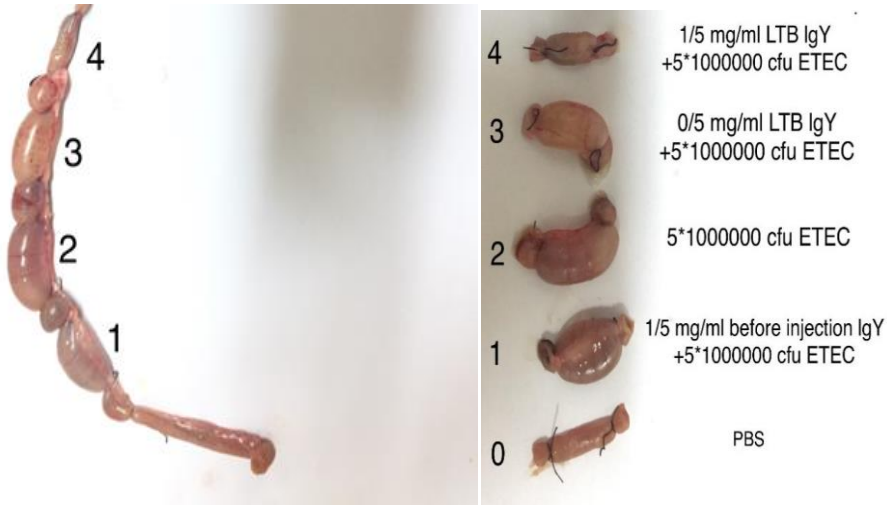
[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۵. سنجش لوپ روده‌ای خرگوش و بررسی فعالیت آنتی بادی در ممانعت از اتصال باکتری ETEC، عملکرد توکسین LT و تجمع مایع درون لوپ‌های خرگوشی**

۱: لوپ حاصل از تزریق $۵\times۱۰^{۶}$ cfu باکتری ETEC + ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از IgY تخم‌مرغ قبل از تزریق.۲: لوپ حاصل از تزریق $۵\times۱۰^{۶}$ cfu باکتری ETEC.۳: لوپ حاصل از تزریق $۵\times۱۰^{۶}$ cfu باکتری ETEC + ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از IgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB.۴: لوپ حاصل از تزریق $۵\times۱۰^{۶}$ cfu باکتری ETEC + ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از IgY علیه پروتئین نوترکیب LTB. ۰: لوپ حاصل از تزریق PBS

## بحث

کشورهای در حال توسعه با آب و هوای گرمسیری جزو مناطقی هستند که با معضلات بهداشتی از جمله اسهال ناشی از ETEC خصوصاً در کودکان زیر ۵ سال، مواجه است. به همین دلیل، تلاش برای درمان عفونت‌های ETEC یکی از اهداف اصلی محققان این رشته می‌باشد. با توجه به ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، استفاده از آنتی بادی ها به منظور ایجاد ایمنی غیرفعال و مقابله با عفونت‌های اسهالی حائز اهمیت است. ETEC نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بسیاری حساس است و به علت توانایی زیاد سویه‌های مقاومETEC در تبادل پلاسمیدهای مقاوم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها رو به افزایش است (۱, ۶-۴). عملکرد باکتری ETEC در طی دو مرحله باعث بروز بیماری و عفونت اسهالی می‌شود در مرحله اول با استفاده از فاکتورهای اتصالی خود را به سطح سلول میزبان نزدیک و به آن متصل می‌گردد، در مرحله بعد با تولید و ترشح توکسین، علائم در فرد بروز می‌کند. بدیهی است که اگر بتوان مانع از اتصال و تولید توکسین شد، می‌توان از بروز بیماری و پاسخ مقاومتی علیه باکتری جلوگیری کرد. پروتئینLTB یکی از عوامل اصلی حدت‌زای باکتری می‌باشد و در بسیاری از سویه‌های بالینی وجود دارد. در مطالعات بسیاری از LTB به عنوان یک اجوانت مناسب برای تحریک سیستم ایمنی علیه عوامل بیماری‌زا استفاده شده است (۱۳-۱۶). در سال ۲۰۰۵ مؤذنی و همکاران ژن LTB را در مخمر ساکارومایسس‌سرویزیه بیان کردند و مطالعات آن‌ها نشان داد که LTB یک کاندیدای واکسن مناسب و ارزان قیمت است (۱۵). خالصی و همکاران، ژن LTB را به وکتور pET28a انتقال داده و درون E.coli همسانه‌سازی کردند و پس از بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب (۲۴)، آنتی بادی علیه آن در موش تولید شد، این آنتی بادی می‌توانست توکسین LT را خنثی نماید (۲۵). این زیر واحد پروتئینی علاوه بر اینکه سبب تولید آنتی‌بادی و ایجاد محافظت علیه توکسین LT می شود، خود به عنوان یک ادجوانت زیستی مهم مطرح است که میتواند



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID



سبب برانگیختن پاسخ‌های ایمنی از جمله ایمنی مخاطی شود (۲۶). این نتایج نشان می دهد که ایمنی علیه LT می‌تواند در محافظت علیه ETEC نقش مؤثری داشته باشد. سلیمیان و همکاران نیز اقدام به تولید پروتئین LTB به صورت الحاق با CfaB در گیاه نمودند و توانستند این فیوژن را در برگ گیاه تنباکو و دانه کلزا بیان کنند و گروه‌های مختلف موش را با برگ و دانه گیاه تراریخت تغذیه نمایند. نتایج حاصل از بررسی این موش‌ها نشان داد که آنتی‌بادی IgG در سرم موش و IgA در سرم و مدفوع موش علیه فیوژن پروتئین CfaB-LTB تولید شده بود. این موش‌ها در چالش با باکتری زنده ماندند (۲۷). در مطالعات سایر محققان بررسی ایمنی زائی پروتئین نوترکیب LTB به عنوان یک ایمونوژن مؤثر برای ایجاد ممانعت از عملکرد توکسین حساس به حرارت باکتری اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک مورد بررسی قرار گرفته است. عمده این تحقیقات متمرکز بر ایجاد ایمنی فعال بوده است. در تحقیق حاضر با توجه به نتایج کاربرد LTB در ایمنی فعال، بر استفاده از آن در جهت ایجاد ایمنی غیرفعال با استفاده از آنتی‌بادی با منشأ پرندگان تأکید شده است که تا کنون در کشور گزارشی در این مورد ارائه نشده است. استفاده از IgY دارای مزایای بسیاری است که از جمله آن‌ها می‌توان به مقرون به صرفه بودن، تخلیص آسان، تولید در مقادیر بالا، غیرتهاجمی بودن روش و عدم فعال نمودن سیستم کمپلمان پستانداران اشاره کرد (۲۸). IgY تولیدی در مرغ به راحتی در خون و تخم‌مرغ قابل شناسایی است. وجود IgY در زرده تخم‌مرغ باعث می‌شود بتوان آن را از طریق خوراکی مصرف کرد. اگرچه این احتمال وجود دارد که IgY پس از ورود به معده توسط آنزیم‌های معده مانند تریپسین، کموتریپسین، پپسین و یا پروتئازها مورد تجزیه قرار گیرد(۱۱)، با این حال مطالعات نشان می‌دهند که مقدار قابل توجهی از این IgY سالم باقی می‌مانند و می‌توانند به آنتی‌ژن متصل شوند(۲۹). مطالعات بسیاری مبنی بر استفاده از IgY جهت پیشگیری و درمان به صورت خوراکی یا تزریقی بر روی خوک، ماهی و گوساله انجام شده است (۴،۳۰).همچنین درمان مؤثر IgY بر روی گونه‌های هلیکوباکتر پیلوری، سالمونلا و رتروویروس‌ها نشان داده شده است(۳۱). خانم ویس ملکشاهی و همکاران توانستند با گاواژ IgY به معده موش‌های دارای زخم معده ناشی از آلوده‌سازی با هلیکوباکترپیلوری را در مان کنند(۳۲). Copelan در سال ۱۹۹۴ اثر محافظتی IgY در مدفوع را با توجه به تجزیه آن در معده و روده نشان داد (۳۳). در سال ۲۰۱۳ Bellingeri فعالیت آنتی‌بادی‌های تخم‌مرغی در مقابله با باکتری ETEC را در خوک بررسی کرد و مشاهده کرد که خوک‌هایی که IgY دریافت کردند از عفونت ETEC محافظت شدند (۳۴). مصرف طولانی مدت و هر روزه زرده تخم‌مرغ حاوی IgY بر ضد باکتری p.aeruginosa عوارض جانبی برای بیمار ایجاد نکرده است (۳۵). مطالعات بر روی دو نژاد مرغ Leghornو Lohmann نشان داده است که مرغ نژاد Leghorn توانایی تولید آنتی‌بادی بیشتری دارد، در این پژوهش نیز از مرغ Leghorn استفاده شده است (۳۶). دو روش متداول برای تخلیص آنتی‌بادی مرغی عبارت اند از استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول و نمک. در این مطالعه از روش ترقیق اسیدی و ترسیب نمکی برای تخلیص و جداسازی IgY از زرده تخم‌مرغ استفاده شده است(۲۰). از آنجاکه در الایزا از پروتئین نوترکیب LTB به عنوان آنتی‌ژن و پروتئین تخلیص شده از زرده تخم‌مرغ به عنوان آنتی‌بادی استفاده شده است، اتصال آنتی‌بادی کانژوگه مرغی با پروتئین تخلیص شده از زرده تخم‌مرغ تائید کننده تخلیص آنتی‌بادی مرغی نیز می باشد؛ مضافا اینکه استفاده از پروتئین تخلیص شده به روش نمکی از زرده تخم‌مرغ در تست لوپ روده‌ای نیز تائید کننده وجود و تخلیص آنتی‌بادی مرغی علیه پروتئین نوترکیب LTB می باشد. IgY ها را پس از تخلیص می‌توان لیوفیلیزه کرد و به صورت پودری سفید رنگ درآورد که می‌توان آن‌ها را به شکل قرص یا کپسول مصرف کرد. مطالعات نشان داده که یخ زدن و یا خشک کردن در اثر سرما نمی‌تواند اثری بر آن داشته باشد و IgY هایی که بر اثر سرما خشک و پودر شده‌اند در برابر حرارت از خود مقاومت بالایی



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID



را نشان می‌دهند و تغییری نمی‌کنند. پایداری IgY پس از تخلیص آن بسته به شرایط می‌تواند تا چند سال باشد(۳۷). میزان IgYهای تخلیص شده در مطالعات و روش‌های مختلف، متفاوت است. در مطالعاتی که توسط Pauly و همکاران انجام شده، توانستند تا مقدار ۶۰ میلی‌گرم از هر زرده تخم‌مرغ جداسازی کنند(۳۸). همچنین در مطالعاتی که در سال۲۰۱۲ بر روی ویروس آنفولانزای B انجام گرفت، توانستند به کمک پلی‌اتیلن گلیکول ۷۶/۵ میلی‌گرم IgY از هر زرده تخم‌مرغ تخلیص کنند، این در حالی است که در این پژوهش IgY تخلیص شده از هر تخم‌مرغ ۱۴۴ میلی‌گرم است که در مقایسه با مطالعات پیشین از بازده بالایی برخوردار است(۳۹) .با توجه به مزایای بسیار IgY، به نظر می‌رسد ایمنی غیرفعال (IgY) در برابر عفونت‌های ETEC می‌تواند جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک و یک روش ایمونوتراپی مؤثر باشد. نتایج تست‌های الایزا در این پژوهش نشان‌دهنده‌ی توانایی شناسایی آنتی‌ژن توسط آنتی‌بادی است و همچنین آنتی‌بادی قادر است با اتصال به آنتی‌ژن از کلونیزاسیون و تکثیر باکتری جلوگیری نماید که با نتایج تست you و همکاران در سال ۲۰۱۴ هم‌خوانی دارد(۴۰).

## نتیجه‌گیری

در تحقیق انجام شده IgY اختصاصی علیه پروتئین نوترکیب LTB توانست در رقت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اثرات توکسین حساس به حرارت LT جلوگیری نماید و مانع از عملکرد توکسینLT بر سلول‌های Y1 شود. سلول Y1 پس از مواجهه با توکسین LT به واسطه افزایش cAMP و تغییر در اسکلت سلولی، از حالت پهن، صاف و زائد دار به صورت سلول‌های گرد درآمد، با خنثی سازی توکسین و افزودن آن به سلول‌های Y1 اکثر سلول‌ها شکل خود را حفظ کرده و در حالت طبیعی باقی ماندند. در تست سنجش لوپ روده‌ای خنثی‌سازی توکسین با رقت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر IgY، مانع از عملکرد توکسین در روده خرگوش شد، به گونه‌ای که میزان تجمع مایع در لوپ‌های روده خرگوشی که IgY را دریافت کرده بود حدود ۶۵ درصد کمتر از میزان تجمع مایع در لوپ‌هایی بود که IgY دریافت نکرده بودند. به عنوان جمع بندی، نتایج تحقیق نشان می دهد که IgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیبLTB می‌تواند به عنوان ترکیب پیشگیرانه جهت ایجاد ایمنی غیر فعال علیه اسهال ناشی از باکتری ETEC مورد توجه قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از شورای محترم پژوهشی دانشگاه شاهد به دلیل حمایت مالی و فراهم آوردن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش(۹۶۷۵۸۶۴۰۰) قدردانی می‌شود. هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

## منابع

1.Svennerholm A-M, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. Expert Rev Vaccines. 2008;7(6):795-804.
2.Huilan S, Zhen LG, Mathan M, Mathew M, Olarte J, Espejo R, et al. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. Bull. World Health Organ. 1991;69(5):549.
3.Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull. World Health Organ. 2003;81(6):197-204.
4.Qadri F, Svennerholm A-M, Faruque A, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin. Microbiol. Rev.2005;18(3):83-465.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID



5.DeBoy J, Wachsmuth I, Davis B. Antibiotic resistance in Enterotoxigenic and non-enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. microbiol. 1980;12(2):264-70.
6.Nguyen TV, Van Le P, Le CH, Weintraub A. Antibiotic resistance in diarrheagenic Escherichia coli and Shigella strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. Antimicrob. Agent Chemother. 2005;49(2):816-9.
7.Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Traveling with infants and young children. Part III: travelers 'diarrhea. J. Travel Med. 2002;9(3):141-50.
8. Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Inst of Biomedicine. Dept of Medical Microbiol. Immunol. 2008; 28(3)60-71
9.Aarestrup FM. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark: Chapter 1: Introduction. Apmis. 2000;108(S101):5-6.
10.Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, Théwis A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 2009;13(3):295-308.
11.Reilly RM, Domingo R, Sandhu J. Oral delivery of antibodies. Clin. Pharmacokinet. 1997;32(4):313-23.
12.Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to Streptococcus mutans. Caries Res. 1997;31(4):268-74.
13.Anosova N, Chabot S, Shreedhar V, Borawski J, Dickinson B, Neutra M .Cholera toxin, E. coli heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. Mucosal Immunol. 2008;1(1):59-67.
14. Fingerut E, Gutter B, Meir R, Eliahoo D, Pitcovski J. Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of E. coli enterotoxin produced in yeast. Vaccine. 2005;23(38):4685-96.
15.Rezaee MA, Rezaee A, Moazzeni SM, Salmanian AH, Yasuda Y, Tochikubo K, et al. Expression of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in Saccharomyces cerevisiae.J Microbiol. 2005;43(4):354-60.
16.Kordbacheh E, Nazarian S, Sadeghi D, Hajizadeh A. An LTB-entrapped protein in PLGA nanoparticles preserves against enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. Iranian J. Basic Med sci. 2018;21(5):517.
17.Kordbacheh E, Nazarian S, Hajizadeh A, Sadeghi D. Entrapment of LTB protein in alginate nanoparticles protects against Enterotoxigenic Escherichia coli. Apmis. 2018;126(4):320-8.
18.Hopkins R, Esposito D, Gillette W. Widening the bottleneck: increasing success in protein expression and purification. J Struct Biol. 2010;172(1):14-20.
19. Smith BJ. Chemical Cleavage of Proteins at Cysteinyl-X Peptide Bonds. Protein Prot. Handb. 2002 (pp. 503-506).
20.Hodek P, Trefil P, Simunek J, Hudecek J, Stiborova M. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. Int J Electrochem Sci. 2013 Jan 1;8:113-24.
21.Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1988; p2.4:1-2
22.Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Alerasol M, Bagheri S, Alipoor SD. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic Escherichia coli among Iranian children. Jpn J Infect Dis. 2014;67(2):78-85.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]

www.SID.ir

Archive of SID



23.De SN, Chatterje DN. An experimental study of the mechanism of action of Vibrio cholerae on the intestinal mucous membrane. Bull. World Health Organ. 2010 Mar 1;88(3):239-41.
24.Khalesi R NS, Amani J, Ehsani Z, Mansori M, Moazeni SM, et al. Cloning ,expression and purification of Escherichia coli heat-labile B subunit as a component of vaccine candidate. Iran chem soci. 2009;15(8):1765-1774
25. Khalesi R, Nazarian S, Ehsaei Z, Mansouri M, Amani J, Salimian J, et al.
Optimization of gene expression and purification of enterotoxigenic Escherichia coli recombinant (2010): 141-147
LTB protein and antibody production against it. Kowsar Medical Journal. 2010;15(3):141-7.۲۷.
26. Anosova N, Chabot S, Shreedhar V, Borawski J, Dickinson B, Neutra M. Cholera toxin, E. coli heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicleassociated epithelium of Peyer's patches. Mucosal immunol. 2008;1(1):59-67.
27. Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T. Production of Escherichia coli heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. Vaccine. 2007 Feb 19;25(9):1647-57.
28. Saadati M, Salimyan J, Ebrahimi F, Bahmani M, Gandomi A. Evaluation of antibody Y (IgY) raised against botulinum neurotoxin type A in an animal model. J Med Sci. 2003;108(2):129-40.
29.Akita E, Li-Chan E, Nakai S .Neutralization of enterotoxigenic escherichia coli heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. Food agric immunol. 1998;10(2):161-72.
30.Arasteh N, Aminirissehei A-H, Yousif A, Albright L, Durance T. Passive immunization of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). Aquaculture. 2004;231(1-4):23-36.
31.Shin J-H, Nam S-W, Kim J-T, Yoon J-B, Bang W-G, Roe I-H. Identification of immunodominant Helicobacter pylori proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. J. Med microbiol. 2003;52(3):217-22.
32.Malekshahi ZV, Gargari SLM, Rasooli I, Ebrahimizadeh W. Treatment of Helicobacter pylori infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin. Microb Pathog. 2011;51(5):366-72.
33.Copelan E, Bechtel T, Klein J, Klein J, Tutschka P, Kapoor N, et al. Controlled trial of orally administered immunoglobulin following bone marrow transplantation. Bone marrow transplant. 1994;13(1):87-91.
34.Bellingeri RV, Busso L, Alustiza FE, Picco NY, Molinero DP, Grosso MC, et al. Characterization of egg yolk immunoglobulin (IgY) against enterotoxigenic Escherichia coli and evaluation of its effects on bovine intestinal cells. 2013.
35.Larsson A, Carlander D. Oral immunotherapy with yolk antibodies to prevent infections in humans and animals. Ups. J. Med. Sci. 2003;108(2):129-40.
36.Liou J, Shiau J, Tai C, Chen L. Production of egg yolk immunoglobulin against Escherichia coli from white Leghorn and Lohmann chickens. J Anim Vet Adv. 2011;10(18):2349-56.
37.Kovacs-Nolan J, Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. Annu Rev food Sci Technol. 2012;10(3):163-82.
38. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2011(51): 30-84.
39. Wen J, Zhao S, He D, Yang Y, Li Y, Zhu S. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. Antiviral res. 2012;93(1):154-9.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]



www.SID.ir

Archive of SID



40. You J, Xu Y, Li H, Wang L, Wu F, Xu F,et al. Chicken egg yolk immunoglobulin (I g Y) developed against fusion protein LTB–ST a–ST b neutralizes the toxicity of E scherichia coli heat-stable enterotoxins. J applied microbiol. 2014;117(2):320-8.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2022-09-10 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.26.6.107 ]



www.SID.ir