ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2020;23(4)

Design of DNA vaccine containing genes encoding sicl of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) and Enteromorrhagic Escherichia coli (EHEC)

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Fatemeh Jafari Parsa[1]
Shohreh Zare[2]
Seyed Ali Mirhosseini[3]
Jafar Amani[3*]

1- Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, Tehran, Iran
2- Department of Genetics and Biotechnology, Pishva Faculty of Biological Sciences, Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
3- Applied Microbiology Research Center, Institute of Biology and Poisoning System, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Correspondence**
Address: Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Vanak Sq. Molasadra St. Tehran-Iran. P.O. Box 19395-5487. Tel: +98 21 82482556, Fax: +98 21 82482549. Email: jafar.amani@gmail.com

Article History
Received: September 13, 2020
Accepted: March 6, 2021
ePublished: December 20, 2020

ABSTRACT

Introduction: Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) and Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 , the most common strains, are causes diarrhea that can kill hundreds of thousands of children annually. The development of an effective combination vaccine for enterohemorrhagic Escherichia coli and Enterotoxigenic Escherichia coli is very important.
Materials and Methods: In this study, the sicl gene was amplified and Subcloned as a DNA vaccine. The sequence of antigen encoding genes was evaluated from the genebank and their epitopes were evaluated to design of primer for the synthetic chimeric gene and was amplified by PCR. Subcloning of a multipartal chimeric gene in eukaryotic expression vector was performed to make a DNA vaccine and finally the protein was purified by nickel chromatography and evaluated by Western blotting.
Results: The immunoblotting results of the expression of SICL chimeric protein indicated the presence of a 76 kDa band in the form of insoluble particles after 12 hours induction. Purification of the recombinant protein using His tag sequencee and confirmation of the purified protein with the recombinant protein specific antibody demonstrated the accuracy of the protein expression.
Discussion & Conclusion: Protein expression, purification and verify by western blotting showed that this recombinant chimeric protein (SICL) can be expressed in eukaryotic host.

Keywords: Vaccine DNA, Chimeric protein, Enterotoxigenic Escherichia coli, Enterohemorrhagic Escherichia coli

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

طراحی DNA واکسن حاوی ژن‌های کدکننده SICL آنتی‌ژن‌های باکتری اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) و اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC)

فاطمه جعفری پارسا

گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، ایران

شهره زارع

گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ایران

سیدعلی میرحسینی

مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیتها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

جعفر امانی

مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیتها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

مقدمه : اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک عامل اسهال باکتریایی, مرگ سالانه صدها هزار کودک بوده و اشیرشیا کلی انتروهموراژیک O157:H7، عامل اسهال خونی است. از این رو تولید یک واکسن ترکیبی موثر برای اشریشیاکلی انتروهموراژیک و اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک بسیار اهمیت دارد.

مواد و روش‌ها:در این مطالعه تکثیر و همسانه‌سازی ژن sicl، به عنوان یک DNA واکسن صورت گرفت. ترادف ژن‌های کد کننده آنتی ژن از بانک ژنی ارزیابی و اپی توپهای آنها به منظور طراحی پرایمر برای ژن کایمری سنتتیک بررسی شد و تکثیر آن از طریق PCR صورت گرفت ،زیر همسانه سازی ژن کایمریک چند قسمتی در وکتور بیانی یوکاریوتیک به منظور ساخت DNA واکسن انجام شد و در آخر پروتئین با روش کروماتوگرافی نیکل تخلیص و با وسترن بلات ارزیابی شد.

نتایج: نتایج ایمونوبلات بیان پروتئین کایمریک SICL به شکل ذرات نامحلول ۱۲ ساعت پس از القا نمایانگر وجود یک باند ۷۶ کیلو دالتونی است. خالص کردن پروتئین نوترکیب با استفاده از ترادف هیستیدینی داخل ژن وتایید پروتئین تخلیص شده با آنتی بادی اختصاصی پروتئین نوترکیب، درستی بیان پروتئین را نشان داد .

کلیدواژه‌ها: DNA واکسن، اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک، اشریشیاکلی انتروهموراژیک، پروتئین کایمریک

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۶

*نویسنده مسئول: jafar.amani@gmail.com

مقدمه

در میان گونه‌های اشریشیاکلی اسهال‌زا، اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) و اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) از عوامل عمده و مهم در ایجاد اسهال اندمیک و اپیدمیک از طریق تولید سم در سراسر دنیا هستند [۱] اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک با تولید سم موجب مسمومیت غذایی در مسافران و اشریشیاکلی انتروهموراژیک با ترشح توکسین شیگا موجب اسهال خونی می‌شود [2].

بیماری‌زایی سویه ETEC به دلیل تولید انتروتوکسین حساس به حرارت LT و انتروتوکسین مقاوم به حرارت ST است که LT با تحریک آدنیلات سیکلاز و ST با تحریک گوانیلات سیکلاز سبب تحریک ترشح آب و کلرید و یا مهار و جذب کلریدکلسیم در روده و باعث اسهال آبکی همراه با تب، استفراغ و درد شکمی می شود [3]. سم حساس به حرارت (LT)، از دسته سموم AB_5است که دارای زیر واحد A کاتالیتیکی و زیرواحد B پنتامری غیرسمی به عنوان زیرواحد اتصالی هستند زیرواحد B به عنوان یک کاندیدای واکسن در طراحی واکسن‌های زیرواحد مورد توجه پژوهشگران قرارگرفته و نتایج نشان داده که به کارگیری این عامل

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

بیماری‌زای مهم می‌تواند پاسخ‌های خنثی کننده و حفاظتی سیستم ایمنی را در پی داشته باشد [٤].

عوامل کلونیزه کننده که باعث اتصال ETEC به سلول میزبان می‌شوند متنوع هستند CFA/I تقریباً در ۱/۳ سویه‌های ETEC یافت می‌شود و از حدود ۱۰۰۰ نسخه زیر واحد CfaB به همراه یک یا چند زیر واحد CfaE تشکیل شده است مطالعات نشان داده که استفاده از عوامل کلونیزاسیون و توکسوئید، ایمنی قابل قبولی را در افراد سبب می‌شود. برهمین اساس، واکسن ETEC باید حاوی آنتی‌ژن‌های CF باشد که در بیشتر سویه‌ها یافت می‌شود [٥].

اشریشیاکلی انتروهموراژیک سویه O157H7 در انسان موجب بروز عفونت‌های روده‌ای ،اسهال بدون خون‌ریزی تا التهاب شدید روده وحتی سندروم خونریزی دهنده ادرار و کولیت هموراژیک می‌شود. انتقال باکتری به انسان از طریق آب و غذای آلوده بوده و اصلی‌ترین مخزن این باکتری روده گاو و گوسفند است. این باکتری با اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده میزبان، آسیب‌های تخریبی شدید (A/E) ایجاد وبعد از اتصال با تولید انتروتوکسین Stx آسیب‌زایی بیشتری می‌کند. سم Stx بازیر واحد B به گیرنده سلول متصل وبا زیر واحد A1 و فعالیت N-گلیکوزیدازی، مانع از ساخت پروتئین در میزبان می‌شود و سلول به سمت تخریب پیش خواهد رفت. تخریب سلول‌های اندوتلیال کلیه موجب ازکارافتادن کلیه و در موارد شدید، موجب مرگ فرد مبتلا خواهد شد [٦] در چندین مطالعه مشخص‌شده است که Stx می‌تواند کلونیزاسیون باکتری را به‌پیش ببرد [٧]. فراوانی شیوع این باکتری در مناطق مختلف کشور متفاوت است. عوامل متعددی از جمله سن، وزن، زمان تولد، فصل، منطقه جغرافیایی یا محل اقامت و غیره می‌توانند به وقوع و نسبت پاتوژن روده‌ای خاص کمک کند [٨]. در مطالعه‌ای از بین ۱۲۵۷۲ نمونه ادرار کودکان بستری در بیمارستان مفید تهران، ۳۷۸ مورد باکتری E.coli جدا شد که فقط ۹ نمونه برای EHEC مثبت بود [۹]. مطالعه‌ای دیگر در شهر بابل نمونه‌های مدفوع از ۲۰۰ کودک زیر ۵ سال که به دلیل ورم معده و روده مراجعه به بیمارستان داشتند جمع‌آوری شد، ٦٨ مورد (٣٤٪) برای اشریشیاکلی اسهال زا مثبت بودند که ۱۸ مورد (۹٪) E. coli انتروتوکسیژنیک (ETEC) مثبت شد [۱۰]. شیوع این ارگانیسم در فصول مختلف متفاوت است. بیشترین شیوع E.coli O157:H7در تابستان (۹/۳٪)اتفاق می‌افتد. شیوع E.coli O157:H7در نمونه‌های گوشت خام در دو استان ایران (فارس و خوزستان) بررسی که چهارده مورد (٤/٧٪) از ۲۹۵ نمونه برای E.coli O157:H7 مثبت بودند که فقط یک مورد به عنوان سروتیپ E.coli O157:H7 تعیین شد [۱۱].

باکتری اشریشیاکلی انتروهموراژیک می‌تواند با تولید اینتیمین از طریق ایجاد ضایعات A/E در اثر اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده میزبان، سبب بیماری در میزبان شود [۱۲, ۱۳]. اتصال مستقیم بین اینتیمین و Tir نیز ثابت شده است و ارتباط Tir و اینتیمین سرآغاز پاسخ‌های سلول میزبان برای ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیکی A/E است [۱۵, ١٤]. براین اساس در این مطالعه، به منظور تولید پروتئین نوترکیب ،همسانه‌سازی و بیان ژن کایمریک sicl (LT) ، CfaB، Intimin ، Stx) مدنظر قرار گرفت که Stx بخش B حدود 75 اسیدآمینه، Intimin بخش DE4 حدود 282 اسیدآمینه ،cfaB یکی از مونومرها، حدود 147 اسیدآمینه و LTB بخش B حدود 82 اسیدآمینه را تشکیل می‌دهند. ترادف ژن‌های کد کننده آنتی ژن از بانک ژنی ارزیابی و اپی توپهای آنها به منظور طراحی پرایمر برای ژن کایمری سنتتیک بررسی شد و تکثیر آن از طریق PCR صورت گرفت ،زیر همسانه سازی ژن کایمریک چند قسمتی در وکتور بیانی یوکاریوتیک به منظور ساخت DNA واکسن انجام شد و در آخر پروتئین با روش کروماتوگرافی نیکل تخلیص و با وسترن بلات ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

سویه Enterotoxigenic E.coli، E.coli BL21(DE3)، اینویتروژن-امریکا) E.coli DH5a،(اینویتروژن-امریکا)، وکتور pcDNA3.1،(انستیتو پاستور-ایران) وکتور pET-28a (نواژن-ایران)و محیط LB (Luria Bertoni) مایع و آگار برای کشت استفاده شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

کشت و ذخیره سویه‌های باکتریایی

در شرایط استریل یک لوپ از باکتری در داخل ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شبانه داده شد. سپس، باکتری رشد یافته به همراه ۲۰ درصد گلیسرول استریل، پس از یکنواخت سازی کامل، در فریزر در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بهینه‌سازی ژن کایمریک sicl و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR):

بر اساس توالی ژن کایمریک sicl سنتز شده [۱۶, ۱۷] آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شد. آغازگر رفت با توالی 5'CATTCTAAGCTTATGGCGGACTGTGCGAAGGG 3' دارای جایگاه برش آنزیم Hind III و آغازگربرگشت با توالی 5'ATATATCTCGAGTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG ATTT3' دارای جایگاه برش آنزیمXho I بود و طول محصول PCR۱۹۹۸ جفت باز است . تکثیر ژن کایمر با واکنش PCR با آنزیمPfu دارای خاصیت تصحیح کنندگی با غلظت ۱۰ پیکو مول بر میکرولیتر از هر آغازگر ۰,۵ میکرولیت پلاسمید، 10 میلی مولار ازdNTP و بافر PCR (۱۰X) همراه با کوفاکتور MgSO 4 در دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی شد. محصول واکنش با DNA نشانگر ۱Kb روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. با استفاده از کیت خالص سازی (GeNet Bio)، محصول PCR خالص وجداسازی انجام شد.

هضم آنزیمی محصولPCR

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمر برای انجام واکنش الحاق و تهیه سازواره‌ای نوترکیب به کمک آنزیم‌های EcoRI و Hind III، مورد هضم آنزیمی قرار گرفت، واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (ژن sicl) روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و قطعه به دست آمده از ژل جداسازی و با استفاده از کیت تخلیص (GeNetBio)، خالص سازی صورت گرفت.

آماده‌سازی وکتور بیانی pcDNA3.1 و اتصال ژن sicl

وکتورpcDNA3.1 (انستیتو پاستور- ایران) نیز به روش قبل با دو آنزیم Xho I و Hind III هضم و روی ژل آگارز یک درصد آشکار و در نهایت خالص سازی صورت گرفت. الحاق قطعه هدف با پلاسمید برش خورده توسط(T4 DNA Ligase(شرکت فرمنتاز- روسیه)، با نسبت مولی یک به سه انجام و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس انتقال ناقل نوترکیب به درون باکتری مستعدشده E.coli(DH5a) به روش شوک حرارتی انجام گرفت. به منظور اطمینان از درستی کلون‌های بدست آمده، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تک کلونی های بدست آمده انجام شد و نتایج روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. پس از تخلیص پلاسمید از تک کلونی‌های منتقل شده به محیط کشت لوریا برتانی(LB)مایع مورد هضم آنزیمی دوگانه قرار گرفت و محصول روی ژل اگارز یک درصد الکتروفورز شد.

انتقال ژن به سلول HEKT293 (ترانسفکشن) و تهیه لیزات سلولی

با استفاده از کیت ترانسفکشن(TurboFect Transfection Reagent– آمریکا) بر مبنای روش‌های بیوشیمیایی، عمل انتقال توسط توربوفکت به سلول یوکاریوت(HEK 293T) انجام شد. وکتور نوترکیب فاقد توالی سیگنال پپتید بوده، انتظار این بود که پروتئین موردنظر داخل سلول باشد، بنابراین لیزات سلولی از سلول‌ها در مرحله نمایی رشد تهیه شد.

وسترن بلاتینگ بمنظور تایید محصول پروتئینی در لاین سلولی

پس از تهیه لیزات سلولی به آن Sample بافر اضافه و روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شده و روی غشای نیتروسلولوزی با استفاده از بافر انتقال (گلایسین ۳۹ میلی مولار، تریس ٤٨ میلی مولار، اتانول ۲۰ درصد) منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز در داخل بافر بلوکه کننده برای پوشش نواحی فاقد پروتئین (۵گرم skim milk در ۱۰۰ میلی لیتر(1X) PBS) ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد شناور شد. در هر مرحله کاغذ نیتروسلولوز با بافر PBST (بافرPBS واجد ۰/۰۵ توئین۲۰) شستشو داده شد. سپس آنتی بادی مونوکلونالAnti-His tag با رقت مناسب در داخل بافر(1X) PBS تهیه و روی غشا نیتروسلولز اضافه شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت.در ادامه محلول DAB (دی آمینو بنزیدین) به عنوان سوبسترا روی غشای نیتروسلولز ریخته شده و پس از ظهور باندها واکنش با آب مقطر مهار شد. نتایج بیانگر تولید و حضور پروتئین مورد نظر در سلول یوکاریوتیک بود.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

بیان پروتئین نوترکیب

پلاسمید نوترکیب به منظور بیان ژن کایمریک به میزبان بیانی E.coli BL21(DE3) انتقال داده شد و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی(آغازگرهای رفت و برگشت) واکنش کلونیPCR انجام شد. کلونی‌های نوترکیب حاوی ژن کایمر به محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین منتقل شد و یک شب در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد بعد از اینکه کدورت رشد باکتری درطول موج ٦٠٠ نانومتر به ٠/٦ رسید القا با استفاده از IPTG (۱ میلی مولار) انجام و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسون صورت گرفت.

تعیین حلالیت پروتئین

به منظور تخریب دیواره سلولی روش‌های شیمیایی، مکانیکی و آنزیمی اعمال شد.به رسوب سلولی حاصل از بیان ۲ میلی لیتر بافر لیز کننده(کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار، سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار) (pH:8) و آنزیم لیزوزیم (۵۰ میکرولیتر) اضافه و یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس ورتکس با Glass Bead و شکسته شدن سلول‌ها، به مدت ۵ دقیقه با بیشترین سرعت سانتریفیوژو محلول رویی به عنوان فاز محلول(Native) جمع‌آوری شد. به رسوب حاصل از مرحله قبل ۲ میلی لیتر بافر لیزکننده (بافر اوره ۸ مولار، تریس–HCl ۱۰ میلی مولار، سدیم دی هیدروژن فسفات۱۰۰ میلی مولار) (pH:8) اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد بعداز ۵ دقیقه با بیشترین سرعت سانتریفیوژمحلول رویی به عنوان فاز نامحلول (Denature) جمع‌آوری شد. دو نمونه فوق روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصدالکتروفورز شد.

تخلیص پروتئین نوترکیب

بوسیله ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل(Ni-NTA) و با روش دناتوراسیون(Denature)انجام گرفت. تخلیص پروتئین SICL نیز با کمک His-tag انتهای آمینی (که به دنبال کلون کردن ژن در ناقل pET28a به ابتدای آمینی پروتئین اضافه می‌شود) انجام پذیرفت. در روش دناتوره از بافرهای حاوی اوره ۸ مولار با شیب pH استفاده می‌شود .

بهینه سازی تخلیص پروتئین نوترکیب

ابتدا کشت باکتری در مقیاس بالا انجام شد و مقادیر متفاوت اوره ۸ مولار و گرادیان pH مربوط به بافر Denature (بافر شستشو) مورد استفاده در ستون Ni-NTA بکار گرفته شد رسوب حاصل از سانتریفیوژ محلول باکتری با ۲ میلی‌لیتر اوره ۸ مولار(pH:8) همگن‌سازی شد و بعد از ورتکس glass beads محلول رویی به ستون Ni-NTA انتقال داده شد سپس ستون به ترتیب با ۵ میلی لیتر بافر شستشو دهنده (pH:٥/٧) ،٢ میلی لیتر بافر استخراج (pH:٤/٧)، ۵۰ میکرولیتر از بافر احیا کننده روی ستون ریخته و خروجی‌های ستون روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شد.

تعیین غلظت پروتئین

پروتئین بیان شده از روش برادفورد و با استفاده ازآلبومین سرم گاوی (BSA) تعیین غلظت شد.

وسترن بلاتینگ به منظور تأیید پروتئین بیان شده

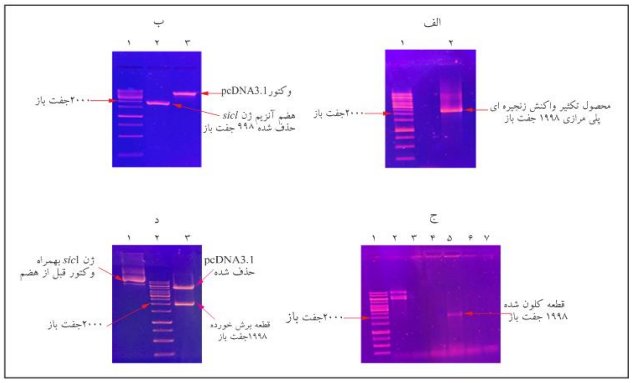
بیان پروتئین تخلیص شده با تکنیک وسترن بلاتینگ توسط آنتی بادی Anti-His tag متصل با HRP تایید شد. پروتئین طبق روش وسترن بلاتینگ روی غشای سلولوزی قرار گرفت که نتایج بیانگر تولید و حضور پروتئین بیان شده است.

نتایج

همسانه سازی ژن sicl

سازه ژنی sicl کلون شده در pET28a استخراج پلاسمید شد، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط پرایمرهای اختصاصی ژن siclانجام شد محصول PCR روی ژل آگارز به طول 2000 bp مشاهده شد. گرادیان دمایی واکنش PCR با آنزیمPFU برای دقت بالا در تصحیح و تکثیر ژن انجام شد (شکل ۱). به منظور تخلیص وکتور pcDNA3.1 از میزبان E.coli DH5a استفاده شد. پس از تکثیر ژنsicl و تخلیص پلاسمید، با دو آنزیم XhoI و Hind III مورد هضم قرار گرفتند (شکل ۲). الحاق ژنsicl به پلاسمید برش خورده، توسط آنزیم T4 DNA ligase انجام و عمل تراریختی در میزبان E.coli DH5a به وسیله روش شوک حرارتی انجام شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]



شکل ۱) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آنزیم، هضم آنزیمی ژن sicl و وکتور pcDNA3.1، آنالیز اولیه کلون‌ها توسط آزمایش کلونی PCR ، هضم انزیمی پلاسمید استخراج شده

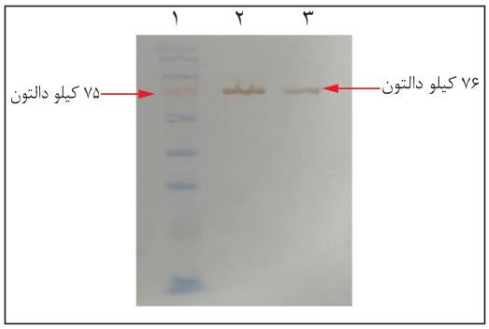
الف) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آنزیم Taq DNA پلیمراز ،چاهک ۱: نشانگر اندازه گیری DNA، چاهک۲: نمایاگر تصویر ژن sicl

ب) هضم آنزیمی ژن sicl و وکتور pcDNA3.1. چاهک ۲: نمونه ژن sicl ، و چاهک ۳: نمایاگر تصویر وکتور pcDNA3.1 که هردو توسط آنزیم‌های محدودکننده XhoI و Hind III برای ایجاد انتهای چسبنده،هضم شده و بصورت خطی درآمده است. ج) آنالیز اولیه کلون‌ها توسط آزمایش کلونی PCR، چاهک ۱: نشانگر اندازه گیری DNA، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک ۵: عمل الحاق ژن sicl به وکتور به درستی انجام شده است و چاهک ٤ –٦– ۷ کلون ها صحیح نبوده است. د) هضم انزیمی پلاسمید استخراج شده ، چاهک ۱: ژن .sicl به همراه وکتور چاهک ۳ :محصول هضم آنزیمی

بیان، تخلیص و تایید پروتیین کایمر

به منظور تایید همسانه‌هایی که حاوی ژنsicl هستند واکنش کلونیPCR با پرایمر اختصاصی انجام شد (شکل ۱). هضم آنزیمی پلاسمیدهای همسانه به منظور تایید همسانه سازی با آنزیم‌هایی که برای همسانه سازی استفاده شد (شکل ۱).

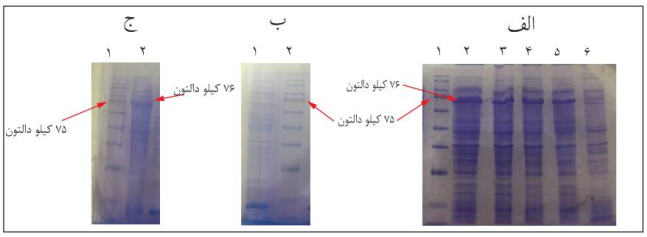
برای بیان در سلول یوکاریوتیک ابتدا لیزات سلولی از سلول‌ها در مرحله نمایی رشد تهیه و به آن‌ها بافر نمونه اضافه شد و روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی و طبق روش وسترن بلاتینگ روی غشای سلولوزی قرار گرفت که نتایج بیانگر تولید و حضور پروتئین مورد نظر در سلول یوکاریوتیک بود.(شکل ۲).



شکل۲)تایید محصول پروتئینی با تکنیک وسترن بلاتینگ در لاین سلولی(ترنسفکشن).

چاهک ۱: نشانگر وزن پروتئین، چاهک۲: کنترل مثبت، چاهک۳: نمونه بعد از بیان که یک باند در محدوده ۷٦ کیلودالتون مشاهده میشود.

به منظور بررسی بیان ژن نوترکیبsicl، پس از کشت سلول‌ها و القاء با IPTG بیان روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد حضور یک باند در محدوده ۷٦ کیلو دالتون را نشان داد. به منظور بررسی حلالیت پروتئین، القاء بیان در یکی از کلونها، انجام شد. پس از شکستن باکتریها و جداسازی فاز محلول و نامحلول هر یک از این فازها به صورت جداگانه روی ژل SDS-PAGE بررسی و همان گونه که مشاهده می‌شود پروتئین مورد نظر در فاز نامحلول بیان می‌شود وبیانگر آن است که پروتئین تشکیل اجسام انکلوژنی می‌دهد (شکل۳).

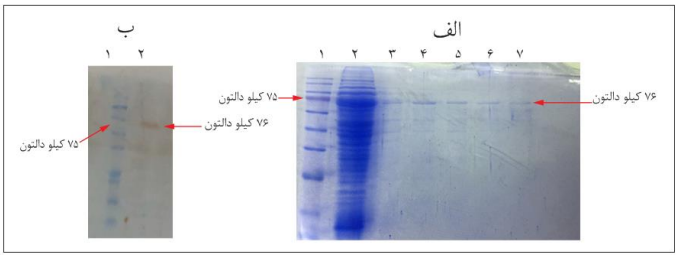


شکل۳) نتایج بیان قطعه ژنی sicl در ناقل pET28a با استفاده از IPTG یک میلی مولار روی SDS-PAGE۱۲ درصد، تعیین وضعیت حلالیت در فاز محلول، تعیین وضعیت حلالیت در فاز نامحلول

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

الف) نتایج بیان قطعه ژنی sicl در ناقل pET28-a با استفاده از IPTG یک میلی مولار روی ژل SDS-PAGE۱۲ درصد . چاهک ۱: نشانگر وزن پروتئین، چاهک ۲، ۳، ٤ و ٥: عصاره پروتئینی باکتری کلونی شماره ۲ O/N پس از القا. چاهک ٦: عصاره پروتئینی باکتری حاوی پلاسمید pET28-a sicl پیش از القا. ب) تعیین وضعیت حلالیت. چاهک ۱: نشانگر وزن پروتئین. چاهک ۲: عصاره پروتئینی باکتری در فاز محلول. ج) تعیین وضعیت حلالیت ، چاهک ۱: نشانگر وزن پروتئین چاهک ۲: عصاره پروتئینی باکتری در فاز نامحلول.

خالص سازی پروتئین نوترکیب به روش دناتوره(مقادیر متفاوت از بافر لیزکننده حاوی اوره ۲ مولار) انجام و با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA در گرادیان pH تخلیص و نمونه‌های خروجی از ستون روی ژل SDS-PAGE بررسی شد. درستی پروتئین نوترکیب تولیدشده با وسترن بلات و استفاده از آنتی‌بادی ضد هیستیدین بررسی و با عدم مشاهده باند غیر اختصاصی تایید شد. غلظت پروتئین نوترکیب به روش براردفورد با منحنی استاندارد ارزیابی و محاسبه شد (شکل٤).



شکل ٤) الکتروفورز پروتئین نوترکیب خالص شده با ستون Ni-NTA روی ژل اکریل آمید، تایید محصول پروتئینی با تکنیک وسترن بلاتینگ

الف) الکتروفورز پروتئین نوترکیب خالص شده با ستون Ni-NTA روی ژل اکریل آمید. چاهک ۱: نشانگر وزن پروتئین نمونه، چاهک۲: پروتئین قبل از تخلیص، چاهک۳: خروجی ستون، چاهک ٤: شستشو با بافر شستشو pH:٥/٥، چاهک٥تا۷ : شستشو با بافراستخراج، چاهک۸: شستشوی ستون با بافر احیا کننده.ب) تایید محصول پروتئینی با تکنیک وسترن بلاتینگ .

بحث

باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای مانند ETEC و EHEC از عوامل عمده ایجاد اسهال هستند. درمان‌های موجود شامل "آب رسانی" و درمان آنتی‌بیوتیکی به دلیل مشکلات بهداشتی و نیز ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاسخگوی نرخ بالای بیماری نیست همچنین این موضوع که سم این باکتری ها عامل اصلی بیماریزایی آن‌ها است، اثبات شده است .از این رویک برنامه واکسیناسیون مناسب می‌تواند باعث کاهش مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری باشد ETEC عامل ٤٥-٢٥ درصد موارد اسهال مسافران هستند [۱۹]. سویهETEC نیز با استفاده از عوامل کلونیزه کننده و سموم روده‌ای می‌تواند در میزبان تکثیرشده و باعث ایجاد اسهال شود[۲۰].کاندیدای واکسن مناسب علیه ETEC باید توانایی ایجاد پاسخ ایمنی مخاطی در روده را داشته باشد. استفاده از عامل کلونیزاسیون و توکسوئید، ایمنی قابل قبولی در افراد سبب می شود. واکسن ETEC باید حاوی آنتی‌ژن‌های CF باشد که در بیشتر سویه‌ها یافت می‌شود [۱۲۰]. شیوع باکتری سویه EHEC O157:H7 در انگلستان از سال ۱۹۹٤ تا ۲۰۰۰ تقریباً به دو برابر رسیده است. آلودگی به این باکتری محدود به کشورهای غربی نشده و پراکندگی آن در سراسر جهان ازجمله ایران نیز گزارش شده است عمده این آلودگی‌ها مربوط به گوشت و شیر آلوده است [۲۱] گاهی این میکروارگانیسم به صورت غیر علامت‌دار در دستگاه گوارش گاوها زندگی می‌کنند. و می‌تواند به صورت دائم از دستگاه گوارش این حیوانات دفع شود. استفاده از فضولات دامی برای مصارف کشاورزی (کودهای طبیعی) نقش مؤثری در انتشار باکتری دارد [۱۸].این باکتری‌ها روند بیماری‌زایی مشابهی دارند و در دو مرحله به ایجاد ضایعات و ایجاد بیماری می‌پردازند. در مرحله اول با استفاده از فیمبریا، به سلول‌های میزبان متصل و عملکرد سلول را مختل و علائم بیماری را ایجاد میکند. در مرحله بعد با تولید سموم میکروبی روی سلول‌های مجاور و همچنین با منتقل شدن این سموم به بافت‌های دورتر (نظیر کلیه)، سایر علائم را از خود بروز می‌دهند [۲۲]. با ایجاد اختلال در مرحله اول مانع از اتصال باکتری‌ها به میزبان شده و می‌توان انتظار داشت که مراحل بعدی بیماری نیز رخ ندهد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

زیر واحد B دو سم LT و Stx دارای فعالیت ادجوانتی هستند که باعث تحریک مضاعف سیستم ایمنی و استفاده همزمان آن‌ها این اثر را بیش‌تر خواهد نمود[۷] به نظر می‌رسد آنتی‌بادی‌های مخاطی فاکتورهای لازم و نه کافی برای کاهش کلونیزاسیون در روده گاو باشند و بنابراین بخشی از کمبود کارایی واکسن‌ها به فقر آنتی‌بادی ویژه آنتی‌ژن در سطوح مخاطی روده‌ای مربوط است [۲۱]. با توجه به اهمیت نقش کلیدی توکسین های نامبرده (StxB, Intimin, CfaB, LtB) در پاتوژنیسیته عوامل باکتریائی بیماری‌های روده‌ای و مطالعاتی که نشان دهنده پاسخ‌های حفاظتی مناسب ناشی از ایمنی‌زایی مناسب توسط آن‌ها هست، طراحی و به کارگیری یک کاندید واکسن با ساختار ژنی چند گانه در برگیرنده ناحیه اتصالی این ژن‌ها بر مبنای مطالعات بیوانفورماتیکی مورد توجه قرار گرفت. در زمینه واکسن‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک در مورد اجزای فوق این مطالعه جدید و کاربردی است. در مطالعه فیروزابراهیمی و همکاران در سال ۲۰۱۸ یک واکسن نوترکیب حاوی پروتیین‌هایی از باکتری هایشیگلادیسانتری EHEC،ETEC دریاکتری E.coli بیان و ایمنی هومورال آن در موش مورد بررسی قرار گرفت که مشخص شد کاندیدای خوبی می‌تواند باشد [۲۳]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸ شهرام نظریان و همکاران پروتیین کایمر نوترکیب EspA-Stx2b-Intimin را تولید و ایمنی زایی آن را علیه E.coli O157H7 ارزیابی نمودند که پاسخ ایمنی هومورال در موش را تقویت نمود. درمطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷آیتک نوین روز و همکاران یک پروتیین کایمر متشکل از E.coli O157H7 OmpA-LTB را تولید و ایمنی‌زایی آن را بررسی نمودند [۲٤]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ لتیسیا بتانکور و همکاران DNA یک واکسن بر علیه Enterohemorragic Escherichia coli تولید نمودند و ایمنی‌زایی آن را در موش بررسی کردند [۲۵].

نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی‌های مطالعات سال‌های گذشته مشاهده شد که پژوهش انجام شده با استفاده از DNA واکسن کاربردی و جدید است . در این مطالعه برای جداسازی قطعات ژنی از لینکر استفاده و بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که قادر به جداسازی هر چهار قسمت از یکدیگر هستند. ساختار پروتئین کایمر حاصل به کمک نرم افزار I-TASSER بررسی شد و نتایج حاصل نشان داد که از نظر پایداری و همچنین ساختار mRNA و نیز ساختار دوم و سوم پروتئین در وضعیت مناسبی دارد سپس همسانه‌سازی و بیان ژن کایمریک sicl (LT ، CfaB ، Intimin ، Stx) صورت گرفت و پروتیین کایمر نوترکیب SICL تولید و بیان ژن کایمر هم داخل رده سلولی بررسی و هر دو توسط وسترن بلاتینگ مورد تایید قرار گرفتند. در اهداف بعدی می‌توان برای تولید و بهینه‌سازی DNA واکسن از این یافته‌ها بهره برد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند صمیمانه تشکر می نمایم

منابع

1. Sears, C.L. and J.B. Kaper, Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiological reviews, 1996. 60(1): p. 167.
2. Clarke, S.C., Diarrhoeagenic Escherichia coli—an emerging problem? Diagnostic microbiology and infectious disease, 2001. 41(3): p. 93-98.
3. Brooks, G.F., J.S. Butel, and S.A. Morse, Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology2004: Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
4. Karaman, S., J. Cunnick, and K. Wang, Expression of the cholera toxin B subunit (CT-B) in maize seeds and a combined mucosal treatment against cholera and traveler's diarrhea. Plant cell reports, 2012. 31(3): p. 527-537.
5. Bourgeois, A.L., T.F. Wierzba, and R.I. Walker, Status of vaccine research and development for enterotoxigenic Escherichia coli. Vaccine, 2016. 34(26): p. 2880-2886.
6. Schüller, S., Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. Toxins, 2011. 3(6): p. 626-639.
7. Mohawk, K.L., et al., Neutralizing antibodies to Shiga toxin type 2 (Stx2) reduce colonization of mice by Stx2-expressing Escherichia coli O157: H7. Vaccine, 2010. 28(30): p. 4777-4785.
8. Al Jarousha, A.M.K., M.A. El Jarou, and I.A. El Qouqa, Bacterial enteropathogens and risk factors associated with childhood diarrhea. The Indian Journal of Pediatrics, 2011. 78(2): p. 165-170.
9. Navidinia, M., et al., Study prevalence of verotoxigenic E. coli isolated from urinary tract infections (UTIs) in

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

an Iranian children hospital. The open microbiology journal, 2012. 6: p. 1.
10. Moshtagian, F., M. Alipour, and Y. Yahyapour, Prevalence of Escherichia coli pathotypes among children with diarrhea in Babol, Northern Iran. Int J Enteric Pathog, 2016. 4(3): p. 1-4.
11. Rahimi, E., H.R. Kazemeini, and M. Salajegheh. Escherichia coli O157: H7/NM prevalence in raw beef, camel, sheep, goat, and water buffalo meat in Fars and Khuzestan provinces, Iran. in Veterinary Research Forum. 2012. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
12. DeVinney, R., D.G. Knoechel, and B.B. Finlay, Enteropathogenic Escherichia coli: cellular harassment. Current opinion in microbiology, 1999. 2(1): p. 83-88.
13. Orden, J., et al., Typing of the eae and espB genes of attaching and effacing Escherichia coli isolates from ruminants. Veterinary microbiology, 2003. 96(2): p. 203-215.
14. Torres, A.G., X. Zhou, and J.B. Kaper, Adherence of diarrheagenic Escherichia coli strains to epithelial cells. Infection and immunity, 2005. 73(1): p. 18-29.
15. Khalouie, F., et al., Immunogenic evaluation of chimeric recombinant protein against ETEC, EHEC and Shigella. Molecular Biology Research Communications, 2017. 6(3): p. 101.
16. Jeshvaghani, F.S., et al., Oral immunization with a plant-derived chimeric protein in mice: Toward the development of a multipotent edible vaccine against E. coli O157: H7 and ETEC. Immunobiology, 2019. 224(2): p. 262-269.
17. Karimi Rahjerdi, A., et al., Immunogenic Evaluation of Bivalent Vaccine Candidate against Enterohemorrhagic and Enterotoxigenic Escherichia coli. Iranian Journal of Immunology, 2019. 16(3): p. 200-211.
18. McNeilly, T.N., et al., Escherichia coli O157: H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. Infection and immunity, 2008. 76(6): p. 2594-2602.
19. Svennerholm, A.-M. and J. Tobias, Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. Expert review of vaccines, 2008. 7(6): p. 795-804.
20. Odumosu, O., et al., AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. Toxins, 2010. 2(7): p. 1612-1645.
21. Aslani, M.M. and S. Bouzari, An epidemiological study on Verotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) infection among population of northern region of Iran (Mazandaran and Golestan provinces). European journal of epidemiology, 2003. 18(4): p. 345-349.
22. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, Diarrheagenic escherichia coli. Clinical microbiology reviews, 1998. 11(1): p. 142-201.
23. Ebrahimi, F., et al., Designing a Recombinant Vaccine Containing Three Bacterial Proteins of EHEC, ETEC, and shigella Dysentery Antigens in E. coli and Evaluation of its Humoral Immunity in Mic. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 2018. 27(157): p. 1-16.
24. Novinrooz, A., et al., In-silico design, expression, and purification of novel chimeric Escherichia coli O157: H7 OmpA fused to LTB protein in Escherichia coli. PLoS One, 2017. 12(3): p. e0173761.
25. Bentancor, L.V., et al., A DNA vaccine encoding the enterohemorragic Escherichia coli Shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to Shiga toxin challenge in the murine model. Clin Vaccine Immunol, 2009. 16(5): p. 712-8.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]