Original Article

Cloning and Expression of the Binding Subunit of Shiga-Like Toxin Type 2 Gene and Immunization Study in an Animal Model

Rouhollah Kazemi[1], Asal Akahavian Tehrani[2], Mahyat Jafari[2], Jafar Amani[3], Amir Mousavi[4], Ali Hatef Salmanian[5*]

1- Ph.D. Candidate, Department of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2- M.Sc., Department of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
3- Associated Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Associated Professor, Department of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
5- Professor, Department of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1417863171, Department of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran*
Email: salman@nigeb.ac.ir

Received: 02/Aug/2015, Accepted: 05/Jan/2016

Abstract

Objective: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) which produces shiga-like toxin type 2 (Stx2) is a major cause of bloody diarrhea. This pathogen can lead to hemolytic uremic syndrome (HUS) and renal failure with a high mortality rate. Stx2 is the major virulence factor of EHEC. Neutralization of toxin by specific antibodies is known to be the best way to prevent and cure HUS. In this study, we describe the cloning, expression, purification, and immunization of the Stx2B subunit which is responsible for toxin binding to the target cell surface.

Methods: The *Stx2B* gene was amplified by PCR and subcloned into a pET28a expression vector and transformed into *E. coli* BL21-DE3. We evaluated recombinant protein expression and rSTX2B was purified by the Ni-NTA column. The purified rSTX2B was administered subcutaneously to BALB/c mice in three separate doses as an immunogenic candidate. The raising of anti-rSTX2B antibodies in immunized mice sera was evaluated by Elisa assay. The neutralizing immune response was verified by an in vitro assay on HeLa cells and an in vivo assay on mice by challenging them with a lethal dose of Stx2.

Results: The IgG titration verified the induction of a humeral response in immunized mice. The HeLa cell assay indicated that the Stx2 toxin was neutralized by immune mice sera. In the challenge assay, 70% of immunized mice survived.

Conclusion: Recombinant rSTX2B can induce a neutralizing immune response in mice. It can be used as a major component in development of EHEC vaccines.

Keywords: Shiga-like toxin, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Immunization, Vaccine candidate

Pathobiology Research, Vol. 18 (2015-2016), No.4, Pages: 45-60

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

مقاله اصیل

همسانه‌سازی و بیان ژن زیر واحد اتصالی سم شبه شیگا نوع ۲ و بررسی ایمنی‌زایی آن در مدل حیوانی

روح اله کاظمی[۱]، عسل اخویان طهرانی[۲]، محیات جعفری[۲]، جعفر امانی[۳]، امیر موسوی[۴]، علی هاتف سلمانیان[۵*]

۱-دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۵- استاد، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۸۶۳۱۷۱، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی
Email: salman@nigeb.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۴/۰۵/۱۲ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۱۶

چکیده

هدف: اشریشیا کلی انتروهموراژیک با قدرت تولید سم شبه شیگا نوع ۲ عامل اصلی اسهال خونی باکتریایی است. این عامل بیماری‌زا در برخی موارد می‌تواند منجر به نشانگان اورمی همولیتیک و نارسایی کلیوی با درجه مرگ و میر بالا شود. تولید سم شبه شیگا نوع ۲ اصلی‌ترین عامل بیماری‌زایی سویه‌های اشریشیا کلی انتروهموراژیک است و از این رو خنثی‌سازی سم با آنتی‌بادی‌های سرمی اختصاصی به‌عنوان راه‌کار اصلی در روش‌های پیشگیری و درمان ضد نشانگان اورمی همولیتیک مطرح است. در این تحقیق، همسانه‌سازی، بیان پروتئین نوترکیب، خالص‌سازی و ایمنی‌زایی زیرواحد B سم شبه شیگا نوع ۲ (Stx2B) که عامل اتصال سم به سلول‌های هدف است، شرح داده شده است.

مواد و روش‌ها: ژن *stx2B* با استفاده از PCR تکثیر و در ناقل بیانی pET28a همسانه‌سازی و ناقل بیانی به اشریشیا کلی BL21-DE3 منتقل شد. پروتئین نوترکیب rSTX2B پس از ارزیابی بیان با استفاده از ستون نیکل خالص‌سازی شد. پروتئین rSTX2B تخلیص شده به‌عنوان کاندید ایمنی‌زایی به روش زیرپوستی در سه مرحله به موش‌های نژاد Balb/c تزریق شد. تولید آنتی‌بادی سرمی ضد rSTX2B در خون موش‌های ایمن شده با استفاده از آزمون الایزا ارزیابی شد. خنثی‌سازی سم در شرایط آزمایشگاهی روی سلول‌های Hela و در شرایط درون بدنی با آزمون چالش موش‌های ایمن با سم شبه شیگا نوع ۲ بررسی شد.

نتایج: با بررسی میزان IgG القا پاسخ ایمنی عمومی در موش‌های ایمن شده تأیید شد. نتایج آزمون سلول‌های Hela نشان داد که سرم موش‌های ایمن قادر به خنثی‌سازی سم است. در آزمون چالش حدود ۷۰ درصد از موش‌های ایمن زنده ماندند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که پروتئین نوترکیب rSTX2B می‌تواند منجر به القای پاسخ ایمنی خنثی‌کننده در موش شود و می‌تواند به‌عنوان یکی از اجزای اصلی واکسن علیه اشریشیا کلی انتروهموراژیک به کار برده شود.

کلیدواژگان: سم شبه شیگا، باکتری اشریشیا کلی انتروهموراژیک، ایمنی‌زایی، کاندید واکسن

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، صفحات: ۴۵-۶۰

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

مقدمه

سم شبه شیگا (*Shiga* like toxin: Stx) در بیماری‌زایی سویه‌های اشریشیا کلی انتروهموراژیک (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) نقش مهمی بر عهده دارد و می‌تواند منجر به کولیت هموراژیک (Hemorrhagic colitis)، آسیب به سیستم عصبی مرکزی و نشانگان اورمی همولیتیک (Hemolytic uremic syndrome: HUS) شود که همراه با نقص شدید در عملکرد سیستم کلیوی است و در نهایت میزان مرگ و میر بالایی را موجب می‌شود. به‌طور کلی حدود ۲/۵ درصد از کل موارد بیماری اسهال به این باکتری نسبت داده می‌شود و تخمین زده می‌شود که حدود ۲۵ درصد از اسهال‌های خونی یا عفونت‌های روده‌ای خونریزی دهنده بر اثر آلوده شدن به این باکتری روی دهد [۱]. اگرچه در اغلب موارد بیماری طی یک هفته بهبود می‌یابد، اما به‌طور تقریبی در ۱۲ درصد موارد نیز ممکن است این بیماری به سمت HUS یا نوع خاصی از بیماری اختلال انعقاد خون (Thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP) تظاهر یابد [۲]. از نظر آماری بین ۳ تا ۵ درصد از افراد مبتلا به HUS جان خود را از دست می‌دهند و در این بین افراد خردسال و مسن در معرض خطر بیشتری هستند [۳]. بیشترین شیوع این باکتری در کودکان زیر ۵ سال وجود دارد و نسبت مرگ و میر بر اثر این مشکل در کودکان بین ۵ تا ۱۰ درصد است، درحالی‌که مرگ و میر ناشی از TTP گاه به ۵۰ درصد نیز می‌رسد [٤، ۵]. به‌دلیل نیاز به تعداد بسیار اندک باکتری برای ایجاد بیماری (کمتر از ۱۰۰ باکتری)، تاکنون موارد متعددی از همه‌گیری از طریق مصرف آب آلوده، انتقال فرد به فرد و تماس با حیوانات توسط این باکتری گزارش‌شده است [٦].

Stx تولید شده توسط اشریشیا کلی، به‌عنوان اصلی‌ترین عامل بیماری‌زا، به دو گروه (Stx1 و Stx2) تقسیم می‌شود که هرکدام دارای انواع و زیرگروه‌های مختلفی است. Stx1 از لحاظ توالی آمینواسیدی بسیار مشابه سم شیگا (ShT) است و شامل دو نوع Stx1 و Stx1c است؛ در حالی که Stx2 شباهت کمتری به ShT داشته و توسط آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه ShT نیز خنثی نمی‌شود. این سم شامل انواع Stx2، Stx2c، Stx2d، Stx2e و Stx2f است که ۸٤-۹۹ درصد از نظر ترادف اسیدهای آمینه مشابه هستند. به‌طورکلی، سویه‌های اشریشیا کلی قادر به تولید یکی از انواع Stx1، Stx2 یا در برخی از موارد هر دو سم هستند. با این حال، بیماری‌های حادی مانند HUS معمولاً تنها بر اثر تولید سم Stx2 ایجاد می‌شود [۷].

سم Stx پس از ورود به سلول‌های روده به‌صورت عمومی در بدن منتشر می‌شود و خود را به سلول‌های اصلی هدف در کلیه و سیستم اعصاب مرکزی که دارای گیرنده اختصاصی سم هستند، می‌رساند و با مهار پروتئین‌سازی موجب مرگ سلول و بیماری‌های سیستمیک سیستم اعصاب مرکزی و HUS می‌شود. هنگام بروز عفونت، این باکتری قادر است که آسیب‌های تخریبی شدید در سلول‌های پوششی روده میزبان (Attaching/Effacing: A/E) ایجاد کند. علاوه بر این؛ مشخص شده است که بیان Stx منجر به افزایش بیان گیرنده‌های اختصاصی باکتری توسط انتروسیت‌ها (Enterocytes) می‌شود که این واکنش باعث افزایش اتصال باکتری به دیواره روده نیز می‌شود [۸].

Stx از سموم خانواده AB5 است و همانند سایر اعضا این گروه واجد یک زیر واحد A با وزن مولکولی ۳۲ کیلو دالتون می‌باشد که فعالیت آنزیمی دارد. علاوه بر این سم Stx شامل ۵ زیر واحد یکسان ۷/۷ کیلو دالتونی StxB است که در کنار هم یک ساختار پنتامری را ایجاد می‌کنند و مسئول اتصال سم به گیرنده اختصاصی در سطح سلول هستند. StxA به‌طور اختصاصی دارای فعالیت N-گلیکوزیدازی است به‌طوری‌که می‌تواند موجب مهار عملکرد ریبوزوم‌های یوکاریوتی شود [۹]. گیرنده اختصاصی Stx، یک اسفنگولیپید خنثی به نام گلوبوتری‌آسیل‌سرامید (Globotriaosylceramide: Gb3) است، که در سطح برخی از سلول‌های یوکاریوتی مانند سلول‌های اندوتلیالی کلیه و رگ‌ها به میزان بالایی بیان می‌شود [۱۰].

تاکنون راه‌کار درمانی گسترده یا پیشگیری کننده مناسبی برای ممانعت از بروز HUS در موارد ابتلا به EHEC گزارش

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

نشده است. درمان نیز مستلزم تزریق پلاکت در موارد خونریزی همراه با مراقبت‌های درمانی موردی است. در درمان بیماری روش‌های متعددی مانند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌کارگیری آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه Stx1 و Stx2 و حتی تزریق گیرنده مشابه گیرنده اختصاصی سم (Gb3) استفاده شده است، اما به‌دلیل ضعف در سیستم درمانی برای این عفونت، هنوز هم پیشگیری بهترین راه است [۱۱، ۱۲].

تلاش‌ها برای دستیابی به یک واکسن پیشگیری کننده از بروز HUS به‌طور عمده، بر تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده Stx یا ممانعت از اتصال باکتری متمرکز شده است. راه‌کارهای مختلفی برای تولید واکسن مناسب به کار گرفته شده است که از آن‌ها می‌توان به واکسن‌های DNA [۱۳] استفاده از پلی‌ساکاریدهای متصل به پروتئین [۱٤] و همچنین استفاده از زیر واحد B این سم در ایمنی‌زایی مخاطی [۱۵] یا بررسی ایمنی‌زایی زیر واحد B سم Stx1 [۱٦] و Stx2 [۱۷] و نیز پروتئین‌های باکتریایی که در اتصال نقش دارند، نظیر اینتیمین (Intimin)، EspA و EspB اشاره کرد [۸، ۱۸، ۱۹].

با توجه به اهمیت StxB به‌عنوان متصل‌کننده سم به سلول میزبان و گزارش‌های موجود مبنی بر قدرت ایمنی‌زایی این پروتئین، به استفاده از آن به‌عنوان کاندید واکسن توجه شده است. در گزارش‌های موجود به مشکلاتی در بیان Stx2B به‌صورت پروتئین نوترکیب [۱۷، ۲۰] و نیز بر ایمنی‌زایی ضعیف آن [۱۵، ۲۱، ۲۲] اشاره شده است. در این تحقیق به‌منظور دستیابی به بیان مناسب این ژن و بررسی میزان ایمنی‌زایی آن، طراحی ژن مصنوعی بهینه‌سازی شده با ترجیح کدونی اشریشیا کلی که با تکیه بر تجزیه و تحلیل‌های ایمنواینفورماتیکی آن انجام شده است، مطالعه شد. برای این منظور، پروتئین نوترکیب پس از تولید و خالص‌سازی به همراه ادجوانت فروند (Freund's adjuvant) به روش زیرپوستی به موش‌های Balb/C تزریق و بررسی‌های ایمنی‌زایی انجام شد و میزان اثر حفاظتی ایمنی ایجاد شده، با چالش حیوان ایمن با دز کشنده سم Stx2 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

آنتی‌بادی کونژوگه (Conjugated antibody) ضد موشی (A9044)، آنتی‌بادی کونژوگه ضد دنباله هیستیدینی (A7058)، اُ-فنیل دی آمین (o-phenylenediamine; P9187) و دی آمینوبنزیدین (3'-diaminobenzidine; D4293 ،3) از شرکت Sigma آلمان، غشای PVDF (Polyvinylidene fluoride) از شرکت Roche آلمان، رزین Ni-NTA (30210) از شرکت Qiagen آلمان و پلیت الایزا (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) از شرکت Nunc دانمارک تهیه شد. آغازگرها (Primers) مورد نیاز از شرکت ژن فن‌آوران (ایران) تهیه شد. کلیه مواد شیمیایی از شرکت Merck آلمان تهیه شد. سایر مواد از قبیل Taq DNApolymerase، dNTP، Isopropyl-beta-D- (ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوزید (thiogalactopyranoside: IPTG)، آگارز و آنزیم‌های محدودگر از شرکت Thermo Scientific (آمریکا) تهیه شد. از دستگاه‌های اسپکتروفتومتر (مدل DU 530)، pH متر (مدل 72 PH METER) ساخت شرکت Beckman (آمریکا)، دستگاه PCR (مدل FFG05TUD) ساخت شرکت TECHNE (انگلستان)، سانتریفیوژ (مدل D37520) ساخت شرکت Kendro (آلمان) و دستگاه خوانش ELISA (مدل ۵۵۰) ساخت شرکت Bio-rad (آمریکا) استفاده شد.

کلیه روش‌های ساخت محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها، اندازه‌گیری غلظت DNA، تخلیص و هضم آنزیمی پلاسمید، تخلیص محصول هضم آنزیمی، الحاق قطعه هدف در ناقل، تهیه سلول‌های مستعد و غربالگری کلونی‌ها براساس کتب مرجع در روش‌های آزمایشگاهی مولکولی انجام شد [۲۳].

تکثیر ژن *stx2B* از طریق واکنش PCR

در این تحقیق، از یک ژن مصنوعی سه قسمتی بهینه‌سازی شده بر اساس ترجیح کدونی اشریشیا کلی به‌عنوان DNA الگو

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

استفاده شد که متشکل از قطعات ژنی *ltB*، *stx2B* و *ctxB* است، این قطعات ژنی با استفاده از توالی‌های پیوند دهنده (Linker) به یکدیگر متصل شده و ژن کایمریک حاصل (lsc) پایگاه داده NCBI با شماره JX866680 قابل‌دسترسی است. به‌منظور زیرهمسانه‌سازی قطعه *stx2B* از ساختار اصلی، آغازگرهای اختصاصی طراحی و با استفاده از نرم‌افزار Oligo ارزیابی شد (شکل ۱-الف) برای همسانه‌سازی در ناقل بیانی pET28a، توالی آنزیم *Bam*HI و کدون شروع (ATG) نیز در آغازگر پیشرو (Sf: 5'- GATCCGGGATCCATGGCCG ACTGTG-3') لحاظ شد. در آغازگر برگشتی (Sr: 5'- TGC TTCAAGCTTTTAATCATTGTTGAACTGAACT TC-3') نیزتوالی آنزیم *Hind*III و کدون خاتمه (UAA) قرار داده شد. واکنش PCR با آنزیم DNA پلیمراز High Fidelity و ۵ پیکومول از هر یک آغازگرهای ذکر شده با استفاده از ۱۰ نانوگرم از DNA الگو (پلاسمیدpUC57 حاوی ژن سه قسمتی lsc)، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP و غلظت ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. کیفیت محصول واکنش روی ژل آگارز یک درصد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) بررسی شد.

تهیه سازه ژنی pET28a-*stx2B*

با استفاده از محصول PCR که دارای انتهای A بود و ناقل pTZ57R/T (Thermo Scientific، آمریکا) که دارای انتهای T است، واکنش اتصال بر مبنای دستورالعمل کیت انجام گرفت. ناقل pET28a از باکتری اشریشیا کلی DH5α به روش لیز قلیایی استخراج شد و واکنش هضم با آنزیم‌های (*Bam*HI/*Hind*III) مطابق با روش استاندارد انجام و از روی ژل آگارز تخلیص شد. زیر همسانه‌سازی قطعه *stx2B* از ناقل pTZ57R-*stx2B* به ناقل بیانی pET28a انجام شد و سازه ژنی pET28a-*stx2B* به سلول‌های مستعد DH5α منتقل و در محیط کشت حاوی کانامایسین (Kanamycin) (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کلونی‌های موردنظر انتخاب شد. پس از تأیید کلون‌ها با استفاده از PCR و هضم آنزیمی، برای اطمینان از درستی ترادف، توالی‌یابی انجام گرفت. سپس ناقل برای بیان به سویه بیانی اشریشیا کلی BL21-DE3 منتقل شد.

بررسی بیان ژن

به‌منظور بررسی بیان ژن، ابتدا حضور سازه pET28a-*stx2B* در چندین کلونی از سویه بیانی با استفاده از واکنش PCR تأیید شد. کلونی‌های تأیید شده در محیط LB مایع حاوی کانامایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌صورت شبانه رشد یافت و برای تلقیح به میزان یک به صد (حجمی/حجمی) به محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین استفاده شد. القای بیان با استفاده IPTG یک میلی‌مولار در جذب نوری (Optical density) ۶۰۰ نانومتر معادل ۰/۸، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت۱۸۰ دور در دقیقه انجام شد. برای بررسی زمان بهینه بیان، نمونه‌برداری در ۳، ۵، ۷ و ۱۲ ساعت بعد از القا انجام گرفت و نمونه‌های پروتئینی روی ژل ۱۲ درصد اکریل‌آمید بررسی شد.

بررسی محلول بودن پروتئین

پس از تجزیه و تحلیل ژل اکریل‌آمید و مشاهده باند بیانی مرتبط با پروتئین نوترکیب، بیان در حجم ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت انجام و رسوب باکتری برای تعیین حلالیت جمع‌آوری شد و در ادامه کل رسوب باکتری در ۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (۵۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4 و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۸ =pH) حل شد. با استفاده از لیزوزیم ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و سونیکاسیون (Sonication) (٦ بار به مدت ۱۰ ثانیه با مراحل استراحت ۱۰ثانیه‌ای) دیواره سلولی باکتری مورد نظر شکسته شد و پس از رسوب دادن (سانتریفوژ ۱۳۰۰۰×g در ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه)، محلول رویی که حاوی پروتئین‌های محلول است جمع‌آوری شد و رسوب به‌دست‌آمده برای بررسی حضور پروتئین نامحلول در بافر لیز کننده (۱۰۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4، ۱۰میلی‌مولار Tris-Cl و ۸ مولار اوره،

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

۸ =pH) حل شد. هر دو نمونه پس از آماده‌سازی روی ژل اکریل‌آمید ۱۲ درصد بررسی شد.

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni.NTA

باتوجه به ترادف نشانه هیستیدینی (در انتهای آمینی) و با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni.NTA و طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده، خالص‌سازی پروتئین نوترکیب انجام شد. برای خالص‌سازی pH محلول شستشو تغییر داده شد و درنهایت در ۷ =pH بهترین وضعیت ممکن از نظر خالص‌سازی به‌دست آمد. به‌منظور خارج‌سازی اوره و سایر نمک‌ها از محلول و جایگزینی آن با محلول بافر فسفات که قابل تزریق به موش است، برای پروتئین موردنظر با استفاده از بافر PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH=۲/۷ و ۰/۱۵ مولار) در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٢٤ ساعت دیالیز انجام شد.

وسترن بلاتینگ (Western blotting) به‌منظور تأیید پروتئین بیان شده

برای انجام این روش از آنتی‌بادی AntiHistag کونژوگه با HRP (Horseradish peroxidase) و آنتی‌بادی مونوکلونال تجاری Stx2B (ab20623، Abcam، انگلستان) استفاده شد. نمونه‌های مورد آزمایش و نمونه کنترل منفی (بدون القا) روی ژل اکریل‌آمید ۱۲درصد و سپس به غشا PVDF به‌مدت ٤٥ دقیقه با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت منتقل شد. غشای PVDF، به‌مدت ۲ساعت در داخل بافر مسدود کننده [محلول ۳ درصد شیر بدون چربی (Skimmilk)] قرار گرفت و متعاقباً با بافر PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBS-Tween 20: PBST) شستشو داده شد. آنتی‌بادی اولیه با رقت ۱ به ۵۰۰۰ در داخل بافر PBST تهیه و به غشای PVDF اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق روی لرزاننده (Shaker) قرار داده شد. سپس سه بار و هر بار به‌مدت ۱۵ دقیقه شستشو با بافر PBST انجام شد. در مورد استفاده از آنتی‌بادی AntiHistag، محلول DAB (3,3'-diaminobenzidine) روی غشای PVDF ریخته شد و پس از ظهور باندها با شستشوی با آب مقطر واکنش مهار شد. ولی در مورد آنتی‌بادی‌های اختصاصی (ضد Stx2B)، پس از انجام مراحل اشاره شده در بالا و شستشو، غشای PVDF در معرض آنتی‌بادی ضد Stx2B و سپس در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با HRP با رقت ۱ به ۵۰۰۰ قرار گرفت. نظیر حالت قبل برای ظاهر شدن باند مورد نظر محلول DAB استفاده شد و پس از ظهور باندها، واکنش با آب مقطر مهار شد.

ایمن‌سازی حیوان آزمایشگاهی با پروتئین نوترکیب

تعداد ۱۸ سر موش Balb/c ماده با سن ٦-٧ هفته‌ای تهیه شد و به دو گروه کنترل (۱۲ سر موش) و آزمون (٦ سر موش) تقسیم شد. برنامه ایمن‌سازی حیوان با سه بار تزریق زیر جلدی با مقدار ۱۰ میکروگرم از پروتئین خالص که در تزریق اول همراه با ادجوانت کامل فروند، در تزریق دوم با ادجوانت ناقص فروند و تزریق سوم بدون ادجوانت بود با فاصله هر دو هفته یک‌بار انجام شد. به گروه کنترل نیز تنها محلول حاوی ادجوانت و PBS تزریق شد.

خون‌گیری و تهیه سرم

یک هفته بعد از هر تزریق، خون‌گیری از موش با استفاده از پیپت پاستور استریل و از گوشه چشم هر موش انجام شد. قطرات خون به داخل میکروتیوپ استریل منتقل و درون گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری شد. برای جداسازی سرم، ابتدا لخته خون ایجاد شده خارج شد و سپس سرم در ۵۰۰۰×g در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع شفاف به‌دست‌آمده برای استفاده در مراحل بعدی جداسازی شد. سرم موش‌های ایمن شده تا زمان استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

سنجش میزان آنتی‌بادی در سرم موش‌های ایمن

از ELISA غیرمستقیم برای سنجش تیتر آنتی‌بادی استفاده شد. برای این کار مقدار یک میکروگرم از آنتی‌ژن خالص با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر بافر کربنات-بی‌کربنات ۰/۰۵ مولار با pH معادل ۹/٦ در کف هر چاهک قرار گرفت. پس از شستشو با محلول PBST (PBS حاوی توئین ۰/۰۵ درصد) مرحله مسدودسازی با استفاده ۱۰۰ میکرولیتر از محلول PBST حاوی ۳ درصد شیر خشک بدون چربی انجام شد؛ رقت‌های ۱:۱۰۰ تا ۱:٤۰۰۰۰۰ از سرم در محلول PBST تهیه و به مقدار ۱۰۰میکرولیتر به چاهک‌ها افزوده شد و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از انجام شستشو با PBST آنتی‌بادی کونژوگه به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر با رقت یک به ۵۰۰۰ به چاهک‌ها افزوده شد و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از شستشو به چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی اُ-فنیل دی آمین به‌عنوان سوبسترا افزوده شد و پس از توقف آزمایش با استفاده از اسیدسولفوریک ۲/۵ مولار، میزان شدت جذب هر چاهک در طول ٤۹۵ نانومتر تعیین شد. در نهایت بر اساس نتایج ELISA، تیتر آنتی‌بادی ارزیابی شد.

آماده‌سازی سم Stx2

ابتدا یک تک کلونی از *E.coli*O157 ($Stx2^+$) در ۳ میلی‌لیتر از محیط LB مایع به‌مدت ۷ ساعت رشد داده شد و برای تلقیح در فلاسک با نسبت یک به ۵۰۰ برای کشت شبانه باکتری استفاده شد. باکتری در ۱۷۰۰×g به‌مدت ۳۰ دقیقه رسوب داده شد و بخش شناور آن با استفاده از صافی ۰/۲۲ میکرومتری استریل شد و به‌عنوان منبع سم Stx2 استفاده شد [۲٤].

بررسی خنثی‌سازی سم با سرم موش ایمن در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)

برای بررسی خنثی‌سازی ابتدا CD_{50} سم Stx2 روی سلول‌های Hela به‌دست آمد [۲۵]. به‌طور خلاصه برای این کار رقت‌های متوالی (از ۱۵۲ نانوگرم تا $۱/۵۲ \times ۱۰^{-۱۲}$ نانوگرم) سم Stx2 در محیط کشت MEM (Minimal essential medium) تهیه شد و به سلول‌های Hela رشد یافته (۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) در پلیت ۹٦ خانه کشت سلولی افزوده شد. پس از ۱۸ تا ۲۰ ساعت (در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد) سلول‌های جدا شده از کف پلیت به همراه محیط کشت دور ریخته شد و سلول‌های باقی‌مانده با استفاده از محلول فرمالین ۲ درصد به‌مدت یک دقیقه تثبیت شد. رنگ‌آمیزی با محلول کریستال ویولت (Crystal violet) ۰/۱۳ درصد در اتانل ۵ درصد و فرمالین ۲ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. باقی‌مانده رنگ توسط شستشو با آب زدوده شد و پلیت در معرض هوا خشک شد. پس از افزودن محلول ۵۰ درصد اتانل به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک جذب نوری در طول‌موج ۵۹۵ خوانده شد. رقتی از سم که مقدار جذب نوری آن معادل نصف جذب نوری چاهک کنترل (سلول‌ها بدون تأثیر سم) بود به‌عنوان CD_{50} در نظر گرفته شد. با این روش رقتی از سم که باعث جدا شدن ۵۰ درصد از سلول‌ها از کف پلیت می‌شد (CD_{50}) به‌دست آمد. برای بررسی خنثی‌سازی، مخلوط غلظت ده برابر CD_{50} سم با رقت‌های مختلف سرم موش‌های ایمن شده (با نسبت ۱ به ۲) در محیط کشت EMEM تهیه و به‌مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس این مخلوط به سلول‌های Hela (۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) افزوده شد و پس از گذشت ۱۸ تا ۲۰ ساعت و در شرایط قبلی مراحل تثبیت سلول‌ها و رنگ‌آمیزی انجام شد تا غلظتی از سرم که منجر به خنثی‌سازی غلظت ده برابر CD_{50} سم Stx2 می‌شود به‌دست آید. این آزمایش با استفاده از سرم هر یک از موش‌های ایمن انجام شد. به‌عنوان کنترل سم تولید شده با سرم موش غیر ایمن نیز مجاور شد و روی سلول‌های Hela اثر داده شد. برای تجزیه و تحلیل، غلظت‌هایی از سرم موش‌های ایمن شده که جذبی بالاتر از جذب نمونه کنترل داشت به‌عنوان رقت خنثی‌کننده سرم موش‌های ایمن شده در نظر گرفته شد [۲٦].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

بررسی میزان محافظت در برابر سم Stx2 بـا چـالش حیوانی

به‌منظور دستیابی به دز کشنده سـم از مقـادیر ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از سم آماده‌سازی شده از بخش شناور کشـت بـاکتری *E. coli* O157 بـه روش تزریـق درون صـفاقی بـه موش‌هـا اسـتفاده شـد (مقـادیر بـر اسـاس گـزارش شـئوران (Sheoran) و همکاران [۲۵] انتخاب شد). برای بررسی میزان اثر محافظتی در موش‌های ایمن شده، دو هفته پس از آخـرین تزریق پروتئین نوترکیب ایمنی‌زا موش‌ها در معرض دز کشنده سم Stx2 (به روش درون صفاقی) قرار گرفت و میزان مرگ و میر آن‌ها تا ده روز پس از تزریق بررسی و ثبت شد.

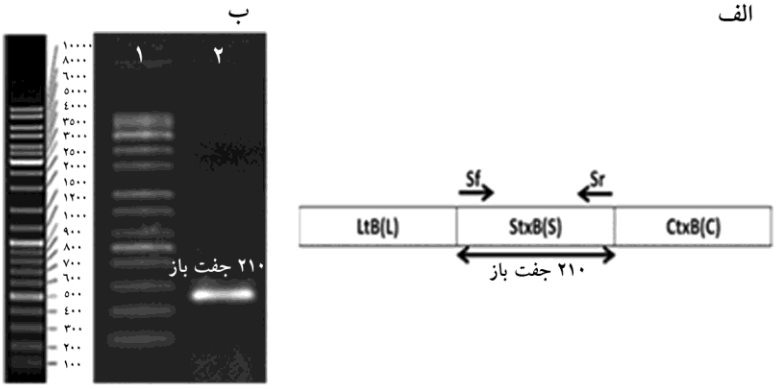
بررسی‌های آماری

تجزیه و تحلیل آماری t-student برای مقایسـه آمـاری گروه ایمن شده و شاهد در آزمایش خنثی‌سازی سم و آزمون دقیق فیشر (Fisher exact test) برای بررسی نتایج آزمـایش چالش به کار گرفته شد. از نرم‌افـزار SPSS نسـخه ۱۶ بـرای بررسی‌های آماری و از نرم‌افزار اکسـل (Excel) بـرای رسـم نمودارها استفاده شد.

نتایج

تکثیر ژن *stx2B* و زیرهمسانه‌سـازی در ناقـل بیانی pET28a

قطعه ژنی *stx2B* از سازه مصنوعی LSC با آغازگرهـای پیشرو و برگشتی اختصاصی تکثیر شـد. محصـول اختصاصـی PCR با اندازه ۲۱۰ نوکلئوتید روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده شد (شکل۱–ب).



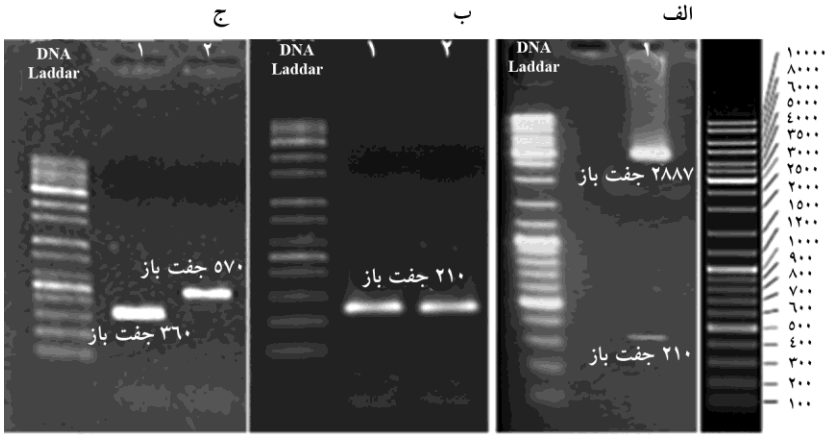
شکل ۱ تکثیر قطعه ژنی StxB؛ الف) تصویر شماتیک از سازه کایمریک LSC و جایگاه آغازگرهای اختصاصی StxB، ب) الکتروفورز محصول PCR بـا آغازگرهـای اختصاصی StxB، ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی DNA (۱۰۰ جفت بازی)، ستون ۲ محصول تکثیر ژن با آغازگرهای Sf و Sr

محصول PCR پس از خالص‌سازی از روی ژل آگارز در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی شد و به باکتری DH5α منتقل شد. برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T حاصـل از الحاق انجام شد که وجود قطعه stx2B در نتیجه الکتروفورز محصول برش آنزیمی (*Bam*HI/*Hind*III) تأیید شـد (شـکل ۲–الف).

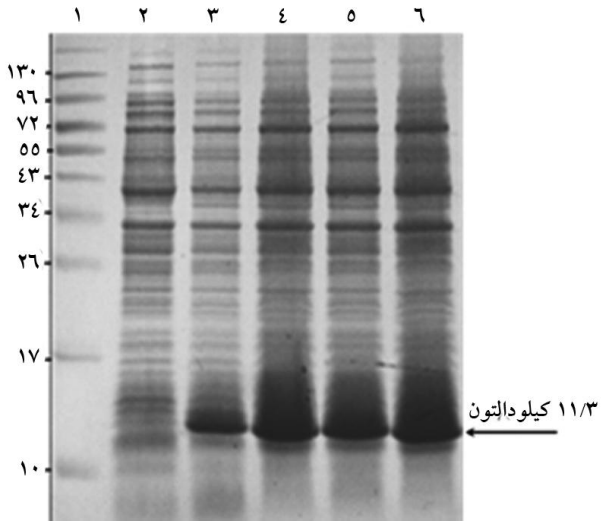
قطعه ژنی *stx2B* برش خورده با *Bam*HI و *Hind*III در ناقل بیانی pET28a زیر همسانه‌سازی شد و تأیید الحـاق آن با واکنش PCR با آغازگرهـای اختصاصـی (شـکل ۲–ب) و آغازگرهـای پـیش برنـده (Promoter) و پایـان دهنـده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

(Terminator) T7 (شکل ۲ـج) واقع بر بدنه ناقل pET28a انجام شد. در PCR با آغازگرهـای T7 و بـا DNA فاقـد ژن نوترکیب یک قطعه کوچک‌تر که ناشی از تکثیر ناحیـه MCS (Multiple Cloning Site) است مشاهده می‌شـود. در ناقـل نوترکیب به‌دلیل حضور ژن نوترکیب بانـد بـزرگ‌تـری (۵۰۰ جفت باز) مشاهده می‌شود (شکل ۲ـج). در نهایـت درسـتی ورود ژن نوترکیب و عدم تغییرات نوکلئوتیدی در آن با تعیین توالی DNA تأیید شد (داده‌ها ارایه نشده است).



شکل ۲ تأیید همسانه‌سازی قطعه StxB در ناقل pTZ57R/T و pET28a؛ الف) ستون ۱ قطعه *stxB* خارج‌شده از ناقل نوترکیب pTZ57R/T استخراج‌شده از کلونی باکتری‌های نوترکیب با هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III، ب) تأیید همسانه‌سازی *stxB* در pET28a بـا الکتروفـورز محصـول PCR بـا آغازگرهـای اختصاصی ژن، ستون ۱ کنترل مثبت (پلاسمید pTZ57R/T حاوی قطعه *stxB*)، ستون ۲ پلاسمیدهای بررسی‌شده مربوط به باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-StxB، ج) الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای استاندارد T7، ستون ۱ پلاسمید pET28a فاقد سازه ژنی، ستون ۲ پلاسمید مورد نوترکیب pET28a-StxB



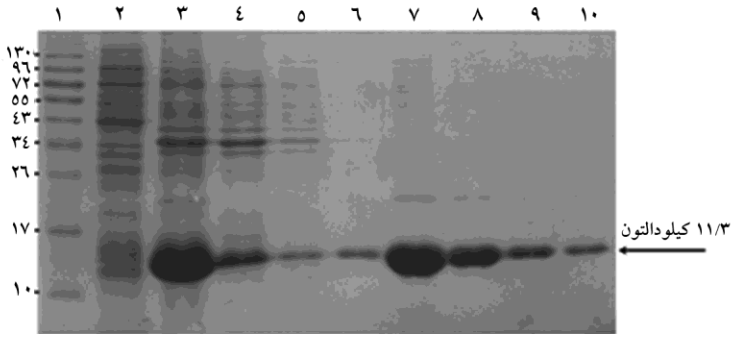
شکل ۳ تجزیه و تحلیل بیان قطعه ژنی *stxB* با استفاده از SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ۱۲ درصد؛ ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ستون ۲ نمونه حاوی پلاسمید نوترکیب پیش از القا، ستون ۳ تا ۶ نمونه باکتری نوترکیب به ترتیب ۳، ۵، ۷ و ۱۲ ساعت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

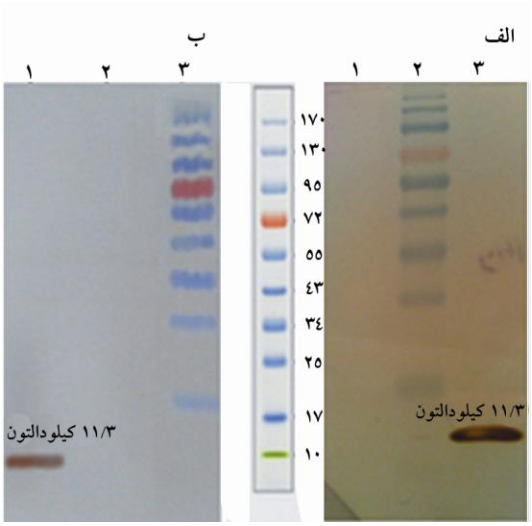
بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب rSTX2B

القای باکتری‌های نوترکیب با IPTG یک میلی‌مولار بیان مناسبی را در ساعات مختلف پس از القا نشان می‌دهد. حضور باند مورد نظر در محدوده ۱۲ کیلودالتون و عدم حضور آن در نمونه‌های پیش از القا تأیید کننده بیان ژن موردنظر است (شکل ۳).

بررسی حلالیت پروتئین بیان شده در شرایط مختلف بیانی نشان داد که پروتئین به شکل نامحلول بیان می‌شود. برای خالص‌سازی پروتئین از روش خالص‌سازی پروتئین‌های نامحلول با استفاده از ستون Ni-NTA استفاده شد (شکل ٤).



شکل ٤ خالص‌سازی پروتئین نوترکیب STXB در بخش نامحلول با استفاده از ستون Ni-NTA؛ ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ستون ۲ بیان سلول پیش از القا، ستون ۳ محتوای کامل پروتئینی سلول پس از القا، ستون ٤ نمونه خارج شده از ستون پس از بارگذاری پروتئین، ستون ٥ نمونه خارج شده از ستون با بافر شستشو، ستون ٦ تا ۹ نمونه خارج شده از ستون با بافر pH ٤/٥، ستون ۱۰ نمونه خارج شده از ستون توسط بافر MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid]



شکل ٥ وسترن بلاتینگ برای تأیید بیان پروتئین STXB؛ الف) وسترن بلاتینگ برای تأیید بیان پروتئین STXB با استفاده از آنتی‌بادی ضد His tag، ستون ۱ نمونه پیش از القا باکتری حاوی قطعه ژنی stxB، ستون ۲ نشانگر وزن مولکولی پروتئین ستون، ۳ نمونه پس از القای باکتری حاوی قطعه ژنی *stxB*، ب) وسترن بلات برای پروتئین های نوترکیب در حضور آنتی‌بادی اختصاصی ضد StxB، ستون ۱ نمونه پس از القای باکتری حاوی قطعه ژنی *stxB*، ستون ۲ نمونه پیش از القا حاوی قطعه ژنی *stxB*، ستون ۳ نشانگر وزن مولکولی پروتئین

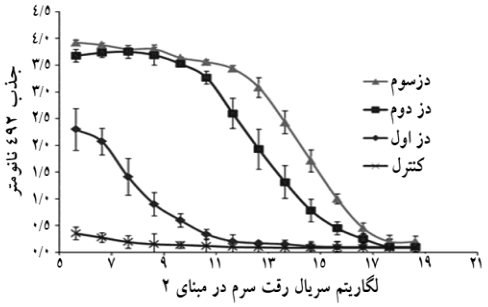
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

تأیید بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از ایمنوبلاتینگ

با توجه به جایگاه زیرهمسانه‌سازی ژن نوترکیب در ناقل بیانی pET28a انتظار می‌رود در انتهای آمینی پروتئین دنباله His Tag وجود داشته باشد. نتایج وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی ضد His Tag و همچنین استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی مونوکلونال علیه Stx2B و مشاهده باند مورد انتظار، درستی بیان پروتئین نوترکیب و امکان شناسایی با آنتی‌بادی استاندارد را تأیید می‌کند (شکل۵).

سنجش میزان آنتی‌بادی به روش ELISA

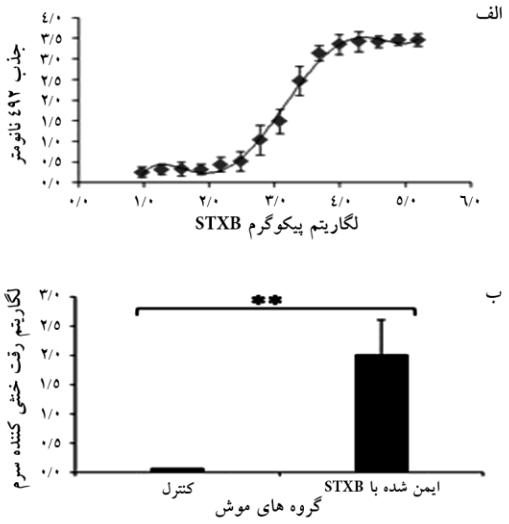
پس از ایمن‌سازی مدل حیوانی، میزان تحریک سیستم ایمنی هومورال علیه rSTX2B با آزمون ELISA اندازه‌گیری شد. از پروتئین نوترکیب به‌عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. از آنتیIgG به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد و نتایج ELISA بیانگر تحریک مناسب سیستم ایمنی علیه پروتئین نوترکیب rSTX2B بود. پس از هر مرحله از تزریق (به‌ویژه تزریق اول به دوم) افزایش تیتر آنتی‌بادی در مقایسه با کنترل وجود داشت و این افزایش نیز قابل توجه است (شکل ٦).



شکل ٦ تعیین تیتر آنتی‌بادی (از کلاس IgG) علیه پروتئین نوترکیب rSTX2B در سرم موش‌های ایمن؛ هر یک از نقاط معرف میانگین به‌دست‌آمده از سرم موش‌های ایمن و کنترل در رقت‌های مختلف است که به همراه خطای استاندارد آن برای تعیین میزان آنتی‌بادی استفاده شده است.

بررسی خنثی‌سازی سم با سرم موش ایمن در شرایط In vitro

به‌منظور تعیین میزان سم تولید شده در محیط کشت رویی باکتری، نمودار استاندارد با استفاده از مقادیر مختلف rSTX2B نوترکیب در مجاورت مقدار ثابت رقت سرم موش ایمن شده علیه rSTX2B رسم شد. نتایج ELISA با استفاده از نمونه سم Stx2 در مایع رویی کشت باکتری عنوان آنتی‌ژن تثبیت شده در کف پلیت ELISA نشان‌دهنده این است که آنتی‌بادی تولید شده علیه rSTX2B نوترکیب قادر به شناسایی سم ترشح شده در بخش شناور کشت باکتریایی است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، منحنی استاندارد ترسیم شد (شکل ۷-الف). با استفاده از ناحیه خطی منحنی و میزان جذب به‌دست آمده برای نمونه سم موجود در بخش شناور کشت باکتری *E. coli* O157:H7، مقدار سم Stx2 معادل ۱۵۲ نانوگرم در میکرولیتر محاسبه شد.



شکل ۷ بررسی میزان سم STX2 و خنثی‌سازی آن در کشت سلولی؛ الف) منحنی بر اساس مقادیر مختلف StxB برای محاسبه میزان سم تولید شده در محیط کشت رویی باکتری *E. coli* O157:H7، ب) بررسی خنثی‌سازی سم STX2 با استفاده از سرم موش‌های ایمن و کنترل در شرایط in vitro روی سلول‌های Hela، مقایسه میانگین رقت سرم خنثی‌کننده بین گروه ایمن شده با STXB و گروه کنترل در سطح یک در صد معنی‌دار است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده سم Stx2 در خون موش‌های ایمن شده با پروتئین نوترکیب با استفاده از آزمون اثر سمیت Stx2 روی سلول‌های Hela به‌عنوان یک روش In vitro در خنثی‌سازی سم بررسی شد. در این بررسی CD_{50} سم Stx2 بر سلول‌های Hela، در غلظت 10^{-5} محلول حاوی سم (معادل ۱/۵ پیکوگرم) تعیین شد. بررسی خنثی‌سازی سرم موش ایمن شده با استفاده از غلظت ده برابر CD_{50} سم Stx2 روی سلول‌های Hela نشان داد که سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین نوترکیب قابلیت خنثی‌سازی محلول حاوی سم را دارد؛ این در حالی است که سرم موش کنترل قادر به جلوگیری از اثر سم نبود و محلول حاوی سم منجر به تخریب سلول‌های Hela شد. تفاوت میانگین مشاهده بین گروه آزمون و کنترل در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است (شکل ۷-ب).

میزان محافظت در برابر سم Stx2 با چالش حیوانی

دو هفته پس از آخرین دز تزریق پروتئین نوترکیب، چالش حیوانی با تزریق درون صفاقی دز کشنده سم Stx2 انجام شد. همه موش‌های غیر ایمن حداکثر پس از گذشت ٤ روز بعد از تزریق سم مردند. در گروه موش‌های ایمن ٦٦ درصد از آن‌هادر مشاهده هر روزه آن‌ها تا پایان آزمایش زنده ماندند (جدول ۱). مقایسه نتایج به‌دست‌آمده در گروه آزمون و کنترل با استفاده از آزمون دقیق فیشر (Fisher exact test) بیانگر تفاوت بسیار معنی‌دار (P value= ۰.۰۰٤۹) بین آن‌ها است.

جدول ۱ میزان محافظت در موش‌های ایمن شده در برابر سم Stx2

نام گروه	تعداد موش آزمایش‌شده	تعداد موش زنده مانده#	در صد زنده ماندن
کنترل##	۱۲	۰	۰
ایمن شده	٦	٤	٦٦

#موش‌ها تا ۱۰ روز بعد از تزریق مشاهده و بررسی شدند. موش‌های گروه کنترل حداکثر ٤ روز بعد از تزریق سم تلف شدند. ## گروه کنترل برای ایمنی‌زایی، تنها محلول PBS و ادجوانت را دریافت کردند.

بحث

باکتری EHEC علاوه بر ایجاد بیماری اسهال به دلیل آسیب‌های کلیوی و عصبی که پس از عفونت با این باکتری رخ می‌دهد، یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی روده‌ای در انسان و به‌خصوص در کودکان است. عامل اصلی عوارض ناشی از این بیماری به دلیل سم ترشح شده از این باکتری است. به نظر می‌رسد اگر بتوان بدن میزبان را علیه سم باکتری ایمن نمود، می‌توان از آثار زیان‌بار بیماری ناشی از آن جلوگیری نمود. با توجه به ساختار و بخش‌های مختلف سم و اهمیت زیرواحد B در اتصال سم به سطح سلول میزبان، در این تحقیق ایمنی‌زایی زیرواحد B سم Stx2 بررسی شد. بدین منظور ابتدا ژن سنتزی زیرواحد اتصالی سم شبه شیگا (*stx2B*) که بر اساس ترجیح کدونی اشریشیا کلی بهینه‌سازی شده بود، تکثیر و زیرهمسانه‌سازی استفاده شد. نتایج بررسی‌های مولکولی درستی همسانه‌سازی ژن در ناقلین حد واسط و بیانی را نشان داد. بررسی بیان ژن نشان می‌دهد، بیان ژن مصنوعی به‌خوبی صورت می‌گیرد؛ در مطالعات مشابه به بیان ضعیف *stx2B* و امکان خالص‌سازی کم آن در مقایسه با *stx1B* اشاره شده است [۱۷، ۲۰]. در این گزارش‌ها به بیان ضعیف ژن طبیعی *stx2B* به همراه توالی پپتید نشانه خود و در موردی با تعویض این پپتید نشانه با پپتید نشانه *stx1B* [۱۷] (که بیان خوبی داشته) اشاره شده است. وجود پپتید نشانه موجب می‌شود که پروتئین تولید شده به فضای پری‌پلاسمیک (Periplasmic space) منتقل‌شود و پس از سر هم شدن و با استفاده از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

فرآیندهای سلولی ترشح شود. از طرف دیگر؛ با وجود این‌که منشأ ژن *stx2B*، باکتری اشریشیا کلی است اما کدون‌های ژن طبیعی، تنها حدود ٦٦ درصد با کدون‌های بهینه میزبان مطابقت دارد. به‌عبارت‌دیگر؛ هنوز هم می‌توان از کدون‌های بهینه‌تری برای بیان ژن‌های اشریشیا کلی در داخل میزبان اشریشیا کلی استفاده کرد. در این تحقیق از ژن *stx2B* بدون پپتید نشانه که بر اساس ترجیح کدونی اشریشیا کلی بهینه‌سازی شده بود، استفاده شد. به نظر می‌رسد استفاده از ژن بهینه‌سازی شده بر اساس ترجیح کدونی میزبان و استفاده از ظرفیت بیان و تجمع سیتوپلاسمی به‌جای ظرفیت تجمع در فضای پری‌پلاسمی (استفاده از پپتید نشانه) می‌تواند منجر به بیان مؤثرتر ژن و بالا رفتن غلظت پروتئین نوترکیب شود. بیان پروتئین نوترکیب rSTX2B از ساعات ابتدایی القا توسط ماده شیمیایی بیان شروع می‌شود و با توجه به بهینه‌سازی ژن به نظر می‌رسد شدت بیان ژن به نحوی است که امکان تشکیل ساختار محلول پروتئین فراهم نمی‌شود. به‌عبارت دیگر؛ در هیچ‌یک از شرایط اعمال شده پروتئین به شکل محلول نبود و به شکل ذرات نامحلول (Inclusion Body: IB) بیان می‌شود. تولید پروتئین‌های نوترکیب به‌صورت ذرات مجتمع (IB) یا محلول هر یک دارای مزایا و معایبی است؛ اما آنچه در خصوص تولید ایمنی‌زاها مطرح است، ذرات مجتمع در تحریک سیستم ایمنی مشکل‌ساز نخواهد بود؛ زیرا با واردکردن آنتی‌ژن به‌صورت مجتمع به داخل مایعات و اجزاء بدنی (نظیر سرم، خون، عضله و ...)، عملاً پروتئین در معرض شرایط کاملاً طبیعی قرار می‌گیرد و با کمک مکانیسم‌های موجود در بدن میزبان، باید بتواند ساختار مناسب خود را پیدا کند؛ البته این مسئله نیاز به بررسی بیشتر دارد.

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از ترادف هیستیدینی تعبیه‌شده در داخل ژن انجام گرفت. شناسایی پروتئین تخلیص شده با آنتی‌بادی ضد ترادف هیستیدینی و نیز آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی پروتئین نوترکیب، درستی بیان پروتئین را نشان داد. استفاده از این پروتئین نوترکیب به‌عنوان کاندیدای واکسن و با هدف تحریک سیستم ایمنی با بررسی سطح IgG تولیدشده نشان داد که پاسخ ایمنوگلوبولینی علیه پروتئین نوترکیب به‌اندازه مناسبی ایجاد شده است. افزایش ایجاد شده تیتر آنتی‌بادی بین تزریق اول و دوم نشان می‌دهد که پس از تزریق دوم سطح IgG خون موش ایمن به مقدار قابل‌توجهی افزایش‌یافته است. این موضوع تأیید کننده این مسئله است که تزریق زیرپوستی پروتئین نوترکیب rSTX2B به همراه ادجوانت امکان تحریک مناسب سیستم ایمنی و افزایش سطح IgG خون را فراهم می‌آورد.

در این تحقیق سم Stx2 با استفاده از بخش شناور کشت باکتری *E. coli* O157:H7 تهیه شد و تأثیر آن روی سلول‌های Hela نشان داد که با وجود سادگی روش جداسازی سم، هنوز این ماده دارای عملکرد زیستی است. چنانچه در قسمت‌های گذشته اشاره شد؛ برای تعیین مقدار سم از آزمون ELISA با به‌کارگیری آنتی‌بادی پلی‌کلونال به‌دست‌آمده در سرم موش‌های ایمن شده با rSTX2B نوترکیب استفاده شد. نتایج حاصل بیانگر این نکته است که آنتی‌بادی ضد rSTX2B تولیدشده در خون موش‌های ایمن قادر به شناسایی سم کامل است. به‌عبارت دیگر؛ با وجو تولید rSTX2B به‌صورت ذرات مجتمع در داخل میزبان اشریشیا کلی، اپی‌توپ‌های ارایه شده به سیستم ایمنی حیوان، مشابهت کامل با تعدادی از اپی‌توپ‌های بخش B در سم اصلی را دارا است. این مسئله یکی از نکات بسیار مهم در به‌کارگیری این جز به‌عنوان یکی از اجزای اصلی واکسن است.

بررسی وضعیت ایمنی ایجاد شده در سطح in vitro نشان داد ایمنی ایجاد شده در سطح سلولی اثر خنثی‌کنندگی دارد و می‌تواند اثر سم بر روی سلول‌های Hela را خنثی نماید. همچنین بررسی چالش حیوان ایمن شده با سم باکتری نشان داد در غلظت کشنده سم ٦٦ درصد از موش‌های ایمن شده با پروتئین نوترکیب زنده ماندند که آثار حفاظتی ایمنی ایجاد شده را نشان می‌دهد. با توجه به ایمنی‌زایی پایین Stx2B که در برخی گزارش‌ها به آن اشاره شده [۱۵، ۲۱، ۲۲] و همچنین

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

تحقیقاتی که آثار حفاظتی بین ۱۰ درصد [۸] تا ۱۰۰ درصد [۲۷، ۲۸] را برای ایمنی ایجاد شده با استفاده از این آنتی‌ژن گزارش کرده‌اند، به نظر می‌رسد نوع ادجوانت مورد استفاده [۲۷] و نیز حضور *stxA* [۲۸، ۲۹] در کنار *stxB* بتواند در دستیابی به سطح ایمنی حفاظتی بالاتر مؤثر باشد. همچنین این احتمال وجود دارد که مرگ تعدادی از موش‌های ایمن شده در نتایج بررسی حاضر به دلیل ناخالصی‌های موجود در سم تولید شده از بخش شناور کشت باکتری *E. coli* O157:H7 باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد زیرواحد اتصالی سم Stx2 می‌تواند آثار حفاظتی بسیار مناسبی در برابر سم تولید شده از باکتری EHEC داشته باشد و پس از بررسی‌های تکمیلی به‌عنوان یکی از اجزای قابل‌استفاده در واکسن مناسب برای جلوگیری از بیماری اسهال ناشی از این باکتری قابل پیشنهاد است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران معاونت علمی و فنی ریاست جمهوری (طرح شماره ۸۹۰۰۰۵۳۹) و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (طرح شماره ٤١١) برای حمایت در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Melton-Celsa A, Mohawk K, Teel L, O'Brien A. Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Curr Top Microbiol Immunol 2012; 357: 67-103.

[2] Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2010; 8(1): 26-38.

[3] Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, Hennessy T, Griffin PM, DuPont H, Sack RB, Tarr P, Neill M, Nachamkin I, Reller LB, Osterholm MT, Bennish ML, Pickering LK; Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis 2001; 32(3): 331-51.

[4] Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J Anim Sci 2007; 85(13 Suppl): E45-62.

[5] Li Y, Frey E, Mackenzie AM, Finlay BB. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. Infect Immun 2000; 68(9): 5090-5.

[6] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004; 2(2): 123-40.

[7] Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J Clin Microbiol 1999; 37(3): 497-503.

[8] Rojas RL, Gomes PA, Bentancor LV, Sbrogio-Almeida ME, Costa SO, Massis LM, Ferreira RC, Palermo MS, Ferreira LC. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* vaccine strains expressing a nontoxic *Shiga*-like toxin 2 derivative induce partial protective immunity to the toxin expressed by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Clin Vaccine Immunol 2010; 17(4): 529-36.

[9] Johannes L, Römer W. Shiga toxins--from cell

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

biology to biomedical applications. Nat Rev Microbiol 2010; 8(2): 105-16.

[10] Obrig TG. *Escherichia coli* shiga toxin mechanisms of action in renal disease. Toxins (Basel) 2010; 2(12): 2769-94.

[11] Tzipori S, Sheoran A, Akiyoshi D, Donohue-Rolfe A, Trachtman H. Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4): 926-41.

[12] Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. N Engl J Med 2000; 342(26): 1930-6.

[13] Bentancor LV, Bilen M, Brando RJ, Ramos MV, Ferreira LC, Ghiringhelli PD, Palermo MS. 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): 712-8.

[14] Konadu E, Donohue-Rolfe A, Calderwood SB, Pozsgay V, Shiloach J, Robbins JB, Szu SC. Syntheses and immunologic properties of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide and Shiga toxin 1 B subunit conjugates in mice. Infect Immun 1999; 67(11): 6191-3.

[15] Imai Y, Nagai R, Ono Y, Ishikawa T, Nakagami H, Tanikawa T, Kurohane K. Production of secretory immunoglobulin A against Shiga toxin-binding subunits in mice by mucosal immunization. Infect Immun 2004; 72(2): 889-95.

[16] Ishikawa S, Kawahara K, Kagami Y, Isshiki Y, Kaneko A, Matsui H, Okada N, Danbara H. Protection against Shiga toxin 1 challenge by immunization of mice with purified mutant Shiga toxin 1. Infect Immun 2003; 71(6): 3235-9.

[17] Marcato P, Mulvey G, Read RJ, Vander Helm K, Nation PN, Armstrong GD. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit. J Infect Dis 2001; 183(3): 435-43.

[18] Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157:H7. Vaccine 2010; 28(42): 6923-9.

[19] Vilte DA, Larzábal M, Cataldi AA, Mercado EC. Bovine colostrum contains immunoglobulin G antibodies against intimin, EspA, and EspB and inhibits hemolytic activity mediated by the type three secretion system of attaching and effacing *Escherichia coli*. Clin Vaccine Immunol 2008; 15(8): 1208-13.

[20] Acheson DW, De Breucker SA, Jacewicz M, Lincicome LL, Donohue-Rolfe A, Kane AV, Keusch GT. Expression and purification of Shiga-like toxin II B subunits. Infect Immun 1995; 63(1): 301-8.

[21] Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Shimizu Y, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Sugiyama S, Taniguchi K, Neri P, Mori H. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. Vaccine 2008; 26(4): 469-76.

[22] Smith MJ, Teel LD, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]

types 1 and 2. Vaccine 2006; 24(19): 4122-9.

[23] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

[24] Sheoran AS, Chapman S, Singh P, Donohue-Rolfe A, Tzipori S. Stx2-specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with *Escherichia coli* expressing Stx2 variants. Infect Immun 2003; 71(6): 3125-30.

[25] Lindgren SW, Samuel JE, Schmitt CK, O'Brien AD. The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. Infect Immun 1994; 62(2): 623-31.

[26] Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. Genetic toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. Vaccine 2006; 24(8): 1142-8.

[27] Marcato P, Griener TP, Mulvey GL, Armstrong GD. Recombinant Shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. Infect Immun 2005; 73(10): 6523-9.

[28] Cai K, Gao X, Li T, Wang Q, Hou X, Tu W, Xiao L, Tian M, Liu Y, Wang H. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. Vaccine 2011; 29(5): 946-52.

[29] Russo LM, Melton-Celsa AR, Smith MA, Smith MJ, O'Brien AD. Oral intoxication of mice with Shiga toxin type 2a (Stx2a) and protection by anti-Stx2a monoclonal antibody 11E10. Infect Immun 2014; 82(3): 1213-21.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-26]