نشریه علمی «علوم و فناوری‌های پدافند نوین»
سال سیزدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱؛ ص ۵۱- ۴۵

علمی- پژوهشی

ایمنی‌زایی پروتئین کایمر نوترکیب STXB-Intimin- EscC علیه بیماری‌زایی باکتری Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7

زهرا صدری نجف‌آبادی[۱]، شهرام نظریان[۲*]، محمد کارگر[۳]، فرشید کفیل زاده[۴]

۱- دانشجوی دکترای،۳ و۴- استاد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، ۲- دانشیار، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

(دریافت: ۰۹/ ۱۴۰۰/۰۹، پذیرش:۲۳ /۱۴۰۱/۰۱)

چکیده

انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* سروتیپ O157:H7 یک عامل بیماری‌زای مهم در بین انسان و حیوانات است که باعث عارضه‌های گوارشی متعددی از جمله کولیت هموراژیک و در موارد حاد سندرم اورمی همولیتیک (HUS) می‌شود. با توجه به خطرات ناشی از درمان آنتی‌بیوتیک‌ها در عفونت *E.coli* O157:H7، واکسن‌ها روشی امیدبخش برای پیشگیری از این عفونت را ارائه می‌کنند. هدف از این تحقیق بررسی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن کایمر StxB-EscC-Intimin (SEI) علیه باکتری *E.coli* O157:H7 بود. بیان پروتئین نوترکیب تحت تأثیر IPTG در *E.coli* BL21 DE3 القاء و توسط SDS-PAGE ارزیابی شد. پروتئین نوترکیب با ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA خالص و به روش الایزا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد توکسین شیگا تأیید گردید. ایمنی‌زایی در موش با پروتئین خالص انجام و تیتر آنتی‌بادی به روش ELISA تعیین شد. ریزش باکتری و مرگ و میر در موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بررسی آماری با آزمون‌های دانکن و T-test با نرم‌افزار SPSS انجام شد. بیان پروتئین با وزن مولکولی ۷۴/۵ کیلو دالتون در SDS-PAGE مشاهده شد. حداقل مقدار آنتی‌ژن شناسایی شده با آنتی‌بادی مرغی ضد شبه شیگا با استفاده از روش ELISA ۱۵۶نانوگرم بود. ریزش باکتری در موش ایمن تا 10^2 cfu/ml کاهش یافت و ۸۰ درصد از موش‌های ایمن پس از تزریق $10LD_{50}$ از باکتری زنده ماندند. نتایج نشان داد که پروتئین نوترکیب کایمر می‌تواند کاندید واکسن مناسبی علیه *E.coli* O157:H7 باشد.

کلیدواژه‌ها: *اشرشیا کلی* انتروهموراژیک، پروتئین کایمر، واکسن نوترکیب، اینتیمین، توکسین شیگا

Immunogenicity of the Recombinant Chimeric Protein STXB-Intimin- Escc Against Pathogenicity of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

Z. Sadri Najafabadi, S. Nazarian[*], M. Kargar, F. Kafilzadeh
Imam Hossein University

(Received: 30/ 11/2021; Accepted: 12/ 04/2022)

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 is an important pathogen in humans and animals that causes a number of gastrointestinal complications, including the hemorrhagic colitis and in acute cases, the hemolytic uremic syndrome (HUS). Considering the risks of antibiotic treatments, vaccines provide a promising way to prevent this infection. The aim of this study was to evaluate the immunogenicity of chimeric antigen STXB-EscC-Intimin (SEI) against *E.coli* O157: H7. A recombinant chimeric protein expression was induced by IPTG in *E.coli* BL21 DE3 and evaluated by SDS-PAGE. The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. The purified protein was confirmed by ELISA using anti Shiga toxin specific antibodies. Immunization was performed in mice with pure protein and the antibody titer was determined by ELISA. Bacterial shedding and mortality in mice were examined. Statistical analysis was performed by Duncan tests and t-test with SPSS software. Expression of a protein with a molecular weight of 74/5 kDa was observed in SDS-PAGE. The minimum amount of detected antigen with anti Shiga-like poultry antibody using ELISA method was 0.156 µg. Bacterial shedding in immunized mice was reduced to 10^2 cfu/ml, and 80% of the immunized mice survived the bacterial injection of $10LD_{50}$. The results showed that the recombinant chimeric protein could be a suitable vaccine candidate against *E. coli* O157: H7.

Keywords: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Chimeric Protein, Recombinant Vaccine, Intimin, STX

*Corresponding Author: kpnazari@ihu.ac.ir

۱. مقدمه

باکتری انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* (EHEC) یک باکتری گرم منفی زئونوز از این گروه بیماری‌زا است که می‌تواند باعث ایجاد عفونت شدید در انسان و حیوانات شود [۱]. EHEC باعث ایجاد اسهال، اسهال خونی، کولیت هموراژیک و در برخی موارد سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) می‌شود، حتی باعث مرگ ۰/۹ مورد در ۱۰۰،۰۰۰ نفر می‌شود [۲ و ۳]. شیوع عفونت با باکتری نامبرده پی در پی در سراسر جهان گزارش شده است [۴ و ۵]. *E.coli* O157:H7 مهم‌ترین سروتیپ EHEC است که با شیوع بیماری همراه است [۶]. EHEC می‌تواند ضایعات متصل شونده و تخریب کننده (A/E)، روی سلول‌های پستانداران که در شرایط آزمایشگاهی رشد می‌کنند، تشکیل دهد [۷]. این ضایعه باعث تخریب میکروویلی‌های انتروسیت‌ها می‌شود که خونریزی و کولیت هموراژیک را در پی دارد همچنین باعث بازآرایی اسکلت سلولی در ناحیه اتصال باکتری می‌شود [۸].این باکتری از سامانه ترشحی نوع III برای انتقال پروتئین‌های مؤثر به سلول‌ها استفاده می‌کند (T3SS). تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که اکثر بیماری‌های ناشی از EHEC O157:H7 با پروتئین‌های T3SS مرتبط هستند، این امر منجر به چسبندگی و کلونیزه شدن باکتری‌ها می‌شود و درنهایت می‌تواند اسکلت سلولی سلول میزبان را تغییر دهد [۸]. پلیمریزاسیون اکتین، آلفا اکتین، ارزین، تالین و میوزین سرانجام باعث ایجاد ضایعه متصل شونده و تخریب کننده هیستوپاتولوژیک بافت ("A/E") می‌شود [۹].

پروتئین‌های T3SS در باکتری *E.coli* O157:H7 از ماشین های ترشح وابسته به ATP پایه، با پروتئین Esc تشکیل شده است. EscC (پروتئین بالغ ۵۴ کیلو دالتون) جزء اصلی ساختار حلقه غشای خارجی است که پلیمریزاسیون پروتئین‌های EscF و EspA ساختار سوزن را افزایش می‌دهد. سرانجام، پروتئین‌های EspD و EspB یک ساختار translocon را در غشای سلول میزبان ایجاد می‌کنند [۱۰].

از طریق این کانال، پروتئین Tir وارد غشای پلاسمایی سلول میزبان پستانداران می‌شود و در کنار پروتئین‌های نوکلئولین به‌عنوان گیرنده اتصال EHEC عمل می‌کنند. اینتیمین (پروتئین بالغ ۱۰۱ کیلو دالتون) یک مولکول چسبندگی باکتریایی است که با چسبندگی صمیمی باکتری‌ها مرتبط است. مطالعات نشان داده بود که قطعه انتهای C، Intimin در معرض است و برای تعامل کافی Tir-Int لازم است از طریق این کانال، پروتئین Tir وارد غشای پلاسمایی سلول میزبان پستانداران می‌شود و علاوه بر آن پروتئین‌های نوکلئولین به‌عنوان گیرنده اتصال EHEC عمل می‌کنند [۱۱].پروتئین‌های سم مانند Shiga (Stx) از دیگر عوامل اصلی تهاجمی EHEC هستند و از زمان کشتن سلول‌های Vero به‌عنوان وروتوکسین شناخته می‌شوند.Stx عضوی از سموم AB_5 است و عامل مهم بیماری‌زایی EHEC است که می‌تواند باعث کولیت هموراژیک، اسهال شدید خونین و سندرم HUS شود. Stx1 و Stx2 با توجه به تفاوت‌های آنتی‌ژنی دو زیرگروه پروتئین Stx هستند [۱۲]. علاوه بر این، مطالعات تأکید بر Stx2 را به‌عنوان ایمونوژن نامزد نشان داده‌اند زیرا می‌تواند توسط تقریباً تمام سروتیپ‌های EHEC تولید شود [۱۳].

از آنجا که هیچ درمانی برای علائم حاد ناشی از *E.coli* O157:H7 وجود ندارد، حتی درمان آنتی‌بیوتیکی، ناگزیر به توسعه کاندیدهای ایمونوژن هستید [۱۴]. در بین انواع مختلف ایمنی‌زایی، واکسن‌های نسل اول یعنی همان باکتری‌های کشته شده، واکسن‌های ضعیف شده زنده یا سلولی، دارای عوارض جانبی موقت هستند که همین دلیل می‌تواند از واکسن‌های زیر واحدی حمایت کند. واکسن‌های زیر واحدی ایمن‌تر و اختصاصی‌تر هستند و واکنش‌های ناخواسته کمتری دارند در عین حال حفاظت ایمنی بیشتری را می‌توان به وسیله واکسن چند زیر واحدی به جای تک زیر واحدی ایجاد کرد [۱۵].

در پژوهشی امانی و همکاران با طراحی پروتئین کایمر متشکل از سه پروتئین Tir، Intimin و EspA ایمنی سازی این کایمر را در موش بررسی کردند. در پژوهش امانی پس از خوراندن 10^{10}cfu از باکتری *E.coli* O157:H7 به موش‌های ایمن شده پس از دو هفته میزان ریزش باکتری به صفر رسید [۱۶]. در تحقیقی دیگر صدیقیان و همکاران با طراحی پروتئین کایمر EspA-Intimin ایمنی بخشی آن را علیه باکتری *E.coli* O157:H7 بررسی کردند. پس از خوراندن 10^{10}cfu از باکتری *E.coli* O157:H7 به موش‌های ایمن شده پس از دو هفته میزان ریزش باکتری به 10^{3} رسید[۱۷].

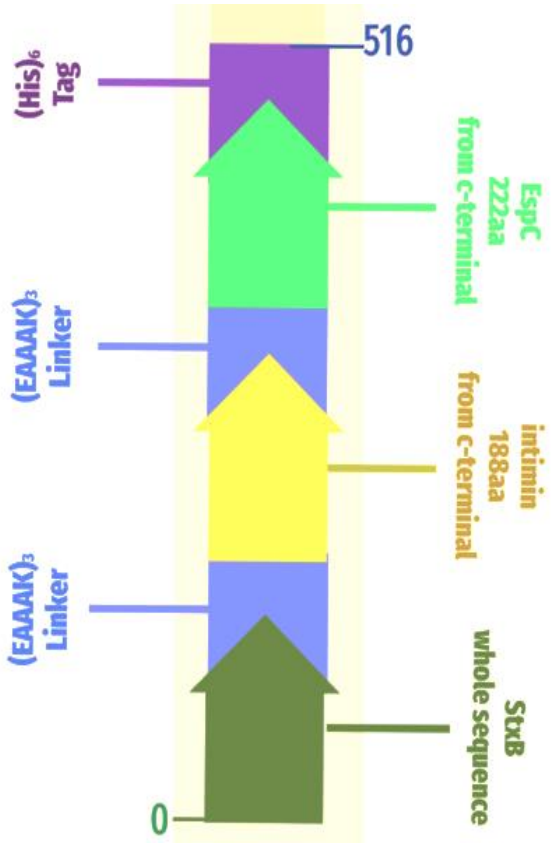
در مطالعه پیش رو ایمنی‌زایی آنتی‌ژن سه ظرفیتی SEI، علیه سمیت و اتصال باکتری Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 مورد بررسی قرار گرفت.

۲. روش تحقیق

۲-۱. سازه کد کننده پروتئین نوترکیب SEI

ژن‌های مرتبط سازه SEI به ترتیب *stxB*، *escC* و *eae* هستند. سه دنباله هر کدام با سه تکرار از لینکر سخت با توالی (EAAAK) ادغام شده‌اند و برای تسهیل در خالص‌سازی و شناسایی پروتئین، توالی ۶ تایی از اسیدآمینه هیستدین به انتهای سازه اضافه گردیده است. همچنین در انتهای ´۵ و ´۳ توالی جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده *Eco*RI و *Hind*III قرار داده شده است (شکل ۱). تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی سازه از جمله خواص فیزیکوشیمیایی توالی، بهینه‌سازی کدونی، بررسی ساختار ثانویه

mRNA، رسم ساختار سوم پروتئین و همچنین ایمونوانفورماتیک توالی در تحقیق قبلی انجام شده است [۱۸].



شکل ۱. تصویر شماتیک از سازه پروتئین نوترکیب SEI

۲-۲. آماده‌سازی کاست ژنی و انتقال به میزبان

پس از انجام تمام ارزیابی‌های *In silico*، توالی ژن کایمریک توسط شرکت ژن شاین (چین) سنتز و در پلاسمید pET32a زیرهمسانه‌سازی شد. سلول‌های مستعد *E.coli* BL21 (DE3) با کمک ($CaCl_2$) تهیه و پلاسمید نوترکیب به روش شوک حرارتی به آن‌ها منتقل گردید. درنهایت سلول‌های میزبان تراریخت شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت (۲۰۰µg/ml) کشت داده و به‌صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرما گذاری شد. برای تأیید کلونینگ پس از استخراج پلاسمید (روش لیز قلیایی)، از آنجایی که کاست SEI بین محل‌های محدود کننده EcoRI و HindIII (۱۵۴۸bp) قرار داده شد، هضم آنزیمی توسط هر دو آنزیم فوق انجام شد.

۲-۳. بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب

۵۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری‌ها در پنج میلی‌لیتر محیط Luria-Bertani (LB) با غلظت ۱۰۰µg/ml آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تلقیح شد و تا رسیدن باکتری‌ها به مرحله رشد لگاریتمی (جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر برابر ۰/۷) درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه قرار گرفت. ۱ میلی مولار IPTG (Isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside) برای بیان پروتئین به نمونه اضافه شد (به کنترل IPTG اضافه نشد) و درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه گرما گذاری شد. پس از ۵ ساعت سلول‌ها با سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و برای سنجش محلول بودن و یا تشکیل اجسام انکلوژنی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور رسوب سلولی درون ۱۰۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده اوره و PBS به ازای هر ۱/۵ میلی‌لیتر از رسوب یکنواخت گردید. دیوار سلولی از طریق سونیکاسیون (قدرت ۷۰ و ۰/۵ سیکل به مدت ۱۰ ثانیه و ۳ مرتبه) شکسته شده و سپس در حداکثر دور به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید و محلول رویی جدا شد. بیان پروتئین و سنجش محلولیت با الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) ۱۲ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این پروتئین با خالص‌سازی به روش کروماتوگرافی رزین نیکل به کمک برچسب‌گذاری شده با His از *E.coli* در شرایط دناتوره خالص شد و توسط SDS-PAGE تأیید شد.

۲-۴. تأیید پروتئین نوترکیب به روش الایزا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد توکسین شیگا

برای این منظور از پروتئین SEI خالص شده و پروتئین BSA به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. به این صورت که درون ۶ چاهک میکروپلیت الایزا سریال غلظت پروتئین خالص شده SEI از ۵ میکروگرم تا ۱۵۶ نانوگرم درون ۱۰۰ میکرو لیتر بافر کوتینگ (۶۴ میلی مولار Na_2CO_3، ۱۳۶ میلی مولار $NaHCO_3$، PH=۹/۸) یکنواخت گردید و سپس میکروپلیت را به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از هر مرحله چاهک‌ها با بافر PBST (PBS به اضافه ۰/۵ درصد Tween20) سه مرتبه شستشو گردید. چاهک‌ها با محلول ۵ درصد شیر خشک بدون چربی در PBST به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس مسدود شد. پس از مرحله شستشو، آنتی‌بادی مرغی اختصاصی ضد توکسین شیگا با رقت ۱:۲۰۰۰ درون PBST به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. چاهک‌ها سه بار با PBST شسته شدند و ۱۰۰ میکرو لیتر آنتی‌بادی ثانویه مرغی کنژوگه با HRP با رقت ۱:۲۰۰۰ در بافر PBST به هر چاهک اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری و چهار بار در PBST شستشو شد. در ادامه، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول سوبسترا حاوی ۳ میلی‌گرم (o-Phenylene Diamine) OPD به هر چاهک اضافه گردید. درنهایت پس از رنگ گرفتن، واکنش با H_2SO_4 ۲/۵مولار متوقف شد و جذب نوری در طول‌موج ۴۹۵ نانومتر خوانش شد.

۲-۵. ایمنی‌زایی در موش‌های آزمایشگاهی

موش‌های ماده BALB/c (۶ تا ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران) که هیچ دارو یا واکسنی دریافت نکرده بودند و وزن تقریبی آن‌ها ۲۵ گرم بود برای آزمایش‌های ایمن‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. برای تجویز زیر جلدی، موش‌ها به دو گروه تقسیم شدند: گروه آزمایش که ۲۰ میکروگرم پروتئین کایمریک را در ترکیب با ادجوانت کامل فروند در تزریق اول و ۱۵ و ۱۰ میکروگرم پروتئین SEI همراه با ادجوانت ناقص فروند به ترتیب در تزریق دوم و سوم دریافت کردند (۳۰ عدد) و گروه کنترل که PBS را در ترکیب با ادجوانت فروند دریافت کردند (۳۰ عدد). درنهایت به هر موش حجم ۲۰۰ میکرو لیتر به‌صورت زیر جلدی در سه نوبت به فاصله دو هفته در هر نوبت تزریق شد. قبل از تزریق و یک هفته پس از تزریقات خون‌گیری و جداسازی سرم تا انجام شده و برای مراحل بعدی در ۲۰- نگهداری شد.

۲-۶. بررسی تیتر آنتی‌بادی با روش الایزای غیر مستقیم

تیترهای آنتی‌بادی با روش الایزا (Enzyme linked immunosorbant assay) تعیین شد. ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب داخل ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ درون چاهک‌های الایزا (Caspian) یک نواخت شد. پس از هر مرحله چاهک‌ها با بافر سه مرتبه شستشو گردید. سپس با شیر خشک ۵ درصد بدون چربی در PBST به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سلسیوس مسدود شد. چاهک‌های شسته شده با نمونه‌های سرم از رقت ۱:۲۰۰ تا ۱:۱۲۵۶۰۰ درون PBST رقیق و به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. چاهک‌ها سه بار با PBST شسته شدند و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ثانویه (ضد موشی کانژوگه با HRP) با رقت ۱:۲۰۰۰ در بافر PBST به هر چاهک اضافه شد. صفحه به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید و سپس چهار بار در PBST شستشو شد. سپس، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول سوبسترا حاوی ۳ میلی‌گرم OPD به هر چاهک اضافه گردید. درنهایت پس از رنگ گرفتن، واکنش با H_2SO_4 ۲/۵مولار متوقف شد و جذب در نانومتر ۴۹۵ آنگستروم بر روی خواننده میکروپلیت خوانده شد.

۲-۷. بررسی ریزش باکتری پس از تجویز باکتری EHEC O157:H7 در موش‌های ایمن

موش‌ها دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون مورد چالش قرار گرفتند. به‌منظور کاهش فلور باکتریایی طبیعی روده، به موش‌ها قبل از چالش آب حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین سولفات خورانده شد. پس از ناشتایی شبانه، موش‌ها با 10^{10} واحد تشکیل کلنی (CFU) از باکتری *E.coli* O157:H7 در ۱۰۰ میکرو لیتر PBS تغذیه شدند. نمونه‌های مدفوع از هر موش در فاصله دو روز به مدت چهار هفته جمع‌آوری شد. ریزش مدفوعی *E. coli* O157:H7 با افزودن تقریباً ۰/۱گرم مدفوع به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت LB broth و سپس انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۴-۲ ساعت برای نرم شدن پلت مدفوع انجام شد. مخلوط را به خوبی ورتکس کرده و رقت‌های مایع رویی نمونه روی پلیت آگار محیط کشت اختصاصی Sorbitol MacConkey (محتوی ۲/۵ mg/ml تلوریت پتاسیم و ۰/۰۵ mg/ml سفکسیم) کشت داده شد. بلیت‌ها در طول شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند و کلونی‌های سفیدرنگ *E.coli* O157: H7 شمارش شدند.

۲-۸. بررسی زنده‌مانی موش‌ها

پس از ۱۴ روز از آخرین مرحله ایمنی‌زایی، موش‌های ایمن به دو گروه تقسیم شدند. به گروه اول به مقدار LD_{50} ۱و به گروه دوم $10LD_{50}$ ۱۰ از باکتری *E.coli* O157: H7 به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. همین روش را نیز برای موش‌های کنترل استفاده شد. سپس در مدت ۱۰ روز زندمانی موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۹. تجزیه و تحلیل آماری

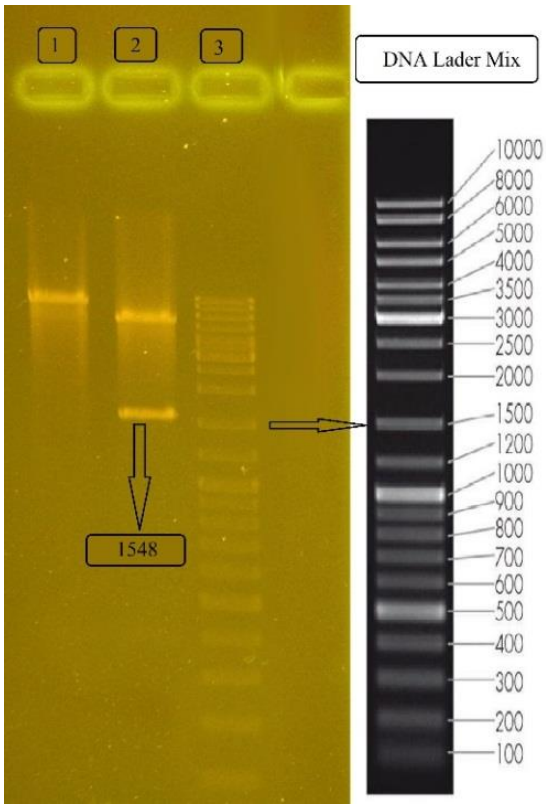
برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروفاسمیرنوف استفاده شد. آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از انوای یک طرفه انجام و مقایسه میانگین در سطح تجویز دوم، سوم و چهارم و ریزش باکتری در گروه غیر ایمن و ایمن شده با استفاده از آزمون دانکل انجام شد. عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۳-۱. همسانه سازی و بیان پروتئین نوترکیب

با توجه به اینکه در طراحی کاست ژنی جایگاه‌های برشی *EcoRI* و *HindIII* در پایانه ´۵ و ´۳ آن تعبیه شده بود، بنابراین از همین آنزیم‌ها نیز برای تأیید وجود ژن در پلاسمید pET32(a) استفاده شد. با انجام واکنش هضم آنزیمی، قطعه ژنی جدا شده از وکتور با اندازه ۱۵۴۸ جفت باز مشاهده شد (شکل ۲). بر این اساس همسانه‌سازی ژن بهینه‌سازی شده در پلاسمید تأیید گردید. پلاسمید نوترکیب به سویه بیانی *E.coli* BL21DE3 منتقل شد.

فرآیند القا و بیان پروتئین نوترکیب کایمر SEI صورت گرفت و نمونه‌ها پس از آماده‌سازی، بر روی ژل اکریل‌آمید ۱۲ درصد با وزن مولکولی ۷۴/۵ کیلو دالتون در مقایسه با نمونه القا نشده (کنترل) مشاهده شد (شکل ۳-الف). محلول بودن پروتئین و یا تشکیل اجسام انکلوژن استخراج پروتئین در بافر اوره و PBS ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل (۳-ب) دیده می‌شود پروتئین هم به‌صورت محلول در بافر PBS هم به‌صورت اجسام انکلوژن بادی قابل استخراج است.



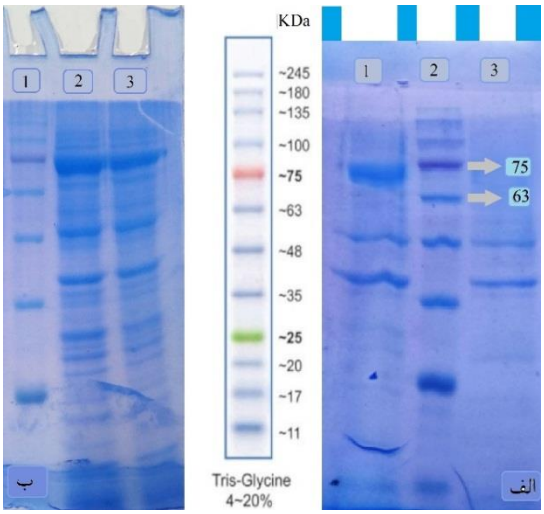
شکل ۲. بررسی هضم آنزیمی پلاسمید استخراج شده pET28a-*sie* بر روی ژل آگارز، چاهک شماره ۱ هضم پلاسمید با آنزیم محمدود کننده EcoRI، چاهک شماره ۲ هضم پلاسمید با دو آنزیم EcoRI و HindIII که درنهایت باند سازه ژنی در بین ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ جفت باز دیده شد، چاهک شماره ۳ نشانگر اندازه DNA Ladder Mix

۳-۲. خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل

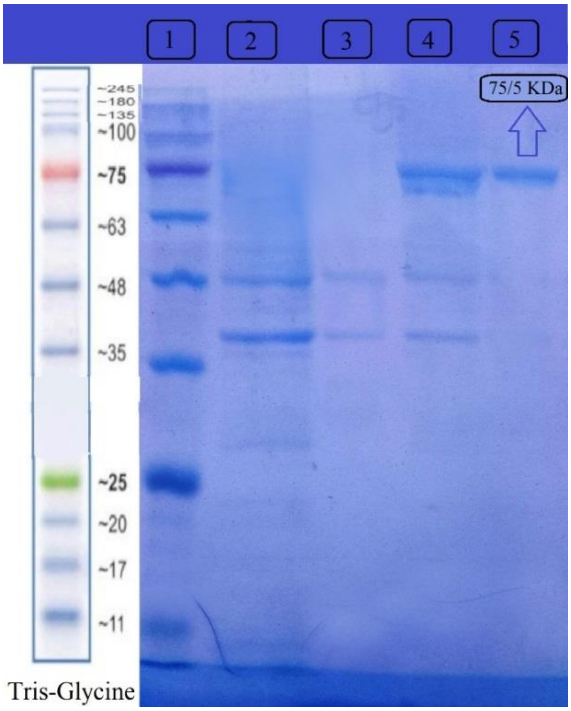
با توجه به محلول بودن پروتئین کایمر از روش شیب غلظت ایمیدازول برای خالص‌سازی پروتئین استفاده شد بدین صورت که محلول حاوی پروتئین کایمر درون PBS، از ستون کروماتوگرافی محتوی رزین نیکل عبور داده و پس از شستشوی ستون، پروتئین با استفاده از بافر ایمیدازول ۲۵۰ از ستون جدا و تخلیص گردید (شکل ۴). غلظت پروتئین خالص شده برابر ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

۳-۳. تأیید پروتئین نوترکیب SEI به روش الایزا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی سم شبه شیگا

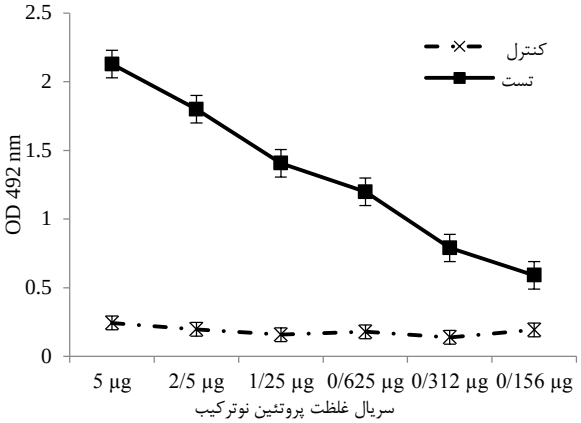
با توجه به وجود پروتئین STXB در سازه پروتئینی SEI از آنتی‌بادی مرغی ضد توکسین شبه شیگا جهت تأیید آن استفاده شد. نتایج نشان داد که حتی در کمترین غلظت یعنی ۱۵۶ نانوگرم از پروتئین هم واکنش اتصال اختصاصی آنتی‌ژن- آنتی‌بادی وجود دارد (شکل ۵).



شکل ۳. بررسی بیان و حلالیت پروتئین نوترکیب SEI: (۳-الف): بررسی بیان پروتئین نوترکیب، ردیف۱ نمونه القاء شده با IPTG، ردیف۲ نشانگر مولکولی پروتئینی سینا کلون-SL7012، ردیف ۳ نمونه کنترل و (۳-ب): بررسی محلول بودن پروتئین، ردیف ۱ نشانگر مولکولی پروتئینی سینا کلون-SL7012، ردیف ۲ عصاره سلولی حاصل از شکست اجسام باکتری با استفاده از بافر لیز کننده واجد اوره ۸ مولار ردیف ۳ عصاره سلولی حاصل از شکست اجسام باکتری با استفاده از بافر PBS



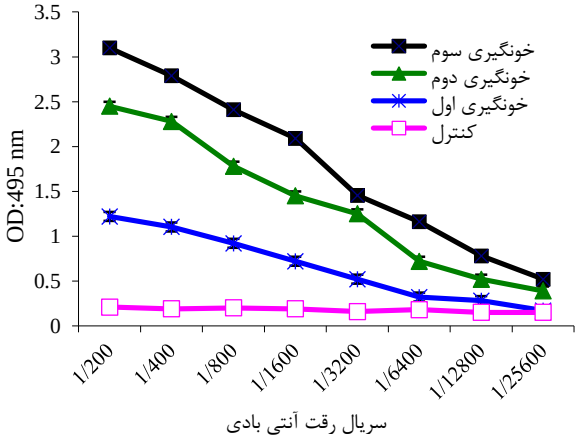
شکل ۴. الگوی الکتروفورز فرآیند تخلیص پروتئین کایمر SEI به روش کروماتوگرافی تمایلی با بافرهای ایمیدازول، ردیف ۱- نشانگر مولکولی پروتئینی سینا کلون-SL7012، ردیف۲-نمونه جمع‌آوری شده پس از اضافه کردن بافر PBS حاوی عصاره حاصل از شکست اجسام باکتری ردیف ۳-نمونه مربوط به شستشوی ستون با ایمیدازول ۵۰ میلی مولار، ردیف ۴- نمونه مربوط به شستشوی ستون با ایمیدازول ۱۵۰ میلی مولار، ردیف ۵- نمونه مربوط به شستشوی ستون با ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار



شکل ۵. تأیید پروتئین نوترکیب به روش الایزا با استفاده از آنتی‌بادی مرغی ضد سم شبه شیگا، پروتئین نوترکیب با حداقل غلظت ۱۵۶ نانوگرم نیز با آنتی‌بادی مرغی ضد سم شبه شیگا واکنش داده است

۳-۴. بررسی تیتر آنتی‌بادی سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین کایمر

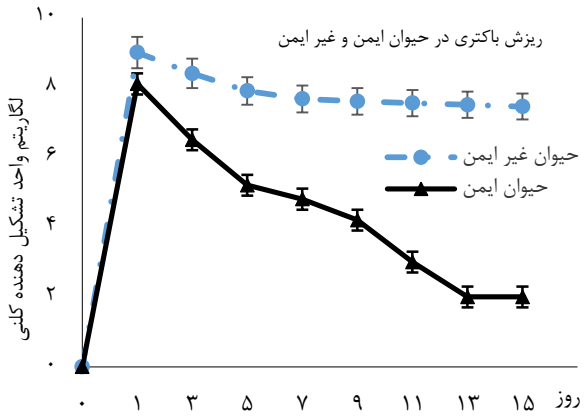
حساسیت آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه آنتی‌ژن کایمر SEI از طریق الایزا بررسی شد. همان‌طور که درشکل (۶) دیده می‌شود تجویز زیرپوستی پروتئین کایمر منجر به تحریک سامانه ایمنی و تولید آنتی‌سرم شد. تیتر آنتی‌بادی علیه پروتئین کایمر پس از هر بار تزریق افزایش داشت. نتایج به‌دست‌آمده از تیتر آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در حیوان‌های ایمن شده تیتر آنتی بادی به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۱). همچنین افزایش تیتر آنتی‌بادی در تزریق چهارم نسبت به تزریق سوم به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).



شکل ۶. بررسی تیتر آنتی‌بادی سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین کایمر SEI، تیتر آنتی‌بادی سرم حاصل از خونگیری سوم در رقت ۱/۲۵۶۰۰۰ معنی‌دار بود. سرم موش ایمن نشده به‌عنوان کنترل استفاده شد (P<۰/۰۱).

۳-۵. چالش موش‌های زنده با باکتری *E.coli* O157:H7

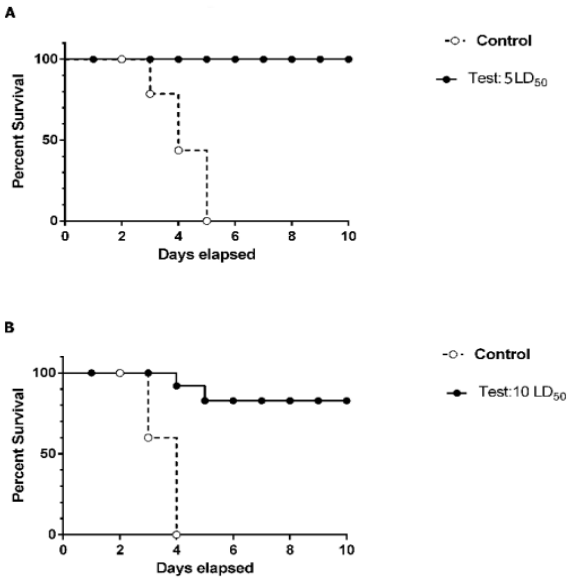
به‌منظور بررسی ریزش باکتری در هر گروه ۱۰ موش به‌عنوان آزمایش و ۱۰ موش به‌عنوان کنترل استفاده شد. به گروه آزمایش 10^{10} cfu/ml باکتری بیماری‌زای *E.coli* O157:H7 به‌صورت خوراکی تلقیح شد. همان‌طور که در شکل (۷) دیده می‌شود میزان دفع باکتری در حیوانات کنترل پس از ۱۵ روز در حدود 10^{8} ثابت ماند در حالی که میزان دفع باکتری در موش‌های ایمن شده سیر نزولی داشت و در پایان روز ۱۵، به حدود 10^{2} کاهش یافته است.



شکل ۷. بررسی ریزش باکتری در موش‌های ایمن و غیر ایمن، پس از گذشت ۱۵ روز ریزش باکتری در باکتری‌های ایمن شده به 10^{2} کاهش یافته است در حالی که میزان ریزش باکتری در گروه کنترل در 10^{8} ثابت مانده است

۳-۶. بررسی زنده ماندن موش‌های ایمن شده

پس از چالش تمام موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت $5LD_{50}$ از باکتری، در طی ۵ روز مردند. این در حالی بود که تمام موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند. بر طبق نتایج تمامی موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت $10LD_{50}$ از باکتری، در طی مدت ۴ روز مردند. این در حالی است که ۸۰ درصد موش‌های ایمن این دوز را تحمل کردند و زنده ماندند (شکل ۸).



شکل ۸. بررسی میزان زنده‌مانی موش‌های ایمن و غیر ایمن در مواجهه با باکتری *E.coli* O157:H7: **(A)** موش‌های ایمن پس از تزریق $5LD_{50}$ زنده ماندن در حالی که تمام موش‌های غیر ایمن تا روز پنجم مردند و **(B)** ۸۰ درصد موش‌های ایمن پس از تزریق $10LD_{50}$ زنده ماندن در حالی که تمام موش‌های غیر ایمن تا روز چهارم مردند

۴. نتیجه‌گیری

همان‌طور که مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) پیشنهاد کردند اسهال دومین علت مرگ‌ومیر در کودکان تا سال ۲۰۱۴ است. عوامل بیماری‌زای باکتریایی روده‌ای مانند *اشرشیاکلی* انتروهموراژیک (EHEC)، *اشرشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC) و ویبریوکلرا عوامل اصلی اسهال هستند. برنامه واکسیناسیون با پروتئین‌های زیر واحد یکی از برنامه‌های مداخله درمانی است که تأثیر آن بر سلامت جهان اثبات شده است. ثابت شده است که دستگاه اتصال سلولی و سم عامل اصلی این عامل بیماری‌زا هستند، بنابراین می‌توان آن‌ها را برای طراحی واکسن اجرا کرد. واکسن‌های زیر واحدی یکی از بهترین برنامه‌ها برای مقابله با این عوامل بیماری‌زا است که تأثیر آن بر سلامت جهان اثبات شده است. با توجه به سازوکار بیماری‌زایی *E.coli* O157:H7 ثابت شده که EscC و Intimin دو آنتی‌ژن مهم هستند که در چسبندگی باکتری‌ها نقش دارند و در اکثر سروتیپ‌های EHEC وجود دارند. همچنین پروتئین غیر سمی StxB بسیار ایمونوژنیک است و در سازه طراحی شده خاصیت ادجوانتی دارد. نتایج نشان داد که پروتئین نوترکیب SEI ایمنی هومورال را در موش تحریک کرده و باعث حفاظت موش‌ها در مقابل عامل بیماری‌زای *E.coli* O157:H7 می‌شود. در نتیجه می‌توان از سازه SEI به‌عنوان یک کاندید واکسن استفاده کرد.

۵. مراجع

[1] Nazarian, S.; Gargari, S. L. M.; Rasooli, I.; Amani, J.; Bagheri, S.; Alerasool, M. "An In Silico Chimeric Multi Subunit Vaccine Targeting Virulence Factors of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* (ETEC) with Its Bacteria Inbuilt Adjuvant"; J. Microbiol. Methods 2012, 90, 36-45.

[2] Vickers, N. J. "Animal Communication: When I'm Calling You, Will You Answer Too?"; Curr. Biol. 2017, 27, 713-715.

[3] Marks, H. M.; Tohamy, S. M.; Tsui, F. "Modeling Uncertainty of Estimated Illnesses Attributed to Non-O157: H7 Shiga Toxin–Producing *Escherichia Coli* and its Impact on Illness Cost"; J. Food Prot. 2013, 76, 945-952.

[4] Khan, A.; Datta, S.; Das, S. C.; Ramamurthy, T.; Khanam, J.; Takeda, Y.; Nair, G. B. "Shiga Toxin Producing *Escherichia Coli* Infection: Current Progress and Future Challenges"; Indian J. Med. Res. 2003, 118, 1-24.

[5] Aslani, M. M.; Bouzari, S. "An Epidemiological Study on Verotoxin-Producing *Escherichia Coli* (VTEC) Infection Among Population of Northern Region of Iran (Mazandaran and Golestan Provinces)"; Eur. J. Epidemiol. 2003, 18, 345-349.

[6] Karmali, M. A.; Gannon, V.; Sargeant, J. M. "Verocytotoxin-Producing *Escherichia Coli* (VTEC)"; Vet. Microbiol. 2010, 140, 360-370.

[7] Knutton, S.; Baldwin, T.; Williams, P. H.; McNeish, A. S. "Actin Accumulation at Sites of Bacterial Adhesion to Tissue Culture Cells: Basis of a New Diagnostic Test for Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia Coli*"; Infect. Immun. 1989, 57, 1290-1298.

[8] Wong, A. R.; Pearson, J. S.; Bright, M. D.; Munera, D.; Robinson, K. S.; Lee, S. F.; Hartland, E. L. "Enteropathogenic and Anterohaemorrhagic *Escherichia Coli* Even More Subversive Elements"; Mol. Microbiol. 2011, 80, 1420-1438.

[9] Schmidt, M. A. "LEE Ways: Tales of EPEC, ATEC and EHEC"; Cell. Microbiol. 2010, 12, 1544-1552.

[10] Caetano, B. A.; Rocha, L. B.; Carvalho, E.; Piazza, R. M. F.; Luz, D. "Immunogenic Domains and Secondary Structure of Escherichia Coli Recombinant Secreted Protein E*scherichia coli*-Secreted Protein B"; Front. Immunol. 2017, 8, 477.

[11] Batchelor, M.; Prasannan, S.; Daniell, S.; Reece, S.; Connerton, I.; Bloomberg, G.; Matthews, S. "Structural Basis for Recognition of The Translocated Intimin Receptor (Tir) by Intimin from Enteropathogenic *Escherichia Coli*"; EMBO J. 2000, 19, 2452-2464.

[12] Cai, K.; Gao, X.; Li, T.; Wang, Q.; Hou, X.; Tu, W.; 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, 946-952.

[13] Kordbacheh, E.; Nazarian, S.; Hajizadeh, A.; Fasihi-Ramandi, M.; Fathi, J. "Recombinant HcpA-EspA-Tir-Stx2B Chimeric Protein Induces Immunity Against Attachment and Toxicity of *Escherichia Coli* O157: H7"; Microb. Pathog. 2019, 129, 176-182.

[14] Conrady, D. G.; Flagler, M. J.; Friedmann, D. R.; Vander Wielen, B. D.; Kovall, R. A.; Weiss, A. A.; Herr, A. B. "Molecular Basis of Differential B-Pentamer Stability of Shiga Toxins 1 and 2"; PloS One, 2010, 5, e15153.

[15] Draper, S. J.; Angov, E.; Horii, T.; Miller, L. H.; Srinivasan, P.; Theisen, M., & Biswas, S. "Recent Advances in Recombinant Protein-based Malaria Vaccines"; Vaccine 2015, 33,7433-7443.

[16] Amani, J.; Salmanian, A. H.; Rafati, S.; Mousavi, S. L. "Immunogenic Properties of Chimeric Protein from EspA, Eae and Tir Genes of *Escherichia Coli* O157:H7"; Vaccine 2010, 28, 6923-6929.

[17] Rad, H. S.; Mousavi, S. L.; Rasooli, I.; Amani, J.; Nadooshan, M. R. "EspA-Intimin chimeric protein, a candidate vaccine against *Escherichia Coli* O157:H7"; Iran. J. Microbiol. 2013, 5, 244-251.

[18] Najafabadi, Z. S.; Nazarian, S.; Kargar, M.; Kafilzadeh, F. "Designing of a Chimeric Protein Contains StxB, Intimin and EscC Against Toxicity and Adherence of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7 and Evaluation of Serum Antibody Titers Against it"; Mol. Immunol. 2021, 134, 218-227.