مقایسه تیتر آنتی بادی علیه پروتئین ها ی نوترکیب منفرد، مخلوط و ممزوج STxB، IpaD و STxB-IpaD

حسین هنری*[۱]، مهدی باران وند[۱]، محمدعلی عارف پور[۱]، محمدصادق هاشم زاده[۱]، حسین پورحکاک[۱]، محمدابراهیم مینایی[۱]، مجدالدین قلاوند[۱]، امیرحسین احمدی[۱]

۱) دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۶

چکیده

مقدمه: پروتئین IpaD نقش مهمی در تهاجم، بیماری زایی و ایجاد عفونت توسط باکتری های شیگلا و اشریشیاکلی دارد. یکی دیگر از فاکتورهای بیماریزای اصلی در شیگلا دیسانتری تیپ ۱ و E.coli O157:H7 انتروتوکسین شیگلا یا (StxB) می باشد. با مخلوط یا ممزوج پروتئین IpaD با STxB می توان منتخب احتمالی مناسب برای واکسن تهیه نمود. در این مطالعه ایمنی زایی و تیتر آنتی بادی ممزوجی، مخلوط و جداگانه پروتئین های نوترکیب IpaD و STxB در موش سوری با یکدیگر مقایسه شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، وکتورهای نوترکیب دارای توالی ژنی stxB-ipaD، ipaD و stxB تهیه و درون باکتری E. coli BL21 DE3 منتقل شدند، میزان بیان پروتئین مذکور مورد ارزیابی و با استفاده از تکنیک لکه گذاری وسترن، بیان آن مورد تایید قرار گرفت. بعد از تخلیص پروتئین نوترکیب با ستون کروماتوگرافی، چهار نوبت متوالی به موش سوری تزریق شد.

یافته های پژوهش: تیتر آنتی بادی علیه آنتی ژن های STxB، IpaD، ممزوج STxB-IpaD و مخلوط STxB با IpaD در موش های سوری از لحاظ آماری کاملاً متفاوت بود و با اضافه شدن IpaD به StxB میزان تیتر آنتی بادی افزایش یافت.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این تحقیق، بیانگر آن است که لینکر فورینی به وسیله شبه فورین ها جدا شده و پروتئین حاصل از مخلوط و امتزاج ژن های ipaD و stxB، می تواند اثر ایمنی زایی STxB را افزایش دهد و منتخب احتمالی مناسبی جهت تولید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا و اشریشیاکلی باشد.

واژه های کلیدی: شیگلا دیسانتری تیپ ۱، زیر واحد B سم شیگلا (STxB)، IpaD، E.coli O157:H7

*نویسنده مسئول: دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

Email: ebimomi@gmail.com

مقدمه

باکتری شیگلا دیسانتری از خانواده انتروباکتریاسه ها می باشد. شیگا توکسین یا STx عامل اسهال خونی شیگلا است. پروتئین STx از سم های دو قسمتی A و B است که قسمت غیر سمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری می باشد. هم چنین پروتئین های IpaA/B/C/D/H محصول پلاسمید تهاجمی شیگلا می باشند. که پروتئین IpaD در گونه های شیگلا شباهت زیادی به هم دارد. مهم ترین شیگلاها از نظر بیماریزایی و بروز اپیدمی ها چهار سروتیپ هستند که بر اساس پلی ساکارید اختصاصی o (osp) در LPS طبقه بندی می شوند و به نام شیگلا دیسانتری(S.dysentry)، شیگلا فلکسنری(S.flexeneri) ، شیگلا سونئی(S.sonneii)، شیگلا بویدی(S.boydii) نام گذاری شدند. اسهال خونی با عامل شیگلا در صورت عدم درمان به مرگ می انجامد(۱،۲). شیگا توکسین یا STx به عنوان یکی از عوامل ویرولانس شیگلا دیسانتری تیپ یک در ایجاد اسهال خونی و دیسانتری مطرح است. توکسین شیگا STx، انتروتوکسین شیگلا دیسانتری، یک پروتئین هموپنتامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ kDa بوده که از یک زیر واحد منومریک سمی و آنزیماتیک به نام STxA و از یک زیر واحد متصل شونده به رسپتور هموپنتامریک به نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیر سمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری می باشد(۳،۴). هر منومر STxB از ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و وزن ملکولی حدود ۷/۷ kDa دارد. هرمنومراز یک مارپیچ آلفا(α helix) و ۶ صفحه بتا(β sheet) تشکیل شده است. این ۵ منومر به طریقی تاخوردگی پیدا می کنند که صفحات بتا در سطح خارجی و مارپیچ های آلفا در داخل قرار می گیرند(۳،۴). پروتئین STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb3 متصل می گردد که روی اکثر سلول های بدن بیان می شود(۵). مطالعات نشان داده است که بیان Gb3 در سطح سلول های سرطانی انسان فراوانی بسیار زیادی دارد. Gb3 بیان زیادی در سطح سلول های سرطانی مثل لنفوما، کارسینوماهای تخمدان، سینه و کلون دارد. هم چنین این فراوانی در سطح سلول های دندریت(DC) انسانی و موش نیز دیده می شود(۶). با تولید آنتی بادی علیه STxB و خنثی سازی آن می توان از اتصال و ورود قسمت سمی(STxA) به درون سلول هدف جلوگیری کرد. هم چنین یکی دیگر از عواملی که در بیماریزایی شیگلا نقش دارد پروتئین های IpaA/B/C/D/H هستند که محصول پلاسمید تهاجمی شیگلا می باشند. کمپلکس ایجاد شده از سه پروتئین IpaB/C/D نقش بسیار مهمی در اتصال به سلول های اپیتلیالی روده(M-cell) و فرار از فاگوزوم ماکروفاژها بازی می کند(۷،۸). توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای IpaD در بین گونه های شیگلا شباهت زیادی نسبت به هم دارد. به این صورت که توالی IpaD در شیگلا دیسانتری سروتیپ ۱ با شیگلا بوئیدی ۹۸ درصد، شیگلا سونئی ۹۵ درصد، شیگلا فلکسنری ۹۴ درصد کاملاً همولوژی دارد(۹). در ابتدا وکتورهای نوترکیب مربوط به این پروتئین ها در باکتری E.coli BL21 ترانسفورم گردید. با تولید آنتی بادی پلی کلونال IgG علیه IpaD می توان از بیماریزایی شیگلا جلوگیری کرد. هم چنین ترانسفورم کاست ژنی stxB –IpaD در باکتری E.coli BL21 و بررسی بیان و ایمنی زایی آن در موش می تواند به عنوان منتخب احتمالی مناسب واکسن علیه بیماری شیگلوزیز باشد(۳،۴). هدف از انجام این تحقیق مقایسه تیتر آنتی بادی تولیدی در موش علیه آنتی ژن های stxB، IpaD، ممزوج stxB- IpaD و مخلوط stxB با IpaD، ایمنی زایی موش ها علیه E.coli O157:H7 و معرفی بهترین شکل منتخب احتمالی مناسب واکسن علیه باکتری شیگلا می باشد.

مواد و روش ها

تهیه کاست های ژنی stxB، ipaD و stxB- ipaD در(+)pET28a: از ژن صناعی تهیه شده، کاست های ژنی stxB، stxB-ipaD و ipaD در وکتور (+)pET28a همسانه سازی شد(۹،۱۰،۱۶). وکتورهای بیانی (+)pET28aدارای ژن های stxB، ipaD و stxB-ipaD در سلول های مستعد E.coli سویه BL21(DE3) (stratagen) ترانسفورم شد. کلون های انتخابی به کمک PCR تایید شدند.

بیان ژن های stxB، ipaD و stxB- ipaD: از کشت شبانه کلون های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن OD به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاء کننده پروموتر (IPTG)فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

الکتروفورز SDS-PAGE: نمونه ها قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی(SM0671) تحت شرایط

دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر بود.

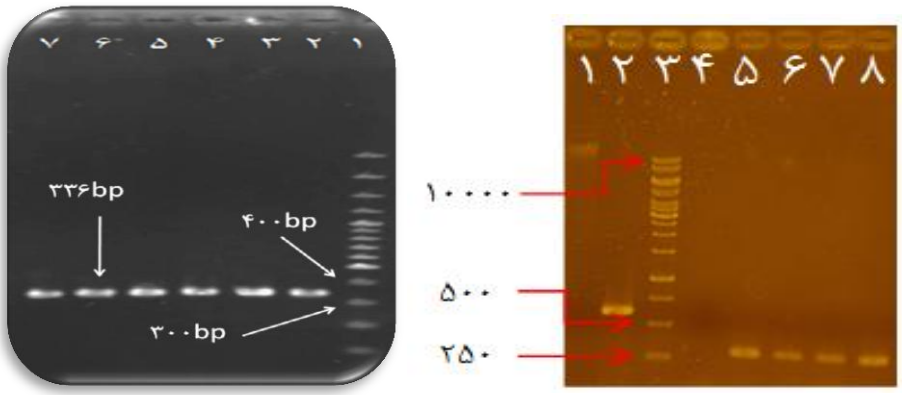
تایید پروتئین های نوترکیب: برای تایید پروتئین های نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی بادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال(گلایسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی مولار، KCl ۲/۷ میلی مولار، $Na_2HPO_4.7H_2O$ ۴/۳ میلی مولار، توین۲۰ درصد وpH: ۷/۲) حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شستشو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی بادی ضد-His tag(ebcam) کانژوگه دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شستشو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سوبسترا(بافر تریس ۵۰mM و pH:۷/۸ حاوی DAB ۶ mg، H_2O_2 10µl) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولزی، واکنش با استفاده از H_2O متوقف گردید(۱۱).

تخلیص پروتئین نوترکیب: پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NTA (سیناژن؛ ایران) جداسازی و نمونه های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد. غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی(BSA سیناژن) به عنوان استاندارد انجام گرفت(۱۱).

تولید آنتی بادی علیه پروتئین های IpaD، STxB و STxB –IpaD: به میزان ۲۰، ۱۵ و ۱۰ میکروگرم از پروتئین های IpaD ، STxB و IpaD- STxB در چهار نوبت، بار اول همراه با ادجوانت کامل (Freund's complete adjuvant) و در نوبت های بعدی با ادجوانت ناقص فروند به ترتیب به موش ها تزریق و در نهایت از موش ها خون گیری و توسط آزمایش الایزا تیتر آنتی بادی آن اندازه گیری شد(۱۱-۹).

یافته های پژوهش

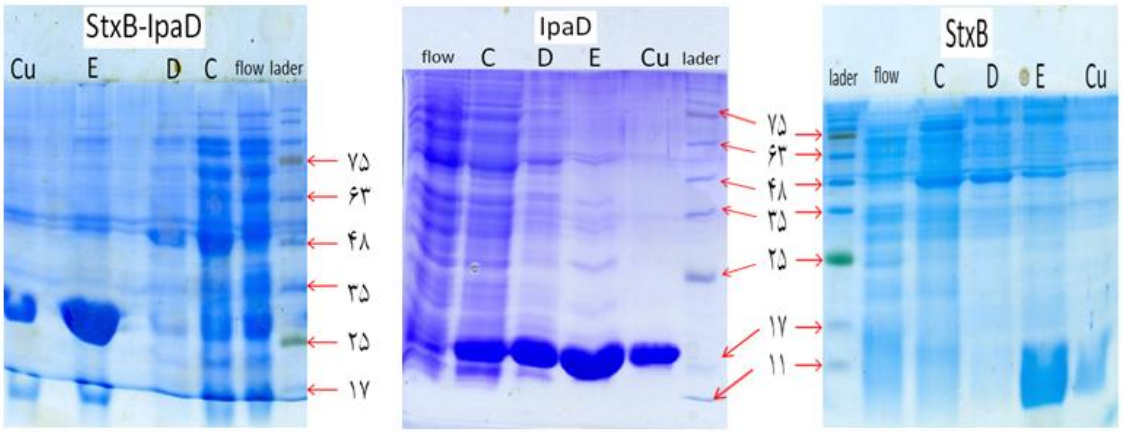
تایید حضور توالی های مورد نظر در وکتور pET28a(+) توسطPCR مستقیم: پلاسمیدهای نوترکیب تهیه شده به باکتریE.coli BL21DE3 ترانسفورم شد. به منظور تایید حضور قطعه مورد نظر در وکتور بیانی pET28a(+) از واکنش PCR استفاده شد. که در این حالت ژنstxB ، ipaD و ipaD –stxB که حدود ۲۵۰، ۳۳۶ و ۵۶۱ جفت باز طول دارد(شکل شماره ۱).



الف ب

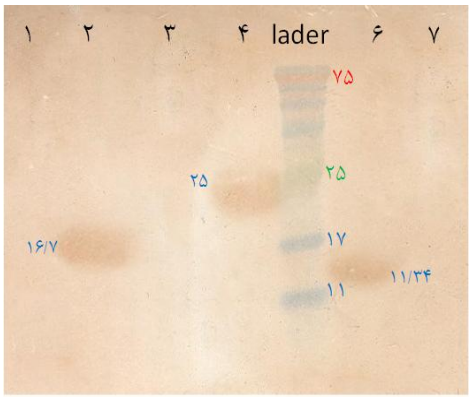
شکل شماره ۱. PCR ژن ها روی ژل آگاروز ۱ درصد. الف) ستون ۱: استخراج پلاسمید ۲: باند حاصل از PCR ژن IpaD-stxB ۳: نشانگر مولکولی۱۰۰۰۰ bp. ستون ۵، ٦، ۷، ۸: باند حاصل از PCR ژن stxB. ب) ستون ۱: نشانگر مولکولی۱۰۰۰۰ bp. ستون ۲ تا ۷: باند حاصل از PCR ژن IpaD.

بیان پروتئینSTxB، IpaD و STxB-IpaD و تخلیص آن: کلنی انتخابی در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و پس از رسیدن به رشد کافی به منظور بیان پروتئین توسط ۱ میلی مولار IPTG القاء گردید و برای بررسی بیان و کیفیت آن روی ژل SDS-PAGE برده شد(شکل شماره ۲). باند پروتئینی STxB، IpaD و stxB- IpaD به ترتیب در جایگاه صحیح ۱۱/۳، ۱۶/۷ و ۲۵ کیلودالتون قرار گرفت در حالی که در کنترل ها هیچ باندی دیده نشد. پروتئین های نوترکیب به کمک
ستون نیکل خالص سازی گردید و غلظـــت پروتئـــین های تولیدی به روش برادفورد اندازه گیری شد.



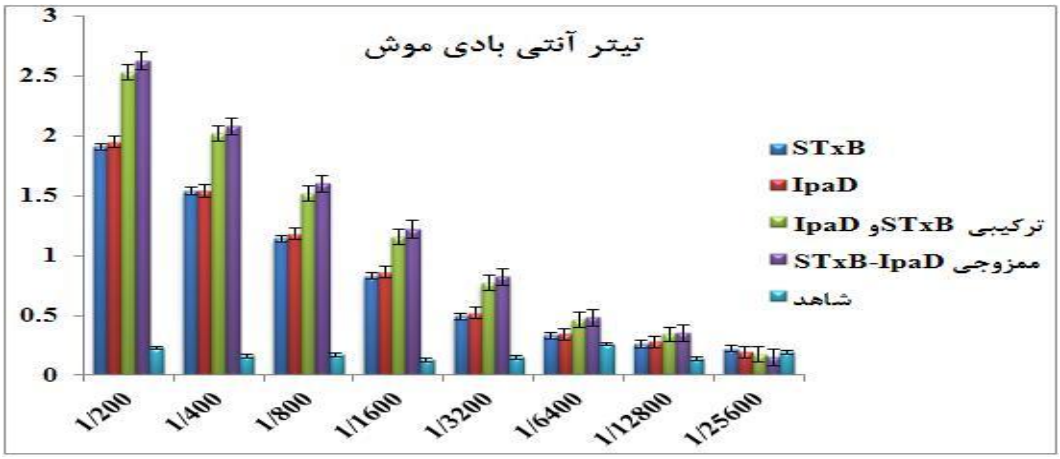
شکل شماره ۲. تخلیص پروتئین ها به وسیله ستون نیکل. الف) StxB، دارای وزن مولکولی ۱۱/۳ کیلودالتون ب) StxB-IpaD، دارای وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون، ج) IpaD، دارای وزن مولکولی ۱۶/۷ کیلودالتون.

آنالیز لکه گذاری وسترن با آنتی بادی ضد His-tag: بیان پروتئین مورد نظر به دلیل داشتن توالی His-tag به کمک وسترن بلات و به کار گیری آنتی بادی علیه His-tag مورد تائید قرار گرفت و باند وسترن در جایگاه صحیح مدنظر قرار گرفت اما در ستون کنترل هیچ باندی دیده نشد(شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳. وسترن بلات: ستون ۱: نمونه کنترل IpaD بدون IPTG، ستون ۲: نمونه بیانی IpaD، ستون ۳: نمونه کنترل StxB–IpaD بدون IPTG، ستون ٤: نمونه بیانی StxB–IpaD، ستون ٥: نشانگر مولکولی PR0602، ستون ٦: نمونه بیانی StxB، ستون ۷: نمونه کنترل StxB بدون IPTG

ارزیابی تیتر آنتی بادی علیه پروتئین نوترکیب به روش الایزای غیرمستقیم: به منظور ارزیابی آنتی بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از تزریق سوم و چهارم به صورت تصادفی از موش های تست و شاهد خون گیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن ها آزمایش الایزا انجام شد که نمودار میانگین تیتر آنتی بادی در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۱. تیتراسیون سرم موش. جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر بعد از تزریق چهارم علیه پروتئین های IpaD ، STxB و IpaD- STxB

بحث و نتیجه گیری

بیماری شیگلوزیز همیشه به عنوان یک اسهال خونی باسیلی حاد شناخته می شود که با مدفوع آبکی همراه با خون و موکوس توام با علائم بالینی چون تب، کرامپ های شکمی مشخص می گردد که ممکن است به همراه نشانگان خونریزی دهنده ادراری باشد. از طرفی شیگا توکسین می تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروتوکسیک ایجاد نماید. امروزه تلاش های زیادی برای ساخت واکسن علیه شیگلا و سم آن انجام شده و کاندیداهای زیادی گزارش شده است. جالب این که هیچ کدام از این کاندیداها به دلایل مختلف تا امروز مورد تائید سازمان جهانی سلامت WHOو FDA قرار نگرفته است. اما تلاش ها برای ساخت واکسن علیه شیگلوز به طور جدی ادامه دارد. نتایج پژوهش های منتشر شده در خصوص شیوع شیگلا در ایران، نشان می دهد که تا چند سال پیش شیگلا فلکسنری بیشترین شیوع را در ایران دارا بوده است. در رتبه های بعدی به ترتیب شیگلا سونئی و شیگلا دیسانتری قرار دارند و مقدار کمی شیگلا بوئیدی مشاهده شده است. اما مطالعات جدید نشان از شیوع بیشتر شیگلا سونئی در مقابل شیگلا فلکسنری می دهد. تقریباً همین ترتیب شیوع شیگلا در کشورهای همسایه ایران(عربستان و پاکستان) نیز گزارش شده است(۱۰).

با توجه به گزارشات محققان ایرانی مبنی بر فراوانی وقوع و مقاومت آنتی بیوتیکی شیگلا این باکتری می تواند به عنوان یک عامل ناتوان کننده مورد توجه قرار گیرد. بنا بر این لازم هست که سوش های بومی ایران به منظور تهیه واکسن مورد مطالعه قرار گیرند(۱۲). به صورت رایج هیچ گونه واکسنی برای شیگلا در دسترس نیست. هر چند که سلول های T در حفاظت علیه شیگلا نقش دارند اما برای ایمن شدن ضروری نیستند. داده های حاصل از چندین مطالعه نشان دادند که پاسخ ایمنی هومورال نقش مهم تری را در ایمنی علیه شیگلا با هر دو پاسخ سیستمیک و مخاطی علیه LPS و تعدادی از پروتئین های کد شده توسط پلاسمید بیماریزا، از جمله پروتئین های Ipa دارد. شیگلا دیسانتری تیپ ۱ هنوز هم عمده ترین علت اصلی اپیدمی اسهال، در صد سال اخیر می باشد و نسبت مرگ و میر آن در کشورهای جهان متفاوت است(۱). مکانیسم بیماریزایی این باکتری شامل دو مرحله کلیدی است: مرحله اول شامل اتصال و به دنبال آن کلونیزاسیون باکتری به سطح سلول های اپی تلیال روده کوچک به وسیله فاکتورهای کلونیزاسیون که باعث تورم و ایجاد زخم های سطحی، تجمع پلی نوکلئورها و بالاخره نکروز و خونریزی می گردد و به صورت بلغم و خون همراه با مدفوع دفع می شود. در مرحله دوم باکتری تولید شیگا توکسین کرده و به سلول های اپی تلیال روده بزرگ حمله و سبب آماس و زخم هایی روی دیواره روده می گردد که نتیجه آن اسهال خونی است. باکتری شیگلا با به کار گیری سیستم ترشحی نوع ۳ فاکتورهای بیماریزای خود را به سلول میزبان انتقال می دهد. پروتئین IpaD فاکتوری است که در راس این سیستم برای تهاجم باکتری به سلول میزبان ضروری است. IpaD یک پروتئین چند کاره است که ترشح و عرضه پروتئین های IpaB و IpaC را در حد فاصل سلول میزبان- باکتری و هم چنین نفوذ صحیح ناقل های پروتئینی به داخل سلول میزبان را کنترل می کند. پروتئین IpaD یک پروتئین kDa ۳۷ بوده و در بین سایر پروتئین های اپرون

Ipaتنها پروتئین IpaD آب دوست می باشد. ناحیه - Nترمینال نزدیک به مرکز در تمامی مطالعات یک ناحیه عملکردی و بسیار مهم در IpaD تلقی می شود. در مطالعاتی که به منظور شناسایی اپی توپ های IpaD صورت پذیرفت غالب اپی توپ های در دسترسIpaD ، در این ناحیه قرار داشتند. هم چنین عملکرد IpaD به عملکرد این ناحیه بستگی دارد به نحوی که اگر فعالیت آن سرکوب گردد به طور کلی قابلیت تهاجم شیگلا سرکوب می شود(۱۳،۱۷).

مطالعات انجام گرفته نشان دادند که آنتی بادی هایی که ناحیه-N ترمینال پروتئین IpaD را شناسایی می کنند توانایی برهمکنش این پروتئین با نمک های صفراوی به ویژه دی اکسی کولات را سرکوب می نمایند. در این حالت باکتری قادر به انجام فعالیت ویژه خود برای فراخوانی و به کارگیری IpaB نخواهد بود. در نتیجه توان شیگلا برای ایجاد منفذ در سلول یوکاریوتی از بین رفته و پروسه ورود باکتری به درون سلول میزبان سرکوب می شود. این نتایج به طور ویژه ای نشان می دهد که پروتئین IpaD و به ویژه ناحیه N ترمینال این پروتئین یک فاکتور لازم در ورود باکتری شیگلا به سلول های میزبان است و این پروتئین به عنوان یک آنتی ژن بالقوه در طراحی واکسن مطرح است(۱۳).

آنتی بادی علیه IpaD می تواند توانایی باکتری را برای تهاجـــم ساقط نماید هم خوانی دارد. آزمایشات در محـــیط in vivo نیز با استفاده از روده خرگوش انجام شد. بدین ترتیب که پس از تهیه آنتی بادی Anti-IpaD با روش ایمونیزه کردن خرگوش ها، آنتی بادی ها را در رقت های مختلف با باکتری شیگلا مخلوط نموده و از آن در آزمایش Rabbit Intestinal iliac loops استفاده شد. نتایج این گونه بود که در غلظت های اولیه آنتی بادی هیچ گونه ضایعه ای در روده ایجاد نشد. در صورتی که در آزمایش کنترل منفی که باکتری بدون حضور آنتی بادی درون روده خرگوش قرار گرفت سراسر روده دچار ضایعه شد(۱۳).

تحقیقات صورت گرفته مشخص کردند که مقدار آنتی ژنی که در حالت فیوژن شده با یک ادجوانت برای مصرف ضروری است، کمتر از مقداری می باشد که به صورت تجویز هم زمان برای ایمنی زایی استفاده می گردد که این نشان از مزیت متصل کردن آنتی ژن ها با ادجوانت های مختلف دارد. امروزه توجه خاصی به واکسن هایی شده است که دارای این مزیت هستند(۱۴). به منظور تقویت اثر واکسن و رفع محدودیت عمده آن یعنی میزان ایمنی زایی پایین آنتی ژن های محلول، بایستی ناحیه N ترمینال IpaDبه عنوان آنتی ژن کاندیدای واکسن شیگلوز با یک ایمنوادجوانت مناسب همراه شود که برای این منظور در این مطالعه stxB انتخاب گردید. ژن stxB در باکتری E.coli کلون شده و بیان آن بررسی گردید و ایمنی زایی آن صورت پذیرفت(۱۵). مطالعات نشان می دهد که به خاطر وزن مولکولی پایین STxB پاسخ ایمنی ناچیزی علیه آن دیده می شود. از طرفی STxB به خاطر اتصال اختصاصی با گیرنده Gb3 روی اکثر سلول های سرطانی، امروزه برای انتقال داروهای ضد سرطان به این سلول ها و کاهش اثرات سوء شیمی درمانی توجه دانشمندان زیادی را به خود جلب کرده است(۱۷،۱۸).

به منظور افزایش ایمنی زایی مخاطی علیه STxB تلاشی انجام شد که در طی آن پروتئین تخلیص شده STxBرا به کمک میکروسفرهای لیپیدی سنتتیک به صورت نازال تلقیح کردند که نتایج آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی را نشان می داد. با ممزوج کردن IpaD–STxB میزان ایمنی زایی آن با استفاده از سم فعال O157:H7 E.coli در خوکچه هندی تا ۲۸ برابر افزایش یافته است(۱۸،۱۹، ۱۵). با توجه به مکانیزم عمل هر کدام از پروتئین های نوترکیب، این پروتئین ها می بایستی در سطح سلول از یکدیگر جدا شوند. با توجه به نتایج به دست آمده از مقایسه تیتر آنتی بادی تولیدی بین پروتئین STxB و IpaDممزوجی و مخلوطی نشان داد که پروتئین ممزوجی IpaD–STxB در سطح سلول از یکدیگر جدا شده اند.

ژن های شیگا توکسین Shiga toxin 1A subunit (stx1A) and Shiga toxin 1B subunit (stx1B) در سویه های مختلف Escherichia coli , Bacteriophage و Shigella sonnei و S.dysenteriae type 1 و Enterobacteria phage VT1 و ژن ipaD در سویه های مختلف Escherichia coli و گونه های مختلف Shigella و سویه مختلف Shigella , flexneri و Shigella boydii و Shigella sonnei و Shigella dysenteria وجود دارد. این باکتری ها به عنوان عوامل ناتوان کننده مطرح بوده و ممکن است در جنگ های بیولوژیک استفاده گردد. با ممزوج و یا مخلوط کردن پروتئین ژن های مورد نظر میزان تیتر آنتی بادی تولیدی در میزبان و ایمنی زایی آن ها را می توان مقایسه نمود.

نتایج تحقـیقات انـــجام شده نقش حاملی، آنتی ژنی و

ادجوانتی پروتئینSTxB را اثبات کرده اند. در این تحقیق خاصیت آنتی ژنی STxB و خاصیت ادجوانتی آن مد نظر بوده است که بتوان در ورود باکتری به سلول های میزبان و برای مقابله با شیگا توکسین ها به طور هم زمان عمل نمود. نتیجه این تحقیق در بررسی تیتر آنتی بادی تولیدی در موش ها بیانگر آن است که آنزیم های شبه فورین به راحتی در محل لینکر فورینی عمل کرده اند. پروتئین حاصل از امتزاج ژن های ipaD و stxB، می تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن نوترکیب علیه انواع شیگلا باشد.

سپاسگزاری

از تمامی اساتید، پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین(ع)، که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاسگزاری می شود.

References

1.Key B, Clemens J, Kotl F. Generic protocol to estimate the burden of Shigella diarrhea and dysenteric mortality. J Mcrobiol. 1999;5: 146-51.

2.Swapan KN. Shigellosis. J Microbiol. 2005;8:133-43.

3.Oludare O, Dequina N, Hiroshi Y, William L. AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. Toxins 2010;2:1612-45.

4.Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. Toxicon 2005;9:389-93.

5.Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, vanEffenterre D. Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites. Biol Cell 2008;100:717-25.

6.Janssen KP, Vignjevic, Boisgard R, Falguie T, Bousquet G, Decaudin D, et al. In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. Cancer Res 2006; 66: 151-8.

7.Sani M, Botteaux A, Parsot C, Sansonetti P, Boekema EJ, Allaoui A. IpaD is localized at the tip of the Shigella flexneri type III secretion apparatus, J Biochim Biophys Acta 2007; 1770:307-11.

8.Man A, Prieto G, Nicoletti C. Improving M-cell-mediated transport across mucosal barriers. J Immunol 2004; 113:15-22.

9.Heiat M, Saadati M, Nazarian S, Barati B, Honari H, Doroudian M, Hesaraki M. Cloning and exparession of N-terminal region of IpaD from Shigella dysenteriae in E. Coli. J Paramed Sci 2010; 1: 12-17.

10.Ranjbar R, Soltan Dallal MM, Pourshafie MR, Aslani MM, Majdzadeh R. Serogroup Distribution of Shigella spp in Tehran. J Iran Pub Health 2004; 33:32-5.

11.Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaei S. Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein. Arak Med Uni J 2013; 16: 83-93.

12.Ranjbar R, Haghi-Ashtiani MT, Jonaidi Jafari N, Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. Iran J Pub Health 2009; 38: 134-8.

13.Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang PL, Chang HW, et al. The immunogenicity of DNA constructs co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus conjugated by GPGP linker in pigs. Veterin Microbiol 2010; 146:189-99.

14.DeMagistris MT. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. Advanc Drug Delivery Rev 2006;58:52-67.

15.Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B, et al. Protection against Shiga toxin-producing Escherichia coli infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B. Clin Vaccine Immunol 2008;15:359-66.

16.Madanchi H, Honari H, Hesaraki H, Sayadnanesh A. Cloning and expression of stxB gene from shigella dysenteria typeI in E. coli Rosseta DE3.Genetics 2012; 1:2641-7.

17.Hromockyj A, Maurelli AT. Identification of Shigella invasion genes by isolation of temperature-regulated inv: lacZ operon fusions. Infect Immun 1989; 57: 2963-70.

18.Pallavi G, Manglesh KS, Yamini S, Vandana G, Subodh K, Om K, et al. Recombinantshiga toxin B subunit elicits protection against shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. Vaccine 2011; 29: 8094-100. 19.

19.Esmaeili A, Honari H, Hamedian M, Safaei S, Ghofrani M. Targeted cloning of

GFP as a tracker and its fusion mediated by PRARR flexible linkers to CTB-STB chimerical vaccine genes. Genetics 2012; 10:2657-65.

Comparison of Antibody Titers against the Single, Mixed, Fused and Recombinant proteins, StxB, IpaD and StxB- IpaD

Honari H[1], Baranvand M[1], Arefpour MA[1], Hashemzadeh MS[1], Pourhakak H[1], Minaei ME[1], Ghalavand M[1], Ahmadi AH[1]

(Received: February 1, 2014 Accepted: September 17, 2014)

Abstract

Introduction: IpaD protein plays an important role in invasion, pathogenesis and infection caused by Shigella and E. coli. Another major virulence factor in Shigella dysenteriae type 1 and E. coli O157: H7 is Shigella entrotoxin or (StxB). A suitable candidate vaccine could be made by a mixture or fusion of IpaD and STxB proteins. In this study, the immunogenicity and antibody titer of fused mixed and separated recombinant proteins, IpaD and STxB, in mice were compared with each other.

Materials & Methods: In this experimental study, recombinant vectors containing the gene sequences stxB-IpaD, IpaD and stxB, were prepared and also transferred into the E. coli BL21 DE3 bacterium. The protein expression levels were assessed and their expression was approved by using of Western blot technique. After purification of recombinant proteins with the column of chromatography, they were injected four times consecutively to the mice.

Findings: The antibody titers were statistically different for STxB, IpaD, STxB-IpaD and IpaD mixed with STxB antigens in the mice, and antibody levels increased by adding the StxB to IpaD.

Discussion & Conclusion: The results of this study indicate that the furin linker separated by semi furins and the produced protein from mixture and fusion genes, ipaD and stxB, can increase STxB immunegenicity effect, and could be a good candidate for the production of recombinant vaccines against Shigella and E. coli types.

Keywords: Shigella dysenteriae type 1, B subunit of Shiga toxin (STxB), IpaD, E. coli O157: H7

1.Imam Hosein University, Tehran, Iran
** Correspondin author Email: ebimomi@gmail.com*