

مقایسه تیتراژ آنتی بادی تولید شده بر علیه پروتئین های نو ترکیب BLF1 و BLF1-STxB در رت های آزمایشگاهی

مهدی مسعودی کرهرودی^۱، حسین هنری^{۲*}، سید مسیح اعتماد ایوبی^۱، مسعود عبدالهی^۱

(۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۸

چکیده

مقدمه: باکتری بورخولدریا سودومالئی عامل بیماری میلوئیدوزیس و باکتری شیگلادیسانتزی شایع ترین عامل اسهال است و تاکنون هیچ واکسن موثری علیه این دو باکتری تولید نشده است. پروتئین BLF1 باکتری بورخولدریا سودومالئی نقش مهمی در ایجاد بیماری زایی و عفونت دارد. STxB شیگلادیسانتزی یکی از فاکتورهای مهم در بیماری زایی است و هم چنین دارای نقش یابری و حاملی است. ترکیب پروتئین BLF1 با STxB می تواند کاندیدای مناسبی برای واکسن باشد. در این مطالعه تیتراژ آنتی بادی پروتئین های BLF1 و BLF1-STxB در رت با یکدیگر مقایسه شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی وکتورهای pET28a(+)-blf1 و pET28a(+)-blf1-stxB به باکتری E. coli BL21(DE3) تراریخت و توسط PCR تایید شدند. بیان ژن های blf1 و blf1-stxB تحت القای Isopropyl-β-D-thiogalactoside انجام و بعد از تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی، پروتئین های حاصل در چهار نوبت به رت تزریق شد. آنتی بادی پلی کلونال تولید شده در سرم رت ها اندازه گیری شد.

یافته های پژوهش: پروتئین های نو ترکیب تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه گذاری وسترن مورد تایید قرار گرفتند. نتایج الایزا نشان داد که آنتی بادی علیه آنتی ژن BLF1 تولید شده و با ترکیب STxB با BLF1 میزان تیتراژ آنتی بادی نسبت به تیتراژ آنتی بادی علیه آنتی ژن BLF1 افزایش یافته است.

بحث و نتیجه گیری: پروتئین BLF1-STxB تیتراژ آنتی بادی بیشتری نسبت به BLF1 داشت. به علت شباهت ساختاری زیر واحد STxB با همتای آن در باکتری اشرشیاکلی می تواند کاندیدای واکسن علیه بورخولدریا سودومالئی، شیگلا دیسانتری، باکتری اشرشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) و اشرشیا انترو توکسینوژنیک (ETEC) باشد.

واژه های کلیدی: بورخولدریا سودومالئی، شیگلا دیسانتری، میلوئیدوزیس، BLF1، STxB

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

Email : honari.hosein@gmail.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

باکتری بورخولدریا سودومالئی در سال ۱۹۱۱ توسط یک افسر انگلیسی از آبنس معتادان مرده به مواد مخدر در کشور برمه جداسازی شده است (۱). میلوئیدوزیس یک بیماری عفونی است که توسط بورخولدریا سودومالئی ایجاد می شود و در انسان، حیوان و بعضی از گیاهان وجود دارد (۲). انتقال باکتری از راه خوراکی، استنشاقی و آلودگی از طریق خراش پوستی می باشد و تلفات زیادی را در طول فصول مرطوب باعث می شود (۳). دوره نهفتگی میلوئیدوزیس در حدود ۲-۳ روز تا چندین ماه و یا چندین سال باشد (۴). پروتئین BLF1 باکتری بورخولدریا سودومالئی باعث دامیناسیون Gln339 و تبدیل آن به Glu339 می شود. این تغییر فعالیت RNA هلیکاز مورد نیاز برای باز کردن ساختار دوم mRNA در طول شروع ترجمه را غیر فعال می کند (۶). به نوبه خود این منجر به مهار گسترده ای از سنتز پروتئین ها در سلول های انسان می شود.

شیگلا یک باکتری دراز، بدون کپسول، غیر متحرک و فاقد اسپور می باشد که باعث اسهال خونی می شود (۷). اغلب اسهال های خونی با عامل شیگلا در بیشتر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان به موقع به مرگ می انجامد. شیگلاها از نظر بیماری زایی و بروز ایمنی ها به چهار سروتیپ به نام های شیگلا دیسانتری، شیگلا فلکسنری، شیگلا سونئی و شیگلا بوئیدی تقسیم می شوند (۹،۸). توکسین شیگا (STx) یک پروتئین هگزامر بوده که از یک زیرواحد منومریک سمی به نام STxA و یک زیرواحد متصل شونده به رستپور به نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیر سمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری می باشد (۱۰). با توجه به این که پروتئین BLF1 توانایی توقف پروتئین سازی را دارد و STxB دارای نقش یابری است و هم چنین با توجه به بررسی تیتراژ آنتی بادی تولید شده، می تواند به عنوان کاندید واکسن علیه *B.pseudomallei* و شیگلا دیسانتری مورد استفاده واقع شود. توکسین های دو زیر واحدی مختلفی به عنوان یاورها و حامل های بالقوه، پیشنهاد شده اند، زیرا آن ها به طور اختصاصی به

سطوح سلول های M-cell متصل می گردند و باعث تقویت و به کارگیری همه بازوهای سیستم ایمنی علیه پاتوژن می شوند. در تحقیقات صورت گرفته مشخص گردید که مقدار آنتی ژنی که در حالت متصل شده با یک یاور 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 های متصل کردن آنتی ژن ها با یاورهای مختلف دارد (۱۱،۱۲). به منظور تهیه واکسن های نو ترکیب در سطح وسیعی در جهان بر روی ژن های انتقال دهنده و یاورهای همراه شده با آنتی ژن کارهای زیادی صورت گرفته است. *Actinobacillus pleuropneumoniae* عامل بیماری سینه پهلوی می باشد. ایجاد بیماری وابسته به اندوتوکسین APX می باشد. اپی توپ هایی از APX با LTB فیوژ گردید. سرم موش داری آنتی بادی ضد LTB-APX epitops فعالیت همولیتیکی APX را به علت تولید آنتی بادی هایی که به طور قوی توکسین APX را شناسایی می کنند خنثی گردید (۱۳). هدف این مطالعه مقایسه تیتراژ آنتی بادی پروتئین های نو ترکیب BLF1 و BLF1-STxB در رت بود که با ترکیب STxB با BLF1 میزان تیتراژ آنتی بادی نسبت به تیتراژ آنتی بادی علیه آنتی ژن BLF1 افزایش یافت.

مواد و روش ها

وکتورهای pET28a(+)-blf1-stxB و pET28a(+)-blf1 از مرکز زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه شد (۱۴). وکتورهای بیانی pET28a(+) دارای ژن های نو ترکیب BLF1 و BLF1-STxB با روش شوک حرارتی به سلول های مستعد (تهیه شده به روش شیمیایی) *E.coli* BL21DE3 تراریخت گردید (۱۵). کلنی های نو ترکیب با غربالگری آنتی بیوتیکی کانامایسین جدا شدند و کاست ژنی blf1-StxB با PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت (۱۵). برای بیان کاست ژنی BLF1 و BLF1-STxB از کشت شبانه کلون های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد

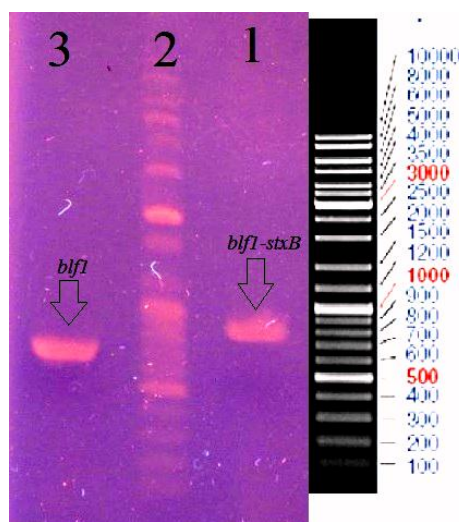
باکتری)، ماده القا کننده پروموتور (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (۱۴-۱۶). نمونه های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند (۱۷). غلظت ژل ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر بود. برای مشاهده باندهای پروتئین، از روش رنگ آمیزی با کوماسی بلو استفاده شد (۱۷). برای تایید پروتئین های نو ترکیب، از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن (Bio-rad) Mini (Protein) و بافر انتقال (گالیسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH=۸/۳) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. به منظور پر کردن جایگاه های خالی (بلاکینگ)، کاغذ به مدت یک شب در محلول ۳ درصد شیر خشک در PBST در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس سه مرتبه با PBST شستشو داده شد. کاغذ با آنتی بادی های پلی کلونال رت با رقت ۱:۲۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. فرآیند شستشو با PBST سه بار انجام گرفت. کونژوگه رت با رقت ۱:۵۰۰۰ به عنوان آنتی بادی تشخیص دهنده به کار رفت. همانند مرحله قبل گرماگذاری انجام شد. فرآیند شستشو نیز همانند مراحل قبلی انجام شد. نهایتاً، کاغذ نیتروسولوز در محلول سوبسترای رنگ زای DAB (۶۰ میلی گرم در صد میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۸) تا ظهور باند پروتئینی، قرار گرفت. برای توقف واکنش،

کاغذ در آب مقطر قرار داده شد (۱۷).

برای تخلیص پروتئین نو ترکیب، پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NAT جداسازی و نمونه های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد. غلظت پروتئین بیان شده به کمک برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد انجام شد. به منظور بررسی تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین های BLF1 و BLF1-STxB، از ۱۰ عدد رت به عنوان تست و ۴ عدد به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر رت، ۵۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده BLF1 و BLF1-STxB با یاور روغن در آب به هر رت در چهار نوبت به صورت داخل صفاقی تزریق شد و تیتراژ آنتی بادی آن ها توسط آزمایش الایزا اندازه گیری شد. برای بررسی تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین BLF1-STxB، به صورت از راه بینی (نازالی) ۵ عدد رت به عنوان تست و ۴ عدد به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر رت، ۵۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده BLF1-STxB بدون یاور به هر رت در چهار نوبت به صورت داخل بینی تجویز و تیتراژ آنتی بادی آن ها توسط آزمایش الایزا اندازه گیری شد.

یافته های پژوهش

برای تایید حضور ژن های blf1 و blf1-stxB پس از استخراج پلاسمید واکنش PCR انجام گرفت. با تکثیر ژن blf1 و blf1-stxB به روش PCR، محصول روی ژل ۱ درصد آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعه های مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما هم خوانی داشت (شکل شماره ۱).

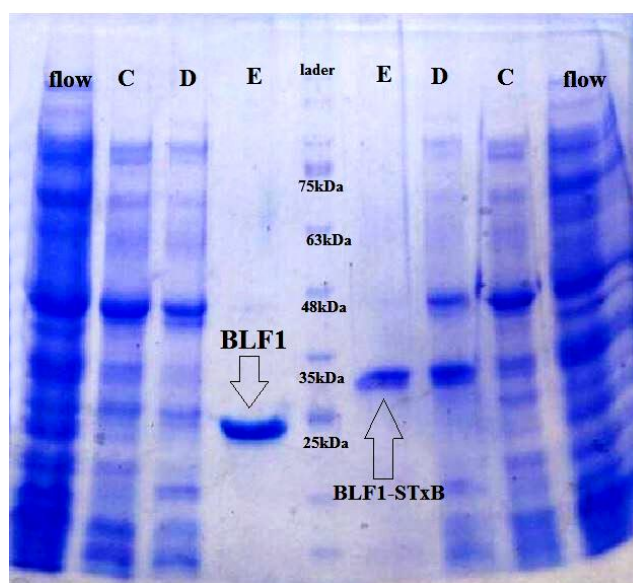


شکل شماره ۱. ژن های نو ترکیب روی ژل آگاروز ۱ درصد

چاهک ۱: محصول PCR روی پلاسمید pET-28a(+)-blf1-stxB و مشاهده باند در محدوده ۹۲۶ جفت باز (۸۷۶ جفت باز قطعه ژنی blf1-stxB و ۵۰ جفت باز طول پرایمر عمومی (pET-28a(+)) چاهک ۲: نشانگر اسید نوکلئیک و چاهک ۳: محصول PCR روی پلاسمید pET-28a(+)-blf1 و مشاهده باند در محدوده ۶۸۶ جفت باز (۶۳۶ جفت باز قطعه ژنی blf1 و ۵۰ جفت باز طول پرایمر عمومی (pET-28a(+)))

پیشین (۱۴) که بیان آنتی ژن ها بهینه سازی شده بود، نمونه ها را بلافاصله بعد از کشت برای تخلیص از ستون نیکل عبور دادیم. پروتئین های نو ترکیب به کمک ستون نیکل خالص سازی گردید (شکل شماره ۲).

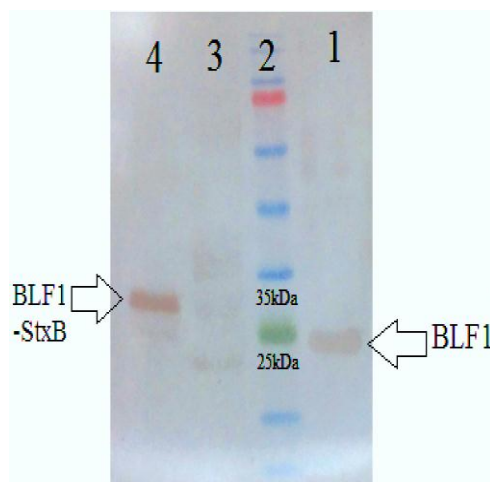
برای بررسی بیان ژن blf1-stxB و blf1 در وکتور pET28a(+) پس از کشت سلول ها و القاء با IPTG بیان ژن ها صورت پذیرفت و پس از تیمار خام بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. باند پروتئینی BLF1-STxB و BLF1 به ترتیب در جایگاه ۲۴kDa و ۳۴/۰۱kDa قرار گرفت. با توجه به پژوهش



شکل شماره ۲. تخلیص پروتئین ها به وسیله ستون نیکل، E: BLF1 دارای وزن مولکولی ۲۴ کیلوالتون و E: BLF1-STxB دارای وزن مولکولی ۳۴/۰۱ کیلوالتون. سایر چاهک ها (C, D, flow) مربوط به سایر بافرهای مورد استفاده در ستون نیکل می باشد.

به منظور تایید محصول پروتئینی از تکنیک وسترن بلاتینگ استفاده شد. در این روش از آنتی بادی پلی کلونال رتی BLF1-STxB برای تایید پروتئین های نو ترکیب BLF1 و BLF1-STxB

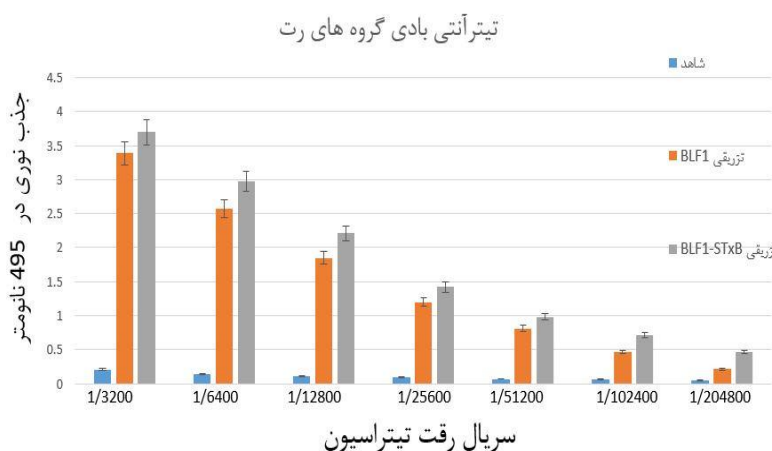
استفاده شد، باند وسترن در جایگاه صحیح مد نظر قرار گرفت اما در ستون کنترل هیچ بانندی دیده نشد (شکل شماره ۳).



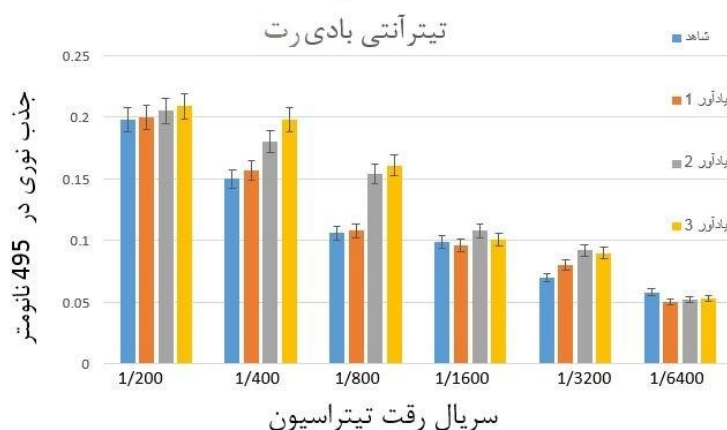
شکل شماره ۳. تایید پروتئین نو ترکیب بیان شده با استفاده از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال. ردیف ۱: نمونه BLF1 القاء شده با IPTG ردیف ۲: مارکر پروتئینی ۳۱۰۰۰۳، ردیف ۲: کنترل بدون القای IPTG، ردیف ۳: نمونه BLF1-STxB القاء شده با IPTG

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 هر بار تزریق (به استثنای تزریق اول) از رت 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 هر مرحله در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. هم چنین نتیجه ارزیابی تیتر آنتی بادی تولید شده علیه نمونه آنتی ژن BLF1-STxB که به صورت نازالی تجویز شده بود در شکل شماره ۵ نشان داده شده است.



شکل شماره ۴. بررسی تیتر آنتی بادی با استفاده از تکنیک الیزا



شکل شماره ۵. بررسی تیتراژ آنتی بادی IgG تولید شده در رت علیه نمونه آنتی ژن BLF1-STxB نازالی بدون یاور

بحث و نتیجه گیری

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. زیر واحد STxB به عنوان یکی از کاندیداهای مهم ساخت واکسن علیه شیگلا دیسانتری و شیگلا توکسین و اشرشیاکلی O157 مطرح است. با تولید آنتی بادی علیه این زیر واحد (STxB) می توان با جلوگیری از اتصال سم شیگلا توکسین مانع از ورود قسمت سمی (STxA) به درون سلول و مانع اثرات مخرب آن شد. به علت شباهت ساختاری زیر واحد STxB با همتای آن در باکتری اشرشیاکلی می توان از آن به عنوان یکی از کاندیداهای مهم ساخت واکسن علیه شیگلا دیسانتری و باکتری اشرشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) و اشرشیا انترو توکسینوژنیک (ETEC) استفاده کرد (۱۸). با تولید آنتی بادی علیه زیر واحد STxB می توان مانع از اتصال سم شیگلا توکسین شد و از ورود قسمت سمی STxA به درون سلول جلوگیری کرد و مانع از اثرات مخرب آن شد.

در حال حاضر هیچ گونه واکسن موثری علیه باکتری بورخولدریا سودومالئی وجود ندارد و در سال ۲۰۰۲ در طبقه بندی CDC جزء عوامل بیوتروریسم رده B قرار گرفته است (۲). این باکتری می تواند ۱۰ سال در آب مقطر زنده بماند و قادر است در تمام اندام های بدن انسان به صورت نهفته زندگی کند و بعد از مدت زمان کوتاه یا طولانی مدت فعال شود و باعث

بیماری شود. یکی از فاکتورهای مهم بیماری زایی در باکتری بورخولدریا سودومالئی که در سال ۲۰۱۱ توسط گروه ویلسون و ریس تعیین ساختار و کریستالوگرافی شد، پروتئین BLF1 بود (۱۹). پروتئین BLF1 با یکی از پروتئین های باکتری بورخولدریا مالئی مشابهت زیادی دارد که با توجه به این شباهت می تواند از این پروتئین برای تولید واکسن علیه هر دو باکتری استفاده کرد. غیرفعال کردن توکسین BLF1 ممکن است به ما اجازه این را بدهد که بتوانیم برای اولین بار یک واکسن برای آن تولید کنیم. در واقع یک جهش در C94S در BLF1 می تواند فعالیت دامیناسیون گلوتامین را مهار کند و می تواند یک نقطه شروع مناسب برای تولید واکسن باشد (۲۰). مهندسی بیشتر بر روی توکسین BLF1 ممکن است به عنوان یک کاندید مناسب برای شناسایی واکسن مورد نیاز باشد. BLF1 هم چنین کاربردهای جایگزینی را در پزشکی می تواند ارائه دهد (۲۱). مهارکننده های سنتز پروتئین به عنوان عوامل ضد سرطان از جمله مهارکننده های eIF4A را می توان مورد استفاده قرار داد (۲۰). BLF1 باعث تغییر eIF4A می شود که باعث تعویض Gln339 به Glu339 می شود و خود یک مهارکننده قوی ترجمه است. بنا بر این BLF1 و eIF4A ابزار جدید مولکولی قوی به منظور شیمی درمانی در تومورها هستند. واضح است که تحویل BLF1 یا eIF4A به تومور شرط لازم برای استفاده درمانی از آن می باشد. STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb3 متصل می شود (۷) و در

سطح سلول های سرطانی انسان بیان Gb3 فراوانی بسیار زیادی دارد (۲۲). مهارکننده های قوی ترجمه می توانند به عنوان یک عامل ضد سرطان قوی مورد استفاده قرار گیرند. در شرایط آزمایشگاهی یک مولکول BLF1 قادر است تقریباً ۷۰۰ مولکول eIF4A را در دقیقه غیر فعال کند، تعداد تبدیل در این محدوده به عمل N-گلیکوزیدی در A4324 از 28S RNA سم قوی ریسین شبیه است که می تواند ترجمه را متوقف کند (۲۳).

توسعه تولید واکسن های جدید بر پایه آنتی ژن های حفاظتی خالص شده برای مدت زیادی است که به علت ایمنی زایی پایین آنتی ژن های محلول و نبودن یاور مخاطی موثر و ایمن، دچار اختلال گردیده است. تحقیقات صورت گرفته مشخص کردند که مقدار آنتی ژنی که در حالت فیوژن شده با یک یاور 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 یاورهای مختلف دارد. امروزه توجه خاصی به واکسن هایی شده است که دارای این مزیت هستند. در سال ۲۰۰۳ یک آژانس سلامت عمومی در کانادا یک واکسن پروتئوزومی با تلقیح نازال (بینی) دارای LPS شیگلا که به صورت غیر کووالان به پروتئین B نایسریا مننژیتیدس متصل شده و در ویزیوکول های مولتی لایر مشتق از نایسریا محصور شده بود ساخت. این واکسن ها از ویزیوکول های چند لایه از پروتئین غشایی خارجی نایسریا مننژیتیدس که برای واکسن های مخاطی استفاده می گردد، منشأ گرفته است. LPS شیگلا را در این ویزیوکول ها قرار می دهند و به صورت نازال تلقیح می کنند. این LPS ناشی از S.dysenteriae و S.flexneri بود و این واکسن تولید آنتی بادی سرمی می کرد. که تلقیح آن به صورت نازال بهتر از نوع خوراکی بود. STx1B به همراه توکسین کلرا برای ایمنی زایی به موش Balb/c استفاده شد که افزایش قوی در پاسخ ایمنی مشاهده شد (۲۴). در سال ۲۰۰۵، Nak-Won Choi و همکاران، ایمنی زایی خوراکی STx1B فیوژ شده با ویروس NSP4₉₀ را به اثبات رساندند (۲۵). در سال

۲۰۰۵ به منظور تقویت ایمنی زایی علیه STxB این پروتئین را با پروتئین هموسیائین کانتوگه کرده در بررسی ایمنی زایی پروتئین کایمیریک پاسخ ایمنی به طور ناچیزی بهبود یافت و IgG1 ترشحی قوی تری ایجاد گردید (۲۶). در سال ۲۰۰۸ واکسن زیر واحد B از شیگاتوکسین ۲ و ۱ به صورت مخلوط با برچسب حرارتی تغییر یافته انتروتوکسین (MLT) برای حفاظت در مقابل شیگاتوکسین ۱ و ۲ تهیه شد که دارای تیتراژ آنتی بادی خوبی بود و باعث مقاوت و ایمنی شده بود (۲۷).

نتایج تحقیقات انجام شده نقش دلیوری، آنتی ژنی و یآوری STxB را اثبات کرده اند از این رو این استدلال وجود داشته که با اتصال ژن stB با ناحیه N-ترمینال BLF1 می توان به توسعه و تولید کاندیدای واکسن مناسبی علیه شیگلوز و B. pseudomallei دسترسی پیدا کرد. در این پروژه ژن های BLF1 و BLF1-stxB برای تولید کاندیدای واکسن دو ظرفیتی به عنوان یک آنتی ژن واحد طراحی و در کاست ژنی -NdeI-BamHI-blf1-linker-stxB-uua-XhoI تولید گردید و در ادامه با بیان آن در میزبان E.coli به بررسی ایمنی زایی آن در رت پرداخته شد.

در ادامه در اولین مرحله، پروتئین نوترکیب همراه یاور روغن در آب به گروه های تست تزریق گردید و بعد از خون گیری از رت ها، تیتراژ آنتی بادی تولید شده با استفاده از الایزا غیرمستقیم مورد ارزیابی قرار گرفت و نتیجه آزمایش الایزا نشان داد که علیه پروتئین های نوترکیب آنتی بادی در رت تولید شده است. بعد از هر بار تزریق یادآور، خونگیری از رت ها انجام شد و بعد از انجام آزمایش الایزا مشخص شد که در هر مرحله تیتراژ آنتی بادی به صورت تصاعدی افزایش یافته است و این بیانگر تحریک مناسب سیستم ایمنی توسط آنتی ژن ها می باشد. توسعه تولید واکسن های جدید بر پایه آنتی ژن های حفاظتی خالص شده به علت ایمنی زایی پایین آنتی ژن های محلول و نبودن یاور مخاطی موثر و ایمن، دچار اختلال گردیده است. برای برطرف کردن این نقص و بالا بردن میزان ایمنی زایی BLF1، آن را با یاور همراه می کنند. نتایج تحقیقات

سلول ها و سایر فعالیت های آن تاثیرگذار است. با توجه به نتایج حاصله نقش آنتی ژنی BLF1-STxB به صورت تزریقی به عنوان کاندید واکسن اثبات شد. نتیجه این تحقیق بیانگر آن است که پروتئین BLF1-STxB می تواند کاندیدای مناسبی جهت تولید واکسن علیه بورخولدریا و شیگلا دیسانتری باشد. هم چنین کاربردهای نوینی برای کاست ژنی blf1-stxB پیش بینی می شود. پروتئین Gb3 (پذیرنده STB)، در سلول های طبیعی انسان، بیان محدودی دارد (۷،۲۱) ولی در بعضی از سلول های سرطانی، به میزان بسیار بالایی بیان می شود و با توجه به عملکرد پروتئین BLF1 که مهارکننده قوی ترجمه است می توان با اتصال دو پروتئین BLF1-STxB به طور اختصاصی به عنوان یک عامل ضد سرطان قوی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

از اساتید، پژوهشگران و کارکنان مرکز و گروه زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در این پژوهش از لحاظ علمی و مالی ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می شود. کد اخلاق:

References

1. Whitmore A, Krishnaswami C. An account of the discovery of a hitherto undescribed infective disease occurring among the population of Rangoon. *Indian Med Gaz* 1912;47:262-07. PMID: 29005374
2. Nandi T, Ong C, Singh AP, Boddey J, Atkins T, Sarkartysen M, et al. A genomic survey of positive selection in *Burkholderia pseudomallei* provides insights into the evolution of accidental virulence. *Plos Path* 2010;6:1000845.
3. Limmathurotsakul D, Chantratita N, Teerawattanasook N, Priyagitpaiboon K, Thanwisai A, Wuthiekanun V, et al. Enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of melioidosis better than we thought. *Clin Inf Dis* 2011;52:1024-08. doi: 10.1093/cid/cir080
4. Currie BJ, Ward L, Cheng AC. The epidemiology and clinical spectrum of

انجام شده نقش حامی، آنتی ژنی و یابری STxB را اثبات کرده است. در این تحقیق، خاصیت ایمنی زایی پروتئین BLF1 و خاصیت آنتی ژنی و یابری STxB به طور هم زمان مد نظر بوده است.

بررسی تیتراژ آنتی بادی پروتئین BLF1 و BLF1-STxB به صورت تزریقی به عنوان کاندید واکسن در رت مورد بررسی قرار گرفت، که نتیجه تحقیق انجام شده نتایج الایزا نشان داد که آنتی بادی علیه آنتی ژن BLF1 تولید شده و با ترکیب STxB با BLF1 میزان تیتراژ آنتی بادی نسبت به تیتراژ آنتی بادی علیه آنتی ژن BLF1 افزایش یافته است. در ادامه تیتراژ آنتی بادی تولید شده علیه نمونه آنتی ژن BLF1-STxB و به صورت تجویز نازال مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه مناسبی مشاهده نشد. با توجه به این که آنتی ژن IpaD-STxB به صورت تجویز نازالی دارای عملکرد مناسبی بود (۹) می توان نتیجه گرفت که نوع آنتی ژن اتصال به STxB به منظور استفاده از خاصیت یابری آن در تجویز نازال مورد اهمیت می باشد. دلیل این امر ممکن است، تاثیراتی باشد که پس از اتصال دو آنتی ژن به یکدیگر در عمل ساختاری به وجود می آید که این تغییرات در اتصال به

- melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study. *Plos Negl Trop Dis* 2010;4:900. doi: 10.1371/journal.pntd.0000900.
5. Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdanotarraga AM, Atkins T, Crossman LC, et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proce Acad Am* 2004; 101:14240-5. doi: 10.1073/pnas.0403302101
 6. Pause A, Methot N, Svitkin Y, Merrick W, Sonenberg N. Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap dependent and cap independent initiation of translation. *EMBOJ* 1994;13:1205.
 7. Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, Effenterre D. Intracellular trafficking of Shiga toxin B subunit

- functionalized spherulites. *Biol Cell* 2008;100:717-28 doi: 10.1042/BC20080009.
8. Clemens J, Kotloff K, Kay BA. Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhoea and dysenteric mortality. *CiteSeer* 1999;2:211-06.
9. Honari H, Amlashi I, Minaei ME. [Expression of recombinant proteins IpaD-STxB and immunogenicity STxB in the Mice]. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2014;23:196-206. (Persian)
10. Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga toxin B subunits thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. *Toxicon* 2005;45:389-93. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.12.014
11. Bai Y. Improving the oral efficacy of recombinant granulocyte colony stimulating factor and transferrin fusion protein by spacer optimization. *Pharm Res* 2006; 23: 2116-21. doi: 10.1007/s11095-006-9059-5
12. Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang P L, 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. *Vet Microbiol* 2010; 146: 189-99. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.007
13. Bagdasarian MB, Nagaia M, Friyb J, Bagdasarian M. Immunogenicity of *Actinobacillus* ApxIA toxin epitopes fused to the *E. coli* heat labile enterotoxin B subunit. *Vaccine* 1999;17: 441-47. doi: 10.1128/IAI.00181-12
14. Masoudikerahroudi M, Honari H, Abdollahi M. [Expression of blf1-stxB gena cassette in *E. coli* and investigation antibody titer in Mice]. *J Shahid Sadoughi Uni Med Sci* 2017;24:876-86. (Persian)
15. Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning a laboratory manual. 3th ed. Coldspring-Harbour Lab UK Publication. 2001;P.132-9.
16. Ahmadi A H, Honari H, Minaei M E. [Cloning fusion and expression of domain a-1 protective antigen 20 of *Bacillus anthracis* and N-Terminal ipaD gene of *Shigella* in *E. coli*]. *Qom Uni Med Sci J* 2015; 9:20-29. (Persian)
17. Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: cloning, expression, purification, and proteolytic activity. *Protein expression and purification* 1999;15:221-7. doi: 10.1006/prep.1998.1007
18. Oloomi M, Bouzari S, Ajdary S. [Immune responses of Mice immunized with active recombinant shiga toxin and its derivatives]. *Iran J Allerg Asth Immunol* 2008;7:53-60. (Persian)
19. Su G, Li F, Huang P, Rui X, Huang C. High level expression of Shiga toxin B subunit of *Shigella dysenteriae* serotype 1 in *Escherichia coli*. *Chinese J Biotechnol* 1992;9:49-55. PMID: 8155839
20. Cruz-Migoni A, et al. A *Burkholderia pseudomallei* toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A. *Science* 2011; 334(6057): p. 821-824. doi: 10.1126/science.1211915
21. Malina A, R Cencic, Pelletier J, Targeting translation dependence in cancer. *Oncotarget* 2011; 2: 76-88. doi: 10.18632/oncotarget.218
22. Janssen K P, Vignjevic D, Boisgard R, Falguieres T, Bousquet G, Decaudin D, et al. In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen based delivery approach. *Cancer Res* 2006;66:7230-06. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0631
23. Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, et al. Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:1113-07. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0038
24. Imai Y, Ishikawa T, Tanikawa T, Nakagami H, Maekawa T, Kurohane K. Production of IgA monoclonal antibody against Shiga toxin binding subunits employing nasal associated lymphoid tissue. *J Immun Meth* 2005; 302: 125-05. doi: 10.1016/j.jim.2005.05.007
25. Choi NW, Estes MK, Langridge WH. Oral immunization with a shiga toxin B subunit rotavirus NSP4 90 fusion protein protects Mice against gastroenteritis.

Vaccine 2005;23: 5168-06. doi:
10.1016/j.vaccine.2005.06.015
26.Marcato P, Thomas P, Griener, George
L, Mulvey, Glen D. Armstrong 2.
recombinant Shiga toxin B subunit keyhole
limpet hemocyanin conjugate vaccine
protects mice from Shigatoxemia. Inf
immun 2005; 73:6523-09. doi:
10.1128/IAI.73.10.6523-6529.2005

27.Tsuji T, Shimizu T, Sasaki
K, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi
S, Shimizu T, et al. A nasal vaccine
comprising B-subunit derivative of Shiga
toxin 2 for cross protection against Shiga
toxin types 1 and 2. Vaccine 2008;26:
2092-09. doi:
10.1016/j.vaccine.2008.02.034



Comparison of the Titers of Produced Antibodies against BLF1 and BLF1-STxB Recombinant Proteins in Laboratory Rats

Masoudikerahrudi M¹, Honari H^{1*}, Etemadaubi M¹, Abdollah M¹

(Received: August 19, 2017

Accepted: November 15, 2017)

Abstract

Introduction: Burkholderia pseudomallei causing Melioidosis and Shigella dysenteriae is the most common cause of diarrhea, and so far no effective vaccine has been produced against these two bacteria. The BLF1 protein of Burkholderia pseudomallei bacteria plays an important role in pathogenesis and infection. Shigella dysenteriae STxB is one of the most important factors in pathogenesis and also has an adjuvant role. Binding the BLF1 protein with STxB can be a good candidate vaccine. In this study, the antibody titers of BLF1-STxB and BLF1 proteins produced in rats were compared.

Materials & Methods: In this experimental study, pET28a (+) - blf1-stxB and pET28a (+) - blf1 vectors were transformed into E. coli BL21 (DE3) and confirmed by PCR. The expression of blf1-stxB and blf1 genes was induced by IPTG and the proteins were injected into rats four times after purification of the protein by using an affinity chromatography column.

Polyclonal antibodies produced in the serum of rats were measured.

Findings: The produced recombinant proteins were approved by SDS-PAGE and Western blotting. ELISA results showed that antibody was produced against the BLF1 antigen and the antibody titer level increased by STxB binding to BLF1, compared with the antibody titer against the BLF1 antigen.

Discussion & Conclusions: The BLF1-STxB protein had higher antibody titer than BLF1. Due to the structural similarity of STxB subunit with its counterpart in E. coli, it can be a vaccine candidate against Burkholderia pseudomallei, Shigella dysenteriae, enterohemorrhagic E. coli, and enterotoxigenic E. coli.

Keywords: Burkholderia pseudomallei, Shigella dysenteriae, Melioidosis, BLF1, STxB

1. Dept of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

* Corresponding author Email: honari.hosein@gmail.com