مقایسه تیتر آنتی بادی تولید شده بر علیه پروتئین های نوترکیب BLF1 و BLF1-STxB در رت های آزمایشگاهی

مهدی مسعودی کرهرودی[۱]، حسین هنری[۱*]، سید مسیح اعتماد ایوبی[۱]، مسعود عبدالهی[۱]

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۴

چکیده

مقدمه: باکتری بورخولدریاسودومالئی عامل بیماری میلوئیدوزیس و باکتری شیگلادیسانتری 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 شیگلادیسانتری یکی از فاکتورهای مهم در بیماری زایی است و هم چنین دارای نقش یاوری و حاملی است. ترکیب پروتئین BLF1 با STxB می تواند کاندیدای مناسبی برای واکسن باشد. در این مطالعه تیتر آنتی بادی پروتئین های BLF1-STxB وBLF1 در رت با یکدیگر مقایسه شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی وکتورهای pET28a(+)-blf1-stxB و pET28a(+)-blf1 به باکتری E. coli BL21(DE3) تراریخت و توسط PCR تایید شدند. بیان ژن های blf1-stxB و blf1 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 نوترکیب 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 تیتر آنتی بادی نسبت به تیتر آنتی بادی علیه آنتی ژن BLF1 افزایش یافته است.

بحث و نتیجه گیری: پروتئین BLF1-STxB تیتر 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]

مقدمه

باکتری بورخولدریا سودومالئی در سال ۱۹۱۱ توسط یک افسر انگلیسی از آبسه معتادان مرده به مواد مخدر در کشور برمه جداسازی شده است(۱). میلوئیدوزیس یک بیماری عفونتی 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 ۳-۲ روز تا چندین ماه و یا چندین سال باشد(۴). پروتئین BLF1 باکتری بورخولدریا سودومالئی باعث دآمیناسیون 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 اپیدمی 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 رسپتور 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 یاوری است و هم چنین با توجه به بررسی تیتر 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 شده‌اند، 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 نوترکیب 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 پهلو 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 تیتر آنتی بادی پروتئین های نوترکیب BLF1 و BLF1-STxB در رت بود که با ترکیب STxB با BLF1 میزان تیتر آنتی بادی نسبت به تیتر 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 نوترکیب 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 نوترکیب 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 کلون‌های 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]

باکتری)، ماده القا کننده پروموتر(IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد(۱۶-۱۴). 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 تائید پروتئین های نوترکیب، از تکنیک وسترن بلات 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. به منظور پرکردن جایگاه های خالی(بلاکینگ)، کاغذ به مدت یک شب در محلول ۳ درصد شیرخشک 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 نیتروسلولز 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).

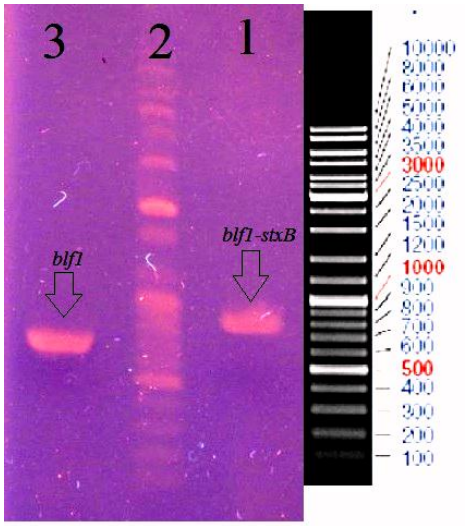
برای تخلیص پروتئین نوترکیب، پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NAT جداسازی و نمونه های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد. غلظت پروتئین بیان شده به کمک برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی(BSA) به عنوان استاندارد انجام شد. به منظور بررسی تیتر آنتی بادی علیه پروتئین های BLF1 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 تیترآنتی بادی آن ها توسط آزمایش الایزا اندازه گیری شد. برای بررسی تیتر 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 تیترآنتی 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).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

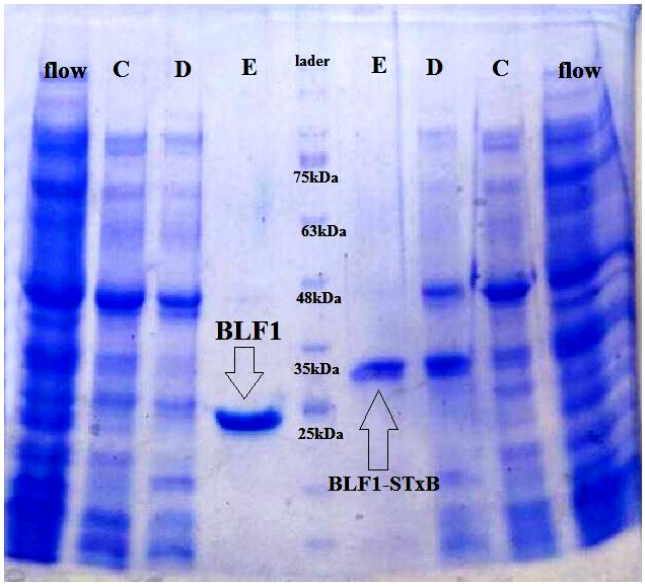
[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]



شکل شماره ۱. ژن های نوترکیب روی ژل آگاروز ۱ درصد

چاهک ۱: محصول PCR روی پلاسمید pET-28a(+)-blf1-stxB و مشاهده باند در محدوده ۹۲٦ جفت باز(۸۷٦ 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 ٦۸٦ جفت باز(٦۳٦ جفت باز قطعه ژنی blf1 و ۵۰ جفت باز طول پرایمر عمومی (pET-28a(+)

برای بررسی بیان ژن blf1 و blf1-stxB در وکتور pET28a(+) پس از کشت سلول ها و القاء با IPTG بیان ژن ها صورت پذیرفت و پس از تیمار خام برروی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. باند پروتئینی BLF1 و BLF1-STxB به ترتیب در جایگاه ۲۴kDa و ۳۴/۰۱kDa قرار گرفت. با توجه به پژوهش 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 نوترکیب به کمک ستون نیکل خالص سازی گردید(شکل شماره ۲).

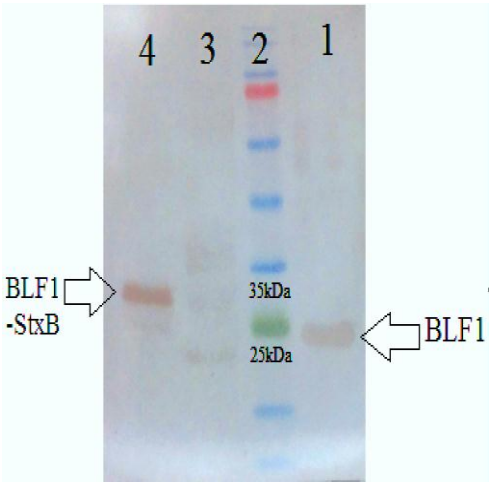


شکل شماره ۲. تخلیص پروتئین ها به وسیله ستون نیکل، E: BLF1 دارای وزن مولکولی ۲٤ کیلودالتون و E: BLF1-STxB دارای وزن مولکولی ۳٤/۰۱ کیلودالتون. سایر چاهک ها(C, D, flow) مربوط به سایر بافرهای مورد استفاده در ستون نیکل می باشد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

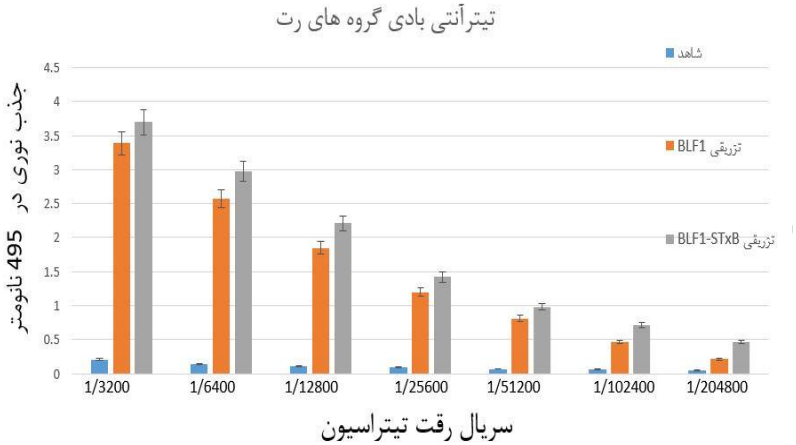
[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]

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 نوترکیب BLF1 و BLF1-STxB استفاده شد، باند وستـرن در جایگاه صحیح مد نظر قرار گرفت اما در ستون کنترل هیچ باندی دیده نشد(شکل شماره ۳).



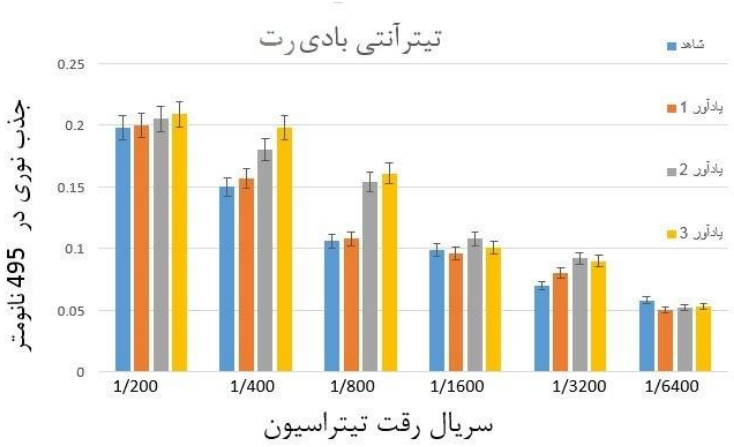
شکل شماره ۳. تایید پروتئین نوترکیب بیان شده با استفاده ازروش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال.
ردیف۱: نمونه BLF1 القاء شده با IPTG ردیف۲: مارکر پروتئینی ۳۱۰۰۰۳ ، ردیف۲: کنترل بدون القای IPTG ،
ردیف۳: نمونه BLF1-STxB القاء شده با IPTG

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 هربار 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 ٤. بررسی تیتر آنتی بادی با استفاده از تکنیک الیزا

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]



شکل شماره ۵. بررسی تیتر 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 شیگا توکسین و اشرشیاکلی O157 مطرح است. با تـــولید آنتی بادی علیه این زیر واحد(STxB) می توان با جلوگیری از اتصال سم شیگا 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 شیگا 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 جزوء عوامل بیوتروریسم رده B قرار گرفته است(۲). این باکتری می تواند ۱۰ سال در آب مقطر زنده بماند و قـــادر 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 دآمیناسیون 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]

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 منتژیتیبدس متصل شده و در ویزیوکول های مولتی لایر مشتق از نایسریا محصور شده بود ساخت. این واکسن ها از وزیکول های چند لایه از پروتئین غشایی خارجی نایسریا منتژیتیدس که برای واکسن های مخاطی استفاده می گردد، منشاء گرفته است. LPS شیگلا را در این وزیکول ها قرار می دهند و به صورت نازال تلقیح می کنند. این LPS ناشی از S.dysenteria و S.flexneri بود و این واکسن تولید آنتی بادی سرمی می‌کرد. 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 STxB فیوژ شده با ویروس $NSP4_{90}$ را به اثبات رساندند(۲۵). در سال ۲۰۰۵ به منظور تقویت ایمنی زایی علیه STxB این پروتئین را با پروتئین هموسیانین کانجوگه کرده در بررسی ایمنی زایی پروتئین کایمریک پاسخ ایمنی به طور ناچیزی بهبود یافت و IgG1 ترشحی قوی تری ایجاد گردید(۲۶). در سال ۲۰۰۸ واکسن زیر واحد B ازشیگاتوکسین 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 تیتر آنتی بادی خوبی بود و باعث مقاوت و ایمنی شده بود(۲۷).

نتایج تحقیقات انجام شده نقش دلیوری، آنتی ژنی و یاوری STxB را اثبات کرده‌اند 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-uaa-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، تیتر 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 تیتر 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]

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

بررسی تیتر 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 تیتر آنتی بادی نسبت به تیتر آنتی بادی علیه آنتی ژن BLF1 افزایش یافته است. در ادامه تیتر 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 اتصالی به STxB به منظور استفاده از خاصیت یاوری 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 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 می‌شود 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, Sarkartyson M, et al. A genomic survey of positive selection in Burkholderia pseudomallei provides insights into the evolution of accidental virulence. Plos Path2010;6:1000845.

3. Limmathurotsakul D, Chantratita N, Teerawattanasook N, Piriyagitpaiboon 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 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, Cerdenotarraga AM, Atkins T, Crossman LC, et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, Burkholderia pseudomallei. Proce Acad Am2004; 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]

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 Microbiol2010; 146: 189-99. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.007

13. Bagdasariana MB, Nagaia M, Friyb J, Bagdasariana 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 Res2006;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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]

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

Masoudikerahroudi M [1], Honari H [1], Etemadaubi M[1], Abdollah M[1]*

(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 dysentery 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*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.111]