مقاله پژوهشی

بررسی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب (STxB) شیگلا دیسانتری تیپ ۱ در موش سوری

حسین هنری[۱*]، مهدی باران وند[۲]، محمد ابراهیم مینایی[۳]

[۱] دانشیار، دکترای ژنتیک، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

[۲] کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

[۳] دانشجوی دکترای نانوبیوتکنولوژی، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، حسین هنری
E-mail:Honari.hosein@gmail.com

وصول:۹۳/۴/۲۰، اصلاح:۹۳/۵/۱۱،پذیرش:۹۳/۶/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: شیگلوز عفونت حادّ روده‌ای حاصل از شیگاتوکسین و توکسین‌های شبه شیگاست که توسط باکتری شیگلا و باکتری اشرشیا کلی انتروهموراژیک (EHEC) و اشرشیا انتروتوکسینوژنیک (ETEC) ایجادمی‌شود. این بیماری، میزان شیوع بالایی در جهان دارد و به‌عنوان یک عامل بیوتروریستی شناخته می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب STxB و نانوالیاف حاوی پروتئین STxB به صورت تجویز نازالی و تزریقی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، وکتور pET28a(+) دارای ژن stxB در اختیار قرارگرفت، این وکتور به درون باکتری E. Coli BL21 DE3 ترانسفورم شد. این باکتری روی محیط آنتی بیوتیک رشد داده شد و با روش PCR مستقیم، بیان پروتئین و ژل SDS-PAGE مورد تایید قرارگرفت. پروتئین نوترکیب توسط ستون نیکل تخلیص و توسط ژل SDS-PAGE و ایمنوبلاتینگ نیز تاییدشد. نانوالیاف کایتوسان حاوی پروتئین STxB توسط دستگاه الکتروریسی سنتز شد. تجویز نازالی و تزریقی پروتئین STxB و نانوالیاف حاوی پروتئین STxB در چهار نوبت متوالی به موش‌های سوری انجام و تیترآنتی بادی آنها بررسی شد.

یافته‌ها: با انجام آزمایش الایزا، افزایش تیتر آنتی بادی IgG علیه پروتئین STxB، درحالت تزریقی و نازالی مشاهده و درحالت نازالی برای نانوالیاف حاوی پروتئین STxB مشاهده نشد که ممکن است به علت عدم جذب آنتی ژن توسط سلول‌های اپیتلیالی بینی موش باشد. موش‌های ایمن شده توانستند تا پنج برابر LD50 شیگا توکسین E. coli O157:H7 را تحمل نمایند.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده از این تحقیق بیانگر آن است که با تجویز نازالی و تزریقی پروتئین STxB موش‌های ایمن شده می‌توانند شیگا توکسین E. coli O157:H7 را تحمل نمایند.

واژه‌های کلیدی: *ایمنی زایی، پروتئین نوترکیب، شیگلا دیسانتری تیپ ۱، همسانه سازی.*

مقدمه

یکی از عوامل اصلی بروز اسهال‌های حاد خونی، باکتری‌های گرم منفی و فاقد اسپور شیگلا می‌باشند. شیگا توکسین‌ها، خانواده‌ای از سموم دو زیر واحدی AB هستند که دارای شباهت‌های عملکردی و ساختاری زیادی می‌باشند. شیگا توکسین و توکسین‌های شبه‌شیگا، متعلق به خانواده‌ی بزرگی از توکسین‌های باکتریایی می‌باشند که طی یک روند بیولوژیک، باعث مرگ سلول می‌شوند. شیگا توکسین STx توسط شیگلا دیسانتری تولیدمی‌شود، درحالی‌که توکسین‌های شبه شیگا یا STx1 و STx2 (Shiga like toxin -1 &2) توسط باکتری اشرشیا کلی انتروهموراژیک (EHEC) و اشرشیا انتروتوکسینوژنیک (ETEC) تولید می‌شوند. توکسین STx2در باکتری اشرشیا کلی سویه O157:H7 ایجادمی‌شود که عامل اسهال‌ها و دیسانتری‌های متعددی در سطح جهان است. باکتری‌های تولیدکننده این خانواده از توکسین‌ها دارای ویژگی‌های ساختاری و فیزیولوژیک مشابه‌ای هستند(۱، ۲، ۳).

توکسین شیگا STx یک پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ kDa کیلودالتون بوده که از یک زیرواحد منومریک سمّی و آنزیماتیک به‌نام STxA و از یک زیرواحد متصل‌شونده به رسپتور هموپنتامریک به‌نام STxB تشکیل‌شده‌است. قسمت غیر سمّی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمّی یا STxA ضروری می‌باشد(۱، ٤).

پروتئین STxB ساختار هموپنتامریک (۵ زیر واحد) دارد که از ۵ UTR منومر کاملا یکسان تشکیل-شده‌است. هر منومر آن از۲۷۰ نوکلئوتید و۶۹ اسید آمینه و وزن ملکولی حدود ۷/۷ kDa دارد. هر منومر از یک مارپیچ آلفا(α helix) و ٦ صفحه β (β sheet) تشکیل‌شده که تاخوردگی بسیار شبیه CTxB دارد. این ۵ منومر به-طریقی تاخوردگی پیدامی‌کنند که صفحات β در سطح خارجی و مارپیچ‌های آلفا در داخل قرارمی‌گیرند و ساختار حلقه‌مانندی را تشکیل‌می‌دهند. مطالعات اخیر نشان‌داده است که برخلاف گذشته که دانشمندان ناحیه‌ی STxB را قسمت کاملا غیرسمّی می‌پنداشتند، این قسمت دارای اندازه‌ی ناچیزی خاصیت سمّی می‌باشد. یعنی با اثر شکافتی بر DNA سلول هدف باعث القای آپوپتوز از طریق فعال‌کردن کاسپازهای ۳ ،٦ و۸ در مسیر اپوپتوز می‌گردد. از طرفی، باعث کاهش در بیان فاکتور حیاتی سلول‌های B(Blc-2) و افزایش بیان لیگاند القاءکننده‌ی اپوپتوز وابسته به TNF(TRAIL) می‌گردد که با آزادشدن یون‌های کلسیم از ER دنبال می‌شود. اثرات سمّی این قسمت، ناچیز و اتفاقی بوده‌است. به‌همین علت نادیده گرفته‌می‌شود و از آن به‌عنوان قسمت غیر سمّی یادمی‌شود. این ناحیه به کمک قسمت C ترمینال A2 به قسمت STxA با پیوند غیر کووالان متصل می‌گردد و باعث ورود این ناحیه به درون سلول می‌شود(۱، ٤).

پروتئین STxB به گیرنده‌ی سطح سلولی خود به-نام Gb_3 متصل می‌گردد که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود(۵). با این حال، مطالعات نشان‌داده‌است که بیان Gb_3 در سطح سلول‌های سرطانی انسان فراوانی بسیار زیادی دارد. پروتئین Gb3 بیان زیادی در سطح سلول‌های سرطانی مثل لنفوما، کارسینوماهای تخمدان، سینه و کلون دارد. همچنین این فراوانی در سطح سلول‌های دندریت (DC) انسانی و موش نیز دیده‌می‌شود(٦). کمپلکس stx/Gb3 به دستگاه گلژی و بعد به شبکه‌ی آندوپلاسمی می‌رود و پروتئین‌سازی را مهارمی‌کند(۷).

هرکدام از مونومرهای StxB دارای ۳ جایگاه پیوندی Gb3 است. یعنی ازنظر تئوری هر مولکول Stx می‌تواند به ۱۵ تا Gb3 متصل شود. به هر حال، تعامل بین Stx و Gb3 نیاز به ترکیبی از گونه‌های Gb3 با طول‌های متفاوتی از زنجیره اسید چرب در بخشی از ستون فقرات سرامید آنها دارد. بخش اسفنگوزین ستون فقرات سرامید معمولا ۱۸ کربن دارد. تعداد کربن در بخش اسید چرب بین ١٦ تا ٢٤ کربن (C_{16}-C_{24}) متفاوت است. بیشتر

گونه‌های Gb_3، شامل C_{24} اند، درحالی‌که بیشتر گونه‌های دیگر، شامل C_{22} اند (٤، ٥، ٨).

بیان بالای Gb_3 در بسیاری ازسرطان‌ها گزارش-شده‌است که استفاده از آن برای انتقال داروهای درمانی، در درمان هوشمند سرطان امکان‌پذیرمی‌باشد. توانایی سلول‌های سرطانی برای اتصال و یا محصورکردن StxB برای یک اثر درمانی کافی است. ساده‌ترین انتخاب برای درمان هوشمند سرطان‌ها با بیان بالای Gb3 این است که از holotoxin طبیعی استفاده‌کرد. نکته‌ی بسیار مهم آن است که این پروتئین توسط انسان قابل تحمل باشد. هدف از این مطالعه، تولید و تخلیص پروتئین STxB در باکتری E. coli و تزریق، تجویز نازالی و نانوالیاف حاوی پروتئین STxB در موش‌های سوری و سنجش تیتر آنتی-بادی آن‌ها و چالش موش‌های ایمن شده با شیگا توکسین E. coli O157:H7 بود.

مواد وروش‌ها

تهیه‌ی کاست ژنی stxB در pET28a(+)

کاست‌ژنی stxB در وکتور pET28a(+) تهیه-شد(٩). وکتوربیانی pET28a(+) دارای ژن stxB در سلول‌های مستعد E. coli سویه (stratagen) BL21(DE3) ترانسفورم شد. کلون‌های انتخابی به کمک PCR تاییدشدند.

بیان ژن stxB

از کشت شبانه‌ی کلون‌های جداسازی‌شده میزان ١٠٠ میکرولیتر به ٥ میلی لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن OD به ٠/٦ در طول موج ٦٠٠ نانومتر (برای به‌دست‌آوردن میزان رشد باکتری)، ماده‌ی القاءکننده‌ی پروموتر (IPTG) فرمنتاز با غلظت ١ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ٣ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌شد.

الکتروفورز SDS-PAGE

نمونه‌ها قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (SM0671) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ١٥ درصد با جریان ثابت ٢٥ میلی‌آمپر بود.

تاییدپروتئین‌های نوترکیب

برای تأیید پروتئین‌های نوترکیب بیان‌شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی ضد His-tag استفاده‌شد. عصاره‌ی سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه-گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین ١٩٢ میلی‌مولار، تریس ٢٥ میلی‌مولار، SDS ٠/١ درصد و متانول ٢٠ درصد و pH: ٨/٣) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل‌شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ٣٧ میلی‌مولار، KCl ٢/٧ میلی‌مولار، $Na_2HPO_4.7H_2O$ ٤/٣ میلی‌مولار، توین٢٠ درصد و٧/٢ pH:) حاوی ٥ درصد شیرخشک به‌مدت ١٦ ساعت در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد بلاک‌گردید. نمونه پس از سه بار شست شو با بافر PBST، به‌مدت یک ساعت با رقت ١/١٠٠٠٠ آنتی‌بادی ضد His-tag(ebcam) کانژوگه‌دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. درنهایت پس از سه بار شست شو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سوبسترا (بافر تریس ٥٠mM و pH:٧/٨ حاوی DAB٦mg، 10µl H_2O_2) استفاده‌شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولزی، واکنش با استفاده از H_2O_2 متوقف گردید(٩).

تخلیص پروتئین نوترکیب

پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NTA جداسازی و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ١٥ درصد الکتروفورز شد. غلظت پروتئین بیان‌شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA سیناژن) به‌عنوان استاندارد انجام‌گرفت(٩).

تهیه‌ی نانوالیاف کایتوسان

محلول ٧/٥ درصد نسبت وزنی کایتوسان در اسید استیک ١ درصد (حلال) تهیه و محلول پلی اتیلن اکساید به نسبت ١:٩ به محلول اضافه‌شد و یک شبانه روز در

دمای اتاق با چرخش ملایم حل‌گردید(۱۰). با درنظر گرفتن غلظت آنتی ژن، به نسبت ۱:۱ این آنتی‌ژن به محلول کایتوسان اضافه و سپس محلول به درون سرنگ‌های ۵ میلی لیتری واردشد. سرنگ‌های پرشده به درون سیستم الکتروریسی انتقال داده‌شد. نوک‌های سرنگ و جمع‌کننده‌ها به‌ترتیب متصل به قطب‌های آند و کاتد مولد الکتریسیته بودند. منبع تغذیه برای ولتاژ مثبت ۱۷KV تنظیم‌گردید. صفحه‌ی جمع‌کننده در۱۶سانتی متری سوزن قرارگرفت و به‌وسیله‌ی یک گیره به‌طور عمودی نگهداشته شد و پلیمر پس از الکتروریسی، جمع‌آوری-گردید. همه آزمایش‌های الکتروریسی در دمای اتاق انجام‌شد.

تولیدآنتی بادی علیه پروتئین STxB

به میزان ۲۰، ۱۵ و۱۰ میکروگرم از پروتئین STxB نوترکیب به‌صورت تزریقی همراه با ادجوانت فروند، نازالی بدون ادجوانت، همراه با نانوالیاف کایتوسان به-صورت نازالی و تزریقی و در چهار نوبت انجام‌شد. ادجوانت فروند کامل و ناقص با پروتئین نوترکیب به نسبت ۱:۱ مخلوط‌گردید. درنهایت از موش‌ها خون گیری و توسط آزمایش الایزا تیتر آنتی بادی آن اندازه‌گیری‌شد (۹-۱۱).

چالش حیوانات ایمن‌شده با عصاره سلولی E. coli سویه O157:H7

بعد از ایمن‌سازی حیوانات، به‌اندازه‌ی ۳۰۰ میکروگرم از عصاره‌ی سلولی E. coli سویه O157:H7 موش‌های شاهد تزریق‌شد. تا پنج برابر LD50 از این عصاره‌ی سلولی به موش‌های ایمن‌شده، تزریق و بعد از ۲/۵ روز نتایج آن مورد بررسی و حیوانات تا ۱۰ روز تحت نظر قرارگرفتند.

یافته‌ها

تأیید حضور ژن stxB توسط PCR مستقیم

پلاسمیدهای نوترکیب تهیه‌شده به باکتری E. coli BL21DE3 ترانسفورم‌شد. به‌منظور تایید حضور قطعه‌ی مورد نظر در وکتور بیانی pET28a(+) از واکنش PCR استفاده‌شد. دراین حالت ژن stxB که ۲۷۳جفت باز طول دارد، مشاهده‌می‌شود (شکل ۱).

بیان پروتئین STxB و تخلیص آن

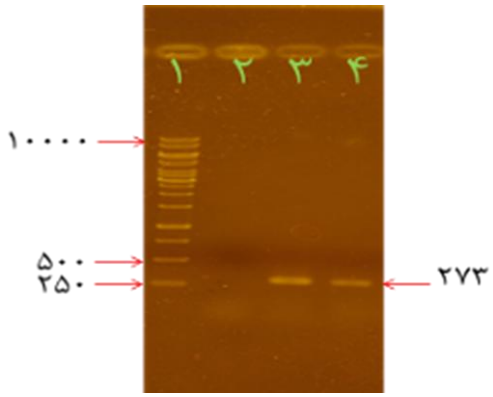
از کلنی انتخابی، کشت تهیه‌شد و پس از رسیدن به رشد کافی به‌منظور بیان پروتئین توسط IPTG ۱ میلی مولار القاء گردید و برای بررسی بیان و کیفیت آن روی ژل SDS-PAGE برده‌شد (شکل ۲). باند پروتئینی مدّ نظر در جایگاه صحیح ۱۱/۳ کیلودالتونی قرارگرفت، در حالی که در کنترل‌ها هیچ باندی دیده نشد. پروتئین حاصل تحت شرایط دناتوره، با استفاده از ستون میل ترکیبی Ni-NTA پس از شست و شو با بافرهای شست و شودهنده، جداسازی و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورزشد. غلظت پروتئین بیان‌شده به‌کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به-عنوان استاندارد انجام گرفت. میزان غلظت پروتئین ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر (µgr/ml) ارزیابی‌شد.

آنالیز وسترن بلاتینگ با آنتی بادی ضد His-tag

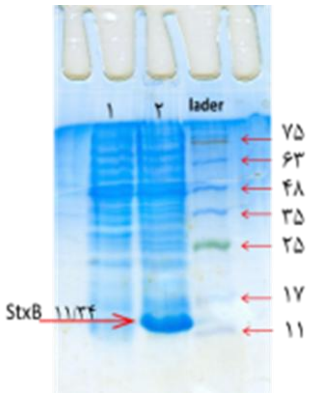
بیان پروتئین STxB به‌دلیل داشتن توالی His-tag و به‌کمک وسترن بلات و به‌کارگیری آنتی‌بادی علیه His-tag (Qiagen, Germany) تائید شد و باند وسترن در جایگاه صحیح مدّنظر قرارگرفت، اما در ستون کنترل هیچ باندی دیده نشد (شکل ۳).

تصویر برداری SEM

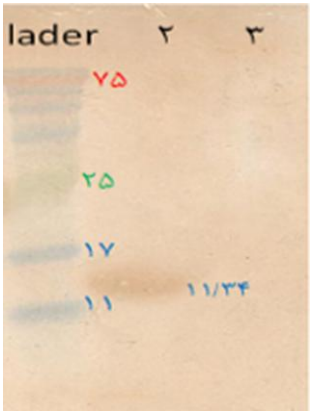
نانوالیاف کایتوسان دربرگیرنده‌ی آنتی‌ژن STxB به‌وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی عکس‌برداری‌شد. درمیان تکنیک‌های تولید نانوالیاف، الکتروریسی به‌دلیل سادگی و هزینه‌ی کم برای تولید نانوالیاف مورداستفاده قرارگرفت. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محلول پلیمر مانند ویسکوزیته، رسانایی الکتریکی و غلظت پلیمر به-شدت می‌تواند شکل‌گیری و شکل الیاف الکتروریسی‌شده



شکل ۱: محصول PCR ژن‌ها روی ژل آگاروز ۱ درصد. ستون۱: نشانگر مولکولی ۱۰۰۰۰bp. ستون ۲: وکتوری که قطعه ژنی را ندارد. ستون۳ و ٤: باند ۲۷۳ bp حاصل از PCR ژن stxB



شکل۲: بیان پروتئین STxB: ستون اول: نمونه کنترل بدون IPTG، ستون دوم: بیان پروتئین STxB دارای وزن مولکولی ۱۱/۳ kDa با IPTG ستون سوم: مارکر پروتئینی



شکل ۳: آزمایش لکه گذاری وسترن. ستون ۱: مارکر پروتئینی، ستون ۲: نمونه بیانی StxB، ستون ۳: نمونه کنترل StxB بدون IPTG

را تحت‌تاثیرقراردهد. پیچیدگی اصلی الکتروریسی، انحلال‌پذیری ضعیف کایتوسان و ویسکوزیته‌ی بالای محلول مائی آن است. الکتروریسی کایتوسان و پلیمرهای طبیعی دیگر به‌دلیل رفتار مخصوص محلول این پلیمر، ویژگی پلی‌کاتیونی، وزن مولکولی بالا و توزیع وزن مولکولی وسیع آن، یک فرایند پیچیده است. بنابراین، پارامترهای کنترل الکتروریسی مانند قطر داخلی سوزن، فاصله‌ی نوک تا جمع‌کننده، ولتاژ میدان الکتریکی و مقدار تغذیه‌ی همگی اثر قابل توجهی را بر قابلیّت ریسندگی و کیفیت محصول دارند. همان‌طورکه در شکل (٤) میکروسکوپ الکترونی مربوط به محلول کایتوسان الکتروریسی شده با پروتئین مشاهده‌می شود، هنگامی که پروتئین به محلول ویسکوز کایتوسان اضافه‌می‌گردد، ویسکوزیته محلول پایین آمده و اشکالی در الیاف به‌صورت گره ظاهر می‌گردد.

تعیین تیترآنتی‌بادی تولیدشده با استفاده از تکنیک الایزا

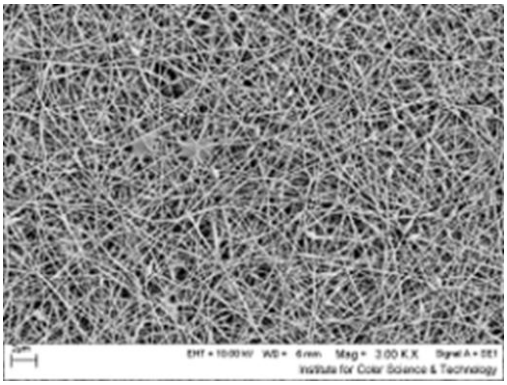
روش الایزا برای تعیین تیترآنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب در سرم موش‌شده مورد استفاده قرارگرفت. با بررسی نمودار ۱، نتایج حاصل از آزمایش الایزا با پروتئین نوترکیب و نانوالیاف کایتوسان به‌صورت نازالی و تزریقی نشان‌می‌دهد که پس از هر مرحله از تجویز و تزریق افزایش تیترآنتی‌بادی در مقایسه با کنترل قابل توجه‌می‌باشد. بالاترین OD به‌دست‌آمده از تست در مقایسه با کنترل تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد. این نتیجه بیانگر این است که این پروتئین قدرت تولید آنتی‌بادی به‌صورت نازالی و تزریقی به‌میزان لازم را دارد و انتظار ایمنی‌زایی از آن متصوّر است و استفاده از پروتئین نوترکیب و نانوالیاف کایتوسان به‌صورت نازالی تولید آنتی‌بادی در موش ها ایجاد نشده است.

جدول ۱: تجویز نازالی یا تزریق زیرجلدی آنتی ژن به موش

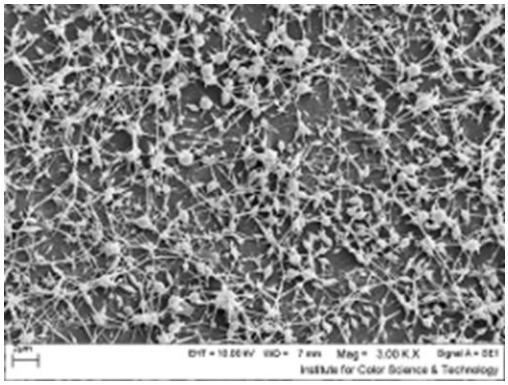
شماره تزریق	روز تجویز یا تزریق	مقدار آنتی ژن و روش تزریق		
		زیر جلدی	نازال بدون ادجوانت	نازال نانوالیاف کایتوسان
۱	۱	۲۰ µg	۲۰ µg	۲۰ µg
۲	۱٤	۱۵µg	۱۵µg	۱۵µg
۳	۲۸	۱۰µg	۱۰µg	۱۰µg
٤	٤۲	۱۰µg	۱۰µg	۱۰µg

جدول ۲: نتایج چالش گروه‌های موشی با عصاره سلولی باکتری E.coli O157:H7

گروه موشی	نوع تجویز	میزان عصاره سلولی تزریق شده	میزان تحمل	مقایسه گروهها	مقایسه آماری
STxB با ادجوانت فروند	زیرپوستی	۱۵۰۰µg	زنده	۲و۱	P<0/001
ادجوانت فروند+PBS	زیرپوستی	۳۰۰µg	مرد		
STxB بدون ادجوانت	نازال	۱۵۰۰µg	زنده	۶و۵و٤با۳	P<0/001
PBS	نازال	۳۰۰µg	مرد		
STxB نانوالیاف کایتوسان	نازال	۳۰۰µg	مرد	۶با۵	n.s
نانوالیاف کایتوسان	نازال	۳۰۰µg	مرد		



الف



ب

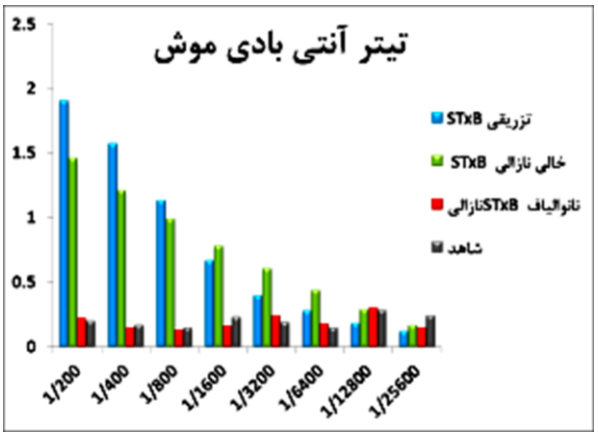
شکل٤: تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از نانوالیاف حاوی STxB: الف) نانوالیاف کایتوسان. ب) نانوالیاف کایتوسان دربرگیرنده پروتئین نوترکیب STxB.

چالش موش‌ها با استفاده از عصاره سلولی حاوی شیگا توکسین

به‌منظور انجام چالش‌های مورد نظر، در هر گروه ۵ سر موش با غلظت ۵ برابر LD50 مورد چالش قرارگرفتند که حیوانات ایمن‌شده قادر به تحمل شیگا توکسین با غلظت‌های فوق بودند و درمدّت ۵۰ روز، زنده و سالم ماندند. همان‌طوری‌که که نتایج آماری نشان‌می‌دهد گروه‌های نازالی و تزریقی STxB با گروه STxB نانوالیاف کایتوسان اختلاف معناداری با همدیگر دارند.

بحث

درطی سی‌سال گذشته، شیگلا دیسانتری تیپ ۱ به‌صورت پاندمیک درکشورهای آمریکای مرکزی، آسیای جنوبی شرقی و مرکزی و آفریقای جنوبی گزارش‌شده‌است. شیوع شیگلا در ایران، نشان‌می‌دهد که تاچند سال پیش شیگلا فلکسنری، بیشترین شیوع را در ایران دارا بوده‌است. در رتبه‌های بعدی به‌ترتیب شیگلا سونئی و شیگلا دیسانتری قراردارند و مقدار کمی شیگلا بوئیدی مشاهده‌شده‌است. اما مطالعات جدید نشان از شیوع بیشتر شیگلا سونئی درمقابل شیگلا فلکسنری می‌دهد. تقریباً همین ترتیب شیوع شیگلا درکشورهای همسایه‌ی ایران (عربستان و پاکستان) نیز گزارش‌شده‌است(۱۱) باتوجه به گزارش‌های محققان ایرانی مبنی بر فراوانی وقوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکیشیگلا، این باکتری می‌تواند به‌عنوان یک سلاح بیولوژیک موردتوجه قرارگیرد و یا ممکن‌است از سمّ شیگا به‌صورت آئروسل استفاده‌گردد(۱۲).



نمودار ۱: تیتراسیون سرم موش

توکسین STx می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروتوکسیک خطرناکی را ایجادنماید. زیر واحد STxB به‌عنوان یکی از کاندیداهای مهم ساخت واکسن علیه شیگلا دیسانتری و شیگا توکسین و اشرشیا کلی O157 مطرح است. با تولید آنتی بادی علیه این زیر واحد (STxB) می‌توان با جلوگیری از اتصال سمّ شیگا توکسین مانع از ورود قسمت سمّی (STxA) به درون سلول و مانع اثرات مخرب آن شد. در رابطه با ژن stxB درسراسر جهان، مطالعات و بررسی‌های گوناگونی به‌عمل‌آمده، ژن نامبرده در موجودات مختلفی از E.coli گرفته تا انواع گیاهان نیز همسانه‌سازی‌شده‌است. به‌علت شباهت ساختاری زیر واحد سمّیSTx با همتای آن در باکتری اشرشیا کلی(EHEC)؛ یعنی SLT، در تحقیقات، یک هدف مشترک از این همسانه‌سازی‌ها درنظر محققان دنبال می‌شد و آن هدف، ایمنی‌زایی مؤثر علیه هر دو عامل شیگلا و اشرشیا کلی می‌باشد.

یکی از راه‌های ایمنی‌زایی در بدن، واکسن‌های خوراکی و نازالی است. به‌منظور تقویت اثر واکسن‌های خوراکی دانشمندان توجه خاصی به ادجوانت‌ها یا یاورها و نانو واکسن‌ها دارند. ادجوانت‌ها، ترکیباتی هستند که با اثراتی که بر سیستم ایمنی دارند، سبب تشدید پاسخ‌های ایمنی می‌شوند. امروزه، ادجوانت‌های زیادی کشف‌شده که از معروف‌ترین آن‌ها می‌توان به ادجوانت کامل فروند و ادجوانت ناقص فروند و هیدروکسید آلومینیوم، PLGA، MCM، کایتوسان و غیره اشاره‌کرد. تقویت ایمنی و ویژگی‌های ادجوانتی زیر واحدهای B بعضی از توکسین‌ها مثل STB،CTB،LTB،RTB و غیره، امروزه به‌طور گسترده در مطالعات اخیر گزارش‌شده‌است. استفاده از STxB به‌تنهایی برای ایمنی‌زایی، از قدرت کافی تحریکِ پاسخِ ایمنی برخوردار نیست(۱۳).

ایمنی‌زایی خوراکی STxB فیوژشده با ویروس NSP490 (۱٤) و STx1B به‌همراه توکسین کلرا به‌صورت اینترانازال در موش Balb/c به اثبات‌رسیده‌است(۱۵). به‌منظور افزایش ایمنی‌زایی مخاطی علیه STxB تلاشی انجام‌شد که درطی آن پروتئین تخلیص‌شده STxB را به‌کمک میکروسفرهای لیپیدی سنتتیک به‌صورت نازال تلقیح‌کردند که نتایج آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی را نشان‌می‌داد(۱٦). واکسن خوراکی گیاهی با انتقال ژن زیر واحد A غیرفعال‌شده از STx2، درگیاه تنباکو (NT1) برای حفاظت در برابر مسمومیّت سیستمیک توسط شیگاتوکسین نوع ۲ ساخته‌شده‌بود و دارای تیتر آنتی‌بادی IgG و IgA بود (۱۷). تلاش برای ساخت یک واکسن نازال (دماغی) ازطریق خالص‌سازی پروتئین STxB و تلقیح آن صورت پذیرفت. چون ایمنی‌زایی علیه STxB ضعیف گزارش‌شده‌بود و آنتی بادی ضد STxB هنوز نتوانسته به‌تنهایی ایمنی‌زایی خوبی ایجادکند، لذا به‌منظور ایجاد ایمنی مخاطی این تلاش صورت‌گرفت. این کار تولید آنتی‌بادی را به سمت آنتی‌بادی‌های مخاطی شیفت داد(۱۳). از STxB به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ی پاسخ ایمنی علیه STxA به‌منظور بررسی ایمنی‌زایی علیه شیگلا و اشرشیاکلی(EHEC) استفاده‌شد که نتیجه‌ی آن به‌شکل افزایش پاسخ ایمنی و تحریک تولید IFN خود را نشان‌داد(۱۸). واکسن نازالی زیرواحد B از شیگاتوکسین۲و۱ به‌صورت مخلوط با بر چسب حرارتی تغییریافته انتروتوکسین (MLT) برای حفاظت درمقابل شیگاتوکسین ۱ و ۲ تهیه‌شد که دارای تیترآنتی بادی خوبی بود و باعث مقاوت و ایمنی‌شده بود. ایمن‌سازی توسط واکسن

اینترانازال (داخل بینی) با پروتئین Stx2B-TIR-Stx1B-Zot منجر به کاهش خون‌ریزی در بزغاله پس از چالش با باکتری‌های اشرشیاکلی O157: H7 شد (۱۹). برای تحویل آنتی‌ژن ازطریق بینی و دهان، از نانوالیاف و نانوذرات چسبنده به موکوس که با سلول‌های اپیتلیال برهم‌کنش داشته و امکان افزایش جذب آنتی‌ژن را فراهم-می‌سازند، استفاده‌می‌شود (۲۱، ۲۰).

به‌منظور بررسی پاسخ سیستم ایمنی هومورال پروتئین نوترکیب STxB، این پروتئین به‌روش نازال و تزریقی بدون ادجوانت و نیز به‌همراه ادجوانت فروند و به شکل نانوالیاف کایتوسان به موش سوری تجویز و بعد از خون‌گیری تیترآنتی بادی (IgG) سرمی بررسی‌شد. جهت به چالش‌کشیدن و بررسی قدرت حفاظت‌کنندگی آنتی بادی تولیدشده، ایمنی‌زایی برروی موش صورت پذیرفت. باتوجه به گزارش‌های شیوع شیگلا در ایران و بادرنظرگرفتن همولوژی بالا در گونه‌های STx و همچنین مطالعات مشابه انجام‌شده در این مرکز، به‌جای استفاده از "شیگا توکسین" برای به چالش‌کشیدن موش‌ها، از سم E. coli O157:H7 استفاده‌شد. باتوجه به نمودارهای تیترآنتی‌بادی و نتایج چالش موش‌ها، چنین نتیجه‌می‌گیریم که روش الکتروریسی و نانوالیاف دربرگیرنده‌ی پروتئین نوترکیب STxB را نمی‌توان برای ساخت واکسن نازالی استفاده‌کرد. افزایش تیترآنتی‌بادی IgG علیه پروتئین STxB، در حالت تزریقی و نازالی مشاهده‌شد، ولی درحالت نازالی برای نانوالیاف حاوی پروتئین STxB مشاهده‌نشد که ممکن‌است علت آن عدم جذب آنتی‌ژن توسط سلول‌های اپیتلیالی بینی موش و یا تغییر ساختار پروتئین نوترکیب طی ستنز نانوالیاف به‌روش الکتروریسی باشد. در روش تجویز خوراکی آنتی‌ژن نانوذره‌ای، در ابتدا باید به موش‌ها هیدروکسیدآلومینیوم خورانده شود تا هم pH اسیدی معده خنثی‌گردد و هم ساختار کپسول‌های کایتوسانی حفظ شود تا بدین‌وسیله آنتی‌ژن از pH اسیدی معده و همچنین آنزیم تریپسین درامان باشد و درنهایت جذب سلول‌های اپیتلیالی روده شود. در روش نازالی، آنتی‌ژن بدون هیچ‌گونه ادجوانتی تجویز می‌شود و در روش تزریقی، به‌دلیل تیترآنتی‌بادی بالا و تحمل موش ایمن‌شده دربرابر عصاره‌ی حاوی شیگاتوکسین و همچنین مقرون به‌صرفه‌بودن ازنظر اقتصادی و زمان تهیه، می‌تواند به‌عنوان یک کاندیدای واکسن مناسب مدنظر باشد.

تشکر و قدردانی

از تمامی استادان، پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین(ع)، که در به‌نتیجه‌رسیدن و اتمام این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable. Toxins. 2010;2(7):1612-45.
2. Sandvig K, Bergan J, Dyve AB, Skotland T, Torgersen ML.Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin.Toxicon. 2010;56(7):1181-5.
3. Johannes L, Römer W. Shiga toxins from cell biology to biomedical applications. Nat Rev Microbiol. 2010; 8(2):105–16.
4. Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications, Toxicon. 2005; 4594):389–93
5. Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, van Effenterre D. Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites. Biol Cell. 2008;100(12):717-25.
6. Janssen KP, Vignjevic, Boisgard R, Falguie T, Bousquet G, Decaudin D,Dollé F, Louvard D, Tavitian B, Robine S, et al. In vivo Tumor Targeting Using a Novel Intestinal Pathogen-Based Delivery Approach.Cancer Res. 2006; 66: (14): 7230-6.
7. Torgersen ML, Wälchli S, Grimmer S, Skånland SS, Sandvig K. rotein kinase Cdelta is activated by Shiga toxin and regulates its transport. J Biol Chem. 2007;282(22):16317-28.

8. Sanglier S, Atmanene C, Chevreux G, Dorsselaer A. Nondenaturing Mass Spectrometry to Study Noncovalent Protein/Protein and Protein/Ligand Complexes: Technical Aspects and Application to the Determination of Binding Stoichiometries.Methods Mol Biol. 2008; 484: 217-43.
9. Madanchi H, Honari H, Hesaraki H, Sayadnanesh A. Cloning and expression of stxB gene from shigella dysenteria typeI in E. coli Rosseta DE3.Genetics in the 3rd millennium. 2012;1:2641-7. [Persian]
10. Homayoni H, Hosseini Ravandi SA, Valizadeh M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. Carbohydrate Polymers. 2009; 77(3): 656–61.
11. Ranjbar R, Soltan dallal MM, Pourshafie MR, Aslani MM, Majdzadeh R. Serogroup Distribution of Shigella spp in Tehran. Iranian Journal of Public Health. 2004; 33(3):32-5.
12. Ranjbar R, Haghi-Ashtiani MT, Jonaidi Jafari N, Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. Iranian J Publ Health. 2009; 38(2): 134-8.
13. Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Shimizu T, Taniguchi K, Noda M, Neri P, 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(17):2092-9.
14. Choi NW, Estes MK, Langridge WH. Oral immunization with a shiga toxin B subunit:rotavirus NSP490 fusion protein protects mice against. Vaccine. 2005; 23(44): 5168–76.
15. Imai Y, Ishikawa T, Tanikawa T, Nakagami H, Maekawa T, Kurohane K. Production of IgA monoclonal antibody against Shigatoxin binding subunits employing nasal-associated lymphoid tissue. J ImmunolMethods. 2005; 302(1-2):125–35.
16. Kurohane K, Kobayashi C, Imai Y. Facilitated production of secretory IgA against Shiga toxin B subunits by intranasal application of antigen-coated polystyrene microspheres.Microbiol Immunol. 2005;49(2):149-54.
17. Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:7082-7.
18. Oloomi M, Bouzari S, Ajdary S. Immune responses of mice immunized with active recombinant shiga toxin and its derivatives. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2008;7(2):53-60.
19. FujiiJ, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly D, Yamada T, Kobayashi H, Yoshida SI,Obrigg T. Protection by a Recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Vaccine Expressing Shiga Toxin 2 B Subunit against Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Mice.Clin Vaccine Immunol. 2012;19(12),1932-7.
20. Soane RJ, Frier M, Perkins AC, Jones NS, Davis SS, Illum L. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans.Int J Pharm. 1999;178(1):55-65.
21. Bacon A, Makin J, Sizer PJ, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Illum L, Chatfield S, Roberts M. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. Infect Immun. 2000;68(10):5764-70.

Immunogenicity Investigation of recombinant proteins (StxB) of Shigella dysenteriae type 1 in mice

Hossein Honari.,
Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

Mahdi Baranvand.,
Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

Mohammad Ebrahim Minaei.,
Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

Received:11/07/2014**, Revised:**02/08/2014**, Accepted:**09/09/2014

Corresponding Author:
Hossein Honari,
Imam Hossein University, Tehran, Iran
E-mail:Honari.hosein@gmail.com

Abstract

Background: Shigellosis is an acute intestinal infection from Shiga toxin and Shiga-like toxin, which is caused by Shigella and enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) and entrotoxinogenic Escherichia coli (ETEC). The disease has a high prevalence rates in the world and is known as a bioterrorist agent. STxB is a part of Shiga toxin and have the property of immunogenicity.

Materials and Methods: In this experimental study, the vector pET28a (+) containing the stxB gene was used and was transformed into E. coli BL21 DE3. The bacteria were grown on antibiotic medium and were confirmed with direct PCR, protein expression and SDS-PAGE gel. The recombinant protein purified by nickel column and was confirmed with SDS-PAGE gel and immunoblotting. The chitosan nanofibers containing STxB protein were synthesized by the electrospinning device. The Intranasal and injectable prescription of STxB protein and nanofibers containing STxB protein were performed in mice for four consecutive times and their Antibody titer were assessed. By ELISA, increased IgG antibody titers were observed in injectable and nasal view mode, which may not capture antigen by nasal epithelial cells in mice.

Results: By ELISA, The increase in IgG antibody titers was observed in injectable and intranasal states but not in naonnasal one, which may be due to the lack of antigen captured by nasal epithelial cells in mice. Immunized mice were able to tolerate five times of the Shiga toxin LD_{50} of E. coli O157: H7.

Conclusion: The results of this study indicate that with nasal and injection prescribed of STxB protein, the immunized mice can tolerate E. coli O157: H7 Shiga toxin.

Key words: *Cloning, Immunization, Protein expression, Recombinant proteins, Shigella dysenteriae Type1*