

مقایسه اثر ایمنی زایی پروتئین های نو ترکیب EIT و Stx2B متصل به نانو ذرات بر پایه کیتوزان در مدل حیوانی به عنوان کاندیدای نانواکسن بر علیه *E. coli* O157:H7

ژاله خنیفر^۱، علی هاتف سلمانیان^{۲*}، رضا حاجی حسینی^۳، جعفر امانی^۴، روح الله کاظمی^۵

مقاله پژوهشی

مقدمه: باکتری *E. coli* O157:H7 پاتوژن مشترک بین انسان و دام و ایجاد کننده سندرم اورمی همولیتیک (HUS) و اسهال حاد در انسان می باشد که به دلیل قابلیت لانه‌گزینی سریع در دستگاه گوارش انسان حائز اهمیت است. یکی از راه کارهای مقابله و پیشگیری در برابر این بیماری ها بکارگیری نانواکسن های حاصل از آنتی ژن های نو ترکیب فاکتورهای بیماری زای این باکتری می باشد. در این تحقیق پروتئین های نو ترکیب EIT (EspA, Intimin, Tir) و Stx2B با نانو ذرات کیتوزان انکپسوله و در دو گروه EIT همراه Stx2B و بدون آن به موش های BALB/c تلقیح شدند و میزان ایمنی زایی ارزیابی و مقایسه شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی پروتئین های نو ترکیب EIT و Stx2B پس از بیان و خالص سازی با روش ستون نیکل و تأیید با وسترن بلائینگ، با نانو ذرات کیتوزان به روش ژلاسیون یونی نانوپارتیکله شدند. پس از واکسیناسیون آنتی بادی های سرمی و مدفوعی ضد rEIT و rStx2B با استفاده از الیزا ارزیابی و مقایسه شد. چالش ریزش مدفوعی باکتری با نرم افزار Excel و میزان محافظت موش ها بر علیه سم این باکتری بر اساس تست دقیق فیشر مورد آزمایش قرار گرفت.

نتایج: میزان IgG سرمی و IgA مدفوعی موش ها اندازه گیری و مقایسه شد. ایمنی مطلوب تری در گروه های واکسینه شده خوراکی- تزریقی با مخلوط دو آنتی ژن نانوپارتیکله به دست آمد. محافظت حیوانی در برابر سم فقط در گروه های واکسینه rEIT همراه با rStx2B مشهود بود. سطح اختلاف معنی دار بین این گروه ها و کنترل مشهود بود ($P < 0.05$).
نتیجه گیری: شواهد نشان می دهد از پروتئین نو ترکیب rEIT همراه با rStx2B متصل به نانو ذرات کیتوزان می تواند مقابله مؤثرتری از طریق جلوگیری از اتصال باکتری و خنثی سازی سم حاصل از آن داشته باشد.

واژه های کلیدی: پروتئین نو ترکیب، کیتوزان، نانواکسن، ایمنی زایی، *E. coli* O157:H7

ارجاع: خنیفر ژاله، سلمانیان علی هاتف، حاجی حسینی رضا، امانی جعفر، کاظمی روح الله. مقایسه اثر ایمنی زایی پروتئین های نو ترکیب EIT و Stx2B نانوپارتیکله بر پایه کیتوزان در مدل حیوانی به عنوان کاندیدای واکسن بر علیه *E. coli* O157:H7. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۱۰): ۴۴-۸۳۲.

۱- دانشجوی دکتری، گروه آموزشی زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- استاد، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۳- استاد، گروه آموزشی زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده سیستم بیولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران، ایران

۵- دکتری، گروه آموزشی مولکولی، شرکت ژن سبز، ایران

نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۶۵۶، پست الکترونیکی: salman@nigeb.ac.ir کد پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱

رابطه با استفاده از حاملین کلونیدی برای اثر بخش تر بودن آنتی ژن ها به منظور تولید ایمنی بیشتر صورت گرفته است. از این گروه کیتوزان با خواص ادجوانتی خود مزایای بیشتری نسبت به سایر حامل های کلونیدی دارد (۹). استفاده از آن نه تنها باعث محافظت آنتی ژن ها خواهد شد بلکه با رهایش آهسته و هدمند در عرضه آن ها به بدن، پاسخ ایمنی مؤثرتری ایجاد خواهد شد (۱۰). در این تحقیق پروتئین های نوترکیب rStx2B و rEIT پس از تهیه به صورت نوترکیب و خالص سازی به روش ژلاسیون یونی توسط نانو ذرات مبتنی بر کیتوزان شدند، سپس این کاندیداهای نانو واکسن به روش های خوراکی، خوراکی- تزریقی و تزریقی به موش های BALB/c تجویز شدند و میزان ایمنی زایی آن ها در برابر عفونت های چندگانه حاصل از *E. coli* O157:H7 مورد سنجش قرار گرفت. با چالش سم این باکتری میزان مصونیت موش ها در مقابله با سم Stx2 و هم چنین با چالش آلودگی آن ها با باکتری *E. coli* O157:H7 میزان ریزش مدفوعی باکتری در موش های ایمن شده کنترل و بررسی شد.

روش بررسی

بر اساس مطالعات تجربی و آزمایشگاهی برای بیان پروتئین های نوترکیب پلاسمیدهای pET28a حاوی ژن های نوترکیب *eit* (۱۶۸۰ جفت باز) و *stx2B* (۲۱۰ جفت باز) از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شد سپس با استفاده از روش PCR، با پرایمرهای عمومی T₇ و پرایمرهای اختصاصی به ترتیب برای *eit* و *stx2B* حضور ژن ها تایید شد. ترانسفورماسیون وکتورهای حاوی ژن *eit* و *stx2B* به سلول های مستعد *E. coli* BL21(DE3) تیمار شده با کلسیم کلرید به روش شیمیایی انجام شد و در محیط کشت LB جامد حاوی کانامایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، کلنی های مورد نظر انتخاب و جهت بررسی بیان ژن، در محیط کشت LB مایع حاوی کانامایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تلقیح شدند. سپس القای بیان در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر (OD معادل 0.8) با استفاده از IPTG (ایزو پروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید) یک میلی مولار در انکوباتور شیکردار

باکتری اشرشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) سویه O157:H7 یکی از پاتوژن های مهم ایجادکننده کولیت هموراژیک و سندرم همولیتیک اورمیک در انسان می باشد. اصلی ترین مخزن این باکتری در روده دام های اهلی است که می تواند عفونت های شدیدی را از طریق غذا و آب ها آلوده در انسان ایجاد کند (۱). شیوع اسهال حاد ناشی از سویه ها اشرشیاکلی در سراسر جهان به خصوص در مناطقی که از سطح بهداشت پایین تری برخوردارند بسیار بالا است و از عوامل مهم مرگ و میر به خصوص در کودکان می باشد (۲). دانشمندان به منظور پیش گیری و درمان بر علیه بیماری های حاصل از *E. coli*: O157:H7 در زمینه تولید واکسن های مرتبط با آن تحقیقات زیادی انجام داده اند (۳). با ابداع روش های مهندسی ژنتیک و استفاده از واکسن های نوترکیب دیگر نیازی به استفاده از کل پیکره پاتوژن به عنوان واکسن وجود ندارد بلکه به منظور کاهش خطرات واکسن های عمومی از ژن های به خصوص و بیان آن ها برای تولید این واکسن ها استفاده می شود (۳). اتصال این باکتری در لوله گوارش بواسطه یک سری از عوامل تحت کنترل جزایر بیماریزایی حاوی ژن های تهاجم /اتصال (Attaching/Effacing) و سیستم ترشحی تیپ III و IV می باشد. سیستم ترشحی نوع III در ترشح پروتئین های مختلف از جمله Tir و EspA و EspB و EspD نقش دارد. (۷) EspA, Intimin, Tir سه پروتئین مهم در اتصال باکتری به سطح سلول های پوششی روده هستند، که با مقابله از اتصال آن ها در مراحل اولیه ورود باکتری، می توان از کلونیزاسیون باکتری جلوگیری کرد (۴). محققین با انتخاب قسمت های مؤثر از پروتئین های مذکور و متصل کردن آن ها به یکدیگر توانستند کاندیدای مناسبی جهت واکسیناسیون برای ایجاد ایمنی زایی بیشتر ارائه دهند (۵،۶،۷). هم چنین به منظور خنثی سازی توکسین شبه شیگا نوع ۲ (STX2) از این باکتری، محققین توانسته اند با استفاده از بخش چسبنده و غیرسمی زیر واحد اتصالی B این توکسین کاندیدای واکسن مناسبی تهیه کنند (۸). از طرفی مطالعات زیادی در

قرار گرفت. ایجاد کدورت در محل نشان‌دهنده تشکیل هیدروژناسیون کیتوزانی است که قابلیت انکپسوله کردن ترکیبات را به همراه دارند، سپس محلول کلئیدی به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار 4 درجه، با سرعت ۱۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصله جهت آماده‌سازی و تجویز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تمام این مراحل مجدداً برای تهیه آنتی‌ژن نانوپارتیکله rStx2B بکار گرفته شد.

تعیین درصد بارگذاری و تعیین سایز آنتی‌ژن‌ها در نانو پارسیکل کیتوزان

پس از جدا نمودن محلول رویی از رسوب کلئیدی، غلظت پروتئین نو ترکیب موجود در محلول رویی به روش برادفورد سنجش شد و بر اساس فرمول زیر درصد بارگذاری آنتی‌ژن در نانو پارسیکل محاسبه گردید.

$$\text{درصد بارگذاری (\%)} = \frac{\text{غلظت آنتی‌ژن در محلول رویی} - \text{غلظت کل آنتی‌ژن در محلول}}{\text{غلظت کل آنتی‌ژن در محلول}} \times 100$$

اندازه نانو پارسیکل‌ها در دانشگاه بقیه الله اعظم توسط دستگاه زتاسایزر Malvern تعیین شد. این دستگاه اندازه، پتانسیل زتا و وزن مولکولی نانوذرات را با اندازه‌گیری حرکت براونی ذرات موجود در یک نمونه و با استفاده از پراش نور دینامیکی (DLS Dynamic light Scattering) تعیین می‌نماید.

ایمن سازی حیوان مدل با نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی‌ژن
تعداد ۴۰ سر موش ماده BALB/c با سن ۶-۷ هفته‌ای از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید و مطابق با پیشنهادات راهنمای مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی از سازمان ملی بهداشت همراه با تسهیلات مراقبتی در پژوهشگاه ملی ژنتیک نگهداری شدند. موش‌ها به سه گروه از دسته‌های ۵ تایی برای ایمن‌سازی به روش خوراکی، خوراکی تزریقی، تزریقی و نیز دو گروه کنترل تقسیم شدند. مطابق جدول ۱ در گروه اول (A) از هر دو آنتی‌ژن rEIT و rStx2B و در گروه دوم (B) فقط از آنتی‌ژن rEIT بدون rStx2B استفاده شد. موش‌ها در زیر گروه A1 و B1 نانوذرات کیتوزان همراه با آنتی‌ژن‌های مزبور را به صورت خوراکی و در زیر گروه A 2 و B 2، در سه نوبت آنتی‌ژن‌های نانوپارتیکله را به صورت خوراکی و در نوبت چهارم آنتی‌ژن خالص را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

با شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه انجام شد. برای بهینه‌سازی شرایط بیانی - نمونه برداری در ۲ و ۴ و ۸ و ۲۴ ساعت بعد از القا انجام و نمونه‌های پروتئینی با استفاده از روش SDS-PAGE با ژل ۱۲ درصد آکریل‌آمید بررسی گردید.

تأیید بیان پروتئین‌ها با روش وسترن بلاتینگ (W.blotting)

در این روش از آنتی‌بادی Anti His tag و کونژوگه با HRP (Horse Radish Peroxidase) استفاده شد. پروتئین‌های rEIT و rStx2B در نمونه‌های مورد آزمایش و نیز کنترل منفی (بدون القا) توسط SDS-PAGE با ژل آکریل‌آمید ۱۲٪ جداسازی و سپس به غشاء PVDF منتقل گردید. پس از قرار گرفتن این غشا در بافر مسدودکننده (محلول ۳ درصد شیر بدون چربی) به مدت دو ساعت، توسط بافر PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBS/T) شسته شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت. سپس ۳ بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با بافر PBS /T شستشو شد. برای آنتی‌بادی Anti His tag، محلول DAB (3,3'-diamino benzidine) روی غشای PVDF ریخته شد و پس از ظهور باندها، مهار واکنش با شستشوی آب مقطر انجام گرفت. پس از تأیید، پروتئین‌های خالص شده به عنوان آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه نانوذرات کیتوزان

برای تهیه نانوذرات کیتوزان از روش ژلاسیون یونی استفاده شد (۲۰،۲۲). ماده (TPP) سدیم‌تری‌پلی‌فسفات پلی‌آنیونی است که می‌تواند به دلیل گروه بار منفی فسفات از طریق نیروهای الکترواستاتیکی با گروه باردار مثبت آمینی کیتوزان به عنوان پلی‌کاتیون اتصالات عرضی برقرار کند. به 7/5 میلی لیتر محلول کیتوزان با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر در اسیداستیک ۲٪/۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی‌ژن rEIT قطره قطره طی ۱۵ دقیقه اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید. سپس pH محلول در ۵/۵ تنظیم شد. سپس ۵ میلی لیتر TPP با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر به آرامی به مخلوط اضافه گردید و یک ساعت بر روی هم‌زن مغناطیسی در دمای اتاق

آنتی‌ژن‌ها را به صورت خوراکی دریافت کردند. میزان دز تزریقی، ۳۰ میلی‌گرم آنتی‌ژن خالص و میزان دز خوراکی، ۲۰۰ میلی‌گرم آنتی‌ژن نانوپارتیکله به ازای هر موش (جدول ۱) در نظر گرفته شد. به منظور برطرف کردن حساسیت نانوذرات کیتوزان نسبت به شرایط اسیدی معده و جلوگیری از تخریب آن‌ها، قبل از گاوژ، به موش‌ها محلول بی‌کربنات سدیم خورانده شد.

به موش‌ها در زیرگروه A3 و B3 تنها به صورت تزریقی آنتی‌ژن‌های فاقد نانوپارتیکله (نوبت اول با ادجوانت کامل فروند به صورت تزریق زیرجلدی، نوبت دوم و سوم با ادجوانت ناقص فروند به صورت تزریق زیرجلدی و در نوبت چهارم بدون ادجوانت و تزریق صفاقی) تجویز شد. به گروه کنترل (C1)، زیرجلدی تزریق شد و گروه کنترل دوم (C2)، کیتوزان فاقد

جدول ۱: گروه بندی موش‌ها و برنامه واکسیناسیون

مقادیر آنتی ژن (میکرو گرم) به ازای هر موش	ادجوانت	برنامه ایمنی زایی		طریقه تجویز واکسن	زیر گروه (تعداد)	گروه های موشی
		نوبت	روز			
(rEIT)100+(rStx2B)100 نانو ذرات با کیتوزان	-	۰	اول	خوراکی	A1 (n=5)	A rEIT+rStx2B=ES
		۱۴	دوم			
		۲۸	سوم			
		۴۲	چهارم			
(rEIT)100+(rStx2B)100 نانو ذرات با کیتوزان	-	۰	اول	خوراکی	A2 (n=5)	
		۱۴	دوم			
		۲۸	سوم			
		۴۲	چهارم			
(rEIT)100+(rStx2B)100 فاقد نانو ذرات	-	۰	اول	تزریق صفاقی	A3 (n=5)	
		۱۴	دوم			
		۲۸	سوم			
		۴۲	چهارم			
(rEIT)100+(rStx2B)100 فاقد نانو ذرات	کامل فروند	۰	اول	تزریق زیر جلدی	A3 (n=5)	
	ناقص فروند	۱۴	دوم			
	ناقص فروند	۲۸	سوم			
	-	۴۲	چهارم			
(rEIT)100 نانو ذرات با کیتوزان	-	۰	اول	خوراکی	B1 (n=5)	B rEIT=E
		۱۴	دوم			
		۲۸	سوم			
		۴۲	چهارم			
(rEIT)100 نانو ذرات با کیتوزان	-	۰	اول	خوراکی	B2 (n=5)	
		۱۴	دوم			
		۲۸	سوم			
		۴۲	چهارم			
(rEIT)100 فاقد نانو ذرات	-	۰	اول	تزریق صفاقی	B3 (n=5)	
		۱۴	دوم			
		۲۸	سوم			
		۴۲	چهارم			
PBS 100 فاقد نانو ذرات	-	۰	اول	تزریق زیر جلدی	(n=5)	C1 (کنترل)
		۱۴	دوم			

C2 (کنترل)	خوراکی	(n=5)	
		اول	دوم
۲۸	سوم	۰	۱۴
۴۲	چهارم	۲۸	۴۲
۱۰۰ کیتوزان (فاقد آنتی ژن)	-	-	-

سنجش میزان آنتی بادی در سرم موش های ایمن شده

یک هفته پس از آخرین تزریق، خون گیری از گوشه چشم سینوس پشت حدقه ای موش ها با استفاده از پی پت پاستور استریل انجام و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. و سرم موش ها پس از قرار دادن خون ها در سانتریفیوژ یخچال دار (4°C)، با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه جدا و در دمای -20 درجه سانتی گراد برای اندازه گیری آنتی بادی IgG و IgA ذخیره گردید. از روش ELISA غیر مستقیم برای سنجش آنتی بادی IgG پلی کلونال ضد Stx2B و EIT در سرم خون موش ها استفاده شد. برای این کار مقدار یک میکروگرم از آنتی ژن خالص با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر بافر کربنات ۰/۰۵ مولار با pH=9.6 در کف هر چاهک قرار گرفت و دو چاهک نیز جهت کنترل در نظر گرفته شد. در داخل یک چاهک آنتی ژن و بافر پوشاننده و در چاهک دیگر تنها بافر پوشاننده ریخته شد. پس از شستشو با بافر PBS/T (PBS حاوی Tween ۰/۰۵٪) مرحله بلوکه سازی با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوشاننده به منظور جلوگیری از واکنش های ناخواسته سرم و کونژوگه (3% Skim milk در PBS/T) صورت پذیرفت و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری گردید.

پس از شستشوی مجدد رقت های ۱ به ۱۰۰ تا ۱ به ۴۰۰۰۰۰ از سرم موشی در محلول PBS/T تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. میکروپلیت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شیکر انکوباتور قرار گرفت. پس از انجام شستشو به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر آنتی بادی کونژوگه با رقت ۱ به ۵۰۰۰ اضافه شد و به مدت یک ساعت در شیکر انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از انجام شستشو، به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر محلول OPD (آ- فنیل دی آمین) ریخته و در تاریکی نگه داری شد. پس از تغییر رنگ محلول واکنش با اسید سولفوریک ۲/۵

مولار متوقف گردید. سپس جذب نوری چاهک ها با طول موج ۴۹۵ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد و در نهایت تیترا آنتی بادی مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی پاسخ های ایمنی در نمونه مدفوع موش های واکسینه شده

جمع آوری نمونه های مدفوعی از هر گروه در ویال های کوچک برای اندازه گیری آنتی بادی IgA صورت گرفت. سنجش تیترا آنتی بادی IgA اختصاصی علیه پروتئین های نو ترکیب EIT و Stx2B مطابق روش تیترا آنتی بادی IgG به روش الیزای غیرمستقیم انجام شد. در این واکنش از رقت سرمی و عصاره مدفوعی ۱ به ۵ و نیز از آنتی بادی کونژوگه ضد IgA با رقت ۱ به ۱۰۰۰ استفاده گردید.

آماده سازی سم Stx2

پس از رشد کلنی های *E. coli* O157:H7 (Stx2)⁺ در محیط LB مایع به مدت هشت ساعت، جهت کشت شبانه در محیط بیشتر (LB) با نسبت ۱ به ۵۰۰ تلقیح شد. باکتری با سرعت ۱۷۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه رسوب داده شد و بخش روشناور آن پس از جداسازی، توسط صافی ۰,۲۲ میکرومتری استریل شد و به عنوان منبع سم مورد استفاده قرار گرفت (۶).

چالش موش های ایمن شده

دو هفته پس از آخرین تزریق، چالش گروه های مختلف ایمن شده به روش خوراکی، خوراکی تزریقی و تزریقی در برابر آلودگی با باکتری *E. coli* O157:H7 (دز کشنده) مورد آزمایش قرار گرفت. به منظور کاهش فلور نرمال دستگاه گوارش به موش ها آنتی بیوتیک استرپتومایسین سولفات خوراندند شد. بعد از یک روز تیمار، ۱۰^{۱۰} باکتری *E. coli* O157:H7 (تعیین مقدار به وسیله آزمایش مک فارلند) در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر PBS استریل از طریق گاواژ به همه موش ها داده شد و روزانه

نتایج

تکثیر ژن *eit* و *stx2B* در ناقل بیانی pET28a و بررسی بیان پروتئین نوترکیب سه قسمتی rStx2B و rEIT محصول اختصاصی PCR برای قطعه ژنی *eit* به اندازه ۱۶۸۰ جفت نوکلئوتید و برای *stx2B* به اندازه ۲۱۰ نوکلئوتید روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد (شکل ۱). پلاسمیدهای مورد تأیید و حاوی ژنهای *stx2B* و *eit* هر کدام به صورت جداگانه به باکتری مستعد شده اشریشیاکلی BL21-DE3 به منظور بیان منتقل شد.

پس از کشت شبانه در محیط کشت LB حاوی کانامایسین بهینه سازی شرایط بیانی در ساعات مختلف انجام پذیرفت (شکل ۲). بهترین شرایط بیانی پس از ۴ ساعت برای rEIT و بعد از کشت شبانه برای rStx2B به دست آمد. پس از خالص سازی پروتئین های نوترکیب به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی ستون Ni-NTA میزان پروتئین نوترکیب در فازهای استخراج شده توسط روش برادفورد اندازه گیری شد.

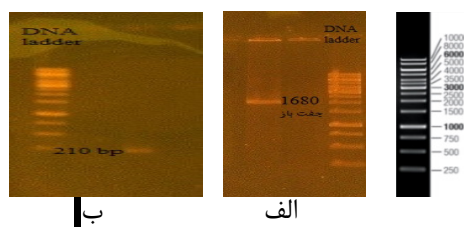
پس از جمع آوری نمونه های مدفوعی و مخلوط کردن مدفوعها در هر گروه طی ۱۴ روز، عصاره گیری از نمونه های مدفوعی انجام شد. عصاره ها بر روی محیط کشت اختصاصی سوربیتول مک کانکی آگار حاوی ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر تلوریت پتاسیم کشت داده شد و ریزش مدفوعی باکتری O157:H7 با روش شمارش روی محیط جامد ارزیابی شد. دو هفته پس از آن به منظور بررسی میزان محافظت موش های واکسینه شده در گروه های مختلف، سم Stx2 به روش درون صفاقی به موش ها تزریق و میزان مرگ و میر آن ها طی ۱۰ روز گزارش و ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

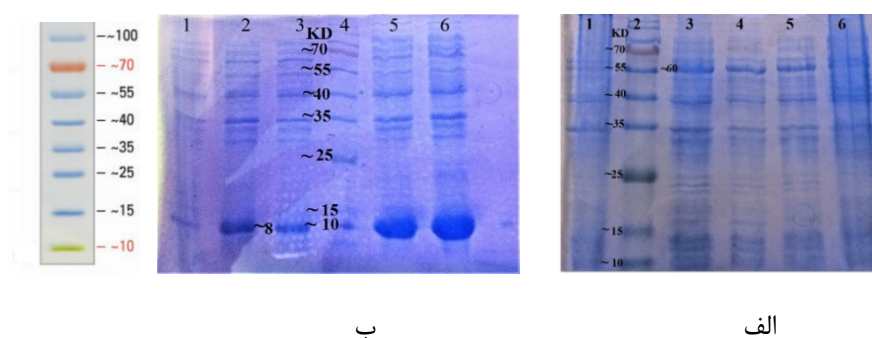
به کمک تجزیه و تحلیل آماری آزمون دقیق فیشر (Fisher exact test) بررسی نتایج چالش گروه ایمن شده و شاهد صورت گرفت و از نرم افزار اکسل (Excel) برای رسم نمودارها استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه پیام نور تأیید شده است (کد اخلاق IR.PNU.REC.1397.39)



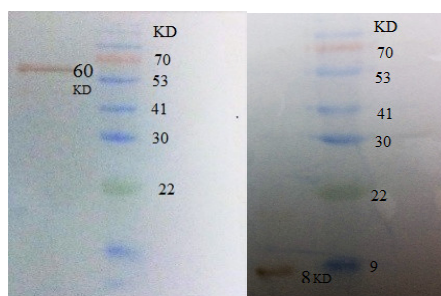
شکل ۱: تأیید حضور الف- سازه ژنی *eit*، ب- قطعه *stx2B* با استفاده از روش PCR



شکل ۲: بررسی بیان پروتئین های نوترکیب: الف) rEIT و ب) rStx2B

تأیید بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از ایمنوبلاتینگ با توجه به این که در انتهای آمینی این پروتئین های نو ترکیب دنباله هیستیدینی (His-tag) قرار دارد، با استفاده از وسترن بلاتینگ با آنتی His-tag و مشاهده باندهای مورد نظر بیان این آنتی ژن ها تأیید شد (شکل ۳).

(توضیح شکل ۲): در بازه زمانی ۴،۲،۲۴،۸ ساعت بعد از القا با IPTG توسط SDS-PAGE الف-rEIT (۱-پیش از القا، ۲- مارکر پروتئین، ۳- پس از دو ساعت، ۴- پس از چهار ساعت، ۵- پس از هشت ساعت، ۶- پس از یک شبانه روز) ب-rStx2B (۱-پیش از القا، ۲- پس از دو ساعت، ۳- پس از چهار ساعت، ۴- مارکر پروتئین، ۵- پس از هشت ساعت، ۶- پس از یک شبانه روز)

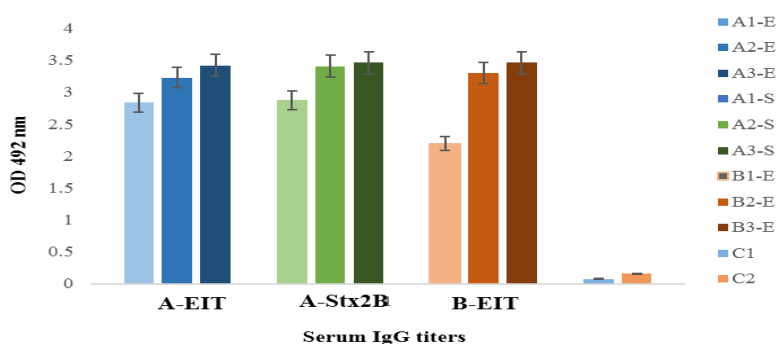


الف ب

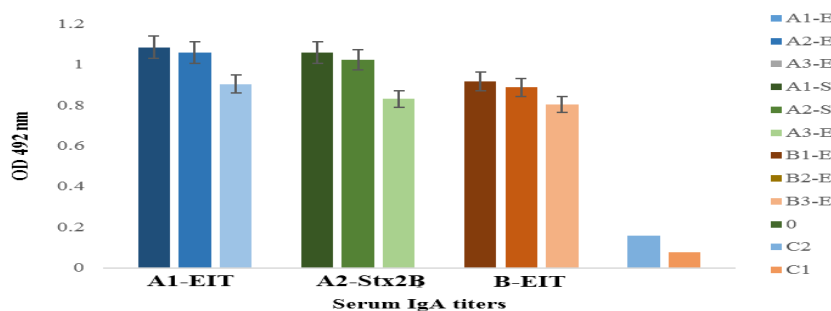
شکل ۳: نتیجه وسترن بلاتینگ به منظور تأیید پروتئین نو ترکیب. الف) Stx2B، ب) EIT

مقایسه میزان آنتی بادی ها در پاسخ به کاندیدای واکسن rEIT به تنهایی و همراه با rStx2B پس از ایمن سازی موش ها، میزان تحریک سیستم ایمنی همورال علیه rEIT و rStx2B با آزمون ایزا اندازه گیری شد. تیتراسیون نمونه های سرمی موش های واکسینه شده با rEIT به صورت گروهای خوراکی، خوراکی تزریقی و تزریقی خالص میزان مطلوبی از IgG اختصاصی و نیز میزان قابل قبولی از آنتی بادی IgA را نشان داد. (شکل ۴)

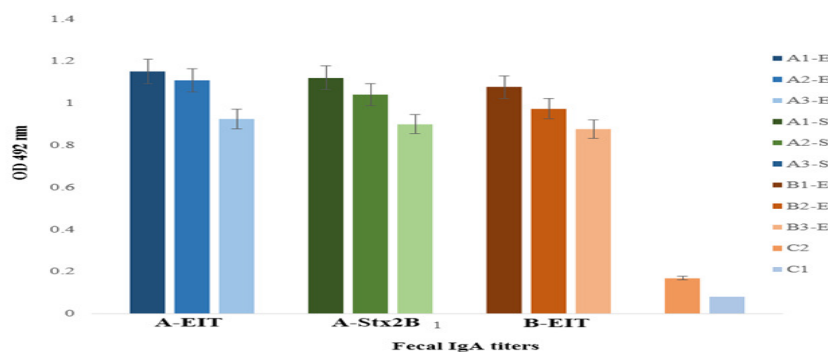
بررسی درصد بارگذاری و تعیین اندازه نانو پار تیکل های حاوی آنتی ژن rEIT و rStx2B درصد بارگذاری برای آنتی ژن rEIT در نانوذرات کیتوزان ۹۱٪ و برای rStx2B ۹۵٪ تعیین شد. اندازه نانوپار تیکل ها و نتایج پتانسیل زتای آن ها نشان داد که میانگین سایز EIT های نانوپار تیکله 116/6 نانومتر و میانگین پتانسیل زتای آن 17/9 میلی ولت و برای rStx2B به ترتیب ۱۲۹،۲ و ۱۹،۳ در وضعیت بسیار مطلوبی بودند.



الف



(ب)



(ج)

شکل ۴: مقایسه بالاترین میزان تیتراژ (الف) IgG سرمی (ب) IgA سرمی، (ج) IgA مدفوعی، در گروه‌های مختلف موشی

اختصاصی سوربیتول مک کانکی آگار کاهش ریزش باکتری‌ها در نمونه‌های مدفوعی موش‌های واکسینه و ایمن شده مشاهده شد (شکل ۵). سطح اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تست و کنترل ($p < 0.05$) مشهود بود.

میزان محافظت در برابر سم *stx2* با چالش حیوانی

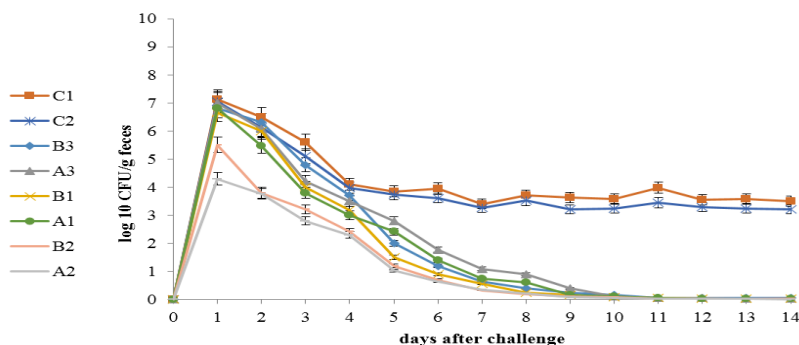
در این چالش همه موش‌های گروه‌های کنترل و موش‌های واکسینه شده تنها با rEIT در گروه B حداکثر پس از گذشت سه روز بعد از تزریق سم مردند. تنها در حدود ۶۶ درصد از موش‌ها در گروه A (واکسینه شده با rEIT و rStx2B) توانستند پس از ده روز زنده بمانند (جدول ۲). سطح اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تست و کنترل موشی بر اساس آزمون دقیق فیشر ($p < 0.05$) مشاهده شد.

A1-E تیتراژ آنتی‌بادی ضد (E) rEIT در زیر گروه خوراکی، A2-E بررسی تیتراژ آنتی‌بادی ضد (E) در زیر گروه خوراکی-تزریقی، A3-E تیتراژ آنتی‌بادی ضد (E) در زیر گروه تزریقی، A1-S تیتراژ آنتی‌بادی ضد (S) Stx2B در زیر گروه خوراکی، A2-S بررسی تیتراژ آنتی‌بادی ضد (S) در زیر گروه خوراکی-تزریقی، A3-S تیتراژ آنتی‌بادی ضد (S) در زیر گروه تزریقی، B1-E تیتراژ آنتی‌بادی ضد (E) در زیر گروه خوراکی، B2-E بررسی تیتراژ آنتی‌بادی ضد (E) در زیر گروه خوراکی-تزریقی، B3-E تیتراژ آنتی‌بادی ضد (E) در زیر گروه تزریقی.

چالش موش‌های ایمن و غیر ایمن در برابر دوز خوراکی

باکتری *E. coli* O157:H7

پس از آلوده کردن گروه‌های موشی و جمع‌آوری نمونه‌های مدفوعی و عصاره‌گیری و کشت روی محیط



شکل ۵: مقاومت موش های ایمن و غیر ایمن در برابر دوز خوراکی باکتری *E. coli* O157:H7

جدول ۲: درصد زنده ماندن موش ها پس از چالش با سم Stx2 باکتری

گروه های موشی ایمن و غیر ایمن	تعداد	تعداد موش های زنده مانده	درصد موش های زنده مانده
گروه کنترل C1	۵	۰	٪۰
گروه کنترل C2	۵	۰	٪۰
B(1,2,3)	۱۵	۰	٪۰
A (1,2,3)	۱۵	۱۰	٪۶۶

Fisher exact test $p=0/01$

ایمنی مؤثرتر صورت گرفته است. در این رابطه استفاده از فناوری های جدید در زمینه نانو بیوتکنولوژی در توسعه واکسن هایی بر پایه نانو حامل های کلونیدی توجه محققین را به خود جلب کرده است (۱۴،۱۵). در بسیاری از مطالعات نانوپلیمر کیتوزان به جهت ویژگی های مثبت فراوان مانند زیست سازگاری، قابلیت چسبندگی مخاطی، زیست تخریب پذیری و خاصیت ادجوانتی توانسته به عنوان حامل مناسبی برای پروتئین های نو ترکیب مورد تایید قرار گیرد (۱۶). از آن جایی که بیشتر عوامل بیماریزای *E. coli* O157:H7 از طریق غشاهای مخاطی وارد بدن می شوند، با تهیه کاندیدای نانو واکسن خوراکی مناسب می توان با بهره گیری از سیستم ایمنی بدن میزبان مقابله مؤثرتری علیه عفونت های این باکتری داشت. اثبات شده است که این ساختارها توانایی تحریک هر دو پاسخ ایمنی سیستمیک و مخاطی را دارند (۱۶). در این تحقیق به تخلیص و تهیه کاندیداهای نانو واکسنی پرداخته شد که اهمیت خاصی در کلونیزاسیون باکتری در اپیتلیوم روده و کنترل اثر سم شیگا

بحث

بیماری اسهال عامل مهم مرگ و میر در کشور های در حال توسعه می باشد. آمار نشان می دهد که سالانه ۴ تا ۶ میلیون کودک بر اثر بیماری های اسهال جان خود را از دست می دهند (۱۱). مطالعه بر روی *E. coli* O157:H7 مهم ترین سروتیپ اشرشیاکلی انتروهموراژیک EHEC به علت بیماری زایی شدید در دستگاه گوارش من جمله کولیت هموراژیک و ایجاد نارسایی های کلیوی از اهمیت بسزایی برخوردار است (۱۲). با توجه به گسترش شیوع این بیماری در جهان و اهمیت آن به عنوان پاتوژن مولد بیماری های روده ای تحقیق های گسترده در جهت پیشگیری و درمان در برابر این باکتری ضروری می باشد. امروزه با بکارگیری تکنیک های مولکولی می توان پروتئین های نو ترکیبی را از فاکتور های مهم بیماری زا تهیه کرد که به عنوان کاندیدای واکسن می توانند میزان ایمنی زایی بهتری علیه پاتوژن های مربوطه داشته باشند (۱۳). طی سال های اخیر مطالعات بر روی بهبود اثر بخشی واکسن ها به منظور ایجاد

گروه های ایمن شده مشاهده شد. در صورتی که نمودار ریزش باکتری در مدفوع موش های غیر ایمن شیب ملایمی داشت و تا روز چهاردهم سطح بالایی را نشان می داد. بیشترین کاهش ریزش مدفوعی در زیر گروه های خوراکی - تزریقی نسبت به زیر گروه های دیگر مشاهده شد. باتوجه به این که این باکتری از راه غذای آلوده وارد لوله گوارش انسان می شود، کاهش ریزش باکتری ها در مدفوع موش های ایمن شده دلیل بر مؤثر بودن این کاندیداهای نانو واکسن در ممانعت از اتصال فاکتورهای مورد نظر به سلول های اپیتلیوم دستگاه گوارشی است. در چالش حیوانی با دوز کشنده توسط سم Stx2 حاصل از *E. coli* O157:H7 تنها در گروه های موشی ایمن شده توسط هر دو آنتی ژن rEIT و rStx2B نزدیک به ۷۰٪ از موش ها زنده ماندند.

اما در گروه های کنترل و گروه هایی که فقط با rEIT ایمن شده بودند تمام موش ها تلف شدند. این نتایج مبین آن است که موش ها در گروه A با واکسیناسیون مخلوط از دو کاندیدا هم در برابر سم پایداری کردند و زنده ماندند و هم با کاهش ریزش مدفوعی در برابر فاکتورهای اتصال ایمنی این باکتری ایمنی را نشان دادند. بنابراین استفاده از واکسن ترکیبی فوق که تنها با انجام یک واکسیناسیون انجام پذیرفته توانسته بدن موجود را در برابر چند عامل بیماری زا ایمن کند. مطالعات بیشتری در این زمینه برای تأثیرگذاری بهتر کاندیدهای نانو واکسن چندگانه با دخیل کردن فاکتورهای مهم بیماری زای دیگر بر علیه *E. coli* O157:H7 لازم می باشد.

نتیجه گیری

کیتوزان به علت خاصیت غیر سمی و توانایی آسان شکل پذیری و اندازه مناسب حامل مطلوبی در تهیه نانو واکسن ها محسوب می شود. استفاده از نانو واکسن های ترکیبی راهی نوین از روش های واکسیناسیون است که با حذف سوزن دردناک در تزریق و کاهش دفعات واکسیناسیون می توان نتایج مؤثرتری در ایجاد ایمنی هومورال و اکتسابی حاصل نمود. نتایج نشان می دهند که محافظت موش های ایمن شده در زیر

دارند. پیش از این امانی و همکاران این سازه سه قسمتی کامپوزیت را به صورت خالص و تزریقی در موش ها مورد ارزیابی قرار داده بودند که نتایج ارزشمندی نیز در این زمینه حاصل شد (۱۷). کاظمی و همکاران نیز ایمنی زایی زیر واحد اتصالی سم شبه شیگا rStx2B را در موش بررسی کردند (۱۸). دعوی و همکاران با انجام تحقیق بر روی rEIT نانو پارسیکل شده با کیتوزان به صورت الکترواسپری از راه بینی به ایمنی زایی قابل قبولی دست یافتند (۱۹). اما به منظور بهبود کیفیت روند ایمنی زایی استفاده از نانوذرات حاوی آنتی ژن ها به روش ترکیبی در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه اندازه نانوذرات حاوی آنتی ژن در حد بسیار مطلوبی به دست آمد. بیشتر محققین در مورد اندازه مطلوب (۱۰۰ تا ۵۰۰) نانومتر به یک اتفاق نظر واحد رسیده اند که متأثر از ماهیت پلیمر می باشد (۲۰).

اندازه کوچک نانوذرات حاوی آنتی ژن و پتانسیل زتای مناسب نشان دهنده چسبندگی بهتر آن ها به سلول های مخاطی روده می باشد و با رهایش تدریجی آنتی ژن های نو ترکیب از کیتوزان بدن فرصت کافی برای ایجاد ایمنی زایی مؤثرتر بر علیه پاتوژن ها پیدا خواهد کرد. در تهیه نانو ذرات استفاده از ماده شیمیایی TPP با ایجاد اتصالات عرضی سبب افزایش حلالیت این پلیمر در pH فیزیولوژیک می شود. بررسی ایمنی زایی گروه های مختلف موشی در برابر این پاتوژن ها به صورت مقایسه بالاترین سطح از آنتی بادی های IgG سرمی و IgA سرمی و مدفوعی صورت پذیرفت. نمودارها نشان می دهند که زیر گروه های خوراکی - تزریقی در هر دو گروه واکسیناسیون A و B (rEIT همراه و بدون rStx2B) نسبت به سایر زیر گروه ها از ایمنی متناسب تری برخوردارند. در هر دو زیر گروه خوراکی - تزریقی سطح آنتی بادی های IgG و IgA در وضعیت مطلوب تری یافت شد.

از مطالعه بروی چالش موش های گروه های مختلف ایمن شده در مقابل گروه های کنترل غیر ایمن با خوراندن باکتری *E. coli* O157:H7، کاهش تعداد کلنی ها بر روی محیط اختصاصی سوربیتول مک کانکی آگار در طی دو هفته در تمام

این پژوهش حاصل از رساله دکتری و تلاش نویسندگان این تحقیق می باشد. از تمامی افرادی که در این پژوهش ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می شود. در ضمن تمام منافع مالی توسط محققین پژوهش تأمین شده است. تعارض در منافع: وجود ندارد.

گروه A2 از مسیر خوراکی- تزریقی (استفاده از هر دو آنتی ژن) بهتر از مسیر های دیگر بود.

سپاسگزاری

References:

- 1-Sussman M. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. Cambridge University press London 1997.
- 2-Wales AD, Woodward MJ, Pearson GR. *Attaching-effacing bacteria in animals*. J Comp pathology 2005; 132: 1-26.
- 3-Rojas-Lopez M, Monterio R, Pizza M, Desvaux M, Rosini R. *Intestinal Pathogenic Escherichia coli: Insights for Vaccine Development*. Front Microbiol 2018; 9: 440.
- 4-Saeedi P, Yazdanparast M, Behzadi E, Salmanian AH, Mousavi SL, Nazarian S, Amani J. *A review on strategies for decreasing E. Micro pathog* 2017; 103: 186-95.
- 5-Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. *Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of Escherichia coli O157: H7*. Vaccine 2010; 28(42): 6923-29.
- 6-Rad HS, Mousavi SL, Rasooli I, Amani J, Nadooshan MRJ. *EspA-Intimin chimeric protein, a candidate vaccine against Escherichia coli O157: H7*. Iran J Microbiol 2013; 5(3): 244-51.
- 7-Sashorpour M, Amani J, Jafari M, et al. *Expression of recombinant chimeric EspA-intimin protein in Nicotiana tobaccum for oral vaccine development*. J Genetic Plant Research 2014; 1(1): 77-94.
- 8-Kazemi R, Tehrani AA, Jafari M, Amani J, Mousavi A, Salmanian AH. *Cloning and Expression of the Binding Subunit of Shiga-Like Toxin Type 2 Gene and Immunization Study in an Animal Model*. Pathobiology Res 2016; 18(4): 45-60.
- 9-Hajizade A, Ebrahimi F, Salmanian AH, Arpanae A, Amani J. *Nanoparticles in vaccine development*. J Applied Biotechnology Reports 2015; 1: 125-34.
- 10- Vinsova J, Vavrikova E. *Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities-a review*. Current Pharmaceutical Design 2011; 17: 3596-607.
- 11- Bach Sj, McAllister TA, Veira DM, Gannon VPJ, Holley RA. *Transmission and control of Escherichia coli O157: H7-a review*. Canadian J Animal Sci 2002; 82(4): 475-90.
- 12- Pop, M., et al., *Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition*. Genome biology, 2014. 15(6): p. R76.

- 13- Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG. *Advances in the development of enterohemorrhagic Escherichia coli vaccines using murine models of infection*. Vaccine 2013; 31(32): 3229-35.
- 14- Hosseini ZS, Amani J, Baghbani Arani F, Nazarian S, Motamedi MJ, Shafighian F. *Immunogenicity of the nanovaccine containing intimin recombinant protein in the BALB/c mice*. Clin Exp vaccine Res 2018; 7(1): 51-60.
- 15- Yazdanparast A, Mousavi SL, Rasooli I, Amani J, Jalalinadoushan M. *Immunogenical Study of Chimeric Recombinant Intimin-Tir of Escherichia coli O157: H7 in Mice*. Archives of Clinical Infectious Diseases 2012; 7(2): 45-51.
- 16- Sekhon BS, Saluja V. *Nanovaccines-an overview*. Int J Pharm Front Res 2011; 1(1): 101-9.
- 17- Amani J, S Latif Mousavi, Sima Rafati, Ali H Salmanian. *In silico analysis of chimeric espA, eae and tir fragments of Escherichia coli O157: H7 for oral immunogenic applications*. Theor Biol Med Model 2009; 6(1): 28.[Persian]
- 18- Kazemi R, Akhavian A, Amani J, Salimian J, Motamedi MJ, Mousavi A, et al. *Immunogenic properties of trivalent recombinant protein composed of B-subunits of LT, STX-2, and CT toxins*. Microbes Infect 2016; 18(6): 421-29. [Persian]
- 19- Doavi T, Mousavi SL, Kamali M, Amani J, Ramandi MF. *Chitosan-based intranasal vaccine against Escherichia coli O157: H7*. Iranian Biomed J 2016; 20(2): 97-108.
- 20- Van der Lubben I, Verhoef J, Borchard G, Junginger H. *Chitosan for mucosal vaccination*. Advanced drug delivery Rev 2001; 52(2): 139-144.

Comparison of immunization potential from recombinant proteins EIT and Stx2B nanoparticulated based on chitosan in animal model, as nanovaccin candidate against *E. coli* O157:H7

Jaleh khanifar¹, Ali Hatef Salmanian^{*2}, Reza Haji Hosseini¹, Jafar Amani³, Rohoallah Kazemi⁴

Original Article

Introduction: *E. coli* O157:H7 with its ability of quick implantation inside gastrointestinal tract that causes hemolytic uremic and bloody diarrhea in humans is an important subject to investigate. One of the effective ways to prevent these infections is using nanovaccines prepared from immunogenic recombinant protein from bacterial virulence factors. In this research, the chitosan encapsulated by recombinant protein of EIT with and without Stx2B were introduced to BALB/c mice and immunogenicity was evaluated and compared.

Methods: In this experimental study the recombinant protein of EIT and Stx2B were nanoparticulated with chitosan through ionic gelation method after expression and purification with Ni-NTA column and approval by Western blotting. After Vaccinations antibodies against rStx2B and rEIT in the mice's serum and feces were detected by ELISA. Challenge test for neutralization and protection against Stx2 toxin was applied with immunized serum by Fisher's exact test.

Results: Evaluation of IgA and IgG antibody levels in the mice's serum and also the IgA level in their feces showed more appropriate immunity oral-injection groups with the both nanoparticulated antigens. The protection challenge study show that, the mice group which received rEIT+ rStx2B could neutralize the toxin activity significant difference ($P<0.05$) between test and control groups of mice was recorded.

Conclusion: The data indicate these multiple vaccine candidates with both nanoparticulated recombinant proteins EIT and Stx2B with chitosan, provide more effective protection against of *E. coli* O157:H7.

Keywords: Recombinant protein, Chitosan, Nanovaccin, Immunization, *E. coli* O157:H7.

Citation: khanifar J, Salmanian AH, Haji Hosseini R, Amani J, Kazemi R. Comparison of immunization potential from recombinant proteins EIT and Stx2B nanoparticulated based on chitosan in animal model, as nanovaccine candidate against *E. coli* O157:H7. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 26(10): 832-44

^{1,3}Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

²Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)

⁴Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences

⁵Green Gene Company, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Tel: 021- 44787365, email: salman@nigeb.ac.ir