مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره دهم، دی ۱۳۹۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۹

مقایسه اثر ایمنی زایی پروتئین های نوترکیبEIT و Stx2B متصل به نانو ذرات بر پایه کیتوزان در مدل حیوانی به عنوان کاندیدای نانوواکسن 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 نانوواکسن های حاصل از آنتی ژن های نوترکیب فاکتورهای بیماری زای این باکتری می باشد. دراین تحقیق پروتئین های نوترکیب EIT (EspA, Intimin, Tir) و Stx2B با نانو ذرات کیتوزان انکپسوله ودردو گروه EIT همراه Stx2B و بدون آن به موش هایBALB/c تلقیح شدندومیزان ایمنی زایی ارزیابی و مقایسه شد .

روش بررسی: در این مطالعه تجربی پروتئین های نوترکیب EIT و Stx2B پس از بیان و خالص سازی با روش ستون نیکل و تأیید با وسترن بلاتینگ، 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 الایزا 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 وIgA سرمی و 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< ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: شواهد نشان می دهد از پروتئین نوترکیب 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.

واژه‌های کلیدی: پروتئین نوترکیب، کیتوزان، نانوواکسن، 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 نوترکیب 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 ه مسئول؛ تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۶۵۶، پست الکترونیکی: salman@nigeb.ac.ir کد پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

مقدمه

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 داده‌اند (۳). با ابداع روش های مهندسی ژنتیک و استفاده از واکسن‌های 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 آن‌ها برای تولید این واکسن‌ها 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 وIV می باشد. سیستم ترشحی نوع III در ترشح پروتئین های مختلف از جمله Tir و EspA وEspB 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 توانسته‌اند با استفاده ازبخش چسبنده و غیرسمی زیر واحد اتصالی B این توکسین کاندیدای واکسن مناسبی تهیه کنند (۸). از طرفی مطالعات زیادی در رابطه با استفاده از حاملین کلوئیدی 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 کلوئیدی دارد (۹). استفاده از آن نه تنها باعث محافظت آنتی ژن ها خواهد شد بلکه با رهایش آهسته و هدفمند در عرضه آن ها به بدن ، پاسخ ایمنی مؤثرتری ایجاد خواهد شد (۱۰). در این تحقیق پروتئین های نوترکیب rEIT و rStx2B 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 موش‌ها 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 T_7 و پرایمرهای اختصاصی به ترتیب برای *eit* و *stx2B* حضور ژن‌ها تایید شد. ترانسفورماسیون وکتورهای حاوی ژن *eit* و *stx2B* به سلول‌های مستعد *E. coli* BL21(DE3) تیمارشده با کلسیم کلرید به روش شیمیایی انجام شد و در محیط کشت LB جامد حاوی کانامایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، کلنی‌های 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 پروپیل‌تیوگالاکتوپیرانوزید) یک میلی‌مولار در انکوباتور شیکردار

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

با شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه انجام شد. برای بهینه سازی شرایط بیانی – نمونه برداری در۲ و ۴ و ۸ و ۲۴ ساعت بعد از القا انجام و نمونه های پروتئینی با استفاده از روش SDS-PAGE با ژل ۱۲ درصد آکریل‌آمید بررسی گردید.

تأیید بیان پروتئین‌ها با روش وسترن‌بلاتینگ (W.blotting)

در این روش از آنتی بادی Anti His tag و کونژوگه با HRP (Horse Radish Peroxidase) استفاده شد. پروتئین‌های rEIT و rStx2B در نمونه های 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 آنتی بادی Anti His tag، محلول DAB (3,3'- diamino benzidine) روی غشایPVDF ریخته شد و پس از ظهور باندها، مهار واکنش با شستشوی آب مقطر انجام گرفت. پس از تایید، پروتئین های خالص شده به عنوان آنتی ژن 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 می تواند به دلیل گروه بار منفی فسفات ازطریق نیروهای الکترواستاتیکی باگروه باردار مثبت آمینی کیتوزان به عنوان پلی کاتیون اتصالات عرضی برقرار کند. به 7/5 میلی لیتر محلول کیتوزان با غلظت ۲ میلی گرم در میلی‌لیتر در اسیداستیک ۲٪ ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی ژنrEIT 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 میلی‌گرم درمیلی‌لیتر به آرامی به مخلوط اضافه گردید و یک ساعت بر روی هم زن مغناطیسی در دمای اتاق قرار گرفت. ایجاد کدورت در محل نشان‌دهنده تشکیل هیدروژناسیون کیتوزانی است که قابلیت انکپسوله کردن ترکیبات را به همراه دارند، سپس محلول کلوئیدی 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 سانتی گراد نگه‌داری شد. تمام این مراحل مجدداً برای تهیه آنتی‌ژن نانوپارتیکله rStx2B بکار گرفته شد.

تعیین درصد بارگذاری وتعیین سایز آنتی ژن‌ها در نانو پارتیکل کیتوزان

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

$$\text{درصد بارگذاری}(\%) = \frac{\text{غلظت کل آنتی ژن درمحلول} - \text{غلظت آنتی ژن درمحلول رویی}}{\text{غلظت کل آنتی ژن درمحلول}} \times ۱۰۰$$

اندازه نانو پارتیکل‌ها دردانشگاه بقیه الله اعظم توسط دستگاه زتاسایزر Malvern تعیین شد. این دستگاه اندازه، پتانسیل زتا و وزن مولکولی نانوذرات را با اندازه گیری حرکت براونی ذرات موجود دریک نمونه و با استفاده از پراش نور دینامیکی DLS (Dynamic light Scattering) تعیین می نماید.

ایمن سازی حیوان مدل با نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی ژن

تعداد ۴۰ سر موش ماده BALB/c با سن ۷-۶ هفته ای 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. موش ها به سه گروه از دسته‌های ۵تایی برای ایمن‌سازی به روش خوراکی، خوراکی تزریقی، تزریقی و نیز دو گروه کنترل تقسیم شدند. مطابق جدول ۱ درگروه اول (A) از هر دو آنتی‌ژن rEIT و rStx2B و در گروه دوم (B) فقط از آنتی ژن rEIT بدون rStx2B استفاده شد. موش‌ها در زیر گروه A1 وB1 نانوذرات کیتوزان همراه با آنتی‌ژن های مزبور را به صورت خوراکی و در زیر گروه A 2 وB 2، در سه نوبت آنتی‌ژن های نانوپارتیکله را به صورت خوراکی و در نوبت چهارم آنتی‌ژن خالص را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

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 تزریقی زیرجلدی و در نوبت چهارم بدون ادجوانت و تزریق صفاقی) تجویز شد. به گروه کنترل (C1)، PBS (Phosphate Buffered Saline) استریل به صورت زیرجلدی تزریق شد و گروه کنترل دوم (C2) ، کیتوزان فاقد آنتی‌ژن ها را به صورت خوراکی دریافت کردند. میزان دز تزریقی، ۳۰ میلی‌گرم آنتی‌ژن خالص و میزان دز خوراکی، ۲۰۰ میلی گرم آنتی‌ژن نانوپارتیکله به ازای هر موش (جدول ۱) در نظرگرفته شد. به منظور برطرف کردن حساسیت نانوذرات کیتوزان نسبت به شرایط اسیدی معده و جلوگیری از تخریب آن ها، قبل از گاواژ، به موش ها محلول بی کربنات سدیم خورانده شد.

جدول ۱:گروه بندی موش ها و برنامه واکسیناسیون

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

			سوم	۲۸	
			چهارم	۴۲	
C2 (کنترل)	(n=5)	خوراکی	اول	۰	- 100 کیتوزان (فاقد آنتی ژن)
			دوم	۱۴	
			سوم	۲۸	
			چهارم	۴۲	

سنجش میزان آنتی بادی در سرم موش های ایمن شده

یک هفته پس از آخرین تزریق، خون‌گیری 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(4^0C)، 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 روشELISA غیر مستقیم برای سنجش آنتی بادی IgG پلی کلونال ضد Stx2B وEIT در سرم خون موش‌ها استفاده شد. برای این کار مقدار یک میکروگرم از آنتی‌ژن 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 نظرگرفته 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 (Skim milk 3% در PBS/T) صورت پذیرفت و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری گردید.

پس از شستشوی مجدد رقت‌های 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 آنتی‌بادی 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 میکرولیتر محلول OPD (أ- فنیل‌دی‌آمین) ریخته و در تاریکی نگه‌داری 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 الایزا ریدر خوانده شد و در نهایت تیتر آنتی‌بادی مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی پاسخ های ایمنی در نمونه مدفوع موش های واکسینه شده

جمع‌آوری نمونه‌های مدفوعی از هر گروه در ویال‌های کوچک برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی IgA صورت گرفت. سنجش تیتر آنتی‌بادی IgA اختصاصی علیه پروتئین‌های نوترکیبEIT و Stx2B مطابق روش تیتر آنتی‌بادی IgG به روش الایزای غیرمستقیم انجام شد. در این واکنش از رقت سرمی و عصاره مدفوعی ۱به ۵ و نیز از آنتی‌بادی کونژوگه ضد IgA با رقت ۱به 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 خورانده شد. بعد از یک روز تیمار، 10^{10} باکتری *E. coli* O157:H7 (تعیین مقدار به وسیله آزمایش مک فارلند) در ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS استریل از طریق گاواژ به همه موش ها داده شد و روزانه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

پس از جمع آوری نمونه های مدفوعی و مخلوط کردن مدفوع‌ها در هر گروه طی ۱۴ روز، عصاره‌گیری از نمونه‌های مدفوعی انجام شد. عصاره ها بر روی محیط کشت اختصاصی سوربیتول‌مک‌کانکی آگار حاوی ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر 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

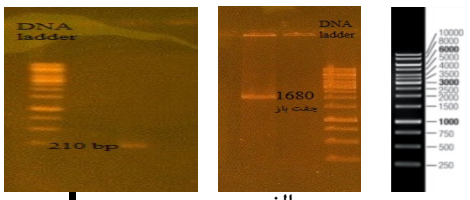
پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه پیام نورتایید شده است (کد اخلاق IR.PNU.REC.1397.39)

نتایج

تکثیر ژن *eit* و *stx2B* در ناقل بیانی pET28a و بررسی بیان پروتئین نوترکیب سه قسمتی rEIT و rStx2B

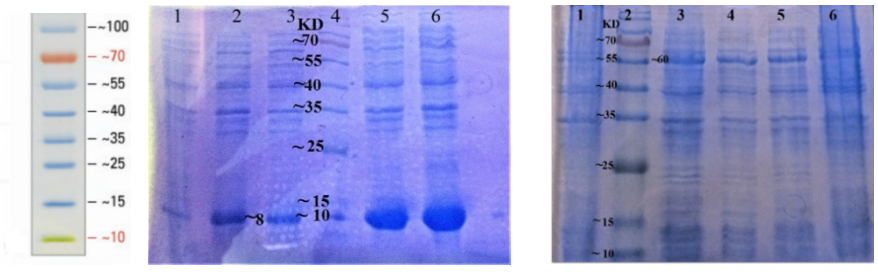
محصول اختصاصی PCR برای قطعه ژنی *eit* به اندازه ۱۶۸۰ جفت نوکلئوتید و برای *stx2B* به اندازه ۲۱۰ نوکلئوتید روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد (شکل ۱). پلاسمیدهای مورد تأیید و حاوی ژن‌های *eit* و *stx2B* هر کدام به صورت جداگانه به باکتری مستعد شده اشریشیاکلی BL21-DE3 به منظور بیان منتقل شد.

پس از کشت شبانه در محیط کشت LB حاوی کانامایسین بهینه سازی شرایط بیانی در ساعات مختلف انجام پذیرفت (شکل۲). بهترین شرایط بیانی پس از ۴ ساعت برای rEIT و بعد از کشت شبانه برای rStx2B به دست آمد. پس از خالص‌سازی پروتئین های نوترکیب به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی ستون Ni-NTA میزان پروتئین نوترکیب در فازهای استخراج شده توسط روش برادفورد اندازه‌گیری شد.



ب الف

شکل۱: تأیید حضور الف- سازه ژنی *eit* ، ب- قطعه *stx2B* با استفاده از روش PCR



ب الف

شکل۲ :بررسی بیان پروتئین های نوترکیب: الف)rEIT وب)rStx2B

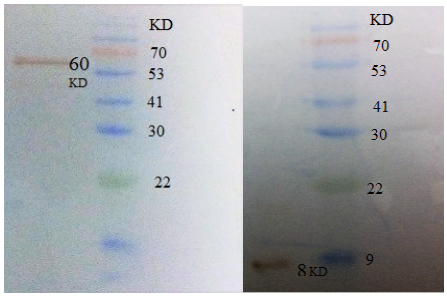
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

(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 چهارساعت، ۵- پس از هشت ساعت، ۶- پس از یک شبانه‌روز) - ب-rStx2B (۱-پیش از القا، ۲- پس ازدو ساعت، ۳-پس از چهارساعت، ۴- مارکر پروتئین، ۵- پس از هشت ساعت، ۶- پس از یک شبانه‌روز)

تأیید بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از ایمنوبلاتینگ

با توجه به این که در انتهای آمینی این پروتئین های نوترکیب دنباله هیستیدینی (His-tag) قرار دارد، با استفاده از وسترن‌بلاتینگ با آنتی His-tag و مشاهده باندهای مورد نظر بیان این آنتی‌ژن‌ها تأیید شد (شکل ۳).



الف ب

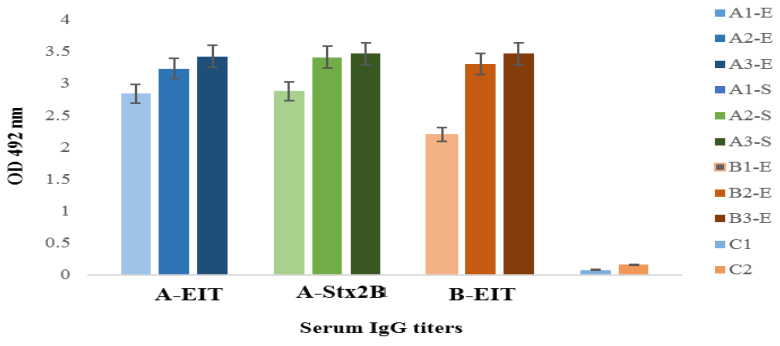
شکل ۳: نتیجه وسترن بلاتینگ به منظور تأیید پروتئین نوترکیب. الف) Stx2B ، ب) EIT

بررسی درصد بارگذاری و تعیین اندازه نانو پارتیکل های حاوی آنتی ژن rEIT و rStx2B

درصد بارگذاری برای آنتی ژن rEIT در نانوذرات کیتوزان ۹۱ ٪ و برای rStx2B ۹۵٪ تعیین شد. اندازه نانوپارتیکل ها و نتایج پتانسیل زتای آن ها نشان دادکه میانگین سایز EITهای نانوپارتیکله 116/6 نانومتر و میانگین پتاسیل زتای آن 17/9 میلی ولت و برای rStx2B به ترتیب۱۲۹,۲ و ۱۹,۳ در وضعیت بسیار مطلوبی بودند.

مقایسه میزان آنتی بادی ها در پاسخ به کاندیدای واکسن rEIT به تنهایی و همراه با rStx2B

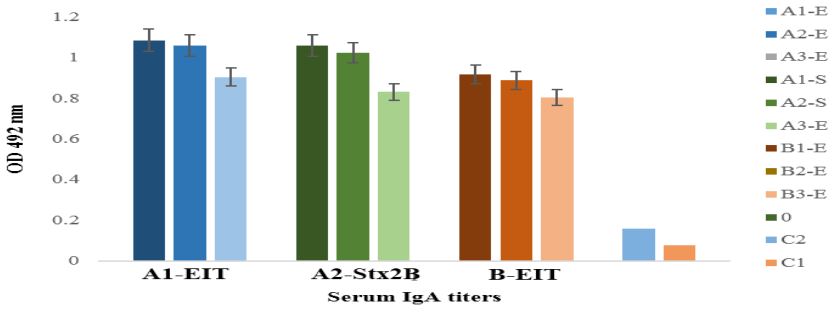
پس از ایمن سازی موش ها، میزان تحریک سیستم ایمنی همورال علیه rEIT وrStx2B با آزمون الایزا اندازه گیری شد. تیتراسیون نمونه های سرمی موش های واکسینه شده با rEIT به صورت گرو های خوراکی ، خوراکی تزریقی و تزریقی خالص میزان مطلوبی از IgG اختصاصی و نیز میزان قابل قبولی از آنتی بادی IgA را نشان داد.(شکل۴)



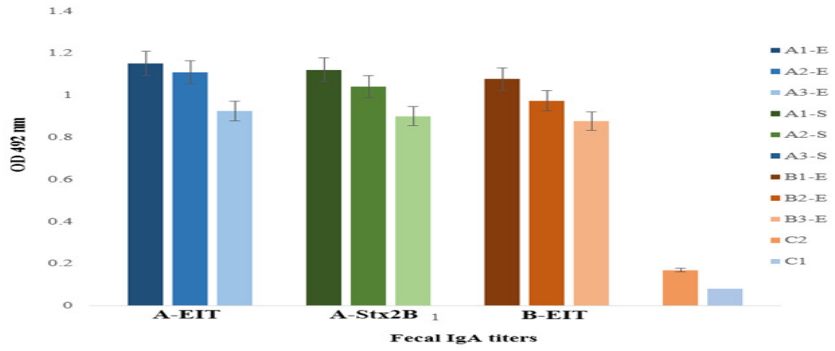
الف)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]



ب)



ج)

شکل۴: مقایسه بالاترین میزان تیتر الف) IgG سرمی ب) IgA سرمی، ج) IgA مدفوعی، در گروه های مختلف موشی

A1-E تیترآنتی بادی ضد(E)= rEIT در زیر گروه خوراکی، A2-E بررسی تیتر آنتی بادی ضد (E) درزیرگروه خوراکی- تزریقی، A3-E تیترآنتی بادی ضد (E) در زیر گروه تزریقی، A1-S تیتر آنتی بادی ضد (S)= Stx2B در زیر گروه خوراکی، A2- S بررسی تیتر آنتی بادی ضد (S) در زیر گروه خوراکی- تزریقی، A3-S تیترآنتی بادی ضد (S) در زیر گروه تزریقی، B1 تیتر آنتی بادی ضد (E) در زیر گروه خوراکی، B2-E بررسی تیتر آنتی بادی ضد (E) در زیر گروه خوراکی- تزریقی، B3-E تیترآنتی بادی ضد (E) در زیرگروه تزریقی.

چالش موش های ایمن وغیر ایمن در برابر دوز خوراکی باکتری *E. coli* O157:H7

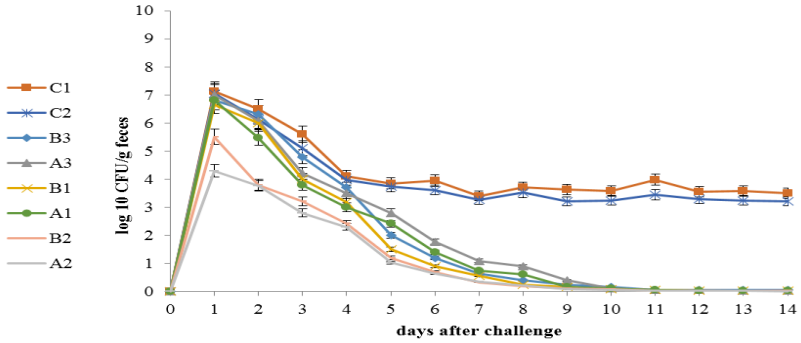
پس از آلوده کردن گروه های موشی و جمع آوری نمونه های مدفوعی و عصاره گیری و کشت روی محیط اختصاصی سوربیتول مک کانکی آگار کاهش ریزش باکتری ها در نمونه های مدفوعی موش های واکسینه و ایمن شده مشاهده شد (شکل ۵). سطح اختلاف معنی دار بین گرو های تست و کنترل (p <۰/۰۵) مشهود بود.

میزان محافظت در برابر سم stx2 با چالش حیوانی

در این چالش همه موش های گروه های کنترل و موش های 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 موش ها در گروه A (واکسینه شده با rEIT و rStx2B) توانستند پس از ده روز زنده بمانند (جدول ۲). سطح اختلاف معنی دار بین گروه های تست و کنترل موشی بر اساس آزمون دقیق فیشر (p <۰/۰۵) مشاهده شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]



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

جدول ۲: درصد زنده ماندن موش ها پس از چالش با سم Stx2باکتری

گروه های موشی ایمن وغیر 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

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 براثر بیمارهای اسهال جان خود را از دست می دهند (۱۱). مطالعه برروی *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). باتوجه 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 نوترکیبی را از فاکتورهای 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 برروی بهبود اثر بخشی واکسن ها به منظور ایجاد 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 کلوئیدی 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 نوترکیب 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 موثرتری 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

دارند. پیش ازاین امانی و همکاران این سازه سه قسمتی کایمریک 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). دعاوی و همکاران با انجام تحقیق برروی rEIT نانوپارتیکله 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 آنتی‌ژن‌ها به روش ترکیبی در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت. دراین مطالعه اندازه نانوذرات حاوی آنتی‌ژن در حد بسیار مطلوبی به دست آمد. بیشتر محققین در مورد اندازه مطلوب (۱۰۰ تا ۵۰۰) نانومتر به یک اتفاق نظر واحد رسیده‌اند که متأثر از ماهیت پلیمر می‌باشد (۲۰).

اندازه کوچک نانوذرات حاوی آنتی ژن و پتانسیل زتای مناسب نشان‌دهنده چسبندگی بهتر آن ها به سلول های مخاطی روده می باشد و با رهایش تدریجی آنتی ژن های نوترکیب از کیتوزان بدن فرصت کافی برای ایجاد ایمنی زایی مؤثرتر بر علیه پاتوژن ها پیدا خواهد کرد. در تهیه نانو ذرات استفاده ازماده شیمیاییTPP 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 زیرگروه های خوراکی- تزریقی در هر دو گروه واکسیناسیون A وB (rEIT همراه و بدون rStx2B) نسبت به سایر زیرگروه ها از ایمنی متناسب تری برخوردارند. در هر دو زیر گروه خوراکی- تزریقی سطح آنتی بادی های IgG و IgAدر 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 تعدادکلنی ها برروی محیط اختصاصی سوربیتول مک کانکی آگاردر طی دو هفته در تمام گروه های ایمن شده مشاهده شد. در صورتی که نمودار ریزش باکتری در مدفوع موش های غیر ایمن شیب ملایمی داشت و تا روز چهادهم 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 ازراه 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 فاکتور های 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 باکاهش ریزش مدفوعی در برابر فاکتورهای اتصالی 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 بهترکاندیدهای نانوواکسن چندگانه با دخیل کردن فاکتورهای مهم بیماری زای دیگر برعلیه *E. coli* O157:H7 لازم می باشد.

نتیجه گیری

کیتوزان به علت خاصیت غیر سمی و توانایی آسان شکل پذیری و اندازه مناسبش حامل مطلوبی در تهیه نانوواکسن ها محسوب می شود. استفاده از نانوواکسن 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

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

سپاسگزاری

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 می‌شود. در ضمن تمام منافع مالی توسط محققین پژوهش تأمین شده است.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 26| NO 10 | Jan 2019

Received: 27 Nov 2018
Accepted: 19 Jan 2019

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 khanifar[1], Ali Hatef Salmanian[*2], Reza Haji Hosseini[1], Jafar Amani[3], Rohoallah Kazemi[4]

Original Article

Introdution: *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

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

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

[5]Green Gene Company, Tehran, Iran.

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.473]