

طراحی و بیان نو ترکیب پروتئین ایمنی زای STX1B-IpaD از اشرشیاکلی آنتروهموراژیک و شیگلا

شادی مصدق^۱، حمید ابطحی^۲، جعفر امانی^۳، شهره زارع کاریزی^۴، علی هاتف سلمانیان^{۵*}

۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دکتری، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳- دکتری، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۴- دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران

۵- دکتری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۶۱-۱۴۹۶۵، تهران، ایران

salman@nigeb.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۵

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۸

چکیده

باکتری‌های شیگلا و اشرشیاکلی خونریزی‌دهنده از شایع‌ترین عوامل ایجادکننده اسهال‌های باکتریایی هستند و تاکنون واکسن کارآمدی علیه آنها تولید نشده است. با توجه به نقش پروتئین IpaD و دخالت زیر واحد B آنروتوکسین شیگلا (StxB) در بیماری‌زایی شیگلا و اشرشیاکلی خونریزی‌دهنده (*E. coli* O157:H7)، پروتئین کایمر حاوی STX1B-IpaD طراحی شد. هدف از این کار، کلون، بیان هترولوگ و خالص‌سازی پروتئین کایمریک STX1B-IpaD به‌عنوان کاندید واکسنی چندگانه علیه انواع گونه‌های شیگلا و *E. coli* O157:H7 است. ژن IpaD از یک ناقل نو ترکیب جداسازی شد (*NdeI/BamHI*) و در ناقل بیانی pET28a حاوی ژن STX1B زیرهمسانه‌سازی شد. سازه نو ترکیب به درون سویه بیانی *E. coli* Rosetta (DE3) منتقل و در حضور پلاسمید نو ترکیب در باکتری با روش PCR و هضم آنزیمی تایید شد. پروتئین نو ترکیب تولیدشده به وسیله روش SDS-PAGE و سترن‌بلات با آنتی‌بادی‌های استاندارد مورد تایید قرار گرفت. پروتئین نو ترکیب STX1B-IpaD با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی، تخلیص و غلظت آن با روش برادفورد اندازه‌گیری شد. نتایج PCR و هضم آنزیمی صحت کلونینگ را تایید کرد. الکتروفورز پروتئین نو ترکیب STX1B-IpaD نشان داد وزن مولکولی آن در حدود ۲۷ کیلودالتون می‌باشد. نتایج آزمون و سترن بلاتینگ تولید پروتئین نو ترکیب را تایید کرد. غلظت پروتئین تولید شده بیش از ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محیط کشت بود. یک روش موثر در تولید پروتئین‌های نو ترکیب، بهینه‌سازی کدونها و بیان در میزبان‌های هترولوگ است. پس از بررسی ایمنی‌زایی این پروتئین نو ترکیب، می‌توان از آن به‌عنوان کاندید واکسن کایمریک علیه باکتری‌های شیگلا و اشرشیاکلی خونریزی‌دهنده (EHEC) استفاده کرد.

کلید واژگان: شیگلا، *E. coli* O157:H7، آنتی‌ژن D پلاسمید تهاجمی IpaD، زیر واحد B سم شیگلا (STxB)

۱-مقدمه

بیماری اسهال به‌طور عمومی به‌عنوان بزرگترین علت مرگ و میر کودکان زیر پنج سال در سراسر جهان شناخته می‌شود. طبق گزارشات، اسهال تقریباً باعث مرگ ۱ کودک از هر ۵ کودک است و سالانه منجر به ۱/۶ میلیون مورد مرگ می‌شود [۱]. این بیماری بیشتر از مجموع ایدز، سرخک و مالاریا باعث مرگ کودکان خردسال می‌شود. شواهد متعددی نشان می‌دهد گونه‌های شیگلا و سویه‌های *اشرشیاکلی* انتروهموراژیک (*EHEC*) از مهم‌ترین عوامل مولد اسهال باکتریایی در سراسر جهان می‌باشند [۲].

باکتری شیگلا اولین بار توسط کیوشی شیگا در سال ۱۸۹۸ در ژاپن از افراد مبتلا به اسهال‌های خونی جداسازی شد [۳]. چهار سروتیپ مهم این باکتری از نظر بیماری‌زایی و بروز اپیدمی‌ها، شیگلا دیسانتری، شیگلا فلکسنری، شیگلا سونئی و شیگلا بوییدی هستند. اسهال خونی با عامل شیگلا در قالب موارد جدی و حاد بوده و در صورت عدم درمان به سرعت می‌تواند منجر به مرگ شود [۴]. فراوانی بالای شیگلا در کشورهای در حال توسعه به‌طور کلی به فقدان آب سالم، مراعات ضعیف اصول بهداشتی، سوء تغذیه و نیاز به درمان آنتی‌بیوتیکی گران نسبت داده می‌شود [۵]. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در شیگلا به‌طور قابل ملاحظه‌ای در حال افزایش است، به‌طوری که سازمان سلامت جهانی توسعه واکسن‌های ایمن و موثر در مقابل شیگلا را در اولویت قرار داده است [۶]. مکانیسم بیماری‌زایی این باکتری شامل دو مرحله اصلی است: (۱) اتصال و به دنبال آن کلونیزاسیون باکتری به سطح سلول‌های اپی‌تلیال روده کوچک که باعث تورم و ایجاد زخم‌های سطحی، تجمع پلی‌نوکلئوترها و بالاخره نکروز و خونریزی می‌شود که همراه با مدفوع دفع

می‌شود. (۲) باکتری با تولید سم شیگا به سلول‌های اپیتلیال روده بزرگ حمله کرده و سبب آماس و زخم‌هایی روی دیواره روده می‌شود که نتیجه آن نیز تشدید اسهال خونی است [۷].

باکتری مهم دیگر اشریشیاکلی است. این باکتری به‌عنوان یک عامل بسیار مهم در اسهال‌های باکتریایی شناسایی شده است. *EHEC* در میان گونه‌های اشریشیاکلی اسهال‌زا به‌عنوان عامل مهم در ایجاد اسهال اندمیک و اپیدمیک از طریق تولید سم در سراسر دنیا می‌باشد، که با تولید عوامل بیماری‌زای متعدد و از جمله ترشح سم شبیه شیگا موجب اسهال خونی می‌شود [۸]. اشریشیاکلی انتروهموراژیک^۱ سویه *O157H7* در انسان موجب بروز عفونت‌های روده‌ای، اسهال بدون خونریزی تا التهاب شدید روده و حتی سندروم خونریزی دهنده ادرار و در نهایت التهاب خونریزی دهنده روده بزرگ می‌شود [۹، ۱۰]. انتقال باکتری به انسان معمولاً از طریق آب و غذای آلوده بوده و اصلی‌ترین مخزن این باکتری روده گاو و گوسفند است. این باکتری با اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده میزبان، آسیب‌های تخریبی شدید (*Attaching and Effacing, A/E*) ایجاد و پس از اتصال با تولید اتروتوکسین *STX* آسیب‌زایی بیشتری ایجاد می‌کند [۱۱].

تحقیقات متعددی مشخص کرده‌اند که سم شبه شیگا (*shiga like toxin: STX*) در بیماری‌زایی سویه‌های *EHEC* و گونه‌های شیگلا نقش اساسی و مهمی را ایفا می‌کند [۱۲، ۱۳]. *STX* از خانواده سموم *AB5* است که شامل یک زیر واحد آنزیمی *A* (*STX-A*)، ۳۲ کیلودالتون) و پنج زیر واحد *B* یکسان (*STX-B*)، ۷،۷ کیلودالتون) است. زیر واحد *A* یک *N-RNA* گلیکوزیداز است که با جدا کردن *RNA* ریبوزومی *28S* ساخت پروتئین در سلول‌های آلوده را مهار

^۱ *Enterohemorrhagic Escherichia coli*

می‌کند و زیر واحد B مسئول اتصال به گیرنده‌های سلولی است [۱۴]. STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام گلیکواسفنگولیپید گلوبوتریوسیل سرامید (Gb3)، همچنین به‌عنوان CD77 شناخته می‌شود) متصل می‌شود. این گیرنده بر روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود [۱۵]. شیگاتوکسین ابتدا به واسطه زیر واحد B به گیرنده سطحی Gb3 مستقر در غشاء سلول اپیتلیال متصل شده و تشکیل یک کمپلکس پوشیده از مولکول کلاترین می‌دهد و طی فرایند اندوسیتوز به‌صورت یک وزیکول، به داخل سلول انتقال می‌یابد. بنابراین، تولید آنتی‌بادی علیه STxB و خنثی‌سازی آن می‌تواند از اتصال (به‌عنوان اولین قدم در کنترل باکتری) و ورود قسمت سمی (STxA) به درون سلول هدف جلوگیری کند [۱۵، ۱۶].

در بیماری‌زایی شیگلا پروتئین‌های IpaA/B/C/D/H که محصول یک پلاسمید تهاجمی در درون باکتری شیگلا می‌باشند، نقش اصلی را ایفا می‌کنند. کمپلکس ایجاد شده از سه پروتئین IpaB/C/D نقش حیاتی در اتصال به سلول‌های اپی‌تلیالی روده و گریز از فاگوزوم ماکروفاژها بازی می‌کند [۱۷]. در این میان، پلی‌پپتید IpaD یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای موجود در انواع شیگلا می‌باشد. به گونه‌ای که سرآغاز و گذرگاه همه فعالیت‌های تهاجمی شیگلا مرهون فعالیت کلیدی IpaD است [۱۸].

IpaD یک پروتئین ۳۷ کیلودالتونی، با یک ساختار دمبلی شکل است که دقیقاً در قسمت انتهایی (راس) سیستم سوزنی ترشحی نوع III از گونه‌ی شیگلا قرار دارد. IpaD برای تهاجم باکتری به سلول میزبان ضروری است. IpaD یک پروتئین چند کاره است که ترشح و عرضه پروتئین‌های IpaB و IpaC و همچنین نفوذ صحیح ناقل‌های پروتئینی به داخل سلول میزبان را در کنترل می‌کند [۱۹]. تفاوت بسیار اندکی بین ترادف ژنی IpaD و پروتئین آن در بین گونه‌های

شیگلا وجود دارد. پروتئین IpaD دارای سه ناحیه اصلی انتهایی آمین، ناحیه مرکزی و ناحیه انتهایی کربوکسیل می‌باشد. ناحیه انتهایی کربوکسیل IpaD یک ناحیه هیدروفوب بوده و عملاً در شرایط طبیعی در دسترس محیط نمی‌باشد. ناحیه مربوط به انتهایی آمینی از مولکول IpaD که در ورود باکتری به سلول‌های میزبان نقش دارد، به‌عنوان کاندیدای واکسن مورد توجه محققین می‌باشد [۲۰، ۲۱].

نتایج مطالعات در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که سم شیگا (STX) نقش مهمی در بیماری‌زایی باکتری/شریشیاکلی انتروهومورائیک و انتقال عوامل بیماری‌زا به سلول‌های میزبان دارند. همچنین، به نظر می‌رسد که پروتئین حاصل از امتزاج ژن‌های IpaD و StxB، می‌تواند اثر ایمنی‌زایی آنتی‌ژن StxB را افزایش دهد. بنابراین، پروتئین کایمیریک STX1B-IpaD می‌تواند به‌عنوان کاندیدی ایمن و کارا بررسی شده و برای توسعه واکسن جدید (واکسن نو ترکیب) علیه انواع گونه‌های شیگلا و EHEC استفاده شود. بنابراین، هدف از این مطالعه، کلون‌کردن، بیان هترولوگ و خالص‌سازی پروتئین کایمیریک STX1B-IpaD به‌برای ساخت یک کاندید واکسن موثر علیه انواع گونه‌های شیگلا و EHEC می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه برای ساخت کاست ژنی STX1B-IpaD، از ژن‌های IpaD و STX1B کلون شده در pET28a (پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) استفاده شد. برای ساخت کاست ژنی ابتدا واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های BamHI و NdeI بر روی ناقل pET-28a حاوی ژن IpaD انجام شد و در ادامه ناقل بیانی pET-28a-Stx1B نیز برای ساخت کاست ژنی نهایی با آنزیم‌های مورد اشاره برش داده شد. پس از هضم آنزیمی، قطعه ژنی IpaD و ناقل pET-28a-Stx1B برش خورده، از روی ژل آگارز تخلیص شد و واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 لیگاز انجام شد. در این

جدول ۱ مقادیر لازم برای انجام واکنش الحاق (Ligation) برای انتقال پلاسمید نوترکیب، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول اتصال (حاوی ناقل نوترکیب STX1B-IpaD) توسط روش شوک حرارتی به درون سلول‌های مستعد *E.coli* Rosetta (DE3) ترانسفرم شد.

۱-۲ بیان ژن مصنوعی STX1B-IpaD

از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کلرامفنیکل (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، تلقیح و پس از رسیدن OD باکتری به میزان ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (برای به‌دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القا کننده ایزوپروپیل تیو بتا-دی گالاتوزید (IPTG) از شرکت فرمنتاس با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده شد. برای بهینه‌سازی شرایط بیان، در بازه‌های زمانی دو ساعته از محیط کشت نمونه برداری انجام شد. سلول‌ها با سانتریفیوژ (۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها قبل و بعد از القاء با IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (شرکت فرمنتاس) تحت شرایط دناتوره و بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد، الکتروفورز شدند. پس از رنگ‌آمیزی با رنگ کوماسی بلو، ژل‌ها از لحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب ارزیابی شدند.

۲-۲ وسترن بلائینگ پروتئین نوترکیب STX1B-IpaD

برای تایید پروتئین نوترکیب بیان شده از روش وسترن بلائینگ با آنتی‌بادی ضد 6XHis-tag استفاده شد. برای انجام این روش از بافر الکترو بلائینگ، بافر PBS، بافر T/PBS، محلول DAB، بافر تثبیت کننده و آنتی‌بادی علیه دنبا له هیستیدینی متصل به HRP (Anti His tag HRP-conjugate) با رقت (۱:۲۰۰۰) شرکت سیگما استفاده شد. پس از بیان پروتئین STX1B-IpaD و نمونه شاهد (کلنی باکتری بدون

مطالعه واکنش الحاق بین ناقل pET-28a-Stx1B و ژن IpaD در شرایط دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و مدت ۱۸ ساعت طبق روش ارائه شده در جدول ۱ انجام شد. برای متوقف کردن واکنش، مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای حصول اطمینان از کیفیت پلاسمید نوترکیب ساخته شده، واکنش تکثیر ژنی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی T7 (پرایمرهای مربوط به پروموتور و خاتمه دهنده) و واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *BamHI* و *NdeI* انجام شد.

برای تکثیر ژن زمان واکنش اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و برای تکثیر ژن از ۳۰ چرخه تکثیر، دمای واسرشت به مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و دمای اتصال به مدت ۱ دقیقه در ۶۶ درجه سانتی‌گراد و دمای طول شدن در هر چرخه به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. در نهایت دمای طول شدن پایانی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

برای برش پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های برشی، مقادیر یک میکروگرم از پلاسمید نوترکیب و پنج واحد (معادل نیم میکرولیتر) از آنزیم‌های برشی در حجم نهایی ۳۵ میکرولیتر در محیط بافری مناسب با یکدیگر مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم آنزیمی انجام شد. در نهایت محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد جدا سازی شد.

ناقل هضم شده pET28a-STX1B	19.5µl
Insert-IpaD	10 µl
T4 (10 X) بافر برای آنزیم	3.5 µl
آنزیم T4-DNA-Ligase (1u/µl)	2 µl
حجم نهایی	35 µl

القاء) بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ در صد الکتروفورز شد و سپس با استفاده از تانک بلاتینگ (۴۵ دقیقه و ولتاژ ۷۵) به روی غشاها نیتروسولوزی (که به ابعاد ژل ها بریده شده بود) منتقل شدند. سپس، غشاء نیتروسولوزی حاوی پروتئین ها به مدت ۲ ساعت، در داخل بافر بلاکینگ شناور و سپس با بافر TBS / T (بافر TBS همراه با توئین ۰,۰۵ در صد) شسته شو داده شدند.

با توجه به پروتئین انتقالی به غشا نیتروسولوزی، آنتی بادی ها با رقت مناسب در داخل بافر TBS / T تهیه و روی کاغذهای نیتروسولوز ریخته شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد روی دستگاه لرزاننده قرار گرفتند. پس از شستشو (۳ بار با بافر TBS / T و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه)، آنتی بادی با رقت مناسب در داخل بافر TBS / T تهیه و روی کاغذهای ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد روی دستگاه لرزاننده قرار گرفتند. دوباره شستشو با بافر TBS/T و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و در نهایت پس از سه بار شست و شو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سویترا (بافر تریس ۵۰ میلی مولار، حاوی ۶ میلی گرم DAB، ۱۰ میکرولیتر H₂O₂) استفاده شد. پس از انجام واکنش ظهور باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولوزی، واکنش با استفاده از H₂O متوقف شد.

۳-۲ تخلیص پروتئین نو ترکیب STX1B-IpaD

تخلیص پروتئین نو ترکیب STX1B-IpaD توسط ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA و تحت شرایط دناتوره انجام شد. ۵۰ میلی لیتر باکتری *E. coli* Rosetta (DE3) دارای پلاسمید pET28a نو ترکیب، ۵ ساعت پس از القاء با IPTG در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب باکتری در ۱ میلی لیتر محلول تخریب کننده (در شرایط دناتوره) حل و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی دستگاه لرزاننده قرار داده شدند. پس از سانتریفیوژ، محلول های

شفاف رویی بر روی ستون های Ni-NTA اضافه شدند. ستون ها به ترتیب با ۲ میلی لیتر بافر شستشو (pH:5.7) و سپس با ۲ میلی لیتر بافر استخراج (pH:4.5) شستشو و خروجی ها جمع آوری شدند. نمونه های خروجی ستون ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند.

۲-۴ تعیین غلظت پروتئین نو ترکیب STX1B-IpaD

برای تعیین غلظت پروتئین به دست آمده از روش برادفورد استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد، از غلظت های مختلف و مشخص از پروتئین BSA استاندارد استفاده شد. پس از تهیه هر یک از محلول های مورد نظر، جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و با نرم افزار Microsoft Excel منحنی استاندارد آن رسم و شیب خط مشخص شد. با استفاده از منحنی استاندارد غلظت پروتئین بیان شده محاسبه شد.

۳-۳ نتایج

برای تایید حضور قطعه *STX1B-IpaD* در ناقل بیانی pET28a از هضم آنزیمی توسط آنزیم های محدود الاثر *BamHI* و *NdeI* استفاده شد. سپس، قطعه مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی و وجود پلاسمید حاوی ژن *STX1B-IpaD* در باکتری تایید شد.

۳-۱ تایید حضور ژن سنتز شده STX1B-IpaD توسط Colony PCR

با استفاده از روش PCR حضور ژن مورد نظر در پلاسمید تایید شد. قطعه ژنی *STX1B-IpaD* (حدود ۶۵۰ جفت باز) روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد (شکل ۱).

۳-۲ بهینه سازی شرایط بیان ژن نو ترکیب STX1B-IpaD

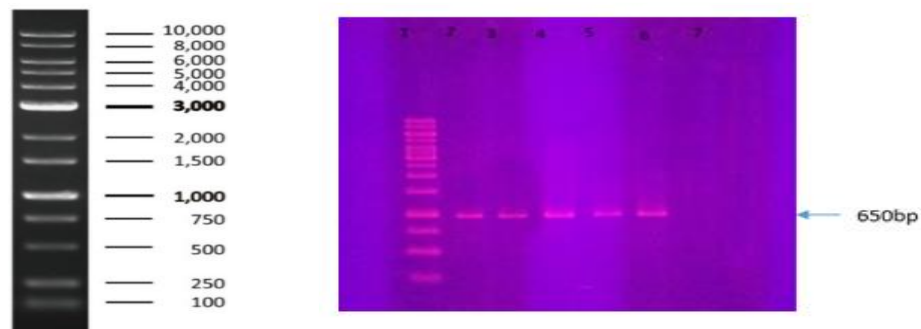
بهینه سازی شرایط بیانی قطعه ژنی *STX1B-IpaD* موجود در پلاسمیدهای باکتری اشریشیا کلی Rosetta (DE3) پس از کشت شبانه در محیط کشت LB حاوی کانامایسین و کلرامفنیکل (ژن های مقاومت روی پلاسمید) در ساعات

بیان پروتئین‌ها در باکتری‌های حاوی ناقل نوترکیب، قبل و پس از القاء با IPTG و همچنین بررسی مراحل خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده، از روش الکتروفورز پروتئین‌ها بر وی ژل SDS-PAGE استفاده شد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود پس از رنگ‌آمیزی ژل مذکور به روش کوماسی بلو نتایج زیر حاصل شد.

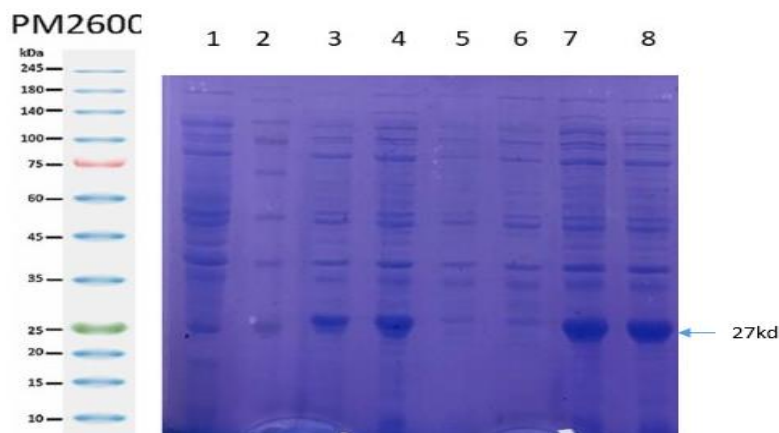
مختلف انجام شد. برحسب محاسبات انجام شده، مشخص شد که وزن مولکولی پروتئین STX1B-IpaD حدود ۲۷ کیلو دالتون می‌باشد (شکل ۲). بهترین شرایط بیانی پس از کشت شبانه برای STX1B-IpaD به دست آمد.

۳-۳ تخلیص پروتئین نوترکیب STX1B-IpaD به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA

تخلیص پروتئین نوترکیب نشان دار شده با 6x His بوسیله کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA انجام شد. برای مقایسه

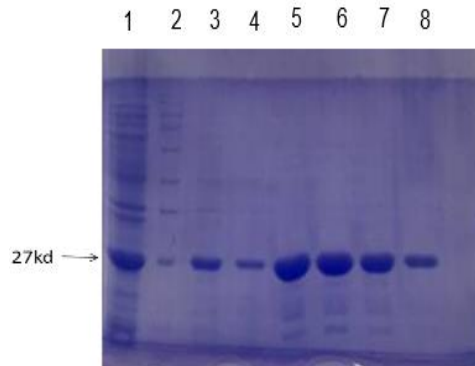
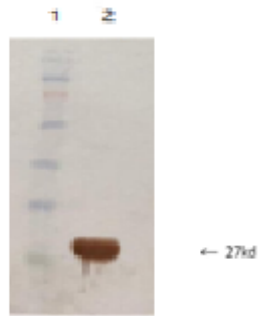


شکل ۱ تصویر حاصل از ژن نوترکیب STX1B-IpaD روی ژل آگاروز ۱درصد. ستون ۱: مارکر DNA؛ ستون ۲، ۳، ۴، ۵، ۶: باند حاصل از PCR ژن نوترکیب STX1B-IpaD با پرایمر T7؛ ستون ۷: کنترل منفی (پلاسمید خالی)



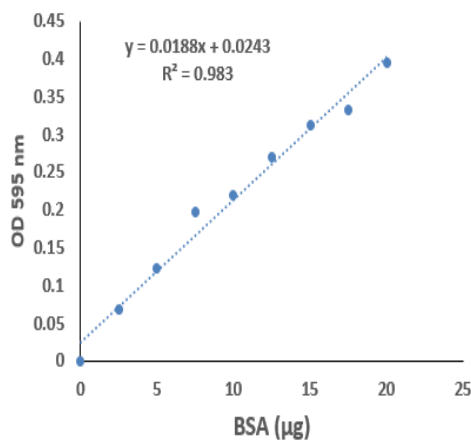
طراحی و بیان نوترکیب ... _____ مصدق و همکاران

شکل ۲ بررسی بیان پروتئین نوترکیب *STX1B-IpaD* که بر روی کلونی‌های مختلف و در شرایط دمایی متفاوت انجام شده است. ستون ۱: نمونه قبل از القا ستون ۲: نشانگر وزن ملکولی پروتئین ستون‌های ۳ و ۴ کلونی شماره ۲ بعد از ۲ و ۱۶ ساعت بعد از القا. ستون‌های ۵ و ۶: کلونی شماره ۳ بعد از ۲ و ۱۶ ساعت بعد از القا. ستون‌های ۷ و ۸: کلونی شماره ۴ بعد از ۲ و ۱۶ ساعت بعد از القا غلظت پروتئین نوترکیب با منحنی استاندارد ارز یابی شد (شکل ۵). غلظت پروتئین نوترکیب *STX1B-IpaD* بیش از ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محیط کشت تعیین شد.



شکل ۳ بررسی خالص‌سازی پروتئین نوترکیب *STX1B-IpaD* (۲۷ کیلودالتون) بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد؛ ستون ۱: سلول لیز نشده؛ ستون ۲: نشانگر اندازه پروتئین؛ ستون ۳: خروجی ستون (flow)؛ ستون شماره ۴: شستشوی ستون با بافر شستشو (Washing Buffer)؛ ستون ۵ و ۶ و ۷: شستشوی ستون با بافر استخراج (Elution Buffer)؛ ستون ۸: شستشوی ستون با بافر احیاکننده (MES)

شکل ۴ تأیید پروتئین نوترکیب *STX1B-IpaD* بیان شده با استفاده از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد برچسب هیستیدین.



شکل ۵ نمودار استاندارد برادفورد. در این نمودار، محور عمودی جذب نوری در طول موج ۵۲۵ نانومتر و محور افقی (x) مقدار پروتئین استفاده شده در اندازه‌گیری برحسب میکروگرم است. این

۳-۴ آنالیز وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی ضد His-tag

تأیید محصول پروتئینی نوترکیب *STX1B-Ipa* با استفاده از روش وسترن بلاتینگ انجام شد. در این روش از آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدینی (Anti-His Tag) که در انتهای پروتئین نوترکیب وجود دارد استفاده شد. از آنجا که روش SDS-PAGE تنها تولید پروتئینی، با وزن مولکولی معین را نشان می‌دهد، برای اطمینان از صحت پروتئین‌های تولیدشده، از روش وسترن بلاتینگ استفاده شد. نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین‌های نوترکیب خالص شده، بر روی کاغذ نیتروسولوز در شکل ۴ نشان داده شده است.

۳-۵ تعیین غلظت پروتئین‌های نوترکیب *STX1B-IpaD*

برای به‌دست آوردن غلظت محصول پروتئینی با روش برادفورد، ابتدا منحنی استاندارد با استفاده از BSA تهیه و

نمودار مبنای محاسبه غلظت محلول‌های پروتئینی قرار گرفته است. معیار R^2 دقت اندازه‌گیری‌ها برای تشکیل نمودار خطی درجه اول را نشان می‌دهد که هرچه مقدار آن به عدد یک نزدیکتر باشد، دقت اندازه‌گیری بالاتر است.

۴- بحث

عوامل بیماری‌زای روده‌ای مختلف می‌تواند در ایجاد عفونت‌های روده‌ای و بیماری‌های اسهالی نقش داشته باشد. این موضوع یکی از مهمترین عوامل مرگ‌ومیر در کودکان زیر ۵ سال است [۲۳]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که باکتری شیگلا و اشرشیاکلی انتروهوموراژیک سوویه *EHEC* O157:H7 مهم‌ترین عوامل مولد اسهال باکتریال در سراسر جهان می‌باشند. انتقال این عفونت‌ها به‌طور عموم به‌صورت مدفوعی-دهانی روی می‌دهد. این انتقال ممکن است از طریق مصرف آب یا غذای آلوده یا به‌صورت مستقیم باشد [۲۴]. با توجه به اهمیت این دو باکتری در ایجاد بیماری‌های اسهالی، می‌توان با جلوگیری از بیماری‌زایی این دو باکتری بخش از اسهال‌ها با منشاء باکتری و به‌ویژه در جوامع در حال رشد را کنترل کرد. با توجه به اهمیت این باکتری‌ها، چنانچه بتوان واکسنی تولید کرد که توانایی مقابله با این باکتری‌ها را به‌صورت هم‌زمان داشته باشد، گامی ارزشمند در برای مقابله با بیماری اسهال به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه برداشته شده است.

نقش پروتئین IpaD در تهاجم، بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط گونه‌های شیگلا توسط محققین مختلف بررسی و تایید شده است. به‌علاوه، ناحیه N-ترمینال IpaD به‌عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری شیگلوز مورد توجه دانشمندان می‌باشد [۲۵]. از سویی دیگر، یکی دیگر از فاکتورهای بیماری‌زای اصلی در شیگلا و همچنین باکتری *E. coli* O157:H7، انترتوکسین شیگلا (STx) است. بررسی

های مختلف نشان داده است که بخش B از سم شیگلا می‌تواند نقش اصلی را در اتصال سم به سلول‌های بدن و ورود بخش سمی (A) به داخل سلول‌ها بازی کند. به نظر می‌رسد که مقابله با بخش B توکسین می‌تواند اثرات بیماری‌زایی این سم را در مراحل اولیه (اتصال) کنترل کند. علاوه بر آن، مطالعات انجام شده نقش آنتی‌ژنی، حاملی و ادجوانتی STxB را تایید کرده‌اند [۲۶]. در این مطالعه، به کلونینگ، بیان و خالص‌سازی پروتئین کایمیریک *STX1B-IpaD* برای ساخت کاندید واکسن یا بخشی از یک کاندید واکسن موثر علیه انواع گونه‌های شیگلا و *E. coli* O157:H7 پرداخته شده است. نتایج این پژوهش نشان داد، وزن مولکولی پروتئین طراحی شده *STX1B-IpaD* حدود ۲۷ کیلودالتون و در محدوده وزنی مورد انتظار روی ژل پلی اکریلامید بود. بهترین شرایط بیانی پس از کشت شبانه (حدود ۱۶ ساعت) برای تولید آنتی‌ژن نوترکیب *STX1B-IpaD* به‌دست آمد. به‌علاوه، خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از ترادف هیستیدینی تعبیه شده در انتهای ترادف ژنی با موفقیت و کار آیی بالا انجام شد. شنا سایی پروتئین تخلیص شده با آنتی‌بادی ضد ترادف هیستیدینی درستی و بیان پروتئین به‌صورت کامل را نشان داد. بیان موثر و خالص‌سازی موفق منجر شد که مقادیر بسیار بالایی از این پروتئین نوترکیب تولید و خالص‌سازی شود. وجود مقادیر بالا در تولید پروتئین‌های نوترکیب همواره به‌عنوان یکی از چالش‌های تولید این پروتئین‌ها مطرح بوده است.

طی مطالعه‌ای که توسط Picking و همکاران انجام شد بر نقش حیاتی *IpaD* در حمله باکتری شیگلا به سلول میزبان، ایجاد منفذ ورودی برای انتقال عوامل بیماری‌زا به سلول میزبان و بیماری‌زایی توسط باکتری تاکید شده است. آنها مشاهده کردند که ناحیه N-ترمینال پروتئین *IpaD* نقش مهمی در این فرایندها ایفا می‌کند [۲۷]. این یافته‌ها نقش و

اهمیت این پروتئین به عنوان یک بخش از کاندید واکسن موثر علیه شیگلا را نشان داد. اما ایمنی زایی نسبتاً پایین و تحریک کم سیستم ایمنی میزبان از عمده ترین مشکل این ناحیه از این پروتئین برای طراحی و ساخت یک کاندید واکسن مناسب برای مبارزه با شیگلوز می باشد. در این راستا، طبق مطالعه‌ای که بر روی *STxB* انجام شد، مشخص شده است که این پروتئین قادر است سیستم ایمنی را به صورت عمومی تحریک کرده و منجر به تقویت نسبی سیستم ایمنی شود [۲۸]. به عبارت دیگر، این بخش متصل شده به آنتی ژن *IpaD* می تواند نقش "ادجوانت زیستی" را برای عرضه مناسب تر آنتی ژن به سیستم ایمنی بازی کند. از سویی دیگر، مقدار آنتی ژنی که در حالت متصل شده با یک ادجوانت برای مصرف ضروری است کمتر از مقداری است که به صورت تجویز هم زمان و جداگانه برای ایمنی زایی استفاده می شود. این مسئله نشان دهنده مزیت فیوژن کردن آنتی ژن ها با ادجوانت های مختلف و به ویژه ادجوانت های زیستی است. در سال های اخیر نیز توجه به این مدل از واکسن ها بسیار زیاد شده است [۲۹-۳۱].

با توجه به شباهت هایی که در مکانیسم بیماری زایی در باکتری شیگلا و اشریشیاکلی خونریزی دهنده (*EHEC*) وجود دارد، تلاش های زیادی برای ساخت واکسن توام علیه بیماری های شیگلا و *E. coli O157:H7* انجام و کاندیداهای متعددی نیز در این زمینه گزارش شده است [۲۱، ۳۲، ۳۳]. نکته قابل توجه این است که هیچ یک از این کاندید واکسن ها به دلایل مختلف تا امروز مورد تائید سازمان های جهانی نظیر سازمان بهداشت جهانی (WHO) یا سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) قرار نگرفته است. اما تلاش ها برای ساخت واکسن علیه این دو باکتری مهم به طور جدی ادامه دارد. در سال های اخیر برای ایجاد واکسن مناسب برای شیگلا پروتئین کایمیریک *IpaD-STxB* و نیز پروتئین های

IpaD و *STxB* تولید شده و به عنوان واکسن خوراکی و همچنین تزریق مورد استفاده و مطالعه قرار گرفته است. به عنوان مثال، هنری و همکاران توالی پروتئین *IpaD-STxB* را در پلاسמיד *pET28a* کلون و در باکتری *DE3* تولید کردند. نتایج *SDS-PAGE* در این پژوهش با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت داشته و پروتئین با حدود وزن ۲۴،۳ کیلودالتون را مشاهده کرده و با روش وسترن بلا تینگ وجود پروتئین را اثبات کردند [۲۶]. در مطالعه ای دیگر که توسط ساداتی و همکاران انجام شد، گزارش شد که تولید یک واکسن موثر علیه شیگلا بر اساس استفاده از *IpaD* و مشتقات عملکردی آن موفقیت آمیز بوده است [۳۴]. همچنین، پروتئینی نو ترکیب حاوی *LPS*، *IpaB* و *IpaC* بر علیه شیگلا تولید شد که توانست موش ها (و نه خوکچه هندی به عنوان حیوان مدل اصلی) را با این کاندید واکسن در برابر باکتری شیگلا مصون کند [۳۵]. در سال ۲۰۱۳ *Martiz-Becerra* و همکاران پروتئین نو ترکیبی حاوی *IpaD* و *IpaB* علیه شیگلا فلکسنری تولید کردند و توانستند موش ها را با این واکسن تزریقی در برابر شیگلا مصون کنند [۳۶]. علاوه بر این، در یک مطالعه واکسن خوراکی از *IpaD* و *IpaB* علیه شیگلا طراحی و ایمنی زایی و اثر حفاظتی این دو پروتئین بررسی شد. در این بررسی مشخص شد که مصرف خوراکی *IpaD* و *IpaB* ایمنی زایی بیشتری نسبت به حالت تجویز از طریق بینی (*Intranasal*) دارد [۳۷]. همچنین، گزارش شده است که با تولید آنتی ژن های *STxB-IpaD* و *STxB* در باکتری *E. coli Rosetta (DE3)* و بررسی ایمنی زایی آن از طریق تنفسی در موش و خوکچه هندی به عنوان کاندیدای واکسن علیه بیماری شیگلوز مطرح می باشد [۳۸، ۳۹]. مطالعات و بررسی های گوناگون و گسترده ای در مورد اثر بخشی و کاربرد پروتئین *STxB* انجام است. با توجه به این نتایج، این ژن با هدف های مختلف در سیستم های متعددی، از *E. coli* گرفته

بر روی حیوانات مدل، به نظر می‌رسد پروتئین نوترکیب *STX1B-IpaD* می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن نوترکیب یا بخشی از واکسن موثر بر علیه انواع شیگلا و *E. Coli O157:H7* باشد.

۶- منابع

- [1] Nasrin S, Garbern SC, Gaine M, Kanekar S, Monjory M, Ahmed D, et al. Clinical, Sociodemographic and Environmental Risk Factors for Acute Bacterial Diarrhea among Adults and Children over Five Years in Bangladesh. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2021.
- [2] Manetu WM, M'masi S, Recha CW. Diarrhea disease among children under 5 years of age: a global systematic review. Open Journal of Epidemiology. 2021;11(3):207-21.
- [3] Lampel KA, Formal SB, Maurelli AT. A brief history of Shigella. EcoSal Plus. 2018;8.(۱)
- [4] Schnupf P, Sansonetti PJ. Shigella pathogenesis: new insights through advanced methodologies. Microbiology spectrum. 2019;7(2):7.2. 28.
- [5] Baker S, The HC. Recent insights into Shigella: a major contributor to the global diarrhoeal disease burden. Current opinion in infectious diseases. 2018;31(5):449.
- [6] Ranjbar R, Farahani A. Shigella: antibiotic-resistance mechanisms and new horizons for treatment. Infection and drug resistance. 2019;12:3137.
- [7] Mattock E, Blocker AJ. How do the virulence factors of Shigella work together to cause disease? Frontiers in cellular and infection microbiology. 2017;7:64.
- [8] Kim J-S, Lee M-S, Kim JH. Recent updates on outbreaks of Shiga toxin-producing Escherichia coli and its potential reservoirs. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020:273.
- [9] Saeedi P, Yazdanparast M, Behzadi E, Salmanian AH, Mousavi SL, Nazarian S, et al. A review on strategies for decreasing E. coli O157: H7 risk in animals. Microbial pathogenesis. 2017;103:186.۹۰-
- [10] Ameer MA, Wasey A, Salen P. Escherichia Coli (E Coli 0157 H7). 2018.
- [11] Nawrocki EM, Mosso HM, Dudley EG. A toxic environment: a growing understanding of how microbial communities affect Escherichia coli O157: H7 Shiga toxin expression. Applied and environmental microbiology. 2020;86(24):e00509-20.

تا انواع گیاهان نظیر کاهو همسانه سازی و بیان شده است [۴۰، ۴۱]. برای افزایش ایمنی‌زایی مخاطی علیه *STxB* تحقیقات متعددی انجام شده است. در یکی از این مطالعات پروتئین تخلیص شده *STxB* را به کمک میکروسفرهای لیپیدی مصنوعی و از طریق بینی تلقیح کردند که نتایج آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی مخاطی و بالا بردن ترشح IgA را نشان می‌داد [۴۲]. در این راستا، در یک مطالعه اولیه ژن *stxB* در باکتری *E. coli* کلون شده و بیان آن بررسی شد. ایمن‌زایی ناشی از آن نشان داد که این ایمنی می‌تواند بر علیه عملکرد سم شیگلا در باکتری / شریشیاکلی خونریزی دهنده موثر باشد. [۴۳]. با توجه به این یافته‌ها ساخت یک کاندید واکسن استنشاقی از طریق خالص سازی پروتئین *STxB* و تلقیح آن به صورت تنفسی نیز انجام شد [۴۴، ۴۵]. علاوه بر نقش مولکول *STxB* در سیستم ایمنی، به دلیل اتصال اختصاصی این مولکول با گیرنده Gb3 که بر روی اکثر سلول‌های سرطانی هم وجود دارد، امروزه برای انتقال داروهای ضد سرطان به این سلول‌ها و کاهش اثرات سوء شیمی درمانی توجه محققین بسیاری را به خود جلب کرده است [۴۶].

۵- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مراحل طراحی، کلونینگ ژن با موفقیت انجام شده است. همچنین، نتایج کلونی PCR و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده نشان داد که توالی مورد نظر به درون ناقل بیانی باکتریایی به درستی کلون شده است. در مرحله بعد بیان پروتئین توسط روش های SDS-PAGE و وسترن بلات تایید شد. فرایند تخلیص نیز با ستون حاوی رزین نیکل از کیفیت قابل قبولی برخوردار بود. با توجه به نتایج پژوهش و با در نظر گرفتن میزان خلوص پروتئین نوترکیب *STX1B-IpaD* تولید شده و در ادامه با بررسی ایمنی‌زایی این پروتئین نوترکیب در مطالعات

- STxB in the mice. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2014;23(109):183-93.
- [27] Picking WL, Nishioka H, Hearn PD, Baxter MA, Harrington AT, Blocker A, et al. IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infection and immunity*. 2005;73(3):1432-40.
- [28] Masoudi Kerahroudi M, Honari H. Expression of B1f1-Stx B gene cassette in *E. coli* and investigation antibody titer in mice. *SSU_Journals*. 2017;24(11):876-86.
- [29] مصدق و همکاران. Immunogenic evaluation of nasal administration of conjugated IpaD with Co1 and STxB ligands against *E. coli* O157: H7 in mice. فصلنامه علمی ژنتیک نوین. ۲۰۱۹؛ ۴(۲): ۱۲۵-۳۴۴.
- [30] Baranvand M, Honari H. Evaluation of Immunogenicity of Chitosan Nanoparticles Containing STxB and STxB-IpaD Antigens of *Shigella Dysenteriae* Type 1 in Mice. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2016;23(4):688-97.
- [31] Rahjerdi AK, Jafari M, Motamedi MJ, Amani J, Salmanian AH. Immunogenic Evaluation of Bivalent Vaccine Candidate against Enterohemorrhagic and Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Immunology*. 2019;16(3):200-11.
- [32] Khanifar J, Hosseini RH, Kazemi R, Ramandi MF, Amani J, Salmanian AH. Prevention of EHEC infection by chitosan nano-structure coupled with synthetic recombinant antigen. *Journal of microbiological methods*. 2019;157:100-7.
- [33] Tarahimofrad H, Nazarian S, Meimandipour A. Expression and purification of recombinant immunogenic protein containing *Shigella dysenteriae* Virulence Factors. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2020;33(4):536-47.
- [34] Saadati M, Heiat M, Nazarian S, Barati B, Honari H, Doroudian M, et al. Cloning and Expression of N-terminal Region of IpaD from *Shigella dysenteriae* in *E. coli*. 2010.
- [35] Davis R, Marquart ME, Lucius D, Picking WD. Protein-protein interactions in the assembly of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens IpaB and IpaC into protein complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1998;1429(1):45-56.
- [36] Martinez-Becerra FJ, Scobey M, Harrison K, Choudhari SP, Quick AM, Joshi SB, et al. Parenteral immunization with IpaB/IpaD protects mice against lethal pulmonary infection by *Shigella*. *Vaccine*. 2013;31(24):2667-72.
- [12] Liu Y, Tian S, Thaker H, Dong M. Shiga toxins: an update on host factors and biomedical applications. *Toxins*. 2021;13(3):222.
- [13] Joseph A, Cointe A, Mariani Kurkdjian P, Rafat C, Hertig A. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: A narrative review. *Toxins*. 2020;12(2):67.
- [14] Lee M-S, Tesh VL. Roles of Shiga toxins in immunopathology. *Toxins*. 2019;11(4):212.
- [15] Kavaliauskiene S, Dyve Lingelem AB, Skotland T, Sandvig K. Protection against Shiga toxins. *Toxins*. 2017;9(2):44.
- [16] Melton-Celsa AR. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiology spectrum*. 2014;2(4):2.4. 06.
- [17] Muthuramalingam M, Whittier SK, Picking WL, Picking WD. The *Shigella* Type III Secretion System: An Overview from Top to Bottom. *Microorganisms*. 2021;9(2):451.
- [18] Bajunaid W, Haidar-Ahmad N, Kottarampatel AH, Ourida Manigat F, Silué N, F Tchagang C, et al. The T3SS of *Shigella*: expression, structure, function, and role in vacuole escape. *Microorganisms*. 2020;8(12):1933.
- [19] Espina M, Olive AJ, Kenjale R, Moore DS, Ausar SF, Kaminski RW, et al. IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. *Infection and immunity*. 2006;74(8):4391-400.
- [20] Jneid B, Rouaix A, Féraudet-Tarisse C, Simon S. SipD and IpaD induce a cross-protection against *Shigella* and *Salmonella* infections. *PLoS neglected tropical diseases*. 2020;14(5):e0008326.
- [21] Khalouie F, Mousavi SL, Nazarian S, Amani J, Pourfarzam P. Immunogenic evaluation of chimeric recombinant protein against ETEC, EHEC and *Shigella*. *Molecular Biology Research Communications*. 2017;6(3):101.
- [22] Schmidt MA. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular microbiology*. 2010;12(11):1544-52.
- [23] Vecchio AL, Conelli ML, Guarino A. Infections and chronic diarrhea in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2021;40(7):e255-e8.
- [24] Ragupathi ND, Sethuvel DM, Inbanathan F, Veeraraghavan B. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies. *New microbes and new infections*. 2018;21:58-62.
- [25] Dey S, Chakravarty A, Guha Biswas P, De Guzman RN. The type III secretion system needle, tip, and translocon. *Protein Science*. 2019;28(9):1582-93.
- [26] Honari H, Amlashi I, Minaei ME. Expression of recombinant proteins IpaD-STxB and immunogenicity

- [42] Kurohane K, Kobayashi C, Imai Y. Facilitated Production of Secretory IgA against Shiga Toxin B Subunits by Intranasal Application of Antigen-Coated Polystyrene Microspheres. *Microbiology and immunology*. 2005;49(2):149-54.
- [43] Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B, et al. Protection against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008;15(2):359-66.
- [44] Madanchi H, Honari H, Hesarak M, Sayadnanesh A. Cloning and expression of stxB Gene from *Shigella dysenteriae* Gype I in *E. coli* Rosseta DE3. 2012.
- [45]. Gupta P, Singh MK, Singh Y, Gautam V, Kumar S, Kumar O, et al. Recombinant Shiga toxin B subunit elicits protection against Shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. *Vaccine*. 2011;29(45):8094-100.
- [46] Robert A, Wiels J. Shiga Toxins as Antitumor Tools. *Toxins*. 2021;13(10):690.
- [37] Heine SJ, Diaz-McNair J, Martinez-Becerra FJ, Choudhari SP, Clements JD, Picking WL, et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of orally delivered *Shigella* type III secretion system proteins IpaB and IpaD. *Vaccine*. 2013;31(28):2919-29.
- [38] Baranvand M, Honari H. Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats. *Koomesh*. 2015;16.(۳)
- [39] Honari H, Amlashi I, Minaee ME, Safaee S. Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2013;16(4):83-93.
- [40] Chaghakaboodi Z, Abbasi A, Honari H, Orzaez D, Mehrizi F, Alizadeh H. Expression of chimeric protein coding IpaD+ stxB in *E. coli* and lettuce. *Iranian Journal of Field Crop Science*. 2019;50.(۲)
- [41] Kordbacheh E, Nazarian S, Hajizadeh A, Fasihi-Ramandi M, Fathi J. Recombinant HcpA-EspA-Tir-Stx2B chimeric protein induces immunity against attachment and toxicity of *Escherichia coli* O157: H7. *Microbial pathogenesis*. 2019;129:176-82.

Design and recombinant expression of STX1B-IpaD immunogenic protein from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella*

Shadi Mosadegh¹, Hamid Abtahi², Jafar Amani³, Shohreh Zare Karizi⁴, Ali Hatef Salmanian^{5*}

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3. Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences
4. Department of Biology, Varamin Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Varamin, Iran
5. Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)

salman@nigeb.ac.ir

Receipt: 2022/06/08

Accepted: 2022/09/06

Abstract

Shigella and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* are among the most common causes of bacterial diarrhea, and no effective vaccine candidate for these bacteria have approved yet. Due to the role of IpaD protein and *Shigella* enterotoxin B subunit (StxB) in *Shigella* and *E. coli* O157: H7 pathogenicity, STX1B-IpaD chimeric protein can be used as a suitable molecule to produce a recombinant vaccine candidate. This study aimed to clone, express, and purify STX1B-IpaD chimeric protein to develop an effective vaccine candidate against *Shigella* and *E. coli* O157: H7 species. IpaD gene with NdeI and BamHI restriction enzyme sites was isolated from a recombinant vector and subcloned into the pET28a -STX1B expression vector. Vector was transferred to *E. coli* strain Rosetta (DE3) and confirmed by PCR and restriction enzyme digestion. SDS-PAGE and western blotting were used to confirm the recombinant protein. The recombinant STX1B-IpaD protein was purified by affinity chromatography, and its concentration was measured by the Bradford method. The PCR and restriction enzyme digestion showed the accuracy of the gene cloning. The protein electrophoresis showed the proper expression and correct molecular weight (27 kDa) of STX1B-IpaD. The western blot analysis confirmed the recombinant protein. The recombinant protein concentration was estimated at more than 0.3 gr/L. An effective method for the production of recombinant proteins is codon optimization and effective expression in heterologous hosts. After the immunogenicity in the animal model, this recombinant protein can be used as a chimeric vaccine candidate against *EHEC* and *Shigella* bacteria.

Keywords: *Shigella*; *E. coli* O157:H7; invasion plasmid antigen D (IpaD), *Shigella* enterotoxin B subunit (StxB)