

بیان، تخلیص و ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین کایمر در بردارنده نواحی ایمونوژن از فلاژلین و اینتیمین علیه باکتری *E.coli* O157:H7

حسین سمیعی ایبانه (M.Sc)، شهرام نظریان* (Ph.D)، عباس حاجی‌زاده* (Ph.D)، عماد کردبچه (M.Sc)

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۸۶۱۳۳۸ - ۰۹۱۲۷۲۳۹۸۲۹ - kpnazari@ihu.ac.ir - abbashajizade@gmail.com تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۱

چکیده

هدف: اشریشیاکلی خونریزی‌دهنده روده‌ای (EHEC) و سروتیپ O157:H7 یکی از مهم‌ترین بیماری‌زاهای عامل اسهال می‌باشند. باکتری با تولید سم شبه شیگا باعث تخریب سلول‌های اپیتلیال و در موارد حاد سندرم اورمی همولیتیک (HUS) می‌شود. درمان آنتی‌بیوتیکی علیه این عامل کارآمد نبوده بلکه باعث تشدید تولید سم شیگا می‌شود. طراحی ایمونوژن‌های کایمر می‌تواند یکی از راه‌بردهای موثر علیه باکتری باشد. هدف از این تحقیق، بررسی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن کایمر نوترکیب در بردارنده نواحی ایمونوژن از پروتئین‌های فلاژلین و اینتیمین علیه باکتری *E.coli* O157:H7 بود.

مواد و روش‌ها: بخش‌های ایمونوژن از پروتئین‌های فلاژلین و اینتیمین برای ارزیابی‌های بیوانفورماتیک انتخاب گردید. پلاسمید نوترکیب pET28a- H7-Int به *E.coli* BL21 (DE3) منتقل شد. بیان پروتئین کایمر با IPTG القا و نتایج با SDS-PAGE ارزیابی گردید. پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA تخلیص و با روش وسترن بلات تأیید شد. ایمنی‌زایی در موش با پروتئین خالص انجام و تیتراژ آنتی‌بادی به روش ELISA تعیین گردید. ریزش باکتری و مرگ‌ومیر در موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان پروتئین نوترکیب در میزبان *E.coli* منجر به تولید پروتئین H7-Int با وزن ۷۰ کیلودالتون شد. میزان پروتئین خالص شده برای هر لیتر از محیط ۸۰ میلی‌گرم بود. ایمنی‌زایی موش‌ها با پروتئین نوترکیب، باعث القای ایمنی هومورال شد. متعاقب خوراندن باکتری زنده، ریزش باکتری در مدفوع موش‌های ایمن به طور معنی‌داری (10^2 CFU/ml) کاهش یافت. ۱۰۰ درصد و ۸۰ درصد از موش‌های ایمن به ترتیب پس از تزریق 10^5 LD₅₀ و 10^7 LD₅₀ از باکتری، زنده ماندند. نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد، پروتئین کایمر ایمنی محافظتی را در موش‌ها ایجاد می‌کند و می‌تواند به عنوان یک کاندید ایمونوژن علیه *E.coli* O157:H7 مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی خونریزی‌دهنده، *E.coli* O157:H7، پروتئین کایمر، ایمونوژن، اینتیمین، فلاژلین

مقدمه

مخزن اصلی EHEC هستند که با ریزش باکتری در مدفوع آنان و وارد شدن باکتری به محیط، آن را به انسان منتقل می‌کنند. مطالعات متعدد نشان داده است که بیش‌تر موارد ابتلا به این عفونت در انسان به دلیل مصرف زیاد مواد غذایی آلوده با منشاء گاوی به ویژه گوشت چرخ کرده [۵] و فرآورده‌ها لبنی [۶].

E.coli O157:H7 مهم‌ترین سروتیپ EHEC است که با شیوع بیماری همراه است [۷]. عفونت این باکتری از طریق کلونیزاسیون در مخاط روده رخ می‌دهد. این باکتری توانایی فرار از سیستم دفاعی میزبان را دارد و با تکثیر خود باعث آسیب به سلول‌های میزبان می‌شود. هم‌چنین مشاهده شده است که این عامل می‌تواند ضایعات متصل‌شونده و تخریب‌کننده (A/E) روی سلول‌های پستانداران را که در

اشریشیا کلی خون‌ریزی‌دهنده روده‌ای (EHEC)، پاتوژن مشترک بین انسان و دام، جزء اشریشیاکلی‌های تولیدکننده سم شیگا (STEC) و عامل ایجاد بیماری‌های مختلفی مانند اسهال، کولیت هموراژیک (HC) و سندرم اورمیک همولیتیک (HUS) است. این باکتری در سراسر جهان توزیع شده است و به عنوان یک مشکل بهداشت عمومی در بسیاری از کشورها در نظر گرفته می‌شود [۲، ۱]. EHEC جزء مهم‌ترین پاتوژن‌های نوظهور اسهالی در دهه‌های گذشته بوده است [۳]. تقریباً ۸ درصد از موارد ابتلا به EHEC منجر به سندرم HUS می‌شود که بیش‌تر در کودکان کم‌تر از ۱۰ سال مشاهده شده است و نرخ مرگ‌ومیر مرتبط با آن ۱-۲ درصد است [۴]. گاوها

ناحیه مرکزی که بخشی از تاژک که در معرض قرار می‌گیرد را تولید می‌کند، در میان گونه‌ها بسیار متغیر است [۲۳، ۱۹]. اینتیمین که پروتئینی بالغ بر ۱۰۱ کیلودالتون می‌باشد در سطح غشاء خارجی باکتری قرار دارد، یکی دیگر از پروتئین‌هایی است که نشان داده شده توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی و ایجاد ایمنی محافظتی را دارد [۲۴]. این پروتئین برای اتصال باکتری و ایجاد ضایعه (A/E) بر روی سلول میزبان ضروری است. تحقیقات نشان داده است که ۲۸۰ اسید آمینه در بخش C-ترمینال این پروتئین در مقایسه با بخش‌های دیگر دارای میزان آنتی‌ژنیسیته بالاتری می‌باشد و بیش‌تر در معرض است [۲۵]. هم‌چنین تائید شده که ۲۸۰ اسید آمینه انتهای C-ترمینال میزان آنتی‌بادی زیادی را در آغوز خوک‌ها القا می‌کند [۲۶].

با توجه به موارد فوق، در مطالعه پیش رو ایمنی‌زایی آنتی‌ژن دو ظرفیتی H7-Intimin (HI)، علیه سمیت و اتصال باکتری EHEC O157:H7 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل اکریل آمید، بیس آکریل آمید، کلروفرم، اتیدیوم بروماید، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، سدیم دی‌هیدروژن فسفات، بی‌کربنات سدیم، توئین ۲۰، اسید فسفریک، سدیم دی‌دسیل دی‌سولفات، اوره، اسید کلریدریک، کلرید سدیم، ایزوپروپانول، ۲-مرکاپتو اتانول، بروموفل بلو، کوماسی برلیانت بلو R250، هیدروکسید سدیم، هیدروکسید آمونیوم، اسید استیک گلاسیال، متانول و اتانول، اسید بوریک، باز تریس، ایزوپروپیل بتا تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، پودر ژل آگاروز معمولی، کلسیم کلرید، و آمونیوم پرسولفات از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند. کاغذ نیتروسولوز از شرکت کیازن (آمریکا) خریداری شد. پلاسمید pET28-a حاوی توالی نوکلوتیدی ژن صناعی از شرکت شاین ژن (چین) دریافت و به منظور انتقال ژن و بررسی بیان آن در سویه *E. coli* BL21 (DE3) مورد استفاده قرار گرفت که از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه گردید. سوبستراهای مولد رنگ (OPD) O-phenylenediamine و Diaminobenzidine (DAB) از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد. آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و HindIII از شرکت سیناکلون (ایران) تهیه شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA agarose resin استفاده شد که از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری گردید. موش‌های آزمایشگاهی BALB/c از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ایران تهیه گردیدند و از اجوانت کامل و ناقص فروند موسسه

شرایط آزمایشگاهی رشد می‌کنند، ایجاد کند [۸]. این ضایعه باعث تخریب میکروویلی‌های انتروسیت‌ها شده، که منجر به خونریزی و در موارد حاد، کولیت هموراژیک می‌شود. هم‌چنین باکتری از طریق این ضایعات باعث بازآرایی اسکلت سلولی در ناحیه اتصال می‌شود [۹].

درمان *E. coli* O157:H7 با آنتی‌بیوتیک منع شده است، زیرا این درمان ممکن است باعث افزایش بیان توکسین از فاژ لیزوژنیک شود که حامل ژن‌های شیگا توکسین (Stx) است [۱۰، ۱۱]. هم‌چنین به دلیل پتانسیل بالای باکتری‌های مرده یا در حال مرگ پس از برخورد با آنتی‌بیوتیک، در رها کردن سم شیگا استفاده از آنتی‌بیوتیک توصیه نمی‌شود [۱۲]. علاوه بر این، درمان *E. coli* O157:H7 توسط عوامل ضد میکروبی برای از بین بردن این پاتوژن یا کاهش مدت زمان ریزش یا جلوگیری از ایجاد سندرم اورمیک همولیتیک (HUS) کارآمد نبود [۱۳].

به دلیل جدی بودن پتانسیل ابتلا به عفونت EHEC در گاوها [۱۴]، واکسیناسیون برای پیشگیری از بیماری در انسان و کاهش کلونیزاسیون باکتری در گاو راهبرد مناسبی است. با این حال، پاسخ ایمنی به عفونت EHEC به طور کامل مشخص نشده است. مشخص شده است که بیماران آلوده به *E. coli* O157:H7 و سایر سروتیپ‌های EHEC علیه آنتی‌ژن‌های مختلف باکتری، آنتی‌بادی تولید می‌کنند و شواهدی وجود دارد که این آنتی‌بادی‌ها از کلونیزاسیون باکتری جلوگیری می‌کند [۱۵-۱۷].

در بین انواع مختلف واکسن‌ها، واکسن‌های نسل اول، یعنی باکتری‌های تخفیف حدت‌یافته یا کشته‌شده، دارای عوارض جانبی موقت هستند که به همین دلیل واکسن‌های زیر واحدی دارای اهمیت زیادی هستند. واکسن‌های زیر واحدی ایمن‌تر و اختصاصی‌تر هستند و واکنش‌های ناخواسته کم‌تری دارند. به‌علاوه، به‌وسیله واکسن چند زیر واحدی به جای تک زیر واحدی می‌توان ایمنی محافظتی موثرتری را ایجاد کرد [۱۸].

آنتی‌ژن‌های مختلفی برای ایجاد پاسخ ایمنی محافظتی علیه این باکتری مورد بررسی قرار گرفته‌اند. آنتی‌ژن‌های سطحی مانند آنتی‌ژن‌های سازنده تاژک، گزینه‌های مناسبی برای این موضوع هستند. آنتی‌ژن H بخشی از پروتئین ساختاری فلاژلین است که توسط ژن *fliC* کدگذاری می‌شود [۱۹]. برای خانواده اشرشیاکلی، ۵۳ نوع آنتی‌ژن H شناخته شده وجود دارد، که در ترکیب با آنتی‌ژن O باعث ایجاد انواع خاصی از بیماری می‌شوند [۲۰-۲۲]. بخش‌های N و C ترمینال این پروتئین که مسئول ترشح و پلیمریزاسیون هستند، در بین گونه‌های مختلف EHEC حفاظت شده‌اند، در حالی که

(GCTAGTTATTGCTCAGCGG) و ۲ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب استفاده شد. PCR مطابق شرایط زیر انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه؛ ۳۰ سیکل شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. جهت بررسی تکثیر قطعه مورد نظر، نمونه بر روی ژل آگارز ۱ درصد، به همراه مارکر DNA Ladder Mix 1kb الکتروفورز گردید.

بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب. ۵۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری‌ها در پنج میلی‌لیتر محیط LB با غلظت ۸۰ μg/ml آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح شد و درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه قرار گرفت تا جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۷ رسید. در این زمان، ۱ میلی‌مولار IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) برای القای بیان پروتئین به نمونه اضافه شد (به کنترل IPTG اضافه نشد) و درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه گرم‌گذاری شد. پس از ۵ ساعت سلول‌ها با سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند و برای سنجش محلول بودن و یا تشکیل اجسام انکلوژنی مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور رسوب سلولی درون ۱۰۰ میکرولیتر PBS (۸ گرم NaCl، ۲۰۰ میلی‌گرم KCl، ۱/۴۴ گرم Na₂HPO₄، ۲۵۴ میلی‌گرم KH₂PO₄) به ازای هر ۱/۵ میلی‌لیتر از رسوب یک‌نواخت گردید. دیواره سلولی از طریق سونیکاسیون (قدرت ۷۰ و ۰/۵ سیکل به مدت ۱۰ ثانیه و ۳ مرتبه) شکسته شده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و محلول رویی جدا شد. بیان پروتئین و سنجش محلولیت با الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات-SDS (SDS-PAGE) درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پروتئین بیان شده که دارای دنباله هیستیدینی بود، به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از رزین نیکل و در شرایط غیر دناتوره با بافر حاوی ایمیدازول خالص شد و نتایج با استفاده از SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین غلظت پروتئین نوترکیب. برای تعیین غلظت پروتئین موجود در محلول‌های به‌دست آمده از مرحله قبل، از روش استاندارد برادفورد استفاده شد. برای تعیین غلظت پروتئین در محلول‌ها، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از هر محلول پروتئین به یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه گردید و سپس

انسیتوپاستور استفاده شد. آنتی‌بادی کانزوگه موشی، از شرکت داکو (دانمارک) تهیه گردید. آنتی‌بیوتیک کانامایسین مورد استفاده شده جهت کشت باکتری واجد پلاسمید نوترکیب از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

طراحی سازه کدکننده پروتئین نوترکیب HI. توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی، به ترتیب از پایگاه‌های داده GeneBank و Uniprot استخراج و به فرمت FASTA ذخیره شد. در ادامه جهت تفکیک دومین‌ها، دو توالی آنتی‌ژن H و اینتیمین توسط دو تکرار از یک لینکر سخت (EAAAK) از هم جدا شدند (شکل ۱). برای تسهیل در تخلیص و شناسای پروتئین، یک دنباله ۶ تایی از اسید آمینه هیستیدین به انتهای C ترمینال سازه اضافه گردید (شکل ۱). سپس، توالی نهایی از پروتئین به DNA ترجمه معکوس شد و برای سنتز در پلاسمید (+) pET28a بین جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و HindIII به شرکت شاین ژن (چین) ارسال شد.

انتقال پلاسمید و غربالگری باکتری‌های نوترکیب. پس از دریافت سازه توترکیب ساخته شده، ابتدا با استفاده از روش شیمیایی کلرید کلسیم سلول‌های *E. coli* BL21 (DE3) مستعد شدند و سپس پلاسمید نوترکیب به روش شوک حرارتی به آن‌ها منتقل گردید. در نهایت سلول‌های میزبان تراریخت شده بر روی محیط کشت Luria-Bertani (LB) آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت (۸۰ μg/ml) کشت داده و به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شد. با توجه به حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین درون وکتور بیانی pET28، تنها کلونی‌های حاوی پلاسمید توانایی رشد در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین را داشتند.

تأیید حضور سازه ژنی در باکتری نوترکیب. تعداد ۲ کلنی از کلون‌های رشد یافته بر روی محیط انتخابی LB آگار انتخاب و به محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۸۰ μg/ml) منتقل شدند. پس از این‌که جذب نوری سلول‌ها در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۸ رسید، پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer (کره جنوبی) تخلیص شد. در ادامه جهت تأیید حضور ژن سنتزی H7-Int واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای انجام واکنش PCR در این حجم، از ۱/۵ میلی‌مولار یون کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای عمومی T7 فرادست (TAATACGACTCACTATAGGG) و T7 فرودست

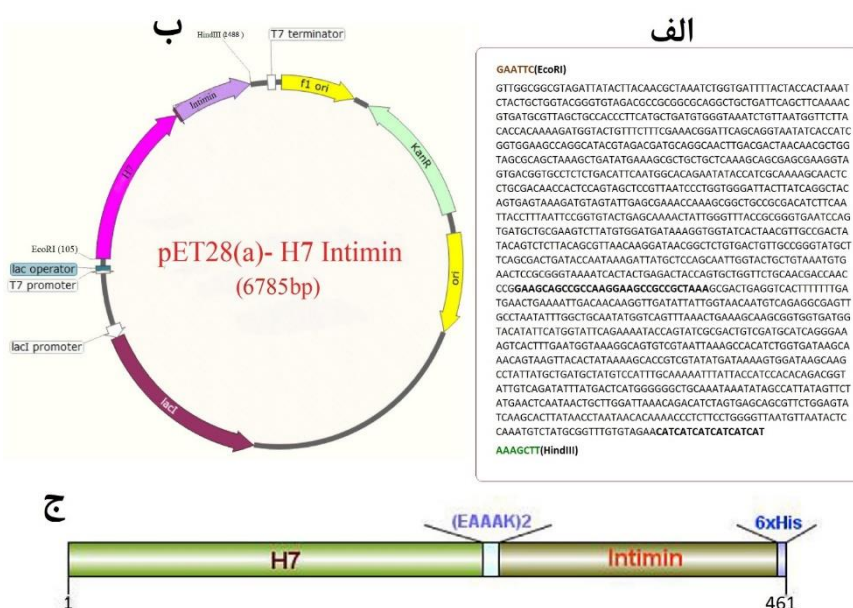
۷۵ دقیقه در معرض آنتی‌بادی موشی کانجوگه ضد دنباله هیستدینی با رقت ۱/۲۰۰۰۰ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فرآیند شست‌وشو مانند قبل تکرار شد و واکنش رنگ‌پذیری باند مربوط به پروتئین با افزودن سوبسترای آنزیم کانجوگه HRP (۱۵ سی‌سی تریس ۵۰ میلی‌مولار با ۷/۸ pH، ۹ میلی‌گرم DAB و ۱۵ میکرولیتر H₂O₂) انجام شد. در نهایت برای توقف واکنش رنگ‌پذیری، محلول محتوی سوبسترا از محیط با شست‌وشوی کاغذ توسط ddH₂O حذف گردید.

ایمنی‌زایی در موش‌های آزمایشگاهی. موش‌های ماده BALB/c ۶ تا ۸ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۵ گرم برای آزمایش‌های ایمن‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌ها در دو گروه ۳۰ تایی (گروه آزمایش و شاهد) دسته‌بندی شدند و به صورت زیر جلدی (ناحیه شکم) ایمن گردیدند. گروه آزمایش در تزریق اول ۲۰ میکروگرم پروتئین کایمر را در ترکیب با حجم برابر اجوانت کامل فروند در تزریق‌های دوم و سوم به ترتیب، ۱۵ و ۱۰ میکروگرم پروتئین را در ترکیب با حجم برابر اجوانت ناقص فروند دریافت کردند (۳۰ عدد) و گروه شاهد تنها PBS را در ترکیب با حجم برابر اجوانت فروند دریافت کردند (۳۰ عدد). حجم ماده تجویز شده به هر موش ۲۰۰ میکرولیتر بود. ایمن‌سازی در سه نوبت به فاصله دو هفته در هر نوبت انجام شد. قبل از تزریق و یک هفته پس از تزریق خونگیری از چشم انجام شد و سرم آن جداسازی گردید و برای بررسی ایمنی‌زایی در ۲۰- نگهداری شد.

حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. در یک لوله نیز فقط ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به عنوان کنترل ریخته شد. سپس به هر تیوب، یک میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه باقی ماندن در دمای اتاق، جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت‌ها بر اساس فرمول به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. از تیوب حاوی آب مقطر برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد. برای صحت بیشتر، آزمایش سه بار تکرار شد.

تائید پروتئین نوترکیب خالص شده به روش ایمنوبلاتینگ

به منظور تائید پروتئین نوترکیب از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی موشی کانجوگه ضد دنباله هیستدینی (Sigma) جهت اتصال به دنباله هیستدینی پروتئین استفاده گردید. برای این کار، ابتدا پروتئین H7-Int خالص شده و BSA (کنترل منفی) بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. سپس فرآیند لکه‌گذاری وسترن بر روی کاغذ نیتروسولوز با استفاده از سیستم لکه‌گذاری BioRad بافر مخصوص آن (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۱ درصد و متانول ۲۰ درصد با pH=۸/۳) صورت پذیرفت. بلاک نمودن کاغذ نیتروسولوز به صورت شبانه با استفاده از محلول بلاکینگ حاوی ۵ درصد شیر خشک انجام شد. نمونه پس از ۳ بار شست‌وشو در بافر PBST (PBS به اضافه ۰/۰۵ درصد Tween ۲۰)، به مدت



شکل ۱. تصویر شماتیک از سازه طراحی شده و پلاسمید نوترکیب، (الف) توالی نوکلئوتیدی سازه نوترکیب H7-Intimin، (ب) تصویر پلاسمید بیانی pET28(a) که سازه ژنی طراحی شده درون آن زیرهمساز ساخته شده است، (ج) تصویر شماتیک از سازه پروتئینی متصل شده با لینکر سخت و دارای دنباله هیستدینی

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و کلونی‌های سفید رنگ *E. coli* O157: H7 شمارش شدند.

بررسی زنده‌مانی موش‌ها پس از تجویز باکتری *E. coli* O157:H7. پس از ۱۴ روز از آخرین مرحله ایمنی‌زایی، موش‌های ایمن به دو گروه تقسیم شدند. به گروه اول به مقدار 1 LD_{50} و به گروه دوم 10 LD_{50} از باکتری *E. coli* O157: H7 به صورت درون صفاقی تزریق شد. همین روش را نیز برای موش‌های کنترل استفاده شد. سپس در مدت ۱۰ روز زندمانی موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری. برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروفاسمیرنوف استفاده شد. آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از آنوای یک طرفه انجام و مقایسه میانگین در سطح تجویز دوم، سوم و چهارم و ریزش باکتری در گروه غیر ایمن و ایمن شده با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. همچنین جهت بررسی آماری میزان زنده‌مانی از آزمون هزارد با استفاده از نرم‌افزار Grafpad استفاده شد. جهت بررسی نرمالیتت دو متغیر از آزمون آمون شاپیرو ویلک (-Shapito Wilk test) در نرم‌افزار SPSS استفاده شد در آزمون شاپیرو ویلک اگر مقدار معنی‌داری آزمون (Significant) یا همان P-value از ۰/۰۵ بیشتر باشد می‌توان نتیجه گرفت که داده‌های متغیر نرمال هستند و در ادامه آزمون T-test جهت بررسی معنادار بودن اختلاف بین دو گروه صورت گرفت. در آزمون T ابتدا جهت بررسی همگن و یا ناهمگن بودن واریانس‌های دو گروه از آزمون لون (Levene's Test) استفاده شده بدین صورت که اگر مقدار P-value از ۰/۰۵ بیشتر باشد واریانس‌ها همگن می‌باشد سپس اگر امتیاز آزمون T-test از ۰/۰۵ کم‌تر باشد فرض صفر آزمون رد می‌شود و میانگین دو گروه با هم برابر نخواهند بود و تفاوت معناداری دارند.

نتایج

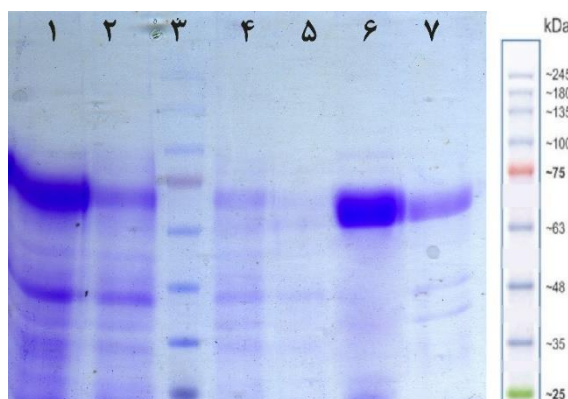
تائید دریافت پلاسمید در باکتری‌های نوترکیب و حضور سازه ژنی در پلاسمید بیانی. پس از دریافت سازه صنعتی الحاق شده در پلاسمید pET28a(+) و آماده‌سازی سلول‌های مستعد میزبان بیانی یعنی باکتری *E. coli* BL21 (DE3)، انتقال سازه مذکور به این سلول‌ها با روش شوک حرارتی انجام شد و در نهایت این سلول‌ها بر روی محیط کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. با رشد کلنی‌ها پس از گذشت ۱۶ ساعت مشخص شد که سازه به شکل مناسب به سلول‌های مستعد منتقل شده و امکان رشد را برای این سلول‌ها بر روی محیط انتخابی فراهم نموده است.

بررسی تیتر آنتی‌بادی با روش الایزای غیر مستقیم. تیتر آنتی‌بادی IgG سرمی با روش الایزا (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) تعیین شد. برای این کار، ابتدا ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب داخل ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ (۶۴ میلی‌مولار Na_2CO_3 ، ۱۳۶ میلی‌مولار NaHCO_3 ، $\text{pH}=9/8$) درون هر چاهک‌های صفحات ۹۶ چاهکی الایزا (Caspian) پوشانده شد و به مدت یک شب در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. پس از آن چاهک‌ها سه مرتبه با بافر PBST شسته شد. سپس چاهک‌ها با ۵ درصد شیر خشک بدون چربی در PBST به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مسدود شد. چاهک‌های شسته شده با نمونه‌های سرم از رقت ۱:۲۰۰ تا ۱:۱۲۶۰۰ درون PBST رقیق و به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. چاهک‌ها سه بار با PBST شسته شدند و ۱۰۰ میکرولیتر IgG موشی کانزوگه با HRP با رقت ۱:۲۰۰۰ در بافر PBST به هر چاهک اضافه شد. چاهک‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس چهار بار در PBST شسته شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا حاوی ۳ میلی‌گرم (o-OPD (Phenylene Diamine) به هر چاهک اضافه گردید. در نهایت پس از رنگ گرفتن، واکنش با H_2SO_4 ۲/۵ مولار متوقف شد و جذب در نانومتر ۴۹۵ نانومتر بر روی میکروپلیت ریدر Bio TEK خوانده شد.

بررسی ریزش باکتری پس از تجویز باکتری *E. coli* O157:H7 در موش‌ها. موش‌ها دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون مورد چالش قرار گرفتند. به منظور کاهش فلور باکتریایی طبیعی روده، یه موش‌ها قبل از چالش آب حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین سولفات خوراندند شد [۲۴].

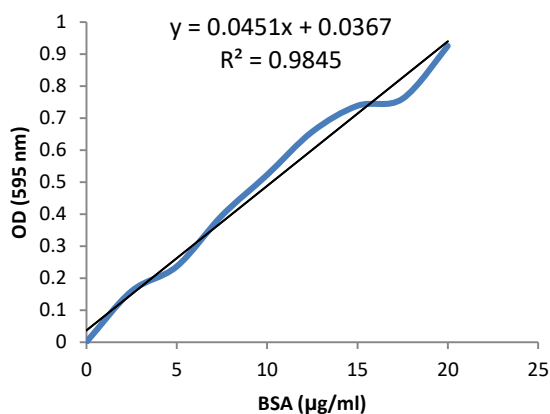
پس از ناشتایی شبانه، به موش‌ها ۱۰۱۰ واحد تشکیل کلنی (CFU) از باکتری *E. coli* O157:H7 در ۱۰۰ ماکرولیتر PBS به صورت دهانی داده شد. نمونه‌های مدفوع هر موش در فاصله دو روز به مدت چهار هفته جمع‌آوری شد. ریزش مدفوعی *E. coli* O157:H7 با افزودن تقریباً ۰/۱ گرم مدفوع به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت LB broth و سپس انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۴-۲ ساعت برای نرم شدن پلت مدفوع انجام شد. مخلوط را به خوبی ورتکس کرده و رقت‌های مایع رویی را روی پلیت آگار محیط کشت اختصاصی سوربیتول مکانکی (محتوی ۲/۵ mg/ml تلوریت پتاسیم و ۰/۰۵ سفکسیم) کشت داده شد. پلیت‌ها در طول شب در

هیستیدینی کوئروگه به HRP برای تائید آن استفاده شد. برای این منظور باندهای رنگ گرفته مربوط به نمونه قبل و بعد از تخلیص با ستون نیکل بر روی کاغذ نیتروسولوز بررسی شد و مشخص گردید که باند رنگی مربوط به پروتئین در جایگاه درست خودش در مجاورت باند ۷۰ کیلودالتونی نشانگر مولکولی پروتئین قرار گرفته است.



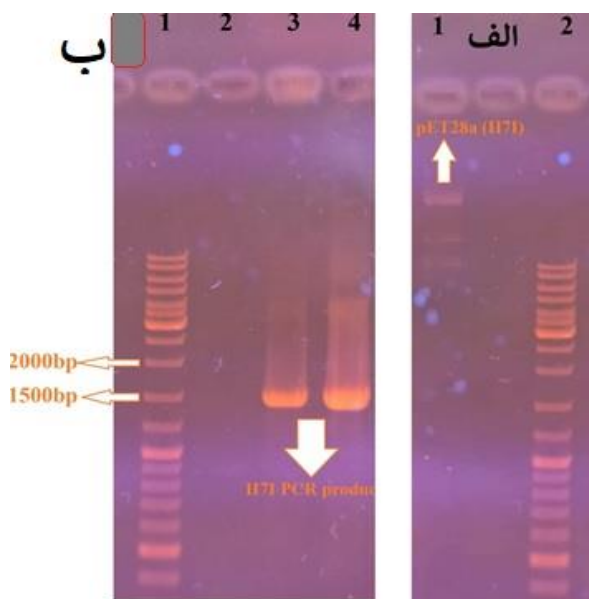
شکل ۳. نتیجه بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب به روش طبیعی (غیر دناتوره) با ستون نیکل. ستون ۱- نمونه پروتئین بیان شده القا با IPTG، ستون ۲- نمونه القاء نشده (کنترل منفی)، ستون ۳- نشانگر مولکولی پروتئین، ستون ۴- نمونه پروتئین اولیه عبور داده شده از ستون (flow through)، ستون ۵- نمونه شستشو با بافر ایمیدازول ۵۰، ستون ۶- نمونه شستشو با بافر ایمیدازول ۱۵۰، ستون ۷، نمونه شستشو با بافر ایمیدازول ۲۵۰.

تعیین غلظت پروتئین نوترکیب. به منظور به دست آوردن غلظت محصول پروتئینی، ابتدا منحنی استاندارد با استفاده از BSA تهیه و سپس غلظت پروتئین نوترکیب به روش برادفورد و با منحنی استاندارد، ارزیابی شد. با توجه به این که ۲۰ میکرولیتر پروتئین نوترکیب مورد نظر دارای OD=0.765 بود، با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت آن ۸۰۰ μg/ml محاسبه گردید. شکل ۴ منحنی استاندارد حاصل از BSA را نشان می‌دهد.



شکل ۴. منحنی استاندارد حاصل از BSA

با توجه به این که ژن مورد نظر در وکتور pET28a(+) همسانه سازی شده از پرایمرهای عمومی T7 برای تائید حضور سازه به روش PCR استفاده شد که نتایج آن در شکل ۲ آورده شده است.

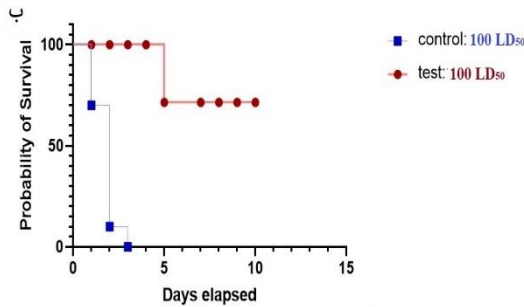
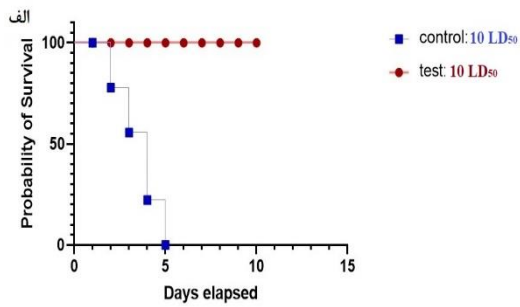


شکل ۲. نتایج ژل آگارز حاصل از استخراج پلاسمید و تائید آن به روش PCR، الف) استخراج پلاسمید ستون پلاسمید استخراج شده از کلنی نوترکیب ۱، ستون ۲ نشانگر اندازه مولکولی DNA (DNA ladder mix) (b) تائید سازه ژنی به روش PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی T7، ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی DNA (DNA ladder mix)، ستون ۲- کنترل منفی واکنش PCR، ستون ۳ و ۴ محصول PCR پلاسمیدهای تخلیص شده از کلنی‌های نوترکیب واحد ژن H7I با طول ۱۵۹۲ جفت باز

بررسی بیان پروتئین نوترکیب و تخلیص آن با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل. پس از القای بیان پروتئین نوترکیب کایمر H7-Int نمونه‌ها پس از آماده‌سازی بر روی ژل اکریل امید ۱۲ درصد بارگذاری و باند مربوط به پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی ۷۰ کیلودالتون در نمونه القا شده مشاهده شد (شکل ۳). با توجه به محلول بودن پروتئین کایمر، از روش شیب غلظت ایمیدازول برای تخلیص پروتئین استفاده شد بدین صورت که محلول حاوی پروتئین کایمر درون PBS، از ستون کروماتوگرافی محتوی رزین نیکل عبور داده و پس از شست‌وشوی ستون، پروتئین با استفاده از بافر ایمیدازول ۲۵۰ از ستون جدا و تخلیص گردید (شکل ۳).

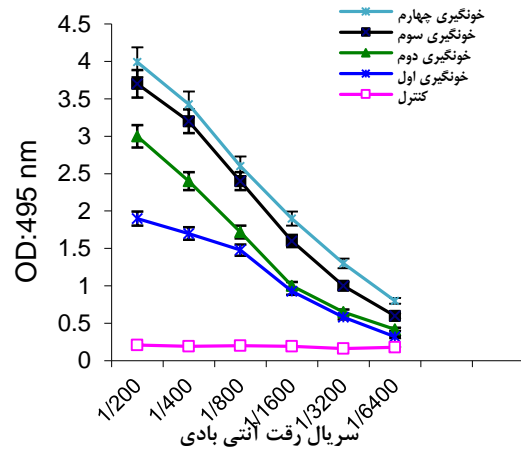
تائید پروتئین نوترکیب H7-Int به روش وسترن بلات به منظور بررسی صحت پروتئین نوترکیب از آنالیز وسترن بلات استفاده شد. با در نظر گرفتن این موضوع که پروتئین حاوی یک دنباله هیستیدینی در انتهای آمین بود، لذا برای انجام فرآیند لکه‌گذاری وسترن از آنتی‌بادی ضد دنباله

۴ روز مردند. این در حالی است ۸۰ درصد موش‌های ایمن این دوز را تحمل کردند و زنده ماندند (شکل ب ۷).



شکل ۶. میزان زنده‌مانی موش‌های ایمن شده و غیر ایمن پس از چالش با باکتری زنده

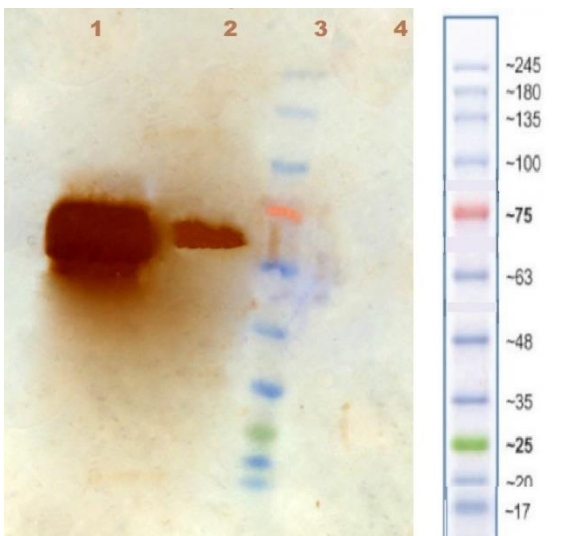
بررسی تیتراژ آنتی‌بادی سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین کایمر. با استفاده از الایزا، حساسیت آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه آنتی‌ژن کایمر H7-Int مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۵ دیده می‌شود تجویز زیر پوستی پروتئین کایمر منجر به تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی شد. تیتراژ آنتی‌بادی علیه پروتئین کایمر پس از هر بار تزریق افزایش داشت. تحلیل آماری نشان داد که متعاقب تجویز چهارم آنتی‌ژن، تیتراژ آنتی‌بادی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05 = 0.23$)



شکل ۵. میانگین تیتراژ آنتی‌بادی IgG پس از تزریق آنتی‌ژن به حیوان موش، نمونه تست شامل آنتی‌ژن و اجوانت و نمونه کنترل فاقد آنتی‌ژن است. فواصل زمانی تزریق در هر دو گروه تست و کنترل، ۱۴ روز و زمان خون گیری، ۸ روز پس از هر تزریق بود. میزان OD رقت ۱/۲۰۰ در تزریق اول ۱/۸۸۹ و در تزریق چهارم ۳/۹۹۱ بود.

چالش موش‌های زنده با باکتری *E. coli* O157:H7 به منظور بررسی ریزش باکتری در هر گروه ۱۰ موش به عنوان تست و ۱۰ موش به عنوان کنترل استفاده شد. به گروه تست 10^9 CFU/ml باکتری بیماری‌زای *E. coli* O157:H7 به صورت خوراکی تلقیح شد. همان‌طور که در شکل ۶ دیده می‌شود میزان دفع باکتری در حیوانات کنترل پس از ۱۵ روز در حدود 10^8 ثابت ماند در حالی که میزان دفع باکتری در موش‌های ایمن شده سیر نزولی داشت و در پایان روز ۱۵، به حدود 10^2 کاهش یافته است.

بررسی زنده ماندن موش‌های ایمن شده. پس از چالش تمام موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت 10 LD_{50} از باکتری، در طی ۵ روز مردند (شکل الف ۷). این در حالی بود که تمام موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند. بر طبق نتایج، تمامی موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت 10 LD_{50} از باکتری، در طی مدت



شکل ۶. نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین بر روی کاغذ نیتروسولوز. ستون ۱ و ۲: نمونه القاء شده توسط IPTG بعد از تخلیص با ستون نیکل، ستون ۳: نشانگر مولکولی پروتئین، ستون ۴- پروتئین BSA به عنوان کنترل منفی

بحث و نتیجه‌گیری

آمارهای تأیید شده توسط مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) نشان می‌دهد که اسهال دومین علت مرگ‌ومیر در کودکان است. عوامل باکتریایی روده‌ای مانند اشرشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC)، اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) و ویبریو کلرا از مهم‌ترین عوامل باکتریایی ایجادکننده اسهال هستند. واکسیناسیون یکی از راهبردهای مقابله با بیماری‌های عفونی

همکاران بود (میزان ریزش باکتری پس از دو هفته به 10^2 رسید)، که این موضوع نشان‌دهنده اهمیت بیش‌تر پروتئین فلاژلین نسبت به EspA در ایمن‌سازی حیوانات می‌باشد. چنگ و همکاران از پروتئین کایمر نو ترکیب متشکل از پروتئین‌های StxB و EspA برای ایمن‌سازی موش‌ها علیه *E. coli* O157:H7 استفاده کردند. آن‌ها چالش را با سم StxB انجام دادند، و نشان دادند که ۱۹ سر از ۲۰ سر موش ایمن شده توانستند در برابر تجویز معادل 10^5 LD₅₀ از سم فعال زنده بمانند. در مطالعه حاضر، از باکتری زنده برای بررسی میزان زنده‌مانی استفاده شد [۳۲]. ۱۰۰ درصد از موش‌هایی که معادل LD₅₀ ۱۰ از باکتری را دریافت کردند، زنده ماندند، در حالی که میزان زنده‌مانی در موش‌هایی که معادل LD₅₀ ۱۰۰ را دریافت نمودند، ۸۰ درصد بود. در مطالعه دیگری که توسط فن و همکاران انجام شد، از پروتئین نو ترکیب Tir برای ایمن‌سازی موش‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان ریزش باکتری در مدفوع موش‌های ایمن شده به میزان قابل توجهی کاهش یافت. میزان زنده‌مانی در حیواناتی که به صورت زیرجلدی ایمن شده بودند، پس از دریافت LD₅₀ ۱ از باکتری زنده ۶۴ درصد و در حیواناتی که به صورت داخل بینی ایمن شده بودند، ۹۲ درصد بود، که در مقایسه با پروتئین کایمر مورد استفاده در مطالعه حاضر (۱۰۰ درصد زنده‌مانی پس از تجویز LD₅₀ ۱۰) محافظت بسیار کم‌تری حاصل شد [۳۳]. اگر چه نتایج تجویز زیرجلدی کامر طراحی شده بسیار مناسب بود، اما با توجه به مسیر عفونت‌زایی باکتری O157:H7، تجویز مخاطی (دهانی یا داخل بینی) پروتئین کایمر نیز اهمیت زیادی دارد که در تحقیقات بعدی انجام خواهد گرفت.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین نو ترکیب مورد استفاده در پژوهش حاضر، توانایی تحریک مؤثر ایمنی هومورال در موش را دارد و ایمنی حاصله محافظتی بوده و قادر است از حیوانات ایمن شده در برابر باکتری زنده *EHEC* O157:H7 به نحو مؤثری محافظت کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه جامع امام حسین (ع)، جهت پشتیبانی و همکاری در طول دوره انجام طرح اعلام می‌دارند.

مشارکت و نقش نویسندگان

نقش هر یک از نویسندگان این مقاله به شرح زیر است: نویسندگان شهرام نظریان و عباس حاجی‌زاده: ایده و طراحی

است که تأثیر آن بر سلامت بشر اثبات شده است. از آن‌جا که دستگاه اتصال سلولی و سم تولید شده، عوامل اصلی بیماری‌زایی این باکتری‌ها هستند، بنابراین می‌توان از آن‌ها برای طراحی واکسن بهره برد. واکسن‌های زیرواحدی یکی از ایمن‌ترین واکسن‌ها برای مقابله با عوامل بیماری‌زا هستند که مطالعات مختلف نشان داده که این واکسن‌ها پتانسیل زیادی برای مقابله با باکتری‌های ذکر شده دارند. مطالعات و پژوهش‌های زیادی در حوزه واکسن‌های نو ترکیب علیه EHEC با استفاده از فاکتورهای بیماری‌زایی آن صورت گرفته که از جمله می‌توان به پروتئین‌های Stx2A، Stx1B و پروتئین‌های سیستم ترشحی نوع ۳، اینتیمین، EspA، Tir، FepA اشاره نمود [۲۸، ۲۷]. با توجه به مکانیسم بیماری‌زایی *E. coli* O157:H7 ثابت شده که H7 و اینتیمین دو آنتی‌ژن مهم هستند که به ترتیب در تحرک و چسبندگی باکتری‌ها نقش دارند و در اکثر سروتیپ‌های EHEC وجود دارند. با کمک ابزارهای توانمند بیوانفورماتیک دو پروتئین مذکور در قالب یک پروتئین کایمر در کنار هم قرار گرفته و توسط یک لینکر سخت بهم متصل گردیدند. یک ترادف تکراری شامل اسیدآمینوهای EAAAK (اسیدآمینو گلوتامیک، آلانین و لیزین) به عنوان لینکر انتخاب گردید. این ترادف تکراری به سبب داشتن پل نمکی مربوط به اسید گلوتامیک و لیزین می‌تواند با ایجاد ساختار هلیکس پایدار سبب شود که دومین‌های پروتئینی اطراف آن به یک‌دیگر نزدیک نشوند [۲۹].

تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک و ایمونوفورماتیک انجام شده کارایی این آنتی‌ژن کایمر را در تحریک سیستم ایمنی و نیز امکان بیان در سیستم پروکاریوتی نشان داد. از کارهای صورت گرفته در این زمینه می‌توان به مطالعه انجام شده توسط امانی و همکاران اشاره کرد. امانی و همکاران یک پروتئین کایمر متشکل از سه پروتئین Tir، اینتیمین و EspA طراحی کرده و ایمنی‌زایی آن را در موش متعاقب تجویز زیرجلدی بررسی کردند. پس از خوراندن 10^{11} CFU از باکتری *E. coli* O157:H7 به موش‌های ایمن شده پس از گذشت دو هفته میزان ریزش باکتری به میزان قابل توجهی کاهش یافته بود که با نتایج به دست آمده در این تحقیق سازگار است [۳۰]. سلمانیان و همکاران از پروتئین کایمری استفاده کردند که تنها حاوی آنتی‌ژن‌های اینتیمین و EspA بود. چالش حیوانات ایمن شده با باکتری زنده نشان داد که میزان ریزش باکتری پس از دو هفته به 10^3 رسید [۳۱]. در مطالعه حاضر، به جای EspA از پروتئین فلاژلین استفاده شد که نتایج چالش بهتر از مطالعه سلمانیان و

- [13] Mølbak K, Gerner-Smidt P, Wegener HC. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Emerging Infect Dis* 2002; 8: 514. https://doi.org/10.3201/eid0805_010288 PMID:11996688 PMCID:PMC2732481
- [14] Norcross MA, Savage K, Shank F, Taylor DN. Consensus conference statement: *Escherichia coli* O157: H7 infections-an emerging national health crisis, July 11-13, 1994. *Gastroenterology* 1995; 108: 1923-1934. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90159-0](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90159-0)
- [15] Bitzan M, Moebius E, Ludwig K, Müller-Wiefel DE, Heesemann J, Karch H. High incidence of serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in children with hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* X 1991; 119: 380-385. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)82049-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)82049-9) PMID:1880650
- [16] Luzzi I, Tozzi AE, Rizzoni G, Niccolini A, Benedetti I, Minelli F, et al. Detection of serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O103 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J Infect Dis* 1995; 171: 514-515. <https://doi.org/10.1093/infdis/171.2.514> PMID:7531209
- [17] Chart H, Scotland S, Rowe B. Serum antibodies to *Escherichia coli* serotype O157: H7 in patients with hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 285-290. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.2.285-290.1989> PMID:2644293 PMCID:PMC267293
- [18] Draper SJ, Angov E, Horii T, Miller LH, Srinivasan P, Theisen M, et al. Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. *Vaccine* 2015; 33: 7433-7443. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.093> PMID:26458807 PMCID:PMC4687528
- [19] Apel D, Surette MG. Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta* 2008 ; 1778:1851-1858. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2007.07.005> PMID:17719558
- [20] Achtman M, Pluschke G. Clonal analysis of descent and virulence among selected *Escherichia coli*. *Ann Rev Microbiol* 1986; 40: 185-210. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.40.100186.001153> PMID:3535645
- [21] Ørskov F, Whittam TS, Cravioto A, Ørskov I. Clonal relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) belonging to different O groups. *J Infect Dis* 1990; 162: 76-81. <https://doi.org/10.1093/infdis/162.1.76> PMID:2192012
- [22] Souza V, Rocha M, Valera A, Eguiarte LE. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl Environ Microbiol* 1999 ;65:3373-3385. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3373-3385.1999> PMID:10427022 PMCID:PMC91507
- [23] Winstanley C, Morgan JA. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. *Microbiology* 1997; 143: 3071-3084. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3071> PMID:9353913
- [24] Guirro M, de Souza RL, Piazza RM, Guth BE. Antibodies to intimin and *Escherichia coli*-secreted proteins EspA and EspB in sera of Brazilian children with hemolytic uremic syndrome and healthy controls. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; 152: 121-125. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.016> PMID:23068271
- [25] Batchelor M, Prasannan S, Daniell S, Reece S, Connerton I, Bloembergen G, et al. Structural basis for recognition of the translocated intimin receptor (Tir) by intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J* 2000; 19: 2452-2464. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.11.2452> PMID:10835344 PMCID:PMC212744
- [26] Dean-Nystrom EA, Gansheroff LJ, Mills M, Moon HW, O'Brien AD. Vaccination of pregnant dams with intiminO157 protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157: H7 infection. *Infect Immunol* 2002;70: 2414-2418.

مطالعه، حسین سمیعی ایبانه: جمع‌آوری داده‌ها، عماد کردبچه: آنالیز و تفسیر نتایج، سمیعی ایبانه: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تأیید نمودند.

منابع

- [1] Noris M, Remuzzi G. Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1035-1050. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004100861> PMID:15728781
- [2] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging Infect Dis* 2011; 17: 7. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101> PMID:21192848 PMCID:PMC3375761
- [3] Hunter PR. Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. *J Water Health* 2003; 1: 65-72. <https://doi.org/10.2166/wh.2003.0008> PMID:15382735
- [4] Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1073-1086. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71144-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2) [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74232-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74232-X) PMID:15781103
- [5] Etcheverria AI, Padola NL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence* 2013; 4: 366-372. <https://doi.org/10.4161/viru.24642> PMID:23624795 PMCID:PMC3714128
- [6] Maleki parvari M, Parsaeimehr M, Staji H, Jebellijavan A. Molecular investigation of the prevalence and detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from traditional cheese in Iran. *Koomesh* 2021; 23: 174-179. (Persian). <https://doi.org/10.29252/koomesh.23.1.174>
- [7] Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 2010; 140: 360-370. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011> PMID:19410388
- [8] Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1989; 57: 1290-1298. <https://doi.org/10.1128/iai.57.4.1290-1298.1989> PMID:2647635 PMCID:PMC313264
- [9] Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol Microbiol* 2011; 80: 1420-1438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x> PMID:21488979
- [10] Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157: H7 infections. *N Engl J Med* 2000; 342: 1930-1936. <https://doi.org/10.1056/NEJM200006293422601> PMID:10874060 PMCID:PMC3659814
- [11] Staji H, Salimi Bejestani MR, Changizi E, Javaheri Vayeghan A. Distribution of *Escherichia coli* Shiga toxin encoding genes (stx1, stx2) in Sangesari lambs suffering from diarrhea by Multiplex PCR technique. *Koomesh* 2015; 17: 84-91. (Persian).
- [12] Grif K, Dierich MP, Karch H, Allerberger F. Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 761-766. <https://doi.org/10.1007/s100960050181> PMID:9923515

and tir genes of Escherichia coli O157: H7. Vaccine 2010; 28: 6923-6929.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.061>

PMid:20709010

[31] Saberi F, Salmanian AH, Amani J, Jafari M. Production of chimeric Tir-intimin protein from E. coli O157: H7 in the Tobacco (Nicotiana tobaccum) plant and its immunological evaluation in an animal model. J Adv Biomed Pathobiol Res 2012; 15: 23-36.

[32] Cheng Y, Feng Y, Luo P, Gu J, Yu S, Zhang WJ, et al. Fusion expression and immunogenicity of EHEC EspA-Stx2AI protein: implications for the vaccine development. J Microbiol 2009; 47: 498-505.

<https://doi.org/10.1007/s12275-009-0116-8>

PMid:19763426

[33] Fan HY, Wang L, Luo J, Long BG. Protection against Escherichia coli O157: H7 challenge by immunization of mice with purified Tir proteins. Mol Biol Rep 2012; 39: 989-997.

<https://doi.org/10.1007/s11033-011-0824-0>

PMid:21567195

<https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2414-2418.2002>

PMid:11953378 PMCID:PMC127944

[27] Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG. Advances in the development of enterohemorrhagic Escherichia coli vaccines using murine models of infection. Vaccine 2013; 31: 3229-3235.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.013>

PMid:23707170 PMCID:PMC3691335

[28] Hajizade A, Salmanian AH, Amani J, Ebrahimi F, Arpanaei A. EspA-loaded mesoporous silica nanoparticles can efficiently protect animal model against enterohaemorrhagic E. coli O157: H7. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2018; 46: S1067-S1075.

<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1529676>

PMid:30638077

[29] Najafabadi ZS, Nazarian S, Kargar M, Kafilzadeh F. Designing of a chimeric protein contains StxB, intimin and EscC against toxicity and adherence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7 and evaluation of serum antibody titers against it. Mol Immunol 2021; 134: 218-227.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.03.016>

PMid:33823320

[30] Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae

Expression, purification, and immunization of a chimeric protein containing immunogenic regions of flagellin and intimin proteins against *E. coli* O157: H7

Hossein Samiei Abianeh (M.Sc), Shahram Nazarian (Ph.D)*, Abbas Hajizadeh (Ph.D)*, Emad Kordbach (M.Sc)
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 9124861338 - 9127239829 kpnazari@ihu.ac.ir-abbashajizade@gmail.com Received: 19 Jan 2022; Accepted: 22 Jun 2022

Introduction: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and serotype O157: H7 is one of the most important diseases causing diarrhea. Shiga-like toxin secreted by the bacteria destroys epithelial cells and, in acute cases, causes hemolytic uremic syndrome (HUS). Antibiotic therapy is not effective against this pathogen, because it increases the production of Shiga toxin. Designing chimeric immunogens can be one of the most effective strategies against bacteria. This study aimed to evaluate the immunogenicity of recombinant chimeric antigen-containing immunogenic regions of flagellin and intimin proteins against *E. coli* O157: H7.

Materials and Methods: Immunogenic regions of flagellin and intimin proteins were selected for bioinformatics evaluations. Plasmid H7-Int pET28a- was transferred to *E. coli* BL21(DE3). Expression of the recombinant chimeric protein was induced by IPTG and evaluated by SDS-PAGE. The recombinant protein was purified using a Ni-NTA affinity chromatography column and confirmed by Western blotting. Immunogenicity of the protein was performed in mice with pure protein and antibody titers were determined by ELISA. Bacterial shedding and mortality in mice were examined.

Results: Expression of recombinant protein in *E. coli* led to the production of a protein with a molecular weight of 70 kDa. The total yield of purified protein was 80 mg/L. Immunization of mice with recombinant protein induced humoral immunity. Bacterial shedding in immunized mice's feces was significantly reduced (10^2 CFU / ml). 100% and 80% of the immunized mice survived challenged with 10LD₅₀ and 100LD₅₀ of bacteria respectively.

Conclusion: The results showed that the chimeric protein provides good protective immunity in mice and can be considered an immunogenic candidate against *E. coli* O157: H7.

Keywords: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *E. coli* O157-H7, Chimeric protein, Immunogen, Intimin, Flagellin