



بیان کاست ژنی SO6-STxB در باکتری اشرشیا کلی و بررسی تیترا آنتی بادی

مسعود عبدالمهدی: کارشناس ارشد زیست‌شناسی، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
حسین هنری: دانشیار و متخصص ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران (*نویسنده مسئول)
hshonari@ihu.ac.ir

سید مسیح اعتماد ایوبی: دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

STxB

شیگلا،

غاسول صابونی،

فعالیت N-glycosidase

SO6

زمینه و هدف: یکی از راه‌های تقویت اثر واکسن‌ها استفاده از یاورها می‌باشد. STxB باکتری شیگلا دارای نقش یآوری و حاملی بوده و می‌توان با ترکیب کردن آنتی‌ژن‌های کاندیدای واکسن با این یاور به تولید واکسن مناسب پرداخت. غاسول صابونی گیاهی دارای فعالیت آن-گلیکوزیداز می‌باشد. ایزوفریم ۶ این گیاه (SO6)، آدنین 4324 را در توالی حفاظت شده GAGA در 28SrRNA پورین‌زدایی کرده و سنتز پروتئین را مختل می‌کند. هدف این مطالعه، بیان ژن SO6-STxB در باکتری اشرشیا کلی و بررسی تیترا آنتی‌بادی آن در موش می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی ژن SO6 با جایگاه‌های آنزیمی BamHI و Sall از پلاسمید pUC57 جداسازی گردید و در وکتور بیانی pET28a(+) حاوی ژن STxB زیرهمسانه‌سازی و به باکتری اشرشیا کلی سویه BL21(DE3) تراریخت شد. بیان پروتئین نوترکیب SO6-STxB توسط IPTG القا و تخلیص به وسیله کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل انجام گردید. تأیید پروتئین نوترکیب با استفاده از وسترن بلات انجام گرفت. موش‌ها به صورت صفاقی با پروتئین تخلیص شده واکسینه شدند و تیترا IgG سرم به روش ELISA مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: زیرهمسانه‌سازی ژن SO6-STxB در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله واکنش PCR و هضم آنزیمی، تأیید شد. پروتئین نوترکیب ۳۷/۵ کیلودالتونی تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن تأیید شد. سپس آنتی‌بادی تولید شده از سرم موش جداسازی و توسط الایزا اندازه‌گیری گردید.

نتیجه‌گیری: آنتی‌ژن SO6-STxB نوترکیب تخلیص شده می‌تواند برای تحقیقات ضد سرطانی و کاندید واکسن استفاده شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منع حمایت‌کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Abdollahi M, Honari H, E'temad Ayubi SM. Expression of SO6-STxB gene cassette in *Escherichia coli* and investigation of antibody titer. Razi J Med Sci.2019;25(11):52-60.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 1.0 SA-BY-NC-CC صورت گرفته است.



Expression of *SO6-STxB* gene cassette in *Escherichia coli* and investigation of antibody titer

Masoud Abdollahi, MSc, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran, Iran

Hossien Honari, PhD, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran Iran (*Corresponding author) [honorari@ihu.ac.ir](mailto:honari@ihu.ac.ir)

Seyed Masih E'temad Ayubi, PhD Student of Nanobiotechnology, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran, Iran

Abstract

Background: One of the ways to strengthen the effect of vaccines is the use of adjuvant. STxB has a carrier role and can act as an adjuvant; thus it can be fused with vaccine candidate antigens in order to produce efficient vaccines. *Saponaria officinalis* is a plant that has shown N-glycosidase activity. *SO6* isoform of this plant, depurinates the adenine 4324 in the conserved sequence GAGA in 28SrRNA and disrupts protein synthesis. The aim of this study was expression of *SO6-STxB* gene in *Escherichia coli* (*E. coli*) and investigation of antibody titer in mice.

Methods: In this study *SO6* gene with *Bam*HI and *Sal*I restriction enzyme sites were isolated from pUC57 plasmid and subcloned into pET28a (+) -*STxB* expression vector and transferred to *E. coli* BL21 (DE3). Expression of *SO6-STxB* gene cassette was induced by IPTG and purified by nickel affinity chromatography. The recombinant protein was confirmed by western blotting. Mice were immunized intraperitoneally with purified protein and serum IgG titers were measured by ELISA.

Results: Subcloning of *SO6-STxB* gene in pET28a (+) expression vector was confirmed by PCR and enzyme digestion reaction. A 37/5 kDa recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and western blotting. The antibody generated from mouse serum was isolated and confirmed by ELISA.

Conclusion: Purified recombinant antigen STxB-SO6 can be used for research and be a suitable anti-cancer vaccine candidates.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Keywords

STxB,

Sigella,

Saponaria Officinalis, N-glycosidase activity, *SO6*

Received: 06/09/2018

Accepted: 13/12/2018

Cite this article as:

Abdollahi M, Honari H, E'temad Ayubi SM. Expression of *SO6-STxB* gene cassette in *Escherichia coli* and investigation of antibody titer. Razi J Med Sci.2019;25(11):52-60.

This work is published under [CC BY-NC-SA 1.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



و بیشترین افتراق با ایزوفرم ۶ مربوط به ایزوفرم ۹ می‌باشد. پروتئین بالغ ساپورین S6 دارای ۲۵۳ اسید آمینه است. توالی کامل ساپورین S6 در سال ۱۹۹۰ شناسایی شد و تقریباً ۱۰ درصد اسیدهای آمینه را در ساپورین S6 اسید آمینه لیزین تشکیل داده است (۳). این پروتئین علاوه بر فعالیت ضد ویروسی و ضدقارچی (۴ و ۵)، توانایی از بین بردن سلول‌ها را از طریق اختلال در سنتز پروتئین آن‌ها داشته و می‌تواند به عنوان عوامل فعال بیولوژیک و ضد سرطان استفاده شوند. از آنجایی که پروتئین‌های غیرفعال کننده ریوزومی ایمنی زایی قوی را ایجاد می‌کند برای کاهش این پدیده می‌توان آن‌ها را با اضافه کردن پلی-اتیلن گلیکول یا اضافه کردن دکستران ترکیب کرد (۶). شیگلا برای انسان بیماری‌زا می‌باشد. شیگلا یک باکتری دراز، بدون کپسول، غیر متحرک، فاقد اسپور و تاژک می‌باشد (۷). توکسین شیگلا (STx) یک پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلودالتون بوده که از یک زیرواحد منومریک سمی و آنزیماتیک به نام STxA و از یک زیرواحد متصل شونده به رسپتور هموپنتامریک به نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیر سمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری می‌باشد (۸). STxB ساختار هموپنتامریک دارد که هر منومر آن از ۲۰۷ نوکلئوتید و ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی حدود ۷/۷ کیلودالتون دارد. هر منومر از یک مارپیچ آلفا و ۶ صفحه β تشکیل شده است (۹). STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb3 متصل می‌گردد که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود (۷). مطالعات نشان داده است که بیان Gb3 در سطح سلول‌های سرطانی انسان فراوانی بسیار زیادی دارد. بیان زیادی در سطح سلول‌های سرطانی مثل لنفوما، کارسینوماهای تخمدان، سینه و کولون دارد (۹). در سال ۲۰۰۵، ناک وون چوی و همکاران، ایمنی-زایی خوراکی STxB فیوژ شده با ویروس NSP490 را به اثبات رساندند (۱۰). در سال ۲۰۰۵ به منظور تقویت ایمنی‌زایی علیه STxB این پروتئین را با پروتئین هموسیانین کانجوگه کرده در بررسی ایمنی زایی

گیاهان مجموعه‌ای از مکانیسم‌های دفاعی القایی و ساختمانی برای حفاظت در مقابل بیماری‌زایی ویروسی، باکتریایی و قارچی را در طول دوره تکامل کسب کرده‌اند. یکی از این سازوکارهای دفاعی، به کارگیری مواد شیمیایی است که ماهیت پروتئینی با وزن مولکولی کم داشته و پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم (Ribosome Inactivating Proteins-RIP) نامیده می‌شوند. این پروتئین‌ها می‌توانند به میزان زیاد و در پاسخ به آلودگی‌ها و دیگر تنش‌ها در گیاهان جمع شوند و با غیرفعال کردن ریبوزوم‌ها فرآیند پروتئین‌سازی را متوقف کنند. پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم اولین بار در سال ۱۹۸۳ شناسایی و جداسازی شدند. این ترکیب‌ها دارای گروه‌های متنوعی هستند و از منابع مختلف گیاهی، باکتریایی و قارچ سنتز می‌شوند. RIP‌های نوع I پروتئین‌های مونومری با وزن مولکولی تقریباً ۳۰ کیلودالتون هستند که دارای فعالیت آنزیمی RNA- آن گلیکوزیدازی می‌باشند. در مقابل، ترکیبات دسته دوم هستند که شامل پروتئین‌های مشتق شده از ۲ رشته شامل زنجیر A با فعالیت آنزیمی RNA N-glycosidas و یک یا چند زنجیره B بوده که این زنجیره سبب ورود راحت‌تر این پلی‌پپتید به سیتوپلاسم می‌شود. وزن مولکولی این نوع از پلی‌پپتیدها تقریباً ۳۵ کیلودالتون می‌باشند. معمولاً زنجیره‌های B از پپتیدهای شبه لکتین تشکیل شده‌اند. یکی از این پروتئین‌ها، ساپورین SO6 می‌باشد که جز خانواده نوع I بوده و بیشتر از دانه گیاه غاسول صابونی (*Saponaria Officinalis*) استخراج می‌شود (۱). در مورد ساپورین خانواده چند ژنی وجود دارد که حداقل ۱۰ ایزوفرم پروتئینی متفاوت از بخش‌های مختلف گیاه، مانند دانه، برگ، ریشه استخراج شده است (۲). سمی‌ترین ایزوفرم‌های ساپورین ایزوفرم ۵، ۶ و ۹ می‌باشد. نتایج تطبیق توالی ایزوفرم‌ها به صورت: ایزوفرم ۱: ۹۵٪، ایزوفرم ۲: ۹۵٪، ایزوفرم ۳: ۹۰٪، ایزوفرم ۴: ۹۸٪، ایزوفرم ۵: ۹۸٪، ایزوفرم ۶: ۱۰۰٪، ایزوفرم ۷: ۹۸٪، ایزوفرم ۸: ۹۸٪ و ایزوفرم ۹: ۹۱٪ بوده

درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۷). سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده مخلوط و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با نسبت یک (بافر نمونه) به پنج (نمونه) با سمپل بافر دارای غلظت ۵x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. در نهایت نمونه‌های تیمار شده توسط ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) از لحاظ بیان پروتئین‌های نو ترکیب بررسی شدند (۱۷). نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (سینازن) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲٪ و جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر بود. برای مشاهده باندهای پروتئین، از روش رنگ آمیزی با کوماسی بلو استفاده شد (۱۷).

برای تأیید پروتئین نو ترکیب، از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلیاسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰٪ و pH=۸/۳) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. به منظور پرکردن جایگاه‌های خالی (بلاکینگ)، کاغذ به مدت یک شب در محلول ۳ درصد شیرخشک در بافر فسفات و سالین-تویین (Phosphat-Buffered Saline-Tween-PBST) در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سه مرتبه با PBST شستشو داده شد. کاغذ با آنتی‌بادی‌های پلی کلونال موشی (۱۵) با رقت ۱:۲۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. فرآیند شستشو با PBST سه بار انجام گرفت. کونژوگه موشی با رقت ۱:۵۰۰۰ به عنوان آنتی‌بادی تشخیص دهنده به کار رفت. همانند مرحله قبل گرماگذاری انجام شد. فرآیند شستشو نیز همانند مراحل قبلی انجام شد. نهایتاً، کاغذ نیتروسولوز در محلول سوپسترای رنگ‌زای دی‌آمینوبنزدین (Diaminobenzidine-DAB) (۶۰ میلی گرم در صد میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۸) تا ظهور باند پروتئینی، قرار گرفت. برای توقف واکنش، کاغذ در آب مقطر قرار داده شد (۱۷). برای تخلیص پروتئین نو ترکیب، پروتئین حاصل تحت

پروتئین کایمیک پاسخ ایمنی به طور ناچیزی بهبود یافت و IgG1 ترشحی قوی‌تری ایجاد گردید (۱۱). هدف این مطالعه بیان ژن SO6-STxB در اشرشیا کلی و بررسی تیترانتی‌بادی آن در موش سوری بود که با موفقیت انجام شد. در آینده می‌توان آنتی ژن تولید شده را جهت بررسی‌های بیشتر به عنوان تولید کاندید واکسن و داروی ضد سرطان مورد استفاده قرار داد.

روش کار

در این مطالعه جهت ساخت کاست ژنی SO6-STxB ژن SO6 گیاه غاسول صابونی و ژن STxB کلون شده در pET-28a(+) از آزمایشگاه مولکولی دانشگاه جامع امام حسین (ع) دریافت شد (۱۵-۱۲). کاست طراحی شده به طور شماتیک به صورت BamHI-SO6-Linker(RARR)-STxB-uaa-XhoI می‌باشد.

برای ساخت کاست ژنی ابتدا واکنش هضم آنزیمی با آنزیم BamHI و SalI بر روی پلاسمید pUC57 انجام گرفت و وکتور بیانی pET-28a(+)-STxB نیز به منظور ساخت کاست ژنی با آنزیم‌های BamHI و SalI برش خورده شد (۱۲). پس از هضم آنزیمی، قطعه ژنی SO6 و pET-28a(+)-STxB برش خورده، از روی ژل آگارز به وسیله کیت استخراج DNA تخلیص گردید (۱۶). ژن SO6 که توسط آنزیم‌های BamHI و SalI برش خورده، به وکتور بیانی pET-28a(+)-STxB که با همین آنزیم‌ها برش خورده و استخراج شده بود، الحاق گردید. واکنش الحاق به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد توسط آنزیم T4 DNA Ligase شرکت فرمنتاز صورت گرفت. محصول الحاق، با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد شده (تهیه شده به روش کلرید کلسیم) BL21(DE3) اشرشیا کلی تراریخت گردید. کلنی‌های نو ترکیب با آنتی بیوتیک کانامایسین، PCR و هضم آنزیمی غربالگری شدند (۱۶).

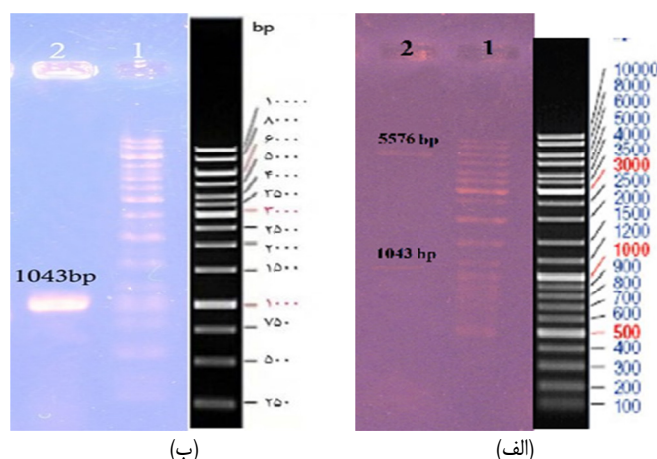
برای بیان کاست ژنی SO6-STxB از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القا کننده پروموتور (IPTG) (فرمنتاز) با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷

SO6 در وکتور pUC57 با هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم های برشی *SalI* و *BamHI* استفاده شد که ژن مورد نظر با طول توالی ۷۵۹ جفت باز از وکتور خارج و تخلیص گردید. برای قراردادن قطعه ژنی SO6 در وکتور pET-28a(+)-STxB، این پلاسمید با آنزیم های برشی *SalI* و *BamHI* خطی شد. بعد از برش آنزیمی، پلاسمید تخلیص شد. پلاسمید تک باند شده در جریان الکتروفورز در راستای باند حدود ۵۵۷۶ جفت باز ایستاد. بعد از الحاق ژن، وکتور به سلول های (DE3) BL21 اشرشیا کلی تراریخت شد. برای تأیید زیر همسانه سازی از کلنی های کشت داده شده به روش لیز قلیایی استخراج پلاسمید انجام شد. برای پلاسمیدها PCR و برش هضم آنزیمی گذاشته شد. پس از تکثیر ژن SO6-STxB به روش PCR، محصول روی ژل ۱٪ آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعه مورد نظر (۱۰۴۳

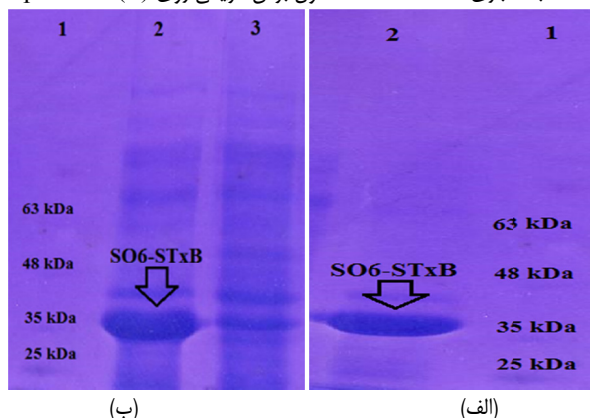
شرایط دناتورده و با استفاده از ستون Ni-NTA جداسازی و نمونه های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شد. غلظت پروتئین بیان شده به کمک برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin-BSA) به عنوان استاندارد انجام شد. به منظور بررسی پاسخ ایمنی، از ۵ عدد موش سوری به عنوان تست و ۴ عدد به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر موش، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده SO6-STxB با یاور (adjuvant) روغن در آب (oil) (in water) به هر موش به صورت داخل صفاقی در سه نوبت و با فاصله ۱۵ روز تزریق شد و تیترانتی بادی آن ها توسط آزمایش الایزا اندازه گیری شد.

یافته ها

به منظور ساخت کاست ژنی SO6-STxB، قطعه



شکل ۱- تأیید زیرهمسانه سازی ژن هدف در pET-28a(+). شکل ۱-الف): مارکر DNA 100 جفت بازی تا 10 kb، ۲: محصول PCR روی پلاسمید pET-28a(+). شکل ۱-ب): مارکر DNA 100 جفت بازی تا 10 kb، ۲: محصول برش آنزیمی روی pET-28a(+)



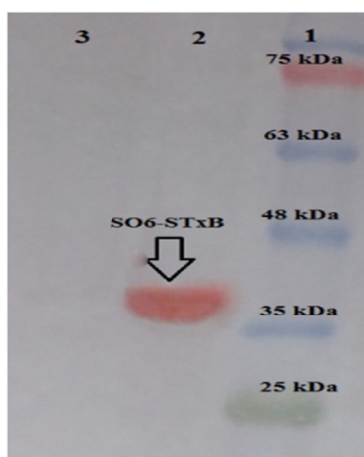
شکل ۲- بیان پروتئین مورد نظر و تخلیص آن. الف) بیان پروتئین مورد نظر: (۱) نشانگر پروتئین، (۲) سلول تحت القا IPTG، (۳) نمونه شاهد، سلول بدون القا با IPTG. ب) تخلیص پروتئین مورد نظر: (۱) نشانگر پروتئین، (۲) پروتئین نوترکیب تخلیص شده از ستون.

مورد تأیید بود (شکل ۲-ب).
به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی (۱۵) استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونه القا شده با IPTG است، یک باند در ۳۷/۵ کیلودالتون مشاهده شد. در ستون شاهد که تحت القای IPTG نبوده باندی مشاهده نشد (شکل ۳).

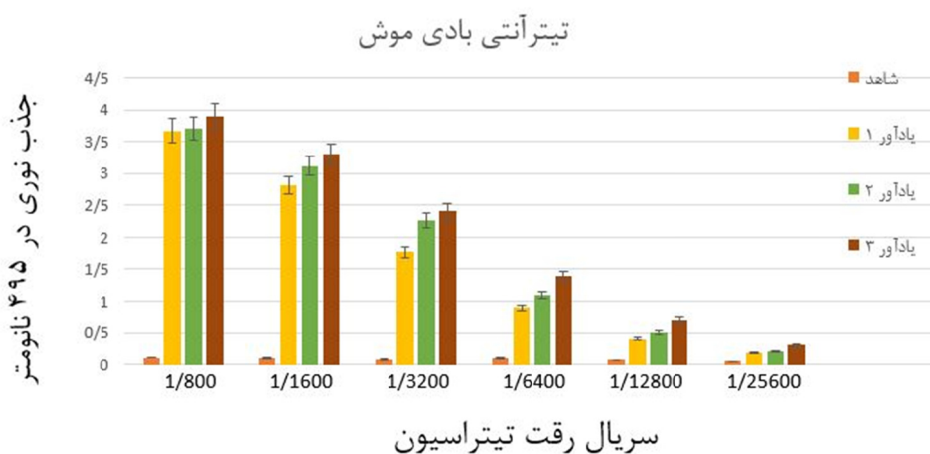
به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولیدشده و محاسبه میزان آن در هر مرحله از تزریق، از روش الیزای غیرمستقیم استفاده شد. تولید آنتی‌بادی نشان‌دهنده تحریک سیستم ایمنی حیوان آزمایشگاهی می‌باشد. یک هفته بعد از هر بار تزریق (به استثنای تزریق اول) و ۶۰ روز بعد از تزریق اول، از موش‌های تست و شاهد خونگیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها، تست الیزا انجام شد که نمودار تیتراستی‌بادی در هر

جفت باز) از لحاظ اندازه با ژن هدف ما همخوانی داشت (شکل ۱-الف). همچنین پلاسمیدها با دو آنزیم‌های برشی BamHI و XhoI برش داده شدند. سپس به کمک نشانگر، اندازه قطعه خارج شده از وکتور تأیید شد (شکل ۱-ب).

برای بررسی بیان ژن SO6-STxB در وکتور pET28a(+) پس از کشت سلول‌ها و القاء با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت و پس از تیمار خام، بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب از ژل ۱۲ درصد استفاده شد (شکل ۲-الف). پس از تأیید بیان، پروتئین نوترکیب مورد نظر با استفاده از ستون Ni-NTA تخلیص و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شد که پروتئین تک باند حاصل در راستای ۳۷/۵ کیلودالتون قرار داشت و تخلیص پروتئین نوترکیب



شکل ۳- وسترن بلاتینگ پروتئین مورد نظر. ۱: نشانگر پروتئین ۲: سلول القاء شده با IPTG ۳: نمونه شاهد، سلول بدون القا با IPTG.



نمودار ۱- بررسی تیتراستی بادی با استفاده از تکنیک الیزا

مرحله در نمودار ۱ نشان داده شده است. با توجه به تیترانتی‌بادی، ایمونوگلوبولین G (IgG) سرمی مناسبی تولید شده است و آنتی ژن، باعث تحریک ایمنی هومورال شده است و نشان دهنده کارایی مناسب کاندید واکسن تولیدی می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

توسعه تولید واکسن‌های جدید بر پایه آنتی ژن‌های حفاظتی خالص شده به علت ایمنی‌زایی پایین آنتی-ژن‌های محلول و نبودن یاور مخاطی موثر و ایمن، دچار اختلال گردیده است. برای برطرف کردن این نقص و بالا بردن میزان ایمنی‌زایی SO₆، آن را با یاور همراه می‌کنند. نتایج تحقیقات انجام شده نقش حاملی و یآوری STxB را اثبات کرده است. تحقیقات صورت گرفته مشخص کردند که مقدار آنتی‌ژنی که در حالت فیوژن شده با یک یاور برای مصرف ضروری است، کمتر از مقداری می‌باشد که به صورت تجویز همزمان برای ایمنی‌زایی استفاده می‌گردد که این نشان از مزیت متصل کردن آنتی‌ژن‌ها با یاورهای مختلف دارد (۱۸). امروزه تلاش‌های زیادی برای ساخت واکسن علیه شیگلا و سم آن انجام شده و کاندیدهای زیادی همانند STxB، IPaC، IPaB، IPaD و غیره گزارش شده است. جالب اینکه هیچ کدام از این کاندیدها به دلایل مختلف تا امروز مورد تأیید سازمان جهانی سلامت WHO و FDA قرار نگرفته است؛ اما تلاش‌ها برای ساخت واکسن علیه شیگلا به طور جدی ادامه دارد. نتایج پژوهش‌های منتشر شده در خصوص شیوع شیگلا در ایران، نشان می‌دهد که تا چند سال پیش شیگلا فلکسنری بیشترین شیوع را در ایران دارا بوده است. در رتبه‌های بعدی به ترتیب شیگلا سونئی و شیگلا دیسانتری قرار دارند و مقدار کمی شیگلا بوئیدی مشاهده شده است؛ اما مطالعات جدید نشان از شیوع بیشتر شیگلا سونئی در مقابل شیگلا فلکسنری می‌دهد. تقریباً همین ترتیب شیوع شیگلا در کشورهای همسایه ایران (عربستان و پاکستان) نیز گزارش شده است (۱۹).

در سال ۲۰۱۳ هنری و همکاران ایمنی زایی خوکچه هندی با پروتئین نوترکیب IpaD-StxB را بررسی و نتایج چالش نشان داد که خوکچه‌های هندی ایمن شده توانستند ۲۸ برابر LD₅₀ شیگا توکسین اشرشیا کلی

O157:H7 را تحمل نمایند (۱۹). در سال ۲۰۱۴ هنری و همکاران بیان پروتئین نوترکیب IpaD-STxB و بررسی ایمنی‌زایی آن در موش سوری را انجام و مشاهده نمودند که تیترانتی‌بادی علیه پروتئین IpaD-STxB در موش افزایش محسوسی داشته و نتایج نشان داد که موش‌های ایمن شده توانستند ۷/۵ برابر LD₅₀ شیگلا توکسین O157:H7 اشرشیا کلی را تحمل نمایند (۲۰). در سال ۲۰۱۵ باران وند و همکاران ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌های STxB و IpaD-STxB را به صورت نازال در موش‌های آزمایشگاهی بررسی و مشاهده کردند که با ترکیب شدن IpaD به STxB میزان تیترانتی‌بادی نسبت به تیترانتی‌بادی علیه آنتی‌ژن STxB افزایش یافته است (۲۱). عبدالهی و همکاران در سال ۲۰۱۷ بیان ژن SO₆ گیاه غاسول صابونی را در باکتری اشرشیا کلی مورد بررسی قرار دادند. در نتیجه این پژوهش میزان بیان بالایی از پروتئین نوترکیب به دست آمد. همچنین در ادامه پروتئین حاصل شده به حیوان آزمایشگاهی تزریق و تیترانتی‌بادی تولیدی اندازه‌گیری شد، بر اساس نتایج به دست آمده تیترانتی‌بادی بالایی پس از خون‌گیری دوم مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده یک تزریق در این پژوهش کاهش داده شد که باز هم تیترانتی‌بادی به شدت افزایش داشته است، این احتمال وجود دارد که خود آنتی‌ژن SO₆ دارای خاصیت یآوری باشد (۲۲). پروتئین StxB اندازه کوچکی دارد و پاسخ ایمنولوژیک مناسبی در بدن در مقابل آن ایجاد نمی‌شود ولی هنگامی که با SO₆ همراه شود پاسخ ایمنولوژیک بدن در برابر آن افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند. نتایج پژوهش ما نشان دهنده تولید تیترانتی‌بادی، ایمونوگلوبولین G (IgG) سرمی مناسبی بود که نشان دهنده کارایی مناسب آنتی‌ژن تولیدی ما در تحریک سیستم ایمنی حیوان آزمایشگاهی می‌باشد.

پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزومی با فعالیت آن-گلیکوزیدازی مانند ساپورین زیر واحد 28S rRNA را جدا کرده و باعث توقف سنتز پروتئین می‌شوند (۲۳). غلظت مهارکنندگی (Inhibitory concentration) در ایزوفرم‌های مختلف پروتئین‌های ساپورین متفاوت است. ایزوفرم‌های ۵، ۶ و ۹ جز قوی‌ترین ایزوفرم‌ها

دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Stirpe F, Battelli M. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci*; 2006. 63(16):1850-66.
2. Ferreras J, Barbieri L, Girbés T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ, et al. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochim Biophys Acta*; 1993. 1216(1):31-42.
3. Maras B, Ippoliti R, De Luca E, Lendaro E, Bellelli A, Barra D, et al. The amino acid sequence of a ribosome-inactivating protein from *Saponaria officinalis* seeds. *Biochem Int*; 1990. 21(5):831-8.
4. Duggar BM, Armstrong JK. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants. *Ann Missouri Bot Gard*; 1925. 12(4):359-66.
5. Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J Biol Chem*; 1991. 266(3):1564-73.
6. Wang S, Li Z, Li S, Di R, Ho CT, Yang G. Ribosome-inactivating proteins (RIPs) and their important health promoting property. *RSC Adv*; 2016. 6(52):46794-805.
7. Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, Effenterre D. Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites. *J Cell Biol*; 2008. 100(12):717-28.
8. Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. *Toxicon*; 2005. 45(4):389-93.
9. Janssen KP, Vignjevic D, Boisgard R, Falguières T, Bousquet G, Decaudin D, et al. In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. *J Cancer Res*; 2006. 66(14):7230-6.
10. Choi NW, Estes MK, Langridge WH. Oral immunization with a shiga toxin B subunit: rotavirus NSP4 90 fusion protein protects mice against gastroenteritis. *Vaccine* 2005;23(44): 5168-5.
11. Marcato P, Thomas P, Griener, George L, Mulvey, Glen D. Armstrong2. Recombinant Shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. *Infect Immun*; 2005. 73(10):6523-9.
12. Honari H, Amlashi I, Minaee ME, Safaee S. [Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB

می‌باشند، به صورتی که این غلظت برای سه ایزوفرم نامبرده شده به ترتیب ۰,۰۵ نانو مولار، ۰,۰۶ نانو مولار و ۰,۰۳۷ نانو مولار می‌باشد (۲۴). مقایسه عملکرد دو ایزوفرم از دانه ساپورین (ایزوفرم ۵ و ۶) نشان می‌دهد که ایزوفرم ۶، خاصیت آنزیمی و فعالیت سمی بیشتری نسبت به ایزوفرم ۵ دارد (۲۵). شروع اثر سمیت ساپورین S6 توسط مهار سنتز پروتئین شروع اما مشاهده غیرفعال‌کنندگی ریبوزوم با دپورینه کردن DNA و دیگر نوکلئیک اسیدهایی است که از یکدیگر و اسرشت شده اند آغاز می‌گردد. اولین توصیفی که از ساپورین S6 می‌توان گفت توانایی کشتن سلول‌ها با آپوپتوز است که در سال ۱۹۹۶ کشف گردید. برخی از ویژگی‌های آپوپتوز مانند قطعه قطعه شدن کروماتین، اجسام آپوپتوتیک، سلول‌های هیپودیپلوئید در لنفوسیت‌ها و بسیاری از رده‌های سلولی سرطان خون پیدا شده‌اند (۲۶ و ۲۷). با اضافه کردن پلی‌اتیلن‌گلیکول یا دکستران، ایمنی زایی پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزومی را می‌توان کاهش داد و در سرکوب سلول‌های سرطانی استفاده کرد (۶). ورود پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزومی به سلول‌ها را می‌توان توسط پالس‌های الکتریکی (۲۸)، امواج (۲۹) و یا ورود فتوشیمیایی (۳۰) تسهیل کرد. پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزومی علاوه بر فعالیت آن-گلیکوزیدازی دارای چندین فعالیت آنزیمی دیگر مانند فعالیت کیتینازی، سوپراکسید دیسموتازی و لیپازی می‌باشند (۲۴).

از آنجا که پروتئین غیرفعال کننده ریبوزومی SO6 بسیار پایدار بوده و با توجه به فعالیت حاملی و یابوری STxB و احتمال خاصیت یابوری پروتئین نو ترکیب SO6، پروتئین به دست آمده فعالیت آنزیمی قوی از خود نشان می‌دهند و توانایی از بین بردن سلول‌ها از طریق اختلال در سنتز پروتئین‌ها را دارند (۳۱). در آینده می‌توان از آنتی‌بادی این ترکیبات به عنوان کیت تشخیصی عامل بیوتورویستی سم گیاهی غاسول صابونی در جنگ‌های بیولوژیک و همچنین آنتی‌ژن تولیدی را به عنوان یک ترکیب ضد سرطان قوی و کاندید واکسن جهت بررسی‌های بیشتر پیشنهاد نمود.

تقدیر و تشکر

از تمامی اساتید، پژوهشگران و همکاران محترم در

recombinant protein]. AMUJ; 2013. 16(4):83-93. [Persian].

13. Honari H, Amlashi I, Minaei ME. [Expression of recombinant proteins IpaD-STxB and immunogenicity STxB in the mice]. J Mazandaran Univ Med Sci; 2014. 23:196-206. [Persian].

14. Honari H, Minaei HH, Ebrahim M. [Analyzing the various fusions for ctxB, ipaD and stxB genes of Shigella dysenteriae and Vibrio cholera by bioinformatics tools]. Genetics in the 3rd Millennium; 2013. 11(2):3070-7. [Persian].

15. Abdollahi M, Honari H, Nazarian S, Masoudi Kerahroudi M. [Subcloning and expression of SO6 gene, Saponaria officinalis plant in E. coli and investigation of antibody titer in rats]. JSSU; 2017. 24(12):1024-33. [Persian].

16. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition. ColdSpring-Harbour Laboratory Press, UK. 2001.

17. Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: cloning, expression, purification, and proteolytic activity. Protein Expr. Purif; 1999. 15(2):221-7.

18. Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang PL, Chang HW, et al. The immunogenicity of DNA constructs co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus conjugated by GPGP linker in pigs. Vet Microbiol; 2010 Dec 15. 146(3):189-99.

19. Honari H, Amlashi I, Minaei ME, Safaei S. [Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein]. AMUJ; 2013. 83-93. Persian.

20. Honari H, Amlashi ???, Minaei ME. [Expression of recombinant proteins IpaD-STxB and immunogenicity STxB in the mice]. J Mazandaran Univ Med Sci; 2014. 183-93. [Persian].

21. Baravand M, Honari H. [Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats]. Koomesh; 2015. 397-403. [Persian].

22. Abdollahi M, Honari H, Nazarian SH, Masoudi Kerahroudi M. [Subcloning and expression of SO6 gene, Saponaria officinalis plant in E. coli and investigation of antibody titer in laboratory rat]. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 2017. 24(12):1024-33. [Persian].

23. Walsh MJ, Dodd JE, Hautbergue GM. Ribosome-inactivating proteins: Potent poisons and molecular tools. Virulence; 2013. 4(8):774-84.

24. Schrot J, Weng A, Melzig MF. Ribosome-inactivating and related proteins. Toxins; 2015. 7(5):1556-615.

25. Bagga S, Hosur M, Batra JK. Cytotoxicity of ribosome-inactivating protein saporin is not mediated through α 2-macroglobulin receptor. FEBS Lett; 2003. 541(1-3):16-20.

26. Bergamaschi G, Perfetti V, Tonon L, Novella

A, Lucotti C, Danova M, et al. Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis. Br J Haematol; 1996. 93(4):789-94.

27. Bolognesi A, Tazzari PL, Olivieri F, Polito L, Falini B, Stirpe F. Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. Int J Cancer; 1996. 68(3):349-55.

28. Mir LM, Banoun H, Paoletti C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol. Exp Cell Res; 1988. 175(1):15-25.

29. Kodama T, Doukas AG, Hamblin MR. Delivery of ribosome-inactivating protein toxin into cancer cells with shock waves. Cancer Lett; 2003. 189(1):69-75.

30. Selbo P, Kristian al, Høgset A, Prasmickaite L, Berg K. Photochemical internalisation: a novel drug delivery system. Tumor Biol; 2002. 23(2):103-12.

31. Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. Toxicon; 2004. 44(4):371-83.