تولید و تخلیص آنتی بادی پلی کلونال علیه زیرواحد فرعی فیمبریه باکتری اشریشیاکولی انتروتوکسیژنیک (ETEC) و مطالعه توانایی آن در ممانعت از اتصال باکتری به رسپتور هدف

میثم منصوری[۱]، سید جعفر موسوی[۲] *، شهرام نظریان[۳]، زهرا احصایی[۱]، مهدی تات[۴] و محمدرضا زالی[۵]

۱. آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)
۲. دکتری تخصصی بیوشیمی، استادیار مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)
۳. کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)
۴. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)
۵. فوق تخصص بیماریهای گوارش، استاد مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران-بزرگراه شهید بابایی- دانشگاه جامع امام حسین(ع)- دانشکده و پژوهشکده علوم پایه- مرکز تحقیقات زیست شناسی، تلفن ۷۷۱۰۴۹۳۴، jmousavy@yahoo.com

دریافت مقاله: تیر نود پذیرش برای چاپ: شهریور نود

چکیده

سابقه وهدف: *باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) شایعترین عامل اسهال باکتریایی در سراسر دنیاست. فیمبریه CFA/I یکی از عوامل ویرولانس مهم است که نقش اساسی در بیماریزایی این باکتری دارد. از این رو، پروتیئن انتهایی این فیمبریه (CFaE) می تواند به عنوان کاندید واکسن مطرح باشد. هدف از این مطالعه، تعیین کارایی آنتی بادی تولید شده علیه CFaE در ممانعت از اتصال ETEC به رسپتورهای سطح سلول های اریتروسیت انسانی به عنوان یک مدل می باشد.*

روش کار: *پس از بهینه سازی کدون های ژن cfaE این ژن سنتز شده و سپس در وکتور بیانی pET28a همسانه سازی گردید. به دنبال القای سازه ژنی با ماده IPTG، پروتیئن مورد نظر بیان و با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی تخلیص گردید. پروتیئن نوترکیب به عنوان آنتی ژن به موش آزمایشگاهی تزریق و تیتر سرم ها با الایزا اندازه گیری شد. در نهایت توانایی اتصال باکتری ها به اریتروسیت های انسانی گروه A در حضور و عدم حضور آنتی بادی علیه CFaE مورد مطالعه قرار گرفت.*

یافته ها: *باکتری های تیمار شده با سرم موش های ایمن برخلاف باکتری های تیمار شده با سرم موش کنترل قادر به ایجاد هماگلوتیناسیون نبودند.*

نتیجه گیری: *یافته های این تحقیق نشان می دهد پروتیئن CFaE به عنوان ایمونوژن توانسته به خوبی سیستم ایمنی موش ها را تحریک نماید. ضمن اینکه آنتی بادی تولید شده علیه آن با اتصال به پروتیئن های فیمبریه مانع از اتصال باکتری ETEC به رسپتور مدل شده است.*

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک؛ زیر واحد فرعی آنتی ژن عامل کلونیزاسیون I (CFaE)، آنتی بادی، سنجش ممانعت از اتصال باکتری.

مقدمه

در قرن حاضر با وجود پیشرفت های عمده و تلاش های جهانی در تضمین بهداشت و سلامت مردم، هنوز هم بیماری ناشی از اسهال یکی از مهمترین مشکلات بهداشتی در سطح جهان از جمله ایران است(۱و۲). در این بین باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) شایعترین عامل اسهال باکتریایی در سراسر دنیا می باشد(۳و۴). تخمین زده می شود که عفونت های ETEC، مسئول حداقل ۶۵۰ میلیون مورد اسهال است که سالانه جان نزدیک به هشتصد هزار کودک زیر ۵ سال را می گیرد(۵). همچنین ETEC به عنوان شایع ترین عامل اسهال در میان مسافران نیز مطرح است و سالانه تعداد زیادی از جهانگردانی را که به نواحی اندمیک بیماری مسافرت می کنند؛ تحت تاثیر قرار می دهد(۶).

باکتری ETEC از طریق آب و غذای آلوده وارد بدن انسان شده و در سطح سلول های اپی تلیال روده کوچک کلونیزه می شود. در گام بعدی، باکتری انتروتوکسین های مقاوم به حرارت (ST) و یا حساس به حرارت (LT) را ترشح می نماید که این سموم باعث خروج آب و الکترولیت ها از سلول و نهایتاً موجب ایجاد اسهال می گردد(۷و۸). اتصال باکتری به سطح سلول های اپی تلیالی یک مرحله کلیدی در شروع عفونت محسوب می شود. این اتصال به وسیله فاکتورهای کلونیزاسیون (CF) که زائده های پروتیئنی در سطح باکتری هستند، صورت می پذیرد. حداقل ۲۵ نوع متفاوت از فیمبریه (که به لحاظ آنتی ژنی از هم متفاوتند) در سویه های ETEC شناسایی شده اس(۷). در این بین، فیمبریه CFA/I اولین فاکتور کلونیزاسیون ETEC خاص انسان است که گزارش شده(۹) و همچنین این فیمبریه شایعترین نوع فیمبریه در میان فیمبریه های شناخته شده برای ETEC در کل جهان است(۱۰). هزار زیر واحد اصلی(CFaB) تولید یک ساقه را برای فیمبریه CFA/I نموده که یک یا تعداد اندکی زیر واحد فرعی به نام CFaE در نوک این فیمبریه جای می گیرد(۱۱). در حقیقت ساختار CFA/I یک مارپیچ است که بدنه آن از CFaB ساخته شده و یک پروتیئن انتهایی به نام CFaE در نوک این ساختمان قرار گرفته است(۱۲).

واکسنی که بتواند این بیماری را کنترل کند تاثیر مهمی در کاهش موارد بیماری و مرگ و میر خواهد داشت(۱۳ و ۱۴). شواهد نشان داده است که امکان به وجود آمدن ایمنی حفاظتی علیه این بیماری وجود دارد؛ افراد بالغ در کشورهای در حال توسعه کمتر به این بیماری مبتلا می شوند و مسافران به این مناطق نیز در صورت اقامت طولانی مدت به این بیماری دچار نمی گردند(۱۵-۱۳). از آنجایی که هدف اصلی سازمان های بهداشتی (نظیر WHO) تولید واکسن موثر علیه این عامل است(۱۶)، به نظر می رسد مطالعه بر روی CFaE به عنوان یک کاندیدای بالقوه بتواند نقش مهمی را در طراحی واکسن علیه کلونیزاسیون ETEC داشته باشد. مطالعه حاضر، به کند وکاو کارایی آنتی بادی تولید شده علیه CFaE به منظور ممانعت از اتصال باکتری ETEC به رسپتورهای سطح سلول اریتروسیت های انسانی گروه A که همان رسپتورهای مورد نظر در سطح روده می باشد، به صورت یک مطالعه در شیشه ای (in vitro) می پردازد.

روش کار

آنالیز های بیوانفورماتیکی لازم روی ژن cfaE با استفاده از نرم افزارهای تحت شبکه به منظور بررسی محتوی GC این ژن، وجود کدون های نادر، پایداری mRNA، و همچنین شاخص سازگاری کدون (CAI) انجام گرفت. با استفاده از الگوریتم OptimumGene™ کلیه پارامترهای ذکر شده به منظور رسیدن به بیان حداکثر در باکتری E.coli، مطابق با الگوی کدون های رایج این باکتری و با حفظ توالی اصلی اسید آمینه، بهینه سازی شد. در انتها، این ترادف توسط شرکت ژن اسکریپت (آمریکا) سنتز شد. ژن مذکور پس از سنتز با استفاده از آنزیم های محدودالاثر BamHI و HindIII که در دو انتهای ژن سنتتیک طراحی شده بودند، برش خورده و در داخل وکتور بیانی pET28a که پیشتر با همین دو آنزیم برش خورده و آماده شده بود، با استفاده از آنزیم T4DNA پلیمراز همسانه سازی گردید. سپس وکتور نوترکیب با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد E.coli BL21DE3pLysS منتقل شد و باکتری ها بروی محیط انتخابی لوریا- برتانی آگار(کانامایسین، ۸۰ µg/ml) کشت گردیدند[۱۸].

بررسی بیان پروتیئن نوترکیب CfaE

سویه‌های نوترکیب واجد وکتور pET28a-cfaE ابتدا در محیط کشت LB مایع حاوی کانامایسین(غلظت ۸۰ µg/ml) کشت گردید. سپس ماده IPTG (ایزوپروپیل β-D- تیوگالاکتوپیرانوزید) به عنوان القاء کننده با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت اضافه و سلول ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰rpm گرماگذاری شدند. پس از جمع آوری سلول ها، سونیکاسیون(قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۷۵) انجام شد.نمونه ها برای بررسی بیان بر روی ژل SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند(۱۸).

برای تخلیص پروتئین، یک بیان ۲۰ میلی لیتری تهیه شد. به ازای رسوب سلولی حاصل از هر ۱ میلی لیتر محیط کشت، ۵۰ ماکرو لیتر بافر PBS حاوی اوره ۸ مولار اضافه و سوسپانسه گردید. پس از افزودن بافر PBS حاوی اوره ۸ مولار، نمونه ها به فواصل ۱۰ دقیقه و به مدت یک ساعت (هر ۱۰ دقیقه ۶ بار) سونیکیت (قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۷۵) شدند. سپس محلول سونیکیت شده با دور ۱۵۰۰۰ rpm و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و مایع رویی جمع آوری شد. به منظور افزایش کارایی فرایند تخلیص و حذف آلودگی های احتمالی (نظیر دیواره سلولی و سایر اضافات سلولی باکتری E. coli) یک روش موثر پیش-تخلیص استفاده شد.برای این منظور، بعد از لیز نمودن سلول ها با عمل سونیفیکاسیون، سلول ها با استفاده از محلول شستشو (100 mM Tris.Cl: pH 7.0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT [770 mg/liter], 2 M urea, 2% [w/v] Triton X-100) شسته شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۳۰دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. مایع رویی بیرون ریخته شده و به رسوب حاصل بافر استخراج 50 mM Tris.Cl: pH 7.0, 5 mM EDTA, 8 M urea, 5 mM DTT [770 mg/liter]) اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۳۰۰۰۰ rpm الترا سانتریفوژ شد (Beckman Optima XL-90 ultracentrifuge). از مایع رویی حاصل برای تخلیص پروتیئن استفاده شد. به منظور تخلیص پروتئین ها از کیت MagHis ساخت شرکت Promega استفاده شد. تخلیص به روش دناتوره و با استفاده از محلول های شستشو و استخراج (بر مبنای تغییر pH) صورت گرفت(۱۹). نمونه خروجی پس از سنجش پروتئین به روش برادفورد(۲۰)، روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز گردید. برای تایید پروتیئن نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلاتینگ با آنتی بادی منوکلونال ضد دنباله هیستیدین (شرکت روش، آلمان) استفاده شد.

جهت حذف اوره از نمونه ها، روش دیالیز بکار گرفته شد. پس از تخلیص پروتئین، نمونه های علیه بافر PBS استریل(حاوی یک شیب اوره؛ به ترتیب اوره ۶ مولار،۴ مولار،۲مولار و بدون اوره) با pH ۷/۲ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت دیالیز شدند(۲۱).

برای تولید آنتی بادی علیه پروتیئن نوترکیب از گروه های ۶ تایی موش آزمایشگاهیBalb/c، ۸-۶ هفته با میانگین وزن تقریبی ۲۲ گرم انتخاب شد. در نوبت اول ۲۰ میکروگرم از آنتی ژن در ادجوان کامل فروند به ازای هر موش به صورت زیر جلدی به هر موش تزریق شد. بعد از آن با فاصله ۲۱ روز از تزریق اول، بوستر اول تا سوم به ترتیب معادل ۱۵ و ۱۰ میکروگرم به ازای هر موش به همراه ادجوان ناقص فروند تزریق شد و در بوسترسوم معادل ۵ میکروگرم در هر موش و بدون ادجوان تزریق شد. به یک گروه ۴ تایی از موش ها، به عنوان شاهد تنها PBS استریل(همراه با ادجوانت های کامل و ناقص) تزریق گردید. یک هفته پس از هر تزریق و در پایان تزریقات سرم جداسازی ودر چهار درجه سانتی گراد انجام شد.

در این روش، هر چاهک با ۱ میکروگرم از پروتئین نوترکیب (آنتی ژن) با استفاده از بافر کربنات – بی کربنات (pH9.6) پوشیده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. در مرحله بلاکینگ از کازئین ۵٪ استفاده شد. در بین تمامی مراحل الایزا، شستشو با بافر PBST (pH 7.2 Tween 0.05%) انجام شد. از سرم های حاصل از خونگیری با توالی رقت از ۱/۵۰۰ تا ۱/۱۶۰۰۰ استفاده شد. سپس، از رقت ۱/۲۰۰۰ کانژوگه موشی (Anti mouse IgG HRP Congugated) در PBST استفاده گردید. پس از آن، سوبسترا حاوی ۲ میلی گرم OPD در ۵ میلی لیتر بافر سیترات- فسفات (pH5) که به آن ۳ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ افزوده شده به هر چاهک اضافه گردید و میکرو پلیت به محل تاریکی منتقل شد تا واکنش انجام گیرد. واکنش با اسید سولفوریک ۲/۵ مولار متوقف و جذب نوری چاهک ها توسط دستگاه خواننده الایزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد(۲۲).

برای تخلیص آنتی بادی IgG از ستون پروتئین G (سیگما، آمریکا) استفاده شد. سرم موش های ایمن با هم مخلوط شده سپس، معادل ۰/۱ حجم سرم، محلول ۱ میلی مولار تریس (pH= ۸) به آن افزوده و پس از ورتکس به ستون منتقل گردید. محلول خروجی در داخل لوله های ۱/۵ میلی لیتری جمع آوری شدند (مرحله اول). مجدداً، ستون همانند مرحله اول با محلول های با محلول های ۱۰ و ۱۰۰ میلی مولار تریس (pH= ۸) شسته و خروجی ستون در لوله های ۱/۵ میلی لیتری جمع آوری شد (مرحله دوم وسوم). بین هر مرحله، ستون در سه نوبت (هر نوبت ۵ml) با محلول ۱۰۰ میلی مولار گلیسین (pH= ۳) شسته می شد. در آخر پس از تعیین غلظت نمونه های جمع آوری شده، سرم تخلیص شده بر روی ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE الکتروفورز گردید.

باکتری ETEC مورد استفاده در این تحقیق یک سویه استاندارد H10407 با شماره ATCC # 35401 است که فاکتورهای حدت زای آن به صورت $LT^+,ST^+,CFA/I^+$ می باشد. برای انجام آزمایش های ممانعت از اتصال باکتری لازم بود باکتری در محیط مخصوصی بنام CFA آگار کشت داده شود. این محیط شامل ۱٪ کازامینو اسید، ۰.۱۵ ٪ عصاره مخمر، ۰.۰۰۵ ٪ سولفات منیزیم، ۰.۰۰۰۵ ٪ کلرید منگنز و ۲٪ آگار می باشد. پس از اتوکلاو و تهیه پلیت ها، باکتری به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بروی آن کشت داده شد. باکتری های کشت داده شده با استفاده از محلول ۰/۱۵ مولار NaCl از روی سطح پلیت با استفاده از یک پارو شیشه ای، پارو شدند. OD_{600} محلول حاصل ۵ بود (به منظور انجام آزمایش ممانعت از اتصال، باکتری ها با PBS شسته شدند).

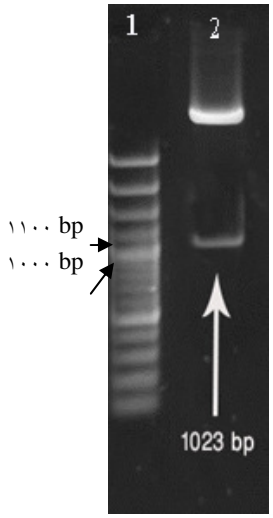
به منظور آماده سازی اریتروسیت های انسانی، ابتدا از یک فرد داوطلب با گروه خونی A ، با استفاده از سرنگ استریل، مقدار ۵ میکرولیتر خونگیری به عمل آمد. خون با استفاده از PBS سه بار شستشو داده شد و با استفاده از محلول ۱۵/. مولار NaCl خون ۳٪ (v/v) تهیه شد.

به منظور انجام آزمایش ممانعت از اتصال، ابتدا 50 µl از اریتروسیت های ۳٪ با D- مانوز۱٪ به خوبی مخلوط شده و سپس مخلوط حاصل با 50 µl باکتری آماده شده بروی پلیت های ۲۴ تایی پلی استایرن کشت بافت، در دمای محیط تیمار شد.

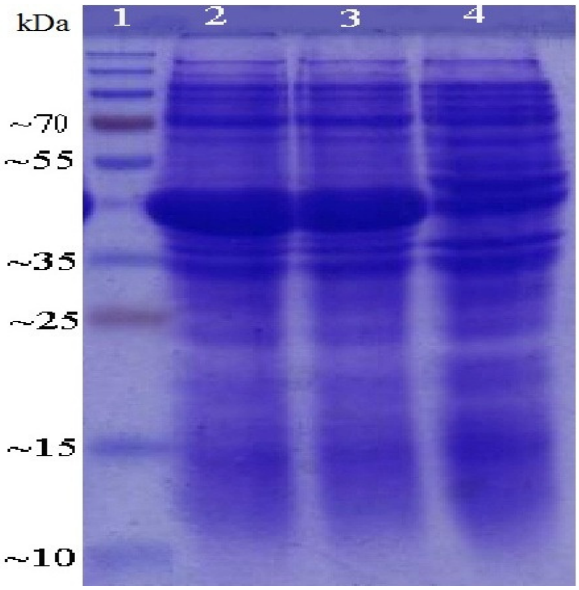
به منظور بررسی کارایی آنتی بادی تولید شده، 50 µl از سوسپانسیون باکتری در PBS به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق با 10 µl سرم موش های ایمن شده مخلوط شده و سپس با اریتروسیت های آماده شده، تیمار شدند. مخلوط باکتری های اضافه شده به سلول های اریتروسیتی به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، انکوبه شدند. سرم موش های غیر ایمن به عنوان کنترل با همین روش مطالعه شدند.

یافته ها

بهینه سازی کدون های ژن cfaE بوسیله الگوریتم OptimumGene™ انجام گرفت. میزانGC این ژن از ۳۶/۴۰ (در حالت طبیعی) به مقدار ۴۹/۹۰ بعد از بهینه سازی افزایش یافت . همچنین میزان CAI (شاخص سازگاری کدون ها) از ۰/۶۱ قبل از بهینه سازی به مقدار ۰/۹۲ بعد از بهینه سازی رسید. بررسی توالی آمینو اسیدی نشان داد این توالی تغییری نکرده است. در نهایت این ژن با شماره دستیابی GU35564 در بانک ژن NCBI ثبت شد. آنالیز های مولکولی با استفاده از آنزیمهای محدودالاثر BamHI و HindIII نشان داده سازه سنتتیک با موفقیت در وکتور بیانی pET28a همسانه سازی گردیده است (شکل ۱). بررسی بیان تولید پروتیئن نوترکیب روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ نشان داد پروتیئن نوترکیب ۴۱ کیلو دالتونی در نمونه های تست در مقایسه با نمونه کنترل تولید شده است. نتایج در شکل ۲ نمایش داده شده است.

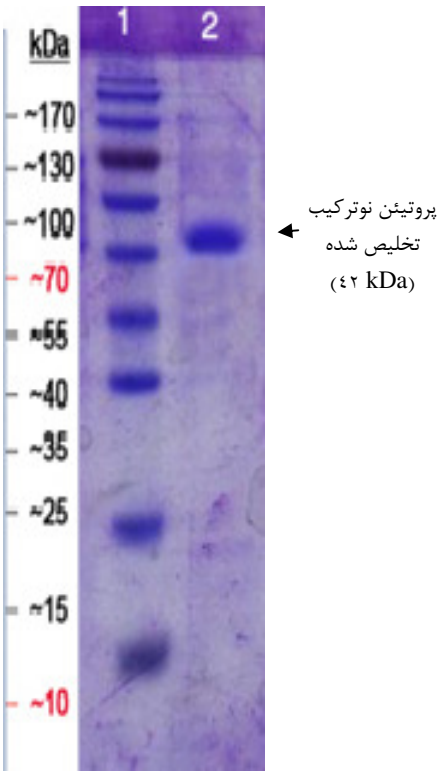


شکل۱. تایید مرحله زیر همسانه سازی با هضم آنزیمی وکتور نوترکیب روی ژل آگارز۱٪. ستون ۱: نردبان DNA، ستون ۲: هضم وکتور نوترکیب با آنزیم های BamHI و HindIII.



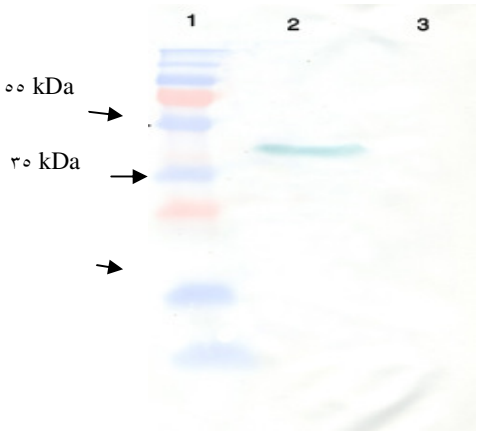
شکل۲. بررسی بیان به صورت خام در سویه های نوترکیب. ستون۱: نشانگر پروتیئنی(فرمنتاز SM1811)، ستون های ۲و۳: نمونه های تست که توسط ماده IPTG القاء شده اند، ستون۴: نمونه کنترل.

پس از انجام تخلیص با استفاده از بیدهای حاوی نیکل، نمونه های نهایی (بعد از استفاده از محلول استخراج) روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ الکتروفورز شدند. بررسی ژل، نشان دهنده خالص سازی پروتیئن نوترکیب



شکل ۳. تخلیص پروتیئن نوترکیب به وسیله کیت MagHis شرکت Promega. ستون ۱: نشانگر پروتیئنی (SM0671)، ستون۲: پروتیئن نوترکیب تخلیص شده.

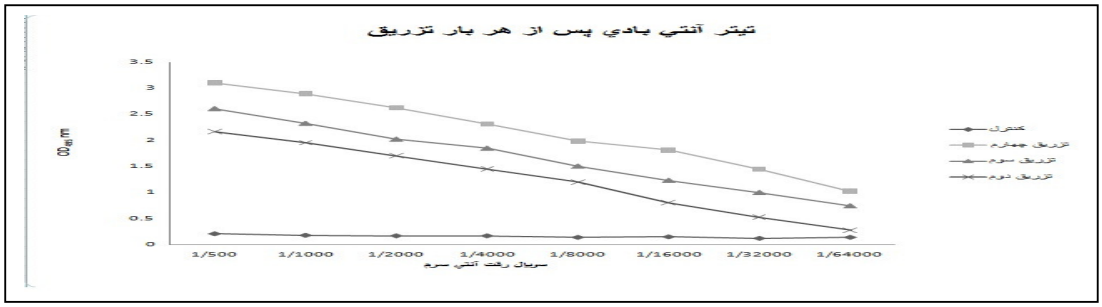
۴۱ کیلودالتونی بود (شکل ۳). بررسی ها با استفاده از روش ایمونوبلاتینگ حاکی از شناسایی باند ۴۱ کیلو دالتونی مورد انتظار توسط آنتی بادی علیه دنباله هیستیدین بود (شکل۴).

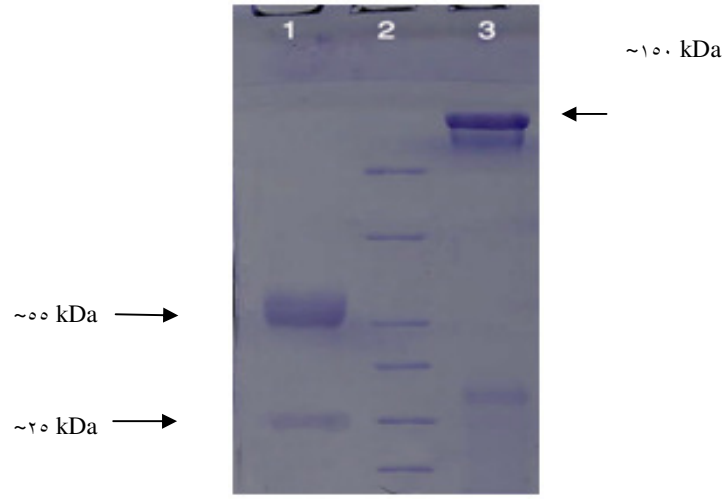


شکل۴. تأئید پروتئین نوترکیب CFaE از طریق ایمونو بلات با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین. ستون ۱: نشانگر پروتئینی SM1811 (فرمنتاز)، ستون ۲: نمونه پروتئین نوترکیب بلات شده، ستون ۳: نمونه کنترل منفی.

نمودار شماره ۱، واکنش الایزا مربوط به پروتئین CFaE تخلیص شده (به میزان ۱ میکروگرم در هر چاهک) و سرم موش ها را نشان می دهد. پس از هر بار تزریق میزان تولید آنتی بادی در موش ها از تزریق اول به سمت تزریق چهارم با وجود کاهش مقدار دور آنتی ژن تزریقی، میزان تولید آنتی بادی افزایش یافت است (نمودار۱). سرم موش های ایمن به منظور جداسازی آنتی بادی از کلاس IgG روی ستون G برده شدند. شکل ۵ تخلیص آنتی بادی قبل و بعد از تیمار با 2ME را نشان می دهد.

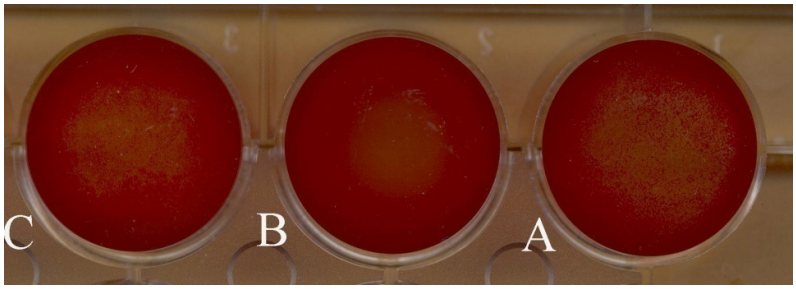
نمودار۱. واکنش الایزا مربوط به پروتئین CFaE تخلیص شده، با استفاده از نوبت های متفاوت سرم موش ها را نشان داده شده است.





شکل ۵. تخلیص آنتی بادی با استفاده از ستون پروتئین G. ستون ۱: آنتی بادی تخلیص شده تحت تاثیر 2ME. ستون ۲: نشانگر پروتئینی (فرمنتاز)SM0431. ستون ۳: آنتی بادی تخلیص شده بدون تاثیر 2ME.

باکتری های ETEC به واسطه بیان فیمبریه CFA/I توانایی اتصال به رسپتورهای سطح سلول اریتروسیت را داشته و پس از مدت زمان معین، باعث ترسیب این سلول ها شده، به طوریکه هماگلوتیناسیون قابل مشاهده بود. زمانی که این باکتری ها با سرم موش ایمن شده علیه CFaE مجاور شده و سپس در معرض اریتروسیت ها قرار می گرفتند این فعالیت هماگلوتیناسیونی از بین می رفت. ولی این پدیده همچنان در باکتری هایی که با سرم موش کنترل مجاور شده بودند، قابل مشاهده بود (شکل ۶).



شکل۶) آزمایش ممانعت از اتصال باکتری در حضور سرم موش ایمن و کنترل. چاهک ۱: باکتری ETEC تیمار شده با اریتروسیت. چاهک ۲: باکتری ETEC تیمار شده با سرم موش ایمن شده و واکنش آن با اریتروسیت. چاهک ۳: باکتری ETEC تیمار شده با سرم موش ایمن نشده (کنترل) و واکنش آن با اریتروسیت.

بحث

باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC)شایعترین عامل اسهال باکتریایی در تمام دنیاست و هر ساله تعداد زیادی از انسان ها را تحت تاثیر قرار داده و کودکان زیادی را به کام مرگ می کشاند(۱و۲۴). هر چند برای مقابله از ETEC می توان از درمان آنتی بیوتیکی نیز سود جست، اما به دلیل مقاومت روزافزون سویه ها، طراحی واکسن علیه این عامل از اهداف سازمان های بهداشتی از جمله WHO است(۱۵). اکثر واکسن هایی که امروزه در مراکز تحقیقاتی مطالعه می شوند، واکسن هایی هستند که حاوی یک جزء توکسین (LTB) و جزیی از فیمبریه است. هدف این واکسن ها ایجاد ایمنی در فرد برای جلوگیری از اتصال باکتری (در گام اول) و جلوگیری از اثر توکسین آن (در گام دوم) می باشد(۱۶). پروتیئن CFaE در نوک فیمبریه CFA/I (که شایعترین فاکتور کلونیزاسیون در سویه های ETEC مختص انسان است) قرار دارد(۱۱ و ۱۲). مطالعات اخیر نشان می دهد CFaE نقش عمده ای در اتصال باکتری به سطح سلول های اپی تلیالی روده بازی می کند: آنتانا و همکاران(۲۵). با مطالعات خود نشان دادند آنتی بادی تولید شده علیه انتهای آمینی و کربوکسیل پروتئین می تواند از اتصال باکتری به سلول های Caco2 در شرایط in vitro جلوگیری نماید. این فرد از وکتور pMAL-P2 استفاده کرد که دارای دنباله مالتوز بایندینگ پروتئین (MBP) با وزن حدوداً ۴۲ کیلو دالتون است که ایمونوژن بوده و می تواند جواب ایجاد شده در مطالعات انجام گرفته را به طور کاذب تحت تاثیر قرار دهد. در تحقیق حاضر از وکتور بیانی pET28a استفاده شد که تنها ۴ کیلو دالتون به ابتدای ژن اضافه می نمایدکه عموماً ایمونوژن نیست(۲۸). یونگ فولی و همکاران(۲۶) به منظور بررسی ساختار کریستالوگرافی پروتیئن CFaE این ژن را در وکتور pET24a همسانه سازی نموده و با استفاده از IPTG در میزبان E.coli BL21DE3 بیان نمودند. از آنجایی که این وکتور، یک وکتور رونویسی بوده و فاقد ATG (کدون آغاز) و RBS (محل اتصال ریبوزوم) می باشد؛ به نظر می رسد محققان این مقاله احتمالا با افزودن توالیهای تنظیمی و قرار دادن توالی های ATG و RBS توانسته اند این ژن را در E.coli بیان نمایند. ساکالاریس و همکاران(۲۷) نشان دادند که وجود توالی مشخص و حفاظت شده CFaE برای ایجاد ویژگی رسپتوری لازم و ضروری است و سویه های موتانت ETEC که در آن ها ژن cfaE در ناحیه انتهای امینی دچار جهش شده است، قابلیت اتصال به گیرنده های مناسب را ندارد. این مطالعات نشان می دهد، CFaE می تواند به عنوان یک کاندیدای بالقوه در طراحی واکسن مطرح می باشد.

این تحقیق شامل دو فاز اصلی بود؛ فاز اول تولید پروتیئن نوترکیب که شامل بهینه سازی، سنتز، همسانه سازی، بیان و تخلیص پروتیئن نوترکیب است و فاز دوم استفاده از این پروتیئن به عنوان آنتی ژن برای تولید آنتی بادی علیه آن در موش و استفاده از آنتی بادی تولید شده برای مطالعات برون تنی بعدی. در فاز اول مطالعه ، تلاش قبلی ما برای بیان پروتیئن نوترکیب از توالی طبیعی این ژن بی نتیجه ماند(۱۷). این امر می تواند ناشی از وجود کدون های نادر زیاد در اپرون های کد کننده این فیمبریه باشد(۹). ازاینرو مقرر شد توالی این ژن پس از بهینه سازی کدون ها مطابق با الگوی کدون های کلاس II باکتری E. coli (۲۹)، سنتز گردد. در فاز دوم مطالعه پس از تولید آنتی بادی علیه پروتیئن هدف، برای بررسی کارایی آنتی بادی تولید شده می بایست یا از آزمایش های درون تنی (حیوان مدل) سود جست و یا آزمایش های برون تنی (رده سلولی روده انسان یا مدل مشابه). از آنجایی که سویه های ETEC مختص سویه بوده، و سویه هایی که حیوانات را آلوده می کنند با سویه های انسانی متفاوت هستندو اتفاقا این تفاوت ناشی از رسپتورهای آن ها (که مورد مطالعه ما است) می باشد، عملا استفاده از مدل حیوانی بدلیل تفاوت رسپتوری با سویه های انسانی غیر ممکن می باشد(۹). از بین روش های برون تنی مابین سلول های CaCo2 و اریتروسیت انسانی، به دلایل مختلف نظیر آسانی کار، سهل الوصول بودن، ارزان، و قابل اطمینان بودن می توان از آزمایش ممانعت از اتصال در روی سلول های اریتروسیت انسانی استفاده کرد(۳۰ و ۳۱). مطالعات مختلف نشان داده است که رسپتور CFA/I سیالوگلایکوپروتیئن (گلایکو پروتیئن حاوی سیالیک اسید) می باشد(۳۲).

مطالعات ما نشان داد، CFaE می تواند به عنوان یک ایمونوژن قوی برای تولید واکسن مطرح باشد، چراکه از تزریق دوم به سمت بوسترهای بعدی با وجود کاهش دوز آنتی ژن، پاسخ آنتی بادی مناسبی در موش ایجاد شد. همچنین مطالعات آزمایشگاهی نشان داد باکتری های مجاور شده با سرم موش های ایمن در مقایسه با سرم موش های کنترل قادر به ایجاد هموگلوتیناسیون نبودند. این امر می تواند ناشی از اتصال آنتی بادی تولید شده به زیرواحد فرعی CFA/I و خنثی سازی آن باشد، به طوری که باکتری دیگر قادر نخواهد بود به رسپتور خود در سطح سلول متصل گردد. این امر می تواند نوید بخش تحقیقات بعدی به منظور بررسی کارایی آنتی بادی در ممانعت از اتصال باکتری به رده سلولی (در محیط کشت) و یا بیوپسی روده (در شرایط درون تنی) باشد. بنابراین پس از تحقیقات کامل تر، این آنتی ژن می تواند همراه با اجزای حدت زای دیگری نظیر LTB به عنوان جزیی از یک واکسن زیرواحدی علیهETEC مورد مطالعات بیشتر قرار گیرد.

نتیجه گیری

آنتی بادی تولید شده علیه زیر واحد فرعی فیمبریه CFA/I می تواند از اتصال باکتری ETEC به سلول های اریتروسیت انسانی گروه A که دارای رسپتورهای مشابه با رسپتورهای اصلی این باکتری در سطح روده است، جلوگیری نماید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان، کمال تشکر و سپاس از آقای دکتر جعفر سلیمیان بخاطر همکاری و راهنمایی های ارزشمندشان در طول این مطالعه، دارند.

REFERENCES

1. Walker RI. Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries. Vaccine; 2005 23; 69–85.

2. World Health Organization report. State of the art of vaccine research and development. 2005. Available from: URL: http:// www.who.int/vaccines-documents/.

3. Walker RI, Steele D, Aguado T. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic E. coli (ETEC) disease. Vaccine; 2007 7; 2545-2566.

4. Wenneras C, Erling V. Prevalence of entertoxigenic Escherichia coli associated diarrhea and carrier state in the developing world. J Health Popul Nutr; 2004 22; 82-85.

5. Benoit V, Raiche P, Smith MG, Guthrie J, Donnelly EF, Lee R, DiMaio S, Rittmann M, Matyas BT. Foodborne outbreaks of enterotoxigenic Escherichia coli. Rhode Island and New Hampshire. MMWR Morb Mortal Wkly Rep; 1994 43:81, 87-89.

6. Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Travelling with infants and young children. Part III: Travellers diarrhea. Travel Med; 2002 9; 41-150.

7. Fleckenstein JM, Harwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H, Molecular mechanisms of enterotoxigenic Escherichia coli infection. Microbes Infect; 2010 12; 89-98.

8. Guth BEC. Entrotoxigenic Escherichia coli- An overview. Mem Inst Oswald Mem Inst Oswaldo Cruz ; 2000 95; 95-97.

9. Gaastra W, Svennerholm, AM. Colonization factors of human enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Trends Microbiol; 1996 4; 444-52.

10. Li YF, Poole S, Kazuya N, Jang K, Rasulova F, McVeigh A. Sructure of fimbriae from Enterotoxigenic Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A; 2009 106; 77-79.

11. MU XQ, Savarino SJ, Bullite E. The Three-Dimensional Structure of CFA/I Adhesion Pili: traveler's diarrhea bacteria hang on by a spring. J Mol Biol; 2008 376; 614-620.

12. Li YF, Poole S, Rasulva F, McVeigh AL, Savarino SJ, Xia D. A Receptor-binding Site as Revealed by the Crystal Structure of CfaE,the Colonization Factor Antigen I Fimbrial Adhesin of enterotoxigenic Escherichia coli . J Biol Chem; 2007 282; 23970-23980.

13. World Health Organization Geneva, Weekly epidemiological record, Printed in Switzerland, 2006 81; 97-104.

14. Sooka A, Plessis M, Keddy K. Enterovirulent Escherichia coli. Southern African J Epidemiol Infect; 2004 19; 23-33.

15. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. Clin Microbiol Rev; 2005 18; 465- 483.

16. Svennerholm AM, Tobias J. Vaccine against Enterotoxigenic Escherichia coli. Expert Rev Vaccines; 2008 7; 795-804.

17. Mansouri M, Mousavy SJ, Salimian J, Nazarian Sh, Ehsaei Z, Jafari F, Khalesi R. Molecular characterization of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) and expression assay of recombinant of recombinant cfaE gene. 3RD International symposium on Molecular Technology manipulation of cell pathway in Drug development. 2009 May 5-7; Tehran, Iran.
18. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laborator manual. NewYork:CSHL press 2001.

19. MagneHis™. Protein Purification System Technical Manual TM060, Promega Corporation.

20. Bollag D.M, Michel D.R, Edelstein SJ. Protein Methods, Two Edittion. New York, Wiley-Liss, 1996 50-55, 96-127.

21. Sørensen HP, Sperling-Petersen HU, Mortensen KK. Dialysis strategies for protein refolding: preparative streptavidin production. Protein Expr Purif; 2003 31; 149-54.

22. Crowther JR., Eliza theory and practice.1995.

23. Wu X, Jornvall H, Berndt K D, Oppermann U. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in Escherichia coli: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. Biochem Biophys Res Commun; 2004 313; 89-96.

24. Celia C, Carlos MD, Mediadora C, Saniel MD. Etiology and Epidemiology of Diarrhea. Microbiol Infect Dis; 1990 19; 51-53.

25. Anantha RP, McVeigh AL, Lee LH, Agnew MK, Cassels FJ, Scott DA. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen I and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect Immun; 2004 72; 190-201.

26. Li YF, Poole S, Rasulova F, Esser L, Savarino SJ, Xiaa D. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of CfaE, the adhesive subunit of the CFA/I fimbriae from human enterotoxigenic Escherichia coli. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun; 2006 121-124.

27. Sakellaris H, Munson GP, Scott JR. A conserved residue in the tip proteins of CS1 and CFA/I pili of enterotoxigenic Escherichia coli that is essential for adherence. Proc Natl Acad Sci U S A; 1999 96:12828–12832.

28. Catalog, pET system manual (Novagen) tenth edition. 2002.

29. Médigue C, Rouxel T, Vigier P, Hénaut A, Danchin A. Evidence for horizontal gene transfer in Escherichia coli speciation. J Mol Biol; 1991 20; 851-6.

30. Evans DG, Evans DJ Jr. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups O6 and O8. Infect Immun; 1978 21; 638-47.

31. Li Y. F., Poole S, Nishio K, Jang K, Rasulova F, McVeigh A, etal. Structure of CFA/I fimbriae from enterotoxigenic Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A; 2009 106; 10793-8.

32. Pieroni P, Worobec EA, Paranchych W, and Armstrong GD. Identification of a human erythrocyte receptor for colonization factor antigen I pili expressed by H10407 enterotoxigenic Escherichia coli. Infect Immun; 1988 56; 1334–1340.