بیان فاکتورهای اصلی نوترکیب EspA-Intimin از باکتری *E. coli* O157:H7 در گیاه تنباکو به منظور تولید واکسن خوراکی

مهدیه ساشورپور[۱]، جعفر امانی[۲]، مهیات جعفری[۱] و علی‌هاتف سلمانیان[۳،*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲٤)

چکیده

یکی از پاتوژن‌های مهم ایجادکننده کولیت هموراژیک و نشانگان همولیتیک اورمیک در انسان باکتری اشرشیاکلی هموراژیک سویه O157H7 می‌باشد. دام‌ها اصلی‌ترین مخزن این باکتری می‌باشند. دو فاکتور پروتئینی با اهمیت در کلونیزاسیون باکتری در اپیتلیوم روده EspA و Intimin هستند که باعث ایجاد آسیب‌های تخریبی به‌واسطه اتصال می‌گردند. این پروتئین‌ها توسط جزایر بیماری‌زایی LEE (Locus of Enterocyte Effacement) کد می‌شوند. EspA بخشی از سیستم ترشحی نوع III می‌باشد که موجب انتقال پروتئین Tir به سلول میزبان و ورود آن به غشا سلول می‌شود. اینتیمین توسط ژن *eae* کد شده و به *Tir* متصل می‌گردد. این تحقیق بر این اساس است که ژن کایمریک و نوترکیب EI شامل EspA و Intimin که به‌واسطه یک لینکر به یکدیگر اتصال یافته‌اند می‌تواند به‌عنوان کاندیدای ایمنی‌زایی خوراکی در نظر گرفته شود و موجب کاهش کلونیزاسیون *E. coli* O157:H در مدل حیوانی گردد. بدین منظور ژن سنتتیک EspA (120) و Intimin (282) که توسط توالی ٤(EAAAK) به یکدیگر متصل شده بود ساخته شد. ژن ساخته‌شده بر اساس کدون‌های گیاه توتون بهینه‌سازی و سپس تحت کنترل پروموتر Camv35s در ناقل بیانی گیاه کلون و پس از آن به‌واسطه انتقال توسط آگروباکتریوم به گیاه توتون منتقل گردید. ورود ساختار ژنی نوترکیب در برگ‌های گیاه توتون توسط آزمون PCR تأیید شد. در مرحله بعد بیان ژن مورد نظر به روش RT-PCR بررسی و تأیید گردید. در نهایت میزان پروتئین EI در برگ‌های توتون تراریخته توسط روش الیزا تخمین زده شد که برابر با ۰/۱ درصد از کل پروتئین محلول در برگ گیاه بود.

واژگان کلیدی: EspA-Intimin، گیاه تراریخت، *E. coli* O157:H7، واکسن خوراکی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **salman@nigeb.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

مقدمه

اشریشیاکلی انتروهموراژیک (*Enterohaemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) سویه O157:H7 یکی از عوامل اصلی بیماری‌زا در انسان می‌باشد که در غذاها و آب‌های آلوده یافت می‌شود. عفونت‌زایی این باکتری در انسان به‌صورت ایجاد اسهال به‌صورت بدون خونریزی و در موارد شدید به‌شکل التهابات شدید روده‌ای همراه با خونریزی [کولیت هموراژیک (Hemorrhagic colitis)] بروز می‌یابد. هم‌چنین در برخی از موارد نشانگان خونریزی دهنده ادرار [اورمی همولیتیک (Hemolytic uremic syndrome)] نیز مشاهده می‌شود (Karmali, 1989; Stewart and Flint, 1999). دام‌ها به‌عنوان مهم‌ترین مخزن این باکتری بوده و منبع اصلی انتقال آن به انسان می‌باشند (Stewart and Flint, 1999; Khaitsa *et al.*, 2003). آسیب‌های تخریبی شدید (Attaching/Effacing: A/E) که به‌واسطه عفونت باکتری انتروهموراژیک در سلول‌های پوششی روده میزبان ایجاد می‌گردد منجربه بروز اسهال در انسان می‌گردد (Moon *et al.*, 1983). طبق مطالعات صورت گرفته در برخی از کشورهای غربی، میزان شیوع باکتری EHEC سویه O157:H7 از سال ۱۹۹٤ تا ۲۰۰۰ تقریباً به‌میزان دو برابر افزایش داشته است (Murphy *et al.*, 2007). به‌دنبال بررسی‌ها در سایر نقاط جهان، آلودگی به این باکتری در سراسر جهان از جمله ایران نیز گزارش گردیده است. در ایران بخش بالای آلودگی در ارتباط با دام‌ها بوده و عامل انتشار آن گوشت و شیر آلوده می‌باشد (Aslani and Bouzari, 2003; Shekarforoush *et al.*, 2008). در حدود ۱۵ تا ۳۰ درصد از دام‌ها از طریق این باکتری آلوده می‌شوند که برخی از این عفونت‌ها به‌صورت بدون علامت بوده و علائمی بروز نمی‌دهند (Potter *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2007). یکی از راه‌های پیشگیری ابتلای دام‌ها به این باکتری‌ها رعایت اصول بهداشتی است که تا حد زیادی مؤثر است. هم‌چنین می‌توان با استفاده از درمان‌های آنتی‌بیوتیکی با عفونت بروز یافته در دام مقابله نمود اما یکی از مشکلاتی که در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد این است که ممکن است موجب بروز مقاومت در ارگانیسم‌های بیماری‌زا گردد و با از بین بردن فلور طبیعی مقامت آنتی‌بیوتیکی را ایجاد کند (Murphy *et al.*, 2007). علاوه بر آن چنانچه اشاره شد این میکروارگانیسم‌ها در برخی موارد به‌صورت غیر علامت‌دار در دستگاه گوارش دام‌ها زندگی می‌کنند و به‌طور مستمر از طریق فضولات دامی به محیط انتشار می‌یابند بنابراین روشی که در پیشگیری از عفونت باکتری EHEC سویه O157:H7 مؤثر است استفاده از روش‌های واکسیناسیون دام‌ها می‌باشد که امروزه کاربرد دارد (Allen *et al.*, 2011). کارایی واکسن‌هایی که امروزه علیه باکتری EHEC مورد استفاده قرار می‌گیرند بر مبنای تأثیر آن‌ها بر روی مکانیسم بیماری‌زایی باکتری می‌باشند. بیماری‌زایی باکتری طی دو مرحله صورت می‌گیرد: مرحله اول مرحله اتصال باکتری به سطح سلول‌های میزبانی است که با واسطه اجزای سلولی نظیر فیمبریا و پروتئین‌های اتصالی ویژه باکتری صورت می‌گیرد در اثر این اتصال تخریب‌های شدید بافتی ایجاد می‌شود. در مرحله دوم باکتری تولید ترکیبات سمی نموده و با انتقال آن به سایر بافت‌ها اثرات تخریبی شدیدتری ایجاد می‌کند (Oliveira *et al.*, 2012). مرحله کلیدی در روند ایجاد بیماری توسط باکتری مرحله کلونیزاسیون آن است. پروتئین‌هایی که توسط ژن‌های LEE (Locus of Enterocyte Effacement.) کد می‌شوند پروتئین‌های مورد نیاز جهت کلونیزاسیون هستند. بر این اساس بیشتر مطالعات برای تهیه واکسن علیه باکتری مذکور به این سمت معطوف گردیده است. عمده واکسن‌هایی که علیه این باکتری ساخته شده حاوی یکی از آنتی‌ژن‌های مهم آن به‌صورت نوترکیب و یا باکتری کامل و کشته می‌باشد؛ اما به‌کارگیری آن‌ها نتوانسته به‌طور قابل توجهی از کلونیزاسیون این باکتری در روده حیوانات جلوگیری کند (McNeilly *et al.*, 2010b). سه پروتئین اصلی که در اتصال باکتری به سطح پوشش روده نقش اصلی را بر

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

عهده دارند اینتیمین (Intimin)، Tir و EspA می‌باشند. درصورتی‌که بتوان با عملکرد اتصالی این پروتئین‌ها مقابله نمود می‌توان از کلونیزاسیون باکتری در مراحل اولیه ایجاد بیماری جلوگیری به‌عمل آورد. بدین جهت پروتئین‌های مذکور می‌توانند به‌عنوان کاندیداهای مناسبی برای تولید مواد ایمنی‌زا علیه این باکتری استفاده شوند. ژن *eae* کد کننده پروتئین غشایی intimin می‌باشد که جهت اتصال باکتری به سلول میزبان ضروری است (Jerse and Kaper, 1991). این ژن بخشی از ناحیه ژنی LEE می‌باشد که این ناحیه هم‌چنین کد کننده سیستم ترشحی تیپ III (Type Three Secretion System: TTSS) و پروتئین Tir می‌باشد که به‌عنوان گیرنده اینتیمین عمل می‌کند. پروتئین EspA از اجزای سیستم ترشحی تیپ III بوده و به‌عنوان مجرایی جهت انتقال Tir از باکتری به درون غشاء سلول میزبان به‌کار می‌رود. فعالیت اتصال سلولی intimin وابسته به ۲۸۰ اسیدآمینه انتهای کربوکسیل آن می‌باشد (Adu-Bobie *et al.*, 1998). متعاقب اتصال intimin به Tir باکتری EHEC به سطح سلول روده‌ای متصل شده و این اتصال موجب بازآرایی اسکلت سلولی اکتین در آن ناحیه می‌گردد (Garmendia *et al.*, 2005; Tree *et al.*, 2009). تحقیقات نشان داده است که intimin به‌عنوان عامل کلیدی کلونیزاسیون جهت اتصال EHEC به سلول‌های میزبان می‌باشد (La Ragione *et al.*, 2006). آنتی‌بادی‌هایی که علیه intimin ساخته می‌شوند می‌توانند از اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال جلوگیری کنند (Carvalho *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2007). EspA که توسط ژن *espA* کد می‌شود در سطح باکتری تشکیل ساختار مجرایی می‌دهد که از طریق آن پروتئینTir ترشح می‌شود. ترکیب اصلی در آسیب تخریبی A/E پروتئین EspA می‌باشد. EspA یک عامل ایمونوژنیک است و تحقیقات آزمایشگاهی نشان داده است که آنتی‌بادی پلی-کلنال علیه این پروتئین باعث کاهش اتصال EHEC به سلول‌های میزبان می‌گردد (Dean-Nystrom *et al.*, 1998). در نتیجه به‌نظر می‌رسد که این پروتئین‌ها آنتی‌ژن‌های مناسبی بوده و می‌توانند به‌عنوان کاندیداهای ایمونوژنیک جهت جلوگیری از فرایند اتصال و کلونیزاسیون *E. coli* O157:H7 به کار روند.

به‌طورکلی واکسن‌های تولیدشده علیه این باکتری به‌صورت تزریقی (McNeilly *et al.*, 2010a) و در مطالعات جدید به‌صورت خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lal *et al.*, 2007). پیشرفت‌های اخیر به‌وضوح نشان داده‌اند که سیستم‌های تولیدی بر پایه گیاهان در مقایسه با دیگر سیستم‌ها مؤثرتر می‌باشند در سیستم‌های جدید تولید و ارائه مواد ایمنی‌زا، واکسن‌های خوراکی (Edible Vaccine) به‌طور عمده شامل اجزایی از گیاهان تراریخت بوده که قادر می‌باشند آنتی‌ژن مورد نظر را در بافت‌های خوراکی خود تولید کنند. واکسن‌های خوراکی قادرند ایمنی سیستمیک و ایمنی هومورال را به‌طور هم‌زمان فعال سازند که توجه به این امر در مقابله با بیماری‌زاهایی که دستگاه گوارش میزبان را مورد حمله قرار می‌دهند مؤثر است. درصورتی‌که از گیاهان جهت تولید آنتی‌ژن‌ها استفاده شود می‌توان نسبت به سالم بودن فرآورده حاصل از آن اطمینان داشت و این فرآورده به بیماری‌زاهای انسانی آلوده نخواهد بود. یک گیاه ایده‌آل برای تولید واکسن خوراکی باید توانایی تراریخت و باز زایی شدن را داشته و قابلیت مصرف بخشی از گیاه که حاوی پروتئین نوترکیب است بدون پخته شدن میسر باشد (Judge *et al.*, 2004; Amani *et al.*, 2011). طی مطالعاتی که پیش‌تر صورت گرفت تأثیر ایمنی‌زایی ساختار ژنی سه قسمتی Tir، اینتیمین و EspA در مدل موشی بررسی گردید (Amani *et al.*, 2010; Amani *et al.*, 2011; Karimi *et al.*, 2013). در این مطالعه هدف بررسی میزان تولید ساختار پروتئینی است که تنها دو بخش از ساختار سه بخشی قبلی را شامل می‌شود. لذا در این تحقیق با هدف ساخت سازه ژنی کوچک‌تر بخشی از ژن‌های مربوط به دو پروتئین اینتیمین و EspA که محصول پروتئینی آن‌ها در کلونیزاسیون باکتری به سطح روده میزبان نقش اصلی را بر عهده دارند انتخاب شدند.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

ساختار کایمریک نوترکیب واجد ۱۲۰ اسید آمینه انتهای کربوکسیلی EspA و ۲۸۲ اسیدآمینه انتهای کربوکسیلی intimin که توسط توالی پپتیدی آب‌گریز (EAAAK) که از برهم‌کنش بین دو پروتئین جلوگیری می‌کند به یکدیگر اتصال داده شدند طراحی گردید. ژن ساخته شده و ترادف ژن مصنوعی به‌دست آمده بر اساس کدون‌های گیاه توتون بهینه‌سازی شد و در ناقل بیانی گیاهی PBI121 کلون و تحت پروموتر عمومی CaMV35S در گیاه مدل توتون بیان شد. پروتئین دو قسمتی ایمنی‌زا حاصل از قسمت-هایی از دو ژن *eae* (کد کننده پروتئین اینتیمین) و *espA* به‌عنوان یک ایمونوژن خوراکی جهت استفاده در مدل حیوانی تولید گردید.

مواد و روش‌ها

سویه اشریشیاکلی *E. coli* O157:H7 از آزمایشگاه رفرانس بیمارستان بوعلی تهران تهیه شد. سویه‌های باکتری‌های اشریشیاکلی سویه DH5α از شرکت Invitrogen خریداری گردید. آگروباکتریوم تومی‌فاشینس، سویه LBA4404 جهت انتقال ژن به سلول‌های گیاهی استفاده گردید. پلاسمید pBI121(ClonTech) به‌عنوان یک ناقل بیان گیاهی و به‌منظور بیان قطعات کلون شده در گیاه استفاده شد. آنزیم DNA پلیمراز Taq، آنزیم‌های محدودالاثر *Xba*I، *Sac*I و آنزیم DNA لیگاز T4 از شرکت فرمنتاز تهیه شدند. کیت High Pure PCR Product Purification، کیت Tri pure-RNA Extraction Solution و کیت Plasmid Extraction از شرکت Roche تهیه شد. بذور تنباکو (*Nicotiana tobbacum*) رقم Samsun ماده گیاهی این تحقیق را شامل می‌شود. این رقم از انستیتو تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. هورمون‌های مورد استفاده در محیط کشت گیاه نظیر ٦- بنزیل آمینو پورین :6-Benzylaminopurine (6-BAP) و ١- نفتالین استیک اسید 1-Naphthaleneacetic acid: 1-NAA) از شرکت Fluka (آلمان) تهیه شد. کلیه روش‌های ساخت محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها، اندازه‌گیری غلظت DNA، تخلیص و هضم آنزیمی پلاسمید، تخلیص محصول هضم آنزیمی، الحاق قطعه هدف در ناقل، تهیه سلول‌های مستعد و غربال‌گری کلونی‌ها بر اساس روش‌های معتبر و مرسوم آزمایشگاهی مولکولی انجام شد.

تکثیر ژن EI (اینتیمین- EspA) از طریق واکنش PCR

به‌منظور دستیابی به ژن کایمریک واجد دو ناحیه ESPA و Intimin که توسط لینکر به هم متصل شده‌اند از ساختار سه قسمتی که از پیش توسط امانی و همکاران سنتز شده بود (Amani *et al.*, 2009) و بخش‌های Tir، Intimin و ESPA را شامل می‌شد استفاده گردید. بدین منظور واکنش تکثیری PCR انجام شد. به‌منظور جلوگیری از تداخل کانفورماسیون، توالی کد کننده دو پروتئین Intimin و EspA، توسط لینکر به هم متصل شدند و عملکرد آن‌ها با کمک بررسی‌های بیوانفورماتیکی مورد پیش‌بینی قرار گرفت (Amani *et al.*, 2009). جهت تکثیر قطعه ژن مورد نظر، نیاز به تهیه آغازگرهای مناسب بود که برای این کار از نرم‌افزارهای Oligo و DNASIS استفاده شد. توالی آغازگر جلویی (Forward) به‌صورت:

5′-TCTAGAGCCACCATGGCTGATATGAACG-3′

طراحی گردید که شامل جایگاه برش آنزیمی *Xba*I و همچنین توالی کزاک (Kozak sequence) بود که این توالی به‌منظور افزایش میزان بیان ژن دوقسمتی در سیستم‌های یوکاریوتی (گیاه) تعبیه گردید. آغازگر برگشتی (Reverse) شامل توالی زیر بود:

5′-GAGCTCTCAAAGCTCATCCTTCTCAACACA AACAGCGTA-3′

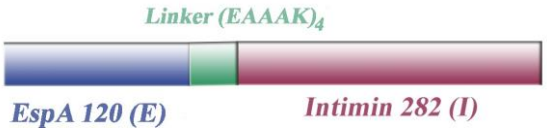
که در آن محل اثر آنزیم SacI قرار گرفت. طراحی توالی اسیدآمینه KDEL در آغازگر برگشتی به‌منظور جهت‌گیری پروتئین در شبکه آندوپلاسمی سلول تعبیه شد. واکنش PCR با آنزیم Max Taq DNA polymerase (آلمان، Vivantis) و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و به‌کارگیری ۱۰ نانوگرم DNA الگو (پلاسمید حاوی ژن سه قسمتی) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت ۲ میلی‌مول منیزیوم (Mg^{+}) انجام شد. برنامه واکنش برای تکثیر قطعه مورد نظر به‌شرح زیر انجام گرفت: ۲ دقیقه

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد؛ سپس ۳۰ چرخه تکثیر (که هر چرخه شامل یک دقیقه دمای واسرشت‌سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه دمای اتصال (آغازگر) در ٦۰ درجه سانتی‌گراد و یک و نیم دقیقه دمای گسترش (یا طویل‌سازی) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد)؛ ۲۰ دقیقه دمای گسترش انتهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت اطمینان ایجاد A در انتهای قطعات تولید شد. تکثیر قطعه مورد نظر با آنزیم Max Taq DNA polymerase. موجب می‌گردد که قطعه در انتهای ´3 دارای یک نوکلئوتید اضافه (اکثر مواردA) باشد. کیفیت محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید بررسی شد.

تهیه سازه ژنی pBI121-EI:

پس از اطمینان از تکثیر ژن دو قسمتی بر روی ژل آگارز، ژن مصنوعی به کمک کیت استخراج از روی ژل، تخلیص شد (شکل ۱). ژن تکثیر یافته که در نتیجه افزایش زمان طویل‌سازی انتهایی واجد انتهای A گردید در ناقل pTZ57R/T (آلمان، Fermentas) که دارای انتهای T بود همسانه‌سازی شد. واکنش اتصال در مدت یک شب و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. در مرحله بعد ناقل حاوی ژن به درون سلول مستعد *E. coli* DH5α از طریق شوک سرما گرما انتقال داده شد. به‌منظور جداسازی کلنی‌های صحیح حاوی ژن دو قسمتی از سایر کلنی‌های ایجاد شده از محیط مک‌کانگی آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین استفاده گردید. از هضم آنزیمی جهت جداسازی ژن دو قسمتی و تأیید نهایی کلنی‌های مربوطه استفاده شد. همزمان، ناقل pBI121 از درون باکتری اشریشیاکلی DH5α به روش لیز قلیایی استخراج گردید و هضم آنزیمی آن (*Xba*I / *Sac*I) مطابق با روش استاندارد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ ساعت انجام شد. در این مرحله و با این هضم آنزیمی، ژن گزارش‌گر بتا گلوکورونیداز (GUS) به وزن تقریبی ۲ کیلو جفت باز از بدنه ناقل خارج شد و بدنه ناقل با استفاده از کیت استخراج از روی ژل آگارز تخلیص شد.



شکل ۱- طرح شماتیک از سازه ژنی حاوی EspA و Intimin

Figure 1. Schematic diagram of gene construct contaning EspA and Intimin

الحاق ژن برش خورده EI با وکتور برش خورده pBI121 توسط آنزیم T4 لیگاز صورت گرفت. الحاق ژن مصنوعی و ناقل برش خورده در واکنش آنزیمی، در دمای ۱٤درجه سانتی‌گراد و به مدت یک شب صورت پذیرفت. محصول الحاق (پلاسمید نوترکیب pBI121-EI) و کنترل واکنش با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E. coli* DH5α ترانسفورم گردید و در شرایط مناسب، کلونی‌های مورد نظر انتخاب شد. پس از اطمینان از مراحل اتصال به کمک روش‌های آنالیز PCR و روش هضم آنزیمی، پلاسمید استخراج و به آگروباکتری منتقل گردید.

انتقال ژن به گیاه و باززایی آن

برای کشت گیاه توتون، بذر ابتدا ضدعفونی و سپس استریل و جهت کشت، به‌صورت فاصله‌دار بر روی محیط MS و در شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در گلخانه قرار گرفتند. کشت شبانه از آگروباکتری تومی‌فاشینس نوترکیب LB4404 به‌ترتیب در محیط LB حاوی غلظت‌های مناسب آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ rpmروی شیکر انجام شد. سپس باکتری‌های رشد یافته در شرایط ٤ درجه سانتی‌گراد، ۲۵۰۰ rpm و ۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع فوقانی دور ریخته شد و به رسوب، ۱۰-۵ میلی‌لیتر محلول MS بدون قند و استریل اضافه گردید تا جذب نوری آن به OD_{600} 0.5 برسد و به‌مدت ۰/۵ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سوسپانسیون باکتری در زیر هود به درون یک پتری دیش استریل منتقل و با پنس و قیچی استریل، برگ‌های استریل و جوان گیاه یک ماهه توتون به درون پتری دیگر وارد گردید. با تیغ اسکالپل، برگ توتون را در عرض برش

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

(ایجاد قطعات یک در یک سانتی‌متر) و سپس این تکه برگ‌ها به درون سوسپانسیون باکتری منتقل و پتری به مدت ۱۰ دقیقه با دست تکان داده شد. برگ‌های آلوده به باکتری را بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده تا محلول اضافی برداشته شود و بلافاصله بر روی محیط هم‌کشتی (co-culture) با اگروباکتری، MS به‌همراه ۲ mg / L BAP و ۰/۱ mg / L NAA منتقل گردید به نحوی که سطح فوقانی برگ‌های بریده شده روی محیط کشت قرار گیرد و سپس در شرایط دمایی گلخانه و محیط تاریک (پیچیده در فویل) قرار داه شد. ٤٨ ساعت بعد برگ‌ها به همـــان صورت روی محیط MS هورمون دار (حاوی BAو NAA) و گزینش‌گر حاوی غلظت‌های ۵۰ mg / L از آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۲۰۰ mg / L سفوتاکسیم منتقل گردید. از این پس ظرف‌های پتری را در نور مناسب (حداقل ۱۰۰۰ لوکس) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود نوری، ١٦ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، در گلخانه نگهداری شد تا جوانه‌ها از کناره‌های برگ پدیدار شوند. پس از جوانه‌زایی و رشد جوانه‌ها، هر ۷ روز یک بار نمونه‌ها بر روی محیط جدید با همان ترکیب قبلی منتقل شدند. پس از اینکه جوانه‌ها به مرحله ٦-٤ برگی رسید؛ ابتدا آن‌ها را به محیط MS حاوی کانامایسین با غلظت ۷۵ mg / L و سفوتاکسیم با همان غلظت قبلی منتقل شد و پس از اینکه جوانه‌ها دارای تعداد برگ بیشتری شد و رشد نوساقه‌ها به ٤-٣ سانتی‌متر رسید آن‌ها به محیط با غلظت کانامایسین mg / L ۱۰۰ منتقل شدند. این روند فرصتی را به نوساقه‌های تراریخت می‌دهد تا به آرامی با غلظت‌های بالاتر کانامایسین سازگار شوند و نوساقه‌های غیر تراریخت در غلظت نهایی کانامایسین حذف خواهند شد. نوساقه‌های سبز و رشد یافته به محیط ریشه‌زایی انتقال داده شد. محیط ریشه‌زایی را می‌توان با اضافه کردن هورمون (L mg / IBA ۲) به‌همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و سفوتاکسیم به MS کامل به‌دست آورد (Kahrizi *et al.*, 2007) در نهایت پس از گل‌دهی بذر گیاه تراریخت حاصل گردید.

تأیید تراریختی گیاهان توتون از طریق PCR

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تراریخت و غیرتراریخت با استفاده از روش بهینه شده استخراج ژنوم از گیاه (Qiagen plant mini kit) انجام گرفت و غلظت DNAهای ژنومی در ۲٦۰ nm به کمک اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. به‌منظور بررسی گیاهان تراریخت بر روی نمونه‌های DNA با استفاده از جفت آغازگرهای EI تخصصی ارزیابی PCR صورت گرفت. برنامه واکنش برای تکثیر قطعه مورد نظر مشابه همان شرایط واکنش قبلی PCR در ساخت سازه لحاظ گردید. جهت نمونه‌های کنترل منفی از برگ‌های گیاهان تنباکو غیرتراریخت استفاده شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

تأیید بیان ژن مصنوعی (EI) در سطح رونویسی

در این مرحله RNA کل از بافت برگ‌های جوان گیاه تراریخت تنباکو با استفاده از روش بهینه شده استخراج RNA از گیاه (آلمان، Roche) استخراج گردید. RNA تخلیص شده به‌عنوان الگو برای آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس استفاده شد و با انجام RT-PCR حضور mRNAی EI در برگ گیاهان تراریخت معین گردید. محصول RT-PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور اطمینان از خالص‌سازی مناسب RNA و عدم آلودگی با DNA ژنومیک از تکثیر اختصاصی ژن توبولین استفاده شد.

بررسی بیان پروتئین EI در گیاه تراریخت با ELISA

از گیاه تراریخت تنباکو، بافت تازه برگ برداشت شد و پروتئین محلول تام آن استخراج شد. حدود یک گرم از بافت گیاهی در هاون چینی استریل در حضور نیتروژن مایع سائیده و به ویال منتقل شد. به محتویات لوله مقدار ml ۱ از بافر استخراج پروتئین–Tris mM 200)

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 400 mM sucrose, 10 mM EDTA, 14 mM, 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 0.05% Tween-20) اضافه و سپس ورتکس و در rpm ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام گردید. محلول رویی جدا و غلظت پروتئین تام به‌دست آمده با روش برادفورد مورد سنجش پروتئین قرار گرفت.

جهت واکنش ELISA میزان ۱۰ میکروگرم از پروتئین تام گیاه تراریخت در پلیت ELISA بارگیری شد سپس با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی که از پیش توسط امانی و همکاران علیه ساختار کایمریک سه قسمتی تهیه شده بود (Amani *et al.*, 2010) واکنش ELISA انجام گرفت. میزان OD به‌دست آمده در نمودار استاندارد قرار داده شد و بر اساس آن میزان غلظت پروتئین نوترکیب IT تولید شده در گیاه محاسبه گردید. این آزمایش سه بار تکرار گردید. در این روش به کمک مقادیر مشخص از پروتئین خالص EIT نوترکیب تولید شده در باکتری *E. coli* (rEIT) و میزان جذب نوری آن در الایزای غیرمستقیم، یک نمودار استاندارد رسم گردید و برمبنای آن و بر اساس میزان جذب نوری فیوژن پروتئین EIT در الایزای نیمه کمی، میزان حضور فیوژن پروتئین EI در پروتئین محلول تام گیاه تراریخت محاسبه می‌گردد. با رسم نمودار استاندارد rEIT، نسبت به تعیین میزان پروتئین کایمریک EI در پروتئین محلول تام گیاه اقدام گردید. لازم به ذکر است گیاه غیرتراریخت به‌عنوان شاهد منفی و پروتئین نوترکیب تخلیص شده از باکتری *E. coli* به‌عنوان کنترل مثبت واکنش استفاده شد (Amani *et al.*, 2010).

نتایج و بحث

همسانه‌سازی و pBI121

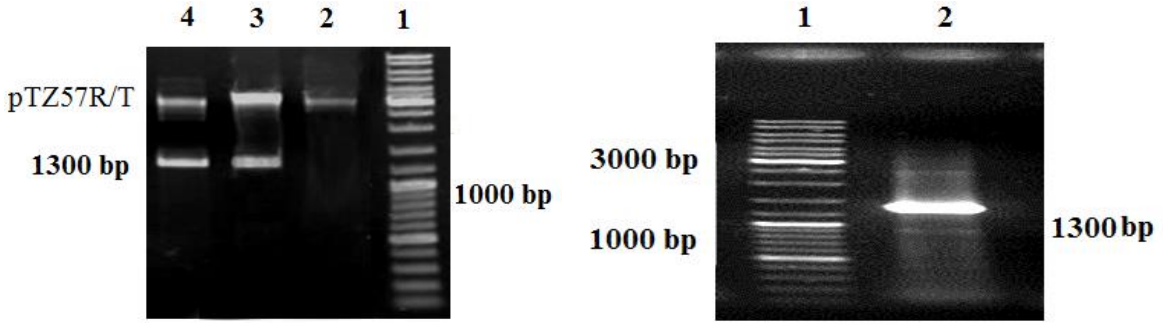
طی واکنش PCR، از ساختار سه قسمتی EIT، ساختار کایمریک دوقسمتی EI حاصل گردید که نتیجه آن بر روی ژل آگارز در شکل شماره ۲ بخش A نمایش داده شده است. هم‌چنین **همسانه‌سازی** ژن مورد **در ناقل TA** (pTZ57R/T) به کمک آنزیم‌های محدودالاثر تأیید گردید که نتیجه حاصل در شکل ۱ بخش B آورده شده است.

به‌منظور هضم آنزیمی ناقل pBI121 و قطعه وارد شونده، ناقل PBI121 و ناقل نوترکیب pTZ57R/T حاوی سازه ژنی با دو آنزیم *Xba*I و *Sac*I هضم و قطعات مورد نظر از روی ژل تخلیص شد. پروموتر عمومی CaMV35S جهت بیان در کل ساختار گیاه می‌باشد که در ناقل pBI121 وجود دارد. با استفاده از قطعه EI تخلیص شده و ناقل pBI121 برش خورده واکنش اتصال انجام گرفت. سپس پلاسمیدهای نوترکیب به درون سلول مستعد *E. coli* DH5α انتقال داده شد و غربال‌گری اولیه بر روی محیط جامد حاوی کانامایسین صورت گرفت. جهت تأیید کلون‌های رشد کرده روی محیط انتخابی از دو روش PCR با آغازگرهای اختصاصی و هضم آنزیمی دو سر ژن استفاده شد. نتایج PCR و هضم آنزیمی در شکل ۳ به آمده است. حضور سازه ژنی در اگروباکتری نوترکیب که بر روی محیط حاوی کانامایسین رشد کرده بودند از طریق واکنش PCR تائید گردید (شکل ٤).

تجزیه و تحلیل مولکولی گیاه تراریخت

به‌منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت به‌دست آمده، DNA ژنومی استخراج گردید و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *ei* واکنش PCR انجام شد. محصول PCR انجام شده قطعه‌ای به اندازه تقریبی bp ۱۳۰۰ بود که در شکل ۵ نشان داده شده است. به‌منظور بررسی رونوشت حاصل از ژن وارد شده به گیاهان با استفاده از RNA تام استخراج شده در۵ نمونه از گیاهان تراریخت که وجود سازه ژنی نوترکیب در آن‌ها به روش PCR به اثبات رسید و یک نمونه گیاه غیرتراریخت با به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی سازه‌ی ژنی، واکنش RT-PCR انجام شد (شکل ٦). همان‌طور که انتظار می‌رفت، در محصول RT-PCR گیاه تراریخت باند حدود bp ۱۳۱٤ مشاهده گردید. جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول به‌صورت کمی، از روش برادفورد استفاده شد و در چاهک‌های الیزا حدود ۱۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده (TSP) تثبیت شد. حضور پروتئین با استفاده از آنتی‌بادی به‌دست آمده از موش‌های ایمن مورد

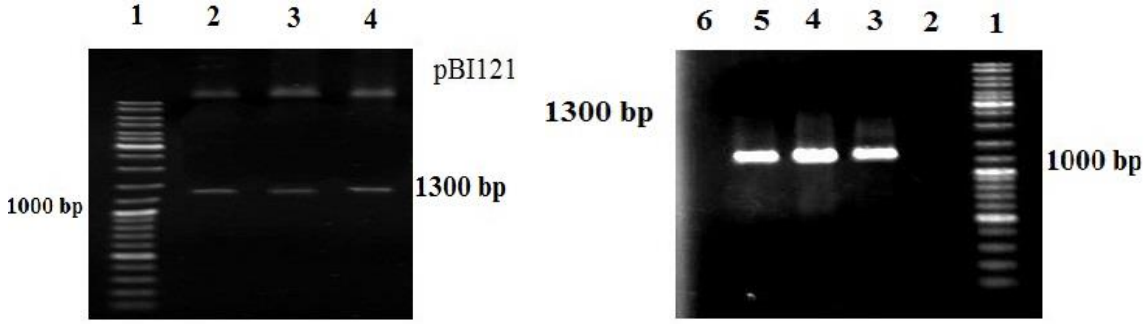
[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]



B A

شکل ۲– A) تکثیر ژن مصنوعی EI با ترجیح کدون گیاهی؛ ستون ۱: نشانگر اندازه DNA (۱۰۰ جفت باز)، ستون ۲: محصول تکثیر ژن EI؛ B) تأیید کلونینگ ژن مورد نظر، با استفاده از روش هضم آنزیمی بر روی چند کلونی مختلف از pTZ57R/T نوترکیب حاوی ژن EI؛ ستون ۱: نشانگر اندازه DNA (۱۰۰ جفت بازی) ستون ۲، ۳ و ٤: پلاسمید pTZ57R/T حاوی قطعات کایمریک دو قسمتی EI برش خورده با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I

Figure 2. A) A synthetic gene amplification of EI with plant codon preference; Column 1: 100 bp DNA Ladder, Column 2: EI gene amplification products. B) Cloning confirmation of the gene of interest, using enzymatic digestion on several different colonies of $_{p}$TZ57R / T plasmid containing the *EI* gene Column 1: 100 bp DNA Ladder, Column 2, 3 and 4: pTZ57R / T plasmid containing the chimeric fragments with enzymes *Xba*I and *Sac*I cutting EI bipartite

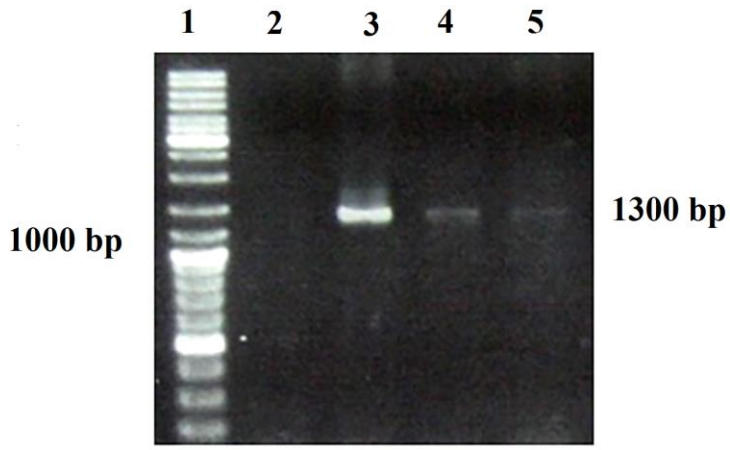


B A

شکل ۳– A) الگوی الکتروفورز محصول PCR از کلون‌های حاوی قطعه دوگانه دو قسمتی ei در ناقل pBI121 بر روی ژل آگارز یک درصد؛ ستون ۱: نشانگر اندازه DNA، ستون ۲: کنترل منفی واکنش، ستون‌های ۳–٦: تجزیه و تحلیل کلون‌های حاوی قطعه دوگانه مورد نظر؛ B) الگوی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی pBI121 نوترکیب حاوی قطعه دوگانه دو قسمتی *ei* با دو آنزیم *Xba*I و *Sac*I بر روی ژل آگارز یک درصد؛ ستون ۱: نشانگر اندازه DNA و ستون‌های ۲–٤: پلاسمید pBI121 حاوی قطعه دوگانه دو قسمتی *ei* برش خورده با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I

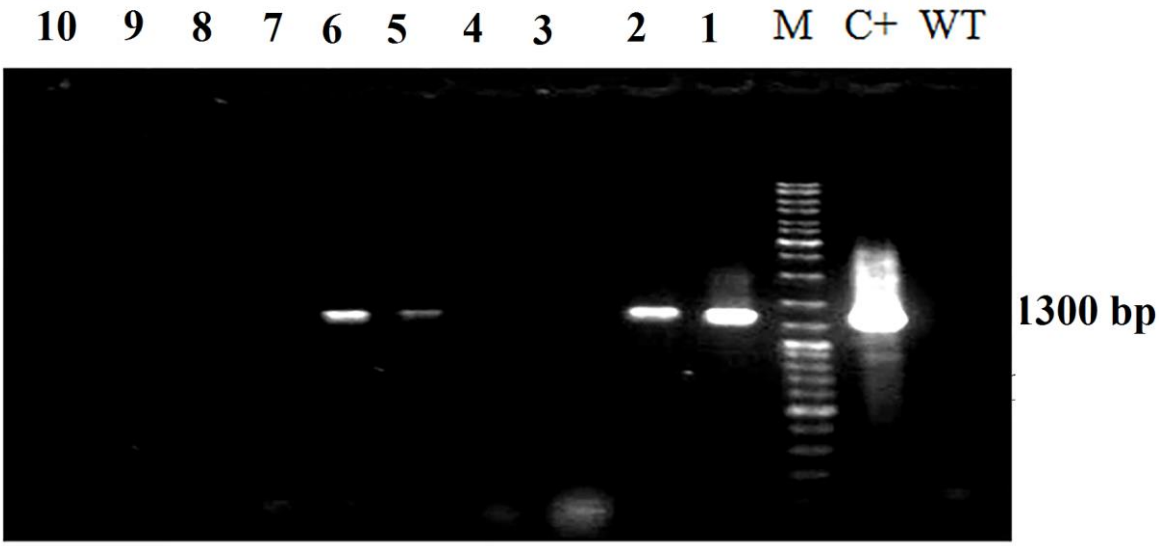
Figure 3. A) The electrophoresis pattern of the PCR product from clones that containing EI binary fragments in pBI121 vector on a 1% agarose gel; Column 1: DNA size marker, Column 2: negative control reaction, columns 3-6: Analysis of the clones containing double desired fragment, B) The electrophoresis pattern of pBI121 recombinant digestion containing the EI double fragments whit two enzymes XbaI and SacI on a 1% agarose gel; column 1: DNA size marker and columns 2-4: pBI121 plasmid containing double piece fragment digested with XbaI/SacI enzyme

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]



شکل ٤- تأیید حضور ناقل pBI121 نوترکیب (حاوی سازه ژنی *ei*) در اگروباکتری با روش PCR؛ ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی Mix (Fermentas)، ستون ۲: کنترل منفی (اگروباکتریوم تراریخت نشده)، ستون ۳: کنترل مثبت (پلاسمید pTZ57R/T حاوی قطعات مورد نظر) و ستون ٤ و ٥: دو کلونی از اگروباکتری های حاوی pBI 121+ei

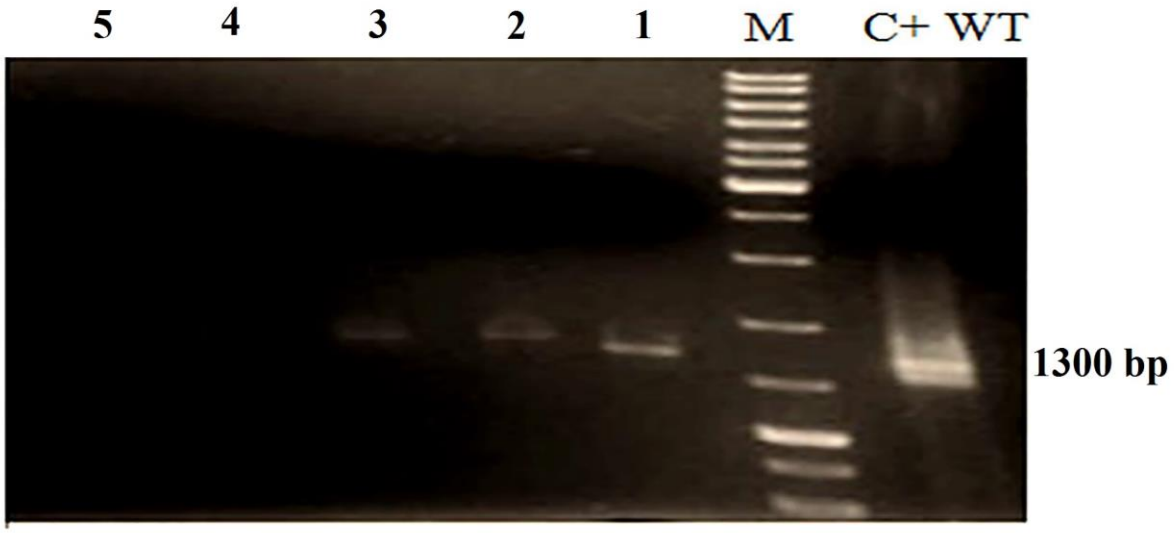
Figure 4. Confirmation of present the recombinant pBI121vector (containing *ei* gene construct) in agrobacterium by PCR; Column 1: molecular 100 bp marker Mix (Fermentas), column 2: negative control (non-transgenic Agrobacterium), Column 3: positive control (pTZ57R / T plasmid containing the target fragments) and columns 4 and 5: two colonies of agrobacterium containing pBI121 + ei



شکل ٥- آزمون PCR بر روی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *ei* ستون ۱ تا ۱۰: محصول PCR از DNA های گیاهان تراریخت، ستون‌های۱،۲،٥،٦و۱۰ واجد ژن مورد نظر می‌باشند ستون WT: محصول PCR با استفاده از DNA ژنومی از گیاه غیرتراریخت (کنترل منفی)، ستون +C: محصول PCR با استفاده از پلاسمید نوترکیب (کنترل مثبت)، ستون M: نشانگر وزن مولکولی Mix (Fermentas)

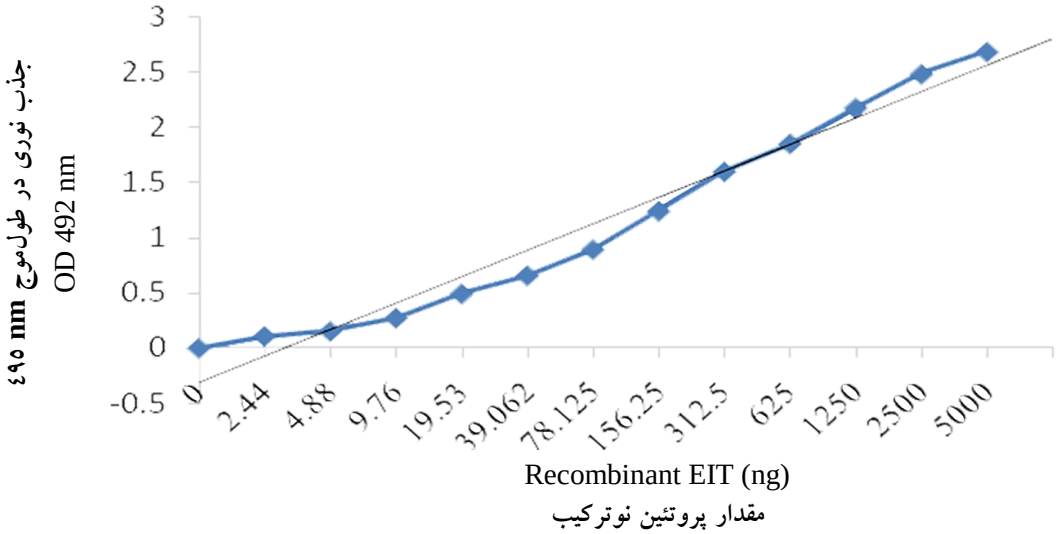
Figure 5. PCR test on genomic DNA extracted from transgenic plants using specific primers *ei* gene; column 1 and 10: PCR products from DNA of transgenic plants, columns 1, 2, 5, 6 and 10: containing target gene, WT column: PCR products from genomic DNA extracted from non-transgenic (negative control), C + column: PCR product using recombinant plasmid (positive control), column M: Molecular weight markers mix (Fermentas)

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]



شکل ٦- الکتروفورز محصول RT-PCR گیاهان تنباکوی تراریخت حاوی قطعه دو قسمتی *ei* با پرایمرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱٪؛ ستون ۱ تا ۵: محصول RT -PCR از گیاه تنباکوی تراریخت (به‌ترتیب گیاهان T1 تا T5)، ستون +C: محصول PCR از پلاسمید نوترکیب (کنترل مثبت)، ستون WT: محصول RT -PCR از گیاه غیرتراریخت (کنترل منفی)، ستون M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی Fermentas

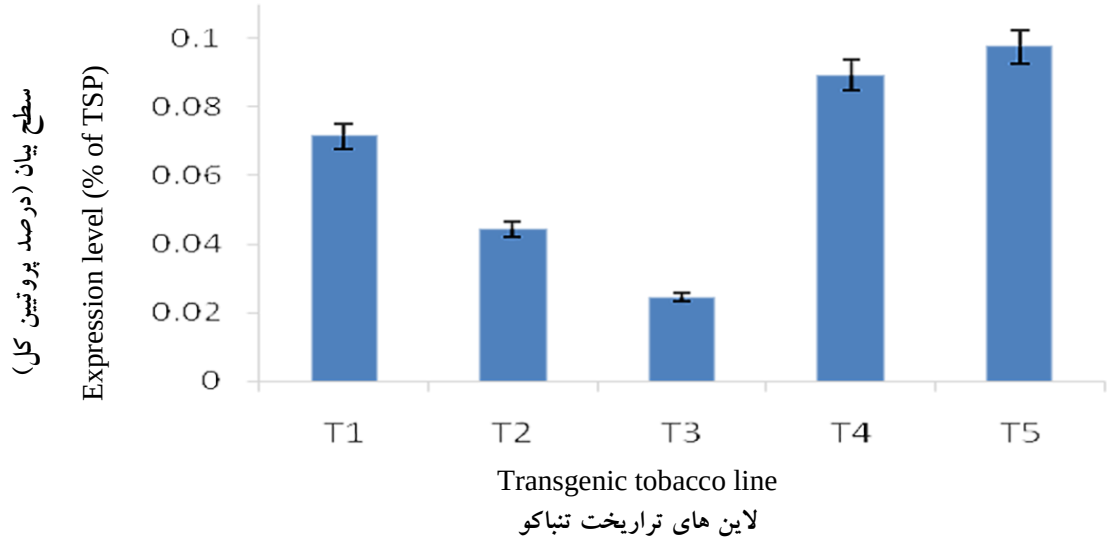
Figure 6. Electrophoresis of RT-PCR product containing transgenic tobacco plants with specific primers containing two-part of ei on a 1% agarose gel. column 1 to 5: RT -PCR product of transgenic tobacco plants (Respectively T1- T5plants), column C +: PCR product of recombinant plasmid (positive control), WT column: RT -PCR product non-transgenic (negative control), M column: Molecular weight markers mix (100 bp Fermentas)



شکل ۷- نمودار استاندارد الایزا. در این نمودار، محور y جذب نوری در طول‌موج ٤٩٥ nm و محور x مقدار پروتئین نوترکیب EIT به‌کار رفته در اندازه‌گیری برحسب نانوگرم است. این نمودار مبنای محاسبه برای غلظت محلول‌های پروتئینی گیاه قرار گرفته است

Figure 7. ELISA standard curve. In this diagram, y axis defines the amount of light absorption in the wavelength of nm 495 and x axis defines the amount of recombinant proteins EIT (ng). This chart was used for calculation of the concentration of plant protein

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]



شکل ۸- تعیین میزان پروتئین نوترکیب در برگ گیاه تراریخت تنباکو به روش ELISA. ستون T1 تا T5 به‌ترتیب شامل گیاهان T1، T2، T3، T4 و T5 می‌باشند

Figure 8. Determination the amount of recombinant protein in transgenic tobacco leaves by ELISA. Column T1 to T5, including T1, T2, T3, T4 and T5 plants, respectively

ارزیابی قرار گرفت. با مقایسه ODهای به‌دست آمده در این آزمون با نمودار استاندارد الیزا (شکل ۷) دیده شده که در بهترین حالت میزان ۰/۱ درصد از کل پروتئین‌های برگ متعلق به پروتئین نوترکیبEI است. قابل توجه است که میزان بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخت تنباکو در محدوده ۰/۰۲ تا ۰/۱ درصد بود (شکل ۸). طبق محاسبات انجام شده و بر مبنای نمودار برادفورد، میزان پروتئین نوترکیب به‌دست آمده از یک گرم وزن برگ گیاه تنباکو لاین ۵ (T5) برابر ۱ میکروگرم بود.

باکتری بیماری‌زای اشریشیاکلی انتروهموراژیک O157:H7 می‌تواند به‌طور مستقیم از طریق آب و غذای آلوده یا به‌صورت غیرمستقیم از طریق دفع باکتری به محیط، منجربه عفونت انسانی گردد (McNeilly *et al.*, 2010b) با توجه به بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و اهمیت پیشگیری از بروز بیماری لزوم ایجاد یک واکسن مؤثر علیه این بیماری مورد توجه است. از آن‌جا که پروتئین‌های EspA، EspB، EspE، Tir و اینتیمین نقش اساسی در اتصال و کلونیزاسیون باکتری دارند و جلوگیری از اتصال باکتری می‌تواند از بروز بیماری جلوگیری کند، این پروتئین‌ها به‌عنوان کاندیدهای خوبی برای ایجاد واکسن شناخته شده‌اند. اگرچه تاکنون چندین واکسن علیه EHEC O157:H7 طراحی شده و به‌صورت تجربی نیز مورد آزمایش قرار گرفته، اما تاکنون یک واکسن مؤثر برای پیشگیری یا کنترل این باکتری طراحی و روانه بازار نشده است. این باکتری‌ها از مکانیسم‌های پیچیده‌ای برای ایجاد بیماری استفاده می‌کنند. عمده این مکانیسم‌ها، شامل استفاده از چند پروتئین است که در زمان و مکان مختلف در سطح باکتری یا حتی در سطح سلول میزبان قرار می‌گیرند (Stevens *et al.*, 2002). در خصوص طراحی واکسن علیه این باکتری نیز بهره‌برداری از روش فناوری پروتئین‌های نوترکیب و تولید آنتی‌ژن‌های نوترکیب و مؤثر ضروری به‌نظر می‌رسد (Amani *et al.*, 2010). طبق بررسی‌های انجام شده در این زمینه مشخص شده بود که پروتئین‌های سیستم ترشحی تیپ III (TTSS) و یک پروتئین داخل غشایی (اینتیمین) در چسبیدن و اتصال باکتری EHEC به سلول‌های روده میزبان نقش مهمی را بر عهده دارند (Dziva *et al.*, 2004; Van Diemen *et al.*, 2005). مطالعات بیشتر بر روی پروتئین داخل غشایی اینتیمین نشان داد که تحریک سیستم ایمنی علیه این جزء می‌تواند

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

در اتصال و متعاقب آن بیماری‌زایی باکتری ایجاد اختلال جدی نماید. آزمایش‌های انجام شده توسط کارولهو و همکاران (Carvalho *et al.*, 2005) نشان داد که نقش اصلی در ایمنی‌زایی مربوط به انتهای کربوکسیل اینتیمین است. پروتئین دیگری که در مطالعات ایمنی‌زایی علیه EHEC O157:H7 مورد توجه قرار گرفت، پروتئین EspA است. این پروتئین به‌صورت پلیمریزه قادر به ایجاد کانال (پیلی) است که وظیفه آن رساندن پروتئین‌های خاص از داخل سلول باکتری به داخل سلول میزبان است. مطالعات صورت گرفته روی این پروتئین نشان می‌دهد که برای پلیمریزه شدن، لازم است که بخش انتهای آمینی با یکدیگر میان‌کنش داشته و عملاً بخشی از مولکول که در بیرون این ساختار قرار می‌گیرد، شامل اسیدهای آمینه‌ایی است که در انتهای کربوکسیل قرار گرفته‌اند. مطالعات ایمونولوژیکی و آنالیزهای بیوانفورماتیک نیز نشان می‌دهد که در ناحیه انتهای کربوکسیلی، تجمعی از اپی‌توپ‌های مربوط به تحریک سیستم ایمنی هومورال قرار گرفته‌اند (Amani *et al.*, 2009). در یک مطالعه تأثیر واکسن خوراکی حاوی EspA، EspB و اینتیمین بر کاهش میزان ریزش اشریشیاکلی O157:H7 در مدفوع گوسفند بررسی شد (Yekta *et al.*, 2011). تحقیقات انجام شده در ایران نشان می‌دهد که می‌توان با بیان قسمت‌های ایمنوژن پروتئین‌های EspA، اینتیمین و Tir در گیاهان تراریخت، ایمن‌سازی حیوانات مدل را از طریق خوراکی انجام داد و سبب تحریک ایمنی هومورال (IgG) و مخاطی (IgA) موجود هدف شد (Amani *et al.*, 2011). نتایج کارهای پیشین کارایی پروتئین کایمریک سه قسمتی EspA ، اینتیمین و Tir در القای ایمنی هومورال و مخاطی را در حیوان مدل و از طریق خوراکی نشان می‌دهد (Karimi *et al.*, 2013). به‌نظر می‌رسد که اگر از نظر ایمونولوژیک بتوان مانع از عملکرد صحیح EspA شد (به‌ویژه در مراحل سرهم شدن، تشکیل کانال)، می‌توان انتظار داشت که انتقال EspB و EspD به‌عنوان دو زیر واحد اصلی در سیستم ترشحی تیپ III نیز با مشکل مواجه شده و عملاً منفذی در داخل غشاء میزبان تولید نگردد. در این صورت می‌توان از انتقال یک مولکول اصلی دیگر که به‌عنوان گیرنده اینتیمین (یعنی پروتئین Tir) عمل می‌کند نیز جلوگیری به‌عمل آورد. با در نظر گرفتن این شرایط شاید بتوان با حذف توالی ژنی سازنده پروتئین Tir، از ساختار سه قسمتی Tir، Intimin و EspA، پروتئین کایمریکی تولید نمود که تنها حاوی بخش‌های ایمونوژن EspA و Intimin باشد. این امر بدین لحاظ حائز اهمیت می‌باشد که ایجاد این سازه ژنی کوتاه راحت‌تر صورت گرفته و بیان پروتئین مورد نظر در سلول میزبان با مشکل کم‌تری مواجه خواهد شد. هم‌چنین با کاهش حجم پروتئین می‌توان عوارض جانبی حاصل از تجویز آن را در بدن موجود زنده کاهش داد. ساختار دو قسمتی EspA;Intimin در یک بررسی که توسط صدیقیان و همکاران (Sedighianrad *et al*;., 2013) صورت گرفت، در باکتری *E. coli* بیان گردید و از لحاظ ایمنی‌زایی در حیوان مدل موشی مورد ارزیابی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که درمان با آنتی‌سرم کایمریک ایجاد شده در موش از رشد باکتری EHEC O157:H7 جلوگیری نمی‌کند اما به‌طور مؤثر از چسبندگی و اتصال این باکتری ممانعت به‌عمل می‌آورد. هم‌چنین این نتایج نشان داد که این پروتئین دو جزئی یک ترکیب ایمنوژن مناسب بوده و با ایمن‌سازی از طریق این پروتئین به‌صورت مؤثری از کلونیزه شده EHEC O157:H7 بر روی سطح روده جلوگیری به‌عمل می‌آید. در پژوهش حاضر با کمک اطلاعات به‌دست آمده از تحقیقات انجام شده قبلی، ساختار دو قسمتی EspA;Intimin به‌عنوان کاندیدای مناسب جهت ساخت ایمونوژن مؤثر علیه EHEC انتخاب گردید. این تحقیق به لحاظ بیان ساختار کایمریک مورد نظر در گیاه به‌منظور دستیابی به یک ایمونوژن با کاربرد خوراکی و در سیستم گیاهی حائز اهمیت می‌باشد. در صورت انجام مراحل تکمیلی و ایمنی‌زایی این پروتئین از طریق خوراکی می‌توان مقایسه‌ای کامل بین اجزاء مختلف این پروتئین کایمریک

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

در مدل حیوانی انجام داد. قطعات انتخاب‌شده از دو پروتئین EspA و اینتیمین شامل بخش‌های نسبتاً بزرگی از پروتئین‌های یادشده می‌باشد و کنار هم قرار گرفتن این دومین‌ها در ژن مصنوعی می‌تواند سبب تداخل ساختاری در آن‌ها گردد. جهت جداسازی دو دومین انتخاب شده، یک ترادف تکراری شامل اسید آمینه‌های EAAAK (اسیدآمینه اسید گلوتامیک، آلانین و لیزین) به‌صورت چهار ترادف تکراری به‌عنوان رابط پلی‌پپتیدی حد واسط انتخاب گردید (Arai *et al.*, 2001) در انتخاب ترادف مذکور، طول مناسب این رابط و توانائی در ایجاد ساختار دوم منظم مدنظر قرار گرفت. تغییر طول رابط پپتیدی بر روی پایداری پروتئین‌های متصل شونده، میزان و سرعت فولدینگ و جهت‌گیری‌های دومین‌ها نسبت به هم تأثیر می‌گذارد. ترادف تکراری انتخاب شده، به سبب داشتن پل نمکی که توسط تکرار اسید گلوتامیک و لیزین ایجاد می‌شود می‌تواند ساختار هلیکس پایداری را ایجاد کند زیرا بخش‌های آب‌دوست این اسیدهای آمینه در حلال‌های قطبی (محیط داخل سلولی) به حالت گسترش یافته درآمده و این امر موجب دور شدن بخش‌های مختلف از یکدیگر و کاهش برهمکنش پروتئین‌ها می‌گردد. انتخاب یک میزبان مناسب برای بیان و تولید این پروتئین کایمر، مسئله دیگری است که در این تحقیق مورد توجه قرار گرفت. گیاهان تراریخت به‌عنوان بیوراکتور برای تولید مواد آنتی‌ژنی، توانایی عرضه این موکول‌های ایمنی‌زا را به دستگاه گوارش (محل عفونت) دارند و می‌توانند پاسخ‌های سیستم ایمنی مخاطی و سیستمیک را تحریک نمایند. علاوه بر آن، گیاهان قادر به تولید فرآورده‌هایی می‌باشند که فاقد آلودگی به پاتوژن‌های انسانی است. هم‌چنین گیاهان دارای امکانات سلول یوکاریوتی برای پردازش پس از ترجمه پروتئین‌ها (نظیر افزودنِ مولکول‌های قندی و folding مناسب) می‌باشند. در ضمن هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته کمتر از هزینه تولید آن‌ها در سلول‌های پروکاریوتی نظیر باکتری *E. coli* می‌باشد. سلول‌های گیاهی به‌عنوان میکروکپسول‌های محافظتی عمل می‌کنند و می‌توانند آنتی‌ژن‌هایی با عملکرد واکسن را پیش از رسیدن به بافت‌های هدف، از تجزیه در دستگاه گوارش حفظ کنند. برای افزایش بیان پروتئین مورد نظر در سیستم گیاهی، تمهیدات مختلفی در نظر گرفته شد: از آن‌جا که ژن‌های با منشأ پروکاریوتی غنی از توالی‌های AT می‌باشند لذا کدون‌های آن‌ها جهت بیان در سیستم یوکاریوتی مناسب نیستند. در مطالعات بیوانفورماتیکی که توسط امانی و همکاران (Amani *et al.*, 2010) صورت گرفت کدون‌های مناسب برای بیان سازه ژنی سه قسمتی EspA;Intimin;Tir در سیستم گیاهی با حفظ توالی اسیدهای آمینه پیشنهاد شد. برای این منظور کدهای اسیدآمینه در گیاه تنباکو با کدهای موجود در ساختارهای مورد نظر مقایسه شد و کدهایی که در گیاه تنباکو بیشترین بیان را دارا بودند انتخاب گردید و جایگزین کدهای موجود در ترادف ژن مصنوعی شد. این بهینه‌سازی به‌همراه کاهش نوکلئوتیدی‌های AT و افزایش نوکلئوتیدی‌های GC و عدم حضور جایگاه برش برای آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I در این سازه ژنی بود. از موارد دیگر مورد توجه، وجود نوکلئوتید G پس از کدون آغاز در گیاه (در موقعیت ٤+) و نوکلئوتید C (در موقعیت ٥+) می‌باشد که موجب افزایش ده برابری بیان پروتئین در مرحله ترجمه می‌گردد که حضور اسیدآمینه آلانین در ابتدای پروتئین EspA با کدون GCT، G مورد نظر را تأمین می‌کند. وجود توالی کزاک در ابتدای سازه ژنی نیز از دیگر عوامل دقت در شروع و افزایش‌دهنده بیان ژن در سیستم‌های یوکاریوت محسوب می‌شود. هم‌چنین به انتهای کربوکسیل پروتئین، توالی KDEL اضافه شد تا این پروتئین را پس از تولید به سمت شبکه اندوپلاسمیک (ER) هدایت کند. در ER، اولاً پروتئین دوقسمتی ساختار مناسب را به خود می‌گیرد و ثانیاً از گزند پروتئازهای سیتوپلاسمی در امان می‌ماند و از این طریق موجب تثبیت پروتئین و بالا بردن راندمان بیان می‌شود (Kang *et al.*, 2004; Moravec *et al.*, 2007).

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان پروتئین کایمر EI در گیاه توتون به ۰/۱ درصد پروتئین تام محلول در برگ می‌رسد. در مطالعات مشابه میزان بیان پروتئین LTB که منشأ باکتریایی دارد، به تنهایی در گیاه تراریخت توتون بین ۰/٤ – ۰/۰۱ درصد پروتئین محلول تام گزارش شده است (Kang *et al.*, 2004). از این منظر، میزان بیان پروتئین کایمریک کاندیدای واکسن در برگ توتون بالا بوده است. در تحقیق صورت یافته توسط امانی و همکاران میزان بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخت کلزا از ۰/۲ تا ۰/۳۳ درصد متغیر بود، در حالی که در گیاهان تراریخت تنباکو از ۰/۱ تا ۰/۳ درصد بود. میزان پروتئین تام بذر کلزا بیست برابر بیشتر از میزان پروتئین تام در برگ گیاه تنباکو می‌باشد (Amani *et al.*, 2011). با توجه به این نکته میزان پروتئین نوترکیب به‌دست آمده از یک گرم بذر کلزا ٦۰ میکروگرم بود در حالی که از یک گرم وزن برگ گیاه تنباکو برابر ۳ میکروگرم بود. مطالعات دیگری که توسط Rossi و همکاران، در زمینه بیان آنتی‌ژن‌های باکتری *E. coli* در گیاه توتون صورت یافته است نشان می‌دهد که با انتخاب پیش‌برنده‌های ویژه بذر می‌توان بیان ژن وارد شده را تا میزان ۳ درصد از کل پروتئین بذر افزایش داد (Rossi *et al.*, 2013). هم‌چنین در تحقیق دیگر گروه میزان بیان پروتئین حاصل از سازه ژنی دوقسمتی IT در گیاه توتون بررسی شد که در آن میزان ۰/۲ درصد از کل پروتئین‌های برگ متعلق به پروتئین نوترکیب IT بود. در مطالعه‌ای که در گروه توسط غیاثی و همکاران صورت یافت، میزان بیان یک آنتی‌ژن گلیکوپروتئینی در برگ‌های گیاه توتون در حدود ۰/۳ درصد از کل پروتئین برگ گزارش گردید. بهینه‌سازی کدون‌ها بر مبنای گیاه توتون و به‌کارگیری ترادف‌های تنظیمی می‌توانند میزان بیان پروتئین نوترکیب را افزایش دهند. علاوه بر این تعداد نسخه‌های وارد شده به گیاه و اثرات مکان الحاق ژن در ژنوم (positional effect) بر میزان بیان پروتئین اثر دارد. با توجه به بهینه شدن کدون‌ها بر مبنای گیاه توتون و به‌کارگیری ترادف‌های تنظیمی، همان‌گونه که انتظار می‌رفت میزان بیان پروتئین دوگانه‌ی EI در برگ گیاه توتون مناسب می‌باشد؛ اما با توجه به نتایج به‌دست آمده در تحقیقات پیشین، بیان پروتئین نوترکیب EI کمتر از مقادیر گزارش شده‌ی قبلی می‌باشد که این مسئله می‌تواند به احتمال ناشی از اثرات موضعی مکان الحاق یا تعداد نسخه‌های انتقالی باشد. اهمیت میزان بیان بالاتر از آن‌جا ناشی می‌شود که مقادیر مناسب آنتی‌ژن را می‌توان در حداقل حجم برگ جهت استفاده ایمنی‌زای از طریق خوراکی تأمین نمود. نتایج به‌دست آمده در تحقیقات مختلف نشان داده است که گیاه توتون برای بیان تهیه‌ی واکسن خوراکی، تنها به‌عنوان یک مدل قابل بررسی است و استفاده از گیاهان دیگر که ارزش غذایی و مطلوبیت خوراکی بهتری دارند می‌تواند نتایج بهتری داشته باشد. هم‌چنین استفاده از دیگر بافت‌های خوراکی، نظیر دانه و بذر یا میوه نیز برای تهیه‌ی واکسن خوراکی را می‌توان به‌عنوان یک راه‌کار مناسب در نظر داشت (Lal *et al.*, 2007; Yekta *et al.*, 2011). بررسی ایمنی‌زایی پروتئین‌هایی که در برگ تولید شده‌اند وجود دارد. به‌عبارت دیگر می‌توان با آماده‌سازی برگ‌های توتون (نظیر خشک کردن و ترکیب با مواد خنثی و حجم دهنده نظیر آرد) به بررسی ایمنی‌زایی این پروتئین‌های نوترکیب نیز پرداخت. آزمایش‌های تکمیلی در خصوص انتقال گیاهان تراریخت به شرایط گلخانه‌ای نشان داد که بیان پروتئین دو قسمتی در گیاه، تأثیر محسوسی بر میزان رشد و نمو گیاه مشاهده نگردید و گیاه تراریخت واجد ژن کایمریک مراحل رشد و بذر دهی را مشابه با گیاهان غیرتراریخت طی نمود. فرضیه ما این است که در صورتی که بتوان پروتئین بیان‌شده مورد نظر را به‌صورت خوراکی مصرف نمود پاسخ ایمنی ایجاد خواهد شد. به‌عبارت دیگر ایمنی‌زایی این ترکیب کایمریک از طریق تزریقی اثبات شده و انتظار می‌رود نوع خوراکی نیز موجب تحریک پاسخ ایمنی شده و در نهایت در محافظت و پیشگیری میزبان در برابر چالش با میکروارگانیسم بیماری‌زا نقش بسزایی داشته باشد.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

References

Adu-Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Goncalves, A.G., Trabulsi, L.R., Douce, G., Knutton, S. and Dougan, G. (1998). Detection of intimins α, β, γ, and δ, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**: 662-668.

Allen, K.J., Rogan, D., Finlay, B.B., Potter, A.A. and Asper, D.J. (2011). Vaccination with type III secreted proteins leads to decreased shedding in calves after experimental infection with Escherichia coli O157. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **75**: 98-105.

Amani, J., Mousavi, S.L., Rafati, S. and Salmanian, A.H. (2009). In silico analysis of chimeric espA, eae and tir fragments of Escherichia coli O157:H7 for oral immunogenic applications. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, **6**: 28-38.

Amani, J., Mousavi, S.L., Rafati, S. and Salmanian, A.H. (2011). Immunogenicity of a plant-derived edible chimeric EspA, Intimin and Tir of Escherichia coli O157: H7 in mice. *Plant Science*, **180**: 620-627.

Amani, J., Salmanian, A.H., Rafati, S. and Mousavi, S.L. (2010). Immunogenic properties of chimeric protein from espA,eae and tirgenes of Escherichia coli O157: H7. *Vaccine*, **28**: 6923-6929.

Arai, R., Ueda, H., Kitayama, A., Kamiya, N. and Nagamune, T. (2001). Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein Engineer Design and Selection*, **14**: 529-532.

Aslani, M.M. and Bouzari, S. (2003). An epidemiological study on Verotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) infection among population of northern region of Iran (Mazandaran and Golestan provinces). *European Journal of Epidemiology*, **18**: 345-349.

Carvalho, H.M., Teel, L.D., Kokai-Kun, J.F. and O'Brien, A.D. (2005). Antibody against the carboxyl terminus of intimin α reduces enteropathogenic Escherichia coli adherence to tissue culture cells and subsequent induction of actin polymerization. *Infection and Immunity*, **73**: 2541-2546.

Cook, S., Maiti, P., DeVinney, R., Allen-Vercoe, E., Bach, S. and McAllister, T. (2007). Avian and mammalian derived antibodies against adherence associated proteins inhibit host cell colonization by Escherichia coli O157: H7. *Journal of Applied Microbiology*, **103**: 1206-1219.

Dean-Nystrom, E.A., Bosworth, B.T., Moon, H.W. and O'brien, A.D. (1998). Escherichia coli O157: H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infection and Immunity*, **66**: 4560-4563.

Dziva, F., Van Diemen, P.M., Stevens, M.P., Smith, A.J. and Wallis, T.S. (2004). Identification of Escherichia coli O157: H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*, **150**: 3631-3645.

Fan, H.Y., Wang, L., Luo, J. and Long, B.G. (2012). Protection against Escherichia coli O157: H7 challenge by immunization of mice with purified Tir proteins. *Molecular Biology Reports*, **39**: 989-997.

Garmendia, J., Frankel, G. and Crepin, V.F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*, **73**: 2573-2585.

Jerse, A. and Kaper, J. (1991). The eae gene of enteropathogenic Escherichia coli encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infection and Immunity*, **59**: 4302-4309.

Judge, N.A., Mason, H.S. and O'Brien, A.D. (2004). Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of Escherichia coli O157: H7 shedding in feces. *Infection and Immunity*, **72**: 168-175.

Kahrizi, D., Salmanian, A.H., Afshari, A., Moieni, A. and Mousavi, A. (2007). Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of E. coli (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. *Plant Cell Reports*, **26**: 95-104.

Kang, T.J., Han, S.C., Jang, M.O., Kang, K.H., Jang, Y.S. and Yang, M.S. (2004). Enhanced expression of B-subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **117**: 175-187.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

Karimi, F., Mousavi, A., Salmanian, A.H., Alizadeh, H. and Rafati, S. (2013). Immunogenicity of EIT chimeric protein expressed in transplastomic tobacco plants towards development of an oral vaccine against Escherichia coli O157: H7. *Plant Biotechnology Reports*, **7**: 535-546.

Karmali, M.A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, **2**: 15-38.

Khaitsa, M.L., Smith, D.R., Stoner, J.A., Parkhurst, A.M., Hinkley, S., Klopfenstein, T.J. and Moxley, R.A. (2003). Incidence, duration, and prevalence of Escherichia coli O157:H7 fecal shedding by feedlot cattle during the finishing period. *Journal of Food Protection*, **66**: 1972-2179

La Ragione, R.M., Patel, S., Maddison, B., Woodward, M.J., Best, A., Whitelam, G.C. and Gough, K.C. (2006). Recombinant anti-EspA antibodies block Escherichia coli O157: H7-induced attaching and effacing lesions in vitro. *Microbes and Infection*, **8**: 426-433.

Lal, P., Ramachandran, V., Goyal, R. and Sharma, R. (2007). Edible vaccines: current status and future. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **25**: 93-102.

McNeilly, T.N., Mitchell, M.C., Nisbet, A.J., McAteer, S., Erridge, C., Inglis, N.F., Smith, D.G., Low, J.C., Gally, D.L. and Huntley, J.F. (2010a). IgA and IgG antibody responses following systemic immunization of cattle with native H7 flagellin differ in epitope recognition and capacity to neutralise TLR5 signalling. *Vaccine*, **28**: 1412-1421.

McNeilly, T.N., Mitchell, M.C., Rosser, T., McAteer, S., Low, J.C., Smith, D.G., Huntley, J.F., Mahajan, A. and Gally, D.L. (2010b). Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of Escherichia coli O157: H7 following oral challenge. *Vaccine*, **28**: 1422-1428.

Moon, H., Whipp, S., Argenzio, R., Levine, M. and Giannella, R. (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines. *Infection and Immunity*, **41**: 1340-1351.

Moravec, T., Schmidt, M.A., Herman, E.M. and Woodford Thomas, T. (2007). Production of Escherichia coli heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine*, **25**: 1647-1657.

Murphy, M., Buckley, J., Whyte, P., O'Mahony, M., Anderson, W., Wall, P. and Fanning, S. (2007). Surveillance of dairy production holdings supplying raw milk to the farmhouse cheese sector for Escherichia coli O157, O26 and O111. *Zoonoses and Public Health*, **54**: 358-365.

Oliveira, A.F., Cardoso, S.A., Almeida, F.B., De-Oliveira, L.L., Pitondo-Silva, A., Soares, S.G. and Hanna, E.S. (2012). Oral immunization with attenuated Salmonella vaccine expressing Escherichia coli O157:H7 intimin gamma triggers both systemic and mucosal humoral immunity in mice. *Microbiol and Immunology*, **56**: 513-522.

Potter, A.A., Klashinsky, S., Li, Y., Frey, E., Townsend, H., Rogan, D., Erickson, G., Hinkley, S., Klopfenstein, T. and Moxley, R.A. (2004). Decreased shedding of Escherichia coli O157: H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine*, **22**: 362-369.

Roe, A.J., Yull, H., Naylor, S.W., Woodward, M.J., Smith, D.G. and Gally, D.L. (2003). Heterogeneous surface expression of EspA translocon filaments by Escherichia coli O157: H7 is controlled at the posttranscriptional level. *Infection and Immunity*, **71**: 5900-5909.

Rossi, L., Di Giancamillo, A., Reggi, S., Domeneghini, C., Baldi, A., Sala, V., Dell'Orto, V., Coddens, A., Cox, E. and Fogher, C. (2013). Expression of verocytotoxic Escherichia coli antigens in tobacco seeds and evaluation of gut immunity after oral administration in mouse model. *Journal of Veterinary Science*, **14**: 263-270.

Sedighianrad, H., Mousavi, S.L., Rasooli, I., Amani, J. and Jalali-Nadooshan, M.R. (2013). EspA-Intimin chimeric protein, a candidate vaccine against Escherichia coli O157:H7. *Iranian Journal of Microbiology*, **5(3)**: 244-251.

Shekarforoush, S., Tahamtan, Y. and Pourbakhsh, A. (2008). Detection and frequency of Stx2 gene in Escherichia coli O157 and O157: H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **11:** 1085-1092.

Stevens, M.P., Van Diemen, P.M., Dziva, F., Jones, P.W. and Wallis, T.S. (2002). Options for the control of enterohaemorrhagic Escherichia coli in ruminants. *Microbiology*, **148**: 3767-3778.

Stewart, C.S. and Flint, H.J. (1999) *Escherichia coli O157 in farm animals*, CABI Publishing, New York, USA.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

Tree, J.J., Wolfson, E.B., Wang, D., Roe, A.J. and Gally, D.L. (2009). Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic Escherichia coli. *Trends in Microbiology*, **17**: 361-370.

Van-Diemen, P.M., Dziva, F., Stevens, M.P. and Wallis, T.S. (2005). Identification of enterohemorrhagic Escherichia coli O26: H-genes required for intestinal colonization in calves. *Infection and Immunity*, **73**: 1735-1743.

Yekta, M.A., Goddeeris, B., Vanrompay, D. and Cox, E. (2011). Immunization of sheep with a combination of intiminγ, EspA and EspB decreases Escherichia coli O157: H7 shedding. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **140**: 42-46.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]

[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]

Expression of Recombinant Chimeric EspA-intimin Protein in *Nicotiana tobaccum* for Oral Vaccine Development

Mahdieh Sahshorpour[1], Jafar Amani[2], Mahyat Jafari[1] and Ali Hatef Salmanian[3,*]

1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran
2- Assistant Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran
3- Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran

(Received: December 22, 2013 – Accepted: March 15, 2014)

Abstract

One of the important pathogens which cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in humans is enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7. Cattle are the most important reservoir of this bacterium. EspA and Intimin are two protein factors for bacteria colonization on intestinal epithelium and cause attaching/effacing lesion. The LEE pathogenicity islands code these proteins. EspA is part of type III secretion systems which delivers Tir to the host cell and integrate to membrane. Intimin encoded by *eae* gene and fused to Tir. In this research we supposed that chimeric recombinant form of EI gene containing EspA and Intimin were fused with a linker as an edible candidate vaccine would reduce colonization of *E. coli* O157:H7 in animal model. We constructed a synthetic gene EspA (E_{120}) and intimin (Int_{282}) fused by $(EAAAK)_4$ sequence. The synthetic gene (EI) was codon optimized and subcloned into plant expression vector (PBI_{121}) under CaMV35S promoter and then transferred to tobacco plant by agrobacterium mediated protocol. The presence of inserted gene in plant genome was documented by PCR and RT-PCR methods. The amount of EI protein in transgenic tobacco leaves were estimated 0.1% of the total soluble protein (TSP) by ELISA method.

Keywords: *E. coli* O157:H7, Edible vaccine, EspA, Intimin, Transgenic plant

* **Corresponding Author, E-mail: salman@nigeb.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.7.2]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.77]