

Comparison of Antibody Titers Against Outer Membrane Protein SlyB and Nano SlyB from Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Its Pure and Encapsulated Forms in a Model Organism|

Sepideh Kazemi Afarmjani¹, Jafar Amani^{2*}, Elaheh Taj Bakhsh¹, Shohreh Zare Karizi³

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahre Kord Branch, Islamic Azad University, Shahre Kord, Iran

2- Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

*Corresponding author: Jafar Amani, Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: jafar.amani@gmail.com

| Received | 2024/05/31

| Revised | 2025/09/13

| Accepted | 2026/06/22

| Abstract |

Background and Aim: Gastrointestinal infectious diseases are among the major health problems in developing countries. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the leading causes of acute diarrheal disease and associated mortality worldwide. Owing to the limitations of current therapeutic strategies, this study aimed to develop and evaluate a SlyB protein-based vaccine with enhanced stability under the acidic conditions of the stomach and within the intestinal environment, thereby preventing antigen degradation and improving its potential efficacy.

Materials and Methods: The *SlyB* gene was isolated from an ETEC strain and, after bioinformatics analysis (BLASTn, SignalP, Oligo7, calculation of CAI and GC%), it was cloned into the pET28a vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein was purified using Ni-NTA affinity chromatography and encapsulated into chitosan nanoparticles by an ionic gelation method. The physicochemical properties of the nanoparticles were characterized using a Malvern Zetasizer. Model animals (New Zealand rabbits) were immunized by injection, oral, and combined groups with doses of 150–300 μ g. Indirect ELISA measured serum and mucosal IgG and IgA antibody titers, and the rabbit ileal loop assay was performed to evaluate the neutralization of LT toxin. Statistical analysis was conducted using SPSS software with a significance level of $p < 0.05$.

Results: The encapsulation efficiency was 88%, and the average size of the nanoparticles was 116.6 nm. The nano-vaccine induced stronger humoral and mucosal immune responses compared to the pure protein form. In the challenge test, a significant reduction in fluid accumulation was observed ($p < 0.001$).

Conclusion: In the model organism, chitosan nanoparticles containing recombinant SlyB protein demonstrated high potential for inducing protective immunity against ETEC. Therefore, encapsulation of antigens in nanoparticles can be used as an effective strategy for oral vaccination.

| Keywords |

Enterotoxigenic *Escherichia Coli* (ETEC)|
Recombinant Protein|
SlyB|
Nanoparticles|
Chitosan|

| Iau Science |

مقایسه تیتراژ آنتی‌بادی در مقابل پروتئین غشای خارجی SlyB و نانو SlyB از باکتری

اشریشیا کلی آنتروتوکسیژنیک به فرم خالص و کپسوله‌شده در جاندار مدل |

سپیده کاظمی افرمجان^۱، جعفر امانی^{۲*}، الهه تاج‌بخش^۱، شهره زارع کاریزی^۳

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین، ایران

*نویسنده مسئول: جعفر امانی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله،

تهران، ایران؛ پست الکترونیکی: jafar.amani@gmail.com

تاریخ دریافت | ۱۴۰۳/۰۳/۱۱ | تاریخ بازنگری | ۱۴۰۴/۰۶/۲۲ | تاریخ پذیرش | ۱۴۰۵/۰۴/۱۱

چکیده |

زمینه و هدف: بیماری‌های عفونی روده‌ای یکی از مشکلات مهم بهداشتی کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شوند. اشریشیاکلی آنتروتوکسیژنیک (ETEC) از عوامل اصلی بروز اسهال حاد و مرگ‌ومیر ناشی از آن است. در این مطالعه با توجه به محدودیت‌های درمانی این عفونت، با هدف طراحی و ارزیابی واکسن بر پایه پروتئین SlyB انجام شد که در شرایط اسیدی معده و محیط روده مقاوم بوده و تخریب نشوند. **مواد و روش‌ها:** ژن SlyB از سویه ETEC جداسازی و پس از بررسی بیوانفورماتیکی (BLASTn، SignalP، Oligo7، محاسبه CAI و GC٪) در وکتور pET28a کلون و در *E. coli* BL21 (DE3) بیان شد. پروتئین نوترکیب با Ni-NTA تخلیص و در نانوذرات کیتوزان (با روش یونیک-ژلاسیون) کپسوله گردید. خصوصیات نانوذرات با زتاسایزر مالورن بررسی شد. جاندار مدل در گروه‌های تزریقی، خوراکی و ترکیبی با دوزهای ۱۵۰-۳۰۰ میکروگرم ایمن‌سازی شد. تیتراژ آنتی‌بادی IgG و IgA سرمی و مخاطی با ELISA غیرمستقیم اندازه‌گیری و آزمون چالش روده بسته خرگوش برای ارزیابی خنثی‌سازی توکسین LT انجام گرفت. تحلیل آماری با SPSS و سطح معناداری $p < 0.05$ نیز صورت پذیرفت.

نتایج: بازدهی کپسوله‌سازی ۸۸ درصد و اندازه نانوذرات ۱۱۶/۶ نانومتر بود. نانوواکسن پاسخ ایمنی *humoral* و *mucosal* قوی‌تری نسبت به فرم خالص ایجاد کرد و در آزمون چالش، کاهش معنی‌دار تجمع مایعات مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** در جاندار مدل نانوذرات کیتوزان حاوی پروتئین نوترکیب SlyB پتانسیل بالایی برای القای ایمنی محافظتی در مقابل ETEC نشان داد. بنابراین کپسوله‌سازی آنتی‌ژن‌ها در نانوذرات می‌تواند به عنوان راه کار مؤثر برای واکسن خوراکی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی |

|ETEC
پروتئین نوترکیب
|SlyB
نانوذرات
کیتوزان
|علوم Iau|

بیماری‌های عفونی علت بیش از ۵۴ درصد موارد مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه می‌باشند (۱). از جمله عوامل باکتریایی مسبب اسهال، *شریشیا کلی* آنتره‌موراژیک EHEC و *شریشیا کلی* آنتره‌توکسیژنیک ETEC به‌واسطه تولید سم نقش مهمی در ایجاد این بیماری در سراسر جهان دارند (۲). بیماری‌زایی این عوامل طی دو مرحله انجام می‌پذیرد: اولین مرحله اتصال باکتری به سطح سلول‌های میزبان یا کلونیزاسیون است و در مرحله دوم باکتری با تولید ترکیب‌های سمی سبب تخریب بافت‌های بیان‌شده می‌شود (۳).

سیستم انتقال سیگنال دو جزئی (TCS) در باکتری‌ها سیستم عمده برای حس کردن تغییرهای محیطی و انتقال اطلاعات درون سلول برای تنظیم بیان ژن است. این سیستم کنترل‌کننده بیان ژن‌های لازم برای به‌دست آوردن مواد غذایی، بیماری‌زایی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌هاست. یکی از این سیستم‌ها در *شریشیا کلی* سیستم *PhoQ/PhoP* است که بیان ژن‌هایی مانند انتقال‌دهنده Mg^{2+} و همچنین ژن‌های لازم برای تغییرهای LPS را در کنترل دارد (۴). AMP (پپتیدهای ضد میکروبی پستانداران) ترکیباتی کاتیونی هستند که با لیپوپلی ساکارید غشا واکنش داده تا غشای خارجی ارگانیسم را مختل کرده و به فضای پری پلاسمی دست یابند. بنابراین این ترکیب‌ها به میزبان کمک کرده تا جلوی تهاجم باکتری را بگیرند. خانواده آنتره‌باکتریاسه با سیستم انتقال سیگنال *PhoPQ* ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به AMP را تنظیم می‌کنند. این باکتری‌ها با سرکوب بیان AMP میزبان می‌توانند به‌صورت عمیق‌تر به سلول‌های میزبان نفوذ کنند (۵).

ژن‌های *SlyB*، *PhoP* و *PhoQ* در آنتره‌باکتریاسه تحت کنترل سیستم *PhoPQ* هستند که مقاومت در برابر پپتیدهای ضد میکروبی و استرس‌های اکسیداتیو را بهبود می‌بخشند. مشخص شده که بیان زیاد *SlyB* باعث مهار فعالیت پروتئین *PhoP* شده و در واقع این ژن به‌صورت منفی فعالیت پروتئین

PhoP را تنظیم می‌کند. بر همین اساس می‌توان با هدف قرار دادن این سیستم در باکتری، توانایی پاتوژن برای مقاومت را تحت تأثیر قرار داده و همچنین فعالیت باکتری‌کشی AMP‌ها درون بدن میزبان را پیش برد. این روش جایگزین خوبی برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌ها است (۶). در سال ۱۴۰۲ مطالعه‌ای با عنوان «بارگذاری پروتئین CfaB از باکتری *شریشیا کلی* آنتره‌توکسیژنیک در نانوذرات کیتوزان و ارزیابی ایمنی‌زایی آن» نشان داد که سرم موش‌های ایمن‌شده با این نانوذرات، اتصال باکتری ETEC سلول‌های Caco-2 را تا ۶۰ درصد کاهش داد. این نتایج حاکی از آن است که بارگذاری پروتئین نوترکیب CfaB در نانوذرات کیتوزان می‌تواند پاسخ ایمنی هومورال در مقابل باکتری ETEC را تحریک کند.

در کشورهای در حال توسعه میزان شیوع بیماری‌های اسهالی قابل توجه بوده و همچنین به‌دلیل کارا نبودن آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و خطر ایجاد سویه‌های مقاوم، این موارد همچنان جز اصلی‌ترین گزینه‌های مورد بررسی در سازمان بهداشت جهانی (WHO) است (۷).

مشخص شده است که یک‌بار ابتلا به این عفونت‌ها در بدن فرد ایجاد مصونیت می‌کند و واکسیناسیون نقش قابل توجهی برای ایمنی و پیشگیری از این عفونت‌ها دارد. به‌دلیل اینکه مسیر عفونت‌زایی این عوامل باکتریایی از راه دهانی-مدفوعی می‌باشد، بنابراین مؤثرترین راهکار برای مقابله با آن‌ها القای تولید تیترا بالایی از IgA ترشحی در سطوح مخاطی است (۸). استفاده از واکسن‌های خوراکی یکی از روش‌های ایجاد ایمنی مخاطی مؤثر است. ایمنی مخاطی می‌تواند سطوح داخلی بدن مانند دستگاه گوارش و تنفس را که در ارتباط با محیط خارج هستند محافظت کند. در حال حاضر این امکان به وجود آمده است که با تحریک سیستم ایمنی از راه بینی یا دهان بتوان پاسخ‌های ایمنی سیستمیک و مخاطی مناسبی را ایجاد کرد (۹). پاسخ مهم و اصلی سیستم ایمنی مخاطی در برابر میکروب‌ها، تولید IgA^۱ ترشحی توسط سلول‌هایی است که در بافت لنفاوی وابسته به دستگاه

^۱ Immunoglobulin A

۲ | مواد و روش‌ها

۲-۱ | بررسی بیوانفورماتیکی و بازیابی توالی ژن *SlyB*

سویه *Enterotoxigenic E. coli* برای جداسازی ژن *SlyB* و انجام آزمون چالش از پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک تهیه گردید. برای بازیابی توالی ژن، توالی پروتئینی *SlyB* از پایگاه داده‌های پروتئینی UniProt و توالی نوکلئوتیدی این ژن از پایگاه داده GeneBank و Gene برای یافتن ناحیه محافظت‌شده ژن، آنالیز BLASTn انجام شد و پس از تعیین ناحیه سیگنال پپتید که در توالی زنجیره اصلی پروتئین بالغ حضور ندارد، توالی مناسب برای طراحی پرایمر انتخاب شد.

۲-۲ | بهینه‌سازی واکنش PCR برای تکثیر ژن *SlyB*

برای انجام مراحل مختلف تکثیر و یا تأییدهای مولکولی بر مبنای PCR و تعیین توالی، پرایمرهای اختصاصی *SlyB-F* و *SlyB-R* برای ژن *SlyB* طراحی شد و آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *HindIII* به ترتیب در پرایمرهای رفت:

SlyB-F: ACTAGAGAATCTGTGTTAATAACGACACCCTGTCAG

و برگشت:

SlyB-R: ATATATAAGCTTGCGCGGAGAAACGGTTCAC

در نظر گرفته شد. ویژگی‌ها و ساختارهای ثانویه احتمالی پرایمرها با کمک نرم‌افزار Oligo7 بررسی شد و بهترین ترادفها سفارش داده شدند. در نهایت واکنش PCR در ۳۰ چرخه با دمای اتصال پرایمرها (۶۳/۹ درجه) صورت گرفت.

۲-۳ | همسانه‌سازی ژن *SlyB* درون pET28a و بررسی

صحت همسانه‌سازی

استخراج پلاسمید با استفاده از کیت شرکت Genet Bio کشور کره براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید بیانی pET28a توسط آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *HindIII* انجام گرفت. قطعه‌های *SlyB* و پلاسمید خطی شده pET28a پس از برش از روی ژل، با استفاده از کیت خالص‌سازی شرکت GenetBio محصول PCR خالص شدند. برای وارد کردن ژن *SlyB* به درون پلاسمید بیانی pET28a، قطعه‌های حاصل از هضم آنزیمی، در واکنش

گوارش^۱ (GALT) حضور دارند. IgA ترشحی در برابر پروتئاز باکتری مقاوم بوده و سبب ممانعت از اتصال پاتوژن به سلول اپی‌تلیال می‌شود (۱۰). باوجود این واکنش‌های حاوی پروتئین باید بتوانند در برابر شرایط اسیدی معده و محیط روده مقاومت کنند و تخریب نشوند. در این راستا به‌منظور افزایش دسترسی زیستی آن‌ها استفاده از حاملین کلونیدی پیشنهاد شده است. کیتوزان از جمله حامل‌هایی است که می‌تواند آنتی‌ژن‌ها را به هنگام تجویز مخاطی در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک محافظت کند. کیتوزان نانوپلیمری است که با خاصیت آدجوانت ذاتی و طبیعی خود قادر به تحریک سایتوکاین‌هاست. این ترکیب با داشتن ویژگی‌هایی مانند زیست‌تخریب‌پذیری، سازگاری زیستی و سادگی تهیه آن برای مسیرهای خوراکی واکنش‌ها مطرح است (۸). در پژوهش‌ها افزایش سطح آنتی‌بادی IgG در سرم و آنتی‌بادی IgA مخاطی در پاسخ به آنتی‌ژن‌های نوترکیب و کمپلکس‌شده با کیتوزان مشاهده شده است. با مخلوط نانواکسن‌های ضد میکروبی و بهره‌گیری از سیستم ایمنی بدن میزبان می‌توان مقابله مؤثرتری در برابر عفونت‌های ناشی از باکتری/شریشیا کلی داشت.

مقاله‌ای در سال ۲۰۲۴ با عنوان «طراحی و تهیه نانوذرات کیتوزان-آلژینات حاوی BSA و مطالعه انتشار آن در شرایط *in-vitro*» به بررسی نانوذرات کیتوزان-آلژینات به‌عنوان حامل‌های دارورسانی پرداخت. این پژوهش نشان داد که نانوذرات بیان‌شده به‌دلیل ویژگی‌های خاص خود، در سیستم‌های واکنش و دارورسانی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۱). در سال ۲۰۲۳ طی یک مطالعه علمی روش‌های مختلف تخلیص پروتئین‌های نوترکیب مقایسه و اهمیت بهینه‌سازی شرایط تخلیص برای حفظ فعالیت بیولوژیکی پروتئین بررسی شد (۱۲).

در این پژوهش پروتئین نوترکیب *SlyB* در نانوذرات کیتوزان کپسوله شده تا توانایی تحریک سیستم‌ایمنی آن افزایش یابد و ایمنی‌زایی آن در جاندار مدل مورد بررسی قرار گیرد.

¹ Gut-Associated Lymphoid Tissue

تعیین حلالیت پروتئین بیان شده در سلول (به شکل محلول سیتوزولی و یا اجسام انکلوژیونی)، با شکستن سلول ها و جداسازی فاز محلول و نامحلول مشخص شد. به منظور تخریب دیواره سلولی روش های شیمیایی (بافر لیزکننده)، مکانیکی (سونیکاسیون) و آنزیمی (لیزوزیم) اعمال شد. برای بررسی جایگاه پروتئین نوترکیب، از فاز محلول و نامحلول نمونه برداری ۵۰ میکرولیتری انجام شد و پس از افزودن بافر نمونه و جوشاندن به مدت ۱۰ دقیقه به همراه نشانگر پروتئینی روی ژل SDS-PAGE (10%) الکتروفورز گردید.

۲-۵ | تخلص و تأیید پروتئین نوترکیب

تخلص پروتئین نوترکیب به وسیله ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده (Qiagen, German) انجام گرفت. برای انجام وسترن بلاتینگ نمونه های پروتئینی بعد از بیان و نمونه شاهد (بدون القا) با استفاده از دستگاه الکتروفورز Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, USA) بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. انتقال پروتئین ها به غشا با استفاده از سیستم Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA) انجام شد. جهت انجام این تکنیک از آنتی بادی در مقابل دنباله هیستیدینی متصل به (Anti His tag HRP-conjugate HRP) با رقت (۱:۲۰۰۰) شرکت سیگما استفاده شد.

۲-۶ | دیالیز پروتئین تخلص شده و تعیین غلظت آن

جهت حذف اوره از نمونه ها، روش دیالیز با استفاده از PBS انجام شد. پس از تخلص پروتئین های جمع آوری شده درون کیسه دیالیز با منافذ ۱۲ کیلودالتون (سیگما D6191) قرار گرفت. سپس کیسه دیالیز حاوی پروتئین نوترکیب به مدت ۱۸ ساعت در بشر حاوی محلول PBS IX قرار داده شد. بشر حاوی PBS و کیسه های دیالیز محتوی نمونه ها، روی هم زن مغناطیسی قرار گرفتند و با استفاده از مگنت یکنواخت گردیدند. این عمل در تمام مدت ۱۸ ساعت درون سردخانه انجام شد.

برای تعیین غلظت پروتئین تخلص شده از روش برادفورد استفاده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد، ابتدا از غلظت های

اتصال آنزیمی به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا توسط آنزیم *T4/ligase* به یکدیگر ملحق شوند. برای آماده سازی سلول های مستعد *E. coli* BL21 (DE3) از روش استاندارد بافر TFB استفاده گردید. همچنین روش شوک حرارتی برای انتقال pET28a-SlyB به درون سلول مستعد شده *E. coli* BL21 (DE3) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی صحت همسانه سازی بر روی کلونی های حاصل از فرایند ترانسفورماسیون واکنش کلونی PCR با استفاده از جفت پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator انجام شد. یکی از کلونی هایی که حضور ژن *SlyB* در آن تأیید شد، با هضم آنزیمی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۴ | آماده سازی وکتور بیانی و بیان پروتئین نوترکیب

در *E. coli* BL21 (DE3)

کلونی های تأیید شده مثبت در مرحله قبل برای بیان پروتئین مورد استفاده قرار گرفتند. به این منظور، مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت شبانه کلونی مثبت به ۵ میلی لیتر محیط LB تازه دارای ۵۰ µg/mL کانامایسین اضافه شدند. پس از رسیدن جذب نوری به محدوده ۰/۸-۰/۶ (حاصل کدورت رشد باکتری) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، IPTG با غلظت نهایی ۱ mM در شرایط استریل به محیط های کشت اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ rpm در شیکر انکوباتور گرماگذاری شدند و در زمان های متفاوت پس از القای نمونه برداری انجام شدند. محیط شاهد نیز بدون افزودن IPTG طبق شرایط بالا تهیه گردیدند. پس از اتمام زمان بالا مقدار ۱/۵ میلی لیتر از هر کدام از لوله های کشت تست و شاهد مربوط به هر کلونی درون میکروتیوب ریخته شدند و سلول های باکتری به کمک سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه جمع آوری شدند. این سلول ها پس از تیمار کردن از لحاظ بیان ژن با استفاده از SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۴-۱ | تعیین حلالیت پروتئین نوترکیب تولید شده

در میزبان بیانی

مختلف و معلوم محلول حاوی پروتئین BSA استفاده شد که جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد و سپس با نرم‌افزار Microsoft Excel منحنی استاندارد رسم شد و به منظور محاسبه میزان پروتئین در نمونه‌های مجهول مورد استفاده قرار گرفت.

۷-۲ | ساخت نانوذرات کیتوزان حاوی پروتئین SlyB

برای ساخت نانوذرات، مقدار ۷/۵ میلی لیتر محلول کیتوزان (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) در یک بشر کوچک بر روی استیر قرار گرفت و پروتئین نوترکیب تخلیص شده SlyB طی مدت زمان ۱۰ دقیقه به صورت قطره قطره به کیتوزان در حال چرخیدن اضافه شد. سپس ۱۵ دقیقه بر روی استیر قرار گرفت تا کاملاً مخلوط شود، آن‌گاه pH آن‌ها با استفاده از محلول NaOH به ۵/۵ رسید. سپس مقدار ۵ میلی لیتر محلول TPP (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به صورت قطره قطره به هریک از محلول حاوی کیتوزان و پروتئین نوترکیب در حال هم‌زدن افزوده شد. برای این منظور هر یک میلی لیتر TPP در مدت زمان ۲ دقیقه افزوده شد. سپس سونیکاسیون در یک چرخه ۲۰ ثانیه‌ای در حمام اولتراسونیک انجام شد. همچنین برای

تهیه نمونه کنترل در مرحله افزودن پروتئین نوترکیب به جای پروتئین محلول PBS هم حجم پروتئین به کیتوزان افزوده شد. در انتها محلول‌ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. رسوب که حاوی نانوذرات است از محلول رویی جدا شد. محلول رویی که حاوی پروتئین‌هایی است که وارد نانوذره نشده‌اند برای اندازه‌گیری میزان بارگذاری پروتئین استفاده شد.

۷-۲-۱ | بررسی خصوصیات نانوذرات حاوی پروتئین SlyB

پس از سانتریفوژ محلول‌های کلئیدی حاوی پروتئین نوترکیب SlyB، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی جدا شد تا غلظت پروتئین‌های نوترکیب مورد نظر در آن با روش برادفورد مورد سنجش قرار گیرد. براساس فرمول زیر درصد بارگذاری آنتی‌ژن‌ها در نانوذرات کیتوزان محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{مقدار پروتئین موجود در محلول رویی (میکروگرم)} - \text{کل مقدار پروتئین (میکروگرم)}}{\text{کل مقدار پروتئین (میکروگرم)}} = \text{درصد بارگذاری پروتئین در نانوذره}$$

اندازه نانوذرات‌ها در دانشگاه بقیه الله توسط دستگاه زتاسایزر مالورن^۱ ساخت انگلستان بررسی شد. برای تعیین میزان رهائش آنتی‌ژن از نانوذرات کیتوزان از روش برادفورد برای غلظت‌سنجی پروتئین‌های آزاد شده استفاده شد. بدین منظور رسوب نانوذرات کلئیدی حاوی آنتی‌ژن SlyB در محلول PBS به صورت سوسپانسیون درآمد. سپس در شیکر

انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. نمونه‌برداری از مایع رویی نمونه‌ها در فواصل زمانی ۰، ۳، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت انجام و برای غلظت‌سنجی پروتئین آزاد شده از نانوذرات کیتوزان از روش برادفورد در محیط استفاده شد.

^۱ Malvern Zeta Sizer

حلقه‌هایی با طول تقریبی ۲ سانتی‌متر ایجاد شد. مخلوط کشت شبانه باکتری ETEC (LT^+) و سرم گروه‌های ایمن شده به حلقه‌های جداگانه تزریق گردید. برای کنترل منفی، به یکی از حلقه‌ها PBS تزریق شد. برای کنترل مثبت تست نیز باکتری به‌تنهایی و بدون مجاورت با سرم به حلقه تزریق شد. ۱۸ ساعت بعد این خرگوش جراحی شده و میزان تجمع مایعات در هر حلقه اندازه‌گیری شد.

۲-۱۰ | آنالیز آماری

در تمامی آزمایش‌ها که نیاز به بررسی‌های آماری داشت از نرم‌افزار SPSS با سطح معناداری $p < 0.05$ و ورژن ۲۷ سال ۲۰۱۹ و جهت رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

۳ | نتایج

۳-۱ | آنالیز بیوانفورماتیکی توالی ژن *SlyB*

درصد GC ژن *SlyB* معادل ۵۲ درصد و شاخص سازگاری کدونی (CAI) معادل ۰/۸ می‌باشد. شاخص توزیع کدون (CFD) نیز نشان می‌دهد که کدون‌های نادر که می‌توانند منجر به کاهش میزان بیان ژن شوند در ساختار کدونی این ژن وجود ندارند. *SlyB* لیپوپروتئینی است که ۱۵۵ اسیدآمینه دارد. تعداد ۱۷ اسیدآمینه انتهای آمینی پروتئین نقش سیگنال پپتید را دارند و ۱۳۸ اسیدآمینه در ساختار اصلی پروتئین قرار دارند.

۳-۲ | بهینه‌سازی واکنش PCR

برای تکثیر ژن *SlyB* از DNA ژنومی ETEC در واکنش PCR استفاده شد. بهترین دمای اتصال پرایمرها در دمای ۶۳/۹ درجه سانتی‌گراد حاصل شد که باند اختصاصی مربوط به *SlyB* (۴۶۸ جفت‌بازی) به‌خوبی تکثیر شده و باندهای غیراختصاصی که در دماهای دیگر مشاهده می‌شوند حذف شده است.

۳-۳ | بررسی صحت همسانه‌سازی ژن *SlyB* درون pET28a

برای تأیید ترانسفورماسیون سازه نوترکیب pET28a-SlyB درون میزبان بیانی، آزمون Colony-PCR انجام شد که نتیجه الکتروفورز محصول آن در شکل ۱ نشان داده شده

۲-۸ | ایمن‌سازی جاندار مدل و بررسی ایمنی‌زایی

جهت بررسی تعداد ۱۸ سر خرگوش ماده نیوزلندی با سن ۷ تا ۱۰ هفته‌ای از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه گردید و در ۶ گروه سه‌تایی تقسیم شدند. در تمامی گروه‌ها فاصله بین یک دوز تجویز پروتئین تا دوز بعدی ۱۴ روز بود. خون‌گیری از خرگوش‌ها یک‌بار در یک هفته بعد از تجویز دوز سوم و خون‌گیری دوم یک‌بار پس از تجویز چهارم انجام شد. گروه‌های ایمنی‌زایی و نحوه تزریق‌ها به‌شرح زیر است:

(۱) گروه تزریق پروتئین نوترکیب: در تزریق اول ۱۵۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب، همراه با آدجوانت کامل فروند (FCA) و در تزریق دوم تا چهارم ۱۵۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب با آدجوانت ناقص (FIA) مخلوط شده و به‌صورت زیرپوستی تزریق شد. (۲) گروه تزریقی نانوذره: در تمامی چهار دوز نانوذره کیتوزان حاوی ۱۵۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب به‌صورت زیرپوستی تزریق شد. (۳) گروه خوراکی نانوذره: چهار دوز نانوذره کیتوزان حاوی ۳۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب به‌صورت گاوژ دریافت کرد. (۴) گروه خوراکی-تزریقی نانوذره: سه دوز نانوذره حاوی ۳۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب را به‌صورت گاوژ و یک دوز تقویتی با مقدار ۵۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب به‌صورت زیرپوستی دریافت کرد. (۵) گروه کنترل تزریقی: چهار دوز محلول PBS به‌صورت زیرپوستی دریافت کرد. (۶) گروه کنترل خوراکی: چهار دوز نانوذره فاقد پروتئین نوترکیب را به‌صورت گاوژ دریافت کرد. برای بررسی پاسخ‌های ایمنی در جانداران واکسینه از روش الایزای غیرمستقیم جهت تعیین میزان آنتی‌بادی‌های IgG و IgA در سرم و مدفوع استفاده شد.

۲-۹ | بررسی چالش خنثی‌سازی توکسین توسط آزمون

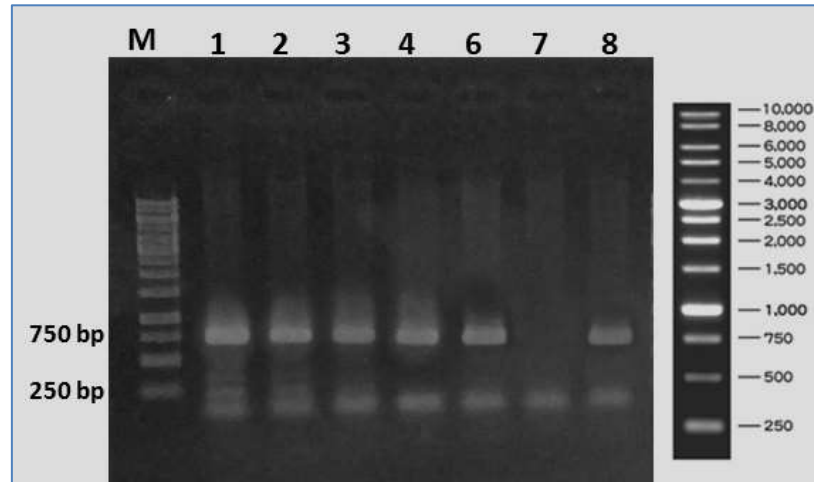
روده بسته خرگوش^۱

برای ارزیابی توان خنثی‌سازی سرم جانداران ایمن شده از آزمون روده بسته خرگوش استفاده شد. بدین منظور خرگوش‌های موردنظر به‌مدت ۲۴ ساعت گرسنگی داده شدند. سپس از طریق عمل جراحی در قسمت ایلئوم روده

^۱ Rabbit Ileal Loop Assay

باند در محدوده ۷۵۰ جفت‌باز ملاحظه می‌شود، مربوط به کلونی‌هایی است که سازه نوترکیب pET28a-SlyB به آن‌ها ترانسفورم (منتقل) شده است.

است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در برخی از کلونی‌ها باندی در محدوده ۷۵۰ جفت‌بازی دیده شده که شامل ۴۶۸ جفت‌باز ژن *SlyB* و بخشی از بدنه وکتور است که توسط پرایمرها تکثیر شده است. از این‌رو چاهک‌هایی که در آن‌ها

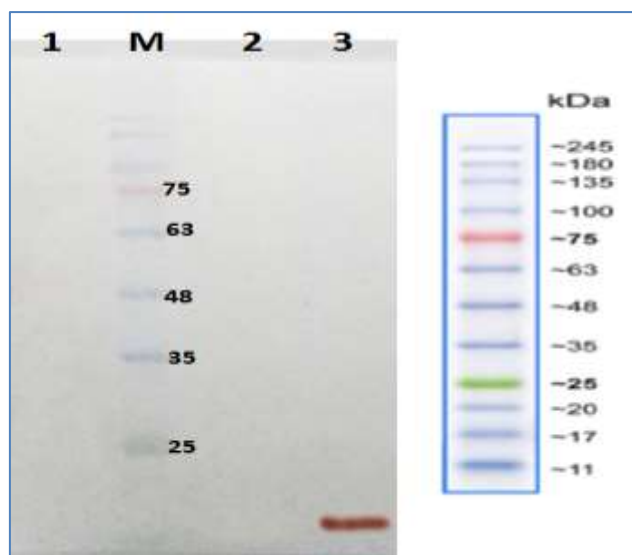


شکل ۱- تأیید انتقال سازه pET28a-SlyB به میزبان بیانی با آزمون PCR با پرایمرهای T7 پروموتور و T7 ترمیناتور. چاهک ۱ تا ۶: کلنی‌های مختلف حاصل از انتقال سازه ژنی، چاهک ۷: کنترل منفی (فاقد DNA الگو)، چاهک ۸: کنترل مثبت با پلاسمید pET28a-SlyB به عنوان الگوی DNA واکنش، چاهک M: نشانگر وزن مولکولی DNA

پروتئین نوترکیب *SlyB* فقط با استفاده از روش استخراج و تخلیص پروتئین به روش نامحلول تخلیص شده است و در روش استخراج پروتئین native (محلول)، باندی در مرحله الوشن مشاهده نشد. با توجه به قرار گرفتن His-Tag در ساختار پروتئین نوترکیب از آنتی‌بادی ضد آن برای شناسایی پروتئین تخلیص شده در وسترن‌بلاتینگ استفاده شد (شکل ۲). پس از انجام دیالیز روی پروتئین استخراجی، غلظت آن با روش برادفورد اندازه‌گیری شده و معادل ۳۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

۴-۳ بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب

القای بیان با IPTG یک میلی‌مولار و در سه کلنی مختلف *E. coli* BL21 (DE3) انجام شده و نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف پس از القا صورت گرفت. حضور باندی در محدوده تقریبی ۲۰ کیلودالتون روی ژل SDS-PAGE که در نمونه پیش از القا دیده نمی‌شود، تأییدکننده بیان پروتئین نوترکیب *SlyB* است. با توجه به شدت بلند، بهترین بیان در زمان ۱۶ ساعت پس از القا دیده می‌شود. همچنین مشخص شد بخش عمده پروتئین *SlyB* به صورت اینکلوزن بادی (ذرات نامحلول) بیان می‌شود.



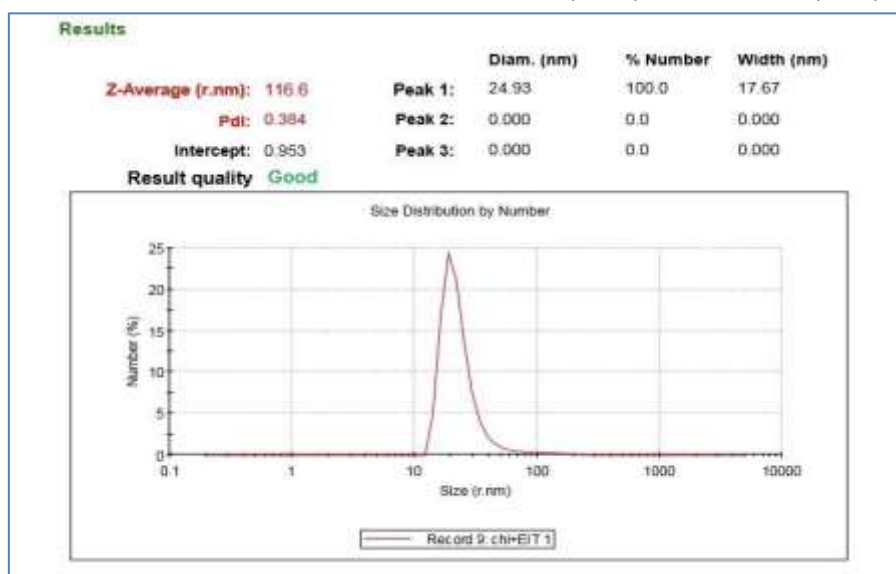
شکل ۲- نتیجه وسترن بلائینگ برای تأیید بیان پروتئین SlyB. چاهک ۱: نمونه استخراج پروتئین از باکتری نوترکیب قبل از القا، چاهک ۲: نمونه تخلیص پروتئین از باکتری به روش محلول، چاهک ۳: نمونه تخلیص پروتئین به روش نامحلول، چاهک M: نشانگر وزن مولکولی پروتئین، اعداد نشانگر وزن تقریبی پروتئین بر حسب کیلوالتون می باشد.

۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت انجام و از روش برادفورد برای غلظت سنجی پروتئین های آزاد شده استفاده شد. همان طور که در نمودار ۵ مشاهده می شود تا پایان روز پنجم (۱۲۰ ساعت) حدود ۷۶ درصد از SlyB در محیط بافری PBS آزاد شده است.

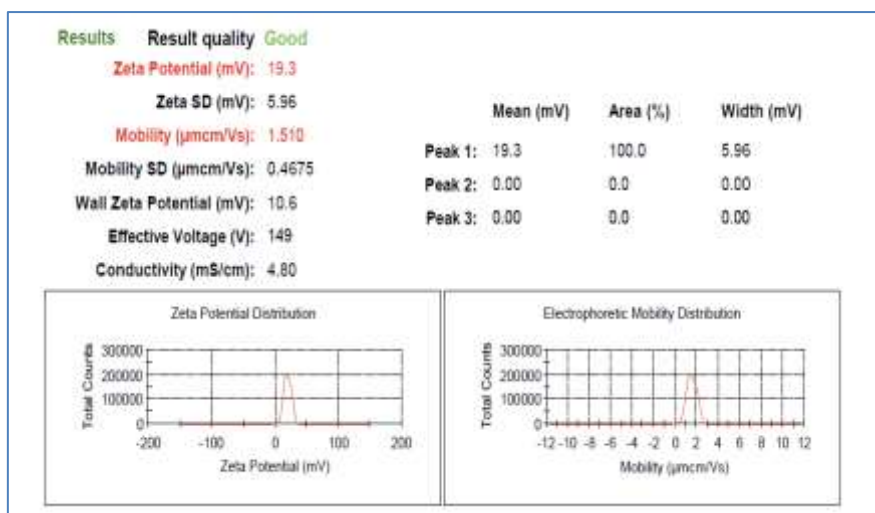
۳-۵ | تهیه نانوذره و برآورد بازده بارگذاری

نتایج محاسبه درصد بارگذاری آنتی ژن در نانوذرات نشان می دهد که ۸۸ درصد از پروتئین نوترکیب SlyB در نانوذرات کیتوزان وارد شده است. میانگین سایز نانوذرات حاوی SlyB معادل ۱۱۶/۶ نانومتر (نمودار ۳) و میانگین پتاسیل زتای آن ۱۹/۶ میلی ولت (نمودار ۴) به دست آمده است که در وضعیت مطلوبی قرار دارند.

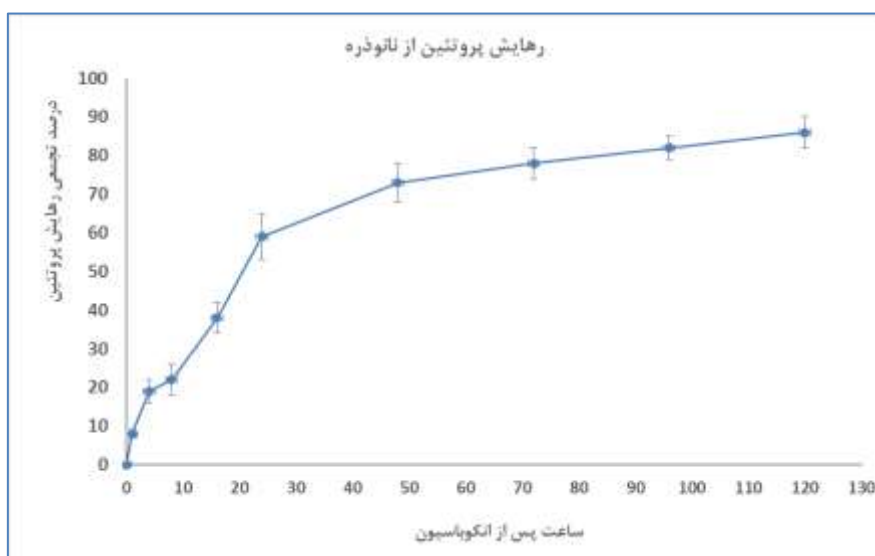
برای تعیین میزان رهایش آنتی ژن از نانوذرات کیتوزان، نمونه برداری از مایع رویی نمونه ها در فواصل زمانی ۰، ۳،



شکل ۳- نتایج اندازه نانوذرات کیتوزان انکپسوله شده با پروتئین نوترکیب SlyB.



شکل ۴- اندازه‌گیری پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان انکپسوله‌شده با SlyB.



شکل ۵- نمودار درصد رهایش SlyB از نانوذرات کیتوزان در بافر PBS.

۳-۶-۲ | بررسی خنثی سازی توکسین توسط آزمون روده بسته خرگوش

برای ارزیابی توان خنثی سازی سرم جانداران ایمن شده از آزمون روده بسته خرگوش استفاده شد. میزان تجمع مایعات در هر حلقه نسبت به طول حلقه اندازه گیری شد و به عنوان شاخص سمیت زایی گزارش گردید. نتایج این بررسی نشان داد در گروهی که ETEC با سرم حاصل از جانداران ایمن شده با نانوذره حاوی پروتئین نو ترکیب، به صورت خوراکی و تزریقی تیمار شده، کاهش تجمع مایعات معنی دار بوده ($p < 0.001$) و همچنین میزان این کاهش تجمع در گروهی که نانوذره حاوی پروتئین نو ترکیب را به صورت خوراکی دریافت کرده، نسبت به گروه نانوذره تزریقی چشمگیرتر بوده است. بنابراین آنتی بادی موجود در سرم ایمن توانایی خنثی سازی اثرهای توکسین LT را دارا بوده و روش خوراکی نانوذره برای این خنثی سازی به صورت مؤثرتری عمل کرده است.

۴ | بحث

باکتری های بیماری زای روده ای مانند /شریشیا کلی آنتروتوکسیژنیک (ETEC) از عوامل عمده ایجاد بیماری اسهال هستند و یک برنامه واکسیناسیون مناسب می تواند کاهش مرگ و میر ناشی از این بیماری را به دنبال داشته باشد (۲). در کشورهای در حال توسعه، این باکتری سالیانه باعث بروز ۲۸۰-۴۰۰ میلیون مورد اسهال در کودکان زیر ۵ سال و همچنین ۴۰۰-۸۰۰ هزار مورد مرگ می شود و مهم ترین عامل اسهال مسافران در افراد بازدید کننده از این مناطق به شمار می آید (۱۳). این باکتری ها از مکانیسم های پیچیده ای برای ایجاد بیماری استفاده می کنند. عمده این مکانیسم ها، شامل استفاده از چند پروتئین است که در زمان و مکان مختلف در سطح باکتری یا حتی در سطح سلول میزبان قرار می گیرند. مشخص شده است که یک بار ابتلا به این عفونت ها در بدن فرد ایجاد مصونیت می کند (۱۴) و واکسیناسیون نقش قابل توجهی برای ایمنی و پیشگیری از این عفونت ها دارد (۱۵).

پاسخ های ایمنی می تواند به واسطه بهینه سازی سیستم های تحویل آنتی ژن و هدف گیری سلول های خاص

۳-۶-۱ | ارزیابی ایمنی زایی

۳-۶-۱ | تیتراسیون IgG سرمی و IgA ترشحی در خرگوش های ایمن شده

تیتراسیون IgG و IgA در خرگوش های ایمن شده با پروتئین SlyB مشخص کرد که این پروتئین منجر به تحریک سیستم ایمنی در تجویز تزریقی و خوراکی پروتئین شده است. تیتراژ آنتی بادی در خرگوش های ایمن شده با SlyB پس از تزریق چهارم (خون گیری دوم) و نیز پس از تزریق سوم (خون گیری اول) به صورت مشخص نسبت به نمونه کنترل بالا رفته است. همچنین افزایش تیتراژ آنتی بادی پس از تزریق دوم نسبت به تزریق اول جالب توجه بوده است. به نحوی که تیتراژ پایانی پس از تزریق دوم معادل رقت یک به ۱۰۰ هزار سرم است در حالی که در تزریق اول این مقدار معادل یک به ۳۰ هزار می باشد. تیتراسیون میزان IgG در گروه خرگوشی که پروتئین نو ترکیب را به صورت نانوذره دریافت کرده، مشابه گروهی است که تزریق پروتئین همراه با آدجوانت انجام شده است. در گروه تزریقی نانوذره میزان آنتی بادی در مقابل SlyB پس از تزریق سوم و چهارم نسبت به گروه تزریقی پروتئین و آدجوانت، افزایش قابل توجهی نشان داده است. تیتراژ پایانی پس از تزریق اول معادل رقت یک به ۴۰ هزار سرم و پس از تزریق دوم معادل رقت یک به ۱۰۰ هزار است. همچنین تیتراسیون IgG در گروه های خرگوشی که پروتئین را به صورت خوراکی از طریق نانوذره حاوی پروتئین دریافت کرده اند، نشان می دهد که تولید آنتی بادی IgG در مقابل پروتئین نو ترکیب انجام شده است. در روش خوراکی گروهی که یک دوز تقویتی را به صورت تزریق دریافت کرده، تیتراژ آنتی بادی بالاتری نسبت به گروهی دارد که هر چهار دوز را به صورت خوراکی داشته است، به نحوی که OD بیشینل در گروه خوراکی-تزریقی معادل ۰/۹ و در گروه خوراکی معادل ۰/۵ است. در خرگوش های ایمن شده به روش خوراکی، تیتراژ بالای از آنتی بادی IgA در مدفوع نشانگر تحریک مؤثر سطوح مخاطی بوده است.

سیستم ایمنی، اختصاصی شود. در واقع نوع آدجوانت به کار گرفته شده و مسیر پذیرش واکسن به میزان زیادی روی نوع و شدت پاسخ ایمنی ایجاد شده تأثیرگذار خواهد بود. مسیر عفونت زایی این عوامل باکتریایی از راه دهانی-مدفوعی می باشد، بنابراین راهکار مؤثر برای مقابله با آن‌ها القای تولید میزان بالایی از IgA ترشحاتی در سطوح مخاطی بوده و براین اساس واکسن خوراکی در کنترل این بیماری‌ها تأثیر بسزایی می تواند داشته باشد (۱۶).

سیستم ایمنی دستگاه گوارش که به صورت سازمان یافته در دیواره روده یافت می شود، پلاک‌های پی‌یر^۱ نام دارد که محلی برای شروع پاسخ‌های ایمنی در روده هستند. اولین قدم در ایجاد تحریک با یک آنتی ژن، به دام انداختن و عبور آن از میان سلول‌های اپیتلیال مخاط است. برای این منظور در پلاک پییر، سلول تخصص یافته M وجود دارد که اجازه انتقال آنتی ژن‌ها و پاتوژن‌ها را به بافت لنفاوی می دهد. آنتی ژن و میکروارگانیسم‌ها پس از انتقال، در اختیار سلول‌های پردازش و عرضه کننده آنتی ژن قرار گرفته و پس از آن پاسخ‌های ایمنی و تولید IgA آغاز می شود (۹).

ساخت واکسن‌های زیرواحدی و کپسوله کردن آن در نانوذرات کیتوزان باعث تحریک مؤثرتر سیستم ایمنی می شود. کیتوزان پلیمر طبیعی از D-گلوکزآمین و N-استیل D-گلوکزآمین بوده که در باکتری‌های گرم منفی، خاصیت ضدباکتری بیشتری از خود نشان داده است. این نانوذرات توسط سلول‌های M در پلاک پییر جذب شده و به دنبال آن پاسخ ایمنی مخاطی شروع می شود. همچنین کیتوزان به عنوان آدجوانت می تواند ایمنی سلولی را با تولید سایتوکاین و فعال کردن سلول‌های دندریتیک القا کند. از طرفی کیتوزان با خاصیت چسبندگی به مخاط^۲ زمان بیشتری در مکان جذب باقی می ماند و دارای قابلیت آزاد کردن کنترل شده ماده فعال است. همچنین ویژگی‌های دیگر کیتوزان که آن را کاندید مناسبی برای مسیرهای خوراکی واکسن‌ها کرده است، شامل

زیست تخریب پذیری، سازگاری زیستی، سادگی تهیه آن و توانایی ذاتی آدجوانت بودن آن است (۸، ۱۷ و ۱۸). AMP (پپتیدهای ضد میکروبی پستانداران) پپتیدهایی کاتیونی هستند که براساس ساختار و عملکرد خود به دو گروه Defensin و Cathelicidin تقسیم بندی می شوند. بار مثبت این ترکیب‌ها اتصال آن‌ها به غشای باکتری‌ها را پیش برده و با مختل کردن غشای خارجی به فضای پری پلاسمی باکتری دست می یابند. مطالعه‌ها نشان داده اند که موش‌های ترانسژنیک که این ترکیب‌های انسانی را بیان کرده اند، در برابر عفونت‌های سالمونلا مقاومت داشته اند. برای بقا در برابر فعالیت باکتری کشی AMP، باکتری باید حضور AMP را احساس کند و بیان ژنهای درگیر در مقاومت AMP را کنترل کند (۵). در خانواده آنتروباکتریاسه ژن‌های کنترل کننده مقاومت به AMP معمولاً تحت کنترل سیستم انتقال PhoPQ هستند. این سیستم انتقال سیگنال یک مکانیسم تنظیمی چندکاره است که در سازگاری باکتری در برابر استرس‌های محیطی نقش دارد (۶ و ۱۹). در آنتروباکتریاسه سه ژن *PhoQ*، *PhoP*، *SlyB* همیشه تحت کنترل این سیستم هستند. اعضای این خانواده برای تغییرهای پوشش سلول مورد نیاز هستند که مقاومت در برابر پپتیدهای ضد میکروبی و استرس‌های اکسیداتیو را بهبود می بخشد. این گونه تغییرها اغلب با تغییر نفوذپذیری غشای خارجی و افزایش مقاومت به پپتیدهای ضد میکروبی روی روند بیماری زایی اثر دارند. همچنین باکتری‌ها با سرکوب بیان AMP میزبان به صورت عمیق تر درون سلول‌های روده کوچک میزبان نفوذ می کنند. مطالعه‌ها نشان داده اند که بیان زیاد ژن *SlyB* که کدکننده یک لیپوپروتئین در غشای خارجی باکتری است، باعث مهار فعالیت پروتئین PhoP شده یعنی به صورت منفی فعالیت این پروتئین را تنظیم می کند. براین اساس با مهار فعالیت این سیستم انتقالی، میزبان می تواند مبارزه مؤثری در برابر باکتری مهاجم داشته باشد و توانایی باکتری برای مقاومت را کاهش داده و همچنین

² Mucoadhesive¹ Peyer's Patches

بارگیری ۹۱.۹۶ درصد بوده است (۲۴). در مطالعه نوروزی و همکاران (۲۰۱۸) که نانوذرات کیتوزان حاوی OMV را مورد بررسی قرار دادند، بازدهی بارگذاری ۹۰ درصد و اندازه نانوذرات هم ۵۳۲ نانومتر برآورد شده است (۲۵).

کیتوزان دارای قابلیت آزاد کردن کنترل شده ماده فعال است و پروفایل آزادسازی، این آزاد شدن آرام و کنترل شده را در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. همان‌طور که در پروفایل مشاهده می‌شود در ۲۴ ساعت نخست آزادسازی حدود ۶۰ درصد بوده و بعد از آن آزاد شدن آرام آن دیده می‌شود که سازگار با یافته‌های سایر محققان است (۸ و ۲۴). در این مطالعه برای ایمنی‌زایی خوراکی از روش گاوژ استفاده شد که با به‌کارگیری کیتوزان باعث افزایش حفاظت آنتی‌ژن در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک می‌شود. تیتراسیون IgG و IgA در خرگوش‌های ایمن شده با پروتئین SlyB نشان می‌دهد که این پروتئین توانسته در تجویز تزریقی و خوراکی سیستم ایمنی را تحریک کند. نتایج ایمنی‌زایی گروهی که به روش تزریقی به دو روش پروتئین به همراه آدجوانت و یا نانوذره حاوی پروتئین دریافت کرده‌اند، نشان می‌دهد از نظر تیتراژ پایانی پس از تزریق دوم در هر دو روش مقدار مشابهی به دست آمده است، هرچند در برخی از رت‌ها میزان OD492nm در گروهی که پروتئین را به صورت نانوذره دریافت کرده بالاتر از گروه تزریق با آدجوانت است. سرم خرگوش‌هایی که پروتئین را به صورت خوراکی از طریق نانوذره حاوی پروتئین دریافت کرده‌اند نیز حاوی تیتراژ قابل ملاحظه‌ای از آنتی‌بادی IgG در مقابل پروتئین نوترکیب بوده است. از لحاظ تولید آنتی‌بادی IgA مشخص شد که گروهی که نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب را به صورت خوراکی دریافت کرده‌اند بالاترین تیتراژ آنتی‌بادی IgA در سرم را نشان داده‌اند. همچنین این تیتراژ در گروه خوراکی نسبت به گروه خوراکی تزریقی تا رت‌های بیشتری ادامه یافته است. در ارتباط با تولید IgA مخاطی نیز گروه خوراکی به میزان قابل توجهی آنتی‌بادی IgA بیشتری نسبت به گروه خوراکی تزریقی در نمونه‌های مدفوع نشان داده است. بنابراین کپسوله کردن پروتئین نوترکیب در نانوذرات

فعالیت باکتری‌کشی AMP میزبان نیز می‌تواند به خوبی پیش رود. این روش Anti-virulence راه‌حل بالقوه‌ای برای روش درمانی با کاربرد آنتی‌بیوتیک‌های معمول و مشکل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها خواهد بود (۵، ۶ و ۲۰).

در این مطالعه ژن *SlyB* از باکتری ETEC را در حامل بیانی بیان کرده و پروتئین آن را بعد از تخلیص در نانوذرات کیتوزان کپسوله نموده تا ایمنی‌زایی آن در جاندار مدل مورد بررسی قرار گیرد. نتایج ایمنوبلاتینگ نشان‌دهنده باند ۲۰ کیلودالتونی برای پروتئین نوترکیب بیان شده است که نشان می‌دهد سنتز پروتئین در این سیستم بیانی به‌طور صحیح و از روی mRNA کامل صورت گرفته است. بعد از انجام دیالیز نیز غلظت پروتئین به میزان ۳۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد شد.

مطالعه‌ها مشخص کرده‌اند که غلظت یک تا سه میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان باعث شکل‌گیری مطلوب نانوذرات کیتوزان شده است (۸). نتایج مطالعه این پژوهش مشخص کرد که غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان و یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر TPP منجر به بالاترین بازدهی بارگیری و سرعت آزادسازی آرام می‌شود. هرچه درصد بازدهی کپسوله شدن پروتئین در نانوذرات بیشتر باشد، میزان پروتئین بیشتری در نانوذرات وجود دارد. بنابراین میزان واکسن بیشتری در دسترس سلول‌های هدف قرار می‌گیرد که به نوبه خود ایمنی‌زایی بهتری ایجاد می‌کند. نتایج درصد بارگذاری پروتئین در نانوذرات نشان می‌دهد که ۸۸ درصد از پروتئین نوترکیب *SlyB* در نانوذرات کیتوزان وارد شده است که سازگار با کار محققان دیگر بوده است (۲۱-۲۳).

همچنین میانگین سایز نانوذرات حاوی پروتئین *SlyB* معادل ۱۱۶/۶ نانومتر و میانگین پتاسیل زتای آن ۱۹/۶ میلی‌ولت به دست آمده است که در وضعیت بسیار مطلوبی قرار دارند. در مطالعه حسینی و همکاران (۲۰۱۹) پروتئین نوترکیب حاوی CfaB، ST، CfaE و LtB در نانوذرات کیتوزان بارگیری شدند، اندازه نانوذرات حاوی این پروتئین نوترکیب ۱۱۲ نانومتر و بازدهی بارگذاری ۹۸/۸ درصد تخمین زده شده است (۱۷). نظریان و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که پروتئین کایمیریک کپسوله شده در نانوذرات PLGA دارای میانگین اندازه ۲۵۲ و بازدهی

۵ | نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه تأییدکننده پتانسیل بالقوه نانوذرات کیتوزان حاوی پروتئین نوترکیب SlyB برای حفاظت در برابر عفونت ناشی از ETEC در جاندار مدل بوده است و بنابراین کپسوله کردن آنتی‌ژن‌ها در نانوذرات پیش‌برنده ایمنی مخاطی بوده و می‌تواند به‌عنوان یک روش واکسیناسیون برای خنثی کردن مؤثرتر عفونت ETEC به‌کار گرفته شود.

۶ | ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۷ | تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ورامین و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله به‌منظور حمایت‌های اجرایی و جمع‌آوری نمونه‌ها کمال تشکر و امتنان را دارند.

۸ | تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

۹ | سهم نویسندگان

سپیده کاظمی افرمجان مسئولیت نگارش اولیه متن، تدوین بخش‌های مختلف مقاله و پیگیری امور مرتبط با آماده‌سازی نسخه اولیه را برعهده داشت.

دکتر جعفر امانی به‌عنوان نویسنده مسئول در ایده‌پردازی، هدایت علمی پژوهش و تأیید نهایی محتوای علمی مشارکت داشته‌اند.

دکتر الهه تاج‌بخش در ویرایش محتوایی و اصلاح‌های نهایی متن نقش مؤثری ایفا نمودند.

دکتر شهره زارع کاریزی در تهیه، تنظیم و آماده‌سازی مقاله مشارکت داشته‌اند.

در نهایت نیز تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را تأیید می‌نمایند.

۱۰ | کد اخلاق

جهت بررسی تعداد ۱۸ سر خرگوش ماده نیوزلندی، از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کد اخلاق (IR.IAU.SHK.REC.1402.049) تهیه شده است.

کیتوزان توانسته به‌خوبی آنتی‌ژن را به محل مناسب در دستگاه گوارش برساند و از تخریب پروتئین آن جلوگیری کرده است. این نتایج هم‌راستا با کار محققان دیگر بوده است. بارگذاری فاکتور CFA/I، CS3 و CS6 درون PLGA و پردازش آن‌ها در پلاک پیر پاسخ ایمنی موضعی و سیستمی را تحریک می‌کند و همچنین تیتراژ آنتی‌بادی‌های IgG و IgA نیز به‌میزان قابل‌ملاحظه‌ای بالا بوده است (۲۴). نانوکپسول‌های کیتوزان حاوی آنتی‌ژن F4 از ETEC نیز با روش خوراکی توانسته ایمنی‌زایی قابل‌قبولی با تولید آنتی‌بادی در جاندار مدل ایجاد کند (۲۶). در بررسی ایمنی‌زایی نانوذرات کیتوزان حاوی OMV در مطالعه نوروزی مشخص شد که تیتراژ آنتی‌بادی IgA مدفوعی در گروهی که آنتی‌ژن را به‌صورت نانوکپسوله دریافت کرده بودند، به‌طور معناداری بالاتر بوده است (۲۵).

در اوایل دهه ۱۹۵۰ محققان متوجه شدند که تزریق آنتروتوکسین‌ها به قطعه‌های بسته روده (حلقه‌های بسته روده) در خرگوش و بعدها در حیواناتی مانند سگ و گوساله باعث تجمع مایعات می‌شود. در نتیجه آزمون روده بسته خرگوش برای شناسایی سم کلرا به‌کار گرفته می‌شد. بعد از آن به‌طور گسترده این آزمون برای شناسایی آنتروتوکسین‌ها به‌کار گرفته شد (۲۷). در آزمون روده بسته خرگوش با سرم جانداران ایمن‌شده، مشخص شد که سرم ایمن‌شده به‌میزان قابل‌توجهی توانسته میزان تجمع مایعات در حلقه‌ها را کاهش دهد و گروهی که نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب را به‌صورت خوراکی دریافت کرده‌اند، نسبت به گروه تزریقی نانوذرات و تزریق پروتئین همراه آدجوانت، تفاوت بسیار معناداری در کاهش تجمع مایعات در مقایسه با لوپ حاوی ETEC نشان داده و می‌توان گفت که تفاوتی با گروه کنترل نداشته است. بنابراین ایمنی‌زایی مخاطی برای خنثی کردن توکسین مؤثر بوده است. در مطالعه نوروزی این آزمون روی موش انجام شد و مشخص کرد که در لوپ‌های حاوی ETEC که با سرم موش ایمن‌شده با نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی‌ژن تیمار شده بود، تجمع مایعات مشاهده نشد درحالی‌که در گروه کنترل تجمع مایعات رخ داده است (۲۵).

| **Extended Abstract**

Comparison of Antibody Titers Against Outer Membrane Protein SlyB and Nano SlyB from Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Its Pure and Encapsulated Forms in a Model Organism|

Background and Aim: Gastrointestinal infectious diseases are a major global health concern, particularly in developing countries. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is a leading cause of acute diarrheal disease and associated mortality worldwide. Given the widespread prevalence and therapeutic limitations of this infection, the development of effective preventive strategies, such as vaccination, is essential. Previous studies have shown that primary infection with this bacterium can induce immunity against subsequent infections. This study aimed to design and evaluate SlyB protein-based vaccines that are resistant to the acidic conditions of the stomach and intestinal environment. To enhance bioavailability, colloidal nanocarriers (chitosan nanoparticles) were used.

Materials and Methods: The *SlyB* gene was isolated from ETEC, analyzed bioinformatically (BLASTn, SignalP, Oligo7, CAI, and GC content), cloned into the pET28a vector, and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant SlyB protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and encapsulated in chitosan nanoparticles using ionic gelation. Nanoparticle size (116.6 nm) and zeta potential (19.6 mV) were determined using a Malvern Zetasizer. New Zealand rabbits were immunized via injection, oral administration, or a combination of both routes with doses of 150–300 µg. Serum and mucosal IgG and IgA titers were measured by indirect ELISA, and LT toxin neutralization was evaluated using the rabbit ileal loop assay. Data were analyzed using SPSS software, with $p < 0.05$ considered statistically significant.

Results: The encapsulation efficiency was 88%. The nano-vaccine induced significantly stronger humoral and mucosal immune responses compared to the pure protein. In the challenge test, a significant reduction in fluid accumulation was observed in the nano-encapsulated groups ($p < 0.001$).

Conclusion: The results confirm the high potential of chitosan nanoparticles containing recombinant SlyB protein for eliciting protective immunity against ETEC infections in the model organism. Therefore, antigen encapsulation in nanoparticles can serve as an effective strategy for enhancing mucosal immunity and developing oral vaccines against ETEC.

| **Keywords**

ETEC, SlyB, Recombinant Protein, Chitosan Nanoparticles, Nano-Vaccine, Mucosal Immunity.

| منابع

1. Concha C, Cañas R, Macuer J, Torres MJ, Herrada AA, Jamett F, et al. Disease prevention: an opportunity to expand edible plant-based vaccines? *Vaccines*. MDPI; 2017;5(2):14.
2. Leitner DR, Lichtenegger S, Temel P, Zingl FG, Ratzberger D, Roier S, et al. A combined vaccine approach against *Vibrio cholerae* and ETEC based on outer membrane vesicles. *Front Microbiol*. Frontiers Media SA; 2015;6:823.
3. Rappelli P, Folgosa E, Solinas ML, DaCosta JL, Pisanu C, Sidat M, et al. Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK; 2005;43(1):67–72.
4. Eguchi Y, Itou J, Yamane M, Demizu R, Yamato F, Okada A, et al. B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(47):18712–7. DOI: 10.1073/pnas.0705768104
5. Gruenheid S, Le Moual H. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK; 2012;330(2):81–9.
6. Kravchenko U, Gogoleva N, Kalubaka N, Kruk A, Diubo Y, Gogolev Y, et al. The PhoPQ two-component system is the major regulator of cell surface properties, stress responses and plant-derived substrate utilisation during development of *Pectobacterium* versatile-host plant pathosystems. *Front Microbiol*. Frontiers Media SA; 2021; 11:621391.
7. Jafari F, Hamidian M, Rezadehbashi M, Doyle M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Derakhshan F, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Med*. 2009;20(3):e56-62. DOI: 10.1155/2009/341275
8. Mirtajaddini SA, Najafi MF, Yazdi SAV, Oskuee RK. Preparation of chitosan nanoparticles as a capable carrier for antigen delivery and antibody production. *Iran J Biotechnol*. 2021;19(4):e2871.
9. McGhee JR, Fujihashi K. Inside the mucosal immune system. Public Library of Science San Francisco, USA; 2012 [cited 2026 July 18]; Available from: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1001397>
10. Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res*. 2017;4(1):14. DOI:10.1186/s40779-017-0122-9
11. Kashani Javid N, Mohammadpour N, Arbabi Bidgoli S. Design and preparation of Chitosan/Alginate nanoparticles containing BSA and In-vitro release study. *Med Sci J Islam Azad University-Tehran Med Branch. Medical Science Journal of Islamic Azad University-Tehran Medical Branch*; 2024;34(3):227–36.
12. Malekzadeh P, Hosseini SH, Jalousian F, Akrami M, Nia NA. A Comparison Survey on Native and Denaturation Conditions for Solubilization and Purification of *Toxocara canis* C-type Lectin Recombinant Protein. *J Vet Res-Tahqīqāt- Dāmpizishkī Univ [Internet]*. 2023 [cited 2026 July 18];78(3). Available from: <https://www.sid.ir/fileservers/jf/76279374-fa-1130754.pdf>
13. Turner AK, Stephens JC, Beavis JC, Greenwood J, Gewert C, Randall R, et al. Generation and characterization of a live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* combination vaccine expressing six colonization factors and heat-labile toxin subunit B. *Clin Vaccine Immunol*. American Society for Microbiology 1752 N St., NW, Washington, DC; 2011;18(12):2128–35.
14. Sizemore DR, Roland KL, Ryan US. Enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors and vaccine approaches. *Expert Rev*

- Vaccines. 2004;3(5):585–95. DOI: 10.1586/14760584.3.5.585
15. Dziva F. Options for the control of enterhaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. Microbiology [Internet]. [cited 2026 July 18]; Available from: https://www.academia.edu/download/51876619/Options_for_the_control_of_enterhaemorrh20170220-9436-wively.pdf
16. Takahashi I, Nochi T, Yuki Y, Kiyono H. New horizon of mucosal immunity and vaccines. Curr Opin Immunol. Elsevier; 2009;21(3):352–8.
17. Hosseini ZS, Amani J, Hosseini F. Expression of the Recombinant Protein Containing CfaB, ST, CfaE, and LtB from Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Loading It in Chitosan Nanoparticles. Pathobiol Reserach. Tarbiat Modares University; 2019;22(2):69–75.
18. Mohammed MA, Syeda JT, Wasan KM, Wasan EK. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. Pharmaceutics. MDPI; 2017;9(4):53.
19. Lu H-F, Wu B-K, Huang Y-W, Lee M-Z, Li M-F, Ho H-J, et al. PhoPQ two-component regulatory system plays a global regulatory role in antibiotic susceptibility, physiology, stress adaptation, and virulence in *Stenotrophomonas maltophilia*. BMC Microbiol. 2020;20(1): 312. DOI: 10.1186/s12866-020-01989-z
20. Perez JC, Shin D, Zwir I, Latifi T, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution of a bacterial regulon controlling virulence and Mg²⁺ homeostasis. PLoS Genet. Public Library of Science San Francisco, USA; 2009;5(3): e1000428.
21. Almasian P, Amani J, Arani FB, Nazarian S, Kazemi R, Tabrizi NM. Preparation of chitosan nanoparticle containing recombinant StxB antigen of EHEC and evaluation its immunogenicity in BALB/c mice. Iran J Microbiol. 2018;10(6):361.
22. Badhana S, Garud N, Garud A. Colon specific drug delivery of mesalamine using eudragit S100-coated chitosan microspheres for the treatment of ulcerative colitis. Int Curr Pharm J. 2013;2(3):42–8.
23. Lee W-J, Cha S, Shin M, Jung M, Islam MA, Cho C, et al. Efficacy of thiolated eudragit microspheres as an oral vaccine delivery system to induce mucosal immunity against enterotoxigenic *Escherichia coli* in mice. Eur J Pharm Biopharm. Elsevier; 2012;81(1):43–8.
24. Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Microbiol Res. Elsevier; 2014;169(2–3):205–12.
25. Norouzi N, Gargari SLM, Nazarian S, Sarvary S, Adriani RR. Immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* outer membrane vesicles encapsulated in chitosan nanoparticles. Iran J Basic Med Sci. 2018;21(3):284.
26. Khan MS, Vishakante GD. Development and evaluation of porous chitosan nanoparticles for treatment of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. J Biomed Nanotechnol. American Scientific Publishers; 2013;9(1):107–14.
27. Duncan CL, Strong DH. Ileal Loop Fluid Accumulation and Production of Diarrhea in Rabbits by Cell-free Products of *Clostridium perfringens*. J Bacteriol. 1969;100(1):86–94. DOI: 10.1128/jb.100.1.86-94.1969