



Designing, cloning and expression of *ctxB–tcpA-c-cpe* gene in *E.coli* as a cholera vaccine candidate

Negar Souod¹, Mohammad Kargar², Mohammad Hossein Hoseini³, Mojtaba Jafarinia⁴

¹ Department of Genetics, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, I. R, Iran. ² Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, I.R, Iran. ³ Immunology Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran. ⁴ Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, I. R, Iran.

Abstract

Background & Objectives: TcpA protein and B subunit of cholera toxin are the most important virulence factors of *Vibrio cholorea*. In the current survey, we applied the C-terminal of *clostridium perferingenes* toxin as a delivery system to bind the CtxB-TcpA fusion as an antigen, cloning it in a prokaryote vector, evaluated the level of expression.

Materials & Methods: In experimental survey, the ability of a constructs based on CtxB-TcpA-C-CPE with complete protein sequences of each protein was studied. After amplification of *tcpA*, *ctxB*, and *c-cpe* genes using PCR, they were cloned in expression plasmids. For fusion protein, all of the three protein sequences were constructed with linker. After expression, the proteins were purified and then confirmed using immunoblot methods.

Results: This fusion protein consists of 484 amino acids. PCR amplification for the *c-cpe*, *tcpA* and *ctxB* genes amplified 381, 375 and 675 bp; respectively. The result of enzymatic restrictions and sequencing indicated the exact homology of the synthesized proteins and the others submitted in NCBI. According to the SDS-PAGE results, the TcpA, CtxB, and C-CPE proteins were 15, 25 and 25 kD respectively.

Conclusion: According to physicochemical results, this fusion protein may be suitable candidate as a vaccine, however; further experimental trials are needed to approve this conclusion.

Keywords: *Vibrio cholorea* vaccine, C terminal of *Clostridium perferingenes* toxin, *tcpA* gene, *ctxB* gene.

Received: 16 May 2020

Revised: 9 September 2020

Accepted: 16 October 2020

Correspondence to: Mohammad Kargar

Tel: +98 9173149203

E-mail: mkargar@jia.ac.ir

Journal of Microbial World 2021, 14(1): 6-20

DOI: 10.30495/jmw.2021.690430



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



طراحی، کلونینگ و بیان ژن *ctxB-tcpA-c-cpe* در اشریشیا کلی به عنوان کاندیدای واکسن وبا

نگار صعود^۱، محمد کارگر^{۲*}، محمد حسین حسینی^۳، مجتبی جعفری نیا^۴

^۱ گروه ژنتیک، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران. ^۲ گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. ^۳ گروه ایمونولوژی، موسسه واکسن و سرم سازی رازی شیراز، شیراز، ایران. ^۴ گروه زیست شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: پیلی و زیر واحد B توکسین مهمترین عوامل بیماری‌زایی ویبریو کلرا می‌باشند. در این پژوهش، از پایانه C توکسین کلاستریدیوم پرفرینجنس به عنوان یک سیستم تحویل استفاده گردید و با ایجاد کایمرای TcpA-CtxB پروتین حاصل در باکتری اشریشیا کلی بیان شد.

مواد و روش‌ها: به صورت تجربی، توانایی سازه دارای CtxB-TcpA-CPE در مقایسه با توالی‌های پروتینی کامل هر یک از پروتین‌های CtxB، TcpA و C-CPE مورد مطالعه قرار گرفت. تکثیر قطعات ژنی با استفاده از PCR و سپس کلون‌سازی در وکتورهای بیانی انجام شد. به منظور ساخت سازه، پروتین کایمرای هدف با استفاده از لینکر طراحی و به روش سنتتیک تولید شد. پس از تولید، پروتین‌ها تخلیص و سپس با روش ایمونوبلات مورد تایید قرار گرفتند.

یافته‌ها: پروتین کایمرای تولید شده ۴۸۴ اسیدامینه داشت. این تعداد آمینواسید می‌تواند نشان دهنده پایداری پروتین باشد. ژن *c-cpe*، ژن *tcpA* و ژن *ctxB* به ترتیب دارای اندازه‌های ۳۸۱،۳۷۵ و ۶۷۵ جفت باز بودند. نتایج هضم آنزیمی و تعیین توالی نشان دهنده همولوژی نوکلئوتیدی محصولات بدست آمده با توالی ژن‌های ثبت شده در NCBI بود. این ژن‌ها به طور موفقیت آمیزی در میزبان اشریشیا کلی وارد و اندازه باند پروتینی آن‌ها در SDS-PAGE به ترتیب، ۱۵، ۲۵، ۲۵ و ۵۲ کیلودالتون بود.

نتیجه‌گیری: براساس مطالعات فیزیکوشیمیایی صورت گرفته، به نظر می‌رسد که این پروتین نوترکیب کاندیدای خوبی برای بررسی به عنوان واکسن خوراکی ویبریو کلرا باشد که البته برای اثبات این فرضیه به انجام آزمون‌های چالشی و مطالعات تکمیلی بیشتری نیاز دارد.

واژگان کلیدی: واکسن ویبریو کلرا، پایانه C توکسین کلاستریدیوم پرفرینجنس، *ctxB*، *tcpA*.

پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۷/۲۵

ویرایش مقاله: ۱۳۹۹/۶/۱۹

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۲/۲۷

مقدمه

شدید متغیر است و پس از ۱۲ ساعت تا ۵ روز بعد از هضم غذا یا آب آلوده، شروع می‌شوند. این بیماری پس از گذراندن چندین پاندمی در سراسر دنیا و واکسن‌هایی که علیه آن ساخته شده، هنوز یکی از دلایل مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود (۱). بر اساس گزارشات سازمان

وبای یک بیماری عفونی است که توسط سویه‌های سمی باکتری ویبریو کلرا ایجاد می‌شود (۱). علائم بیماری از اسهال ملایم تا

* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، بخش میکروبیولوژی.

پست الکترونیک: mkargar@jia.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳



(CtxA) و زیر واحدهای هموپنتامر (CtxB) می‌باشد (۵). زیر واحد A بصورت پروتئولیتیکی برش خورده و دو زنجیره‌ی پلی پپتیدی به نام‌های A1 و A2 ایجاد می‌نماید (۸). بر اساس گزارشات، تمامی فعل و انفعالات بیولوژیکی بر عهده‌ی زیر واحد A1 کلراتوکسین می‌باشد (۹). بخش CtxB دارای ۵ قسمت است که توانایی اتصال به گانگلیوزید GM1 سلول‌های اپیتال بدن را دارند (۹). با وجود خواص ایمونولوژیک توکسین و با که بسیار مورد توجه محققین می‌باشد، سمیت آن موجب محدود شدن استفاده برای واکسیناسیون انسان شده است. با این وجود، به دلیل خاصیت غیر سمی زیر واحد B، استفاده از CtxB به طور وسیعی به عنوان ایمونوژن مخاطی در انسان مورد بررسی قرار گرفته است (۷).

کلاستریدیوم پرفرینجنس، یکی از پاتوژن‌های مهم انسانی و دامی است که بر اساس تولید ۴ توکسین کشنده‌ی بزرگ، ۵ تیپ از آن نامگذاری شده‌اند (۱۰). کلاستریدیوم پرفرینجنس تیپ A، ارگانسمی است که عامل بروز میونکروز، عفونت‌های زخمی خفیف‌تر و شکلی از مسمومیت غذایی ترجیحاً در انسان می‌باشد. بیشتر سوش‌های تیپ A حاوی ژن انترتوکسین CPE روی کروموزوم خود هستند (۱۱). CPE شامل ۳۱۹ اسید آمینه با توالی منحصر بفرد است. در واقع، CPE یک پروتین ۳ جزیی است که ۳۷ آمینو اسید ابتدایی برای خاصیت سمی بی اثر است. دومین قسمت، از توالی ۸۱ تا ۱۰۶ می‌باشد که به نظر می‌رسد در ایجاد ساقه‌ی بین غشایی نقش داشته باشد. سومین قسمت که در انتها واقع شده، در تشکیل سوراخ موثر است. طی ۲۰ سال اخیر ثابت شده که انتهای C سم کلاستریدیوم پرفرینجنس توانایی اتصال به رسپتور دارد این در حالی است که این قسمت خاصیت سمی ندارد (۱۰). CPE توانایی اتصال به انواع claudin، که در اتصالات محکم بین سلول‌های اپیتلیال وجود دارند، را دارا می‌باشد (۱۰). به محض اتصال C-CPE به کلادین، این کمپلکس توسط N ترمینال CPE پلی ریزه شده و در غشای اپیتلیال سوراخ ایجاد می‌کند که موجب تغییر نفوذپذیری غشا نسبت به یون Ca^{2+} و مایعات می‌شود و ایجاد اسهال می‌کند (۱۲). بسیاری از مطالعات ثابت کرده‌اند که

بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۱۹، این بیماری موجب مرگ سالانه ۲۱۰۰۰ تا ۱۴۳۰۰۰ نفر در جهان شده است (۲). با وجود تلاش‌هایی که برای درمان و با بوسیله‌ی تامین آب از دست رفته‌ی بدن و درمان آنتی‌بیوتیکی انجام می‌شود، این بیماری هنوز یک معضل سلامتی در جهان به ویژه در کشورهایی است که استانداردهای بهداشتی کمتر رعایت می‌شوند (۳).

با شیوع سویه‌های ویبریو کلرای مقاوم به آنتی‌بیوتیک و زیادتر شدن نواحی اندمیک این بیماری، یافتن واکسنی مناسب برای این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. در حال حاضر دو نوع واکسن برای این بیماری در انسان استفاده می‌شود: واکسن‌های کشته شده و واکسن‌های اصلاح ژنتیک شده و تخفیف حدت یافته. مهم‌ترین مشکل واکسن‌های کشته شده این است که ایمنی زایی پایینی دارند که باعث الزام در تجویز چندین دوز واکسن در افراد می‌گردد و متأسفانه کودکان ایمنی بالایی علیه این واکسن‌ها نشان نمی‌دادند (۴). از مشکلات واکسن‌های زیر واحدی می‌توان به عوارض جانبی آن‌ها نظیر اسهال خفیف و تب اشاره کرد (۱). بنابراین یک رویکرد جایگزین برای طراحی واکسن کلرا، تولید واکسن‌های جدید زیر واحدی می‌باشد (۴). ویبریو کلرا پس از خورده شدن توسط غذا یا آب آلوده، در روده مستقر می‌شود که این مسئولیت توسط Toxin regulated pilus (TCP) انجام می‌پذیرد. TCP یک همومر ۲۰/۵ کیلودالتونی است که پس از عفونت بیان می‌شود (۵). در واقع یک پیلی نوع چهار است که کلونی زایی و استقرار در روده را تسهیل می‌نماید (۶).

این پیلی برای اتصال و استقرار باکتری ضروری است. بنابراین باکتری می‌تواند در ناحیه‌ی اپیتلیال روده میکرو کلنی‌هایی را تشکیل دهد. TcpA به عنوان زیر واحد بزرگ پیلی باکتری محسوب می‌شود. با توجه به محل قرارگیری TcpA در سطح باکتری، این پروتین ۲۲ کیلودالتونی در دسترس سیستم ایمنی بوده و کاندیدای مناسبی برای توسعه‌ی ایمنی ضد استقرار باکتری محسوب می‌شود (۷).

پروتین کلرا توکسین، متشکل از زیرواحدهای هتروداایمر A

فیزیوشیمیایی آن توسط سایت <https://web.expasy.org/protparam/> بررسی شد. پس از اتمام مطالعات بیوانفورماتیکی توالی مذکور جهت سنتز به شرکت کانادایی Biomatik تحویل داده شد.

ب) طراحی پرایمر و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس: سه جفت پرایمر اختصاصی برای ژن‌های یادشده با استفاده از نرم افزار GeneRunner (version 6.5) طراحی شد. پرایمرها بر اساس وکتور بیانی pQE 30 دارای جایگاه‌های برش *SmaI* و *BamHI* بودند. دو سویه باکتریایی *V. cholerae* ATCC51394 و *C. perferingens* ATCC13124 در این مطالعه استفاده شدند.

جدول ۱: جزئیات مربوط به پرایمرها

شماره اکسیژن رفرانس	طول توالی‌ها	توالی‌ها	پرایمرها ژن
NC_007772.1	381bp	5'ATTATGGATCCGATATA GAAAAAGAAATCCTTG3'	<i>cpe</i> <i>cpe-F</i>
		5'TTCACCCGGGTTAAAAAT TTTGAAATAATATTG3'	<i>cpe-R</i>
NC_002505.1	375bp	5'ATTATGGATCCATTAAA TTAAAATTTGGTGT3'	<i>ctx</i> <i>ctx-F</i>
		5'TTCACCCGGGTTAATTT GCCATACTAATTGCGG3'	<i>ctx-R</i>
M33514.1	675bp	5'ATTATGGATCCATGCAA TTATTAACAGCT3'	<i>tcp</i> <i>tcp-F</i>
		5'TTCACCCGGGTTAGCTG TTACCAAATGCAACGCC3'	<i>tcp-R</i>

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در حجم نهایی ۲۵ ماکرولیتر شامل 50ng از DNA الگو (2µl)، 2 Mgcl₂ میلی مولار (1µl)، dNTP میکس ۰/۴ میلی مولار (1µl)، بافر X 10 PCR (2.5µl)، واحد Taq DNA Polymerase (Cinagen, Iran) (0.1µl) ۰/۵ and BiofluxBiotech, Japan) ۱ µM از هر پرایمر به علاوه‌ی ۱۶/۴ آب دیونیزه شده، انجام شد. PCR طبق سیکل دمایی، ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، و تکرار ۳۰ مرتبه‌ای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۶۶ درجه ۱/۵ دقیقه و نهایتاً ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه انجام شد. نهایتاً دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. محصولات PCR به دست آمده در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز، استخراج و رویت شد.

C-CPE به طور موثر آنتی‌ژن‌هایی را که به صورت ژنتیکی به آن متصل باشند را به مخاط اپیتلیوم تحویل می‌دهد و باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی مخاطی و سیستمی علیه آنتی‌ژن متصل شده می‌شوند (۱۱).

به طور کلی، ایمنی علیه ویبریوکلرا زمانی ایجاد می‌شود که محافظت علیه استقرار و سم آن به وجود آید. بنابراین، ایجاد یک واکسن زیرواحدی دارای توانایی‌های ویژگی‌های ضد توکسینی و ضد استقرار، ضروری به نظر می‌رسد.

علاوه براین، همراه شدن *CtxB* در کنار C-CPE به عنوان یک اجزای غشایی، توانایی برانگیختن پاسخ‌های مخاطی علیه آنتی‌ژن را دارد. بنابراین، یکی از راهبردهای بسیار مهم همراه کردن آنتی‌ژن با *CtxB* و C-CPE برای برانگیختن پاسخ‌های ایمنی مخاطی می‌باشد.

هدف از این پژوهش، طراحی و تولید یک فیوژن پروتین شامل *CtxB*، *TcpA* و C-CPE و بیان آن در میزبان پروکاریوت و تخلیص آن با روش‌های SDS-PAGE و Western blot می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) بررسی‌های بیوانفورماتیک: توالی آمینو اسیدی پروتین‌های *CtxB*، *TcpA* و C-CPE با استفاده از UniProtKB id: Ctx-B id: UniProtKB – P01556 (CHTB_VIBCH); *TcpA* id: UniProtKB – P23024 (TCPA_VIBCL); C-CPE id: UniProtKB – Q8XNF8 (Q8XNF8_CLOPE)) به دست آمد. این توالی‌ها برای ساخت فیوژن پروتین به کار رفت. در ساختار این فیوژن، پروتین *CtxB* در ابتدا قرار گرفت که به وسیله‌ی یک لینکر قابل انعطاف Gly-Pro به *TcpA* متصل شد. پس از یک لینکر Gly-Pro، پروتین C-CPE واقع شد. جهت بیان فیوژن، در میزبان اشریشیا کلی با استفاده از نرم افزار بهینه سازی JCat بیوانفورماتیک صورت گرفت و در انتها نیز عدم حضور جایگاه برش برای آنزیم‌های *BamHI* و *SmaI* به دو طرف قطعه طراحی شده اضافه شد. توالی نوکلئوتیدی حاصل با استفاده از برنامه <https://web.expasy.org/translate> ترجمه و مشخصات

باکتری نوترکیب بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین، گرماگذاری در ۳۷ درجه سلسیوس در طول شب شدند. در نهایت کلنی های مثبت شناسایی شده و پس از تخلیص پلاسمید، بوسیله *BamHI/SmaI* صحت آنها تایید گردید. سپس به وسیله روش Sanger سکانس انجام شد (Gene Fanavaran, IRAN).

ه) بیان پروتئین نوترکیب CtxB-TcpA-C-CPE: جهت بیان تک تک پروتئین ها و فیوژن آنها، از کلنی حاوی پلاسمید در محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کشت داده شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از باکتری به ۵۰ میلی لیتر از محیط LB برات اضافه و بر روی انکوباتور شیکردار و حرارت ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شده تا به OD ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسید. سپس ۵۰ میکرو لیتر IPTG را به محیط کشت اضافه کرده و تا ۶ ساعت OD آن مورد محاسبه قرار گرفت. پس از القا با شرایط یاد شده، سلول ها رسوب داده شد. پس از شکستن سلول ها با سونیکاسیون و رسوب اجزای سلولی، محلول رویی حاوی پروتئین مورد نظر جدا گردید.

برای جداسازی پروتئین دارای دنباله tag-His از ستون کروماتوگرافی نیکل (NTA-Ni) استفاده شد. در این مرحله از شیب غلظت اوره در pH 8 برای خالص سازی پروتئین ها استفاده گردید. در ادامه پروتئین خالص شده با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها

الف) پروتئین نوترکیب حاصل، پایدار است: با در نظر گرفتن لینکر و بنیان های توالی، کل فیوژن پروتئین حدود ۴۸۴ بنیان آمینو اسید داشت. بررسی ویژگی های فیزیکی شیمیایی نشان دادند که شاخص پایداری ۲۳/۴۰ بود که این فیوژن را یک پروتئین پایدار معرفی می کند. علاوه بر این، منفی بودن GRAVY برای پروتئین نشان دهنده ی آب دوست بودن و بالاترین میزان برهم کنش با آب بود. نتایج به اختصار در جدول ۲ نشان داده شده است.

ب) نتایج کلونینگ: تکثیر قطعات با واکنش زنجیره ای پلیمرز و

جزئیات مربوط به پرایمرها شامل سکانس، طول و شماره دسترسی (accession number) در جدول ۱ قابل رویت می باشد.

ج) T/A کلونینگ و ساخت پلاسمید های نوترکیب: در این مطالعه، از وکتور pGEM®-T Easy vector (Promega, USA) جهت T/A کلون استفاده شد. اتصال بین وکتور pGEM®-T خطی و ژن های *ctxB* و *tcpA* و *c-cpe* به صورت جداگانه به وسیله آنزیم DNA T4 لیگاز و در دمای اتاق انجام گرفت. در ادامه ۵ میکرو لیتر از محصول اتصال برای تراریخت کردن باکتری های مستعد DH5α به روش شوک حرارتی استفاده شد. مرحله کلون کردن به وسیله شوک حرارتی به این ترتیب بود: قرار دادن باکتری مستعد شده بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه، انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل این باکتری، قرار دادن باکتری DH5α حاوی وکتور بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه، شوک حرارتی در ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، اضافه کردن محیط کشت LB مایع به ویال حاوی باکتری به میزان 100 ul، شیک کردن به مدت یک ساعت، سپس کشت دادن باکتری نوترکیب بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین، گرماگذاری در ۳۷ درجه سلسیوس در طول شب. در نهایت تعداد ۵ عدد از کلنی ها انتخاب شدند و با استفاده از روش لیز قلیایی، پلاسمید این کلنی ها جهت تأیید کلونینگ استخراج شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمر طراحی شده و آنزیم Polymerase DNA Taq صورت گرفت و سپس محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. واکنش هضم آنزیمی نیز به صورت جداگانه بر روی پلاسمید استخراج شده و با استفاده از آنزیم های *BamHI* و *SmaI* نیز انجام شد. د) کلون کردن ژن های *ctxB*، *tcpA*، *c-cpe* در وکتور بیانی *pQE30*: پلاسمید های pGEM®-T Easy حاوی ژن های *ctxB*، *tcpA*، *c-cpe* و وکتور بیانی pQE30 به وسیله آنزیم های برش دهنده *SmaI* (Qiagen, Germany) و *BamHI* برش داده شدند و ژن های *ctxB* و *tcpA*، *c-cpe* با روش که اشاره شده به درون وکتور pQE30 متصل و نهایتاً وارد باکتری های مستعد *E. coli* DH5α گردیدند.

Upstream:

M13 Forward sequencing primer
 AAGGCGATTAAGTTGGGT **AACGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC** GTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATT
 GGGCCGACGTCGCATGCTCCCGCGCCATGGCGCGGGGAATTCGAT
 MSC ECoRI

A) *c-cpe* gene:

cpe-F Primer
 BamHI site
 ATTATGGATCCGATATAGAAAAAGAAATCCTTGATTAGCTGTCTGCTACAGAAAGATTAATTTAACTGATGCATAACTCAAATCCAGCTGGTAA
 TTTATATGATTGGCGTTCTTCTAACTCATACCCTGGACTCAAAAAGCTTAATTTACACTTAACAATTACAGCTACTGGACAAAAATATAGAATCTTAG
 CTAGCAAAATTGTTGATTTTAATATTATCAAATAATTTAATAATCTAGTAAAATTAGAACAGTCTTAGGTGATGGAGTAAAAGATCATTATGTT
 GATATAAGCTTAGATGCTGGACAATATGTTCTTGTAAATGAAAGCTAATTCATCATATAGTGGAAATTACCCCTATTCAATATTATTCAAAAAATTT
 TAA**CCCGGGTGAA**
 Stop codon SmaI site
 Complementary cpe-R Primer

B) *ctxB* gene:

ctx-F Primer
 BamHI site
 ATTATGGATCCATTAAATTAATAATTTGGTGT TTTTTTACAGTTTTACTATCTTCAGCATATGCACATGGAACACCTCAAAAATTACTGATTGTGTG
 CAGAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAACTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTT
 TAAGAATGGTGCAATTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAAAAAAGCGATTGAAAGGATGAAGGATACCCGTAGGAT
 TGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCAAAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAACGCCTCATGCGATTG**CCGCAATTAGTATGGCAAATTAACCCGGG**
 TGAA
 Complementary ctx-R Primer
 Stop codon SmaI site

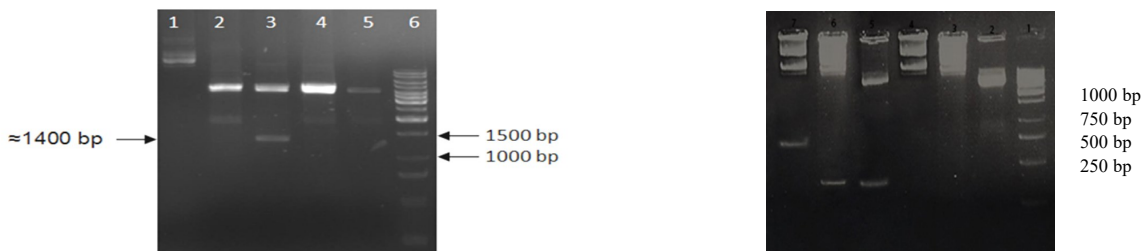
C) *tcpA* gene:

tcp-F Primer
 BamHI site
 ATTATGGATCCATGCAATTATTAACAACAGCTTTTTAAGAAGAATTTGTAAGAAGAACAACACGATAAGAAAACCGGTCAAGAGGGTATGACATTAC
 TCGAAGTGATCATCGTTCTAGGCATTATGGGGTGGTTTCGGCGGGGGTGTACTCTGGCGCAGCGTGGATTGATTTCGACAGATTATGACCAAGGC
 CGCGCAAAGTCTCAATAGTATCCAAGTTGCACTGACACAGACATACCGTGGTCTAGGTAATTTCCAGCAACAGCTGATGCGACAGCTGCTAGTAAG
 CTAATTCAGGCTGGTTAGTTTAGGTAATAATCATCCGATGAGGCAAAAAACCCATTCAATGGTACAAATATGAATATTTTTTCATTCCCGGTAA
 TGCAGCAGCTAATAAAGCATTTGCAATTCAGTGGATGGTCTGACACAGGCTCAATGCAAGACACTTATTACCAGTGTGCGGTATATGTTCCCATAT
 ATTGCAATCAAAGCTGGTGGCGCAGTAGCACTTGCAGATCTAGGTGATTTGAGAATTTCTGCAGCAGCGGCTGAGACAGGCGTTGGTGTGATCAAAT
 CTATCGCTCCCGCTAGTAAGAATTTAGATCTAACGAACATCACTACGTTGAGAAAATTATGTAAGGTAAGTCTCCATT**CCGGCGTTGCAATTGGTAA**
 AGCTAA**CCCGGGTGAA**
 Stop codon SmaI site
 Complementary tcp-R Primer

Downstream:

ECoRI MSC
 ATCACTAGTGAATTCGGCGCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATA GCTTGAGTATTCTATAGTGCACCTAAA
 TAGCTTGGCGTAATCATG**GTCA**TAGCTGTTTCTCTGTGTGA AATTGTTATCCGCTCAAAAT
 M13 Reverse sequencing primer binding site

شکل ۳: توالی یابی محصولات PCR ژنهای *c-cpe*، *tcpA* و *ctxB* بوسیلهی پرایمرهای M13F و M13R. پرایمرهای اختصاصی، جایگاههای برش و کدونهای خاتمه در شکل نشان داده شدهاند.



شکل ۴: تایید ورود ژنهای *c-cpe*، *tcpA* و *ctxB* به پلاسمیدهای بیانی pQE30 بوسیلهی برش با آنزیمهای برش دهندهی *SmaI* و *BamHI*. A: ۱- نشانگر؛ ۲- پلاسمید برش نخوردهی pQE30 حاوی ژن *tcpA*؛ ۳- پلاسمید برش نخوردهی pQE30 حاوی ژن *ctxB*؛ پلاسمید برش نخوردهی pQE30 حاوی ژن *c-cpe*؛ ۴ و ۵ پلاسمیدهای حاوی ژن *c-cpe*؛ ۶ و ۷ پلاسمیدهای حاوی *tcpA* و *ctxB*. B) پلاسمید pQE30 برش نخورده، ۲، ۴ و ۵ پلاسمیدهای بدون قطعه ژن، ۳- پلاسمید نوترکیب حاوی *c-cpe-tcpA-ctxB*، ۶- سایز مارکر 100kb.

Upstream:

TCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAGGAGAAATTAAGCTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCAC
 ↓ RBS start codon ← 6xHix

Coding sequences

A) *c-pe* gene:

cpe-F Primer

BamHI site
 GGATCCGATATAGAAAAAGAAATCCTTGATTTAGCTGCTGCTACAGAAAGATTAATTTAACTGATGCATTAAGCTCAAATCCAGCTGGTAATTTATAT
 GATTGGCGTTCCTTAACCTCATACCTTGGACTCAAAGCTTAATTTACACTTAAACAATTACAGCTACTGGACAAAAATATAGAATCTTAGCTAGCAAAA
 TTGTTGATTTAAATATTTAATCAATAATTTTAAATAATCTAGTGAAATTAGAACAGTCTTAGGTGATGGAGTAAAGATCATTATGTTGATATAAGCTT
 AGATGCTGGACAATATGTTCTTGAATGAAAGCTAATTCATCATATAGTGAAATTACCTTATTCAATATTAATTTCAAAAATTTAAACCCGGG
 Complementary *cpe*-R Primer
 stop codon *Sma*I site

B) *ctxB* gene:

ctx-F Primer

BamHI site
 GGATCCATTAAATTAATTTGGTGTTTTTTTACAGTTTTACTATCTTCAGCATATGCACATGGAACACCTCAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATA
 CCACAACACACAAATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAAGAAATGG
 TGCAATTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAAAAAAGCGATTGAAAGGATGAAGGATACCTGAGGATTGCATATCTTAC
 TGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGTTGATGGAATAATAAACGCCCTCATGCGATTGCCGAATTAGTATGGCAAATGGACCCGGACCCCAATTATTA
 Complementary *ctx*-R Primer
 stop codon *Sma*I site

C) *tcpA* gene:

tcp-F Primer4

BamHI site
 GGATCCATGCAATTATTAACACAGCTTTTTAAGAAGAAATTTGTAAGAAGAAGAACACGATAAGAAAACCGGTCAAGAGGGTATGACATTACTCGAAGT
 GATCATCGTCTAGGCATTATGGGGTGGTTTCGGCGGGGGTGTACTCTGGCGCAGCGTGCATTGATTGCGAGATTATGACCAAGGCCGCGCAAAG
 TCTCAATAGTATCCAAGTGCAGTACACAGACATACCGTGGTCTAGGTAATTATCCAGCAACAGCTGATGCGACAGCTGCTAGTAAGCTAACTTCAGGCTTGGTTAGTTAGGTA
 AAAGCTAAAGTCAAGTAAAGTATGTTGATGGAATAATAAACGCCCTCATGCGATTGCCGAATTAGTATGGCAAATGGACCCGGACCCCAATTATTA
 AAAGCATTGCAATTTCAAGTGGATGGTCTGACACAGGCTCAATGCAAGACACTTATACCAGTGTGCGGTGATATGTTCCCATATATTGCAATCAAAGCTGGTGGCGCAGTAGCACTT
 GTGGCGCAGTAGCACTTGCAGATCTAGGTGATTTGAGAAATTCGACAGCAGCGGTGAGACAGGCGTGGTGTGATCAAATCTATCGCTCCCGCTAGTA
 AGAATTTAGATCTAACGAACATCACTACCGTTGAGAAATTTGTAAGGTAAGTACTGCTCCATTCGGCGTGCATTGGTAACAGCTAAACCCGGG
 Complementary *tcp*-R Primer
 stop codon *Sma*I site

D) *ctx-tcp-cpe* gene:

BamHI site
 GGATCCATTAAATTAATTTGGTGTTTTTTTACAGTTTTACTATCTTCAGCATATGCACATGGAACACCTCAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATA
 CCACAACACACAAATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAAGAAATGG
 TGCAATTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAAAAAAGCGATTGAAAGGATGAAGGATACCTGAGGATTGCATATCTTAC
 TGAAGCTAAAGTCAAGTAAAGTATGTTGATGGAATAATAAACGCCCTCATGCGATTGCCGAATTAGTATGGCAAATGGACCCGGACCCCAATTATTA
 ACAGCTTTTTAAGAAGAAATTTGTAAGAAGAAGAACACGATAAGAAAACCGGTCAAGAGGGTATGACATTACTCGAAGTATGATCGTCTTAGGCATTAT
 GGGGGTGGTTTCGGCGGGGGTGTACTCTGGCGCAGCGTGCATTGATTGCGAGATTATGACCAAGGCCGCGCAAAGTCTCAATAGTATCCAAGTTC
 ACTGACACAGACATACCGTGGTCTAGGTAATTAATCCAGCAACAGCTGATGCGACAGCTGCTAGTAAGCTAACTTCAGGCTTGGTTAGTTAGGTA
 ATCATCCGATGAGGCAAAAACCCATTC AATGGTACAAATATGAATATTTTTCATTTCGGCGTAAATGCAGCAGCTAATAAAGCATTGCAATTTCAAGT
 GATGGTCTGACACAGGCTCAATGCAAGACACTTATTACCAGTGTGCGGTGATATGTTCCCATATATTGCAATCAAAGCTGGTGGCGCAGTAGCACTT
 GATCTAGGTGATTTGAGAAATTCGACAGCAGCGGCTGAGACAGGCGTGGTGTGATCAAATCTATCGCTCCCGCTAGTAAGAAATTTAGATCTAACGAAC
 ATCACTCAGTTGAGAAATTTAGTAAAGGTAAGTCTCCATTCGGCGTTCGATTTGGTAAACAGCGGACCCGGACCCGATATAGAAAAAGAAATCCTT
 TTAGCTGCTGCTACAGAAAGATTAATTTAACTGATGCATTAAACTCAAATCCAGCTGGTAAATTTATATGATTGGCGTCTCTCAACTCATACCTTGGGA
 CTCAAAAGCTTAAATTTACACTTAAACAATTACAGCTACTGGACAAAAATATAGAAATCTTAGCTAGCAAAATTTGTTGATTTTAAATTTTAAATTAATTT
 TAATAATCTAGTGAAATTAGAACAGTCTTAGGTGATGGAGTAAAGATCATTATGTTGATATAAGCTTAGATGCTGGACAATATGTTCTTGTAAATGAA
 AGCTAATTCATCATATAGTGAAATTACCTTATTCAATATTTTCAAAAATTTTAAACCCGGG
 stop codon *Sma*I site

Downstream:

AATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAATCCATCTGGATTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTAT
 TGGTGAGA

شکل ۵: توالی یابی ژنهای *c-pe*, *tcpA* و *ctxB* درون وکتور بیانی pQE30.

A) C-CPE Protein:

Start 6xHis

MRGSHHHHHHGSIDIEKILDLAAATERLNLTDALNSNPAGNLYDWRSSNSYPWTQKLNHLTLTITATGQKYRILASKIVDFNIYSNNFNLLVKLEQSLG
DGVKDHVYVDSLDAQYVLMKANSYSYSGNYPYSILFQKF

B) CtxB Protein:

Start 6xHis

MRGSHHHHHHGSIKLKFGVFFTVLLSSAYAHGTPQNITDLCAEYHNTQIYTLNDKIFSYTESLAGKREMAITFKNGAIFQVEVPGSQHIDSQKKAIER
MKDTRLRIAYLLEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN

C) TcpA Protein:

Start 6xHis

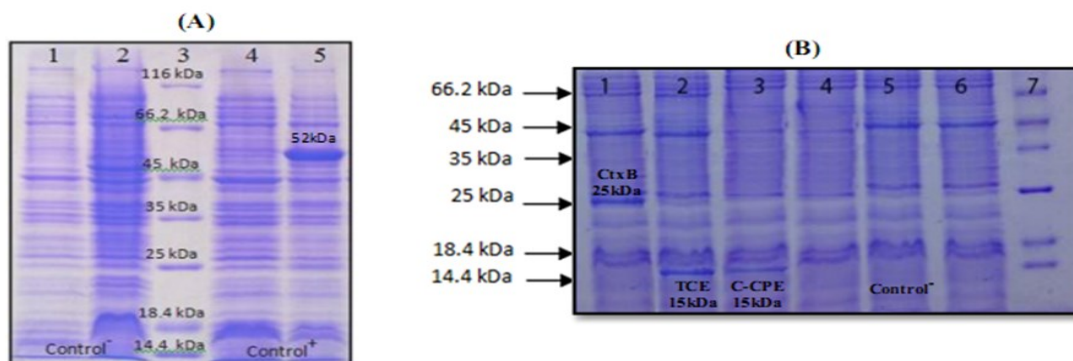
MRGSHHHHHHGSIMQLKQLFKKFKVKEEHDKKTGQEGMTLLEVIIVLGIMGVVSAGVVTLAQRAIDSQIMTKAAQSLNSIQVALTQTYRGLGNYP
TADATAASKLTSGLVSLGKISSDEAKNPFNGTNNMIFSPRNSAAANKAFISVDGLTQAQCKTLITSVGDMFPYIAIKAGGAVALADLGDGFNSAAAAETG
KSIAPASKNLDLTNITHVEKLCGTAPFGVAFGNS

D) CTX-TCP-CPE Protein:

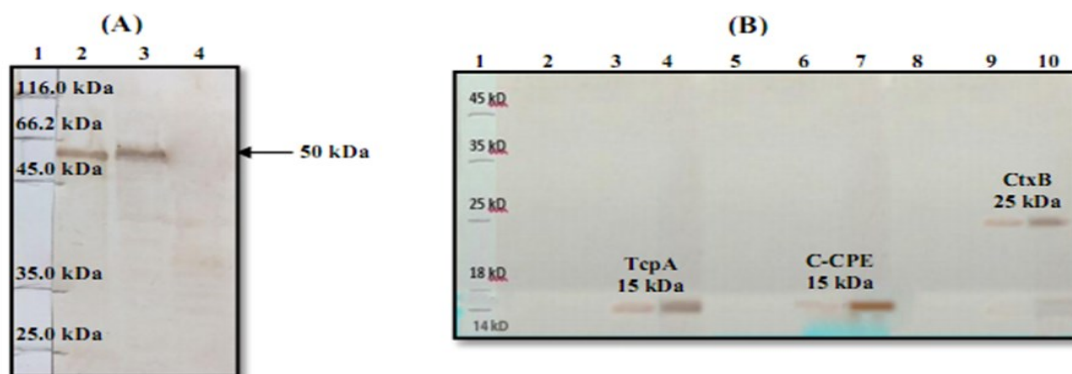
Start 6xHis

MRGSHHHHHHGSIKLKFGVFFTVLLSSAYAHGTPQNITDLCAEYHNTQIYTLNDKIFSYTESLAGKREMAITFKNGAIFQVEVPGSQHIDSQKKAIER
MKDTRLRIAYLLEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANGPGPQLLKQLFKKFKVKEEHDKKTGQEGMTLLEVIIVLGIMGVVSAGVVTLAQRAIDSQIMTKAAQ
SLNSIQVALTQTYRGLGNYPATADATAASKLTSGLVSLGKISSDEAKNPFNGTNNMIFSPRNSAAANKAFISVDGLTQAQCKTLITSVGDMFPYIAIKAGGAV
ALADLGDGFNSAAAAETG
KSIAPASKNLDLTNITHVEKLCGTAPFGVAFGNSGPGPDIEKILDLAAATERLNLTDALNSNPAGNLYDWRSSNSYPWT
QKLNHLTLTITATGQKYRILASKIVDFNIYSNNFNLLVKLEQSLGDGVKDHVYVDSLDAQYVLMKANSYSYSGNYPYSILFQKF

شکل ۶: توالی آمینواسیدی پروتین نو ترکیب پس از توالی یابی توسط gene runner



شکل ۷: SDS-PAGE پروتین های CtxB, TcpA, C-CPE و پروتین کایمرای CtxB-TcpA-C-CPE که سایز آن‌ها به ترتیب ۱۵، ۲۵، ۲۵ و ۵۲ کیلو دالتون



شکل ۸: تایید بیان پروتین‌ها توسط وسترن بلات.

بحث

سروتایپ O139 وجود دارد (۶). به دلیل ایمنی‌زایی و همولوژی بالای آنتی‌ژن TcpA در بین سروتایپ‌ها و بیوتایپ‌های مختلف، این آنتی‌ژن به عنوان کاندید مناسب برای القای پاسخ‌های ایمنی ضد استقرار باکتری در بسیاری از مطالعات طراحی واکسن علیه وبا اهمیت داشته و مورد توجه واقع شده است (۱۶). در سال ۲۰۱۴، کیایی و همکارانش متوجه شدند که زیر واحد A پروتین Tcp در مقایسه با کل پروتین ایمنی‌زاتر است و می‌تواند در یک میزبان مناسب به عنوان واکسن برای کلرا مورد استفاده قرار گیرد (۱۷). بر اساس مطالعات Iredel و همکارانش در سال ۱۹۹۴، پروتین TcpA به همراه چند زیر واحد دیگر ویبریوکلرا، ایمنی‌زایی وسیعی علیه عفونت ویبریوکلرا بوجود آوردند. آن‌ها ادعا کردند که این پروتین به تنهایی ایمنی‌زایی وسیعی ندارد و حتماً باید زیر واحد دیگری آن را همراهی کند (۱۸).

سم کلرا (CT) مهم‌ترین عامل پاتوژنز بیماری وبا یعنی عامل ایجاد اسهال شدید است. این سم شامل زیرواحد B به شکل پنتامر و زیرواحد A که فعالیت آنزیمی دارد می‌باشد (۱۹). ابتدا زیرواحد B به گیرنده GM1 گانگلیوزید بر روی سطح سلول‌های اپی تلیالی روده متصل شده و باعث ورود زیرواحد A به سلول‌های اپی تلیالی روده می‌شود. سپس زیرواحد A با فعالیت آنزیمی خود منجر به افزایش سطح cAMP داخل سلولی شده که این عمل منجر به خروج شدید آب و الکترولیت‌ها از سلول‌ها به داخل لومن روده کوچک و در نهایت ایجاد اسهال شدید می‌شود. ذکر این نکته حائز اهمیت است که عملکرد پاتوژنز ویبریوکلرا وابسته به زیرواحد A است (۲۰). این در حالیست که زیرواحد B (CtxB) به دلیل اتصال به گانگلیوزید GM1 به عنوان حمل‌کننده واکسن عمل کرده و باعث انتقال آنتی‌ژن فیوز شده به سلول‌های اپی تلیالی روده و فعال سازی پاسخ‌های ایمنی مخاطی می‌شود. بر اساس مطالعات Ryan و همکارانش در سال ۲۰۰۱، زیر واحد B توکسین کلرا به تنهایی برای انسان کاملاً ایمن می‌باشد و بیماری‌زایی ندارد بنابراین یک اجوانت واکسن مناسب برای

ویبریوکلرا باکتری است که موجب به وجود آمدن اسهال کشنده در انسان‌ها به دلیل استفاده از آب و غذای آلوده می‌باشد. بیماری‌زایی باکتری را می‌توان در تهاجم آن به سیستم ایمنی ذاتی روده، ورود به غشای سلول‌های روده‌ی کوچک، چسبیدن و تکثیر روی سطح میکروویلی‌ها و تولید سم از طریق بیان ژن‌های حدت، خلاصه نمود (۱۳).

پیشگیری نقش اساسی در کنترل بیماری وبا بازی می‌کند. انواع واکسن‌های تخفیف حدت یافته یا غیر فعال شده برای پیشگیری از این بیماری مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما هیچ کدام به قدر کافی موثر برای ریشه کن کردن بیماری نبوده‌اند. به همین دلیل توجه بیشتری به تحقیق در مورد واکسن‌های زیر واحدی شده است (۱۴). سیستم ایمنی مخاطی روده، نقش اساسی در محافظت از بدن و ایمنی‌زایی خوراکی بهترین روش برای بالا بردن این ایمنی علیه باکتری ویبریوکلرا دارد (۱۵). TcpA و CtxB از مهم‌ترین زیرواحدهای پیلای و سم این باکتری می‌باشند که به عنوان اصلی‌ترین عوامل حدت باکتری محسوب شده و نقش بسزایی در عفونت‌زایی باکتری ایفا می‌کنند (۵). علاوه بر این، انتهای C توکسین کلاستریدیوم پرفرینجنس، که باکتری مسئول مسمومیت‌های غذایی می‌باشد، نیز می‌تواند به عنوان یک اجوانت یا حامل برای تولید واکسن‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۱۱). بنابراین در مطالعه‌ی حاضر، از ژن‌های *ctxB* و *tcpA* به عنوان عوامل حدت باکتری ویبریوکلرا استفاده گردید. سپس آن‌ها در کنار ژن *c-cpe* باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس در میزبان پروکاریوت کلون شدند تا این پروتین نو ترکیب در بررسی‌های بعدی به عنوان واکسن برای پیشگیری از ویبریوکلرا مورد ارزیابی قرار گیرد.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پروتین‌های TcpA و CtxB به عنوان مهم‌ترین فاکتورهای پاتوژنز باکتری ویبریوکلرا محسوب می‌شوند (۷). پروتین TcpA به عنوان یکی از عوامل مؤثر در مستقر شدن باکتری در روده شناخته می‌شود که آنتی‌ژن و ژن کدکننده آن در بیوتایپ‌های کلاسیک O1 و El Tor و همچنین

ترکیب با تجویز داخل بینی میزان IgA را بالا می‌برد (۲۵). Suzuki و همکارانش در سال ۲۰۱۵، از C-CPE و کلادین-۴ برای تحویل واکسن pneumococcal به صورت nasal به موش استفاده نمودند. آن‌ها PspA را به C-CPE فیوز کرده و به موش تلقیح نمودند. بر اساس یافته‌های آن‌ها، آنتی‌ژن به طور صحیح وارد NALT شده و آنتی‌بادی‌های اختصاصی PspA بوجود آمدند. علاوه بر این، آن‌ها به این نتیجه رسیدند که NALT-PspA-C-CPE نه تنها به سلول‌های M، بلکه به اپیتلیوم NALT نیز متصل می‌شود که باعث افزایش جذب آنتی‌ژن به درون NALT می‌گردد (۲۶). بنابراین، ناحیه‌ی N ترمینال CtxB و C ترمینال C-CPE، برای اتصال به رسپتورهای اختصاصی شان بسیار حائز اهمیت می‌باشند و می‌توان نتیجه گرفت که اتصال TcpA به C ترمینال CtxB، تداخلی در ساختار سه بعدی آن برای پتامریزاسیون و اتصال به گانگلیورید GMI ایجاد نمی‌نماید (۲۷ و ۲۸). از طرف دیگر، اتصال C-CPE به انتهای فیوژن CtxB-TcpA تغییری در ساختار C-CPE برای اتصال به claudin-4 بوجود نمی‌آورد (۲۷). نهایتاً به این نتیجه می‌رسیم که ترتیب قرارگیری C-CPE-TcpA-CtxB و جایگاه لینکرها، به قدر کافی مناسب برای اتصال به رسپتورها و برانگیختن پاسخ‌های ایمنی می‌باشد.

از طرف دیگر مطالعات قبلی نشان داده است که برای ایجاد ساختار مناسب پتامری پروتین CtxB و اتصال به گیرنده‌اش، نیاز به یک توالی لینکر با قابلیت انعطاف در ترکیب فیوژن می‌باشد تا امکان حرکت آزادانه پروتین CtxB و پروتین فیوز شده به آن را فراهم نماید (۲۹).

در این رابطه ترکیب تتراپپتید متشکل از اسیدآمینه‌های Gly و Pro بصورت Gly-Pro-Gly-Pro ترکیب مناسبی است و ترجیح داده می‌شود که کدون کدکننده هر دو اسیدآمینه Gly و Pro از کدون‌های کمیاب میزبان هترولوگ انتخابی برای بیان فیوژن پروتین باشد تا باعث کاهش سرعت ترجمه mRNA در هنگام ترجمه این توالی تتراپپتید و در نتیجه کمک به فولدینگ صحیح پروتین CtxB بدون ایجاد ممانعت فضایی برای شکل‌گیری

فعال کردن ایمنی مخاطی در انسان به شمار می‌آید (۱۷). همچنین طبق بررسی‌های Cui و همکارانش در سال ۲۰۰۳، فعالیت اجوانتی سم کلرا برای آنتی‌ژن‌های دهانی بسیار موثر است اما استفاده از زیر واحد B این توکسین به تنهایی به عنوان اجوانت هنوز محدود می‌باشد. بنا براین همراه شدن این زیر واحد با دیگر آنتی‌ژن‌های این باکتری می‌تواند بطور موثری میزان IgA و IgG مخاطی در واکسن‌ها را بالا برد (۲۱). عامریان و همکارانش در سال ۲۰۱۷، یک کاست ژنی که شامل ژن‌های *ctxB* و *tcpA* بود و با یک لینکر بهم متصل می‌شدند را به صورت بیوانفورماتیک طراحی نمودند. آن‌ها مشاهده کردند که این فیوژن پروتین باعث افزایش پاسخ آنتی‌بادی‌های سرمی علیه ویبریو کلرا در موش شد (۲۲).

از طرف دیگر انترتوکسین کلاستریدایوم پرفرنجنس (CPE)، پروتینی که بعنوان عامل اصلی ایجاد مسمومیت غذایی شناخته می‌شود دارای دو بخش است. قسمت N-terminal (N-CPE) که عملکرد توکسیک این پروتین را انجام می‌دهد و قسمت C-terminal (C-CPE) که عملکرد اتصال به گیرنده claudin را انجام می‌دهد. در هنگام ایجاد مسمومیت غذایی، C-CPE با اتصال به claudin-4 بر روی سطح سلول‌های اپی تلیالی MALT روده (GALT) باعث افزایش نفوذپذیری سلول و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۲۳). همچنین مطالعات نشان داده که claudin-4 بر روی سلول‌های M در MALT روده و بیسی نیز بیان می‌شود (۲۴). با توجه به اینکه قسمت C-CPE عملکرد توکسیک قسمت N-CPE را ندارد، بنابراین همراه کردن آنتی‌ژن هدف با C-CPE بعنوان حمل کننده واکسن باعث انتقال آنتی‌ژن فیوز شده به سلول‌های اپی تلیالی MALT روده و بیسی و در نتیجه القای پاسخ‌های ایمنی مخاطی می‌شود (۲۴).

طبق گزارشات Lo و همکارانش در سال ۲۰۱۴، کلادین-۴ در NALT نیز بیان می‌شود و بنابراین می‌تواند هدف مناسبی برای واکسن‌های روده ای باشد. آن‌ها از هم‌گلوپتینین آنفولانزا (HA) متصل به C-CPE برای تولید واکسن استفاده کردند و با هدف قرار دادن کلادین ۴ بوسیله C-CPE مشاهده نمودند که این

کاندیدای خوبی برای بررسی به عنوان واکسن خوراکی و بیوریو کلرا باشد. اما مطالعات آینده در خصوص ایمنی‌زایی و چالش حیوانی این موضوع را به اثبات خواهد رساند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از پرسنل بخش ایمونولوژی انستیتو واکسن سرم‌سازی شیراز به دلیل حمایت‌های اجرایی کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

ساختار سه بعدی پروتین فیوز شده به آن شود (۳۰). بنابراین بر اساس این یافته‌ها، در مطالعه حاضر توالی تتراپپتید Gly-Pro-Gly-Pro بعنوان لینکر برای فیوژن پروتین مورد نظر انتخاب و بر اساس کدون‌های کمیاب میزبان/اشریشیا کلی طراحی و سنتز شد.

در این مطالعه، به منظور بیان پروتین‌های مورد نظر، از سیستم بیانی هترولوگ پروکاریوتی/اشریشیا کلی استفاده گردید. انتخاب باکتری/اشریشیا کلی به عنوان ساده‌ترین سیستم بیانی برای این پروتین‌ها که به تغییرات پس از ترجمه از جمله گلیکوزیلاسیون نیازی ندارد، صورت پذیرفت (۳۱). در این بررسی، با استفاده از پلاسمید pQE30 به عنوان ناقل بیانی، سطوح بالایی از بیان هر چهار پروتین نوترکیب در باکتری اشریشیا کلی بدون نیاز به مراحل پر هزینه، حاصل گردید. پلاسمید pQE30، پروتین نوترکیب را به صورت متصل به 6His تولید می‌نماید. حضور این فیوژن پروتین در انتهای آمینی پروتین نوترکیب، سبب تسهیل روند خالص‌سازی با استفاده از ستون نیکل می‌گردد. بنابراین با استفاده از این ناقل در باکتری اشریشیا کلی، پروتین‌های نوترکیب تولید شدند و پس از بهینه‌سازی شرایط تخلیص، به مقادیر کافی و خالص از هر یک از آنتی‌ژن‌های CtxB، TcpA، C-CPE و پروتین فیوژن CtxB-TcpA-C-CPE به منظور ارزیابی ایمونوژنیسیته آن‌ها دست یافتیم. پس از بیان هر چهار پروتین نوترکیب، تأیید آن‌ها توسط SDS-PAGE و وسترن بلات، در شرایط احیایی پیش از تخلیص و پس از تخلیص انجام گردید و ثابت شد که هر چهار پروتین نوترکیب تخلیص شده، پروتین‌های هدف مورد نظر در این مطالعه هستند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش، پروتین نوترکیب حاصل از CtxB-TcpA-C-CPE بیان بسیار خوبی در میزبان *E. coli* DH5 α داشت و به نظر می‌رسد که این پروتین نوترکیب

References

1. Zingl FG, Kohl P, Cakar F, Leitner DR, Mitterer F, Bonnington KE, et al. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and in vivo adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell host & microbe*. 2020;27(2):225-37. e8.
2. Peschek N, Herzog R, Singh PK, Sprenger M, Meyer F, Fröhlich KS, et al. RNA-mediated control of cell shape modulates antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*. *Nature communications*. 2020;11(1):1-11.
3. Sela R, Hammer BK, Halpern M. Quorum-sensing signaling by chironomid egg masses' microbiota, affects haemagglutinin/protease (HAP) production by *Vibrio cholerae*. *Molecular Ecology*. 2021;30(7):1736-46.
4. Naha A, Mandal RS, Samanta P, Saha RN, Shaw S, Ghosh A, et al. Deciphering the possible role of ctxB7 allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1. *PLoS neglected tropical diseases*. 2020;14(4):e0008128.
5. Taheri F, Nazarian S, Ahmadi TS, Gargari SLM. Protective effects of egg yolk immunoglobulins (IgYs) developed against recombinant immunogens CtxB, OmpW and TcpA on infant mice infected with *Vibrio cholerae*. *International Immunopharmacology*. 2020;89:107054.
6. Raheem SG, Salh KK, Ibrahim KS, Gorji AE. In-Silico Designing a Multi-Peptide Vaccine: Against *Vibrio Cholera*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2021;27(2):1541-53.
7. Souod N, Kargar M, Hoseini MH, Jafarinia M. Fusion-expressed CtxB-TcpA-C-CPE improves both systemic and mucosal humoral and T-cell responses against cholera in mice. *Microbial Pathogenesis*. 2021;157:104978.
8. Mahboobi M, Mirnejad R, Sedighian H, Piranfar V, Fooladi AAI. Genetic Diversity of *ctxB* Gene Among Classical O1 and El Tor Strains of *Vibrio cholerae* using High-Resolution Melting Curve Analysis. *Iranian Journal of Pathology*. 2020;15(4):320.
9. Kenworthy AK, Schmieder SS, Raghunathan K, Tiwari A, Wang T, Kelly CV, et al. *Cholera* Toxin as a Probe for Membrane Biology. *Toxins*. 2021;13(8):543.
10. Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018;53:5-10.
11. Kiu R, Hall LJ. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging microbes & infections*. 2018;7(1):1-15.
12. Navarro MA, McClane BA, Uzal FA. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. *Toxins*. 2018;10(5):212.

13. Weil AA, Ryan ET. Cholera: recent updates. *Current opinion in infectious diseases*. 2018;31(5):455-61.
14. Sordo-Puga Y, Pérez-Pérez D, Montero-Espinosa C, Oliva-Cárdenas A, Sosa-Teste I, Duarte CA, et al. Immunogenicity of E2CD154 Subunit Vaccine Candidate against Classical Swine Fever in Piglets with Different Levels of Maternally Derived Antibodies. *Vaccines*. 2021;9(1):7.
15. dong Zhang Y, Li M, Du GS, Chen XY, Sun X. Advanced oral vaccine delivery strategies for improving the immunity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021:113928.
16. Molaee N, Mosayebi G, Amozande-Nobaveh A, Soleyman MR, Abtahi H. Evolution of the Immune response against recombinant proteins (TcpA, TcpB, and FlaA) as a candidate subunit cholera vaccine. *Journal of immunology research*. 2017;2017.
17. Ryan ET, Bridges EA, Crean TI, Gausia K, Hamadani JD, Aziz A, et al. Local production of anti-vibrio cholerae mucosal antibody in reproductive tract tissues after cholera. *The Journal of infectious diseases*. 2001;184(5):643-7.
18. Iredell J, Manning P. Biotype-specific tcpA genes in *Vibrio cholerae*. *FEMS microbiology letters*. 1994;121(1):47-54.
19. Hitchcock MM, Holubar M, Hogan CA, Tompkins LS, Banaei N. Dual reporting of *Clostridioides difficile* PCR and predicted toxin result based on PCR cycle threshold reduces treatment of toxin-negative patients without increases in adverse outcomes. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(11):e01288-19.
20. Kabbani AM, Raghunathan K, Lencer WI, Kenworthy AK, Kelly CV. Structured clustering of the glycosphingolipid GM1 is required for membrane curvature induced by cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(26):14978-86.
21. Cui Z, Mumper RJ. Microparticles and nanoparticles as delivery systems for DNA vaccines. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2003;20(2&3).
22. Amerian M, Nazarian S. Expression and purification of recombinant chimeric protein contains CtxB and TcpA from *Vibrio cholera* and investigation of antibody titer in mouse. *Pathobiology Research*. 2017;20(3):33-48.
23. Black JD, Lopez S, Cocco E, Schwab CL, English DP, Santin AD. *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) and CPE-binding domain (c-CPE) for the detection and treatment of gynecologic cancers. *Toxins*. 2015;7(4):1116-25.
24. Rajapaksa TE, Stover-Hamer M, Fernandez X, Eckelhoefer HA, Lo DD. Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *Journal of Controlled Release*. 2010;142(2):196-205.
25. Park T-E, Singh B, Maharjan S, Jiang T, Yoon S-Y, Kang S-K, et al. Mucosal delivery of vaccine by M cell targeting strategies. *Current Drug Therapy*. 2014;9(1):9-20.

26. Suzuki H, Watari A, Hashimoto E, Yonemitsu M, Kiyono H, Yagi K, et al. C-terminal *Clostridium perfringens* enterotoxin-mediated antigen delivery for nasal pneumococcal vaccine. PLoS One. 2015;10(5):e0126352.
27. Arabshahi S, Derakhshandeh A, Fasaee BN, Novinrooz A. In-silico design and production of a novel antigenic chimeric Shigella IpaB fused to C-terminal of *Clostridium perfringens* enterotoxin. Molecular biology reports. 2019;46(6):6105-15.
28. Davod J, Fatemeh DN, Honari H, Hosseini R. Constructing and transient expression of a gene cassette containing edible vaccine elements and shigellosis, anthrax and cholera recombinant antigens in tomato. Molecular biology reports. 2018;45(6):2237-46.
29. Sharma MK, Singh NK, Jani D, Sisodia R, Thungapathra M, Gautam J, et al. Expression of toxin co-regulated pilus subunit A (TcpA) of *Vibrio cholerae* and its immunogenic epitopes fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). Plant cell reports. 2008;27(2):307-18.
30. Lipscombe MJ. Construction and characterisation of *Escherichia coli* heat-labile toxin B-subunit fusion proteins: University of Warwick; 1991.
31. Rohweder B, Semmelmann F, Endres C, Sterner R. Standardized cloning vectors for protein production and generation of large gene libraries in *Escherichia coli*. BioTechniques. 2018;64(1):24-6.