دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی و درمانی بوشهر

مرکز تحقیقات
طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس

CrossMarck

مقاله پژوهشی

تولید ایمونوگلوبولین زرده تخم مرغ (IgY) علیه پروتئین نوترکیب TolC از باکتری شیگلا فلکسنری

حسین سمیعی ابیانه [۱و۲]، شهرام نظریان [۳*]، امیر رضایی [۲]، نهال هادی [۳]، کوثر کیوان شکوه [۴]

[۱] گروه زیست فناوری و نانو فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
[۳] گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
[۴] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه: پیشرفت مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک عامل نگران کننده جهانی برای مقابله با شیگلوزیس می‌باشد. توسعه افلاکس پمپ‌ها از جمله پمپ AcrAB-TolC موجب گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیک در سویه‌های *شیگلا فلکسنری* شده است. هدف از این تحقیق تولید IgY علیه ایمونوژن نوترکیب TolC و ارزیابی میزان اتصال آن به ایمونوژن نوترکیب بود.

مواد و روش‌ها: پس از طراحی و سنتز سازه حاوی نواحی ایمونوژن پروتئین TolC، پلاسمید نوترکیب pET28a-tolC به سلول‌های مستعد *E. coli* BL21 (DE3) ترانسفورم شد. بیان پروتئین نوترکیب با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG القا گردید. پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از رزین Nickel-Nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) تخلیص و با وسترن بلاتینگ ارزیابی شد. ایمن‌سازی مرغ‌های نژاد لگهورن با ۲۰۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب انجام شد. آنتی‌بادی مرغی به روش ترسیب با پلی اتیلن گلیکول (PEG) استحصال و ارزیابی تیتر آنتی‌بادی در سرم و زرده تخم مرغ، در مرغ‌های ایمن شده در مقایسه با گروه کنترل به روش الایزا تعیین گردید.

یافته‌ها: پروتئین نوترکیب TolC با وزن مولکولی ۴۰ کیلودالتون و بازده بیانی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر محیط کشت بیان شد. غلظت آنتی‌بادی مرغی تخلیص شده ۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از زرده تخم مرغ بود. نتایج تیتر آنتی‌بادی در سرم علیه پروتئین نوترکیب پس از تزریق سوم تا رقت ۱ به ۶۴۰۰ معنی‌دار بود ($P<0/05$). در روش الایزا حداقل ۷ نانوگرم از آنتی‌بادی به پروتئین نوترکیب واکنش نشان داد.

نتیجه‌گیری: آنتی‌بادی‌های حاصل از ایمونوژن نوترکیب TolC می‌توانند به عنوان منبع ایمنی غیرفعال در بیماری ایجاد شده توسط *شیگلا فلکسنری* مورد بررسی قرار گیرند.

واژگان کلیدی:
شیگلا فلکسنری
افلاکس پمپ
TolC
پروتئین نوترکیب
IgY

***نویسنده مسئول:**
شهرام نظریان
دانشگاه جامع امام حسین (ع)
nazarian@ihu. ac. ir

کد اخلاق
IR. IHU.REC.1400.2.24

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۸
پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۷

پیام کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی عامل نگران کننده برای مقابله با شیگلوزیس است. پیش‌بینی می‌شود تولید آنتی‌بادی IgY علیه افلاکس پمپ باکتری، کاهش میزان مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیکی را سبب گردد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

Original Research

Production of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) against Recombinant TolC Protein From Shigella flexneri Bacteria

H. Samiei-Abianeh[1,2], SH. Nazarian[2*], A. Resaei[2], N. Hadi[3], K. Kayvan shokooh[4]

[1] Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, School of Medicine، Mashhad University of Medical Sciences Mashhad, Iran

[2] Department of Biology, School of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

[3] Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

[4] Department of Microbiology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Growing antibiotic resistance is a global concern for the treatment of shigellosis. The development of efflux pumps such as the AcrAB-TolC pump has increased antibiotic resistance in *Shigella flexneri* strains. The aim of this study was to produce IgY against the recombinant immunogen TolC and evaluate the binding of the antibody to the recombinant immunogen

Materials and Methods: A construct containing immunogen regions of TolC protein was designed and synthesized; then, the recombinant plasmid pET28a-tolC was transferred to *E. coli* BL21 (DE3) competent cells. Expression of the recombinant protein in *E. coli* was induced with 1 mM IPTG. The recombinant protein was purified using affinity chromatography by Nickel-Nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin and evaluated by western blotting. Leghorn chickens were immunized with 200 micrograms of the recombinant protein. IgY was purified using PEG precipitation, and the antibody titer was determined in immunized chicken's serum and egg yolk by ELISA method compared to the control group.

Results: Recombinant protein TolC was expressed with a molecular weight of 40 kDa and an expression yield of 10 mg/l of the culture media. The IgY concentration was determined to be 9 mg/ml of egg yolk. The antibody titer in serum against the recombinant protein after the third immunization was 1: 6400 (P<0.05). In the ELISA method, at least seven nanograms of antibody reacted with the recombinant protein.

Conclusion: Antibodies against TolC recombinant immunogen can be investigated as a source of passive immunity in the disease caused by Shigella flexneri.

Keywords:
Shigella flexneri
Efflux pump
TolC
Recombinant protein
IgY

***Corresponding author:**
shahram Nazarian
nazarian@ihu. ac. ir

Ethical code:
IR. IHU.REC.1400.2.24

Received: 2024/06/17
Accepted: 2024/10/08

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

مقدمه

شیگلا یک باکتری گرم منفی می‌باشد که باعث تخریب سلول‌های لایه اپیتلیوم و در نتیجه سبب اسهال خونی موسوم به شیگلوزیس می‌گردد. این باکتری عضوی از خانواده انتروباکتریاسه است که برای اولین بار توسط میکروب‌شناس ژاپنی به نام کیوشی شیگا (Kiyoshi Shiga) در سال ۱۸۹۸ شناسایی شد (۱ و ۲).

جنس شیگلا شامل ۴ گونه بیماری‌زا با نام‌های شیگلا فلکسنری، شیگلا سونئی، شیگلا دیسانتری، شیگلا بویدی می‌باشد. در این میان گونه شیگلا فلکسنری بیشترین آمار مرگ ومیر را داشته است (۳). شیگلا از مسیر دهانی-مدفوعی بوسیله آب یا غذای آلوده منتقل می‌شود. بیشترین گزارشات ابتلا به شیگلوزیس مربوط به جنوب آسیا و آفریقا می‌باشد که علت اصلی آن شرایط ضعیف بهداشتی بخصوص آب آلوده گزارش شده است (۴).

درمان شیگلوزیس با کنترل شرایط عمومی بیمار از جمله هیدراتاسیون در صورت کم آبی بدن انجام می‌شود. با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی (AR) مقابله مستقیم با باکتری شیگلا، بوسیلة آنتی‌بیوتیک توصیه نمی‌شود. گزارشاتی در خصوص بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه در این باکتری وجود دارد. در سال ۲۰۱۳ سویه‌ای از شیگلا فلکسنری به نام X.variant مقاوم به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، کلرامفنیکل، تتراسیکلین، آموکسی سیلین، جنتامایسین و ده آنتی‌بیوتیک دیگر در کشور چین شناسایی و گزارش شد (۵). مقاومت‌ها آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های شیگلا فلکسنری در حال پیشرفت است که یک عامل نگران کننده جهانی برای مقابله با این عامل بیماری زا محسوب می شود. از جمله این مقاومت‌ها می‌توان به گزارشاتی از کشور هند در خصوص افزایش مقاومت به کینولون‌ها و سفالوسپورین‌ها اشاره کرد (۶).

یکی از سیستم‌های دفاع ذاتی که باعث مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود بیان افلاکس پمپ‌ها در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی است. نقش این افلاکس پمپ‌ها ایجاد مقاومت دارویی (MDR) و کمک به تشکیل بیوفیلم می باشد (۷). مشخص شده که با ممانعت از عملکرد صحیح این پمپ‌ها علاوه بر کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توان بیماری‌زایی باکتری را نیز کاهش داد (۸).RNDها یکی از ۵ خانواده بزرگ افلاکس پمپ‌ها هستند که یکی از شناخته شده‌ترین آن‌ها در انتروباکتریاسه پمپ AcrAB-TolC است (۹).

برای اولین بار در سال ۱۹۸۳، کلمپرر مشاهده کرد که با واکسیناسیون مرغ‌ها، آنتی‌بادی‌هایی هم در سرم و هم در زرده تخم مرغ تولید می‌شود. بعدها در دوزیستان، خزندگان و پرندگان نیز دیده شد که به علت برخی تفاوت ساختاری با آنتی‌بادی پستانداران IgY نام‌گذاری شد (۱۰). این آنتی‌بادی به سهولت و برخلاف خونگیری با روش غیرتهاجمی، از زرده تخم مرغ جداسازی می‌شود. علاوه بر این آنتی‌بادی استخراج شده از زرده تخم مرغ می‌تواند به عنوان یک محصول طبیعی در مواد غذایی که بخشی از رژیم غذایی است، مصرف شود. برخی دیگر از مزایای IgY مقرون به صرفه بودن در تولید، فرآیند تولید سریع‌تر، قابلیت نگهداری طولانی مدت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و بازده تولید بالا می‌باشد (۱۱). با توجه به گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری شیگلا فلکسنری هدف از این تحقیق بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب TolC در میزبان بیانی پروکاریوتی و تولید و تخلیص آنتی‌بادی مرغی علیه پروتئین نوترکیب TolC می‌باشد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

مواد و روش‌ها

مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده شامل اکریل آمید، بیس آکریل آمید، کلروفرم، اتیدیوم بروماید، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، سدیم دی‌هیدروژن فسفات، دی‌سدیم هیدروژن فسفات، بی‌کربنات سدیم، توئین۲۰، اسید فسفریک، سدیم دو دسیل دی سولفات، اوره، اسید کلریدریک، کلرید سدیم، ایزوپروپانول، ۲- مرکاپتو اتانول، برومونفل بلو، کوماسی برلیانت بلو R250، هیدروکسید سدیم، هیدروکسید آمونیوم، اسید استیک گلاسیال، متانول و اتانول، اسید بوریک، باز تریس، ایزوپروپیل بتا تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، پودر ژل آگاروز معمولی، کلسیم کلرید، و آمونیوم پرسولفات از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند. کاغذ نیتروسلولز از شرکت کیاژن (آمریکا) تهیه گردید. پلاسمید pET28-rTolC حاوی توالی نوکلوتیدی ژن صناعی از شرکت Shinegene (چین) دریافت شد. میزبان بیانی پروکاریوتی سویه *E. coli* BL21 (DE3) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید. سوبستراهای مولد رنگ O-phenilenediamine (OPD) و Diaminobenzidine (DAB) از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA agarose resin استفاده شد که از شرکت نوآوران زیست گستر ارگ خریداری گردید. موش‌های آزمایشگاهی BALB/c از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. از ادجوانت کامل و ناقص فروند مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ایران استفاده شد. آنتی‌بادی ضد IgG موشی کونژوگه به HRP، از شرکت داکو (دانمارک) خریداری گردید.

طراحی و شرایط انجام پژوهش

این پژوهش از نوع تجربی بود. پرندهٔ مورد استفاده در این تحقیق مرغ تخم‌گذار نژاد لگهورن با سن ۲۴ هفته‌ای بودند که در شرایط نوری ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در حالی که امکان دسترسی آب و غذا به آن‌ها فراهم بود در اتاق پرندگان مرکز زیست‌شناسی نگهداری شدند. زمان انجام پژوهش از خرداد ۱۴۰۰ تا بهمن ۱۴۰۱ به مدت ۱۰ ماه بود. کلیه مراحل مطالعه حاضر با تأئید کمیته اخلاق دانشگاه جامع امام حسین (ع) طبق کد (۲۴. ۲. IR. IHU. REC .۱۴۰۰) انجام گردید.

استخراج توالی ژنی و پروتئینی TolC

توالی نوکلئوتیدی ژن tolC از باکتری شیگلا فلکسنری با عدد دسترسی NC_004337. 2 از پایگاه داده GeneBank استخراج و به فرمت FASTA برای آنالیزهای بعدی ذخیره گردید. توالی نوکلئوتیدی با سرور آنلاین Expasy Translate Tool (https: //web. expasy. org/translate) به توالی آمینواسیدی ترجمه و به فرمت FASTA ذخیره شد. برای بررسی صحت توالی بدست آمده توالی آمینواسیدی در سرور آنلاین pBLAST با پایگاه داده RefSeq Proteins همترازی انجام شد. ویژگی‌های پروتئینی TolC از پایگاه داده Uniprot با عدد دسترسی A0A822PEA8 مورد مطالعه قرار گرفت.

سپس رسوب حاصل در ۵۰۰ میکرولیتر بافر CTAB حل گردید. این عمل با استفاده از پیپت کردن انجام شد. در نهایت نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در هیتر بلاک (South Korea، Dihan Scientific) قرار داده شدند. پس از این زمان، نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شدند. (۲۵-۲۲).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

آنالیز ایمونوانفورماتیک

جهت به دست آوردن ناحیه اپیتوپیک در توالی پروتئینی TolCاز سرورهای متعدد پایگاه داده IEDB استفاده شد. ابتدا برای به دست آوردن اپی‌توپ‌های خطی و فضایی سلول‌های B به‌ترتیب از سرورهای Bepipred Linear Epitope Prediction 2. 0 و ElliPro و برای بدست آوردن ساختارهای Beta turn که حاوی نواحی غنی از اپی‌توپ هستند از سرور Chou and Fasman beta turn predictionاستفاده شد. همچنین برای بدست آوردن اپی‌توپ‌هایی که در سطح قرار می‌گیرند از سرور Emini surface accessibility scaleو اپی‌توپ‌های flexible در B-cellاز Karplus and Schulz flexibility scale استفاده شد. در ادامه اپی‌توپ‌های فضایی سلول‌های B با سرورهای Discotopeو ElliPro پیش‌بینی شد. برای این منظور ابتدا از روی توالی آمینواسیدی TolC ساختار فضایی پروتئین TolCبا سرور Swiss-Model پیش‌بینی شد.

پیش بینی ساختار دوم و ویژگی‌های فیزیک و شیمیایی rTolC

ساختار دوم و سوم پروتئین نوترکیب rTolc که شامل ناحیه اپیتوپیک (۳۳۵-۴۰) در پروتئین TolC می‌باشد با سرور آنلاین Phyre 2 مورد ارزیابی قرار گرفت. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب rTolC به‌ترتیب با سرورهای Protparam و Vaxigen بررسی شد. در نهایت میزان پایداری ساختار سوم نمودار prosa و ramachandran مورد ارزیابی قرار گرفت.

طراحی سازه نوترکیبpET28-rTolC

بهینه‌سازی بیانی توالی نوکلئوتیدی rTolC توسط سرور optimizer انجام شد و سپس ساختار ثانویه mRNA جهت بررسی پایداری mRNA با سرور RNAFOLD پیش‌بینی شد. در نهایت توالی ژنی بهینه‌سازی در بین دو ناحیه برشی EcoRI و HindIII جهت سفارش به شرکت Shinegene (چین) ارسال گردید.

تراریخت نمودن سلول‌های میزبان با پلاسمید-pET28 rTolC

باکتری‌های *E. coli* BL21 (DE3) جهت دریافت پلاسمید pET28-rTolC با استفاده از کلسیم کلرید مستعد شدند. پس از کشت شبانه و تلقیح در محیط LB با رسیدن جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۷، ۲ میلی‌لیتر از سلول‌های باکتری را رسوب داده (سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه) و رسوب را در یک میلی‌لیتر کلسیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار یکنواخت و به مدت ۱ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ترسیب باکتری‌ها، ۱۵۰ میکرولیتر کلسیم کلرید سرد اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از مستعدسازی، مقدار ۵ میکرولیتر از پلاسمید pET28-rTolC به باکتری‌های مستعد شده اضافه و با روش شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه ترانسفورماسیون صورت گرفت. سپس یک میلی‌لیتر از محیط LB فاقد آنتی‌بیوتیک به باکتری‌ها اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در شیکر با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شد. جهت انتخاب باکتری‌های تراریخت شده رسوب باکتری در محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کشت داده شد.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب rTolC

میزان ۱۰۰ میکرولیتر از کشت‌های شبانه کلون‌های ذخیره شده به ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک اضافه

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

و سپس درون شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید تا جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ برسد. سپس، به هر یک از لوله‌ها به میزان ۵۰ میکرولیتر Isopropyl β-D-1-(IPTG) thiogalactopyranoside ۱۰۰ میلی‌مولار افزوده و محیط کشت به مدت ۵ ساعت در شیکر انکوباتور گرماگذاری گردید. پس از القاء بیان پروتئین، سلول‌های باکتری در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و جمع‌آوری شد. میزان بیان پروتئین rTolC برروی ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد بررسی شد.

جهت تخلیص پروتئین rTolC که دارای دنباله His-tag می‌باشد از ستون کروماتوگرافی نیکل (Ni-NTA) استفاده شد. در این مرحله از بافرهای شیب غلظت ایمیدازول جهت شست و شوی ستون از اتصال‌های غیراختصاصی و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب rTolC استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۳ مرتبه عصاره لیز سلول‌های باکتری القا شده حاوی پروتئین نوترکیب از ستون عبور داده شد و نمونه عبوری جهت بررسی کارایی اتصال نگهداری گردید. در مرحله بعد جهت شست وشوی ستون از اتصالات غیر اختصاصی، ستون با ایمیدازول ۵ و سپس ۱۰ میلی‌مولار شستشو داده شد. جهت تخلیص پروتئین نوترکیب rTolC ایمیدازول ۱۰۰ و سپس ۲۵۰ میلی‌مولار اضافه گردید و نمونه عبوری جهت بررسی میزان خلوص روش تخلیصی نگهداری گردید. تمام نمونه‌های عبوری جهت بررسی در ژل ۱۲ درصد آکریل آمید SDS-PAGE به روش لاملی الکتروفورز شدند (۱۲). پس از تأئید خالص‌سازی پروتئین نوترکیب، غلظت سنجی به روش رنگ سنجی در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از معرف برادفورد و نمودار استاندارد BSA انجام شد (۱۳).

تجویز پروتئین نوترکیب rTolC به مرغ

جهت ایمنی‌زایی به هر مرغ ۲۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب را که با ادجوانت کامل فروند (برای تجویز اول) و یا ادجوانت ناقص فروند (برای دوزهای یادآور) به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده و در سه نوبت به فاصله زمانی دوهفته‌ای به‌صورت زیر جلدی در ناحیه سینه تزریق شد. همچنین میزان ۵۰۰ میکرولیتر از بافر PBS استریل با حجم برابری از ادجوانت ترکیب و به مرغ گروه شاهد تزریق گردید. یک هفته پس از هر تجویز خونگیری از مرغ‌ها انجام و سرم آن جهت بررسی تیتر آنتی‌بادی جدا شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. جمع‌آوری تخم مرغ با فاصله زمانی ۱۰ روز بعد از هر تزریق انجام و تا ۴۵ روز بعد از آخرین تزریق ادامه پیدا کرد. جهت خالص‌سازی آنتی‌بادی IgY، زرده تخم مرغ با استفاده از کاغذ صافی جدا شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی تیتر آنتی‌بادی به روش الایزا غیرمستقیم

بررسی تیتر آنتی‌بادی به روش الایزا غیرمستقیم به منظور بررسی تیتر آنتی‌بادی از روش الایزا غیرمستقیم استفاده گردید. برای این منظور ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب rTolC در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ داخل هریک از چاهک‌های الایزا تثبیت شد. در هر مرحله چاهک‌ها با بافر PBS حاوی توین ۲۰ شست‌وشو داده شدند. سپس میکروپلیت با PBST حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سرم‌ها با رقت ۱: ۱۰۰ تا ۱: ۶۴۰۰ تهیه شده در بافر PBST به چاهک‌ها اضافه و پلیت الایزا به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شست و شو آنتی‌بادی موشی ضد آنتی‌بادی مرغی کانژوگه شده به HRP با رقت ۱: ۵۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه و پلیت الایزا به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا (۲ میلی‌گرم O- Phenylenediamine Dihydrocholoride در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات حاوی ۲/۵ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد) به هر چاهک اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک یک مولار به منظور توقف واکنش اضافه و جذب نوری در ۴۹۰ نانومتر ثبت شد.

استخراج آنتی‌بادی از زرده تخم‌مرغ و بررسی کیفیت آن

به منظور تخلیص IgY از روش ترسیب با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG6000) استفاده گردید. برای این منظور به لوله حاوی زرده دو برابر حجم زرده بافر PBS استریل افزوده و زرده به خوبی در بافر PBS یکنواخت شد. به محتویات فالکون PEG6000 با نسبت ۳/۵ درصد وزنی-حجمی افزوده شد و فالکون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه به‌آرامی شیک گردید. فالکون مذکور با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سوپ حاصل از سانتریفیوژ از کاغذ صافی عبور داده و PEG6000 با نسبت ۸ درصد وزنی-حجمی افزوده و همانند شرایط قبل انکوبه و سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS استریل حل گردید و سپس PEG6000 با نسبت ۱۲ درصد وزنی- حجمی افزوده شد و مجدد شرایط قبل انکوبه و سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته و رسوب در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS استریل حل و پس از دیالیز شبانه علیه بافر PBS، برای نگهداری طولانی مدت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان خلوص آنتی‌بادی تخلیص شده با الکتروفورز در شرایط احیا و غیر احیا SDS-PAGE سنجیده شد. از روش براد فورد برای تعیین میزان پروتئین استفاده گردید. کارایی آنتی‌بادی خالص شده با کوت کردن پروتئین نوترکیب rTolC و واکنش الایزا ارزیابی شد.

یافته‌ها

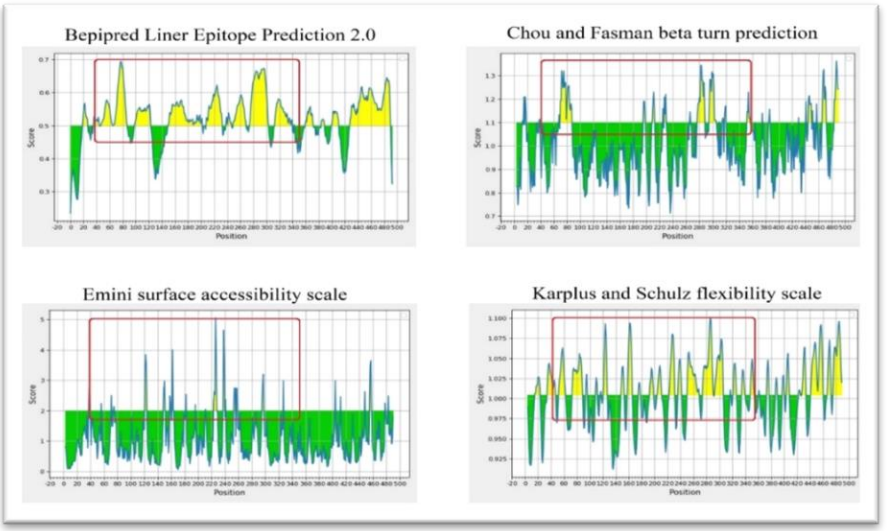
توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی TolC

توالی نوکلئوتیدی ژن tolC از باکتری شیگلا فلکسنری حاوی ۱۴۸۲ جفت باز و توالی پروتئینی ۴۹۳ آمینو اسید می‌باشد. نتایج BLAST توالی آمینواسیدی ترجمه شده نشان داد که توالی انتخاب شده Identity برابر با ۱۰۰ و E-value برابر صفر با پروتئین TolC در انتروباکتریاسه با شماره دسترسی 1 .WP_000735285 دارد. در پایگاه داده Uniprot وزن مولکولی پروتئین TolC ۵۳/۸ کیلو دالتون اعلام شده که ۲۲ آمینواسید ابتدایی آن سیگنال پپتید می‌باشد.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی B-Cell

با استفاده از سرورهای Bepipred، Chou and Fasman، Emini و Karplus and Schulz با حد آستانه‌های به ترتیب ۰/۵، ۱/۱، ۲ و ۱ در کل توالی پروتئین TolC در مجموع ۹۱ ناحیه اپیتوپیک شناسایی شد که ناحیه بین آمینواسیدهای ۴۰-۳۳۵ حاوی ۶۱ ناحیه اپیتوپیک بود (شکل ۱). قوی‌ترین ناحیه اپیتوپی با امتیاز ۰/۸۳۶ در ناحیه بین ۹۳-۶۴ قرار داشت که توالی آمینو اسیدی آن LGLGADYTYSNGYRDANGINSNATSASLQL بود.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

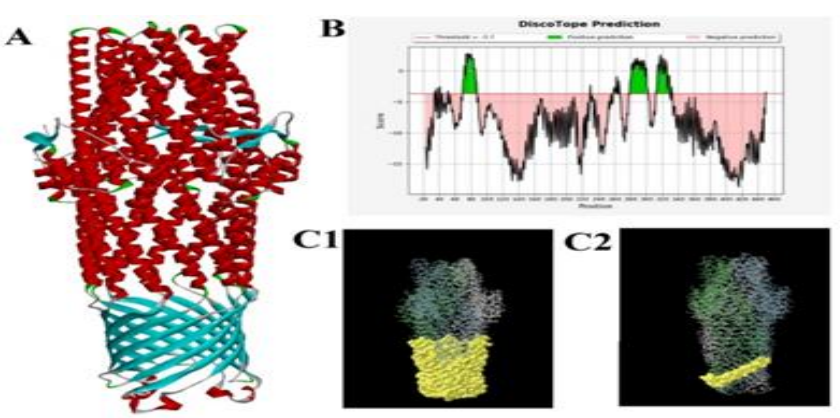


شکل ۱. نتایج آنالیز اپی‌توپ‌های خطی B-Cell، با استفاده از الگوریتم‌های مختلف پروفایل اپیتوپی توالی آمینواسیدیTolC به دست آمد که ناحیه بین آمینواسیدهای ۴۰ تا ۳۳۵ (در نمودارها داخل کادر قرمز) بیشترین میزان اپی توپ را شامل می‌شد.

Fig 1. The results of the B-cell linear epitope analysis of TolC amino acid sequence were obtained using different algorithms, which showed that the region between amino acids 40 and 335 had the highest epitope activity (highlighted in the charts within the red box)

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های فضایی B-Cell

ساختار فضایی توالی TolC که با سرور Swiss-Model پیش‌بینی شده بود ۹۸/۸۰ درصد Seq Identity با Outer membrane protein TolC در باکتری *E. coli* K12 نشان داد (شکل ۲- الف). طبق پیش بینی سرور ElliPro در ساختار پروتئین TolC ۱۰۱ ناحیه اپیتوپی به امتیاز ۰/۷۹۳ شناسایی شد که تمامی این نواحی بین آمینو اسیدهای ۳۳۵-۴۰ قرار داشت و هیچ اپیتوپ فضایی در ناحیه بین آمینواسیدهای ۴۰-۱ قرار نداشت.



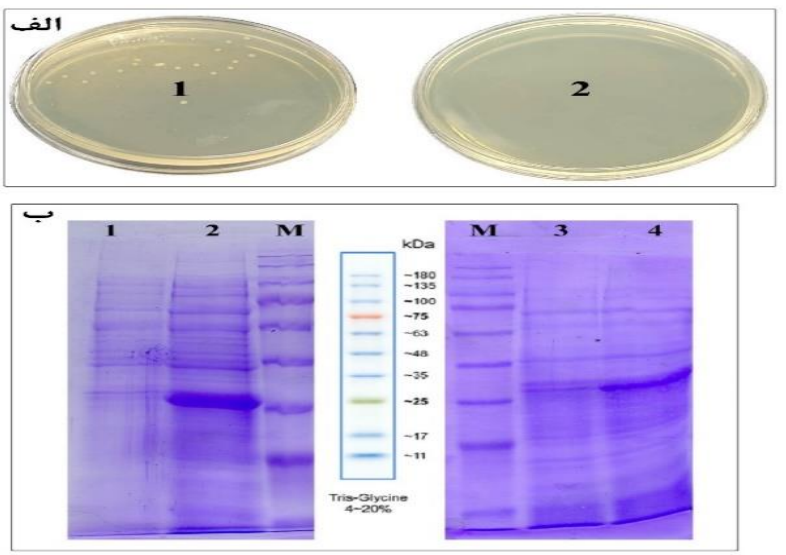
شکل ۲. بررسی اپی توپ‌های فضایی در پروتئین TolC، (A) ساختار سوم پیش‌بینی شده از پروتئین TolC از باکتری شیگلا فلکسنری، (B) اپی‌توپ‌های فضایی با سرور Discotope فقط در سه ناحیه ۹۰-۷۶، ۳۰۰-۲۸۰ و ۳۳۰-۳۱۰ قرار داشت، (C) اپی‌توپ‌های فضای پیش بینی شده با سرور ElliPro، C1 ۱۰۱ ناحیه با قدرت بالای اپیتوپی به رنگ زرد مشخص شده است، C2 قویترین اپی‌توپ فضایی در ناحیه ۹۳-۶۴ به رنگ زرد مشخص شده است.

Fig 2. Examination of conformational epitopes in the TolC protein. (A) The tertiary structure of the TolC protein from Shigella flexneri predicted, (B) conformational epitopes predicted by the DiscoTope server were identified in three regions: 90–76, 300–280, and 330–310. (C) Epitope predictions from the ElliPro server, C1 corresponding to a region around amino acid 101 having a highly antigenic epitope, and C2 as the strongest conformational epitope located in the zone around amino acids 93–93

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

پیش‌بینی ویژگی‌های پروتئین نوترکیبrTolC

ناحیه اپیتوپیک پروتئین TolC (۳۳۵-۴۰) به عنوان پروتئین نوترکیب (rTolC) مورد ارزیابی قرار گرفت. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین rTolC و آنتی‌ژنیسیته پیش بینی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. ۹۲ درصد (۳۱۰ ناحیه) از ساختار سوم پیش‌بینی شده توسط سرور Phyre 2 با پروتئین TolC شباهت داشت (شکل ۳).



شکل ۳. الف) بررسی ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب به باکتری E. coli روی محیط کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین. پلیت شماره ۱ نمونه سلول مستعد مجاور شده با پلاسمید نوترکیب، پلیت شماره ۲ نمونه سلول مستعد بدون پلاسمید نوترکیب (کنترل منفی). شکل ۳-ب) بررسی بیان پروتئین نوترکیب در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد. ستون ۱- نمونه عدم القای بیان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (کنترل منفی)، ستون ۲- نمونه القای بیان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت، ستون ۳- نمونه عدم القای بیان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (کنترل منفی) ستون ۴- نمونه القای بیان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت، ستون M- نشانگر رنگی پروتئین شرکت سیناکلون.

Fig 3.A) Investigation of recombinant plasmid transformation into E. coli on a selective culture medium containing kanamycin antibiotics. Plate 1: Cell sample containing the recombinant plasmid, Plate 2: Cell sample without the recombinant plasmid (negative control). Fig 3-B): Investigation of recombinant protein expression at 25°C and 37°C. Column 1: Non-induced at 37°C (negative control), Column 2: Induced expression at 37°C for 4 hours, Column 3: Non-induced at 25°C (negative control), Column 4: Induced expression at 25°C for 4 hours, M: Protein marker (Sinaclon)

جدول ۱. پیش‌بینی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و آنتی‌ژنیسته پروتئین rToLC

سرور پیش‌بینی کننده	شاخص پیش‌بینی شده	امتیاز
ProtParam	تعداد اسید آمینه	۳۳۸
	وزن مولکولی (kDa)	۳۷/۱
	PI نظری	۵/۹۲
	نیمه عمر در رتیکلوم پستانداران، In-vitro	۳۰ ساعت
	نیمه عمر در مخمر، In-vivo	۲۰ ساعت
	نیمه عمر در E. coli، In-vivo	۱۰ ساعت
	شاخص ناپایداری*	۲۹/۰۷
	شاخص آلیفاتیک	۷۶/۳۰
VaxiJen	امتیاز آنتی ژنیسیته**	۰/۶۶۳۱

* شاخص ناپایداری کمتر از ۴۰ نشان دهنده پایداری پروتئین می‌باشد.
** حد آستانه برای آنتی ژنیسیته طبق پیش فرض سرور ۰/۴ در نظر گرفته شد

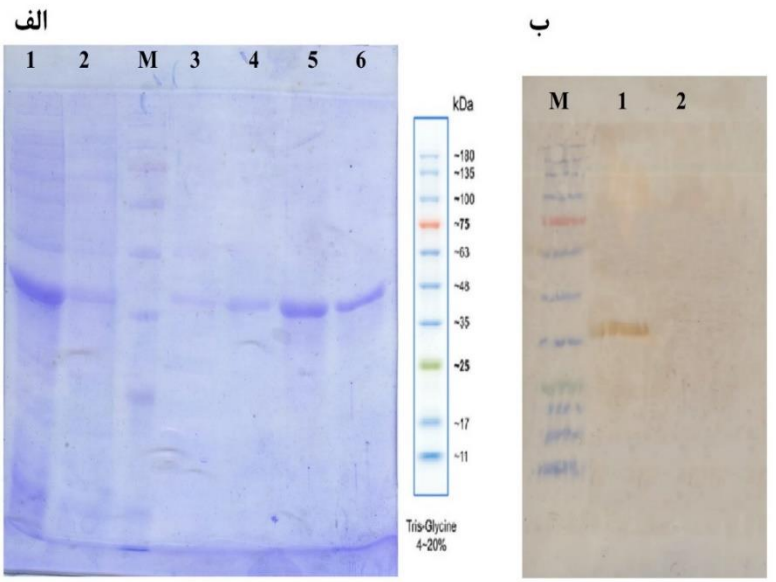
بیان پروتئین نوترکیبrTolC

پس از تأئید ترانسفورماسیون بر روی محیط انتخابی واجد آنتی‌بیوتیک (شکل ۳- الف)، یک کلنی جهت ارزیابی بیان، کشت داده شد. با القای بیان پروتئین، سلول‌های القاء شده و القاء نشده جمع‌آوری و شکسته شدند و پس از افزودن بافر نمونه حاوی SDS ۱۰ درصد بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. نتایج نشان داد که بیان پروتئین با وزن ۴۰ کیلو دالتون در باکتری القاء شده است (شکل ۳-ب)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

تخلیص پروتئین نوترکیبrTolC

تخلیص پروتئین نوترکیب در شرایط غیردناتوره جهت حفظ فولدینگ با استفاده از رزین نیکل انجام شد. برای این منظور پس از عبور محلول لیز باکتری القا شده و اتصال پروتئین نوترکیب به ستون، شست وشوی ستون با بافر ایمیدازول ۵ و ۱۰ میلی‌مولار انجام شد و جهت جداسازی پروتئین نوترکیب rTolC از بافر ایمیدازول ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. باند تخلیصی پروتئین نوترکیب با خلوص بالا بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده گردید (شکل ۴- الف). بازده بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب rTolC در میزبان پروکاریوتی پس از بهینه‌سازی برابر ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر محیط کشت بود. در ادامه پروتئین تخلیص شده با روش وسترن بلاتینگ و با استفاده از آنتی‌بادی ضد توالی His-Tag تأئید گردید (شکل ۴- ب).



شکل ۴. تخلیص پروتئین نوترکیب rTolC با شیب ایمیدازول و تائید پروتئین تخلیص شده با وسترن بلاتینگ.
الف) تخلیص rTolC، ستون ۱- نمونه لیز باکتری القا شده قبل از عبور از ستون، ستون ۲- نمونه عبوری از ستون نیکل، ستون ۳- شست و شوی ستون با ایمیدازول ۵ میلی‌مولار، ستون ۴- شست و شوی ستون با ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، ستون ۵- جداسازی پروتئین نوترکیب با ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار، ستون ۶- جداسازی پروتئین نوترکیب با ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار، ستون M- نشانگر رنگی پروتئین شرکت سیناکلون. ب) وسترن بلاتینگ rTolC، ستون ۱ پروتئین تخلیص شده (ستون ۶ بخش الف)، ستون ۲- پروتئین BSA خالص تجاری به عنوان کنترل منفی، ستون M- نشانگر رنگی پروتئین شرکت سیناکلون.

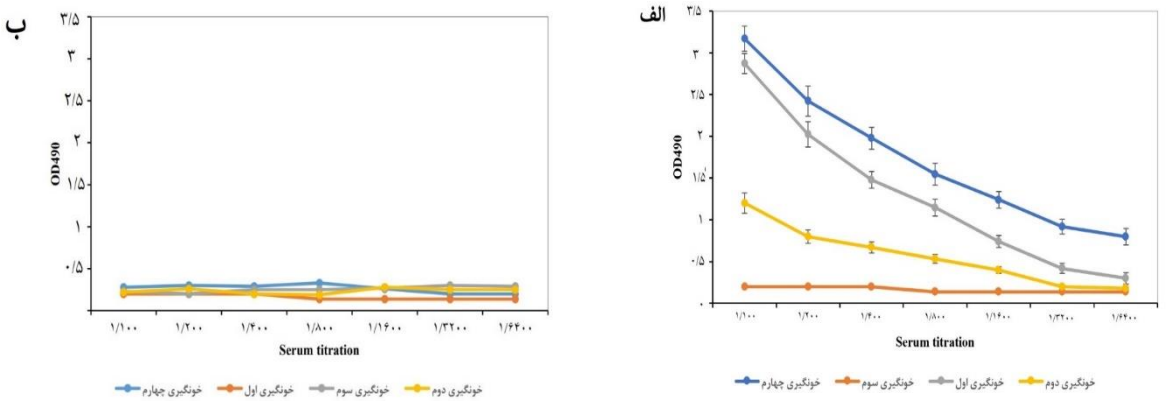
Fig 4. Purification of recombinant rTolC protein with imidazole elution and validation of purified protein by Western blotting. (A) rTolC purification: Column 1: Bacterial sample before passing through the column, Column 2: flow trough sample from Nickel column, Column 3: sample wash with 5 mM imidazole, Column 4: sample wash with 10 mM imidazole, Column 5: Protein elution with 100 mM imidazole, Column 5: Protein elution with 250 mM imidazole, M: Protein marker (Sinaclon). (B) rTolC Western blotting: Column 1: Purified protein (from Column 4 in section A), Column 2: Commercial BSA protein as a negative control, M: Protein marker (Sinaclon).

بررسی تیتر آنتی‌بادی به روش الایزا غیرمستقیم

با بررسی تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه آنتی ژن rToLC در سرم مرغ‌های آزمون مشخص گردید که تیتر آنتی‌بادی قابل توجهی علیه آنتی‌ژن مذکور توسط سیستم ایمنی مرغ‌های آزمون در قیاس با گروه کنترل ایجاد شده است. همانطور که در نمودار دیده می‌شود تیتر آنتی‌بادی پس از هر بار تزریق افزایش داشته، به گونه‌ای که پس از آخرین

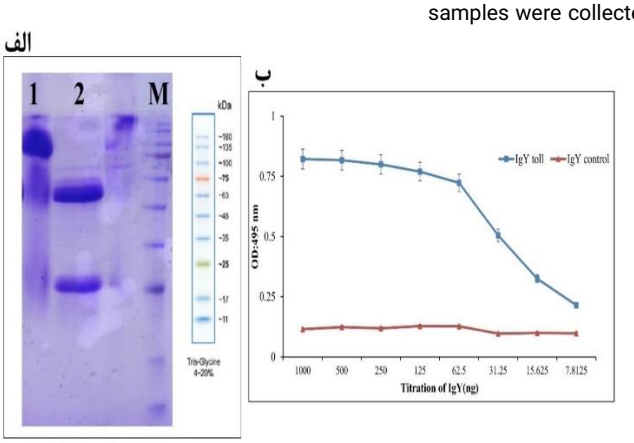
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

تزریق (تزریق سوم/ خونگیری چهارم)، تیتر آنتی‌بادی در سرم مرغ‌های آزمون در رقت ۱ به ۱۰۰، نزدیک به ۳/۵ (بیشترین OD) بوده است (شکل ۵- الف). در مرغ‌های کنترل (PBS) افزایشی در تیتر آنتی‌بادی پس از خونگیری سوم در مقایسه با خونگیری اول مشاهده نشد (شکل ۵- ب).



شکل ۵. بررسی تیتر آنتی‌بادی ضد rTolC در سرم مرغ‌های آزمون (الف) و کنترل (ب). خونگیری اول قبل از شروع واکسیناسیون با ایمونوژن بوده (کنترل منفی) و باقی خونگیری‌ها یک هفته پس از هر تجویز انجام شده.

Fig 5. Measurement of anti-rTolC antibody titers in the sera of test chickens (a) and control chickens (b). The first blood sample was taken before the start of vaccination with the immunogen (negative control), and subsequent blood samples were collected one week after each dose.



شکل ۶. الف- الگوی الکتروفورزی آنتی‌بادی‌ها تخلیص شده در شرایط احیا با دو باند تقریباً ۲۵ و ۵۰ کیلودالتونی (ستون ۲) و غیر احیا با یک باند تقریباً ۱۵۰ کیلو دالتون (ستون ۱). شکل ۶-ب- نتایج الایزا آنتی‌بادی خالص شده با پروتئین نوترکیب rTolC.

Fig 6. (A) Electrophoretic pattern of purified antibodies under reducing conditions, showing two bands at approximately 25 and 50 kDa (lane 2), and under non-reducing conditions, showing a single band at approximately 150 kDa (lane 1), (B) ELISA results of purified antibodies with recombinant rTolC protein.

استخراج آنتی‌بادی از زرده تخم مرغ و بررسی کیفیت آن

پس از تخلیص آنتی‌بادیاز زرده تخم مرغ‌ها، میزان خلوص آن‌ها با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید انجام شد. این بررسی نشان داد که در صورت استفاده از ۲- مرکاپتواتانول، دو قطعه پروتئین با وزن ۶۰ و ۲۵ کیلودالتون که به ترتیب نشان دهنده دو زنجیره سنگین و سبک آنتی‌بادی است، دیده می‌شود و در صورت نبود ۲- مرکاپتواتانول یک باند در حوالی ۱۵۰ کیلو دالتون دیده می‌شود (شکل۶- الف). بازده میزان آنتی‌بادی تخلیص شده از هر تخم مرغ تقریباً ۹ میلی‌گرم محاسبه شد. آنتی‌بادی خالص شده توانست تا غلظت ۷ نانوگرم از آنتی ژن نوترکیب را در مقایسه باIgY مرغ‌های کنترل با واکنش الایزا غیرمستقیم شناسایی کند (شکل۶- ب).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

بحث

عوامل عفونی اسهال مانند شیگلا در جوامع پیشرفته و بخصوص در کودکان، آمار بالای بیماری و مرگ ومیر را دارد (۱۴). سالانه حداقل ۸۰ میلیون نفر در جهان توسط شیگلا آلوده شده که ۷۰۰ هزار نفر از آن‌ها فوت می‌شوند (۱۵). افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین فقدان واکسن برای درمان و پیشگیری علیه گونه‌های شیگلا. باعث شده است که مطالعات زیادی به منظور کنترل این بیماری انجام شود (۱۶ و ۱۷). در میان کاندیدهای ایمونوژن نوترکیب، پروتئین‌های غشای خارجی که بیشتر در معرض سیستم ایمنی میزبان هستند، به عنوان کاندید واکسن پیشنهاد می‌شوند لذا انتخاب افلاکس پمپ‌ها به این منظور مناسب می‌باشد (۱۸).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک تهدید برای سلامت عمومی در سراسر جهان است که باعث منسوخ شدن داروهای آنتی‌بیوتیکی موجود می‌شود. از جمله مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بیان بیش از حد افلاکس پمپ‌ها،مانند AcrA-AcrB-TolC است که ترکیبات متنوعی را از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها و سم‌های به بیرون از باکتری پمپ می کند.

از این رو نقش بسزایی در مقاومت دارویی دارند و از طرفی به تشکیل بیوفیلم باکتری نیز کمک کرده و باعث مقاومت بیشتر باکتری می‌شوند (۱۹ و ۲۰). اخیراً در مطالعات متعددی از بخش خارجی پروتئین مذکور یا همان TolC با اهداف درمانی استفاده شده است. لو (Leow) و همکاران با مطالعات واکسیناسیون معکوس بر روی پروتئین‌های شیگلا فلکسنری پنج پروتئین را به عنوان کاندید مناسب واکسیناسیون معرفی کرده‌اند که پروتئین TolCیکی از آن‌ها می‌باشد (۲۱). ویسی و همکاران نیز این پروتئین را به عنوان کاندید مناسب مطالعات بیوانفورماتیک انتخاب کرده و با طراحی پروتئین نوترکیب ایمنی‌زایی آن را در موش سنجیده‌اند (۱۸). در مطالعه بصیر و همکاران نیز برای پیش‌بینی کاندید واکسن علیه شیگلا سونئی پس از بررسی خصوصیات فیزیکی وشیمیایی، پروتئین TolC به عنوان یک پروتئین آنتی ژنیک انتخاب شد (۲۲). مطالعات کوروناکیس (Koronakis) و همکاران نشان داده است که در میان پروتئین‌های غشای خارجی باکتری E.coli پروتئینTolC از پروتئین‌هایی نظیر OmpA، OmpF و FepA بزرگ‌تر بوده و بیشتر در معرض سیستم ایمنی قرار دارد (۲۳). ویسی و همکاران نیز پروتئین TolC را توانستند با موفقیت بیان کنند و افزایش تیتر آنتی‌بادیعلیه آن را در موش آزمایشگاهی تأئید کنند و در نهایت به عنوان یک کاندید واکسن علیه شیگلا فلکسنری معرفی کردند (۱۸). تمام مطالعات فوق مؤید انتخاب پروتئین TolC به عنوان کاندید ایمونوژن بود.

ما نیز با بررسی مقالات واکسینولوژی معکوس (۲۱ و ۲۲) و سنجش ایمنی‌زایی بخش‌های مختلف افلاکس پمپ‌ها، پروتئین AcrAB–TolC را به‌عنوان یکی از کلیدی‌ترین پروتئین‌ها انتخاب کردیم (۱۸، ۲۰ و ۲۴). در مطالعه حاضر، پروتئین TolC ابتدا برای ویژگی‌های همسانی و پیوندهای مناسب حفاظتی، آنتی‌ژنیسیته، حلالیت و پیش‌بینی اپی توپ توسط ابزارهای بیوانفورماتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که TolC از S. flexneri A0A822PEA8 در بین گونه‌های شیگلا بسیار حفاظت شده بود که ایمن‌سازی ناشی از TolC به‌عنوان کاندیدای واکسن جهانی می‌تواند در برابر شیگلوز ناشی از شیگلا فلکسنری،شیگلا دیسانتری و شیگلا سونئی مؤثر باشد. TolC پروتئین بزرگی به شکل یک کانال می‌باشد که سمت بتا بشکه در غشای خارجی باکتری قرار گرفته و بخش آلفا هلیکس بشکه در سمت پری پلاسمیک است و باید

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

بخشی را به عنوان ایمونوژن انتخاب کرد که در معرض سیستم ایمنی میزبان بوده و آن را تحریک کند (۲۵). لذا به کمک ابزارهای ایمونوانفورماتیک نواحی اپیتوپیک این پروتئین را پیش‌بینی کرده که همان شامل بخش‌های بشکه‌ای مانند از نوع صفحات بتا بود (شکل C1 -۲) و ناحیه ۳۳۵-۴۰ از این پروتئین را برای مراحل بعد انتخاب کردیم. در نهایت، پروتئین rTolC از طریق ابزارهای بیوانفورماتیک به عنوان یک توالی ایمونوژن انتخاب و برای بیان مناسب در میزبان باکتریایی بهینه‌سازی شد. در مطالعه حاضر، پروتئین rTolC با راندمان بیانی بالا به کمک ستون Ni-NTA تخلیص و آماده تزریق به مدل حیوانی مرغ گردید.

استخراج آنتی‌بادی از زرده تخم مرغ در مقایسه با سرم حیوانات دارای مزایایی است از جمله اینکه زرده تخم مرغ حاوی مقادیر زیادی آنتی‌بادی (IgY) علیه ایمونوژن می‌باشد (۲۶ و ۲۷). طبق تحقیقات شاین (Shin) و همکاران ۱ میلی‌لیتر از زرده هر تخم مرغ حاوی ۴/۹ میلی‌گرم IgY است. هر مرغ در سال ۲۵۰ تخم می‌گذارد که معادل ۴۰۰۰ میلی لیتر زرده می‌باشد لذا هر مرغ ایمن شده توانایی تولید تقریباً ۱۹/۶ میلی‌گرم IgY در سال را داراست (۲۸). از طرفی استفاده خوراکی ازIgYهای تولید شده علیه بسیاری از عوامل بیماری‌های گوارشی نظیر انتروتوکسیژنیک اشرشیاکلای (Enterotoxigenic Escherichia coli) (۲۹)، روتاویروس‌های انسانی (Rotaviruses) (۳۰) و سودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa) (۳۱) به‌طور موفق گزارش شده است. در مطالعه‌ای آنتی‌بادی IgY علیه پروتئین نوترکیب کایمر شامل IpaD، StxB و TolC در زرده تخم‌مرغ تولید شده که در نهایت نشان داده شد در موش توانایی زنده مانی ۷۰ درصدی در مواجه با LD50 ۱۰ از باکتری شیگلا فلکسنری را دارد (۳۲). در مطالعه‌ای دیگر پروتئین TolC به عنوان کاندید واکسن در موش‌ها استفاده شد که توانست تا ۶۰ درصد مرگ ومیر را هنگام چالش نسبت به موش‌های کنترل کاهش دهد. مهم‌تر اینکه سرم موش‌های ایمن شده که حاوی آنتی‌بادی ضد TolCبوده توانسته در In-vitro فاگوسیتوز باکتری E. coli را توسط ماکروفاژها افزایش دهد که نشان دهنده کارآمدی آنتی‌بادی ضد TolC در مبارزه با باکتری می‌باشد (۳۳).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اولین پژوهش جهت تولید آنتی‌بادی مرغی ضد پروتئین TolC است که در ادامه این پژوهش پیشنهاد می‌شود که اثرگذاری آنتی‌بادی‌های پلی کلونال تولیده شده بر خنثی‌سازی افلاکس پمپ‌ها در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بررسی گردد.

سپاس و قدردانی

بدینوسیله از حمایت‌های مالی دانشگاه جامع امام حسین جهت انجام این پژوهش قدردانی می‌گردد.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1.Levine MM, Kotloff KL, Barry EM & et al. Clinical trials of Shigella vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. Nat Rev Microbiol 2007; 5(7): 540-53. 10.1038/nrmicro1662

2.Lampel KA, Formal SB and Maurelli AT. A Brief History of Shigella. EcoSal Plus 2018; 8(1). 10.1128%2Fecosalplus.ESP-0006-2017

3.Gentle A, Ashton PM, Dallman TJ & et al. Evaluation of Molecular Methods for Serotyping Shigella

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

flexneri. J Clin Microbiol 2016; 54(6): 1456-61. 10.1128/jcm.03386-15
4.Hosangadi, D, WHO consultation on ETEC and Shigella burden of disease, Geneva, 6-7th April 2017: Meeting report. Vaccine 2019; 37(50): 7381-90. 10.1016/j.vaccine.2017.10.011
5.Qiu Sh, Wang Y, Li P & et al. Multidrug-resistant atypical variants of Shigella flexneri in China. Emerg Infect Dis 2013; 19(7): 1147-50. 10.3201%2Feid1907.111221
6.Taneja N & Mewara A. Shigellosis: Epidemiology in India. Indian J Med Res 2016; 143(5): 565-76. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4989829/
7.Hassan, K.A, et al. Homologs of the Acinetobacter baumannii AceI transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. mBio 2015; 6(1): e01982-14. 10.1128/mbio.01982-14
8.Blanco P, ernando-Amado S, Reales-Calderon JA & et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. Microorganisms 2016; 4(1): 14. 10.3390/microorganisms4010014
9.Alav I, Kobylka J, Kuth MS & et al. Structure, Assembly, and Function of Tripartite Efflux and Type 1 Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria. Chem Rev 2021; 121(9): 5479-5596. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00055
10.Klemperer F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. Archiv für experimentelle pathologie und pharmakologie 1893; 31: 356-382. 10.1007/BF01832882
11.Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT & et al. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. Int Immunopharmacol 2019; 73: 293-303. 10.1016/j.intimp.2019.05.015
12.He F. Laemmli-SDS-PAGE. bio-protocol 2011; 1(11). https://bio-protocol.org/pdf/Bio-protocol80.pdf
13.Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. Cold Spring Harb Protoc 2020; 2020(4): 102269. 10.1101/pdb.prot102269
14.Ahmed SF, Riddle MS, Wierzba TF & et al. Epidemiology and genetic characterization of Shigella flexneri strains isolated from three paediatric populations in Egypt (2000-2004). Epidemiol Infect 2006; 134(6): 1237-48. 10.1017/s095026880600642x
15.Jolly-Ryan J. Ebolamania and Equal Protection of Health Care Workers Under Rational Basis with Bite Review. WVLR 2017; 120(2): 575-627. https://researchrepository.wvu.edu/wvlr/vol120/iss2/8/
16.Ali Nor BSh, Menza NCh, Musyoki AB. Multidrug-resistant shigellosis among children aged below five years with diarrhea at Banadir Hospital in Mogadishu, Somalia. canad J infect dis med microbiol 2021; 2021(1): 6630272. 10.1155/2021/6630272
17.Ebrahimi A A, Ebrahimi S, Aghouli M. Survey of resistance rate of Shigella species isolated from children with diarrhea Fasa, Summer, 1383. Iran South Med J 2009; 12(3): 225-230. (Persian) http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-195-fa.html
18.Veisi R, Nazarian Sh, Fathi J & et al. Expression and purification of TolC as a recombinant protein vaccine against Shigella flexneri and evaluation of immunogenic response in mice. Microbial Pathogenesis 2024; 188: 106539. 10.1016/j.micpath.2024.106539
19.Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence 2013; 4(3): 223-9. https://doi.org/10.4161%2Fviru.23724
20.Coluccia, M., et al., Role of the MDR efflux pump AcrAB in epithelial cell invasion by Shigella flexneri. Biomolecules 2023; 13(5): 823. 10.3390/biom13050823
21.Leow CY, Kazi A, Hisyam Ismail CM & et al. Reverse vaccinology approach for the identification and characterization of outer membrane proteins of Shigella flexneri as potential cellular-and antibody-dependent vaccine candidates. Clin Exp Vaccine Res 2020; 9(1): 15-25. 10.7774%2Fcevr.2020.9.1.15
22.Baseer S, Ahmad S, Ranaghan KE & et al. Towards a peptide-based vaccine against Shigella sonnei: A subtractive reverse vaccinology based approach. Biologicals 2017; 50: 87-99. 10.1016/j.biologicals.2017.08.004

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]

23.Koronakis V. TolC – the bacterial exit duct for proteins and drugs. FEBS Lett 2003; 555(1): 66-71. 10.1016/s0014-5793(03)01125-6
24.Jennison AV, Raqib R, Verma NK. Immunoproteome analysis of soluble and membrane proteins of Shigella flexneri 2457T. World J Gastroenterol 2006; 12(41): 6683-88. 10.3748%2Fwjg.v12.i41.6683
25.Costa T, Felisberto-Rodrigues C, Meir A & et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. Nat Rev Microbiol 2015; 13(6): 343-359. 10.1038/nrmicro3456
26.Li X, Nakano T, Sunwoo HH & et al. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. Poult Sci 1998; 77(2): 266-270. 10.1093/ps/77.2.266
27.Verdoliva A, Basile G, Fassina G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. J Chromatogr B Biomed Sci 2000; 749(2): 233-42. 10.1016/s0378-4347(00)00426-6
28.Shin JH, Yang M, Nam SW & et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9(5): 1061-6. 10.1128%2FCDLI.9.5.1061-1066.2002
29.Marquardt RR, Jin LZ, Kim JW & et al. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic Escherichia coli K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 23(4): 283-8. 10.1111/j.1574-695x.1999.tb01249.x
30.Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR & et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001; 32(1): 19-25. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11176319/
31.Sugita-Konishi Y, Shibata K, Yun SS & et al. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. Biosci Biotechnol Biochem 1996; 60(5): 886-8. 10.1271/bbb.60.886
32.Hadi N, Nazarian S, Rouhi S & et al. Production of egg yolk antibody (IgY) against a chimeric protein containing IpaD, StxB, and TolC antigens from Shigella: An investigation of its prophylactic effects against Shiga toxin (Stx) and Shigella dysenteriae in vitro and in vivo. Heliyon 2024; 10(4): e26361. 10.1016/j.heliyon.2024.e26361
33.Silva TO, Costa LVS, L Chagas do Nascimento & et al. The Escherichia coli TolC efflux pump protein is immunogenic and elicits protective antibodies. BioRxiv 2023: qiae201. 10.1101/2023.10.09.559948

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/ismj.27.2.123]