Expression of Multi-Epitope Gene Structure Based on Bacterial Genes of Salmonella Typhimurium and Escherichia Coli in BALB/c Mice

Mikaeel Saeid [1], Doosti Abbas [2], Sharifzadeh Ali [2,3]

1.PhD Candidate, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3950-0443.
2.Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. (Corresponding Author), Tel: 038-33361000, Email: bio.gene84@gmail.com. ORCID ID: 0000-0001-8052-5963.
3.Assistant Professor, Department of Micribiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3063-8086.

ABSTRACT

Background and Aim: Chitosan nanoparticles are becoming a popular alternative to deliver nucleic acids to tissues for gene transfer. The present study was carried out to design a combined multi-epitope gene construct based on the pathogenic genes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli strain O157:H7 and to transfer it to BALB/c mice with the help of chitosan nanoparticles.

Materials and Methods: In this experimental study, pcDNA3.1(+) recombinant vector containing a multi-epitope gene construct was designed and synthesized. E. coli strain TOP10F was transformed with the mentioned vector. Using the plasmid extraction kit, the plasmid was extracted from the transformed bacteria and confirmed. In the next step, this recombinant vector was combined with chitosan nanoparticles, and the characteristics of the complex after production were investigated. Plasmid-containing complexes with or without nanoparticles were injected into the thigh muscle of animals at time intervals of 0, 7, and 14 days. The animal tissue was collected, and the expression of gene structure and cytokines (IFN-γ and IL-10) was analyzed by the reverse transcription method. The spleen tissue of the animals was also examined histopathologically.

Results: The correctness of the synthesis and extraction of the recombinant vector was successfully confirmed. Chitosan nanoparticles and recombinant vector were combined in the ratio (1:1). In animals treated with the recombinant vector, compared to the control group, the expression of the gene construct was successfully confirmed. Examination of cytokines showed that the cellular immune response increased in the challenge groups compared to the control group. However, the structure of the spleen tissue in the group that was transferred with the recombinant vector carrying the gene construct along with chitosan nanoparticles was healthy and normal.

Conclusion: The recombinant vector, after combining with chitosan nanoparticles, was correctly transferred and expressed in the animal tissue, and there was no damage to the spleen pulp. In the future, this multi-epitope gene structure can be used as a vaccine against Salmonella Typhimurium and Escherichia coli.

Key words: Chitosan nanoparticles, Gene transfer, Recombinant vector, Combined multi-epitope gene construct.

Received: Feb 24, 2024 **Accepted:** July 14, 2024

How to cite the article: Mikaeel Saeid, Doosti Abbas, Sharifzadeh Ali. Expression of Multi-Epitope Gene Structure Based on Bacterial Genes of Salmonella Typhimurium and Escherichia Coli in BALB/c Mice.SJKU 2025;30(2):29-45.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

بیان سازه ژنی چند اپی‌توپی بر پایه ژن‌های باکتریایی سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیاکلی در موش BALB/c

سعید میکائیل[۱]، عباس دوستی[۲]، علی شریف‌زاده[۳]

۱. دانشجوی دکتری،گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۳-۳۹۵۰-۰۴۴۳-۰۰۰۰

۲. استاد، گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.(نویسنده مسئول)، تلفن ثابت: ۳۳۳۶۱۰۰۰-۰۳۸ پست الکترونیک: bio.gene84@gmail.com ، کد ارکید: ۰۰۰۱-۸۰۵۲-۵۹۶۳-۰۰۰۰

۳. دانشیار ، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۲-۳۰۶۳-۸۰۸۶-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات کیتوزان در حال تبدیل‌شدن به یک جایگزین محبوب برای رساندن اسیدهای نوکلئیک به بافت‌ها برای انتقال ژن (ژن‌درمانی) هستند. مطالعه حاضر، باهدف طراحی سازه ژنی چند اپی‌توپی ترکیبی بر پایه ژن‌های بیماری‌زای سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی سویه O157:H7 و انتقال آن با کمک نانوذرات کیتوزان به موش BALB/c، انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+) حاوی سازواره ژنی چند اپی‌توپی، طراحی و سنتز گردید. باکتری E.coli سویه TOP10F با وکتور مذکور ترانسفورم گردید. با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، از باکتری‌های ترانسفورم شده، پلاسمید استخراج و تأیید گردید. در مرحله بعد، این ناقل نوترکیب همراه با نانوذرات کیتوزان ترکیب شد و ویژگی‌های کمپلکس پس از تولید، موردبررسی قرار گرفت. کمپلکس‌های حاوی پلاسمید به همراه نانوذرات یا بدون نانوذرات، در فواصل زمانی ۰، ۷ و ۱۴ روز به عضله ران حیوانات تزریق شد. بافت حیوان جمع‌آوری و بیان سازه ژنی و سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-10 به روش رونوشت برداری معکوس موردبررسی قرار گرفت. بافت طحال حیوانات نیز موردبررسی هیستوپاتولوژیک قرار گرفت.

یافته‌ها: صحت سنتز و استخراج وکتور نوترکیب با موفقیت تأیید شد. نانوذرات کیتوزان و وکتور نوترکیب به نسبت (۱:۱) ترکیب شدند. در حیوانات تحت تیمار با ناقل نوترکیب در مقایسه با گروه کنترل، بیان سازه ژنی با موفقیت تائید شد. بررسی سایتوکاین‌ها نشان داد که پاسخ ایمنی سلولی در گروه‌های چالش نسبت به گروه کنترل افزایش یافت؛ اما ساختار بافت طحال در گروهی که وکتور نوترکیب حامل سازه ژنی به همراه نانو ذرات کیتوزان منتقل شده بود، سالم و طبیعی بود.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان داد که وکتور نوترکیب پس از ترکیب با نانوذرات کیتوزان، در بافت حیوان به‌درستی انتقال‌یافته، بیان شده است و آسیبی به پالپ‌های طحال نرسیده است. می‌توان در آینده از این سازه ژنی چند اپی‌توپی به‌عنوان واکسن علیه سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: نانوذرات کیتوزان، انتقال ژن، وکتور نوترکیب، سازه ژنی چند اپی‌توپی ترکیبی

وصول مقاله:۱۴۰۲/۱۲/۵ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۳/۴/۱۷ پذیرش:۱۴۰۳/۴/۲۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

مقدمه

قبل از تعیین اولین توالی کدکننده انسانی، گمانه‌زنی‌هایی در مورد چشم‌انداز ژن‌درمانی وجود داشت. یک مقاله که در سال ۱۹۷۱ در ژورنال Science منتشر شد (۱)، بسیاری از مشکلاتی را که ژن درمانی بالینی با آن مواجه بود، از جمله ساخت ناقل‌های انتقال ژن ویروسی ایمن و تحویل ژن کارآمد به سلول‌های بیمار پیش‌بینی کرد. در حال حاضر، همان مسائل همچنان ادامه دارند؛ اما پیشرفت قابل توجهی در این زمینه حاصل شده است. برخلاف مفهوم ساده جایگزینی ژن، اکثر آزمایش‌های بالینی ژن درمانی تا به امروز شامل «افزودن ژن» بوده است. با این حال، مطالعات کنونی بر بهبود مدل‌های تحویل اسید نوکلئیک یا افزایش ناقل‌های ویروسی و غیر ویروسی تمرکز دارند و به دنبال ساخت واکسن‌های ژنی و بهبود روش انتقال آن‌ها هستند (۲ و ۳).

سالمونلا تیفی‌موریوم که به نام سالمونلا غیرتیفوئیدی نیز شناخته می‌شود، یکی از عوامل اصلی بیماری‌های گوارشی ناشی از غذا در انسان است. ازآنجایی‌که آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های پاتوژن گرم منفی کارایی کمتری دارند، توسعه واکسن‌های قدرتمند یک رویکرد جایگزین برای کنترل و پیشگیری از بیماری‌های عفونی سالمونلا است. در حال حاضر هیچ واکسن مجازی برای مبارزه با عفونت باکتریایی غیرتیفوئیدی ناشی از *S. Typhimurium* در دسترس نیست (۵ و ۴).

E. coli 0157:H7 متعلق به گروهی از *E. coli* ها به نام سویه‌های *E. coli* انتروهموراژیک است. این ارگانیسم‌ها می‌توانند حتی در افراد نسبتاً سالم خطرناک باشند. آن‌ها می‌توانند باعث بیماری‌های شدید؛ مانند کولیت هموراژیک، سندرم اورمیک همولیتیک و پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک شوند (۷ و ۶). مقاومت آنتی-بیوتیکی *E. coli* به دو دلیل عمده به طور گسترده موردمطالعه قرار گرفته است. اولاً، رایج‌ترین پاتوژن گرم منفی عفونی برای انسان است، ثانیاً، *E. coli* مقاوم می‌تواند از طریق انتقال عوامل تعیین‌کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سایر باکتری‌های دستگاه گوارش را تحت‌تأثیر قرار دهد. راه‌حل جایگزین برای مبارزه با این پاتوژن، طراحی یک واکسن مؤثر علیه پاتوتیپ‌های رایج آن است (۸).

واکسن‌های چند اپی‌توپی از چندین اپی‌توپ محدود شده با MHC (Major histocompatibility complex) تشکیل شده‌اند. اجزای واکسن کمکی چند اپی‌توپی می‌توانند ایمنی‌زایی را افزایش دهند، پاسخ‌های ایمنی طولانی‌مدت را فراهم کنند و اجزای ناخواسته‌ای را کاهش دهند که می‌توانند باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی پاتولوژیک یا اثرات نامطلوب شوند (۱۰ و ۹). واکسن‌های چند اپی‌توپی از نظر اثربخشی نسبت به واکسن‌های تک‌جزئی برتری دارند (۱۱). برای برخی از عفونت‌های باکتریایی، تظاهرات بالینی همپوشانی دارند و عامل بروز عفونت بیش از یک باکتری است و استفاده از واکسن ترکیبی برای محافظت راه‌حل مناسبی است. مزایای واکسن‌های ترکیبی به‌حداقل‌رساندن دفعات تزریق، کاهش هزینه واکسیناسیون و تسهیل گنجاندن واکسن‌های جدید در برنامه ایمن‌سازی است (۱۲).

در همین راستا، مطالعه حاضر به‌منظور بیان سازه ژنی چند اپی‌توپی ترکیبی بر پایه ژن‌های بیماری‌زای سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی سویه O157:H7 در موش BALB/c است.

مواد و روش‌ها

سنتز سازواره ژنی

در این مطالعه تجربی، روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه‌ای و تجربیات آزمایشگاهی است. لازم به ذکر است که تمام کارهای پژوهشی این مطالعه با رعایت کامل اصول اخلاقی (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.1402.050) انجام گرفته است.

توالی مورد نظر به صورت سازواره ژنی طراحی و برای سنتز به شرکت‌های ذیربط ارسال شد. به این ترتیب که ابتدا از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

پایگاه داده NCBI برای به دست آوردن ژنوم‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی سویه O157:H7 استفاده گردید. سپس مجموعه داده Vaxign (https://violinet.org/vaxign)، برای شناسایی پروتئین‌های بالقوه بیماری‌زا در سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی استفاده شد. هنگامی کهUniprot (https://www.uniprot.org) وجود پروتئین‌ها را تأیید کرد، از وب سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information (nih.gov)) برای انتخاب شماره دسترسی پروتئین‌ها استفاده شد. توالی‌های اسید آمینه پلی‌پپتید برای وجود اپی توپ‌های خطی با استفاده از وب سایت ABCpred (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred) بررسی شدند. به منظور پیش‌بینی توالی‌های تعامل MHC کلاس I، از پایگاه داده NetMHCpan 4.1 (NetMHCpan 4.1 - DTU Health Tech - Bioinformatic Services) استفاده گردید. الگوریتم شناسایی پپتید متصل شونده MHC کلاس II در وب سایت IEDB برای پیش بینی توالی‌هایی که به مولکول‌های MHC کلاس II مرتبط هستند، مورد استفاده قرار گرفت؛ بنابراین، یک سازه چند پپتیدی با پیوستن چندین اپی‌توپ، برای ایجاد سازه ژنی نهایی ترکیب شد. سپس، یک ادجوانت مولکولی مناسب (CPG)، به انتهای C ترمینال توالی سازه انتخابی اضافه گردید. در مرحله بعد، اطلاعات مربوط به توالی وکتورالقایی pcDNA3.1(+)، از سایت Addgene(https://www.addgene.org) بـه دست آمد و با اسـتفاده از نـرم افـزار Gene Runner جایگاه برش آنـزیم‌های محدود کننده مشخص شد. اندازه این وکتور ۵۳۸۳ جفت باز است و دارای مارکر مقاومت به آنتی-بیوتیک‌های نئومایسین و آمپیسیلین به عنوان شاخص انتخاب‌گر و یک جایگاه برش چندگانه برای ورود ژن است. توالی سازه ژنی طراحی شده بـه طـول ۱۲۱۸ جفت باز درون وکتور مذکور طراحی گردید. سپس وکتور نوترکیب توسط شرکتGENEray کشور چین کلون شد. در نهایت وکتور نوترکیب با اندازه ۶۶۰۱ جفت باز با استفاده از جایگاه‌های برش EcoRI-XbaI ساخته شد. وکتور خالی pcDNA3.1(+) نیز تهیه شد.

سازگاری کدون‌ها و شبیه‌سازی in silico

سازگاری کدون مؤثرترین روش برای افزایش کارایی ترجمه ژن است؛ زیرا تفاوت در استفاده از کدون، ترجمه ژن‌های خارجی را محدود می‌کند. کدون اپتیمیزاسیون سازه ژنی ابداع شده ما در مورد میزبان موشی انجام گرفت. جهت بیان بیشتر در سلول یوکاریوتی توالی کوزاک افزوده شد و یک قطعه ۳۹۹ آمینواسیدی سنتز شد. توالی کدون اصلاح شده سازه ژنی، بین سایت‌های برش EcoRI و XbaI ناقل بیانی pcDNA3.1(+) قرار داده شد، برای آسان‌تر کردن خالص‌سازی کروماتوگرافی ایمنی سازه، یک قسمت ۶ هیستیدینی نیز درج شده است.

تأیید صحت کلون شدن سازه ژنی در وکتور pcDNA3.1(+)

واکنش PCR برای ردیابی سازه به‌وسیله پرایمرهای اختصاصی و برنامه دمایی اشاره شده در ذیل انجام و محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز شد. واکنش PCRدر حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر از بافر PCR 10x (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۲ میلی‌مولار MgCl2 (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها (سیناژن، ایران) (توالی و مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در جدول ۱ بیان شده است.)، ۱۰۰ نانوگرم از DNAپلاسمید و ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز (Taq یکتا تجهیز آزما، ایران) در دستگاه ترمال سایکلر گرادیانت (اپندورف، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل، یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ مرحله تکراری شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، ۶۳ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

نهایت طویل شدن نهایی یک‌مرحله‌ای در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۱۳). محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شد و باندها با دستگاه عکس‌برداری از ژل (Tech UVI، انگلستان)، مشاهده و ثبت گردید. هضم آنزیمی و توالی‌یابی وکتور نوترکیب توسط شرکت GENEray با استفاده از آنزیم‌های برشی EcoRI-XbaI انجام شده و نتایج دریافت شدند.

جدول ۱. توالی و مشخصات پرایمرهای طراحی شده

نام محصول	توالی (3 to 5)	دمای اتصال پرایمر	طول محصول
Gene construct	Gene construct-F-5'-ATGAGCCCTAGCGTGAGGCAC -3' Gene construct-R-5'-GCCCATCACGATGGCAGGCAC -3'	۶۳°C	۱۲۱۸bp
IFN-γ	IFN-γ-F: 5'- GCCTAGCTCTGAGACAATGAACG -3' IFN-γ-R: 5'- GCCAGTTCCTCCAGATATCCAAG -3'	۶۴°C	۱۸۸bp
IL-10	IL-10-F: 5'-CTGGACAACATACTGCTAACCGACTC-3' IL-10-R: 5'- TCTTCACCTGCTCCACTGCCTTG -3'	۶۷°C	۲۵۰bp

تکثیر و استخراج پلاسمید

باکتری E. coli سویه TOP10 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری و در محیط کشت Luria-Bertani (LB) (مرک، آلمان) کشت داده شد و سپس به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) انکوبه گردید. وکتور نوترکیب نامبرده و وکتور خالی با استفاده از روش کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) و شوک حرارتی (۴۲ درجه سلسیوس برای ۹۰ ثانیه) به درون سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شدند. کلنی‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB آگار، حاوی آمپی‌سیلین (۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) رشد کردند و انتخاب شدند. صحت انجام ترانسفورماسیون با استفاده از روش PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی تأیید شد. کلنی‌های ترانسفورم شده در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth حاوی آمپی‌سیلین در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت شدند (۱۴). DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید یکتا تجهیز آزما طبق دستورالعمل کیت، خالص‌سازی شد. کیفیت پلاسمیدهای استخراج شده توسط نانودراپ (ترموساینتیفیک ۲۰۰۰، آمریکا) در طول‌موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت تأیید استخراج پلاسمید نوترکیب، واکنش PCR بر روی پلاسمید استخراج شده با پرایمرهای اختصاصی سازه ژنی انجام شد.

تهیه نانوذرات کیتوزان به همراه وکتور

جهت تهیه محلول نانوذره کیتوزان و DNA پلاسمیدی، محلول نانوذره (۱۰۰ میکروگرم) به مدت یک شب در ۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۵/. درصد (w.v) با استفاده از یک همزن چرخشی حل شد. محلول رقیق شده نانوذره کیتوزان با استفاده از فیلتر سرنگ ۲/. میلی‌متری استریل فیلتر گردید. DNA پلاسمید تا غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با محلول Na_2SO_4 (۵/. mmol.L) رقیق شد. سپس، نانوذرات کیتوزان رقیق شده قبل از مخلوط‌شدن با پلاسمید، با استفاده از فیلتر سرنگ ۲/. میلی‌متری فیلتر شدند. در دمای اتاق، ۲۵۰ میکرولیتر محلول نانوذره رقیق استریل به ۲۵۰ میکرولیتر DNA پلاسمیدی اضافه گردید و پیپتینگ انجام شد تا محلول نانوذره/پلاسمید (۱:۱) ساخته شود. سطح مورفولوژی پراکندگی نور پویا (DLS) برای مخلوط نانوذره/پلاسمید در Zetasizer برای اندازه‌گیری اندازه

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

ذرات مورداستفاده قرار گرفت. مورفولوژی سطح نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی (FESEM) و XRD مشاهده شد. برای ارزیابی محتوای نانوذرات کیتوزان از یک آنالایزر گرمایی وزنی بهره گرفته شد. اسیدنوکلئیک فلورسنت OliGreen (غلظت 1X در آب، ۲۵ میکرولیتر) به ۴ نانوگرم DNA پلاسمیدی اضافه گردید و در دمای اتاق در یک منطقه تاریک به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. پس از انکوباسیون، حجم کل توسط آب مقطر به ۵۰۰ میکرولیتر رسانیده و در کووت ریخته شد. برای اندازه‌گیری فلورسانس نسبی با استفاده از تحریک ۴۹۰ نانومتر و طول‌موج‌های گسیل ۵۲۰ نانومتر، از طیف‌سنج لومینسانس فوق‌سریع مورداستفاده قرار گرفت. در نهایت، پلاسمید نوترکیب– نانوذره کیتوزان و پلاسمید خالی– نانوذره کیتوزان برای بررسی کمپلکس‌ها استفاده شد. برای اندازه‌گیری تحرک کمپلکس پلاسمید – نانوذره کیتوزان، از ژل الکتروفورز استفاده گردید. جهت تأیید پایداری کمپلکس‌های پلاسمید – نانوذره کیتوزان، ۱/۳۵ میکروگرم از هر کدام از کمپلکس‌ها، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، با DNase I (1.0 U.mL) تیمار شدند. سپس پروسه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، با افزودن مواد ۴۰۰ میلی‌مول در لیتر NaCl، ۱۰۰ میلی‌مول در لیتر EDTA (pH=8) ادامه پیدا کرد. همچنین ۱۶ میکرولیتر کیتوزاناز (0.2 U.mL) و ۴ میکرولیتر لیزوزیم (0.2 U.mL)اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در بلوک حرارتی ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. برای ارزیابی پایداری DNA پلاسمید از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

آنالیز انتقال ژن

ترکیب تزریقی در چند گروه به موش‌ها تزریق گردید. اطلاعات تزریق در جدول ۲ مشخص شده است.

تعداد ۳۲ سر موش ماده BALB/c ۵ هفته‌ای با میانگین وزن تقریبی ۱۸ گرم در ۴ گروه تقسیم شدند. موش‌ها در گروه‌های نامبرده دسته بندی شده و کمپلکس سازه ژنی به همراه نانو ذرات کیتوزان، بدون نانوذره و پلاسمید خالی را دریافت کردند. برنامه‌ی زمانی تزریق: روزهای ۰، ۷ و ۱۴ تزریق در عضله چهارسر ران موش BALB/c انجام شد. موش‌ها با مقدار ۱۰۰ میکروگرم از پلاسمید حامل سازه ژنی به همراه نانو ذرات کیتوزان و بدون آن در گروه اول و دوم مورد تزریق قرار گرفتند و موش‌های کنترل با ۱۰۰ میکروگرم وکتور خالی و ۱۰۰ میکرولیتر PBS در گروه سوم و چهارم تحت آزمایش قرار گرفتند. پس از گذشت یک ماه پس از آخرین مرحله تزریق، بیان ژن هدف در سطح RNA در بافت محل تزریق با استفاده از روش RT-PCR ارزیابی شد. به این صورت که بر اساس روش کار کیت، استخراج RNA و سنتز cDNA از بافت محل تزریق انجام گرفت و واکنش RT-PCR به کمک پرایمر اختصاصی و برنامه دمایی گفته شده در قبل انجام شد. سپس بافت طحال حیوان مورد بررسی هیستوپاتولوژیک قرار گرفت.

جدول ۲. گروه بندی موش‌ها

تعداد موش	میزان	محلول تزریق شده	شماره گروه
۸	۱۰۰ میکروگرم	پلاسمید حامل واکسن ژنی به همراه نانوذرات کیتوزان	۱
۸	۱۰۰ میکروگرم	پلاسمید حامل واکسن ژنی *بدون* نانوذرات کیتوزان	۲
۸	۱۰۰ میکروگرم	پلاسمید خالی	۳
۸	۱۰۰ میکروگرم	PBS	۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

بررسی بیان سایتوکاین‌ها با real time RT-PCR

در این پژوهش به‌منظور بررسی بیان سایتوکاین از روش real-time PCR استفاده گردید. برای بررسی اثرات سازه ژنی طراحی شده بر روی بیان سایتوکاین‌ها و ایمنی‌زایی در موش‌های دریافت‌کننده کمپلکس سازه ژنی به همراه نانوذرات کیتوزان، بدون نانوذره و پلاسمید خالی، از تکنیک PCR کمی یا real time PCR استفاده شد. نام ژن‌ها و پرایمرهای مورداستفاده برای هر واکنش در جدول ۱ نشان داده شده است. پرایمرهای ژن‌های سایتوکاینی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار Gene Runner نسخه ۳/۰۵ طراحی و سفارش داده شد. توالی هر کدام از ژن‌ها از بانک اطلاعاتی GenBank در NCBI به دست آمد و جایگاه اتصال و شناسایی هر یک از پرایمرها، در پایگاه BLAST این سایت مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. در این مطالعه، میزان بیان ژن‌های سایتوکاینی با بیان ژن *GAPDH* (به عنوان کنترل داخلی) مقایسه شدند و تجزیه‌وتحلیل منحنی استاندارد برای هر کدام از ژن‌ها انجام شد. cDNA هر گروه در رقت سریال‌های ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ و ۱:۳۱۲۵ تهیه گردید. حجم نهایی برای هر واکنش μL ۱۳ بود که حاوی: μL ۱ از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر SYBR green (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران)، μL ۰/۵ از هر دو پرایمرهای F/R، و μL ۴/۵ آب مقطر. همه واکنش‌ها به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامه دمایی زیر انجام شد: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۵ درجه سلسیوس و ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجه سلسیوس به ۹۵ درجه سلسیوس (۱ درجه سلسیوس در ثانیه) رسم شد. جهت محاسبه بیان ژن، چرخه‌های آستانه (CT) توسط نرم‌افزار Rotor-Gene Real-time analysis نسخه ۶ رسم شد.

تغییرات نسبی بیان ژن‌ها توسط روش لیواک $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با مقایسه هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد.

آنالیز آماری

داده‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism ارائه و با استفاده از ANOVA یک‌طرفه مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و پس از آن توسط روش Newman-Keuls چندگانه آزمون مقایسه یا آزمون *t* انجام شد. تفاوت بین دو گروه از نظر آماری $p\leq0.05$ در نظر گرفته شد و تجزیه‌وتحلیل آماری در سطح ۹۵ درصد ارزیابی شد. برای نرمال کردن داده‌ها Ct ژن مورد بررسی در تک تک نمونه‌ها از Ct ژن کنترل داخلی همان نمونه تفریق شد. از آنجایی که داده‌های نرمال برای هر نمونه از تفریق Ct ژن مورد نظر از Ct ژن کنترل داخلی به دست آمده است داده نرمال شده را دلتا Ct (ΔCt)می‌نامیم و بیان نتیجه آزمایش به صورت fold change گزارش شد.

یافته‌ها

سازگاری کدون‌ها و شبیه‌سازی in silico

به‌منظور به‌دست‌آوردن بیان عملی در میزبان، اصلاح کدون برای میزبان موشی انجام شد. مطالعه اتصال مولکولی (molecular docking) همچنین نشان داد که سازه ژنی پیشنهادی با ناحیه اتصال گیرنده TLR4 با حداقل انرژی اتصال (۸۵۶.۶ کیلوکالری بر مول)، برهمکنش می‌کند که نشان‌دهنده میل پیوندی بالا است. پایداری و تحرک TLR4–سازه ژنی در سیستم بیولوژیکی از طریق شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور کلی، شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی نشان داد که سازه ژنی پیشنهادی به طور مناسب پایدار است. علاوه بر این، نتایج شبیه‌سازی ایمونولوژیک نشان داد که سازه طراحی شده یک آبشار ایمنی در برابر میکروارگانیسم‌هایی ایجاد می‌کند که باعث بیماری روده می‌شوند. نتایج حاصل از بررسی‌های in silico نشان داد که سازه طراحی شده مکانیسم‌های

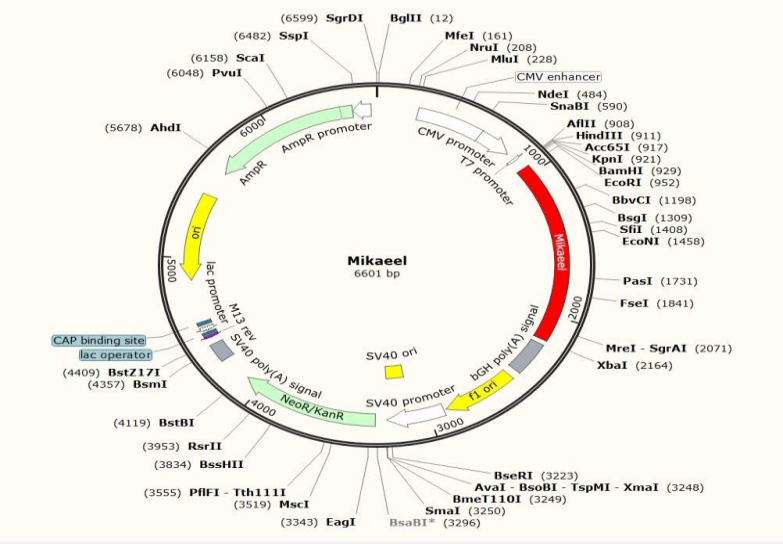
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

دفاعی ثانویه قوی‌تر از پاسخ‌های اولیه ایمونولوژیک ایجاد می‌کند.

نقشه ژنی وکتور نوترکیب

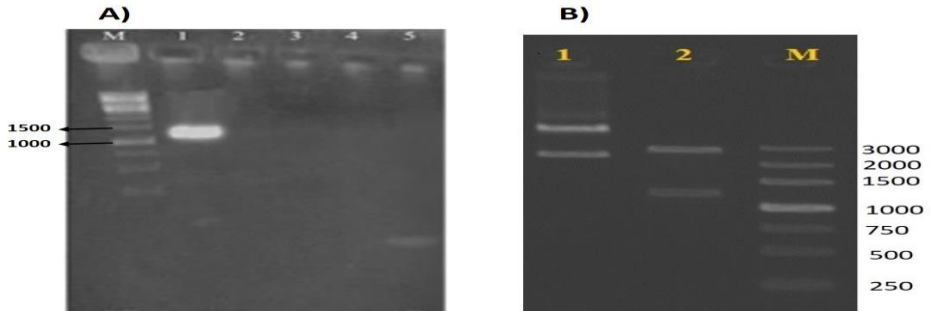
تصویر ۱ شماتیک وکتور طراحی شده و جایگاه قرارگیری سازه ژنی اپی‌توپی و شاخص انتخابی آنتی‌بیوتیکی را نشان می‌دهد.



تصویر ۱. نقشه ژنی وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+) به همراه سازه ژنی اپی‌توپی. جایگاه قرار گیری سازه ژنی در وکتور (با رنگ قرمز) و ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک مشخص شده است.

تأیید صحت وکتور

نتیجه واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی سازه ژنی، به‌منظور تأیید حضور سازه در وکتور pcDNA3.1(+) مشاهده یک باند ۱۲۱۸ جفت بازی روی ژل آگارز بود که تأییدی بر نوترکیب بودن وکتور pcDNA3.1(+) است (تصویر ۲A). همچنین، صحت قرار گرفتن سازه ژنی در وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+) توسط شرکت GENEray با استفاده از روش هضم آنزیمی دوگانه (با کمک آنزیم‌های محدودکننده EcoRI-XbaI و توالی‌یابی وکتور نوترکیب تائید شد و نتیجه به صورت عکس ژل ارسال شد (تصویر ۲B).



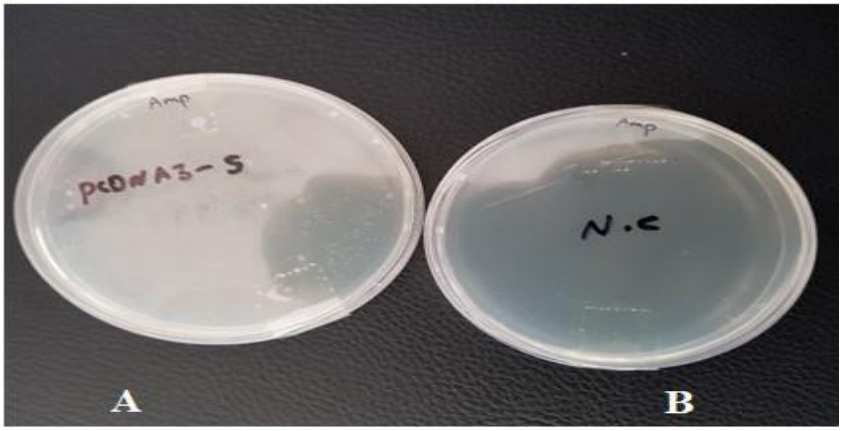
تصویر ۲. تائید سنتز پلاسمید نوترکیب. A: واکنش PCR جهت تائید ساخت پلاسمید نوترکیب با پرایمرهای اختصاصی سازه ژنی. M: مارکر مولکولی ۱ کیلو جفت بازی، ۱ قطعه ۱۲۱۸ جفت بازی مربوط به سازه ژنی، ۲: کنترل منفی، B: هضم آنزیمی دوگانه روی پلاسمید نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های اختصاصی دو سر قطعه (*EcoRI-XbaI*)،M: مارکر،:۱ باندها به ترتیب از بالا به پایین form circular Nicked، form Linear و form supercoiled Circular مربوط به وکتور هستند. ۲: هضم آنزیمی دوگانه که باند ۱۲۱۸ جفت بازی مربوط به قطعه سازه به همراه را نشان می‌دهد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

ترانسفورماسیون E.coli سویه TOP10F با وکتور نوترکیب حامل سازه اپی‌توپی

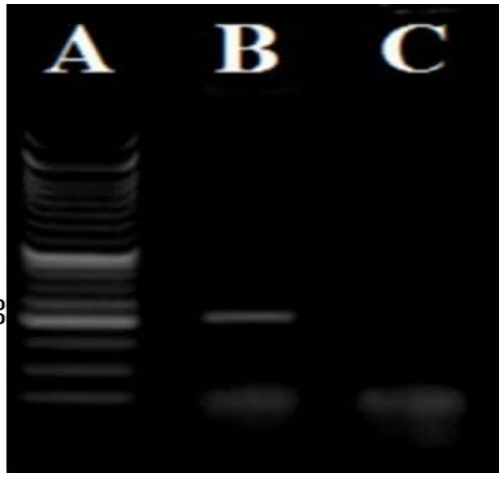
ترانسفورم کردن باکتری اشریشیاکلی با موفقیت انجام شد. نتایج کشت روی محیط Agar-LB حاوی آنتی-بیوتیک آمپی‌سیلین و کنترل منفی، نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن ترانسفورماسیون باکتری‌ها برای انجام ادامه آزمایش‌ها بوده است (تصویر ۳).



تصویر ۳. ترانسفورماسیون E.coli سویه TOP10F. A: ترانسفورماسیون موفقیت آمیز باکتری E.coli با وکتور نوترکیب و رشد آن روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین به عنوان شاخص انتخابی است. B: عـدم رشد باکتری ترانسفورم نشده روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک است (کنترل منفی).

استخراج و تخلیص پلاسمید

اشریشیاکلی ترانسفورم شده، در محیط Broth-LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد و سپس استخراج پلاسمید انجام شد. تعیین غلظت پلاسمید استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ بیانگر کیفیت و میزان مناسب پلاسمیدهای استخراج شده بود. جهت تأیید استخراج پلاسمید، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی سازه ژنی بر پلاسمیدهای استخراج شده انجام شد. باند ۱۲۱۸ جفت بازی مربوط به سازه، صحت استخراج را تأیید کرد (تصویر ۴).



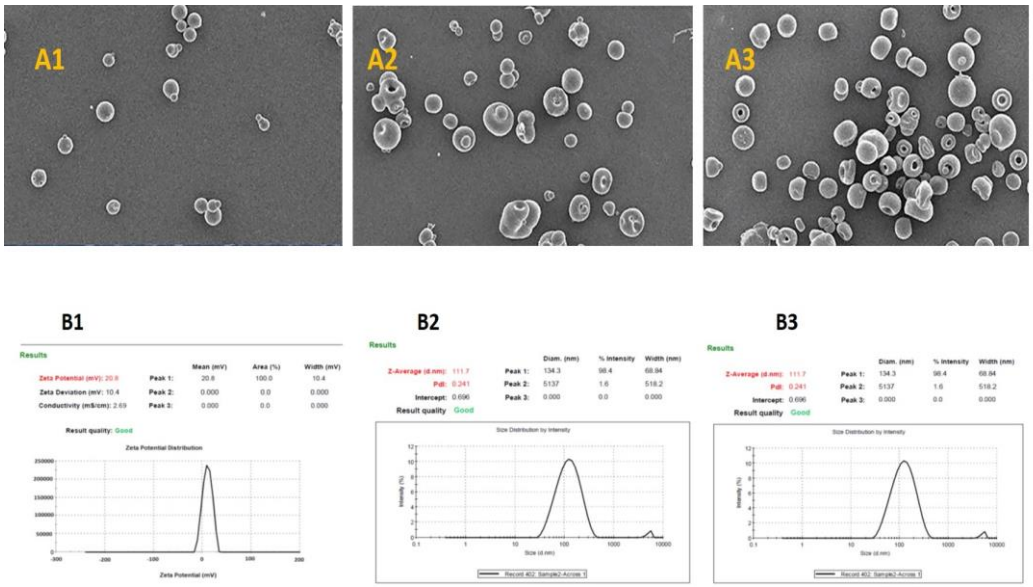
تصویر ۴. واکنش PCR جهت تائید استخراج پلاسمید. A: مارکر مولکولی ۱ کیلو جفت بازی، B: قطعه ۱۲۱۸ جفت بازی مربوط به سازه ژنی، C: کنترل منفی.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

اندازه ذرات، پتانسیل زتا و مورفولوژی سطح DNA پلاسمیدی/ نانوذرات کیتوزان

DNA پلاسمیدی/ نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان با داشتن ساختارهای کروی، به ترتیب دارای اندازه‌های ۵۰/۱۲ و ۲۵/۹۳ نانومتر هستند (تصویر ۵A). اندازه کمپلکس‌ها به عنوان تابعی از نسبت DNA پلاسمیدی/ نانو ذرات کیتوزان در محدوده ۰ تا ۱ مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر کمپلکس‌سازی نانو ذرات با اتصال DNA پلاسمیدی در نسبت‌های مختلف منجر به افزایش اندازه ذرات با افزایش نسبت DNA پلاسمیدی/ نانو ذرات کیتوزان شد. کمپلکس‌های DNA پلاسمیدی/ نانو ذرات کیتوزان یکسان دارای بار مثبت هستند، با پتانسیل زتا بیشتر از ۲۰ میلی‌ولت بررسی شدند. شاخص PDI (polydispersity index) پارامتر مهم دیگری است که عرض یا گسترش توزیع اندازه ذرات را توصیف می‌کند. PDI برای نانو ذرات کیتوزان و DNA پلاسمیدی/ نانو ذرات کیتوزان به ترتیب ۰۹۵/. و ۱۰۷/. بود. با توجه به اینکه شاخص پراکندگی کمتر از ۰.۱ است، کیفیت نانو ذرات تولید شده مناسب و قابل قبول است؛ بنابراین، نوع نانو ذرات تک فاز یا چند فاز تولید شده با استفاده از نمودار XRD تعیین شد. در نتیجه نمودار XRD، حداکثر بازتاب در ۳۰۵۵۸ درجه (تصویر ۵B) برای کمپلکس DNA پلاسمیدی/ نانو ذرات کیتوزان ثبت شد. در مطالعات تحرک الکتروفورتیک، فلورسانس نسبی رنگ اسید نوکلئیک OliGreen نشان می‌دهد که آیاDNA در آزمایش آزاد است یا تا حدی محصور شده است. نمونه حاوی پلاسمید آزاد در آب دارای بالاترین فلورسانس است. کاهش فلورسانس نشان می‌دهد که پلاسمید به حدی پیچیده شده است که تعامل رنگ DNA و فلورسانس دیگر امکان پذیر نیست و در این حالت شدت فلورسنت کمتر رویت شد.



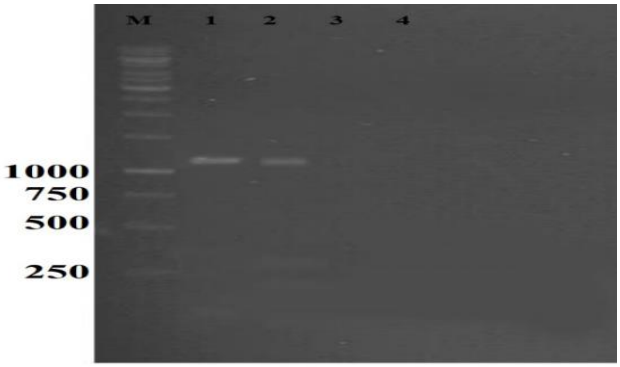
تصویر ۵. ساختار و شرایط نانو ذرات کیتوزان کمپلکس شده. A1: ساختار کروی نانو ذرات کیتوزان، A2: ساختار کروی نانو ذرات کیتوزان به همراه پلاسمید خالی، A3: ساختار کروی نانو ذرات کیتوزان به همراه پلاسمید نوترکیب; B1: الگوی XRD نانو ذرات کیتوزان، B2 الگوی XRD نانو ذرات کیتوزان به همراه پلاسمید خالی، B3: الگوی XRD نانو ذرات کیتوزان به همراه پلاسمید نوترکیب.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

نتایج تحویل ژن

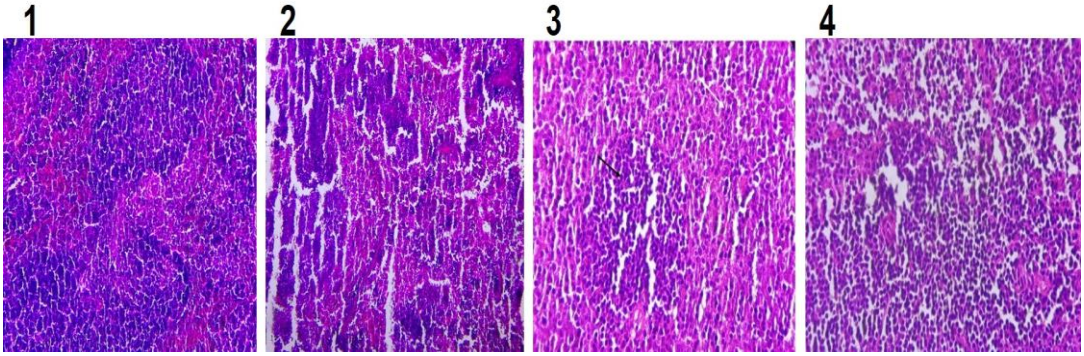
بافت محل تزریق جداگانه با اسکالپل و تیغ جراحی استریل جدا گردید. از بافت‌ها، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام گرفت و بیان قطعه ژنی انتقال‌یافته در بدن حیوان، از طریق واکنش RT-PCR بررسی شد. همان‌گونه که در تصویر شماره ۶ نشان‌داده‌شده است در گروه موش‌هایی که وکتور نوترکیب را به همراه نانوذرات و همچنین وکتور نوترکیب به‌تنهایی را دریافت کرده بودند باند ۱۲۱۸ جفت بازی مربوط به سازه اپی‌توپی رویت شد. در مقابل گروهی که وکتور خالی تزریق شده بود، باند مربوط به این قطعه دیده نشد.



تصویر ۶. ژل آگارز به منظور بررسی بیان سازه ژنی در بافت محل تزریق موش‌های BALB/c با وکتور نوترکیب به تنهایی و یا در ترکیب با نانو ذرات. M، مارکر مولکولی یک کیلو جفت بازی، ۱: گروه مورد تزریق وکتور نوترکیب همراه با نانو ذرات، ۲: گروه مورد تزریق وکتور نوترکیب به تنهایی، ۳: گروه مورد تزریق پلاسمید خالی و ۴: گروه PBS.

نتایج بررسی هیستوپاتولوژیک بافت طحال

همان‌گونه در که تصویر ۷ مشخص است، بافت طحال گروهی که با PBS تیمار شدند پالپ قرمز و سفید طحال کاملاً سالم است (تصویر ۱-۷)، در حیواناتی که پلاسمید خالی (فاقد سازه ژنی) را دریافت کردند پالپ سفید طحال دچار نکروز شدید شده است (تصویر ۲-۷)، در صورتیکه در حیوانات تحت تیمار با وکتور حامل سازه ژنی همراه با نانو ذرات کیتوزان، کمترین آسیب به پالپ‌های سفید و قرمز طحال رسیده است و طحال در شرایط نرمال قرار دارد (تصویر ۳-۷). در مقابل، در حیوانات تحت تیمار با وکتور نوترکیب حامل سازه ژنی بدون نانو ذرات کیتوزان برهم خوردن نظم و ساختار طحال دیده می‌شود و پالپ سفید و قرمز ساختار طبیعی خود را از دست داده‌اند (تصویر ۴-۷).



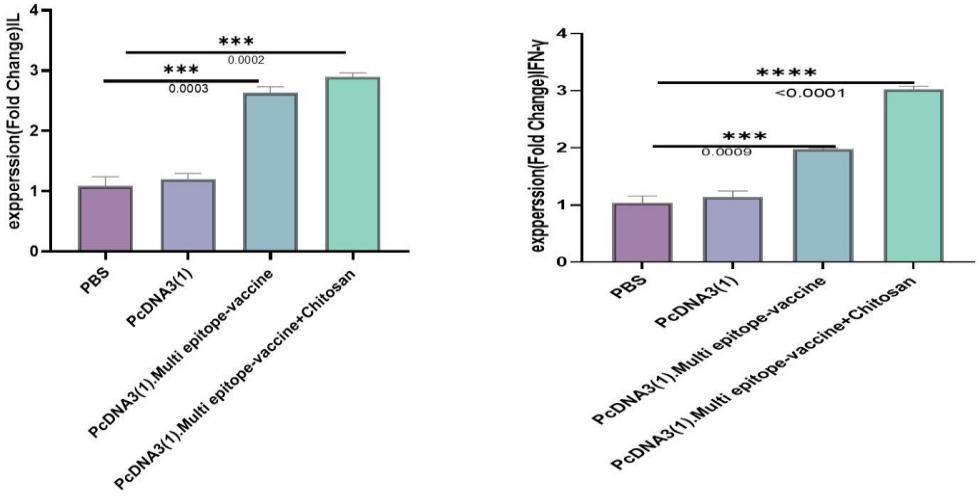
تصویر ۷. بررسی هیستوپاتولوژیک بافت طحال در حیوانات تحت تیمار. ۱: تیمار با PBS، ۲: تیمار با وکتور خالی (نکروز پالپ سفید)، ۳: تیمار با وکتور نوترکیب به همراه نانو ذرات کیتوزان (شرایط سالم و طبیعی پالپ‌ها) و ۴: تیمار با وکتور نوترکیب بدون نانو ذرات کیتوزان (برهم خوردن نظم پالپ سفید و قرمز).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

نتایج تغییرات بیان سایتوکاین‌ها توسط real time RT-PCR

پس از انجام real time PCR منحنی تکثیر ژن‌های GAPDH و سایتوکاین‌های موردبررسی برای هر گروه از نمونه‌ها رسم و بیان نسبی آن‌ها تعیین شد. سایتوکاین عملکردی (IFN-γ) و سایتوکاین مهاری (IL-10) القا شده توسط پلاسمید نوترکیب در بافت طحال موردبررسی قرار گرفت. پاسخ ایمنی سلولی در گروه‌های چالش نسبت به گروه کنترل (تصویر ۸) افزایش یافت. بدین شرح که بیان IFN-γ در گروه سازه ژنی نسبت به گروه PBS با p-value= 0.0009 افزایش نشان داد و در گروه سازه ژنی به همراه نانوذرات نیز افزایش بیان با p-value= 0.0001 داشت. در همین راستا بیان سایتوکاین IL-10 نتیجه مشابهی نشان داد به‌طوری‌که بیان IL-10 در گروه سازه ژنی نسبت به گروه PBS با p-value= 0.0003 افزایش نشان داد و در گروه سازه ژنی به همراه نانوذرات نیز افزایش بیان با p-value= 0.0002 نشان داده شد.



تصویر ۸. سطح سایتوکاین عملکردی IFN-γ و IL-10 در بافت طحال در گروه‌های سازه ژنی به همراه نانوذره و بدون نانوذره توسط real time RT-PCR تعیین شد. PBS و وکتور خالی به عنوان شاهد استفاده شد. داده‌ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار است. *p<0.05، **p<0.01، ***p<0.001 و ****p<0.0001

بحث

در مطالعه حاضر، یک سازه ژنی چند پپتیدی با پیوستن چندین اپی‌توپ از ژنوم‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی سویه O157:H7، برای ایجاد سازه نهایی ترکیب شدند. پس از انتخاب توالی آنتی‌ژن‌های مربوطه به‌صورت بیوانفورماتیکی، توالی حاصل به‌صورت سازواره ژنی طراحی و برای سنتز به شرکت‌های ذیربط ارسال شد. ترانسفورم کردن باکتری E.coli سویه TOP10F با وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+) حاوی سازه ژنی اپی‌توپی و گروهی دیگر با وکتور خالی، با موفقیت انجام شد. در گام بعدی، استخراج پلاسمید در حجم بالا انجام گرفت و با نانوذرات کیتوزان ترکیب گردید و در ۴ گروه به موش‌های BALB/c ماده تزریق شدند. گروه اول: پلاسمید حامل سازه ژنی به همراه نانوذرات کیتوزان، گروه دوم: پلاسمید حامل سازه ژنی بدون نانوذرات کیتوزان، گروه سوم: پلاسمید خالی و گروه چهارم: PBS. تزریق در

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

روزهای ۰، ۷ و ۱۴ در عضله چهارسر ران موش با مقدار ۱۰۰ میکروگرم از هر گروه انجام شد. موش‌ها با کمک کلروفرم و رعایت شرایط اخلاقی (بدون زجرکشیدن حیوان) کشته شدند. نمونه‌گیری از بافت هر حیوان انجام شد. پس از استخراج RNA، واکنش سنتز cDNA انجام شد و جهت بررسی بیان سازه ژنی از واکنش RT-PCR بهره گرفته شد. نتایج این مطالعه، نشان داد که سازه ژنی چند اپی‌توپی طراحی شده در این مطالعه، به طور موفقیت‌آمیز در موش‌های موردمطالعه بیان شده و سبب تغییر سطح بیان سایتوکاین‌ها شده است. این سازه در هر دو گروه از حیوانات که با وکتور نوترکیب تیمار شده بودند (همراه با نانوذرات کیتوزان و بدون نانوذرات کیتوزان) بیان شده بود؛ اما بررسی هسیتوپاتولوژیک بافت طحال حیوانات نشان داد که در گروهی که سازه ژنی همراه با نانوذرات انتقال‌یافته است، نکروز و برهم‌خوردگی بافت دیده نمی‌شود. باتوجه‌به مطالعات و پژوهش‌های انجام شده، از این سازواره ژنی می‌توان در انجام تحقیقات واکسن ژنی بر پایه ژن‌های بیماری‌زای گوارشی سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی سویه O157:H7 استفاده کرد و ایمنی را در جوامع بشری و کودکان بر علیه عفونت‌های گوارشی سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی افزایش داد.

درمان عفونت‌های میکروبی نیازمند مصرف آنتی‌بیوتیک است. تحقیقات نشان داده که افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شود و از سوی دیگر مطالعات نشان می‌دهد که عفونت‌های ایجاد شده توسط این دسته از باکتری‌ها باعث افزایش عوارض ناشی از عفونت، مرگ‌ومیر و هزینه‌های درمان می‌شود. یکی از روش‌های کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از واکسن‌ها است. امروزه واکسن‌های مبتنی بر میکروارگانیسم‌های نوترکیب زنده به‌عنوان «داروی زیستی» و به‌صورت تجویز خوراکی جهت پیشگیری یا درمان برخی بیماری‌ها کاربرد دارند (۱۵).

IFN- γ سایتوکاین اصلی است که پاسخ ایمنی نوع Th1 را هدایت می‌کند و نشان‌دهنده فعالیت ایمنی سلولی است. IFN- γ فاگوسیتوز و کشتن درون‌سلولی را تحریک می‌کند که برای پاک‌سازی اولیه و موفقیت‌آمیز سالمونلا مهم است. اثر محافظتی IFN-g در عفونت سالمونلا در بیماران مبتلا به کمبود ژنتیکی تولید IFN- γ یا گیرنده آن ثابت شده است. این بیماران بیشتر در معرض عفونت سالمونلا هستند و عوارض بالینی شدید بیماری را تجربه می‌کنند. به‌طورکلی پذیرفته شده است که فعال‌شدن ماکروفاژها توسط سایتوکاین‌هایی مانند IFN- γ و TNF- α برای تخریب سالمونلا در عفونت تجربی بسیار مهم است. منبع اصلی تولید IFN- γ سلول‌های T مخصوص سالمونلا هستند (۱۶). IL-10 قوی‌ترین سایتوکاین ضد التهابی است که عرضه آنتی ژن را به سلول‌های T مهار می‌کند و فاگوسیتوز و کشتن درون سلولی را سرکوب می‌کند (۱۷). IL-10 همراه با IL-4 ترشح IL-12 و IFN را سرکوب می‌کند (۱۸). در مرحله حاد عفونت سالمونلا، غلظت بالاتر سرمی IL-10 در بیماران مشاهده می‌شود (۱۹). این یافته می‌تواند پیشنهاد کند که IL-10 ممکن است در پاکسازی تاخیری سالمونلا نقش داشته باشد. این یافته همسو با یافته‌های مطالعه حاضر است و نویسندگان پیشنهاد می‌کنند که افزایش بیان IL-10 در مرحله حاد بیماری می‌تواند یک رویداد دفاعی باشد که التهاب بیش از حد را با کاهش تولید سایتوکاین‌های Th1 پیش التهابی مهار و از آسیب بیش‌ازحد به بافت‌ها جلوگیری می‌کند (۲۰). با توجه به اینکه در این مطالعه بیان هر دو ژن IFN-γ و IL-10 بعد از تیمار افزایش داشت، می‌توان عنوان کرد که IFN-γ در هایپراکتیو شدن ماکروفاژها و به دنبال آن تقویت قدرت سلول کشی ماکروفاژ بسیار اهمیت دارد (۲۱) که برای مقابله با سالمونلا از اهمیت خاصی برخوردار است. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، افزایش بیان IFN-γ بعد از تیمار، سبب تقویت قدرت سلول کشی میزبان در برابر عفونت می‌شود؛ زیرا به طور کلی پذیرفته شده است که

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

فعال شدن ماکروفاژها توسط سایتوکاین‌های مانند IFN-γ و TNF-α برای تخریب سالمونلا در عفونت تجربی بسیار مهم است (۲۲). همانطور که در مطالعه بروز و همکاران (۲۰۱۲) به این موضوع پرداخته شده است (۲۳). از سویی دیگر، یکی از عملکردهای IL-10، عملکرد ضدالتهابی آن است و با توجه به اینکه در این مطالعه افزایش بیان نشان داده است، می‌تواند با مهار آسیب به بافت‌های خودی به نفع میزبان عمل کند (۲۴). در مجموع با افزایش بیان این دو ژن، میزبان در طی عفونت می‌تواند ایمن شود؛ زیرا از طرفی بیان IFN- γ با افزایش پاسخ ایمنی به ضرر پاتوژن عمل کرده و همچنین بیان IL-10 از آسیب به بافت میزبان جلوگیری می‌کند. مطالعات دانشمندان و گزارش‌ها علمی نیز تأییدی بر نتایج حاصله است. ظفر و همکاران (۲۰۲۲)، از TolA که یک پروتئین غشایی سالمونلا تیفی‌موریوم است، برای طراحی واکسن چند اپی‌توپی علیه پاتوژن استفاده کردند. این واکسن یک پاسخ ایمنی کارآمد را القا کرد، همان‌طور که توسط شبیه‌سازی ایمنی In silico تعیین شد. مطالعات محاسباتی نشان داد که واکسن چند اپی‌توپی مهندسی شده از نظر ساختاری پایدار است و قادر به برانگیختن واکنش‌های ایمونولوژیکی خاص است؛ بنابراین کاندیدای واکسن نهفته سالمونلا تیفی‌موریوم است (۲۵). این یافته همسو با مطالعه حاضر است و اعلام می‌کنند که واکسن اپی‌توپی طراحی شده بر علیه سالمونلا کارآمد است.

در دوره اخیر شناخت وسیع در زمینه ژنتیک منجر به توسعه چندین سیستم بیان ژن بر پایه باکتری‌ها شده است و بسیاری از ابزارهای ژنتیکی گسترده شده است؛ بنابراین دست‌کاری ژنتیکی آن برای محققان آسان‌تر می‌شود. تولید بالای پروتئین‌های هترولوگ در باکتری‌ها بسته به هدف موردمطالعه با استفاده از پروموترهای القایی یا ساختمانی آن‌ها حاصل شده است (۲۶). خان و همکاران (۲۰۱۹)، مدل‌سازی اپی‌توپ‌های پروتئین‌های آنتی‌ژنی اشرشیاکلی را به همراه مطالعات شبیه‌سازی اتصال با آلل‌های MHC کلاس II انجام دادند. این پژوهشگران پس از بررسی‌های دقیق، ۳ اپی‌توپ YKFVPWFNL، LNIDITGCA و MKASNGLNI را به‌عنوان بالقوه‌ترین اپی‌توپ‌های سلول T شناسایی کردند. همسو بامطالعه حاضر نویسندگان این پژوهش نیز اعلام کردند که پپتیدهای پیش‌بینی‌شده از طریق روش‌های محاسباتی مختلف ممکن است پتانسیل ایجاد یک پاسخ ایمنی مؤثر باواسطه سلول T را داشته باشند و می‌توانند برای تجزیه‌وتحلیل تجربی برای تأیید خواص آنتی‌ژنی آن‌ها به‌عنوان نامزد مناسب واکسن پیشنهاد شوند (۲۷). همچنین، چندین گزارش بیان کردند که تجویز واکسن‌های نوترکیب در موش باعث ایجاد محافظت می‌شود. چهلگردی و همکاران (۲۰۲۰)، طراحی واکسن بر اساس cagW علیه عفونت هلیکوباکترپیلوری را انجام دادند. نتایج نشان داد که واکسن طراحی شده شامل ژن cagW هلیکوباکترپیلوری که در نانوذرات کیتوزان محصور شده است، با مورفولوژی خوب، پایداری بالا، قطر متوسط ۱۱۷.۷ نانومتر و پتانسیل زتا ۵.۶۴+ میلی‌ولت است. علاوه بر این، سنجش ایمونوفلورسانس نشان داد که ژن cagW می‌تواند در سلول‌های HDF بیان شود و هم‌زمان فعالیت زیستی خوبی را حفظ کند. در مقایسه با موش‌های ایمن شده با پلاسمید کنترل، ایمن‌سازی in vivo نشان داد که موش‌های ایمن شده با pcDNA3.1 (+) -cagW-NPs پاسخ‌های ایمنی بهتری را نشان دادند. این پژوهشگران اعلام کردند که نانوذرات کیتوزان DNA- به‌عنوان کاندیدای ایمن‌سازی قوی در برابر عفونت هلیکوباکترپیلوری است (۲۸). با بررسی یافته‌های پژوهشگران دیگر به‌خوبی نشان داده می‌شود که مثال‌های متعددی ازاین‌دست در مورد نتایج مثبت واکسن‌های ژنی وجود دارد. سلطان و همکاران (۲۰۲۲)، از یک رویکرد واکسینولوژی معکوس همراه با ایمونوانفورماتیک برای شناسایی آنتی‌ژن‌های بالقوه برای ایجاد یک واکسن مؤثر استفاده کرده‌اند. بر اساس غربالگری از ۵۱۵۵ پروتئین، پروتئین مونتاژ لیپوپلی‌ساکارید (LptD) و فاکتور مونتاژ پروتئین غشای خارجی (BamA) را به‌عنوان کاندیدای واکسن برای مطالعه فعلی شناسایی کردند. واکسن

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

چند اپی‌توپی با استفاده از اپی‌توپ‌های لنفوسیت T سیتوتوکسیک (CTL)، لنفوسیت T کمکی (HTL) و لنفوسیت سلول B (BCL)، با پیوندهای مناسب و ادجوانت ساخته شد. پس از آن، به‌صورت محاسباتی مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت که در آن مشخص شد آنتی‌ژنی محلول، پایدار و غیر حساسیت‌زا است (۱۱). همسو با مطالعات دیگر پژوهشگران، یافته‌ها نشان می‌دهد که DNA پلاسمید محصور شده یک فناوری ایمن برای حمل و آزادسازی دارو است که نویدبخش کاربردهای پزشکی در آینده است.

نتیجه‌گیری

طراحی واکسن‌های ژنی چند اپی‌توپی، در ایمنی‌سازی جوامع بشری در برابر موارد بیماری‌زا ارزشمند خواهد بود. ما یک سازواره ژنی چند اپی‌توپی را طراحی و در بافت موش، بیان کردیم که سبب تغییر سطح بیان سایتوکاین‌ها در بافت طحال موش‌های تحت چالش شد. همچنین، نتایج این پژوهش نشان داد که انتقال این سازه ژنی به همراه نانوذرات کیتوزان علاوه بر بیان سازه در بدن حیوان، بافت طحال نیز در شرایط سالم و طبیعی قرار دارد، در صورتی که انتقال سازه بدون نانوذرات کیتوزان سبب نکروز و برهم‌خوردن نظم بافت طحال می‌شود. با توجه نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان در آینده از این سازه ژنی چند اپی‌توپی به‌عنوان واکسن علیه سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی استفاده کرد و مطالعات تکمیلی اثرات حاصل از آن را در حیوان بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکترای تخصصی بیوتکنولوژی میکروبی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد است. بدین‌وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. این پروژه در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شناسه IR.IAU.SHK.REC.1402.050 تصویب گردیده است.

منابع

1.Fox MS, Littlefield JW. Reservations concerning gene therapy. Science. 1971 Jul 16;173(3993):195.
2.Collins M, Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015 Dec 22;282(1821):20143003.
3.Amiri-Farsani M, Taheri Z, Tirbakhsh Gouran S, Chabok O, Safarpour-Dehkordi M, Kazemi Roudsari M. Cancer stem cells: Recent trends in cancer therapy. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. 2024 Jan 30:1-32.
4.Safarpour-Dehkordi M, Doosti A, Arshi A. Deletion of Salmonella enterica serovar typhimurium sipC gene. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2015 Dec 1;5(12):987-91.
5.Galán JE. Salmonella Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. Nature Reviews Microbiology. 2021 Nov;19(11):716-25.
6.Mody RK, Hoekstra RM, Scott MK, Dunn J, Smith K, Tobin-D'Angelo M, Shiferaw B, Wymore K, Clogher P, Palmer A, Comstock N. Risk of Hemolytic Uremic Syndrome Related to Treatment of Escherichia coli O157 Infection with Different Antimicrobial Classes. Microorganisms. 2021 Sep 21;9(9):1997.
7.Ajulo OH, Adetunji OV, Ajulo OM. Molecular Characterization of Salmonella Typhimurium and E. coli O157: H7 Isolated from Ready-to-eat Chicken Meat. Journal of Pharmaceutical Research International. 2022 Apr 22;34(33B):22-42.
8.Zhang C, Iqbal J, Gómez-Duarte OG. Murine immunization with CS21 pili or LngA major subunit of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) elicits systemic and mucosal immune responses and inhibits ETEC gut colonization. Veterinary microbiology. 2017 Apr 1; 202:90-100.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]
[DOI: 10.22034/30.2.29]

9.Lu IN, Farinelle S, Sausy A, Muller CP. Identification of a CD4 T-cell epitope in the hemagglutinin stalk domain of pandemic H1N1 influenza virus and its antigen-driven TCR usage signature in BALB/c mice. Cellular & molecular immunology. 2017 Jun;14(6):511-20.
10.Saadi M, Karkhah A, Nouri HR. Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. Infection, Genetics and Evolution. 2017 Jul 1; 51:227-34.
11.Soltan MA, Behairy MY, Abdelkader MS, Albogami S, Fayad E, Eid RA, Darwish KM, Elhady SS, Lotfy AM, Alaa Eldeen M. In silico designing of an epitope-based vaccine against common E. coli pathotypes. Frontiers in Medicine. 2022 Mar 4; 9:829467.
12.Shende P, Waghchaure M. Combined vaccines for prophylaxis of infectious conditions. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2019 Dec 4;47(1):695-704.
13.Safarpour-Dehkordi M, Doosti A, Jami MS. Impacts of the Staphylococcal Enterotoxin H on the Apoptosis and lncRNAs in PC3 and ACHN. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2020 Jul; 35:180-8.
14.Safarpour-Dehkordi M, Chabok O, Asgari M, Khademi R, Doosti A. A comprehensive investigation of the medicinal efficacy of antimicrobial fusion peptides expressed in probiotic bacteria for the treatment of pan drug-resistant (PDR) infections. Archives of Microbiology. 2024 Mar;206(3):93.
15.D'Souza R, Pandeya DR, Hong ST. Lactococcus lactis: an efficient Gram positive cell factory for the production and secretion of recombinant protein. Biomed Res. 2012 Jan 1;23(1):1-7.
16.Döffinger R, Jouanguy E, Altare F, Casanova JL, Wood P, Lammas D, Kumararatne D, Shirakawa T, Novelli F. Inheritable defects in interleukin-12-and interferon-gamma-mediated immunity and the TH1/TH2 paradigm in man. Allergy. 1999 May 1;54(5).
17.İbibik B. Characterization of Altered Innate and Adaptive Immune Responses of Primary Immune Deficient Patients (Master's thesis, Bilkent Universitesi (Turkey)). 2021 May; 50-53.
18.Mejía D, Salvatierra G, Maximiliano J, Rímac R, Carhuaricra D, Almeyda M, Luna L, Rosadio R, Maturrano L. Expression of cytokines TH1 (IL-2, IL-12, IFN-γ, TNF-α) , TH2 (IL-4, IL-10, TGF-β) and Th17 (IL-17) in circulating lymphocytes of Guinea pigs inoculated with a field strain of Salmonella Typhimurium. 2019: 1750-1761.
19.Rahman MM. Modulation of Low Pathogenic Avian Influenza Using Attenuated Salmonella Vaccine Chicken Interferon-α and Interleukin-18. MedCrave Group LLC. 2016 May; 5-10.
20.Pie S, Matsiota-Bernard P, Truffa-Bachi P, Nauciel C. Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and resistant mice during the early phase of Salmonella typhimurium infection. Infection and immunity. 1996 Mar;64(3):849-54.
21.Jalili A, Moslemi E, Izadi A, Mosaffa N. Assessing the gene expression of IL4, TNFα, TGFβ and IFNγ in studying M1 and M2 macrophages derived from human monocyte. Research in Medicine. 2015 May 10;39(1):9-13.
22.Döffinger R, Jouanguy E, Altare F, Casanova JL, Wood P, Lammas D, Kumararatne D, Shirakawa T, Novelli F. Inheritable defects in interleukin-12-and interferon-gamma-mediated immunity and the TH1/TH2 paradigm in man. Allergy. 1999 May 1;54(5).
23.Broz P, Ohlson MB, Monack DM. Innate immune response to Salmonella typhimurium, a model enteric pathogen. Gut microbes. 2012 Mar 1;3(2):62-70.
24.Pie S, Matsiota-Bernard P, Truffa-Bachi P, Nauciel C. Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and resistant mice during the early phase of Salmonella typhimurium infection. Infection and immunity. 1996 Mar;64(3):849-54.
25.Zafar S, Ajab H, Baig S, Baig A, Habib Z, Jamil F, Ibrahim M, Kanwal S, Rasheed MA. Prediction and evaluation of multi epitope based sub-unit vaccine against Salmonella typhimurium. Saudi Journal of Biological Sciences. 2022 Feb 1;29(2):1092-9.
26.Mantis NJ, Rol N, Corthésy BJ. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. Mucosal immunology. 2011 Nov;4(6):603-11.
27.Khan F, Srivastava V, Kumar A. Computational identification and characterization of potential T-cell epitope for the utility of vaccine design against enterotoxigenic Escherichia coli. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2019 Mar 15;25:289-302.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]

28.Chehelgerdi M, Doosti A. Effect of the cagW-based gene vaccine on the immunologic properties of BALB/c mouse: an efficient candidate for Helicobacter pylori DNA vaccine. Journal of Nanobiotechnology. 2020 Dec;18(1):1-6.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-07-25]

[DOI: 10.22034/30.2.29]