بیان، استخراج، تخلیص و بررسی ایمنی‌زایی سه پروتئین نوترکیب LTB, THc, BoNT/A و مقایسه تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه آن‌ها در حیوان آزمایشگاهی

حکمت نکویی‌فرد[۱](M.Sc)، مجتبی سعادتی[۱](Ph.D)، مرضیه ابراهیمی[۲](Ph.D)، غلامرضا اولاد[۳*](Ph.D)، فرید عزیزی جلیلیان [۴] (Ph.D)، جعفر سلیمیان[۵](Ph.D)، بیژن صدیقی‌مقدم[۶](Ph.D)، مونا زمانیان عضدی [۷](Ph.D)

۱- دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی

۲- پژوهشگاه رویان تهران، پژوهشکده سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی

۳- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوزی کاربردی

۴- دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه میکروبیولوژی

۵- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی

۶- دانشگاه علوم‌پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

۷- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس

چکیده

سابقه و هدف: در میان عوامل باکتریایی، شایع‌ترین عامل بیماری اسهال، باکتری اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک است. تزریق زیرواحد LTB توکسین آن قادر به ایجاد مصونیت شش ماهه در میزبان است. توکسین تتانوس کلستریدیوم تتانی عامل بیماری مهلک کزاز است. به‌وسیله واکسن توکسوئید کزاز می‌توان از بیماری کزاز جلوگیری نمود. این مصونیت تا ۱۰ سال در انسان ادامه می‌یابد. ناحیه اتصالی توکسین کزاز (THc) بخش اصلی در ایمنی‌زایی این توکسین محسوب می‌شود. کلستریدیوم بوتولینوم عامل بیماری بوتولیسم است. تزریق واکسن توکسوئید بوتولینوم نیز مصونیت ۲ ساله علیه بیماری ایجاد می‌کند. هدف از این مطالعه، تولید و بررسی ایمنی‌زاییLTB, BONT/A و THc در حیوان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: از سه باکتری E.Coli Bl21 DE3 تراریخت شده با وکتور pET28a که به‌طور جداگانه حاوی سه ژن نوترکیب ltb, bont/a-Hc و thc بودند، جهت بیان پروتئین‌های نوترکیب فوق استفاده شد. هر سه پروتئین مورد نظر استخراج، تخلیص و بر روی ژل SDS-PAGE بررسی گردیدند. سپس ایمنی‌زایی موش‌های آزمایشگاهی به‌وسیله این سه پروتئین صورت گرفت. تیتر آنتی‌بادی حاصل از پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از تست الایزا و آزمون آماری دو طرفه آنووا مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج ارزیابی ژل SDS-PAGE بیان و تخلیص مناسب هر سه پروتئین را نشان داد. نتایج ایمنی‌زایی و تست‌های الایزای سرم این سه گروه ایمن شده نشان داد که تیتر آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب THc بالاتر از پروتئین‌های نوترکیب LTB و BONT/A است. هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین تیتر آنتی‌بادی LTB و BONT/A (P value<۰/۰۰۰۱) مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: اختلاف در تیتر آنتی‌بادی این سه گروه ممکن است به طول عمر سلول‌های خاطره حاصله در این گروه‌ها ارتباط داشته باشد. هر چند که نتایج نیاز به مطالعات بیش‌تری دارد.

واژه‌های کلیدی: ایمنی‌زایی، تیتراسیون آنتی‌بادی، LTB, BONT/A و THc.

مقدمه

اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) عامل نوعی بیماری دستگاه گوارش بوده که در بسیاری از جمعیت‌های جهان می‌تواند اسهال مسافرتی ایجاد نماید و تعداد زیادی از افراد را مبتلا نماید. به‌طور کلی این بیماری در افراد بزرگ‌سال به‌صورت خود محدود شونده بوده و غالباً با تجویز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۸۰۴۳۴۹۲ نمابر: ۰۲۱-۲۲۷۱۴۲۴۸ Email: grolad@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۳۰

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

آنتی‌بیوتیک برطرف می‌شود. [۴،۱]. ETEC به‌وسیله غذا یا آب آلوده‌شده با مدفوع انسان و یا حیوان منتقل می‌شود. عامل اصلی ویرولانس (حدت‌زایی) ETEC، تولید انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) و یا انتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST)هست. این بیماری با بلع باکتری ETEC گسترش می‌یابد و آلودگی زمانی پایه‌گذاری می‌شود که باکتری به روده کوچک رسیده باشد [۲،۳]. باکتری از طریق فاکتورهای کلونیزاسیون (CFs) سطحی خود به اپی‌تلیوم روده کوچک متصل می‌شود و کلونیزاسیون در سطح این سلول ایجاد می‌شود. سپس این انتروتوکسین‌های تولیدی این باکتری به خارج سلول ترشح و روی سلول‌های اپی‌تلیوم آن ناحیه اثر می‌گذارد [۳]. توکسین LT ، یک پروتئین الیگومر با وزن مولکولی تقریباً ۸۶ کیلودالتون هست. این توکسین حاوی یک حلقه پنتامری از پنج زیرواحد اتصالی (LTB) یکسان با وزن مولکولی ۱۱/۵ کیلودالتون و یک زیرواحد فعال (LTA) با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون می‌باشند [۳]. گزارش شده که LTعمل‌کرد ادجوانی دارد و این عمل‌کرد ناشی از فعالیت آنزیمی زیرواحد A نبوده بلکه به زیرواحد B جداشده از آن وابسته هست و ممکن است اثرات مختلفی را روی سلول‌های سیستم ایمنی اعمال نماید [۶،۵،۴]. تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که خاطره ایمنی حاصل از واکسن‌های این نوع توکسین کوتاه‌مدت هست [۴].

خانواده نوروتوکسین کلستریدیوم شامل نوروتوکسین کزاز و هفت نوروتوکسین متمایز بوتولینوم هستند که سبب بیماری کزاز و بوتولیسم می‌گردند [۷]. سویه‌های مختلف باکتری کلستریدیوم بوتولینوم، هفت نوع مختلف نوروتوکسین تولید می‌کنند که از A تا G نام‌گذاری می‌شوند. این هفت نوع سم از نظر ساختمانی شبیه یک‌دیگرند و دارای یک زنجیره سبک و یک زنجیره سنگین بوده و حدود ۱۵۰ کیلو دالتون وزن دارند [۸]. نوروتوکسین بوتولینوم تایپ A (BoNT/A)، قوی‌ترین توکسین در میان تمام توکسین‌های گیاهی، جانوری، باکتریایی و ترکیب‌های شیمیایی است. BoNT/A به‌صورت یک تک زنجیره پروتئینی با فعالیت پائین تولید می‌شود و در صورت برش پروتئولیتیکی، به دو زنجیره سبک (۵۰ کیلودالتون) و زنجیره سنگین (۱۰۰ کیلودالتونی) فعال تبدیل می‌شود. نیمه انتهای کربوکسیلی زنجیره سنگین که قطعه C نامیده می‌شود، پذیرنده سطحی سلول‌های نورونی را شناسایی کرده و به آن اتصال می‌یابد [۷]. این پروتئین ۵۰ کیلودالتونی واقع در انتهای کربوکسیلی زنجیره سنگین توکسین کلستریدیوم بوتولینوم که وظیفه اتصال به سلول‌های عصبی را به عهده دارد از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی برخوردار هست [۳]. این نوروتوکسین‌ها مشابه یک‌دیگر عمل می‌کنند و با جلوگیری از آزادسازی استیل‌کولین از انتهای سیناپسی سلول‌های عصبی، موجب فلج شل پیش‌رونده می‌شوند [۹]. باکتری کلستریدیوم تتانی با تولید تتانوتوکسین، بیماری کزاز را به وجود می‌آورد. این بیماری که به‌طور بالقوه کشنده است و بر سیستم عصبی تأثیر می‌گذارد، با ایجاد درد و انقباضات غیرارادی ماهیچه‌ای تظاهر می‌نماید [۱۰]. توکسین کزاز متشکل از یک زنجیره سنگین و یک زنجیره سبک هست که به‌وسیله یک پیوند دی‌سولفیدی به هم اتصال یافته‌اند. زنجیره سبک، قسمت کاتالیتیکی توکسین را به وجود می‌آورد، در حالی‌که ناحیه انتهای C زنجیره سنگین اتصال به گانگلیوزیدهای نورون‌ها را انجام می‌دهد [۱۳،۱۲،۱۱]. توکسین کزاز و توکسین بوتولینوم به این دلیل که در یک خانواده قرار می‌گیرند، همولوژی نسبتاً زیادی با یک‌دیگر دارند. همولوژی این دو حدود ۳۶٪ محاسبه‌شده است [۱۴] در حالی‌که همولوژی بین زیرواحد HC این توکسین‌ها، ۳۳٪ هست. مطالعات قبلی نشان داده است که در نتیجه ایمنی‌زایی افراد با این دو پروتئین، و با وجود این میزان از همولوژی، خاطره ایمنی ناشی از توکسوئید تتانی ۱۰ ساله بوده در حالی که توکسوئید بوتولینوم خاطره‌ای دو ساله را ایجاد می‌کند و در ردیف آنتی‌ژن‌هایی قرار می‌گیرد که مصونیتی نه‌چندان طولانی را در سیستم ایمنی فرد القا می‌کنند [۳۰]. میزان تیتر آنتی‌بادی که در برابر هر آنتی‌ژن ترشح می‌گردد، ما را از میزان و نسبت پاسخ ایجادشده آگاه می‌سازد. پس بنابراین، با توجه به این که اولین گام در ایجاد خاطره طولانی‌مدت، تحریک کافی سیستم ایمنی و ایجاد

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

پاسخی قابل توجه است، احتمالاً میزان تیتر آنتی‌بادی تولیدشده علیه هر آنتی‌ژن می‌تواند ما را از طول عمر خاطره محافظت‌کننده در آن میزبان باخبر کند. بنابراین سه آنتی‌ژن فوق با خاطره ایمنی بلند مدت، میان مدت و کوتاه‌مدت، انتخاب شده و به نظر می‌رسد که احتمالاً تیترهای آنتی‌بادی متفاوتی از خود نشان دهند. به همین دلیل هدف از این مطالعه بیان، استخراج، تخلیص و بررسی ایمنی‌زایی سه پروتئین نوترکیب LTB THc, BoNT/A, و مقایسه تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه آن‌ها، ارزیابی تیتر آنتی‌بادی ترشح شده در برابر هر یک از این آنتی‌ژن‌ها و سپس مقایسه آن‌ها با یک‌دیگر در حیوان آزمایشگاهی هست. در این مطالعه از دومین‌های اتصالی توکسین مقاوم به حرارت (LTB) اشرشیاکلی انتروتوکسیژینیک، بخشی از زنجیره سنگین توکسین کزاز (HC) و بخشی از زنجیره سنگین بوتولینوم (BONT/A-Hc) جهت بررسی میزان ایمنی‌زایی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

بیان پروتئین‌های نوترکیب: برای بیان سه ژن bont/a – Hc, thc, و ltb از سه میزبان E. Coli Bl21 DE3 تراریخت شده با وکتور pET28a هرکدام به‌صورت جداگانه حاوی یکی از این سه ژن و حاصل مطالعات قبلی در مرکز تحقیقات علوم زیستی دانشگاه امام حسین (ع) بود استفاده گردید. بررسی محصولات بیان اولیه هرسه ژن به‌وسیله ژل SDS-PAGE، ۱۲٪ انجام گردید. بهینه‌سازی بیان پروتئین‌های نوترکیب در سه متغیر (دما، زمان و غلظت ماده القاکننده) صورت پذیرفت.

تولید دو پروتئین نوترکیب THc و LTB در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر و با شرایط بهینه شده در OD=۰/۵ – ۰/۷ (کانامایسین با غلظت ۲۰ µg /ml، IPTG با غلظت ۱ mM در، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶ ساعت بیان و سرعت ۱۵۰ rpm) انجام شد. تولید پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc نیز در حجم (۱۰۰ میلی‌لیتر) و در شرایط بهینه شده در ۰/۷– OD=۰/۵ (کانامایسین با غلظت ۲۰ µg/ml، IPTG با غلظت ۱ mM، دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۰ ساعت بیان و سرعت ۱۵۰ rpm) انجام گردید. هر سه پروتئین نوترکیب حاصل با وسترن بلاتینگ مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند.

استخراج و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب با ستون Ni-NTA: با توجه به وجود هر دو پروتئین نوترکیب بیانی THc و BoNT/A-Hc در فاز محلول، تخلیص این پروتئین‌ها با استفاده از شیب غلظتی ایمیدازول انجام گردید. جهت محلول‌سازی پروتئین LTB که در شکل انکلوژن بادی بود و در فاز نامحلول وجود داشت از بافرهای واجد اوره ۸ مولار و با شیب pH جهت تخلیص استفاده شد. فرایند تخلیص این سه پروتئین به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA صورت گرفت. خروجی‌های ستون به‌وسیله ژل SDS-PAGE، ۱۲٪ مورد ارزیابی قرار گرفتند. غلظت هر یک از پروتئین‌های نوترکیب با روش برادفورد اندازه‌گیری گردید.

ایمن‌سازی حیوانات آزمایشگاهی: جهت بررسی‌های ایمنی‌زایی، برای هر یک از آنتی‌ژن‌ها یک گروه ۱۰ تایی موش در نظر گرفته شد. در تمام گروه‌ها تزریق اول آنتی‌ژن با ادجوانت کامل فروند و در تزریق‌های بعدی آنتی‌ژن با ادجوانت ناقص فروند استفاده شد. در تمام گروه‌ها در مرحله نخست تزریق µg ۲۵، در تزریق دوم µg ۲۰، در تزریق سوم µg ۱۵، در تزریق چهارم µg ۱۰ از هر آنتی‌ژن به‌صورت زیرجلدی تزریق گردید. فاصله تزریق اول و دوم ۲۱ روز و فاصله تزریقات بعدی نسبت به هم ۱۴ روز در نظر گرفته شد. روش تزریق در تمام مراحل در هر گروه به‌صورت زیرپوستی انجام شد. ایمنی‌زایی موش‌های گروه اول با آنتی‌ژن THc، گروه دوم با آنتی‌ژن BONT/A-Hc، گروه سوم با آنتی‌ژن LTBصورت پذیرفت.

گروه چهارم شاهد: جهت بررسی و تأیید نتایج حاصل و هم‌چنین جلوگیری از پاسخ کاذب، به یک گروه ۵ تایی به عنوان شاهد فقط بافر PBS استریل تزریق گردید.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

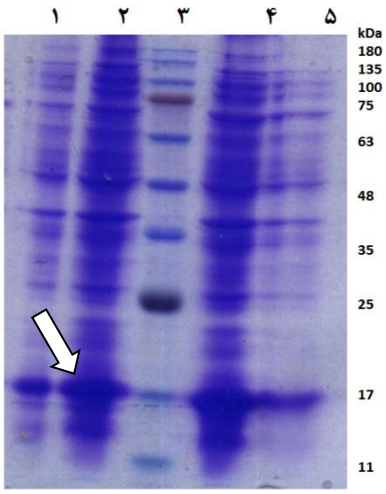
بررسی تیتر آنتی‌بادی: خون‌گیری در چهار نوبت و طی دو هفته پس از مراحل دوم، سوم و چهارم و هم‌چنین یک ماه پس از آخرین مرحله ایمن‌سازی، از گوشه چشم گروه‌های چهارگانه موشی (ایمن و غیر ایمن) انجام شد. نمونه‌های خون به داخل میکروتیوپ استریل منتقل و پس از یک ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای جداسازی سرم، ابتدا لخته خون خارج شده، سرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع شفاف زردرنگ به دست آمده جهت استفاده در مراحل بعدی جدا گردید. در مرحله بعد سنجش کمی و کیفی آنتی‌بادی پلی‌کلونال موجود در ۱۶ نمونه سرم فوق به روش الایزا مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

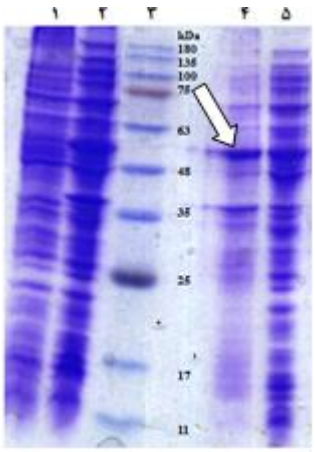
بیان پروتئین‌های نوترکیب. نتایج ژل SDS-PAGE، بیان مناسب پروتئین‌های نوترکیب THc, BONT/A-Hc و LTB را به ترتیب در دو فاز محلول و نامحلول نشان می‌داد.

بیان ژن ltb و تعیین موقعیت پروتئین نوترکیب نتایج ژل SDS-PAGE، بیان مناسب پروتئین نوترکیب LTB را پس از القاء IPTG نشان می‌دهد. پس از سونیکیت نمودن سلول‌ها در بافر PBS و انجام سانتریفیوژ، محلول رویی از رسوبات جداسازی شده و همگی آن‌ها بر روی ژل SDS-PAGE بررسی شدند و به وجود پروتئین نوترکیب LTB در فاز نامحلول پی برده شد (شکل ۱).

بیان ژن bont/a-Hc و تعیین جایگاه پروتئین نوترکیب: نتایج ژل SDS-PAGE، بیان مناسب پروتئین نوترکیب BoNT/A را پس از القاء IPTG نشان می‌دهد. با سونیکیت نمودن سلول‌ها در بافر PBS و انجام سانتریفیوژ، محلول رویی از رسوب جداسازی شده و محصولات بر روی ژل SDS-PAGE ارزیابی گردید. نتایج حضور پروتئین نوترکیب BoNT/A را در فاز محلول نشان داد (شکل ۲).



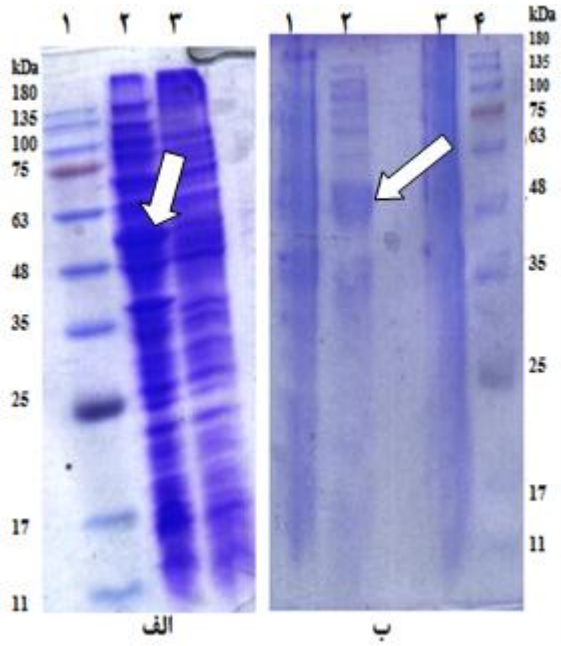
شکل ۱ . بیان ژن ltb و تعیین حلالیت پروتئین LTB . ۱) نمونه کنترل جهت بیان ژن ltb (بدون القا به‌وسیله IPTG ۲) نمونه تست جهت بیان ژن ltb با القا ء IPTG ۳) نشانگر پروتئینی PR911654 ۴) رسوب پس از سانتریفیوژ ۵)محلول رویی پس از سانتریفیوژ



شکل ۲. بیان ژن bont/a و جایگاه پروتئین نوترکیب. ۱) نمونه شاهد بدون القاء IPTG ۲) نمونه تست با القاء IPTG ۳) نشانگر پروتئینی ۴PR911654) محلول رویی (پس ازسانتریفیوژ نمودن عصاره سلولی حل شده با PBS) ۵) رسوب حاصل (پس ازسانتریفیوژ نمودن عصاره سلولی حل شده با PBS)

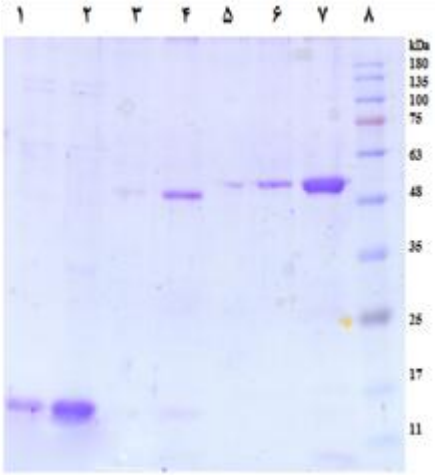
بیان ژن thc و تعیین جایگاه پروتئین نوترکیب: نتایج ژل SDS-PAGE، بیان مناسب پروتئین نوترکیب THc را پس از القاء IPTG نشان می‌دهد. با سونیکیت نمودن سلول‌ها در بافر PBS و انجام سانتریفیوژ و محلول رویی از رسوب جداسازی شده و محصولات بر روی ژل SDS-PAGE بررسی گردید و حضور پروتئین نوترکیب Thc را در فاز محلول را نشان می‌دهد (شکل ۳).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]



شکل ۳: بیان ژن thc و تعیین موقعیت پروتئین THc. الف) بیان ژن *thc*۱) نشانگر پروتئینی *PR911654* ۲) نمونه تست با القاء *IPTG* ۳) نمونه شاهد بدون القاء *IPTG* ب) تعیین موقعیت پروتئین *Thc* ۱) رسوب (پس از سانتریفیوژ نمودن عصاره سلولی حل شده با *PBS*) ۲) محلول (پس از سانتریفیوژ نمودن عصاره سلولی حل شده با *PBS*) ۳) عصاره سلولی سونیکیت شده با *PBS* ۴)نشانگر پروتئینی

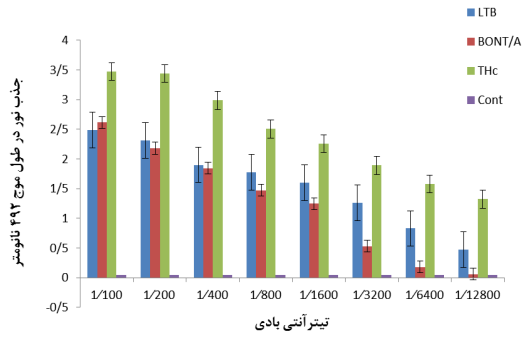
تخلیص پروتئین‌های نوترکیب: تخلیص هر سه پروتئین نوترکیب به‌وسیله ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA صورت گرفت و خروجی‌های آن بر روی ژل SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های تخلیص شده این مسئله را به وضوح نشان داد (شکل ۴).



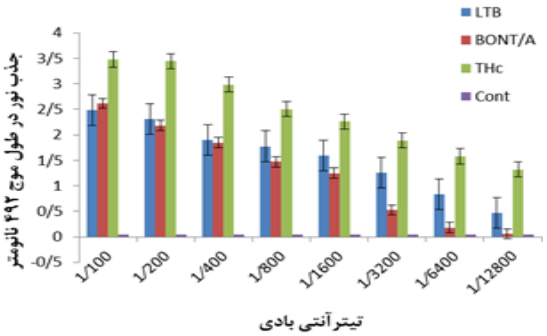
شکل ۴. ژل SDS-PAGE از پروتئین‌های نوترکیب تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی

بررسی تیتر آنتی‌بادی در سرم. ایمنی‌زایی حیوانات: ایمنی‌زایی حیوانات به‌صورت مجزا با هر سه نمونه پروتئین LTB, THc و BONT/Hc انجام گردید، خون‌گیری، جداسازی سرم و سپس آزمایش الایزا برای هر نمونه سرم در زمان‌های دو هفته بعد از مراحل دوم، سوم و چهارم ایمنی‌زایی و هم‌چنین یک ماه پس از آخرین مرحله ایمنی‌زایی انجام شد شکل‌های ۵ تا ۸ نتایج به‌دست آمده را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، سرم‌ها از ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۲۸۰۰ رقیق شده است. نتایج حاصل از تیتر آنتی‌بادی تست‌های الایزا با روش آنالیز آنووا دوطرفه مورد ارزیابی قرار گرفت و اختلاف معنی‌دار در تیترهای آنتی‌بادی به خصوص در تیترهای پائین بسیار چشم‌گیر بود (Pvalue<۰/۰۰۰۱).

با افزایش دفعات ایمن‌سازی تیتر آنتی‌بادی افزایش یافته به‌طوری که بین گروه ایمن شده با THC از یک طرف و گروه‌های LTB و BONT/A از طرف دیگر تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در غلظت‌های پائین‌تر نیز بین گروه‌های LTB و BONT/A تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

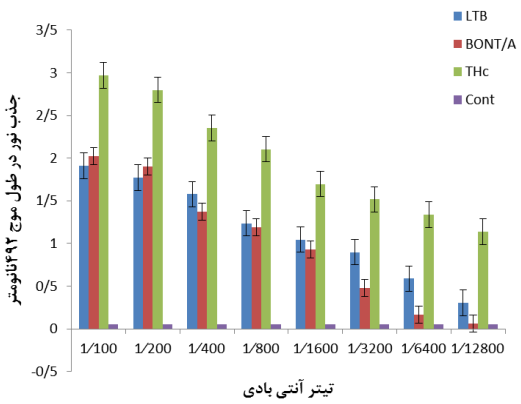


شکل ۵. میانگین تیتر آنتی بادی بعد از دومین تزریق

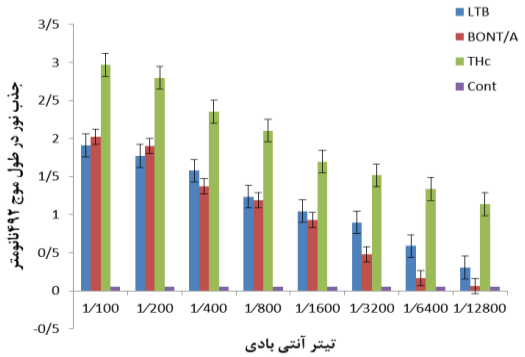


شکل۶. میانگین تیتر آنتی بادی بعد از سومین تزریق

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]



شکل ۷. میانگین تیتر آنتی بادی بعد از چهارمین تزریق



شکل ۸. میانگین تیتراسیون آنتی بادی یک ماه بعد از ایمنی زایی با سه آنتی ژن LTB,*THc* و BONT/*A*

بحث و نتیجه‌گیری

ماهیت آنتی‌ژن در روند و مسیرهای ایمنی‌زایی تأثیر بسیار ارزنده‌ای دارد [۱۵]، به‌طوری‌که آنتی‌ژن‌های پروتئینی که همان آنتی‌ژن‌های وابسته به سلول T می‌باشند در طی واکنش مراکز زایا نقش بسیار اساسی در تولید اکثر سلول‌های خاطره دارند در حالی‌که آنتی‌ژن‌های پلی‌ساکاریدی باکتریایی بر خلاف پروتئین‌ها، تنها پلاسماسل‌های کوتاه عمر را (در نتیجه راه‌اندازی پاسخ‌های سلول B مستقل از سلول T) تولید می‌نماید و سبب تولید یک نوع به خصوص سلول‌های خاطره خواهند شد [۱۸،۱۷،۱۶،۱۵]. خاطره ایمنی دو بازو دارد: ایمنی هومورال شامل آنتی‌بادی‌های از پیش موجود، سلول‌های خاطره B و پلاسماسل‌ها هست. ایمنی سلولی شامل سلول‌های T نوع CD4 و CD8 هست. این دو بازوی خاطره ایمنی در ایجاد ایمنی، عمل‌کردهای اجرایی متفاوتی دارند. آنتی‌بادی‌های از پیش موجود می‌توانند مستقیماً به ذرات ویروسی، باکتری‌های خارج سلولی و انگل‌ها متصل شوند. نقش این عوامل فراهم کردن اولین خط دفاعی به‌وسیله خنثی کردن یا اپسونیزه کردن عوامل بیماری‌زای مهاجم است [۱۹]. کروتی و همکاران نشان داده‌اند که میان میزان تولید آنتی‌بادی سرمی و فراوانی سلول‌های خاطره B ارتباط مستقیمی وجود دارد [۲۰،۱۹]. در سال‌های ۱۹۷۹ و ۱۹۸۷ پیترسون و فینکل آستین نشان دادند، با این‌که ایمنی‌زایی توسط هر دو آنتی‌بادی ضد LTA و ضد LTB ایجاد می‌شود، اما آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده توکسین LT تقریباً به‌طور کامل به‌وسیله زیرواحد LTB ایجاد می‌شوند [۲۱،۲۲]. یان و همکاران در سال ۲۰۰۴ ژن ltb را در سیستم پروکاریوتی بیان کردند و ایمنی‌زایی آن را مورد بررسی قرار داد. هم‌چنین سیستم بیانی پروکاریوت، ژن هدف را با کارایی بسیار بالا بیان کرد. ژن بیان شده، خاصیت ایمنی و ادجووانتی مناسبی را از خود نشان داد. همه این شواهد حاکی از لزوم استفاده از LTB در توسعه واکسن مهندسی شده علیه ETEC است [۲۳]. هاجی شنگالیس در سال ۲۰۰۵ نشان داد که LTB علاوه بر خاصیت ادجووانتی باعث افزایش پاسخ ایمنی نیز می‌شود [۲۴]. سرم ضد تتانواسپاسمین، بدن را در برابر کزاز محافظت می‌کند. تاکنون برای تولید این سرم و مصون کردن فرد در برابر بیماری کزاز از توکسوئید آن استفاده شده است اما بسیاری از محققین به تولید زیرواحدهای نوترکیب این توکسین با ویژگی‌های منحصر به فرد آن رو آورده‌اند [۲۵]. اسمیت و همکاران نشان دادند که امکان زیر همسانه‌سازی قطعات غیر توکسیک ژن bont در E. coli وجود دارد. در این مطالعه، موش‌ها را با قطعات غیرتوکسیک نوترکیب ایمن نموده و قابلیت ایمنی‌زایی آن‌ها را در شرایط زنده بررسی نمودند. نتایج ارزیابی ایمن‌سازی با قطعات مختلف از هر یک از سه قسمت توکسین، نشان داد که فقط یک قطعه ۵۰ کیلودالتونی از ناحیه FC توکسین قادر است موش‌ها را کاملاً در برابر توکسین ایمن نماید، لذا کار بیش‌تر محققین بر روی همین قطعه متمرکز گردیده است [۲۶]. در این مطالعه سعی شده که میزان ایمنی‌زایی در گروه‌های موشی مورد مطالعه در شرایط

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

کاملاً یکسان و البته با سه آنتی‌ژن متفاوت بررسی شوند. تمام پارامترهای به‌کار رفته در ایمنی‌زایی از جمله: دوز تزریقی هر آنتی‌ژن، راه ورودی آنتی‌ژن، ادجووانت استفاده شده، فاصله زمانی بین تزریق‌ها، نوع حیوان، تجهیزات و کلیه مواد مورد استفاده و شرایط نگه‌داری آن‌ها .... مواردی بوده‌اند که برای یکسان کردن شرایط ایمنی‌زایی مد نظر بوده است. به همین دلیل می‌توانیم این‌گونه استدلال نماییم که تفاوت ایجادشده در پاسخ ایمنی (اعم از میزان تیتر آنتی‌بادی) توسط هر گروه احتمالاً به خاطر ساختار متفاوت آنتی‌ژن‌های LTB, THc و BONT/Hc باشد. توکسوئیدهای کزاز، بوتولینوم و LTB به ترتیب خاطره ۱۰ و ۲ ساله و شش ماهه را به وجود می‌آورند [۲۷،۲۸]. پروتئین‌های نوترکیب LTB, THc و BONT/Hc قسمت اصلی ایمونوژن این سه توکسوئید می‌باشند [۲،۲۹]. تیتر آنتی‌بادی تولیدی توسط پروتئین نوترکیب THc با BONT/Hc و یا پروتئین نوترکیب THc با LTB تفاوت معنی‌دار و آشکاری را نشان می‌دهد (شکل‌های ۵ تا ۸) در حالی که بین میزان تیتر آنتی‌بادی BONT/Hc و LTB در غلظت‌های بالا اختلاف معنی‌داری با هم ندارند حال آن‌که در غلظت‌های پائین‌تر میزان تیتر آنتی‌بادی بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد که به ماهیت متفاوت این دو نوع آنتی‌ژن بر می‌گردد [۳۰]. بنابراین می‌توان این چنین استدلال نمود که بین ساختار این سه پروتئین، تیتر آنتی‌بادی ناشی از هر کدام و خاطره ایمنی ایجاد شده میان این سه پروتئین روابطی معنی‌دار وجود دارد که نیاز به تحقیقات بیش‌تر دارد.

تشکر و قدردانی

از آقایان دکتر محمود تولایی و دکتر شهرام نظریان به خاطر در اختیار گذاشتن سامانه ژنی مطالعات قبلی تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

[1] Coster TS, Wolf MK, Hall ER, Cassels FJ, Taylor DN, Liu CT, et al. Immune response, ciprofloxacin activity, and gender differences after human experimental challenge by two strains of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect Immun 2007; 75: 252-259.

[2] Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. Expert Rev Vaccines 2008; 7: 795-804.

[3] Mudrak B, Kuehn MJ. Heat-labile enterotoxin: beyond G(m1) binding. Toxins (Basel) 2010; 2: 1445-1470.

[4] Salimian J, Salmanian A, Khalesi R, Mohseni M, Moazzeni S. Antibody against recombinant heat labile enterotoxin B subunit (rLTB) could block LT binding to ganglioside M1 receptor. Iran J Microbiol 2010; 2: 120-127.

[5] Sears CL, Kaper J B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol Rev 1996; 60: 167-215.

[6] Millar DG, Hirst TR, Snider DP. Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its vlosely related homologue, the B subunit of cholera toxin. Infect Immun 2001; 69: 3476-3482.

[7] Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends Biochem Sci 2002; 27: 552-558.

[8] Zhang JC, Sun L, Nie QH. Botulism, where are we now? Clin Toxicol (Phila) 2010; 48: 867-879.

[9] Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. Biochimie 2000; 82: 427-446.

[10] Calvo AC, Olivan S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. Int J Mol Sci 2012; 13: 6883-6901.

[11] Bruggemann H, Gottschalk G. Insights in metabolism and toxin production from the complete genome sequence of Clostridium tetani. Anaerobe 2004; 10: 53-68.

[12] Zdanovsky AG, Zdanovskaia MV. Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 3166-3173.

[13] Yu YZ, Li N, Zhu HQ, Wang RL, Du Y, Wang S, et al. The recombinant Hc subunit of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A is an effective botulism vaccine candidate. Vaccine 2009; 27: 2816-2822.

[14] Nayak R, Lal G, Shaila MS. Perpetuation of immunological memory: role of serum antibodies and accessory cells. Microbes Infect 2005; 7: 1276-1283.

[15] Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From vaccines to memory and back. Immunity 2010; 33: 451-463.

[16] Herzenberg LA. B-1 cells: the lineage question revisited. Immunol Rev 2000; 175: 9-22.

[17] MacLennan IC. Germinal centers. Annu Rev Immunol 1994; 12: 117-1139.

[18] Tarlinton D. B-cell memory: are subsets necessary? Nat Rev Immunol 2006; 6: 785-790.

[19] Celada F. The cellular basis of immunologic memory. Prog Allergy 1971; 15: 223-267.

[20] Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R. Generation and maintenance of immunological memory. Seminar Immunol 2004; 16: 323-333.

[21] Peterson JW, Hejtmancik KE, Markel DE, Craig JP, Kurosky A. Antigenic specificity of neutralizing anti body to cholera toxin. Infect Immun 1979; 24: 774 -779.

[22] Finkelstein RA, Burks MF, Zupan A, Dallas WS, Jacob CO, Ludwig DS. Epitopes of the cholera family of enterotoxins. Rev Infect Dis 1987; 9: 544-561.

[23] Yan J, Wang Y, Shao SH, Mao YF, Li HW, Luo YH. Construction of prokaryotic expression system of ltB-ureB fusion gene and identification of the recombinant protein immunity and adjuvanticity. World J Gastroenterol 2004; 10: 2675-2679.

[24] Hajishengallis G, Arce S, Gockel CM, Connell TD, Russell MW. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections. J Dent Res 2005; 84: 1104-1116.

[25] Ozutsumi K, Sugimoto N, Matsuda M. Rapid, simplified method for production and purification of tetanus toxin. Appl Environ Microbiol 1985; 49: 939-943.

[26] Roblot P, Roblot F, Fauchere JL, Devilleger A, Marechaud R, Breux JP, et al. Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers, France. J Med Microbiol 1994; 40: 379-384.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

[27] Rezaie E, Miri A, Salimian J, Olad GH, Saadati M, Ebrahimi M, Boostani H. Survey and comparison of immunization scale of the recombinant proteins of attachment subunit of tetanus and botulinom(A) toxins. J ilam Univ Med Sci 2013; 21: 109-114.

[28] Miri A, Salimian J, Rezaie E, Olad GH, Saadati M, Arefpoor MA, Azizi Jalilian F. Evaluation and comparison of immunization level between recombinant proteins of binding subunit of entrotoxigenic Escherichia coli and botulinum toxin. J Shahrekord Univ Med Sci 2013; 15: 159-166.

[29] Byrne MP, Smith LA. Development of vaccines for prevention of botulism. Biochimie 2000; 82: 955-966.

[30] Tavallaie M, Chenal A, Gillet D, Pereira Y, Manich M, Gibert M, et al. Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies. FEBS Lett 2004; 572: 299-306.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

Expression, extraction, purification and immunogenicity study of three recombinant proteins LTB, THc, BoNT / A and Comparison of produced antibody titer against them in laboratory animals

Hekmat Nekooei Fard (M.Sc)[1], Mojtaba Saadati (Ph.D)[1], Marziyeh Ebrahimi (Ph.D)[2], Gholamreza Olad (Ph. D) [*3], Farid Azizi Jalilian (Ph.D)[4], Jafar Salimian (Ph.D)[5], Bijan Sedighi Moghadam (Ph.D)[6] Mona Zamanian Azodi (Ph.D)[7]

1 - Dept. of Biology Science, Faculty of Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran
2 - Dept. of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Tehran, Iran
3 - Applied Biotechnology Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Dept. of Microbiology, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
5 - Chemical Injuries Research Center, Baqiatallah University of Medical Science, Tehran, Iran
6 - Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
7-Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 11 Nov 2014; Accepted: 22 Oct 2014)

Introduction: Among the bacterial agents, the most common cause of diarrheal disease is Entrotoxigenic Escherichia coli. Lebal toxin B (LTB) subunit of LT toxin could induce six-month immunity. Tetanus toxin of Clostridium tetani causes the fatal disease, tetanus. Tetanus can be prevented by vaccination with tetanus toxoid. This toxoid induces ten years immunity in humans. Binding domain of tetanus toxin (THc), of the toxoid is considered as immunogenic part of tetanus toxin. Clostridium botulinum causes botulism disease. The protectional effect of this toxoid is only two years against this disease. It seems that the immunogenicity potency of these three subunits may influence on the memory longevity. The aim of this study is the assessment of LTB, BoNT/A and THc immunogenicity in mouse.

Materials and Methods: The transgenic E. coli BlDE3 with pET28a vector, containing recombinant ltb, thc and bont/A-Hc genes separately were used for expression of recombinant proteins. All mentioned proteins were derived, purified and evaluated on SDS-PAGE gel. Finally, mice immunization were carried out and antibody titration of all recombinant proteins were evaluated and compared using t-Test in SPSS software.

***Results*:** The result of SDS-PAGE gel evaluation showed a proper expression. The immunoassay results of serum showed that the antibody titer against the recombinant protein of THc was higher than those for the recombinant protein of BONT/A-Hc and LTB. A difference in antibody titer also was observed between two proteins i.e. BoNT/A-Hc and LTB (P value <.0001).

Conclusion: The differences in the antibody titer may be related to the longevity of memory cells. However, the result needs more studies.

Keywords: Antibody titration, Immunization, BoNT/A-Hc, LTB, THc

*Corresponding author. Fax: +98 21 22714248 Tel: +98 9128043492
grolad@gmail.com

How to cite this article:
Nekooei Fard H, Saadati M, Ebrahimi M, Olad G, Azizi Jalilian F, Salimian J, et al . Expression, extraction, purification and immunogenicity study of three recombinant proteins LTB, THc, BoNT / A and Comparison of produced antibody titer against them in laboratory animals. koomesh. 2015; 16 (2) :246-253
URL http://koomeshjournal.semums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-2658-1&slc_lang=fa&sid=1

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]