مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره ۲، بهمن ۱۳۹۳، صفحه ۱۴-۷

تولید و تخلیص آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه کلرا توکسین

شهرام نظریان (PhD)[۱]، محمدعلی عارف‌پور (MSc) *[۱]، محمدجواد باقری‌پور (MSc)[۱]، غلامرضا اولاد (PhD)[۲]

۱- مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع) تهران
۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران

دریافت: ۹۳/۵/۱۹ ، اصلاح:۹۳/۷/۲ ، پذیرش:۹۳/۹/۵

خلاصه

سابقه و هدف: وبا بیماری خطرناکی است که توسط باکتری ویبریو کلرا ایجاد می شود. توکسین کلرا مهم‌ترین عامل ویرولانس در بیماریزایی ویبریوکلرا می باشد. زیر واحد B انتروتوکسین (CTxB) که مسئول اتصال سم به سلول یوکاریوتی است، ویژگیهای ایمونوژنیک دارد. هدف از این تحقیق تولید و تخلیص آنتی بادی علیه پروتئین نوترکیبCTxB می‌باشد.

مواد و روشها: پروتئین نوترکیب CTxB بیان و با کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA تخلیص گردید. تعداد ۱۰ موش BALB/C با سن پنج هفته به دو گروه کنترل و تست تقسیم شدند. هر موش از گروه تست، ۱۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب را به همراه ادجوان فروند به صورت زیر جلدی دریافت کرد. تیترآنتی بادی در موشهای ایمن شده به روش الایزا بررسی شد. سرم موشهای دریافت کننده PBS به عنوان کنترل در روش الایزا استفاده شد. IgG به وسیله ستون تمایلی پروتئین G خالص گردید. اثر مهاری آنتی بادی ضد CTxB بر روی توکسین با استفاده از روش GM1-ELISA ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج الایزا واکنش اختصاصی پروتئین نوترکیب با آنتی بادی ضد توکسین کلرا را نشان داد. میزان پروتئین خالص شده برای هر لیتر از محیط ۹ میلی گرم بود. نتایج الایزا نشان داد پس از هر بار تزریق میزان تولید آنتی‌بادی در بدن موش‌ها افزایش یافته است. میزان جذب مربوط به سرم با رقت ۱/۵۰۰ بالاتر از ۳ بود. غلظت آنتی بادی تخلیص شده بر طبق روش برادفورد، mg/ml ۱ بود. در واکنش الایزا، ۱۵۶ نانوگرم از زیر واحد اتصالی سم توسط آنتی بادی شناسایی شد. اتصال توکسین به GM1 کوت شده با استفاده از سرم حیوان ایمن شده تا ۷۰ درصد کاهش یافت.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق کارائی پروتئین CTxB نوترکیب به عنوان ایمونوژن موثر تحریک کننده پاسخ هومورال علیه توکسین کلرا را نشان داد. آنتی بادی ضد زیر واحد B نوترکیب، توانائی شناسایی توکسین و مهار اتصال آن به گیرنده GM1 را دارا است.

واژه های کلیدی: ویبریوکلرا، زیر واحد B توکسین کلرا، پروتئین نوترکیب، آنتی بادی پلی کلونال، GM1-ELISA.

مقدمه

ویبریو کلرا عامل بیماری خطرناک وبا است که اغلب درکشورهای جهان سوم بروز یافته و با مرگ و میر بالایی همراه است (۲و۱). بیماری وبا توسط سویه‌هایی از ویبریو کلرای تولیدکننده توکسین وبا ایجاد می‌شود. اگرچه بیش از ۲۰۰ سروتایپ از ویبرو کلرا شناسایی شده است اما فقط دو سروتایپ O1 وO139 سبب بروز بیماری وبای پاندمیک و اپیدمیک می‌شوند (۴و۳). در نتیجهٔ عملکرد توکسین، آب و الکترولیت‌ها از بدن خارج شده و در نتیجه، کاهش شدید حجم پلاسمای خون و در نهایتا مرگ در عرض چند ساعت ایجاد خواهد شد (۵). در میان فاکتورهای بیماری‌زایی متعدد ویبریو کلرا، مهم‌ترین آنها کلرا توکسین می‌باشد که یک اگزوتوکسین بوده و عامل اصلی بیماری وبا می‌باشد (۶). با توجه به خواص آنتی‌ژنیک قابل توجه کلراتوکسین، مطالعات زیادی جهت استفاده از این توکسین برای ایجاد مصونیت در برابر این بیماری صورت گرفته است (۸و۷). این توکسین، پروتئینی متشکل از زیر واحدهای هترودایمر A (CtxA) با وزن مولکولی ۲۷۴۰۰ دالتون و زیر واحدهای هوموپنتامرB (CtxB) با وزن مولکولی حدود ۵۸۰۰۰ دالتون می‌باشد. زیر واحد B شامل ۵ قسمت ۱۰۳ اسید آمینه‌ای است که آرایش حلقه مانند داشته و دارای محل اتصال به GM1 سلول‌های اپیتلیال ژژنوم هستند (۹). زیر واحد A به صورت پروتئولیتیکی برش خورده و دو زنجیرهٔ پلی پپتیدی به نامهای A1 و A2 ایجاد می‌نماید. به نظر می‌رسد مسئول کلیه فعل و انفعالات بیولوژیکی، زیر واحد A1 کلرا توکسین باشد (۱۰و۷). زیر واحد B مسئول اتصال سم به گیرنده‌های موجود در غشاء سیتوپلاسمی سلول میزبان بوده و فاقد خاصیت سمی می‌باشد. این بخش، زیر واحد A1 را قادر

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۲۰۵۱ دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران می‌باشد.
* مسئول مقاله: محمدعلی عارف پور
آدرس: تهران، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات زیست شناسی. تلفن: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۴
E-mail: maarefpour@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.1.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.7]

می‌سازد تا درون سلول نفوذ کند (۱۱). عملکرد زیر واحد A1 باعث افزایش آدنیلات سیکلاز و افزایش مداوم آدنوزین مونو فسفات حلقوی (cAMP) داخل سلولی می‌گردد که در نهایت ترشح بیش از حد آب و الکترولیت در روده را سبب می‌شود (۹و۸).

علی‌رغم خواص ایمونولوژیکی کلرا توکسین که بسیار مورد توجه محققان می‌باشد، سمیت آن موجب محدود شدن استفاده برای واکسیناسیون انسانی شده است. در عوض، به علت عدم خاصیت سمی زیر واحد B، استفاده از CTxB به طور وسیعی به عنوان ایمونوژن مخاطی در انسان مورد بررسی قرار گرفته است (۱۴-۱۲). با توجه به این امر، تولید پروتئین نوترکیب CTxB می‌تواند کاربردهای فراوانی در تهیه واکسن‌های خوراکی داشته باشد (۱۶و۱۵). روش‌های قدیمی تخلیص CTxB بر پایه کشت انبوه باکتری ویبریو کلرا و سپس جمع‌آوری محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته و نهایتا استخراج سم از آن بود. در این روش‌ها، علاوه بر این که امکان جداسازی CTxB به صورت خالص وجود نداشت، پروتئین بدست‌آمده حاوی مقادیری CtxA و سایر پروتئین‌های ناخواسته بود که موجب محدودیت استفاده از آن می‌شد (۱۷). در روش تولید پروتئین نوترکیب، علاوه بر کاهش خطرات ناشی از کار با عامل بیماری، پروتئین بدست آمده، خالص بوده و تولید آن نیز مقرون به صرفه می‌باشد به طوری که می‌توان در مدت زمان کوتاه‌تر و با هزینه کمتر، میزان پروتئین خالص بیشتری تولید نمود (۱۷).

مطالعات انسانی با استفاده از توکسوئید کلرا کانژوگه شده با ترکیبات شیمیایی، کارائی محافظتی مناسبی را نشان نداده است که یکی از دلایل احتمالی اثر گلوترآلدئید بر خاصیت آنتی ژنی توکسین برشمرده می‌شود (۱۸و۳). Levine و همکاران نشان دادند که استفاده از توکسوئید تهیه شده با ترکیبات شیمیایی سبب ایجاد تیتر بالایی از آنتی بادی ضد توکسین نخواهد شد (۱۸). در تحقیق Clemens و همکاران مشخص گردید که استفاده از باکتری کشته شده به همراه زیر واحد اتصالی سم تخلیص شده از باکتری، نسبت به تجویز باکتری کشته شده به تنهایی، کارائی بیشتری را دارد (۱۹).

در تحقیق Dakterzada و همکاران، پروتئین نوترکیب CTxB به میزان ۱ میلی گرم در لیتر بیان و تخلیص شد. عملکرد پروتئین نوترکیب بدست آمده با استفاده از روش GM1-ELISA مورد بررسی قرار گرفت (۲۰). در تحقیقی که Zeighami و همکاران انجام دادند حداکثر میزان پروتئین نوترکیب تخلیص شده را ۴۸۰ میکروگرم در هر لیتر از محیط کشت گزارش کردند (۲۱). Yuki و همکاران اثرات آنتی بادی تولید شده علیه زیر واحدهای کاتالیتیک و اتصالی سم، بر عملکرد سم و ایجاد اسهال در مدل حیوانی را بررسی و نشان دادند که آنتی بادی تولید شده علیه زیر واحد اتصالی سم، کارائی بیشتری در ایجاد مصونیت و عدم بروز علائم اسهال در مدل حیوانی را دارد (۲۲).

در مطالعه Nochi و همکاران نیز آنتی بادی ایجاد شده در موش توانست به میزان ۸۰ درصد، از اتصال کلرا توکسین به گیرنده GM1 ممانعت کند (۲۳). با استفاده از پروتئین نوترکیب می‌توان با ایمن‌سازی، آنتی‌بادی پلی‌کلونال تهیه کرد. آنتی بادی‌های پلی‌کلونال مخلوطی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشند، که علیه اپی توپهای مختلف تولید می‌شوند و با تمایل بالا به مولکول آنتی ژن اتصال می‌یابند که احتمالا به دلیل وجود انواع مختلف آنتی بادی علیه اپی توپهای آنتی ژن در آنها می‌باشد (۲۴).

از آنجا که این آنتی بادی‌ها بر علیه چندین اپی‌توپ ایجاد شده‌اند، لذا در زمینه مقابله با عوامل میکروبی حائز اهمیت می‌باشند. برای ایجاد ایمنی علیه ویبریوکلرا، روش‌های ضد توکسین و ضد باکتری مطرح است (۱) که در تحقیق حاضر، ایمنی‌زائی و تولید آنتی بادی بر اساس زیر واحد توکسین مد نظر می‌باشد. زیر واحد نوترکیب CTxB علاوه بر این که به عنوان ایمونوژن مطرح است، می‌تواند برای تولید آنتی بادی علیه توکسین به منظور شناسایی آن هم مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این مطالعه تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه زیر واحد اتصالی توکسین کلرا و بررسی ممانعت از اتصال سم به پذیرنده آن در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه از باکتری *E. coli* BL21-DE3 و جهت رشد آن، از محیط‌های کشت LB مایع و آگار استفاده گردید. مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی از شرکت‌های مرک، سیناژن، کیاژن و فرمنتاز تهیه شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل-نیتریلو استیک اسید (Ni-NTA) از شرکت کیاژن و جهت تخلیص آنتی‌بادی از ستون G شرکت Roche استفاده شد. تعداد ۱۰ موش BALB/C با سن پنج هفته به دو گروه کنترل و تست تقسیم شدند.

تولید و تخلیص پروتئین CTxB: پروتئین نوترکیب پس از بیان، با استفاده از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA تخلیص شد (۲۵).

تایید پروتئین تخلیص شده با روش الایزا: برای تأئید پروتئین تخلیص شده از Anti CTxB و تکنیک الایزا استفاده شد. پروتئین CTxB تخلیص شده با سریال رقت ۴ میکروگرم تا ۱۲۵ نانوگرم در چاهک‌های اول تا آخر تثبیت شد. سپس چاهک ها با بافر شستشو (PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) سه مرتبه شسته شدند. در این مرحله، داخل تمام چاهکها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ (۵ درصد شیر خشک بدون چربی در بافر شستشو) ریخته و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از شستشو به ترتیب از رقت ۱/۵۰۰۰ آنتی بادی ضد CTxB و رقت ۱/۲۵۰۰ آنتی بادی کانژوگه خرگوشی استفاده گردید. سوبسترای OPD و H_2O_2 به‌چاهک ها افزوده و بعد از ۱۵دقیقه، پس از مهار واکنش با اسید سولفوریک، در طول موج ۴۹۵ نانومتر، شدت نور با قرائت‌گر الایزا خوانده شد.

بررسی ایمنی زایی: جهت بررسی ایمنی‌زایی در مدل موش، ۱۵۰ میکرولیتر حاوی ۵۰ میکروگرم از پروتئین تخلیص شده، با بافر PBS به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده و سپس با اضافه نمودن هم حجم آن از ادجوانت کامل فروند، حجم نهایی آن به یک میلی لیتر رسانده شد. تعداد ۵ موش برای تزریق در نظر گرفته شد و مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از مخلوط تهیه شده فوق (حاوی ۱۰ میکروگرم از آنتی‌ژن)، بصورت زیر جلدی به هر موش تزریق گردید. جهت بررسی و تایید نتایج حاصل و همچنین جلوگیری از پاسخ کاذب، به یک گروه ۵ تایی به عنوان شاهد فقط بافر PBS استریل تزریق گردید. تزریقات به فواصل ۱۴ روز انجام شد.

جهت بررسی ایمنی‌زائی، از چشم حیوانات (ایمن و غیر ایمن) خونگیری 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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.1.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.7]

سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای جداسازی سرم، ابتدا لخته خون خارج شده، سرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و مایع شفاف زرد رنگ به دست آمده جهت استفاده در مراحل بعدی جدا گردید. در مرحله بعد آنتی‌بادی پلی کلونال موجود در سرم به روش الایزا مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

تخلیص آنتی‌بادی پلی کلونال: تخلیص آنتی‌بادی پلی کلونال سرم حیوانات ایمن شده با آنتی‌ژن نوترکیب CTxB، با ستون G صورت پذیرفت. ابتدا ستون با ۵ میلی‌لیتر از بافرهای ۱۰۰ mM Tris و ۱۰ mM Tris با pH=۸ شسته و اجازه داده شد تا بافر از ستون کاملا خارج گردد. سپس ۰/۱ حجم سرم، محلول ۱ M Tris با pH=۸ به سرم افزوده و پس از ورتکس به ستون منتقل و خروجی ستون جمع آوری شد. مجددا ستون با ۵ میلی‌لیتر از بافرهای ۱۰۰ mM Tris و ۱۰ mM Tris با pH=۸ شسته و خروجی ستون جمع آوری گردید. در مرحله بعد، ستون با ۵ میلی‌لیتر محلول گلایسین ۱۰۰ mM با pH=۳ شسته و خروجی ستون جمع‌آوری گردید. در نهایت نمونه‌های جمع آوری شده پس از تعیین غلظت به روش برادفورد، با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. پس از تخلیص آنتی‌بادی و تعیین غلظت آن، از آنتی بادی سریال رقت تهیه و از آن برای الایزا استفاده شد.

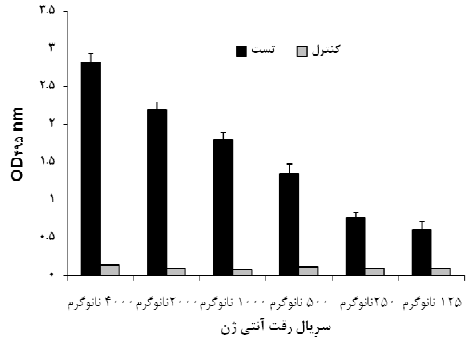
ارزیابی میزان فعالیت آنتی بادی در ممانعت از اتصال توکسین LT به پذیرنده GM1: به منظور ارزیابی فعالیت آنتی بادی تهیه شده، آزمایش ممانعت از اتصال توکسین به پذیرنده GM1 صورت گرفت. ابتدا مقدار ۱۰۰ نانوگرم از پذیرنده GM1 در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ داخل چاهک‌های میکروپلیت ریخته و به مدت ۲ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از تخلیه مواد، محتوای چاهک شستشو و با استفاده از محلول شیر خشک ۵ درصد بلاک گردید. محلول رویی کشت باکتری حاوی ۵۰ نانوگرم از توکسین در رقتهای سرم و محلول حاصل از نمونه کنترل به چاهک‌ها افزوده شد. پس از شستشو و خشک کردن، آنتی بادی ضد CTXB به چاهک‌ها افزوده شد. در ادامه روش الایزا از آنتی بادی کانژوگه موشی و سوبسترای OPD استفاده شد (۲۷و۲۶). با مقایسه میزان OD واکنش الایزا در حضور سرم غیر ایمن، آنتی بادی تخلیص شده و نمودار استاندارد اتصال توکسین به رسپتور، درصد اتصال به GM1 محاسبه گردید.

یافته ها

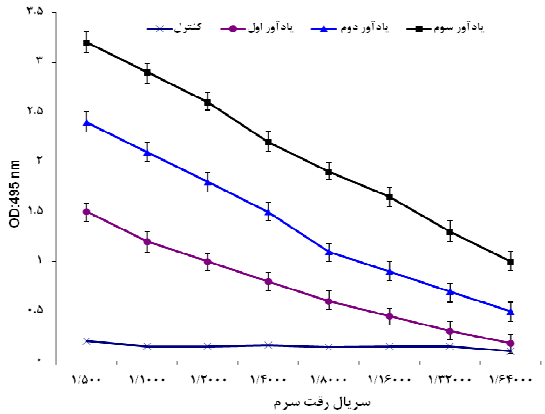
تولید پروتئین نوترکیب و تأئید آن با تکنیک الایزا: پس از انتقال سازه pET28a/ctxB به سلولهای مستعد باکتری *E.coli* BL21-DE3، القاء بیان از ژن مورد نظر انجام و پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون نیکل به روش دناتوره تخلیص شد. با استفاده از دیالیز شیب اوره، بافر PBS جایگزین اوره ۸ مولار گردید. جهت تأئید پروتئین نوترکیب، از تکنیک الایزا با استفاده از آنتی‌بادی Anti CTX استفاده شد. این آنتی‌بادی توانسته است پروتئین نوترکیب حاصل از بیان ژن ctxB را به خوبی شناسایی نماید (نمودار ۱). همانطور که نتایج نشان می دهد مقادیر کم از پروتئین نوترکیب نیز به خوبی با آنتی بادی واکنش می‌دهد به گونه‌ای که واکنش اتصالی بین آنتی‌بادی و ۱۲۵ نانوگرم از پروتئین نیز معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$).

نتایج سنجش آنتی‌بادی ضد CTxB با الایزا: ایمنی‌زایی حیوانات با تزریق پروتئین CTxB حاصل به ۵ موش انجام گردید. در فواصل تزریقات و پس از گذشت دو هفته از آخرین تزریق، از موش‌ها خونگیری به عمل آمد و سرم آن‌ها تهیه و واکنش الایزا انجام شد. پس از هر بار تزریق میزان تولید آنتی‌بادی در بدن موش‌ها افزایش یافت (نمودار ۲).

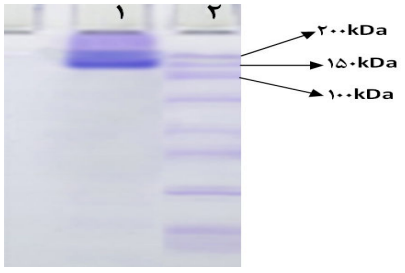
تخلیص آنتی‌بادی پلی کلونال: با استفاده از ستون G، آنتی‌بادی IgG از سرم موش‌های ایمن شده تخلیص گردید (شکل ۱). غلظت آنتی‌بادی تخلیص شده از سرم مربوط به یاد آور سوم، بر اساس روش برادفورد ۱ µg/µl محاسبه گردید. نتایج الایزا با استفاده از آنتی‌بادی تخلیص‌شده نشان داد که این آنتی‌بادی به خوبی پروتئین نوترکیب را شناسایی می‌کند (نمودار ۳).



نمودار ۱. تأئید پروتئین نوترکیب CTxB از طریق الایزا

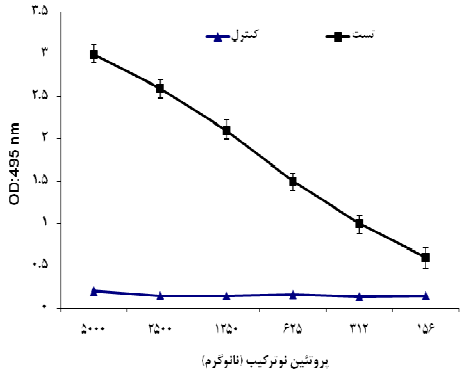


نمودار ۲. نتایج تست الایزای سنجش آنتی‌بادی حاصل از ایمنی‌زایی



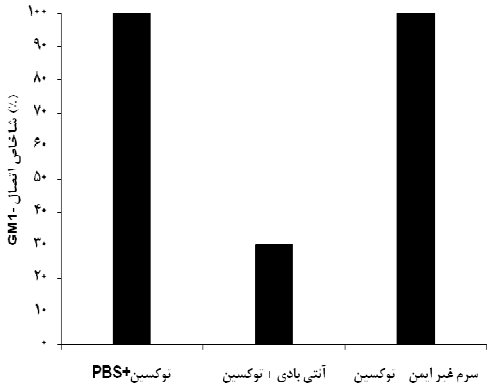
شکل۱. بررسی آنتی بادی تخلیص شده بر روی ژل SDS PAGE
ستون ۱) آنتی بادی تخلیص شده ستون ۲) نشانگر اندازه پروتئینی

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.1.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.7]



نمودار ۳. نتایج الایزای سنجش آنتی‌بادی تخلیص شده با پروتئین نوترکیب CTxB

ممانعت آنتی بادی از اتصال توکسین بـه پذیرنـده GM1: بـه منظـور ارزیـابی فعالیت آنتی بادی تولیدشده، آزمایش ممانعت از اتصال توکسین به GM1 انجـام شد. با مقایسه میزان OD واکنش الایزا در حضور سرم غیـر ایمـن، آنتـی بـادی تخلیص شده و نمودار استاندارد اتصال توکسـین بـه رسـپتور، درصـد اتصـال بـه GM1 محاسبه گردید. بر این اساس آنتی بادی تولید شده، تقریبا از اتصال ۷۰٪ از توکسین به پذیرنده GM1 ممانعت کرد (نمودار ۴).



نمودار ۴. بررسی فعالیت آنتی بادی در ممانعت از اتصال توکسین به پذیرنده GM1

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق، آنتی بادی پلی کلونال علیـه پـروتئین نوترکیـب زیـر واحـد اتصالی سم کلرا در حیوان آزمایشگاهی تولید گردید که توانست از عملکرد اتصالی سم به پذیرنده آن ممانعت کند. پروتئین های کلرا توکسین و زیر واحد اتصالی آن به عنوان ادجوان‌های موثر مد نظر قرار دارند. مطالعات نشان داده اند که بر خلاف کلرا توکسین که دارای سمیت بوده و استفاده از آن به ادجوان محدود شده اسـت، CTxB علاوه بر اینکه دارای خاصیت ایمونوژنی و ادجـوانی مخـاطی مـی‌باشـد برای سلول‌ها نیز خاصیت سمی ندارد. در واقع CTxB با اتصال به آنتـی‌ژن‌هـا، موجب تحریـک پاسـخ ایمنـی بـه واسـطه بـرهمکنش آنتـی‌ژن بـا سـلول‌هـای عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) موجود در مخاط گوارش و تنفس می‌شود. CTxB به صورت کوالان به آنتی‌ژن‌ها متصل شده و آن‌ها را از طریق گانگلیوزید GM1 به سلول‌های مخاطی حمل می‌کند و بـدین ترتیـب خاصـیت ادجـوانی CTxB زمانی که به صورت کونژوگه همراه با سایر پـروتئین‌هـا بـوده، تاییـد شـده اسـت (۲۸و۱۷). مولکول CTxB نقش مهمی در اتصال سم کلرا به سلولهای اپی تلیال روده داشته و آنتی بادی تولیده شده علیـه آن مـی توانـد از اثـرات سـم ممانعـت کنـد(۱). بـا توجـه بـه خـواص ادجـوانی و همچنـین اهمیـت ایـن پـروتئین در واکسن‌سازی، به نظر می‌رسد بیان این پروتئین به صورت نوترکیب، روش مناسب، کارا و مقرون به صرفه‌ای برای تولید این پروتئین و انجام مطالعـات بعـدی ماننـد اثرات ایمنی‌زایی آن به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ایمونـوژن و همچنـین بـه صورت‌های مختلف مانند خوراکی، باشد.

در ایـن مطالعـه، پـس از بهینـه‌سـازی و انتقـال سـازه ژن صـناعی pET28a/ctxB به باکتری، بیـان و تخلـیص پـروتئین نوترکیـب آن صـورت پذیرفت و تست‌های تائید کننده این پروتئین نیـز انجـام گردیـد. میـزان پـروتئین نوترکیب حاصل از تخلیص ۹ میلـی گـرم در هـر لیتـر از محـیط کشـت بـود. در مطالعه‌ای کـه Zeighami و همکـاران انجـام دادنـد حـداکثر میـزان پـروتئین نوترکیب تخلیص شده را ۴۸۰ میکروگرم در هر لیتر از محیط کشت گزارش کردند (۲۱). پس از تزریق آن به حیوانات آزمایشگاهی، بررسی تیتر آنتـی بـادی از سـرم جدا شده از خون این حیوانات با تست الایزا انجام و در نهایت تخلیص آنتی بادی پلی کلونال تولید شده علیه کلرا توکسین، به کمک ستون G انجام پذیرفت. علت استفاده از ستون پروتئین G برای تخلیص آنتی بادی، افزایش سرعت و دقـت در خالص سازی می‌باشد. بر این اساس نیازی به استفاده از سـولفات آمونیـوم بـرای ترسیب اولیه آنتی‌بادی نبوده و همچنین نیاز به استفاده از مراحل دشوار و زمان بر ستون‌های کروماتوگرافی تعویض یونی نیست. از آنجاکه آنتی بادی بدسـت آمـده خالص است و امکان تعیین غلظـت آن وجـود دارد مـی‌تـوان از آن در روش‌هـای تشخیص توکسین کلرا از جمله ساندویچ الایزا نیز استفاده کرد.

در تحقیق حاضر از زیر واحد اتصالی سم برای ایمنی زائی استفاده شد و زیر واحد کاتالیتکی سم مد نظر قرار نگرفت. در مطالعه انجـام شـده توسـط Yuki و همکاران، اثرات آنتی بادی تولید شده علیه زیر واحدهای کاتالیتیک و اتصالی سـم بر عملکرد سم و ایجاد اسهال در مدل حیوانی بررسی شد. نتایج تحقیق نشـان داد که استفاده از زیر واحد اتصالی به عنوان ایمونوژن به میزان ۲ برابـر بـیش از زیـر واحد اتصالی در بروز علائم اسـهال در حیـوان تـاثیر دارنـد (۲۲). فعالیـت خنثـی کنندگی آنتی بادی تولیدشده نشان می‌دهد که آنتـی بـادی ضـد CTB سـاختار پنتامر و طبیعی زیر واحد B را در توکسین شناسایی کرده و مانع از اتصال آنها بـه گیرنده GM1 شده است. آنتی‌بادی ایجـاد شـده از نـوع IgG بـوده و توانسـت میزان اتصال توکسین به گیرنده را تا ۷۰ درصد کاهش دهد. در مطالعـه Nochi و همکاران نیز آنتی بادی ایجاد شده در مـوش توانسـت بـه میـزان ۸۰ درصـد از اتصال کلرا توکسین به گیرنده GM1 ممانعت کند (۲۳).

از آنجا کـه روش تجـویز آنتـی ژن در تحقیـق حاضـر و مطالعـه Nochi متفاوت است، اختلاف درصد مهار اتصـال توکسـین نیـز قابـل تجزیـه و تحلیـل نخواهد بود. اما هر دو مطالعه اثر آنتی بادی ضد زیر واحد اتصالی سم در ممانعـت از عملکرد اتصالی توکسین کلرا را نشان می دهد. زیر واحد اتصالی توکسین کلـرا بیش از ۸۰ درصد با زیر واحد اتصالی توکسین حساس به حـرارت اشریشـیا کلـی انتروتوکسیژنیک تشابه آمینو اسیدی دارد. بر این اساس نتایج این تحقیـق را مـی توان با نتایج مطالعات انجام شـده بـر روی LTB ارزیـابی کـرد. Salimian و همکاران در مطالعه‌ای اثر آنتی بادی ضد LTB را در مهار اتصال توکسـین LT

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.1.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.7]

به گیرنده GM1 را مورد بررسی قرار دادند. آنتی بادی ضد LTB به میزان ۸۰ درصد از اتصال سم به گیرنده ممانعت کرده بود (۲۹). افزایش ۱۰ درصدی ممانعت از اتصال در مقایسه با تحقیق حاضر را می توان به میزان آنتی ژن مورد استفاده برای ایمنی سازی حیوانات مرتبط دانست چنانچه در تحقیق Salimian و همکاران، از ۲۰ میکروگرم آنتی ژن برای هر مرحله از ایمنی سازی استفاده شده اما در این تحقیق، با مقدار آنتی ژن کمتر یعنی ۱۰ میکروگرم در هر مرحله ایمنی‌زایی انجام شد. همانطور که اشاره شد با توجه به تشابه آمینواسیدی بالای توکسین‌های کلرا و حساس به حرارت اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک، از آنتی بادی پلی کلونال تهیه شده در این مطالعه می‌توان در مواردی از جمله تشخیص اولیه توکسین حساس به حرارت نیز استفاده کرد. Nazarian و همکاران در تحقیقی برای تائید پروتئین کایمر واجد آنتی ژنهای ETEC از آنتی‌بادی ضد کلرا توکسین استفاده کردند (۲۶).

در تحقیق دیگر نیز Salimian و همکاران برای تائید پروتئین نوترکیب LTB از باکتری ETEC ، از آنتی بادی ضد زیر واحد اتصالی کلرا توکسین استفاده کردند (۲۹). همچنین ایمونوژن تهیه شده در مطالعات ایمنی زائی علیه ETEC قابل استفاده خواهد بود. Walker و همکاران نیز نشان دادند که استفاده از پروتئین نوترکیب CTxB به همراه پنج فاکتور اتصالی شایع از ETEC سبب ایجاد ایمنی علیه ETEC و توکسین آن در افراد تحت آزمایش می‌شود (۳۰). نتایج این تحقیق کارائی پروتئین CTxB نوترکیب به عنوان ایمونوژن موثر تحریک کننده پاسخ هومورال علیه توکسین کلرا را نشان داد. همچنین از آنتی‌بادی پلی‌کلونال تهیه شده می‌توان در روش‌های تشخیصی توکسین کلرا که مبتنی بر آنتی بادی می‌باشند نیز استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع) به جهت فراهم آوردن امکانات لازم جهت اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.1.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.7]

Production and Purification of Polyclonal Antibody against Cholera Toxin

Sh. Nazarian (PhD)[1], M.A. Arefpour(MSc)*[1], M.J. Bagheripour (MSc)[1], G.R. Olad (PhD)[2]

1. Biology Research Centre, Basic Science Faculty, Imam Hosein University, Tehran, I.R.Iran.
2. Applied Biotechnology Research Centre, Baqiatolah University, Tehran, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 17(2); Feb 2015; PP: 7-14

Received: Aug 10th 2014, Revised: Sep 24th 2014, Accepted: Nov 26th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Cholera is a debilitating enteric disease, caused by Vibrio cholerae. Cholera toxin is the most important virulence factor in the pathogenesis of Vibrio cholera. Cholera toxin B subunit (CTxB), which forms a bond between the toxin and eukaryotic cells, has immunogenic features. The purpose of this study was to produce and purify antibodies against CTxB recombinant protein.

METHODS: The CTxB recombinant protein was expressed and purified by Ni-NTA affinity chromatography. In total, ten 5-week-old BALB/C mice were divided into control and test groups. The test group subcutaneously received 10 micrograms of the recombinant protein along with Freund's adjuvant. Antibody titers were measured by ELISA method. The serum of immunized mice, receiving phosphate-buffered saline, was used in ELISA as the control. Immunoglobulin G was purified by the use of affinity column of G protein. The inhibiting effect of antibody against CTxB on toxin was examined using GM1-ELISA method.

FINDINGS: The results of ELISA method showed the binding of recombinant protein to cholera toxin antibody. The amount of purified protein for each liter of the medium was 9 milligrams. ELISA findings showed that after each injection, the amount of antibody in mice was increased. The absorption rate of serum with the dilution of 1:500 was higher than three. According to Bradford assay, the density of purified antibody was 1 mg/ml. In ELISA'S reaction, 156 ng of toxin-binding subunit was identified by the antibody. The binding of toxin to GM1 increased by 70%, using immunized animal serum.

CONCLUSION: The results of this study showed the efficiency of CTxB recombinant protein as an effective immunogen for provoking humoral response against cholera toxin. The antibody against the recombinant B subunit was able to identify toxins and inhibit its binding to GM1 receiver.

KEY WORDS: *Vibrio Cholera, B Subunit of Cholera, Recombinant Protein, Polyclonal Antibody, GM1-ELISA.*

Please cite this article as follows:

Nazarian Sh, Arefpour MA, Bagheripour MJ, Olad GR. Production and Purification of Polyclonal Antibody against Cholera Toxin. J Babol Univ Med Sci. 2015; 17(2):7-14.

* **Corresponding Author; M.A. Arefpour(MSc)**
Address: Biology Research Centre, Basic Science Faculty, Imam Hosein University, Tehran, I.R. Iran.
Tel: +98 21 77105121
E-mail: maarefpour@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.1.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.7]

References

1. Mousavi S, Nazarian S, Amani J, Rahgerdi A. Rapid screening of toxigenic vibrio cholerae O1 strains from south Iran by PCR-ELISA. Iranian biomedical journal. 2008;12(1):15-21.

2. Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of Escherichia coli O157: H7, toxigenic Vibrio cholerae, and Salmonella typhimurium by multiplex PCR. Iran J Clin Infect Dis. 2009;4(2):97-103.

3. Price GA, McFann K, Holmes RK. Immunization with cholera toxin B subunit induces high-level protection in the suckling mouse model of cholera. PLoS One. 2013;8(2):e57269.

4. Bakhshi B, Boustanshenas M, Ghorban M. A single point mutation within the coding sequence of Cholera Toxin B Subunit will increase its expression yield. Iran Biomed J. 2014;18(3):130-35.

5. Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera: a great global concern. Asian Pac J Trop Med. 2011;4(7):573-80.

6. Vanden Broeck D, Horvath C, De Wolf MJ. Vibrio cholerae: Cholera toxin. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(10):1771-5.

7. Hill DR, Ford L, Lalloo DG. Oral cholera vaccines: use in clinical practice. Lancet Infec Dis. 2006;6(6):361-73.

8. Bharati K, Ganguly NK. Cholera toxin: A paradigm of a multifunctional protein. Indian J Med Res. 2011;133:179-87.

9. Ahmadi S, Mousavi M, Sorouri R, Salimian J, Karimi A, Nazarian S, et al. Rapid detection of toxigenic vibrio cholera O1 using PCR-ENZYME-LINKED immunosorbent assay (PCR-ELISA). Kowsar Med J. 2006; 11(1):41-50. [In Persian]

10. Lima AA, Fonteles MC. From Escherichia coli heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous guanylin hormones. Braz J Med Biol Res. 2014;47(3):179-91.

11. Simon NC, Aktories K, Barbieri JT. Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. Nat Rev Microbiol. 2014;12(9):599-611.

12. Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. Cell Mol Life Sci. 2008;65(9):1347-60.

13. Fan JL, Peterson JW, Prabhakar BS. Adjuvant effects of cholera toxin b subunit on immune response to recombinant thyrotropin receptor in mice. J Autoimmun. 2000;14(1):43-52.

14. Sun JB, Eriksson K, Li BL, Lindblad M, Azem J, Holmgren J. Vaccination with dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen conjugated to cholera toxin efficiently induces specific tumoricidal CD8+cytotoxic lymphocytes dependent on cyclic AMP activation of dendritic cells. Clin Immunol. 2004;112(1):35-44.

15. Tochikubo K, Isaka M, Yasuda Y, Kozuka S, Matano K, Miura Y, et al. Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. Vaccine. 1998;16(2-3):150-5.

16. Kim HJ, Kim JK, Seo SB, Lee HJ, Kim HJ. Intranasal vaccination with peptides and cholera toxin subunit B as adjuvant to enhance mucosal and systemic immunity to respiratory syncytial virus. Arch Pharm Res. 2007;30(3):366-71.

17. de Geus B, Dol-Bosman M, Scholten JW, Stok W, Bianchi A. A comparison of natural and recombinant cholera toxin B subunit as stimulatory factors in intranasal immunization. Vaccine. 1997;15(10):1110-3.

18. Levine MM, Nalin DR, Craig JP, Hoover D, Bergquist EJ, Waterman D, et al. Immunity of cholera in man: relative role of antibacterial versus antitoxic immunity. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979;73(1):3-9.

19. Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Khan MR, Stanton BF, et al. Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh. Lancet. 1986;2(8499):124-7.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.1.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.7]

20. Dakterzada F, Mobarez AM, Roudkenar MH, Forouzandeh M. Production of pentameric cholera toxin B subunit in Escherichia coli. Avicenna J Med Biotechnol. 2012;4(2):89-94.
21. Zeighami H, Sattari M, Rezayat M. Purification of the recombinant beta subunit of Vibrio cholera entrotoxin. Arak Med Univ J. 2011;14(3):27-35. [In Persian]
22. Yuki Y, Tokuhara D, Nochi T, Yasuda H, Mejima M, Kurokawa S, et al. Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. Vaccine. 2009;27(43):5982-8.
23. Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, et al. Rice–based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain-and needle-free vaccination. Proc Natl Acad Sci. 2007;104(26):10986-91.
24. Alizadeh H, Madani R, Babaie M, Kavid N, Golchinfar F, Emami T. Preparation and purification of polyclonal antibodies against mycobacterium avium paratuberculosis antigens in rabbit. J Fasa Univ Med Sci. 2012;2(3):168-73. [In Persian]
25. Nazarian S, Arefpour MA, Bagheripour MJ, Olad G. Bioinformatical study and evaluation of expression of cholera toxin subunit B optimized gene as a vaccine cndidate. J Isfahan Med Sch. 2014;32(279):378-87. [In Persian]
26. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiol Res. 2014;169(2-3):205-12.
27. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Alerasol M, Bagheri S, Alipoor SD. Prevalent Phenotypic and Genotypic Profile of Enterotoxigenic Escherichia coli among Iranian Children. Jpn J Infect Dis. 2014;67(2):78-85.
28. Isaka M, Yasuda Y, Kozuka S, Taniguchi T, Matano K, Maeyama J, et al. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. Vaccine. 1999;18(7-8):743-51.
29. 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(3):120-7.
30. Walker RI, Steele D, Aguado T. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic E. coli(ETEC) disease. Vaccine. 2007; 25(14);2545-66.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.1.6]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.7]