

تولید پروتئین نوترکیب سیالیداز-کمپ و تهیه نانوذرات کایتوزان حامل آن به منظور استفاده بعنوان کاندیدای واکسن پروپیونی باکتریوم آکنه

پروین ضرغام قلعه جوق (MSc)^۱، معصومه حشمتی (PhD)^۱، کوثر منصوری (MSc)^۲، جعفر امانی (PhD)^۳،
جعفر سلیمیان (PhD)^۲، علی احمدی (PhD)^{*۴}

۱- گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی-تهران-ایران
۲- مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت های غذایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
۳- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت های غذایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
۴- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت های غذایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

دریافت: ۹۶/۵/۱۵، اصلاح: ۹۶/۹/۸، پذیرش: ۹۶/۱۰/۴

خلاصه

سابقه و هدف: آکنه ولگاریس یکی از شایع ترین بیماری های پوستی است که فشار روحی زیاد و هزینه بالایی برای بیماران دارد. درمان های موجود کارایی پایینی داشته و شامل آنتی بیوتیک ها و داروهای ضدالتهابی هستند که با توجه به ماهیت مزمن بیماری بویژه در سنین جوانی، عوارض زیادی از جمله مقاومت آنتی بیوتیکی و واکنش های آلرژیک دارند. به همین دلیل یکی از رویکردهای جدید درمانی، استفاده از واکسن درمانی با کمک خود باکتری و یا اجزای آن است. هدف از این مطالعه تولید نانوذرات حامل پروتئین نوترکیب CAMP-Sialidase به عنوان یک آنتی ژن کایمیریک جدید برای استفاده در واکسن درمانی بیماری آکنه می باشد.

مواد و روش ها: جهت بیان پروتئین نوترکیب CAMP-Sialidase از میزبان *E. coli* BL21 DE3 استفاده شد. تخلیص پروتئین به روش ترکیبی اوره-ایمیدازول و با استفاده از ستون نیکل-نیتریلو استیک اسید انجام شد. پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلاتینگ با آنتی بادی ضد هیستیدین مورد تایید قرار گرفت. سپس نانوذرات بارگذاری شده با پروتئین نوترکیب به روش ژلاسیون یونی کایتوزان با تری پلی فسفات تهیه شدند. در نهایت اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات با دستگاه DLS تعیین گردید.

یافته ها: پس از بیان و تخلیص، پروتئین نوترکیب CAMP-Sialidase مورد تایید قرار گرفت. اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب CAMP-Sialidase با غلظت ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر از طریق دستگاه DLS برترتیب ۸۰ نانومتر و ۲۷+ میلی ولت تعیین گردید. میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات ۸۸ درصد تعیین شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که پروتئین نوترکیب بصورت کاملاً سالم بیان شده و بطور موفقیت آمیزی در داخل نانوذرات کایتوزان کپسوله شده است.

واژه های کلیدی: آکنه ولگاریس، پروتئین CAMP-Sialidase، نانوذره کایتوزان، واکسن درمانی.

مقدمه

و شامل داروهای هورمونی و ضد التهابی و نیز درمان آنتی بیوتیکی است. متأسفانه در مجموع درمان های موجود کارایی پایینی داشته با توجه به ماهیت مزمن و دوره طولانی درمان، عوارض زیادی از جمله بروز مقاومت های آنتی بیوتیکی و ایجاد سویه های مقاوم در باکتری های فلور نرمال روده و پوست و نیز بروز واکنش های آلرژیک در بیمار دارند. امروزه با توجه به بروز عوارض جانبی این داروها، توجه محققان به استفاده از سایر روش های درمانی جلب شده است. یکی از این روش ها، روش واکسن درمانی با استفاده از خود باکتری بصورت کشته شده (در قدیم) و یا اجزای باکتری در حال حاضر جلب شده است. از گذشته، پروپیونی باکتریوم آکنه کشته شده که از محل عفونت جوش پوستی خود بیمار بدست می آمد بعنوان اتوواکسن تزریقی برای درمان آکنه در آن بیمار استفاده می شد (۳و۲).

آکنه ولگاریس یکی از شایع ترین بیماری های پوستی بوده و تقریباً ۸۵٪ از افراد جامعه آکنه را در دوره ای از زندگی خود تجربه می کنند (۱). این بیماری عوارض قابل توجهی هم از نظر جسمی و هم از نظر روانی در بیماران ایجاد می کند که از جمله آنها می توان به بروز اسکار در پوست، بروز افسردگی و اضطراب و اعتماد به نفس پایین اشاره نمود. آکنه یک بیماری چند عاملی است که یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده آن تکثیر پروپیونی باکتریوم آکنه است. درمان اصلی این بیماری عمدتاً از طریق تجویز رتینوئیک اسیدها و نیز درمان آنتی بیوتیکی است. آکنه بویژه در فرم های شدید مانند آکنه فولمینانس، مشکلات زیادی برای بیماران که اغلب در سنین جوانی هستند ایجاد می کند و باعث می شود هزینه های بسیار بالایی برای درمان متحمل شوند. این درمان ها هم معمولاً بصورت مقطعی است

این مقاله حاصل پایان نامه پروین ضرغام قلعه جوق دانشجوی رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۶۷۳ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر علی احمدی

E-mail: ahmadi1919@gmail.com

آدرس: تهران، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، ساختمان پژوهشگاه. تلفن: ۸۲۴۸۲۵۵۷-۰۲۱

افزایش گردید و پس از انجام سونیکاسیون و سانتریفیوژ، سوپرناتانت حاصل از ستون تمایلی عبور داده شد. سپس از بافر حاوی ایمیدازول ۲۰ میلی مولار برای شستشو و ۵۰۰ میلی مولار به عنوان بافر خارج کننده پروتئین نوترکیب استفاده شد. سپس فرآیند دیالیز علیه PBS به منظور خروج اوره انجام شد.

تایید پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلات: برای تایید پروتئین نوترکیب از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی هیس آنتی بادی استفاده گردید. عصاره سلولی نمونه القا شده و القا نشده و نشانگر پروتئینی PS-107 روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. لکه گذاری بر روی کاغذ نیتروسولوز و بافر مخصوص انتقال حاوی گلاسیسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۱ درصد و متانول ۲۰ درصد انجام شد. کاغذ نیتروسولوز به صورت شبانه در بافر PBST حاوی ۵ درصد شیر خشک بلاک شد. پس از فرآیند شستشو، کاغذ نیتروسولوز در معرض آنتی بادی پلی کلونال موشی علیه 6-His-tag با رقت ۱:۱۰۰۰ قرار گرفت. پس از شستشو واکنش رنگ پذیری پروتئین با افزودن دی آمینوبنزدین در بافر تریس ۵۰ میلی مولار و H₂O₂ انجام شده و پس از ظهور باند واکنش متوقف گردید.

تهیه نانوذرات کایتوزان: نانوذرات کایتوزان با روش ژلاسیون یونی تهیه شد. محلول ۲ mg/ml کایتوزان در اسید استیک ۲٪ و محلول ۱ mg/ml سدیم پلی فسفات (TPP) تهیه گردید. سپس آنتی ژن مورد نظر قطره قطره و طی مدت زمان ۵ دقیقه به ۷/۵ میلی لیتر محلول کایتوزان اضافه گردید، به نحوی که غلظت نهایی آنتی ژن به ۱ میلی گرم بر میلی لیتر رسید. سپس pH محلول با استفاده از محلول NaOH غلیظ به ۵/۵ رسید و اجازه داده شد تا محلول به مدت ۳۰ دقیقه بر روی استیر در دمای محیط بماند تا شرایط pH در تمامی محلول یکسان شود. ۵ میلی لیتر از محلول سدیم تری پلی فسفات به صورت قطره قطره به محلول کایتوزان حاوی پروتئین اضافه شد. برای این منظور هر یک میلی لیتر TPP در مدت زمان ۵ دقیقه افزوده شد. لازم به ذکر است پس از افزودن هر یک میلی لیتر TPP سونیکاسیون در پنج سیکل ۲۰ ثانیه‌ای انجام شد. این کار به دلیل جلوگیری از تجمع نانو ذره صورت پذیرفت. در نهایت محلول نهایی به مدت ۴۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ و مایع رویی جدا گردید. تعیین میزان بار گذاری پروتئین در مایع رویی براساس فرمول زیر، از اختلاف مقدار پروتئین اولیه افزوده شده به محلول کایتوزان و مقدار نهایی باقیمانده در محلول رویی محاسبه گردید.

$$\% LC = [(A-B)/A] \times 100$$

LC=Loading Capacity

A: مقدار پروتئین اولیه

B: مقدار پروتئین باقیمانده در مایع رویی بعد از سانتریفیوژ

اندازه نانوذرات با استفاده از دستگاه DLS مدل Malvern اندازه گیری شد.

یافته ها

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب CAMP-Sialidase: پس از القا ژن مورد نظر و جمع آوری سلول ها و شکستن سلول ها، کل محتوای پروتئینی روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه های القاء شده، بیان بالای پروتئین مشاهده گردید که در نمونه های القاء نشده وجود نداشت

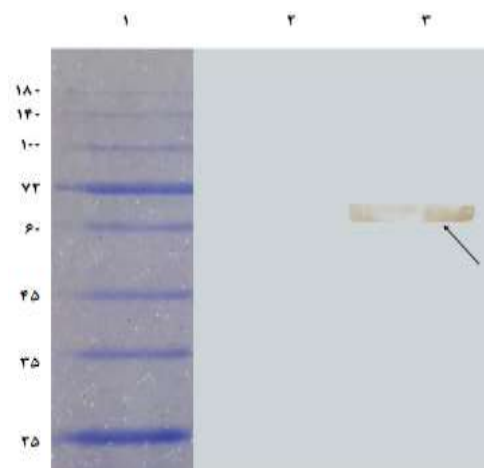
اما با توجه به عوارض واکنس قدیمی، بتدریج از واکنس های جدید حاوی آنتی ژنهای باکتری استفاده شد. در این راستا دو آنتی ژن مهم شامل فاکتور سیالیداز و فاکتور کمپ هستند که در مطالعات جداگانه بعنوان واکنس علیه بیماری آکنه مورد آزمایش قرار گرفته اند (۳و۴). سیالیداز یک پروتئین متصل به دیواره سلولی است که به عنوان یک عامل بیماریزا باعث تحلیل رفتن بافت و القای عفونت در میزبان می شود. سیالیداز متصل به دیواره سلولی یکی از پنج سیالیداز باکتری می باشد و نقش مهمی در چسبندگی و عفونت دارد (۴). فاکتور کمپ یک پروتئین ترشحی است که همراه با اسفنگومیلیناز میزبان باعث همولیز گلبول های قرمز می شود که می تواند برای کراتینوسیت ها و ماکروفاژها سمی باشد (۳و۵). در مطالعات قبلی برای اولین بار یک پروتئین کایمیریک حاوی دو بخش از آنتی ژن سیالیداز و آنتی ژن کمپ پروپوینی باکتریوم آکنه بصورت بیوانفورماتیک طراحی شده و پس از تعیین ساختار دوم و سوم و آنالیز خصوصیات مختلف آن، با هدف استفاده در واکنس درمانی آکنه، کلون گردید (۶). هدف از این مطالعه بیان پروتئین نوترکیب CAMP-Sialidase، تخلیص توسط روش کروماتوگرافی تمایلی، تایید توسط آنتی بادی اختصاصی با روش وسترن بلات و تولید و ارزیابی نانوذرات کایتوزان حاوی این پروتئین نوترکیب به منظور استفاده خوراکی در روش واکنس درمانی بیماری آکنه می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، از باکتری *E. coli* BL21 DE3 و جهت رشد آن از محیط کشت LB استفاده گردید. مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی از شرکت های مرک، سیناژن، کیاژن و فرمتاز تهیه شد. ستون افینیتی کروماتوگرافی Ni-NTA از شرکت کیاژن خریداری گردید.

آنتی بادی ثانویه (کانژوگه) متصل به HRP علیه ایمونوگلوبین G موشی و آنتی بادی موشی علیه His-tag از شرکت سیگما خریداری گردید. کایتوزان با وزن مولکولی متوسط و سدیم تری پلی فسفات از شرکت سیگما تهیه گردید. به منظور بررسی اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات از دستگاه DLS دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله استفاده شد.

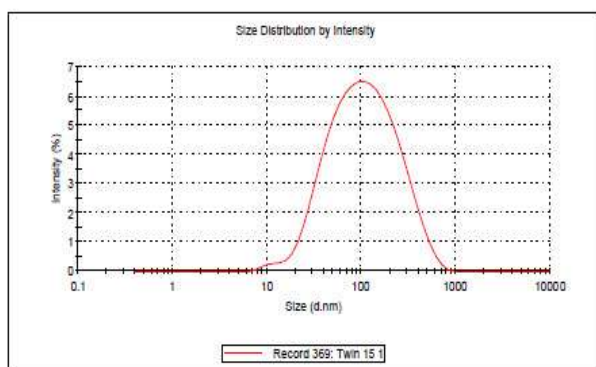
بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب: وکتور pET28a حاوی توالی ژن نوترکیب CAMP-Sialidase موجود از مطالعه قبلی (۶)، در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بیان پروتئین نوترکیب CAMP-Sialidase، از میزبان بیانی *E. coli* BL21 DE3 استفاده شد. جهت انجام القا از کشت شبانه باکتری در حضور کانامایسین (۲۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) استفاده شد و پس از رسیدن جذب نوری حدود ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، IPTG (۱ میلی مولار) برای القا استفاده شد. پس از آن سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت و با ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. پس از سانتریفیوژ، رسوب سلولی در PBS حل و با سونیکاسیون سلول ها شکسته و سانتریفیوژ انجام شد. سپس رسوب حاصل در بافر اوره حل و بعد از مدت زمان یک ساعت در دمای محیط سانتریفیوژ کرده، محلول های رویی و رسوب القا نشده بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE از نظر وجود باند مورد نظر بررسی شدند. برای تخلیص پروتئین از روش ترکیبی اوره-ایمیدازول و ستون نیکل-نیتریلو استیک اسید استفاده شد. به این منظور پس از جمع آوری رسوب باکتری به آن بافر لیز کننده



شکل ۳. تایید پروتئین نوترکین با وسترن بلائینگ. ستون ۱: نشانگر مولکولی پروتئین؛ ستون ۲: نمونه کنترل (بدون IPTG)؛ ستون ۳: پروتئین مورد نظر

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 77.91	Peak 1: 138.5	100.0	115.5
Pdl: 0.412	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.940	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

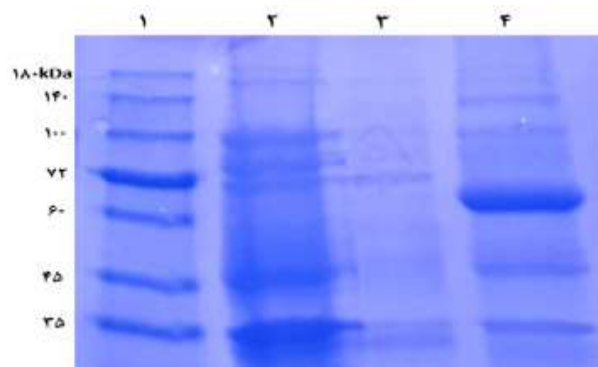


شکل ۴. نمودار نتایج دستگاه DLS در مورد نانوذرات کایتوزان

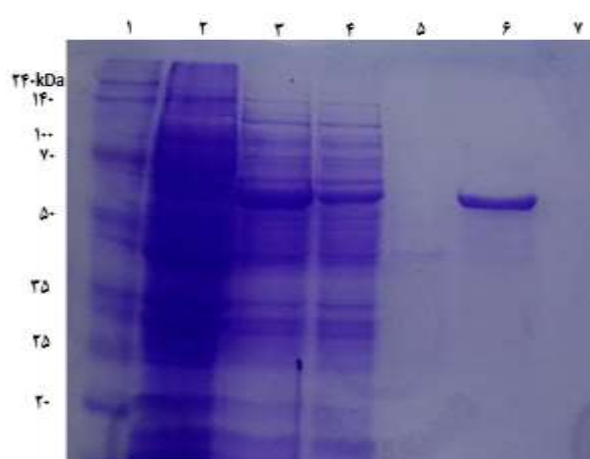
بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر سازه کایمربک CAMP-Sialidase که توسط مطالعه قبلی ما از قسمت هایی از دو پروتئین کمپ و سیالیداز پروپیونی باکتریوم آکنه طراحی و کلون شده بود (۶)، برای اولین بار بیان گردید و به عنوان کاندیدای واکسن استفاده شد. در این مطالعه اولین گام، پس از القای ژن، پروتئین نوترکین به میزان قابل توجهی بیان گردید که برای تخلیص آن از روش ترکیبی اوره - ایمیدازول و ستون نیکل استفاده گردید. سپس تکنیک های SDS-PAGE و وسترن بلات به منظور تایید حضور پروتئین مورد استفاده قرار گرفتند و غلظت پروتئین نوترکین CAMP-Sialidase به روش برادفورد ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد. مطالعه حاضر به نوعی ادامه مطالعات Nakatsuji و همکاران بوده که از دو آنتی ژن کامل باکتری آکنه بطور جداگانه و در مطالعات مستقل استفاده کرده بود. وی و همکارانش در چندین مطالعه باکتری غیر فعال شده و نیز آنتی ژنهای سیالیداز و کمپ را بطور جداگانه بیان کرده و از نظر قدرت ایمنی زایی مورد بررسی قرار دارند. (۲و۴). اما در مطالعه حاضر، ما این دو آنتی

(شکل ۱). نتایج حاصل از تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل - نیتریلو استیک اسید بیانگر وجود پروتئین نوترکین با وزن ۶۵ کیلودالتون در خروجی ایمیدازول ۵۰۰ میلی مولار با درجه خلوص بالا بود (شکل ۲).



شکل ۱. ژل الکتروفورز قبل و پس از القاء پروتئین. ستون ۱: نشانگر مولکولی پروتئین (کیلودالتون)؛ ستون ۲: نمونه القا نشده؛ ستون ۳: محلول رویی نمونه حل شده در PBS؛ ستون ۴: محلول رویی نمونه حل شده در بافر اوره



شکل ۲. ژل الکتروفورز پس از تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل (Ni-NTA). ۱. نشانگر مولکولی پروتئین؛ ۲: نمونه کنترل یا القا نشده؛ ۳: نمونه القا شده قبل از ستون؛ ۴: نمونه خروجی اول قبل از شستشو؛ ۵: نمونه خروجی ایمیدازول ۲۰ میلی مولار؛ ۶: نمونه خروجی ایمیدازول ۵۰۰ میلی مولار؛ ۷: نمونه خروجی بافر MES

آنالیز وسترن بلائینگ با آنتی بادی ضد His-tag پس از حذف اوره توسط دیالیز، بیان پروتئین مورد نظر به دلیل داشتن توالی His-tag به کمک تکنیک وسترن بلائینگ و به کارگیری آنتی بادی علیه His-tag مورد تایید قرار گرفت و باند مورد نظر در جایگاه وزن صحیح قرار گرفت و در ستون کنترل هیچ باندی دیده نشد (شکل ۳).

تهیه نانوذرات کایتوزان و بررسی میزان بارگذاری پروتئین: پس از ساخت نانوذرات کایتوزان حاوی پروتئین نوترکین با روش ژلاسیون یونی و اندازه گیری سایز، نتایج دستگاه DLS بیانگر تولید نانوذرات کایتوزان با میانگین اندازه ۸۰ نانومتر بود (شکل ۴). پتانسیل زتای نانوذرات حاوی پروتئین نوترکین +۲۷ میلی ولت بود. همچنین نتایج نشان داد میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات ۸۸ درصد بود.

نانوذره تهیه شده در مطالعه حاضر مناسب بوده و درصد بارگذاری آن تقریباً برابر با این مطالعات است. استفاده از نانوذرات پلیمری در سالهای اخیر بسیار مورد توجه محققین بوده و مطالعات متعددی با استفاده از آنها در راستای تولید واکسن های مختلف صورت گرفته است. در مطالعات جداگانه، Soleymani و همکاران و نیز Bagheripour و همکاران از نانوذرات TMC و کایتوزان به عنوان حامل پروتئین فعال کننده نوتروفیلی نوترکیب هلیکوباکتر پیلوری و نیز به عنوان حامل پروتئین نوترکیب ناحیه اتصال BONT/E استفاده کردند (۷۱۴). در این مطالعات اندازه نانوذرات، پتانسیل زتا و میزان بارگذاری پروتئین به ترتیب ۲۱۰ نانومتر، +۱۱ میلی ولت و ۲۸۵ نانومتر، ۹۱٪ اندازه گیری کردند. همچنین Vila و همکاران از نانوذرات کایتوزان به عنوان حامل پروتئین برای واکسن کزاز استفاده کردند و اندازه نانوذرات ۳۵۰ نانومتر، پتانسیل زتا ۴۰+ میلی ولت و میزان بارگذاری پروتئین را ۵۰-۶۰٪ تخمین زدند و نتایج قابل قبولی در ارائه یک واکسن نازال بدست آوردند (۱۵).

در مطالعه ای که توسط Jesus و همکاران انجام شد نانوذرات کایتوزان PCL به عنوان حامل پروتئین نوترکیب آنتی ژن هیپاتیت B مورد استفاده گرفت. اندازه نانوذرات ۲۰۱ نانومتر، پتانسیل زتا ۱۸/۶+ میلی ولت و میزان بارگذاری پروتئین ۹۶٪ تخمین زده شد (۱۶). در مطالعه Nesalin و همکاران، zidovudine در نانوذرات کایتوزان با غلظت های متفاوت بارگذاری گردید. ابعاد نانوذرات تولید شده تقریباً در محدوده ۴۸۶-۳۴۲ نانومتر و پتانسیل زتا ۴/۲ تا ۳۷/۰۸ میلی ولت بود (۱۷). Zolfagharinia و همکاران به منظور دارورسانی انسولین از نانوذرات TMPC بهره جستند. در این مطالعه اندازه نانوذرات تولید شده ۲۶۸ نانومتر، پتانسیل زتا ۲۸/۳ میلی ولت و میزان بازده بارگذاری در حدود ۹۱+۲/۶ درصد گزارش گردید (۱۸).

در مجموع مطالعات نشان می دهد که می توان از نانو پارسیکل های پلیمری بطور رضایت بخشی در تولید واکسن های خوراکی استفاده کرد. نتایج ما نشان می دهد پروتئین نوترکیب مورد نظر بصورت کاملاً سالم و صحیح بیان شده و در داخل نانوذرات کایتوزان کپسوله شده است. در مطالعه بعدی میزان ایمنی زایی این ساختار کایمیریک به روش تجویز خوراکی در مدل موش بررسی شده و کارایی آن بعنوان یک روش درمان کمکی در بیماری اکنه بررسی خواهد شد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کلیه همکاران آزمایشگاه تحقیقات مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله بویژه آقایان رشیدیانی، صدیقیان و تات تشکر و قدردانی می گردد.

ژن را به بصورت یک پروتئین کایمر واحد سنتز کرده و برای اولین بار بصورت نانوپارسیکل درآورده تا در مطالعه بعدی از نظر ایمنی زایی بررسی کنیم. به منظور طراحی واکسن های خوراکی توجه به فاکتورهای همانند مقابله با پروتئین های دستگاه گوارش، پایداری نسبت به محیط معده و روده، نفوذپذیری از دیواره روده و غشاء پایه و ورود به جریان خون و حلالیت در pH نزدیک به خنثی ضرورت دارد (۷). از این رو امروزه بسیاری از تحقیقات به سمت استفاده از نانو ذرات به عنوان یک سیستم کارآمد برای دارو رسانی روی آورده اند. مزیت استفاده از نانوذرات پلیمری همچون کایتوزان این است که مولکول های فعال زیستی را از طریق کپسوله نمودن، در برابر تخریب هیدرولیتیک و آنزیمی محافظت می نماید. خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانوذرات نقش مهمی در میانکشی آنها با آنتی ژن ها، سیستم های زیستی و سلول های سیستم ایمنی دارد و بر کارآمدی واکسن نیز اثر گذار است (۸۹).

از جمله پر کاربردترین نانوذرات می توان به کایتوزان، PLGA و TMC اشاره نمود. در این مطالعه به منظور حذف درد و ناراحتی و آلودگی های همراه با تزریق، غیرتهاجمی بودن مسیر خوراکی جهت دارو رسانی و همچنین در امان ماندن واکسن مورد نظر از تخریب توسط آنزیم های گوارشی برای اولین بار از نانوذره کایتوزان استفاده گردید. این پلی ساکراید بسیار زیست سازگار، در دسترس و غیرسمی بوده و به آسانی از موجود زنده حذف می شود. کایتوزان همچنین دارای خاصیت ضد میکروبی است و بعلاوه دارای قدرت چسبندگی خوب، درجه داسیتلاسیون و وزن مولکولی قابل کنترل و توانایی برای رهایش کنترل شده می باشد و از این رو می تواند در انتقال داروهای پیثیدی مورد استفاده قرار بگیرد (۱۰). در این پژوهش، برای تهیه نانوسفرهای کایتوزان از روش ژله ای شدن یونی استفاده شد. از مزایای این روش، عدم استفاده از حلال های آلی مضر برای پروتئین ها، بازدهی بالا، درصد بالای انکپسولاسیون و رهایش کنترل شده را می توان نام برد (۱۲). در مطالعه حاضر برای ساخت نانوسفرهای کایتوزان از محلول کایتوزان با pH=۵/۵ استفاده شد زیرا رشته مولکولی کایتوزان در این pH بازتر بوده و مکان های فعال بیشتری برای تشکیل پیوندهای هیدروژنی با مولکول های پروتئینی وجود دارد (۱۳).

همچنین با توجه با ماهیت اسیدی PI پروتئین سنتز شده، فرایند نانوپارسیکله شدن با کایتوزان به خوبی انجام شد. نتایج این قسمت از تحقیق بیانگر این موضوع است که اندازه نانوذره حاوی آنتی ژن در حدود ۸۰ نانومتر و پتانسیل زتا ۲۷+ میلی ولت و میزان بارگذاری پروتئین در آن ۸۸٪ بود. همچنین بر اساس نتایج این مطالعه در رابطه با نانوذره کایتوزان، بهترین اندازه نانوذره در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر کایتوزان به دست می آید. با توجه به مطالعات قبلی، اندازه

Production of recombinant CAMP – Sialidase protein and preparation of chitosan nanoparticles carrying this protein to be used as a candidate for vaccines targeting *Propionibacterium acnes*

P. Zargham Ghalehjough (MSc)¹, M. Heshmati (PhD)¹, K. Mansouri (MSc)², J. Amani (PhD)³,
J. Salimian (PhD)², A. Ahmadi (PhD)^{4*}

1.Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran.

2.Chemical Injuries Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

3.Applied Microbiology Research Center, Institute of Biology and Food Poisoning, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

4.Molecular Biology Research Center, Institute of Biology and Food Poisoning, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 20(2); Feb 2018; PP: 64-9

Received: Aug 6th 2017, Revised: Nov 29th 2017, Accepted: Dec 25th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Acne vulgaris is one of the most common skin diseases that imposes too much mental pressure and high costs on patients. The existing treatments have low efficacy and include antibiotics and anti-inflammatory drugs, which have many complications due to the chronic nature of the disease, especially at young age, including antibiotic resistance and allergic reactions. For this reason, one of the new therapeutic approaches is the use of a vaccine with the help of the bacterium or its components. The aim of this study is to produce nanoparticles carrying the recombinant CAMP – Sialidase protein as a new chimeric antigen to be used in acne vaccine.

METHODS: To express the recombinant CAMP – Sialidase protein, *E. coli* BL21 DE3 was used as the host. Purification of protein was done through combined urea/imidazole method and using a nickel-nitroacetic acid column. The recombinant protein was confirmed using Western Blotting by Anti – Histidine Antibody. Then, the loaded nanoparticles were prepared by recombinant protein using ionic gelation technique and tripolyphosphate. Finally, the size and zeta potential of the nanoparticles were determined by the DLS device.

FINDINGS: The recombinant CAMP – Sialidase protein was confirmed after expression and purification. The size and zeta potential of nanoparticles containing recombinant CAMP – Sialidase protein at a concentration of 0.6 mg / ml were determined to be 80 nm and +27 mV, respectively, using the DLS device. The loading rate of the protein in the nanoparticles was found to be 88%.

CONCLUSION: The results show that the recombinant protein is expressed completely and is successfully encapsulated in the chitosan nanoparticles.

KEY WORDS: *Acne Vulgaris, Camp – Sialidase Protein, Chitosan Nanoparticle, Vaccine.*

Please cite this article as follows:

Zargham Ghalehjough P, Heshmati M, Mansouri K, Amani J, Salimian J, Ahmadi A. Production of recombinant CAMP – Sialidase protein and preparation of chitosan nanoparticles carrying this protein to be used as a candidate for vaccines targeting *Propionibacterium acnes*. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(2):64-9.

*Corresponding Author; A. Ahmadi (PhD)

Address: Research Institute Building, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Mollasadra st, Tehran, I.R.Iran.

Tel: +98 21-82482557

E-mail: ahmadi1919@gmail.com

References

1. Kim J. Acne vaccines: therapeutic option for the treatment of acne vulgaris?. *J Investigat Dermatol*. 2008;128(10):2353-4.
2. Nakatsuji T, Liu Y-T, Huang C-P, Gallo RL, Huang C-M. Antibodies elicited by inactivated propionibacterium acnes-based vaccines exert protective immunity and attenuate the IL-8 production in human sebocytes: relevance to therapy for acne vulgaris. *J Investigat Dermatol*. 2008;128(10):2451-7.
3. Beylot C, Auffret N, Poli F, Claudel JP, Leccia MT, Del Giudice P, et al. Propionibacterium acnes: an update on its role in the pathogenesis of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(3):271-8.
4. Nakatsuji T, Liu Y-T, Huang C-P, Gallo RL, Huang C-M. Vaccination targeting a surface sialidase of P. acnes: implication for new treatment of acne vulgaris. *PloS One*. 2008;3(2):1551.
5. Nakatsuji T, De-chu CT, Zhang L, Gallo RL, Huang C-M. Propionibacterium acnes CAMP factor and host acid sphingomyelinase contribute to bacterial virulence: potential targets for inflammatory acne treatment. *PloS one*. 2011;6(4):14797.
6. Ahmadi A, Farhadi E, Salimian J, Amani J. Designing a vaccine therapy candidate against Propionibacterium acnes: a bioinformatics approach. *Molecul Gen, Microbiol Virol*. 2016;31(3):178-86.
7. Bagheripour M, Ebrahimi F, Hajizadeh A, NAZARIAN S, Arefpour M. Preparation of chitosan based botulinum neurotoxin e recombinant nanovaccine and evaluation of its immunogenicity as oral & intradermal route in mice. *J Rafsanjan Univ Med Sci*. 2016, 14(11): 923-38.[In Persian]
8. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomed*. 2011;6:765-74.
9. Hajizade A, Ebrahimi F, Salmanian A-H, Arpanae A, Amani J. Nanoparticles in vaccine development. *J Applied Biotechnol Rep*. 2015;1(4):125-34.
10. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release*. 2004;100(1):5-28.
11. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv Drug Delivery Rev*. 2010;62(1):28-41.
12. Zaharoff DA, Rogers CJ, Hance KW, Schlom J, Greiner JW. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*. 2007;25(11):2085-94.
13. Tamber H, Johansen P, Merkle HP, Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2005;57(3):357-76.
14. Soleimani N, Mohabati-Mobarez A, Atyabi F, Hasan-Saraf Z, Haghighi MA. Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2014;23(2):134-44.
15. Vila A, Sánchez A, Janes K, Behrens I, Kissel T, Jato JLV, et al. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. 2004;57(1):123-31.
16. Jesus S, Soares E, Borchard G, Borges O. Poly-ε-caprolactone/chitosan nanoparticles provide strong adjuvant effect for hepatitis B antigen. *Nanomedicine*. 2017(0).
17. Nesalin JAJ, Smith AA. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing zidovudine. *Asian J Pharm Sci*. 2012;7(1):80-4.
18. Zolfagharnia B, Mortazavian E, Kaviani D, Rafiee-Tehrani M. Preparation and evaluation of nanoparticles composed of thiolated methylated pyridinyl chitosan as a new strategy for bucal drug delivery of insulin. *Nanomedicine Journal*. 2017;4(2):83-8.