Arak Medical University Journal (AMUJ)
2011; 14(56): 27-35

Original Article

Purification of the recombinant beta subunit of Vibrio cholera entrotoxin

Zeighami H[1], Sattari M[1*], Rezayat M[2]

1- Department of Bacteriology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Department of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Accepted: 19 May 2010, Received: 5 Apr 2010

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

Abstract

***Background*:** Vibrio cholera toxin B (CTB) subunit is the pentameric non-toxic portion of cholera toxin (CT) which is responsible for the holotoxin binding to the GM1 ganglioside receptor present on nucleated cells. this study was to produce, purify, and verify recombinant CTB (rCTB) subunitin prokaryotic system.

Materials and Methods: In this experimental study, rCTB expression vector (pET-28a) which could be induced in E. coli (BL21) was designed and synthesized. Then the recombinant expression strains containing the result of IPTG interaction were induced and the rCTB was generated on small and large scales. The rCTB produced through Ni^{2+}-charged resin, after refolding and free of possible CTA contaminants, was extracted. After purification, rCTB was verified by Western blotting.

***Results*:** The results indicated the level of purification to be about 480µg of purified active pentameric rCTB for each liter of the induced culture. Also, Western blotting analysis showed that recombinant CTB is strongly and specifically recognized by polyclonal antibodies against the cholera toxin.

Conclusion: The findings of this study demonstrated that E.coli is an available host for production of CTB. In addition, the designed host and vector can be used in large scale production of this protein.

Keywords: Cholera Toxin, Purifying, Rctb, Western Blotting

*****Corresponding author:
Address: Department of Bacteriology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sattarim@modares.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 14، شماره3 (شماره پیاپی 56)، مرداد و شهریور1390، 35-27

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

تخلیص پروتئین نوترکیب زیر واحد بتای انتروتوکسین ویبریو کلرا

حبیب ضیغمی[1]، مرتضی ستاری[2*]، سید مهدی رضایت[3]

1- دانشجوی دکترای باکتری شناسی، گروه باکتری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2- دانشیار، دکترای باکتری شناسی پزشکی، گروه باکتری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- استاد، دکترای فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت 89/1/16 ، تاریخ پذیرش89/2/29

چکیده

زمینه و هدف: زیر واحد بتای انتروتوکسین ویبریو کلرا بخش غیرسمی و پنتامریک محسوب می‌شود که این بخش مسئول اتصال هولوتوکسین به گیرنده گانگلیوزید GM1 واقع در سلول‌های هسته‌دار است. در این بررسی سعی شد زیر واحد بتای توکیسن ویبریوکلرا در سیستم پروکاریوتی تولید، تخلیص و تأیید گردد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ابتدا حامل نوترکیب زیر واحد بتای توکسین ویبریوکلرا pET-28a قابل القاء در داخل سویه بیانی اشرشیاکلی (BL21) طراحی و ساخته شد. سپس سویه بیانی تحت تأثیر ایزوپروپیل- بتا- دی- تیوگالاکتو پیرانوزید القاء و پروتئین نو ترکیب زیر واحد بتای توکسین ویبریوکلرا در مقیاس کوچک و بزرگ تولید شد. پروتئین نوترکیب تولید شده بااستفاده از ستون رزین نیکل پس از چند برابر شدن بدون آلودگی با زیر واحد A توکسین استخراج شد. در انتها پروتئین نوترکیب زیر واحد بتای توکسین ویبریوکلرا استخراج و تخلیص شده با آزمایش وسترن بلاتینگ تأیید نهایی شد.

یافته‌ها: میزان تخلیص پروتئین نوترکیب زیر واحد بتای توکسین ویبریوکلرا با این روش حدود 480 میکروگرم به ازای هر لیتر از محیط القاء شده بود. آزمایش وسترن‌بلاتینگ نیز نشان داد پروتئین نوترکیب تخلیص شده به طور قوی و اختصاصی با آنتی بادی ضد انتروتوکسین ویبریو کلره واکنش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: اشرشیاکلی می‌تواند میزبان قابل دسترسی برای تولید پروتئین نوترکیب زیر واحد بتای توکسین ویبریوکلرا باشد. همچنین می‌توان از وکتور و میزبان طراحی شده برای تولید انبوه این پروتئین استفاده کرد.

واژگان کلیدی: تخلیص، توکسین وبا، وسترن بلاتینگ، پروتئین نو ترکیب زیر واحد بتای توکسین ویبریوکلرا (rCTB)

* **نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی

Email: sattarim@modares.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

مقدمه

ویبریوکلرا عامل سببی بیماری مهلک وبا است که اغلب کشورهای جهان سوم را درگیر می‌کند. این ارگانیسم باکتری گرم منفی است که متعلق به خانواده ویبریوناسیه می‌باشد. علیرغم درمان بیماران مبتلا به وبا با جایگزینی آب و الکترولیت‌ها هنوز این بیماری با مرگ و میر زیادی همراه می‌باشد. در مناطقی که دارای وضعیت بهداشتی مطلوبی نیستند وبا اغلب به صورت اندمیک بوده و در این مناطق ناقلین بدون علامت عامل اپیدمی در بیماران با نقص ایمنی نظیر کودکان، افراد مسن و مسافران هستند(3-1).

ویبریوکلرا دارای فاکتورهای بیماری زایی متعددی است. این باکتری واجد دوکروموزوم است که کروموزوم I آن واجد تمام فاکتورهای بیماری زایی نظیر کلراتوکسین و پیلی تنظیم شونده مرتبط با توکسین است. ویبریو کلرا در روده کوچک با استفاده از TCP کلونیزه شده و گیرنده‌های اپیتلیوم روده‌ایی را درگیر می‌کند. پس از اتصال، باکتری انتروتوکسین را به‌همراه پروتئاز/هماگلوتینین آزاد می‌کند. پروتئاز/هماگلوتینین خارج سلولی، مسئول شکافت زیر واحد A توکسین (CTA) در ناحیه Arg 192 و تولید دو زیر واحد کوچک‌تر (CT1 , CT2) است که توسط یک پیوند ضعیف به هم متصل می شوند. این تغییرات پس ترجمه‌ایی برای فعالیت توکسین (افزایش تولید cAMP) کاملا ضروری است(1, 5-3).

کلرا توکسین (CT) متعلق به خانواده بزرگ توکسین‌های AB است. این توکسین پروتئین اولیگومری است که متشکل از زیر واحدهای هترودایمریک A (CTA) با وزن مولکولی حدود 27400 دالتون) و زیر واحدهای هوموپنتامری B (CTB) با وزن مولکولی حدود 58000 دالتون) است. پنج مونومر CTB آرایش حلقه مانند داشته و دارای محل اتصال به GM1 سلول‌های اپیتلیال ژژنوم هستند(1، 5). CTB به تنهایی موجب تعدیل پاسخ‌های ایمنی مخاطی می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد تجویز خوراکی CTB به همراه یک آنتی‌ژن پروتئینی موجب افزایش پاسخ‌های IgA مخاطی اختصاصی آنتی‌ژن پروتئینی در موش می‌شود(6). علاوه بر این تجویز خوراکی یا استنشاقی CTB به عنوان حاملی که به پروتئین کونژوگه شده است موجب القا پاسخ‌های IgA ترشحی نسبت به آنتی‌ژن اختصاصی می‌شود(8،7). همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد تجویز روده‌ایی پروتئین به همراه CTB به طور بسیار موثری تحمل خوراکی را نسبت به تجویز پروتئین‌ها به تنهایی القا می کند(8 ،9).

بررسی نشان می‌دهد CT و CTB موجب افزایش تعویض ایزوتایپی آنتی بادی IgA می‌شود. بنابراین CT و CTB موجب افزایش تعداد سلول‌های محرک مولد IgA در میان سلول‌های B فعال شده با لیپوپلی ساکارید موجود در پلاک‌های پیر می‌شود(10). همچنین تعویض ایزوتایپی IgA القا شده توسط CTB با همکاری فاکتور رشد لنفوسیت (Tcell Growth Factor- ß1=TGF-ß1) بوده و نیاز به کوفاکتور IL-2 دارد(10).

در سال‌های اخیر خواص ایمونولوژیکی CT بسیار مورد توجه قرار گرفته است. امروزه CT به عنوان ایمونوژن قوی محرک مخاط دهانی بوده همچنین به عنوان ادجوانت بسیار قوی برای تجویز سایر پروتئین‌ها می‌باشد(11). سمیت CT موجب محدود شدن آن برای واکسیناسیون انسانی می‌شود. در مقابل CTB به طور وسیعی بدون عوارض جانبی به عنوان ایمونوژن مخاطی در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد. لذا تولید پروتئین نوترکیب CTB می‌تواند کاربرد فراوانی در تهیه واکسن‌های خوراکی داشته باشد. استفاده از آنتی‌ژن به همراه CTB موجب کاهش چشم‌گیر مقدار آنتی ژن لازم برای واکسیناسیون شده و موجب کاهش دوزهای یادآور در تجویز واکسن‌های خوراکی می‌شود(12).

تجویز CTB موجب مهار پاسخ‌های ایمونولوژیکی ناخواسته مرتبط با بیماری‌های خود ایمنی، آلرژن‌های تیپ I و رد پیوند آلوگرافت می‌شود (8 ،۱۶،۹-13). همچنین تجویز کونژوگه آنتی ژن-CTB به عنوان درمان به جای پیشگیری

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

مطرح است.

روش‌های قدیمی تخلیص CTB مشتمل بر کشت انبوه باکتری سم‌زا و جمع‌آوری محیط کشتی بود که باکتری در آن رشد کرده بود. در استفاده از این روش‌ها باتوجه به این که امکان جداسازی CTB به شکل کاملا خالص وجود نداشت، لذا پروتئین تخلیص شده دارای مقادیری CTA و سایر پروتئین‌های ناخواسته بود که همین امر موجب محدود شدن استفاده از این روش‌ها شد.

بررسی‌های مختلفی در زمینه تولید این پروتئین انجام شده است، اما در تمامی این بررسی‌ها از سیستم‌ها یوکاریوتی یا ارگانیسمی غیر از اشرشیاکلی استفاده شده است. با توجه به این که استفاده از سیستم بیانی پروکاریوتی ساده و مقرون به صرفه است، لذا هدف از این مطالعه استفاده از این سیستم است تا با کمترین هزینه بیشترین مقدار پروتئین تولید شود. در واقع این اولین گزارش از تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب CTB است که از سیستم اشرشیاکلی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سویه باکتری ویبریو توکسین‌زا از انیستیتو پاستور تهران تهیه شد. سویه‌های *E.coli*(DH5α و BL-21) از شرکت Invitrogen ووکتور pET-28a از شرکت Novagen تهیه شد. همچنین در این بررسی از محیط‌های L.B آگار و مایع (مرک-آلمان) و آنتی‌بیوتیک کانامایسین شرکت سیگما استفاده شد.

در این بررسی از وکتور pET-28a برای بیان پروتئین CTB استفاده شد. این وکتور 5369 bp طول داشته، دارای ژن مقاومت به کانامایسین و T7 پروموتور و T7 ترمیناتور است. بدین ترتیب که ابتدا PCR بروی ژن CTB از سویه استاندارد سم‌زا انجام شد برای این منظوراز پرایمرهای 5'-ATTAAGCTTCCATGATTAAATTAAAATTTGG-3' و 5'-ATCCTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3' استفاده شد. سپس بر روی حامل و محصول PCR هضم دوگانه با استفاده از دو آنزیم Xho I و Hind III انجام و محصول واکنش در هم الحاق شدند. در ادامه حامل نوترکیب تهیه شده در DH5α منتقل شد تا در حد انبوه تکثیر پیدا کند. سپس حامل نوترکیب استخراج و به میزبان بیانی (BL21) منتقل شدند (در این بررسی با توجه به این که BL21 استفاده شده فاقد pLYsS بود لذا تنها از آنتی‌بیوتیک حامل استفاده شد) و در محیط LB آگار حاوی کانامایسین کشت داده شدند.

از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط LB آ گار مرحله قبل، 5 میلی لیتر کلونی تک انتخاب و هر کدام به طور جداگانه به 5 میلی لیترمحیط LB براث حاوی کلرامفنیکل و کاناماسین افزوده و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از این که کدورت ناشی از رشد باکتری‌ها به حدود 0/7 (در طول موج 600 نانومتر) رسید؛ یک میلی‌لیتر از هر محیط کشت به عنوان نمونه القاء نشده انتخاب شد. به 4 میلی لیتر محیط باقیمانده محلول IPTGIsopropyl-β-D-thiogalactopyranoside با غلظت نهایی 1 میلی مولار افزوده شد تا رونویسی از ژن CTB اتفاق افتد و مجدداً انکوباسیون محیط‌های القاء شده و القاء نشده به مدت 4 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد ادامه پیدا کرد.

برای بررسی بیان ژن CTB، کلیه سوسپانسیون‌های باکتریایی در 5000×g به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شدند و رسوب حاصل از آنها در 100 µl از بافر نمونه (5X) SDS-PAGE حل و مخلوط شد. کلیه نمونه‌ها را به مدت 10 دقیقه در بن‌ماری جوش حرارت داده در نهایت کلیه نمونه‌ها را به مدت 10 دقیقه در بن‌ماری جوش حرارت داده در نهایت 20- 30 µl از نمونه‌ها در کنار مارکر پروتئینی الکتروفورز ژل آکریل آمید 15 درصد (SDS-PAGE) شدند. پس از رنگ آمیزی ژل با کوماسی G-250، حضور پروتئین CTB نوترکیب در نمونه‌های القاء شده و القاء نشده با یکدیگر مقایسه شدند. ابتدا کشت تازه‌ای از باکتری BL-21 حاوی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

حامل نوترکیب تهیه شد؛ سپس 5 میلی‌لیتر از این کشت به محیط‌های کشت LB براث حاوی کانامایسین که در حجم‌های300 میلی‌لیتری آماده شده بودند، اضافه گردید و کشت‌ها در انکوباتور شیکردار (37 درجه سانتی گراد) قرار گرفتند، پس از این که کدورت ناشی از رشد باکتری‌ها به حدود 0/7 (در طول موج 600 نانومتر) رسید، کشت‌ها با غلظت نهایی 1 میلی مولار IPTG القاء و به مدت 4 ساعت انکوبه شدند. سپس محیط‌ها در 10000×g به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ و رسوبات سلولی جمع‌آوری شدند.

رسوبات سلولی تهیه شده به کمک ورتکس در بافر شستشوی IB (حاوی Tris-EDTA-TritonX100) حل شد (0/1 حجم کشت اولیه) و در 70- درجه سانتی گراد فریز و مجدداً ذوب گردیدند. سپس از 100 μg/ml لیزوزیم به رسوب افزوده و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق روی یخ قرار داده شد. به محلول‌های فوق 1 میلی مولار PMSF افزوده و عمل سونیکاسیون به تعداد 8 سیکل 2 دقیقه‌ای انجام شد. پس از سونیکاسیون، 10میلی مولار سولفات منیزیم (برای حذف EDTA) و 10μg/ml آنزیم DNAse به محلول سونیکیت شده افزوده و به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. لیزات سلولی 10 دقیقه در 10000×g در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. پلت به دست آمده به کمک ورتکس در بافر شستشوی IB بدون EDTA حل گردید. سانتریفوژ مرحله قبل تکرار و انکلوژن بادی‌ها در بافر شستشوی IB فاقد EDTA و Triton حل شدند. رسوب حاصل از سانتریفوژ (انکلوژن بادی‌ها) برای مراحل بعدی تخلیص در فریزر نگهداری شدند.

انکلوژن بادی‌های حاصل از کشت انبوه در 10 میلی‌لیتر از بافر لیز گوانیدیوم (گوانیدین هیدروکلراید 6 مولار، سدیم فسفات 20 میلی مولار، کلرید سدیم 500 میلی مولار) به کمک ورتکس حل شدند و پس از سانتریفوژ (2000×g، 5 دقیقه) مواد غیرمحلول رسوب و مایع رویی برای انجام کروماتوگرافی آماده گردید.

تخلیص پروتئین‌های نوترکیب با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی با رزین نیکل طبق مراحل زیر انجام گرفت: حدود 5 میلی‌لیتر از رزین نیکل (ProBond Nickel-Chelating Resin , Invitrogen, USA) در داخل ستون کروماتوگرافی جای گذاری شد. رزین با مقدار کافی از محلول Denaturation Binding Buffer (اوره 8 مولار، فسفات سدیم 20 میلی مولار، کلرید سدیم) شستشو و به تعادل رسید. انکلوژن بادی‌های حل شده در بافر گوانیدیوم به آرامی بر روی ستون وارد شدند. ستون با حجم تقریبی 20 میلی‌لیتر از محلول Denaturation Wash Buffer (اوره 8 مولار، فسفات سدیم 20 میلی مولار، کلرید سدیم 500 میلی مولار) شستشو شد. شستشو با 30 میلی لیتر از محلول (فسفات دی هیدروژن سدیم 250 میلی مولار، کلرید سدیم 2/5 مولار، ایمیدازول 3 مولار) ادامه پیدا کرد. در نهایت، CTB نوترکیب با 12-8 میلی‌لیتر از محلول Native Elution Buffer (فسفات دی هیدروژن سدیم 250 میلی مولار، کلرید سدیم 2/5 مولار، ایمیدازول 6 مولار) شستشو و در حجم‌های 2 میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند. پروتئین‌های تخلیص شده بر روی ژل SDS-PAGE 15 درصد الکتروفورز و با روش برادفورد مورد سنجش قرار گرفتند.

هدف از آزمایش وسترن بلاتینگ تأیید پروتئین بیان و تخلیص شده بود. برای انجام این تست، ابتدا رسوب های باکتریایی مرحله القاء و غیرالقاء به همراه CTB نوترکیب خالص شده در ژل 15 درصد ژل آکریل آمید الکتروفورز SDS-PAGE (15 درصد) شدند. تعدادی کاغذ خشک کن به اندازهٔ ژل بریده شد و به مدت 30 دقیقه در بافر انتقال (تریس- بیس، گلایسین، متانول) قرار گرفت. غشاء PVDF (Polyvinylidene fluoride) به مدت 30 ثانیه در متانول مطلق، 1 دقیقه در آب مقطر و 5 دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد. انتقال باندهای پروتئینی از ژل به غشاء PVDF با روش Wet در ولتاژ 25 ولت از قطب مثبت به منفی به مدت

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

12 ساعت انجام گرفت. پس از اتمام انتقال، غشاء به مدت یک ساعت در بافر مسدود کننده (2 درصد BSA درPBS) قرار گرفت. غشاء را 4 بار هر بار به مدت 5 دقیقه در بافر PBS-T (تریس بیس، کلرید سدیم، توین 20) شستشو داده و سپس به مدت 1/5 ساعت در آنتی سرم علیه CTB که از ژاپن تهیه شده بود (رقت 1:1000 در PBS-T) قرار داده شد. غشاء پس از شستشوی مجدد به مدت 1/5 ساعت در رقت 1:2500 آنتی‌بادی کونژوگه با پراکسیداز (IgG-HRP Anti Rabbit) قرار داده شد. در نهایت پس از شستشوی کامل غشاء، ده میلی لیتر معرف رنگزار (0/5 میلی گرم در میلی لیتر دی آمینو بنزیدین به همراه 0/1 درصد پراکسید هیدروژن در PBS) بر روی آن اضافه شد و در تاریکی انکوبه شد و پس از ظاهر شدن باندها، غشاء با مقدار کافی آب مقطر شستشو داده شد.

نتایج

در این بررسی از حامل نوترکیب pET-28a/CTB پس از طراحی و تولید استفاده شد. حامل طوری طراحی شد تا پروتئین نوترکیب CTB تولید شده در هر دو انتهای C و N ترمینال واجد انتهای 6XHis-tag بوده و تحت پروموتور T7 قابل القا باشد تا تخلیص آن با استفاده از رزین و ستون تمایلی نیکل انجام شود. بیان پروتئین نوترکیب زیر واحد بتای انتروتوکسین ویبریوکلرا (rCTB) در مقیاس کوچک و بزرگ با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE در ژل 15 درصد بررسی شد (شکل1). در این بررسی بهترین و بالاترین میزان تولید زمانی بود که از غلظت یک میلی‌مولار به ازای هر میلی‌لیتر استفاده شد(برای دستیابی به این غلظت بهینه القا در غلظت‌های مختلف انجام شد، در نهایت تولید بهینه در این غلظت تائید شد). همچنین زمانی که کشت انبوه در حجم 250-300 میلی‌لیتر بود بیشترین پروتئین تولیدی (480 میکروگرم به ازای هر لیتر) نسبت به حجم‌های بالاتر نظیر یک لیتر (320 میکروگرم به ازای هر لیتر کشت) وجود داشت. همچنین بررسی ما نشان داد مقادیر بالایی از پروتئین rCTB تولید شده در داخل انکلوزیون بادی‌ها قرار داشتند که پس از محلول سازی، چند برابر شدن و تحت شرایط تخلیص-دناتوراسیون و با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شدند. بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده با SDS-PAGE نشان داد Rctb های تهیه شد به صورت مونومر بودند. همچنین آزمایش برادفورد انجام شده با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین نشان داد؛ میزان تولید rCTB با این روش 480 میکروگرم به ازای هر لیتر بود.

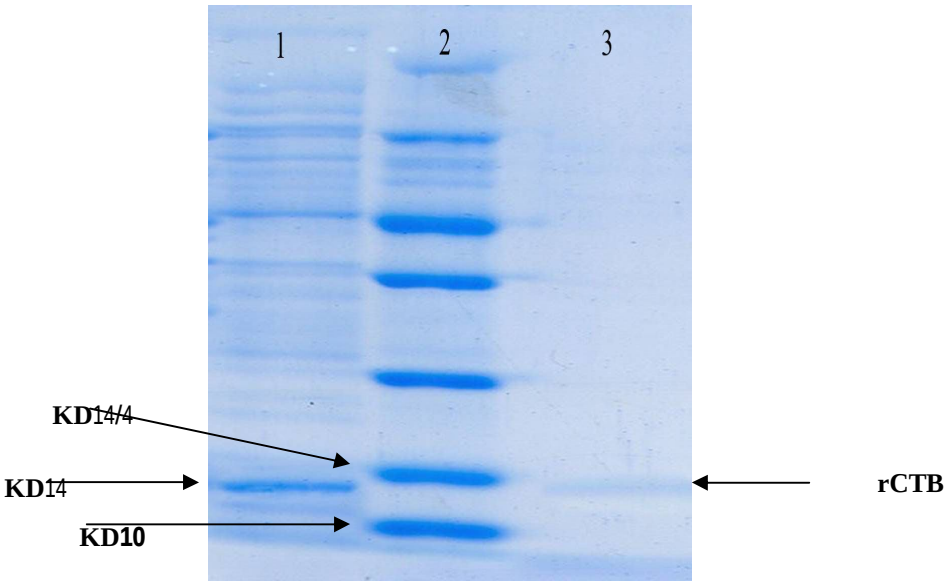
در این بررسی rCTB بیان و تخلیص شده با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال علیه CT و آزمایش وسترن بلاتینگ تائید شد. rCTB تخلیص شده به طور اختصاصی با آنتی‌بادی اختصاصی واکنش نشان داد. در این آزمایش ازCTB تجاری شرکت سیگما به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(شکل 2).

بحث

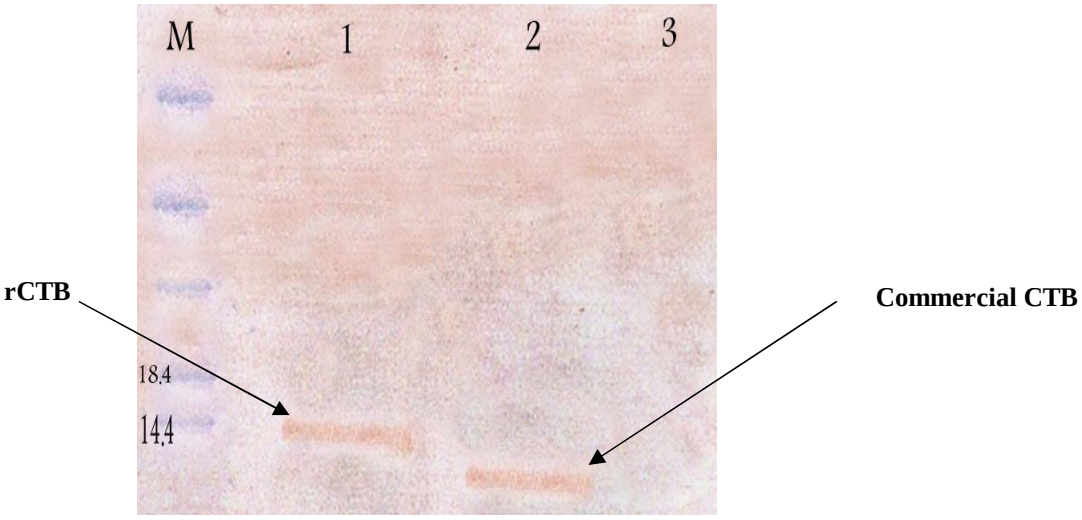
بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد CT و CTB از مهمترین و بهترین ادجوانت‌های مخاطی هستند. با توجه به سمیت CT در انسان، استفاده از آن به مدل‌های حیوانی محدود شده است. با توجه به اهمیت تولید CTB، از سیستم‌ها و میزبان‌های مختلفی برای تولید استفاده شده است. در بررسی‌های انجام شده از سیستم‌هایی نظیر اشرشیاکلی (17،18)، لاکتوباسیلوس، باسیلوس برویس و حتی ویبریوکلرای فاقد ژن‌های CTA استفاده شده است.(22-19). در تمام مطالعات انجام شده پروتئین نوترکیب تولید شده معمولا به صورت کونژوگه همراه سایر پروتئین‌ها بوده و خاصیت ادجوانتی آن تأیید شده است(18، 20).

CTB با اتصال کووالانتی به آنتی‌ژن‌ها متصل شده و آنها را به سلول‌های مخاطی از طریق گانگلیوزید GM1 حمل می‌کند. این ارائه موجب تحریک و فعال شدن پاسخ‌های ایمنی از طریق میان کنش آنتی ژن با سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن (APC) واقع در مخاط گوارشی و تنفسی می‌شود.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018



شکل 1. بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب CTB. Lane 1: پروتئین rCTB بیان شده تحت تاثیر IPTG، که نشان دهنده پروتئین مربوطه است.Lane 2: مارکر پروتئینی، Lane3: پروتئین rCTB تخلیص شده.



شکل 2. آنالیز وسترن‌بلاتینگ rCTB با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی. Lane 1: rCTB تولید و تخلیص شده (باوزن تقریبی 14KD) ، Lane 2: CTB تجاری شرکت سیگما (با وزن 12KD) ، Lane 3: کنترل منفی ، M: مارکر پروتئینی

علاوه براین CTB به عنوان سیستم انتقال بین مخاطی برای القاء تحمل دهانی مورد استفاده قرار می‌گیرد خصوصا زمانی که با اتوآنتی ژن‌ها یا آلرژن‌ها کونژوگه شده باشد(23،9،8). حضور دو انتهای واجد 6XHis tag در پروتئین rCTB تهیه شده موجب تسهیل تخلیص این پروتئین پس از بیان شد. علت این امر بیشتر شدن اندازه پروتئین و افزایش میزان چسبندگی آن به رزین نیکل بود که در نتیجه شستشو خارج نشده و تنها در مرحله آخر تخلیص شد. با این وجود مقدار کلی پروتئین تخلیص شده در ابتدا حدود 15 درصد مقدار پروتئین بیان شده بود که پس از بهبود روش تخلیص این مقدار به 45 درصد افزایش پیدا کرد. به نظر می‌رسد این مقدار از پروتئین نوترکیب تولید شده توانایی تحریک تولید آنتی بادی‌های سیستمیک و مخاطی را داشته باشد . علت اصلی این افزایش بیشتر به دلیل کاهش حجم کشت از یک لیتر به 300

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

میلی لیتر، برداشت باکتری‌های القا شده پس از 4 ساعت واستفاده از PMSF به عنوان آنتی پروتئاز بود. همچنین در تصویر ژل الکتروفورز باندهای متعددی مشاهده می‌شود که تمامی این پروتئین‌ها مربوط به خود باکتری BL21 است که تاثیری در بیان پروتئین ما ندارد و در طی فرایند تخلیص حذف می‌شوند. بررسی ما نشان داد یکی از مهمترین مراحلی که در آن میزان تخلیص پروتئین کاهش پیدا می‌کند، مراحل چند برابر کردن (Refolding) بود که طی آن مقادیر فراوانی از rCTB از دست می‌رود. اگر چه در نتایج حاصل از بررسی دیگران مقادیر ناچیزی اشکال دایمر و تترامر نیز وجود داشت، در بررسی ما پس از تخلیص تنها فرم مونومر وجود داشت. امروزه بررسی‌ها نشان داده است، تجمع و غلظت عوامل مهم تجمع اشکال مونومر CTB است. در بررسی وسترن بلاتینگ با توجه به این که در نمونه تجاری از داخل ژن CTB برای بیان این پروتئین استفاده می‌شود لذا اندازه آن نسبت به پروتئین نوترکیب ما که از کل پروتئین (حدود 14 کیلو دالتون) استفاده شده است، کوچک‌تر (حدود 12 کیلو دالتون) است.

بررسی ما اولین مورد از تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب زیر واحد بتای انتروتوکسین ویبریوکلرا است که از اشرشیاکلی به عنوان سیستم بیانی استفاه شده است. از آنجائی که اشرشیاکلی سویه بیانی ارزان، مناسب و دارای رشد سریعی است، لذا یکی از بهترین میزبان‌های بیانی محسوب می‌شود، لذا پیشنهاد می‌شود با بهبود دوباره روش بیان و تخلیص این پروتئین می‌توان مقادیر بیشتری از rCTB را تهیه نمود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت پروتئین زیر واحد بتای انتروتوکسین ویبریوکلرا به عنوان ادجوانت در صنعت واکسن سازی و با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی و مقایسه 5آن با بررسی‌های مشابه به نظر می‌رسد اشرشیاکلی میزبان مناسبی برای تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب زیر واحد بتای انتروتوکسین ویبریو کلرا باشد.

تشکر و قدردانی

با توجه به این که بررسی فوق بخشی از پایان نامه دوره دکترای نویسنده اول با عنوان "استفاده از ذرات نانو در شناسایی سریع سم ویبریوکلره" بود، از تمام اساتید و دانشجویان گروه باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر و قدردانی را دارم. ضمناً بودجه پژوهشی این طرح از طرف دانشگاه تربیت مدرس تامین شده بود.

منابع

1.Vanden Broeck D, Horvath C, De Wolf MJS. Vibrio cholerae: cholera toxin. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007; 39(10): 1771-5.

2.Hill DR, Ford L, Lalloo DG. Oral cholera vaccines: use in clinical practice. The Lancet Infectious Diseases. 2006; 6(6): 361-73.

3.Chinnapen DJF, Chinnapen H, Saslowsky D, Lencer WI. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. FEMS microbiology letters. 2007;266(2):129-37.

4.Gong Z, Jin H, Jin Y, Zhang Y. Expression of cholera toxin B subunit and assembly as functional oligomers in silkworm. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2005; 38(6): 717-724.

5.Haan L, Hirst TR. Cholera toxin: A paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). Molecular membrane biology. 2004;21(2): 77-92.

6.Pierre P, Denis O, Bazin H, Mbella EM, Vaerman JP. Modulation of oral tolerance to ovalbumin by cholera toxin and its B subunit. European journal of immunology. 1992; 22(12): 3179-82.

7.Wu H, Russell MW. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

cholera toxin B subunit. Infection and immunity. 1993; 61(1): 314-322.

8.Sun JB, Rask C, Olsson T, Holmgren J, Czerkinsky C. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(14):7196-7201 .

9.Bergerot I, Ploix C, Petersen J, Moulin V, Rask C, Fabien N, et al. A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(9):4610-4614.

10.Lycke N, Strober W. Cholera toxin promotes B cell isotype differentiation. The Journal of Immunology. 1989;142(11):3781-3787.

11.Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. Cellular and Molecular Life Sciences. 2008;65(9):1347-60.

12.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. Clinical Immunology. 2004; 112(1): 35-44.

13.Arakawa T, Yu J, Chong DKX, Hough J, Engen PC, Langridge WHR. A plant-based cholera toxin B subunit–insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. Nature Biotechnology. 1998; 16(10): 934-8.

14.Tarkowski A, Sun JB, Holmdahl R, Holmgren J, Czerkinsky C. Treatment of experimental autoimmune arthritis by nasal administration of a type II collagen–cholera toxoid conjugate vaccine. Arthritis & Rheumatism. 1999; 42(8): 1628-34 .

15.Tamura S, Hatori E, Tsuruhara T, Aizawa C, Kurata T. Suppression of delayed-type hypersensitivity and IgE antibody responses to ovalbumin by intranasal administration of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit-conjugated ovalbumin. Vaccine. 1997; 15(2): 225-9.

16.Rask C, Fredriksson M, Lindblad M, Czerkinsky C, Holmgren J. Mucosal and systemic antibody responses after peroral or intranasal immunization: Effects of conjugation to enterotoxin B subunits and/or of co administration with free toxin as adjuvant. Apmis. 2000;108(3): 178-86.

17.L'hoir C, Renard A, Martial JA. Expression in Escherichia coli of two mutated genes encoding the cholera toxin B subunit. Gene. 1990;89(1):47-52.

18.de Geus B, Dol-Bosman M, Willem Scholten J, 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.

19.Slos P, Dutot P, Reymund J, Kleinpeter P, Prozzi D, Kieny MP, et al. Production of cholera toxin B subunit in Lactobacillus. FEMS microbiology letters. 1998; 169(1): 29-36.

20.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.

21.Goto N, Maeyama J, Yasuda Y, Isaka M, Matano K, Kozuka S, et al. Safety evaluation of recombinant cholera toxin B subunit produced by Bacillus brevis as a mucosal adjuvant. Vaccine. 2000;18(20):2164-71 .

22.Rudin A, Johansson EL, Bergquist C, Holmgren J. Differential kinetics and distribution of antibodies in serum and nasal and vaginal secretions after nasal and oral vaccination of humans. Infection and immunity. 1998; 66(7): 3390-3396.

23.Sun JB, Holmgren J, Czerkinsky C. Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994; 91(23): 10795-10799.