

ارزیابی و مقایسه تیترا آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های نوترکیب منفرد، مخلوط و کایمر CTXB-TCPA و TCPA، CTXB

میلاذ عامریان: دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.
*شهرام نظریان: استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران (*نوسنده مسئول). pnazari@ihu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: وبا به عنوان بیماری اسهالی یکی از مهم‌ترین علل مرگ و ناتوانی در افراد جوامع مختلف به شمار می‌رود. فاکتور کلونیزاسیون پیلای tcpA و توکسین کلرا مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی ویبریوکلرا می‌باشند. زیر واحد B سم کلرا (ctxB) و tcpA توانایی القای پاسخ‌های ایمنی را دارند. هدف از این مطالعه، تولید پروتئین‌های نوترکیب CTXB-TCPA و TCPA، CTXB و مطالعه ایمنی‌زایی و مقایسه تیترا آنتی‌بادی کایمر، مخلوط و جداگانه پروتئین‌های نوترکیب در موش بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ژن‌های tcpA، ctxB و کایمر ctxB-tcpA در وکتورهای بیانی pET28a (+) و pET32a (+) همسانه‌سازی و پلاسمیدهای نوترکیب به E. coli BL21 DE3 منتقل شدند. بیان پروتئین‌های نوترکیب با IPTG القا و با روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ بررسی شد. جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA استفاده شد. ایمن‌سازی موش‌ها به روش درون صفاقی و زیر پوستی انجام شد. تیترا آنتی‌بادی در سرم موش‌های ایمن شده با روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: آنالیز SDS PAGE و وسترن بلاتینگ، بیان و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب را تأیید کرد. میزان پروتئین‌های خالص شده CTXB، TCPA و CTXB-TCPA به ترتیب ۱۵/۵۷۰، ۱۱/۵۳۳ و ۳۳/۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. نتایج الایزا نشان داد که ایمنی‌زایی موش‌ها به خوبی صورت پذیرفته است. تفاوت معنی‌داری در تیترا آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های CTXB-TCPA و مخلوط TCPA با CTXB وجود نداشت. همچنین تفاوت معنی‌داری در تیترا آنتی‌بادی حاصل از تزریق درون صفاقی و زیرپوستی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: اختلاف جزئی در تیترا آنتی‌بادی پروتئین‌ها ممکن است به طول عمر سلول‌های خاطره‌حاصل در این گروه‌ها و همچنین روش تزریقی آن‌ها ارتباط داشته باشد. با توجه به مزیت‌های پروتئین‌های کایمر، CTXB-TCPA می‌تواند جایگزین مناسبی برای مخلوط پروتئین‌ها جهت تحریک سیستم ایمنی باشد.

کلیدواژه‌ها: ویبریو کلرا، ctxB، tcpA، پروتئین کایمر، تیترا آنتی‌بادی

مقدمه

بر اساس آمارهای جهانی، پس از بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان، عفونت‌های اسهالی یکی از بزرگ‌ترین علل مرگ‌ومیر انسان‌ها به شمار می‌رود. شایع‌ترین خطری که فرد مبتلا به بیماری اسهال را تهدید می‌کند دهیدراتاسیون و در کشورهای در حال توسعه، سوء تغذیه است (۱ و ۲). بیماری اسهال یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در سطح جهان و ایران می‌باشد که اکثر تحقیقات در زمینه عفونت‌های اسهالی بر روی اسهال کودکان است (۳ و ۴). با توجه به اهمیت این بیماری در

ایجاد تلفات انسانی و زیان‌های اقتصادی زیاد در جوامع، سازمان بهداشت جهانی درصدد راهکارهای تولید واکسن مناسب علیه این میکروارگانیزم است (۵). مهم‌ترین نشانه این بیماری استفراغ و اسهال آبکی فراوان می‌باشد (۶).

در بیماری‌زایی باکتری ویبریوکلرا دو عامل انتروتوکسینی و چسبندگی نقش دارند. یک انتروتوکسین قدرتمند خارج سلولی که بر روی سلول‌های روده‌ای کوچک‌تأثیر می‌گذارد و از نظر ساختمانی و عملکرد، ارتباط بسیار نزدیکی با توکسین حساس به حرارت اش‌ریشیاکلی

ویژگی ادجوانی از جمله زیر واحد اتصالی سم کلرا می‌تواند سبب بهبود پاسخ‌های سیستم ایمنی در مواجهه با ایمونوژن‌های نوترکیب شود (۱۶). هدف از این تحقیق بررسی میزان ایمنی زایی پروتئین‌های نوترکیب در حالت کایمر و مخلوط و مقایسه آن‌ها با پروتئین‌های نوترکیب منفرد می‌باشد (۷ و ۱۷).

روش کار

۱- مواد آزمایشگاهی، پلاسمید و سوش‌های باکتری: در این مطالعه تجربی از باکتری *E. coli* سویه DH5 α جهت همسانه‌سازی ژن‌های *ctxB*، *tcpA* و سویه BL21(DE3) جهت بیان پروتئین استفاده شد. از محیط‌های کشت لوریا برتونی (LB) مایع و آگار جهت رشد باکتری *E. coli* استفاده گردید. جهت انتخابی نمودن رشد باکتری از آنتی‌بیوتیک کانامایسین شرکت فرمنتاز استفاده شد. به منظور تایید همسانه‌سازی ژن در وکتور بیانی، از آنزیم‌های محدود الاثر *HindIII* و *XhoI* ساخت شرکت Fermentas (اوکراین) استفاده گردید. غشای نیترو سلولز از شرکت Roche و پلیت‌الیزا از شرکت Nunck مورد استفاده قرار گرفت. کیت‌های تخلیص پلاسمید و محصول PCR از شرکت Bioneer تهیه شد. ستون *Ni-NTA agarose resin* جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از شرکت Qiagene خریداری گردید.

۲- همسانه‌سازی ژن‌ها: جهت بهره‌برداری از سازه ژنی *ctxB-linker-ctxB-pET28a(+)*، ابتدا ژن *ctxB* سنتزی که دارای پرایمرهایی با جایگاه برشی آنزیم *EcoRI* برای پرایمر پیشرو و آنزیم *HindIII* برای پرایمر پیرو بودند، توسط PCR تکثیر پیدا کردند.

*ctxB/F:TGCAGAATTCACACCTCAA
ATATTACTG (EcoRI)*
*ctxB/R:TATCAAGCTTATTTGCCATA
CTAATTGC (HindIII)*

در گام بعدی ژن سنتزی *tcpA* که دارای پرایمرهایی با جایگاه برشی آنزیم *HindIII* برای پرایمر پیشرو و آنزیم *XhoI* برای پرایمر پیرو بودند نیز توسط PCR تکثیر پیدا کردند.

(*Escherichia coli- E.coli*) دارد. انترتوکسین ویبریوکلا حساس به حرارت با وزن مولکولی ۸۴ کیلو دالتون که از زیر واحد A (CTA) و زیر واحد B (CTB) تشکیل شده است. زیر واحد CTB با اتصال به گیرنده سطحی در سلول‌های مخاطی باعث ورود CTA به درون سلول می‌شود (۹-۷). گیرنده سطح سلولی CTB نوعی پنتاساکارید گانگلوئید به نام GM1 است که روی شمار زیادی از سلول‌های هسته‌دار بدن از جمله سلول‌های اپی تلیالی مخاطی، سلول‌های لنفوئیدی و سلول‌های پردازش‌کننده آنتی‌ژن بیان می‌شود (۱۰ و ۱۱). اتصال و ورود سم به سلول سبب افزایش cAMP سلولی شده که تعادل جریان‌های الکترولیتی درون روده را به هم می‌زند و موجب ایجاد اسهال آب برنجی می‌گردد. باکتری ویبریو کلرا برای ایجاد بیماری نیازمند اتصال به سلول‌های روده ای است. فاکتور کلو نیزاسیون پیلی (TCP) مهم‌ترین ساختار اتصالی باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده است. TCP دارای محلی است که مانند یک رسپتور برای فاژ CTX عمل می‌نماید (۱۴-۱۲). پروتئین TCPA با وزن حدود ۳۸/۶ کیلو دالتون یکی از اجزاء مهم ویبریوکلا است ژن سازنده این پروتئین دارای ۵۴۳ جفت باز است. در سال‌های اخیر، خواص ایمونولوژیکی *tcpA* به علت نداشتن عوارض جانبی به عنوان ایمونوژن مورد توجه بوده است (۱۵). پروتئین‌های نوترکیب خواص ساختاری پروتئین‌های طبیعی را داشته و تولید آن‌ها در مقایسه با پروتئین‌های طبیعی مقرون به صرفه و خالص‌سازی آن‌ها آسان‌تر می‌باشد. پروتئین‌های نوترکیب به دلیل بهینه‌سازی کدونی، دارای کدون‌هایی هستند که tRNA بیشتری برای آن وجود داشته، بنابراین سیستم ایمنی بهتر تحریک شده و پاسخ ایمنی قوی‌تری ایجاد می‌کنند. در حالی که استفاده از ترکیب پروتئین‌ها در مقایسه با مصرف جداگانه پروتئین آن‌ها و یا پروتئین‌های تک‌طرفیتی احتمال برداشت همزمان آن‌ها توسط سلول‌های میزبان را افزایش داده و به میزان برابر و در شرایط یکسان سیستم ایمنی را تحریک می‌نمایند. در طراحی پروتئین‌های کایمر، استفاده از پروتئین‌هایی با

ctxB و chimera در کنار نشانگر مولکولی توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. پس از هضم آنزیمی قطعات ژنی برش خورده از روی ژل آگارز به وسیله کیت استخراج DNA تخلیص گردیدند. ژن ها متناسب با آنزیم های محدودالاثری که برش خورده بودند به درون وکتور متناسب با ژن های مذکور که با همان آنزیم ها برش خورده اند، الحاق گردیدند. محصول الحاق، با روش شوک حرارتی به سلول های مستعد (تهیه شده به روش شیمیایی) *E. coli* BL21 DE3 سویه تراریخت گردیدند. کلنی های نو ترکیب با غربال گری آنتی بیوتیکی جدا و حضور پلاسمید حاوی ژن های *tcpA*، *ctxB* و *chimera* با PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفتند.

۳- بیان و تعیین جایگاه پروتئین های نو ترکیب *CTXB*، *TCPA* و کایمر *CTXB-TCPA*: برای بیان ژن های مذکور از کشت شبانه کلون های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک متناسب با هر ژن تلقیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القا کننده پروموتور (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سلول های باکتریایی جمع آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول های حاصل از ژن *ctxB* و کایمر *ctxB-tcpA* با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده B اوره دار و سلول های حاصل از ژن *tcpA* با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده بدون اوره مخلوط و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند. سپس نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ g سانتیفریوژ شدند و محلول رویی با نسبت یک (بافر نمونه) به پنج (نمونه) با سمپل بافر دارای غلظت ۵x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانده شد. در نهایت نمونه های تیمار شده توسط ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲٪ از لحاظ بیان پروتئین های نو ترکیب بررسی شدند.

۴- تخلیص پروتئین های نو ترکیب و تأیید آن به روش وسترن بلاتینگ: با توجه به وجود پروتئین

tcpA/F: 5'- AGTTAAGCTTGCATG ACATTACTCGAAGT -3 (HindIII)

tcpA/R: 5'- AATACTCGAGTTAGCT GTTACCAAATGC -3 (XhoI)

جهت همسانه سازی کاست ژنی کامل *pET28a(+)-ctxB-tcpA* از لینکر غیرفورینی سخت EAAAK شامل اسید آمینه های گلوتامیک اسید، آلانین و لیزین استفاده شد. لینکر به دلیل جداسازی و ایجاد فاصله بین دو ژن که در نهایت منجر به در معرض قرار گرفتن کامل هر دو پروتئین در بدن میزبان و دستگاه ایمنی می شود، مورد استفاده قرار گرفت. سکانس پرایمر ژن *tcpA* با لینکر EAAAK دارای جایگاه برشی آنزیم *XhoI* و *HindIII* برای پرایمر پیشرو به همراه لینکر که در پرایمر پیشرو تعبیه شده و آنزیم *XhoI* برای پرایمر پیرو می باشند.

tcpA/F with linker= AGTTAAGCT TGCGA

AGCTGCGGCAAAAATGACATTACTC G (XhoI)

پس از تایید صحت کلون شدن ژن *ctxB* در وکتور *pET28a(+)*، ژن *tcpA* در وکتور *pET32a(+)* و کایمر ژنی *ctxB-tcpA* در وکتور *pET28a(+)* محصول PCR هر کدام با روش شوک حرارتی به سلول مستعد *DH5α* سویه *E. coli* تراریخت شدند. سلول های ژن *ctxB* و کایمر ژنی *ctxB-tcpA* بر روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین (غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و سلول های ژنی *tcpA* بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی سیلین (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به صورت چمنی کشت داده شدند. تعدادی کلنی از هر کدام متناسب با آنتی بیوتیک مربوطه انتخاب و به طور جداگانه در محیط LB مایع به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. پس از جمع آوری سلول ها، باروش لیز قلیایی پلاسمید استخراج گردید. با استفاده از آنزیم های محدود الاثر بر روی پلاسمید های استخراج شده، هضم آنزیمی صورت، وجود ژن های *tcpA*،

(سیگما، میلی گرم در ده میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۸) تا ظهور باند پروتئینی، قرار گرفت و در ادامه برای توقف واکنش، از آب مقطر قرار استفاده شد.

۵- ایمن نمودن موش‌های سوری توسط آنتی ژن‌های نوترکیب: به منظور بررسی پاسخ ایمنی، از موش سوری که هیچ دارو یا واکنشی دریافت نکرده بودند، استفاده شد.

موش‌ها دارای وزن ۲۵ گرم بوده و در مدت آزمایش تحت شرایط یکسان از جمله میزان غذا و آب مصرفی، شرایط نگهداری، دمای محیط و ... قرار داشتند. به منظور بررسی پاسخ ایمنی از ۲۴ عدد موش برای گروه تست و ۶ عدد برای گروه کنترل استفاده شد.

برای هر موش، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده با PBS استریل به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. جهت آماده سازی نمونه‌ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوانت کامل فروند (موسسه سرم سازی رازی) در تزریق اول و ادجوانت ناقص فروند در تزریق‌های بعدی اضافه گردید آنتی ژن‌ها به صورت زیر جلدی و داخل صفاقی تزریق شد. فواصل تزریق ۱۴ روز در نظر گرفته شد.

یک هفته پس از تزریقات دوم، سوم، چهارم از موش‌ها خون‌گیری و سرم‌ها جدا شده و برای مراحل بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۶- بررسی تیتراژ آنتی‌بادی توتال IgG: در این مرحله به منظور بررسی تیتراژ آنتی‌بادی از روش الیزا استفاده گردید. ابتدا مقدار ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ داخل هر یک از چاهک‌های الیزا ریخته و در دو چاهک جهت کنترل در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شستشو با بافر PBST در بین هر مرحله صورت گرفت. میکروپلیت با PBST حاوی ۵ درصد شیر خشک بدون چربی مسدود شد و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سرم مورد نظر از رقت ۱:۲۰۰ تا ۱:۲۵۶۰۰ در PBST رقیق و در چاهک‌ها قرار گرفت و میکروپلیت به مدت نیم

نوترکیب بیانی TCPA در فاز محلول، تخلیص این پروتئین با استفاده از شیب غلظتی ایمیدازول انجام گردید. جهت محلول‌سازی پروتئین‌های CTXB و CTXB-TCPA که در شکل انکلوژن بادی بود و در فاز نامحلول وجود داشتند از بافرهای واجد اوره ۸ مولار و با شیب pH ۸، ۶/۵، ۵/۲، ۴/۵ جهت تخلیص استفاده شدند. با در نظر گرفتن اینکه پروتئین‌های نوترکیب بیان شده، دارای توالی شش هیستیدین در فرادست می‌باشند، لذا، فرآیند تخلیص پروتئین‌ها به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA صورت گرفت. خروجی‌های ستون به وسیله ژل ۱۲% SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. غلظت هر یک از پروتئین‌های نوترکیب با روش برادفورد اندازه‌گیری گردیدند. جهت تایید پروتئین‌های نوترکیب از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad و بافر انتقال (گلاسیسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱٪ و متانول ۲۰٪ و pH=۸/۳) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل و به منظور پرکردن جایگاه‌های خالی (بلاکینگ)، کاغذ به مدت یک شب در محلول ۵ درصد شیرخشک در PBST در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس سه مرتبه با PBST شستشو داده شد. نوار نیتروسولوزی واجد پروتئین TcpA به طور جداگانه با آنتی‌بادی ضد هیستیدین (کیاژن) با رقت ۱:۵۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. کاغذ نیتروسولوز واجد پروتئین CTB و پروتئین کایمر با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد کلرا توکسین (سیگما) با رقت ۱:۲۰۰۰ مجاور گردید. پس از شستشو از آنتی‌بادی بادی (داکو) با رقت ۱:۵۰۰۰ به عنوان آنتی‌بادی ثانویه برای کاغذ واجد پروتئین‌های CTB و کایمر استفاده شد. فرآیند شستشو با PBST سه بار انجام گرفت. کونژوگه موشی با رقت ۱:۵۰۰۰ به عنوان آنتی‌بادی تشخیص دهنده به کار رفت. همانند مرحله قبل گرماگذاری انجام شد. فرآیند شستشو نیز همانند مراحل قبلی انجام شد. نهایتاً، کاغذ نیتروسولوز در محلول سوبسترای DAB ۶

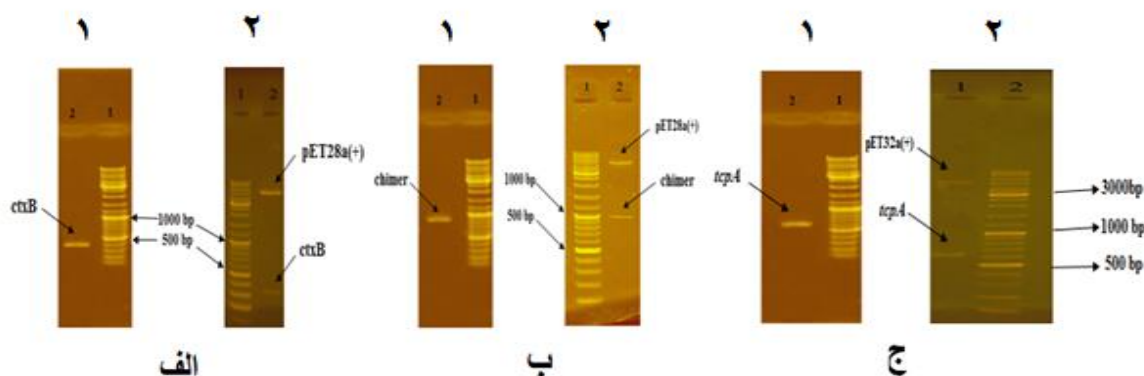
افزار SPSS 22 انجام شد.

یافته‌ها

بررسی الحاق و صحت همسانه سازی در باکتری *E. coli* BL21(DE3): جهت تأیید همسانه سازی ژن‌ها و ساخت کاست ژنی از جفت پرایمرهای اختصاصی هر ژن استفاده شد. در شکل (۱-الف) واکنش PCR مربوط به پلاسمید نوترکیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ctxB* منجر به تکثیر قطعه ۳۲۹ جفت بازی، (شکل ۱-ج) پلاسمید نوترکیب با پرایمرهای اختصاصی *tcpA* با قطعه ۵۶۳ جفت بازی و (شکل ۱-ب) کایمر نوترکیب با پرایمرهای مشترک دو ژن *ctxB* و *tcpA* با اندازه ۸۹۲ جفت بازی دیده می‌شود. در روش دوم جهت بررسی صحت پلاسمید حاوی ژن *ctxB* با روش هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر *HindIII* و *EcoRI* در وکتور *pET28a(+)* (شکل ۱-الف)، ژن *tcpA* با آنزیم‌های محدود الاثر *HindIII* و *XhoI* در وکتور *pET32a(+)* (شکل ۱-ب) و در نهایت کایمر ژنی *ctxB-tcpA* هم با آنزیم‌های *HindIII* و *XhoI*

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله بعد، رقت ۱:۲۰۰۰ از آنتی‌بادی گونژوگه موشی (داکو) در PBST تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر سوپسترا (۲ میلی‌گرم OPD در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات حاوی ۲/۵ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد) به هر چاهک اضافه شد. با ایجاد رنگ زرد، واکنش با اسید سولفوریک یک مولار متوقف و جذب در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

۷- آنالیز آماری: برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلموگراف-ایرنوزوف و برای مقایسه تعداد دفعات تجویز فرمولاسیون در مراحل مختلف اندازه‌گیری از تحلیل واریانس مکرر با استفاده از انوای یک طرفه انجام شد. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار، آزمون *t* زوجی بون فرونی برای تعیین منشا تفاوت مورد نظر قرار گرفت. آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین (در سطح تجویز دوم، سوم و چهارم) با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم



شکل ۱- تأیید همسانه سازی وکتورهای نوترکیب *tcpA-tcpA*، *pET28a(+)-ctxB*، *pET32a(+)-tcpA*، *pET28a(+)-ctxB* با روش PCR داخلی (۱) و روش هضم آنزیمی (۲)

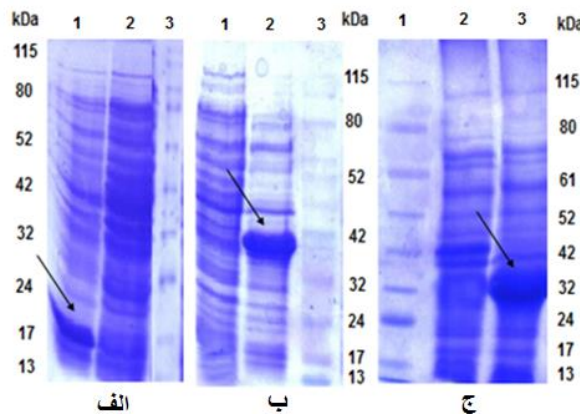
الف: تأیید همسانه سازی وکتور نوترکیب *pET28a(+)-ctxB* (۱) ردیف ۱: الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب با جفت پرایمرهای اختصاصی *ctxB* / (۲) ردیف ۱: نشانگر اندازه DNA ladder mix، ردیف ۲: پلاسمید نوترکیب *pET28a(+)-ctxB* برش خورده با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI*
ب: تأیید همسانه سازی وکتور نوترکیب *pET28a(+)-ctxB-tcpA* (۱) ردیف ۱: الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب با جفت پرایمرهای اختصاصی ترکیبی *ctxB* و *tcpA*، ردیف ۲: نشانگر اندازه DNA ladder mix / (۲) ردیف ۱: نشانگر اندازه DNA ladder mix، ردیف ۲: پلاسمید نوترکیب *pET28a(+)-ctxB-tcpA* برش خورده با آنزیم‌های *HindIII* و *XhoI*

ج: تأیید همسانه سازی وکتور نوترکیب *pET32a(+)-tcpA* (۱) ردیف ۱: الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب با جفت پرایمرهای اختصاصی *tcpA*، ردیف ۲: نشانگر اندازه DNA ladder mix / (۲) ردیف ۱: پلاسمید نوترکیب *pET32a(+)-tcpA* برش خورده با آنزیم‌های *HindIII* و *XhoI*، ردیف ۲: نشانگر اندازه DNA ladder mix

شد که در آن با استفاده از پروتئین‌های استفاده شده در SDS-PAGE با استفاده از روش های اوره برای پروتئین های نامحلول و روش ایمیدازول برای پروتئین محلول مشخص گردید. پروتئین CTXB در بافر ایمیدازول ۲۵۰ اوره دار (شکل ۳ - الف) پروتئین کایمر CTXB-TCPA هم در بافر ایمیدازول ۲۵۰ اوره دار (شکل ۳-ج) و پروتئین TCPA در بافر ایمیدازول ۲۵۰ بدون اوره (شکل ۳-ب) از ستون تخلیص شدند. میزان پروتئین تخلیص شده CTXB ۱۵/۵۷۰ میلی گرم در لیتر، میزان پروتئین تخلیص شده TCPA ۱۱/۵۳۳ میلی گرم در لیتر و پروتئین کایمر

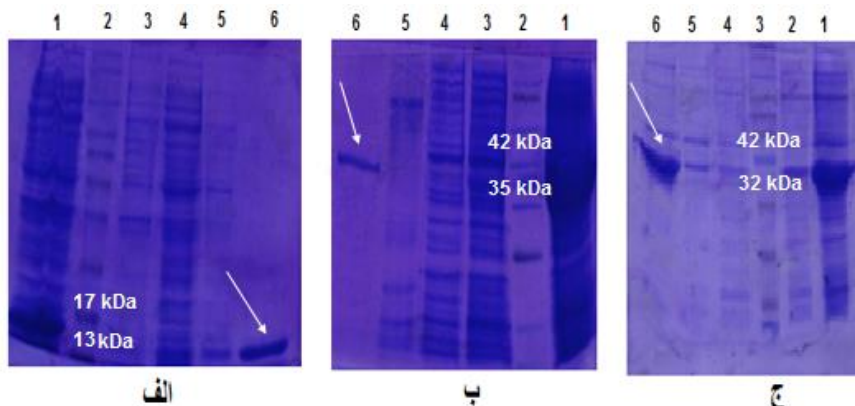
انجام وصحت سازه ژنی تایید شد (اشکال ۲ و ۱). بررسی بیان پروتئین‌های نو ترکیب: برای بررسی بیان ژن های ctxB و کایمر ژنی tcpA-ctxB در وکتور pET28a(+) بیان ژن tcpA در وکتور pET32a(+) پس از کشت سلول ها و القاء با IPTG بیان ژن ها صورت پذیرفت و پس از تیمار خام برروی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به وزن پروتئین های نو ترکیب از ژل ۱۲٪ استفاده شد (شکل ۲).

بررسی خلوص پروتئین های نو ترکیب و آنالیز وسترن بلاتینگ: برای بررسی میزان خلوص پروتئین های نو ترکیب از ستون Ni-NTA استفاده



شکل ۲- بیان ژن های ctxB و tcpA و کایمر ctxB-tcpA و تعیین موقعیت پروتئین های CTXB و TCPA

الف: (۱) نمونه تست CTXB با القای IPTG (۲) نمونه شاهد بدون القای IPTG (۳) نشانگر پروتئینی Vivantis product Number:PR0602
ب: (۱) نمونه شاهد بدون القای IPTG (۲) نمونه تست کایمر CTXB-TCPA با القای IPTG (۳) نشانگر پروتئینی Vivantis product Number:PR0602
ج: (۱) نشانگر پروتئینی Vivantis product Number:PR0602 (۲) نمونه شاهد بدون القای IPTG (۳) نمونه تست TCPA با القای IPTG

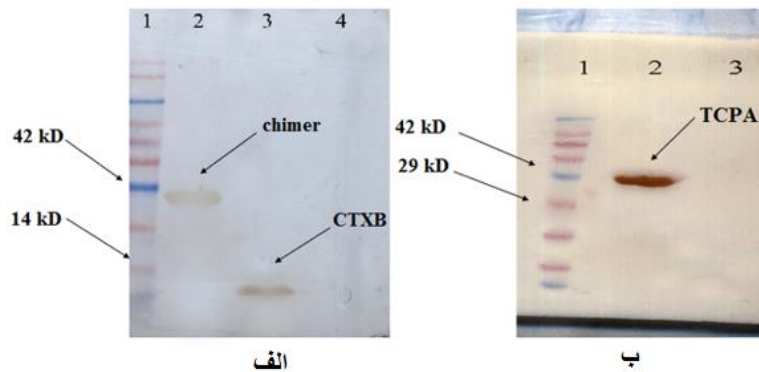


شکل ۳- ژل SDS-PAGE از پروتئین های نو ترکیب تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی

الف) پروتئین CTXB (روش اوره) - ستون ۱: flow قبل از ستون - ستون ۲: نشانگر پروتئینی شماره Vivantis product Number:PR0602 ستون ۳: flow ستون، ستون ۴: بافر C، ستون ۵: بافر D، ستون ۶: بافر ایمیدازول ۲۵۰ (اندازه پروتئین ۱۶/۶ کیلو دالتون)
ب) پروتئین TCPA (روش ایمیدازول) - ستون ۱: flow قبل از ستون - ستون ۲: مارکر پروتئینی - ستون ۳: flow ستون - ستون ۴: بافر ایمیدازول ۴۰ - ستون ۵: بافر ایمیدازول ۱۷۰ - ستون ۶: بافر ایمیدازول ۲۵۰ (اندازه پروتئین ۳۸/۶ کیلو دالتون)
ج) پروتئین کایمر CTXB-TCPA (روش اوره) ستون ۱: flow قبل از ستون، ستون ۲: flow ستون، ستون ۳: مارکر پروتئینی، ستون ۴: بافر C، ستون ۵: بافر D، ستون ۶: بافر ایمیدازول ۲۵۰ (اندازه پروتئین ۳۵ کیلو دالتون)

موش: اشکال ۵ و ۶ واکنش الایزا مربوط به پروتئین های TCPA، CTXB و کایمر-CTXB و نمونه مخلوط (TCPA+CTXB) تخلیص شده و سرم موش را نشان می دهد. یک هفته بعد از تجویزهای دوم، سوم و چهارم از موش های تست و شاهد خون گیری به عمل آمد و بعد از

۳۳/۱۰۰ میلی گرم در لیتر بود. به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک Western Blotting استفاده شد. در این روش از آنتی بادی علیه کلرا توکسین (شکل ۴- الف)، Anti-Histag (شکل ۴- ب) استفاده شد. تولید آنتی بادی علیه پروتئین های نو ترکیب در



شکل ۴- تأیید پروتئین های نو ترکیب بیان شده با استفاده از روش وسترن بلات
 الف) تأیید پروتئین های نو ترکیب با استفاده از Anti-CTXB ستون ۱: نشانگر پروتئینی ستون ۲: نمونه کایمر CTXB-TCPA القاء شده با IPTG، ستون ۳: نمونه پروتئین CTXB القاء شده با IPTG ستون ۴: نمونه BSA
 ب) تأیید پروتئین نو ترکیب با استفاده از Anti.His-tag ستون ۱: نشانگر پروتئینی ستون ۲: نمونه پروتئین TCPA القاء شده با IPTG

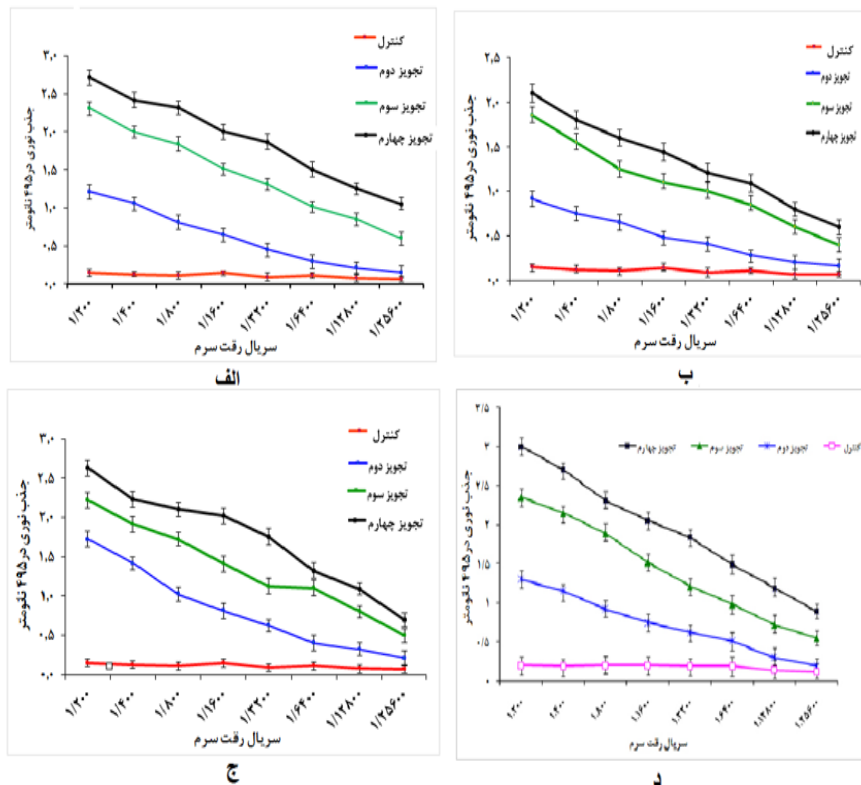
جدول ۱- بررسی آماری تفاوت تیتر آنتی بادی در مراحل تجویز آنتی ژن ها

آنتی ژن	روش تجویز	دفعات تجویز	معنی داری تفاوت تیتر آنتی بادی
CTXB	درون صفاقی	دوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم و چهارم با دوم (P<01)
		سوم	
		چهارم	
CTXB	زیر پوستی	دوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم و چهارم با دوم (P<01)
		سوم	
		چهارم	
TCPA	درون صفاقی	دوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم و چهارم با دوم (P<01)
		سوم	
		چهارم	
TCPA	زیر پوستی	دوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم و چهارم با دوم (P<01)
		سوم	
		چهارم	
CTXB+ TCPA	درون صفاقی	دوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز چهارم با سوم (P<05) تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم با دوم (P<05)
		سوم	
		چهارم	
CTXB+ TCPA	زیر پوستی	دوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز چهارم با سوم (P<05) تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم با دوم (P<05)
		سوم	
		چهارم	
CTXB-TCPA	درون صفاقی	دوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم و چهارم با دوم (P<01)
		سوم	
		چهارم	
CTXB-TCPA	زیر پوستی	دوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم و چهارم با دوم (P<01)
		سوم	
		چهارم	

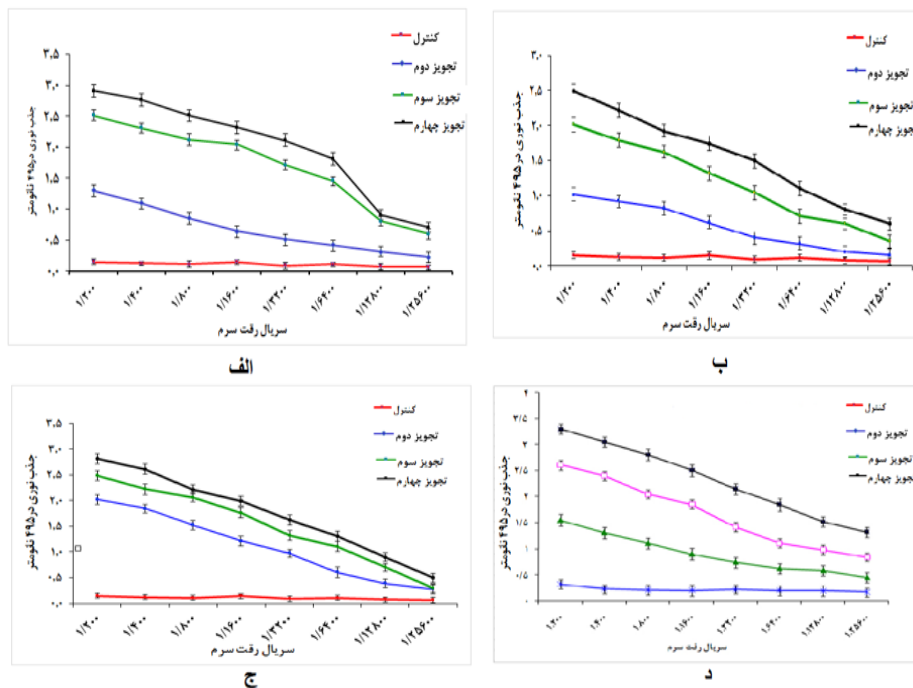
منجر به افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در هر مرحله شده است. نتایج به دست آمده تیتراژ آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در موش‌های ایمن شده با آنتی‌ژن کایمر به صورت زیر پوستی، تیتراژ آنتی‌بادی به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل ($p < 0.01$) بود.

بیشترین میزان OD مربوط به رقت $1/200$ در تزریق چهارم و به میزان $3/3$ بود. تیتراژ آنتی‌بادی مربوط به تجویز آنتی‌ژن به صورت زیر پوستی (شکل ۶) نسبت به تیتراژ آنتی‌بادی آنتی‌ژن تجویز شده به درون صفاق (شکل ۳) بالاتر بوده که این میزان از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. بنابراین در تجویز درون صفاقی و تزریقی آنتی‌ژن‌های CTXB، TCPA و کایمر-CTXB تفاوت معنادار بین تیتراژ آنتی‌بادی تجویز شده سوم و چهارم با دوم ($p < 0.01$) بود که نشان دهنده‌ی بالا بودن معنادار تیتراژ آنتی‌بادی حیوان‌های ایمن شده نسبت به گروه کنترل ($p < 0.05$) می‌باشد. در حالی که در تجویز درون صفاقی

جداسازی سرم آن‌ها، آزمایش الیزا انجام گرفت (با توالی رقت $1/200$ تا $1/25600$). تجزیه واریانس اثرات فرمولاسیون تجویز آنتی‌ژن و تعداد دفعات تجویز با اندازه‌گیری مکررانجام و بررسی آماری تفاوت تیتراژ آنتی‌بادی در مراحل تجویز آنتی‌ژن‌ها مطابق جدول ۱ را نشان داد. براین اساس طرح آماری برای فاکتورهای مورد ارزیابی در این تحقیق، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). در شکل ۵ افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در گروه تست کایمر که آنتی‌ژن را به صورت درون صفاقی دریافت کرده بودند دیده می‌شود. نتایج به دست آمده از تیتراژ آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در حیوان‌های ایمن شده تیتراژ آنتی‌بادی به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل ($p < 0.01$) بود. در شکل ۵ در هر مرحله از تزریق درون صفاقی شاهد افزایش تیتراژ آنتی‌بادی بودیم به نحوی که بیشترین میزان OD مربوط به رقت $1/200$ در تزریق چهارم و به میزان ۳ بود. شکل ۶ نیز بیانگر این است که تجویز زیر پوستی آنتی‌ژن نیز همانند گروه قبلی،



شکل ۵- بررسی تیتراژی آنتی‌بادی نمونه‌های پروتئینی به صورت درون صفاقی با استفاده از تکنیک الیزا. الف) بررسی تیتراژی آنتی‌بادی نمونه CTXB، ب) بررسی تیتراژی آنتی‌بادی نمونه TCPA، ج) بررسی تیتراژی آنتی‌بادی نمونه مخلوط (CTXB+TCPA)، د) بررسی تیتراژی آنتی‌بادی نمونه کایمر (CTXB-TCPA)



شکل ۶- بررسی تیتراژهای بادی نمونه‌های پروتئینی به صورت زیرپوستی با استفاده از تکنیک الیزا

الف) بررسی تیتراژی بادی نمونه CTXB

ب) بررسی تیتراژی بادی نمونه TCPA

ج) بررسی تیتراژی بادی نمونه مخلوط (CTXB+TCPA)

د) بررسی تیتراژی بادی نمونه کایمر (CTXB-TCPA)

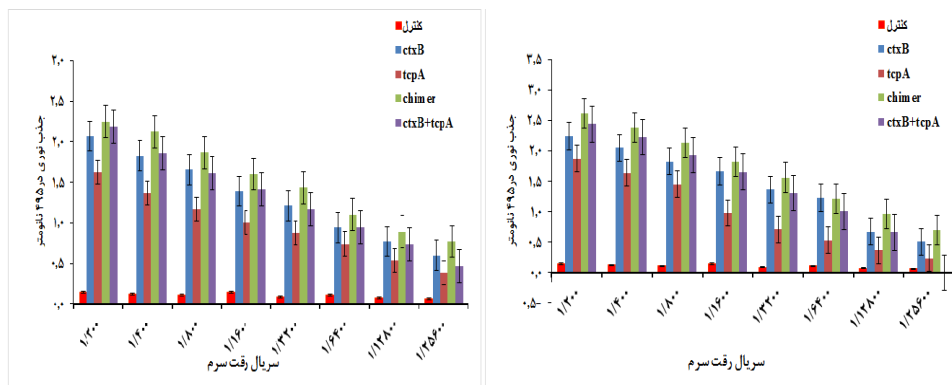
کلراتوکسین را حمل می کند، ضروری می باشد. با توجه به محل قرار گیری پروتئین TCPA در سطح باکتری و موقعیت قرارگیری آن نسبت به آنتی بادی ها باعث شده تا کاندیدای مناسبی به منظور توسعه ایمنی علیه بیماری وبا باشد. از سوی دیگر پروتئین CTXB دارای خاصیت ادجوانتی بوده که باعث ایجاد ایمنی سلولی و افزایش تیتراژ آنتی بادی به صورت سیستمیک می شود. در صورتی که از آنتی ژن های متعدد ویبریو در کنار هم وبه صورت دوگانه یا چندگانه بهره گرفته شود، نوید بخش دستیابی به واکنشی مناسب و کاربردی علیه بیماری مهلک وبا خواهد بود. لذا، در این تحقیق از پروتئین های CTXB و TCPA برای ایجاد ایمنی علیه فاکتورهای اتصال و توکسین باکتری ویبریوکلرا استفاده شد.

در این تحقیق به منظور بیان پروتئین ها از وکتورهای pET28a(+) و pET32a(+) استفاده شد. از pET32a(+) به دلیل اضافه نمودن بخش هایی به پروتئین جهت افزایش حلالیت پروتئین

و تزریقی آنتی ژن مخلوط (CTXB+TCPA) تفاوت معنی دار تیتراژ آنتی بادی تجویز چهارم با سوم ($p < 0.05$) و همچنین تفاوت معنی دار تیتراژ آنتی بادی تجویز سوم با دوم ($p < 0.05$) بود (جدول ۱). در تجویز درون صفاقی نیز همچنین تفاوت معنی داری در تیتراژ آنتی بادی ایجاد شده در تجویز پروتئین کایمر نسبت به پروتئین مخلوط وجود ندارد (شکل ۷). بر این اساس می توان نتیجه گرفت استفاده از پروتئین کایمر می تواند سطح ایمنی را به مانند پروتئین های تحریک نموده و همچنین سبب کاهش مراحل آزمایشگاهی و صرفه جویی هزینه نیز گردد.

بحث و نتیجه گیری

از عوامل مهم بیماری زای ویبریوکلرا می توان به توکسین آن (ctxB) و عامل چسبندگی آن (tcpA) اشاره کرد (۷، ۸، ۱۲). وجود پبلی به دلیل چسبیدن باکتری به مخاط روده، ایجاد عفونت و چسبیدن به ctx فاژی که ژن



شکل ۷- مقایسه میانگین تیترا آنتی‌بادی نمونه‌های پروتئینی CTXB، TCPA، کایمر (CTXB- TCPA) و نمونه مخلوط (CTXB+TCPA) (الف) مقایسه میانگین تیترا آنتی‌بادی نمونه‌های پروتئینی به صورت صفاقی (ب) مقایسه میانگین تیترا آنتی‌بادی نمونه‌های پروتئینی به صورت زیرپوستی

دادند. آنتی ژن مخلوط حاصل از پروتئین‌های CTXB و TCPA تیترا آنتی‌بادی بیشتری نسبت به آنتی ژن‌های تک CTXB و TCPA از خود نشان دادند، در حالی که میزان تحریک پذیری کمتری نسبت به پروتئین کایمر برای میزبان داشته‌اند، لذا، میزان تیترا آنتی‌بادی کمتری از خود نشان دادند که در شکل‌ها قابل مشاهده است. بنابراین نتایج تیترا آنتی‌بادی پروتئین کایمر نزدیک به پروتئین مخلوط بوده اما به دلیل ایجاد تحریک یکسان سیستم ایمنی، کوتاه نمودن مراحل آزمایشگاهی و کاهش هزینه‌ها استفاده از پروتئین کایمر مطلوب‌تر می‌باشد. در همه سطوح تزریقی با میزان رقت یکسان از آنتی ژن تیترا آنتی‌بادی حاصل از تزریق زیر پوستی از صفاقی بیشتر بوده که نشان دهنده‌ی تاثیر بیشتر این نوع تزریق بر سیستم ایمنی میزبان و پاسخ میزبان به آنتی ژن تزریقی بوده است. مقایسه میانگین تیترا آنتی‌بادی آنتی ژن‌های مختلف در سریال رقت‌های مختلف به هر دو صورت درون صفاقی و زیرپوستی حاکی از تفاوت میان نوع و ساختار متفاوت آنتی ژن‌های تزریقی می‌باشد.

اختلاف جزئی در تیترا آنتی‌بادی پروتئین‌ها ممکن است به طول عمر سلول‌های خاطره حاصله در این گروه‌ها و همچنین روش تزریقی آن‌ها ارتباط داشته باشد. با توجه به مزیت‌های پروتئین‌های کایمر، CTXB-TCPA می‌تواند جایگزین مناسبی برای مخلوط پروتئین‌ها جهت تحریک سیستم ایمنی

استفاده شد. از سوی دیگر دلیل استفاده از وکتور pET28a(+)، داشتن پروموتور قوی T7 lac، His6 tag در دو طرف MCS جهت تخلیص بهتر پروتئین کایمر بود. به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر بار تزریق از موش‌های تست و شاهد خون‌گیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها آزمایش الایزا انجام شد. کدو هندی و همکاران به ایمنی‌سازی استنشاقی از طریق زیر واحد B کلراتوکسین وزیر واحد A پیللی متحرک و بیروکلرا در خرگوش پرداختند. نتایج پژوهش آن‌ها حاکی از ایمنی‌زایی بیشتر مخلوط پروتئینی نو ترکیب CTXB و TCPA نسبت به پروتئین‌های تک CTXB و TCPA بوده که با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا بود (۱۷). موش‌هایی که آنتی ژن تک را مانند CTXB، TCPA را دریافت کردند تیترا آنتی‌بادی کمتری نسبت به پروتئین‌های نو ترکیب فیوژن‌شده و ممزوجی از خود نشان دادند. موش‌هایی که آنتی ژن TCPA را به صورت تزریقی داخل صفاقی چه بصورت زیرپوستی چه درون صفاقی دریافت کردند تیترا آنتی‌بادی ضعیف‌تری نسبت به آنتی ژن CTXB را نشان دادند.

موش‌هایی که آنتی ژن کایمری CTXB-TCPA را به صورت تزریقی داخل صفاقی و زیر پوستی دریافت کردند، تیترا آنتی‌بادی بیشتر و قابل ملاحظه‌ای نسبت به آنتی ژن‌های تک نشان

epidemic *Vibrio cholerae*: past and the present. Sci Cult 2010;76:153-9.

12. Pal B, Khuntia H, Samal S, Kar S, Patnaik B. Epidemics of severe cholera caused by El Tor *Vibrio cholerae* O₁ Ogawa possessing the ctxB gene of the classical biotype in Orissa, India. Int J Infect Dis. 2010;14(5):e384-e9.

13. Chaparro AP, Ali SK, Klose KE. The ToxT-dependent methyl-accepting chemoreceptors AcfB and TcpI contribute to *Vibrio cholerae* intestinal colonization. FEMS Microbiol Lett. 2010;302(2):99-105.

14. Sarkar A, Nandy RK, Nair GB, Ghose AC. *Vibrio* pathogenicity island and cholera toxin genetic element-associated virulence genes and their expression in non-O₁ non-O₁₃₉ strains of *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 2002;70(8):4735-42.

15. Baldauf KJ, Royal JM, Hamorsky KT, Matoba N. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. Toxins 2015 Mar 20;7(3):974-96.

16. Arêas AP, Oliveira ML, Miyaji EN, Leite LC, Aires KA, Dias WO, et al. Expression and characterization of cholera toxin B-pneumococcal surface adhesin A fusion protein in *Escherichia coli*: ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice. Biochem Biophys Res Commun 2004;321(1):192-6.

17. Kundu J, Mazumder R, Srivastava R, Srivastava BS. Intranasal immunization with recombinant toxin-coregulated pilus and cholera toxin B subunit protects rabbits against *Vibrio cholerae* O₁ challenge. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009 Jun 8;56(2):179-84.

باشد.

تقدیر و تشکر

کد طرح اجرایی پژوهش ارزیابی و مقایسه تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین های نو ترکیب منفرد، مخلوط و کایمر CTXB، TCPA و TCPA، بدین وسیله از مدیریت محترم مرکز علم و فناوری زیستی دانشگاه جامع امام حسین (ع) جهت همکاری در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر می شود.

منابع

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

2. Mousavi SL, Nazarian S, Amani J, Rahgerdi AK. Rapid screening of toxigenic *Vibrio cholerae* O₁ strains from south Iran by PCR-ELISA. Iran Biomed J 2008;12(1):15-21.

3. Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Traveling with infants and young children. Part III: travelers' diarrhea. 2002 May 1;9(3):141-50.

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

5. Zhang W, Sack DA. Current progress in developing subunit vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhea. Clin Vaccine Immunol. 2015 Sep 1;22(9):983-91.

6. Pal BB, Khuntia HK, Samal SK, Kar SK, Patnaik B. Epidemics of severe cholera caused by El Tor *Vibrio cholerae* O₁ Ogawa possessing the ctxB gene of the classical biotype in Orissa, India. Int J Infect Dis. 2010 May 31;14(5):e384-9.

7. Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. Toxins 2010 Jun 25;2(7):1612-45.

8. Pina, D.G. and L. Johannes, Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. Toxicon 2005;45(4):389-93.

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

10. Chatterjee S, Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*: I. Physical and chemical characterization. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2003;1639(2):65-79.

11. Ramamurthy T, Nair GB. Evolving identity of

Evaluation and comparison of antibody titers against single recombinant proteins, mixtures and chimer CTXB, TCPA and CTXB-TCPA

Milad Amerian, MA student in Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran.

***Shahram Nazarian**, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran (*Corresponding Author). kpnazari@ihu.ac.ir

Abstract

Background: Cholera as diarrheal illness is one of the most important causes of death and people's disability in different societies. Colonization factor pili (*tcpA*) and cholera toxin are the most important factors in the pathogenesis of *Vibrio Cholera*. B subunit of cholera toxin (*ctxB*) and *tcpA* have the ability to induce immune responses. The aims of this study was production of CTXB, TCPA, CTXB-TCPA recombinant protein and evaluation of antibody titers against separately, cocktail and chimeric protein in mice.

Methods: In this research study, *ctxB*, *tcpA* and *ctxB-tcpA* genes were cloned in pET28a and pET32a vectors. Recombinant plasmids was transformed to *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21 DE3 and expression was induced with IPTG. The protein expression were evaluated by SDS-PAGE and Western Blotting analysis. The recombinant proteins were purified using Ni-NTA affinity chromatography. Mice immunization were done subcutaneously or intraperitoneally. Antibody titer was determined by ELISA in immunized mice sera.

Results: SDS PAGE and western blotting confirmed expression and purification of recombinant proteins. The yield of purified CTXB, TCPA, CTXB-TCPA proteins was 15/570, 11/533 and 33/100 mg/L, respectively. ELISA results showed satisfactory immunization of mice.

There was no significant difference in antibody titers against CTXB-TCPA protein and CTXB, TCPA cocktail. Also, no significant difference was observed in titers between subcutaneously or intraperitoneal injection.

Conclusion: The low differences in the antibody titer may be related to the longevity of memory cells and also their injection method. Due to the advantages of chimeric proteins, CTXB-TCPA protein could be a good alternative instead of protein cocktail to stimulate the immune system.

Keywords: *Vibrio cholera*, *ctxB*, *tcpA*, Chimeric recombinant, Antibody titer