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

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

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۵

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 پیلی tcpA و توکسین کلرا مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی ویبریوکلرا می‌باشند. زیر واحد B سم کلرا (ctxB) و tcpA توانایی القای پاسخ های ایمنی را دارند. هدف از این مطالعه، تولید پروتئین های نوترکیب CTXB، TCPA و CTXB-TCPA و مطالعه ایمنی زایی و مقایسه تیتر آنتی بادی کایمر، مخلوط و جداگانه پروتئین های نوترکیب در موش بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ژن های tcpA،ctxB و کایمر ctxB-tcpA در وکتورهای بیانی (+) pET28a و (+) pET32a همسانه سازی و پلاسیمدهای نوترکیب به E. coli BL21 DE3 منتقل شدند. بیان پروتئین های 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. ایمن سازی موش‌ها به روش درون صفاقی و زیر پوستی انجام شد. تیتر آنتی‌بادی در سرم موش های ایمن شده با روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: آنالیز SDS PAGE و وسترن بلاتینگ، بیان و تخلیص پروتئین های نوترکیب را تائید کرد. میزان پروتئین های خالص شده CTXB، TCPA و CTXB-TCPA به ترتیب ۱۵/۵۷۰، ۱۱/۵۳۳ و ۳۳/۱۰۰ میلی گرم در لیتر بود. نتایج الایزا نشان داد که ایمنی‌زایی موش ها به خوبی صورت پذیرفته است. تفاوت معنی داری در تیتر آنتی بادی علیه آنتی ژن های CTXB-TCPA و مخلوط TCPA با CTXB وجود نداشت. همچنین تفاوت معنی‌داری در تیتر آنتی‌بادی حاصل از تزریق درون صفاقی و زیرپوستی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: اختلاف جزئی در تیتر آنتی‌بادی پروتئین‌ها ممکن است به طول عمر سلول‌های خاطره حاصله در این گروه‌ها و همچنین روش تزریقی آن‌ها ارتباط داشته باشد. با توجه به مزیت های پروتئین های کایمر، CTXB-TCPA می تواند جایگزین مناسبی برای مخلوط پروتئین ها جهت تحریک سیستم ایمنی باشد.

کلیدواژه‌ها: ویبریو کلرا، ctxB، tcpA، پروتئین کایمر، تیترآنتی بادی

مقدمه

بر اساس آمارهای جهانی، پس از بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان، عفونت‌های اسهالی یکی از بزرگ‌ترین علل مرگ‌ومیر انسان‌ها به شمار می رود. شایع‌ترین خطری که فرد مبتلا به بیماری اسهال را تهدید می‌کند دهیدراتاسیون و در کشورهای درحال‌توسعه ، سوءتغذیه است (۱ و ۲). بیماری اسهال یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در سطح جهان و ایران می‌باشد که اکثر تحقیقات درزمینه 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 میکروارگانیسم 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 روده‌ی کوچک ثاثیر می‌گذارد و از نظر ساختمانی و عملکرد، ارتباط بسیار نزدیکی با توکسین حساس به حرارت اشریشیاکلی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

(*Escherichia coli- E.coli*) دارد. انتروتوکسین ویبریوکلرا حساس به حرارت با وزن مولکولی ۸۴ کیلو دالتون که از زیر واحد A (CTA) و زیر واحد B (CTB) تشکیل‌شده 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 گانگلوزید به نام GM1 است که روی شمار زیادی از سلول‌های هسته‌دار بدن ازجمله سلول‌های اپی تلیالی مخاطی، سلول‌های لنفوئیدی و سلول‌های پردازش کننده 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 سلول های 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 حدود۳۸/۶ کیلو دالتون یکی از اجزاء مهم ویبریوکلرا 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). پروتئین های نوترکیب خواص ساختاری پروتئین‌های طبیعی را داشته و تولید آن ها در مقایسه با پروتئین‌های طبیعی مقرون به صرفه وخالص سازی آن‌ها آسان تر می‌باشد. پروتئین‌های نوترکیب به دلیل بهینه سازی کدونی، دارای کدون هایی هستندکه tRNA بیشتری برای آن وجود داشته، بنابراین سیستم ایمنی بهتر تحریک شده و پاسخ ایمنی قوی تری ایجاد می کنند. در حالی که استفاده از ترکیب پروتئین ها در مقایسه با مصرف جدا گانه پروتئین آن‌ها و یا پروتئین های تک ظرفیتی احتمال برداشت همزمان آن‌ها توسط سلول‌های میزبان را افزایش داده و به میزان برابر و در شرایط یکسان سیستم ایمنی را تحریک می نمایند. در طراحی پروتئین های کایمر، استفاده از پروتئین هایی با ویژگی ادجوانی از جمله زیر واحد اتصالی سم کلرا می تواند سبب بهبود پاسخ های سیستم ایمنی در مواجهه با ایمونوژن های نوترکیب شود (۱۶). هدف از این تحقیق بررسی میزان ایمنی زایی پروتئین های نوترکیب در حالت کایمر و مخلوط و مقایسه آن ها با پروتئین های نوترکیب منفرد می باشد (۷ و ۱۷).

روش کار

۱- مواد آزمایشگاهی، پلاسمید و سوش های باکتری: در این مطالعه تجربی از باکتری E. coli سویه DH5α جهت همسانه سازی ژن های ctxB، tcpA و سویه BL21(DE3) جهت بیان پروتئین استفاده شد. از محیط های کشت لوریا برتونی (LB) مایع و آگار جهت رشد باکتری E.coli استفاده گردید. جهت انتخابی نمودن رشد باکتری از آنتی بیوتیک کانامایسین شرکت فرمنتاز استفاده شد. به منظور تایید همسانه سازی ژن در وکتور بیانی، از آنزیم های محدود الاثرHindIII و XhoI ساخت شرکت Fermentas (اوکراین) استفاده گردید. غشای نیترو سلولز از شرکت Roche و پلیت الایزا از شرکتNunck مورد استفاده قرار گرفت. کیت های 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- همسانه سازی ژن‌ها: جهت بهره برداری از سازه ژنی pET28a(+)-ctxB-linker- tcpA، ابتدا ژن ctxB سنتزی که دارای پرایمرهایی با جایگاه برشی آنزیم EcoRI برای پرایمر پیشرو وآنزیم HindIII برای پیرایمر پیرو بودند، توسط PCR تکثیر پیداکردند.

ctxB/F:TGCAGAATTCACACCTCAAA ATATTACTG (EcoRI)

ctxB/R:TATCAAGCTTATTTGCCATA CTAATTGC (HindIII)

در گام بعدی ژن سنتزی tcpA که دارای پرایمرهایی با جایگاه برشی آنزیم HindIII برای پرایمر پیشرو وآنزیم XhoI برای پیرایمر پیرو بودند نیز توسط PCR تکثیر پیداکردند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

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

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

جهت همسانه سازی کاست ژنی کامل pET28a(+)-ctxB-tcpA از لینکرغیرفورینی سخت EAAAK شامل اسید آمینه های گلوتامیک اسید، آلانین ولیزین استفاده شد.لینکر به دلیل جداسازی و ایجاد فاصله بین دو ژن که در نهایت منجر به در معرض قرارگرفتن 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 وHindIII 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(+) وکایمر ژنی ctxB-tcpA در وکتور pET28a(+) محصول PCR هرکدام با روش شوک حرارتی به سلول مستعد DH5α سویه E. coli تراریخت شدند. سلول ها ی ژن ctxB وکایمر 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 ۱۰۰میکروگرم بر میلی لیتر) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به صورت چمنی کشت داده شدند. تعدادی کلنی از هرکدام 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 ازآنزیم های محدود الاثر بر روی پلاسمید های استخراج شده، هضم آنزیمی صورت، وجود ژ ن های tcpA، ctxB و chimer 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 نوترکیب با غربال گری آنتی بیوتیکی جدا وحضور پلاسمید حاوی ژن های tcpA، ctxB و chimer با PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفتند.

۳- بیان و تعیین جایگاه پروتئین های نوترکیب 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 پروموتر (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول‌ها ی حاصل از ژن ctxB وکایمر 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 نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با نسبت یک (بافر نمونه) به پنج (نمونه) با سمپل بافر دارای غلظت 5x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. در نهایت نمونه‌های تیمار شده توسط ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲٪ از لحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب بررسی شدند.

۴- تخلیص پروتئین های نوترکیب و تائید آن به روش وسترن بلاتینگ: با توجه به وجود پروتئین

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

نوترکیب بیانی TCPAدر 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 شیبpH ۸، ۶/۵، ۵/۲، ۴/۵ جهت تخلیص استفاده شدند. با در نظر گرفتن اینکه پروتئین های نوترکیب بیان شده، دارای توالی شش هیستیدین در فرادست می باشند، لذا، فرآیند تخلیص پروتئین ها به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA صورت گرفت. خروجی های ستون به وسیله ژل SDS-PAGE 12% مورد ارزیابی قرار گرفتند. غلظت هر یک از پروتئین های نوترکیب با روش برادفورد اندازه گیری گردیدند. جهت تایید پروتئین های نوترکیب از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad و بافر انتقال (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار،SDS ۰/۱٪ و متانول ۲۰٪ و pH=۸/۳) روی کاغذ نیتروسلولز 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 نگه داری شد. سپس سه مرتبه با PBST شستشو داده شد. نوار نیتروسولوزی واجد پروتئین TcpA به طور جداگانه با آنتی بادی ضد هیستیدین (کیاژن) با رقت ۱:۵۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. کاغذ نیتروسلولز واجد پروتئین CTB و پروتئین کایمر با آنتی‌بادی-های پلی کلونال ضد کلرا توکسین (سیگما) با رقت ۱:۲۰۰۰ مجاور گردید. پس از شستشو از آنتی بادی (داکو) با رقت ۱:۵۰۰۰ به عنوان آنتی بادی ثانویه برای کاغذ واجد پروتئین های 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. فرایند شستشو نیز همانند مراحل قبلی انجام شد. نهایتاً، کاغذ نیتروسلولز در محلول سوبسترای DAB ۶ (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 موش های سوری توسط آنتی ژن‌های نوترکیب: به منظور بررسی پاسخ ایمنی، از موش سوری که هیچ دارو یا واکسنی 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 از۲۴ 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 نمونه ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوانت کامل فروند (موسسه سرم سازی رازی) در تزریق اول و ادجوانت ناقص فروند درتزریق های بعدی اضافه گردید آنتی ژن ها 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 موش ها خون گیری و سرم ها جدا شده و برای مراحل بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۶- بررسی تیترآنتی بادی توتال IgG: در این مرحله به منظور بررسی تیتر آنتی بادی از روش الیزا استفاده گردید. ابتدا مقدار ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ داخل هر یک از چاهک های الایزا ریخته و در دو چاهک جهت کنترل در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد قرار گرفت. سپس سرم مورد نظر از رقت ۱:۲۰۰ تا ۱:۲۵۶۰۰ در PBST رقیق و در چاهک ها قرار گرفت و میکروپلیت به مدت نیم

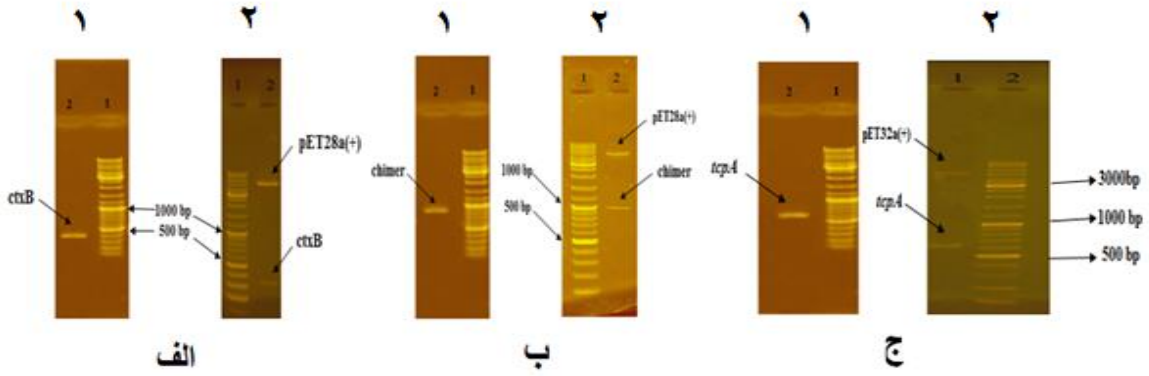
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در مرحله بعد، رقت ۱:۲۰۰۰ از آنتی بادی گونژوگه موشی(داکو) در PBST تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا (۲ میلی گرم OPD در ۵ میلی لیتر 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 داده ها از آزمون کلموکراف-ایرنوزوف و برای مقایسه تعداد دفعات تجویز فرمولاسیون در مراحل مختلف اندازه گیری از تحلیل واریانس مکرر با استفاده از انوای یک طرفه انجام شد. در صورت مشاهده تفاوت معنی دار، آزمونt زوجی بون فرونی برای تعیین منشا تفاوت مورد نظر قرار گرفت. آنالیز واریانس داده ها و مقایسه میانگین (در سطح تجویز دوم، سوم و چهارم) با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 22 انجام شد.

یافته‌ها

بررسی الحاق و صحت همسانه سازی در باکتری E.coli BL21(DE3): جهت تائید همسانه سازی ژن ها 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، (شکل۱-ج) پلاسمید نوترکیب با پرایمرهای اختصاصی tcpA با قطعه ۵۶۳ جفت بازی و (شکل۱-ب) کایمر نوترکیب با پرایمرهای مشترک دو ژن ctxB وtcpA با اندازه ۸۹۲ جفت بازی دیده می شود. در روش دوم جهت بررسی صحت پلاسمید حاوی ژن ctxB با روش هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیم های محدود الاثر HindIII و EcoRI در وکتور pET28a(+) (شکل۱-الف)، ژن tcpA با آنزیم های محدودالاثر HindIII و XhoI در وکتور pET32a(+) (شکل۱-۲) و در نهایت کایمر ژنی tcpA- ctxB هم با آنزیم های HindIII وXhoI



شکل ۱- تایید همسانه سازی وکتور های نوترکیب pET28a(+)-ctxB- tcpA, pET32a(+)-tcpA, pET28a(+)-ctxB با روش PCR داخلی (۱) و روش هضم آنزیمی (۲)

الف: تایید همسانه سازی وکتور نوترکیب pET28a(+)-ctxB – (۱) ردیف۱: الکتروفروز محصول PCR پلاسمید نوترکیب با جفت پرایمرهای اختصاصی *ctxB* / (۲) ردیف۱: نشانگر اندازه DNA ladder mix، ردیف۲: پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-*ctxB* برش خورده با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII*

ب: تایید همسانه سازی وکتور نوترکیب pET28a(+)-ctxB- tcpA-(۱) ردیف ۱: الکتروفورز محصول PCR پلاسمیدنوترکیب با جفت پرایمرهای اختصاصی ترکیبی *ctxB* و*tcpA*، ردیف۲: نشانگر اندازه DNA ladder mix / (۲) ردیف ۱: نشانگر اندازه DNA ladder mix، ردیف ب: پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-*ctxB-tcpA* برش خورده با آنزیم‌های *XoI* و *HindIII*

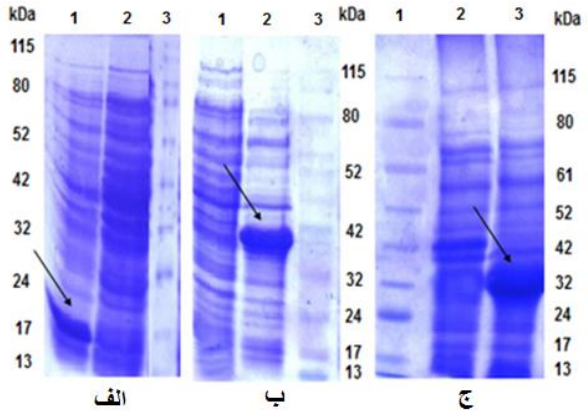
ج: تایید همسانه سازی وکتور نوترکیب pET32a(+)-tcpA-(۱) ردیف۱: الکتروفروز محصول PCR پلاسمید نوترکیب با جفت پرایمرهای اختصاصی *tcpA*، ردیف ۲: نشانگر اندازه DNA ladder mix/ (۲) ردیف۱: پلاسمید نوترکیب pET32a(+)-*tcpA* برش خورده با آنزیم‌های *XoI* و *HindIII* ردیف ۲: نشانگر اندازه DNA ladder mix

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

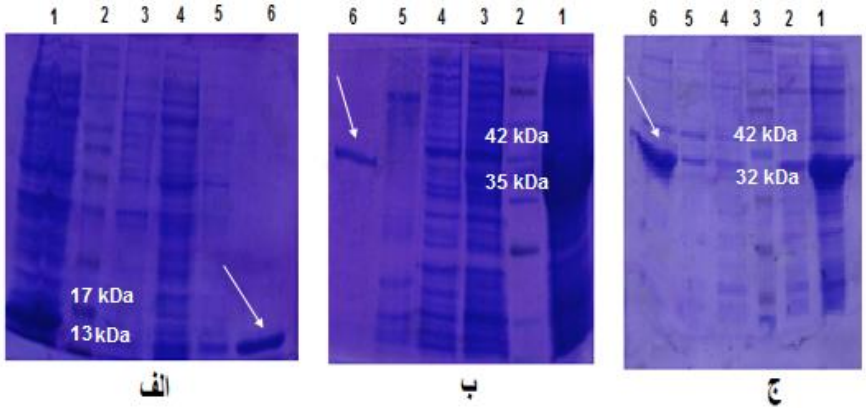
انجام وصحت سازه ژنی تایید شد (اشکال ۱و۲).

بررسی بیان پروتئین‌های نوترکیب: برای بررسی بیان ژن های ctxB و کایمر ژنیctxB- tcpA در وکتور pET28a(+)و 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 نوترکیب از ژل ۱۲ ٪ استفاده شد (شکل ۲).

بررسی خلوص پروتئین های نوترکیب و آنالیز وسترن بلاتینگ: برای بررسی میزان خلوص پروتئین های نوترکیب از ستونNi-NTA استفاده شد که در آن با استفاده از پروتئین‌های استفاده شده درSDS-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 (شکل۳- ج) و پروتئین TCPA در بافر ایمیدازول ۲۵۰ بدون اوره (شکل۳- 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



شکل ۲- بیان ژن های ctxB وtcpA وکایمر 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 پروتئینیVivantis product Number:PR0602
ج: ۱) نشانگر پروتئینی Vivantis product Number:PR0602۲)نمونه شاهد بدون القای IPTG ۳)نمونه تست TCPA با القای IPTG

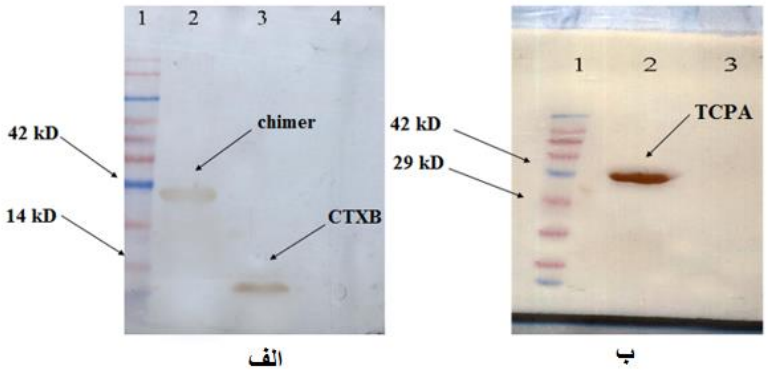


شکل ۳- ژل SDS-PAGE از پروتئین های نوترکیب تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی
الف) پروتئین CTXB (روش اوره) – ستون ۱: flow قبل از ستون- ستون ۲: نشانگرپروتئینی شماره Vivantis product Number:PR0602 ستون ۳:flow ستون، ستون ۴: بافر C، ستون ۵: بافرD، ستون ۶: بافر ایمیدازول۲۵۰ (اندازه پروتئین ۱۶/۶ کیلو دالتون)
ب) پرو تئین 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 کایمرCTXB-TCPA (روش اوره) ستون ۱:flow قبل از ستون، ستون ۲:flow ستون، ستون ۳: مارکر پروتئینی، ستون ۴: بافر C، ستون ۵: بافرD، ستون ۶: بافر ایمیدازول ۲۵۰ (اندازه پروتئین۳۵ کیلودالتون)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

۳۳/۱۰۰ میلی گرم در لیتر بود. به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیکWestern Blotting استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی علیه کلرا توکسین (شکل ۴- الف)، Anti-Histag (شکل۴- ب) استفاده شد.

تولید آنتی بادی علیه پروتئین های نوترکیب در موش: اشکال ۵ و ۶ واکنش الایزا مربوط به پروتئین های CTXB،TCPA وکایمر-CTXB TCPA 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



شکل۴- تایید پروتئین های نوترکیب بیان شده با استفاده ازروش وسترن بلات

الف) تایید پروتئین های نوترکیب با استفاده از Anti-CTX ستون ۱: نشانگر پروتئینی ستون۲: نمونه کایمر CTXB-TCPA القاء شده با IPTG، ستون ۳: نمونه پروتئین CTXB القاء شده با IPTG ستون ۴: نمونه BSA

ب) تایید پروتئین نوترکیب با استفاده از Anti.His-tag ستون۱: نشانگر پروتئینی ستون ۲: نمونه پروتئین TCPA القاء شده با IPTG

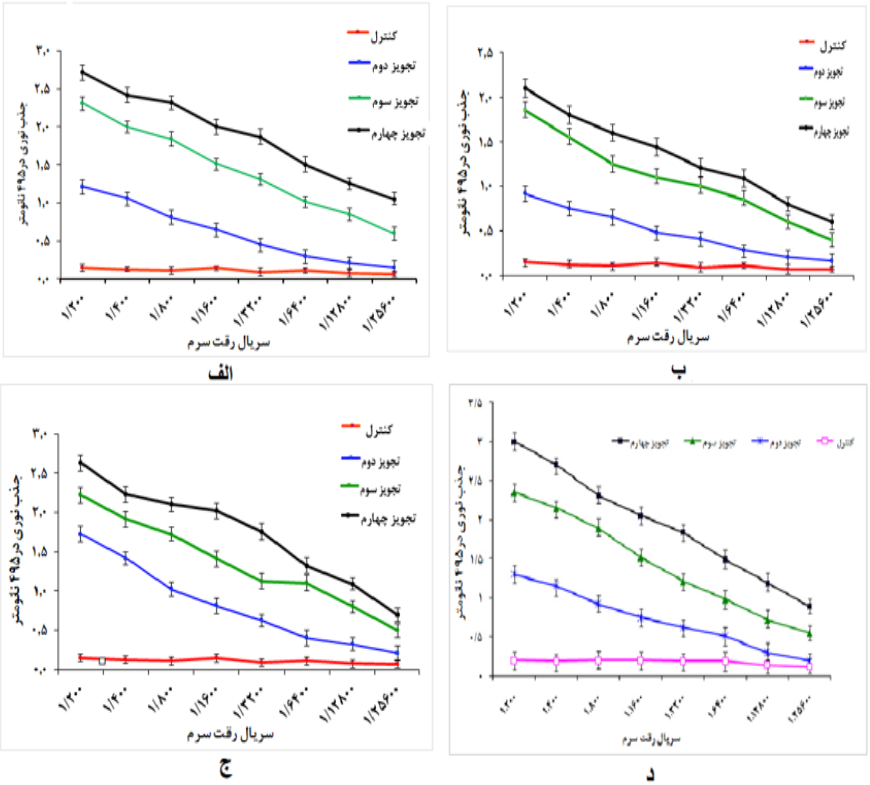
جدول ۱- بررسی آماری تفاوت تیتر آنتی بادی در مراحل تجویز آنتی ژن ها

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)
		سوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم با دوم (P<05)
		چهارم	
CTXB+ TCPA	زیر پوستی	دوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز چهارم با سوم (P<05)
		سوم	تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم با دوم (P<05)
		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	

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

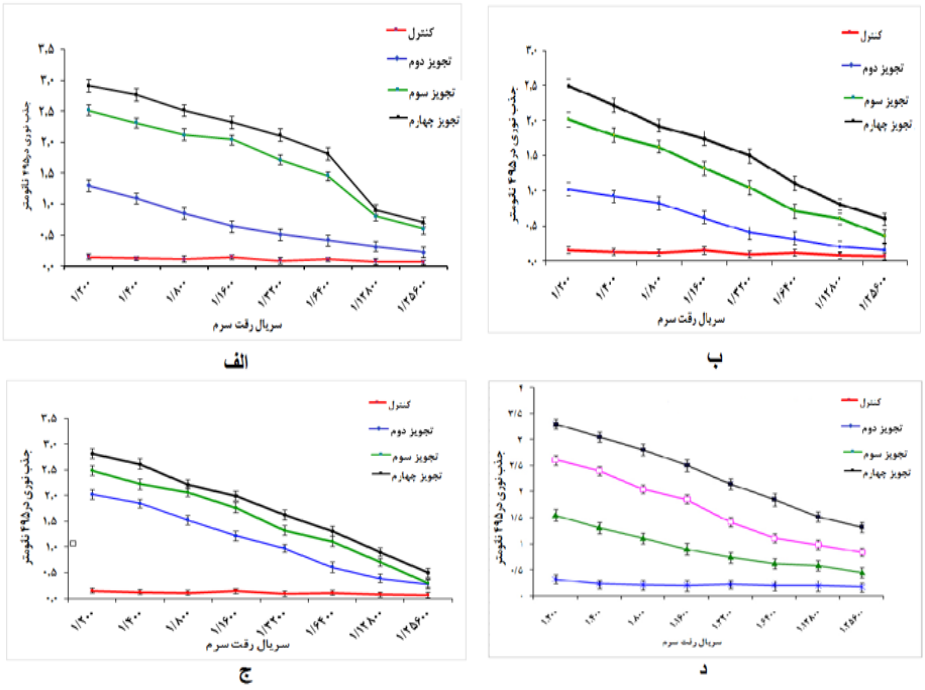
جداسازی سرم آن ها، آزمایش الایزا انجام گرفت (با توالی رقت ۱/۲۰۰تا۱/۲۵۶۰۰). تجزیه واریانس اثرات فرمولاسیون تجویز آنتی‌ژن و تعداد دفعات تجویز با اندازه گیری مکررانجام و بررسی آماری تفاوت تیتر آنتی بادی در مراحل تجویز آنتی ژن‌ها مطابق جدول ۱ را نشان داد. براین اساس طرح آماری برای فاکتورهای مورد ارزیابی در این تحقیق، از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). در شکل ۵ افزایش تیتر آنتی‌بادی در گروه تست کایمر که آنتی‌ژن را به صورت درون صفاقی دریافت کرده بودند دیده می شود. نتایج به دست آمده از تیتر آنتی بادی نشان می دهدکه در حیوان های ایمن شده تیتر آنتی بادی به صورت معنی داری بالاتر از گروه کنترل (p<۰/۰۱) بود. در شکل ۵ در هر مرحله از تزریق درون صفاقی شاهد افزایش تیتر آنتی‌بادی بودیم به نحوی که بیشترین میزان OD مربوط به رقت ۱/۲۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۳ بود. شکل ۶ نیز بیانگر این است که تجویز زیر پوستی آنتی‌ژن نیز همانند گروه قبلی، منجر به افزایش تیتر آنتی‌بادی در هر مرحله شده است. نتایج به دست آمده تیتر آنتی بادی نشان می دهد که در موش های های ایمن شده با آنتی‌ژن کایمر به صورت زیر پوستی، تیتر آنتی بادی به صورت معنی داری بالاتر از گروه کنترل (p<۰/۰۱) بود.

بیشترین میزان OD مربوط به رقت ۱/۲۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۳/۳ بود. تیتر آنتی بادی مربوط به تجویز آنتی ژن به صورت زیر پوستی (شکل۶) نسبت به تیتر آنتی بادی آنتی ژن تجویز شده به درون صفاق (شکل۳) بالاتر بوده که این میزان از لحاظ آماری تفاوت معنی داری را نشان نداد. بنابراین در تجویز درون صفاقی و تزریقی آنتی ژن های CTXB، TCPA و کایمر CTXB-TCPA تفاوت معنادار بین تیتر آنتی بادی تجویز شده سوم و چهارم با دوم (p<۰/۰۱) بود که نشان دهنده ی بالا بودن معنادار تیتر آنتی بادی حیوان های ایمن شده نسبت به گروه کنترل (p<۰/۰۵) می باشد. درحالی که در تجویز درون صفاقی



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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]



شکل۶- بررسی تیترآنتی بادی نمونه‌های پروتئینی به صورت زیرپوستی با استفاده از تکنیک الیزا

الف) بررسی تیترآنتی بادی نمونه CTXB

ب) بررسی تیترآنتی بادی نمونه TCPA

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

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

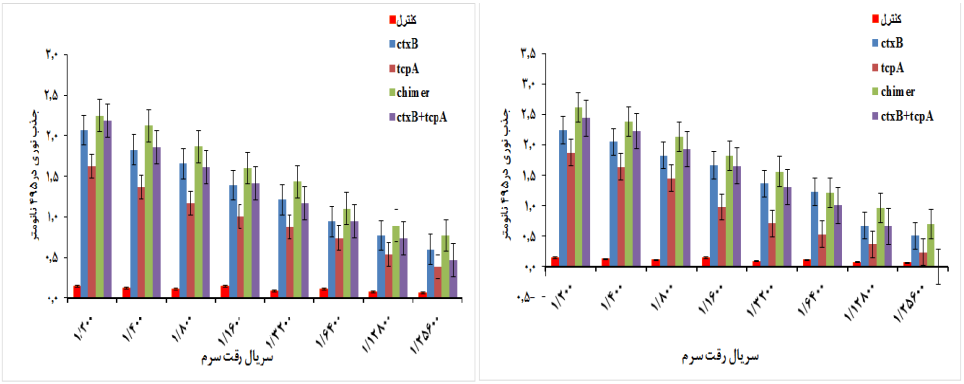
وتزریقی آنتی ژن مخلوط (CTXB+TCPA) تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز چهارم با سوم ($p<۰/۰۵$) و همچنین تفاوت معنی دار تیتر آنتی بادی تجویز سوم با دوم ($p<۰/۰۵$) بود (جدول ۱). در تجویز درون صفاقی نیز همچنین تفاوت معنی داری در تیتر آنتی بادی ایجاد شده در تجویز پروتئین کایمر نسبت به پروتئین مخلوط وجود ندارد (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 نتیجه‌گیری

از عوامل مهم بیماری زای ویبریوکلرا می توان به توکسین آن (ctxB) و عامل چسبندگی آن (tcpA) اشاره کرد (۷، ۸ ، ۱۲). وجود پیلی به دلیل چسبیدن باکتری به مخاط روده، ایجاد عفونت و چسبیدن به ctx فاژی که ژن کلراتوکسین را حمل می کند، ضروری می باشد. با توجه به محل قرار گیری پروتئین TCPA در سطح باکتری وموقعیت 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 تیتر 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 واکسنی مناسب وکاربردی 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]



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

استفاده شد. از سوی دیگر دلیل استفاده از وکتور pET28a(+)، داشتن پروموترقوی lac T7، His6 tag در دوطرف MCS جهت تخلیص بهتر پروتئین کایمر بود. به منظور ارزیابی آنتی بادی 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 موش های تست و شاهد خون گیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها آزمایش الایزا انجام شد. کندو هندی و همکاران به ایمنی سازی استنشاقی از طریق زیر واحد B کلراتوکسین وزیر واحد A پیلی متحرک ویبریوکلرا در خرگوش پرداختند. نتایج پژوهش آن ها حاکی از ایمنی زایی بیشتر مخلوط پروتئینی نوترکیب CTXB و TCPA نسبت به پروتئین های تک CTXB و TCPA بوده که با نتایج مطالعه حاضر هم راستا بود (۱۷). موش‌هایی که آنتی ژن تک را مانند CTXB، TCPA را دریافت کردند تیتر آنتی بادی کمتری نسبت به پروتئین های نوترکیب فیوژشده و ممزوجی از خود نشان دادند. موش‌هایی که آنتی‌ژن TCPA را به صورت تزریقی داخل صفاقی چه بصورت زیرپوستی چه درون صفاقی دریافت کردندتیترآنتی‌بادی ضعیف تری نسبت به آنتی ژن CTXB را نشان دادند.

موش‌هایی که آنتی ژن کایمری TCPA-CTXB را به صورت تزریقی داخل صفاقی و زیر پوستی دریافت کردند، تیتر آنتی بادی بیشتر و قابل ملاحظه ای نسبت به آنتی ژن های تک نشان دادند. آنتی ژن مخلوط حاصل از پروتئین های CTXB و TCPA تیتر آنتی بادی بیشتری نسبت به آنتی ژن های تک CTXB و TCPA از خود نشان دادند ،در حالی که میزان تحریک پذیری کمتری نسبت به پروتئین کایمر برای میزبان داشته اند، لذا، میزان تیترآنتی بادی کمتری از خود نشان دادند که در شکل ها قابل مشاهده است. بنابراین نتایج تیتر آنتی بادی پروتئین کایمر نزدیک به پروتئین مخلوط بوده اما به دلیل ایجاد تحریک یکسان سیستم ایمنی، کوتاه نمودن مراحل آزمایشگاهی وکاهش هزینه ها استفاده از پروتئین کایمر مطلوب تر می باشد. در همه سطوح تزریقی با میزان رقت یکسان از آنتی ژن تیتر آنتی بادی حاصل از تزریق زیر پوستی از صفاقی بیشتر بوده که نشان دهنده ی تاثیر بیشتر این نوع تزریق بر سیستم ایمنی میزبان و پاسخ میزبان به آنتی ژن تزریقی بوده است. مقایسه میانگین تیتر آنتی بادی آنتی ژن های مختلف در سریال رقت های مختلف به هردو صورت درون صفاقی و زیرپوستی حاکی از تفاوت میان نوع و ساختار متفاوت آنتی ژن های تزریقی می‌باشد.

اختلاف جزئی در تیتر آنتی‌بادی پروتئین‌ها ممکن است به طول عمر سلول‌های خاطره حاصله در این گروه‌ها و همچنین روش تزریقی آن‌ها ارتباط داشته باشد. با توجه به مزیت های پروتئین های کایمر، CTXB-TCPA می تواند جایگزین مناسبی برای مخلوط پروتئین ها جهت تحریک سیستم ایمنی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

باشد.

تقدیر و تشکر

کد طرح اجرایی پژوهش ارزیابی و مقایسه تیتر آنتی بادی علیه پروتئین های نوترکیب منفرد، مخلوط و کایمر CTXB، TCPA و TCPA CTXB-۱۱۶۸ می باشد. بدین وسیله از مدیریت محترم مرکز علم و فناوری زیستی دانشگاه جامع امام حسین (ع) جهت همکاری در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

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 Purication 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* O_1 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 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* O_1 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-O_1 non-O_{139} 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 O_1 challenge.FEMS Immunol Med Microbiol.2009 Jun 8;56(2):179-84.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-26]