Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۹، پیاپی ۴۱: ۱۴۸-۱۳۷

مقاله پژوهشی

بهینه سازی و بررسی میزان تولید توکسین وبا توسط باکتری ویبریو کلرا در دوره های زمانی مختلف

علی خواستار[۱]، مجید جمشیدیان مجاور*[۲]، به آفرید قلندری[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی تهران، ایران

۲- استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۳- استادیار، گروه نانوتکنولوژی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۵

چکیده

سم باکتری ویبریو کلرا یکی از مورد مطالعه ترین سموم باکتریایی خانواده AB5 است که به دلیل توانایی آن در افزایش پاسخ ایمنی نسبت به انتی ژن تزریق شده با آن به طور گسترده به عنوان یک ادجوانت موکوزال قوی مورد استفاده قرار می گیرد. این توکسین از دو زیر واحد، یک زیرواحد پنتامریک به نام زیر واحد B و یک زیرواحد A تشکیل شده است. این توکسین از طریق اتصال به گیرنده گانگلوزیدی GM1 به سلول هدف وارد می گردد. در این پژوهش باکتری ویبریو کلرا درون ۱۰۰ سی سی محیط AKI و Craig's به صورت دو گروه دوتایی کشت داده شد. سپس یک گروه درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و گروه دیگر درون انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. از تمامی محیط به صورت منظم از لحظه آغاز دوره انکوباسیون به منظور بررسی میزان تولید توکسین نمونه برداری شد. در نهایت میزان تولید توکسین به وسیله آزمون الایزا GM1 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری در هر دو محیط توانایی تولید توکسین به میزان نسبتا بالا را دارد. بیشترین میزان تولید توکسین در محیط کشت Craig's در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بعد از ۵۰ ساعت مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از تست الایزا GM1 نشان داد که باکتری پس از ۵۰ ساعت بیشترین تولید را در محیط Craig's و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد دارد این در حالی است که بیشترین میزان تولید توکسین در محیط AKI پس از ۲۴ ساعت و در دما ۳۷ درجه سانتی گراد بدست می آید.

کلمات کلیدی: ویبریو کلرا، توکسین، الایزا GM1

*نویسنده مسئول: مجید جمشیدیان مجاور

آدرس: مشهد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۱۷۸۰

پست الکترونیک: jamshidian@rvsri.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویبریو کلرا یک عضو از خانواده ویبریوناسیه، بی هوازی اختیاری، گرم منفی، باسیلی خمیده و غیر تشکیل دهنده اسپور،با طول تقریبی ۱/۴ تا ۲/۶ میکرومتر است (۹). این باکتریوم اکسیداز مثبت است و نیترات را کاهش می دهد،همچنین به وسیله یک تاژک قطبی غلاف دار دارای حرکت است. رشد *ویبریو کلرا* با افزودن ۱ درصد سدیم کلراید به محیط تحریک می شود اما با این وجود یک تفاوت عمده این باکتریوم با سایر گونه های ویبریو توانایی رشد آن در محیط های مایع مغذی (Nutrient Broth) فاقد سدیم کلراید است (۱۳). تفاوت های موجود در ترکیب قند آنتی ژن سطحی مقاوم به حرارت سوماتیکی O عامل تمایز و طبقه بندی سرولوژیکی *ویبریو کلرا* است (۶). در حال حاضر این ارگانیسم به ۲۰۶ سروگروه "O" طبقه‌بندی می‌شود (۲۵،۲۰).

سم وبا، یک توکسین محلول است که توسط باکتری گرم منفی *Vibrio cholerae* ترشح می‌شود. این سم متشکل از دو پروتئین، زیر واحد A (CTA) که به صورت یک مونومر در کمپلکس وجود دارد و وزن مولکولی آن برابر با ۲۸ کیلو دالتون است. زیرواحد B (CTB) که یک پنتامر با وزن مولکولی ۱۱/۶ کیلودالتون را تشکیل می‌دهد، است (۲۲). ماهیت دو گانه توکسین ویبریو کلرا در ابتدا توسط لونروس و هولمگرن در ۱۹۷۳ تشخیص داده شد (۱۲)، و مطالعات ساختاری درباره ارتباط نزدیک انتروتوکسین حساس به حرارت (heat-labile enterotoxin) باکتری اشرشیا کلی و متعاقبا توکسین ویبریوکلرا و CTB یافته‌های آن ها را تائید کرد (۱۶،۱۵). CTB ساختاری حلقوی را تشکیل می‌دهد که از پنج مونومر CTB تشکیل شده‌است؛ هر منومر با دو مولکول مجاور خود از طریق پیوند هیدروژنی و پل‌های نمکی، بدون پیوند کووالانسی با یکدیگر، در تعامل است. مرکز این سازه پنتامریک یک ساختار شبیه به تونل را می پذیرد که جداره داخلی آن توسط ۵ ساختار مارپیچ آلفا که هرکدام متعلق به یک مونومر است تشکیل شده است. CTA ساختاری کروی با یک ترمینال C بیرون زده دارد؛این انتهای بیرون زده به تونل تشکیل شده توسط CTB که تنها پذیرای یک مولکول CTA است وارد می شود و ساختار هگزامریک نهایی AB_5 توکسین وبا را تشکیل می دهد (۲۱). CTA به صورت یک زنجیره پروتئینی واحد تولید می شود، ولی به دلیل وجود یک جایگاه شکاف پروتئولیتیک CTA به دو زیرواحد CTA1 و CTA2 تقسیم می شود که در ساختار هگزامریک توکسین در ارتباط با هم باقی می مانند تا زمانی که کمپلکس به سلول هدف وارد شود و به شبکه آندوپلاسمی برسد. CTA1مربوط به بخش کروی CTA است، در حالی که CTA2 یک مارپیچ آلفا بیرون زده را تشکیل می‌دهد که به درون تونل تشکیل شده توسط بخش پنتامریک وارد می‌شود (۲۲).

هدف از اجرا این تحقیق بررسی میزان تولید توکسین وبا توسط باکتری ویبریو کلرا در دوره‌های زمانی مختلف و در دو محیط کشت سازگار با این باکتری و در نهایت بررسی خاصیت ادجوانتی آنها در واکسن‌های دامی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی می‌باشد. نیاز به توسعه و تولید ادجوانتهای جدید که همراه با واکسن‌های تولید شده در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، ایجاد ایمنی نماید، احساس می شود. تولید چنین ادجوانت‌هایی تا کنون بومی سازی نشده و درصورت توسعه و تولید آن در موسسه رازی، به بسیاری از دامداران کمک می کند تا از

www.SID.ir

Archive of SID

واکسن‌های این موسسه بهره بیشتر برده و تلفات و خسارات مالی کمتری متوجه آنان گردد.

مواد و روش کار

- بیوتیب و سویه باکتری:

باکتری ویبریو کلرا (PTCC 1611) سروتیپ اینابا و بیوتیپ التور از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران تهیه شد.

- محیط های کشت:

محیط کشت Craig's حاوی ۳ گرم کازئین اسید هیدرولیزات (مرک)، ۰/۴ گرم عصاره مخمر (مرک)، ۰/۰۵ گرم دی پتاسیم فسفات (SAFC) با pH ۷/۲ تا ۷/۴ در حجم ۹۸ میلی لیتر تهیه و اتوکلاو گردید پس از پایان اتوکلاو ۲ میلی لیتر محلول فیلتر شده گلوکز (مرک) ۲۰٪ به آن اضافه شد. محیط AKI حاوی۱۵ گرم پپتون گوشت (مرک)، ۴گرم عصاره مخمر، ۵گرم نمک (فخر رازی) با pH ۷/۲ تا ۷/۶ در حجم ۱۰۰ میلی لیتر تهیه شد به منظور تثبیت pH از محلول بیکربنات سدیم استفاده شد. هر محیط کشت به صورت دوتایی (هر کدام ۱۰۰ میلی لیتر) تهیه گردید.

- کشت باکتری و شرایط کشت:

باکتری ویبریو کلرا به میزان برابر درون هر کدام از محیط های کشت ریخته شد. جهت بررسی شرایط دمایی مختلف بر تولید توکسین در هر محیط کشت یک گروه از محیط های کشت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و گروه بعدی محیط های کشت درون انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در هیچ یک از گروه ها هوادهی انجام نپذیرفت. مدت زمان انکوباسیون برای تمام گروه ها ۷۲ ساعت در نظر گرفته شد. پس از کشت باکتری در یک دوره ۸ ساعته در روز اول کشت هر ۴ ساعت یکبار از هر کدام از گروه ها نمونه برداری صورت پذیرفت. از روز دوم تا پایان روز سوم از هر گروه در همان دوره زمانی به صورت هر ۲ ساعت یکبار نمونه برداری انجام گرفت. نمونه های دریافتی در دور RPM ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma) شد و مایع رویی آن به منظور بررسی میزان توکسین برداشت شد.

- بررسی میزان توکسین وبا در نمونه ها به وسیله تست الایزا GM1

الایزا GM1 یک تست ایمونولوژیک حساس برای تعیین غلظت توکسین کلرا است که در آن از یک آنزیم نشاندار شده ایمونوگلوبولین استفاده می شود که فعالیت آن در یک بستر خاص اندازه گیری می شود. در این تست چاهک های پلیت میکروتیتر با رقت ۱:۵۰۰۰ توسط گانگلیوزید GM1 که گیرنده طبیعی برای کلرا توکسین می باشد، پوشیده شد و به مدت یک شب تا صبح درون یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. به منظور بلاک کردن گودهها از محلول آلبومین سرم گاوی (Sigma) استفاده شد. ۱۰۰ µl از نمونه‌های سوپرناتانت کشت به چاهک های پوشیده شده اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از پایان دوره انکوباسیون آنتی بادی ضد سم کلرا خرگوشی(Sigma) که با رقت ۱:۱۰۰ در محلول نمکی بافر شده با فسفات حاوی ۰/۱٪ BSA رقیق شده بود به گودهها افزوده شد. آنتی بادی اختصاصی ضد ایمونوگلوبولین خرگوش کنژوگه با HRP (Sigma) که با رقت ۱:۵۰۰۰ در محلول نمکی بافر شده با فسفات حاوی ۰/۱٪ BSA رقیق شده بود به چاهک‌ها اضافه گردید. سرانجام محلول رنگ‌زا تترامتیل بنزدین یا TMB (biolegend) که با آنزیم کنژوگه شده واکنش نشان می دهد به محیط افزوده شد. تشکیل یک محصول رنگی نشان دهنده وجود سم کلرا و تائید این تست می باشد. این

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش را می توان با اسپکتروفتومتری با طول موج ۴۵۰ نانومترقرائت کرد. در این تست به منظور تعیین غلظت دقیق میزان سم موجود در چاهک‌ها از توکسین کلرا استاندارد (Sigma) با رقت های ۱:۱(۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر)، ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

- تائید توکسین به روش SDS-PAGE

به منظور تائید تولید توکسین توسط باکتری مورد تحقیق از روش SDS-PAGE استفاده شد. پس از پایان نمونه برداری های لازم از محیط های کشت در پایان ۷۲ ساعت دوره انکوباسیون، مقدار باقیمانده از هر محیط کشت در دور RPM ۱۳۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت جدا شد و به سطح اشباع ۹۰٪ با آمونیوم سولفات (Supelco) رسانده شد، سپس به مدت یک شبانه روز در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت. سوپرناتانت های اشباع شده در دور RPM ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله در حداقل بافر فسفات (PB) حل گردید. جهت انجام این تست دو رقت ۱:۱۰۰ از نمونه های پروتئینی تخلیص شده تهیه شد. پس از آماده سازی نمونه ها به میزان ۱۵میکرولیتر در هر چاهک ژل ریخته شد و الکتروفورز اجرا گردید پس از پایان زمان مورد نیاز جهت حرکت پروتئین ها، ژل اکریل آمید از شیشه ها جدا و برای رنگ آمیزی نیترات نقره مورد استفاده قرار گرفتند.

- تائید توکسین به روش وسترن بلات (Western-Blot)

به منظور تائید نهایی تولید پروتئین توسط باکتری ویبریو کلرا از تست وسترن بلات استفاده شد. پس از خارج نمودن کاغذ نیتروسلولز از تانک، کاغذ ۲ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با محلول TBS شسته شد. کاغذ به وسیله محلول ۳٪ BSA در TBS به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس کاغذ ۲ بار به وسیله محلول TBS توئین دار و یکبار به وسیله بافر TBS شستشو داده شد. به عنوان آنتی بادی اولیه از آنتی بادی ضد سم کلرا خرگوشی با رقت ۱:۱۰۰ در محلول بلاکینگ استفاده و کاغذ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از دوره انکوباسیون کاغذ نیتروسلولز به شیوه بیان شده شستشو داده شد. آنتی بادی ثانویه ضد ایمونوگلوبولین خرگوش (abcam) تولید شده در بز با رقت ۱:۵۰۰۰ در محلول شیرخشک بدون چربی (سیتومتین ژن) مورد استفاده قرار گرفت و به مدت ۱ ساعت کاغذ در دمای اتاق انکوبه گردید. کاغذ ۴ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با محلول TBS توئین‌دار شسته شد و در نهایت از محلول رنگ زا TMB (biolegend) مناسب برای الایزا جهت بررسی باندها استفاده شد.

- بررسی فعالیت توکسین در بازه های زمانی مختلف

به منظور بررسی فعالیت توکسین از سلول های VERO استفاده گردید. در این بررسی ۱۰۰ µl از سوپرناتانت کشت باکتری در بازه های زمانی و دمایی مختلف در دو محیط کشت به سلول های کشت داده شده VERO اضافه گردید و به مدت یک شب تا صبح درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. از اسید هیدروکلرید به عنوان کنترل استفاده شد.

نتایج

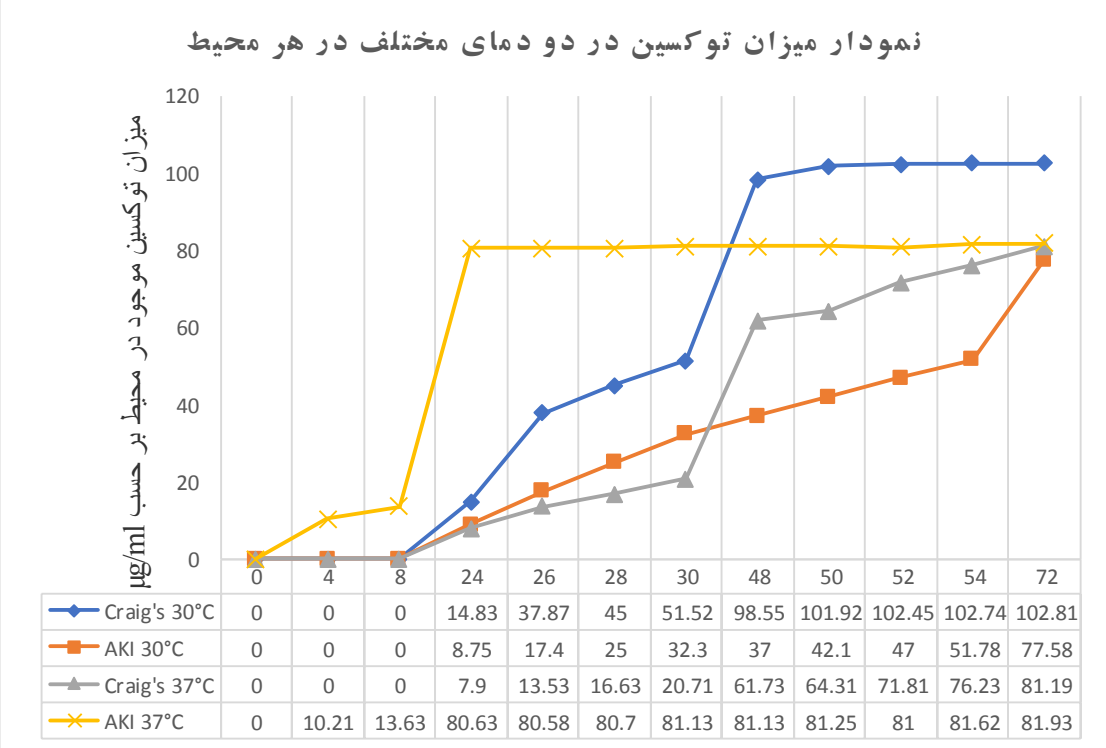
- نتایج حاصل از آزمایش الایزا GM1

پس از خوانش پلیت های میکروتیتر الایزا (شکل ۳) ، بر اساس داده های مربوط به توکسین استاندارد، نمودار استاندارد الایزا توسط نرم افزار Curve expert نسخه ۱,۴ ترسیم گردید. بر اساس اطلاعات بدست آمده از نتایج الایزا GM1 و با توجه به نمودار استاندارد

www.SID.ir

Archive of SID

توکسین، مشخص گردید میزان تولید توکسین در محیط AKI پس از گذشت ۷۲ ساعت از کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به بیشترین میزان خود یعنی ۸۱/۹۳ µg/ml می رسد در حالی که در مدت مشابه میزان توکسین تولید شده در این محیط در دمای انکوباسیون ۳۰ درجه سانتی گراد به ۷۷/۵۸ µg/ml می رسد. این نتایج همچنین نشان می دهد که میزان توکسین تولید شده توسط ویبریو کلرا به صورت چشمگیری به ۸۰/۶۳ µg/ml می رسد و پس از آن روند تولید توکسین بسیار کاهش می یابد. لذا دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و مدت انکوباسیون ۲۴ ساعت برای تولید بهینه توکسین توسط این باکتری در این محیط پیشنهاد می گردد. با توجه به این نتایج مشاهده می گردد که تولید توکسین وبا پس از گذشت ۷۲ ساعت از کشت باکتری در محیط Craig's به بیشترین میزان خود یعنی ۱۰۲/۸۱ µg/ml در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد می رسد در حالی که در مدت مشابه میزان توکسین موجود در محیط در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به ۸۱/۱۹ µg/ml می رسد. نتایج الایزا نشان می دهند که میزان تولید توکسین تا ۵۰ ساعت پس از کشت باکتری در محیط به صورت تصاعدی افزایش یافته و پس از این مدت روند تولید ثابتی را نشان می دهد. لذا با توجه به داده های موجود دمای انکوباسیون ۳۰ درجه سانتی گراد و مدت انکوباسیون ۵۰ ساعت برای تولید بهینه توکسین توسط باکتری در این محیط پیشنهاد می گردد. نمودار ۱ مقایسه میان هر محیط کشت را در بازه‌های زمانی و دماهای مختلف نشان میدهد.



	0	4	8	24	26	28	30	48	50	52	54	72
Craig's 30°C	0	0	0	14.83	37.87	45	51.52	98.55	101.92	102.45	102.74	102.81
AKI 30°C	0	0	0	8.75	17.4	25	32.3	37	42.1	47	51.78	77.58
Craig's 37°C	0	0	0	7.9	13.53	16.63	20.71	61.73	64.31	71.81	76.23	81.19
AKI 37°C	0	10.21	13.63	80.63	80.58	80.7	81.13	81.13	81.25	81	81.62	81.93

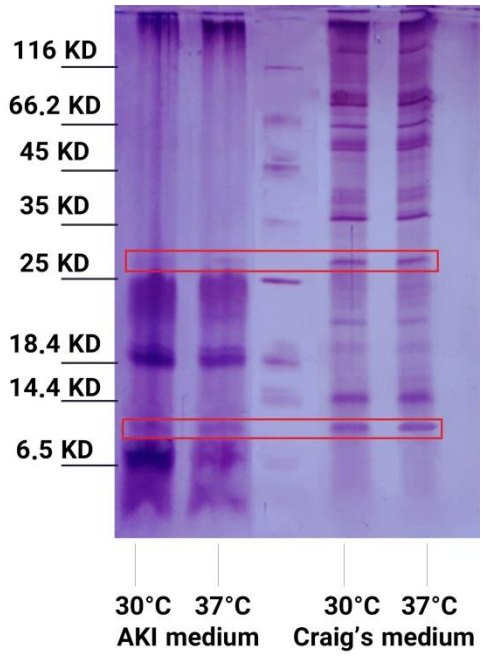
نمودار ۱. مقایسه میزان توکسین تولید شده در محیط های کشت تحت آزمایش در بازه های زمانی مختلف. (جدول فوق نشان دهنده میزان توکسین در محیط است)

www.SID.ir

Archive of SID

- تائید توکسین به روش SDS-PAGE

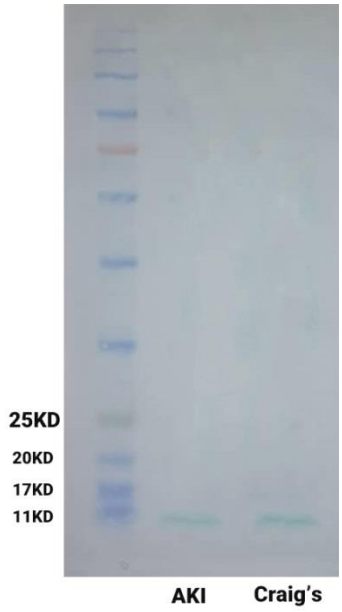
پس از رنگ آمیزی نیترات نقره ژل الکتروفورز، باندهای پروتئینی موجود مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز ژل در هر دو محیط باندهای پروتئینی در حدود ۱۱/۶ کیلو دالتون را نشان می دهد که مختص زیر واحد B توکسین کلرا می باشد. همچنین باندهای پروتئینی در حدود ۲۸ کیلو دالتون نیز در هر دو محیط قابل مشاهده می باشد که مرتبط با زیر واحد A سم ویبریو کلرا است. شکل ۱ نتایج الکتروفورز مربوط به هر محیط و حدود باندهای پروتئینی را نشان می دهد.



شکل ۱. نتیجه حاصل از تست SDS-PAGE باندهای پروتئینی مورد انتظار مربوط به توکسین کلرا در محدود ۱۱/٦ کیلو دالتون برای زیر واحد B و در محوده ۲۸ کیلو دالتون برای زیرواحد A را در هر محیط و در دماهای انکوباسیون مختلف نشان میدهد.

- تائید توکسین به روش وسترن بلات

پس از اتمام رنگ آمیزی کاغذ نیتروسلولز حاوی نمونه‌های توکسین هر دو محیط، باندهای پروتئینی مربوط به توکسین وبا بر روی کاغذ نیتروسلولز ظاهر گردید (شکل۲).



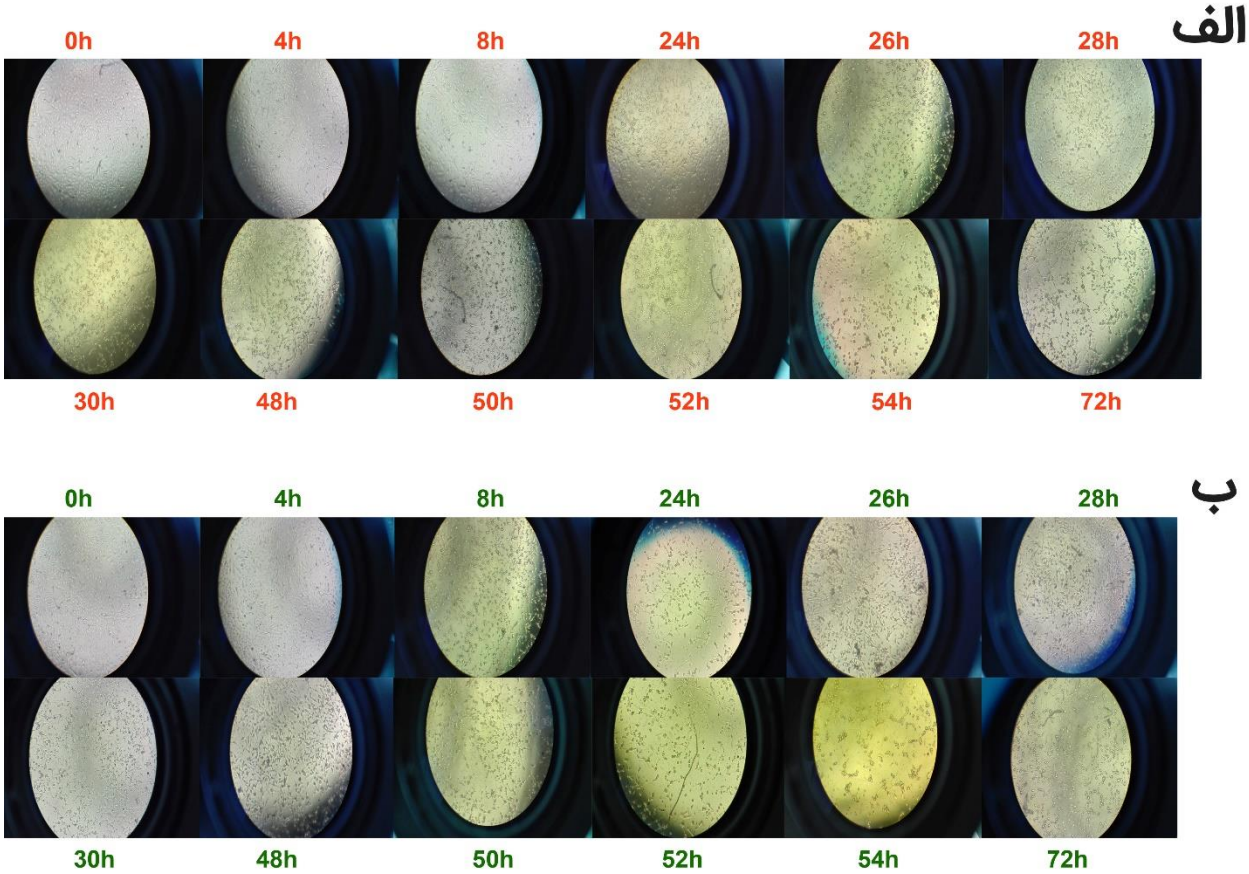
شکل ۲. کاغذ نیتروسلولز پس از رنگ آمیزی

www.SID.ir

Archive of SID

- بررسی فعالیت توکسین

بررسی سلول های VERO نشان داد که توکسین تولید شده توسط باکتری *Vibrio cholerae* در هر دو محیط و تحت شرایط گرمادهی مختلف فعالیت خود را حفظ کرده و موجب تخریب سلول های VERO شده است. توکسین تولید شده در محیط AKI ۳۷ درجه سانتیگراد پس از گذشت ۸ ساعت از کشت باکتری شروع به تخریب سلول های VERO نموده است؛ درحالی که توکسین تولید شده در همین محیط و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد پس از ۲۶ ساعت سلول ها را تخریب نموده است. نتایج این تست برای محیط Craig's نشان می دهد که توکسین تولید شده در این محیط در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد پس از گذشت ۲۶ ساعت از کشت باکتری سلول های VERO را تخریب می نماید در حالی که توکسین تولیدی در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در این محیط پس از ۲۴ ساعت سلول ها را تخریب می نماید. شکل ۳ وضعیت سلول های VERO را نشان می دهد.



شکل ۳. وضعیت سلول های VERO پس از افزودن سوپرناتانت های کشت حاوی توکسین در دوره های زمانی و دمایی مختلف. الف) مربوط به محیط کشت Craig's در ۳۰ درجه سانتی گراد و ب) محیط کشت AKI در ۳۷ درجه سانتی گراد

بحث و نتیجه گیری

وبا یکی از قدیمی ترین و شناخته شده ترین بیماری های همه گیر است. گمان می شود که منشا شیوع وبا در شبه جزیره هند و در اواخر قرن شانزدهم باشد (۱۰).

در سال ۱۸۸۳ میلادی همزمان با پنجمین شیوع پاندمیک وبا رابرت کخ توانست عامل وبا را با موفقیت

www.SID.ir

Archive of SID

جدا کند و وجود CT را در سال ۱۸۸۴ مطرح نمود (۵). هفت پاندمی وبا تا کنون به ثبت رسیده است. ویبریوکلرا O1 کلاسیک عامل پاندمی پنجم و ششم است و اعتقاد بر آن است که با پاندمی هفتم نیز مرتبط بوده است، هرچند هیچ مدرک محکمی وجود ندارد (۱). عامل پاندمی هفتم بیوتیپ التور بود (۱۸). سازمان بهداشت جهانی (WHO) یک افزایش ۳۰ درصدی ابتلا به وبا در سراسر جهان بین سال های ۲۰۰۴ (۱۰۱۳۸۳ مورد) و ۲۰۰۵ (۱۳۱۹۴۳ مورد) و یک افزایش ۷۹ درصدی بین سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ (۲۳۶۸۶۰ مورد) را گزارش نمود در حالی که تعداد کشورهای گزارش شده ثابت بود. در همین زمان، نرخ مرگ و میر در جهان از ۱,۷۲ ٪ در سال ۲۰۰۵ به ۶۶.۲ درصد در سال ۲۰۰۶ افزایش یافت (http://www.who.int/wer/2007).

عفونت ناشی از ویبریوکلرا با مصرف آب و غذا آلوده شروع می‌شود. پس از گذر از مانع اسید معده، میکرو ارگانیسم در اپیتلیوم روده کوچک با استفاده از پیلی تنظیمی توکسین ساکن می شود، احتمالا دیگر عوامل کلونیزاسیون مانند هموگلوتنین های مختلف، عامل کلونیزاسیون جانبی و پیلوس کد شونده توسط هسته، نقش مهمی دارند (۲۳). انتروتوکسین کلرا ساخته شده به وسیله ویبریوهای چسبیده به روده به خارج غشای سلولی باکتری و در فضای خارج سلولی روده کوچک ترشح می شود و انتقال یون ها به وسیله سلول های اپیتلیوم روده را مختل می کند (۱۳). از دست رفتن آب و الکترولیت منجر به مشخصه اسهال شدید وبا می‌شود. بیماری‌زایی *ویبریوکلرا* بیشتر مرتبط با ترشح یک کمپلکس پروتئینی به نام توکسین کلرا (CT) است. CT مسوول اثرات مضر ناشی از عفونت وبا می‌باشد. ساختار توکسین کلرا متشکل از زیر واحد های A (۲۸ کیلو دالتون) و B (۱۱/۶ کیلو دالتون) است که هر کدام فعالیت ویژه و اختصاصی را انجام می دهند. زیرواحد B مسئول اتصال هولوتوکسین به گیرنده سلول یوکاریوتی است و زیرواحد A دارای یک فعالیت آنزیمی خاص است که به صورت درون سلولی عمل می کند (۸). فاکتورهای عمده مرتبط با ویرولانس در خوشه ژنی با حداقل سه منطقه در کروموزوم *V.cholerae* وجود دارد (۷).وجود توکسین کلرا اولین بار توسط رابرت کخ در سال ۱۸۸۴ پیشنهاد شد و ۷۵ سال پس از آن توسط دی (۱۹۵۹) و دوتا ، پاز ، کولکارنی (۱۹۵۹) اثبات گردید. خالص سازی زیر واحدها و بررسی ساختار توکسین نشان می دهد که سم کلرا از یک زیرواحد A و ۵ زیرواحد یکسان B ساخته شده است (۵). زیرواحد A دارای یک فعالیت آنزیمی خاص است و به صورت درون سلولی عمل می کند و سطح cAMP سلولی را بالا می برد، در نتیجه تمایل جذب خالص روده کوچک را تغییر می دهد.زیر واحد B برای اتصال سم به گیرنده سلول یوکاریوتی، ganglioside GM1 استفاده می‌شود. اتصال CT به سلول‌های اپی تلیال توسط نورآمینیداز تقویت می‌شود (۱۳).

صرف نظر از اهمیت آشکار CT در فرآیند بیماری، اکنون کاملا روشن است که تولید CT توسط باکتری *ویبریو کلرا* از منظر یک سروگروه با توانایی بالقوه در ایجاد بیماری همه گیر به ویژه از زمان پیدایش *ویبریو کلرا* O139 دارای اهمیت است (۲۴). یک ناحیه مرکزی با طول ۴/۵ کیلو باز که کاست ویرولانس خوانده می شود (۲۴) در ارتباط با ویبریو کلرا O1 و O139 توکسوژنیک شناخته شده است که در سایر گونه های غیر توکسوژنیک دیده نمی شود. این کاست ویرولانسی حداقل شش ژن، از جمله *ctxAB* (کدگذاری زیرواحد های A و B)، *zot* (کدگذاری

www.SID.ir

Archive of SID

سم انسدادگر زونولا که سبب از بین رفتن اتصالات محکم سلول های روده شده و نفوذپذیری آن را بیشتر می کند (۲))، *cep* (کدگذاری پیلی کد شونده توسط هسته (۱۷))، *ace* (کدگذاری ضروریات جانبی انتروتوکسین کلرا (۲۴)) و *orfU* (کدگذاری محصولی با عملکرد ناشناخته (۲۴)) را حمل می کند. در بیوتیپ التور، بسیاری از سویه ها دارای عناصر الحاقی با توالی های تکراری (RS) در دو طرف ناحیه مرکزی، هستند؛تصور می شود این توالی های تکراری جایگاه اختصاصی ادغام کاست ویرولانس در کروموزوم *ویبریو کلرا* است. ناحیه مرکزی به همراه توالی های RS در طرفین، عنصر ژنتیکی CTX، توکسین کلرا را تشکیل می دهد (۱۴).

بخش سمی توکسین کلرا CTA یا به طور دقیق تر CTA1 است. پس از ورود به سلول، CTA1 در نهایت به شبکه آندوپلاسمی و سپس سیتوزول می رسد؛در اینجا با آدنیلات سیکلاز واکنش داده و فعال می شود (۳). آدنیلات سیکلاز تبدیل آدنوزین تری فسفات (ATP) را به آدنوزین مونو فسفات حلقوی (cAMP) کاتالاز می کند که مسئول فعال شدن کانال های تنظیم کننده هدایت ورای غشایی سیستیک فیبروزیز (CFTR) می باشد (۱۱). این رویداد سبب عدم تعادل نمک در سلول های اپیتلیال روده می شود؛ سلولهای اپیتلیال تحت این شرایط خروج یون های کلرید را افزایش می دهند و همزمان از جذب سدیم نیز جلوگیری می کنند. تمام این وقایع سبب از دست رفتن مهلک آب توسط روده می شود.

زیرواحد B توکسین وبا، بخش غیر سمی توکسین کلرا است. تمایل آن به مونوسیالوتتراهگزوسیل گانگلیوزید (GM1) که به طور گسترده در انواع سلولی از جمله سلول‌های اپی تلیال روده، سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن، ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و سلول‌های B توزیع می‌شود، اجازه دسترسی بهینه به سیستم ایمنی را می‌دهد. جذب سلولی توکسین وبا با شناسایی گیرنده سلولی آن یعنی GM1 گانگلوزید تنظیم می گردد. تعامل CTB با GM1 از طریق بخش پنتاساکاریدی گیرنده گانگلوزیدی GM1 صورت می گیرد. شکل ۱-۸ ساختار شیمیایی گیرنده GM1 گانگلوزید را نشان میدهد. هر منومر CTB در درجه اول با یک پنتاساکارید فعل و انفعال دارد؛ این مسئله نشان می دهد به چه دلیل زیر واحد B توکسین وبا برای بدست آوردن عملکرد حداکثری خود بایستی ساختار پنتامریک بگیرد. با این حال، هر پنتاساکارید تماس خود را به یک مولکول CTB مجاور نیز گسترش می‌دهد؛ اتصال مطلوب قند به دو زیر واحد B تنها در صورتی فراهم می شود که تمایل بیشتر در برهمکنش همزمان با بیش از یک گانگلیوزید GM1 وجود داشته باشد. تعامل پنتاساکارید-CTB، برهمکنش میان زیرواحد های B را درون پنتامر افزایش می دهد (۱۹).

در پژوهش حاضر با توجه به اهمیت بالای توکسین حاصل از باکتری ویبریو کلرا در تولید ادجوانت های قوی جدید ،به بررسی تولید این سم در بازه های زمانی و دماهای مختلف در ۲ محیط مغذی AKI و Craig's برای این باکتری پرداخته شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که بهترین زمان لازم برای تولید توکسین در محیط AKI ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و بدون هوادهی است. به منظور تولید توکسین در محیط Craig's این شرایط عبارت اند از ۵۰ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و بدون هوادهی. میزان تولید توکسین در محیط craig's پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به ۱۰۲/۸۱ میکروگرم در هر میلی لیتر می رسد،

www.SID.ir

Archive of SID

ایـن میـزان بـرای محـیط AKI پـس از ۷۲ سـاعت انکوباشیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گـراد بـه ۸۱/۹۳ میکروگرم در هر میلی لیتر می رسد. نتـایج ایـن تحقیـق نشـان مـی دهـد کـه هرچنـد تولیـد توکسـن در محـیط CraIg's مدت زمـان بیشـتری نسـبت محـیط AKI نیـاز دارد ولـی میـزان غلظـت سـم وبـا در ایـن محـیط بیشـتر می باشد.

- تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامـه مقطـع کارشناسـی ارشـد آقای علی خواستار می باشـد کـه در موسسـه تحقیقـات واکسـن و سـرم سـازی رازی شـعبه شمالشرق(مشـهد) بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوزی و به هـدایت جناب آقای دکتر مجید جمشیدیان مجاور انجام پذیرفته است. نویسندگان این مقاله همچنـین از زحمـات تمـامی پرسـنل بخـش تحقیقـات دامپزشـکی و بیوتکنولـوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سـازی رازی مشـهد بـه ویژه سرکار خانم محدثه امیری قدردانی می نمایند.

منابع

1. Barua D. (1992). Cholera. First edition. Springer. USA: 1-36.
2. Fasano A, Baudry B, Pumplin DW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley JM, et al. (1991). Vibrio cholerae produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **88**:5242-6.
3. Feng Y, Jadhav AP, Rodighiero C, Fujinaga Y, Kirchhausen T, Lencer WI. (2004). Retrograde transport of cholera toxin from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum requires the trans-Golgi network but not the Golgi apparatus in Exo2-treated cells. *EMBO reports*. **5**:596-601.
4. Finkelstein RA, LoSpalluto JJ. (1969). Pathogenesis of experimental cholera: preparation and isolation of choleragen and choleragenoid. *Journal of experimental medicine*. **130**:185-202.
5. Finkelstein RA. (1996). Medical Microbiology. 4th edition: University of Texas Medical Branch at Galveston. USA: 1358-1408.
6. Gardner A, Venkatraman K. (1935). The antigens of the cholera group of vibrios. *Epidemiology & Infection*. **35**:262-82.
7. Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular microbiology*. **23**:1089-97.
8. Huq A, Small EB, West PA, Huq MI, Rahman R, Colwell RR. (1983). Ecological relationships between Vibrio cholerae and planktonic crustacean copepods. *Appl Environ Microbiol*. **45**:275-83.
9. Imhoff JF. (2005). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. 2th edition. Springer. USA: 491-555
10. Kindhauser MK, World Health O. (2003) Communicable diseases 2002 : global defence against the infectious disease threat / edited by Mary Kay Kindhauser. World Health Organization. Geneva: 105-117.
11. Kopic S, Geibel JP. (2010). Toxin mediated diarrhea in the 21st century: The pathophysiology of intestinal ion transport in the course of ETEC, V. cholerae and rotavirus infection. *Toxins*. **2**:2132-57.
12. Lönnroth I, Holmgren J. (1973). Subunit structure of cholera toxin. *Microbiology*. **76**:417-27.
13. Maheshwari M, Nelapati K, Kiranmayi B. (2011). Vibrio cholerae-a review. *Veterinary world*. **4**:423.
14. Mekalanos J. (1985). Genetic Approaches to Microbial Pathogenicity. First edition. Springer. USA: 97-118.

www.SID.ir

Archive of SID

Proceedings of the National Academy of Sciences. **84**:2833-7.
24. Trucksis M, Galen JE, Michalski J, Fasano A, Kaper JB. (1993). Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a Vibrio cholerae virulence cassette. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **90**:5267-71.
25. Yamai S, Okitsu T, Shimada T, Katsube Y. (1997). Distribution of serogroups of Vibrio cholerae non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups. *Kansenshogaku zasshi The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. **71**:1037-45.
15. Merritt EA, Sarfaty S, Akker FVD, L'Hoir C, Martial JA, Hol WG. (1994). Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Science*. **3**:166-175.
16. Merritt EA, Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Hol WG. (1994). Galactose-binding site in Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Molecular microbiology*. **13**:745-53.
17. Pearson GD, Woods A, Chiang SL, Mekalanos JJ. (1993). CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **90**:3750-4.
18. Samadi A, Shahid N, Eusof A, Yunus M, Huq M, Khan M, et al. (1983). Classical Vibrio cholerae biotype displaces EL tor in Bangladesh. *The Lancet*. **321**:805-7.
19. Schoen A, Freire E. (1989). Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor, ganglioside GM1. *Biochemistry*. **28**:5019-24.
20. Shimada T. (1993). Outbreak of Vibrio cholerae non-O1 in India and Bangladesh. *Lancet*. **341**:1347.
21. Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, et al. (1993). Refined structure of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *Journal of molecular biology*. **230**:890-918.
22. Stratmann T. (2015). Cholera toxin subunit B as adjuvant—an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity. *Vaccines*. **3**:579-96.
23. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. (1987). Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 16, Issue 2, 2020

Evaluation and optimization of cholera toxin production by Vibrio cholerae in different time periods.

Ali Khastar[1], Majid Jamshidian Mojaver[2*], Behafarid Ghalandari[3]

1- Master student of Microbial Biotechnology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Medical Nanotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 2 March2020 *Accepted: 26 August 2020*

Abstract

Vibrio cholerae is one of the most studied bacterial toxins in the AB5 family and is widely used as a potent mucosal adjuvant because of its ability to enhance the immune response to the antigen injected with it. This toxin consists of two subunits, a pentameric subunit called subunit B, and a subunit A. This toxin enters the target cell by binding to the GM1 ganglionic receptor .In this study Vibrio cholerae were cultured in 100 ml of AKI and Craig's medium in two groups. One group was then incubated at 37 ° C and the other group was incubated at 30 ° C for 72 h. All media were sampled on a regular basis from the beginning of the incubation period to evaluate the toxin production. Finally, the amount of toxin production was evaluated by ELISA GM1 test. The results showed that the bacteria in both culture medium were capable of producing relatively high levels of toxin. The highest toxin production was observed in Craig's medium at 30 ° C after 50 h. The results of ELISA GM1 test showed that the bacterium had the highest production in Craig's medium after 50 hours at 30 ° C, while the highest toxin production in AKI medium after 24 hours at 37° C.

Keywords: Vibrio cholerae, toxin, ELISA GM1

**Corresponding author: Majid Jamshidain Mojaver*

Address: Department of Veterinary and Biotechnology Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad, Iran.

Tel: +985138431780

Email: m.jamshidian@rvsri.ac.ir

www.SID.ir