مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۶، شماره ۱/فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۳/۱۱۳-۱۰۶

مقاله پژوهشی

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب ژن سنتتیک زنجیره HC تتانوتوکسین در سیستم بیانی پروکاریوت

محمدعلی عارف پور[۱]، شهرام نظریان[۱*]، غلامرضا اولاد[۲]، احسان رضایی[۲،۱]، جعفر سلیمیان[۳]

[۱] گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران، تهران، ایران؛ [۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران؛ [۳] مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۰

چکیده:

زمینه و هدف: **توکسین کلستریدیوم تتانی یا تتانواسپاسمین عامل بیماری مهلک کزاز است. امروزه از توکسوئید آن به عنوان واکسن استفاده می شود. تتانواسپاسمین شامل سه زنجیره L، H_N و H_C می باشد. زنجیره H_C بخش اتصال دهنده و ایمونوژنیک آن است و به عنوان کاندیدای واکسن مطرح می باشد. هدف از این مطالعه، طراحی و تهیه ژن صناعی زنجیره H_C تتانواسپاسمین، بیان و بهینه سازی آن و تخلیص پروتئین نوترکیب حاصل از آن به عنوان کاندیدای واکسن است.**

روش بررسی: **در این مطالعه آزمایشگاهی پس از انجام مطالعات بیوانفورماتیکی و بهینه سازی ترادف ژن H_C، سفارش سنتز ژن در وکتور بیانی pET28a داده شد. تأیید آن به کمک هضم آنزیمی انجام شد. سپس این سازه ژنی در میزبان مناسب (E. Coli Bl21DE3) تراریخت گردید. پس از بیان ژن و تخلیص پروتئین نوترکیب، این پروتئین با کمک وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت.**

یافته ها: **آنالیز بیوانفورماتیکی و مولکولی این ژن، صحت آن را تأیید نمود. باند bp ۱۳۵۶ ژن Hc در ژل آگارز و باند ۵۰ کیلو دالتونی بیان ژن در ژل SDS-PAGE و در غشای نیترو سلولز (وسترن بلات) مشاهده شد. پروتئین نوترکیب در هر دو شکل محلول و نامحلول (اجسام توده ای شکل) تولید شده بود. این دو شکل پروتئین با هر دو روش طبیعی و دناتوره به میزان زیادی تخلیص گردید.**

نتیجه گیری: **با توجه به مزیت های پروتئین نوترکیب H_C به توکسوئید کزاز به نظر می آید پروتئین نوترکیب حاصل می تواند به عنوان کاندیدای واکسن جایگزینی مناسبی برای واکسن کزاز باشد.**

واژه‌های کلیدی: توکسین کزاز، زنجیره نوترکیب H_C، بیان، کاندید واکسن.

مقدمه:

کلستریدیوم تتانی عامل بیماری مهلک کزاز می‌باشد. کلستریدیوم تتانی به وسیله ی توکسینی به نام تتانوتوکسین یا تتانواسپاسمین سبب ایجاد بیماری کزاز می شود (۱). تتانواسپاسمین توکسین سیستم عصبی است. کزاز نوعی بیماری دستگاه اعصاب نورولوژیک (Neurologic) است که با افزایش سفتی و گرفتگی های اسپاسم (Spasm) عضلات مشخص می‌شود (۲). گاهی این اسپاسم ها به حدی شدید است که می تواند موجب صدمات جدی نظیر شکستگی دنده ها و مهره ها و خفگی بشود. این علائم ممکن است با محرک هایی نظیر حرکت ناگهانی، صدا، نور، سرفه و بروز نمایند (۴،۳). ژن تتانوتوکسین در یک پلاسمید ۷۵ کیلو بازی رمز دهی می شود و به صورت یک پلی پپتید منفرد با وزن مولکولی ۱۵۰ کیلودالتون سنتز می گردد. بعد از ترجمه، پلی پپتید حاصل به دو بخش زنجیره سبک (L) و زنجیره سنگین (H) که با پیوند دی سولفیدی متصل شده اند، شکسته می شود. این پلی پپتید شامل بخش های زنجیره L، H_N و H_C است که هر زنجیره ۵۰ کیلو دالتون می باشد (۶-۳). قسمت ایمونوژنیک و متصل شونده این توکسین به سلول

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه جامع امام حسین- گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی- تلفن: ۰۹۱۲۴۸۶۱۳۳۸، E-mail: nazarian56@gmail.com

www.SID.ir

نورونی، بخش H_C می باشد. گروه کربوکسیل انتهایی در زنجیره سنگین این توکسین به طور غیر قابل برگشتی به دو مولکول گانگلیوزید (GD1b و GT1b) سلول‌های عصبی متصل می‌شود و بدینوسیله به درون سلول‌های عصبی راه می‌یابد و در نهایت باعث رفلکس شدید (Hyper reflex)، اسپاسم عضلانی (Muscle spasms) و فلج اسپاستیک (Spastic paralysis) می شود (۷،۳). از دهه ۱۹۵۰ استفاده از واکسن علیه تتانوس آغاز شده است (۸). سرم ضد تتانواسپاسمین، بدن را در برابر کزاز محافظت می کند (۹). تاکنون برای تولید این سرم و مصون کردن فرد در برابر بیماری کزاز از توکسوئید استفاده شده است؛ اما بسیاری از محققین به تولید زیر واحدهای این توکسین به صورت نوترکیب با ویژگی های منحصر به فرد آن رو آورده اند (۱۰). هدف ما در این مطالعه تولید زیر واحد H_C این توکسین به صورت نوترکیب و با حداکثر خاصیت ایمنوژنیک به عنوان کاندید برتر واکسن علیه تتانوتوکسین می باشد.

روش بررسی:

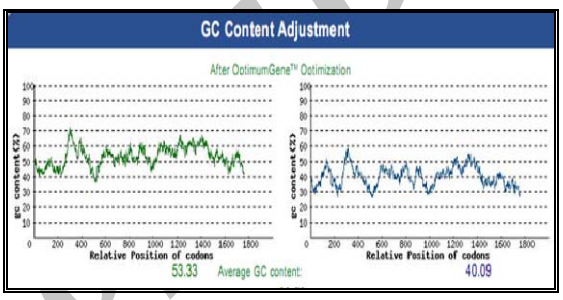
بخش اتصال دهنده یا بخش ایمنی زای ژن تتانوتوکسین دارای bp ۱۳۵۶ می باشد. ترادف ژن بر اساس ترجیح کدونی (Codon preference) جهت بیان در باکتری *E.coli* بهینه سازی گردید. توالی حاصل، توسط نرم افزار DNasis مورد بررسی قرار گرفت. ژن صناعی مذکور در وکتور pET28a از شرکت شاین ژن (Shine Gene) تهیه گردید. لازم به ذکر است که یکی از وکتورهای بیانی سیستم pET نوع pET28a است که با داشتن پروموتور T7 بیان بالایی در پروکاریوت ها دارد. ضمن اینکه با داشتن دو ناحیه 6His در دو طرف پروتئین بیانی ویژگی آن را در تخلیص به وسیله ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی دو چندان نموده است. پلاسمید مذکور به سلول های مستعد *E.coli* Bl21-DE3 (نوواژن) با روش شوک حرارتی انتقال داده شد. سپس پلاسمید حامل ژن صناعی توسط ژل آگاروز بررسی گردید. هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده حاوی ژن مورد نظر، به کمک دو آنزیم Hind III و EcoR I (شرکت Rosh) به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد صورت گرفت. پس از بیان اولیه ژن مورد مطالعه، عصاره خام سلول های بیانی بروی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. سپس بیان پروتئین نوترکیب H_C در مقیاس بالای آزمایشگاهی (۲۰۰ میلی لیتر) و در شرایط کانامایسین با غلظت ۲۰μg/ml، افزودن IPTG (isopropyl- beta-D-thiogalactopyranoside) با غلظت ۱ mM در OD=۰/۶، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و زمان ۶ ساعت انجام شد. ۶ ساعت پس از القا، سلول ها با سانتریفیوژ (۸۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه) جمع آوری شدند. پس از شست و شوی سلول ها با بافر PBS (Phosphate buffered saline) و سانتریفیوژ مجدد، شکست سلول های جدا شده به وسیله سونیکاتور با قدرت رزونانس ۷۵ درصد، ۶ بار و هر بار به مدت ۲۰ ثانیه انجام گردید. سپس با استفاده از سانتریفیوژ (۱۴۰۰۰ rpm در مدت ۳۰ دقیقه) مایع رویی و رسوبات باقیمانده حاصل از آن جداسازی گردیده و بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. جهت تخلیص، مایع رویی جدا شده حاوی پروتئین های محلول، به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از شیب غلظت ایمیدازول در بافرهای مختلف در ستون نیکل (Ni-NTA) ساخت شرکت کیاژن و کیت ارائه شده از همین شرکت انجام شد. همچنین جهت تخلیص پروتئین های در شکل نامحلول انکلوژن بادی (inclusion body) موجود در رسوب حاصل از مراحل قبل، با استفاده از بافرهای حاوی اوره ۸ مولار در ستون کروماتوگرافی Ni-NTAبه روش دناتوره نیز صورت پذیرفت. محصولات جمع آوری شده از ستون با ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پروتئین های حاصل نیز به روش برادفورد اندازه گیری گردید. تأیید این پروتئین نوترکیب بیانی حاصل، با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال ضد هیستیدین، وسترن بلات انجام گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته ها:

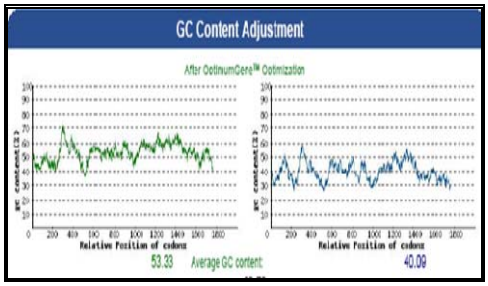
بهینه سازی کدون های زیرواحد H_C ژن تتانوتوکسین در این مطالعه به وسیله الگوریتم Optimum Gene ™ انجام گرفت. نمای محتوای GC این ژن، قبل و بعد از فرآیند بهینه سازی نشان می دهد میزان GC این ژن از ۴۰/۰۹ درصد در حالت طبیعی به مقدار ۵۳/۳۳ درصد بعد از بهینه سازی افزایش یافته و به تبع آن میزان AT از ۶۰ درصد در حالت طبیعی به مقدار ۴۷ درصد در حالت بهینه سازی شده، کاهش یافت (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: میانگین محتوی GC ژن Tetani قبل و بعد از بهینه سازی کدون ها

همچنین میزان Codon Adaptation (CAI) Index (کمیتی است که می گوید یک کدون در یک ژن با چه درجه ای به کدون های موجود در ژن های بیان شونده به میزان بالا، شباهت دارد) از ۰/۶۵ قبل از بهینه سازی به مقدار ۰/۸۷ بعد از بهینه سازی رسید (تصویر شماره۲).

ساختار mRNA پروتیئن نوترکیب مذکور به وسیله نرم افزار mfold مورد بررسی قرار گرفت. در این نرم افزار پایداری mRNA عموماً به وسیله ی تغییرات انرژی آزاد نشان داده می شود. پروتیئن تتانوتوکسین در حالت طبیعی دارای تغییرات انرژی آزاد kcal/mol-۸۰/۹۷ است در حالی که با تغییرات ایجاد شده و بهینه سازی شرایط، این مقدار به kcal/mol-۶۰/۱۵۴ رسیده است. همچنین با الگوریتم به کار گرفته شده تا حد ممکن ساختارهای حلقه – ساقه که در اتصال ریبوزومی و پایداری mRNA مهم هستند و می توانند کارایی ترجمه را به نحو چشمگیری کاهش دهند، شکسته شدند.



تصویر شماره ۲: شاخص سازگاری کدون CAI ژن تتانی قبل و بعد از بهینه سازی کدون ها

CAI= Codon Adaptation Index

پس از انجام تغییرات و بهینه سازی توالی ژن مورد مطالعه، پروتیئن مورد نظر با پروتیئن طبیعی مورد مقایسه قرار گرفت. در سایت NCBI برای توالی فوق BLASTx انجام گردید که این توالی به صورت ۱۰۰٪ با توالی پروتئین طبیعی همولوژی داشت.

پس از تهیه سلول های مستعد *E.coli Bl21-DE3*، پلاسمید حاوی DNA نوترکیب به میزبان فوق انتقال داده شده و غربالگری انجام گردید. استخراج پلاسمید از سلول های تراریخت شده به روش لیز قلیایی صورت پذیرفت. پلاسمید استخراج شده روی ژل آگاروز ۱ درصد، الکتروفورز گردید.

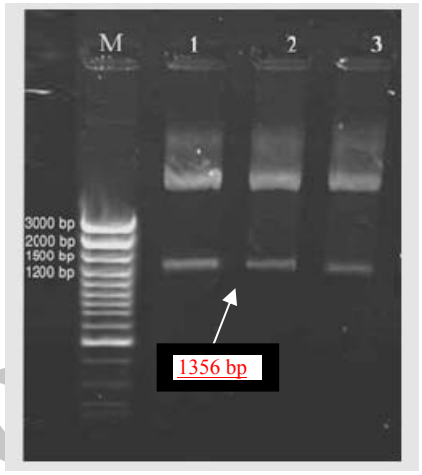
نتایج نشان دهنده این است که طی فرآیند تخلیص پلاسمید DNA کروموزومی حذف شده و همچنین پلاسمید تهیه شده عاری از RNA سلولی می باشد.

نتایج حاصل از هضم آنزیمی، پلاسمیدهای استخراج شده حاوی ژن مورد مطالعه را مورد تأیید قرار می دهد (تصویر شماره ۳).

پس از بیان ژن در باکتری تراریخت، نتایج کل محتوای پروتئینی سلول های بیانی روی ژل ۱۲ درصد

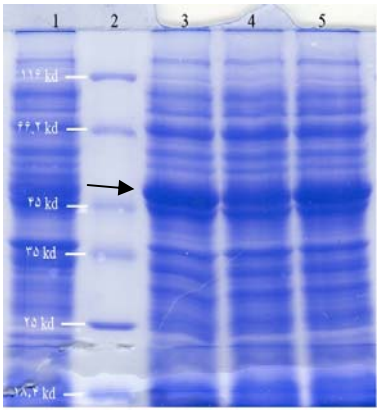
Archive of SID
www.SID.ir

SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه های القاء شده پروتئینی با بیان بسیار بالا مشاهده گردید (تصویر شماره ۴). مقداری از پروتئین نوترکیب در فاز محلول و مقداری نیز به صورت انکلوژن بادی در رسوب مشاهده گردید. نتایج نشان داد که القا و بیان این پروتئین نوترکیب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، زمان ۶ ساعت و غلظت ۱ میلی مولار ماده القاءکننده می باشد.



تصویر شماره ۳: آنالیز کلون‌ها به روش هضم آنزیمی

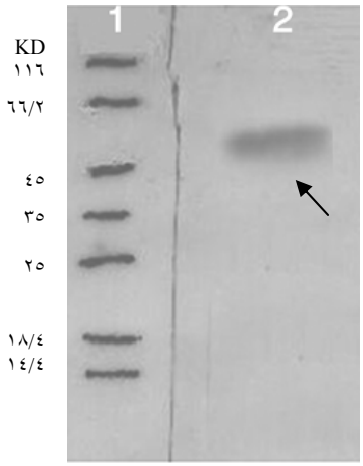
ردیف ۱،۲،۳: پلاسمیدهای دارای قطعه ژنی 1356bp جدا شده در واکنش؛ ردیف M: نشانگر مولکولی (100 bp plus DNA ladder) شرکت فرمانتاز



تصویر شماره ۴: بررسی بیان ژن زنجیره Hc

ردیف ۱: کلون‌های القاء نشده؛ ردیف ۲: نشانگر پروتئینی SM0431؛ ردیف ۳،۴ و ۵: کلون‌های القاء شده با IPTG1mM

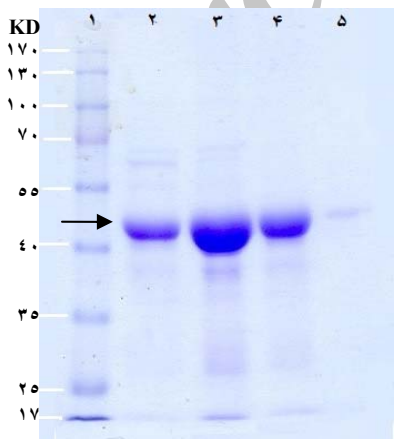
تکنیک ایمونوبلات با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال ضد توکسین کزاز انجام شد. (تصویر شماره ۵) نشان می دهد که این آنتی بادی توانسته است پروتئین نوترکیب حاصل از بیان ژن زنجیره Hc را به خوبی شناسایی نماید.



تصویر شماره ۵: تأیید پروتئین نوترکیب زیر واحد از طریق ایمونو بلات

ردیف ۱: نشانگر پروتئینی SM0431 شرکت فرمانتاز؛ ردیف ۲: نمونه پروتئین نوترکیب بیان شده

سپس محلول رویی در شرایط طبیعی(شیب غلظت ایمیدازول) برای تخلیص پروتئین نوترکیب به روی ستون نیکل برده شد (تصویر شماره ۶).

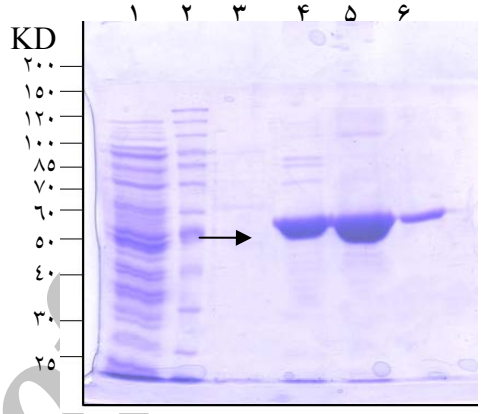


تصویر شماره ۶: تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل(Ni-NTA) به روش طبیعی (غلظت های مختلف ایمیدازول)

www.SID.ir

ردیف ۱: نشانگر پروتئینی SM0671 شرکت فرمانتاز؛ ردیف ۲،۳،٤ و ۵: نمونه خروجی از ستون پس از شستشو به ترتیب با بافرهای C و D و E (غلظت های۱۰۰و ۱۷۰ و ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول) و بافر Mes

رسوب باقیمانده نیز که حاوی پروتئین در شکل انکلوژن بادی بود با روش دناتوره(حاوی اوره ۸ مولار و شیب pH) از ستون نیکل عبور داده شد (تصویر شماره ۷).



تصویر شماره ۷: تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل (Ni-NTA) به روش دناتوره

ردیف ۱: نمونه خروجی از ستون قبل از شستشو؛ ردیف ۲: نشانگر پروتئینی (SM1811 شرکت فرمانتاز)؛ ردیف ٦،٥،٣،٤: نمونه خروجی از ستون پس ازشستشو با بافر C-D-E(حاوی اوره ۸ مولار با pH مختلف) و بافر MES

بحث:

تاکنون اکثر واکسن هایی که علیه کزاز مجوز استفاده در انسان را پیدا کرده اند، از نوع واکسن های نسل اول یعنی میکروارگانیسم های ضعیف شده، غیر فعال شده یا کشته شده می باشند (۱۱). پیشرفت های مهندسی ژنتیک به دانشمندان این اجازه را می دهد که طراحی منطقی واکسن بر مبنای اجزایی از میکروب بهتر و کاربردی تر از کل آنتی ژن انجام گردد. اگرچه تعداد کمی از واکسن های نوترکیب وجود دارند که تاکنون مجوز مصرف دریافت نموده اند؛ اما پر واضح است که فناوری های ژنتیک جدید در سال های آتی نقش مهمی در افزایش چشمگیر آن ها خواهد داشت (۱۲). از جمله مزیت هایی که واکسن های نوترکیب پروتئینی بر سایر انواع واکسن دارند، قدرت بیشتر در تحریک سیستم ایمنی، واکنش متقاطع (reactogenic) کمتر، تخلیص بهتر، صرفه اقتصادی و محافظت گسترده تر علیه چندین زیر گروه یا زیر نوع از یک باکتری (serotypes/serogroups) می باشد. اولین نوع از این واکسن ها بیان ژن آنتی ژن های سطحی کاملاً خالص شده ویروس هپاتیت B در مخمر بود (۱۳). دومین نوع آن یک واکسن زیر واحد بردوتلاپرتوزیس شامل سه پروتئین خالص می باشد که جایگزینی ایمن و مطمئن به جای غیر فعال کننده های شیمیایی بود. استفاده از مهندسی ژنتیک در مطالعات عملکردی و ساختاری، تولید زیر واحدهای این توکسین را بسیار کاراتر و موثرتر نموده است (۱۴). بر همین اساس بسیاری از فاکتورهای حدت (virulence) به عنوان کاندید واکسن های نوترکیب جدید مورد مطالعه قرار دارند. تاکنون مطالعه پیرامون شناسایی و تولید واکسن های نوترکیب بسیاری از فاکتورهای ایمنی زا و بیماریزای مختلف انجام گردیده است. برخی از این واکسن ها دارای مجور بوده و هم اکنون استفاده می شوند و برخی دیگر در حال سپری کردن مراحل بالینی خود هستند (۱۲). واکسن کزاز جزء برنامه ثابت واکسیناسیون نوزادان قرار دارد. این واکسن معمولاً از توکسین باکتری کلستریدیوم تتانی و با استفاده از روش های متداول به دست می آید. پس از استخراج و تخلیص توکسین، خاصیت سمی آن به وسیله فرمالدهید گرفته شده و بدین شکل مبنای واکسن کزاز شکل می گیرد (۱۵). هر چند که مطالعه پیرامون زیر واحدهای نوترکیب این توکسین در خارج از کشور صورت گرفته است؛ ولی تاکنون هیچ سابقه ای از این مطالعه در داخل گزارش نگردیده است. اگر به ژن تشکیل دهنده تتانوتوکسین توجه نماییم متوجه حضور سه بخش L، H_N و H_C در آن می شویم. با توجه به اینکه بخش H_C تتانوتوکسین نقش اصلی در ایمنی زایی

Archive of SID
www.SID.ir

و نیز اتصال به سلول نورونی را ایفا می نماید، این بخش می تواند به عنوان کاندید واکسن نوترکیب مناسبی علیه این توکسین مطرح باشد. آقای Fairweather بخش های مختلف توکسین کزاز را به صورت نوترکیب و ایمنی زایی آن را مورد بررسی قرار دادند (۱۶). Toivonen و همکاران و همچنین Makoff و همکارانش ضمن تولید زیر واحد نوترکیب (قطعه C) این توکسین آن را به عنوان کاندید واکسن معرفی نمودند (۱۷،۲). دو سال بعد Romanos تولید پروتئین نوترکیب این بخش را به عنوان کاندید واکسن در سیستم یوکاریوت (مخمر) گزارش نمود (۱۸). نهایتاً Anderson در سال ۱۹۹۷ استفاده از توالی ژنی این قطعه را به عنوان کاندید DNA vaccine گزارش نمود (۱۹). از آنجا که واکسن پروتئینی نوترکیب با استناد به مواردی که مرور گردید مزایای قابل توجهی نسبت به سایر واکسن ها (میکرو ارگانیسم های زنده ضعیف شده یا کشته شده، توکسوئیدها و ...) دارد، حرکت به سمت تولید این نوع از واکسن ها می تواند نتایج موثری به دنبال داشته باشد.

به همین دلیل در این مطالعه، جهت بومی سازی فرآیند تولید این زیر واحد به عنوان گام اول، قطعه Hc این توکسین بیان، استخراج و تخلیص و مورد آنالیز و تأیید با ایمنوبلات قرار گرفت. بررسی و ارزیابی میزان ایمنی زایی این کاندید واکسن در مقایسه با واکسن های نسل اول، جهت مقابله با بیماری کشنده کزاز، در مطالعات بعدی مورد نظر می باشد.

نتیجه گیری:

با توجه به مزیت های پروتئین نوترکیب HC به توکسوئید کزاز به نظر می آید پروتئین نوترکیب حاصل می تواند به عنوان کاندیدای واکسن جایگزینی مناسبی برای واکسن کزاز باشد

تشکر و قدردانی:

ازکلیه کسانی که درانجام این تحقیق همکاری کردند کمال تقدیر و تشکر را می شود.

منابع:

1. Hassel B. Tetanus: pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. Toxins. 2013 Jan; 5(1): 73-83.
2. Toivonen JM, Olivan S, Osta R. Tetanus toxin C-fragment: the courier and the cure? Toxins. 2010 Nov; 2(11): 2622-44.
3. Farrar JJ, Yen LM, Cook T, Fairweather N, Binh N, Parry J, et al. Tetanus. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2000 Sep; 69(3): 292-301.
4. Matsuda M, inventor.Tetanius toxin functional fragment antigen and tatanus vaccine, The research foundation if microbial disease of Osaka University. Osaka (JP) patent US6372225 B1. 2002 Apr 16.
5. Calvo AC, Olivan S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. Int J Mol Sci. 2012; 13(6): 6883-901.
6. Yu YZ, Gong ZW, Ma Y, Zhang SM, Zhu HQ, Wang WB, et al. Co-expression of tetanus toxin fragment C in Escherichia coli with thioredoxin and its evaluation as an effective subunit vaccine candidate. Vaccine. 2011 Aug 11; 29(35): 5978-85.
7. Arnold L. Demain, metod for production of tetanus toxin using media substantially free of animal products. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA (US), patent US 6558926 B1, 2003 May 6.
8. Danilova E, Shiryayev A, Kristoffersen EK, Sjursen H. Attenuated immune response to tetanus toxoid in young healthy men protected against tetanus. Vaccine. 2005 Oct 10; 23(42): 4980-3.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe E. Epidemiology and prevention of vaccine preventable diseases. 10th ed. US: Centre for Disease Control and Prevention, Public Health Foundation; 2007.
10. Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, et al. Plant-based vaccines: unique advantages. Vaccine. 2001 Mar 21; 19(17-19): 2742-8.
11. Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future. Nat Rev Microbiol. 2011 Dec; 9(12): 889-93.
12. Unnikrishnan M, Rappuoli R, Serruto D. Recombinant bacterial vaccines. Curr Opin Immunol. 2012 Jun; 24(3): 337-42.
13. Andre FE. Overview of a 5-year clinical experience with a yeast-derived hepatitis B vaccine. Vaccine. 1990; 8(Suppl.): S74-S78 discussion S79–S80.
14. Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Perugini M, Nencioni L, De Magistris MT, et al. Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. Science. 1989 Oct 27; 246(4929): 497-500.
15. Piersma SJ, Leenaars MP, Guzylack-Piriou L, Summerfield A, Hendriksen CF, McCullough KC. An in vitro immune response model to determine tetanus toxoid antigen (vaccine) specific immunogenicity: Selection of sensitive assay criteria. Vaccine. 2006 Apr 12; 24(16):3076-83.
16. Fairweather NF, Lyness VA, Maskell DJ. Immunization of mice against tetanus with fragments of tetanus toxin synthesized in Escherichia coli. Infect Immun. 1987 Nov; 55(11): 2541-5.
17. Makoff AJ, Ballantine SP, Smallwood AE, Fairweather NF. Expression of tetanus toxin fragment C in Escherichia coli: its purification and potential use as a vaccine. Bioflecbnology.1989; 7: 1043-6.
18. Romanos M A, Makoff A J, Fairweather N F, Rayment FB, Payne MM, Clare JJ, et al. Expression of tetanus toxin Fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. Nucleic Acids Res. 1991; 19: 1461-7.
19. Anderson R, Gao XM, Papakonstantinopoulou A, Fairweather N, Roberts M, Dougan G. Immunization of mice with DNA encoding fragment C of tetanus toxin. Vaccine. 1997 Jun; 15(8):827-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 Apr, May; 16(1): 106-113. ***Original article***

Expression and purification of recombinant heavy chain (Hc) of tetanus toxin in prokaryotic expression system

Arefpour MA [1], Nazarian SH [1*], Olad GHR [2], Rezaei E [1, 2], Salimian J [3]

[1]Biology Dept., and Research Center, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran; [2]Applied Biotechnology Research Center, Baqyatllah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran; [3]Chemical Damages Research Center, Baqyatllah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

Received: 11/Nov/2013 Accepted: 20/Apr/2012

Background and aims: Tetanus toxin, the product of Clostridium tetani, is the causative agent of fatal disease tetanus. Nowadays, toxoid form of this toxin used as a vaccine against this disease. Tetanus toxin is composed of three chains: L, H_N and Hc. Hc chain is immunogenic and binding domain of toxin. Owing to this fact, Hc is considered as candidate for vaccine. The aim of this study was the design and development Hc gene and its synthesis, expression and expression optimization and purification of recombinant protein as vaccine candidate.

Methods: In this laboratory study, after bioinformatics study and gene optimization, the Hc chain gene was ordered to synthase and clone in pET28a vector. The integrity of Hc gene was confirmed by restriction digestion methods. Then, this construct was transformed in *E.coli*. Subsequently, Gene expression, recombinant protein purification was performed and this protein was confirmed by western blotting technique.

Results: The Hc gene was confirmed using bioinformatics and molecular analysis. A 1356 bp band was observed in agarose gel and a 50 kDa band was detected in SDS-PAGE and nitrocellulose membrane (western blot). Recombinant protein was produced in both soluble and insoluble forms (inclusion body). These two forms of proteins were purified in high level by native and denatured methods.

Conclusion: Regarding to more advantages of recombinant Hc protein to tetanus toxoid, it seems Hc protein as a suitable vaccine candidate can be replaced with tetanus toxoid vaccine.

Keywords: **Tetanus Toxin, Recombinant Hc chain, Expression, Vaccine candidate.**

Cite this article as: Arefpour MA, Nazarian S, Olad GHR, Rezaei E, Salimian J. Expression and purification of recombinant heavy chain (Hc) of tetanus toxin in prokaryotic expression system. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014 Apr, may; 16(1): 106-113.

[*]**Corresponding author:**
Biology Research Center, Biology Dept., Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran. Tel: 0098 9124861338, E-mail: nazarian56@gmail.com

www.SID.ir