



شماره ۸۵، زمستان ۱۳۸۸

نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)

تخلیص و جدا سازی پادگن های اگزو توکسین *Bacillus anthracis* (PA, LF, EF) سویه 34F2 به روش اولترا فیلتر و HPLC

• فریبا گلچین فر (نویسنده مسئول) بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• رسول مدنی

بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• غلامرضا موذنی جولا

بخش تولید واکسن های هوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تاریخ دریافت: آذرماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۸

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۲۲۶۵- داخلی ۰۳۸-۴۵۷۰۰۲۶۱

Email: f_golchinfar@yahoo.com

چکیده

بیماری آنتراکس (شاربن) یکی از مهمترین بیماری های مشترک بین انسان و دام می باشد. عامل آن باکتری گرم مثبت و میله ای شکل *B.anthraxis* است. *B.anthraxis* دارای دو عامل بیماری زای شناخته شده شامل یک سم پروتئینی سه قسمتی و یک کپسول پلی دی گلوتامیک اسید می باشد. با توجه به این که توکسین باکتری نقش مهمی در بیماریزایی و تهیه واکسن دارد، لذا جداسازی و تخلیص آن همواره مورد توجه محققین بوده است. سم سه قسمتی شامل پادگن های PA, LF, EF می باشد. درک بیشتر اکتیویته سم، نقش هر یک از اجزای توکسین در بیماری زائی و حفاظت در برابر بیماری و تهیه پادگن برای به کار رفتن در سیستم های تشخیص نیازمند درجات بالای تخلیص می باشد. در این تحقیق پس از کشت باکتری روی محیط کشت اختصاصی و جدا نمودن محلول روئی از پیکره باکتری، این محلول از اولترا فیلتر (UF) با Cutoff ۳۰۰۰۰ و ۵۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ عبور داده شد و سپس عملیات ترسیب با سولفات آمونیوم و دیالیز انجام گردید. که نهایتاً با استفاده از دستگاه HPLC پادگن های توکسین *B.anthraxis* از یکدیگر جدا شد و در روش الکتروفورز این پادگن ها (EF, LF, PA) به ترتیب با وزن مولکولی های ۸۶، ۸۷، ۸۵ کیلودالتون و با خلوص بالا مشخص گردید.

کلمات کلیدی: *B.anthraxis*، HPLC، جداسازی، تخلیص

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 85 pp: 2-7

Purification & separation of *Bacillus anthracis* 34F2 Antigens with UF & HPLC

By: Golchinfar, F., Madani, R., Biotechnology Dept. Razi Vaccine & Serum Research Institute, Moazeni Jula, G., Aerobic Bacterial Vaccines Dept. Razi Vaccine & Serum Research Institute.

Anthrax is one of the important zoonose disease between human and cattle. *Bacillus anthracis* is a gram- positive bacterium which its tripartite protein toxin contains protective antigen (PA), edema factor (EF) and lethal factor (LF) and a poly D- glutamic acid capsule. A recent resurgence of interest in *B.anthraxis* resulted in improved methods for production, separation and purification of the known toxin components. This in turn has lead to development of much more sensitive toxin-detection systems. Further understanding of toxin activity, the role of individual components in protection against the disease and the production of antigens for use in diagnostic requires high-degree of purity. In this study after cultivation of bacteria and separaing the supernatant the solution was passed through different membrane of ultra filter system with 30000, 50000 and 100000 Dalton molecular weight cut off respectively. The final solution was treated with ammonium sulphate and the antigens prepared which after dialysis have passed through gel chromatography of HPLC for separating of *B.anthraxis* toxins. Finaly three toxin antigens EF,LF and PA with 86, 87 and 85 K dalton molecular weight of high purity were obtained.

Key words: *B.anthraxis*, HPLC, separation, purification, EF,LF,PA Proteins

مقدمه

باسیلوس ها از ارگانسیم های شایع محیطی بوده و در آزمایشگاه ها اغلب به عنوان آلوده کننده محیط های کشت و نمونه های آزمایشگاهی محسوب می شوند. از مهم ترین بیماریزای این جنس *B.anthraxis* عامل بیماری آنتراکس (سیاه زخم) از مهمترین بیماری های مشترک بین انسان و دام می باشد. این باکتری بدون حرکت، اسپور دار و به اندازه ۴-۸ میکرومتر با انتهای چهار گوش می باشد. اسپور این باکتری بیضی شکل، غیر متورم و مرکزی می باشد و از نظر اندازه مشابه سایر باسیلوس ها است برای مشاهده اسپور از محیط های اختصاصی و رنگ آمیزی اسپور استفاده می شود اسپورها در بافت آلوده در معرض هوا دیده نمی شوند. اسپور در محیط مغذی یا بافت انسان و دام تکثیر یافته و تشکیل زنجیره های کوتاه کپسول دار می دهد. جنس کپسول *B.anthraxis* از گلوتامیک اسید می باشد که عامل حدت زای آن می باشد. نقش کپسول در پاتوژنز میکروب بوسیله جلوگیری از مواجهه سیستم ایمنی میزبان با باکتری و تحریک سپتی سمی می باشد. این باکتری گرم مثبت و هوازای بی هوازی اختیاری می باشد. دمای بین ۳۵-۴۵ درجه سانتی گراد را تحمل می کند ولی دمای مناسب آن ۳۵ درجه می باشد (۱). این باکتری روی تمامی محیط های معمولی رشد کرده و تشکیل کلنی هایی با مرکز موج و محدب می دهد که اصطلاحاً به آن سر مدوزا می گویند (۱۱). توکسین *B.anthraxis* یک اگزو توکسین می باشد که از سه جزء پروتئینی تشکیل شده است به نام های PA (Protective antigen) یا پادگن محافظت کننده که به خاطر توانایی آن در ایجاد ایمنی محافظت کننده در برابر آنتراکس به این نام خوانده می شود، EF (Edema Factor) یا فاکتور ادم زا و LF (Lethal factor) یا فاکتور کشنده، هر سه ژن های *cya,lef,pag*

A به ترتیب کدکننده EF,LF, PA هستند که تمامی آنها روی پلاسמיד pxo1 قرار دارند هر سه فاکتور به طور جداگانه کلون و سکانس شده اند (۱۳). تخلیص و جداسازی اجزای توکسین *B.anthraxis* به منظور مطالعه ساختمان و نحوه عملکرد هر یک از آنها و نیز به منظور تهیه و تولید واکسن های انسانی و دامی و بهبود کیفیت اثر این واکسن ها، از سال های گذشته مورد توجه محققان بوده است (۶، ۷). هدف اصلی این تحقیق نیز تهیه خالص ترین پادگن شاربن جهت استفاده در سیستم های مختلف تشخیص برای به کارگیری بهترین سیستم ها جهت شناسایی عامل مربوطه می باشد که در قدم های بعدی با دستیابی به پادگن های تخلیص یافته به صورت آزمایشگاهی شاید بتوان به پادگن های تشخیصی اختصاصی و یا واکسن های Sub unit نیز دست یافت.

جهت تخلیص پادگن ها از دو تکنیک اولترا فیلتر (میلی پور) که در حقیقت نوعی غربالگر مولکولی است (۹) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) شرکت (waters) با بهره گیری از ستون فاز معکوس (RPC18) استفاده شد.

مواد و روش ها**کشت باکتری**

ابتدا یک ویال لیوفلیزه از سویه 34F2 (موجود در بخش بی هوازی موسسه رازی) در محیط بلاد آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب رشد داده شد پس از اطمینان از خلوص باکتری بوسیله رنگ آمیزی و کنترل میکروسکوپی باکتری رشد کرده به محیط RM منتقل گردید (۸)، تا به مدت ۱۸ الی ۲۰ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد رشد داده شد.

Tris/HCl ۰/۰۶۲۵ مولار با pH: ۶/۸ SDS ۲٪- گلیسرول ۱۰ درصد- مرکاپتواتانول ۵ درصد- برومو فنل بلو ۰/۰۰۱ درصد.

آماده سازی نمونه

آماده سازی نمونه به این صورت انجام شد که نمونه و بافر نمونه (در داخل میکروتیوب) به نسبت ۱:۱ به یکدیگر افزوده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار گرفت. در نهایت مقدار بسیار کمی سوکروز به آن افزوده و ورتکس گردید.

مراحل انجام الکتروفورز پادگن ها

(۱) پس از تهیه ژل ها، ابتدا ژل جداکننده در فضای دو شیشه الکتروفورز که قبلاً آماده و با آب مقطر تست شده بود، ریخته و روی آن با آب مقطر پوشانده شد.
(۲) بعد از بسته شدن ژل و حذف آب موجود، ژل تنظیم کننده ریخته شد و بلافاصله شانه داخل ژل قرار گرفت.
(۳) بعد از بسته شدن ژل تنظیم کننده، نمونه ها داخل چاهک ها ریخته شد و کل مجموعه داخل تانک بافر قرار گرفت به طوری که سطح نمونه ها کاملاً با بافر پوشانده شد.
(۴) سپس جریان برق برقرار گردید و با ولتاژی معادل ۱۲۰ ولت حرکت نمونه ها در ژل آغاز شد. بعد از رسیدن نمونه ها به انتهای ژل، جریان برق قطع و ژل از فضای دو شیشه خارج گردید. سپس ژل بالایی بریده و به مدت ۱ - ۰/۵ ساعت داخل محلول رنگ قرار داده شد. پس از این مرحله ژل از محلول رنگ خارج شده و داخل محلول رنگ بر قرار داده شد. ژل تا ظهور باندهای روی آن داخل محلول رنگ بر باقی ماند.

تعیین وزن مولکولی پروتئین ها

وزن مولکولی پروتئین مورد نظر به آسانی از روی حرکت نسبی آن بر روی ژل تعیین می شود. بطوری که در کنار نمونه های پروتئینی به کار برده شده (EF, LF, PA) از مارکر پروتئینی استاندارد که وزن مولکولی مشخص دارند در مقایسه استفاده گردید.

نتایج

استخراج پروتئین از محیط کشت

حجم کلی کشت باکتری روی محیط RM ۶ لیتر بود. بعد از سانتریفوژ و جدا کردن باکتری از مایع رویی و استریل کردن مایع رویی حجم آن به ۵/۵ لیتر کاهش یافت. مقدار پروتئین مایع جدا شده که به روش لوری محاسبه گردید ۱/۴۴ mg/ml بدست آمد.

اولترا فیلتر با کاتاف ۳۰۰۰۰

با انجام اولترافیلتر با کاتاف ۳۰۰۰۰ و تغلیظ مایع رویی استخراج شده حجم آن به ۵۰۰ میلی لیتر کاهش یافت. مقدار پروتئین محلول بدست آمده از اولترافیلتر با کاتاف ۳۰۰۰۰ برابر با ۲/۳ mg/ml محاسبه شد.

اولترافیلتر با کاتاف ۵۰۰۰۰

محلول پروتئینی بدست آمده از اولترافیلتر با کاتاف ۳۰۰۰۰ مجدداً با

جداسازی توکسین

خلوص میزان رشد باکتری ها بوسیله رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی انجام شده سپس جداسازی باکتری از مایع رویی توسط سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ انجام گرفت و pH آن روی ۸ تنظیم گردید، سپس مایع جدا شده توسط فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرون استریل شده و نهایتاً EDTA یک درصد به مایع رویی به منظور حفظ اجزای توکسین باکتری افزوده گردید.

اولترافیلتراسیون

در انجام عملیات ابتدا محلول رویی جدا شده از باکتری را از یک غشا با حد جداسازی (cut off) ۳۰۰۰۰ که از جنس استات سلولز می باشد. عبور داده از آنجا که وزن مولکولی پروتئین های مورد نظر ما بین ۸۰ KDa و ۹۰ KDa قرار دارد محلول مورد نظر ما قسمتی از محلول اصلی بوده که از غشا دستگاه عبور نمی کند و آن را جمع آوری نموده سپس از کاتاف ۵۰۰۰۰ از جنس پلی اتر سولفون عبور داده این بار هم محلول باقی مانده جمع آوری شده و از کاتاف ۱۰۰۰۰۰ از جنس سلولز تغییر یافته عبور داده و این بار محلول خروجی جمع آوری گردید.

ترسیب پروتئین ها

افزودن سولفات آمونیوم ۷۰ درصد و مخلوط نمودن آن در ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شب سبب ترسیب پروتئین ها شده که با استفاده از سانتریفوژ ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه رسوب بدست آمده را در بافر TEA (pH=۸) حل نموده و علیه همان بافر به مدت ۵ ساعت بطوری که در هر ساعت بافر تعویض می گردید: دیالیز شد.

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

شرایط و مشخصات دستگاه عبارتست از: HPLC مدل Preparative ۴۸۶ شرکت Waters مجهز به دتکتور UV که به کامپیوتر مدل NEC-Image ۴۶۶۰۳ متصل شده است. نوع ستون به کار رفته ET25014 Nuclosil 4000-7PEI. سرعت فاز متحرک ۱ mg/ml و میزان تزریق ۱۰۰ میکرولیتر بود. برای تزریق نمونه بدست آمده (نمونه دیالیز شده بدست آمده از اولترافیلتر با کاتاف ۱۰۰۰۰۰) به دستگاه HPLC ابتدا آن را از فیلترهای Millipore با سایز ۰/۴۵ میکرون عبور داده و سپس وارد ستون مورد نظر به همراه بافر 20mM Tri Ethanolamine / NaOH / PH=8 گردید. محلول خارج شده از ستون در طول موج ۲۵۴ نانومتر بررسی شد.

الکتروفورز SDS-PAGE برای بررسی پادگن ها

ژل تنظیم کننده ۴ درصد و ژل جداکننده ۱۰ درصد آکریل آمید که شامل محلول های زخیره آکریل آمید و بیس آکریل آمید، آمونیوم پرسولفات ۱/۵ درصد، SDS ۱۰ درصد و TEMED می باشد. محلول رنگ آمیزی عبارتست از: متانول ۳۵ درصد اسید استیک ۷/۵ درصد رنگ کوماسی بلو: ۱ گرم در لیتر و محلول رنگ بری نیز مانند محلول رنگ تهیه می گردد و تنها فاقد رنگ می باشد. همچنین بافر نمونه (Sample buffer) شامل:

۲- پیک دوم ۱/۵ میلی لیتر (LF) ۳- پیک سوم ۱ میلی لیتر (EF) می باشد که هر یک جداگانه مورد سنجش پروتئین قرار گرفت و میزان پروتئین هر یک به قرار زیر می باشد.

EF = 0.6 mg/ml

LF = 0.77mg/ml

PA = 0.75mg/ml

SDS-PAGE پادتن ها

نمونه های بدست آمده از HPLC را به همراه مارکر پروتئینی بر روی ژل برده و در شکل زیر LF، PA و EF به ترتیب با وزن مولکولی های ۸۶، ۸۷ و ۸۵ کیلودالتون مشخص می باشند.

بحث

سویه های باسیلوس آنتراسیس قادر به تولید توکسین می باشند. اجزای تشکیل دهنده این توکسین (EF، LF و PA) از جنس پروتئین هستند که بعد از ساخته شدن در سیتوپلاسم باکتری به محیط خارج ریخته می شوند. سویه ۷۷۷۰ تنها قادر به تولید PA می باشد و فاقد دو فاکتور دیگر است سویه های ۴۲۲۹، ۶۶۰۲ از *B.anthraxis* بیماریزا نبوده و برای تحقیق مناسباند اما این سوش ها قادر به تولید توکسین

کاتاف ۵۰۰۰۰ اولترا فیلتر شد که در نتیجه این عمل حجم محلول به ۷۵ میلی لیتر تقلیل یافت.

اولترا فیلتر با کاتاف ۱۰۰۰۰۰

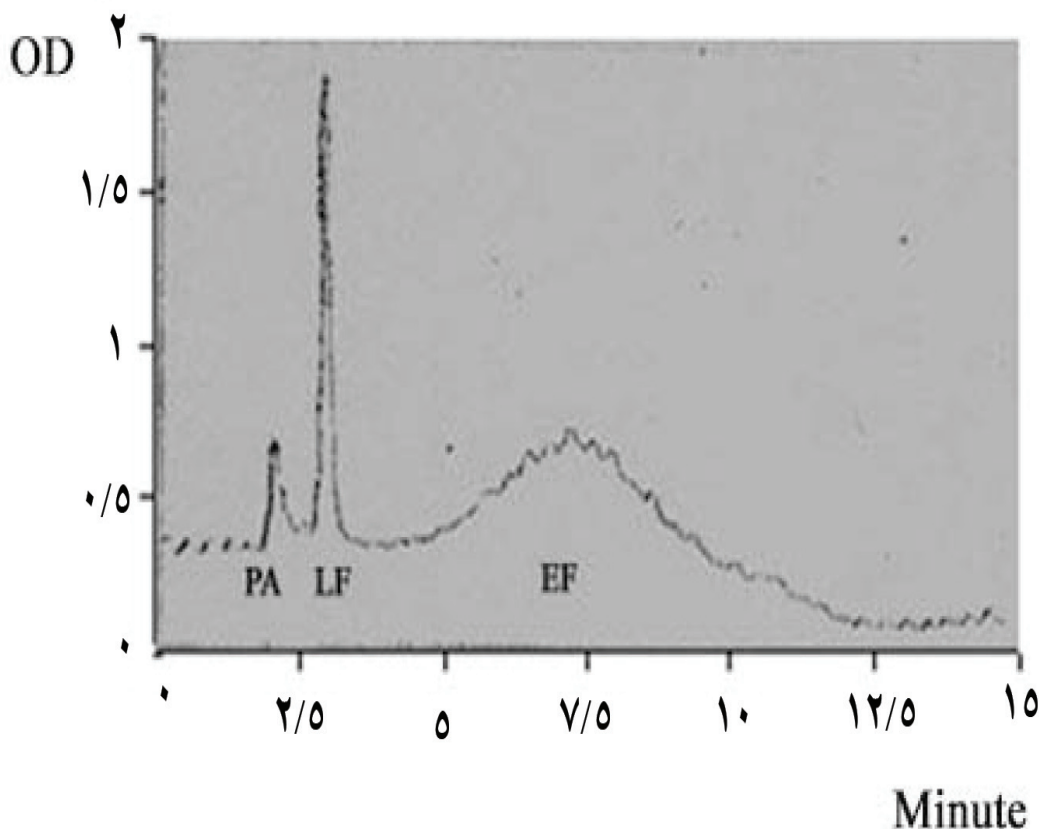
محلول پروتئینی بدست آمده از اولترافیلتر با کاتاف ۵۰۰۰۰ بار دیگر با کاتاف ۱۰۰۰۰۰ اولترا فیلتر شد حجم نمونه در پایان عمل فیلتر ۷۳ میلی لیتر بود.

ترسیب پروتئین ها

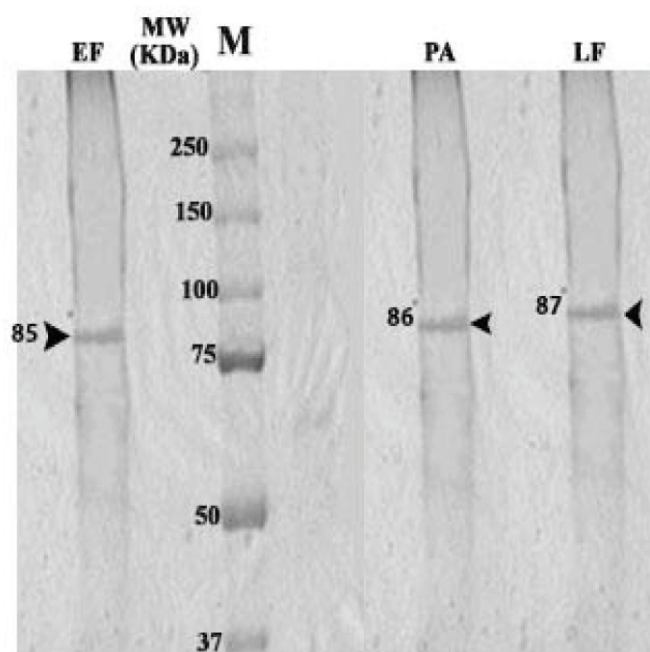
سولفات آمونیوم توزین شده به تدریج به محلول مورد نظر افزوده گردید و پس از یک شب هم خوردن در ۴ درجه سانتی گراد توسط سانتریفوژ بادور ۱۵۰۰۰ پروتئین ها رسوب کرده و در بافر TEA pH=۸، حل گردید که در مجموع ۱۴ میلی لیتر محلول پروتئین غلیظ بدست آمد. علیه بافر مشابه دیالیز گردید.

HPLC نمونه

نتیجه حاصل از HPLC که در نمودار زیر مشخص می باشد سه فراکسیون مشخص است که شامل: ۱- پیک اول ۰/۷ میلی لیتر (PA)



شکل ۱- نمودار منحنی پادتن ها PA، LF، EF با HPLC



شکل ۲- الکتروفورز پادگن‌های PA، LF، EF جداسازی شده با HPLC

وی برای جداسازی از روش کروماتوگرافی با ژل هیدروکسی آپاتیت استفاده نمود که البته به صورت مکتوب در جایی گزارش نشده است، در سال ۱۹۹۶ Chul-soon Choi و همکارانش (۳) توسط متد FPLC، کروماتوگرافی با ستون Mono Q موفق به جداسازی پادگن‌های *Banthracis* شده‌اند که محصول عمل را روی الکتروفورز ۱۰ درصد برده‌اند و موفق به بدست آوردن باند ۸۵ کیلو دالتنی PA شدند. در سال ۱۹۹۷ Frachaus و همکارانش (۵) با بکار بردن ستون کروماتوگرافی تبادلگری یونی و HPLC با فاز معکوس موفق به جداسازی جزء PA با ۹۵ درصد خلوص شدند. در این تحقیق برای جداسازی و تخلیص از دستگاه اولترافیلتر به همراه HPLC استفاده گردید بطوری که اجزای آگزو توکسین به طور کامل در دستگاه HPLC مورد جداسازی و تفکیک قرار گرفت و به ترتیب PA، LF، EF با وزن‌های مولکولی ۸۷، ۸۵، ۸۶ گزارش شدند. Robert Mabry و همکارانش (۱۰) در سال ۲۰۰۵ از متد اولترا فیلتراسیون با کاتاف ۱۰۰۰۰ برای تخلیص پادگن نوترکیبی که تهیه نموده بودند استفاده کردند. تحقیق حاضر با بررسی و مطالعه بر روی نتایج حاصل از تحقیق دانشمندان و بهره‌گیری بهینه از تلفیق دو روش اولترا فیلتراسیون و متد HPLC به نتایج مطلوب‌تری رسید که البته قابل تطبیق با نتایج سایر دانشمندان در این زمینه می‌باشد و همان طور که در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است سه پادگن PA، LF، EF با روش HPLC از همدیگر جدا شده و با SDS-PAGE وزن ملکولی دقیق همراه با خلوص را نشان دادند.

نیز نمی‌باشند سوش‌هایی مثل Ames, Buffalo, Colorado, AH قادر به تولید توکسین و اجزای آن به صورت کامل هستند اما این سوش‌ها بیماری‌زا می‌باشند (۱۲). سویه 34F2 که در این تحقیق انتخاب شد علاوه بر تولید میزان قابل توجهی EF، LF، PA بیماری‌زا نیز نمی‌باشد. در انتخاب محیط کشت مناسب محققینی چون Bailie در سال ۲۰۰۱ (۱)، Heclay و Gold در سال ۱۹۴۹ (۷) و Gladstone در سال ۱۹۴۶ (۶) از محیط‌های کشت پروتئینی استفاده کردند اما اشکال عمده در تفکیک پروتئین‌های محیط کشت از توکسین باکتری بود که استفاده از محیط کشت حاوی اسیدهای آمینه و سایر مواد ضروری و حذف پروتئین‌ها و ماکرو مولکول‌های محیطی این مشکل را رفع می‌کند بطوری که در این تحقیق از محیط غیر پروتئینی RM (۸) برای جداسازی و تخلیص اجزای آگزو توکسین *Banthracis* استفاده شد.

در سال ۱۹۸۶ Doris و همکارانش (۴) با استفاده از روش Sequential immunosorbent chromatography و پادگن‌های مونوکلونال موفق به تخلیص و جداسازی EF، LF، PA گردیدند و وزن مولکولی آنها را ۸۷، ۸۵ و ۸۶ کیلو دالتون گزارش نمودند. همچنین Quin و همکارانش در سال ۱۹۸۸ (۲) توسط متد ژل فیلتراسیون و HPLC با ستون آنیونی و استفاده از کروماتوگرافی با DEAE- Cellulose تجربه‌ای داشتند. در سال ۱۹۹۵ خالدی موفق به تخلیص جزء PA آگزو توکسین *Banthracis* در بخش تولید و تحقیق هواری موسسه رازی گردید و وزن مولکولی PA را ۸۶ اعلام نمود

Bacillus anthracis the production of an immunizing antigen *invitro*. *I.Infect.* 84-91

8. Leppla, S.H., (1988) Production and purification of anthrax toxin. *Meth.Eny.*165- 168.

9. Muder, S.H (1991) Background for after filtration of protein solutions. *Cent.Afr.I.Med.*42:312-15.

10. Mabry,R., Mridula R., Geiger,R., Hubbard,G., Carrion, Jr R., Brasky,K., Patterson,J.L., Georgiou,G. and Iverson B. L(2005) Passive Protection against Anthrax by Using a High-Affinity Antitoxin Antibody Fragment Lacking an Fc Region. *J. Infection and Immunity.*73(12) 8362- 8368

11. Slack, R.C.B.(2002) *Medical microbiology, a guide to infections: Pathogenesis, Immunity Laboratory diagnosis and control*, 16nd Edn, CChurchill Lvingstone, London.

12. Vincent, P and Guy, P. (1996) Identification and characterization of bacillus anthracis by multiplex PCR and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS.Microbiol.*9-16.

13. Welkos, S.L. and Love. I.R. (1988) Sequenced and analysis of the DNA encoding protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Gene.* 69:287-300.

منابع مورد استفاده

1. Bailie, L and Read, T.D. (2001) *Bacillus anthracites*, a bug with attitude. *Curr opin microbiol.* 4:78-81

2 - Quinn, C. P., Shone, C. C., Turnbull, P C, and Melling, J. (1988); Purification of anthrax-toxin components by high-performance anion-exchange, gel-filtration and hydrophobic-interaction chromatography. *Biochem J.* 15; 252(3): 753-758

3-Chul-Soon, C., Sang-In, C., Ki-Jeong,K., Chan-Ho, C., Won-Yong, K and Yong-Tae, Y. (1996) Study on the antigens for cell free vaccine and retrospective diagnosis of anthrax: Production of protective antigen of *Bacillus anthracis*. *J.Korean Soc. Microbiol.*, 31(6), 631-641

4. Doris, K and Larson ,P (1986) Separation of three exotoxigenic factors of bacillus anthracis by sequential immuno sorbent chromatography. *J.Toxicon.*26:10:913-921

5.Farchaus, J.W and Ribot, W.J (1998) Fermentation, purification and characterization of protective antigen from a recombinant a virulent strain of *Bacillus anthracis*. *Applied and environ microbial.* 64:3: 982-991

6. Gladstone, G.P (1946) Immunity to anthrax, protective antigen present in cell free culture filtration. *Br.J.EXP.Pathol.*27:394-418

7. Heckly, R.I and Gold wasser, E (1949) Studies on identification

