ایجاد آنتی‌بادی علیه پروتئین سطحی باکتری ویبریو کلرا OmpW O1 با تزریق آنتی‌ژن نوترکیب به بدن میزبان رت

جمال رشیدیانی[1]، مهدی کمالی[2]، رضا رنجبر[3*]، حمید کوشکی[4]، منصور منصوری[5]

1. کارشناس ارشد نانوبیوتکنولوژی ، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران
2. استادیار مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران
3. دانشیار باکتری شناسی پزشکی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران
4. کارشناس ارشد مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران
5. کارشناس ارشد مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران

*** نشانی برای مکاتبه:** مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ranjbarre@gmail.com

دریافت مقاله: شهریور نود پذیرش برای چاپ: خرداد نود و یک

چکیده

زمینه و اهداف: *وبا یک بیماری حاد روده‌ای و عامل آن از خانواده ویبریوناسه‌ها می‌باشد. از میان بیش از یک صد عضو این خانواده تنها ویبریو کلرا O1 و ویبریو کلرا O139 برای انسان و بعضی از آب زیان بیماری‌زا می‌باشند. پروتئین‌های سطحی این باکتری عامل کلونیزاسیون بوده و ایمونوژن هستند. هدف از انجام این تحقیق، تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آنتی‌ژن نوترکیب ompW و بررسی اختصاصی بودن آن به‌عنوان یک هدف تشخیصی می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه، از نمونه آنتی‌ژن نوترکیب به حیوان آزمایشگاهی (رت) تزریق شد. پس از چهار مرتبه تزریق زیر جلدی، سرم رت‌ها جمع‌آوری و با استفاده از ستون پروتئین G تخلیص شده و کارایی آنتی‌بادی با استفاده از واکنش الایزا مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *غظت پروتئین نوترکیب به روش برادفورد حدود 0/9µg/ml اندازه‌گیری شد. در واکنش الایزا پاسخ سرم رت به پروتئین نوترکیب تا رقت 1/25000 مثبت بود. غلظت آنتی‌بادی تخلیص شده با استفاده از برادفورد حدود 0/78µg/ml برآورد شد. واکنش الایزای آنتی‌بادی علیه ompW در برخورد با سوسپانسیون باکتریای ویبریو کلرا O1 با OD_{640}= 0/5 تا رقت 1/25000 مثبت بود و با سایر با کتری‌های روده‌ای واکنش نشان نداد.*

نتیجه‌گیری: *پروتئین نوترکیب ompW ایمونوژن بوده و آنتی‌بادی تولید شده علیه‌ی آن قادر به شناسایی سلول کامل باکتری ویبریو کلرا O1 می‌باشد و با گروه‌های مشابه دیگر واکنش متقاطع ندارد.*

واژگان کلیدی: ویبریو کلرا، پروتئین‌های سطحی (omp)، آنتی‌بادی پلی‌کلونال

مقدمه

وبا یک بیماری حاد روده‌ای است که عامل آن از خانواده ویبریوناسه‌ها می‌باشد. از میان بیش از یک‌صد عضو این خانواده تنها *ویبریو کلرا* O1 و *ویبریو کلرا* O139 برای انسان و بعضی از آب زیان بیماری‌زا می‌باشند(3-1). در بین آنتی‌ژن‌های باکتری ویبریو کلرا O1، سموم ترشحی، لیپوپلی‌ساکاریدها و پروتئین‌های سطحی بسیار حائز اهمیت هستند(4-6).

پروتئین‌های سطحی یا Outer Membrane Protein (omp) ایمونوژن هستند. این پروتئین‌ها عامل کلونیزاسیون بوده و چنان چه باکتری فاقد آن باشد، توانایی اتصال به دیواره‌ی روده را نخواهد داشت(9-7). تاکنون پروتئین های سطحی مختلف با وزن‌های مولکولی متفاوت (22 ،30 ،38 ،42 و 43 K Da) شناسایی شده‌اند(8). ompW پروتئینی است با وزن مولکولی 22 K Da و بسیار ایمونوژن که برای اولین بار در سال 1990 گزارش داده شد(10). توالی ژنی مربوط به OmpW که در کروموزوم کوچک باکتری قرار گرفته، بین بیوتیپ‌ها و سروتایپ‌های مختلف *ویبریو کلرا* بسیار حفاظت شده است. این توالی با وجودی که بین بیوتیپ‌های مختلف *ویبریو کلرا* مشترک است، کاملاً اختصاصی بوده و برای شناسایی سویه‌های بیماری‌زای ویبریو مورد استفاده قرار می‌گیرد(2و3). با وجود این‌که توالی آن با توالی پروتئین های سطحی موجود در *اشرشیا کلی* بیشترین همگونی را داراست (درحدود 60 درصد) ولی آنتی‌سرم علیه *ویبریو کلرا* با هیچ یک از گونه‌های روده‌ای از قبیل *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا*، شیگلا و... واکنش متقاطع انجام نمی‌دهد(6و7). در حالی که میان omp U *ویبریو کلرا* و omp A *اشرشیا کلی* واکنش متقاطع مشاهده شده است(11).

این مطالعه با هدف ایجاد آنتی‌بادی علیه پروتئین سطحی باکتری ویبریو کلرا O1 OmpW با تزریق آنتی‌ژن نوترکیب به بدن میزبان رت انجام شد.

روش کار

نمونه پروتئین نوترکیب ompW که در تحقیق قبلی توسط تیم تحقیق کنونی تهیه شده بود، با استفاده از روش برادفورد پروتئین سنجی شد. به منظور ایمن‌سازی حیوانات آزمایشگاهی، طی چهار مرحله به صورت زیر جلدی به موش‌های رت تزریق گردید. تزریق دوم به فاصله 20 روز از تزریق اول و تزریق بعدی به فواصل 18 روز صورت گرفت. در تزریق اول ادجوانت کامل فروند و در تزریق‌های بعدی ادجوانت ناقص فروند استفاده شد. در مرحله‌ی اول تزریق از µg 50 پروتئین و در مراحل بعدی از µg 100 پروتئین، برای هر موش استفاده شد(12 و13).

پس از اطمینان از تولید آنتی‌بادی در بدن میزبان رت، اقدام به خون‌گیری و تخلیص سرم آن‌ها شد. خون‌گیری از موش‌ها توسط پیپت پاستور، و از گوشه‌ی چشم آن‌ها صورت گرفت. قطرات خون موش‌ها در داخل میکروتیوپ‌های جداگانه جمع‌آوری، و سپس میکروتیوپ‌ها به مدت یک ساعت در دمای 37^oC گرماگذاری شد. سپس میکروتیوپ‌ها به مدت 10 دقیقه در دمای 4^oC، و با سرعت 1500 rpm سانتریوفیوژ شد. مایع شفاف رویی (سرم) به میکروتیوپ‌های جدید منتقل و به منظور استفاده در مراحل بعدی در دمای 4^oC نگهداری شد(14).

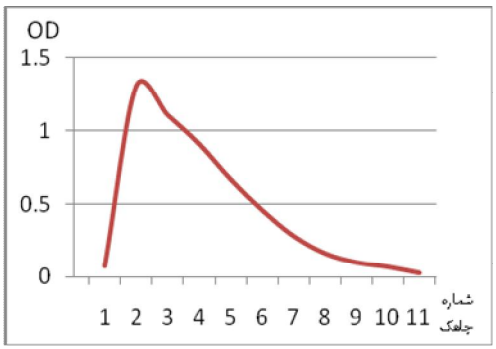
برای تخلیص آنتی‌بادی IgG از ستون پروتئین G استفاده شد. ابتدا ستون در سه نوبت (هر نوبت 5 ml) با محلول‌های 10 و 100 میلی‌مولار تریس (pH= 8) شستشو داده شد. سپس، معادل 0/1 حجم سرم، محلول یک مولار تریس (pH= 8) به آن افزوده، و پس از ورتکس به ستون منتقل گردید، و در نهایت خروجی ستون جمع‌آوری شد(15). برای تعین غلظت آنتی‌بادی با روش برادفورد نمونه‌های جمع‌آوری شده، در مرحله‌ی قبل را پروتئین سنجی(13) نموده و جهت حصول اطمینان با استفاده از ژل 10 درصد SDS-PAGE الکتروفورز گردید. این عمل در دو مرحله یکی با سمپل‌بافر بدون 2ME، و یکی با سمپل‌بافر دارای 2ME انجام شد. در مرحله‌ی آخر نمونه‌های واجد IgG به میزان مطلوب علامت‌گذاری و جهت استفاده‌های بعدی به دمای 20^oC - منتقل شد.

برای ارزیابی گزینش‌پذیری آنتی‌بادی نسبت به آنتی‌ژن موجود در دیواره‌ی سلولی باکتری *ویبریو کلرا*، ابتدا سوسپانسیون میکروبی در فرمالین 0/5% به مدت 12 الی 18 ساعت در یخچال انکوبه، سپس سوسپانسیون حاصله همراه بافر کوتینگ در کف پلیت الایزا تثبیت شد. پس از افزودن آنتی‌بادی و گرما گذاری مجدد، به چاهک‌ها آنتی‌بادی نشان‌دار ثانویه افزوده و با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 نانومتر جذب نمونه‌ها بررسی شد(16 و17).

این آزمایش برای باکتری‌های *شیگلا، اشرشیا کلی و سالمونلا* نیز تکرار، و صحت شناسائی آنتی‌ژن توسط آنتی‌بادی ارزیابی شد.

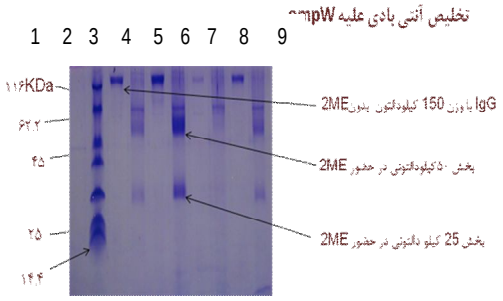
یافته ها

از مقایسه میزان جذب نمونه‌های پروتئین نوترکیب با منحنی استاندارد، غلظت OmpW تخلیص شده به میزان µg/µl 0/9 تعیین شد. پس از چهار مرتبه تزریق آنتی‌ژن نوترکیب، سرم رت‌ها با روش الایزا مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج آزمون الایزا که در نمودار 1 ارائه شده است، بیان‌گر عیار آنتی‌بادی تا رقت 1/25000 بود .



نمودار 1: تیتر آنتی‌بادی در سرم رت

پس از تخلیص آنتی‌بادی با استفاده از ستون تخلیص پروتئینG ، با استفاده از ژل الکتروفورز صحت حضور آنتی‌بادی در محلول نهایی بررسی شد. ژل SDS-PAGE. بیان‌گر حضور و خلوص آنتی‌بادی بود. از آنجا که IgGوزنی معادل 150 کیلو دالتون دارد در حضور 2 ME تبدیل به چهار قطعه 25 و50 کیلو دالتونی تبدیل شده که دو به دو روی هم قرار گرفته، و عملاً دو باند در ژل مشاهده شد (شکل 1). پروتئین‌سنجی با روش برادفورد از نمونه‌ی آنتی‌بادی تخلیص شده توسط ستون G مقدار آنتی‌بادی را به میزان µg/µl 0/78 معین کرد.



شکل 1: تخلیص آنتی‌بادی از سرم رت با ستون پروتئین G: چاهک 1 مارکر پروتئینی، چاهک 2، 4، 6 و 8 پروتئین کامل آنتی‌بادی بدون حضور2ME ، چاهک 3، 5 ، 7 و 9 پروتئین شکسته شده توسط 2ME .

قدرت شناسائی آنتی‌ژن سطحی باکتری سالم توسط آزمایش الایزا از باکتری سالم *ویبریو کلرا* O1 به عمل آمد. نتیجه‌ی آزمون الایزا در جدول 1 ارائه شده است، آزمایش الایزا از باکتری سالم با سه گونه‌ی *اشرشیا کلی، کلبسیلا و شیگلا* به عمل آمد. نتایج آزمون الایزا حاکی از اختصاصیت آنتی‌بادی تولید شده، *برای ویبریو کلرا* O1 بود. در آزمون الایزا با *اشرشیا کلی* رقت‌های 1/200 و1/400 سرم مثبت بود که این نکته بیانگر قرابت آنتی‌ژنیک این دو گونه می‌باشد.

جدول 1 : ارزیابی قدرت شناسایی باکتری سالم ویبریو کلرا O1 توسط آنتی‌بادی

	آنتی بادی	سوسپانسیون باکتریایی	کونژوگه	میزان OD *(450nm)*
A1	-	-	+	0.16
B1	-	-	-	0.055
C1	+	-	-	0.061
D1	+	-	+	0.50
E1	-	+	+	0.19
F1	+	+(0.25)	+	1.004
G1	+	+1/2(0.25)	+	0.961
H1	+	+1/4(0.25)	+	0.889
A2	+	+1/8(0.25)	+	0.783
B2	+	+1/16(0.25)	+	0.668
2	+	+1/32(0.25)	+	0.592
D2	+	+1/64(0.25)	+	0.548
E2	+	+1/128(0.25)	+	0.325
F2	+	+1/256(0.25)	+	0.198
G2	+	+1/512(0.25)	+	0.076
H2	+	+1/1024(0.25)	+	0.056

چاهک‌های A1، B1 و C1 کنترل‌های منفی. D1 کنترل مثبت. F1 رقت نخست از سوسپانسیون میکروبی با جذب 1/004 در طول موج 640 و بقیه رقت سریالی از آن .که تا چاهک F2 (رقت 1/25600) مثبت بود.

بحث

علاوه بر آنتی‌بادی علیه سموم ویبریو کلرا، آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های سطحی آن نیز ایجاد ایمنی قابل توجهی در مقابل بیماری می‌نمایند(4، 18، 19). با توجه به این‌که هدف غایی این تحقیق، شناسایی باکتری در مراحل قبل از کلونیزاسیون و ترشح سموم بود، آنتی‌بادی سطحی مورد توجه قرار گرفت. از بین آنتی‌ژن‌های سطحی با توجه به این که پروتئین ها عامل کلونیزاسیون به پرزهای روده‌ی کوچک بوده(20) و باکتری‌های فاقد omp قادر به اتصال به روده نمی‌باشند(6) ، لذا omp برای این تحقیق انتخاب شد اغلب گروه‌ها تحقیقاتی آنتی‌ژن omp را از تخلیص پروتئین‌های سطحی باکتری بدست آورده اند(21 و22). آنتی‌ژن نوترکیب کاملاً خالص بوده آنتی‌بادی علیه آن یک‌نواخت‌تر خواهد بود. این آنتی‌ژن در مرکز نانوبیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج) تولید شده، بنابراین به عنوان نامزد نهائی انتخاب گردید(21).

با تزریق آنتی‌ژن به صورت زیرجلدی به بدن رت آنتی‌بادی به دست آمد. دلیل انتخاب میزبان رت دست‌یابی به میزان کافی از آنتی‌بادی بود. از آنجا که آنتی‌بادی کانجوگه علیه رت در دسترس نبود زمان‌بندی تحقیق با مشکل مواجه شد. گروه‌های تحقیقاتی دیگر یا از میزبان خرگوش استفاده نموده بودند، یا از موش(8، 24-21). با توجه به حجم زیاد سرم مورد نیاز و خون‌گیری راحت برای تحقیق‌های بعدی پیشنهاد می‌شود از خرگوش استفاده گردد. پس از تزریق دوم تا تزریق چهارم به صورت هفتگی با استفاده از الایزا پاسخ ایمنی میزبان به آنتی‌ژن مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج الایزا نشان داد که هفته‌ی هشتم پس از اولین تزریق، بهترین زمان برای خون‌گیری می‌باشد زیرا در این زمان، هم تیتر آنتی‌بادی در بالاترین حد خود بوده و هم بیشترین نوع آنتی‌بادی‌ها در این فاز از نوع IgG می‌باشد(22).

تهیه آنتی‌بادی خالص اولین قدم در رسیدن به آنتی‌بادی استاندارد است. روش‌ها و تکنیک‌های مختلفی برای تخلیص آنتی‌بادی گزارش شده است. ژل‌کروماتوگرافی، گروماتوگرافی تعویض یونی، دیالیز و رسوب دهی با غلظت نمکی هر کدام بر یکی از خواص ایمونوگلوبولین‌ها پایه‌ریزی شده‌اند(28-25). استفاده از ستون G برای تخلیص پروتئین سابقه‌ی طولانی دارد(9، 31-29). لذا با توجه به مزایا و در دسترس بودن، از طریق کروماتوگرافی میل‌ترکیبی و با استفاده از کرو ماتوگرافی ستون G آنتی‌بادی خالص بدست آمد. آنتی‌بادی مربوطه دارای وزن مولکولی حدود 150 کیلودالتون بود.

از آنجا که زنجیره پروتئینی آنتی‌بادی بر اثر 2ME شکسته و تبدیل به دو زنجیره سنگین (50 کیلو دالتونی) و دو زنجیره سبک (25 کیلودالتونی) می‌شود. از این خاصیت جهت تایید نوع آنتی‌بادی (IgG) و خالص بودن آن استفاده شد(6).

در منابع اشاره شده بود، که آنتی‌بادی علیه omp باکتری ویبریو کلرا به رغم تشابه توالی ژنی بالا با سویه‌های اشرشیا کلی واکنش نمی‌دهد در حالی که در غلظت‌های بالای باکتریایی با آن واکنش نشان داد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که پروتئین نوترکیب ompW ایمونوژن بوده و قادر به اتصال به آنتی‌ژن سطحی موجود در دیواره‌ی باکتری می‌باشد. این آنتی‌بادی برای باکتری ویبریو کلرا O1 اختصاصی بوده و می‌توان از آن برای شناسائی سریع استفاده نمود.

REFERENCES

1. Nandy RK, Sengupta T K, Mukhopadhyay S, Ghose AC. A comparative study of the properties of Vibrio cholerae 0139, 01 and other non-01 strains. J. Med. Microbiol., 1999. **42** p. 251-257.

2. Tuteja, U., et al., Simultaneous direct detection of toxigenic and nontoxigenic Vibrio cholerae from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. Journal of Medical Microbiology, 2007. **56**: p. 1340-1345.

3. Nandi, B., et al., Rapid Method for Species-Specific Identification of Vibrio cholerae Using Primers Targeted to the Gene of Outer Membrane Protein OmpW. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2000. **38**(11): p. 4145–4151.

4. Finkelstein, R.A., Cholera, Vibrio cholerae O1 and O139, and Other Pathogenic. 1996.

5. Chatterjee, S.N. and K. Chaudhuri, Lipopolysaccharides of Vibrio cholerae III .Biological functions. Biochimica et Biophysica Acta 2006: p. 1-16.

6. Villeneuve, S., et al., Immunochemical characterization of an Ogawa-Inaba common antigenic determinant of Vibrio cholerae O1. Microbiology, 1999. **145 (Pt 9)**: p. 2477-84.

7. SPERANDIO ,V., et al., The OmpU Outer Membrane Protein, a Potential Adherence Factor of Vibrio cholerae. INFECTION AND IMMUNITY, 1995. **63**(11): p. 4433–4438 Vol. 63, No. 11.

8. Margaret, D., et al., Antisera to selected outer membrane proteins of Vibrio cholerae protect against challenge with homologous and heterologous strains of V. cholerae. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1998. **22**: p. 303-308.

9. Igbinosa, E.O. and A.I. Okoh, Toxigenic Vibrio cholerae strains and their associated malaisesAfrican Microbiology Research Vol. 3(5) pp. 200-211 May, 2009, 2009. **3**(5): p. 200-211

10. Jalajakumari, M.B. and P.A. Manning, Nucleotide sequence of the gene, ompW, encoding a 22kDa immunogenic outer membrane protein of Vibrio cholerae. Nucleic Acids Research, 1990. **1** :(۸)۸p. 2180.

11. Urmil, T., et al., Simultaneous direct detection of toxigenic and nontoxigenic Vibrio cholerae from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. Journal of Medical Microbiology, 2007. **56**: p. 1340-1345.

12. Besch, E.L., B.J .Chou, and C.E. Cornelius, Physiological responses to blood collection methods in rats. Proc Soc Exp Biol Med, 1971. **138**(3): p. 1019-21.

13. Singh, B.P., et al., Evaluation of protein assay methods for pollen and fungal spore extracts. Biochem Int, 1992 :(۳)۲۷ .p. 477-84.

14.Janet, H. and R. LV, Methods of Blood Collection in the Mouse. Lab Animal, 2000. **29**(10.(

15.flemingtonlab, K., Affinity purification of antibody using GST-Fusion proteins crosslinked to glutathione columns.

16.Prieto, C.I., et al ,.Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bound Moraxella bovis pili. Vet Microbiol, 2003. **91**(2-3): p. 157-68.

17.Claudia, I.P., et al., Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bound Moraxella bovis pili. Veterinary Microbiology, 2003. **91**: p. 157–168.

18.Svennerholm, A.M. and J. Holmgren, Synergistic protective effect in rabbits of immunization with Vibrio cholerae lipopolysaccharide and toxin/toxoid. Infect Immun, 1976. **13**(3): p. 735-40.

19.Pierce, N.F .and R.B. Sack, Immune response of the intestinal mucosa to cholera toxoid. J Infect Dis, 1977. **136 Suppl**: p. S113-7.

20.Eubanks, E.R., M.N. Guentzel, and L.J. Berry, Evaluation of surface components of Vibrio cholerae as protective immunogens. Infect Immun, 1977. **15**(2): p. 533-8.

21.STEPHEN, D.S., et al., Evaluation of the Human Immune Response to Outer Membrane Proteins of Vibrio cholerae. INFECTION AND IMMUNITY, 1984. **44**(2): p. 439- 444

22.MARTINEZ, A.G., et al., Identification and Strain Differentiation of Vibrio cholerae by Using Polyclonal Antibodies against Outer Membrane Proteins. CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY :(۴)۸ .۲۰۰۱ p. 768–771.

23.Enroth, H. and L. Engstrand, Immunomagnetic separation and PCR for detection of Helicobacter pylori in water and stool specimens. J Clin Microbiol, 1995. **33**(8): p. 2162-5.

24.Dryselius, R., K. Kurokawa, and I. Tetsuya, Identification and Strain Differentiation of Vibrio cholerae by Using Polyclonal Antibodies against Outer Membrane Proteins. Research in Microbiology 2007. **158**: **p. 479-480.**

25.Harrington, E.A., et al., pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11945-50.

26.Zhang, Y., et al., Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol, 1991. **5**(2): p. 381-91.

27.Kronvall, G., A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. J Immunol, 1973. **111**(5): p.۶-۱۴۰۱ .

28.Shakib, F., Is IgG-mediated hypersensitivity an autoimmune disease? Allergy, 1990. **45**(1): p. 1-9.

29.Jeong, W.C., et al., Charge Storage in Redox-active Azurin Monolayer on 11-MUA Modified Gold Surface. biochip journal, 2009. **32**(2.(

30.Nikolayenko, I.V., et al., Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. Ukrainica Bioorganica Acta 2005. **2**: p. 11.

31.Bruce, G., B.H. Wainer, and L.B. Hersh, Immunoaffinity purification of human choline acetyltransferase: comparison of the brain and placental enzymes. J Neurochem, 1985. **45**(2): p. 611-20.