View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۵، شماره ۶/بهمن و اسفند۱۳۹۲/۱۶۶-۱۵۹

مقاله پژوهشی

ارزیابی و مقایسه میزان ایمنی زایی پروتئین های نوترکیب زیر واحد اتصالی توکسین های *اشریشیا کلی* و بوتولینیوم تایپ A

علی میری[۱و۲]، دکتر جعفر سلیمیان[۳*]، احسان رضایی[۱و۴]، دکتر غلامرضا اولاد[۴]، دکتر مجتبی سعادتی[۱]، محمد علی عارف پور ترابی[۱]، دکتر فرید عزیزی جلیلیان[۵]

[۱]مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران؛ [۳]مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران؛ [۴]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران؛ [۵] مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام ،ایلام، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۲ اصلاح نهایی: ۹۲/۰۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۷/۱

چکیده:

زمینه و هدف: **در میان عوامل باکتریایی، شایع ترین عامل بیماری اسهال، باکتری اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک است. زیر واحد LTB سم این باکتری قادر به ایجاد مصونیتی شش ماهه است. *کلستریدیوم بوتولینوم* نیز عامل بیماری کشنده بوتولیسم می باشد و زیر واحد BoNT/A-Hc سم آن می تواند تا دو سال در برابر این بیماری مصونیت ایجاد کند. میزان ایمنی زایی که هر یک از این زیر واحدهای نوترکیب ایجاد می کنند، می تواند از عواملی باشد که در به وجود آمدن مصونیتی با ماندگاری متفاوت تأثیرگذار باشد. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه میزان تولید آنتی بادی ناشی از استفاده از دو پروتئین LTB و BONT/A-Hc در موش آزمایشگاهی بود.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی از باکتری E. Coli Bl21DE3 تراریخت شده با وکتور pET28a استفاده گردید. این وکتور حاوی ژن نوترکیب LTB اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک و ژن نوترکیب BONT/A-Hc بوتولینوم به طور جداگانه بود. پس از بهینه سازی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب LTB از فاز نامحلول و BoNT/A-Hc از فاز محلول عصاره سلولی، محصولات آن ها بر روی ژل SDS-PAGE بررسی گردید. موش های آزمایشگاهی به وسیله پروتئین های حاصل، ایمنی زایی شدند. تیتر آنتی بادی حاصل از هر دو نوع پروتئین نوترکیب با استفاده از آزمون آماری t-Test در نرم افزار SPSS ارزیابی و مورد مقایسه قرار گرفت.**

یافته ها: **پروتئین های نوترکیب بیان شده BoNT/A-Hc و LTB با ستون نیکل تخلیص شدند. پس از ایمنی زایی موش های آزمایشگاهی، تفاوت معناداری در تیتر آنتی بادی برای دو پروتئین BoNT/A-Hc و LTB مشاهده گردید (P<۰/۰۱).**

نتیجه گیری: **اختلاف کمی بین تیتر آنتی بادی برای دو پروتئین BoNT/A-Hc و LTB مشاهده گردید که می تواند به دلیل خاصیت قوی ادجوانسیتی LTB و ایمنی زایی ایجاد شده تقریباً یکسان، در فاصله زمانی محدود باشد.**

واژه‌های کلیدی: سنجش آنتی بادی، ایمنی زایی، سلول های خاطره، نوروتوکسین بوتولینوم، انتروتوکسین حساس به حرارت.

مقدمه:

رایج ترین عامل اسهال باکتریایی *اشیرشیاکلی* انتروتوکسیژنیک (Enterotoxigenic *Escherichia coli* = ETEC) است (۱). این باکتری بعد از روتا ویروس، به عنوان عامل دوم مرگ ومیر کودکان در کشورهای در حال توسعه است (۲،۱). ETEC پس از استقرار در سلول های اپیتلیالی روده و کلونیزاسیون، با ترشح انتروتوکسین حساس به حرارت (Letal toxin = LT) و یا انتروتوکسین مقاوم به حرارت موجب بیماریزایی می شود (۳). از این رو یکی از مهم ترین عوامل حدت زای این باکتری LT است که به عنوان کاندیدای واکسن نیز مطرح می باشد (۵-۲). این توکسین متشکل از یک زیر واحد سنگین (Letal toxin A = LTA) و یک زیر واحد سبک (Letal toxin B = LTB) است. زیر واحد LTA با وزن ۲۷ کیلو دالتون، خاصیت آنزیمی داشته و جزء سمی توکسین است. اما زیر واحد

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)- مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی- تلفن: ۰۲۱-۸۲۴۸۲۴۹۱، E-mail: jafar.salimian@gmail.com

LTB که ۱۱/۸ کیلو دالتون وزن دارد، به شکل پنتامری و غیرکووالان در اتصال با زیر واحد A می باشد. LTB قسمت اتصالی توکسین را شکل داده و به گیرنده های سطحی GM1 سلول های اپی تلیال روده اتصال می یابد (۸-۶). با توجه به نقش مهم این توکسین در بیماریزایی، گزارش های مهمی مبنی بر استفاده از این بخش به عنوان واکسن وجود دارد (۲).

نوروتوکسینی که از باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* ترشح می گردد، می تواند از طریق سطوح مخاطی وارد گردش خون شده و به واسطه ی جلوگیری از آزاد شدن استیل کولین در پایانه های عصبی، فلج عضلانی پیش رونده را موجب شده که در موارد حاد معمولاً منجر به مرگ خواهد شد (۹). نوروتوکسین بوتولینوم تایپ A (Botulinum neurotoxin A= BoNT/A)، قویترین توکسین در میان تمام توکسین های گیاهی، جانوری، باکتریایی و ترکیب های شیمیایی است. BoNT/A به صورت یک تک زنجیره پروتئینی با فعالیت پائین تولید می شود و در صورت برش پروتئولیتیکی، به دو زنجیره سبک (۵۰ کیلو دالتون) و زنجیره سنگین (۱۰۰ کیلو دالتونی) فعال تبدیل می شود. نیمه انتهای کربوکسیلی زنجیره سنگین که قطعه C نامیده می شود، پذیرنده سطحی روی سلول های نورونی را شناسایی کرده و به آن اتصال می یابد (۹). این پروتئین ۵۰ کیلو دالتونی واقع در انتهای کربوکسیلی زنجیره سنگین توکسین کلستریدیم بوتولینوم که وظیفه اتصال به سلول های عصبی را به عهده دارد از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی نیز برخوردار می باشد(۱۱،۱۰).

خاطره ایمونولوژی، توانایی سیستم ایمنی برای ایجاد پاسخی با قدرت بیشتر به محض برخورد مجدد با همان عامل بیماریزا بوده و اساس واکسیناسیون را تشکیل می دهد (۱۴-۱۲). خاطره ی ایمونولوژی شامل لنفوسیت های B و T گسترش یافته ای است که نسبت به سلول های اولیه، میزان تقسیم سلولی بیشتری داشته و نیز تلومرهای سلولی در مقایسه با سلول های اولیه در این سلول ها کوتاهتر هستند (۱۵). مشخص گشته است که توکسوئید ETEC، خاطره ایمونولوژی شش ماهه ای را به وجود می آورد (۱۶). به این معنی که تنها شش ماه فرد را از بیماری محافظت می نماید؛ اما توکسوئید بوتولینوم خاطره ای دو ساله را ایجاد می کند (۱۷) و در ردیف آنتی ژن هایی قرار می گیرد که مصونیت نسبتاً طولانی تری را در سیستم ایمنی فرد ایجاد می کنند. به نظر می رسد میزان تیتر آنتی بادی که در برابر هر آنتی ژن ترشح می گردد، می تواند در تغییرات مدت ماندگاری خاطره مستقیماً تأثیرگذار باشد (۱۹،۱۸). بنابراین احتمالاً این دو آنتی ژن، یکی با خاطره کوتاه مدت و دیگری میان مدت، تیترهای آنتی بادی متفاوتی را از خود نشان می دهند. به همین دلیل در این مطالعه پس از تهیه و خالص سازی آنتی ژن های مذکور، تزریق به حیوان، ارزیابی تیتر آنتی بادی ترشح شده در برابر هر یک از این آنتی ژن ها و مقایسه کمی آن ها با یکدیگر مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی:

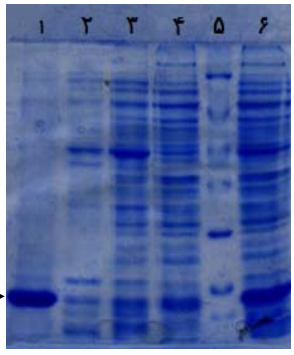
در این مطالعه تجربی از دو میزبان *Escherichia Coli* Bl21 DE3 تراریخت شده به وکتور pET28a که یکی حاوی ژن نوترکیب LTB/*شریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک و دیگری حاوی ژن نوترکیب Hc توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تایپ A بود استفاده شد (۹،۶). بهینه سازی بیان برای هر دو نوع پوتئین نوترکیب و در سه متغیر (دما، زمان و غلظت ماده القاکننده) صورت پذیرفت. تولید پروتئین نوترکیب LTB در مقیاس بالای آزمایشگاهی (۵۰۰ میلی لیتر) و با شرایط بهینه (کانامایسین با غلظت ۲۰μg/ml =IPTG با غلظت ۱mM در جذب نوری برابر ۰/۷، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۶ ساعت القاء) انجام شد. تولید پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc نیز در حجم ۵۰۰ میلی لیتر و در شرایط بهینه (کانامایسین با غلظت ۲۰μg/ml، افزودن IPTG با غلظت ۱ mM در جذب نوری برابر ۰/۷، دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و زمان ۱۸ ساعت القاء) انجام

گردید. تخلیص پروتئین نوترکیب LTB از فاز نامحلول عصاره خام سلول های بیانی به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل (Ni-NTA) و با استفاده از شیب pH بافرهای حاوی اوره (اوره ۸ مولار، تریس کلراید ۱۰ میلی مولار و سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار) انجام گردید. این در شرایطی بود که تخلیص پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc از فاز محلول عصاره خام سلول های بیانی با کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل و با استفاده از شیب غلظتی ایمیدازول صورت گرفت. خروجی های ستون به وسیله ی SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. غلظت هر یک از پروتئین های نوترکیب به وسیله روش برادفورد معین گردید. جهت ایمنی زایی، یک گروه ۱۰ تایی از موش ها برای هر یک از آنتی ژن ها در نظر گرفته شد و علاوه بر آن یک گروه ۵ تایی نیز به عنوان گروه شاهد تعیین گردید. هم حجم آنتی ژن ادجوانت کامل فروند اضافه گردید و برای تزریق اول به صورت زیر جلدی استفاده شد. هر یک از ۱۰ موشی که جهت ایمنی زایی با LTB در نظر گرفته شده بودند، µg ۲۵ از آنتی ژن LTB را در تزریق نخست دریافت نمودند. جهت ایمنی زایی گروه دوم موش ها با BoNT/A-Hc، به هر یک از موش ها، در بار دوم به بعد یادآور آنتی ژن به صورت زیر جلدی تزریق گردید. در هر تزریق یادآور، میزان آنتی ژن تزریقی کاهش داده شد به طوری که در تزریق دوم µg ۲۲، در تزریق سوم µg ۱۹ و در تزریق چهارم µg ۱۵ از هر آنتی ژن به صورت زیر جلدی به همراه ادجوانت ناقص فروند تزریق گردید. فاصله تزریق اول و دوم ۲۰ روز و فاصله تزریقات بعدی نسبت به هم ۱۴ روز در نظر گرفته شد.

۲۰ روز پس از آخرین تزریق خونگیری از گوشه چشم موش ها صورت گرفت. نمونه ها یک روز در یخچال (دمای ۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شده و پس از سانتریفیوژ (دور ۵۰۰۰rpm، دمای ۴ درجه سانتیگراد و مدت ۳۰ دقیقه)، سرم جداسازی گردید. از الایزای غیر مستقیم برای تیتر کردن آنتی بادی استفاده شد. میزان آنتی ژن قرار گرفته در هر چاهک µg ۲ بود. رقت های ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ از سرم تهیه و به چاهک ها افزوده شد. کانژوگه (آنتی بادی ضد آنتی بادی موش کانژوگه با پراکسیداز) با رقت ۱:۱۵۰۰۰ به همه چاهک ها اضافه شد. پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک، پلیت در ۴۹۲ نانومتر در دستگاه ELISA reader شرکت DYNEX آمریکا، خوانده شد. در نهایت اطلاعات بدست آمده از تیتر آنتی بادی توسط نرم افزار SPSS و با روش t-Test، بصورت دوتایی (Pair) مورد ارزیابی قرار گرفت.

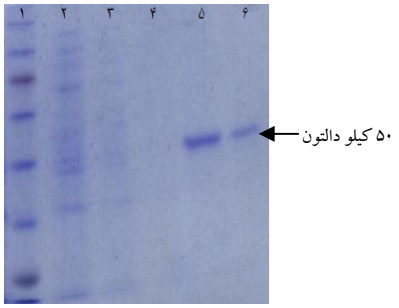
یافته ها:

نتیجه ژل SDS-PAGE، بیان مناسب پروتئین نوترکیب LTB باند پروتئینی را در فاز نامحلول نشان داد (تصویر شماره ۱). پس از بهینه سازی بیان ژن، در مورد ژن BoNT/A-Hc افزایش چشمگیر بیان مشاهده گردید و باند پروتئینی را در فاز محلول نشان داد (تصویر شماره ۲). تخلیص هر دو پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل (shinegene چین) صورت گرفت.



تصویر شماره ۱: تخلیص پروتئین LTB با استفاده از ستون نیکل (Ni-NTA).

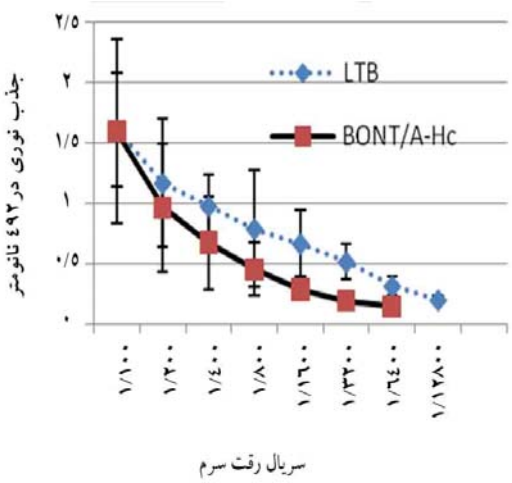
باند پروتئینی با وزن ۱۱/۸ کیلو دالتون قابل مشاهده است؛ ستون های ۱،۲و۳: نمونه خروجی از ستون ها بترتیب پس از شستشو با بافر D،C وE؛ ستون۴: نمونه خروجی از ستون قبل از شستشو؛ ستون ۵: نشانگر پروتئینیSM0431؛ ستون ۶: نمونه پروتئین قبل از عبور از ستون.



تصویر شماره ۲: تخلیص پروتئین BONT/A-Hc با استفاده از ستون نیکل (Ni-NTA).

باند پروتئینی با وزن ۵۰ کیلو دالتون قابل مشاهده می باشد. ستون ۱:.نشانگر پروتئینی SM0431 ستون های ۲و۳: نمونه های خروجی از ستون قبل از شستشو؛ ستون های ٤،٥و٦: خروجی پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc از ستون بترتیب پس از شستشو با بافرهای C،D وE.

آزمایش الایزا، تیتر آنتی بادی متفاوتی را برای دو پروتئین نوترکیب LTB و BoNT/A-Hc نشان داد (نمودار شماره ۱). رقت های متفاوتی از ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ از سرم تهیه شده بود که بطور کلی تفاوت تیتر آنتی بادی قابل مشاهده بود. در رقت ۱:۱۰۰ از آنتی بادی دو نمونه OD برابر ۱/۶ مشاهده شد، اما در رقت های پائین تر تفاوت تیتر آنتی بادی (P_{value}=۰/۰۰۲ و P_{value}<۰/۰۰۱) قابل تمایز بود.



نمودارشماره ۱: مقایسه تیتر آنتی بادی در موش ها پس از تزریق پروتئین های نوترکیب LTB و BoNT/A-Hc پس از تزریق چهارم

بحث:

از دهه ۱۹۴۰ میلادی تلاش های فراوانی برای تولید واکسن در برابر بیماری بوتولینوم صورت گرفته است. در حال حاضر تنها یک واکسن پذیرفته شده وجود دارد که به صورت توکسوئیدی علیه تیپ های A-E تهیه می شوند (۲۰). Byrne و همکاران نشان دادند که امکان زیر همسانه سازی قطعات غیر توکسیک ژن BoNT/A در *E. Coli* وجود دارد. آن ها گروه موش ها را با قطعات غیر توکسیک نوترکیب، ایمن نموده و قابلیت ایمنی زایی موش ها را در شرایط *in vivo* برون تنی بررسی کرده اند و نشان داده اند که فقط یک قطعه ۵۰ کیلو دالتونی از ناحیه FC توکسین قادر است کاملاً موش ها را در برابر توکسین ایمن نماید؛ لذا کار بیشتر محققین بر روی قطعه BoNT/A-Hc متمرکز گردیده است (۱۷).

مطالعات گسترده ای نیز روی انتروتوکسین های حساس به حرارت مانند توکسین کلرا و توکسین حساس به حرارت نوع I و II باکتری اشریشیاکلی صورت گرفته و مشخص شده که این قسمت از توکسین ها می توانند منجر به افزایش پاسخ های ایمنی شوند. برخلاف تشابه ساختاری در اتصال زیر واحد A به زیر واحد B پنتامریک، یافته های اخیر آشکار کرده که عملکرد ادجوانی توکسین LT به فعالیت آنزیمی زیر واحدهای A بستگی ندارد و زیر واحدهای B جدا شده ممکن است اثرات مختلفی روی سلول های سیستم ایمنی انجام دهد (۶).

موارد متعددی وجود دارند که می توانند در کیفیت پاسخ ایمنی اکتسابی و به تبع آن خاطره ایمونولوژیک ایجاد شده تأثیرگذار باشند. سلول های عرضه کننده آنتی ژن، ماهیت آنتی ژن، منشاء ورود آنتی ژن به بدن، از عواملی می باشند که یقیناً در کیفیت و کمیت این پاسخ ها موثرند و در بوجود آوردن پاسخ ایمنی اولیه مناسب (تیتر بالای آنتی بادی) و سپس در

ایجاد خاطره ای طولانی مدت نقشی قابل توجه داشته باشند (۱، ۲۳-۲۰).

در این مطالعه سعی بر این بوده است که میزان ایمنی زایی در گروه های موشی مورد مطالعه در شرایط کاملاً یکسان و البته با دو آنتی ژن متفاوت بررسی شود. تمام عوامل بکار رفته در ایمنی زایی از جمله: میزان دوز تزریقی از هر آنتی ژن، راه ورودی آنتی ژن به بدن حیوان، نوع ادجووانت استفاده شده، فاصله زمانی بین تزریق ها و شرایط نگهداری حیوان، مواردی بودند که جهت یکسان سازی شرایط ایمنی زایی مورد نظر قرار گرفتند. به همین دلیل می توان گفت، تفاوت ایجاد شده در پاسخ ایمنی (میزان تیتر آنتی بادی) در هر گروه احتمالاً به خاطر ماهیت متفاوت آنتی ژن های LTB و BoNT/A-Hc باشد (۸، ۹). اما مقایسه تیتر آنتی بادی تولیدی توسط هر کدام از پروتئین های نوترکیب LTB و BoNT/A-Hc نیز تفاوتی معناداری نشان داده است. از آنجا که آنتی ژن LTB خاصیت ادجوانیسیتی قوی دارد (۲۴)، ممکن است در کوتاه مدت اثر تحریکی بیشتری بر سیستم ایمنی داشته باشد. از طرف دیگر فاصله زمانی نسبتاً کوتاه و یکسان از زمان تهیه سرم و آزمایش الایزا، این تفاوت تیتر آنتی بادی را منجر شده باشد. در دیگر مطالعات نشان داده شده است که با افزایش تیتر آنتی بادی، سلول های B خاطره ی دارای IgG در بین جمعیت مورد مطالعه افزایش می یابد (۱۹،۱۸). بر این اساس بالا رفتن تیتر آنتی بادی ایجاد شده در گروه های تزریق شده با آنتی ژن های LTB و BoNT/A-Hc را می توان به افزایش خاطره ایمنولوژی ایجاد شده نسبت داد.

نتیجه گیری:

افزایش تیترآنتی بادی LTB نسبت به BoNT/A-Hc می تواند ناشی از خاصیت ادجوانتیسیتی قوی LTB و ایمنی زایی تقریباً یکسان در فاصله زمانی محدود باشد که در این فاصله زمانی محدود، شدت ایمنی زایی LTB افزایش چشمگیری نسبت به BoNT/A-Hc داشته است. تیتر آنتی بادی ممکن است با طول عمر سلول های خاطره ای هر کدام ارتباط داشته باشد که نیاز به بررسی بیشتری دارد. در مراحل بعدی با مطالعه خاطره ایجاد شده از این پروتئین ها می توان این ارتباط را به صورت واضح مشخص نمود.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله نویسندگان از آقای دکتر محمود تولایی جهت در اختیار گذاشتن سوش حاوی ژن پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc سپاسگذاری می نمایند.

منابع:

1. Jiang ZD, Mathewson JJ, Ericsson CD, Svennerholm AM, Pulido C, DuPont HL. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in patients with travelers' diarrhea acquired in Guadalajara, Mexico, 1992-1997. J Infect Dis. 2000 Feb; 181(2): 779-82.

2. Savarino SJ, Hall ER, Bassily S, Wierzba TF, Youssef FG, Peruski LF, Jr., et al. Introductory evaluation of an oral, killed whole cell enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine in Egyptian infants. Pediatr Infect Dis J. 2002 Apr; 21(4): 322-30.

3. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. Microbes Infect. 2010 Feb; 12(2): 89-98.

4. Coster TS, Wolf MK, Hall ER, Cassels FJ, Taylor DN, Liu CT, et al. Immune response, ciprofloxacin activity, and gender differences after human experimental challenge by two strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 2007 Jan; 75(1): 252-9.

5. Sanchez J, Holmgren J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. Curr Opin Immunol. 2005 Aug; 17(4): 388-98.

6. Salimian J, Salmanian A, Khalesi R, Mohseni M, Moazzeni S. Antibody against recombinant heat labile enterotoxin B subunit (rLTB) could block LT binding to ganglioside M1 receptor. Iran J Microbiol. 2010 Sep; 2(3): 120-7.

7. Leong J, Vinal AC, Dallas WS. Nucleotide sequence comparison between heat-labile toxin B-subunit cistrons from Escherichia coli of human and porcine origin. Infect Immun. 1985 Apr; 48(1): 73-7.

8. Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): University of Gothenburg. Sahlgrenska Academy. 2008.

9. Tavallaie M, Chenal A, Gillet D, Pereira Y, Manich M, Gibert M, et al. Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies. FEBS Lett. 2004 Aug 13; 572(1-3): 299-306.

10. Yu YZ, Li N, Zhu HQ, Wang RL, Du Y, Wang S, et al. The recombinant Hc subunit of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A is an effective botulism vaccine candidate. Vaccine. 2009 May 11; 27(21): 2816-22.

11. Zdanovsky AG, Zdanovskaia MV. Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins. Appl Environ Microbiol. 2000 Aug; 66(8): 3166-73.

12. Campos M, Godson DL. The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune responses. Int J Parasitol. 2003 May; 33(5-6): 655-61.

13. Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R. Generation and maintenance of immunological memory. Semin Immunol. 2004 Oct; 16(5): 323-33.

14. Zielinski CE, Corti D, Mele F, Pinto D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Dissecting the human immunologic memory for pathogens. Immunol Rev. 2011 Mar; 240(1): 40-51.

15. Beverley PC. Immune memory: the basics and how to trigger an efficient long-term immune memory. J Comp Pathol. 2010 Jan; 142 Suppl 1: S91-5.

16. Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. Expert Rev Vaccines. 2008 Aug; 7(6): 795-804.

17. Byrne MP, Smith LA. Development of vaccines for prevention of botulism. Biochimie. 2000 Sep-Oct; 82(9-10): 955-66.

18. Leung DT, Rahman MA, Mohasin M, Riyadh MA, Patel SM, Alam MM, et al. Comparison of memory B cell, antibody-secreting cell, and plasma antibody responses in young children, older children, and adults with infection caused by *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa in Bangladesh. Clin Vaccine Immunol. 2011 Aug; 18(8): 1317-25.

19. Smith KG, Light A, Nossal GJ, Tarlinton DM. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. EMBO J. 1997 Jun 2; 16(11): 2996-3006.

20. Siegel LS. Human immune response to botulinum pentavalent (ABCDE) toxoid determined by a neutralization test and by an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1988 Nov; 26(11): 2351-6.

21. Farber DL. Biochemical signaling pathways for memory T cell recall. Semin Immunol. 2009 Apr; 21(2): 84-91.

22. Lanzavecchia A, Sallusto F. Human B cell memory. Curr Opin Immunol. 2009 Jun; 21(3): 298-304.

23. Nayak R, Lal G, Shaila MS. Perpetuation of immunological memory: role of serum antibodies and accessory cells. Microbes Infect. 2005 Aug-Sep; 7(11-12): 1276-83.

24. Yan J, Wang Y, Shao SH, Mao YF, Li HW, Luo YH. Construction of prokaryotic expression system of ltB-ureB fusion gene and identification of the recombinant protein immunity and adjuvanticity. World J Gastroenterol. 2004 Sep 15; 10(18): 2675-9.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 Feb, March; 15(6): 159-166. ***Original article***

Evaluation and comparison of immunization level between recombinant proteins of binding subunit of entrotoxigenic *Escherichia coli* and botulinum toxin

Miri A (MSc)[1, 2], Salimian J (PhD)[3*], Rezaie E (MSc)[1, 4], Olad GH (PhD)[4], Saadati M (PhD) [1], Arefpoor MA (MSc)[1], Azizi Jalilian F (PhD)[5]

[1]Biology Dept., Imam Hossein University, Tehran, Iran; [2]Human Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran; [3]Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran; [4]Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran; [5]Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.

Received: 12/June/2013 Revised: 21/Sep/2013 Accepted: 23/Sep/2013

Background and aims: Among the bacterial agents, the most common cause of diarrheal disease is Entrotoxigenic *Escherichia coli*. Letal toxin B (LTB) subunit of LT toxin could induce six-month immunity. *Clostridium botulinum* causes botulism disease. BoNT/A-Hc toxin subunit could induce two years immunity against this disease. It seems that the immunogenicity potency of these two subunits may influence on the memory longevity. The aim of this study is the assessment of LTB and BoNT/A-Hc immunogenicity and investigation of their relations to immunological memory longevity.

Methods: In this experimental study the transgenic *E. coli* BlDE3 with pET28a vector, containing recombinant LTB and BoNT/A-Hc genes separately were used for expression of recombinant proteins. LTB and BoNT/A-Hc expressed as insoluble and soluble forms respectively; and their purity were confirmed on SDS-PAGE gels. Finally, mice immunization were carried out and antibody titration of both recombinant proteins were evaluated and compared using t-Test in SPSS software.

Results: After immunization the mice, a difference in antibody titer was observed between two proteins i.e. BoNT/A-Hc and LTB ($P<0.01$).

Conclusion: There was a significant difference of antibody titration between LTB and BoNT/A-Hc proteins. That can represent a strong adjuvanticity of LTB and almost the same immunogenicity in a limited time.

Keywords: **Antibody titration, Immunization, Memory cell, BoNT/A-Hc, Letal toxin B**

Cite this article as: Miri A, Salimian J, Rezaie E, Olad GH, Saadati M, Arefpoor MA, et al. Evaluation and comparison of immunization level between recombinant proteins of binding subunit of entrotoxigenic *Escherichia coli* and botulinum toxin. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014 Feb, March; 15(6): 159-166.

[*]**Corresponding author:**
Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
Tel: 00982182482481, E-mail: jafar.salimian@gmail.com.