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

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۵، شماره ۶/ بهمن و اسفند ۱۳۹۲/ ۴۳-۳۵

مقاله پژوهشی

تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه ناحیه ۴-۲ آنتی ژن محافظت کننده *باسیلوس آنتراسیس* در حیوانات آزمایشگاهی

دکتر حسین هنری*، هاجر مهرآذین، دکتر مجتبی سعادتی، محمد ابراهیم مینایی
گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.
تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۴ اصلاح نهایی: ۹۲/۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۷

چکیده:

زمینه و هدف: **آنتراکس که مسبب آن باکتری *باسیلوس آنتراسیس* می‌باشد یک بیماری عفونی حاد است و اغلب در گیاه‌خواران و انسان اتفاق می‌افتد. فرم رویشی *باسیلوس آنتراسیس* یک اگزوتوکسین سه جزیی شامل آنتی ژن حفاظت کننده (Protective Antigen=PA)، فاکتور کشنده (Lethal Factor=LF) و فاکتور ادم (Edema Factor=EF) می‌باشد. آنتی ژن حفاظت کننده به عنوان یک ایمونوژن اولیه برای توسعه ایمنی حمایتی بر علیه آنتراکس بررسی شده است. این مطالعه با هدف تولید آنتی بادی علیه ناحیه ٤-۲ آنتی ژن حفاظت کننده این باکتری در حیوانات آزمایشگاهی طراحی و اجرا شده است.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی ناحیه ٤-۲ ژن PA از پلاسمید pXOI با جایگاه های آنزیمی BamHI و HindIII به روش PCR تکثیر و در وکتورها کلون و ساب کلون شد. وکتور pET28a(+) در باکتری اشرشیاکلی سویه BL21(DE3) ترانسفورم گردید. بعد از القاء با IPTG، بیان پروتئین ژن PA مشاهده شد. پروتئین تخلیص شده در ٤ نوبت به موش و خرگوش تزریق شد؛ سپس آنتی بادی تولید شده از سرم موش و خرگوش جداسازی و توسط آزمون الایزا تایید گردید.**

یافته ها: **ناحیه ٤-۲ ژن PA کلون شده در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله ی توالی یابی، PCR، آنالیز آنزیمی، الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید و لکه گذاری وسترن مورد تأیید قرار گرفت. افزایش تیتر آنتی بادی در خون موش و خرگوش توسط آزمون الایزا تایید گردید.**

نتیجه گیری: **با توجه به ایمونوژن بودن پروتئین PA، می‌توان از آن در طراحی واکسن و همچنین به عنوان ادجوانت قوی سیستم مخاطی استفاده نمود.**

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس آنتراسیس*، آنتی ژن حفاظت کننده، آنتی بادی، روش الایزا.

مقدمه:

باسیل عامل بیماری سیاه زخم (آنتراکس) از اولین باکتری هایی است که در نیمه دوم قرن ۱۹ کشف گردید (۱). نام بیماری از کلمه یونانی آنتراکیز (Anthrakis) به معنای زغال سنگ (Coal) گرفته شده است که به واسطه زخم های سیاه شبه زغال سنگ که بر روی پوست در آنتراکس پوستی مشاهده شده است، به این نام نامیده می‌شود. این باکتری هم اکنون به عنوان یک سلاح بیوتروریستی مطرح می‌باشد. از پاکت های آلوده به اسپور این باکتری در حمله بیوتروریستی سال ۲۰۰۱ آمریکا استفاده شده است (۲). *باسیلوس آنتراسیس* دارای دو پلاسمید بزرگ pXO1 (شامل ژن های توکسیک) و pXO2 (شامل ژن های مولد کپسول) می‌باشد که عامل اخیر یعنی کپسول، عامل تعیین کننده در بیماری زایی بوده و باکتری را در برابر هجوم ماکروفاژهای میزبان محافظت می‌کند. توکسین با واسطه یک پلاسمید به نام PBA1 یا pXO1 ایجاد می‌شود که ۳ پروتئین شامل فاکتور ادم (Edema Factor=EF; 89 kDa)، آنتی ژن محافظت کننده (Protective Antigen=PA; 83 kDa) و فاکتور

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، گروه علوم زیستی، تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷، E-mail:honari.hosein@gmail.com*

مرگ سلولی (Lethal Factor=LF; 90 kDa) را کد می‌کند. هیچ کدام از این فاکتورها به تنهایی اثری نداشته و دو فاکتور EF و LF در صورتی موثرند که همراه با PA باشند؛ در این صورت ادم زیر پوستی و مرگ سلولی بروز می‌کند (۵-۳).

پروتئین PA بدون EF و LF غیر سمی می‌باشد؛ بوسیله ژن Pag کد شده و غنی از A/T (۶۹٪)، فاقد سیستئین، دارای وزن ۸۳ کیلو دالتون، ۷۳۵ اسیدآمینه و پروتئینی مسطح و بلند می‌باشد که وظیفه ورود توکسین های EF و LF را در سیتوزول بر عهده دارد؛ همچنین دارای ۴ ناحیه می‌باشد (۷،۶). ناحیه ۱ شامل اسیدآمینه ۱ الی ۲۵۸ و در برگیرنده جزء ۲۰ کیلو دالتونی است که در اثر فعالیت پروتئازها از آن جدا می شود. ناحیه ۲ از اسید آمینه ۲۵۹ الی ۴۸۷ تشکیل شده و مسئول ایجاد منافذی در غشای سلول است. ناحیه ۳ از اسیدآمینه های ۴۸۸ تا ۵۹۵ تشکیل شده و در اتصال عامل مرگ آور و تورم زا به آنتی ژن محافظت کننده دخالت دارد. ناحیه ۴ در طرف کربوکسیل انتهایی قرار دارد و از اسیدآمینه ۵۹۶ الی ۷۳۵ تشکیل شده است و حاوی جایگاه اتصال به غشای سلول است (۸). برای اینکه فعالیت سمیت توکسین ها اتفاق بیافتد، PA باید بر روی سطح سلول مستقر شود. پروتئین PA (۸۳ kDa) ابتدا به رسپتور روی غشای سلول هدف متصل می شود؛ سپس در بین اسیدهای آمینه ۱۶۷-۱۶۴(Arg-Lys-Lys-Arg) به دو قطعه که یکی (۶۳ kDa) PA و متصل به رسپتور باقی می ماند و دیگری (۲۰kDa) PA که آزاد می شود، شکسته شده و به این صورت PA از فرم غیر فعال به فرم فعال تبدیل می شود. PA فعال شده سپس با ۷ یا ۸ مولکول PA شکسته شده دیگر یک منفذ هپتامری یا اکتامری را تشکیل می دهد که به عنوان وسیله انتقال EF یا LF عمل می کند. LF و EF به طور رقابتی به هپتامر ایجاد شده متصل می شوند (۱۰،۹).

پروتئین PA به عنوان کاندیدای اصلی برای تحقیق در ساخت واکسن در نظر گرفته شده است. پروتئین PA وقتی در غیاب LF و EF تولید می‌شود، قادر به ایجاد حمایت موثر به صورت یک پروتئین خالص یا یک واکسن نوترکیب و یا واکسن ضعیف شده می‌باشد (۱۳-۱۱).

یکی از راه های محافظت اشخاص در برابر باکتری *باسیلوس آنتراسیس* استفاده از واکسن تولید شده علیه آن می‌باشد. واکسن های متعددی تاکنون تولید و مورد استفاده قرار گرفته اند؛ لیکن هر کدام دارای عوارض جانبی بوده و تلاش برای تهیه واکسن جدید همچنان ادامه دارد. در این تحقیق که به منظور بررسی میزان تولید آنتی بادی علیه ناحیه ۴-۲ PA در حیوان آزمایشگاهی انجام شد پس از استخراج و تخلیص پروتئین ناحیه ۴-۲، به موش و خرگوش تزریق و میزان آنتی بادی تولید شده توسط آزمون ELISA و لکه گذاری وسترن مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی برای طراحی پرایمر ناحیه ۴-۲ ژن PA مربوط به باکتری *باسیلوس آنتراسیس*، توالی کامل ژن PA باکتری *باسیلوس آنتراسیس* از بانک ژن (NCBI-AF306783) بدست آمد و طراحی پرایمر به کمک نرم افزار primer3# صورت گرفت و پرایمر مورد نظر توسط شرکت سیناژن سنتز شد. پرایمر آغازین دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر BamHI (5'ccggatccgaaaaatggagcacggcttct3') و پرایمر پایانی (5'aagcttcattaaaatttttcttgatcccgtt3') دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر HindIII است که بوسیله BIOLABS_NEB-cutter تعیین شد. در ادامه تکثیر ناحیه ۴-۲ ژن PA با روش PCR صورت گرفت. ابتدا باکتری *باسیلوس آنتراسیس* (تهیه شده از موسسه رازی) در محیط کشت مایع Lysogeny broth (LB) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شد. استخراج ژنوم و پلاسمیدهای باکتری با کمک روش CTAB-NaCl انجام و با استفاده از روش اسپکتروفتومتری غلظت آن تعیین گردید و به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. برای تکثیر ژن PA،

واکنش PCR با آنزیم Taq پلی مراز (سیناژن) در غلظت ۲ میلی مولار MgCl2 ، ۰/۴ پیکو مول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی مولار dNTPs و در دمای اتصال ۶۱ درجه سانتی گراد بهینه سازی شد. به منظور جلوگیری از جهش‌های ناخواسته، تکثیر نهایی ژن با استفاده از آنزیم Pfu پلی‌مراز فرمنتاز در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. هر واکنش PCR شامل ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی مولار dNTPs، ۰/۲۵ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Pfu ،۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، MgSo4 با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار و ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج شده *باسیلوس آنتراسیس* بود. چرخه های PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود (۱۴، ۱۵).

برای همسانه سازی قطعه حاصل از واکنش PCR، ابتدا با کمک الکتروفورز ژل آگارز، محصول PCR مورد تایید قرار گرفت و سپس قطعه مورد نظر از ژل آگارز تخلیص شد. سپس برای همسانه سازی و ترانسفورم از وکتور کلونینگ pEGM-T Easy Vector پرومگا و سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α استفاده شد. به منظور بیان ژن، قطعات توسط آنزیم های برشی BamHI و HindIII از ناقل TA کلونینگ جداسازی و در وکتور بیانی pET28a(+) کیاژن همسانه سازی و در سلول‌های مستعد *E. coli* سویه BL21(DE3) (Stratagen) ترانسفورم شد. کلون های حاوی قطعه مورد نظر به کمک PCR و هضم آنزیمی و در نهایت با تعیین توالی تایید شدند(۱۵،۱۴). همچنین به منظور بیان ژن مورد نظر، کلون های جداسازی شده به صورت یک شبه، رشد داده شدند و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن ها به ۵ میلی لیتر محیط کشت LB مایع تلقیح و پس از رسیدن جذب به میزان ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای بدست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاء کننده پروموتر (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (۱۴، ۱۵).

برای تعیین غلظت پروتئین بیان شده از روش پروتئین سنجی برادفورد استفاده شد و آلبومین سرم گاوی (BSA) (سیناژن) به عنوان استاندارد آن در نظر گرفته شد. همچنین جهت جـــداسازی و تفکیک پروتئین ها، نمونه های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (SM0671) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر بود (۱۶).

به منظور تخلیص پروتئین نوترکیب، با استفاده از ستون Ni-NTA، پروتئین مربوط به ناحیه ۴-۲ PA تحت شرایط دناتوره جداسازی و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شدند.

برای تولید آنتی بادی علیه ناحیه ۴-۲ ژن PA در حیوانات آزمایشگاهی، به نمونه‌های موش و خرگوش به ترتیب میزان µg ۱۰ و µg ۱۰۰ از پروتئین ناحیه ۴-۲ PA در چهار نوبت، بار اول همراه با ادجوانت کامل و در نوبت های بعدی با ادجوانت ناقص فروند تزریق و در نهایت از موش ها و خرگوش‌ها خون‌گیری صورت گرفت و تیتر آنتی بادی آن ها توسط آزمایش الایزا اندازگیری شد (۱۷).

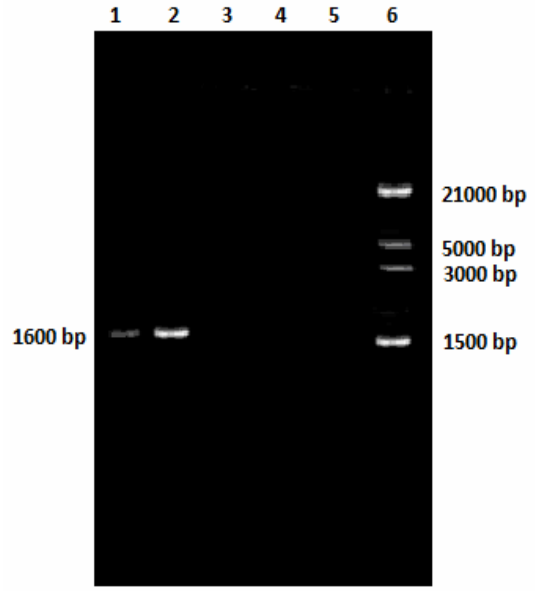
در نهایت به منظور تایید پروتئین نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی بادی ضد PA استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم وسترن بلاتینگ Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین ۳۹ میلی مولار، تریس ۴۸ میلی مولار، SDS ۰/۰۳۷٪ و متانول ۲۰٪) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیترو سلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی مولار، KCl ۲/۷ میلی مولار، Na2HPO4.7H2O ۴/۳ میلی مولار، توین۲۰ ۰/۵٪ و pH:۷/۲) حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بلاک گردید. نمونه ها پس از سه بار شست شو با بافر PBST به مدت یک ساعت با رقت

۱/۸۰۰ آنتی بادی ضد PA در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شدند. نمونه ها پس از شست شو مجدد با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۲۰۰۰ از آنتی بادی کانژوگه خرگوشی و موشی (Dako) در بافر PBST در دمای اتاق قرار گرفتند و در نهایت پس از سه بار شست شو با بافر PBST، برای آشکار سازی از بافر تریس ۵۰mM حاوی ۶mg DAB و 10µl H2O2 استفاده شد. واکنش با استفاده از H2SO4 متوقف گردید (۱۷).

یافته ها:

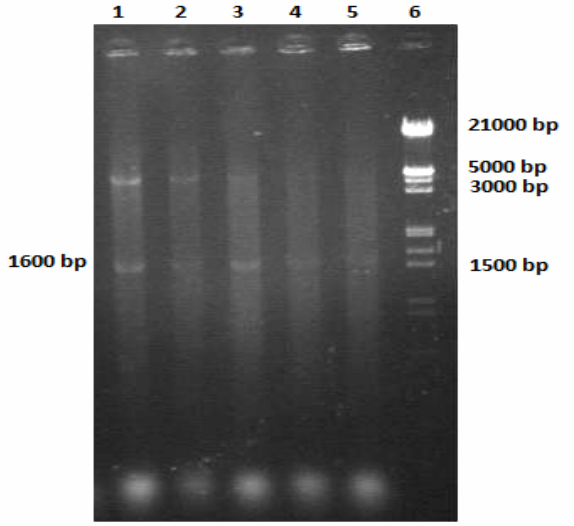
با روش PCR، ناحیه ۴-۲ ژن PA تکثیر و محصول آن روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما همخوانی داشت (۱۶۰۰ جفت باز) (تصویر شماره ۱).

بعد از تخلیص پلاسمید ها و بررسی آن ها روی ژل آگارز، پلاسمیدها با دو آنزیم HindIII و BamHI هضم شدند سپس به کمک مارکر، اندازهٔ قطعه خارج شده از وکتور تأیید شد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: محصول PCR ناحیه ٤-۲ ژن PA روی ژل آگارز ۱٪

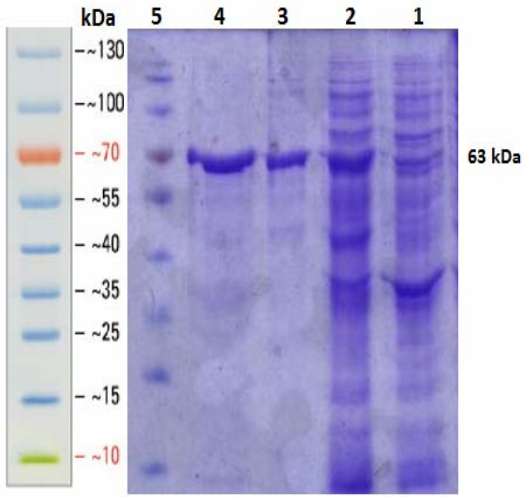
ستون های ۱ و ۲: حاوی ناحیه ٤-۲؛ ستون های ۵-۳: فاقد ناحیه ٤-۲؛ ستون ٦: مارکر .



تصویر شماره ۲: الگوی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید (+) PET28a حاوی قطعه ۱۶۰۰bp با دو آنزیم HindIII و BamHI روی ژل آگارز (۱٪)

ستون های ۵-۱: پلاسمید PET28a حاوی قطعه ۱۶۰۰bp برش خورده با آنزیم های BamHI و HindIII؛ ستون ۶: مارکر

در این مطالعه بعد از کشت سلول ها و القاء آن ها با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت و پس از تیمار خام بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب از ژل ۱۲ درصد استفاده شد. پس از بررسی بر روی ژل، بیان ژن مورد نظر (ناحیه ۴-۲) مشاهده شد (تصویر شماره ۳ ردیف های ۱ و ۲).

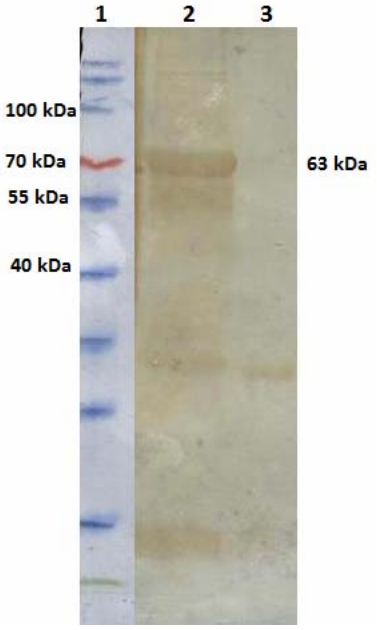


تصویر شماره۳: الگوی الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲ درصد حاصل از بیان پروتئین نوترکیب PA.

ستون ۱: نمونه بدون القای IPTG؛ ستون ۲: نمونه با القای IPTG؛ ستون های ۳ و ٤: پس از تخلیص با ستون نیکل؛ ستون ۵ نشانگر پروتئینی (SM0671 فرمنتاز).

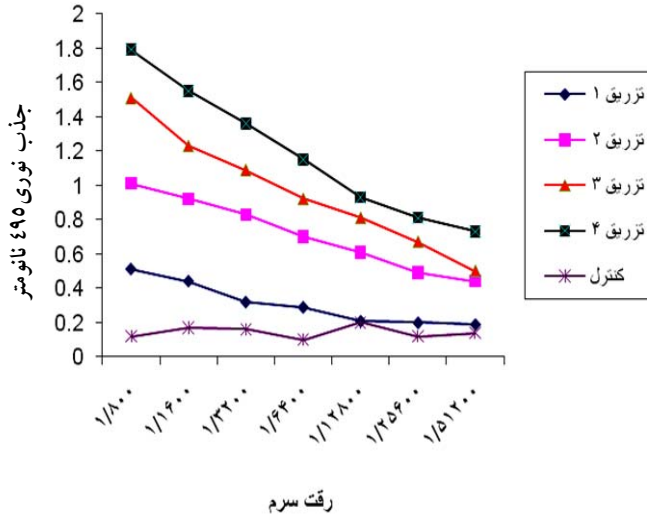
پس از اطمینان از القاء بیان ژن، بهینه سازی شرایط بیان پروتئین مورد بررسی قرار گرفت و بهترین شرایط بیان با کشت کلون ها در محیط LB مایع حاوی ۴۰µg/ml کاناماسین، پس از رسیدن OD محیط کشت به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، با افزودن IPTG با غلظت ۱mM به محیط و انکوبه نمودن آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰rpm به مدت ۵ ساعت بدست آمد.

از آزمایش لکه گذاری وسترن به منظور تأیید محصول پروتئینی استفاده شد. در این روش از آنتی بادی تولید شده توسط موش یا خرگوش استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونهٔ بعد از بیان است یک باند در نزدیکی ۶۳ kDa مشاهده می‌شود که درستون کنترل قبل از بیان، قابل مشاهده نبود (تصویر شماره ۴).



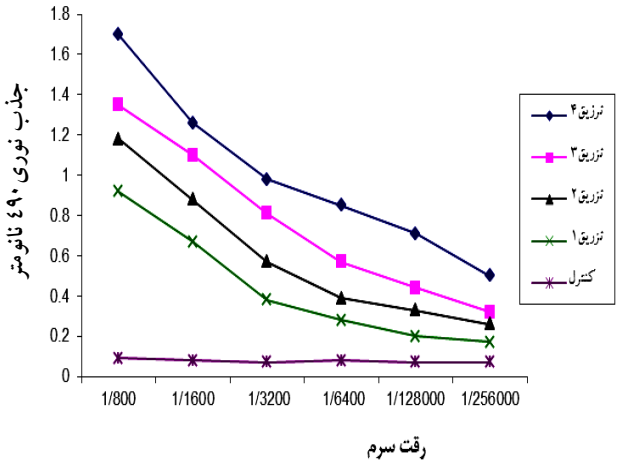
تصویر شماره ۴: آزمایش لکه گذاری وسترن به منظور تأیید محصول پروتئین PA

ستون ۱: مارکر پروتئین SM0671 فرمنتاز؛ ستون ۲: نمونه تست بعد از بیان ناحیه ٤-۲؛ ستون ۳: نمونه قبل از بیان (کنترل).



نمودار شماره ۱: بررسی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب PA ناحیه ٤-۲ در موش

برای تعیین تیتر آنتی بادی بر علیه پروتئین نوترکیب به منظور ارزیابی محصول در طول فرایند تخلیص در سرم حیوانات ایمن شده، از روش الیزا استفاده شد. نتایج حاصل از آزمایش الیزا با پروتئین نوترکیب نشان داد که پس از هر مرحله از تزریق، افزایش تیتر آنتی بادی در مقایسه با کنترل قابل توجه بوده است. بالاترین OD بدست آمده از تست در مقایسه با کنترل تفاوت قابل ملاحظه‌ای داشت. همچنین تیتر آنتی بادی ایجاد شده در سرم موش (نمودار شماره ۱) نسبت به سرم خرگوش (نمودار شماره ۲) بیشتر بود.



نمودار شماره ۲: بررسی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب PA ناحیه ٤-۲ در خرگوش

بحث:

در این مطالعه، برای ایمن سازی موش و خرگوش، پروتئین نوترکیب PA ناحیه ۴-۲ به همراه ادجوانت فروند استفاده شد و به علت ایمونوژن بودن این پروتئین، افزایش آنتی بادی ضد PA نوترکیب (IgG) در سرم نمونه ها، مشاهده شد؛ این افزایش تیتر آنتی بادی، در موش بیشتر از خرگوش بود.

آنتی ژن محافظت کننده PA یک جزء بسیار مهم از توکسین آنتراکس است، به این دلیل که این پروتئین در ایمنی آنتراکس نقش اصلی را هم بعد از ایمن سازی و هم در جریان عفونت بازی می‌کند (۱۸). تعدادی از آنتی ژن های *باسیلوس آنتراسیس* به منظور بررسی توانایی شان برای القاء ایمنی حمایتی بر علیه بیماری، مورد مطالعه قرار گرفته اند. از شناخته ترین این آنتی ژن ها می‌توان کپسول، لایه S، پلی ساکاریدهای سطحی و پروتئین هـــای دیگر را نام برد. تنها آن پروتئین‌هایی که با یکدیگر توکسین آنتراکس را می‌سازند، باعث تولید آنتی بادی های قابل شناسایی می‌شوند (۲۰،۱۹،۱۱). از ۳ پروتئین EF، LF و PA تنها آنتی بادی های استخراج شده از PA بر علیه بیماری نقش حمایتی دارند (۲۳-۲۱). این ایمنی در نتیجه خنثی سازی فعالیت توکسین آنتراکس اتفاق می‌افتد (۲۴). آنتی بادی ها بر علیه PA می‌توانند مانع از اتصال پروتئین به رسپتورهای سلول میزبان شوند و یا در حالی که به رسپتور سلول میزبان متصل می‌شوند، از شکست فورین ممانعت کنند. در هر دو وضعیت حالت تحویلی PA غیر فعال است. بدون PA فعالی که به سلول متصل شود EF و LF نمی توانند وارد سلول شوند؛ بنابراین تاثیر توکسین آنتراکس بر روی میزبان متوقف می‌شود (۲۰). به دلیل اینکه پروتئین PA تنها آنتی ژن شناخته شده برای تحریک کردن آنتی بادی های حمایتی بر علیه آنتراکس است، تمرکز اصلی روی این پروتئین (PA) برای تحقیق واکسن می باشد (۲۵،۱۱).

مطالعه ای که بر روی ناحیـــه های PA بـــر روی موش های A/J به همراه ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم (۱/۳٪) انجام شده، نشان داده است که کیفیت پاسخ ایمنی تحریک شده بعد از ایمن سازی با ناحیه های ناقص PA نوترکیب، بر علیه اسپورهای STI *باسیلوس آنتراسیس*، مشابه پاسخ ایمنی حاصل از PA نوترکیب کامل می‌باشد که البته بعد از بررسی های بیشتر در همین مطالعه مشخص شد که تمام گروه هایی که شامل ناحیه ۴ در ترکیب خود بودند به طور کامل حفاظت شده اند (۲۶). از سویی آزمایشات انجام شده با آنتی بادی های منوکلونال، نتایج مختلفی را نشان داده است. در یک مطالعه، تولید منوکلونال آنتی بادی خنثی کننده که به ناحیه ۲ و ۴ PA متصل می شد، کارآیی نامناسبی داشت که لزوم اتصال آنتی بادی به جایگاه‌های چندگانه برای خنثی سازی مطلوب را نشان می دهد (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر، نواحی ۴-۲ و سایر نواحی PA را در یک سیستم پروکاریوتی کلون و ایمنی زایی آن را در ۴ سویه متفاوت موش بررسی کردند. سیستم بیانی پروکاریوتی ژن هدف را با کارآیی بسیار بالا بیان کرد. ژن بیان شده خاصیت ایمنی زایی و ادجوانتی خوبی را نشان داد (۱۵). Fasanella و همکاران نیز نشان دادند که PA نوترکیب پاسخ آنتی بادی قوی را بر علیه آنتی ژن PA القاء می‌کند و یک ایمنی ۱۰۰ درصد را در خرگوش های ایمن شده با آنتی ژن PA بعد از چالش با سویه *باسیلوس آنتراسیس* نشان می دهد (۲۸).

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق و بررسی مطالعات انجام شده، پروتئین نوترکیب PA ناحیه ۴-۲ را می توان به عنوان یک ایمونودومیننت در نظر گرفت و از آن برای طراحی یک واکسن مهندسی شده استفاده نمود.

تشکر و قدردانی:

از تمامی اساتید، همکاران و دوستـــــان در دانشـگاه جامع امام حسین(ع) که ما را در انجـــام این تحقیــق یـــاری رساندند کمال تشکر را می‌نماییم.

منابع:

1. Koehler T, Dai Z, Kaufman-Yarbray M, Regulation of the Bacillus anthracis protective antigen gene: CO2 and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. J Bacteriol. 1994 Feb; 176(3): 586-95.

2. Spencer RC. *Bacillus anthracis*. J Clin Pathol. 2003 Mar; 56(3): 182-7.

3. Gupta P, Waheed SM, Bhatnagar R. Expression and purification of the recombinant protective antigen of *Bacillus anthracis*. Protein Expr Purif. 1999 Aug; 16(3): 369-76.

4. Tripathi Nagesh K, Srivastva A, Lakshmana Rao PV. Process development for production of recombinant protective antigen from *Bacillus anthracis*. Indian Chem Eng. 2006; 48(3): 178-84.

5. Brey RN. Molecular basis for improved anthrax vaccines. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Jun; 57(9): 1266-92.

6. Robert CL. Anthrax: a molecular full nelson. Nature. 2002 Jan; 415(6870): 373-4.

7. Brossier F, Levy M, Landier A, Lafaye P, Mock M. Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. Infect Immun. 2004 Nov; 72(11): 6313-7.

8. Zhou J, Ullal A, Liberato J, Sun J, Keitel W, Reason DC. Paratope diversity in the human antibody response to Bacillus anthracis protective antigen. Mol Immunol. 2008; 45(2): 338-47.

9. Benson E, Huynh P, Finklestein A, Collier R. Identification of residues lining the anthrax protective antigen channel. Biochemistry. 1998 Mar; 37(11): 3941-8.

10. Greenfield R, Bronze M. Prevention and treatment of bacterial diseases caused by bacterial bioterrorism threat agents. Drug Discov Today. 2003 Oct; 8(19): 881-8.

11. Turnbull PCB. Anthrax Vaccines: Past, Present and Future. Vaccine. 1991 Aug; 9(8): 533-9.

12. Flick-Smith Helen C, Walker Nicola J, Gibson P, Bullifent H, Hayward S, Miller J, et al. A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against. Anthrax Infection. 2002 Mar; 70(3): 1653-6.

13. Gaur R, Gupta Pradeep K, Banerjea Akhil C, Singh Y. Effect of nasal immunization with protective antigen of *Bacillus anthracis* on protective immune response against anthrax toxin. 2002 Jun; 20(21-22): 2836-9.

14. Sambrook J, Russell DW, Molecular cloning. NewYork : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

15. Abboud N, Casadevall A. Immunogenicity of *Bacillus anthracis* protective antigen domains and efficacy of elicited antibody responses depend on host genetic background. Clin Vaccine Immunol. 2008 July; 15(7): 1115-23.

16. Edelstein S, Bollag MD. Protein methods. NewYork: Wiley-Liss; 1991.

17. Little SF, Webster WM, Norris SLW, Andrews GP. Evaluation of an anti-rPA IgG ELISA for measuring the antibody response in mice. Biologicals. 2004 Jun; 32(2): 62-9.

18. Shlyakhov E, Rubinstein E, Novikov I. Anthrax Post-Vaccinal Cell-Mediated immunity in humans: Kinetics Pattern. Vaccine. 1997 Apr-May; 15(6-7): 631-6.

19. Mizrahi A. Bacterial Vaccines. In advances in biotechnological processes. Amazon. 1990; 105-22.

20. Singh Y, Ivins B, Leppla S. Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of *B. Anthracis*. Infect Immun. 1998 Jul; 66(7): 3447-8.

21. Miller JB, McBride R, Manchee P, Moore L. Anthrax vaccine adsorbed description leaflet. Michigan Department of Public Health. 1987.

22. Singh Y, Chaudhary V, Leppla S. A deleted variant of *B. Anthracis* protective antigen is Non-toxic and blocks anthrax toxin action in vivo. J Biol Chem. 1989 Nov; 264(32): 19103-7.

23. Vodkin M, Leppla S. Cloning of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. Cell. 1983 Sep; 34(2): 693-7.

24. Ezzell J, Abshire T. Immunological analysis of Cell-mediated antigens of *Bacillus anthracis*. Infect Immun. 1988 Feb; 56(2): 349-56.

25. Ivins B, Welkos S. Recent advances in the development of an improved human anthrax vaccine. Eur J Epidemiol. 1988 Mar; 4(1): 12-9.

26. Pezard C, Sirard JC, Mock M. Protective immunity induced by *Bacillus anthracis* toxin mutant strains. Adv Exp Med Biol. 1996; 397: 69-72.

27. Rivera J, Nakouzi A, Abboud N, Revskaya E, Goldman D, Collier R, et al. A monoclonal antibody to *Bacillus anthracis* protective antigen defines a neutralizing epitope in domain 1. 2006; 74(7): 4149-56.

28. Fasanella A, Tonello F, Garofolo G, Muraro L, Carattoli A, Adoneand R, et al. Protective ativity and imunogenicity of two recombinant anthrax vaccines for veterinary use. Vaccine. 2008; 45: 5684-8.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 Feb, March; 15(6): 35-43. ***Original article***

Production of polycolonal antibody against domain 2-4 of protective antigen of *Bacillus anthracis* in laboratory animals

Honari H (PhD)*, Mehrazin H (MSc), Saadati M (PhD), Minaie ME (MSc)
Faculty of Biology Science, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran.
Received: 12/Feb/2013 Revised: 22/Oct/2013 Accepted: 29/Oct/2013

Background and aims: Anthrax caused by *bacillus anthracis*, is an acute infectious disease that mostly occurs in herbivorous animals and in human. The vegetative format *Bacillus anthracis* is an exotoxin, which consists of three polypeptide: protective antigen (PA, 83 kDa), lethal factor (LF, 90 kDa) and edema factor (EF, 89kDa). PA is considered as a primary immune gen for development of protective immunity against anthrax. The aim of this study was the production of antibody raised against domain 2-4 PA in lab animals.

Methods: In this experimental study, domain 4-2 PA gene of plasmid pXOI with BamHI and HindIII restriction enzyme sites, amplified by PCR and were cloned and sub cloned in the vectors. Vector pET28a (+) was transformed to *E. coli* strain BL21 (DE3). After induction with IPTG, PA gene expression was observed. Purified protein was injected in mice and rabbits 4 times. Then the raised antibody was isolated from mice and rabbits sera and confirmed by ELISA.

Results: The pET28a (+)/domain 2-4 expression vector confirmed by end nuclease digestion, PCR and sequence analysis. The expression product domain 2-4 was confirmed by SDS-PAGE and Western blot. Antibody in mice and rabbits sera was confirmed by ELISA.

Conclusion: Due to PA protein being immunogenic, it could be used for vaccine design and as a powerful mucosal adjuvant system.

Keywords: **Antibody, *Bacillus anthracis*, ELISA, Protective antigen.**

Cite this article as: Honari H, Mehrazin H, Saadati M, Minaie ME. Production of polycolonal antibody against domain 2-4 of protective antigen of *Bacillus anthracis* in laboratory animal. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014 Feb, March; 15(6): 35-43.

***Corresponding author:**
Biology Dept., Faculty of Biology Science, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00989123848187, E-mail: honari.hosein@gmail.com