

## بررسی و مقایسه میزان ایمنی زایی پروتئین های نوترکیب زیر واحدهای اتصالی نوروتوکسین تتانی و توکسین حساس به حرارت اشیریشیاکلی و ارتباط آن با خاطره ایمنی

احسان رضایی<sup>۱،۲</sup>، مجتبی سعادت<sup>۱</sup>، جعفر سلیمیان<sup>۳\*</sup>، غلام رضا اولاد<sup>۲</sup>، علی میری<sup>۴</sup>، فرید عزیزی جلیلیان<sup>۵</sup>، شهرام نظریان<sup>۱</sup>

- (۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه جامع (امام حسین) (ع)  
(۲) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)  
(۳) مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)  
(۴) مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)  
(۵) مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۳

### چکیده

**مقدمه:** توکسین حساس به حرارت (LT) از عوامل حدت زای باکتری اشیریشیاکلی انتروتوکسیژنیک است. زیر واحد LT<sub>B</sub>، قسمت اتصال دهنده توکسین و قادر به ایجاد مصونیتی شش ماهه در انسان است. توکسین کلستریدیوم تتانی عامل بیماری کشنده کزاز است و توکسوئید آن مصونیتی ده ساله در انسان ایجاد می نماید. زیر واحد Hc قسمت اتصال دهنده و ایمونوژنیک توکسین کزاز می باشد. میزان ایمنی زایی که هر یک از زیر واحدهای نوترکیب THc و LT<sub>B</sub> ایجاد می کنند، می تواند از عواملی باشد که در به وجود آمدن مصونیتی با ماندگاری متفاوت تاثیرگذار باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی و مقایسه میزان ایمنی زایی دو پروتئین نوترکیب LT<sub>B</sub> و THc در مدل حیوانی و بررسی ارتباط آن با مدت مصونیت می باشد.

**مواد و روش ها:** بیان پروتئین های نوترکیب THc و LT<sub>B</sub> با استفاده از میزبان E.coli B121 DE3 تراریخته با وکتورهای pET28a حاوی این دو ژن در شرایط بهینه انجام شد. پس از بیان در شرایط بهینه، LT<sub>B</sub> از فاز نامحلول و THc از فاز محلول تخلیص و خلوص آن بر روی ژل SDS-PAGE بررسی گردید. جهت بررسی ایمنی زایی، این دو پروتئین به موش تزریق گردید. تیتراژ آنتی بادی حاصل با الایزا ارزیابی شده و مورد مقایسه قرار گرفت.

**یافته های پژوهش:** نتایج ژل SDS-PAGE، بیان زیاد هر دو پروتئین را نشان می داد. نتایج بررسی ایمنی زایی با این دو پروتئین نوترکیب نشان داد که در شرایط یکسان ایمنی زایی، زیر واحد THc تیتراژ آنتی بادی بالاتری نسبت به زیر واحد LT<sub>B</sub> دارد.

**بحث و نتیجه گیری:** تیتراژ آنتی بادی بالا، گام اول در ایجاد خاطره ایمنی قوی و ماندگار است. بنا بر این تفاوت در تیتراژ آنتی بادی ممکن است با طول عمر سلول های خاطره ای موش های ایمن شده با هر یک از این دو پروتئین نوترکیب ارتباط داشته باشد.

**واژه های کلیدی:** دومین اتصال دهنده توکسین کزاز (THc)، زیر واحد B توکسین حساس به حرارت (LT<sub>B</sub>)، پروتئین نوترکیب، تیتراژ آنتی بادی، خاطره ایمنی

\* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

Email: jafarsalimyan@yahoo.com

## مقدمه

اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) رایج ترین عامل اسهال باکتریایی است. این باکتری بعد از روتاویروس، به عنوان دومین عامل مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه است، (۱،۲). ETEC پس از استقرار در سلول های اپی تلیال روده، تکثیر شده و با ترشح انتروتوکسین حساس به حرارت و یا انتروتوکسین مقاوم به حرارت موجب بیماری زایی می شود، (۱). از این رو یکی از مهم ترین عوامل حدت زای این باکتری، توکسین حساس به حرارت (LT) است که توکسوئید آن به عنوان کاندیدای واکسن مطرح می باشد، (۳-۵). این توکسین از یک زیر واحد سنگین (LTA) و یک زیر واحد سبک (LTB) تشکیل شده است. زیر واحد A با وزن ۲۷ کیلودالتون، خاصیت آنزیمی داشته و جزء سمی توکسین است اما زیر واحد B با وزن مولکولی ۱۱/۸ کیلودالتون به شکل پنتامری و غیر کووالان در اتصال با زیر واحد A می باشد، (۶). این زیر واحد، قسمت اتصال توکسین را شکل داده و به گیرنده های GM<sub>1</sub> سطح سلول های اپی تلیالی روده اتصال می یابد، (۶-۸). با توجه به نقش مهم این توکسین در بیماری زایی، گزارشات زیادی مبنی بر استفاده از زیر واحد LTB به عنوان کاندیدای واکسن وجود دارد. (۳)

نوروتوکسینی که از باکتری کلستریدیوم تتانی ترشح می گردد، می تواند با حمله به سیستم عصبی موجب بیماری کشنده کزاز گردد. گروه کربوکسیل انتهایی پلی پپتید زنجیره سنگین این توکسین به طور غیر قابل برگشتی به دو مولکول گانگلیوزید (GD<sub>1b</sub> و GT<sub>1b</sub>) سلول های عصبی متصل شده و به درون سلول های عصبی راه می یابد، (۹-۱۱). انتهای کربوکسیل این توکسین با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلودالتون که قطعه C (THC) نامیده می شود؛ پذیرنده سطحی روی سلول های عصبی را شناسایی کرده، به آن اتصال می یابد. هم چنین این زیر واحد قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی دارد. (۱۲،۱۳)

استفاده از توکسوئید کزاز به عنوان واکسن، خاطره ایمنی ده ساله در انسان ایجاد می کند. این واکسن در ردیف واکسن هایی قرار دارد که مصونیت طولانی مدتی را در سیستم ایمنی فرد ایجاد می کند، (۱۳). از طرف دیگر، پروتئین نو ترکیب LTB خاطره ایمنی شش ماهه ای را به وجود می آورد، (۱۴). به این معنی که تنها شش ماه فرد را از بیماری ناشی از توکسین حساس به حرارت ETEC محافظت می نماید. گام اول در ایجاد خاطره ایمنی قوی و ماندگار، قدرت ایمنی زایی زیاد می باشد، (۱۵). بنا بر این

میزان و ماندگاری تیتر آنتی بادی که در برابر هر آنتی ژن تولید می گردد، ممکن است در ماندگاری خاطره ایمنی حاصل، تاثیر مستقیم داشته باشد، (۱۶). احتمالاً این دو آنتی ژن، با توانایی ایجاد خاطره کوتاه مدت و بلند مدت، الگوی تولید آنتی بادی متفاوتی را از خود نشان می دهند. به همین دلیل هدف از این مطالعه ارزیابی تیتر آنتی بادی ترشح شده در برابر هر یک از این آنتی ژن ها و سپس مقایسه آن ها با یکدیگر می باشد.

## مواد و روش ها

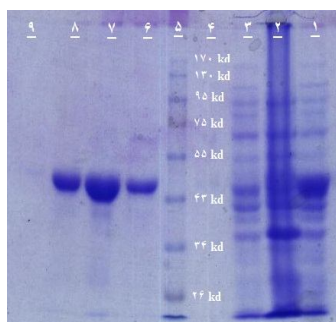
دو میزبان E.coli BI21 DE3 با وکتور pET28a تراریخت شد. یک وکتور واجد ژن نو ترکیب بخشی از زنجیره سنگین توکسین تتانی (THC) بوده، (۱۷)، و دیگری حاوی ژن نو ترکیب قسمت LTB توکسین حساس به حرارت اشریشیاکلی بود، (۱۸). بهینه سازی بیان در مورد هر دو نوع پروتئین نو ترکیب و در سه متغیر (دما، زمان و غلظت ماده القاء کننده) صورت پذیرفت. تولید پروتئین نو ترکیب LTB در مقیاس بالای آزمایشگاهی (۲۰۰ میلی لیتر) و با شرایط (کانامایسین با غلظت ۲۰ μg/ml، افزودن IPTG با غلظت ۱ mM در OD=۰/۶، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۶ ساعت) انجام شد. تولید پروتئین نو ترکیب THC نیز در حجم (۴۰۰ میلی لیتر) و در شرایط (کانامایسین با غلظت ۲۰ μg/ml، افزودن IPTG با غلظت ۱ mM در OD=۰/۷، دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و زمان ۱۸ ساعت) انجام گردید. تخلیص پروتئین نو ترکیب LTB از فاز نامحلول عصاره سلولی (اجسام توده ای) به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA و با استفاده از شیب PH در بافرهای حاوی اوره (اوره ۸ مولار، تریس کلراید ۱۰ میلی مولار و سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار) انجام گردید. در حالی که تخلیص پروتئین نو ترکیب THC از فاز محلول عصاره سلولی با کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل و با استفاده از شیب غلظتی ایمیدازول صورت گرفت. سپس خروجی های هر کدام از ستون ها به وسیله الکتروفورز SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. غلظت هر یک از پروتئین های نو ترکیب فوق به وسیله روش برادفورد معین گردید. جهت ایمنی زایی، تزریق در یک گروه ۱۰ تایی از موش برای هر یک از آنتی ژن ها انجام گردید و علاوه بر آن یک گروه ۵ تایی نیز به عنوان گروه کنترل تعیین گردید. تزریق هر کدام از آنتی ژن ها به میزان ۲۰ میکروگرم به همراه ادجوانت کامل در تزریق اول و به میزان ۲۲، ۱۹ و ۱۵ میکروگرم در سه تزریق یادآور اول

تا سوم به همراه ادجوانت ناقص به صورت زیرجلدی انجام گردید. فاصله تزریق اول و دوم ۲۰ روز و فاصله تزریقات بعدی نسبت به هم ۱۴ روز در نظر گرفته شد. خون گیری از چشم موش ها و جداسازی سرم ها ۲۰ روز پس از آخرین تزریق صورت گرفت. از تست الایزای غیرمستقیم برای سنجش (تیتراسیون) آنتی بادی سرم های جدا شده استفاده گردید. در این تست ها از رقت های ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ سرم ها و کونزوگه با رقت ۱:۱۵۰۰۰ استفاده گردید. در پایان میزان OD به وسیله دستگاه الایزا ریدر (Dynex) قرائت گردید و در نهایت نتایج الایزا و تیتراژ آنتی بادی گروه های موشی ایمن شده با این دو پروتئین نوترکیب (THC و LTB) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

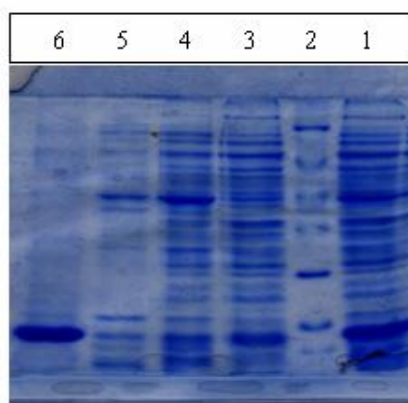
### یافته های پژوهشی

پس از بهینه سازی، بیان مناسب پروتئین نوترکیب

THC در فاز محلول و پروتئین نوترکیب LTB در فاز نامحلول روی ژل SDS-PAGE مشاهده گردید. تخلیص هر دو پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل صورت گرفت و ژل SDS-PAGE از نمونه های خالص شده نشانگر این مسئله است. (شکل شماره ۱ و ۲) همان طور که در شکل شماره ۱ دیده می شود، ستون ۱ و ۲ نشانگر بیان پروتئین نوترکیب زیر واحد THC در فاز محلول می باشد. در ستون ۶ از شکل شماره ۲ نیز نشان داده شده است که پروتئین نوترکیب زیر واحد LTB در فاز نامحلول بیان شده است و ستون ۱، باند تخلیص شده این پروتئین نوترکیب را نشان می دهد. سه هفته پس از اتمام مرحله ایمنی زایی خون گیری و سرم گیری و تست الایزا انجام گردید که نتایج آن در سه نمودار ۱ تا ۳ نمایش داده شده است.

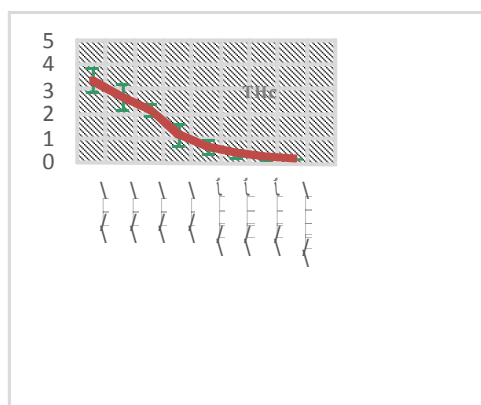


شکل شماره ۱. تخلیص پروتئین نوترکیب زیر واحد THC با استفاده از ستون نیکل (Ni-NTA) با روش طبیعی (۱) محلول رویی حاصل از بیان THC قبل از عبور از ستون (۲) رسوب حاصل از بیان THC (۳) محلول خروجی از ستون (Flow) (۴) محلول خروجی بافر B (Wash) (۵) نشانگر پروتئینی (سیناکلون) ۶ تا ۹) خروجی از ستون با بافرهای C، D، E (حاوی غلظت - های متفاوت ایمیدازول) و بافر MES



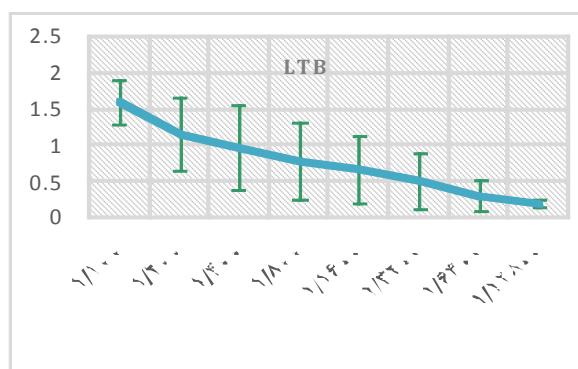
شکل شماره ۲. تخلیص پروتئین نوترکیب زیر واحد LTB با استفاده از ستون نیکل (Ni-NTA) به روش دنا توره (۱) رسوب حاصل از بیان پروتئین قبل از عبور از ستون (۲) نشانگر پروتئینی (SM0431) رسوب حل شده با بافر B حاوی اوره قبل از ستون (۳) نمونه خروجی از ستون (flow) (۴) نمونه خروجی از ستون با بافر C (Wash) (۵) نمونه خروجی از ستون با بافر E (بافر جدا کننده)

نتایج مربوط به نمودار شماره ۱ الیزا نشان از پاسخ بالایی  
 آنتی بادی در غلظت های متفاوت به پروتئین نو ترکیب زیر  
 واحد THC دارد. همان طور که دیده می شود در غلظت  
 ۱:۱۰۰، OD حدود ۳/۵ می باشد.



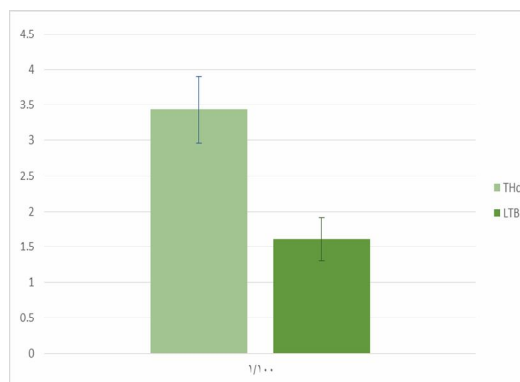
نمودار شماره ۱. تیتراژ آنتی بادی حاصل از آنتی ژن THC

همان طور که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است، در  
 غلظت ۱:۱۰۰ از آنتی بادی، OD حدود ۱/۷ به دست آمده  
 است و تا غلظت ۱:۱۲۸۰۰ از آنتی بادی نیز پاسخ قابل  
 مشاهده می باشد.



نمودار شماره ۲. تیتراژ آنتی بادی حاصل از آنتی ژن LTB

همان طور که در نمودار شماره ۳ مشاهده  
 می شود، تفاوت آشکاری میان تیتراژ آنتی بادی  
 حاصل از دو آنتی ژن THC و LTB وجود دارد. به  
 عنوان مثال میزان جذب در غلظت آنتی بادی  
 ۱:۱۰۰ در هر دو نمونه نشان داده شده است.



نمودار شماره ۳. مقایسه تیتراژ آنتی بادی حاصل از آنتی ژن THC و LTB در غلظت ۱:۱۰۰ آنتی بادی

## بحث و نتیجه گیری

یکی از اهداف ایمنی زایی، تولید سطوح آنتی بادی محافظت کننده و تولید و حفظ پلاسما سل می باشد، (۱۹). سلول های خاطره و هم چنین یک نوع از پلاسما سل ها به نام پلاسما سل های دراز عمر می توانند تا مدت های زیادی زنده بمانند، (۲). مراکز زایا، ساختارهای لنفوییدی هستند که پس از ایمنی زایی و در معرض قرار گرفتن آنتی ژن (آنتی ژن های وابسته به سلول T)، در فولیکول های لنفاوی تولید می گردند. مراکز زایا در جهت تسهیل توسعه سلول های خاطره B و پلاسما سل های با عمر طولانی تولید می شود، (۲۰). مرحله اول در تولید سلول های خاطره B و پلاسما سل های با عمر طولانی اختصاصی یک آنتی ژن، ایجاد تیتراژ آنتی بادی بالا علیه همان آنتی ژن است، (۱۵). در شرایط یکسان ایمنی زایی عاملی که می تواند منجر به تولید تیتراژهای متفاوتی از آنتی بادی شده و احتمالاً در ماندگاری خاطره ایمنی موثر باشد، ماهیت آنتی ژن است به صورتی که واکنش مراکز زایا بسته به ماهیت آنتی ژن ممکن است متفاوت باشد، (۲۱). رضایی و همکاران در یک مطالعه با انتخاب دو آنتی ژن Thc و BONT A/Hc که توانایی ایجاد خاطره هایی با ماندگاری متفاوت را دارند، نشان دادند در نتیجه ایمنی زایی در شرایط کاملاً یکسان، تیتراژ متفاوتی از آنتی بادی علیه هر یک از این آنتی ژن ها که از یک خانواده نیز هستند، به وجود می آید. به طوری که تیتراژ آنتی بادی تولید شده علیه هر آنتی ژن با ماندگاری خاطره اختصاصی رابطه مستقیم برقرار می کند، (۲۲). به این ترتیب به نظر می رسد در شرایط ایمنی زایی یکسان، آنتی ژن هایی که خاطره های ماندگارتری ایجاد می کنند، تیتراژ آنتی بادی بالاتری نسبت به آنتی ژن های ناتوان در ایجاد خاطره ای ماندگار علیه خود بر می انگیزند، (۱۵، ۱۶). در مطالعه دنیل تی. لیئونگ و همکاران روی افراد آلوده شده با ویروس کلرا O1 E1 در بنگلادش،

ارزیابی سلول های B خاطره، پلاسما سل های ترشح کننده آنتی بادی و تیتراژ آنتی بادی در سه گروه سنی ۵-۳ سال، ۱۷-۶ سال و ۶۰-۱۸ سال صورت گرفت. در این مطالعه ابتدا با اندازه گیری تیتراژ آنتی بادی در سه گروه سنی تفاوتی دیده نشد. سلول های B خاطره اختصاصی آنتی ژن و پلاسما سل های ترشح کننده آنتی بادی نیز در سه گروه سنی قابل مقایسه و تقریباً برابر بودند، (۲۳). در مطالعه کنوف ام و همکاران در دو گروه سنی واکسینه شده با واکسن چهار ظرفیتی ضد منگوقوچک تایپ A، C، W135 و Y کنژوگه با توکسوئید کزاز تیتراژ آنتی بادی اولیه ارزیابی شده و با تیتراژهای آنتی بادی حفظ شده و خاطره ایمنی مورد مقایسه قرار گرفته است، (۲۴). بدین ترتیب مقایسه در چندین مطالعه دیگر نیز مقایسه بین تیتراژ آنتی بادی در پاسخ اولیه و تیتراژ آنتی بادی حفاظتی که معمولاً از خاطره ایمنی ایجاد می شود صورت گرفته است، (۲۹-۲۵). در مطالعه حاضر نیز دو آنتی ژن به صورت هدف دار انتخاب شده اند. توکسوئید کزاز در برنامه واکسیناسیون نوزادان قرار داشته و قابلیت ایجاد خاطره ای ۱۰ ساله در انسان را دارد، (۳۰). آنتی ژن Thc زیر واحد اتصال و ایمونوژنیک توکسوئید کزاز می باشد. LTB نیز زیر واحد B توکسین حساس به حرارت باکتری اشیریشیاکلی بوده و بارها به شکل کاندیدای واکسن مورد استفاده قرار گرفته است. این زیر واحد تنها قابلیت ایجاد خاطره ای شش ماهه را دارد، (۳۳-۳۱). در این مطالعه مقایسه پروتئین نوترکیب زیر واحد Thc با پروتئین نوترکیب زیر واحد LTB از نظر میزان ایمنی زایی صورت گرفت که تیتراژ آنتی بادی بالای آنتی ژن Thc نسبت به آنتی ژن LTB مشاهدات قبلی را تأیید می کند. بنا بر این به نظر می آید تیتراژ آنتی بادی می تواند با ماندگاری خاطره ایمنی ارتباط داشته باشد. اثبات این فرضیه نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

## References

- 1-Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AG, Bradley-Sack R. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 465-83.
- 2-Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Travelling with infants and young children. Part III: Travellers diarrhea. *J Travel Med* 2002; 9: 141-50.
- 3-Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Institute of Biomedicine Department of Microbiology and Immunology Göteborg University, Printed at Vasastadens Bokbinderi AB, Göteborg: Sweden; 2008.
- 4-Hajishengallis G, Arce S, Gockel CM, Connell TD, Russell MW. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections. *J Dent Res* 2005; 84: 1104-16.
- 5-Turnbull B, Homans S. Dissecting the cholera toxin-ganglioside GM1 interaction by isothermal titration calorimetry. *J Am Chem Soc* 2004; 126: 1047-54.
- 6-Zhi-Dong J, Mathewson JJ, Ericsson CD, Svennerholm A, Pulido C, DuPont HL. Characterisation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in patients with traveller's diarrhoea acquired in Guadalajara, Mexico, 1992-1997. *J Infect Dis* 2000; 181: 779-82.
- 7-Millar DG, Hirst R, Snider DP. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of Cholera toxin. *Infect Immun* 2001; 65: 3476-82.
- 8-Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Travelling with infants and young children. Part III: Travellers diarrhea. *J Travel Med* 2002; 9:141-50.
- 9-Toivonen JM, Olivan S, Osta R. Tetanus toxin C-fragment: the courier and the cure? *Toxins* 2010;2:2622-44.
- 10-Farrar JJ, Yen LM, Cook T, Fairweather N, Binh N, Parry J, Parry CM, Tetanus J. *Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69:292-301.
- 11-Morihiro M. Tetanus Toxin Functional Fragment Antigen and Tetanus Vaccine. The research foundation of microbial disease of Osaka University. Osaka (JP). 2002; Patent No: US6372225 B1.
- 12-Danilova E, Shiryayev A, Kristoffersen EK, Sjursen H. Attenuated immune response to tetanus toxoid in young healthy men protected against tetanus. *Vaccine* 2005; 23: 4980-3.
- 13-Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe E. Epidemiology and prevention of vaccine preventable diseases. 10<sup>th</sup> ed. Centre for Disease Control and Prevention: Public Health Foundation; 2007.
- 14-Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Expert Rev Vaccine* 2008;7:795-804.
- 15-Daniel T, Mohammad AR, Mohasin M, Asrafuzzaman R, Sweta M. 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. *Vaccine Immunol* 2011;18:13-7.
- 16-Knuf M, Baine Y, Bianco V, Boutriau D, Miller JM. Antibody persistence and immune memory 15 months after priming with an investigational tetravalent meningococcal tetanus toxoid conjugate vaccine (MenACWY-TT) in toddlers and young children. *Hum Vaccin Immunother* 2012; 8:866-72.
- 17-Fatemi S, Yari K, Tolani M. [Expression and purification of C-terminal fragment of Botulinum neurotoxin A in *E. coli*]. *J Kurdistan Uni Med Sci* 2010;16:36-44. (Persian)
- 18-Khalesi R, Nazaryan S, Amani J, Ehsaei Z, Mansouri M. [Expression of heat-labile enterotoxin B subunit in *Escherichia coli* as vaccine candidate]. *Kaasar Med J* 2005;14:95-100. (Persian)
- 19-Beverley R. Immune Memory: the Basics and How to Trigger an Efficient Long-Term Immune Memory. *J Comp Path* 2010;142: S91-S95.
- 20-Williams M, Okitsu S, Wang N, Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Immunology* 2012; 12:321-8.
- 21-William GT, Jolly CT, Kohler J, Neuberger MS. The contribution of somatic hypermutation to the diversity of serum immunoglobulin. *Immunity* 2000;13:409-17.
- 22-Rezaei A, Miri A, Aolad G, Saadati M, Ebrahimi M, Boostani H. [Evaluating and

- comparing immunization level of the recombinant proteins, binding domain of tetanus neurotoxin and b subunit of heat labile toxin of escherichia coli, and their relation to immunological memory]. *J Ilam Uni Med Sci* 2013;21:38-42. (Persian)
- 23- Daniel TL, Rahman MA, Mohasin M, Riyadh MA. 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; 4:1317-25.
- 24- Knuf M, Baine Y, Bianco V, Boutriau D, Miller JM. Antibody persistence and immune memory 15 months after priming with an investigational tetravalent meningococcal tetanus toxoid conjugate vaccine (MenACWY-TT) in toddlers and young children. *Human Vaccine Immunotherap* 2012; 8: 866-72.
- 25- Roost HP, Bachmann MF, Haag A, Kalinke U, Pliska V, Hengartner H, et al. Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:1257-61.
- 26- Kalinke U, Bucher EM, Oxenius A, Ernst B, Roost HP, Geley S, et al. The role of somatic mutation in the generation of the protective humoral immune response against vesicular stomatitis virus (VSV). *Immunity* 1996;5:639-52.
- 27- Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhart C, et al. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 1997;276: 2024-7.
- 28- Goldbaum FA, Cauerhff A, Velikovsky CA, Llera AS, Riottot MM, Poljak RJ. Lack of significant differences in association rates and affinities of antibodies from short-term and long-term responses to hen egg lysozyme. *J Immunol* 1999;162:6040-5.
- 29- Jerne NK. A study of avidity based on rabbit skin responses to Diphtheria toxin-antitoxin mixtures. *Acta Path Microbiol Scand* 1951;87:1-183.
- 30- 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; 24:3076-83.
- 31- Initiative for Vaccines Research Team of the Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, "State of the art of vaccine research and development ". World Health Organization Department of Immunization, Vaccines and Biologicals CH-1211 Geneva 27:Switzerland; 2005.
- 32- Walker RI, Steele D, Aguado T. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic E. coli (ETEC) disease. *Vaccine* 2007; 25: 2545-66.
- 33- World Health Organization Geneva .Weekly epidemiological record. Printed in Switzerland 2006; 81: 97-104.



## Evaluating and Comparing Immunization Level of the Recombinant Proteins, Binding Domain of Tetanus Neurotoxin and B Subunit of Heat Labile Toxin of Escherichia coli, and their Relation to Immunological Memory

Rezaie E<sup>1,2</sup>, Saadati M<sup>1</sup>, Salimian J<sup>3</sup>, Olad GH<sup>2</sup>, Miri A<sup>1,4</sup>, Azizi Jalilian F<sup>5</sup>, Nazarian S<sup>1</sup>

(Received: 1 June, 2013

Accepted: 25 August, 2013 )

### Abstract

**Introduction:** Heat labile toxin (LT) is one of the virulence factors of Enterotoxigenic Escherichia coli. B subunit of LT (LHB) is the binding subunit and can induce six months immunity in humans. Tetanus toxin of Clostridium Tetani causes the fatal disease, tetanus. This toxoid induces two years immunity in humans. Hc subunit, as binding domain of the toxoid is considered as immunogenic part of tetanus toxin. The THc and LTB recombinant subunits have the potential role to induce immunological memories with different longevity. The purpose of this study was to evaluate and compare the immunogenicity of THc and LTB recombinant proteins in animal model and also to evaluate their roles in immunity duration.

**Materials & methods:** The recombinant proteins, THc and LTB, were expressed in the transgenic host, E.Coli BL21 DE3 using pET28a vector containing their respected genes in optimum condition. After expression, LTB and THc were purified from insoluble and soluble phases, respectively.

Then, their purity was confirmed by SDS-PAGE gel. To evaluate their immunogenicity, these proteins were injected into mice and the antibody titer were evaluated and compared by ELISA technique.

**Findings:** SDS-PAGE results showed overexpressed levels of the proteins under study. Immunity assessment revealed that in the same condition of immunity the THc subunit produces a higher antibody titer in comparison with the LTB subunit.

**Discussion & Conclusion:** The first step in creating a strong and long-lasting immunological memory is the induction of high titer of antibody. Thus, the difference in antibody titer may be related to memory cells lifetime in the immunized mice.

**Keywords:** Recombinant protein, binding domain of tetanus toxin (THc), B subunit of heat labile toxin (LTB), antibody titer, immune memory

1) Dept of Biology, Faculty of Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran

2) Applied Biotechnology Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3) Applied Microbiology Research Center, Baqiatallah University of Medical Science, Tehran, Iran

4) Human Genetic Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5) Clinical Microbiology Research Center, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran