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

احسان رضایی[۱،۲]، مجتبی سعادتی[۱]، جعفر سلیمیان[۳*]، غلام رضا اولاد[۲]، علی میری[۱،۴]، فرید عزیزی جلیلیان[۵] ، شهرام نظریان[۱]

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 اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک است. زیر واحد LTB، 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 LTB 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 LTB و THc در مدل حیوانی و بررسی ارتباط آن با مدت مصونیت می باشد.

مواد و روش ها: بیان پروتئین های نوترکیب THc و LTB با استفاده از میزبان E.coli Bl21 DE3 تراریخته با وکتورهای pET28a حاوی این دو ژن در شرایط بهینه انجام شد. پس از بیان در شرایط بهینه، LTB 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. تیتر 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 تیتر آنتی بادی بالاتری نسبت به زیر واحد LTB دارد.

بحث و نتیجه گیری: تیتر آنتی بادی بالا، گام اول در ایجاد خاطره ایمنی قوی و ماندگار است. بنا بر این تفاوت در تیتر 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(LTB)، پروتئین نوترکیب، تیتر آنتی بادی، خاطره ایمنی

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

Email: jafarsalimyan@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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،(۵-۳). 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 غیرکووالان در اتصال با زیر واحد A می باشد،(۶). این زیر واحد، قسمت اتصالی توکسین را شکل داده و به گیرنده های GM_1 سطح سلول های اپی تلیالی روده اتصال می یابد،(۸-۶). 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_1b و GT_1b) سلول های عصبی متصل شده و به درون سلول های عصبی راه می یابد،(۱۱-۹). 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 نوترکیب 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

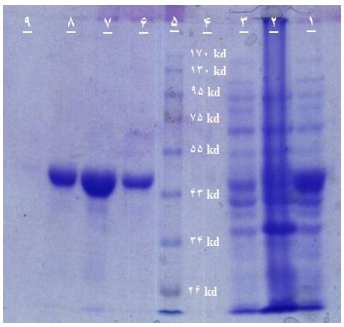
دو میزبان E.coli Bl21 DE3 با وکتور pET28a تراریخت شد. یک وکتور واجد ژن نوترکیب بخشی از زنجیره سنگین توکسین تتانی(THc) بوده،(۱۷)، و دیگری حاوی ژن نوترکیب قسمت LTB توکسین حساس به حرارت اشریشیاکلی بود،(۱۸). بهینه سازی بیان در مورد هر دو نوع پروتئین نوترکیب و در سه متغیر(دما، زمان و غلظت ماده القاء کننده) صورت پذیرفت. تولید پروتئین نوترکیب LTB در مقیاس بالای آزمایشگاهی(۲۰۰ میلی لیتر) و با شرایط(کانامایسین با غلظت ۲۰μg /ml، افزودن IPTG با غلظت ۱mM در OD=۰/۶، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۶ ساعت) انجام شد. تولید پروتئین نوترکیب THc نیز در حجم(۴۰۰ میلی لیتر) و در شرایط(کانامایسین با غلظت ۲۰μg /ml، افزودن IPTG با غلظت ۱mM در OD=۰/۷، دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و زمان ۱۸ ساعت) انجام گردید. تخلیص پروتئین نوترکیب 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 نوترکیب 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 نوترکیب 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

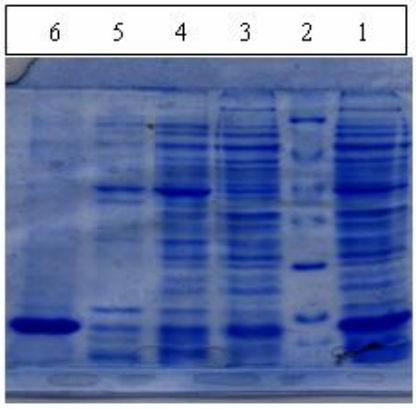
تا سوم به همراه ادجوانت ناقص به صورت زیرجلدی انجام گردید. فاصله تزریق اول و دوم ۲۰ روز و فاصله تزریقات بعدی نسبت به هم ۱۴ روز در نظر گرفته شد. خون گیری از چشم موش ها و جداسازی سرم ها ۲۰ روز پس از آخرین تزریق صورت گرفت. از تست الایزای غیرمستقیم برای سنجش(تیتراسیون) آنتی بادی سرم های جدا شده استفاده گردید.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

یافته های پژوهش

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.



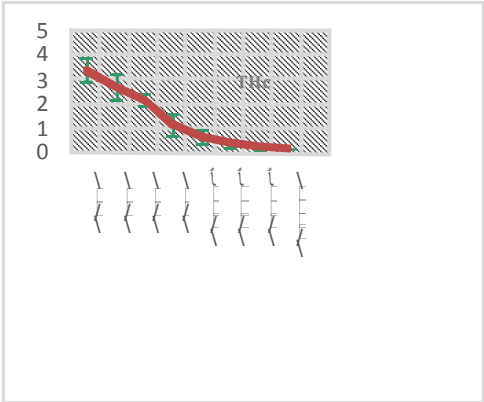
شکل شماره ۱. تخلیص پروتئین نوترکیب زیر واحد THc با استفاده از ستون نیکل(Ni-NTA)با روش طبیعی
۱)محلول رویی حاصل از بیان THc قبل از عبور از ستون ۲)رسوب حاصل از بیان THc ۳)محلول خروجی از ستون(Flow) ٤)محلول خروجی بافر B (Wash) ٥)نشانگر پروتئینی(سیناکلون) ٦ تا ۹)خروجی از ستون با بافرهای C، D، E (حاوی غلظت - های متفاوت ایمیدازول) و بافر MES



شکل شماره ۲. تخلیص پروتئین نوترکیب زیر واحد LTB با استفاده از ستون نیکل(Ni-NTA) به روش دناتوره
۱)رسوب حاصل از بیان پروتئین قبل از عبور از ستون ۲)نشانگر پروتئینی SM0431 ۳)رسوب حل شده با بافر B حاوی اوره قبل از ستون ٤)نمونه خروجی از ستون(flow) ٥)نمونه خروجی از ستون با بافرC (Wash) ٦) نمونه خروجی از ستون با بافر E (بافر جدا کننده)

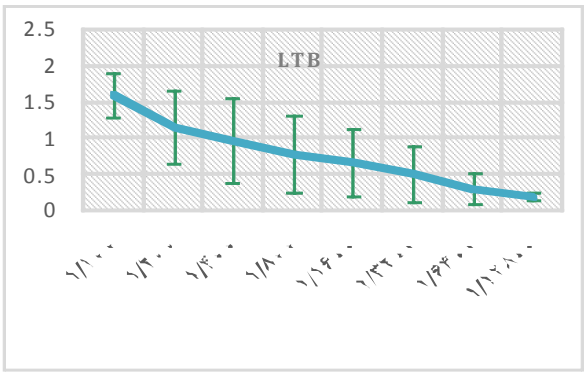
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

نتایج مربوط به نمودارشماره ۱ الیزا نشان از پاسخ بالای آنتی بادی در غلظت های متفاوت به پروتئین نوترکیب زیـر واحد THc دارد. همان طور که دیده مـی شـود در غلظـت ۱:۱۰۰، OD حدود ۳/۵ می باشد.



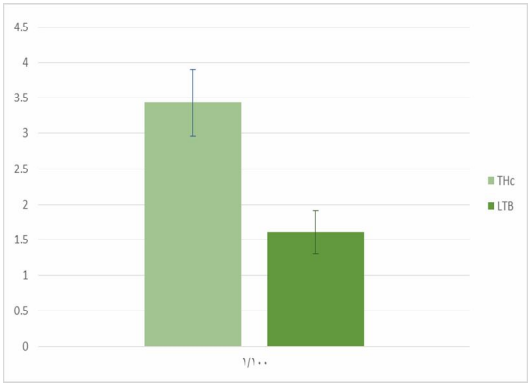
نمودار شماره ۱. تیتر آنتی بادی حاصل از آنتی ژن THc

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. تیتر آنتی بادی حاصل از آنتی ژن LTB

همـان طـور کـه در نـمودار شـمـاره ۳ مـشاهـده می شـود، تـفاوت آشـکاری میـان تـیتـر آنـتی بـادی حاصـل از دو آنتـی ژن THc و LTB وجـود دارد. بـه عنـوان مـثال مـیـزان جـذب در غلـظـت آنـتی بـادی ۱:۱۰۰ در هـر دو نمـونه نـشان داده شـده اسـت.



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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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 لنفوئیدیی 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 تیتر آنتی بادی بالا علیه همان آنتی ژن است،(۱۵). در شرایط یکسان ایمنی زایی عاملی که می تواند منجر به تولید تیترهای 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، تیتر 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 تیتر 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، تیتر 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 ویبریوکلرا O1 E1 در بنگلادش، ارزیابی سلول های B خاطره، پلاسما سل های ترشح کننده آنتی بادی و تیتر 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 تیتر 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 چهارظرفیتی ضد منینگوکوک تایپ A، C، W135 و Y کنژوگه با توکسوئید کزاز تیتر آنتی بادی اولیه ارزیابی شده و با تیترهای آنتی بادی حفظ شده و خاطره ایمنی مورد مقایسه قرار گرفته است،(۲۴). بدین ترتیب مقایسه در چندین مطالعه دیگر نیز مقایسه بین تیتر آنتی بادی در پاسخ اولیه و تیتر 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 اتصالی 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 تیتر آنتی بادی بالای آنتی ژن THc نسبت به آنتی ژن LTB مشاهدات قبلی را تائید می کند. بنا بر این به نظر می آید تیتر آنتی بادی می تواند با ماندگاری خاطره ایمنی ارتباط داشته باشد. اثبات این فرضیه نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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 Quadalajara, 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, Tetanius J. Neurol Neurosurg Psychiatry 2000; 69:292-301.

11-Morihiro M. Tetanius Toxin Functional Fragment Antigen and Tatanus Vaccine. The research foundation if 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. 10th ed. Centre for Disease Control and Preventi-on: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 Butolinum 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]. Kaosar 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-Willium 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

comparing immunization level of the recombinant proteins, binding domain of tetanus neurotoxin and b subnnit 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, Summerfielda 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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

*Rezaie E[1,2], Saadati M[1], Salimian J[*3], Olad GH[2], Miri A[1,4], Azizi Jalilian F[5] , Nazarian S[1]*

(Received: 1June, 2013 Accepted: 25August, 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 immuneological 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 subnnit 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]