خالص‌سازی توکسین اپسیلون از سویه‌ی واکسینال کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ D با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یون و ژل فیلتراسیون

احسان زایرزاده[۱*]، احمدرضا جباری[۲]، محمدکاظم کوهی[۳]، گودرز صادقی‌هشجین[۳]، زینب قاسم‌پورآبادی[۴] و آزاده فردی‌پور[۵]

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۸

چکیده

باکتری کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ D در بره‌ها، گوساله‌ها، کره اسب‌ها، بچه خوک‌ها و جوجه‌ها باعث ایجاد بیماری انتروتوکسمی یا pulpy kidney می‌شود. هم‌چنین در انسان، عامل بیماری enteritis necroticans می‌باشد. مهم‌ترین توکسین تیپ D توکسین اپسیلون است. این توکسین به عنوان مهم‌ترین فاکتور ویرولانس باکتری کلستریدیوم پر فرنژنس تیپ D در بیماری‌زایی به شمار می‌رود. در مطالعه‌ی حاضر، عملیات خالص‌سازی توکسین اپسیلون با استفاده از تکنیک‌های مختلف کروماتوگرافی نظیر کروماتوگرافی تعویض کاتیون CM-Sepharose و ژل فیلتراسیون Sephadex-G100 با هدف ابداع روشی جدید و اقتصادی به منظور خالص‌سازی توکسین اپسیلون انجام شد. پس از کشت باکتریایی، MLD نمونه‌ی حاصل از کشت باعث مرگ موش‌ها تا رقت ۱/۸۰۰۰ گردید. هم‌چنین نمونه‌ی کشت اولیه باعث مرگ سلول‌های MDCK در کشت سلولی شد. بهترین غلظت نمک سولفات آمونیوم جهت ترسیب و تغلیظ نمونه‌ی کشت باکتریایی ۶۰ درصد تعیین شد. پس از عملیات ترسیب، تغلیظ و دیالیز، نمونه‌ی خام روی کروماتوگرافی تعویض کاتیون CM-Sepharose بارگذاری شد. توکسین اپسیلون در غلظت نمک ۱۰۰ میلی‌مولار خارج گردید. توکسین اپسیلون بر اساس فعالیت توکسین در مراحل مختلف خالص‌سازی حدود ۱۳۸/۹ برابر خالص شد. وزن مولکولی این توکسین حدود ۳۴ کیلو دالتون تعیین گردید. با توجه به یافته‌های این تحقیق، روش‌های استفاده شده در عملیات خالص‌سازی این توکسین مناسب می‌باشد و توکسین به دست آمده دارای میزان فعالیت و درجه‌ی خلوص مناسبی است.

کلمات کلیدی: خالص‌سازی، کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ D، توکسین اپسیلون، کروماتوگرافی تعویض کاتیون، ژل فیلتراسیون

مقدمه

کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ D عامل آنتروتوکسمی در بره، گوسفند، بز و گوساله بوده و به ندرت باعث بیماری در گاو و شتر اهلی می‌شود (Uzal et al. 2010, McClane et al. 2004). این بیماری واگیردار نیست و در صورت رشد سریع در روده که در اثر عواملی مانند تغییر ناگهانی جیره از یک جیره‌ی فقیر به یک جیره‌ی غنی اتفاق می‌افتد. توکسین اپسیلون که یک پروتوکسین است تحت تأثیر آنزیم‌های گوارشی به ویژه تریپسین قرار گرفته و به صورت توکسین فعال تغییر ماهیت داده و مسموم‌کنندگی آن تا صد برابر افزایش می‌یابد (Uzal et al. 2010, Songer 1996). این توکسین دارای گیرنده‌هایی روی سیالوگلیکوپروتئین‌های سلول‌های مغزی بوده و

[۱*] استادیار گروه بیولوژی پژوهشکده‌ی صنایع‌غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج E-mail: zayerzadeh@standard.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانشیار بخش تحقیق و تولید واکسن‌های بی‌هوازی، موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج

[۳] دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

[۴] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

[۵] کارشناس ارشد بخش کنترل کیفی موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج

باعث آسیب به عروق مغزی می‌شود و ایجاد نکروز آبکی موضعی در بافت مغز می‌کند. جایگاه این گیرنده در عروق آندوتلیوم است که باعث اختلال در عروق مغز شده و در نتیجه میزان نفوذپذیری عروق مغز را نسبت به پروتئین‌های پلاسما و آب افزایش می‌دهد، این امر باعث جمع شدن مایع در داخل مغز و در نتیجه افزایش فشار داخل مغزی می‌شود. در نتیجه این اثرات، تظاهر علائم بالینی سیستم عصبی از جمله عدم تعادل و تشنج است. تأثیر این توکسین روی کلیه به صورت نکروز قشر کلیه بروز می‌کند (McClane et al. 2004, Sakurai 1995, Uzal et al. 2010). ژن توکسین اپسیلون بر روی هر دو توکسینوتیپ D و B واقع شده است. در توکسینوتیپ B، ژن ET روی پلاسمید ۶۵kb و هم‌چنین ممکن است روی ژن cpb_2 که مربوط به B_2-Toxin است قرار داشته باشد (Miyamoto et al. 2008, Sayeed et al. 2008). در توکسینوتیپ D ژن توکسین اپسیلون روی پلاسمیدهایی بین 48-110 KDa قرار دارد (Miyamoto et al. 2008). توکسین اپسیلون ترشح شده از باکتری یک پروتوتوکسین نسبتاً غیرفعال با ۲۹۶ اسیدآمینه و وزن مولکولی حدود 32.9 KDa است که بعد از طی فرآیندهای پروتئولیتیک روده به فرم فعال یا توکسیک درمی‌آید (Miyamoto et al. 2008). با توجه به نوع پروتئاز، تعداد اسید آمینه‌های جدا شده می‌تواند بین ۱۳-۱۰ اسید آمینه از سمت N-terminal و ۲۹-۲۲ اسید آمینه از سمت C-terminal باشند (Sayeed et al. 2008). پروتوتوکسین اپسیلون در صورتی که تحت تأثیر همزمان دو آنزیم تریپسین و کموتریپسین قرار بگیرد به فرم فعال توکسین در می‌آید و خاصیت سمی نشان می‌دهد. در این صورت، ۱۳ اسید آمینه از N و ۲۹ اسید آمینه از C جدا می‌شود، توکسین حاصل ۱۰۰۰ برابر سمی‌تر از پروتوکسین می‌باشد که بعد از سموم بوتولینیوم و کزاز قوی‌ترین سم شناخته شده‌اند (Sakurai 1995). توکسین اپسیلون مهم‌ترین توکسین باکتری کلستریدیوم پر فرنژنس تیپ D می‌باشد که توکسویید آن در واکسن چهارگانه انتروتوکسمی ساخت موسسه‌ی رازی وجود دارد. لذا، به منظور سنجش ایمنی‌زایی واکسن و نیز سایر مطالعات مربوط به تشخیص و پاتوژنز بیماری، در اختیار داشتن توکسین اپسیلون خالص بسیار مهم و ضروری است. با توجه به بررسی منابع، مطالعه‌ی حاضر، اولین تحقیق در زمینه‌ی خالص‌سازی توکسین اپسیلون از سویه واکسینال کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ D در ایران می‌باشد. هم‌چنین در این مطالعه، روشی جدید برای خالص‌سازی این توکسین معرفی گردیده است.

مواد و روش کار

کشت باکتری کلستریدیوم پر فرنژنس تیپ D

به منظور کشت باکتری، آمپول لیوفیلیزه حاوی باکتری کلستریدیوم پر فرنژنس تیپ D باز گردید و در لوله ولکام حاوی محیط کشت عصاره‌ی کبد گوساله (تهیه شده در بخش تولید محیط‌های کشت و استریلیزاسیون موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی (جار بی‌هوازی) کشت داده شد. در مرحله‌ی بعد مقدار مشخصی از باکتری رشد کرده در لوله‌ی معمولی حاوی عصاره‌ی کبد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس محتویات لوله‌ی معمولی به طور کامل در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی عصاره‌ی کبد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد. به این صورت که باکتری رشد کرده در لوله‌ی معمولی به همراه محیط کشت در شرایط استریل در کنار شعله به ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری برای تکمیل مرحله‌ی کشت انتقال داده شد. پس از این مرحله، محتویات ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری در ارلن حاوی محیط کشت مخصوص توکسین‌زایی کشت داده شد و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد آنکوبه گردید، کنترل آلودگی تمامی مراحل بالا با استفاده از کشت باکتری در محیط‌های آگار خوندار و ژلوز انجام شد. محیط کشت توکسین‌زایی حاوی پپتون ۲ درصد، عصاره‌ی مخمر ۰/۵ درصد، ال- سیستئین ۰/۰۲ درصد، پودر کبد ۰/۷۵ درصد، نمک ۲/ درصد، تامپون ۱ درصد، تیکه گوشت ۱ درصد و تریس ویتامین می‌باشد. تریس

ویتامین حاوی ۵ میلی‌گرم بیوتین، ۲ میلی‌گرم تیامین، ۵ میلی‌گرم نیکوتینیک اسید، ۵ میلی‌گرم پیریدوکسین، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B_{12}، ۵ میلی‌گرم سولفات آهن، ۲ میلی‌گرم سولفات مس، ۳ میلی‌گرم سولفات روی، ۳ میلی‌گرم سولفات منیزیم و ۵ میلی‌گرم کلرید منگنز می‌باشد (Subramanyam et al. 2001).

تأیید وجود توکسین در فیلترات با استفاده از کشت سلولی

مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی محیط کشت پس از سانتریفیوژ و جدا سازی جرم، به سلول‌های MDCK (Madin Darby canine kidney) (سلول‌های MDCK تهیه شده از بانک سلول انستیتو پاستور) که در محیط کشت (DMEM (Dulbecco's modified eagle medium حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (FCS)، ۱۰۰IU/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰mg/ml استرپتومایسین و ۲ میکرولیتر ال-گلوتامین که به طور کامل رشد کرده بودند، اضافه شد. در صورت وجود توکسین فعال در محلول روئی کشت باکتری، سلول‌های MDCK ابتدا گرد شده و در نهایت از کف پلیت جدا خواهند شد. در این مرحله، ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین به عنوان گروه کنترل به محیط کشت سلول‌های MDCK اضافه گردید (تصویر ۱) (Shortt 2000).

مراحل خالص‌سازی توکسین اپسیلون

ترسیب با استفاده از نمک آمونیوم سولفات

در این مرحله از غلظت‌های مختلف نمک آمونیوم سولفات (۱۰ و ۲۰ و ۳۰ و ۴۰ و ۵۰ و ۶۰ و ۷۰ و ۸۰ درصد) جهت ترسیب فیلترات استفاده شد و به مدت ۲۴ ساعت در سردخانه قرار داده شدند. عملیات ترسیب به دلیل کم کردن حجم محلول برای خالص‌سازی توکسین اپسیلون و از سوی دیگر برای حذف برخی از توکسین‌های ترشح شده از باکتری صورت می‌گیرد. پس از ترسیب با غلظت‌های مختلف نمک، بهترین غلظت نمک با تزریق ترسیب دیالیز شده به موش به منظور تعیین minimum lethal dose (MLD) تعیین گردید (Subramanyam et al. 2001).

عملیات دیالیز

در این مرحله محلول حاوی آمونیوم سولفات به مدت ۴۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و در نهایت مایع رویی حذف شد. رسوب به دست آمده از ته ظرف جمع‌آوری گردیده و درون کیسه‌ی دیالیز به همراه ۲۰ml از محلول بافر تریس هیدروکلراید pH=7.5 و مولاریته ۰/۰۲ ریخته شد. کیسه‌ی دیالیز حاوی رسوب در ۴ لیتر بافر تریس هیدروکلراید pH=7.5 و مولاریته ۰/۰۲ برای خروج آمونیوم سولفات از نمونه قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در سردخانه قرار داده شد. در طول این مدت ۳ بار مرحله‌ی بافر تعویض شد تا مرحله‌ی تبادل نمک به خوبی انجام شود. در پایان نمونه‌ی دیالیز شده جمع‌آوری گردید و در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

کروماتوگرافی تعویض کاتیون CM-Sepharose

پس از آماده شدن و متعادل شدن ستون، نمونه‌ی تغلیظ شده روی ستون بار گذاری گردید. پس از عبور نمونه روی ستون جهت شستشوی ستون از بافر شستشو تریس هیدروکلراید با pH=7.5 با مولاریه ۲۰ میلی‌مولار استفاده گردید. برای شستشو حدود ۳ برابر حجم ستون از بافر شستشو استفاده شد تا جایی که فراکشن‌های آخر، هیچ‌گونه جذب نوری نداشتند. سرعت خروج نمونه‌ها از ستون ۳۰ml/h با استفاده از پمپ پریستالتیک تنظیم گردید. هم‌چنین حجم فراکشن‌های جمع‌آوری شده ۵ میلی‌لیتر تنظیم گردید. پس از مرحله‌ی شستشو، غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌مولار تهیه شده در بافر اولیه با حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر به ستون تزریق گردید و پروتئین‌های چسبیده به ماتریکس از ستون خارج گردید. در این مرحله، به منظور تعیین فعالیت توکسین اپسیلون ، ۰/۵ میلی‌لیتر از

فراکشن‌های به دست آمده به موش تزریق گردید. برای تعیین الگوی پروتئین‌ها و تعیین خلوص توکسین اپسیلون از تکنیک SDS-PAGE استفاده گردید (Hames and Rickwood 1981).

کروماتوگرافی ستونی (Gel filtration)

به منظور خالص‌سازی نهایی توکسین اپسیلون، نمونه‌ی حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیون CM-Sepharose پس از ترسیب و دیالیز روی ستون sephadex-G100 بارگذاری گردید. در این مرحله به مقدار کافی از پودر ژل sephadex-G100 با بافر ۲۰ میلی‌مولار تریس با pH=7.5 مخلوط و در سردخانه نگهداری شد. پس از حجم گرفتن ژل، عملیات گاز زدایی انجام شد و در نهایت ژل در ستون به ارتفاع ۱۰۰ سانتی‌متر و قطر ۲ سانتی‌متر پک شد. پس از عملیات پر کردن ستون، عملیات متعادل‌سازی بستر انجام شد. سپس نمونه‌ی تغلیظ شده از مرحله‌ی قبل به ستون تزریق شد. سرعت حرکت نمونه ۳۰ml/h توسط پمپ تنظیم گردید و فراکشن‌های خروجی توسط دستگاه فراکشن کالکتور با حجم ۱۰ میلی‌لیتر در هر لوله جمع‌آوری گردید (تصویر ۲). پس از این مرحله، میزان جذب نوری فراکشن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد (Parreiras et al. 2002). در نهایت منحنی کروماتوگرام توسط نرم‌افزار اکسل رسم شد.

پروتئین سنجی به روش لوری (Lowry)

مقدار پروتئین موجود در نمونه‌های مورد نظر با استفاده از روش Lowry سنجیده شد. در این روش از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد برای تهیه‌ی منحنی استاندارد استفاده شد (Lowry et al. 1951).

وسترن بلات (Western Blot)

تکنیک وسترن بلات جهت ردیابی پروتئین‌های اختصاصی در یک نمونه استفاده می‌شود. از این تکنیک برای ردیابی توکسین اپسیلون در نمونه‌های تخلیص شده پس از عملیات تخلیص (کروماتوگرافی) استفاده شد. در این تکنیک، ژل را پس از اتمام SDS-PAGE که از ژل ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۲۰ ولت استفاده شده بود، از دستگاه خارج کرده و با بافر شستشوی وسترن بلات یک بار شستشو داده شد. سپس ژل برش داده شد، هم‌چنین کاغذ نیتروسلولز به اندازه‌ی ژل برش داده شد و برای مشخص شدن ترتیب نمونه‌ها، ابتدا و انتهای کاغذ بایستی علامت زده شود. پس از برش ژل و کاغذ نیترو سلولز، دو لایه کاغذ صافی، اسفنج و ساپورت بسته می‌شود و در بافر ترانسفر در تانک وسترن بلات قرار داده شد. جریان با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱ ساعت در تانک وسترن بلات برقرار گردید . پس از پایان عملیات انتقال، کاغذ نیتروسلولز از سیستم جدا شد و یک بار با بافر شستشو داده شد. کاغذ نیتروسلولز در محلول بلوکینگ که حاوی ۳ درصد BSA (bovine serum albumin) می‌باشد به مدت ۱/۵ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بهم زده شد (Blocking). بعد از مرحله‌ی بلوکینگ، ۲ بار به مدت ۱۰ دقیقه کاغذ با بافر شستشو داده شد. کاغذ نیتروسلولز جهت اتصال آنتی‌بادی اولیه در محلول حاوی آنتی‌توکسین اپسیلون (DAKO, Denmark) به نسبت ۱/۵۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق آنکوبه و تکان داده شد (Primary antibody). پس از مرحله‌ی اتصال، چهار بار شستشو و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با بافر شستشو داده شد. در این مرحله کاغذ نیتروسلولز در محلول ۱/۱۰۰ آنتی آنتی‌بادی (IgG) کنژوگه به مدت ۲ ساعت در دمای محیط برای اتصال آنتی آنتی‌بادی (DAKO Denmark) با آنتی‌بادی آنکوبه و شیک گردید (DAKO Denmark). پس از اتمام مرحله‌ی اتصال، کاغذ نیترو سلولز چهار مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد. در پایان، برای ظهور باندها، کاغذ نیتروسلولز در محلول حاوی ۴- کلرو آلفا نفتول تریس هیدروکلراید، NaCl و H_2O_2 قرار داده شد. در صورت اتصال مناسب

آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، رنگ قهوه‌ای باندها مشاهده می‌شود (Colorimetric detection) (Chen et al. 2011).

الایزا (ELISA)

الایزا یک تست مهم در ردیابی حضور یک آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی در یک نمونه است. از این تست برای ردیابی حضور توکسین اپسیلون در نمونه‌ی تخلیص شده، استفاده گردید. تست با استفاده از کیت مخصوص توکسین اپسیلون محصول شرکت (Cypress Diagnostics) انجام شد. در این تست، نمونه حاوی توکسین با استفاده از بافر رقیق‌سازی، رقیق شد و در چاهک‌های میکرو پلیت ۹۶ خانه‌ای بار گزاری گردید. مدت انکوباسیون ۶۰ دقیقه بود. پس از شستشوی پلیت، آنتی‌توکسین اپسیلون کنژوگه در چاهک‌ها بارگذاری شده و به مدت ۶۰ دقیقه آنکوبه گردید. پلیت مجدد شستشو داده شد و کروموژن (تترا متیل بنزیدین TMB) اضافه گردید. در این مرحله جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد و مورد آنالیز قرار گرفت (Pooladgar et al. 2014).

تست خنثی‌سازی توکسین (TNT)

در این آزمایش، رقت‌های مختلف (۱/۱۰۰ تا ۱/۱۰۰۰) توکسین از استوک حاصل (۱mg/ml) از عملیات خنثی‌سازی تهیه شد. هم‌چنین استوک آنتی‌توکسین استاندارد اپسیلون به مقدار یک واحد بین‌المللی (IU) تهیه شد. به هر کدام از لوله‌های حاوی رقت‌های توکسین، یک واحد آنتی‌توکسین اضافه شد و به مدت نیم ساعت انکوبه شد. سپس، از هر رقت به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به دو موش به صورت داخل رگی تزریق گردید. مرگ و میر حیوانات به مدت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (Lucken et al. 2000).

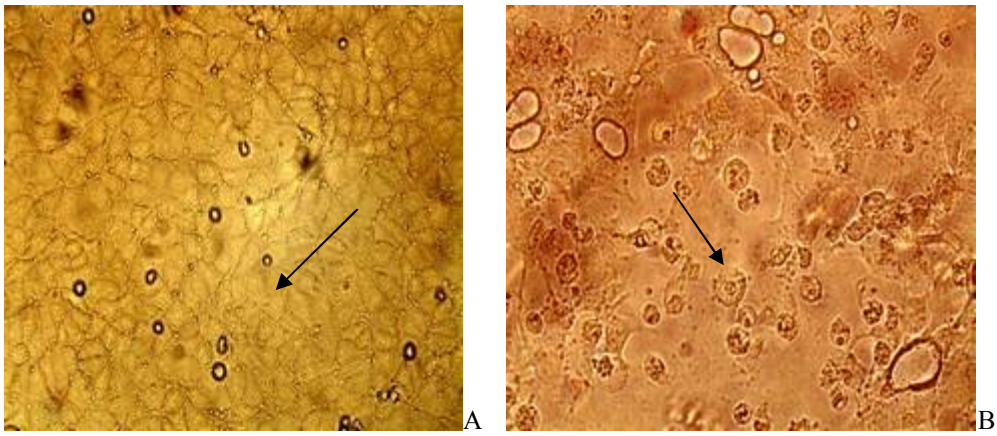
نتایج

بررسی فعالیت توکسین اپسیلون

پس از سانتریفیوژ کردن مایع کشت باکتری کلستریدیوم پر فرنژنس تیپ D و جداکردن جرم از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به دو عدد موش به صورت داخل صفاقی تزریق شده و ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین به دو موش برای گروه کنترل تزریق شد. مرگ حیوانات در گروه ۱ نشان دهنده‌ی فعالیت توکسین اپسیلون می‌باشد. هم‌چنین برای تعیین میزان فعالیت توکسین اپسیلون تست MLD انجام شد. کم‌ترین میزان دوز کشنده محلول رویی، رقت ۱/۸۰۰۰ شد.

بررسی فعالیت سیتو توکسیک توکسین اپسیلون با استفاده از کشت سلول

نمونه‌های مربوط به هر مرحله از عملیات خالص-سازی که شامل مایع رویی محیط کشت باکتری، نمونه‌ی تغلیظ شده، نمونه‌ی به دست آمده بعد از ستون CM-Sepharose و نمونه‌ی به دست آمده پس از ستون Sephadex G100 به محیط کشت سلول‌های MDCK اضافه شد و در زمان‌های مختلف بررسی شد. تمامی نمونه‌ها اثرات سیتوتوکسیک از جمله گرد شدن، ستاره‌ای شدن و واکوئله شدن را روی سلول‌های MDCK نشان دادند.



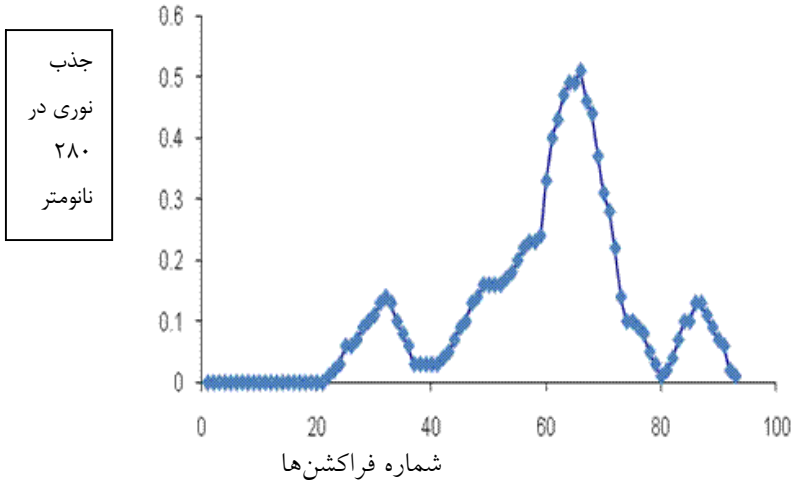
تصویر ۱: اثرات سیتوتوکسیک توکسین اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D. A: سلول‌های MDCK طبیعی (کنترل)، B: سلول‌های MDCK پس از مواجهه با نمونه‌های حاوی بتا توکسین. نوک پیکان: گرد شدن، ستاره‌ای شدن و واکوئله شدن سلول‌های MDCK

خالص سازی توکسین اپسیلون

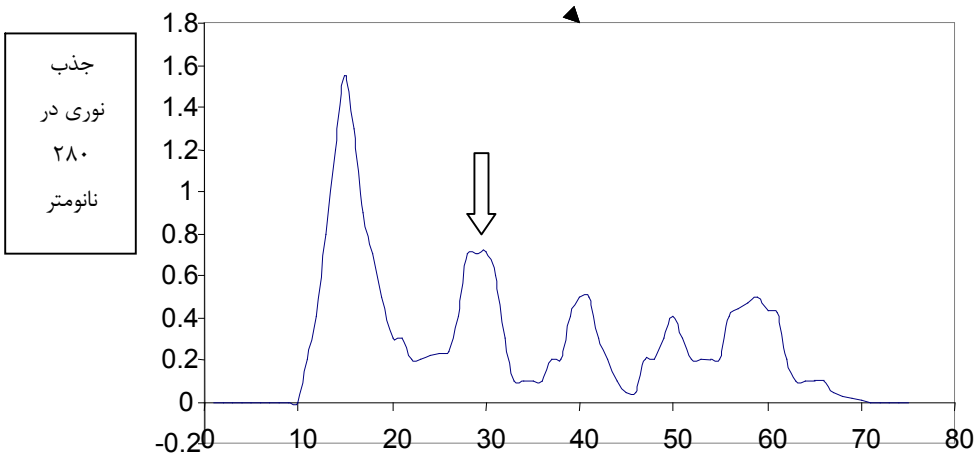
پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف نمک آمونیوم سولفات برای عملیات ترسیب و تغلیظ مایع رویی کشت باکتری، بهترین و مناسب‌ترین غلظت نمک ۶۰ درصد تعیین گردید به این صورت که رسوب به دست آمده از غلظت ۶۰ درصد نمک آمونیوم سولفات بالاترین میزان فعالیت توکسین از نظر MLD در موش و بیش‌ترین میزان پروتئین را نشان داد (جدول ۱). در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ی به دست آمده روی ستون کروماتوگرافی تعویض کاتیون CM-Sepharose بارگذاری گردید. پس از اتمام شستشو توسط بافر شستشو غلظت‌های مختلف نمک بررسی شد که پیک حاصل از غلظت نمک ۱۰۰ میلی‌مولار بهترین جداسازی و خلوص توکسین اپسیلون را نشان داد که در کروماتوگرام به دست آمده، پیک دوم می‌باشد (تصویر ۳). سپس نمونه‌ی حاصل از غلظت نمک ۱۰۰ میلی‌مولار دیالیز و در نهایت تغلیظ شد و روی ستون sephadex G100 بارگذاری گردید و توسط بافر تریس شستشو گردید. در نهایت کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی ستونی Sephadex G100 دو پیک نشان داد که در پایان فراکشن‌های ۶۱ تا ۷۵ بالاترین میزان کشندگی را از نظر MLD نشان دادند. فرایند خالص‌سازی توکسین اپسیلون کلستریدیوم پر فرنژنس تیپ D در جدول ۲ بررسی و آنالیز شده است. هم‌چنین نتایج SDS-PAGE حضور توکسین اپسیلون در پیک دوم را تایید کرد. توکسین به دست آمده در این مرحله از خلوص بسیار بالایی برخوردار بود (تصویر ۴).

جدول ۱: مقدار پروتئین و کم‌ترین دوز کشنده حاصل از ترسیب با غلظت‌های مختلف آمونیوم سولفات

مقدار پروتئین (میلی‌گرم)	کم‌ترین دوز کشنده (MLD)	درصد آمونیوم سولفات
۸	۰	۱۰
۲۶	۱۰۰۰	۲۰
۴۳	۶۰۰۰	۳۰
۵۵	۱۲۰۰۰	۴۰
۶۸	۱۶۰۰۰	۵۰
۷۵	۱۸۰۰۰	۶۰
۸۳	۱۶۰۰۰	۷۰
۹۶	۱۴۰۰۰	۸۰



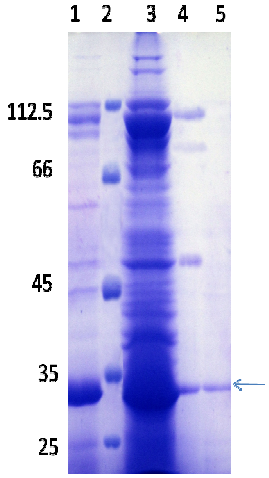
تصویر ۲: نمودار کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی Sephadex-G100



تصویر ۳: نمودار کروماتوگرام پس از مرحله‌ی کروماتوگرافی تعویض کاتیون CM-Sepharose
نوک پیکان – پیک مربوط به غلظت نمک ۱۰۰ میلی‌مولار

جدول ۲: خلاصه فرایند خالص‌سازی توکسین اپسیلون کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ D

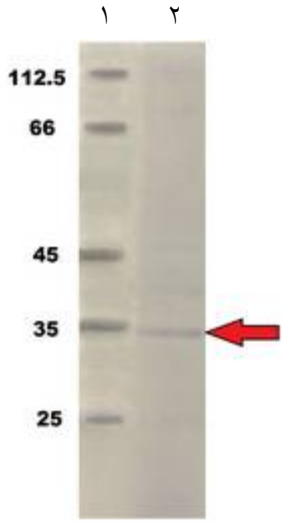
step	Protein (mg)	Activity (MLD)	Specific activity (MLD/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Ammonium sulfate precipitation	۷۵	۱۸ × ۱۰^{۳}	۲۴۰	–	–
CM-Sepharose	۴/۳	۱۶ × ۱۰^{۳}	۳۷۲۱	۱۵/۵	٪۸۸/۹
Sephadex-G100	۰/۰۹	۳ × ۱۰^{۳}	۳۳۳۳۳/۳	۱۳۸/۹	٪۱۶/۷



تصویر ۴: آنالیز فرایند خالص‌سازی توکسین اپسیلون با استفاده از SDS-PAGE. ۱- فیلترات اولیه ۲- مارکر ۳- رسوب دیالیز شده حاصل از ترسیب مایع رویی با استفاده از نمک آمونیوم سولفات ۴- فراکشن حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیون CM-Sepharose ۵- فراکشن حاصل از کروماتوگرافی Sephdex-G100. نوک پیکان- توکسین اپسیلون خالص

Western blotting

نتایج به دست آمده از وسترن بلات نشان داد که توکسین از درجه‌ی خلوص بالایی برخوردار است و هم‌چنین آنتی‌بادی تهیه شده به طور کامل برای توکسین اپسیلون اختصاصی می‌باشد (تصویر ۵).



تصویر ۵: Western Blotting ۱: مارکر ۲: فراکسیون حاوی توکسین خالص حاصل از ستون Sephadex-G100 نوک پیکان- توکسین اپسیلون

ارزیابی توکسین با آنتی‌توکسین استاندارد

به منظور فعالسازی توکسین اپسیلون، نیم میلی‌لیتر محلول توکسین با ۷۵ میکروگرم تریپسین به مدت سی دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد آنکوبه گردید. توکسین به دست آمده از عملیات خالص‌سازی پس از آنکوبه شدن با آنتی‌توکسین استاندارد تا رقت ۱/۵۰۰ باعث مرگ هر دو موش (موش‌ها از بخش حیوانات آزمایشگاهی موسسه‌ی رازی تهیه شد) در گروه‌ها گردید و در گروه رقت ۱/۶۰۰ یک موش زنده و یک موش تلف شد. موش‌های گروه‌های رقت ۱/۷۰۰ به بالا زنده ماندند. لیکن از رقت‌های بالاتر از ۱/۶۰۰ قدرت کشندگی نداشت. نتیجه نشان می‌دهد که ۱ واحد آنتی‌توکسین اپسیلون استاندارد توانایی خنثی‌سازی رقت‌های بالاتر از ۱/۶۰۰ توکسین را داراست.

نتایج تست الایزا

میانگین عددی جذب نوری (OD) برای کنترل مثبت و کنترل منفی به ترتیب برابر ۰/۹۷۱ برای کنترل مثبت و ۰/۰۷۲ برای کنترل منفی به دست آمد. میانگین عددی

مقادیر جذب نوری (OD) نمونه‌ی تخلیص شده با سه بار تکرار ۱/۳۴ به دست آمد.

بحث

توکسین اپسیلون اصلی‌ترین توکسین باکتری کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ D می‌باشد (Parreiras et al. 2002) که توکسویید آن در واکسن چهارگانه انتروتوکسمی ساخت موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی حضور دارد؛ لذا به منظور سنجش ایمنی‌زایی واکسن و نیز سایر مطالعات مربوط به تشخیص و پاتوژنز بیماری، در اختیار داشتن توکسین خالص بسیار مهم و راهگشا می‌باشد. اگرچه براساس پروتکل‌های موجود برای انجام آزمایش سرونوترولیزاسیون توکسین خام کفایت می‌کند ولی برای راه‌اندازی روش‌های آزمایشگاهی مثل الایزا که از دقت بیش‌تری نیز برخوردار هستند، به توکسین خالص نیاز است. در این مطالعه برای اولین بار، ترکیب دو روش کروماتوگرافی تعویض یون و ژل فیلتراسیون برای تخلیص توکسین اپسیلون استفاده گردید. در مطالعه‌ی حاضر، روش‌های مختلف خالص‌سازی بررسی شدند که با توجه به فاکتورهای هزینه کم‌تر، سرعت بالاتر و سادگی، مناسب‌ترین روش انتخاب گردید. البته در کنار این فاکتورها، مهم‌ترین فاکتور که فعالیت توکسین می‌باشد مورد توجه قرار گرفت. مهم‌ترین گام جهت تولید یک پروتئین با درجه‌ی خلوص بالا و فعالیت بیولوژیک مناسب، تعیین بهترین استراتژی خالص‌سازی می‌باشد (Cavalcantil et al. 2004). در این عملیات تخلیص، از روش‌های مختلف کروماتوگرافی که شامل ستون کروماتوگرافی تعویض کاتیون CM-Sepharose و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون Sephadex-G100 استفاده گردید. در تحقیقی با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی تعویض یون DEAE-Cellulose و CM-Cellulose این توکسین را تخلیص کرده‌اند (Habeeb 1969, Parreiras et al. 2002). در مطالعه‌ی حاضر توکسین اپسیلون با وزن مولکولی تقریبی ۳۴ کیلو دالتون به دست آمد. در مطالعات دیگر تخلیص توکسین اپسیلون انجام شد و وزن مولکولی این پروتوتوکسین را ۳۳ کیلو دالتون و وزن مولکولی توکسین فعال را ۳۲ کیلو دالتون گزارش کرده‌اند. توکسین اپسیلون به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر با وزن مولکولی توکسین اپسیلون حاصل از عملیات‌های تخلیص در مطالعات مذکور مطابقت دارد (Subramanyam et al. 2001, Parreiras et al. 2002). قدرت کشندگی این توکسین توسط محققان زیادی مطالعه شده است. در تحقیقی LD_{50} این توکسین را ۷۰ng/kg در موش گزارش کرده‌اند (Miyamoto et al. 2000). LD_{50} توکسین خالص شده در مطالعه‌ی حاضر ۹۰ ng/kg در موش محاسبه گردید که قدرت کشندگی این توکسین در حدود نزدیک به توکسین خالص شده توسط میاموتو می‌باشد (Miyamoto et al. 2000). بازده روش مورد استفاده برای تخلیص توکسین اپسیلون در این تحقیق بسیار بالا بود به طوری که توکسین خالص شده ۱۳۸/۹ برابر نسبت به توکسین خام اولیه خالص شد. میزان فعالیت اختصاصی توکسین بعد از عملیات خالص‌سازی ۳۳۳۳۳/۳ MLD/mg که این مقدار کم‌تر از میزان فعالیت اختصاصی توکسین به دست آمده در مطالعات دیگر که حدود ۶۰۰۰۰ MLD/mg با روش DEAE-Cellulose و $۳/۳\times۱۰^{۶}$ در روش CM -Cellulose بوده می‌باشد (Habeeb 1969, Parreiras et al. 2002). البته روش استفاده شده در مطالعه‌ی حاضر در مقایسه با روش حبیب دو مزیت عمده دارد که شامل هزینه‌ی کم‌تر و مراحل کم‌تر روش مورد استفاده و قابلیت تولید بیش‌تر توکسین در مقیاس صنعتی می‌باشد. برای شناسایی و تایید توکسین خالص شده از روش وسترن بلاتینگ و الایزا استفاده شد. برای تایید فعالیت بیولوژیک توکسین از روش کشت سلولی روی سلول‌های MDCK و تزریق به موش آزمایشگاهی استفاده شد. هم‌چنین اثرات سیتوتوکسیک توکسین اپسیلون روی سلول‌های MDCK به صورت گرد شدن سلول‌ها و ستاره‌ای شدن سلول‌ها و در نهایت مرگ سلولی خود نمایی کرد که با نتایج مطالعات دیگر مشابهت

داشت (Popoff 2011). اثرات سیتوتوکسیک این توکسین روی سلول‌های مختلفی مطالعه شده است. طبق نتایج تحقیقات گذشته این توکسین روی سلول‌های MDCK و Caucasion renal leiomyoblastoma (G-402) اثرات مخرب و توکسیک ایجاد می‌کند (Petit et al. 2001, Petit et al. 1997, Payne et al. 1994). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، می‌توان روش جدید خالص‌سازی توکسین اپسیلون را کاربردی‌تر، سریع‌تر و ارزان‌تر از سایر روش‌های قدیمی ذکر کرد و در عین حال که میزان فعالیت توکسین و مقدار توکسین خالص تولید شده روند افزایشی داشته است. از این روش جدید خالص‌سازی می‌توان در تهیه و خالص‌سازی توکسین اپسیلون با فعالیت بیولوژیک بالا برای آزمایش‌های مربوط به کنترل واکسن در زمان تولید و تهیه‌ی کیت‌های تشخیصی و تولید آنتی‌توکسین اختصاصی اپسیلون استفاده کرد.

منابع

Miyamoto, O.; Sumitani, K.; Nakamura, T.; Yamagami, S.I.; Miyata, S.; Itano, T. et al. (2000). *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in mouse hippocampus. FEMS Microbiology Letters, 189(1): 109-113.

Miyamoto, K.; Li, J.; Sayeed, S.; Akimoto, S. and McClane, B.A. (2008). Sequencing and diversity analyses reveal extensive similarities between some epsilon-toxin-encoding plasmids and the pCPF5603 *Clostridium perfringens* enterotoxin plasmid. Journal of Bacteriology, 190: 7178-7188.

Parreiras, P.M.; Lobato, F.C.F.; Heneine, C.F. L.G.D.; Assis, R.A.; Balsamao, G.M. and Nascimento, R.A.P. (2002). Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 54: 328-330.

Payne, D.W.; Williamson, E.D.; Havard, H.; Modi, N. and Brown, J. (1994). Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. FEMS Microbiology Letters, 116: 161-167.

Petit, L.; Gibert, M.; Gillet, D.; Laurent-Winter, C.; Boquet, P. and Popoff, M.R. (1997). *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. Journal of Bacteriology, 179, 6480-6487.

Petit, L.; Maier, E.; Gibert, M.; Popoff, M.R. and Benz, R. (2001). *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. Journal of Biological Chemistry, 276: 15736-15740.

Cavalcanti, M.T.H.; Porto, T.; Porto, A.L.F.; Brandi, I.V.; Lima Filho, JL de. and Pessoa Junior, A. (2004). Large scale purification of *Clostridium Perfringens* toxins: a review. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 40 (2): 151-164.

Chen, J.; Rood, J.I. and McClane, B.A. (2011). Epsilon-toxin production by *Clostridium perfringens* type D strain CN3718 is dependent upon the agr operon but Not the VirS/VirR Two-Component Regulatory System. mBio, 2(6): 1-11.

Habeeb, A.F. (1969). Studies on E prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. 1. purification methods: evidence for multiple forms of E prototoxin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 130: 430-440.

Hames, B.D. and Rickwood, D. eds. (1981). Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach. London. IRL Press Limited.

Lowry, O.H..; Rosebrough, N.J.; Farr, A..L. and Randall, R..J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.

Lucken, R.; Daas, A. and Esposito-Farese, M.E. (2000). Collaborative study for the establishment of a European pharmacopoeia biological reference preparation for *Clostridia antiserum* for serological potency testing of clostridial vaccines for veterinary use. Pharmeuropa Biology. (2): 65-87.

McClane, B.A.; Uzal, F.A.; Fernandez-Miyakawa, M.; Lyerly, D.; Wilkins, T.D.; Dworkin, S.F.M. et al. (2004). The enterotoxigenic clostridia. The Prokaryotes. New York: Springer-Verlag;. 698-752.

Pooladgar, A.R.; Loni, R.; Heidari, R.; Pilechian Langrudi, R. and Ghaemmaghami, S. (2014) Detection and determination of various types of *Clostridium perfringens* in sheep and goat by culture and ELISA method in Khuzestan Province. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 5: 32-39.

Popoff, M.R. (2011). Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. The FEBS Journal, 278: 4602-4615.

Sakurai, J. (1995). Toxins of *Clostridium perfringens*. Review Medical Microbiology, 6: 175-185.

Sayeed, S.; Uzal, F.A.; Fisher, D.J.; Saputo, J.E.; Vidal, Y.; Chen, P. et al. (2008). Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. Molecular Microbiology, 67: 15-30.

Shortt, S.J.; Titball, R.W. and Lindsay, C.D. (2000). An assessment of the in vitro toxicology of *Clostridium perfringens* type D epsilon-toxin in human and animal cells. Huma and Experimental Toxicology, 19(2): 108-116.

Songer, J.G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clinical Microbiology Reviews, 9: 216-234.

Subramanyam, K.V.; Panduranga Rao, V.; Vijayakrishna, S. and Subba Rao, M.V. (2001). Purification of epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D by DEAE-Cellulose chromatography. Indian Veterinary Journal, 78: 471-472.

Uzal, F.A.; Vidal, J.E.; McClane, B.A. and Gurjar, A.A. (2010). *Clostridium Perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. The Open Toxinology Journal, 2: 24-42.

Purification of epsilon toxin from vaccinal strain of clostridium perfringens type D using ion exchange chromatography and gel filtration

Zayerzadeh, E.[1]; Jabbari, A.R.[2]; Koohi, M.K.[3]; Sadeghi Hashjin, G.[3]; Ghasempourabadi, Z.[4] and Fardipour, A.[5]

Received: 21.12.2013 Accepted: 20.10.2014

Abstract

Clostridium perfringens type D strains cause severe enteroxemia in sheep, calves, goats, pigs and chickens. epsilon-toxin is introduced to be the essential virulence factor of this microorganism. In the present study, a new method was established for the purification of epsilon toxin from culture supernatant fluid of *Clostridium perfringens* type D vaccinal strain. The three steps of the purification scheme involved ammonium sulfate precipitation, cation exchange chromatography (CM- Sepharose) and gel filtration (Sephadex G-100). epsilon toxin was purified about 138.9-fold from the Sephadex G-100 column in terms of the toxin lethality. The molecular weight of the epsilon toxin determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was approximately 34kD. MDCK exposed to epsilon toxin showed a cell border retraction, cytoplasmic blebbing, cell shrinkage and cell rounding. In conclusion, this new method for purification of epsilon toxin of clostridium perfringens type D is reliable and the purified epsilon toxin has high activity.

Key words: *Clostridium perfingens*, epsilon toxin, chromatography, gel filtration

1- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Food Industry and Agriculture, Standard Research Institute, Karaj, Iran
2- Associate Professor, Department of Anaerobic Bacterial Vaccine Research & Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
3- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
4- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
5- MSc Department of Quality Control, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
Corresponding Author: Zayerzadeh, E., E-mail: zayerzadeh@standard.ac.ir