نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۳۸، بهـار ۱۴۰۰

ص‌ص: ۱۰۵~۱۱۲

خالص سازی نانو بادی تولید شده بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی

مریم سادات موسوی پارسا [۱]، رضا عصاران دربان [۲]، سعید زیبایی* [۳]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد،دانشکده علوم،گروه زیست شناسی،مشهد،ایران

۲-استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد،دانشکده علوم،گروه زیست شناسی،مشهد،ایران

۳-دانشیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق ، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک ، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی ، مشهد

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۳۵۹۱۹

Email: S.zibaee@rvsri.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092aasrj.2021.124298

چکیده:

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن فرصت طلب و از عوامل عفونت های بیمارستانی می باشد .باتوجه به مقاومت این باکتری در برابر اغلب آنتی بیوتیک ها، مقابله با آن با استفاده از منابع مختلف و کم هزینه بسیار با اهمیت است.در شترسانان علاوه برآنتی بادی های معمولی ،آنتی بادی هایی فاقد زنجیره سبک وجود دارد که به دلیل اندازه کوچک و وزن ملکولی پایین وهمچنین تفاوت در ساختار ، اثر بخشی بیشتری دارد. با توجه به اینکه نانو بادی پروتئینی باردار است در این پروژه از کروماتوگرافی تعویض یونی جهت خالص سازی نانو بادی استفاده گردید. برای تعیین PH و غلظت نمکی مناسب جهت استخراج بهتر از دونوع رزین CM-Sephadex-C50 و DEAE با PHها وشیب های غلظتی مختلف جهت خالص سازی استفاده شد. همچنین دو نانوبادی با منشاء متفاوت ناشی از دو ادجوانت کیتوزان و آلژینات کلسیم استفاده گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE نشان داد که با کروماتوگرافی تعویض یونی به وسیله رزین CM-Sephadex-C50 در فراکسیون با غلظت ۰/۵ میلی گرم NaCl و PH=6 برای نانوبادی تهیه شده باادجونت کیتوزان و نیزدر فراکسیون با همان غلظت نمک در PH=7 برای نانوبادی تهیه شده با ادجوانت آلژینات کلسیم ، جهت خالص سازی مناسب می باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ، نانوبادی، خالص سازی،کروماتوگرافی تعویض یونی

Applied Animal Science Research Journal No 38 pp: 105-112

Purification of Nanobodies produced against Staphylococcus aureus using Ion Exchange Chromatography

By: M. S. Mosavi Parsa[1], R. Asaran Darban[2], S. Zibaee[3]*

1-MSc graduate Mashhad Branch, Islamic Azad University, Department of Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2- Associate Professor. Mashhad Branch , Islamic Azad University, Department of Biology , Faculty of Sciences , Mashhad Branch , Islamic Azad University , Mashhad ,Iran

3- Associate professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Mashhad

Received: December 2020 **Accepted: April 2021**

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen and a cause of nosocomial infections. Due to the resistance of this bacterium to most antibiotics, it is very important to control it using different sources and at low cost. In camelids, in addition to common antibodies, there are antibodies without light chain that are more effective due to their small size and low molecular weight as well as differences in structure. Due to the fact that nanobody are charge proteins, ion exchange chromatography was used in this project to purify nanobodies. To determine the appropriate pH and salt concentration for better extraction, two types of resin CM-Sephadex-C50 and DEAE with different PH and concentration gradients were used for purification. Also, two nanobodies of different origin due to two adjuvants of chitosan and calcium alginate were used. The results of SDS-PAGE electrophoresis showed that ion exchange chromatography with CM-Sephadex-C50 resin in the fraction with a concentration of 0.5 mg NaCl and PH = 6 for nanobodies prepared with chitosan adjuvant and also in the fraction with the same salt concentration in PH = 7 for purification of nanobodies prepared with calcium alginate adjuvant are suitable.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Nanobody, Purification, Ion-exchange chromatography

۱-مقدمه:

از جمله کاربردهای علوم زیستی برطرف کردن نیاز های انسانی با استفاده از طبیعت و منابع طبیعی است. از جمله این نیازها مبارزه با عوامل بیماری زا است. *استافیلوکوکوس اورئوس* از عوامل بیماری زای خطرناک و عفونت های بیمارستانی است که سبب مرگ و میر می گردد. همچنین یکی از پاتوژن های فرصت طلب است که جزء شایع ترین عامل عفونت های زخم ها از جمله زخم های سوختگی(۳۰-۲۷٪) در بیمارستان ها است (۱۹،۱۷،۱۶). مطالعات نشان داده است که ۸-۱۲٪ بیماران بستری در بیمارستان ها از عوارض جانبی آلودگی به این عفونت ها رنج می برند.(۳)

آنتی بادی ها علاوه بر شباهتشان در ساختار، براساس جایگاه اتصال به آنتی ژن ها انواع مختلف دارند(۸). آنتی بادی ها در ساختار خود دو زنجیره سبک یکسان و دو زنجیره سنگین یکسان دارند که با پیوند های دی سولفیدی بین زنجیره بهم متصل هستند (۶). نانوبادی ها (آنتی بادی های تک دومینی) آنتی بادی های زنجیره سنگین (HCAbs)و فاقد زنجیره سبک هستند.که خصوصیات منحصر به فردشان از جمله اندازه خیلی کوچک آنها باعث وجه تمایز نسبت به آنتی بادی های متداول شده است. همچنین در ساختار زنجیره سنگین(VHH) اسید آمینه های آب دوست جایگزین اسید آمینه های آب گریز شده اند و این جابجایی باعث انعطاف پذیر شدن حلقه های اتصال به آنتی ژن در این نوع آنتی بادی ها شده است.وزن ملکولی زنجیره سنگین حدود ۱۲ تا ۱۵ کیلودالتون می باشد. (۴،۵). نانو بادی ها این

قابلیت را دارند که در بافت نفوذ کرده و آنتی ژن های مختلفی را تشخیص دهند. از جمله ویژگی های دیگر نانو بادی ها،مقاومت در برابر حرارت، پایداری دربرابر پروتئاز و PH می باشد (۲) .

آنتی‌بادیها مانند سایر پروتئینها از نظرخواصی چون قابلیت انحلال در محلولهای نمکی غلیظ، بار الکتریکی، وزن مولکولی و آنتی ژینیسته قابل بررسی هستند. بنابراین جهت خالص سازی آنتی بادی ها می توان از روش های رسوب آنتی بادی با نمک(آمونیوم سولفات) و کروماتوگرافی تبادل یونی و ژل فیلتراسیون استفاده نمود(۱). کروماتوگرافی روشی برای تشخیص اجزا در ابعاد نانومتری، با دقتی در حد و اندازه ی مولکولی است. اساس کار کروماتوگرافی جداسازی اجزای مخلوط با استفاده از سرعت متفاوت حرکت مولکولهای مختلف در محیط یکسان و با انرژی اولیه ی مشابه است. جداسازی کروماتوگرافی تعویض یونی بر اساس برهمکنش های یونی (یا الکترواستاتیک) بین آنالیت های یونی و قطبی می باشد. این کروماتوگرافی یکی از مهمترین تکنیک های جذب است که در جداسازی پپتیدها ، پروتئینها ، اسیدهای نوکلئیک و بیوپلیمرهای مرتبط با آن استفاده می شود (۷).

۲-مواد و روش ها:

۱-۲-مواد:

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC=25923) و موشهای سوری از نژاد بالبسی ،جنس نر با وزن تقریبی ۲۰گرم از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق تهیه شد.مواد ودستگاه های مورد استفاده شده در آزمایشات شامل کریستال ویوله ، لوگل ، الکل استون(Merck) ، فوشین (Fluka)،اسید کلرید ریک ۱نرمال ،بوتانل ، رزین-CM sephdex-C50، رنگ کوماسی بلو G250 ،سدیم دو دسیل سولفات ،کلرید سدیم ، سولفات آمونیوم، گلایسین و متانول (محصولات شرکت مرک آلمان)آلبومین سرم گاوی، اکریل آمید، بیس اکریل آمید ،DEAE ،آلژینات کلسیم و کیتوزان (محصولات شرکت سیگما آلدریچ) می باشد.

۲-۲- روش ها:

۱-۲-۲-آزمایش ها انجام شده بر روی باکتری :

رنگ آمیزی گرم و تست های کاتالاز ،کوآگالاز ، اکسیداز ، تخمیر مانیتول ،نوکلئاز و DNase انجام گردید.

۲-۲-۲-آزمایش ها انجام شده بر روی موش سوری از نژاد بالبسی :

برای تشخیص میزان لازم جهت تزریق و سنجش LD50 (مرگ ومیردر نیمی از جمعیت) CFU باکتری سنجیده شد و از رقت 10^{-1} و 10^{-2} همراه با نمونه خالص جهت تعیین میزان LD50 به ۹ سر موش سوری از نژاد بالبسی که هر گروه شامل سه موش بودند، تزریق گردید.

۳-۲-۲-ایمن سازی شتر

جهت ایمن سازی شتر از باکتری غیر فعال شده *همراه با ادجوانت های* کیتوزان و آلژینات کلسیم تزریق در سه نوبت به فاصله دو هفته در شتر یکساله انجام گرفت.

۴-۲-۲-خالص سازی بوسیله کروماتوگرافی تعویض یونی:

۴-۲-۲- ۱- آماده سازی سرم جهت خالص سازی نانو بادی:

پس از خونگیری از شترها و جدا کردن سرم ها به منظور خالص سازی نانو بادی سولفات آلومینیوم اشباع افزوده و مخلوط را به مدت ۲۰دقیقه با دورg ۴۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و مایع رویی خارج شد. به رسوب، PBS اضافه شد.

۴-۲-۲- ۲-کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین CM-sephadex-C50:

برای دست یابی به PH مناسب جهت خالص سازی بهتر از CM-Sephadex-C50 به همراه بافر تریس استفاده گردید.

پس از خارج کردن بافر تریس از سفادکس ، با حجمی برابر سرم و نیز بافر تریس با PH های ۷،۶و۸ اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰به مدت ۵ دقیقه مایع رویی خارج و از فرکسیون هایی با غلظت نمکی ۰/۳ تا ۰/۸ جهت جدا سازی نانوبادی استفاده گردید.

جهت تعیین غلظت نمکی و PH مناسب برای خالص سازی نمونه

های جمع آوری شده، ژل های بدست آمده پس از الکتروفورز SDS-PAGE ، با استفاده از کوماسی بلو G250 رنگ آمیزی شدند.

۴-۲-۲-۳-کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین DEAE:

پس از خارج کردن بافر تریس از DEAE خارج گردید. با حجمی برابر سرم و نیز بافر تریس با PH های ۷،۸و۹ اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰به مدت ۵ دقیقه مایع رویی خارج و از فراکسیون هایی با غلظت نمکی ۰/۳ تا ۰/۸ جهت جدا سازی نانوبادی استفاده گردید.

بمنظور تعیین غلظت نمکی و PH مناسب برای خالص سازی ، ژل های بدست آمده پس از الکتروفورز SDS-PAGE ، با استفاده از کوماسی بلو G250 رنگ آمیزی شدند.

۴-۲-۲-۴-پروتئین سنجی به روش برادفورد:

میزان نانو بادی خالص شده با استفاده از روش پروتئین سنجی به روش برادفورد اندازه گیری و تعیین غلظت شدند.

۳- نتایج:

۳-۱-نتایج حاصل از آزمایش ها انجام شده بر روی باکتری :

نتایج آزمایش ها وجود و عدم آلودگی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را تایید نمود. میزان CFU باتوجه میانگین رشد کلنی ها در رقت ای کشت داده شده ، $۱۰^{۱۱}$ ×۲محاسبه گردید.

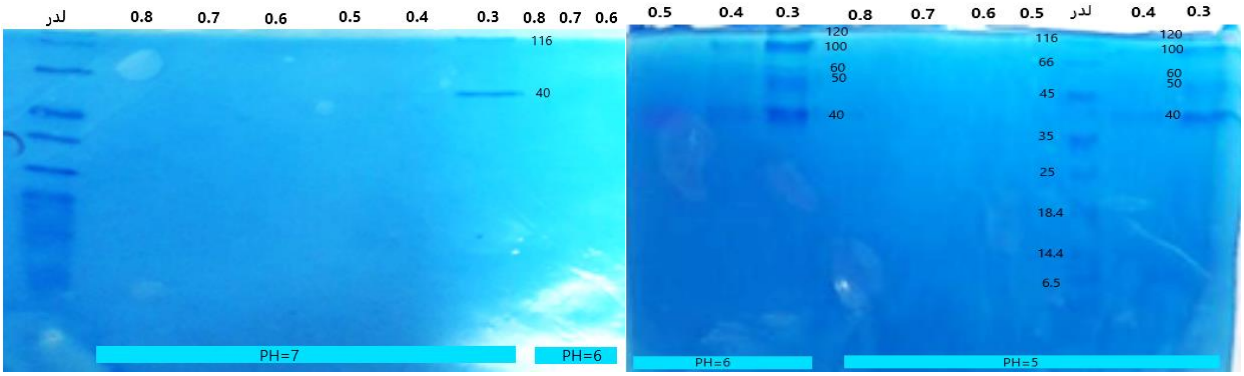
۳-۲- نتایج حاصل ازآزمایش ها انجام شده بر روی موش سوری از نژاد بالبسی : میزان مرگ در موشهای سوری BALB/cدر نمونه خالص ۳ موش از سه موش بود.میزان مرگ در رقت $۱۰^{-۱}$ نیز ۱ موش از سه موش بوده و در رقت $۱۰^{-۲}$ مرگی مشاهده نشد.

۳-۳- نتایج حاصل از خالص سازی بوسیله کروماتوگرافی تعویض یونی :

۳-۳-۱- نتایج حاصل از کروماتوگرافی CM-Sephadex-c50 : پس از انجام SDS-PAGE نمونه های حاصل از کروماتوگرافی CM-Sephadex-c50 ، درPH های ۶،۵ و ۷و در غلظت نمکی ۰/۳ باند های مربوط به وزن های ملکولی ۱۲۰،۱۰۰،۶۰،۵۰،۴۰ کیلودالتون مشاهده گردیدکه باند ۴۰کیلودالتون از بقیه واضح تر بود.در همین PH هاو با فراکسیون باغلظت نمکی ۰/۴ نیز باندهایی مربوط به وزن های ۱۰۰،۶۰،۴۰ کیلودالتون مشاهده گردید که در این ردیف نیز باند مربوط به وزن ۴۰ کیلودالتون واضح تر از بقیه بود. فراکسیون باغلظت نمکی ۰/۵ در PH=6 برای نمونه حاوی نانوبادی علیه باکتری همراه با ادجونت کیتوزان تک باند مربوط به وزن ملکولی ۴۰کیلودالتون مشاهده گردید.در همین غلظت نمکی ودر PH=7 برای نمونه حاوی نانوبادی علیه باکتری همراه با ادجونت آلژینات کلسیم نیز تک باند با وزن ملکولی ۴۰ کیلو دالتون مشاهده گردید (تصویر های ۱و۲).

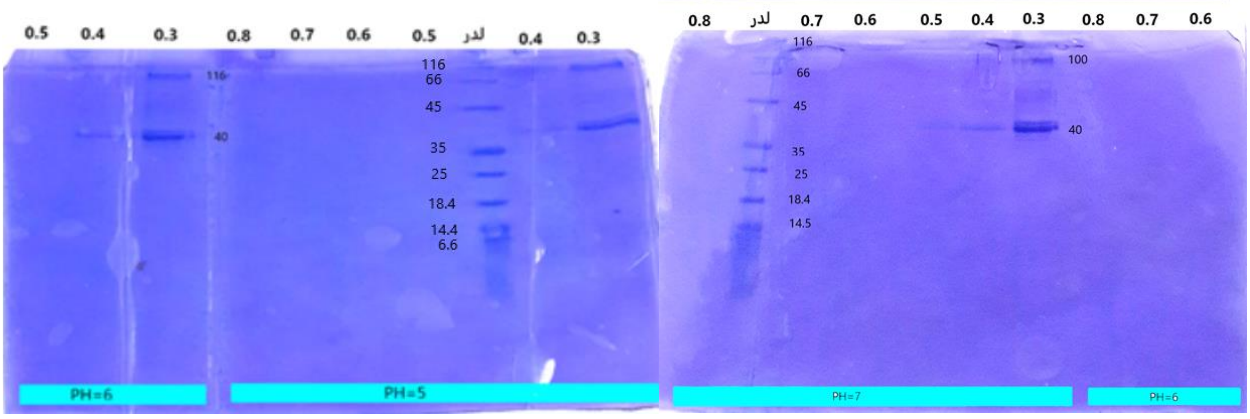
۳-۳-۲- نتایج حاصل از کروماتوگرافی DEAE : نتایج حاصل از کروماتوگرافی با استفاده از DEAE پس از الکتروفورز نشان داد که در همه ی PH ها بکار رفته ، در غلظت های نمکی ۰/۳ ، ۰/۴و ۰/۵باند ها یی مشاهده گردیدکه در غلظت ۰/۳ و ۰/۴ پروتئین هایی با وزن ملکولی۱۱۶،۶۰ و ۴۰ کیلودالتون مشاهده شدکه باند ۴۰کیلودالتون واضح تر بود (تصویرهای ۳و۴).

۳-۳-۳-نتایج حاصل از پروتئین سنجی به روش برادفورد: مقدار غلظت نانوبادی خالص شده با کروماتوگرافی تعویض یونی با C Sephadex-C 50 نشان داد که غلظت نانوبادی علیه باکتری همراه با ادجونت آلژینات کلسیم ، ۱۰/۵۲ میکروگرم بر میلی لیتر و غلظت نانو بادی علیه باکتری همراه با ادجونت کیتوزان ، ۸۴/۲۱ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.



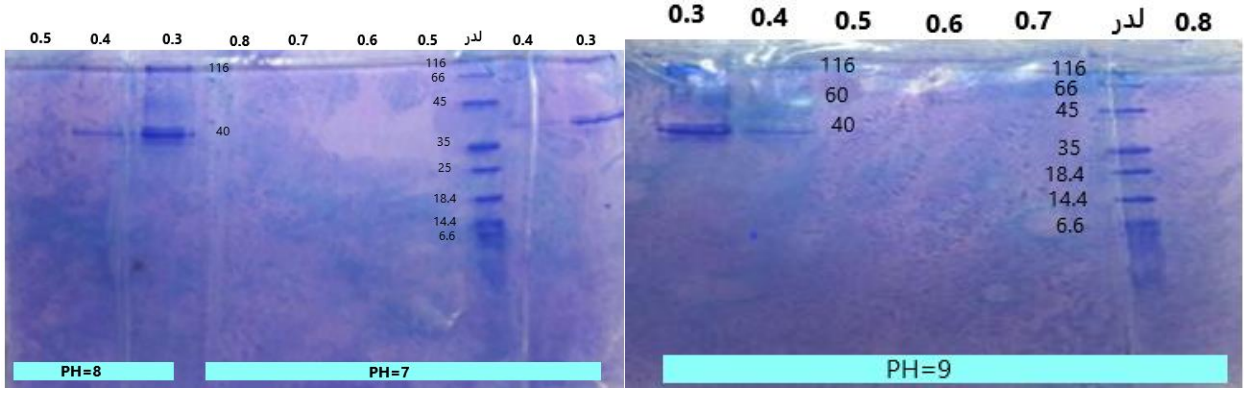
تصویر۱: نتایج حاصل از الکتروفورز نانوبادی تهیه شده علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس همراه با کیتوزان به عنوان ادجوانت، خالص شده با کروماتوگرافی CM Sephadex-C50 در PH ۶،۵و۷ و فراکسیون هایی با غلظت های نمکی ۰/۳ تا ۰/۸

باندهای مربوط به غلظت های ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ در PH=6 وغلظت های۰/۳و ۰/۴ برای PHهای ۵و۷ مشاهده گردید.

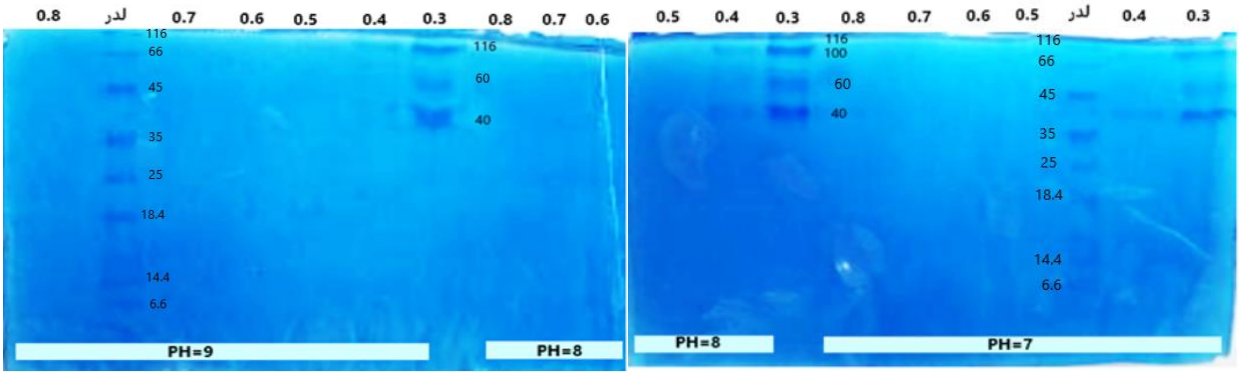


تصویر۲: نتایج حاصل از الکتروفورز نانوبادی تهیه شده علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس همراه با آلژینات کلسیم به عنوان ادجوانت ،خالص شده با کروماتوگرافی CM Sephadex-C50 در PH ۶،۵و۷ و فراکسیون هایی با غلظت های نمکی ۰/۳ تا ۰/۸

باندهای مربوط به غلظت های ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ در PH=7 مشاهده گردید.



تصویر۳: نتایج حاصل از الکتروفورز نانوبادی تهیه شده علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس همراه با آلژینات کلسیم به عنوان ادجوانت ،خالص شده با کروماتوگرافی DEAE در PH های ۷،۸ و۹ و فراکسیون هایی با غلظت های نمکی ۰/۳ تا ۰/۸باندهای مربوط به غلظت های ۰/۳و ۰/۴ درPH های ۷،۸ و۹ مشاهده گردید.



تصویر۴: نتایج حاصل از الکتروفورز نانوبادی تهیه شده علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس همراه با کیتوزان به عنوان ادجوانت ،خالص شده با کروماتوگرافی DEAE در PH های ۷،۸ و۹ و فراکسیون هایی با غلظت های نمکی ۰/۳ تا ۰/۸ باندهای مربوط به غلظت های ۰/۳و ۰/۴ درPH های ۷،۸ و۹ مشاهده گردید.

٤- بحث:

با توجه به اهمیت *استافیلوکوکوس* پس از تایید با استفاده از تست های تشخیصی و تولید نانوبادی برعلیه این باکتری، خالص سازی آن به روش کروماتوگرافی تعویض یونی صورت گرفت. در این روش ابتدا سرم را با سولفات آمونیوم اشباع ترکیب گردید. به منظور از کروماتوگرافی تعویض یونی با دو بستر CM-Sephadex-C50 و DEAE استفاده گردید.

Chen,Ch و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی عامل بیماری اسهال ویروسی گاو (BVD-MD) مطالعه کردند. در این پژوهش ، نانوبادی که میل و ویژگی بالای در برابر اسهال ویروسی گاو دارا می باشد را استخراج وخالص نمودند ، وزن مولکولی مورد انتظار ۴۴ کیلو دالتون بود (۴) .

Conrath, K. E و همکاران در سال ۲۰۰۳ ،با توجه به اهمیت نانو بادی ها، ژن های اختصا صی را مورد بررسی قرار دادند که آنها را در شتر رمزگذاری می کند و بر روی منشاء نانو بادی ها و چگونگی تکامل این نوع از آنتی بادی شتر متمرکز شدند (۵) .

در این پژوهش جهت خالص سازی نانو بادی، استفاده ازکروماتوگرافی تعویض یونی با CM-sephadex-C50 در غلظت نمکی ۰/۳ با PH=7 برای نانوبادی علیه استافیلوکوکوس اورئوس با ادجونت کیتوزان و غلظت نمکی ۰/۴ با PH=7 برای نانوبادی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* همراه با ادجونت آلژینات کلسیم ، مناسب تشخیص داده شد.

تشکر و قدردانی

از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق که در انجام این پروژه مساعدت نموده است کمال تشکررا داریم .

منابع:

روان سالار، حسن.توکل افشاری ،جلیل. سیدین ، سیدمحمد. وارسته ، عبدالرضا.۱۳۸۱. تهیه و خالص سازی آنتی بادی پلی کلونال بر علیه انسولین انسانی.نشریه ی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار (اسرار). دوره ۹ , شماره ۲ (مسلسل ۲۴) ; از صفحه ۳۷ تا صفحه ۴۹ .

یکتاسرشت ،آ.(۱۳۹۴) کاربرد نانوبادی هابه عنوان ابزاری سودمند در تشخیص و درمان.سایت ستاد ویژه توسعه فناوری نانو.

Becker, K. Cookson, B.,JE. Harbarth, S. Kluytmans. Köck ,R. van Gemert-Pijnen J. et al. (2010)Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. Euro Surveill; 15:19688. Review.

Chen,Ch. Ding,j. Huang ,M. Li,T. Sheng ,J. Wu,P. Xiao ,H. Zhang ,H. Zhang,H. (2017) Selection and characterization of specific nanobody against bovine virus diarrhea virus (BVDV) E2 protein. journals.plos

Conrath, K. E. S, Muyldermans, V. K, Nguyen .U ,Wernery. (2003). Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. Developmental & Comparative Immunology .27(2):87-103

Deffar,K. Shi,H. Li,L. Wang, X. Zhu,H.. (2009) Nanobodies - the new concept in antibody engineering. African Journal of Biotechnology. Vol 8, No 12

Grudpan ,K. Jakmunee,J. Sooksamiti ,P . (1999) Flow injection dialysis for the determination of anions using ion chromatography. Talanta 49 215–223

Holliger, P. Hudson, PJ. (2005).Nat Biotechnol, Engineered antibody fragments and the rise of single domains , Nature Biotechnology. 1136-1126 .23