مجله علمی- پژوهشی «علوم و فناوری های پدافند غیرعامل»
سال دوم، شماره ۱ (شماره پیاپی ۳)، بهار ۱۳۹۰: ص ۲۵-۱۹

تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه ناحیه ۴ آنتی‌ژن محافظت کننده باسیلوس آنتراسیس در حیوانات آزمایشگاهی

هاجر مهرآذین[۱]، حسین هنری[۱*]، مجتبی سعادتی[۱]، هوشنگ علیزاده[۲]، شهرام نظریان[۱]

۱- دانشگاه جامع امام حسین(ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات زیست شناسی

۲- دانشگاه تهران، گروه بیوتکنولوژی

(دریافت: ۸۹/۰۹/۲۰ ، پذیرش: ۹۰/۰۲/۱۸)

چکیده

آنتراکس (سیاه زخم یا شاربن) یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده و عامل آن باکتری باسیلوس آنتراسیس می‌باشد. فرم رویشی باسیلوس آنتراسیس دارای یک اگزوتوکسین سه جزیی بوده که شامل سه آنتی‌ژن حفاظت‌کننده (۸۳ کیلو دالتون)، فاکتور کشنده (۹۰ کیلو دالتون) و فاکتور ادم (۸۹ کیلو دالتون) می‌باشد. آنتی‌ژن حفاظت‌کننده به‌عنوان یک ایمونوژن اولیه برای توسعه ایمنی حفاظتی علیه آنتراکس بررسی شده است. ژن از پلاسمید pXOI با جایگاه‌های آنزیمی BamHI و XhoI تکثیر و به کلونینگ وکتور و بعد از جداسازی به وکتور pET28a(+) همسانه‌سازی و به باکتری E.coli سویه BL21(DE3) ترانسفورم شد. ناحیه ۴ژن آنتی‌ژن محافظت‌کننده (PA) کلون شده در وکتور بیانی pET28a(+) به‌وسیله توالی‌یابی، PCR و آنالیز آنزیمی، هم‌چنین پروتئین تولیدی به‌وسیله SDS-PAGE مورد تأیید قرار گرفت. بیان ژن PA با القای IPTG انجام و پروتئین تولید و تخلیص شده در ۴ نوبت با فاصله ۱۵ روز به موش و خرگوش تزریق شد. سپس آنتی بادی تولید شده از سرم موش و خرگوش جداسازی و توسط تست الایزا و وسترن بلات تایید گردید.

کلیدواژه‌ها: باسیلوس آنتراسیس، آنتی‌ژن محافظتی، آنتی‌بادی پلی‌کلونال

Production of Polyclonal Antibody against Domain 4 of Protective Antigen of Bacillus anthracis in Laboratory Animals

H. MehrAzin[1], H. Honari[1]*, M. Saadati[1], H. Alizadeh[2], Sh. Nazarian[1]

[1] Biology Research Center, Imam Hossein University
[2] Biotechnology Group, University of Tehran

Abstract

Anthrax caused by Bacillus anthracis, is an acute infectious disease that most commonly occurs in herbivorous animals and human. The vegetative state of Bacillus anthracis has a triplex exotoxin, which consists of three polypeptide: protective antigen (PA, 83 kDa), lethal factor (LF, 90 kDa) and edema factor (EF, 89kDa). PA is considered a primary immunogen for the development of protective immunity against anthrax. This study aims to produce polyclonal antibody in laboratory animals. Domain 4 gene was amplified by PCR from pXOI and inserted into expression plasmid pET28a (+) to create the recombinant pET28a (+)/domain4. The pET28a (+)/domain 4 expression vector confirmed by endonuclease digestion, PCR and sequence analysis. The expression of product domain 4 was confirmed by SDS-PAGE. After induced by IPTG, the expression of product domain 4 was analyzed and then was injected to mice and rabbits. All groups received injection four times in 15 days intervals. Finally, the antibody in animals' sera was confirmed by ELISA and western blotting tests.

Keywords: Bacillus Anthracis, Protective Antigen (PA), Polyclonal Antibody

* Corresponding author E-mail: honari.hosein@gmail.com

۱. مقدمه

آنتراکس یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام بوده و انسان در نتیجه تماس مستقیم با حیوانات بیمار و یا فرآورده‌های حیوانات مثل پوست، مو و پشم بیمار می‌شود. بنابراین دامپزشکان، دامداران، میکروب‌شناسان، کشاورزان، چوپانان، کارگران کشتارگاه‌ها و کارگرانی که در صنایع پوست و پشم کار می‌کنند، بیشتر در معرض ابتلاء به این بیماری هستند[1]. باسیلوس آنتراسیس دارای دو پلاسمید بزرگ pXO1 (شامل ژن‌های کدکننده سموم) و pXO2 (شامل ژن مولد کپسول) می‌باشد که عامل کپسول، عامل تعیین‌کننده در بیماری‌زایی بوده و باکتری را در برابر هجوم ماکروفاژهای میزبان محافظت می‌کند. توکسین با واسطه یک پلاسمید به‌نام PBA1 یا pXO1 ایجاد می‌شود که ۳ پروتئین مولد تورم‌زا[1] (EF)، آنتی‌ژن محافظت کننده[2] (PA) و فاکتور مولد کشنده[3] (LF)را کد می‌کند[۳،۲،۱]. PA بدون LF و EF غیرسمی بوده و به‌وسیله ژن Pag کد شده و غنی از A/T (۶۹٪)، فاقد سیستئین، وزن مولکولی ۸۳ kDa، دارای ۷۳۵ اسیدآمینه و پروتئینی مسطح و بلند می‌باشد که وظیفه ورود توکسین‌های LF و EF را در سیتوزول بر عهده دارد [۴].

PA برای سمیت سلول میزبان در ترکیب با LF یا EF ضروری است که به‌ترتیب توکسین کشنده یا توکسین تورم‌زا تولید کرده [۵] و دارای ناحیه اتصال به رسپتور سلول میزبان بوده [۶] و ورود کمپلکس توکسین را به درون سلول میزبان تسهیل می‌نماید [۷]. ساختار کریستالی از PA طبیعی نشان داده است که PA شامل ۴ ناحیه مجزا و از نظر عملکردی غیر وابسته به‌هم می‌باشند. ناحیه ۱ به ناحیه‌های 1a که مرکب از اسیدآمینه‌های ۱ تا ۱۶۷ است و1b که مرکب از اسیدآمینه‌های ۱۶۸تا ۲۵۸ است، تقسیم می‌شود و ناحیه۲ مرکب از اسید آمینه‌های ۲۵۹ تا ۴۸۷، ناحیه ۳ مرکب از اسیدآمینه‌های ۴۸۸ تا ۵۹۵ و ناحیه ۴ شامل اسیدآمینه‌های ۵۹۶ تا ۷۳۵ می‌باشد [۱].

سمیت سلولی زمانی اتفاق می‌افتد که کل طول PA (PA۸۳) به رسپتور سطح سلولی، به واسطه ناحیه ۴ که شامل ناحیه اتصال به رسپتور سلول میزبان می‌باشد متصل شود [۸]. در هنگام اتصال به رسپتور سلول میزبان اسیدهای آمینه N ترمینال ۱تا ۱۶۷ ناحیه 1a که شامل یک ناحیه شکست پروتئاز فورین است[۹]، شکسته می‌شود و ناحیه اتصال EF یا LF را در ناحیه 1b در معرض و نزدیکی ناحیه ۳ قرار می‌دهد[۷]. ناحیه‌های ۲و۳، قسمتی از یک منفذ هپتامری بر روی سطح سلولی هستند[۱۱،۱۰]. LF یا EF بر روی رسپتورش متصل می‌شوند و درون سیتوزول سلول ـ جایی که اثر سمیت را نشان می‌دهد ـ جابه‌جا می‌شوند[۱۲]. بنابراین، ممانعت از اتصال و ورود کمپلکس توکسین ـ مخصوصا توکسین کشنده ـ به درون سلول میزبان برای جلوگیری از عفونت با اهمیت است.

آنتراکس در۳ فرم پوستی، گوارشی و استنشاقی اتفاق می‌افتد[۱۳]. اگر بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود، عفونت با آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شود؛ اما علائم همیشه به موقع ظاهر نمی‌شود تا درمان آنتی‌بیوتیکی موثر باشد. بنابراین واکسیناسیون برای حمایت اشخاصی که در معرض خطر هستند الزامی است. در حال حاضر واکسن آنتراکس مجوز داده شده در انگلستان، کشت‌های سویه sterne باسیلوس آنتراسیس فیلتر شده در رسوب alum و رشد یافته با حداکثر پروتئین PA می‌باشد. ضرورت آنتی بادی‌های PA برای ایمنی عفونت آنتراکس به اثبات رسیده است [۱۴]. در این تحقیق، ناحیه۴ از PA کلون شد و پس از استخراج و تخلیص پروتئین آن، به موش و خرگوش تزریق و میزان تولید آنتی بادی آن توسط آزمون ELISA و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. طراحی پرایمر ژن PA۴ مربوط به باکتری باسیلوس آنتراسیس

توالی کامل ژن PA۴ باکتری باسیلوس آنتراسیس از بانک ژن (NCBI-AF306783) استخراج شد و به کمک نرم‌افزار primer3# طراحی پرایمر صورت گرفت. پرایمر آغازین دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر BamHI و پرایمر پایانی دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثرXhoI است که به‌وسیله BIOLABS_NEB-cutter تعیین شد. پرایمرهای آغازین و پایانی به‌ترتیب در زیر آورده شده است.

PA4-F 5'cgggatcccaagggaaagacataaccgaa3'
PA4-R 5'ccgctcgagattaaaattttcttgatcccgtt3'

1. Edema Factor
2. Protective Antigen
3. Lethal Factor

۲-۲. تکثیر ژن PA با روش PCR

باکتری باسیلوس آنتراسیس (از بخش هوازی موسسه رازی) در محیط کشت مایع LB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. ژنوم و پلاسمیدهای باکتری با کمک روش CTAB-NaCl استخراج و با استفاده از اسپکتروفتومتری تعیین غلظت گردید و به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر ژن PA ابتدا با آنزیم Taqپلی‌مراز (سیناژن) در غلظت ۲ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۴ پیکو مول از هر پرایمر،۰/۲ میلی‌مولار dNTPs و در دمای اتصال ۶۱ درجه بهینه‌سازی شد. به‌منظور 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 میلی‌مولار dNTPs، ۰/۲۵ واحد آنزیم DNA پلی مراز Pfu ، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10XPCR و MgSo4 با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار و ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج شده باسیلوس آنتراسیس بود. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۶۱ درجه به‌مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه به‌مدت یک دقیقه و در پایان، یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه بود[۲۹].

۲-۳. همسانه‌سازی قطعه حاصل از واکنش PCR

محصول PCR روی ژل آگارز(سیناژن) مورد تایید و از ژل تخلیص و به انتهای آن‌ها نوکلوتید A اضافه شد. برای همسانه‌سازی از وکتور کلونینگ pEGM-T Easy Vector پرومگا و سلول‌های مستعد E.coli سویهDH5α استفاده شد. سپس قطعات توسط آنزیم‌های برشی BamHI و XhoI از ناقل TA کلونینگ جداسازی و در وکتور بیانی (+)pET28a کیاژن همسانه‌سازی و در سلول‌های مستعد E.coli سویه BL21(DE3) (stratagen) ترانسفورم شد. کلون‌های حاوی قطعه مورد نظر به کمک PCR و هضم آنزیمی و در نهایت با تعیین توالی تایید شد[۲۹].

۲-۴. بیان ژن PA۴

از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن OD ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر(برای به‌دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتر (IPTG) فرمنتاز با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به‌مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

۲-۵. تعیین غلظت پروتئین

غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) (سیناژن) به‌عنوان استاندارد انجام گرفت[۲۹].

۲-۶. الکتروفورز SDS-PAGE

نمونه‌ها قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (SM0671) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲٪ با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بود.

۲-۷. تخلیص پروتئین نوترکیب

پروتئین حاصل از ناحیه PA۴ تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NTA جداسازی و نمونه‌های حاصل بر روی ژل ۱۲٪ الکتروفورز شد[۲۹].

۲-۸. تولید آنتی‌بادی بر علیه ناحیه ۴ ژن PA

به میزان ۱۰µg و ۱۰۰ µg از پروتئین ناحیه PA۴ در چهار نوبت، بار اول همراه با ادجوانت کامل و در نوبت‌های بعدی با ادجوانت ناقص فروند به‌ترتیب به موش و خرگوش تزریق و در نهایت از آن‌ها خون‌گیری و توسط آزمایش الایزا تیتر آنتی‌بادی آن اندازه‌گیری شد.

۲-۹. تایید پروتئین نوترکیب

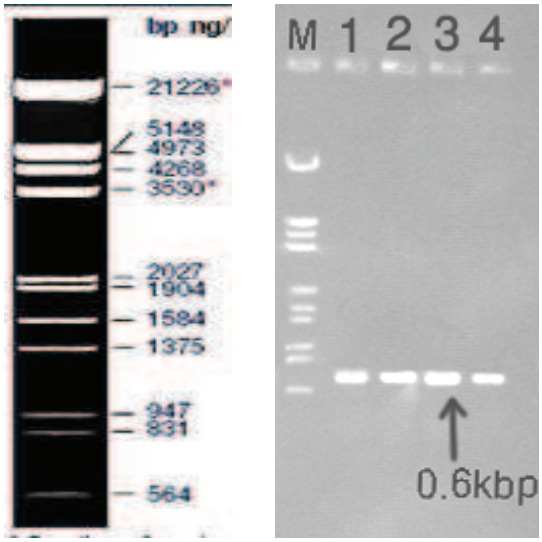
برای تأیید پروتئین نوترکیب بیان شده، از تکنیک وسترن بلات با آنتی‌بادی ضد برچسب هیستیدین استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم وسترن بلاتینگ Bio-rad(Mini Protean) و بافر انتقال(گلایسین۳۹ میلی‌مولار، تریس ۴۸ میلی‌مولار، SDS ۰/۰۳۷٪ و متانول ۲۰٪) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی‌مولار،KCl ۲/۷ میلی‌مولار، Na2HPO4.7H2O/۳ ۴ میلی‌مولار، توین۲۰ ۵٪ و pH:۷/۲) حاوی ۵٪ شیر خشک به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بلاک

گردید. نمونه پس از سه بار شست‌وشو با بافر PBST به‌مدت یک ساعت با رقت ۱/۸۰۰ آنتی‌بادی ضد برچسب هیستیدین در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. نمونه پس از شست‌وشو مجدد با بافر PBST، به‌مدت یک ساعت و با رقت ۱/۲۰۰۰ از آنتی‌بادی کانژوگه خرگوشی و موشی (Dako) در بافر PBST در دمای اتاق قرار گرفت و در نهایت پس از سه بار شست‌وشو با بافر PBST، برای آشکارسازی از بافر تریس ۵۰mM حاوی ۶mg DAB، 10µl H_2O_2 استفاده و واکنش با H_2SO_4 متوقف گردید[۲۹].

۳. نتایج

۳-۱. تکثیر ناحیه ۴ ژن PA

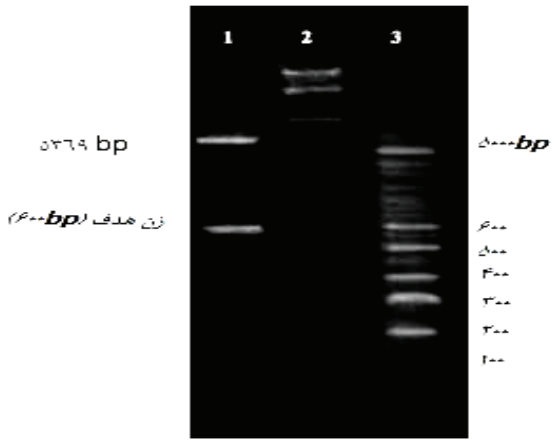
پس از تکثیر ژن PA به‌روش PCR، محصول بر روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و همان‌طور که در شکل(۱) مشاهده می‌شود، قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف تحقیق، هم‌خوانی دارد(۶۰۰ جفت باز).



شکل ۱. نتایج محصول PCR ژن PA بر روی ژل آگارز ۱٪؛ ستون۱: مارکر ۲۱kbp، ستون‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ ژن PA

۳-۲. هضم آنزیمی پلاسمید ناحیه ۴

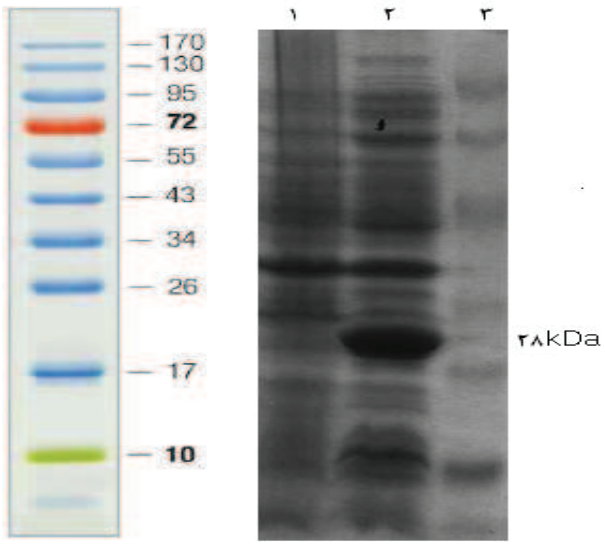
پس از تخلیص پلاسمید و تأیید آن‌ها بر روی ژل آگارز، پلاسمیدها با دو آنزیم XhoI و BamHI هضم شدند؛ سپس به کمک مارکر، اندازهٔ قطعه خارج شده از وکتور تأیید شد. شکل(۱)، محصول هضم آنزیمی را نشان می‌دهد که قطعه مورد نظر، ۶۰۰bp می‌باشد(شکل (۲)).



شکل ۲. الگوی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی(+) pET28a حاوی قطعه ۶۰۰bp با دو آنزیم *XhoI* و*BamHI* بر روی ژل آگارز (یک درصد)؛ ستون۱: پلاسمید(+)pET28a حاوی قطعه ۶۰۰bp برش خورده با آنزیم *BamHI* و *XhoI*؛ ستون۲: پلاسمید(+) pET28a برش نخورده؛ ستون۳: سایز مارکر

۳-۳. بیان ژن در وکتور(+) PET28a

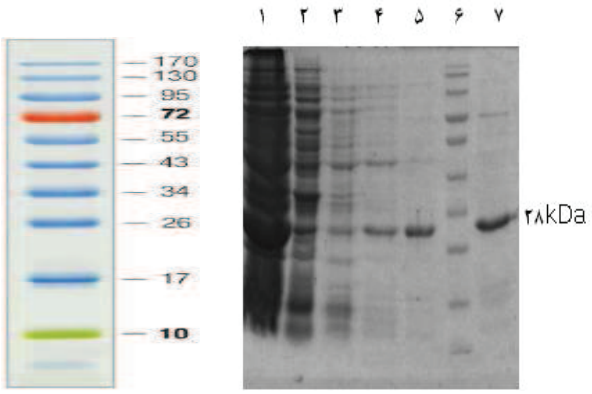
در این مرحله پس از کشت سلول‌ها و القاء با IPTG بیان ژن صورت گرفت و پس از تیمار خام بر روی ژل SDS-PAGE، مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نوترکیب از ژل ۱۲ درصد استفاده شد(شکل (۳)).



شکل ۳. الکتروفورز بیان ژن بر روی SDS-PAGE؛ ستون۱: کنترل منفی (پروتئین باکتری بدون ژن نوترکیب)؛ ستون ۲: تست ناحیه ۴؛ ستون ۳: مارکر پروتئین SM0671 فرمنتاز

۳-۴. جداسازی پروتئین بیان شده در شرایط دناتوره[1]

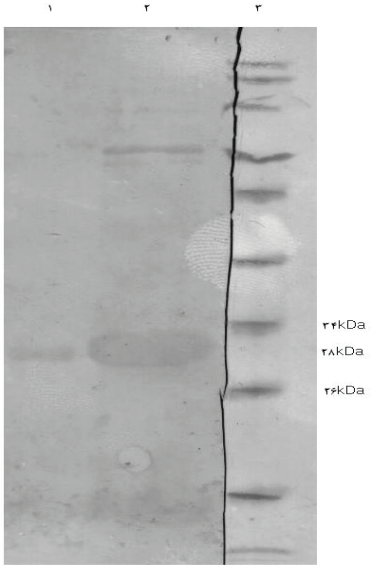
با توجه به نامحلول بودن پروتئین ناحیه ۴، الکتروفورز پروتئین بیان شده در شرایط دناتوره Denaturing conditions مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌ها در دو حالت قبل و بعد از تخلیص بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند(شکل(۴)). پس از این‌که از القاء بیان ژن اطمینان حاصل شد، ارزیابی بیان پروتئین مورد بررسی قرار گرفت و بهترین شرایط بیان با کشت کلون‌ها در محیط LB مایع حاوی ۴۰µg/ml کانامایسین، پس از رسیدن OD محیط کشت به ۰/۵ در طول موج ۵۹۵ نانومتر، با افزودن IPTG با غلظت ۱mM به محیط و انکوبه نمودن آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰rpm به‌مدت ۵ ساعت به‌دست آمد.



شکل ۴. الکتروفورز بیان ژن ناحیه ۴ شرایط دناتوره برروی SDS-PAGE ستون۱: نمونه قبل از تخلیص ستون۲: خروجیflow، ستون ۳: خروجیC ستون۴: خروجی D، ستون۵: خروجی E ستون۶: مارکر پروتئین SM0671 فرمنتاز ستون ۷: خروجی MES

۳-۵. تأیید محصول پروتئینی به‌دست آمده با تکنیک Western Blotting

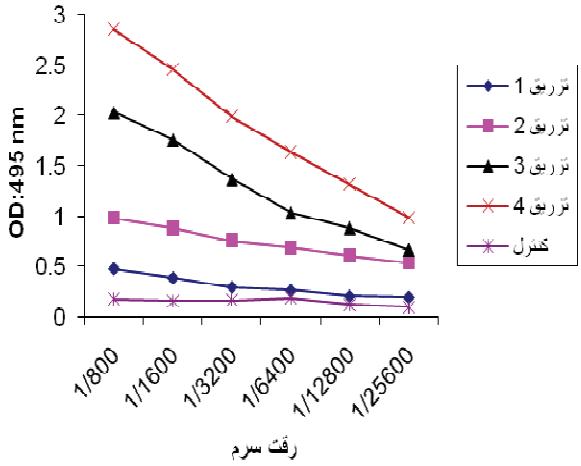
به‌منظور تأیید محصول پروتئینی، تکنیک Western Blotting مورد استفاده قرار گرفت. در این‌روش از آنتی‌بادی ضد برچسب هیستیدین استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونهٔ بعد از بیان است، یک باند در نزدیکی ۲۸ kDa مشاهده می‌شود که در ستون کنترل(۱) قبل از القاء با IPTG باند ضعیفی از بیان مشاهده می‌شود(شکل (۵)).



شکل ۵. نتیجه وسترن بلاتینگ به منظور تأیید محصول پروتئین؛ ستون ۱: نمونه قبل از بیان(کنترل)؛ ستون۲: نمونه تست بعد از بیان ناحیه۴؛ ستون۳: مارکر پروتئین SM0671 فرمنتاز

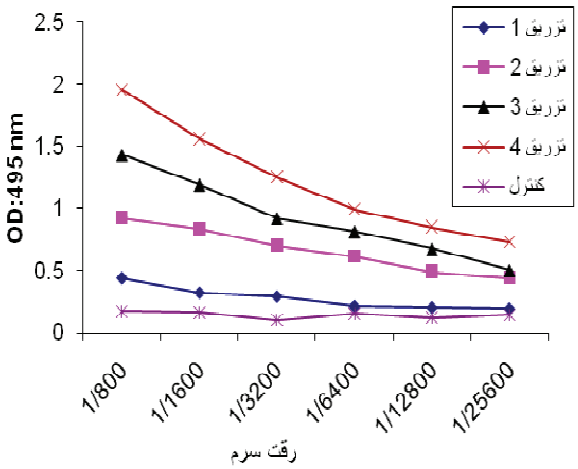
۳-۶. ارزیابی تولید آنتی بادی به روش الیزا

روش الیزا برای تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب به منظور ارزیابی محصول در طول فرایند تخلیص و هم‌چنین تعیین تیتر خنثی‌سازی در سرم حیوانات ایمن شده مورد استفاده قرار گرفت. نمودارهای زیر بیانگر تیتر سرم در حیوانات مورد استفاده می‌باشد(نمودار(۱) و (۲)).



نمودار ۱. بررسی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب ناحیه ۴ در موش

1 - Denaturing conditions



نمودار ۲. بررسی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب ناحیه ۴ در خرگوش

با بررسی این نمودارها، نتایج حاصل از آزمایش الیزا با پروتئین نوترکیب نشان می‌دهد که پس از هر مرحله از تزریق، افزایش تیتر آنتی‌بادی در مقایسه با کنترل قابل توجه می‌باشد. بالاترین OD به‌دست آمده از تست در مقایسه با کنترل، تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد، این نتیجه بیانگر این است که این پروتئین قدرت تولید آنتی بادی به میزان لازم را دارد و در نتیجه، انتظار ایمنی‌زایی از آن متصور است. نمودارهای الایزای حاصل از ناحیه ۴ در موش و خرگوش نشان می‌دهد که میزان افزایش تیتر آنتی بادی در موش نسبت به خرگوش بیشتر می‌باشد که این تفاوت قابل ملاحظه است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

PA یک جزء بسیار مهم از توکسین آنتراکس است. این پروتئین در ایمنی آنتراکس نقش اصلی را هم بعد از ایمن‌سازی و هم در جریان عفونت، بازی می‌کند[۱۵]. تعدادی از آنتی‌ژن‌های باسیلوس آنتراسیس به‌منظور بررسی توانایی‌شان برای القاء ایمنی حمایتی بر علیه بیماری، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از شناخته شده‌ترین این آنتی‌ژن‌ها می‌توان کپسول، لایه S، پلی‌ساکاریدهای سطحی و پروتئین‌های دیگر را نام برد. تنها پروتئین‌هایی که با یکدیگر توکسین آنتراکس را می‌سازند، باعث تولید آنتی‌بادی‌های قابل شناسایی می‌شوند[۱۶،۱۷، ۱۸]. از ۳ پروتئین EF,LF,PA، تنها آنتی‌بادی‌های استخراج شده از PA علیه بیماری حمایتی هستند[۱۹، ۲۰، ۲۱]. این ایمنی در نتیجه خنثی‌سازی فعالیت توکسین آنتراکس اتفاق می‌افتد [۲۲]. آنتی‌بادی‌ها علیه PA هم می‌توانند مانع از اتصال پروتئین به رسپتورهای سلول میزبان شوند و یا در حالی‌که به رسپتور سلول میزبان متصل می‌شوند، مانع عمل شکست فورین شوند. در هر دو وضعیت حالت تحویلی PA غیر فعال است. با عدم فعالیت EF,LF PA نمی‌توانند وارد سلول شوند، و تاثیر توکسین آنتراکس بر روی میزبان متوقف می‌شود[۲۳]. PA تنها آنتی‌ژن شناخته شده برای تحریک کردن آنتی‌بادی‌های حمایتی علیه آنتراکس می‌باشد، این پروتئین(PA) به‌عنوان کاندید اصلی برای تحقیق واکسن در نظرگرفته شده است[۲۵،۲۴]. PA وقتی در غیاب LF,EF تولید می‌شود، به‌عنوان یک پروتئین خالص شده و یک واکسن نوترکیب یا واکسن ضعیف شده قادر به ایجاد ایمنی کامل نخواهد بود[۲۵].

در سال ۱۹۹۵ پیزارد و همکارانش، پاسخ آنتی‌بادی را به تولید درون سلولی PA,LF,EF در موش‌های ایمن شده با اسپورهایی از سویه‌های تولیدکننده این پروتئین‌ها مورد بررسی قرار دادند. در این آزمایش بالاترین تیتر آنتی‌بادی به PA، بعد از ایمن‌سازی با همه سویه‌های تولیدکننده PA انجام شده مشاهده شد[۲۶]. در مطالعه‌ای دیگر توسط ابود و همکاران در سال ۲۰۰۸ ناحیه ۴ و ناحیه‌های دیگر PA را در یک سیستم پروکاریوتی کلون و ایمنی‌زایی 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 ایمونوژنیسیته و ادجوانتی خوبی را نشان داد [۲۷]. فاسنلا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که PA نوترکیب پاسخ آنتی‌بادی قوی را علیه آنتی‌ژن PA القاء می‌کند و یک ایمنی ۱۰۰٪ را در خرگوش‌های ایمن شده با آنتی‌ژن PA بعد از چالش با سویه باسیلوس آنتراسیس نشان داد [۲۸]. در مطالعه پیش رو، ناحیه PA۴ بعد از خالص سازی و تزریق به موش و خرگوش تیتر قابل توجهی از آنتی‌بادی را به‌همراه داشت که این تیتر در موش در تزریق سوم معادل تیتر آنتی‌بادی در تزریق چهارم خرگوش بود. در نتیجه، می‌توان تیتر قابل توجه را در مدت زمان کمتر و امکانات کمتر از موش نسبت به خرگوش به‌دست آورد. همه این شواهد PA را به‌عنوان یک عامل ایمنی‌زایی غالب شناسایی می‌کند که می‌تواند در طراحی یک واکسن مهندسی شده استفاده شود. یکی از تهدیدات احتمالی در حوزه غیر نظامی، امنیت غذا و جان انسان بوده و یکی از راه‌های ایمنی‌زایی در بدن واکسن‌هاست که می‌تواند نقش کلیدی در پدافند غیرعامل و توسعه سلامت در جامعه امروزی ایفا کند.

۵. مراجع

[1] Brey, R. N. "Molecular Basis for Improved Anthrax Vaccines."; Advanced Delivery Reviews 2005, 57, 1266-1292.

[2] Dixon, T.; Meselson , M.; Guillemin. J.; Hanna, P. "Anthrax."; N. Engl. J. Med. 1999, 341, 815-826.

[3] Dai, Z.; Koehler, T. "Regulation of Anthrax Toxin Activator Gene (atxA) Expression in Bacillus Anthracis: Temperature, Not CO2/Bicarbonate, Effects AtxA Synthesis."; Infect. Immun. 1997, 65, 2576-2582.

[4] Robert C. L. "Anthrax: a Molecular Full Nelson."; Nature 2002, 415, 373-374.

[5] Ezzell, J. W.; Ivins, B. E.; Leppla, S. H. "Immuno-electrophoretic Analysis, Toxicity, and Kinetics of in Vitro Production of the Protective Antigen and Lethal Factor Components of Bacillus Anthracis Toxin."; Infect Immun. 1984, 45, 761–767.

[6] Escuyer, V.; Collier, R. J. "Anthrax Protective Antigen Interacts with a Specific Receptor on the Surface of CHO-K1 Cells."; Infect. Immun. 1991, 59, 3381–3386.

[7] Petosa, C.; Collier, R. J.; Klimpel, K. R.; Leppla, S. H.; Liddington, R. C. "Crystal Structure of the Anthrax Toxin Protective Antigen."; Nature 1997, 385, 833–838.

[8] Little , S. F.; Novak, J. M.; Lowe, R. J.; Leppla, S. H.; Singh, Y.; Klimpel, K. R. "Characterization of Lethal Factor Binding and Cell Receptor Binding Domains of Protective Antigen of Bacillus Anthracis Using Monoclonal Antibodies."; Microbiology 1996, 142, 707–715.

[9] Klimpel, K. R.; Molloy, S. S.; Thomas, G.; Leppla, S. H. "Anthrax Toxin Protective Antigen Is Activated by a Cell Surface Protease with the Sequence Specificity and Catalytic Properties of Furin."; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992, 89, 10277–10281.

[10] Milne, J. C.; Furlong, D.; Hanna, P. C.; Wall, J. S.; Collier, R. J. "Anthrax Protective Antigen Forms Oligomers During Intoxication of Mammalian Cells." J. Biol. Chem. 1994, 269, 20607–20612.

[11] Mogridge, J.; Mourez, M.; Collier, R. J. "Involvement of Domain 3 in Oligomerization by the Protective Antigen Moiety of Anthrax Toxin."; J. Bacterial, 2001, 183, 2111–2116.

[12] Friedlander, A. M. "Macrophages Are Sensitive to Anthrax Lethal Toxin Tthrough an Acid-Dependent Process."; J. Biol. Chem. 1986, 261, 7123–7126.

[13] Quinn, C. P.; Turnbull, P. C. B. "Anthrax."; In: Collier, L.; Barlow, A.; Sussman, M. (ed.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Arnold, London, United Kingdom, 1998, 799-818.

[14] Turnbull, P. C. B. "Anthrax Vaccines: Past, Present and Future."; Vaccine 1991, 9, 33–539.

[15] Shlyakhov, E.; Rubinstein, E.; Novikov, I. "Anthrax Post-Vaccinal Cell-Mediated Immunity in Humans: Kinetics Pattern."; Vaccine 1997, 15, 631-636.

[16] Mizrahi, A. "Bacterial Vaccines. "; In Advances in Biotechnological Processes. Amazon, 1990, 105-122.

[17] Singh,Y.; Ivins, B.; Leppla, S. "Study of Immunization Against Anthrax with the Purified Recombinant Protective Antigen of B. Anthracis."; Infect. Immun. 1998, 66, 3447-3448.

[18] Turnbull, P. "Anthrax Vaccines: Past, Present and Future."; Vaccine 1991, 9 , 533-539.

[19] Miller, J. B.; McBride, R.; Manchee, P.; Moore, L. "Anthrax Vaccine Adsorbed Description Leaflet."; Michigan Department of Public Health, 1987.

[20] 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, 264, 19103-19107.

[21] Vodkin, M.; Leppla, S. "Cloning of the Protective Antigen Gene of Bacillus Anthracis."; Cell 1983, 34, 693-697.

[22] Ezzell, J.; Abshire, T. "Immunological Analysis of Cell-Mediated Antigens of B. Anthracis."; Infect. Immun. 1988, 56, 349-356.

[23] Singh, Y.; Ivins, B.; Leppla, S. "Study of Immunization against Anthrax with the Purified Recombinant Protective Antigen of B. Anthracis."; Infect. Immun. 1998, 66, 3447-3448.

[24] Ivins, B.; Welkos, S. "Recent Advances in the Development of an Improved Human Anthrax Vaccine."; Eur. J. Epidem. 1988, 4, 12-19.

[25] Turnbull, P. "Anthrax Vaccines: Past, Present and Future."; Vaccine 1991, 9, 533-539.

[26] Pezard, C.; Sirard, J. C.; Mock, M. "Protective Immunity Induced by Bacillus Anthracis Toxin Mutant Strains."; Adv. Exp. Med. Biol. 1996, 397, 69–72.

[27] Abboud, N.; Casadevall, A. "Immunogenicity of Bacillus Anthracis Protective Antigen Domains and Efficacy of Elicited Antibody Responses Depend on Host Genetic Background. Clinical and Vaccine."; Immunology 2008, 1115–1123.

[28] Fasanella, A,; Tonello, F.; Garofolo, G.; Muraro, L.; Carattoli, A.; Adoneand, R.; Montecucco, C. "Protective Activity and Immunogenicity of Two Recombinant Anthrax Vaccines for Veterinary Use."; Vaccine 2008, 45, 5684-8.

[29] Sambrook, J.; Russell, D. W. " Molecular Cloning."; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.