جداسازی اگزوتوکسین A از سودوموناس آئروجینوزا

دکتر حسین کیوانی امینه[1] دکتر حاجیه قاسمیان صفائی[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، ۳۶-۳۳، (۱۳۸۰)

سودوموناس آئروجینوزا پاتوژن فرصت طلب و سومین عامل شایع عفونتهای بیمارستانی است که می‌تواند باعث مرگ در بیماران مبتلا به سوختگیهای شدید، بیماریهای نئوپلاستیک و سیستیک فیبروزیس شود. این باکتری دارای چندین فاکتور ویرولانس می‌باشد که مهمترین آنها اگزوتوکسین A است که با ADP ریبوزیله کردن فاکتور EF-2 از سنتز پروتئین سلولهای حساس میزبان ممانعت نموده و باعث مرگ سلولی می‌شود. در این بررسی از بیماران دارای سوختگی عفونی نمونه‌برداری انجام شد و پس از کشت بر روی محیطهای تشخیصی، افتراقی و اختصاصی باکتری جدا شده و در محیط اختصاصی جهت تولید توکسین کشت داده شد. سپس با استفاده از روش SDS-PAGE اگزوتوکسین A در مقایسه با استاندارد شناسایی و با استفاده از روشهای رسوبی انتخابی، دیالیز، سانتریکون و کروماتوگرافی تبادل یونی اگزوتوکسین A تولید شده تخلیص و تغلیظ گردید. با توجه به میزان شیوع و اهمیت عفونتهای سودوموناییی در بخشهای سوختگی، اخیراً استفاده از روشهای ایمونولوژی همراه با درمان ضد میکروبی برای کنترل عفونت مورد توجه قرار گرفته و در مطالعات متعددی گزارش شده که ایمونیزاسیون فعال یا پاسیو علیه سودوموناس آئروجینوزا میزان مرگ را در اثر عفونتهای سیستماتیک کاهش می‌دهد . در این بررسی اگزوتوکسین A به میزان کافی و با درجه خلوص بالا تولید گردید که ضمن استفاده در تحقیقات بعدی استفاده از روش خالص سازی فوق می‌تواند نیاز کشور را نیز از نظر این ماده برطرف سازد.

واژه‌های کلیدی: اگزوتوکسینA، سودوموناس آئروجینوزا.

سودوموناس آئروجینوزا باسیل گرم منفی و پاتوژن فرصت طلب در انسان است. این باکتری می‌تواند عفونتهای حاد و کشنده در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، سوختگی، بیماریهای چشمی، عفونتهای تنفسی و سایر بیماریهای تضعیف کننده سیستم ایمنی ایجاد کند (۱). عفونتهای پزودوموناییی بالاترین میزان مرگ و میر را در باکتریمی‌های ناشی از باسیلهای گرم منفی دارا می‌باشد (۲).

سودوموناس آئروجینوزا دارای چندین فاکتور ویرولانس سلولی می‌باشد که در بین آنها اگزوتوکسین A سمی‌ترین پروتئین تولید شده توسط باکتری است و با وزن مولکولی ۶۶ کیلو دالتون به صورت یک پلی پپتید پیش‌ساز با ۶۳۸ اسید آمینه سنتز می‌شود. مطالعات کریستالوگرافی با اشعه ایکس نشان داده که ساختمان توکسین از سه دومن (Domain) تشکیل شده است. انتهای آمینی (دومن I) مسئوول شناسایی سلول هدف است و در سلولهای یوکاریوتیک برای آن رسپتور وجود دارد. (دومن II) (بخش میانی) برای عبور توکسین از غشا بوده و انتهای کربوکسیل (دومن III) دارای فعالیت ADP ریبوزیل ترانسفراز است (۳). این توکسین با ADP ریبوزیله کردن فاکتور EF_2 از سنتز پروتئین ممانعت کرده و باعث مرگ سلول می‌شود (۵). اگزوتوکسین A هنگامی که به آنتی‌بادی مونوکلونال متصل شود ایمونوتوکسینی تولید می‌کند که برای درمان سرطان و یا سایر بیماریها به کار می‌رود (۶). کاربرد دیگر اگزوتوکسین A استفاده از ایمونوتراپی همراه با درمان آنتی‌بیوتیک می‌باشد که اخیراً برای کنترل عفونت مورد توجه قرار گرفته است. این پروتئین را اولین بار دکتر لیو و همکاران از پزودوموناس ائروژینوزا جدا کردند و اکنون دکتر کریز در انستیتو واکسن و سرم سویس این توکسین را خالص و تحقیقاتی را بر روی کاربردهای مختلف آن انجام می‌دهد (۲۰). تولید اگزوتوکسین A خالص شده برای اولین بار در ایران انجام شده که از نظر قطع وابستگی به سایر کشورها اهمیت دارد و زمینه را برای تحقیق در مورد سایر کاربردهای اگزوتوکسین A فراهم می‌کند. از جمله این کاربردها تولید آنتی‌بادی ضد اگزوتوکسین A و استفاده در ایمونوتراپی بیماران می‌باشد. تحقیق و پژوهش در این مورد، زمینه را برای دستیابی به اهداف ذکر شده فراهم می‌کند.

مواد و روش کار

به منظور تولید توکسین از پسودوموناس آئروجینوزا (ATCC=1563) تهیه شده از انستیتو رازی حصارک و باکتری جدا شده از بیمار مبتلا به عفونت پزودوموناییی پس از سوختگی استفاده شد. باکتریها در محیط ژلوز خوندار و ستریماید آگار کشت داده شدند و با توجه به رشد در ۴۲ درجه سانتیگراد و آزمایش اکسیداز و تخمیر قندهای گلوکز و لاکتوز هویت آنها تایید گردید. همچنین جهت تعیین قدرت پروتئولیتیک، باکتریها در محیط کشت نوترینت آگار حاوی Skim milk کشت داده شدند (۷). به منظور بررسی توکسین‌زایی ابتدا از باکتریهای کشت داده شده سوسپانسیونی با غلظت 10^{10} cell/ml تهیه و ۰/۴ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط T.S.B دیالیز شده حاوی یک درصد گلیسرول و یک مولار مونو سدیم گلوتامات اضافه گردید و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد با ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۲۲ ساعت قرار داده شد. سپس محیط حاوی باکتریها را در سانتریفوژ یخچالدار در دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و باکتریها جمع آوری و مایع رویی حاوی توکسین تا قبل از انجام مراحل بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید (۸،۹).

برای جداسازی و تخلیص نسبی توکسین از روشهای رسوبی انتخابی استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا سیترات سدیم ۰/۳ مولار را به میزان $\frac{1}{10}$ حجم مایع حاوی توکسین اضافه و در کیسه دیالیز در مقابل بافرتریس ۰/۰۱ مولار (pH=8) در دمای ۴ درجه سانتیگراد حداقل به مدت ۲۴ ساعت و سه بار تعویض بافر، دیالیز گردید. سپس بافر حاوی توکسین را در دور ۵۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و مایع رویی حاوی توکسین جدا گردید.

به مایع رویی به میزان $\frac{1}{10}$ حجم آن سولفات آمونیم ۶۰ درصد اشباع با pH= ۸ اضافه و رسوب حاصل پس از سانتریفوژ نمودن در دور ۶۰۰۰r.p.m به مدت ۴۵ دقیقه دیالیز گردید. این توکسین را می‌توان به مدت ۸-۶ ماه در برودت ۱۵- درجه سانتیگراد بدون اینکه کاهشی در مقدار سمیت آن ایجاد شود نگهداری کرد (۱۰).

به منظور تخلیص بیشتر و تغلیظ توکسین، محلول حاوی توکسین به دست آمده از مرحله قبل را از فریزر خارج کرده و در درجه حرارت اتاق ذوب و در دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید . ۱۰ میلی لیتر از مایع رویی حاوی توکسین از ستون کروماتوگرافی (Pharmacia، $2^m \times 25$) که با رزین DE-52 پر شده و با بافرتریس ۰/۰۱ M به حالت تعادل در آمده بود عبور داده شد. ستون را هر بار با ۲۵۰ میلی‌لیتر بافرتریس با غلظتهای ۰/۰۱M، ۰/۰۱M، ۰/۳M، ۰/۵M شستشو داده و فراکسیونهای ۵۰ میلی‌لیتری از آن جمع آوری گردید. سپس توکسین با استفاده از سانتریکون ۳۰ (Amicon) تغلیظ شد. برای تایید وجود و خلوص توکسین از روش الکتروفرز بر روی ژل‌پلی‌اکریلامید (SDS-PAGE) با غلظت ده درصد، استفاده از اکریل‌امید ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی با روشهای نیترات نقره و کوماسی بلو استفاده شد (۱۱). حضور توکسین به شیوه ژل‌دیفیوژن (روش اشترلونی) و

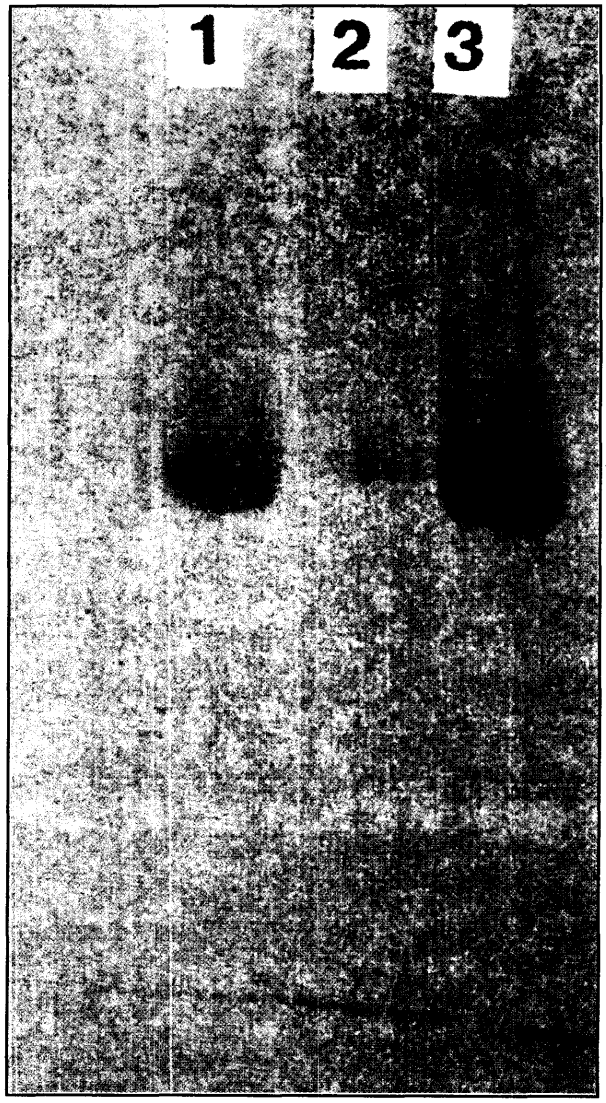
۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان - ایران.

با استفاده از آنتی‌بادی استاندارد و اگزوتوکسین A استاندارد تایید گردید.

به دلیل واکنش توکسین خالص شده با آنتی‌بادی اختصاصی ضد توکسین A (سیگما) در ژل دیفوزیون بروش اشترلونی (تصویر ۳)، همچنین تشابه رفتار الکتروفورتیک توکسین خالص شده با نوع استاندارد (سیگما) بر روی ژل پلی‌اکریلامید (تصویر ۲) و همچنین مشابهت علایم مسمومیت و هیستوپاتولوژیک ایجاد شده در موش پس از تزریق توکسین خالص شده و توکسین استاندارد (نتایج جهت چاپ اریه شده‌اند) از انجام ایمونوبلات جهت تایید نهایی توکسین صرفنظر گردید.

نتایج

در این بررسی، پس از شناسایی باکتری و انتخاب انواع غیر پروتئولیتیک آنها در محیط کشت اختصاصی برای تولید توکسین کشت داده شد. بعد از جدا سازی، تخلیص و تغلیظ برای اطمینان از وجود و درجه خلوص توکسین، پروتئین به دست آمده در مراحل مختلف با استفاده از روش SDS-PAGE با نمونه استاندارد مقایسه گردید (تصویر ۱). میزان توکسین تولید شده از باکتری ۱۵۶۳ (تصویر ۱) و باکتری جدا شده از بیمار (تصویر ۲) در مراحل مختلف تولید توسط ژل پلی‌اکریل امید ۱۰



تصویر ۱- نتیجه حرکت توکسین تولید شده از باکتری ۱۵۶۳ در SDS-PAGE رنگ‌آمیزی با نیترات نقره. ردیف ۱: توکسین استاندارد PO185 سیگما، ردیف ۲: توکسین تولید شده قبل از تغلیظ با سانتریکون، ردیف ۳: توکسین تولید شده بعد از تغلیظ با سانتریکون، مقادیر نمونه‌های کاشته شده ۵۰-۱۰ میکرولیتر می‌باشد.

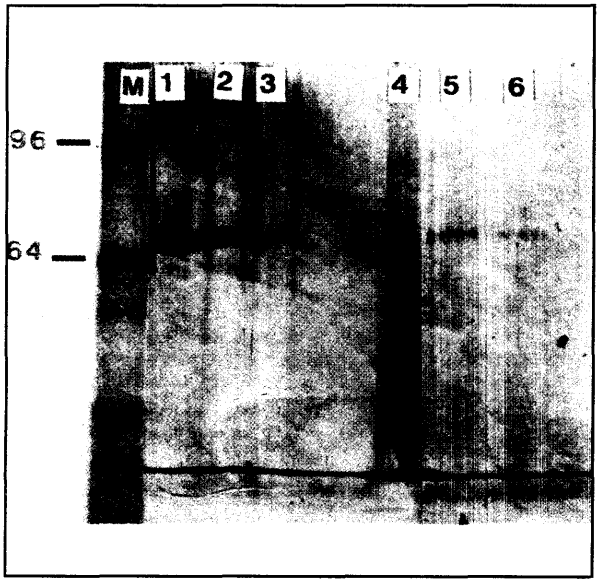
درصد رنگ آمیزی شده به وسیله کوماسی‌بلو و سپس نیترات نقره (۱۱) بررسی گردید.

میزان پروتئین به دست آمده با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری گردید میزان پروتئین توکسین تولید شده ۰/۴۴ mg/ml و توکسین استاندارد ۰/۶۶ mg/ml بود (۱۱). به منظور اطمینان از حضور توکسین و مطالعه واکنش آنتی‌بادی بر علیه ان در مقایسه با توکسین استاندارد با استفاده از روش ژل دیفیوژن توکسین تولید شده در مجاورت آنتی‌بادی استاندارد (سیگما) قرارداده شد و باندهای رسوبی حاصل با نوع استاندارد مقایسه گردید(تصویر ۳).

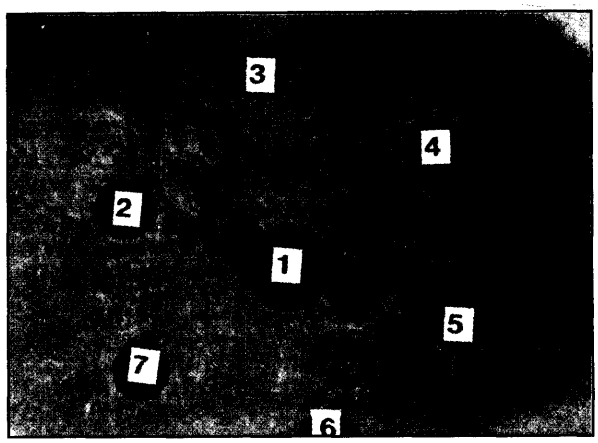
بحث

سودوموناس آئروجینوزا پاتوژن فرصت طلب و سومین عامل شایع عفونتهای بیمارستانی است. این باکتری می‌تواند باعث مرگ در بیماران با سوختگیهای شدید، بیماریهای نئوپلاستیک و سیستیک فیبروزیس شود (۱۲). سمی‌ترین پروتئین تولید شده به وسیله سودوموناس اگزوتوکسین A می‌باشد. این پروتئین را اولین بار دکتر لو و همکاران از سودوموناس ائروژینوزا جدا کردند و به عنوان فاکتور کشندگی (Lethal Factor) معرفی نمودند. بعد از آن سایر مراکز تحقیقاتی دیگر نیز توکسین را جدا سازی و خالص نمودند (۱۳).

در این بررسی پس از نمونه‌برداری از بیماران مبتلا به سوختگی و شناسایی باکتری، سویه غیر پروتئولیتیک آن جهت تولید توکسین انتخاب گردید. زیرا که سویه‌های پروتئولیتیک با تولید آنزیم پروتئاز باعث تجزیه اگزوتوکسین در محیط کشت می‌شوند. یکی از راههای غربالگری برای تعیین تولید آنزیمهای پروتئولیتیک توسط باکتری مولد توکسین کشت آن در محیط Skim milk می‌باشد. پس از گذشت پانزده ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، اگر شیر شفاف نشد و یا هاله کوچکی تشکیل داد نشان دهنده این است که باکتری مورد نظر مولد پروتئاز در محیط مایع می‌باشد. (۷). در این بررسی با توجه به این‌که سویه جدا شده از بیمار تایپ نشده بود و امکانات تایپ کردن نیز فراهم نشد لذا سوش استاندارد ۱۵۶۳ از انستیتو رازی (حصارک) تهیه گردید و پس از تایید عدم تولید پروتئاز، تولید توکسین در این



تصویر ۲- نتیجه حرکت توکسین تولید شده از باکتری جدا شده از بیمار سوختگی در SDS-PAGE رنگ‌آمیزی با نیترات نقره. ردیف M: مارکر وزن مولکولی ۹۶ و ۶۴ کیلو دالتون، ردیف ۱: توکسین استاندارد PO185 سیگما، ردیف ۲: توکسین تغلیظ شده بعد از سانتریکون، ردیف۳: نمونه جدا شده از کروماتوگرافی تبادل یونی بابافرتریس ۰/۳ مولار، ردیف ۴: نمونه رسوب توکسین بعد از ۲۰ دقیقه سانتریفوژ، ردیف ۵و۶: نمونه جدا شده از کروماتوگرافی تبادل یونی بابافرتریس ۰/۵ و ۰/۱ مولار.



تصویر ۳- واکنش توکسین و آنتی‌بادی استاندارد ضد توکسین در ژل دیفیوژن. شماره ۱: آنتی‌بادی استاندارد P2318 سیگما، شماره ۲: توکسین استاندارد Pol85 سیگما، شماره ۳: توکسین تولید شده از باکتری جدا شده از بیمار، شماره ۴: توکسین تولید شده از باکتری شماره ۱۵۶۳، شماره ۵و۶: توکسین تولید شده قبل از تغلیظ و تخلیص، شماره ۷: کنترل منفی (سرم موش بدون تزریق سم)، مقادیر نمونه کاشته شده ۴۰ میکرولیتر می‌باشد.

سوش با سوش جدا شده از بیمار مقایسه شد. تولید توکسین A سودوموناس پیچیده بوده و تحت کنترل تنظیم شده ژنتیکی می‌باشد ولی بسیاری از محرکهای محیطی مثل غلظت آهن، حرارت، میزان اکسیژن و ترکیبات موجود در محیط کشت نیز بر میزان تولید آن مؤثر هستند (۱۴،۱۵،۱۶). بهترین تولید توکسین در محیطی اختصاصی حاوی آبگوشت (Trypticase Soy Broth = "T.S.B") دیالیز شده، گلیسرول و مونوسدیم گلوتامات صورت می‌گیرد . علت برتری محیط دیالیز شده T.S.B این است که این محیط حاوی ترکیباتی با وزن مولکولی پایین می‌باشد. زیرا که ترکیبات با وزن مولکولی بالا از تولید توکسین ممانعت می‌کنند. گزارشها نشان می‌دهد که در این محیط کشت، رشد ارگانیسم نسبت به محیط معمولی نصف شده ولی تولید توکسین دو برابر می‌شود(۱۳).

اضافه کردن گلیسرول به محیط اثر زیادی در رشد باکتری ندارد ولی تولید توکسین را به طور اختصاصی افزایش می‌دهد. مونوسدیم گلوتامات به عنوان منبع نیتروژن ارزان و مناسب به محیط کشت اضافه می‌شود. بنابراین محیط کشت ("T.S.B.D" Trypticase Soy Broth Dialysed) حاوی یک درصد گلیسرول و یک مولار مونوسدیم گلوتامات محیط کشت مناسبی برای تولید توکسین می‌باشد (۱۷).

تولید توکسین با تکان دادن محیط کشت و هوادهی درانکوباتور شیکردار تقویت می‌شود و در درجه حرارت ۳۲ درجه سانتیگراد میزان تولید توکسین به حداکثر مقدار خود می‌رسد. اگر چه گزارشهایی نیز وجود دارد که تولید توکسین در ۲۴ درجه سانتیگراد بیشتر است.

در این بررسی به منظور ترسیب توکسین از استات روی و سولفات آمونیم استفاده شد. رسوب حاصله طی چندین مرحله دیالیز عاری از املاح فوق گردید. این ترکیبات باعث از دست دادن اثرات بیولوژیک توکسین نمی‌شوند (۱۸). به منظور تخلیص توکسین از روش کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از رزین DE-۵۲ (Watman) استفاده گردید که بیشترین میزان توکسین در فراکسیون حاصل از شستشوی ستون با ۰/۳M بافرتریس بود. فراکسیون فوق بعد از دیالیز توسط سانتریکون ۳۰ تغلیظ شد (۱۹). بدین طریق پروتئینهای با وزن مولکولی بالای ۳۰ کیلو دالتون بالای غشای سانتریکون قرار گرفته و پروتئینهای با وزن مولکولی پایینتر ، از غشای عبور می‌نمایند. عمل تغلیظ در سانتریفوژ یخچالدار با دور ۶۰۰۰ صورت پذیرفت. بدین ترتیب توکسین خالص و تغلیظ شده به دست آمد که به منظور حفظ فعالیت آن در دمای منهای ۲۰- درجه سانتیگراد تا قبل از انجام آزمایشات بعدی نگهداری شد.

توکسین تولید شده در این بررسی با استفاده از روش SDS-PAGE در ژل ۱۰ درصد، با توکسین استاندارد مقایسه گردید (۲۱). همان‌طور که تصاویر ۱ و ۲ نشان می‌دهند هر دو باکتری مورد آزماش قادر به تولید توکسین می‌باشند و توکسین‌های تولید شده از نظر وزن مولکولی قابل مقایسه با استاندارد هستند. برای رنگ‌آمیزی ژل از هر دو روش نیترات نقره و کوماسی بلو استفاده شد و نتایج نشان داد که خصوصیات فیزیکوشیمیایی و بیولوژیک توکسین حاصل از هر دو باکتری جدا شده از بیمار و سوش ATCC مشابه با توکسین استاندارد می‌باشد.

تولید اگزوتوکسین A و یا فرم نو ترکیب آن برای تحقیقات و یا کاربرد در کلینیک اهمیت فراوانی دارد (۲۲). در کشورما تاکنون جداسازی اگزوتوکسین A صورت نگرفته است. با توجه به میزان موارد شیوع عفونت مخصوصاً در مراکز سوختگی و میزان مرگ و میر ناشی از باکتریمی‌ها و لزوم اجرای روشهای نوین درمانی (ایمنونیزاسیون فعال و پاسیو) این پروتئین تخلیص و به صورت ارزان و فراوان در اختیار محققان و مصرف کنندگان قرار خواهد گرفت.

References

1. Jean-marie meyer. (1996): Pyoverdin is essential for virulence of P.A. Infect. Immu, 64 (2): 518-523.
2. Abdul N.Hamood. (1990): Expression of the P.A. tox A positive regulatory gene (reg A) in E.coli. J.Bact.. 172(2): P.589-594.
3. Abdul N.Hamood. (1989): Regions of toxin A involved in toxin A excretion in P.A. J.Bact, 171(4): P.1817-1824.
4. Ulrich brinkmann. (1992): Independent domain folding of Pseudomonas exotoxin and single chain immunotoxins: Influence of interdomain connections. Proc. Natt. Acad. Sci, USA, 89: 3075-3079.
5. Abdul N.Hamood. (1992): Isolation and characterization of toxin A excretion – deficient mutants of P.A.PAO1. Infect. Immu, 60 (2): P.510-517.
6. John W.pearson. (1989): Enhanced therapeutic efficacy of an immunotoxin in combination with chemotherapy against an intraperitoneal human tumor xenograft in athymic mice. Cancer Resarch, 49: 4990-4995.
7. Dogett, R.G., (1979): Pseudomonas Aeruginosa, Academic Press, UK, 6-10.
8. Susan E.H.West. (1994): The Vfr gene product, required for P.A. exotoxin A and protease production, belonge to the cyclic AMP receptor protien family. J.Bact. 176 (19): P.7532-7542.
9. Pingui V. Liu. (1973): Exotoxins of P.A.11. Concentration, Purification, and characterization of exotoxin A.J. Infect. Dis., Oct. Vol. 128 (4): P.514-519.
10. Murray P. Deutscher, (1990): Guide to protien purification, AP com., 285-306.
11. J.sam brooke. (1989): *Molecular Clonning, A Laboratory* Manual, CSH com.: 18-49-18.59.
12. Ian alan holder, (1983): Experimental studies of the pathogenesis of infection owing to P.A., Can. J. Micro, 30: 1118-1124.

13. Pinghui V.Lin. (1973): Exotoxins of P.A.1 Factors that influence the production of exotoxin A.J. Infect.Dis., Vol. 128 (4): P.506-513.
14. Douglas C.storey. (1991): Effect of reg B on expression from the p1 and p2 promoters of the P.A. reg AB operon. J.Bact, 173 (19): P.6088-6094.
15. Charlotte Fryling. (1992): Characterization of a cellular protease that cleaves pseudomonas exotoxin Infect. Immun, 60 (2) : P.497-502.
16. Inger Helene Madshus. (1989): Effects of eliminationg a disulfide bridge within domain 11 of P.A. exotoxin A. Infect. Immun, July 57 (7): P.1873-1878.
17. Dara.W. frank. (1989): Differential regulation by iron of reg A and tox A transcriptcript accumulation in P.A. J.Bact, 171 (10): P.5304-5313.
18. Pinghui V.Liu. (1973): Exotoxins of P.A III. Characteristics of antitoxin A.J. Infect. Dis. 123 (4): P.520-526.
19. Centricon Microconcentration, W.R. (1991): grace company, USA.
20. S.J. cryz. (1986): P.A. immunotypes polysacchride- toxin A conjugate vaccine. Infect. Imm, 52 (1): 161-165.
21. Daniel J. Wozniak. (1995): Construction and use of a nontoxigenic strain of P.A. for the Production ofrecombinant exotoxin A. Appl. Envi.Micro, ,61 (5): 1739-1744.

Purification of Exotoxin A from Pseudomonas aeroginosa

Keyvani Amineh, H.[1], Ghasemian Safaei, H.[2]
[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran.* [2]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Esfehan Medical Sciences University, Esfehan – Iran.*

Pseudomonas aeroginosa is an opportunistic human pathogen ranked as the third nosocomial infectious agent. It causes death in patients with severe burns, neoplasia and cystic fibrosis. The most important virulence factor associated to p.aeroginosa is exotoxin A wich by ADP ribosilation of EF2 inhibits host cell protein synthesis. recently passive and active immunization with exotoxin A combined with antibacterial therapy have significantly reduced the death rate caused by pseudomonal infection. For the immunization purposes, in this study, we selected a toxin producer strain of p.aeroginosa, culture it in liquid media and purified toxin using a combination of selective precipitation and ion exchange chromatography methods. Highly pure toxin was obtained in this study showed the same molecular weight and biological activities when compared with standard toxin.

Key words: Pseudomonas aeroginosa,Exotoxin, Purification.