University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 78, Number 3, 2023, 157-165

A Comparison Survey on Native and Denaturation Conditions for Solubilization and Purification of *Toxocara canis* C-type Lectin Recombinant Protein

Parmida Malekzadeh[1]✉, Seyed Hossein Hosseini[2]✉, Fateme Jalousian[2]✉, Mohammad Akrami[3]✉, Narges Amini Nia[2]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Department of Pharmaceutical Biomaterials and Medical Biomaterials Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: *15 March 2023*, ***Accepted:*** *22 May 2023*

10.22059/jvr.2023.353071.3316 20.1001.1.20082525.1402.78.3.1.7

Abstract

BACKGROUND: *Toxocara canis* C-type lectin (*T. canis*-CTL) is the main protein part of the secretory-excretory product secreted by *Toxocara canis* infective larvae. *T. canis*-CTL can stimulate immune response-mediated regulatory T lymphocytes, increase the FOXP3+ cells population, and reduce severe inflammatory responses. *T. canis*-CTL is a promising candidate for immune modulation in some autoimmune diseases, deserving further investigation.

OBJECTIVES: The current research aimed to purify the recombinant *T. canis*-CTL under denaturation and native condition to increase exploration and maintain biological activity.

METHODS: The expression vector, pET32a was constructed with the partial sequence 660bp of *T. canis*-CTL and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). *T. canis*-CTL protein expression was induced by IPTG (1 mM) at 37°C after 6 h. In this study, different buffers were used for cell explosion and recombinant protein solubilization, including lysis buffer with urea (8 M, pH=8) and lysozyme enzyme as well as lysis buffer with Imidazole (0.01 M) and lysozyme enzyme, and previous buffers in addition to sonication. The effect of these buffers was evaluated in bacterial cells explosion, using Gram-staining and microscopic examination. Recombinant *T. canis*-CTL protein was extracted and purified under denaturation and native condition using Ni-NTA affinity chromatography by agarose and sepharose resin. A New Zealand male rabbit was immunized with the recombinant protein to evaluate the bioactivity of the protein.

RESULTS: Lysis buffer with urea (8 M, pH=8) and lysozyme enzyme, in addition to sonication, provided acceptable results, and an additional amount of recombinant *T. canis*-CTL protein was secreted in the buffer. Protein purification under denaturation conditions with Ni-NTA agarose affinity chromatography also provides further recombinant protein. Most of the induction of recombinant *T. canis*-CTL with 41 KDa molecular weight was collected 6 h after induction at 37°C. Dot-blot results illustrate the brown dot, which showed a 1:500 titer of specific IgG polyclonal antibody has developed in the sera of rabbits immunized with *T. canis*-CTL recombinant protein.

CONCLUSIONS: The denaturation condition did not affect the biological activity of the *T. canis*-CTL recombinant protein and can recover a further amount of recombinant proteins.

Keywords: C type Lectin, Denaturate, Extraction of protein, Native conditions, *Toxocara canis*

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Seyed Hossein Hosseini, Tel/Fax: +9821-61117073

How to cite this article:

Malekzadeh P, Hosseini SH, Jalousian F, Akrami M, Amini Nia N. A Comparison Survey on Native and Denaturation Conditions for Solubilization and Purification of *Toxocara canis* C-type Lectin Recombinant Protein. J Vet Res, 2023; 78(3): 157-165. doi: 10.22059/jvr.2023.353071.3316

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. The SDS-PAGE results of *T. canis*-CTL expression with 41 KDa molecular weight in *E. coli* strain BL21(DE3) during first to sixth hours after induction with IPTG (1 mM).

Figure 2. The results of microscopic examination after cell destruction of *T. canis*-CTL recombinant protein in *E. coli* strain BL21(DE3) (Gram staining, 100x).

Figure 3. The SDS-PAGE results of *T. canis*-CTL recombinant protein extraction and purification, 41 kDa MW.

Figure 4. Dot blot analysis of immunized and non-immunized rabbit sera against *T. canis*-CTL with DAB substrate.

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۸، شماره ۳، ۱۴۰۲، ۱۶۵-۱۵۷

بررسی مقایسه‌ای شرایط طبیعی و واسرشته در محلول‌سازی و تخلیص پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس*

پارمیدا ملک‌زاده[۱]، سیدحسین حسینی[۲]، فاطمه جالوسیان[۲]، محمد اکرمی[۳]، نرگس امینی‌نیا[۲]

[۱] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۲] *گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۳] *گروه زیست مواد دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۴ اسفند ماه ۱۴۰۱ ، **تاریخ پذیرش:** ۱ خرداد ماه ۱۴۰۲

10.22059/jvr.2023.353071.3316 20.1001.1.20082525.1402.78.3.1.7

چکیده

زمینه مطالعه: لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* عامل اصلی تعدیل سیستم ایمنی و تحریک لنفوسیت‌های T تنظیمی در میزبان می‌باشد و باعث افزایش جمعیت سلول‌های $Foxp3^+$ (Forkhead box P3) و کاهش التهاب می‌شود و می‌تواند به عنوان کاندیدای دارویی در درمان بیماری‌های خودایمن معرفی شود.

هدف: مقایسه تخلیص پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* در دو شرایط واسرشته و طبیعی به منظور افزایش بازیابی و حفظ فعالیت زیستی آن می‌باشد.

روش‌کار: یک توالی به طول ۶۶۰ جفت‌باز از لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* در پلاسمید pET32-a سنتز و در باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت با ایزوپروپیل بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) ۱ میلی‌مولار القا و بیان شد. در مطالعه حاضر بافر لیزکننده اوره ۸ مولار (pH=8) و بافر حاوی ایمیدازول ۰/۰۱ مولار همراه با لیزوزیم ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برای شکستن سلول‌های باکتریایی و محلول‌سازی پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. بافرهای فوق همراه با سونیکه کردن، به منظور شکستن سلول‌های باکتری استفاده شد و لام‌های میکروسکوپی تهیه و با رنگ‌آمیزی گرم بررسی شدند. پروتئین نوترکیب استخراج شده تحت شرایط واسرشته و طبیعی با استفاده از رزین نیکل-نیتریلوتری‌استیک‌اسید آگاروز و رزین نیکل-نیتریلوتری‌استیک‌اسید سفاروز تخلیص شد. ارزیابی ایمونوژنیسیته پروتئین نوترکیب با روش دات‌بلات با سرم خرگوش چالش شده با پروتئین نوترکیب انجام شد.

نتایج: بیشترین مقدار بیان پروتئین با وزن مولکولی ۴۱ کیلودالتون در ساعت ششم پس از القا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با IPTG ۱ میلی‌مولار حاصل شد. بافر اوره ۸ مولار (pH=8) حاوی لیزوزیم ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر همراه با سونیکه کردن، مقدار زیادی از پروتئین نوترکیب استخراج شد. تخلیص پروتئین تحت شرایط واسرشته با استفاده از رزین نیکل- آگاروز مقدار پروتئین بیشتری نسبت به رزین نیکل سفاروز بازیابی شد. نتایج آزمایش دات‌بلات نیز حضور آنتی‌بادی IgG (Immunoglobulin G) اختصاصی علیه پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* در سرم خرگوش ایمن شده تا رقت ۱:۵۰۰ را مورد تأیید قرار داد.

نتیجه‌گیری نهایی: استفاده از روش واسرشته بر فعالیت زیستی پروتئین تأثیر منفی نداشت و با این روش مقدار بیشتری پروتئین در سیستم باکتریایی بازیابی گردید. پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* تخلیص شده با این روش می‌تواند با اهداف مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: استخراج پروتئین، *توکسوکارا کنیس*، شرایط طبیعی، شرایط واسرشته، لکتین نوع سی

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: سیدحسین حسینی، گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

توکسوکارا کنیس کرم گرد سگ با انتشار جهانی می‌باشد، که تعداد زیادی از پستانداران از جمله انسان را نیز آلوده می‌کند. توکسوکاریازیس از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی مشترک انسان و دام می‌باشد و به عنوان تهدیدی برای بهداشت عمومی جامعه معرفی شده است (۱). تخم‌های حاوی نوزاد عفونت‌زا میزبان‌های حامل (پاراتنیک) شامل مرغ، گاو، بره، خوک، انسان و موش را نیز آلوده می‌کنند، اما نوزادها در میزبان‌های حامل بالغ نمی‌شوند و از طریق بافت نرم مهاجرت می‌کنند و برای مدت طولانی حتی تا سال‌ها در بدن باقی می‌مانند (۲). *توکسوکارا کنیس* به عنوان یک نماتود برای مدت طولانی در بافت‌های بدن زندگی و از سیستم ایمنی میزبان فرار می‌کند.

لکتین نوع سی یکی از گلیکوپروتئین‌هایی است که در مرحله نوزادی این انگل به مقدار زیاد ترشح می‌شود. نوزادهای انگل *توکسوکارا کنیس* در بافت میزبان‌های حامل، پروتئین‌هایی از خانواده گلیکوپروتئین‌ها از جمله لکتین نوع سی را از کوتیکول خود دفع می‌کنند (۳).

محصولات دفعی- ترشحی گونه‌های *توکسوکارا* عمدتاً از لکتین‌ها تشکیل شده‌اند، که هدف‌های مناسبی برای گیرنده‌های لکتین نوع سی انسان می‌باشند، با این‌حال، طیف وسیعی از گیرنده‌های لکتین نوع سی میزبان‌ها که گونه‌های *توکسوکارا* را تشخیص می‌دهند، هنوز ناشناخته است (۴).

لکتین‌های نوع سی، خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌های وابسته به کلسیم می‌باشند که در قلمرو تشخیص کربوهیدرات (Carbohydrate-Recognition Domains) به مونو و الیگوساکاریدها متصل می‌شوند. این پروتئین‌ها می‌توانند عوامل بیماریزا را شناسایی و در واکنش متقابل سلول‌ها شرکت کنند. خانواده پروتئین‌های دارای قلمرو لکتین نوع سی، در پستانداران که به عنوان میزبان حامل معرفی شده‌اند، در پاسخ‌های ایمنی نقش دارند. لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* (*T.canis*-CTL) یکی از گلیکوپروتئین‌های ترشح شده از نوزاد این نماتود با ۲۱۹ اسیدآمینه و حاوی یک قلمرو تشخیص کربوهیدرات است، در حالی که لکتین‌های نوع سی در برخی نماتودها مانند *آنکیلوستوما سیلانیکوم*، *نکاتور امریکانوس*، *هموئنکوس کونتورتوس*، *سنورابدیتیس الگانس* دارای دو یا چند قلمرو تشخیص کربوهیدرات می‌باشند. این خانواده از پروتئین‌ها علاوه بر انگل‌های کرمی و نماتودهای آزادزی در سایر حیوانات بی‌مهره و مهره‌داران یافت شده‌اند. لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* به عنوان یک پروتئین مهم در ایمنی‌زایی و واکنش متقابل میزبان-انگل در نظر گرفته شده است. توالی‌های لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* با توالی‌هایی از پروتئین‌های دارای لکتین نوع سی که در پاسخ‌های ایمنی پستانداران نقش دارند، هم‌ردیف شدند و نتایج حاصل مناطق بسیار حفاظت شده را در جایگاه چهار سیستئین نشان دادند که دو پیوند دی‌سولفیدی را تشکیل دادند و برای تشکیل ساختار پروتئین، حیاتی می‌باشند. پروتئین لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* چهار نوع است، نوع یک و چهار پروتئین‌های دفعی- ترشحی می‌باشند. غلظت نوع یک در بین پروتئین‌های دفعی- ترشحی بیشتر است. این پروتئین‌ها در تعدیل سیستم ایمنی نقش دارند و سبب کاهش واکنش‌های التهابی در میزبان می‌شوند. ژن کدکننده پروتئین لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* دارای توالی بسیار حفاظت شده است و به طور اختصاصی در نوزاد عفونت‌زا بیان می‌شود (۱)، این پروتئین می‌تواند به منظور افزایش سلول‌های T تنظیمی در بیماری‌های خودایمن ناشی از افزایش فاکتورهای التهابی به عنوان یک پروتئین درمانی مورد توجه قرارگیرد.

برای تخلیص تمام پروتئین‌ها یک روش یکسان به کار نمی‌رود و بسته به هدف مطالعه، شرایط و مراحل خالص‌سازی یک پروتئین بایستی بهینه‌سازی شود. بنابراین، ممکن است فرآیند تخلیص یک پروتئین با پروتئین دیگر متفاوت باشد (۵). به منظور دستیابی به سطح بالای خلوص پروتئین، معمولاً تکنیک‌های قابل دسترس مانند تبادل کاتیونی و آنیونی در محدوده pHهای مختلف و کروماتوگرافی تمایلی به کار می‌روند. اساس کروماتوگرافی تمایلی استفاده از یون‌های فلزی برای تخلیص پروتئین‌های نوترکیب دارای دنباله هیستیدینی است. برای جداسازی پروتئین نوترکیب متصل شده به رزین در حالت طبیعی از شیب غلظت ایمیدازول به عنوان مولکول رقیب هیستیدین و در شرایط واسرشته از تغییر pH برای جداسازی پروتئین مورد نظر استفاده می‌شود (۶). در مطالعه حاضر افزایش بازیابی و حفاظت فعالیت‌زیستی پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* در دو شرایط واسرشته و طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

بیان پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس*: در مطالعه حاضر باکتری *E.coli* BL21(DE3) حاوی پلاسمید دارای ژن لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* به منظور بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده شد. این باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط مایع لوریا برتانی دارای آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر (شرکت داروسازی دانا، ایران) کشت داده شد و پس از ۱۸ ساعت ۲۰۰۰ میکرولیتر از آن به ۴۰ سی‌سی محیط مایع لوریا برتانی دارای آمپی‌سیلین اضافه و در انکوباتور شیکردار (۳۰۰~ دور در دقیقه) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از گذشت ۱/۵ تا ۲ ساعت جذب نوری آن به ۰/۶ تا ۰/۷ رسید (OD600nm= 0.6-0.7)؛ سپس ۴۰۰ میکرولیتر از محلول IPTG ۱۰۰ میلی‌مولار (Sigma-Aldrich, Germany) به محیط کشت افزوده (غلظت نهایی IPTG مورد استفاده ۱ میلی‌مولار بود) و به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار

(۳۰۰~ دور در دقیقه) قرار داده شد. پس از مدت زمان ۶ ساعت همه محیط کشت را درون لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه تحت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و رسوب حاصل جمع‌آوری گردید. ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت در ساعت‌های مختلف بیان جمع‌آوری و تا زمان بررسی با ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس*: رسوب حاصل از کشت باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب القا شده، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و کاملاً از حالت انجماد خارج شد. سپس به رسوب حاصل از ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده اوره ۸ مولار (اوره، تریس بیس، مونو سدیم دی هیدروژن فسفات) و همچنین به رسوب دیگر نیز ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده ایمیدازول ۰/۰۱ مولار (ایمیدازول، سدیم کلراید، مونو سدیم دی هیدروژن فسفات) اضافه گردید و سپس در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه به طوری که از کف کردن آن جلوگیری شود، مورد تکان شدید قرار گرفتند. پس از آن لیزوزیم ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر (DNA Biotech, Iran) به محلول‌های حاصل اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه به روی یخ منتقل شد و سپس در مجاورت یخ با استفاده از دستگاه اولتراسونیک(Hielscher, Germany) ۶ سیکل ۱۰ ثانیه‌ای با قدرت ۱۰۰ وات و ۱۰ ثانیه استراحت بین هر سیکل سونیکه صورت گرفت تا از شکسته شدن دیواره باکتری‌ها اطمینان حاصل شود. به منظور تأیید شکسته شدن دیواره باکتری و آزادسازی کامل پروتئین‌های محلول تولید شده، نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و مایع رویی که حاوی پروتئین محلول بود را جهت بررسی با ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ درصد، جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده و رسوب‌های حاصل از لاشه باکتری‌ها دور ریخته شدند.

تخلیص پروتئین تحت شرایط واسرشته با استفاده از رزین Ni-NTA agarose **و** Ni-NTA Sepharose: به رسوب‌های حاوی بافر لیزکننده اوره ۸ مولار (pH=۸) در مرحله استخراج، رزین Ni-NTA agarose (Qiagen, Germany) و Ni-NTA Sepharose (Noavaranzist, Iran) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه به روی یخ به آرامی شیک شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از این محلول به ستون منتقل کرده و به مدت ۵ دقیقه تحت ۲۷۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. ستون‌ها با استفاده از بافر شستشو(pH=۶/۳) به مدت ۲ دقیقه تحت ۸۹۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت بافر حل‌شونده (pH=۴/۵) به ستون‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۵ دقیقه بر روی یخ تحت ۸۹۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول‌های خارج شده از هر ستون پس از هر مرحله، جمع‌آوری و بر روی ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شده و با رنگ آمیزی کوماسی‌بلو بررسی شدند.

تخلیص پروتئین تحت شرایط طبیعی با استفاده از رزین Ni-NTA agarose و Ni-NTA Sepharose: به رسوب‌های حاوی بافر لیزکننده ایمیدازول ۰/۰۱ مولار در مرحله استخراج رزین Ni-NTA agarose (Qiagen, Germany) و Ni-NTA Sepharose (Noavaranzist, Iran) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه به روی یخ به آرامی شیک شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از این محلول به ستون منتقل شده و ستون‌ها به مدت ۱۰ ثانیه تحت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از آن ستون‌ها با استفاده از بافر شستشو ایمیدازول ۰/۰۲ مولار به مدت ۱۰ ثانیه تحت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت بافر حل‌شونده ایمیدازول ۰/۲۵ مولار به ستون‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۵ دقیقه بر روی یخ ۱۰ ثانیه تحت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول‌های خارج شده از هر ستون پس از هر مرحله، جمع‌آوری و بر روی ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ درصد و رنگ آمیزی کوماسی‌بلو بررسی شدند.

ایمن کردن خرگوش با پروتئین نوترکیب تخلیص شده: دو خرگوش نر سفید نیوزلندی ده هفته‌ای تهیه گردید. مقدار پروتئین‌های تخلیص شده با روش واسرشته و طبیعی با روش میکروبرادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه میکرو اسپکتروفتومتر (Bio-Rad, USA) اندازه‌گیری شد. از پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* تخلیص شده با روش واسرشته به میزان ۵۰۰ میکرولیتر (۲۵۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب تخلیص شده در ۵۰۰ میکرولیتر بافر (pH=۷/۴) PBS) آماده و با حجم برابر (۱:۱) با ادجوانت کامل فروند (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، ایران) تهیه شد. محتویات تهیه شده برای هر تزریق با استفاده از فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتری استریل شدند (Membrane, USA). سپس به صورت زیرجلدی در دو ناحیه پشت کتف خرگوش تزریق انجام

شد. در فاصله ۱۴ روز، تزریق دوم و سوم (هفته دوم و سوم هرکدام یک تزریق) با ۱۲۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب تخلیص شده با روش واسرشته در ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS (pH=۷/۴) و ۵۰۰ میکرولیتر ادجوانت ناقص فروند (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، ایران) انجام شد. خرگوش دوم به عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود و تزریق‌ها دقیقاً مانند خرگوش قبلی با PBS استریل انجام شد. از هر دو خرگوش یک هفته پس از آخرین تزریق خونگیری به عمل آمد، سرم‌ها جدا و تا زمان انجام آزمایش دات‌بلات در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ادجوانت کامل فروند یک روغن معدنی می‌باشد که حاوی سوسپانسیونی از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کشته شده با حرارت است که همراه با محلولی از آنتی‌ژن، *T.canis*-rCTL به شکل یک امولسیون آب در روغن به خرگوش‌ها تزریق شد، این امولسیون باعث تقویت پاسخ ایمنی سلولی و هومورال به آنتی‌ژن تزریقی می‌گردد. مایکوباکتری‌های موجود در ادجوانت کامل فروند، ماکروفاژها و سایر سلول‌ها را به محل تزریق جذب می‌کنند که باعث تقویت واکنش ایمنی می‌شود. این امولسیون روغنی اگر بدون باکتری باشد ادجوانت ناقص فروند نامیده می‌شود. ادجوانت فروند (اولین بار توسط ژول فروند در دهه ۶۲۲۴ ساخته شد) و تاکنون یکی از پرمصرف‌ترین ادجوانت‌های مورد استفاده در مطالعات می‌باشد که برای آزادسازی پیوسته آنتی‌ژن‌ها به منظور تحریک پاسخ ایمنی قوی و پایدار در برابر آنتی‌ژن‌ها استفاده می‌شود. عیب اصلی ادجوانت فروند این است که می‌تواند باعث ایجاد گرانولوما و التهاب در محل تلقیح شود، به همین دلیل برای تزریقات اولیه از ادجوانت کامل فروند و برای به حداقل رساندن عوارض جانبی دوز یادآور (بوستر)، از ادجوانت ناقص فروند استفاده می‌شود (۷).

دات‌بلات: ۱ میکرولیتر از پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* تخلیص شده تحت شرایط واسرشته با غلظت ۱۹۲ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمده از روش واسرشته با رزین نیکل-نیتریلوتری‌استیک‌اسید سفاروز بر روی کاغذهای نیتروسلولز ۱×۱ سانتی‌متر مربع (Bio-Rad ،USA) لکه‌گذاری و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. دو مرتبه شستشو با بافر TBST (Tris Buffer Salin+Tween20) ۰/۰۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر به آهستگی صورت گرفت. نقاط غیراختصاصی موجود بر روی کاغذ توسط بافر TBST ۰/۵ درصد حاوی شیرخشک بدون چربی ۳ درصد به مدت ۱ ساعت به آرامی شیک و مسدود شدند. پس از گذشت ۱ ساعت مایع بلاکر را دور ریخته و ۲ بار با بافر TBST ۰/۰۵ درصد و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو صورت گرفت. سرم خرگوش ایمن شده و سرم خرگوش کنترل (سرم خرگوشی که با پروتئین *T.canis*-CTL چالش نشده است) با رقت ۱:۵۰۰ اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر با سرعت آرام انکوبه گردید. شستشو مانند مراحل قبل انجام شد. سپس آنتی‌بادی Goat anti-Rabbit IgG کنژوگه شده با آنزیم HRP (RaziBiotech, Iran) با رقت ۱:۲۰۰۰ به کاغذها اضافه و در دمای اتاق به آرامی شیک شدند. این‌بار ۳ مرتبه شستشو (هر مرتبه ۱۰دقیقه) به شکلی که ۲ مرتبه اول بافر TBST۰/۰۵ درصد و مرتبه آخر با بافر TBS انجام شد. از ۳/۳ دی‌آمینوبنزیدین DAB (Sigma-Aldrich, Germany) در حضور پراکسیدهیدروژن به عنوان سوبسترای آنزیم استفاده و نتیجه حضور یا عدم حضور لکه رنگی پس از ۱۵-۵ دقیقه مشاهده شد و در پایان از آب مقطر به منظور متوقف کردن واکنش استفاده گردید. سپس کاغذها را در دمای اتاق قرار داده تا کاملاً خشک شوند.

نتایج

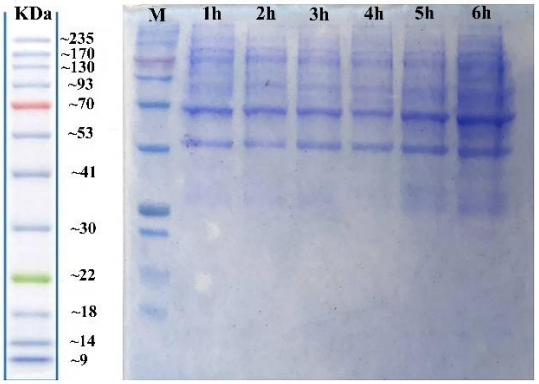
نتایج مطالعه حاضر بر روی ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات-پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد با رنگ‌آمیزی کوماسی‌برلیانت‌بلو نشان داد که بیشترین میزان بیان پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* در ساعت ششم پس از القا حاصل می‌گردد (تصویر ۱).

پس از القا و استخراج پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس*، برای تخلیص در یک گروه از سلول‌های باکتریایی از بافر اوره ۸ مولار (pH=۸) و در گروه دیگر از بافر ایمیدازول ۰/۰۱ مولار به عنوان بافر لیزکننده استفاده شد و سپس لیزوزیم ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر اضافه گردید و همراه با سونیکه کردن سلول‌های باکتری شکسته و پروتئین نوترکیب بیان شده وارد محلول شد. از مراحل مختلف شکستن دیواره سلولی باکتری لام تهیه شد و نتیجه با رنگ‌آمیزی گرم نشان داد که در بافر لیز حاوی اوره ۸ مولار (pH=۸) و لیزوزیم ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر همراه با سونیکه، تمام باکتری‌ها شکسته شدند (تصویر ۲-۲) و بافر لیز حاوی ایمیدازول ۰/۰۱ مولار و لیزوزیم ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر همراه با سونیکه کردن، سبب شکسته شدن تعداد زیادی از باکتری‌ها شد (تصویر ۴-۲).

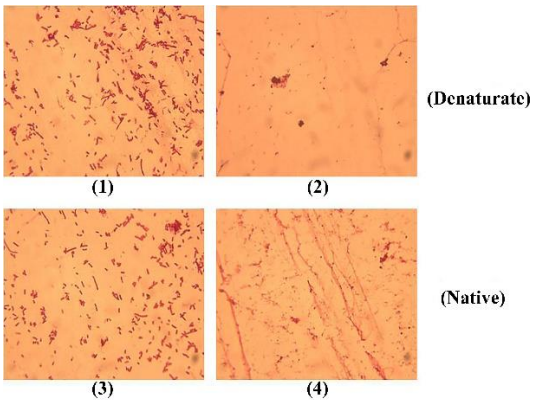
اما در لام‌های تهیه شده از باکتری‌ها در بافر لیز حاوی اوره ۸ مولار (pH=۸) و لیزوزیم ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر (تصویر ۱-۲) و بافر لیز حاوی ایمیدازول ۰/۰۱ مولار و لیزوزیم ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بدون سونیکه کردن (تصویر ۳-۲) تعداد زیادی از سلول‌ها بدون تغییر باقی ماندند.

در نتایج مطالعه حاضر استخراج پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* با بافر لیزکننده اوره ۸ مولار و بافر لیزکننده ایمیدازول ۰/۰۱ مولار توسط لیزوزیم و سونیکه کردن، بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ درصد نشان داد که میزان پروتئین استخراج شده در بافر لیزکننده اوره ۸ مولار بیشتر بود. در روش تخلیص تحت شرایط واسرشته نیز مقدار پروتئین حاصل بیشتر بود (تصویر ۳) و در اندازه‌گیری با روش میکروبرادفورد نیز این نتایج تأیید شد که پروتئین تخلیص شده با رزین آگاروز تحت شرایط واسرشته ۳۳۵ میکروگرم/میلی‌لیتر و تحت شرایط طبیعی ۱۵۷ میکروگرم/میلی‌لیتر و با استفاده از رزین سفاروز تحت شرایط واسرشته ۱۹۲ میکروگرم/میلی‌لیتر و تحت شرایط طبیعی ۱۰۲ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد. مقایسه نتایج استخراج پروتئین نوترکیب در تکرارهای مستقل نشان داد که روش‌های تخلیص مورد استفاده در مطالعه حاضر تکرارپذیر می‌باشد (تصویر ۳- ستون ۳ و ۴).

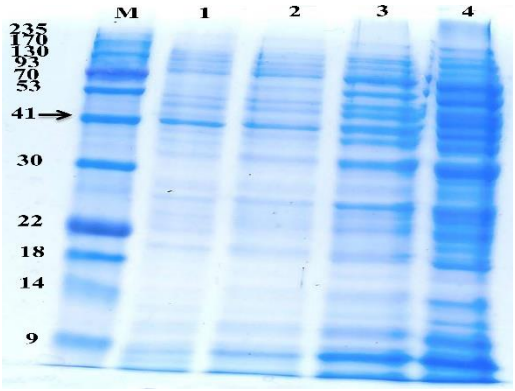
نتایج ایمن‌سازی خرگوش با پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* تخلیص شده تحت شرایط واسرشته با روش دات‌بلات ارزیابی گردید و سرم خرگوش تا رقت ۱:۵۰۰ با پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* غلظت ۱۹۲ میکروگرم/میلی‌لیتر واکنش داد (تصویر ۴).



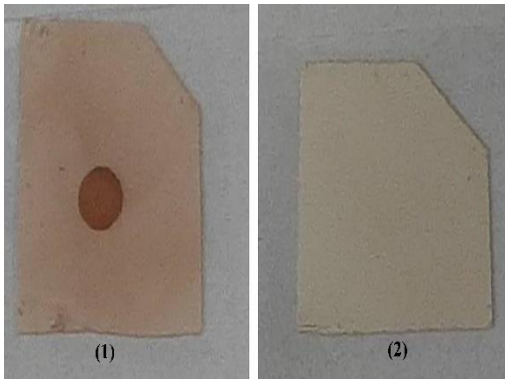
تصویر ۱. نتایج SDS-PAGE بیان پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* با وزن مولکولی ۴۱ کیلودالتون در باکتری *اشریشیاکلی* BL21(DE3) در ساعت‌های اول تا ششم (1h-6h) پس از القا با IPTG (۱ میلی‌مولار).



تصویر ۲. نتایج بررسی میکروسکوپی لام‌های تهیه شده از تخریب باکتری *اشریشیاکلی* BL21(DE3) (رنگ‌آمیزی گرم، 100X)(۱ و ۲) به ترتیب محلول رویی حاوی بافر لیزکننده اوره ۸ مولار و لیزوزیم و همان همراه با سونیکه کردن تحت شرایط واسرشته، (۳ و ۴) به ترتیب محلول رویی حاوی بافر لیزکننده ایمیدازول ۰/۰۱ مولار و لیزوزیم و همان همراه با سونیکه کردن تحت شرایط طبیعی.



تصویر ۳. نتایج SDS-PAGE استخراج و تخلیص پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس*، باند ۴۱ کیلودالتون، از چپ به راست: ستون M) مارکر پروتئین 9KDa (Sinaclon, Iran)، ۱) پروتئین نوترکیب تخلیص شده تحت شرایط واسرشته با استفاده از رزین نیکل- آگاروز، ۲) پروتئین نوترکیب تخلیص شده تحت شرایط طبیعی با استفاده از رزین نیکل- آگاروز، ۳) پروتئین نوترکیب استخراج شده با بافر لیزکننده ایمیدازول ۰/۰۱ مولار توسط لیزوزیم و سونیکه کردن، ۴) پروتئین نوترکیب استخراج شده با بافر لیزکننده اوره ۸ مولار توسط لیزوزیم و سونیکه کردن.



تصویر ۴. نتایج دات‌بلات سرم خرگوش ایمن شده با پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* تخلیص شده با رنگ‌آمیزی DAB. از چپ به راست: ۱) پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* با سرم مثبت خرگوش (۱:۵۰۰) و آنتی‌بادی Goat anti- Rabbit IgG، ۲) کنترل منفی فاقد پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* با سرم خرگوش مثبت (۱:۵۰۰) و آنتی‌بادی Goat anti- Rabbit IgG. مقایسه نتایج کنترل مثبت و کنترل منفی در سه تکرار مستقل نشان داد که واکنش پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا* کنیس با سرم خرگوش چالش شده با این پروتئین، تکرارپذیر است.

بحث

پلاسمید pET32a از سری پلاسمیدهای بدون سیگنال می‌باشد که پروتئین را به صورت اجسام انکلوژن (به شکل نامحلول) بیان می‌کند، علاوه بر این، دو دنباله شامل شش اسیدآمینه هیستیدین و تیوردوکسین، به ترتیب در انتهای C و N توالی بیانی لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* قرار می‌دهد. این تگ‌ها به منظور صرفه‌جویی در زمان و هزینه تخلیص پروتئین نوترکیب است و تأثیر منفی بر فعالیت‌های زیستی پروتئین ندارد. در مطالعه حاضر پلاسمید pET-32a به این دلیل انتخاب شد که یکی از پلاسمیدهایی می‌باشد که به طور اختصاصی برای کلون‌سازی، بیان و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب در *اشریشیا کلی* طراحی شده و چندین دهه است که به طور وسیع برای بیان پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است. این پلاسمید pET-32a حاوی ژن (Lactose Inhibitor) lacI می‌باشد که مانع بیان ژن RNA پلی‌مراز T7 تحت کنترل پروموتر lacUV5 و پروموتر T7lac می‌شود. باکتری BL21(DE3) یک میزبان بیانی می‌باشد و حامل ژن RNA پلی‌مراز T7 است که توسط پروموتور lacUV5 کنترل و با IPTG القا می‌شود (۸).

Yari و همکاران در سال ۲۰۱۷ به منظور بیان و تخلیص هورمون نوترکیب پاراتیروئید انسانی از پلاسمید pET-32a و دو سویه باکتری *اشریشیا کلی* شامل BL21 و Rosetta-gami و ستون‌های Ni-NTA استفاده کردند و در نتایج خود اعلام کردند که پروتئین نوترکیب به طور قابل قبول در هر دو سویه بیان شده اما درصد پروتئین هدف به کل پروتئین در باکتری *اشریشیا کلی Rosetta-gami* بیشتر از *اشریشیا کلی* BL21 بود (۹).

نتایج مطالعه Fong و همکاران در سال ۲۰۰۳ به منظور بیان TES-120 در باکتری *E.coli* نشان داد که در ساعت دوم پس از القا بیشترین میزان بیان حاصل شد. همچنین پروتئین نوترکیب TES-120 بیان شده با ۴۵ سرم انسانی توکسوکاریازیس واکنش مثبت داد (۱۰).

در مطالعه حاضر پس از چندین تلاش برای تعیین شرایط بهینه، بالاترین مقدار بیان پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* در باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) به روش القایی با ۱ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت شش ساعت حاصل شد (تصویر ۱). مطالعه Shahbakhsh و همکاران در سال ۲۰۲۱ به روی پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* در باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) و *اشریشیا کلی* BL21 نشان داد که میزان بیان پروتئین در باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) در ساعت چهارم پس از القا بیشتر بود (۱۱). مقایسه نتایج الکتروفورز تخلیص پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی در دو شرایط واسرشته و طبیعی نشان داد که با هر دو روش تحت شرایط واسرشته و طبیعی تخلیص انجام می‌شود و باند ۴۱ کیلودالتون بر روی ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات-پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با کوماسی‌برلیانت‌بلو قابل مشاهده می‌باشد (تصویر ۳) اما مقدار پروتئین حاصل در تخلیص تحت شرایط واسرشته بیشتر از طبیعی است و اندازه‌گیری با روش میکروبرادفورد نیز مؤید این نتایج بود.

اغلب پروتئین‌های نوترکیب در اجسام انکلوژن تجمع می‌یابند و با استفاده از روش‌های ترکیبی محلول و خالص‌سازی می‌شوند. در مطالعه حاضر پس از القا و استخراج پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* لام میکروسکوپی تهیه و رنگ‌آمیزی شد و در باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* با استفاده از لیزوزیم میزان کمی از پروتئین مورد نظر وارد بخش محلول شد و همچنان تعداد زیادی از باکتری‌ها شکل ظاهری خود را حفظ کردند اما با روش لیزوزیم همراه با سونیکه کردن، باکتری‌ها شکل میله‌ای خود را از دست داده، دیواره سلولی شکسته شده و مقدار زیادی از پروتئین مورد نظر وارد بخش محلول شد (تصویر ۲).

در مطالعه Abbaszadeh و همکاران در سال ۲۰۱۹ که با هدف انتخاب بهترین روش استخراج و تخلیص پروتئین نوترکیب تری‌پاراتید در میزبان *اشریشیا کلی* با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل بود نیز از روش نیتروژن مایع برای له کردن سلول‌های باکتریایی استفاده کردند اما هدف مطالعه را تأمین نکرد لذا از تیمار با بافر شیمیایی همراه با سونیکه کردن استفاده کردند که با این روش بیش از ۹۷ درصد پروتئین وارد فاز محلول شد و نتیجه مطلوب و قابل قبول، مشابه با مطالعه حاضر حاصل گردید (۱۲).

نتایج سنجش دات‌بلات نشان داد که IgG پلی‌کلونال اختصاصی تولید شده در خرگوش چالش شده، می‌تواند پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* بیان شده در *اشریشیا کلی* BL21(DE3) را تشخیص دهد (تصویر ۴) این یافته نشان داد که این پروتئین نوترکیب تخلیص شده، فعالیت زیستی خود را به درستی حفظ کرده و بنابراین تخلیص در شرایط واسرشته تأثیر نامطلوبی بر ایمنی‌زایی پروتئین نداشته است.

نتیجه‌گیری‌نهایی: مطالعه حاضر یک روش اصلاح شده برای محلول‌سازی و تخلیص پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس* را در باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) معرفی کرد. پروتئین نوترکیب به شکل اجسام انکلوژن با پلاسمید pET-32a بیان شد. به منظور محلول‌سازی از بافرهای لیزکننده اوره و ایمیدازول حاوی لیزوزیم همراه با سونیکه کردن و برای تخلیص از کروماتوگرافی تمایلی با رزین نیکل-نیتریلوتری‌استیک‌اسید آگاروز و رزین نیکل-نیتریلوتری‌استیک‌اسید سفاروز استفاده شد و میزان پروتئین بازیابی شده بازدهی قابل قبول داشت. پروتئین نوترکیب لکتین نوع سی *توکسوکارا کنیس*، خاصیت ایمنی‌زایی خود را حفظ کرده و به عنوان یک مولکول زیستی برای اهداف مختلف قابل استفاده است. روش بهینه‌سازی مورد استفاده در مطالعه حاضر می‌تواند در تخلیص سایر پروتئین‌های نوترکیب که در *اشریشیا کلی* به شکل اجسام انکلوژن بیان می‌شوند نیز مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی مرکز تحقیقات مالتیپل‌اسکلروزیس، پژوهشکده علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد اخلاق IR.TUMS.NI.REC.1400.033، کد طرح پژوهشیاری ۱۴۰۰-۱-۲۳۳-۵۲۹۷۱ و معاونت پژوهش و فناوری دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد و مراحل آزمایشگاهی آن در آزمایشگاه مولکولی گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

به انجام رسید، نویسندگان بدین ترتیب مراتب قدردانی خود را از حامیان، ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Etebar F, Hosseini SH, Jalousian F, Ranjbar MM. Phylogenetic analysis of C type lectin from *Toxocara canis* infective larvae and comparison with the C type lectin family in the immune system of mouse and human. Iran J Parasitol. 2018;13(1):49. PMID: 29963085

2. Eslahi AV, Badri M, Khorshidi A, Majidiani H, Hooshmand E, Hosseini H, et al. Prevalence of *Toxocara* and *Toxascaris* infection among human and animals in Iran with meta-analysis approach. BMC Infect Dis. 2020;20(1):1-17. doi: 10.1186/s12879-020-4759-8 PMID: 31910815

3. Loukas A, Doedens A, Hintz M, Maizels RM. Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. Parasitology. 2000;121(5):545-54. doi: 10.1017/S0031182099006721 PMID: 11128806

4. Raulf MK, Lepenies B, Strube C. *Toxocara canis* and *Toxocara cati* somatic and excretory-secretory antigens are recognised by C-type lectin receptors. Pathogens. 2021;10(3):321. doi: 10.3390/pathogens10030321 PMID: 33803269

5. Wang Y, Van Oosterwijk N, Ali AM, Adawy A, Anindya AL, Dömling ASS, et al. A systematic protein refolding screen method using the DGR approach reveals that time and secondary TSA are essential variables. Sci Rep. 2017;7(1):9355. doi: 10.1038/s41598-017-09687-z PMID: 28839267

6. Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. Methods Enzymol. 2000;326:245-254. doi: 10.1016/S0076-6879(00)26058-8 PMID: 11036646

7. Noh AS, Chuan TD, Khir NA, Zin AA, Ghazali AK, Long I, et al. Effects of different doses of complete Freund's adjuvant on nociceptive behaviour and inflammatory parameters in polyarthritic rat model mimicking rheumatoid arthritis. PLoS One. 2021;16(12):1-24. doi: 10.1371/journal.pone.0260423 PMID: 34879087

8. Matthey B, Engert A, Klimka A, Diehl V, Barth S. A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of *Pseudomonas* exotoxin-based fusion proteins. Gene. 1999;229(1-2):145-53. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00038-4 PMID: 10095114

9. Yari S, Behzadian F, Nejad HR, Masoumian M, Karimi M. Expression and purification of soluble form of human parathyroid hormone (rhPTH1-34) by trx tag in *E. coli*. Res Mol Med. 2017;5(3):26-31. doi: 10.29252/rmm.5.3.26

10. Fong MY, Lau YL, Init I, Jamaiah I, Anuar AK, Rahmah N. Recombinant expression of *Toxocara canis* excretory-secretory antigen TES-120 in *Escherichia coli*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003;34(4):723-6. PMID: 15115078

11. Shahbakhsh M, Jalousian F, Hosseini SH, Shayan P, Moghadasi AN. Optimization of expression and extraction of *Toxocara canis* recombinant C-type lectin protein in *Escherichia coli* BL21 (DE3). J Vet Res. 2021;76(2):162-70. doi: 10.22059/JVR.2020.287488.2966 (In Persian)

12. Abbaszadeh AS. Optimized solubilization and purification of recombinant teriparatide fusion protein expressed in *E. coli*. Modares J Biotechnol. 2019;10(1):1-7. (In Persian)