

مطالعه اثر یابوری نانوذرات طلا بر ایمنی زایی

ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در موش

امیر ربیعی رودسری^۱، فیروز ابراهیمی^{۲*}، محمدعلی عارف پور ترابی^۳

۱- کارشناسی ارشد، ۲- استادیار و ۳- کارشناس ارشد دانشگاه جامع امام حسین (ع)

(دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۳۰، پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۲۰)

چکیده

بوتولیسم یک سندروم خطرناک است که توسط نوروتوکسین‌های بوتولینوم تولید شده از باکتری‌های جنس کلوستریدیا (سروتیپ‌های A تا G) ایجاد می‌شود. مطالعات زیادی نشان می‌دهند که ناحیه اتصالی نوروتوکسین‌های بوتولینوم در تمام تیپ‌ها (A-G)، در ایجاد مصونیت، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و امروزه این ناحیه را به‌عنوان کاندید واکسن مفرقی می‌نامند. در این تحقیق، برای بررسی اثر یابوری نانوذره طلا بر روی یک کاندید واکسن مورد نظر، از فرم نوترکیب ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E استفاده شد. در مطالعات واکسن، یکی از مشکلات، دسترسی به یک یاور کارا و زیست سازگار و با اثرات جانبی کمتر می‌باشد. جهت توسعه یاور جدید، خاصیت یابوری نانوذرات طلا با یاور فروند مقایسه شد. بدین منظور، آنتی ژن نوترکیب نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E متصل به نانوذرات طلا تهیه و چهار بار متوالی به موش‌ها تزریق شد. حیوانات به دو گروه تقسیم شدند که به یک گروه آنتی ژن با یاور فروند و به گروه دیگر آنتی ژن - نانوذره طلا تزریق شد. سپس عیار آنتی بادی تولید شده در دو گروه باهم مقایسه شدند. در نهایت، حیوانات ایمن شده، با استفاده از نوروتوکسین فعال تیپ E مورد چالش قرار گرفتند. با توجه به نتایج القای آنتی بادی، چالش و زیست سازگاری نانو ذرات طلا، می‌توان در مطالعات آینده آن را به عنوان یاور جدید معرفی نمود.

کلید واژه‌ها: یاور، ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E، نانوذرات طلا، بوتولیسم، پروتئین نوترکیب.

Study of Adjuvant Capability of the Gold Nanoparticles on the Immunity of Botulinum Neurotoxin Serotype E in Mouse

A. Rabiee Rudsari, F. Ebrahimi*, M. A. Arefpour Torabi

Imam Hossein University

(Received: 20/11/2012; Accepted: 11/09/2013)

Abstract

Botulism is a dangerous neuromuscular syndrome caused by Clostridium botulinum neurotoxins (serotypes A-G). The more studies have shown that the binding domains in all neurotoxin types (A-G) have a great importance in immunity against the botulism syndrome and nowadays, this domain has been introduced as a vaccine candidate. In this study, for evaluation of adjuvant effect of Gold Nanoparticles (GNPs) on a vaccine candidate, the botulinum neurotoxin type E binding domain was used. In vaccine studies one of the problems is the presence of a potent and biocompatible adjuvant with fewer side effects. For developing of new adjuvants, the adjuvant properties of GNPs to Freund's adjuvant (FA) was compared. A recombinant binding domain BoNT/E conjugated with GNPs was prepared and injected four times. The animals were enrolled in two groups, one of which was injected with FA and the other one with GNP-Ag. Then, the antibody titers were compared with each other. Ultimately, the mice were challenged using active BoNT/E. The results showed that the immunized mice with GNP-Ag and Ag-FA produced high titers of antibody and presented immune response comparable with together. Regarding antibody induction, challenging results and the GNPs biocompatibility, this kind of nanoparticles might be introduced as a candidate new adjuvant in the future studies.

Keywords: Adjuvant, BoNT/E, Gold Nanoparticles, Botulism, Recombinant Binding Domain.

*Corresponding Author E-mail: febrhimi@ihu.ac.ir

۱. مقدمه

از طرفی، مدت زیادی است که میکرو و نانو ذرات به‌عنوان تحویل دهنده‌های دارویی استفاده می‌شوند و به‌تازگی به‌عنوان سیستم‌های تحویلی پپتیدها و آنتی‌ژن‌ها کاربرد پیدا کرده‌اند. این ذره‌ها می‌توانند هم با واسطه تحریک ایمنی مستقیم سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن و یا تحویل آنتی‌ژن به ساختارهای خاص سلولی و تسهیل جذب آنتی‌ژن و پردازش آن، پاسخ‌های ایمنی قوی ایجاد کنند [۹]. نانوذرات زیست تخریب‌پذیر مانند لانتکس، پلی‌استیرن، طلا، سیلیکا و غیره، به‌عنوان کاندید یاور واکسن مطالعه شده‌اند [۱۰]. نانوذرات طلا که معمولاً طلای کلونیدی نامیده می‌شوند، ویژگی‌هایی دارند که آنها را برای کاربردهای پزشکی و زیست‌شناسی بسیار مناسب می‌نماید. از جمله آنها می‌توان به سنتز آسان نانوذرات طلا، پایداری زیاد، توانایی اتصال انتخابی با بیومولکول‌های تشخیصی مثل پروتئین‌ها، پپتیدها و اسیدهای نوکلئیک [۱۱-۱۳]، ویژگی‌های نوری منحصر به‌فرد و زیست سازگاری آن اشاره کرد. از آنجایی که اتصال یک آنتی‌ژن به نانوذره طلا، مکانیسم ارائه و پردازش آنتی‌ژن و دیگر ویژگی‌های ایمونوژنیک را می‌تواند بهبود بخشد، به‌تازگی کاربرد جدیدی برای نانوذرات طلا پیشنهاد شده و آن ویژگی یابوری است. مطالعات در کاربرد یابوری نانوذرات طلا در ایران انجام نشده و در سطح بین‌المللی، به تعداد محدودی تحقیق با آنتی‌ژن‌های متفاوت و نانوذرات طلا با اندازه‌های دیگر خلاصه می‌شود [۱۴-۱۶]. تاکنون هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر اتصال نوروٹوکسین‌های بوتولینوم به نانوذره طلا و مطالعه ایمونولوژیکی کونژوگه حاصل، دیده نشده است. بنابراین در تحقیق حاضر، ابتدا ناحیه اتصال نوروٹوکسین بوتولینوم تیپ E به نانو ذره طلای فعال شده متصل شد. سپس توان ایمنی‌زایی کونژوگه حاصل با توجه به اثر یابوری نانوذرات طلا در مقایسه با یابوری قوی آزمایشگاهی فروند، در حیوان موش مورد مطالعه واقع شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد

سنتز ژن صنعتی توسط شرکت Shinegene (چین) انجام شد. آنزیم‌های محدودکننده NdeI و XhoI از شرکت فرمنتاز (آمریکا) تهیه شدند. کونژوگه اسی^۴، از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA agarose resin استفاده شد که از شرکت Shinegene (چین) خریداری گردید. پلاسمید (+) pET28a از شرکت Novagen (آمریکا) تهیه گشت. سوش باکتری E.coli BL21(DE3) تهیه شده از شرکت Novagen (آمریکا) به‌عنوان میزبان بیانی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲. بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی

به‌منظور تهیه مقادیر زیاد پروتئین نوترکیب به کشت میزبان E. coli-BL21 (DE3) که حاوی وکتور (+) pET28a همراه با ژن صنعتی مورد نظر بود) در فلاسک‌های دو لیتری اقدام شد. برای این

نوروٹوکسین‌های بوتولینوم (BoNT) قوی‌ترین سموم شناخته شده هستند که توسط گونه‌های مختلف کلسترییدیوم بوتولینوم^۱ تولید می‌شوند و موجب سندرم بوتولیسم می‌شوند. هفت زیر گروه مختلف از BoNTs وجود دارد که با حروف A تا G مشخص می‌شوند و هرکدام از این زیر گروه‌ها دارای خاصیت آنتی‌ژنی و بیوشیمیایی متفاوت هستند. تمام این زیر گروه‌ها آزاد شدن استیل‌کولین از پایانه‌های عصبی را مهار می‌کنند. توکسین‌های A, B, E, F در انسان بیماری‌زا بوده در حالی که انواع C و D در حیوانات بیماری ایجاد می‌کنند و تاکنون هیچ بیماری از نوع G گزارش نشده است [۱]. توکسین مذکور، ابتدا در سیتوزول باکتری به‌صورت یک پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای و غیرفعال با وزن حدود ۱۵۰ کیلودالتون تولید می‌شود. سپس پروتئازهایی که در سیتوزول باکتری وجود دارند، پلی‌پپتید را شکسته و به‌صورت دو زنجیره فعال درمی‌آورند که توسط یک باند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند (زنجیره سبک (L) و زنجیره سنگین (H) که به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ کیلو دالتون وزن دارند). زنجیره سنگین از دو ناحیه تشکیل شده است: ناحیه اتصال^۲ (HC) و ناحیه انتقال‌دهنده^۳ (HN). ناحیه اتصال دهنده با تشخیص گیرنده‌های نوروٹوکسین در سطح سلول‌های عصبی (پروتئین SV2 و گانگلیوزید GTb1 در مورد تیپ E) و اتصال به آن، فرآیند اندوسیتوز وابسته به رسپتور را شروع کرده که در نهایت به کمک ناحیه انتقال دهنده، باعث انتقال زنجیره سبک، که یک اندوپیتیداز وابسته به فلز روی می‌باشد، به سیتوزول نوروٹوکسین‌های موتور در سیستم عصبی می‌شود. زنجیره سبک به پروتئین‌های خاصی در سلول‌های هدف حمله کرده و با شکستن آنها، باعث ترشح استیل‌کولین و در نتیجه ایجاد فلج عضلانی شده و بدین صورت خاصیت سمی خود را اعمال می‌کند [۲].

سالانه حدود ۱۰۰۰ مورد بوتولیسم ناشی از غذا در جهان گزارش می‌شود که تولید یک واکسن مناسب برای پیشگیری و درمان این بیماری ضروری به‌نظر می‌رسد [۳]. در حال حاضر واکسیناسیون علیه این باکتری به‌وسیله توکسین غیرفعال شده با فرمالدهید انجام می‌شود. اما استفاده از واکسن‌های توکسوئید دارای معایبی است که تلاش برای ساخت واکسن‌های جدیدتر را توجیه می‌کند [۴]. در واکسن‌های جدید، از روش‌های مهندسی ژنتیک برای تولید واکسن استفاده می‌شود. برای تولید واکسن با استفاده از این روش‌ها معمولاً از توکسین کامل استفاده نمی‌شود، بلکه نواحی خاصی از توکسین که سیستم ایمنی را به‌خوبی تحریک می‌کنند و علیه آنها مقادیر زیادی آنتی‌بادی تولید می‌شود را مورد هدف قرار می‌دهند. امروزه این نواحی به شکل نوترکیب تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵-۸].

^۱ Clostridium Botulinum^۲ Binding Domain^۳ Translocation Domain^۴ Goat Anti- Horse Igg

پروتئین‌ها و نانوذرات آزاد از فیلتر آمیکون نمره ۵۰ کیلو دالتون با سرعت RPM ۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. جهت بررسی اتصال آنتی‌ژن به نانوذرات طلا، نمونه‌های نهایی به فیلم میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) با پوشش کربن اضافه شدند. در نهایت، با اورانیل استنات ۱٪ به منظور افزایش تباین، تیمار شدند. سپس اجازه داده شد تا خشک شوند. توسط میکروسکوپ الکترونی مدل ZEISS EM900 در ۵۰ kV عکس‌برداری شدند (شکل ۴). با توجه به اینکه کونژوگه حاصل پایداری ندارد، بنابراین موقع انجام تزریقات می‌بایست اتصال آنتی ژن به نانوذرات طلا انجام گیرد. نانوذرات طلا به شکل پودر لیوفیلیزه و آنتی ژن بوتولینوم به‌طور مجزا در دمای زیر ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ماه‌ها قابل نگهداری هستند.

۲-۵. تزریق نمونه‌های آنتی‌ژن به موش

به منظور بررسی پاسخ ایمنی، مجموعاً از ۴۵ عدد موش سوری به‌عنوان آزمون و ۵ عدد به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. سه گروه ۱۵ تایی برای سه گروه آزمون یعنی کونژوگه آنتی ژن- نانوذرات طلا- یاور فروند، آنتی ژن- نانوذرات طلا و آنتی ژن- یاور فروند در نظر گرفته شد. تزریقات به گروه‌های موشی مطابق با جدول (۱) انجام گرفت. روش تزریق به حیوان زیر جلدی و حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر بود. ابتدا نمونه‌های آنتی‌ژن غیر کونژوگه و کونژوگه با نانوذره طلا با روش برادفورد، غلظت‌سنجی شدند. برای تعیین غلظت پروتئین، با روش برادفورد از BSA به‌عنوان استاندارد استفاده شد. در تزریقات، غلظت آنتی‌ژن موردنظر طوری تنظیم گردید که در حجم ۱۰۰ میکرولیتر مقدار مورد نیاز از آنتی‌ژن مطابق با جدول تزریقات (جدول ۱) قرار بگیرد.

۲-۶. تعیین تیتراژ آنتی بادی به روش الیزای غیرمستقیم^۴

ابتدا، چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص ELISA با پروتئین نوترکیب غیرمزدوج پوشیده شد (در هر چاهک ۲ μg از آنتی‌ژن با استفاده از بافر کوتینگ). سپس پلیت به مدت یک شب در دمای ۴°C قرار داده شد و چاهک‌ها ۴ بار با استفاده از PBST (بافر فسفات نمکی توئین ۲۰) شستشو داده شد و خشک گردید (شستشوی پلیت‌ها و خشک نمودن آنها در پایان هر مرحله انجام می‌شود). از شیر خشک ۵٪ به‌منظور مسدودکننده فضاهای خالی چاهک‌ها استفاده گردید و پلیت به مدت یک ساعت در شیکر انکوباتور و دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. سرم موش‌های هر گروه با رقت ۱:۱۰۰ به چاهک اول هر ستون اضافه و رقت‌های متوالی (ضریب ۱/۲) انجام گرفت و پلیت به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. سپس کونژوگه موشی با دقت ۱:۷۰۰۰ به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و پلیت به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. در نهایت محلول سوبسترا (حاوی بافر سترات فسفات، OPD، H₂O₂) به هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه با افزودن H₂SO₄ ۰.۱M واکنش خاتمه یافت و پلیت در طول موج ۴۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader خوانده شد [۱۸].

منظور، ابتدا پس از تهیه محیط‌های LB مایع با حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر در داخل فلاسک‌های دو لیتری و افزودن کانامایسین با غلظت نهایی ۲۵ μg/ml، عمل تلقیح از کشت‌های شبانه^۱ انجام گرفت. سپس با افزودن IPTG با غلظت یک میلی‌مولار، در OD_{600nm} = ۰/۷ عمل القاء انجام شد. پس از مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و هوادهی با سرعت ۱۵۰ rpm، سلول‌ها به کمک سانتریفوژ در مدت زمان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ rpm جمع‌آوری شدند. براساس پروتکل شرکت QIAGEN و تحت شرایط طبیعی (غیر دناتور)، سلول‌ها با بافرلیزکننده (حاوی ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، PMSF یک میلی‌مولار، Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار، NaH₂PO₄ ۱۰۰ میلی‌مولار و pH = ۸) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرماگذاری شدند. سپس سلول‌ها از طریق فراصوت^۲ (قدرت ۷۵ درصد ۴ سیکل: ۱۰ ثانیه سونیکاسیون ۱۵ ثانیه در یخ) شکسته شدند و سلول‌های لیز شده در مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند تا سلول‌های نشکسته، قطعات دیواره سلولی و دیگر اجزاء سلولی ته‌نشین شده و محلول رویی شفاف جدا شد. ناحیه اتصالی نوروکسین بوتولینوم تیپ E با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل (Ni-NTA) از طریق روش طبیعی (غیر دناتور) تخلیص گردید و نتایج آن با روش SDS-PAGE مورد مشاهده قرار گرفت [۱۷].

۲-۳. تأیید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات

بعد از تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA، به‌منظور تأیید پروتئین بیان شده روش لکه‌گذاری وسترن مورد استفاده قرار گرفت و از پروتئین BSA به‌عنوان کنترل منفی و از آنتی بادی پلی کلونال اسبی استاندارد علیه نوروکسین بوتولینوم تیپ E (شرکت مصون دارو، ایران) با دقت ۱:۱۰۰۰۰ استفاده شد [۱۸].

۲-۴. اتصال پروتئین نوترکیب به نانوذره طلا و سنجش اتصال

توسط TEM

طبق پروتوکول شرکت سازنده (Nanoprobe, USA) ابتدا محلول نانو ذره طلا که به‌صورت پودر قهوه‌ای رنگ است، در ۱ میلی‌لیتر آب بدون یون حل و ورتکس گردید. (نانوذرات مذکور دارای پوشش سطحی فعال شده با عامل مونو سولفو هیدروکسی سوکسین ایمید^۳ بوده و قادر است از طریق گروه‌های عاملی اسیدهای آمینه سرین و ترئونین به پروتئین متصل شود). سپس محلول پروتئین در بافر PBS به آن اضافه شد (غلظت نهایی پروتئین به‌منظور اتصال بهینه ۵ mg/ml تنظیم شد)، به مدت یک ساعت در دمای اتاق به‌آرامی هم زده شد و سپس یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد تا اتصال به‌خوبی انجام شود [۱۹]. برای حذف

^۱ Overnight

^۲ Sonication

^۳ Mono-Sulfo-N-Hydroxy-Succinimid

^۴ Indirect ELISA

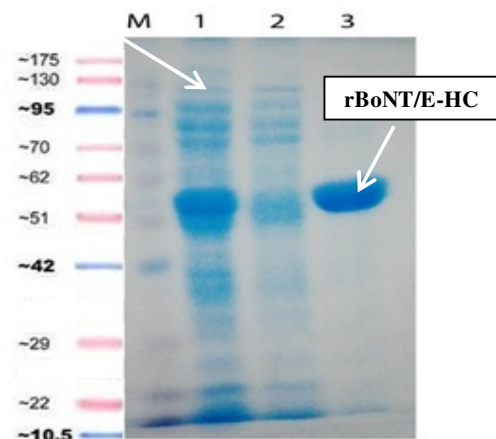
جدول ۱. فواصل زمانی و مقادیر تزریق پروتئین نو ترکیب کونژوگه به نانوذره طلا در مراحل ایمن سازی (Ag: آنتی ژن، FA: یاور فروند، GNP: نانوذره طلا)

		۴	۳	۲	۱
		Contorol	Ag-GNP-FA	Ag-GNP	Ag-FA
PBS (یاور کامل)	۲۵ μg (یاور کامل)	۲۵ μg	۲۵ μg (یاور کامل)	۱	اول
PBS (یاور ناقص)	۱۵ μg (یاور ناقص)	۱۵ μg	۱۵ μg (یاور ناقص)	۱۴	دوم
PBS (یاور ناقص)	۱۰ μg (یاور ناقص)	۱۰ μg	۱۰ μg (یاور ناقص)	۲۸	سوم
PBS (یاور ناقص)	۱۰ μg (یاور ناقص)	۱۰ μg	۱۰ μg (یاور ناقص)	۴۲	چهارم

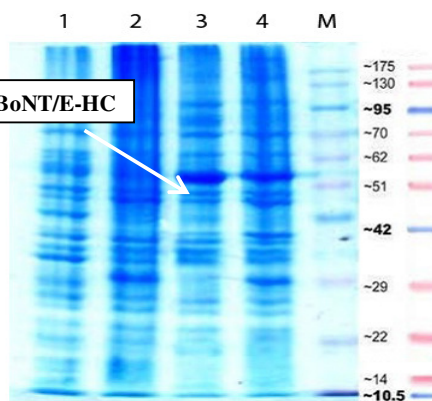
۳. نتایج و بحث

۳-۱. بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب

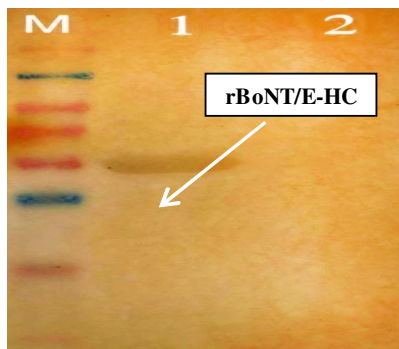
بررسی بیان آنتی ژن نو ترکیب با الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲٪ (شکل ۱)، نشان داد که آنتی ژن مذکور با وزن مولکولی ۵۲ کیلودالتون بیان گردیده است. نتایج تخلیص آنتی ژن بیانی با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل نیز که در شکل (۲) آمده است، بیانگر تخلیص مناسب آن است.



شکل ۲. تصویر SDS-PAGE ۱۲٪ تخلیص پروتئین ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA. ستون شماره ۱: سلول های القاء شده قبل از عبور از ستون را نشان می دهد و ستون های ۲ و ۳: به ترتیب بافر شستشو دارای ایمیدازول ۴۰ و ۲۵۰ میلی مولار را نشان می دهد و ستون M استانداردهای پروتئینی با اوزان مشخص می باشد.



شکل ۱. تصویر SDS-PAGE ۱۲٪ بیان پروتئین ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E. ستون شماره ۱: محلول رویی نمونه شاهد می باشد. ستون شماره ۲: رسوب عصاره سلولی نمونه شاهد، ستون شماره ۳: محلول رویی عصاره سلولی نمونه آزمون و ستون ۴: رسوب عصاره سلولی نمونه آزمون و ستون M استانداردهای پروتئینی با اوزان مشخص می باشد.



شکل ۳. تصویر وسترن بلات از پروتئین ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E. ستون ۱: پروتئین ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E می باشد که به آنتی بادی استاندارد علیه BoNT/E واکنش نشان داده است و ستون ۲: پروتئین BSA می باشد که به آنتی بادی استاندارد علیه BoNT/E واکنش نشان نداده و ستون M استانداردهای پروتئینی با اوزان مشخص می باشد.

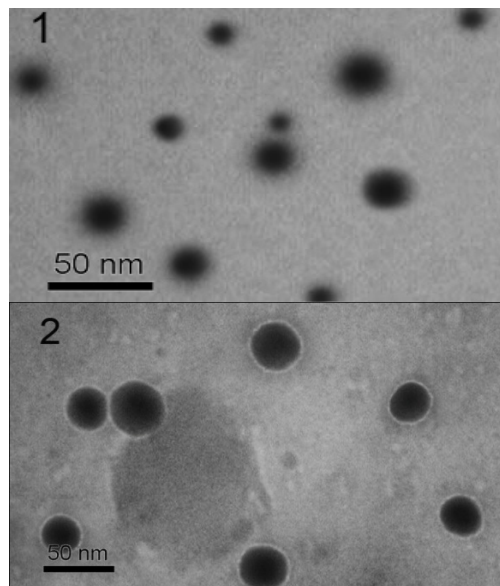
۳-۲. تأیید پروتئین نو ترکیب با استفاده از روش لکه گذاری وسترن

به منظور تأیید پروتئین نو ترکیب، از روش وسترن بلات استفاده شد (بخش ۲-۲). از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان کنترل منفی استفاده شد (شکل ۳).

۳-۳. سنجش و تأیید اتصال آنتی‌ژن به نانوذره طلا به کمک

دستگاه TEM

به منظور تأیید اندازه ذرات و همچنین تأیید اتصال آنتی‌ژن به نانوذره طلا، نمونه‌ها پس از تیمارهای انجام گرفته در بخش ۲-۳ توسط میکروسکوپ الکترونی TEM تصویربرداری شدند. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، اتصال به خوبی انجام شده است (شکل ۴).



شکل ۴. میکروگراف الکترونی از نمونه اتصال آنتی‌ژن به نانوذره طلا. میکروگراف شماره ۱: نمونه نانوذره طلا قبل از اتصال و میکروگراف شماره ۲: نمونه نانوذره طلا بعد از اتصال آنتی‌ژن. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، اتصال آنتی‌ژن به نانوذرات به صورت هاله‌ای در اطراف ذرات دیده می‌شود.

۴-۳. چالش موش‌های ایمن با نوروتوکسین فعال بوتولینوم

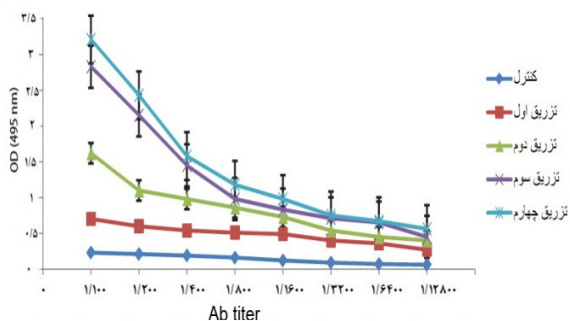
تیپ E

به منظور بررسی میزان تحمل گروه‌های موشی ایمن شده با آنتی‌ژن‌های مورد استفاده، از محلول توکسین فعال تیپ E با LD50 برابر 2×10^{-6} mg/ml استفاده شد. گروه‌های ۱۵ تایی به سه زیرگروه ۵ تایی تقسیم و به هر زیرگروه به ترتیب با 10^5 ، 10^4 و 10^3 برابر LD50 از توکسین مورد چالش واقع شدند. حجم تزریق ۲۰۰ میکرولیتر و به صورت داخل صفاقی انجام شد. به‌طور کلی، آزمون چالش مطابق جدول (۲) ترتیب داده شد.

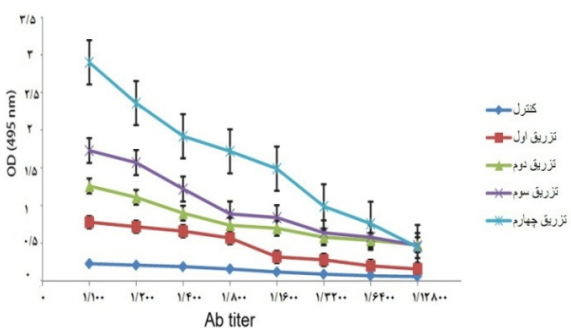
نمودارهای میانگین تیتراژ آنتی‌بادی بعد از هر بار تزریق در شکل‌های (۵-۷) و نمودار مقایسه‌ای تیتراژ آنتی‌بادی در گروه‌های مختلف در شکل (۸) آورده شده است.

جدول ۲. چالش موش‌ها با نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E فعال شده (n/m: نسبت تعداد موش‌های زنده مانده به تعداد کل موش‌ها در هر گروه تیمار و کنترل، Ag: آنتی‌ژن، FA: یاور فروند، GNP: نانوذره طلا)

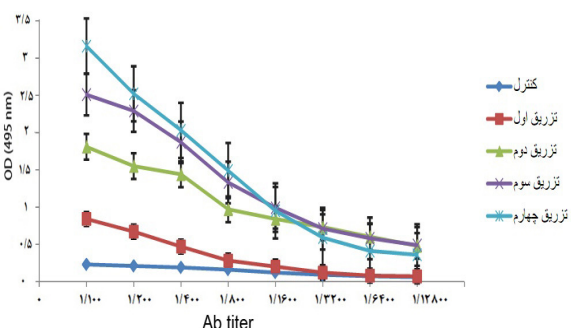
Groups	$10^5 \times LD_{50}$	$10^4 \times LD_{50}$	$10^3 \times LD_{50}$	$\times LD_{50} LD_{50}$
Ag-FA (۱)	۰/۵	۰/۵	۳/۵	
Ag-GNP (۲)	۰/۵	۰/۵	۱/۵	
Ag-GNP-FA (۳)	۰/۵	۰/۵	۲/۵	
Control (۴)	-	-	۰/۵	



شکل ۵. میانگین تیتراژ آنتی‌بادی بعد از هر بار تزریق (در گروه آنتی‌ژن-یاور فروند) نشان داده شده است.

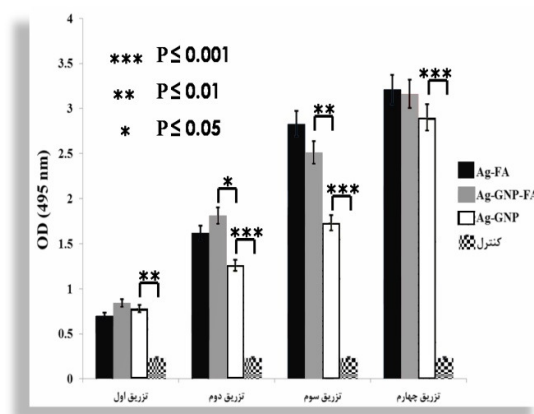


شکل ۶. میانگین تیتراژ آنتی‌بادی بعد از هر بار تزریق (در گروه آنتی‌ژن-نانوذره طلا) نشان داده شده است.



شکل ۷. میانگین تیتراژ آنتی‌بادی بعد از هر بار تزریق (در گروه آنتی‌ژن-نانوذره طلا-یاور فروند) نشان داده شده است.

- [4] Janice, M.; Rusnak, A.; Smith, L. "Botulinum neurotoxin Vaccines Past History and Recent Developments"; Human Vaccines 2009, 5, 794-805.
- [5] Smith, L. "Development of Recombinant Vaccines for Botulium Neurotoxin"; Toxicon 1998, 36, 1539-1548.
- [6] Baldwin, M.; Tepp, W.; Przedpelski, A.; Pier, C.; Bradshaw, M.; Johnson, E.; Barbieri, J. "Subunit Vaccine Against the Seven Serotype of Botulism"; Infect. Immun. 2008, 76, 1314-1318.
- [7] Dolimbek, B.; Steward, L.; Aoki, K.; Atassi, M. "Immune Recognition of Botulinum Neurotoxin B: Antibody-Binding Region on the Heavy Chain of the Toxin"; Mol. Immunol. 2007, 45, 910-24.
- [8] Baldwin, M.; Tepp, W.; Pier, C.; Bradshaw, M.; Hao, M.; Wilson, B.; Fritz, R.; Johnson, E.; Barbieri, J. "Characterization of the Antibody Response to the Receptor Binding Domain of Botulinum Neurotoxin Serotypes A and E"; Infect. Immun. 2005, 73, 6998-7005.
- [9] Kalkanidis, M.; Pietersz, G. A.; Xiang Sue, D.; Mottram, P. L.; Crimien-Irwin, B.; Ardipradja, K.; Plebanski, M. "Methods for Nano-Particle Based Vaccine Formulation and Evaluation of Their Immunogenicity"; Methods 2006, 40, 20-29.
- [10] Huang, Y.; Yu, F.; Park, Y. S.; Wang, J.; Shin, M. C.; Chung, H. S.; Yang, V. C. "Co-Administration of Protein Drugs with Gold Nanoparticles to Enable Percutaneous Delivery"; Biomaterials 2010, 31, 9086-91.
- [11] Forestier, J.; Calais, R. "Gold Salts in Rheumatology; What One Should Do and Not Do"; Concours Med. 1954, 76, 1162-1166.
- [12] Pavelic, K.; Hadzija, M.; Bedrica, L.; Pavelic, J.; Dikic, I.; Katic, M.; Kralj, M.; Bosnar, M. H.; Kapitanovic, S.; Poljak-Blazi, M.; Krizanac, S.; Stojkovic, R.; Jurin, M.; Subotic, B.; Colic, M. "Natural Zeolite Clinoptilolite: New Adjuvant in Anticancer Therapy"; Mol. Med. 2001, 78, 708-720.
- [13] Kogan, M. J.; Olmedo, I.; Hosta, L.; Guerrero, A. R.; Cruz, L. J.; Albericio, F. "Peptides and Metallic Nanoparticles for Biomedical Applications"; Nano Med. 2007, 2, 287-306.
- [14] Neus, G.; Ester, Sánchez-T.; Silvia, P. "Peptides Conjugated to Gold Nanoparticles Induce Macrophage Activation"; Mol. Immunol. 2009, 46, 743-748.
- [15] Epple, M.; Kovtun, A. "Functionalized Calcium Phosphate Nanoparticles for Biomedical Application"; Key Eng. Mater. 2010, 441, 299-305.
- [16] Parween, Sh.; Gupta, P. K.; Chauhan, V. S. "Induction of humoral Immune Response Against PfMSP-1₁₉ and PvMSP-1₁₉ Using Gold Nanoparticles Along with Alum"; Vaccine 2011, 29, 2451-2460.
- [17] Ralph, R. "The Nucleic Acid Protocols Hand Book"; Humana Press, ISBN: 978-0-89603-459-4 14, 2000.
- [18] Bollag, D. "Protein Methods"; Wiley-LISS, 1992, 45-160.
- [19] "Mono-Sulfo-N-Hydroxy-Succinimido Nanogold Labeling Reagent Protocol"; Nanoprobe 2010, 2025A, 1-3, <http://www.nanoprobe.com/instruction>.
- [20] Nixon, D. F.; Hioe, C.; Chen, P. D.; Bian, Z.; Kuebler, P.; Li, M. L. "Synthetic Peptides Entrapped in Microparticles Can Elicit Cytotoxic T Cell Activity"; Vaccine 1996, 14, 1523-1530.
- [21] Bartus, R.; Tracy, M.; Emerich, D.; Zale, S. "Sustained Delivery of Proteins for Novel Therapeutic Agents"; Sci. 1998, 281, 1161.
- [22] Zelphati, O.; Nguyen, C.; Ferrari, M.; Felgner, J.; Tsai, Y.; Felgner, P. L. "Stable and Mono Disperse Lipoplex Formulations for Gene Delivery"; Gene Ther. 1998, 5, 1272-1282.



شکل ۸. نمودار مقایسه‌ای تیتراژ آنتی‌بادی (غلظت ۱/۱۰۰) در گروه‌های مختلف تیمار و کنترل (Ag): آنتی‌ژن، FA، یاور فرونده، GNP: نانوذره طلا.

نتایج آزمایش الیزا نشان داد که در هر مرحله، تیتراژ آنتی‌بادی به صورت تصاعدی افزایش یافته و این بیانگر تحریک مناسب سیستم ایمنی توسط کونژوگه نانوذرات طلا- پروتئین نوترکیب است. طبق نتایج آماری اختلاف معنی‌داری در نتایج دو گروه (Ag-GNP-FA و Ag-GNP) و همچنین در مقایسه تیتراژ ایجاد شده در پاسخ به یاور فرونده (Ag-FA) مشاهده نشد و این بیانگر تحریک تولید آنتی‌بادی مناسب توسط کونژوگه‌های طلاست که با نتایج حاصل از یاور فرونده قابل مقایسه می‌باشد. همچنین نتایج چالش نیز اختلاف زیادی را در سه گروه مورد آزمایش نشان نداد (جدول ۲).

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه نتایج حاصل از تیتراژ آنتی‌بادی در پاسخ به نمونه آنتی‌ژن- نانوذره طلا و تیتراژ آنتی‌بادی در پاسخ به نمونه آنتی‌ژن- یاور فرونده بسیار نزدیک به هم هستند، بنابراین نتیجه به دست آمده، خاصیت یآوری نانوذره طلا را تأیید می‌کند. اگر چه تاکنون استفاده از آن به عنوان یاور گزارش نشده، ولی با توجه به اینکه نانوذرات طلا در مواردی دیگری برای مصارف انسانی به کار گرفته شده‌اند، می‌توان چشم‌اندازی از کاربرد این نانوذرات را به عنوان یاور واکسن ارائه داد.

۵. مراجع

- [1] Gimenez, D. F.; Ciccarelli, A. S. "Another Type of Clostridium Botulinum"; Zentral Blatt Bacteriol Mikrobiol Hyg. 1970, 215, 221-224.
- [2] Montecucco, C.; Schiavo, G. "Mechanism of Action of Tetanus and Botulinum Neurotoxins"; Mol. Microbiol. 1994, 13, 1-8.
- [3] Zaharaie, S. M.; Pourshafiee, M. R.; Afshariee, M. T.; Aghelie, N. "The Epidemiological Feature of Botulism Syndrom in Iran"; Quaternary Journal of Tropical and Infectious Diseases 1384, 41, 13-16. (In Persian).