

بهینه سازی ترسیب توکسوئید دیفتری به منظور ارتقاء واکسن به وسیله آمونیوم- سولفات فوق اشباع

میثم اکرمی^۱، مجتبی نوفلی^{۲*}، میترا السادات طباطبایی^۱

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، تحقیقات کشاورزی، سازمان آموزش و پژوهش و توسعه (AREEO)، کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کورینه باکتریوم دیفتریه باکتری هوازی و بی‌هوازی اختیاری است. مهم‌ترین گونه از خانواده کورینه باکتریها، عامل بیماری دیفتری است که به وسیله توکسین خود، بیماری دیفتری را ایجاد می‌کند. آمونیوم سولفات نمکی معدنی است که از آن برای ترسیب و خالص سازی پروتئین ها استفاده می‌شود که با افزایش مقدار نمک حلالیت پروتئینی کم شده و پروتئین‌ها به واسطه قطعه‌های هیدروفوب خود، به هم پیوسته و رسوب می‌کنند. واکسن دیفتری از طریق تخلیص و ترسیب توکسوئید باکتری دیفتری تهیه می‌شود که از جمله روش‌های ترسیب، استفاده از آمونیوم سولفات به صورت نمک خشک و یا تهیه محلول فوق اشباع از آن است.

مواد و روش‌ها: کشت باکتری دیفتری در شرایط بهینه و مغذی سبب افزایش تولید توکسین توسط باکتری می‌شود و بعد از غیرفعال سازی توکسین و تبدیل آن به توکسوئید در صنایع تولید واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد. کلیه محیط‌های کشت باید حداقل به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شوند. به منظور ترسیب توکسوئید باکتری از محلول فوق اشباع ۴/۳۲ مولار آمونیوم با درصدهای مختلف سولفات استفاده شد. نتایج به دست آمده از این روش با SDS PAGE و *Lf TEST* (Lateral flow test) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: استفاده از آمونیوم سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار به جای استفاده از نمک خشک آمونیوم سولفات که در روش سنتی (WHO TRS, No.980) که قبل در صنایع واکسن سازی مورد استفاده قرار می‌گرفت، باعث حذف مرحله طولانی مدت دیالیز شده و از طرفی هدر رفت محصول نهایی (توکسوئید) را به صورت کامل محسوس کاهش داده و همچنین باعث حذف ناخالصی‌های ناخواسته از محصول نهایی شده و محصول نهایی خالص تر را در مقیاس بیش تر در اختیار قرار داده است.

نتیجه گیری: از آنجایی که هدف در صنایع تولید واکسن، دستیابی به مقدار حداکثری توکسوئید از این باکتری است لذا استفاده از آمونیوم سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار برای ترسیب توکسوئید دیفتری به جای استفاده از نمک خشک آمونیوم-سولفات باعث کاهش هدر رفت محصول نهایی و حذف مرحله زمان بر و غیر اقتصادی دیالیز شده و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه تر خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: واکسن، دیفتری، ترسیب، توکسوئید، آمونیوم سولفات

نویسنده مسئول :

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه
آزاد اسلامی، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: noofeli1234@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۳

مقدمه

دیفتری بیماری حاد باکتریایی دستگاه تنفسی است. دیفتری بیماری شدید و بالقوه کشنده‌ای است که میزان مرگ و میر آن در کودکان خردسال و افراد مسن زیادتر است. عامل این بیماری باکتری کورینه باکتریوم دیفتریه است. کورینه باکتریوم‌ها شامل دو گروه بیماری‌زا و غیربیماری‌زا هستند. گروه غیربیماری‌زا را تحت عنوان دیفترئوئیدها می‌شناسند که به‌صورت فلور نرمال در بینی، گلو، دستگاه تنفسی وجود دارند. مهم‌ترین گونه از خانواده کورینه باکتری‌ها، عامل بیماری دیفتری است. این باکتری باسیل گرم مثبت، کاتالاز مثبت، چماقی شکل و به شکل حروف چینی دیده می‌شود (۵،۱). ظاهری دنداندار و تسبیح مانند دارد. هوازی و بی‌هوازی اختیاری است و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (حداقل ۲۰ و حداکثر ۴۰ درجه) رشد می‌کند. آمونیم‌سولفات نمکی معدنی است که از آن برای ترسیب و خالص‌سازی پروتئین‌ها استفاده می‌شود که با افزایش مقدار نمک حلالیت پروتئینی کم شده و پروتئین‌ها به‌واسطه قطعه‌های هیدروفوب خود به‌هم پیوسته و رسوب می‌کنند (۲،۱۴). در واقع با افزایش غلظت نمک آمونیم‌سولفات، پروتئین دیفتری در درصدهای خاصی کم‌ترین و بیش‌ترین رسوب را دارند که اساس جداسازی پروتئین محسوب می‌گردد (۲۱،۴). تست Lf در واقع تست ای برای تشخیص حضور و یا عدم حضور آنتی‌ژن در نمونه (توکسوئید) خالص شده است که در اصل مواجهه کردن آنتی‌بادی استاندارد با آنتی‌ژن است (۲۰، ۸). تست Kf هم‌زمان با تست Lf ارزیابی می‌شود. در واقع Kf مدت زمانی است که به‌طول می‌انجامد تا لوله‌ها با نسبت‌های مختلف حاوی آنتی‌ژن اولین فولیکولاسیون (کلوئید) را نشان دهند. این زمان مدت زمانی است که برهم‌کنش ضدآنتی‌بادی با آنتی‌بادی را برای هر لوله نشان می‌دهد. از آنجایی که ترسیب واکسن دیفتری در روش‌های سنتی با استفاده از آمونیم‌سولفات خشک زمان‌بر، پرهزینه و با هدر رفت محصول همواره همراه بوده است، لذا

نیاز به طراحی روشی جدید و بدون اشکال‌های روش‌های گذشته، بیش از پیش احساس شد که هدفی برای استفاده از آمونیم‌سولفات فوق اشباع به‌جای استفاده از نمک خشک آمونیم‌سولفات برای ترسیب توکسوئید باکتری دیفتری در طرح انجام گرفته است (۱۷،۹).

روش کار

به‌منظور کشت باکتری، ابتدا سویه باکتریایی واکسن دیفتری از بخش واکسن‌های باکتریایی انسانی مؤسسه رازی تحویل گرفته شد. سپس باکتری در محیط مغذی لوفلر کشت داده شد و سپس کلنی‌ها به محیط Steiner با حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر انتقال داده شد. بعد از رشد نسبی باکتری در محیط Steiner با حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر کلنی‌ها را به حجم ۲ لیتر از همان محیط وارد کرده و کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت انکوبه کردن محیط کشت باکتری، توکسین از محیط کشت جداسازی و غیرفعال گردید. در نهایت کلنی‌ها به فرمانتور ۳۵۰ لیتری منتقل شد و مراحل تغلیظ بر روی آن‌ها انجام گرفت که این فرآیند باعث شد توکسین تهیه شده به حجم ۳۰ لیتر تغلیظ و کاهش یابد (۲۲). سپس توکسین با فرمالدهید غیرفعال شده و تبدیل به توکسوئید شد سپس Crude Antigen از محلول حاوی توکسین و محیط کشت جداسازی شده و برای مرحله ترسیب فرستاده شد. ۱ لیتر توکسوئید تغلیظ شده از بخش تولید واکسن‌های باکتریایی انسانی (DTP) مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد و این حجم در ۱۰ لوله به‌طور مساوی تقسیم شد (هر لوله ۱۰۰ میلی‌لیتر) و با افزودن محلول فوق اشباع آمونیم‌سولفات ۴/۳۲ مولار به‌صورت مایع، با درصدهای مختلف (۰ تا ۵۰ درصد) به هر کدام از ۱۰ لوله اضافه گردید (هر لوله با درصد خاص از آمونیم‌سولفات) و ترسیب به‌صورت OVER NIGHT در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۹،۴). مایع رویی یا سوپرناتانت حاصل از اضافه شدن درصدهای مختلف

ترسیب شده با درصدهای مختلف از آمونیوم سولفات نمونه تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر نیز به آن ها سمپل بافر اضافه شد تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شود، سپس نمونه ها به چاهک های ژل آماده شده ۱۰ درصد آکریل آمید SDS-PAGE اضافه شد و به مدت ۱/۵ ساعت با ولتاژ ۱۱۰ ولت الکتروفورز انجام گرفت. ژل الکتروفورز شده با کوماسی بلو رنگ آمیزی شد و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت.

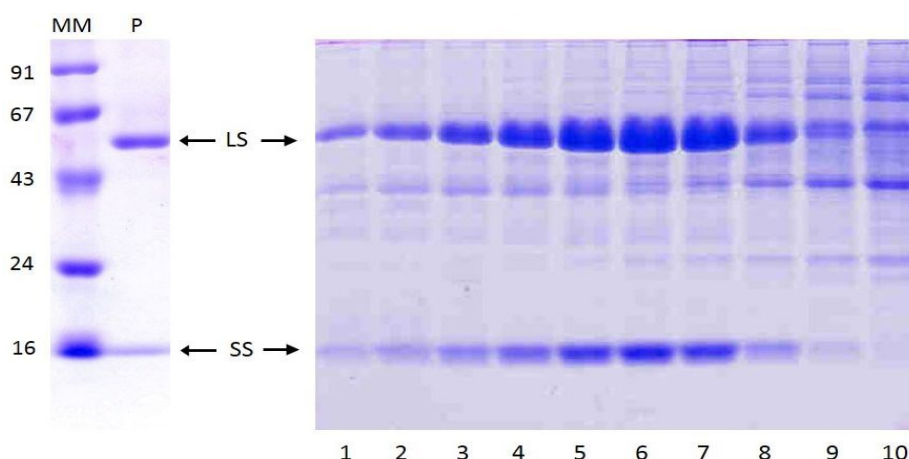
یافته ها

هدف در صنایع تولید واکسن، حفظ حداکثری محصول نهایی است. لذا بهینه سازی روش تولید محصول در حوزه تحقیق و توسعه از موارد مهم بشمار می رود. ترسیب توکسوئید دیفتری و تک مرحله ای نمودن آن نیز از اهمیت زیادی در تولید برخوردار است. در این تحقیق از محلول آمونیوم سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار به جای پودر خشک آن، استفاده گردید (جدول ۱) و نتایج بیان گر این مطلب است که در محلول آمونیوم سولفات ۴۰ درصد، مایع رویی یا سوپرناتانت توکسوئید دیفتری، بیشترین فعالیت Lf و کوتاه ترین زمان Kf را دارا است و در SDS-PAGE نیز کمترین پروتئین های ناخواسته را دارد.

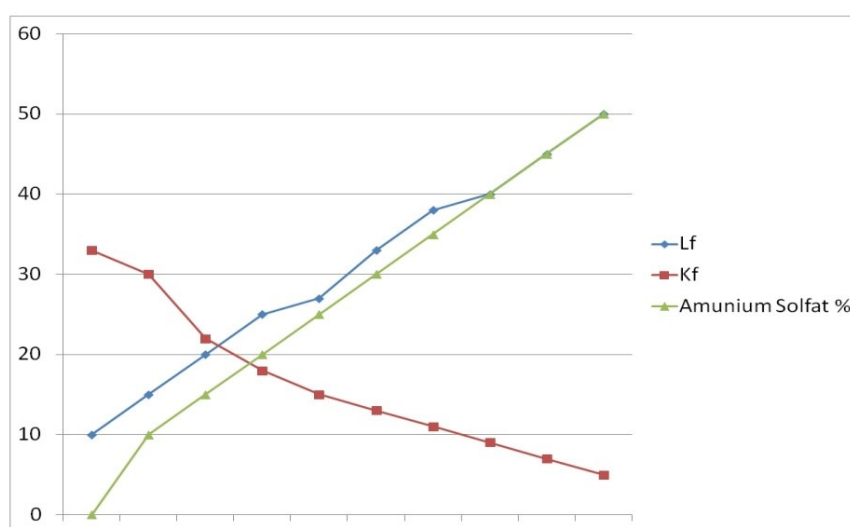
آمونیوم سولفات، ابتدا توسط تست Lf و سپس توسط ژل ۱۰ درصد آکریل آمید SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۳). پس از ترسیب توکسوئید به وسیله درصدهای مختلف آمونیوم سولفات فوق اشباع، تست Lf و Kf بر روی لوله های مورد آزمایش انجام گرفت، به این ترتیب که محلول آنتی بادی با نسبت های ۰ تا ۹۰ درصد رقیق سازی شد، تعداد ۱۰ لوله با نسبت های مختلف آنتی بادی تهیه شده و سپس ۱ میلی لیتر آنتی بادی (۰ تا ۹۰ درصد) به همراه ۱ میلی لیتر نمونه توکسوئید ترسیب شده با آمونیوم سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار (لوله هایی که دارای ترسیب بیش تر و همچنین داری جذب بالا در دستگاه اسپکتوفتومتر بودند) به هر کدام از لوله های اضافه شد و حجم کلی هر کدام از لوله ها با سرم فیزیولوژی به ۱۰ میلی لیتر افزایش یافت، سپس لوله ها در هر دقیقه مورد بررسی قرار گرفتند (۱۲، ۱۳). بررسی لوله ها در یک محیط به طور کامل تاریک مانند باکس و یا جعبه ای سیاه رنگ که تنها یک لامپ در آن تعبیه شده صورت گرفت. اولین لوله ای که در آن فولیکولاسیون (کلوئید) تشکیل شد به عنوان لوله دارای Lf بالا و به عبارت بهتر نمونه دارای بیش تر آنتی ژن یا پروتئین توکسوئید مشخص شد (۱۰، ۲۴). ۱۰ میکرولیتر از لوله های حاوی توکسوئید

جدول ۱- ترسیب توکسوئید با درصدهای مختلف آمونیوم سولفات و تست Lf و Kf انجام شده از این درصدها

شماره آزمایش	درصد آمونیوم سولفات (%)	Lf/ml	Kf (min)
۱	۰	۱۰*۲۵	۳۳
۲	۱۰	۱۵*۲۵	۳۰
۳	۱۵	۲۵*۲۵	۲۲
۴	۲۰	۲۷*۲۵	۱۸
۵	۲۵	۳۰*۲۵	۱۵
۶	۳۰	۳۵*۲۵	۱۳
۷	۳۵	۴۰*۲۵	۱۱
۸	۴۰	۴۵*۲۵	۹
۹	۴۵	۵۰*۲۵	۷
۱۰	۵۰	۵۵*۲۵	۵



شکل ۱- ترسیب توکسوئید با درصدهای مختلف آمونیوم سولفات و تست SDS-PAGE انجام شده از این درصدها. عنوان هر کدام از چاهک ها به- ترتیب: MM: مارکر - P: کنترل مثبت (توکسوئید خاص) - چاهک شماره ۱: آمونیوم سولفات ۰ درصد - چاهک شماره ۲: آمونیوم سولفات ۵ درصد - چاهک شماره ۳: آمونیوم سولفات ۱۰ درصد - چاهک شماره ۴: آمونیوم سولفات ۲۰ درصد - چاهک شماره ۵: آمونیوم سولفات ۳۰ درصد - چاهک شماره ۶: آمونیوم سولفات ۴۰ درصد - چاهک شماره ۷: آمونیوم سولفات ۴۵ درصد - چاهک شماره ۸: آمونیوم سولفات ۵۰ درصد - چاهک شماره ۹: آمونیوم سولفات ۶۰ درصد - چاهک شماره ۱۰: آمونیوم سولفات ۷۰ درصد.



نمودار ۱ - نمودار تست Lf و Kf بعد از ترسیب با غلظت های مختلف از آمونیوم سولفات

تخلیص توکسوئید دیفتری استفاده کردند (۷)، هم چنین در سال ۲۰۱۵، Chandani Payal و همکاران از اولترا فیلتر (UF) برای تخلیص توکسوئید استفاده کردند (۱۵)، اما در هر دو مطالعه انجام گرفته ترسیب توکسوئید دیفتری به روش WHO TRS , No. 980 و با استفاده از نمک خشک آمونیوم سولفات بوده است. با توجه به روش توصیه شده سازمان بهداشت جهانی در WHO

بحث

در سال های اخیر تلاش های بسیاری برای بهبود روش های تخلیص و ترسیب توکسوئید دیفتری و افزایش راندمان واکسن و کاهش هزینه ها صورت گرفته است، در سال ۲۰۱۱، Fernando Fratelli و همکاران از mPEG (polymer methoxypolyethylene glycol) برای

Technical Report Series (TRS) , No. 980 که در قبل برای ترسیب توکسوئید دیفتری مورد استفاده قرار می گرفت و اساس آن استفاده از آمونیوم سولفات به صورت پودر خشک و اضافه کردن آن در چندین مرحله است، میزان هدر رفت محصول نهایی به دلیل آلودگی پودر خشک نمک آمونیوم سولفات، اشباع آنی توکسوئید و عدم انحلال کامل نمک در توکسوئید، زمان بر بودن فرآیند ترسیب با نمک خشک، نگهداری به مراتب سخت تر پودر خشک نمک آمونیوم سولفات و همچنین عدم صرفه اقتصادی هزینه های ترسیب و نیاز به مرحله دیالیز در روش توصیه شده سازمان بهداشت جهانی (WHO TRS No. 980)، هدفی برای طراحی روش جدید برای ترسیب توکسوئید دیفتری شد که در مطالعه جاری مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن مشهود است. هدر رفت محصول در این روش (استفاده از آمونیوم سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار به جای استفاده از پودر خشک آمونیوم سولفات) تا ۲۵ درصد کاهش یافت و از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه تر بود، از آنجا که این روش بر خلاف روش سنتی گذشته به صورت تک مرحله ای انجام می شود، ۴۸ ساعت صرفه جویی در زمان انجام می گیرد و از طرفی مرحله دیالیز که خود در ۷۲ ساعت و به منظور حذف نمک های اضافی انجام می گرفت به طور کامل حذف شد و این روش بدون نیاز به مرحله دیالیز می تواند ترسیب توکسوئید را انجام دهد.

نتایج بیان گر آن است که روش طراحی شده برای ترسیب توکسوئید دیفتری از جوانب بسیاری قابل بسط است که می توان به صرفه اقتصادی و کاهش هزینه ها، آلودگی کم تر محصول نهایی، L_f بالاتر و فلوکولاسیون (K_f) در زمان کوتاه تر، حذف کلی مرحله دیالیز که به منظور حذف نمک های اضافی از محصول نهایی مورد استفاده قرار می گرفت و در نهایت صرفه جویی در زمان اشاره کرد (۴،۲۱). در مقیاس صنعتی با توجه به حجم عظیم توکسوئید و میزان محصول نهایی به منظور تولید واکسن دیفتری،

کوتاه شدن مراحل ترسیب، حذف مراحل اضافی، کاهش هدر رفت نمک آمونیوم سولفات و در نهایت محصول نهایی بیش تر و خالص تر یکی از اهداف اصلی برای تولید واکسن پایدارتر در تمامی مراکز تحقیقاتی واکسن در جهان است. این تحقیق قابلیت استفاده برای تولید توکسوئید دیفتری در مقیاس صنعتی را دارد و از بسیاری جهت های اقتصادی، روش های تولیدی و تحقیقاتی مقرون به صرفه تر است.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از آمونیوم سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار مایع به جای استفاده از پودر خشک آمونیوم سولفات به منظور ترسیب توکسوئید دیفتری با هدف ارتقاء کیفیت واکسن، علاوه بر صرفه اقتصادی و زمانی می تواند روشی جدید برای ترسیب توکسوئید دیفتری در فاز صنعتی و حجم بالا نیز باشد، زیرا هدر رفت محصول نهایی، عدم آلودگی توکسوئید در مراحل ترسیب و هزینه های تولید توکسوئید که در روش های قبل در چندین مرحله زمان بر انجام می گرفت در این روش به حداقل ممکن کاهش یافته و کیفیت واکسن با توجه به کوتاه شدن مراحل ترسیب، حذف مراحل اضافی، تک مرحله ای شدن مرحله اضافه کردن نمک آمونیوم سولفات و در نهایت حذف مرحله دیالیز، نیز افزایش می یابد.

سپاسگزاری

با تشکر و قدردانی فراوان از:

دکتر رسول مدنی مدیریت بخش پروتئومیکس و بیوشیمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
دکتر علی نظری مسئول آزمایشگاه پروتئومیکس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی دوره هشتم شماره سی و یکم - بهینه سازی ترسیب...

سرکار خانم مهندس مائده سمیعانی کارشناس آزمایشگاه

پروتئومیکس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

مهندس فرامرز عمادی آذر کارشناس بخش توپرکولین

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

جناب آقای اسمعی هاشم پور

منابع

- 1- Bennett, M. J. and G. Fujii. "The crystal structure of diphtheria toxin." 1992; *Nature* 357(6375): 216.
- 2- Brgles, M., Prebeg, P., Kurtović, T., Ranić, J., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G., & Halassy, B. Optimization of tetanus toxoid ammonium sulfate precipitation process using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2016; 46(7), 695-703.
- 3- Chung, Y. J., Lee, J. A., Jung, M. Y., Lee, S. M., Kim, T. Y., Choe, Y. K., & Kim, I. H. Optimization of diphtheria toxin production by *Corynebacterium diphtheriae* using a casein-based medium in a fermenter. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 2016; 21(4), 537-543.
- 4- Collier, R. "Diphtheria toxin: structure and function of a cytotoxic protein." ADP-ribosylating toxins and G proteins: 1990; 3-19.
- 5- Dhar, D., Rakshit, P., Tahlan, A. K., Ghoshal, M., Kumbhare, F., Kashyap, T., & Gupta, R. K. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015.
- 6- Forgac, M. "Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps." *Physiological reviews*. 1989; 69(3): 765-796.
- 7- Fratelli, F., Abrahão-Neto, J., Caricati, A. T. P., Borges, M. M., Guidolin, R., & Caricati, C. P. An alternative method for purifying and detoxifying diphtheria toxin. *Toxicon*, 2011; 57(7), 1093-1100.
- 8- Gill, D. M. and L. L. Dinius. "Observations on the structure of diphtheria toxin." *Journal of Biological Chemistry*. 1971; 246(5): 1485-1491.
- 9- Kurokawa, M., et al. "ON THE ANTIGENICITY OF DIPHTHERIA TOXOID. PART II. PRELIMINARY REPORT ON THE IMMUNIZING POTENCY OF DIPHTHERIA TOXOID FRACTIONS ISOLATED AT LOWER AMMONIUM SULFATE CONCENTRATION." *The Japanese Medical Journal* 1951; 4(4): 233-238.
- 10- Linggood, F., et al. "The toxoiding of purified diphtheria toxin." *British journal of experimental pathology* 1963; 44(2): 177.
- 11- MØYNER, K. and G. CHRISTIANSEN. "Comparison of gel filtration and ammonium sulphate precipitation in the purification of diphtheria toxin and toxoid." *APMIS* 1984; 92(1-6): 17-23.
- 12- Muni, C., Mani, K. R., & Subashkumar, R. Large scale recovery of tetanus toxin and toxoid from fermentation broth by microporous tangential flow filtration. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 2013; 4(2), 28-37.
- 13- Northrop, J. H. "Purification and crystallization of diphtheria antitoxin." *The Journal of general physiology* 1942; 25(3): 465-485.
- 14- Pappenheimer Jr, A. "Diphtheria toxin." *Annual review of biochemistry* 1977; 46(1): 69-94.

- 15- Payal, C., & Kashyap, T. Production, Optimization of Detoxification and Ammonium Sulphate Precipitation of Ultrafiltered Tetanus Toxin. *Recent Research in Science and Technology*, 2015; 3(11).
- 16- Pina, L. M., Bassily, E., Machmer, A., Hou, V., & Reinhardt, A. Safety and immunogenicity of a quadrivalent meningococcal polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccine in infants and toddlers: three multicenter phase III studies. *The Pediatric infectious disease journal*, 2012; 31(11), 1173-1183.
- 17- Pope, C. and M. F. Stevens. "The purification of diphtheria toxin and the isolation of crystalline toxin-protein." *British journal of experimental pathology* 1958; 39(2): 139.
- 18- Relyveld, E. H., Bizzini, B., & Gupta, R. K. Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids. *Vaccine*, 1998; 16(9-10), 1016-1023.
- 19- Stojićević, I., Dimitrijević, L., Dovezenski, N., Živković, I., Petrušić, V., Marinković, E., ... & Stojanović, M. Tetanus toxoid purification: Chromatographic procedures as an alternative to ammonium-sulphate precipitation. *Journal of Chromatography B*, 2011; 879(23), 2213-2219.
- 20- Sundaran, B., Rao, Y. U. B., & Boopathy, R. Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2001; 91(2), 123-128.
- 21- Tchobanov, A. I., Dimitrov, J. D., & Vassilev, T. L. Molecular composition of diphtheria toxoid produced using semi-synthetic and meat extract-based broths. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004; 20(2), 211-217.
- 22- Vancetto, M. D. C., Oliveira, J. M. D., Prado, S. M. A., Fratelli, F., & Higash, H. G. Tetanus toxoid purification: A case study. *Nature biotechnology*, 1997; 15(8), 807-808.
- 23- Vose, J. R., Fahim, R. E., Jackson, G. E., Tan, L. U., Herbert, A., Boux, L., ... & Klein, M. H. *U.S. Patent No. 6,399,076*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 2002.
- 24- Zakikhany, K., & Efstratiou, A. Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future microbiology*, 2012; 7(5), 595-607.

سولفات فوق اشباع

میثم اکرمی^۱، مجتبی نوفلی^{۲*}، میترا السادات طباطبایی^۱

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، تحقیقات کشاورزی، سازمان آموزش و پژوهش و توسعه (AREEO)، کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کورینه باکتریوم دیفتریه باکتری هوازی و بی هوازی اختیاری است. مهم ترین گونه از خانواده کورینه باکتریها، عامل بیماری دیفتری است که به وسیله توکسین خود، بیماری دیفتری را ایجاد می کند. آمونیوم سولفات نمکی معدنی است که از آن برای ترسیب و خالص سازی پروتئین ها استفاده می شود که با افزایش مقدار نمک حلالیت پروتئینی کم شده و پروتئین ها به واسطه قطعه های هیدروفوب خود، به هم پیوسته و رسوب می کنند. واکسن دیفتری از طریق تخلیص و ترسیب توکسوئید باکتری دیفتری تهیه می شود که از جمله روش های ترسیب، استفاده از آمونیوم سولفات به صورت نمک خشک و یا تهیه محلول فوق اشباع از آن است.

مواد و روش ها: کشت باکتری دیفتری در شرایط بهینه و مغذی سبب افزایش تولید توکسین توسط باکتری می شود و بعد از غیرفعال سازی توکسین و تبدیل آن به توکسوئید در صنایع تولید واکسن مورد استفاده قرار می گیرد. کلیه محیط های کشت باید حداقل به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شوند. به منظور ترسیب توکسوئید باکتری از محلول فوق اشباع ۴/۳۲ مولار آمونیوم با درصدهای مختلف سولفات استفاده شد. نتایج به دست آمده از این روش با SDS PAGE و Lf TEST (Lateral flow test) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: استفاده از آمونیوم سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار به جای استفاده از نمک خشک آمونیوم سولفات که در روش سنتی (WHO TRS, No.980) که قبل در صنایع واکسن سازی مورد استفاده قرار می گرفت، باعث حذف مرحله طولانی مدت دیالیز شده و از طرفی هدر رفت محصول نهایی (توکسوئید) را به صورت کامل محسوس کاهش داده و همچنین باعث حذف ناخالصی های ناخواسته از محصول نهایی شده و محصول نهایی خالص تر را در مقیاس بیش تر در اختیار قرار داده است.

نتیجه گیری: از آنجایی که هدف در صنایع تولید واکسن، دستیابی به مقدار حداکثری توکسوئید از این باکتری است لذا استفاده از آمونیوم سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار برای ترسیب توکسوئید دیفتری به جای استفاده از نمک خشک آمونیوم- سولفات باعث کاهش هدر رفت محصول نهایی و حذف مرحله زمان بر و غیر اقتصادی دیالیز شده و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه تر خواهد بود.

واژه های کلیدی: واکسن، دیفتری، ترسیب، توکسوئید، آمونیوم سولفات

نویسنده مسئول :

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: noofeli1234@yahoo.com