مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره پانزدهم، تابستان ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تولید ادجوانت آرکئوزومی از لیپیدهای قطبی غشایی با استفاده از کشت انبوه *Methanobrevibacter smithii*

علی شریفات سلمانی[۱]، محمدرضا آقاصادقی[۲]، رخشنده ناطق[۳]، طلعت مختاری آزاد[۴] و سید داور سیادت[۵]

۱: دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، عضو و بورسیه گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲: عضو هیات علمی (دانشیار) گروه هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳: عضو هیات علمی (استاد) گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴: عضو هیات علمی (استاد) گروه ویروس شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵: عضو هیات علمی (دانشیار) گروه سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: از جمله ادجوانت هایی که امروزه مورد توجه قرار گرفته اند و از ویژگی های اختصاصی فراوانی برخوردارند ترکیباتی لیپوزومی با منشائی منحصر به فرد یعنی آرکی ها (آرکی باکتری ها) می باشند که تحت عنوان آرکئوزوم (Archaeosome) نامیده می شوند. هدف از انجام این مطالعه کشت انبوه آرکی *Methanobrevibacter smithii* در فرمانتور و سپس تولید ادجوانت آرکئوزومی از لیپیدهای قطبی استخراج شده از توده سلولی حاصل و بررسی ویژگی های مختلف آرکئوزوم استخراج شده می باشد.

مواد و روش ها: به منظور دستیابی به توده سلولی جهت استخراج لیپیدهای آرکیایی (Archaeal lipids)، *Methanobrevibacter smithii* (DSMZ ۲۳۷۵) در فرمانتور و تحت شرایط کنترل شده pH، دما و شرایط اتمسفری بی هوازی کشت داده شد. سپس لیپیدهای قطبی آرکیایی با استفاده از ترکیب متانول، کلروفرم و آب استخراج گردید و در مرحله بعد به واسطه آبدهی لیپیدهای قطبی با بافر حاوی BSA لیپوزوم آرکیایی (آرکئوزوم) ساخته شد.آرکئوزوم ها به لحاظ عدم وجود آلودگی DNA و پروتیئن و مقدار آنتی ژن وارد شده در ساختمان آنها با استفاده از تکنیک های الکتروفورز بر روی ژل آگاروز، سنجش پروتئین به روش Lowry و با استفاده از دستگاه Picodrop و SDS-PAGE بررسی شدند.

یافته ها: نتایج به دست آمده از ارزیابی لیپیدهای قطبی و آرکئوزوم های تولید شده نشان دهنده غلظت بالای لیپید، قرارگیری مناسب آنتی ژن درون آرکئوزوم ها و خلوص این لیپوزوم ها می باشد.

نتیجه گیری: لیپیدهای استخراج شده با غلظت بالا و تولید کارآمد آرکئوزوم حاوی آنتی ژن با درجه خلوص بالا می تواند در مطالعات آینده در زمینه تحقیقات واکسن به همراه آنتی ژن های مختلف به عنوان یک ترکیب لیپوزومی با پایداری بالا و ویژگی های بالقوه ادجوانتی به کار گرفته شود.

کلمات کلیدی: ادجوانت، آرکئوزوم، لیپیدهای قطبی، متانوبروی باکتر اسمیتی

مقدمه

امروزه یکی از اهداف اصلی علم واکسن شناسی (Vaccinology) طراحی و دستیابی به واکسن هایی است که قادر به تحریک پاسخ های ایمنی سلولی قوی به ویژه از نوع سلول های $CD8^+$ T یا به عبارتی محدود به MHC کلاس I یا پاسخ سلول

آدرس نویسنده مسئول : تهران، پونک، به طرف حصارک، دانشگاه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
Email :alisharifat@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.5.2]

های Cytolytic باشند. این نوع پاسخ های ایمنی، پاسخ های موثر اصلی علیه بیماری هایی عفونی مانند ایدز، سل و مالاریا می باشند که از جمله جدی ترین عفونت هایی هستند که به مرگ منجر می شوند(۴). همچنین تحریک این نوع ایمنی سلولی در درمان سرطان به روش ایمنی درمانی (Immunotherapy) به منظور از بین بردن سلول های بدخیم کاربردی کلیدی دارد (۷). یکی از راهکارهای در دست بررسی به منظور القای این گونه پاسخ های ایمنی وجهت دهی الگوی سایتوکاینی به سمت ایمنی سلولی حفاظت کننده (Protective) استفاده از ترکیبات Immunomodulator یا به عبارتی ادجوانت ها (Adjuvants) می باشد. ادجوانت ها، ترکیبات شیمیایی یا بیولوژیک هستند که باعث تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی، علیه آنتی ژنی یا آنتی ژنهایی می شوند که به همراه آن تزریق شده است. کاهش اثرات مضر مربوط به واکسن و تحریک انواع خاصی از ایمنی، منجر به توسعه ادجوانت های بسیار زیاد و جدیدی شده است. مکانیسم فعالیت این ترکیبات مختلف، متفاوت است و فاکتورهای تاثیر گذار در انتخاب یک ادجوانت شامل گونه حیوان، پاتوژن، آنتی ژن، مسیر ایمن سازی و نوع ایمنی مورد نیاز می باشد(۱۶).

از جمله ادجوانت هایی که امروزه مورد توجه قرار گرفته اند و از ویژگی های اختصاصی فراوانی برخوردارند ترکیباتی لیپوزومی با منشاء منحصر به فردی یعنی آرکی ها (آرکی باکتری ها) می باشند که تحت عنوان آرکئوزوم (Archaeosome) نامیده می شوند. آرکئوزوم ها ساختار تیپیک دیگر لیپوزوم ها را دارند با این تفاوت که منشا آنها لیپیدهای آرکیایی (Archaeal lipids) است. در ساختار این لیپیدها الکل تا حد زیادی ساختاری شبیه به گلیسرول دارد و آرکئول (Archaeol) نامیده می شود. هسته مرکزی آنها که مشخصه این لیپیدها است شامل گلیسرولیپیدهایی با زنجیره ایزوپرنوئید می باشد که مشابه ساختار لیپیدهای پستانداران می باشد. آرکئوزوم ها علاوه بر برخورداری از ویژگی های سایر لیپوزوم ها دارای صفاتی اختصاصی و منحصربفرد می باشند که ممکن است بتوان آنها را به عنوان یک ادجوانت مناسب در طراحی واکسن هایی از قبیل واکسن HIV استفاده کرد(۱۱). از جمله این ویژگی ها القای تولید آنتی بادی علیه آنتی ژنی است که همراه آن تزریق می گردد. به عنوان مثال هنگامی که سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin) به همراه آرکئوزوم با منشا *Methanobrevibacter smithii*، *M. voltae*، *M. hungatei*، *M. concilii*، *M. mazei* و *Thermoplasma* acidophilum تزریق می شود عیار آنتی بادی تولید شده علیه آن به طور چشمگیری افزایش می یابد و حتی اثر ادجوانتی آرکئوزوم در مورد این آنتی ژن (BSA) با اثر ادجوانت کامل فروند برابری می کند. تحریک شدید پاسخ های هومورال و سلولی به ویژه پاسخ های $TCD8^+$ با قابلیت ایجاد پاسخ های خاطره ای (Memory) ویژگی دیگر آرکئوزوم ها می باشد که اغلب علیه آنتی ژن های داخل سلولی و سیتوزولی برانگیخته می شوند. همچنین آرکئوزوم ها قادر به تحریک اندوسیتوز و تحریک متقاطع (Cross-priming) آنتی ژن های قرار گرفته داخل فاگوزوم ها علاوه بر القای تحریک مسیر کلاسیک عرضه آنتی ژن می باشد. از دیگر ویژگی های آنها قابلیت فراخوانی و فعالسازی ماکروفاژها و دندریتیک سل ها، تحریک گسترش کلونال (Clonal expansion) و بقای طولانی سلول های $CD8^+$ T است(۸). نکته جالب توجهی که می تواند منجر به کاربرد احتمالی این ادجوانت ها در مورد واکسن هایی نظیر واکسنHIV شود این است که این ترکیبات می توانند بدون نیاز به سلول های $TCD4^+$ و مستقل از سایتوکاین های آنها باعث القای شدید و طولانی مدت سلول های $CD8^+$ T شوند که به علت سیر نزولی تعداد سلول های $CD4^+$T طی این عفونت این ویژگی ممکن است باعث تاثیرگذاری بیشتر واکسن گردد(۶). با توجه به این ویژگی ها و ضرورت ارزیابی اثر ادجوانتی آرکئوزوم ها در تحریک پاسخ های ایمنی علیه عوامل عفونی مختلف برای اولین بار در کشور در این مطالعه به کشت انبوه آرکی *Methanobrevibacter smithii* در فرمانتور و سپس تولید آرکئوزوم از لیپیدهای قطبی استخراج شده از توده سلولی حاصل از کشت انبوه پرداختیم.

مواد و روش ها

کشت اولیه و تهیه بذر سلولی

به منظور دستیابی به توده سلولی جهت استخراج لیپیدهای آرکیایی (Archaeal lipids)،*Methanobrevibacter smithii*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.5.2]

(DSMZ ۲۳۷۵) در فرمانتور کشت داده شد. بدین منظور ابتدا سویه مذکور در محیط کشت اختصاصی (جدول ۱) در فلاسک های ۱/۵ لیتری به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. به دلیل رشد بی هوازی این آرکی، محیط کشت به صورت بی هوازی تحت شرایط اتمسفری H_2 ۸۰٪ و CO_2 ۲۰٪ تهیه گردید. جهت تامین شرایط بیهوازی از اتاقک بی هوازی (Anaerobic chamber) استفاده گردید. این اتاقک دارای منابع گازی با قابلیت تنظیم خودکار بوده و شرایط اتمسفری مذکور را برای ساخت محیط کشت و کشت اولیه فراهم می کند. بعد از کشت اولیه به منظور تهیه محیط بذر(Seed Culture) کشت با حجم بالاتر در ظرف ۱۰ لیتری صورت گرفت. در این مرحله به منظور تامین شرایط بی هوازی گازدهی به صورت دستی انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا ۲ میلی لیتر از کشت اولیه به محیط کشت موجود در ظرف ۱۰ لیتری افزوده شد و سپس محیط کشت با ترکیب H_2 ۸۰٪ و CO_2 ۲۰٪ گازدهی و ورودی ظرف کشت کاملا بسته شد. هر ۱۲ ساعت یک بار گازدهی به محیط کشت صورت گرفت و کشت تا ۷۲ ساعت در ۳۷° C ادامه یافت(۱).

ترکیب	مقدار در یک لیتر
KCl	0.34 g
MgCl2 x 6 H2O	4.00 g
MgSO4 x 7 H2O	3.45 g
NH4Cl	0.25 g
CaCl2 x 2 H2O	0.14 g
K2HPO4	0.14 g
NaCl	18.00 g
Trace elements	10.00 ml
Vitamin solution	10.00 ml
Fatty acid mixture	20.00 ml
Fe(NH4)2(SO4)2 x 7 H2O	2.00 mg
NaHCO3	5.00 g
Yeast extract	2.00 g
Trypticase	2.00 g
Resazurin	1.00 mg
Cysteine-HCl x H2O	0.50 g
Na2S x 9 H2O	0.50 g
Na-acetate	1.00 g

جدول ۱: محیط کشت اختصاصی *Methanobrevibacter smithii*

ترکیب	مقدار در یک لیتر
Nitrilotriacetic acid	1.50 g
MgSO4 x 7 H2O	3.00 g
MnSO4 x H2O	0.50 g
NaCl	1.00 g
FeSO4 x 7 H2O	0.10 g
CoSO4 x 7 H2O	0.18 g
CaCl2 x 2 H2O	0.10 g
ZnSO4 x 7 H2O	0.18 g
CuSO4 x 5 H2O	0.01 g
KAl(SO4)2 x 12 H2O	0.02 g
H3BO3	0.01 g
Na2MoO4 x 2 H2O	0.01 g
NiCl2 x 6 H2O	0.03 g
Na2SeO3 x 5 H2O	0.30 mg

جدول ۲: ترکیبات نادر موجود در محیط کشت اختصاصی

ترکیب	مقدار در یک لیتر
Biotin	2.00 mg
Folic acid	2.00 mg
Pyridoxine-HCl	10.00 mg
Thiamine-HCl x 2 H2O	5.00 mg
Riboflavin	5.00 mg
Nicotinic acid	5.00 mg
D-Ca-pantothenate	5.00 mg
Vitamin B12	0.10 mg
p-Aminobenzoic acid	5.00 mg
Lipoic acid	5.00 mg

جدول ۳: محلول ویتامینی موجود در محیط کشت اختصاصی

ترکیب	مقدار
Valeric acid	0.500 g
Isovaleric acid	0.500 g
2-Methylbutyric acid	0.500 g
Isobutyric acid	0.500 g
Distilled water	20.00 ml

جدول ۴: مخلوط اسیدهای چرب موجود در محیط کشت

-کشت انبوه در فرمانتور و تهیه توده سلولی

کشت انبوه *Methanobrevibacter smithii* (DSMZ ۲۳۷۵) در فرمانتور ۶۰ لیتری (Nova-Paljas, Contact-flow., Netherland) حاوی ۴۰ لیتر محیط کشت اختصاصی انجام شد. این محیط کشت حاوی عناصر نادر، ترکیب ویژه ویتامینی و همچنین ترکیب اسیدهای چرب می باشد (جدول۲ ،۳ و ۴). به منظور اطمینان از حفظ شرایط بی هوازی، ورودی گاز فرمانتور با ترکیب H_2 ۸۰٪ و CO_2 ۲۰٪ و با جریان ۸ لیتر در ساعت تغذیه و به محیط کشت شاخص اکسید و احیای Resazurin افزوده شد. به واسطه این ترکیب گازی و همچنین وجود ترکیبات کاهنده مانند سولفید و سیستئین، پتانسیل اکسید و احیا به کمتر از mv ۱۱۰- رسید، در نتیجه محیط کشت که به علت وجود Resazurin قرمز رنگ بودکاملاً بی رنگ شد (نشان دهنده شرایط بی هوازی مطلق). در این مرحله جریان ورودی گاز به ۱/۵ لیتر در ساعت کاهش یافت و سپس از محیط

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.5.2]

کشت بذر (Seed Culture) که در فاز لگاریتمی رشد بود ۱/۵ لیتر به مخزن فرمانتور اضافه گردید. حین فرآیند فرمانتاسیون pH در محدوده۰/۱± ۷ و سرعت همزن (Agitator) بر روی rpm۳۵۰ تنظیم شد. به علت متانوژن بودن این آرکی خروجی گاز فرمانتور بعد از گذشت ۷ ساعت آزاد گردید تا متان تجمع یافته حاصل از متابولیسم ارگانیسم از مخزن فرمانتور خارج گردد. دریچه این خروجی به علت فشار گاز متان تولید شده به سمت خارج باز شده و در نتیجه شرایط بی هوازی حفظ می گردد. همزمان با باز شدن دریچه، مجدداً فشار ورودی گاز(H_2 ۸۰٪ و CO_2 ۲۰٪) تا ۸ لیتر در ساعت افزایش یافت تا شرایط بی هوازی تهدید نشود. نمونه برداری از محتویات فرمانتور و بررسی مستقیم میکروسکوپی به منظور کنترل پاکی و همچنین سنجش جذب نوری (OD) در ۶۴۰ نانومتر به عنوان یک شاخص رشد و pH محیط کشت در فواصل زمانی معین صورت گرفت. کشت انبوه تا ۷۲ ساعت ادامه یافت و در پایان توده سلولی به وسیله سانتریفیوژ محیط کشت به مدت ۱ ساعت در ۳۸۰۰ g جمع آوری شد(۱۸و۱۹).

-استخراج لیپیدهای قطبی

به منظور استخراج لیپیدهای قطبی موجود در غشای سلولی که در ساخت آرکئوزوم به کار می روند ابتدا باید توده سلولی حاصل از کشت انبوه، منجمد و سپس به دمای اناق رسانده شود (freeze and thaw). بدین منظور توده سلولی ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در ۲۰°C- و سپس به همین مدت در دمای اتاق قرار گرفت. استخراج با مخلوط متانول، کلروفرم و آب به نسبت حجمی ۲: ۱: ۰/۸ انجام گرفت. بدین ترتیب که به هر۵۰ گرم توده سلولی ۵۰۰ میلی لیتر از مخلوط فوق اضافه، به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و سپس به شدت تکان داده (Shake) شد که در نتیجه لیپیدهای قطبی غشایی در ترکیب متانول، کلروفرم و آب حل شدند. در این مرحله سانتریفیوژ به مدت ۲ ساعت در g ۳۰۰۰ صورت گرفت و مایع رویی (Supernatant) که حاوی لیپیدهای قطبی است جدا گردید. در مرحله بعد به منظور استخراج لیپیدها، از رسوب دهی توسط استن سرد استفاده می شود، بدین ترتیب که استن به مدت ۱۲ ساعت در ۲۰ °C- قرار داده و به مخلوط فوق اضافه گردید. سپس ترکیب مذکور در ۲۰ °C- به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد تا رسوب دهی به طور کامل انجام شود. در نهایت لیپیدهای قطبی از استن به وسیله فیلتر کردن جدا شده و لیپیدها در مجاورت هوا خشک شدند(۱۰).

-بررسی لیپیدهای قطبی استخراج شده به لحاظ عدم وجود آلودگی DNA

بدین منظور ۳ مایکرولیتر از نمونه لیپیدهای قطبی که در مرحله قبل استخراج شده بود بر روی ژل های آگاروز ۰/۵٪، ۱/۵ ٪ و ۳٪ الکتروفورز گردید تا هرگونه آلودگی DNA با هر اندازه ای که باشد توسط اتیدیوم برماید آشکار گردد (۱۷).

-تهیه آرکئوزوم

در این مرحله از لیپیدهای قطبی استخراج شده، لیپوزوم (آرکئوزوم) تهیه می شود و هر آنتی ژنی که مد نظر باشد را می توان درون ساختار آن وارد ساخت که در این تحقیق از سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) به عنوان آنتی ژن آزمایشی استفاده گردید. بدین منظور ابتدا ۲۰ میلی گرم از لیپیدهای استخراج شده با ۱ میلی لیتر PBS (Potassium phosphate buffer, pH ۷.۱۴,) استریل فاقد پیروژن (Pyrogen-free) حاوی ۱۰ میلی گرم BSA به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ °C آبدهی گردید که در این زمان لیپوزوم ها تشکیل می شوند و در حین تشکیل شدن آنتی ژن درون آنها قرار می گیرد. همزمان با این فرآیند ۳۰ میلی گرم از لیپیدهای استخراج شده با ۱ میلی لیتر PBS استریل فاقد پیروژن (Pyrogen-free) و فاقد BSA آبدهی گردید تا متعاقباً آرکئوزوم های حاصل با آرکئوزوم های تهیه شده با PBS حاوی BSA مقایسه گردند. بعد از آبدهی و تشکیل آرکئوزوم ها، با استفاده از امواج فراصوت (ultra sound) که توسط دستگاه سونیکاتور (Hielscher, Germany) ایجاد گردید اندازه آنها کاهش یافت. در نهایت آنتی ژن هایی که درون آرکئوزوم وارد نشده اند به وسیله اولتراسانتریفیوژ در g۲۰۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه حذف شدند. رسوب حاصل دو بار با PBS استریل شستشو داده و مجدداً سانتریفیوژ انجام شد. در نهایت رسوب به دست آمده که آرکئوزوم های حاوی آنتی ژن می باشد در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.5.2]

PBS استریل فاقد پیروژن حل شدند و با عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل گردیدند(۹).

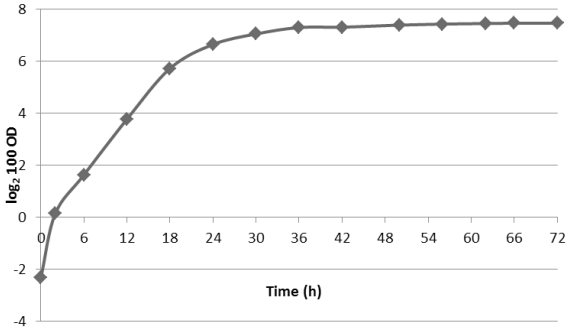
-ارزیابی آرکئوزوم های تولید شده

به منظور ارزیابی مقدار آنتی ژن وارد شده در ساختار آرکئوزوم از دو روش استفاده گردید که یکی روش سنجش غلظت پروتئین به روش Lowry (Lowry method) و دیگری سنجش غلظت پروتئین با استفاده از دستگاه Picodrop (Picodrop limited, United Kingdom) می باشد. قبل از انجام روش های سنجش پروتئین ابتدا محتویات لیپیدی موجود در نمونه (لیپوزوم) با استفاده از کلروفرم حذف گردید تا اختلالی در سنجش پروتئین ایجاد نکنند. بدین ترتیب که به ۳ میلی لیتر از نمونه های آرکئوزوم حاوی و فاقد آنتی ژن (BSA) ۳ میلی لیتر کلروفرم افزوده شد، ترکیب حاصل به شدت ورتکس گردید تا یک امولسیون ایجاد شود. سپس سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در g ۱۰۰۰ صورت گرفت و مایع رویی (Supernatant) از لایه لیپید-کلروفرم جدا شد. این مایع رویی یک بار دیگر به مدت ۳۰ دقیقه در g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی برای سنجش غلظت پروتئین جدا گردید(۲). در روش Lowry ابتدا یک منحنی استاندارد (Standard curve) با استفاده از غلظت های مشخص BSA رسم گردید سپس نمونه آرکئوزوم های حاوی و فاقد آنتی ژن به لحاظ میزان پروتئین بررسی شدند و با استفاده از منحنی استاندارد و جذب نوری در ۷۳۰ نانومتر مقدار آنتی ژن پروتئینی موجود در آنها تعیین گردید(۵). همانطور که اشاره شد از دستگاه Picodrop نیز بدین منظور استفاده شد و غلظت پروتئین موجود در ساختار آرکئوزوم های حاوی و فاقد آنتی ژن تعیین گردید. همچنین با استفاده از غلظت پروتئین نمونه و غلظت معلوم لیپید به کار رفته در ساخت آرکئوزوم ها نسبت پروتئین به لیپید در آرکئوزوم های حاوی آنتی ژن به عنوان یک شاخص میزان قرارگیری آنتی ژن در آرکئوزوم تعیین گردید. علاوه بر این نمونه آرکئوزوم های حاوی و فاقد آنتی ژن بعد از حذف لیپید با استفاده از کلروفرم با تکنیک SDS-PAGE ارزیابی شدند. بدین منظور از ژل ۱۲/۵٪ پلی اکریل آمید و سیستم الکتروفورز Biorad استفاده گردید و در پایان ژل به وسیله کوماسی بلو (Coomassie brilliant blue G-۲۵۰) رنگ آمیزی شد(۱۵).

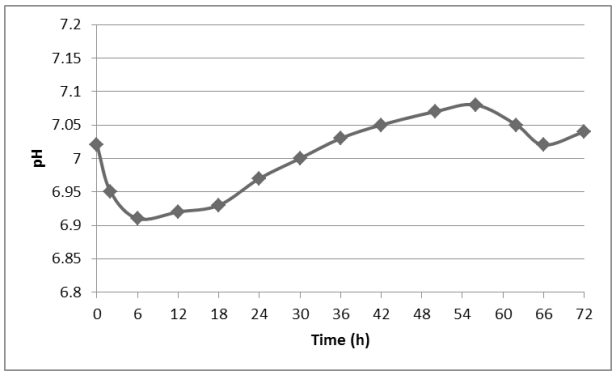
یافته ها

کشت انبوه در فرمانتور و تهیه توده سلولی

به دنبال کشت انبوه ۷۲ ساعته *Methanobrevibacter smithii*، شاخص های رشد و فرمانتاسیون که در فواصل زمانی معین مورد ارزیابی قرار گرفته بودند به دست آمدند . همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود جذب نوری محیط کشت فرمانتور همزمان با رشد میکروارگانیسم تدریجاً افزایش یافته که از ساعت ۳۶ به بعد شیب آن کند می شود. همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می شود تغییرات pH جزئی بوده و در محدوده ۷ ±۰/۱ به طور خودکار توسط سیستم کنترل pH فرمانتور حفظ شد. در پایان فرآیند کشت انبوه، ۹۳/۴ گرم توده سلولی *Methanobrevibacter smithii* به دست آمد که جهت استخراج لیپیدهای قطبی آرکیایی مورد استفاده قرار گرفت.



نمودار ۱: تغییرات log ۱۰۰ OD بر حسب زمان طی فرآیند



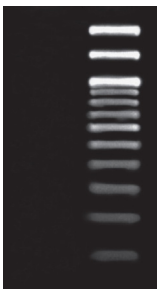
نمودار ۲: تغییرات pH بر حسب زمان طی فرآیند کشت انبوه

-استخراج لیپیدهای قطبی، تهیه و ارزیابی آرکئوزوم

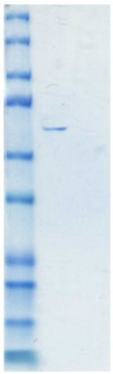
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.5.2]

همان طور که گفته شد لیپیدهای قطبی از توده سلولی با استفاده از ترکیب متانول، کلروفرم و آب و سپس رسوب دهی با الکل سرد استخراج شد به طوری که نهایتاً از ۹۳/۴ گرم توده سلولی ۱/۶۶ گرم لیپید قطبی به دست آمد. بررسی نمونه لیپیدهای قطبی به لحاظ آلودگی با DNA نشان داد که نمونه ها فاقد مقادیر قابل شناسایی DNA می باشند (شکل ۱). در بررسی غلظت آنتی ژن پروتئینی قرار گرفته درون آرکئوزوم های ساخته شده با این لیپیدها که با استفاده از دستگاه Picodrop و همچنین روش lowry صورت گرفت غلظت آنتی ژن در نمونه ای که به وسیله PBS فاقد پیروژن و حاوی BSA آبدهی شده بود معادل ۱/۴۷ mg/ml تعیین شد در حالی که در نمونه دیگر که آبدهی بدون حضور آنتی ژن پروتئینی انجام گرفته بود هیچ پروتئینی شناسایی نشد. این نتایج به وسیله تکنیک SDS-PAGE تایید شد به طوریکه در الکتروفورز نمونه آرکئوزوم حاوی آنتی ژن یک باند با وزن مولکولی معادل وزن مولکولی BSA (۶۶/۵ کیلو دالتن) مشاهده شد در حالی که در الکتروفورز نمونه آرکئوزوم فاقد آنتی ژن هیچ باندی رویت نشد (شکل ۲). همچنین نسبت پروتئین (BSA) به لیپید معادل ۷۳/۵ میکروگرم پروتئین به ۱ میلی گرم لیپید تعیین گردید.



شکل۱: عدم تشکیل باند در نمونه آرکئوزوم (ردیف ۱) الکتروفورز شده بر روی ژل آگاروز در کنار DNA ladder



شکل ۲: ژل مربوط به الکتروفورز نمونه آرکئوزوم حاوی و فاقد آنتی ژن (به ترتیب ردیف ۲و۳) در کنار مارکر پروتئین (ردیف ۱)

بحث

بخش عده ای از تحقیقات گسترده ای که در زمینه طراحی و تولید واکسن های مختلف انجام می شود در ارتباط با شناسایی و به کارگیری ترکیبات تنظیم کننده پاسخ های ایمنی (Immunomodulators) و ادجوانت ها می باشد. از جمله ترکیباتی که امروزه بر روی ویژگی های ادجوانتی آنها تحقیق می شود ترکیباتی با منشا میکروبی هستند که از جمله آنها می توان پروتئین های غشای خارجی (Outer membrane proteins)، ترکیبات غشایی و لیپیدی را نام برد(۳). از این بین امروزه آرکئوزوم ها که لیپوزوم های تولید شده از لیپیدهای آرکیایی هستند به علت ویژگی های منحصر به فردی که دارند بسیار مورد توجه قرار گرفته اند چرا که این لیپیدها از زنجیره های شاخه دار فیتانیل (Phytanl) تشکیل شده اند که کاملاً اشباع شده هستند و به وسیله پیوند اتری (Ether bond) گلیسرول اتصال دارند. به همین علت لیپوزوم های حاصل از آنها یعنی آرکئوزوم ها پایداری بالایی در مقایسه با لیپوزوم های عادی دارند که از اسیدهای چرب تشکیل شده اند که بسیاری از آنها اشباع نشده می باشند و با پیوند استری (Ester bond) به گلیسرول اتصال دارند(۱۸). در این تحقیق نیز که برای اولین بار در کشور در این زمینه صورت گرفته است تولید آرکئوزوم با استفاده از کشت انبوه *Methanobrevibacter smithii* در فرمانتور به مدت ۷۲ ساعت صورت گرفت. کمیت های سنجش شده و عوامل ارزیابی شده حین کشت انبوه نشان دهنده رشد میکروارگانیسم در شرایط بهینه رشد آن می باشد . تغییرات pH در محدوده ۶/۹۱ تا ۷/۰۸ که محدوده بهینه این آرکی می باشد کنترل گردید (نمودار ۲). دانسیته نوری همانطور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می شود در کل فرایند روندی افزایشی داشته که شیب نمودار مربوطه تا ساعت ۳۶ نشان دهنده مرحله رشد صعودی میکروارگانیسم (Exponential phase) می باشد. از ساعت ۳۶ تا پایان فرایند اگرچه شیب منحنی رشد کاهش یافته است اما همچنان مقدار دانسیته نوری رو به افزایش بوده است که به منزله عدم ورود میکروارگانیسم به مرحله سکون (Stationary

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.5.2]

phase) می باشد. به عبارت دیگر فرایند کشت انبوه زمانی پایان می پذیرد که میکروارگانیسم در پایان مرحله رشد صعودی قرار دارد و به همین علت بازده فرایند در حالت حداکثر بوده و ۹۳/۴ گرم توده سلولی *Methanobrevibacter smithii* در پایان به دست آمد. در مرحله بعد استخراج لیپیدهای قطبی از توده سلولی صورت گرفت و ۱/۶۶ گرم لیپید که فاقد ناخالصی DNA بود حاصل گردید به طوری که الکتروفورز نمونه بر روی ژل آگاروز و متعاقباً رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید هیچ باندی را آشکار نساخت در حالی که نمونه مارکر DNA که در کنار نمونه لیپیدهای استخراج شده بر روی همان ژل و در چاهک (well) مجاور قرار داده شده و الکتروفورز شده بود به خوبی با تمامی باندهای مجزا بر روی ژل مشخص گردید (شکل ۱). ارزیابی آرکئوزوم های تولید شده که حاصل از آبدهی لیپیدهای قطبی استخراج شده در مجاورت BSA (آنتی ژن) بود در مقایسه با آرکئوزوم های حاصل از آبدهی با بافر فاقد BSA نشان داد که آنتی ژن به خوبی درون آرکئوزوم های ساخته شده قرار گرفته است به طوری که بعد از حذف لیپید از هر دو نمونه آرکئوزوم های ساخته شده به وسیله کلروفرم، غلظت پروتئین هر دو نمونه سنجیده شد که در نمونه آرکئوزوم حاوی آنتی ژن معادل mg/ ۱/ml۴۷ تعیین گردید در حالی که در نمونه فاقد آنتی ژن هیچ پروتئینی شناسایی نشد. وجود غلظت قابل توجهی پروتئین در نمونه آرکئوزوم حاوی آنتی ژن و عدم وجود پروتئین در نمونه آرکئوزوم آبدهی شده با بافر فاقد آنتی ژن نه تنها نشان دهنده صحت فرایند ساخت آرکئوزوم می باشد بلکه نشان دهنده عدم آلودگی پروتئینی این آرکئوزوم ها نیز می باشد زیرا بعد از حذف لیپید از آرکئوزوم های فاقد آنتی ژن اگر این آرکئوزوم ها حاوی ناخالصی پروتئینی بودند هنگام سنجش غلظت پروتئین، این آلودگی مشخص می شد. این مطلب همچنین به وسیله الکتروفورز نمونه های آرکئوزوم بر روی ژل پلی اکریل آمید بعد از حذف لیپید توسط کلروفرم تایید گردید به این ترتیب که این دو نمونه آرکئوزوم در کنار مارکر پروتئین الکتروفورز شدند و بعد از رنگ آمیزی با کوماسی بلو بریلیانت در نمونه حاوی آنتی ژن فقط یک باند مشاهده شد که وزن مولکولی آن تاییدکننده وجود BSA یعنی آنتی ژن به کار رفته در تهیه آرکئوزوم حاوی آنتی ژن بود (شکل ۲). همچنین عدم نمایان شدن باند دیگری غیر از باند مربوط به BSA تاییدکننده عدم وجود آلودگی پروتئینی در نمونه آرکئوزوم می باشد. نسبت پروتئین به لیپید در آرکئوزوم های حاوی آنتی ژن، معادل ۷۳/۵ میکروگرم پروتئین به ۱ میلی گرم لیپید بود که نسبتی مناسب در تهیه لیپوزوم های حاوی آنتی ژن می باشد. با در نظر داشتن این مطلب که هر آنتی ژن پروتئینی مورد نظر را می توان در فرایند تولیدآرکئوزوم هنگام آبدهی لیپیدهای قطبی درون این لیپوزوم ها قرار داد می توان از لیپیدهای قطبی به دست آمده در این تحقیق در مطالعات بسیار گسترده ای از جمله طراحی و ارزیابی کاندیدهای واکسن های مختلف بهره برد(۱۴). ویژگی های بالقوه ادجوانتی آرکئوزوم ها می تواند به دلایل و با مکانیسم های عمل مختلف تایید و توجیه گردد. قرار گرفتن آنتی ژن درون ساختار آرکئوزوم می تواند در تشدید پاسخ های ایمنی اختصاصی به واسطه ایجاد اثر انباشتگی آنتی ژن (antigen depot effect) بسیار موثر باشد. قرار گرفتنن آنتی ژن درون لیپوزوم باعث تشدید پاسخ های ایمنی سلولی (Cell-mediated immunity) نیز می گردد زیرا انتقال همزمان آنتی ژن و لیپوزوم به یک سلول عرضه کننده آنتی ژن (APC:Antigen presenting cell) باعث می شود که سیگنال های تحریکی و آنتی ژن هر دو به یک APC برسند در نتیجه عرضه آنتی ژن با کارایی بالا به لنفوسیت های T صورت بگیرد و باعث ایجاد پاسخ های سلولی مناسب گردد(۱۳). این ویژگی در طراحی واکسن هایی مانند واکسن ایدز و در کل عفونت هایی که پاسخ های ایمنی محافظت کننده در آنها از نوع سلولی می باشند می تواند بسیار موثر باشد(۱۲). علاوه بر این پایداری ساختمانی بالای آرکئوزوم ها به علت ماهیت لیپیدهای قطبی آرکیایی در مقایسه با لیپوزوم های عادی احتمال کاربرد موفقیت آمیز آنها را در مطالعات واکسن افزایش می دهد. در مجموع آنچه از نتایج حاصل از این تحقیق برمی آید نشان دهنده موفقیت آمیز بودن کل فرایند از کشت انبوه *Methanobrevibacter smithii* تا استخراج لیپیدهای قطبی آرکیایی و تولید آرکئوزوم حاوی آنتی ژن می باشد که می تواند در مطالعات آینده در زمینه تحقیقات واکسن به کار گرفته شود.

سپاسگزاری: از پرسنل محترم بخش های هپاتیت و ایدز و واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.5.2]

ایران قدردانی و تشکر می گردد. لازم به ذکر است که هزینه
های این تحقیق از محل اعتبار طرح پژوهشی مصوب انستیتو
پاستور ایران به شماره ۵۷۳ تامین شده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.5.2]

منابع

۱: Breznak J A and Costilow R N. Physicochemical factors in growth, Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington,1994;137-154.
۲: Christie WW and Han X. Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis,1, Bridgwater, U.K. Oily Press,2010,563.
۳: Conlan JW, Krishnan L, Patel GB and Sprott GD. Immunization of mice with lipopeptide antigens encapsulated in specialized liposomes prepared from the total polar lipids of various archaeobacteria elicits rapid prolonged protective immunity against the facultative intracellular pathogen Listeria monocytogenes, Vaccine,2001;19: 3509–3517.
۴: Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. Memory T cells and vaccines. Vaccine, 2003; 21(5-6): 419-30.
۵: Everette JD, Bryant QM, Green AM, Yvonne A, Wangila GW, Walker RB. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin−Ciocalteu Reagent. J. Agric. Food Chem.2010;58 (14): 8139-48.
۶: Gurnani K, Kennedy J, Sad S, Sprott GD and Krishnan L. Phosphatidylserine Receptor-Mediated Recognition of Archaeosome Adjuvant Promotes Endocytosis and MHC Class I Cross-Presentation of the Entrapped Antigen by Phagosome-to-Cytosol Transport and Classical processing. J Immunol,2004;173: 566-578.
۷: Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. Immunol Rev,2006; 211:214-24.
۸: Krishnan L, Dicaire CJ, Patel GB and Sprott GD. Archaeosome Vaccine Adjuvants Induce Strong Humoral, Cell-Mediated and Memory Responses: Comparison to Conventional Liposomes and Alum. Infect & Immun,2000;54-63.
۹: krishnan L, Gurnani K, Dicaire CJ, Van Faassen H, Zafer A, Kirschning CJ, Sad S and Sprott GD. Rapid Clonal Expansion and Prolonged Maintenance of Memory $CD8^+$ T Cells of the Effector (CD44 highCD62Llow) and Central (CD44 highCD62Lhigh) Phenotype by an Archaeosome Adjuvant Independent of TLR2. J Immunol,2007;178,2396-2406.
۱۰: Krishnan L, Sad S, Patel GB and Sprott GD. The potent adjuvant activity of archaeosomes correlates to the recruitment and activation of macrophages and dendritic cells in vivo. J. Immunol,2001;166:188.
۱۱: Krishnan L, Sprott GD. Archaeosome adjuvants: Immunological capabilities and mechanisms of action.Vaccine, 2008; 26: 2043-2055.
۱۲: McMichael AJ and Rowland-Jones SL.Cellular immune responses to HIV.Nature, 2001;410:980-987.
۱۳: Mosmann TR Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today,1996; 17(3):138-46.
۱۴: Patel GB, Zhou H, KuoLee R, Chen W. Archaeosomes as adjuvants for combination vaccines. J Liposome Res, 2004;14(3-4):191-202.
۱۵: Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun,1967;28(5): 815–820.
۱۶: Sharifat Salmani A, Siadat SD, Norouzian D, Izadi Mobarakeh J, Kheirandish M, Zangeneh M, Aghasadeghi MR, Nejati M, Hedayati MH, Moshiri A, Sadat SM. Outer membrane vesicle of Neisseria meningitidis serogroup B as an adjuvant to induce specific antibody response against the lipopolysaccharide of Brucella abortus S99. Ann of Microbiol, 2009; 59(1): 145-149.
۱۷: Smisek D L, Hoagland DA. Agarose gel electrophoresis of high molecular weight, synthetic polyelectrolytes. Macromolecules,1989; 22(5): 2270.
۱۸: Sprott GD, Sad S, Fleming LP, Dicaire CJ, Patel GB and Krishnan L. Archaeosomes varying in lipid composition differ in receptor-mediated endocytosis and differentially adjuvant immune responses to entrapped antigen. Archaea,2003;1:151–164.
۱۹: Wolfe RS. Microbial formation of methane. Adv. Microb. Physiol,1971;6: 107-146.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.5.2]