مقایسه دو روش خالص‌سازی بتا توکسین *کلستریدیوم پرفرنژنس* تیپ B

راضیه جعفری خوشن‌آبادی[۱]، محسن فتحی نجفی*[۲]، محمد مومن هروی[۱]، محمدرضا بزرگمهر[۱]

۱- گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۲- گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. و مؤسسه تحقیقات واکسن وسرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۲۶ فروردین ۱۴۰۱، بازنگری: ۲ اردیبهشت ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۳ اردیبهشت ۱۴۰۱

چکیده

کلستریدیوم پرفرنژنس یک باکتری بی‌هوازی است که از بین سویه‌های آن فقط تیپ B و C می‌توانند بتا توکسین را تولید کنند. بتا توکسین نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌های انسان و حیوان دارد و تأثیر مهلکی بر روده می‌گذارد. مطالعه‌ی حاضر با هدف مقایسه دو روش خالص‌سازی برای استخراج بتا توکسین از *کلستریدیوم پرفرنژنس* تیپ B انجام شد. به‌عنوان روش اول، بتا توکسین با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی ستونی (سفادکس G-25) و کروماتوگرافی تعویض یونی خالص‌سازی شد، در حالی که در روش دوم از کروماتوگرافی افینیتی استفاده شد. فعالیت همولیزی و مقدار پروتئین در هر مرحله از خالص‌سازی اندازه‌گیری شد. خلوص بتا توکسین در هر مرحله با استفاده از الکتروفورز (SDS-PAGE) بررسی شد. با توجه به نتایج مقایسه این دو روش نشان داد که بازده روش اول ۸۲/۸ درصد و بازده روش دوم ۹۰/۱ درصد بود. مقادیر فعالیت ویژه برای روش اول و دوم به‌ترتیب ۲۳۶۸/۱ U/mg و ۱۶۴/۵ U/mg محاسبه شد. نتایج ما نشان می‌دهد که کروماتوگرافی افینیتی می‌تواند برای خالص‌سازی بتا توکسین از *کلستریدیوم پرفرنژنس* تیپ B با خلوص بالا و نسبت فعالیت به پروتئین (۴۳۷۰ HU/mg) استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: *کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ B، بتا توکسین، کروماتوگرافی تعویض یونی، کروماتوگرافی افینیتی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: najafi99@yahoo.com

مقدمه

کلستریدیوم پرفرنژنس باکتری گرم‌مثبت، میله‌ای شکل و غیرمتحرک است که قادر به تشکیل اسپورهای مقاوم در برابر عوامل زیست محیطی است (۱، ۲) . سویه‌های پرفرنژنس چهار سم عمده به نام‌های آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا که دارای فعالیت کشنده و نکروز هستند را دارد که به پنج گروه ایزوتایپ (A, B, C, D, E) تقسیم می‌شوند (۳). نوع مورد مطالعه در این تحقیق بتا توکسین می‌باشد که فقط توسط تیپ B و C تولید می‌شود (۴). بتا توکسین به‌عنوان یک عامل اصلی نکروز کننده آنتروکولیت و آنتروتوکسمی در انسان و حیوان شناخته شده است بنابراین برای بالا بردن کیفیت واکسن آنتروتوکسمی، خالص‌سازی مناسب بتا توکسین بسیار اهمیت دارد (۵).

روش‌های مختلفی به‌منظور خالص‌سازی پروتئین‌ها وجود دارد از جمله این روش‌ها می‌توان روش‌های مدرن و کلاسیک خالص‌سازی نظیر رسوب‌گیری با نمک آمونیوم سولفات، حلال‌های آلی، الکتروفورز، ژل فیلتراسیون و انواع کروماتوگرافی و... را نام برد (۶). اغلب فرایندهای کروماتوگرافی ترجیح داده می شوند، و از آنها می‌توان به‌طور اختصاصی برای اتصال و دفع پروتئین با خلوص بالا استفاده کرد (۷). به همین منظور روش‌های مختلف کروماتوگرافی توسعه یافته‌اند که شامل کروماتوگرافی ستونی، کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی کاغذی، کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی نفوذ ژل، کروماتوگرافی با فشار بالا و کروماتوگرافی افینیتی می‌باشد (۸). اولویت‌های صنعتی برای استفاده از روش‌های کروماتوگرافی، ستون‌های با جریان بالا است که در طول تعادل و شستشو نمونه حفظ شود (۹). مبنای کروماتوگرافی جذب سطحی میل ترکیبی فاز ساکن کروماتوگرافی است (۱۰). کروماتوگرافی تعویض یونی یک تکنیک تاریخی است که به‌طور گسترده برای خالص‌سازی پروتئین‌های درمانی استفاده می‌شود (۱۱). به این صورت که پروتئین‌ها را بر اساس اختلاف در بار سطح مولکول‌ها از هم جدا می‌کند (۱۲). در سال ۲۰۱۲ Adalgisa Milach و همکارانش بتا توکسین *کلستریدیوم پرفرنژنس* تیپ C تولید شده در Escherichia coli را با استفاده از روش کروماتوگرافی جذب سطحی خالص کردند (۱۳). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۶ انجام شد پروتئین بتا نوترکیب از *کلستریدیوم پرفرنژنس* تیپ B نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA استخراج شد (۱۴). صیادمنش و همکارانش در سال ۲۰۱۳، با کمک روش کروماتوگرافی تمایلی (ستون نیکل) موفق به خالص‌سازی نروتوکسین بتولنیوم از *کلستریدیوم بوتلنیوم* شدند (۱۵). در سال ۲۰۱۴ زائر زاده و همکارانش، با تلفیق چهار روش غلیظ‌سازی با آمونیوم سولفات، کاتیون کروماتوگرافی (CM)، آنیون کروماتوگرافی (DEAE)و در نهایت با ژل فیلتراسیون (G-100) بتا توکسین را از *کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ C خالص‌سازی کردند. در سال ۲۰۱۱ فتحی نجفی، در پروژه‌ای با کمک رسوب‌دهی با PEGو سپس با استفاده از کروماتوگراف ستونی آلفا توکسین را از باکتری *کلستریدیوم نووی* خالص‌سازی کرد (۱۶). در سال ۲۰۱۱ جانسون اریک و همکارانش با بهره‌گیری از روش کروماتوگرافی یونی موفق به خالص‌سازی نوروتوکسین BoNT/A3 از *کلستریدیوم بوتلنیوم* شدند (۱۷). در این مطالعه، کروماتوگرافی روش کروماتوگرافی افینیتی با روش تلفیقی (رسوب‌دهی آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی تعویض یونی) برای خالص‌سازی بتا توکسین مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و رشد: *کلستریدیوم*

پرفرنژنس تیپ B از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد، ایران تهیه شد. این باکتری در محیط کشت عصاره کبد به مدت ۱۶ ساعت رشد داده شد. سپس در محیط پپتون پروتئوز برای تولید سم قرار گرفت. پس از انکوباسیون به مدت ۶-۵ ساعت در شرایط بی‌هوازی، کشت سانتریفوژ شد و مایع رویی برای مراحل خالص‌سازی استفاده شد. فعالیت همولیزی و غلظت پروتئین در تمام مراحل اندازه‌گیری شد. سپس مایع رویی کشت به دو قسمت تقسیم شد تا در دو روش خالص‌سازی استفاده شود.

تست همولایزین: یک میلی‌لیتر خون با دور (۲۰۰۰rpm) به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب (گلبول قرمز) با دو برابر حجم اولیه توسط بافرPBS شستشو داده شد و برای ادامه آزمایش به آن ۱۰ برابر بافرPBS اضافه گردید.

۰/۲ میلی‌لیتر نمونه را با ۱ میلی‌لیتر RBC به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور قرار دادیم و سپس با دور ۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ انجام شد و جذب محلول رویی در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

کنترل مثبت واکنش: ۰/۲ میلی‌لیتر بافر PBS را با ۱ میلی‌لیتر RBC به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و رسوب حاصل با ۱/۲ میلی‌لیتر آب مخلوط و جذب در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

کنترل منفی واکنش: ۰/۲ میلی‌لیتر PBS را با ۱ میلی‌لیتر RBC به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و با دور ۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی را در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری کردیم. سپس فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$\%\text{همولیز} = \frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل مثبت}} \times 100$$

محاسبه درصد همولیز :

فعالیت همولیزین: مقدار آنزیمی که قادر است ۱ درصد لیز سلولی RBC در واحد زمان و حجم ایجاد نماید:

$$\text{همولیزین} = \frac{\text{ضریب رقت} \times \text{درصد همولیز}}{\text{زمان}}$$

سنجش مقدار پروتئین: غلظت پروتئین با روش برادفورد اندازه‌گیری شد که در آن از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد استفاده شد. در این روش ۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی برلیانت بلو G-250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد (وزنی/حجمی) به مخلوط اضافه شد. هنگامی که رنگ به‌طور کامل حل شد، حجم مخلوط به ۱ لیتر تنظیم شد. پس از آن، نمودار استاندارد در برابر غلظت‌های مختلف (BSA۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ترسیم شد. در نهایت ۲۵ میکرولیتر از نمونه به ۱۲۵ میکرولیتر از محلول برادفورد اضافه شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. میزان پروتئین هر نمونه با استفاده از شیب خط نمودار استاندارد محاسبه شد.

خالص سازی بتا توکسین روش اول: روش اول برای خالص‌سازی بتا توکسین در سه مرحله، یعنی رسوب‌دهی آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد (مراحل در زیر توضیح داده شده است). پس از هر مرحله، مقدار پروتئین و فعالیت آن با توجه به روش‌هایی که در بخش‌های قبل توضیح داده شد، تعیین شد. علاوه بر این، حضور بتا توکسین در هر مرحله با استفاده از الکتروفورز (SDS-PAGE) بررسی شد.

رسوب آمونیوم سولفات: آمونیوم سولفات جامد (تا ۷۰ درصد اشباع) به مایع رویی کشت در حمام آب سرد اضافه شد و سپس با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌طور مداوم همزده شد. مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای رسوب بهتر پروتئین مورد نظر نگهداری شد. سپس با سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور در دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه) پروتئین رسوب شده. با حل کردن مخلوط حاصل در بافر تریس (۲۰ میلی‌مولار، pH ۷,۰) جمع‌آوری شد.

کروماتوگرافی ستونی: بتا توکسین به‌دست آمده از مرحله قبل بر روی ستون Sephadex G-25 (۱۳۵×۱/۲ سانتی‌متر)، از قبل متعادل‌شده با بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار (PH= ۷) با سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر بر ساعت بارگذاری شد. نمونه‌هایی با حجم ۳ میلی‌لیتر جمع‌آوری شدند و آنهایی که دارای فعالیت همولیزی بالا بودند، ادغام شدند و برای کروماتوگرافی تبادل یونی استفاده شدند.

کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE سفادکس: ستون کروماتوگرافی تعویض یونی با ابعاد (۱۰cm × ۲) در دمای اتاق بارگذاری شد. ابتدا رزین DEAE سفادکس اضافه شد و بعد برای به تعادل رساندن PH و مولاریته ستون با بافر تریس ۱۰۰mM، PH=۷ شسته شد تا زمانی که میزان PH ورودی و خروجی ستون یکسان شد. سپس ستون از بافر کاملاً خالی شد و جریان خروجی ستون بسته شد و ۱ml نمونه فعال به‌دست آمده از مرحله قبل وارد ستون شد و بعد از گذشت یک ساعت خروجی ستون باز شد و محلول خروجی جمع‌آوری شد. در مرحله بعد ستون DEAE سفادکس با ۲۰ml بافر تریس (PH=۷، ۱۰۰mM) شسته شد و سپس با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول NacL(۱۰۰۰mM، ۸۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰) شسته شد. نمونه‌های شسته شده جمع‌آوری و میزان فعالیت و مقدار پروتئین آنها سنجیده شده و در نهایت حضور بتا توکسین و میزان خلوص آن با استفاده از ژل الکتروفورز ۱۲/۵٪ تأیید شد.

روش دوم خالص سازی: در روش دوم خالص‌سازی محلول رویی سانتریفوژ شده پس از پروتئین سنجی و تعیین میزان فعالیت با استفاده از روش کروماتوگرافی افینیتی خالص‌سازی شد و در انتها نیز میزان فعالیت و مقدار پروتئین تعیین گردید و همچنین بتا توکسین با استفاده از ژل الکتروفورز ۱۲/۵ درصد ردیابی شد.

کروماتوگرافی افینیتی: پس از تعیین فاز ساکن (ما از لسیتین به‌عنوان فاز ساکن استفاده کردیم) آن را با بافر تریس ۷ =PH به تعادل رساندیم و سپس ۲۵ میلی‌لیتر محلول رویی سانتریفوژ شده که حاوی پروتئین کلستریدیوم پرفرژنس نوع B اضافه کردیم برای انجام عمل اتصال پروتئین مورد نظر بر روی لیگاند (لسیتین) به مدت ۱۵ دقیقه آن را در حمام آب سرد قرار دادیم. سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای خارج ساختن کامل ناخالصی‌ها عمل شستشو با ۲۵ میلی‌لیتر بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار ۷ =PH در حمام آب سرد و سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دو بار انجام شد .در مرحله آخر برای جداسازی پروتئین هدف از فاز ساکن (لیسیتین) به آن ۵ میلی‌لیتر بافر با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس با دورrpm ۱۲۰۰۰ و زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید این عمل نیز دو بار تکرار شد.

الکتروفورز (SDS PAGE): برای ارزیابی کیفی و بررسی مراحل خالص‌سازی، نمونه‌های هر مرحله توسط الکتروفورز بررسی شد. ابتدا از ژل پلی اکریل آمید ۱۲/۵ درصد SDS-PAGE و سپس رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

نتایج

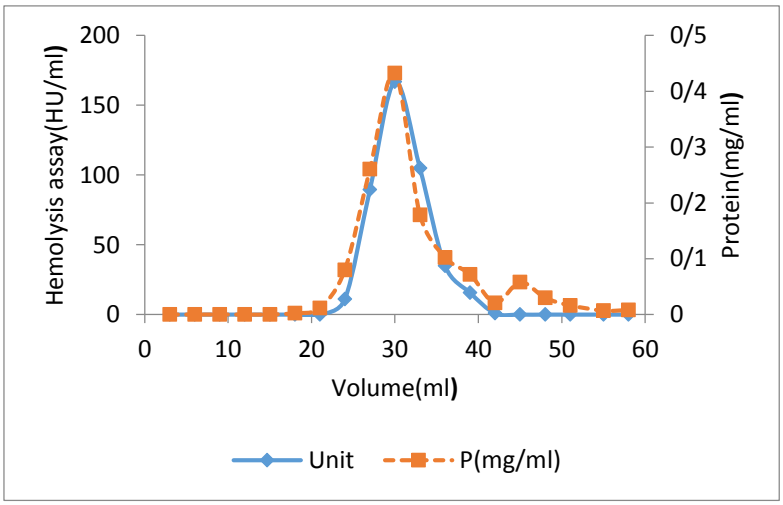
میکروارگانیسم و رشد: با توجه به نتایج SDS-PAGE و سنجش سمیت سلولی، بتا توکسین در مراحل اولیه رشد باکتری تشخیص داده شد. سنجش سمیت سلولی نشان داد که بتا توکسین ماندگاری پایینی دارد و نگهداری طولانی مدت نقش مهمی در غیر فعال کردن بتا توکسین دارد.

خالص‌سازی بتا توکسین: مقایسه خواص مختلف فیزیکی و شیمیایی بین دو روش به کار برده شده خالص‌سازی بتا توکسین با دو روش مختلف انجام شد و شرایط خالص‌سازی در جدول ۱ خلاصه و مقایسه شد.

جدول۱- شرایط خالص‌سازی بتا توکسین

مراحل	حجم(ml)	PH	زمان(h)	دما(C^0)
سفادکس $G-25_5$	۱	۶	۳/۵	۲۵
سفادکس-DEAE	۳	۶	۲	۲۵
کروماتوگرافی جذب سطحی	۲۰	۷	۱	۴

روش اول خالص‌سازی (کروماتوگرافی ترکیبی): بتا توکسین توسط آمونیوم سولفات و سپس کروماتوگرافی ستونی (سفادکس G-25) برای نمک‌زدایی و حذف پروتئین‌های با وزن مولکولی کم خالص شد (شکل ۱).



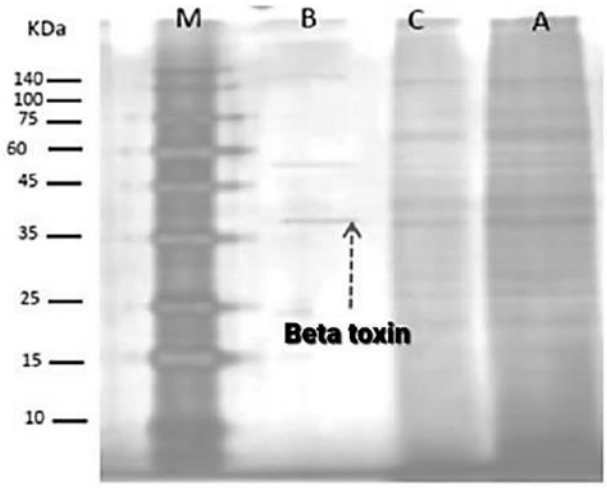
شکل۱- خالص‌سازی بتا توکسین با کروماتوگرافی ستون ژل(سفادکس G-25).

کروماتوگرافی تبادل یونی (DEAE سفادکس) برای حذف برخی پروتئین‌های دیگر و تعیین فعالیت

خاص استفاده شد. در نهایت، بتا توکسین همگن با فعالیت ویژه 2370U/mg، و ضریب خالص‌سازی ۱۴/۳ برابر خالص‌سازی و بازده ۸۲/۸ درصد خالص‌سازی شد. نتایج خالص‌سازی در جدول ۲ خلاصه شده است. پروتئین‌های خالص شده در هر مرحله با استفاده از SDS-PAGE آنالیز شدند (شکل ۲).

جدول ۲- مراحل خالص‌سازی کلستریدیوم پرفرژنس تیپ B (روش اول)

مرحله	پروتئین کل(mg)	فعالیت کل (U)	نسبت فعالیت به پروتئین(U/mg)	ضریب خالص سازی	بازده٪
کشت	۵۶۰	92100	۱۶۴/۵	۱	۱۰۰
آمونیوم سولفات	۴۸۸	۹۱۴۷۰	۱۸۷/۴	۱/۱	۹۹/۳
کروماتوگرافی ستونی	۱۰۹	89340	۸۱۹/۷	۴/۹	۹۷/۷
کروماتوگرافی تعویض یونی	۳۲	75780	۲۳۶۸/۱	۱۴/۳	۸۲/۸



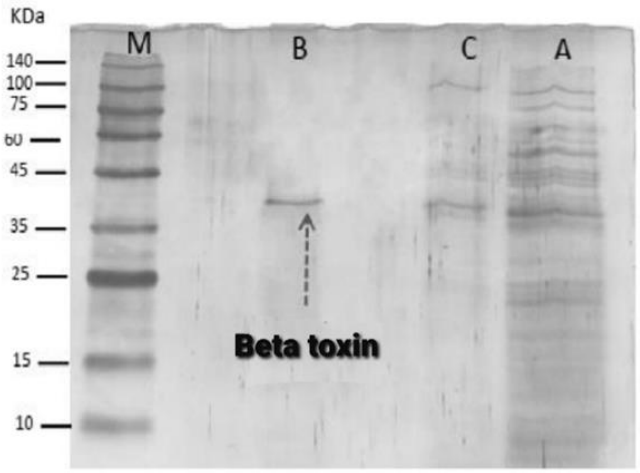
شکل ۲- تجزیه و تحلیل ژل الکتروفورز مراحل خالص‌سازی بتا توکسین. A: نمونه رسوب آمونیوم سولفات. C: نمونه خروجی از کروماتوگرافی ستون G-25. B: نمونه خروجی از کروماتوگرافی تعویض یونی. M: مارکر

روش دوم خالص‌سازی (کروماتوگرافی جذب سطحی): بتا توکسین با استفاده از کروماتوگرافی جذب سطحی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با اتصال بتا توکسین به لسیتین به‌عنوان یک سوبسترا خالص شد. در این روش ناخالصی‌ها حذف و بتا توکسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از بستر جدا شد. در نهایت، بتا توکسین همگن با فعالیت ویژه 4372U/mg، و ۲۶/۵ برابر خالص‌سازی و بازده ۹۰/۱ درصد خالص‌سازی شد. بتا توکسین به‌صورت یک نوار در SDS PAGE ظاهر شد (شکل

۳). همان‌طور که در SDS-PAGE نشان داده شده است، بتا توکسین استخراج شده از کلستریدیوم پرفرژنس نوع B در کروماتوگرافی جذب سطحی یک مرحله‌ای به خلوص بالا رسیده است.

جدول ۲- خالص‌سازی *کلستریدیوم پرفرزنس* تیپ B

مرحله	پروتئین کل (mg)	فعالیت کل (U)	نسبت فعالیت به پروتئین (U/mg)	ضریب خالص‌سازی	بازده٪
کشت	۵۶۰	92100	۱۶۴/۵	۱	۱۰۰
کروماتوگرافی جذب سطحی	۱۹	83050	۴۳۷۱/۵	۲۶/۵	۹۰/۱



شکل۳- تجزیه و تحلیل دو روش خالص‌سازی.A: سوپر ناتانت بتا توکسین.C: نمونه خروجی کروماتوگرافی تعویض یونی.B: نمونه خروجی کروماتوگرافی جذب سطحی.M: مارکر

بحث

باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* به‌طور گسترده در خاک و محیط وجود دارد، و به‌عنوان جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و در حیوانات خونگرم نیز مشاهده می‌شود. *کلستریدیوم پرفرنژنس* تحت شرایط خاصی می‌تواند به‌عنوان یک پاتوژن عمل نماید (۱۸). بتاتوکسین *کلستریدیوم پرفرنژنس* تیپ B یکی از علت‌های عمده بیماری روده در کشورهای توسعه یافته است (۱۹). به نظر می‌رسد واکسیناسیون مؤثرترین روش برای کنترل کلستریدیوز روده است (۲۰). به‌منظور سنجش ایمنی‌زایی واکسن و نیز سایر مطالعات مانند الایزا که دارای دقت بالایی می‌باشند، در اختیار داشتن توکسین خالص بسیار اهمیت دارد. به همین دلایل انتخاب روش خالص‌سازی مناسب بسیار اهمیت دارد. اگر چه بتا توکسین چند بار با موفقیت خالص شده است (۲۱)، اما برخی از تلاش‌ها برای خالص‌سازی به خلوص بالا نرسیده است (۲۲). در این مطالعه برای اولین بار، ترکیب دو روش کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی تعویض یون برای تخلیص بتا توکسین استفاده گردید و نتایج حاصل با روش کروماتوگرافی افینیتی نسبت به

فاکتورهایی مانند سرعت بالاتر، هزینه کمتر و سادگی نسبت به سایر مطالعات مقایسه گردید. و در کنار این فاکتورها مهم‌ترین فاکتور که فعالیت توکسین می‌باشد مورد توجه قرار گرفت.

نتایج حاصل از روش اول این پژوهش (ابتدا ستون کروماتوگرافی سفادکسG-25 و سپس کروماتوگرافی تعویض یونی) در شرایط PH=7 و دمای محیط (۲۵درجه سانتی‌گراد) برای بتا توکسین *کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ B نسبت فعالیت به مقدار پروتئینU/mg ۲۳۶۸/۱ نشان داد. این در حالی است که در روش دوم خالص‌سازی (کروماتوگرافی افینیتی) با یک مرحله خالص‌سازی این کمیت برابر با ۴۳۷۱/۵U/mg به دست آمد.

بتا توکسین *کلستریدیوم پرفرنژنس* نوع C توسط Sakurai و همکارانش با انجام متناوب چهار روش خالص‌سازی (اضافه کردن آمونیوم سولفات، ژل فیلتراسیون با سفادکس G -100، isoelectrofocusing در محدوده ۳ تا ۶ =PH و سپس کروماتوگرافی immunoaffinity خالص شد، نتایج حاصل از پژوهش Sakurai بیانگر این بود که پروتئین مورد بررسی آنها نهایت به خلوص ۸۰ درصد رسید (۲۳). در مطالعه حاضر با استفاده از کروماتوگرافی ستون سفادکس G-25 بتا توکسین به خلوص حدود ۳۰ درصد رسید و بعد از آن با انجام متناوب کروماتوگرافی تعویض یونی خلوص بتا توکسین به حدود ۷۰ درصد رسید. اما با استفاده از کروماتوگرافی افینیتی در یک مرحله خلوص توکسین به بیش از ۹۰ درصد رسید که نشان دهنده‌ی کارایی و سرعت بالای این روش می‌باشد. در مقایسه‌ای که در سال ۲۰۰۴ در آزمایشگاه ایمونوپاتولوژی Keizo-Asam انجام شد روش کروماتوگرافی ایمنی (immunoaffinity chromatography) با درصد بازده ۲۴ درصد به‌عنوان روش برتر برای خالص‌سازی بتا توکسین معرفی شد (۲۴). در حالی که روش کروماتوگرافی افینیتی انجام شده در این مطالعه درصد بازده ۹۰/۱ درصد را نشان می‌دهد. Bharti و همکاران در سال ۲۰۱۴ بتا توکسین را ابتدا با رسوب‌دهی آمونیوم سولفات و سپس با استفاده از ستون فسفات سلولز خالص کردند (۲۱). البته روش کروماتوگرافی افینیتی انجام شده در مطالعه حاضر در مقایسه با روش Bharti دو مزیت عمده دارد که شامل هزینه کمتر و مراحل کمتر روش مورد استفاده و قابلیت تولید بیشتر توکسین در مقیاس صنعتی می‌باشد. از آن جایی که در خالص‌سازی حجم نمونه بسیار اهمیت دارد مطابق با جدول (۱) در روش کروماتوگرافی ستونی حجم نمونه مورد استفاده در یک مرحله خالص‌سازی ۱ml می‌باشد و در کروماتوگرافی تعویض یونی حجم نمونه سه برابر کروماتوگرافی ستونی می‌باشد، اما در روش کروماتوگرافی افینیتی حجم نمونه در یک مرحله ۲۰ml می‌باشد که خود نشان‌دهنده کارایی این روش در حجم زیاد و مقادیر صنعتی می‌باشد. همچنین روش کروماتوگرافی افینیتی از نظر دسترسی به مواد و هزینه انجام شده مقرون به صرفه می‌باشد. از دیگر پارامترهای مهم در خالص‌سازی مدت زمانی است که برای خالص‌سازی یک نمونه مورد نیاز است که مطابق با جدول (۱) مدت زمان خالص‌سازی در روش کروماتوگرافی جذب سطحی حدود یک سوم کروماتوگرافی ستونی و یک دوم کروماتوگرافی تعویض یونی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

کروماتوگرافی افینیتی یک روش مقرون به صرفه و کارآمد برای خالص‌سازی بتا توکسین تولید شده توسط *کلستریدیوم پرفرنژنس* تیپ B از نظر خلوص بالا، زمان کمتر مورد نیاز برای خالص‌سازی و حجم تولید زیاد در مقایسه با روش‌های دیگر است.

سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد بابت تأمین منابع بیولوژیکی برای این مطالعه و کمک‌های فنی و آزمایشگاهی آنها کمال تشکر را داریم.

References

1- Milach A, de los Santos JRG, Turnes CG, Moreira AN, de Assis RA, Salvarani FM, *et al.* Production and characterization of Clostridium perfringens recombinant β toxoid. *Anaerobe*. 2012; 18(3): 363-5.

2- Juneja VK, Marks H, Thippareddi HH. Predictive model for growth of Clostridium perfringens during cooling of cooked ground pork. *Innovative food science & emerging technologies*. 2010; 11(1): 146-54.

3- Sakurai J, Nagahama M. Clostridium perfringens beta-toxin: characterization and action. *Toxin Reviews*. 2006; 25(1): 89-108.

4- Bakhshi F, Langroudi RP, Eimani BG. Enhanced expression of recombinant beta toxin of Clostridium perfringens type B using a commercially available Escherichia coli strain. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2016; 83(1): 1-4.

5- Zayerzadeh E, Fardipour A, Jabbari A. A New Purification Method for Beta-Toxin of Clostridium perfringens Type C Vaccinal Strain. *Journal of Medical Bacteriology*. 2014; 3(3-4): 8-13.

6- Cavalcanti MTH, Porto T, Porto ALF, Brandi IV, Lima Filho JLd, Pessoa Junior A. Large scale purification of Clostridium perfringens toxins: a review. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas*. 2004; 40(2): 151-64.

7- Xiong N, Yu R, Chen T, Xue Y-P, Liu Z-Q, Zheng Y-G. Separation and purification of l-methionine from E. coli fermentation broth by macroporous resin chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2019; 1110: 108-15.

8- Coskun O. Separation techniques: chromatography. Northern clinics of Istanbul. 2016;3(2):156.

9- Gagnon P. Technology trends in antibody purification .*Journal of chromatography A*. 2012; 1221: 57-70.

10- Zhao X, Li G, Liang S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *Journal of analytical methods in chemistry*. 2013; 2013.

11- Fekete S, Beck A, Veuthey J-L, Guillarme D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015; 113: 43-55.

12- Schmidt M, Hafner M, Frech C. Modeling of salt and pH gradient elution in ion-exchange chromatography. *Journal of separation science*. 2014; 37(1-2): 5-13.

13- Milach A, de los Santos JR, Turnes CG, Moreira AN, de Assis RA, Salvarani FM, *et al.* Production and characterization of Clostridium perfringens recombinant beta toxoid. *Anaerobe*. 2012; 18(3): 363-5.

14- Bakhshi F, Langroudi RP, Eimani BGJOJoVR. Enhanced expression of recombinant beta toxin of Clostridium perfringens type B using a commercially available Escherichia coli strain. 2016; 83(1): 1-4.

15- Sayadmanesh A, Ebrahimi F, Hajizade A, Rostamian M, Keshavarz H. Expression and purification of neurotoxin-associated protein HA-33/A from Clostridium botulinum and evaluation of its antigenicity. *Iranian Biomedical Journal*. 2013; 17(4): 165.

16- Fathi Najafi M, Hemmati M, Jabbari AR, Mehrvarz M, Aghaipour K. Purification and characterization of alpha-toxin from vaccinal strain of Clostridium novyi. 2011.

17- Johnson E, Tepp W, Lin G. Purification, characterization, and use of Clostridium botulinum neurotoxin BoNT/A3. Google Patents; 2016.

18- Poursoltani M, Mohsenzadeh M, Razmyar JJIJoMM. Toxinotyping of Clostridium perfringens strains isolated from packed chicken portions. 2014; 8(1): 9-17.

19- Gkogka E, Reij MW, Gorris LG, Zwietering MHJFC. Risk assessment of Clostridium perfringens in Cornish pasties in the UK. 2020; 108: 106822.

20- Nijland R, Lindner C, van Hartskamp M, Hamoen LW, Kuipers OP. Heterologous production and secretion of Clostridium perfringens beta-toxoid in closely related Gram-positive hosts. *Journal of biotechnology*. 2007; 127(3): 361-72.

21- Bhatia B, Solanki AK, Kaushik H, Dixit A, Garg LCJPe, purification. B-cell epitope of beta toxin of Clostridium perfringens genetically

conjugated to a carrier protein: expression, purification and characterization of the chimeric protein. 2014; 102: 38-44.

22- Kouguchi H, Watanabe T, Sagane Y, Ohyama TJEJoB. Characterization and reconstitution of functional hemagglutinin of the Clostridium botulinum type C progenitor toxin. 2001; 268(14): 4019-26.

23- Sakurai J, Duncan CJI, Immunity. Purification of beta-toxin from Clostridium perfringens type C. 1977; 18(3): 741-5.

24- Cavalcanti MTH, Porto T, Porto ALF, Brandi IV, Lima Filho JLd, Pessoa Junior AJRBdCF. Large scale purification of Clostridium perfringens toxins: a review. 2004; 40(2): 151-64.

Comparison of two methods of purification of Clostridium perfringens beta toxin type B

Raziyeh Jafari Khoshanabadi[1], Mohsen Fathi Najafi[2]*, Mohammad Momen Heravi[1], Mohammad Reza Bozorgmehr[1]

1- Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
2- Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran and Education and Extension Organization (AREEO), Agricultural Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad Branch, Mashhad, Iran.

Accept: April 15, 2022, Receive: April 23, 2022, Revise: April 22, 2022

Summary

Clostridium perfringens is an anaerobic bacterium that among its strains, only types B and C can produce beta-toxin. Beta-toxin plays an important role in many human and animal diseases and has detrimental effects on the intestine. The present study aimed to compare two purification methods for the extraction of beta-toxin from C. perfringens type B. In the first method, beta-toxin was purified using ammonium sulfate precipitation, column chromatography (Sephadex G-25), and ion-exchange chromatography (DEAE Sephadex), while the second method employed affinity chromatography. Hemolysis activity and protein content were measured in each step of purifications. The purity of beta-toxin was monitored in each step using SDS-PAGE. According to the results, a comparison of these two methods indicated that the yield of the first method was 82.8%, and the yield of the second method was 90.1%. The specific activity values for the first and second methods were calculated to be 2368.1 U/mg and 164.5 U/mg, respectively. Our results show that affinity chromatography could be used to purify beta-toxin from clostridium perfringens type B with high purity and specific activity (4370 HU/mg).

Key words: *Clostridium Perfringens type B, Beta-toxin, Ion exchange chromatography, Affinity chromatography*