نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۷، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۵۳- ۶۲

بررسی دو روش کروماتوگرافی تلفیقی و کروماتوگرافی افینیتی برای خالص‌سازی آلفا توکسین *باکتری کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A

زهرا حشمتی[۱]، محسن فتحی نجفی[*۲]، غلامحسین رونقی[۱]، محمود ابراهیمی[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: ۸ اسفند ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۰ فروردین ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۱ فروردین ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.445263.1229

چکیده

آلفا توکسین یا فسفولیپاز C (PLC) توسط باکتری *کلستردیوم پرفژنس* تولید می‌گردد و خواص کشنده درمونوکرتیک را دارا می‌باشد. تمامی سویه‌های *کلستردیوم* قادر به تولید این توکسین می‌باشند که در توسعه میونکروز *کلستریدی* نقش بسزایی را ایفا می‌کنند. آلفا توکسین باعث بروز علائم در انسان و دام می‌گردد و تأثیرات کشنده بر سیستم روده‌ای را نشان می‌دهد. در این تحقیق سعی بر آن خواهیم داشت که روش‌های متفاوت خالص‌سازی و استخراج آلفا توکسین *کلستردیوم پرفژنس* تیپ A را با هم مقایسه نماییم. روش اول شامل خالص‌سازی آلفا توکسین با استفاده از تکنیک‌های ترکیبی کروماتوگرافی شامل رسوب‌دهی سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی تبادل یون با استفاده از DEAE- Sephadex در مقادیر ۷ و ۹ pH و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با استفاده از Sephadex G-100 بود، روش دوم مبتنی بر استفاده از کروماتوگرافی افینیتی اجرا گردید. درجه خلوص توکسین آلفا در هر مرحله از فرآیند خالص‌سازی با استفاده از SDS-PAGE ارزیابی گردید. با بررسی نتایج حاصل از دو روش فوق نتایج زیر حاصل گردید. بازدهی روش اول ۸۸ درصد و بازده روش دوم ۹۱/۷درصد بود. مقادیر فعالیت ویژه برای روش اول و دوم به‌ترتیب ۶۹۱۷۰ U/mg و ۱۰۵/۷۱ U/mg محاسبه گردید. نتایج نشان داد که از روش کروماتوگرافی افینیتی می‌توان برای خالص‌سازی آلفا توکسین تولیدشده از کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ A با خلوص بالا و نسبت فعالیت به مقدار پروتئین (HU/mg) ۱۰۸۷۰۰ استفاده گردد.

واژگان کلیدی: *آلفا توکسین، کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A، فعالیت آنزیمی، کروماتوگرافی افینیتی، کروماتوگرافی ستونی*

[*] پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: najafiii99@gmail.com

مقدمه

کلستریدیوم پرفرنژنس یک باکتری گرم مثبت بی‌هوازی است که قادر به تشکیل اسپور می‌باشد. این باکتری در محیط‌های گسترده‌ای مثل خاک، آب، فاضلاب و معمولاً در روده‌ی حیوانات و انسان‌ها حضور دارد که در شرایط خاصی می‌تواند بیماری‌زا باشد (۱). این باکتری در انسان منجر به بیماری قانقاریا و بیماری‌هایی مثل مسمومیت غذایی و آنتریت نکروتیک می‌شود در حالی‌که در سایر جانوران بیماری‌های روده‌ای و انتروتاکسمیک را بیشتر ایجاد می‌کند. *کلستریدیوم پرفرنژنس* به سلول‌های سالم هجوم نبرده بلکه توکسین‌ها و آنزیم‌های متعددی تولید می‌کند که مسئول زخم‌ها و علائم بیماری می‌باشند. توکسین‌های تولید شده بستگی به سویه‌ی *کلستریدیوم پرفرنژنس* دارد و هر نوع توکسین سندروم خاصی را ایجاد می‌کند (۲). بنابراین، تشخیص صحیح نوع سویه *کلستریدیوم پرفرنژنس* در مطالعات اپیدمیولوژیک و همچنین در اجرای اقدامات پیشگیرنده‌ی مؤثر مثل واکسیناسیون بسیار حیاتی است. سویه‌های این باکتری بر اساس تولید ۴ توکسین اصلی (آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) به ۵ ایزوتایپ (A,B,C,D,E) تقسیم می‌شوند (۳). نوع مورد مطالعه در این تحقیق آلفا توکسین بوده است که توکسین آلفا از *کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A تولید می‌شود، یک متالوفسفولیپاز است که سبب مسمومیت غذایی می‌شود و مشخصه آن اسهال، ناراحتی شکمی یا حتی مرگ است. با توجه به کاربرد آلفا توکسین در طراحی و تولید کیت تشخیص بیماری آنتیت نکروتیک خالص‌سازی این محصول دارای اهمیت تشخیصی بالایی می‌باشد.

رسوب‌دهی با نمک، دیالیز، استخراج حلال آلی، الکتروفورز و کروماتوگرافی برخی از روش‌های کلاسیک و متعارف مورد استفاده برای خالص‌سازی پروتئین هستند. روش‌های کروماتوگرافی به‌دلیل اثربخشی آنها در اتصال انتخابی و حذف پروتئین‌های با خلوص بالا، به‌طور گسترده‌ای در تحقیقات علمی و کاربردهای صنعتی استفاده می‌شود (۴).کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی کاغذی، کروماتوگرافی ستونی، کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی افینیتی و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) تنها برخی از تکنیک‌های کروماتوگرافی را نشان می‌دهند (۵). در صنعت، برای استفاده از روش‌های کروماتوگرافی، از ستون‌هایی با سرعت بالا به‌دلیل توانایی آنها در حفظ تعادل و شستشوی نمونه‌ها استفاده می‌شود (۶). اصول اصلی کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) میل ترکیبی فاز ساکن کروماتوگرافی است (۵).

در این مطالعه، کروماتوگرافی تلفیقی (رسوب‌دهی با نمک آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی تعویض یونی (pH ۷,۹-) و کروماتوگرافی ستونی) را با کروماتوگرافی افینیتی برای خالص‌سازی آلفاتوکسین مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و رشد: *کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی واحد مشهد تهیه گردید. این باکتری به مدت۲۴ ساعت در محیط کشت غنی جگر رشد داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در محیط پپتون گوشت برای تولید توکسین درون انکوباسیون بی‌هوازی قرار داده شد، و در مرحله بعد محلول کشت سانترفیوژ شد، از محلول رویی برای مراحل خالص‌سازی استفاده شد. فعالیت همولیزی و غلظت پروتئین در تمامی مراحل اندازه‌گیری شد. سپس محلول رویی کشت به دو قسمت تقسیم گردید تا در دو روش خالص‌سازی استفاده گردد.

آزمون همولیز کمی: یک میلی‌لیتر خون در دور (۱۳۰۰ rpm)به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده رسوب (گلبول قرمز) با دو برابر حجم اولیه محلول بافر PBS شستشو داده شد و به آن ۱۰ برابر PBS اضافه گردید.

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

کنترل مثبت واکنش: ۰/۲ میلی‌لیتر PBS را با ۱ میلی‌لیتر RBC به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ کردیم و رسوب را با۱/۲ 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 در دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم. جذب محلول رویی را در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری نموده. طول موج‌های به‌دست آمده بایستی مابین کنترل مثبت و منفی باشند. سپس فعالیت آنزیمی را برای نمونه محاسبه و نمودار آن را رسم کردیم.

فعالیت آنزیمی به معنای آن مقدار آنزیمی که قادر است در واحد زمان یک درصد خون را لیز کند.

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

سنجش مقدار پروتئین (روش برادفورد): به‌منظور بررسی مقدار کمی پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. این روش علاوه بر اینکه روش دقیق و سریع می‌باشد، ترکیبات غیر پروتئینی نیز به میزان کمتری در آن تداخل ایجاد می‌کنند. این روش بر پایه اتصال رنگ کوماسی بلو G250به پروتئین عمل می‌نماید. استفاده از بلانک حاوی بافر مورد استفاده در این روش به علت اینکه نقطه صفر را روی منحنی استاندارد مشخص می‌کند دارای اهمیت زیادی خواهد بود (۷).

برای هر کدام از نمونه‌های پروتئینی با غلظت مشخص (تهیه شده از آلبومین سرم گاوی) یک آزمون برادفورد انجام گردید که به‌صورت زیر عمل شد:

شاهد: ۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد +۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه

نمونه: ۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد+ ۱۰۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی (BSA) و آب به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا اسپکتروفتومتر را در طول موج ۵۹۵ نانومتر تنظیم کرده و سپس دستگاه با محلول بلانک صفر گردید جذب نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. در نهایت با استفاده از برنامه اکسل نمودار رسم گردید و از این نمودار به‌عنوان یک نمودار استاندارد برای تعیین غلظت پروتئین در تمامی مراحل استفاده شد.

خالص سازی آلفا توکسین روش اول: روش اول برای خالص‌سازی آلفا توکسین در چهار مرحله، شامل رسوب‌دهی آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی تعویض یونی در دو بازه‌ی pH (۷ ، ۹ =pH) و کروماتوگرافی ستونی انجام شد (مراحل در زیر توضیح داده شده است). بعد از هر مرحله، مقدار پروتئین و فعالیت آن با توجه به روش‌هایی که در قسمت‌های قبلی توضیح داده شد، تعیین گردید. علاوه بر این، حضور آلفا توکسین در هر مرحله با استفاده از الکتروفورز (SDS-PAGE) بررسی شد.

رسوب‌دهی آمونیوم سولفات: به محتوای سوپرناتانت کشت باکتری آمونیوم سولفات ۷۰ درصد کم‌کم اضافه شد. ارلن حاوی سوپرناتانت محیط کشت را در محیط سرد روی همزن قرار داده و کم‌کم آمونیوم سولفات به آن اضافه گردید. سپس به مدت یک شبانه‌روز در دمای۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. روز بعد محتوای ارلن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ گردید. رسوب پروتئینی در مقداری بافر تریس (۲۰ میلی‌مولار ،pH، ۷) حل گردید، با کمک روش برادفورد غلظت پروتئین، با آزمون همولایزین کیفی و کمی میزان فعالیت، مورد سنجش قرار گرفت.

کروماتوگرافی تعویض یونی: در این روش ستونی با رزین DEAE-cellulose پر شد و با کمک سیستم بافری تنظیم pH شد. سپس نمونه را به ستون اضافه و

اجازه داده شد تا رزین و نمونه به خوبی با هم واکنش دهند. پس از آن با دو بافر طی چند مرحله شستشو داده شد. با بافر اولیه بیشترین چسبندگی پروتئین را ایجاد و با بافر دومی که در غلظت‌های مختلف نمکی ساخته شده‌اند، تمامی پروتئین‌های چسبیده به ستون جدا شدند، جذب نمونه‌های خروجی در طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی شد. روی تمامی نمونه‌ها آزمون همولیز صورت گرفت. در این خالص‌سازی انجام شده دو بار ستون با رزین DEAE-cellulose پر شد یک‌بار در pH= ۷ و خروجی انتخابی از این مرحله را به pH= ۹ رسانده و به ستونی که با رزین DEAE-cellulose با pH= ۹ پر شده است تزریق نموده، بر روی تمامی خروجی‌ها آزمون‌های میزان فعالیت و تعیین مقدار پروتئین انجام شد و بهترین خروجی را انتخاب و آن را با آمونیوم سولفات رسوب‌دهی و تغلیظ گردید. در مرحله بعد محلول غلیظ شده را وارد ستون ژل فیلتراسیون کردیم.

کروماتوگرافی ستونی: در این روش در ستونی به ارتفاع ۱۱۵ cm و قطر داخلی ۱/۵ سانتی‌متر که با رزین سفادکس G100 به تعادل رسید انجام گردید. عمل متعادل‌سازی رزین با بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار در pH= ۶ انجام شد. جذب نمونه‌های خروجی را در طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی و بر روی خروجی‌های دارای جذب، آزمون برادفورد انجام شد.

روش دوم خالص سازی: در روش دوم خالص‌سازی محلول رویی سانتریفیوژ شده پس از سنجش تعیین میزان فعالیت و مقدار پروتئین، با استفاده از روش کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) خالص‌سازی گردید و در پایان کار نیز میزان فعایت و مقدار پروتئین تعیین شد. همچنین آلفا توکسین با استفاده از ژل الکتروفورز ۱۲/۵ درصد ردیابی شد.

کروماتوگرافی افینیتی(جذب سطحی): در این بررسی از لسیتین به‌عنوان فاز ساکن استفاده شد و آن را با بافر تریس pH= ۷ به تعادل رساندیم سپس ۲۵ میلی‌لیتر از محلول رویی را که قبلاً سانتریفیوژ کرده و حاوی پروتئین *کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A اضافه نموده، به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب سرد برای اتصال پروتئین مورد نظر به لیگاند (لسیتین) قرار دادیم.

سپس به مدت زمان ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. برای خالص‌سازی کامل ناخالصی‌ها این عمل دو بار انجام شد. در مرحله آخر جهت جداسازی پروتئین هدف از فاز ساکن (لسیتین) به آن ۵ میلی‌لیتر بافر در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه و با دور rpm ۱۲۰۰۰ و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید این عمل نیز دو بار تکرار شد.

الکتروفورز SDS-PAGE: به‌منظور تعیین خلوص میزان توکسین و همچنین کنترل روند صحیح خالص‌سازی از الکتروفورز استفاده گردید. بدین صورت که نمونه‌ی به‌دست آمده از هر مرحله توسط الکتروفورز بررسی گردید. ابتدا از ژل پلی‌اکریل آمید- سدیم دی دوسیل سولفات (SDS-PAGE) ۱۲/۵ درصد و سپس رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

نتایج

میکروارگانیسم و رشد: با توجه به نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE و سنجش سمیت سلولی، آلفا توکسین در مرحله اولیه رشد باکتری تشخیص داده شد. نتایج حاصل بیانگر این مطلب بود که آلفا توکسین ماندگاری پایینی دارد و نگهداری طولانی مدت نقش مهمی در غیر فعال کردن آلفا توکسین دارد.

خالص سازی آلفا توکسین: نتایج حاصل از مقایسه خواص فیزیکی و شیمیایی بکار برده شده خالص‌سازی آلفا توکسین با دور روش مختلف انجام شد و شرایط خالص‌سازی در جدول (۱) مقایسه و خلاصه شد.

جدول ۱- شرایط خالص‌سازی آلفا توکسین

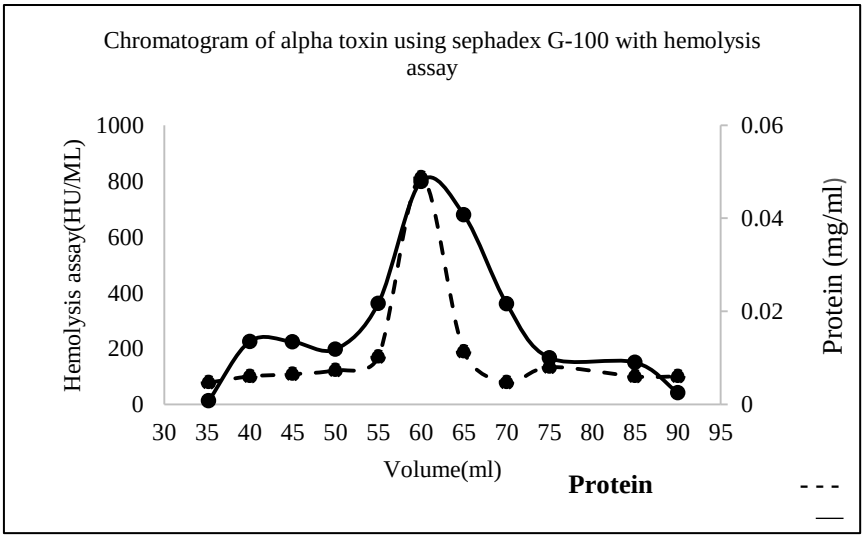
مراحل	pH	زمان(h)	دما(C^0)
سفادکس-pH7،DEAE	۷	۱	۲۵
سفادکس-pH9،DEAE	۹	۱	۲۵
سفادکس-G100	۶	۳	۲۵
کروماتوگرافی افینیتی(جذب سطحی)	۷	۱	۴

روش اول خالص‌سازی (کروماتوگرافی ترکیبی):

پس از بهینه‌سازی محیط کشت، باکتری در حجم انبوه کشت داده شد. برای خالص‌سازی توکسین آلفا از روش‌های: رسوب‌دهی آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی تعویض یونی در دو (pH= ۷ ، pH= ۹) و کروماتوگرافی ستونی G100 به‌طور پیوسته استفاده شد. نتایج حاصل خالص‌سازی در جدول (۲) گردآوری شد. نسبت خالص‌سازی در مرحله رسوب‌دهی با نمک آمونیوم سولفات ۱ در نظر گرفته شد، پس از خالص‌سازی با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی نسبت خالص‌سازی به ۲۲۸/۳ و بازده آنزیمی ۸۹/۷٪ رسید. سرانجام پروتئین خالص شده از مرحله کروماتوگرافی ستونی G100 با نسبت فعالیت به پروتئین (۶۹۱۷۰U/mg) و سرعت خالص‌سازی ۶۵۴ و بازدهی ۸۸٪ به‌دست آمد. نتایج خالص‌سازی در هر مرحله در جدول ۲ گردآوری شده است.

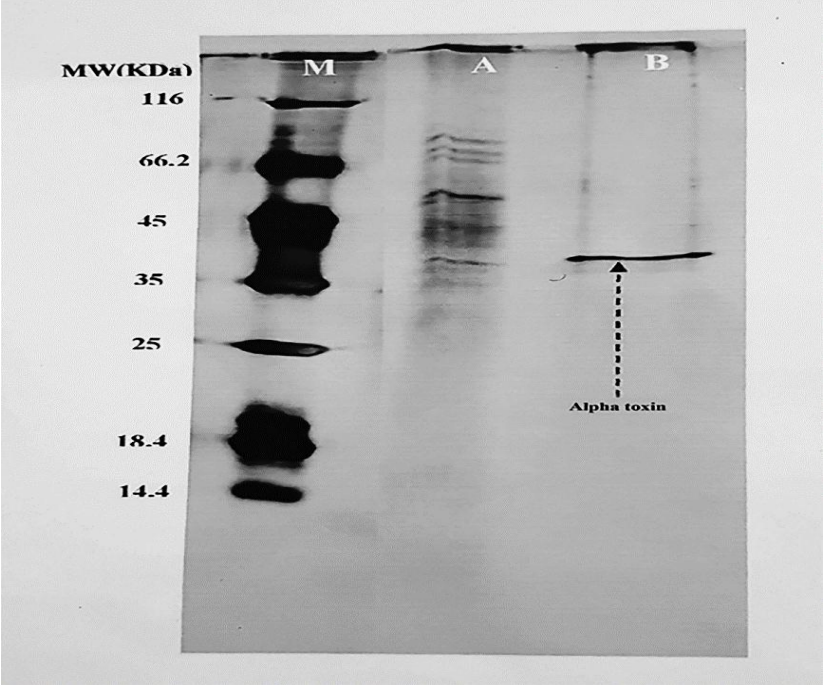
جدول ۲- مراحل خالص‌سازی *کلستریدیوم پرفرژنتس* تیپ A (روش اول)

مرحله	پروتئین کل (mg/ml)	فعالیت کلU(HU/mg)	نسبت فعالیت به پروتئین (U/mg)	ضریب خالص‌سازی	بازده٪
کشت	۵۶۰	۵۹۲۰۰	۱۰۵/۷۱	۱	۱۰۰
آمونیوم سولفات	۵۴۶	۵۸۵۹۶	۱۰۷/۱	۱/۰۱	۹۸,۹۷
کروماتوگرافی تعویض یونی (pH۷)	۲/۲۵	۵۴۷۰۰	۲۴۳۱۱	۲۳۰	۹۲,۴
کروماتوگرافی تعویض یونی(pH۹)	۲/۲	۵۳۱۰۳	۵۴۱۳۸	۲۲۸,۳	۸۹/۷۱
کروماتوگرافی ستونی	۰/۷۲	۵۱۹۷۰	۶۹۱۷۰	۶۵۴	۸۸



شکل ۱- خالص‌سازی آلفا توکسین با کروماتوگرافی ستونی سفادکس G100

خروجی به‌دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی در مرحله بعد به ستون کروماتوگرافی (سفادکس G100) تزریق شد و نتایج حاصل در شکل (۱) نشان داده شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در حجم ۶۰ml یک پیک جذب در ۲۸۰ nm و ۵۷۰ قابل مشاهده است. همچنین توکسین آلفا خالص‌شده تک‌باند از این خروجی با وزن مولکولی ۴۳KD در شکل (۲) قابل مشاهده است.



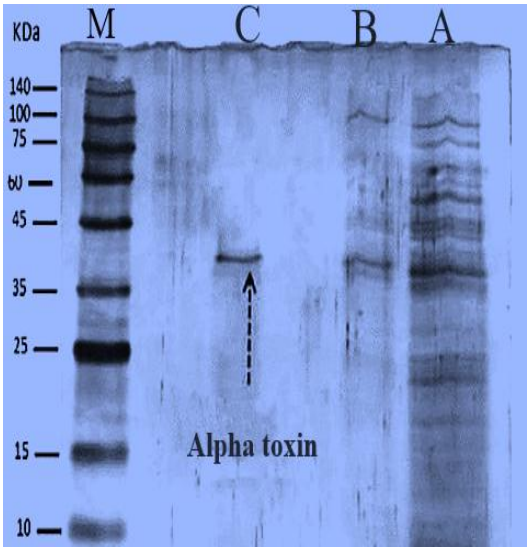
شکل ۲- ژل اکریل آمید ۱۲/۵٪ می‌باشد که ترتیب نمونه‌ها از چپ به راست، M - مارکر (۱۴،۴-۱۱۶کیلودالتون)،A رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات، B- کروماتوگرافی ستونی

روش دوم خالص‌سازی (کروماتوگرافی افینیتی):

آلفا توکسین با استفاده ازکروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با اتصال آلفا توکسین به لسیتین (سوبسترا) خالص گردید. در این روش ناخالصی‌ها حذف و آلفا توکسین در دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد از بستر جدا شد. و در نهایت، آلفا توکسین همگن با بازده ۹۱/۷٪ ، ۱۰۲۸ برابر خالص‌سازی و فعالیت ویژه ۱۰۸۷۰۰ U/mg خالص شد. آلفا توکسین به‌صورت یک نوار در SDS-PAGE رؤیت شد، شکل(۳). همان‌طور که در SDS-PAGE نشان داده شده است آلفا توکسین استخراج شده از کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A افینیتی(جذب سطحی) در یک مرحله به خلوص بالا رسیده است.

جدول ۳- خالص‌سازی کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A

مرحله	پروتئین کل (mg/ml)	*فعالیت کل* U(HU/mg)	*نسبت فعالیت به پروتئین* (U/mg)	*ضریب خالص‌سازی*	*بازده٪*
کشت	۵۶۰	۵۹۲۰۰	۱۰۵/۷۱	۱	۱۰۰
کروماتوگرافی افینیتی	۰/۵	۵۴۳۵۰	۱۰۸۷۰۰	۱۰۲۸	۹۱/۷



شکل ۳- تجزیه و تحلیل دو روش خالص‌سازی؛ از سمت راست به چپ. A: سوپرناتانت آلفا توکسین.B: نمونه خروجی کروماتوگرافی ستونی.C: نمونه‌ی خروجی کروماتوگرافی افینیتی.M:مارکر

بحث و نتیجه‌گیری

کلستریدیوم پرفرژنس تیپ A باعث بیماری گانگرن‌گازی در انسان‌ها می‌شود (۸). در ایجاد این بیماری ابتدا توکسین آلفا ترشح و سپس با مشارکت توکسین بتا و آنزیم‌های هیدرولیتیک باکتری باعث پیشرفت و وخیم شدن بیماری می‌شوند(9) . این سویه (Type A) در مسمومیت‌های غذایی هم دیده شده است (۲). آلفا توکسین (CPA) توسط همه‌ی سویه‌های *کلستریدیوم پرفرنژنس* تولید می‌شود، البته سویه تیپ A مقادیر بیشتری از توکسین آلفا را نسبت به سایر تیپ‌های *کلستریدیوم* تولید می‌کنند. فسفولیپاز C (PLases C) یک مولکول دوقطبی است و دارای یک سر گروه فسفر و سر دیگر آن glycerophyll glycosylpyridine می‌باشد، بخش دوم آن مسئول کنترل فعالیت کاتالیکی آنزیم (توکسین آلفا) می‌باشد و خواص بخصوصی دارد از جمله آن خصوصیات می‌توان به نقطه ایزوالکتریک (PI=۵/۴) اشاره کرد. این خاصیت باعث شده که باکتری، آنزیمی (توکسین آلفا) را تولید کند که خاصیت کاتالیزی داشته باشد. از جمله باکتری‌هایی که ساختمان پروتئینی آنها، این خاصیت را داشته باشند می‌توان به باکتری‌های گرم مثبتی نظیر سویه‌های *لیستریا*، سویه‌های *باسیل*، *کلستریدیوم‌ها*، *ردکوکوس دریایی* و *استافیلوکوکوس زرد* اشاره کرد (۱۰).

از آنجایی که توکسین آلفا باعث نکروز و مرگ می‌شود در این تحقیق، به بررسی روش‌های خالص‌سازی آلفا توکسین آن برای یافتن تکنیک‌هایی (نظیر واکسن) برای مقابله با آلفا توکسین پرداخته شده است. انتخاب روش خالص‌سازی مناسب بسیار اهمیت بالایی دارد، هرچند برخی از تلاش‌ها برای خالص‌سازی به خلوص بالا نرسیده است.

در این مطالعه، تلفیق دو روش کروماتوگرافی یونی و کروماتوگرافی ستونی برای خالص‌سازی آلفا توکسین استفاده گردید و نتایج حاصل با روش کروماتوگرافی افینیتی نسبت به فاکتورهایی نظیر هزینه کمتر، سرعت بالاتر و سادگی روش نسبت به مطالعات دیگر مقایسه گردید. در کنار تمامی این فاکتورهای بیان شده مهم‌ترین فاکتور فعالیت توکسین می‌باشد که مورد توجه قرار گرفت. در سال ۲۰۱۴، Zayerzadeh و همکاران با استفاده از ترکیب چهار تکنیک کروماتوگرافی تبادل کاتیونی، رسوب دهی با نمک، ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تبادل آنیون به خالص‌سازی توکسین *کلستریدیوم پرفرژنس* پرداختند (۱۱). در سال ۲۰۱۲ ، فتحی نجفی و

همکارنش برای خالص‌سازی اپسیلون توکسین *کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A از تلفیق مجموعه‌ای از تکنیک‌ها از جمله دیالیز، رسوب‌دهی با نمک آمونیوم سولفات و با استفاده از کروماتوگرافی آنیونی استفاده کردند (۱۲).در سال ۲۰۱۶، جانسون اریک و همکاران با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی موفق به خالص‌سازی نوروتوکسین BoNT/A3 از *کلستریدیوم بوتولینوم* شدند (۱۳). در سال ۲۰۱۳ Sayadmanesh و همکارانش برای خالص‌سازی نوروتوکسین بوتولین از *کلستریدیوم یوتولینوم* از روش کروماتوگرافی افینیتی (با استفاده از ستون نیکل) استفاده کردند (۱۴). در سال ۲۰۱۱، فتحی نجفی و همکاران با استفاده از رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) و سپس با استفاده کروماتوگرافی ستونی آلفا توکسین باکتری *کلستریدیوم نووی* را خالص کردند (۱۵). در سال ۱۹۸۷ ادندال با استفاده از اولترافیلتراسیون و کروماتوگرافی ژل به خالص‌سازی آلفا توکسین از *باکتری کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A پرداخت (۱۶). در سال ۱۹۷۶ مولبی و همکارانش از ترکیب چند تکنیک شامل DEAE-Sephadex، کروماتوگرافی Sephadex G-75 و متمرکزسازی ایزوالکتریک برای خالص‌سازی آلفا توکسین از *کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A استفاده کردند (۱۷).

متأسفانه تحقیقات کمی راجع به خالص‌سازی آلفا توکسین از باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* تیپ A صورت گرفته است. برای مثال: برای فعالیت آنزیمی در سال ۱۹۴۱ وان ۵۴٪ و اسمایس در سال ۱۹۷۴ ، ۵۶٪ نمونه خالص‌شده آلفا توکسین را به‌دست آوردند. در سال ۱۹۸۵، مک فارلن با انجام روش تغلیظ با آمونیوم سولفات (رسوب دهی با نمک) و سپس تزریق به ستون کروماتوگرافی فعالیت آنزیمی را بهبود بخشید(۱۸). در سال ۱۹۷۶ مولبی و همکارانش از ترکیب چند تکنیک شامل DEAE-Sephadex، کروماتوگرافی Sephadex G-75و متمرکزسازی ایزوالکتریک برای خالص‌سازی آلفا توکسین از *کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A استفاده کردند که به ضریب بازدهی ۲۰۰ و خلوص ۱۰/۴٪ آلفا توکسین رسیدند (۱۷). در سال ۱۹۸۷ ادندال با استفاده از اولترافیلتراسیون و کروماتوگرافی ژل به خالص‌سازی آلفا توکسین از *باکتری کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A پرداخت (۱۶). تولید و خالص‌سازی الفا توکسین در ابتدای سال ۱۳۹۶ در مؤسسه رازی کلید خورده است. این تحقیقات با بررسی بر روی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آلفا توکسین به‌منظور خالص‌سازی به روش ترکیبی رسوب‌دهی با نمک آمونیوم سولفات و همچنین استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی و ستونی صورت گرفته است. نتایج حاصل نشان‌دهنده خلوص ۸۸ درصد محصول نهایی بوده است. روش اول بر مبنای خالص‌سازی با نمک آمونیوم سولفات پایه‌گذاری شده بود ولی روش دوم بر پایه‌ی کروماتوگرافی تعویض یونی و ستونی به‌صورت تلفیقی انجام گرفته است. اصول کلی این روش بر پایه تعویض یونی می‌باشد که شامل دو مرحله کروماتوگرافی آنیونی در pH های مختلف به‌ترتیب ۷ و ۹ می‌باشد و در مرحله بعدی با تزریق نمونه‌ی خروجی از کروماتوگرافی آنیونی منجر به خالص‌سازی ۸۸ درصد آلفا توکسین گردیده است. نسبت فعالیت به مقدار پروتئین U/mg ۶۹۱۷۰ می‌باشد و بر طبق شواهد به‌دست‌آمده از SDS-PAGE باند مورد نظر در ۴۳ کیلو دالتون قرار گرفته است. در حالی که در روش دوم خالص‌سازی (کروماتوگرافی افینیتی)، تنها با یک مرحله خالص‌سازی نسبت فعالیت به پروتئین U/mg ۱۰۸۷۰۰ رسیده است. در مقایسه بین روش کروماتوگرافی افینیتی، درصد افینیتی در این تحقیق ۹۱/۷ ٪ می‌باشد. روش کروماتوگرافی افینیتی نسب به روش اول دو مزیت عمده دارد: یکی هزینه کمتر و دیگری مراحل کمتر روش مورد استفاده و قابلیت تولید بیشتر توکسین در مقیاس صنعتی است. مطابق جدول (۱) روش کروماتوگرافی افینیتی از نظر دسترسی به مواد و هزینه انجام شده مقرون به‌صرفه است و مدت زمان خالص‌سازی در روش کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) یک دوم روش کروماتوگرافی تعویض یونی و یک سوم کروماتوگرافی ستونی می‌باشد. همچنین نسبت

میزان فعالیت به مقدار پروتئین در روش کروماتوگرافی افینیتی نسبت به روش اول ۱/۵ برابر افزایش داشته است.

کروماتوگرافی افینیتی (جذب سطحی) یک روش کارآمد و مقرون به‌صرفه برای خالص‌سازی آلفا توکسین تولید شده از باکتری *کلستریدیوم پرفرژنس* تیپ A از نظر خلوص بالا، زمان کمتر مورد نیاز برای خالص‌سازی و در نهایت تولید حجم بالاتر نسبت به سایر روش‌ها است.

سپاسگزاری

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

References

1- Rood JI, Cole ST. Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens. *Microbiol Rev*. 1991; 55(4): 621-48.

2- Niilo L. Clostridium perfringens in animal disease: a review of current knowledge. *Can Vet J*. 1980; 21(5): 141.

3- Cavalcanti MTH, Porto T, Porto ALF, Brandi IV, Lima Filho JLd, Pessoa Junior A. Purificação de toxinas produzidas por Clostridium perfringens: uma revisão. *Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo*. 2004; 40(2): 151-64.

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

5- Coskun OJNcoI. Separation techniques: *Chromatography*. 2016; 156 (2): 3.

6- Gagnon PJJocA. Technology trends in antibody purification. 2012; 1221: 57-70.

7- Raine J, Clay JW. Testamenta eboracensia: A selection of wills from the registry at York: The Society. 1884.

8- Uzal F, Vidal J, McClane B, Gurjar A. Clostridium perfringens toxins involved in mammalian veterinary diseases. *The open toxinology journal*. 2010; 2: 24.

9- 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 Ciências Farmacêuticas. 2004. 40(2): 151-64.

10- Titball RW. Clostridium perfringens vaccines. *Vaccine*. 2009; 27: D44-D7.

11- Zayerzadeh E, Fardipour A, Jabbari ARJJoMB. A new purification method for Beta-toxin of Clostridium perfringens type C Vaccinal strain. 2014; 3(3-4): 8-13. [In Persian]

12- Najafi MF. Purification of epsilon-toxin from vaccinal strain of Clostridium perfringens type D. 2012. [In Persian]

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

14- Sayadmanesh A, Ebrahimi F, Hajizade A, Rostamian M, Keshavarz HJIBJ. Expression and purification of neurotoxin-associated protein HA-33/A from Clostridium botulinum and evaluation of its antigenicity. 2013; 17(4): 165. [In Persian]

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

16- Odendaal M. Purification of the alpha toxin of Clostridium perfringens type A by ultrafiltration and gel chromatography. 1987.

17- Möllby R, Holme T, Nord C-E, Smyth C, Wadström TJM. Production of phospholipase C (alpha-toxin), haemolysins and lethal toxins by Clostridium perfringens types A to D. 1976; 96(1): 137-44.

18- Logan A, Williamson E, Titball R, Percival D, Shuttleworth A, Conlan J, *et al*. Epitope mapping of the alpha-toxin of Clostridium perfringens. 1991; 59(12): 4338-42.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 7, Issue 2, Autumn & Winter 2024, pages: 53-62

Comparative analysis between compound chromatography and affinity chromatography for the purification of Alpha toxin *C.perfringense* type A

Zahra Heshmati[1], Mohsen Fathi Najafi[2]*, Gholam Hossein Ronaghi[1], Mahmood Ebrahimi[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.

Receive: February 27, 2024; Revise: March 29, 2024; Accept: March 30, 2024

10.22034/nfvm.2024.445263.1229

Summary

Alpha toxin, sometimes referred to as phospholipase C (PLC), is a significant toxin generated by *C. perfringens* that possesses both deadly and dermonecrotic properties. All strains (A, B, C, D, E) of *C. perfringens* generate varying quantities of this toxin, which is recognized as a key various factor in the development of clostridial myonecrosis.Alpha-toxin is known to significantly influence several human and animal disorders, exhibiting deleterious impacts, specifically on the intestinal system. The primary objective of this research was to conduct a comparative analysis of two distinct purification techniques in order to extract alpha-toxin from *C. perfringens* type A. The first approach involved the alpha-toxin purification through a series of techniques, including ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography using DEAE Sephadex at pH values of 7 and 9, and gel filtration chromatography using Sephadex G-100, while the second approach was implemented using the affinity chromatography. The degree of purity of alpha-toxin was assessed at each stage of the purification process by the utilization of SDS-PAGE.The protein content and hemolysis activity were also quantified at each purification step. Based on the obtained findings, examining these two approaches revealed that the first method yielded a percentage of 88, while the second method yielded percentage of 91.7. The specific activity values obtained from the calculations for the first and second methods were 69170 U/mg and 105.71 U/mg, respectively. Our research shows that affinity chromatography can produce a highly pure alpha toxin with a specific activity of 108700 (HU/mg), produced by *Clostridium perfringens* type A.

Keywords: *Alpha-toxin, Clostridium perfringens type A, Enzymatic activity, Affinity chromatography, column chromatogr*