

Original Article

Immunogenicity of N-CfTX-2 Antigen of *Chironex fleckeri* Jellyfish in Mice

Hossein Honari^{1*}, Seyed Mojtaba Aghaie¹, Hamed Jalilpour¹

¹Biology Research Center,
Faculty of Sciences, Imam
Hossein University, Tehran,
Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Chironex fleckeri* is the most toxic and dangerous marine species. CfTX-2 is one of the antigenic proteins of jellyfish venom that has been suggested for stimulation of the immune system, for treatment, and as a candidate for vaccine. The purpose of this study was designing, optimization, synthesis, and expression of the N-CfTX-2 gene in *E. coli* and investigation of the production of antibodies and immunization in mice.

Methods: In this experimental study, the complete sequence of N-CfTX-2 gene was obtained from NCBI (with accession number AFQ00677.1). After optimizing the codon of *E. coli* host, other bioinformatics studies needed for better gene expression were performed, such as protein stability and mRNA structure. The gene sequence was ordered for synthesis and replication in the pET21a (+) vector. The recombinant vector was transformed into *E. coli* BL21 and protein expression was induced by IPTG. After purification of the protein, the obtained antigen was injected into the mice in four steps and the amount of antibody produced in their serum, was measured. Then, the produced antibody was isolated from the serum and confirmed by ELISA assay. Sixty days after the first injection, the mice were challenged by the *Chironex fleckeri* jellyfish venom.

Results: The N-CfTX-2 gene sequence cloned in the expression vector pET21a (+) was confirmed by PCR, and the produced recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blot. Moreover, the immunized mice tolerated jellyfish venom 50 x LD50.

Conclusion: Given the antigenic properties of N-CfTX-2 and antibody production in laboratory animal, this protein can be used as a vaccine candidate in future studies.

Keywords: *Chironex fleckeri*; Immune system; Toxin 2.

***Corresponding Author:**
Hossein Honari; Biology
Research Center, Faculty of
Sciences, Imam Hossein
University, Tehran, Iran.

Email:
honari.hosein@gmail.com

Received: 21 Apr, 2018
Accepted: 13 Jun, 2018

ایمنی‌زایی آنتی‌ژن N-CfTX-2 عروس دریایی در موش سوری

حسین هنری^{۱*}، سیدمجتبی آقایی^۱، حامد جلیل‌پور^۱

چکیده

زمینه و هدف: عروس دریایی (*Chironex fleckeri*)، سمی‌ترین گونه و خطرناک‌ترین موجود دریایی است. *CfTX-2* یکی از پروتئین‌های آنتی‌ژنیک زهر عروس دریایی بوده که به‌منظور تحریک سیستم ایمنی، جهت درمان و به‌عنوان کاندید واکسن پیشنهاد شده است. این مطالعه با هدف طراحی، بهینه‌سازی، سنتز و بیان ژن N-CfTX-2 در *E. coli* و بررسی تولید آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی در موش سوری انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، توالی ژن کامل N-CfTX-2 از NCBI (به شماره AFQ00677.1) به دست آمد. پس از بهینه‌سازی کدونی میزبان *E. coli*، سایر بررسی‌های بیوانفورماتیکی لازم برای بیان بهتر ژن؛ از قبیل پایداری پروتئین و ساختار mRNA انجام شد. توالی ژن جهت سنتز و همانندسازی در وکتور pET21a(+) سفارش داده شد. وکتور نو ترکیب به‌درون باکتری *E. coli* BL21 منتقل و بیان پروتئین با IPTG القا گردید. پس از تخلیص پروتئین، آنتی‌ژن حاصل در چهار نوبت به موش‌ها تزریق و میزان آنتی‌بادی تولیدی در سرم آنها اندازه‌گیری شد، سپس آنتی‌بادی تولیدی از سرم موش جداسازی و به‌وسیله تست ELISA تأیید گردید. ۶۰ روز پس از اولین تزریق، حیوانات به‌وسیله زهر *Chironex fleckeri* چالش شدند.

یافته‌ها: توالی ژنی N-CfTX-2 کلون‌شده در وکتور بیانی pET21a(+) به‌وسیله PCR و پروتئین نو ترکیب تولیدشده به‌وسیله SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن تأیید گردید. همچنین موش‌های ایمن شده ۵۰ برابر LD50، زهر عروس دریایی را تحمل کردند.

نتیجه‌گیری: با توجه به خاصیت آنتی‌ژنی N-CfTX-2 و تولید آنتی‌بادی در حیوان آزمایشگاهی، می‌توان از این پروتئین در مطالعات آتی به‌عنوان یک کاندید واکسن استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: عروس دریایی؛ سیستم ایمنی؛ توکسین ۲.

^۱مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام‌حسین(ع)، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

حسین هنری؛ مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام‌حسین(ع)، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

honari.hosein@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۱

تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۳

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Honari H, Aghaie SM, Jalilpour H. Immunogenicity of N-CfTX-2 antigen of *chironex fleckeri* jellyfish in mice. Qom Univ Med Sci J 2018;12(9):47-57. [Full Text in Persian]



مقدمه

انواع عروس دریایی از خانواده بی‌مهرگان و از رده کیسه‌تنان می‌باشند (۲،۱). از میان ۲۰۰ گونه عروس دریایی، بیش از ۱۰۰ گونه برای انسان خطرناک تشخیص داده شده که از این میان، خطرناک‌ترین گونه عروس دریایی جعبه‌ای است که بیشترین آسیب را به انسان می‌رساند. عروس دریایی جعبه‌ای در مناطق گرم و در تمامی اقیانوس‌ها یافت می‌شود و پس از یک باران محلی تعدادشان زیاد شده و به‌خصوص نزدیک مکان‌های اتصال رودخانه‌ها به دریا، به‌وفور دیده می‌شوند (۱). عروس دریایی به‌عنوان یک مشکل اورژانسی در مناطق مختلف ساحلی در سراسر جهان، از جمله سواحل ایران در خلیج فارس مطرح است. گزش عروس دریایی در آب‌های نمکی سواحل جنوبی کشور و در هنگام شنای مسافران در سواحل خلیج فارس و دریای عمان اتفاق می‌افتد که در برخی موارد می‌تواند مرگ‌آور باشد. سالانه حدود ۱۵۰ میلیون مورد گزش با عروس دریایی در سرتاسر جهان گزارش می‌شود (۳). در سال ۱۳۹۲، ۳۰۵ مورد گزیدگی در آب‌های خلیج فارس به‌وسیله عروس دریایی گزارش شد (۴). گزش با عروس دریایی یک تهدید جدی برای گردشگران و ماهیگیران بوده و از لحاظ اقتصادی، همچنین سلامت، بسیار مهم است. صدمات ناشی از عروس دریایی معمولاً فصلی است (۵-۷). انواع عروس دریایی براساس شکل به ۵ دسته تقسیم‌بندی می‌شوند که در دو دسته هیچ‌گونه بازو یا دنباله وجود ندارد و توانایی نیش‌زدن را نیز ندارند، ولی سه دسته دیگر دارای بازو بوده و بر روی بازوهایشان سلول‌های سمی نیش‌دار یا نماتوسیت‌ها قرار گرفته‌اند که جهت شکار به‌کار می‌روند. نماتوسیت‌ها سامانه گزشی منحصر به‌فردی هستند که از کپسولی پر از مایع حاوی یک رشته تشکیل شده و می‌توانند با شتاب پرتاب شوند. نماتوسیت‌ها با تحریک مکانیکی یا شیمیایی، سم خود را آزاد می‌کنند (۹،۸). سم عروس دریایی دارای توکسین‌های پروتئینی مختلف شامل: طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی، همولیتیک، درمونکروتیک، میوتوکسیک، نوروتوکسیک و کاردیواسکولار می‌باشد (۱۰). سم عروس دریایی جعبه‌ای متشکل از سم دستگاه قلبی یا کاردیوتوکسین و سم دستگاه عصبی یا نوروتوکسین بوده که سریعاً جذب و وارد سیستم گردش خون

بدن شده و در کمتر از ۵ دقیقه سبب مرگ می‌گردد. بیشتر مرگ‌ها به‌علت تأثیر سم بر روی دستگاه قلبی، در ۵ دقیقه اول پس از گزیدگی است. علائم گزش با عروس دریایی معمولاً بلافاصله در پی گزش ایجاد می‌شود، اما ممکن است علائم تأخیری نیز پس از چند ساعت دیده شود. همچنین واکنش حساسیت تأخیری با این نوع عروس دریایی شیوع بیشتری دارد (۱۱،۸). شایع‌ترین علت مرگ در این گونه، نارسایی تنفسی و ایست قلبی است (۱۲،۱۱). فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در نماتوسیت عروس دریایی *C. fleckeri*، دو پروتئین *CFTX-1* و *CFTX-2* با وزن مولکولی ۴۰ و ۴۲ کیلودالتون می‌باشد (۱۳). ژن *CFTX* دارای ۱۴۹۳ جفت باز، ۴۶۱ اسید آمینه و mRNA خطی است که پروتئینی به وزن مولکولی ۵۱ کیلودالتون را کد می‌کند (۱۴). در حال حاضر، بخش عمده‌ای از اطلاعات در مورد زهر همولیتیک کیسه‌تنان از شقایق‌های دریایی و مرجان‌های نرم به‌دست آمده و اطلاعات کمتری مربوط به عروس دریایی وجود دارد (۱۵،۱۶). پیچیدگی زهرهای *CfTX* عروس دریایی، نشان‌دهنده یک چالش درمانی منحصر به‌فرد بوده که نیاز به ابداع روش‌های درمانی و پیشگیری را یادآوری می‌کند؛ بنابراین، ارزشمند است به‌عنوان یک هدف درمانی برای درمان گزیدگی، نیش‌زدگی و یا ترکیباتی برای طراحی دارو مورد استفاده قرار گیرد (۶). با توجه به صدمات ناشی از سم عروس دریایی و نظر به اهمیت درمانی آن، این مطالعه با هدف طراحی، بهینه‌سازی، سنتز و بیان ژن N-CfTX-2 در *E. coli* و بررسی تولید آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی آن در موش سوری انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ترادف ژن N-CfTX-2 از بانک ژنی NCBI (با شماره AFQ00677.1)، استخراج و برای ساخت به شرکت ندای فن سفارش داده شد. پلاسمید pET21a(+) به‌وسیله شرکت سترکننده ژن و باکتری مربوطه برای ترانسفورماسیون از آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی دانشگاه تهیه گردید. برای تخلیص پروتئین نوترکیب، از ستون Ni-NTA agarose resin (شرکت QIAGEN) استفاده شد.

بررسی پروتئین بیان‌شده به‌وسیله الکتروفورز آکریل آمید (۱۸): برای تهیه محلول ژل، درصد آکریل آمید و بیس اکریل آمید متناسب با اندازه پروتئین انتخاب شد. با توجه به اینکه پروتئین بیان‌شده در حدود ۳۱ کیلو دالتون وزن داشت، از ژل ۱۲٪ استفاده گردید. نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن)، تحت شرایط دناتوره الکتروفورز شدند. غلظت ژل، ۱۲٪ با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بود. برای مشاهده باندهای پروتئین، از روش رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو استفاده گردید.

تأیید پروتئین بیان‌شده با روش لکه‌گذاری وسترن (۱۹): برای تأیید پروتئین نوترکیب، تکنیک وسترن بلات به‌کار برده شد. بلاتینگ نمونه‌ها بر روی کاغذ نیتروسلولز انجام گرفت و از پروتئین BSA به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. فرآیند بلاتینگ در ولتاژ ۱۰۰ میلی‌ولت به مدت یک‌ساعت و نیم انجام شد. کونژوگ موشی با رقت ۱:۴۰۰۰ به‌عنوان آنتی‌بادی تشخیص‌دهنده به کار گرفته شد.

به‌کارگیری ستون Ni-NTA برای تخلیص پروتئین به روش دناتوره (۱۹): تمام مراحل تخلیص در اتاق سرما با دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام و پروتئین به‌دست‌آمده بلافاصله در دمای ۲۰°- سانتیگراد ذخیره شد. مقدار ۲۵ میکرولیتر از محلول‌های خروجی ستون برداشته شد تا پس از تیمار با سمپل بافر به‌وسیله ژل الکتروفورز SDS-PAGE بررسی شوند.

تعیین غلظت پروتئین (۱۹): غلظت پروتئین بیان‌شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) (سیناژن) به‌عنوان استاندارد انجام گرفت.

حذف اوره از پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده: به‌منظور استفاده از پروتئین تخلیص‌شده جهت ایمنی‌زایی، از آنجا که در فرآیند تخلیص از اوره استفاده می‌شود، برای بازگشت پروتئین نوترکیب تا حد امکان به حالت طبیعی خود، از روش دیالیز با استفاده از شیب غلظت، به‌منظور حذف اوره استفاده شد؛ بدین‌صورت که ابتدا در اوره ۴ مولار، سپس در اوره ۲ مولار و در ادامه، ۱ مولار و در نهایت، در PBS دو مرتبه عمل دیالیز صورت گرفت.

توالی نوکلئوتیدی ژن مورد نظر به کمک نرم‌افزار Genscript بهینه‌سازی شد تا بیان در باکتری *E. coli* بدون مشکل انجام گیرد. شش واحد هیستیدین به انتهای C- ترمینال آن اضافه گردید تا مرحله تخلیص با استفاده از ستون نیکل انجام شود. نهایتاً، در انتهای ۵' و ۳' ژن به ترتیب جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدودکننده NdeI و BamHI تعبیه شدند. پس از اتمام طراحی ژن، توالی ژنی مورد نظر برای سنتز در ناقل pET-21a به شرکت ندای فن سفارش داده شد. پیش از ثبت سفارش، توالی ژن صنعتی مورد نظر به‌منظور بهینه‌سازی، استفاده صحیح از کدون‌ها برای میزبان مورد نظر، تصحیح مقدار محتوای GC، ایجاد ساختمان ثانویه صحیح برای mRNA، تصحیح نواحی پیرایشی و تعدیل جایگاه‌های برش بررسی گردید.

ترانسفورماسیون و تأیید پلاسمیدهای استخراج‌شده از *E. coli* (۱۷): عمل ترانسفورماسیون به روش فیزیکی و شیمیایی انجام شد و پلاسمیدها به روش مینی‌پرب، استخراج و با ژل آگارز مطالعه و بررسی شدند.

بیان ژن نوترکیب: از کشت شبانه کلون‌های جداسازی‌شده، به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح شد و پس از رسیدن OD به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ماده القاکننده پروموتور (IPTG) فرمتاز با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید.

تیمار سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری‌شده جهت بررسی بیان به‌وسیله الکتروفورز (۱۸): سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری‌شده در مرحله فوق به روش دناتوره تیمار شدند. در این روش، سلول‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده B مخلوط و از طریق سونیکاسیون شکسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند و محلول رویی با نسبت ۱ (بافر نمونه) به ۵ (نمونه) با سمپل بافر دارای غلظت ۵x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانده شد. در نهایت، نمونه‌های تیمارشده به‌وسیله ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) از لحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفتند.

آماده‌سازی و تزریقات پروتئین نو ترکیب به موش

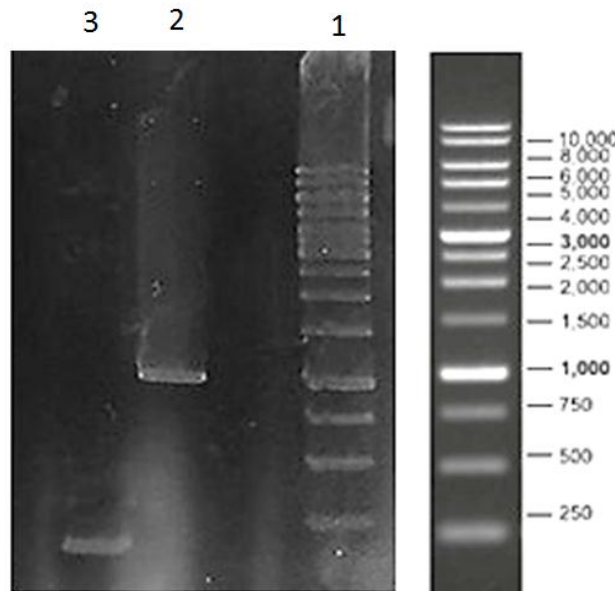
سوری (۲۰): به‌منظور بررسی پاسخ ایمنی، از ۵ عدد موش سوری به‌عنوان تست و ۵ عدد به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر موش، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص‌شده با PBS استریل به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. جهت آماده‌سازی نمونه‌ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوان کامل و ناقص فروند اضافه گردید (حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر)، سپس محتویات همگن شدند. در پایان، به هر موش ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تهیه‌شده (حاوی ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن مورد نظر) به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. این عمل با فاصله ۱۵ روز، سه بار دیگر تکرار گردید.

تعیین تیتراژ آنتی‌بادی به روش الایزای غیرمستقیم (۱۹): در این مرحله به‌منظور تعیین تیتراژ آنتی‌بادی موجود در سرم حیوان، از روش ELISA در مراحل زیر استفاده شد:

- ۱- تثبیت پروتئین نو ترکیب به‌عنوان آنتی‌ژن در کف میکروپلیت؛
 - ۲- شست‌وشوی چاهک‌ها؛
 - ۳- مسدود کردن محل‌های خالی از آنتی‌ژن در کف چاهک‌ها؛
 - ۴- تهیه سریال رقت از سرم حیوانات تست و کنترل؛
 - ۵- افزودن کانژوگه موشی؛
 - ۶- افزودن سوبسترا و توقف آزمایش.
- بعد از ایمن‌سازی حیوانات، ۵۰ برابر LD₅₀ زهر عروس دریایی به موش‌ها تزریق شد و بعد از ۲/۵ روز نتایج آن مورد بررسی و حیوانات تا ۳۰ روز تحت نظر قرار گرفتند.

یافته‌ها

پس از دریافت سازه ژنی مورد در داخل وکتور بیانی از شرکت سازنده، حضور ژن با استفاده از پرایمرهای T7 مورد بررسی قرار گرفت. در این حالت ژن *N-CfTX-2* (با ۸۵۵bp طول) بر روی ژل مشاهده گردید (شکل شماره ۱).

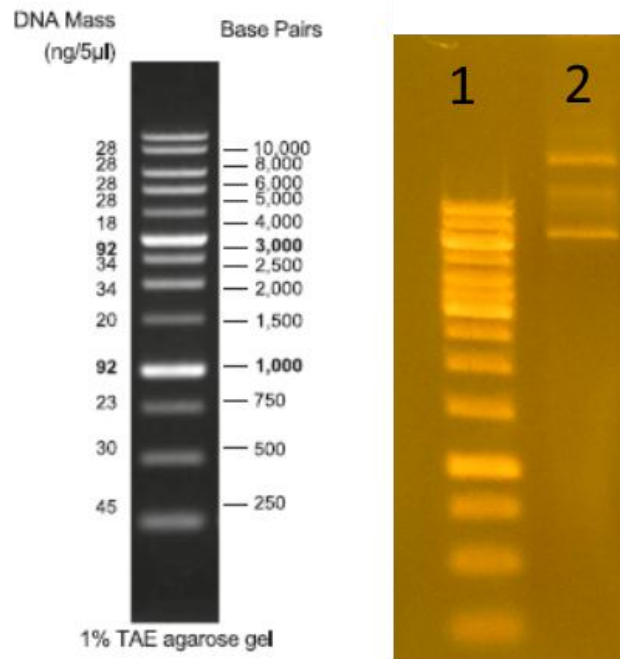


شکل شماره ۱: تصویر تأیید حضور ژن در وکتور.

ستون ۱: نشانگر مولکولی 10000bp؛ ستون ۲: محصول PCR با پرایمرهای T7 بر روی ناقل نو ترکیب pET21 حاوی قطعه مورد نظر؛ ۳: محصول PCR با پرایمرهای T7 بر روی ناقل pET21 فاقد قطعه مورد نظر.

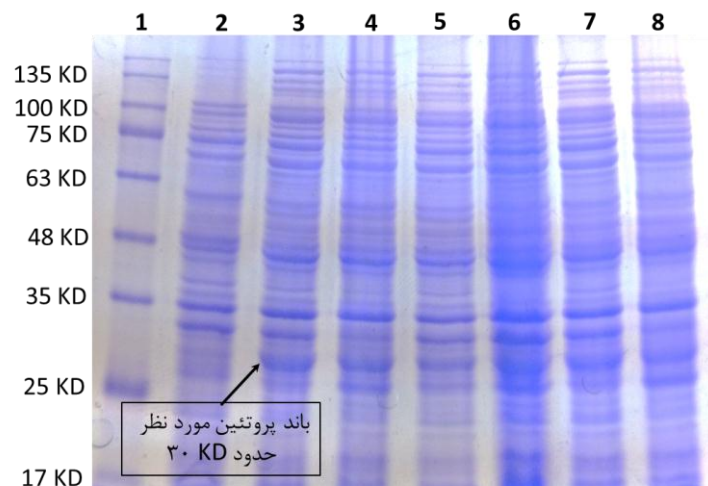
مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۲).

برای تأیید ترانسفر ماسیون وکتورهای حاوی ژن *CFTX-2* به سلول‌های باکتری بعد از استخراج، پلاسمید در ژل الکتروفورز



شکل شماره ۲: تصویر حاصل از استخراج پلاسمید و مشاهده سه حالت کوئل، سوپر کوئل و حالت خطی.
ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی؛ ستون ۲: پلاسمید pET21a حاوی ژن سنتتیک.

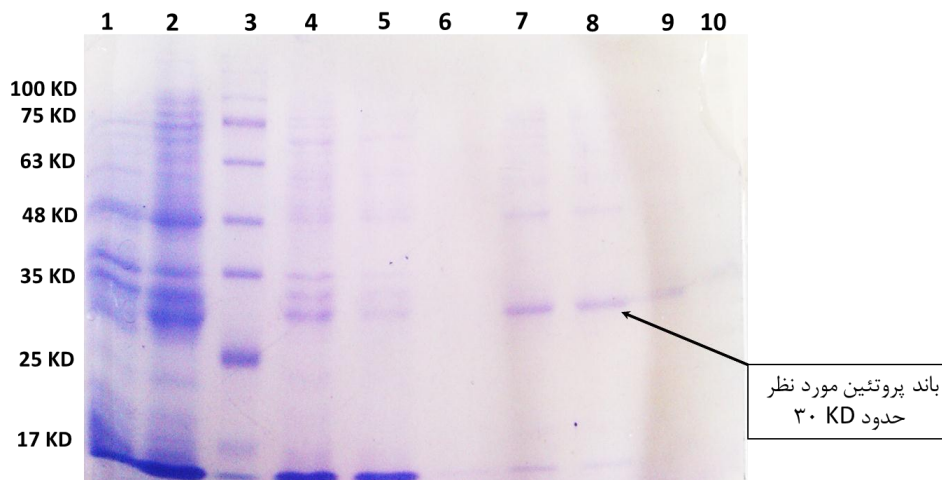
بررسی وضعیت بیان پروتئین در ساعت‌های مختلف، نشان‌دهنده بهترین وضعیت بیان در ۲ ساعت پس از القا بود (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: نتیجه بهینه‌سازی بیان ژن، SDS-PAGE جهت بررسی بیان پروتئین نوترکیب.
ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین؛ ستون ۲: نمونه برداشت‌شده پیش از القا توسط IPTG؛ ستون ۳-۸: نمونه‌های پروتئینی برداشت‌شده، ۲ و ۱۴ ساعت پس از القا با IPTG.

تخلیص پروتئین تحت شرایط دنا توره و به کمک تغییر pH محیط صورت گرفت. شکل شماره ۴، نشان‌دهنده تخلیص نسبی پروتئین نوترکیب نشاندار شده با دنباله هیستیدین می‌باشد.

تخلیص پروتئین نوترکیب نشاندار شده با دنباله هیستیدین، به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA انجام شد. به دلیل شکل‌گیری اجسام درهم‌تنیده پروتئینی در هنگام بیان پروتئین،



شکل شماره ۴: تخلیص پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA (روش دنانوره).
 ستون ۱: نمونه برداشت شده پیش از القا توسط IPTG؛ ستون ۲، نمونه بیان شده پیش از بارگذاری روی ستون کروماتوگرافی نیکل؛
 ستون ۳: نشانگر وزن مولکولی؛ ستون ۴: خروجی ستون کروماتوگرافی؛ ستون‌های ۵ و ۶: شست‌وشوی ستون با بفر شست‌وشو؛
 ستون ۷-۹: شست‌وشوی ستون کروماتوگرافی با بفر استخراج و
 ستون ۱۰: شست‌وشوی ستون با بفر احیاکننده می‌باشد.

با توجه به نمودار استاندارد پروتئین آلبومین گاوی، غلظت میکروگرم محاسبه گردید (جدول).
 نمونه‌های پروتئین نوترکیب مشخص و محتوی آن برحسب

جدول: نتیجه تخلیص پروتئین

نام نمونه	محتوا (میکروگرم)	حجم موجود (میلی لیتر)	غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)	حجم برادفورد (میکرولیتر)	595nm OD
نمونه ۱	۱۱۲	۶۰۰	۱۸۶/۲	۵۰	۰/۲۹۴
نمونه ۲	۱۴۳	۶۰۰	۲۳۹	۵۰	۰/۳۷
نمونه ۳	۱۰۸	۶۰۰	۱۷۹/۹	۵۰	۰/۲۵۸
نمونه ۴	۱۱۵	۶۰۰	۱۹۱/۷	۵۰	۰/۳۰۲
نمونه ۵	۶۱	۶۰۰	۱۰۲/۲	۵۰	۰/۱۷۳
نمونه ۶	۹۱	۶۰۰	۱۵۲/۲	۵۰	۰/۲۴۵
نمونه ۷	۹۷	۶۰۰	۱۶۱/۹	۵۰	۰/۲۵۹
جمع	۷۲۷				

عکس تهیه شد که در ناحیه مورد نظر {(ستون حاوی باکتری‌های
 واجد سازه (pET21a(+)-N CfTX-2)}، باند مشاهده گردید
 (شکل شماره ۵).

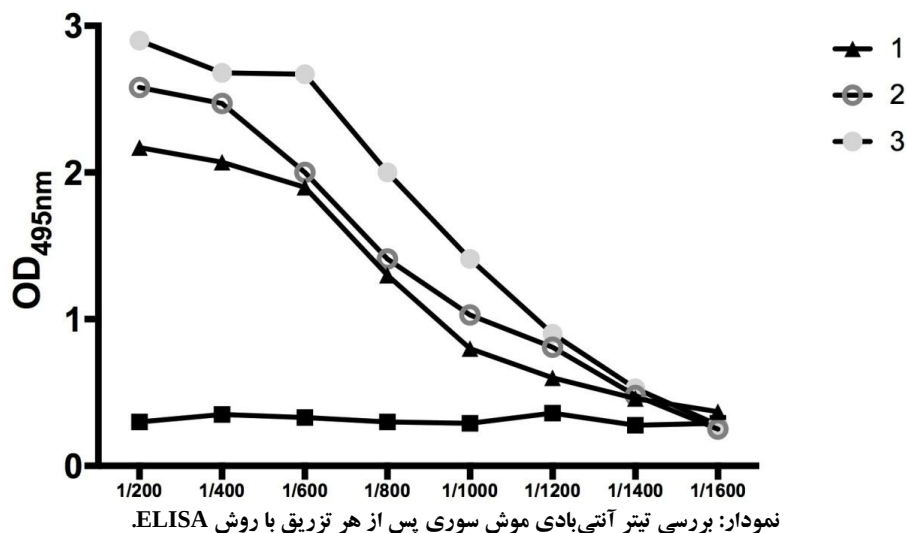
به منظور تأیید پروتئین مورد نظر، بیان ناحیه کاست ژن در باکتری
E. coli به روش لکه گذاری و سترن بررسی شد که بدین منظور از
 زهر عروس دریایی (ونوم) و برای کنترل منفی نیز از BSA
 استفاده گردید. پس از انجام مراحل واکنش، از کاغذ نیتروسلولز



شکل شماره ۵: تأیید پروتئین نو ترکیب بیان شده به وسیله روش وسترن بلات با استفاده از کونژوگه موشی. ستون ۱: نشانگر مولکولی PR0602؛ ستون ۲: نمونه باند پروتئین مورد نظر؛ ستون ۳: کنترل بدون القای IPTG

جداسازی سرم آن‌ها، آزمایش ELISA با پروتئین نو ترکیب انجام شد. نتایج نشان داد بعد از هر مرتبه تزریق، تیتراژ آنتی‌بادی نسبت به کنترل افزایش می‌یابد و در خونگیری آخر نیز بیشترین آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن نو ترکیب ایجاد می‌شود. میانگین تیتراژ آنتی‌بادی در هر مرحله در نمودار نشان داده شده است.

بدین وسیله پروتئین نو ترکیب به وسیله تست وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت. به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق، از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر مرحله تزریق (به استثنای تزریق اول)، از موش‌های تست و شاهد خونگیری به عمل آمد و بعد از



به‌منظور انجام چالش مورد نظر، ۵ سر موش با غلظت ۵۰ برابر LD50 مورد بررسی قرار گرفت که حیوانات ایمن‌شده قادر به تحمل زهر عروس دریایی با غلظت‌های فوق بودند و در مدت ۳۰ روز، زنده و سالم ماندند.

به‌منظور انجام محاسبات، از بسته‌های نرم‌افزار آماری R نسخه ۳٫۱ و ۴ (۲۱) با رابط کاربری R Studio استفاده گردید.

داده‌ها با استفاده از واریانس یک‌طرفه (برای اندازه‌گیری‌های مکرر) تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

بحث

اگرچه تاکنون در خلیج فارس و دریای عمان، عروس دریایی جعبه‌ای گزارش نشده است؛ لیکن گونه‌های مختلفی از عروس دریایی وجود دارد که در فصول خاصی از سال زیاد شده و موجب گزیدگی شناگران می‌شوند. زهر عروس دریایی جعبه‌ای *C. fleckeri*، از قوی‌ترین و کشنده‌ترین زهر موجودات دریایی است (۲۲). زهر این جاندار دارای ترکیبات پروتئینی فعالی است که می‌تواند سریعاً جذب و وارد گردش خون شده و روی دستگاه قلبی - عروقی، همچنین دستگاه عصبی تأثیرگذار باشد (۲۳). شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر با این گونه، نارسایی تنفسی و ایست قلبی است که در ۲۰-۵ دقیقه پس از گزش اتفاق می‌افتد (۱۲، ۲۱). یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های زهر عروس دریایی جعبه‌ای، CfTX-2 بوده که بسیار آنتی‌ژنیک و عامل ایجاد مشکلات قلبی است. با توجه به اینکه تاکنون داروی مؤثری برای درمان گزیدگی با این جاندار یافت نشده و بهترین راه درمان یا پیشگیری، استفاده از پادزهر و یا واکسن مؤثر است (۲۳)؛ لذا تهیه پادزهر یکی از راه‌های درمانی بوده که با مشکلاتی نیز همراه است. دلایل زیادی برای عدم تأثیر مناسب پادزهر وجود دارد که یکی از مهم‌ترین آنها، اثر سریع زهر و کاردیوتوکسیک بودن آن است (۲۴). معمولاً زهر عروس دریایی *C. fleckeri* از طریق عروق به بافت‌هایی همچون قلب می‌رسد و در مواردی، مرگ‌ومیر کمتر از ۱۰ دقیقه اتفاق می‌افتد. Anderso و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند برای خنثی کردن زهر، پادزهر زیادی باید تزریق شود و ۶۰ دقیقه طول می‌کشد تا اثر آن را خنثی کند.

از طرفی دیگر، استفاده از پادزهر بعضی اوقات با واکنش‌های حساسیتی فوری و تأخیری همراه است (۲۵). ایجاد ایمنی غیرفعال برای مقابله با گزش عروس دریایی، مفید و مؤثر نخواهد بود؛ هرچند اغلب مطالعات انجام‌شده برای درمان گزیدگی عروس دریایی با هدف تولید پادزهر انجام می‌گیرد. CfTX-2 تحت عنوان یک ایمونوژن غالب مطرح بوده و می‌تواند به‌عنوان کاندید واکسن نو ترکیب مدنظر قرار گیرد (۲۶). مطالعات بیوشیمیایی نشان می‌دهند جداسازی پروتئین‌های CfTX-1 و CfTX-2 به دلیل همولوژی زیاد با یکدیگر، بسیار مشکل بوده و با روش‌های الکتروفورز و کروماتوگرافی نمی‌توان آنها را از هم جدا کرد (۲۷).

در تحقیق حاضر نیز پروتئین مذکور در *E. coli* تولید شد؛ بدین منظور با بررسی توالی اسیدهای آمینه CfTX-1 و CfTX-2 مشخص گردید در نواحی از سکانس‌ها، بیش از ۹۵٪ همولوژی وجود دارد؛ لذا با حذف این ناحیه، قطعه ژنی ۸۵۵ جفت بازی از ناحیه N- ترمینال CfTX-2 انتخاب شد که میزان همولوژی اسیدهای آمینه آنها کمتر از ۵۳٪ بود. سپس با انتخاب این ناحیه، بهینه‌سازی، همسانه‌سازی و بیان آنتی‌ژن در *E. coli* و میزان تولید آنتی‌بادی در موش مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات موجود در زهر عروس دریایی باعث تحریک سیستم ایمنی سلولی و هومورال می‌شود (۲۸). Vaker و همکاران با بررسی تأثیر زهر عروس دریایی *C. fleckeri* بر روی موش و خوکیه هندی نشان دادند علائم ناشی در اثر گزش انسان به‌وسیله این گونه، قابل مشاهده است. همچنین مرگ در موش و خوکیه هندی پس از تزریق درون وریدی در اثر عارضه قلبی اتفاق می‌افتد (۲۵). در تحقیق حاضر، موش‌هایی که ۴ مرتبه تزریق را در فواصل مشخص دریافت کرده بودند تا ۵۰ برابر LD50 زهر توانستند ایمن باشند و زهر تزریق‌شده فقط موجب ایجاد علائم ضعیف نوروکسیک شامل انقباض موقتی عضلات در موش گردید. مطالعه‌ای دیگر نشان داد سایر عوارض ازدیاد حساسیت فوری و تأخیری که معمولاً در اثر تزریق پادزهر بروز می‌کند با تزریق پروتئین نو ترکیب مذکور، مشاهده نمی‌شود (۲۹).

Breakman و همکاران در سال ۲۰۰۷، با انجام کلون و بیان سکانس کامل CfTX-1 و CfTX-2، میزان ایمنی‌زایی آنها را در موش بررسی و اندازه‌گیری کردند (۳۰).

از آنجایی که قسمت انتهایی این پروتئین‌ها دارای همولوژی ۹۶٪ است؛ جداسازی آنها از یکدیگر بسیار مشکل می‌باشد (۱۴، ۱۵). بنابراین تولید قطعات پروتئینی غیرهمولوگ، همولوگ و بررسی ایمنی‌زایی آنها از اهمیت خاصی برخوردار است. در این مطالعه بیان ژن N-CfTX-2 (غیرهمولوگ) در *E. coli* با موفقیت انجام شد و موش‌های ایمن‌شده ۵۰ برابر LD50 زهر عروس دریایی را تحمل کردند. همچنین اکثر مطالعات انجام‌شده در زمینه درمان گزش عروس دریایی جعبه‌ای مربوط به تولید پادزهر بوده است (۲۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به تأثیر سریع زهر و اثرات کاردیوتوکسینی که گاهی منجر به مرگ می‌شود؛ طراحی واکسن جهت ایجاد مصونیت برای افرادی که بیشتر در معرض گزش عروس دریایی قرار دارند مؤثر خواهد بود. لذا در این تحقیق استفاده از پروتئین نو ترکیب به‌منظور ایمنی‌زایی موش‌ها در برابر زهر عروس دریایی بسیار مؤثر واقع شد.

براساس نتایج، تحلیل آماری، فرض یکسان بودن تیتراژ آنتی‌بادی در نمونه‌گیری‌ها را رد کرده و تولید افزایشی آنتی‌بادی ($p=0/001$) را تأیید می‌کند.

تشکر و قدردانی

در پایان از زحمات اساتید، پژوهشگران محترم مرکز و گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام‌حسین (ع) تهران و پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان در بندرعباس که در به نتیجه رسیدن این پژوهش ما را حمایت معنوی و مالی کردند، سپاسگزاری می‌شود.

References:

- Nabipor I, Khoshdel AR, Golaghaie AR, Tashakori-Beheshti A, Afshar R. Clinico-epidemiologic study on marine envenomations and injuries in south Iran, persian gulf coasts. *Med Toxicol J* 2012;4(3):112-15. Link
- Gallin W. Sequence of an acidic ribosomal protein from the jellyfish polyorchis penicillatus. *Biochem Cell Biol* 1991;69(2-3):211-15. PubMed
- Currie BJ. Marine antivenoms. *J Toxicol Clin Toxicol* 2003;41(3):301-8. PubMed
- Zarezadeh R. Dangerous marine animals of the Persian Gulf and Oman Sea. Tehran: Aquaculture Scientific Publisher; 2010 . p. 12-40. [Text in Persian]
- Alam MJ, Ashraf KU. Prediction of an epitope-based computational vaccine strategy for gaining concurrent immunization against the venom proteins of Australian box jellyfish. *Toxicol Int* 2013;20(3):235-53. PubMed
- Ponce D, Brinkman DL, Luna-Ramírez K, Wright CE, Dorantes-Aranda JJ. Comparative study of the toxic effects of chrysaora quinquecirrha (cnidaria: scyphozoa) and chironex fleckeri (cnidaria: Cubozoa) venoms using cell-based assays. *Toxicon* 2015;106:57-67. PubMed
- White J. Venomous animals: Clinical toxinology. *EXS* 2010;100:233-91. PubMed
- Nabipour I, editor. The venomous animals of the Persian Gulf. Iran: Bushehr University of Medical Sciences Press; 2012. p. 6-30. Link
- Vera C, Kolbach M, Zegpi MS, Vera F, Lonza JP. Jellyfish sting. An update. *Rev Med Chil* 2004;132(2):233-41. PubMed
- Nimorakiotakis B, Winkel KD. Marine envenomations. Part 1-jellyfish. *Aust Fam Physician* 2003;32(12):969-74. PubMed

11. Mariottini GL, Pane L. Mediterranean jellyfish venoms: A review on scyphomedusae. *Mar Drugs* 2010;8(4):1122-52. PubMed
12. Moosler A, Rinehart KL, Grimmelikhuijzen CJ. Isolation of three novel neuropeptides, the cyanea- rfamides i-iii, from scyphomedusae. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236(3):743-9. PubMed
13. Brinkman D, Konstantakopoulos N, McInerney M, Mulvenna J, Seymour J. Chironex fleckeri (Box Jellyfish) venom proteins: Expansion of a Cnidarian toxin family that elicit variable cytolytic and cardiovascular effects. *J Biol Chem* 2014;289(8):4798-812. PubMed
14. Brinkman D, Burnell J. Identification, Cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish, Chironex fleckeri. *Toxicon*. 2007;50(6):850-60. Link
15. Brinkman DL, Xinying J, Jeremy P, Dharendra K, Debasis D, David K, et al. Transcriptome and venom proteome of the box jellyfish chironex fleckeri. *BMC Genomics* 2015;16(1):407. Link
16. Mariottini GL, Pane L. Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins (Basel)* 2014;6(1):108-51. PMC
17. Rusel D, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
18. Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: Cloning, expression, purification and proteolytic activity. *Protein Expr Purif* 1999;15(2):221-7. PubMed
19. Daniel M, Bollag S, Edelstein G. Protein Methods. 2nd ed. new York: Wiley; 1996. Chapters: 2, 3, 6, 8. Link
20. Fan J, Zhuang Y, Li B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging. *Nutrients* 2013;5(1):223-33. Link
21. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, 2011. Link
22. Masoudi M, Honari H, Minaei M, Abdollahi M. Expression of blf1 gene of burkholderia pseudomallei in escherichia coli and assessment of antibody titer in mouse. *Qom Univ Med Sci J* 2017;11(10):30-9.[Full Text in Persian] Link
23. Jouiaei M, Casewell NR, Yanagihara AA, Nouwens A, Cribb BW, Whitehead D, et al. Firing the sting: Chemically induced discharge of cnidarian reveals novel proteins and peptides from box jellyfish (*chironex fleckeri*) venom. *Toxins (Basel)* 2015;7(3):936-50. PubMed
24. Isbister GK. Antivenom efficacy or effectiveness: The Australian experience. *Toxicology* 2010;268(3):148-54. PubMed
25. Andreosso A, Smout MJ, Seymour JE. Dose and time dependence of box jellyfish antivenom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2014;20:34. PubMed
26. Mariottini GL. Hemolytic venoms from marine cnidarian jellyfish—an overview. *J Venom Res* 2014;5:22-32. PubMed
27. Brinkman D, Burnell J. Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, chironex fleckeri. *Toxicon* 2008;51(5):853-63. PubMed
28. Bloom DA, Radwan FF, Burnett JW. Toxinological and immunological studies of capillary electrophoresis fractionated chrysaora quinquecirrha fishing tentacle and chironex fiekeri southcott nematocyst venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicol Pharmacol* 2001;128(1):75-90. Link
29. Sutherland SK. Antivenom use in Australia. Premedication, adverse reactions and the use of venom detection kits. *Med J Aust* 1992;157(11-12):734-9. PubMed
30. Brinkman DL, Konstantakopoulos N, McInerney BV, Mulvenna J, Seymour JE, Isbister GK. Chironex fleckeri (box jellyfish) venom proteins expansion of a cnidarian toxin family that elicits variable cytolytic and cardiovascular effects. *J Biol Chem* 2014;289(8):4798-812. PubMed