*Journal of Police Medicine*

Summer 2014; Vol. 3, No. 2: 101-106

Original Article

# Polyclonal Antibody Production and Purification against Tetanospasmin

**Received:** 4 January 2014 **Revised:** 14 June 2014 **Accepted:** 19 June 2014

Shahram Nazarian[1]
Golamreza Olad[2]
Mohhamad Ali Arefpour[3*]
Jafar Salimian[4]
Mohhamd Javad Bagheripour[5]
Mohhamd Ebrahim Minaie[5]
Ehsan Rezaie[6]

[1]Assistant Professor, Biology Research Centre, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

[2]PhD, Molecular Biotechnology, Applied Biotechnology Research Centre, Baqitatolah University, Tehran, Iran.

[3]MSc, Cell and Molecular Biology, Biology Research Centre, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

[4]PhD, Immunology, Chemical Injuries Research Center, Baqitatolah University, Tehran, Iran.

[5]PhD Student, Nanobiotechnology, Biology Research Centre, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

[6]MSc, Cell and Molecular Biology, Applied Biotechnology Research Centre, Baqitatolah University, Tehran, Iran.

[*]**Corresponding Author:**
Mohhamad Ali Arefpour
Tel: (+98)2171104934
e-mail: kparef@ihu.ac.ir

## ABSTRACT

***Background:*** Tetanus is a kind of neurological disease characterized by rigidity and spasm of muscles. The causative agent of this fatal disease is known as Tetanus Toxin, Clostridium tetani. The Tetanospasmin consists of three chains: $H_N$, $H_C$ and L. The $H_C$ chain is binds domain and immunogenic part of toxin, so it is proposed as a vaccine candidate. In this study, the recombinant $H_C$ protein obtained from synthetic $H_C$ gene was investigated for its immunogenicity. Additionally, antiserum and polyclonal antibody was prepared against this agent.

***Materials and Methods:*** Recombinant His-tagged Hc protein was expressed in Escherichia coli Bl21 DE3 and purified with Ni-NTA column. Then, rHc protein was used for animal immunization. Along with survey of antibody titer, serum polyclonal antibody was purified by G column.

***Results:*** After gene optimization, expression and purification, $rH_C$ protein was confirmed by western blot technique. Immunization of mice showed high titer of antibody against recombinant protein. Antibody purification from immunized animal serum was carried out as well.

***Conclusion:*** The recombinant $H_C$ protein production and its immunogenicity investigation showed high titer of antibody against Tetanospasmin.

***Keywords:*** tetanus, Hc chain, recombinant protein, polyclonal antibody

[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-05-19 ]

[ DOI: 10.30505/3.2.101 ]

تابستان ۱۳۹۳ – دوره ۳ – شماره ۲– صفحات ۱۰۱-۱۰۶

**مجله طب انتظامی**

مقاله تحقیقی

# تولید و تخلیص آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه تتانوتوکسین

**تاریخ دریافت:** ۱۵ بهمن ۱۳۹۲ **تاریخ اصلاح:** ۲۴ خرداد ۱۳۹۳ **تاریخ پذیرش:** ۲۹ خرداد ۱۳۹۳

**شهرام نظریان**[۱]
**غلامرضا اولاد**[۲]
**محمدعلی عارف پور**[۳*]
**جعفر سلیمیان**[۴]
**محمد جواد باقری پور**[۵]
**محمد ابراهیم مینایی**[۵]
**احسان رضایی**[۶]

[۱]استادیار، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.
[۲]دکتری، بیوتکنولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.
[۳]کارشناسی ارشد، بیولوژی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.
[۴]دکتری، ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.
[۵]دانشجوی دکتری، نانوبیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.
[۶]کارشناسی ارشد، بیولوژی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:**
محمدعلی عارف پور
تلفن: ۲۱۷۱۱۰۴۹۳۴(+۹۸)
پست الکترونیک:
kparef@ihu.ac.ir

## چکیده

**مقدمه:** کزاز نوعی بیماری دستگاه اعصاب است که با افزایش صلابت و گرفتگی های عضلات مشخص می‌شود. عامل این بیماری کشنده، توکسین کلستریدیوم تتانی می‌باشد. تتانواسپاسمین شامل سه زنجیره L، $H_N$ و $H_C$ می‌باشد. زنجیره $H_C$ بخش اتصال‌دهنده و ایمونوژنیک آن است و به عنوان کاندید واکسن مطرح می‌باشد. هدف از این مطالعه استفاده از ژن صناعی زنجیره $H_C$ تتانواسپاسمین و بررسی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب حاصل از آن و نهایتاً تهیه سرم و آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آن می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** از میزبان E. coli Bl21 DE3، دارای وکتور pET28a حامل ژن نوترکیب زنجیره $H_C$ تتانوتوکسین، جهت بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب مورد مطالعه استفاده شد. ایمنی‌زایی آن در حیوان آزمایشگاهی صورت گرفت. ضمن بررسی تیتر آنتی‌بادی، آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه تتانوتوکسین از سرم تخلیص گردید.

**یافته‌ها:** پس از بهینه‌سازی بیان و تخلیص، پروتئین نوترکیب بیانی حاصل با وسترن‌بلاتینگ تأیید گردید. ایمنی‌زایی در مدل موش نشان از تیتر بالای آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب داشت. تخلیص آنتی‌بادی پلی‌کلونال از سرم حیوانات ایمن به روش ستون G انجام گردید.

**نتیجه‌گیری:** تولید پروتئین نوترکیب بخش $H_C$ و بررسی ایمنی‌زایی آن، نشان‌دهنده تیتر بالایی از آنتی‌بادی پلی‌کلونال در سرم حیوان علیه تتانوتوکسین می‌باشد.

**کلید واژه‌ها:** کزاز، تتانواسپاسمین، زنجیره $H_C$، واکسن نوترکیب

## مقدمه

بیماری کزاز یک بیماری عفونی بسیار کشنده برای انسان و بیشتر پستانداران است. این بیماری بوسیله توکسین کزاز ایجاد می‌شود و از خصوصیات آن ایجاد واکنش ازدیاد حساسیت در برابر تحریکات، انقباض عضلات و تشنج است. توکسین کزاز یا تتانوتوکسین به وسیله باکتری کلستریدیوم تتانی ترشح می‌گردد [۱] و سیستم



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-05-19 ]

[ DOI: 10.30505/3.2.101 ]

*Journal of Police Medicine*
Summer 2014; Vol. 3, No. 2: 101-106

عصبی را مورد هدف قرار می‌دهد. گروه کربوکسیل انتهایی پلی‌پپتید زنجیره سنگین این توکسین بطور غیر قابل برگشت به دو مولکول گانگلیوزید (GD1b و GT1b) در سلول‌های عصبی متصل می‌شود و بدین واسطه به درون سلول راه می‌یابد. سپس در خلاف جهت حرکت جریان عصبی، با عبور از سیناپس‌های عصبی (به وسیله سیستم انتقال برگشتی[1] در آکسون)، به نخاع و سپس به ساقه مغز می‌رسد. بعد از آن، توکسین در پایانه سلول‌های مهاری که شامل نورون‌های بینابینی ترشح‌کننده گلایسین[2] و گاما آمینوبوتیریک‌اسید[3] (دو ماده، عامل تنظیم انقباضات عضلات) می‌شوند، انتشار می‌یابد. در این مرحله، توکسین باعث تخریب پروتئین سیناپتوبروین (که برای ادغام وزیکول های حاوی واسطه‌های عصبی با غشای پیش‌سیناپسی لازم است) می‌شود. در نتیجه، رهاسازی گلایسین و GABA متوقف شده و نورون های حرکتی مهار نمی‌شوند که حاصل آن هیپررفلکسی، اسپاسم و فلج عضلانی می‌باشد [۲]. گاهی این اسپاسم‌ها به حدی شدید است که می‌تواند موجب صدمات جدی نظیر شکستگی دنده‌ها و مهره‌ها و حتی خفگی شود [۴ و ۳]. ژن این توکسین در یک پلاسمید ۷۵ کیلو بازی رمزدهی می‌شود و به صورت یک پلی پپتید منفرد با وزن ملکولی ۱۵۰ کیلودالتون سنتز می‌گردد. پلی پپتید حاصل، دارای دو بخش زنجیره سبک (L) و زنجیره سنگین (شامل دو قطعه $H_N$ و $H_C$) می‌باشد [۷-۴] که بخش $H_C$ با وزن حدود ۵۰ کیلودالتون، قسمت ایمونوژنیک و متصل‌شونده این توکسین به سلول نورونی است. از دهه ۱۹۵۰ استفاده از واکسن علیه تتانوس آغاز شده که تاکنون نیز ادامه دارد [۸]. آنتی سرم ضد تتانواسپاسمین، از بدن در هنگام مواجهه با کزاز محافظت می‌کند [۹]. مصونیت‌بخشی مصدومین با این توکسین و اثر استفاده از آنتی‌سرم علیه آن و نجات از مرگ، ضرورت تولید آنرا دوچندان می‌کند. تاکنون برای تولید این آنتی سرم (با کاربرد ایمنی غیر فعال) و همچنین مصونیت‌زایی فرد در برابر بیماری کزاز (ایمنی فعال) از توکسوئید آن استفاده شده است. در حالیکه به‌تازگی بسیاری از محققین توانسته‌اند استفاده از زیرواحدهای نوترکیب این توکسین را با ویژگی‌های منحصر به فرد آن، جایگزین نمایند [۱۰]. هدف ما در این مطالعه نیز تولید، جداسازی و تخلیص قسمت $H_C$ تتانوتوکسین با حداکثرخاصیت ایمنوژنیک به عنوان کاندید برتر واکسن نوترکیب علیه کزاز و استفاده از این پروتئین نوترکیب جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آن می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

برای بیان پروتئین نوترکیب مورد مطالعه، از وکتور pET28a حامل ژن صناعی زنجیره $H_C$ تتانوتوکسین در میزبان E.coli Bl21-DE3 استفاده شد. پس از بیان اولیه پروتئین نوترکیب $H_C$، عصاره خام سلول‌های بیانی بر روی ژل SDS-PAGE (شرکت Bioneer) مورد بررسی قرار گرفت. سپس بیان پروتئین نوترکیب در شرایط بهینه (کانامایسین با غلظت ۲۰μg /ml، افزودن IPTG با غلظت ۱mM در OD = ۰/۶، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶ ساعت) و مقیاس بالای آزمایشگاهی (۲۰۰ میلی‌لیتر) در مقایسه با نمونه کنترل منفی صورت گرفت. پروتئین نوترکیب بیانی حاصل با وسترن بلاتینگ تأیید گردید. مایع رویی جدا شده حاوی پروتئین شکل محلول، جهت تخلیص استفاده شد. تخلیص پروتئین نوترکیب به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی و با استفاده از شیب غلظت ایمیدازول در ستون Ni-NTA ساخت شرکت کیاژن و کیت ارائه‌شده از همین شرکت محقق شد. محصولات جمع‌آوری شده از ستون کروماتوگرافی با ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پروتئین‌های حاصل نیز به روش برادفورد و با استفاده از اسپکتروفتومتری (شرکت CECIL) اندازه‌گیری گردید [۱۱].

ایمنی‌زایی در مدل موش، با استفاده از پروتئین نوترکیب تخلیص شده حاصل، در بافر PBS و به همراه ادجوان کامل و یا ناقص (بانسبت حجمی/حجمی) بر اساس جدول ۱ استفاده گردید. تعداد ۵ موش بعنوان گروه تست انتخاب و به هر موش ۲۰۰ میکرو لیتر از مخلوط تهیه شده، حاوی ۱۰ میکروگرم از آنتی‌ژن موردنظر، بصورت زیر جلدی تزریق شد. جهت تأیید پاسخ و جلوگیری از بررسی جواب کاذب به ۵ موش به عنوان گروه شاهد مطابق جدول ۱ فقط PBS استریل تزریق شد.

برای بررسی ایمنی‌زایی از حیوانات ایمن و غیر ایمن (گروه آزمون و شاهد) خون‌گیری و جداسازی سرم انجام گردید. در مرحله بعد آنتی‌بادی‌های تولیدشده موجود در سرم به روش الیزا (با استفاده از

**جدول ۱:** زمان، نحوه و مقادیر پروتئین نوترکیب تزریقی در مراحل ایمن سازی موش‌ها.

| تزریق | روز | مقدار آنتی ژن تزریقی μg/mouse | نوع ادجوانت |
|---|---|---|---|
| اول | ۰ | ۱۰ | کامل |
| دوم | ۲۰ | ۱۰ | ناقص |
| سوم | ۳۴ | ۱۰ | ناقص |
| چهارم | ۴۸ | ۱۰ | بدون ادجوانت |



1: Retrograde, 2: Glycine, 3: GABA

[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-05-19 ]

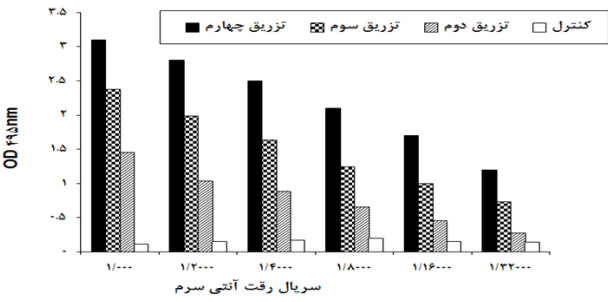
[ DOI: 10.30505/3.2.101 ]

**مجله طب انتظامی**
تابستان ۱۳۹۳ - دوره۳ - شماره ۲- صفحات ۱۰۱-۱۰۶

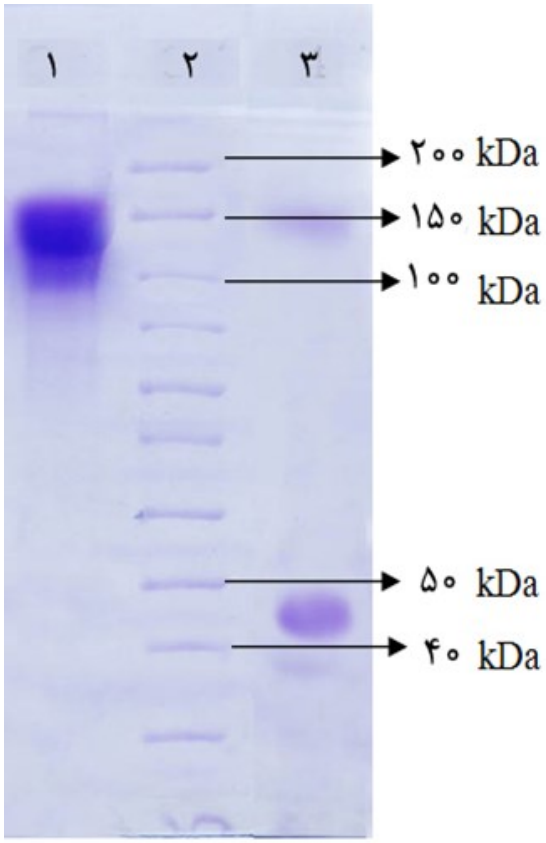
دستگاه الایزا ریدر شرکت DYNEX) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس تخلیص آنتی‌بادی با استفاده از ستون G با روش زیر انجام شد. ابتدا ستون با ۵ میلی‌لیتر از محلول‌های mM۱۰۰Tris و mM ۱۰Tris با pH = ۸ در سه نوبت (هر نوبت ۵ میلی لیتر) شسته و اجازه داده شد تا بافر از ستون عبور کند. سپس ۰/۱ حجم سرم، محلول Tris 1M با pH = ۸ به سرم افزوده و پس از ورتکس به ستون منتقل گردید و خروجی ستون جمع آوری شد. ستون با ۵ میلی‌لیتر از محلول‌های mM ۱۰۰ Tris و mM ۱۰ Tris با pH = ۸ در سه نوبت (هر نوبت ۵ میلی‌لیتر) شسته و خروجی ستون جمع‌آوری گردید. در مرحله بعد ستون با ۵ میلی‌لیتر محلول گلایسین mM ۱۰۰ با pH = ۳در سه نوبت (هر نوبت ۵ میلی‌لیتر) شسته و خروجی ستون در تیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری جمع‌آوری شد. درنهایت نمونه‌های جمع‌آوری‌شده پس از تعیین غلظت، با SDS-PAGE آنالیز شدند. پس از تخلیص آنتی‌بادی و تعیین غلظت آن، از آنتی‌بادی با غلظت mg/ml ۲ سریال رقت تهیه و از آن برای الیزا استفاده شد. برای ارزیابی توانایی شناسایی توکسین کزاز توسط آنتی‌بادی‌های تخلیص شده، از توکسوئید کزاز (واکسن دوگانه تهیه‌شده از موسسه سرم‌سازی رازی) استفاده گردید. نمونه توکسوئید به‌عنوان آنتی‌ژن در روش الیزا مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته‌ها**

نتایج واکنش الیزا جهت سنجش میزان آنتی‌بادی موجود در سرم موش‌ها (با استفاده از ۱ میکروگرم از زیرواحد نوترکیب تخلیص شده در هر چاهک) در شکل ۱ نشان داده شده است. مطابق این شکل، نتایج سنجش آنتی‌بادی در نمونه‌های سرم حاصل از اولین خون‌گیری (یک هفته پس از تزریق دوم)، و سرم حاصل از دومین خون‌گیری (یک هفته پس از تزریق سوم) و سرم حاصل از سومین خون‌گیری (یک هفته پس از تزریق چهارم) و همچنین سرم گروه شاهد، با سریال رقت از ۱/۱۰۰۰ تا ۱/۳۲۰۰۰ به شرح ذیل است.




**شکل ۱:** بررسی تیتر آنتی‌بادی تولیدشده در موش‌های ایمن با پروتئین نوترکیب.




**شکل ۲:** بررسی آنتی‌بادی تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE ستون ۱) آنتی‌بادی تخلیص شده ستون ۲) مارکر پروتئینی. ستون ۳) آنتی‌بادی تخلیص شده تحت تأثیر ۲ME

نتایج، تیتر بالایی را از تولید آنتی‌بادی علیه این آنتی ژن نشان می‌دهد.

همان‌طور که در شکل ۱ مشخص شده، پس از هر بار تزریق میزان تولید آنتی‌بادی در بدن موش‌ها افزایش یافته است به‌گونه‌ای که در الیزای حاصل از سومین خون‌گیری در رقت‌های پایین‌تر از ۱/۱۰۰۰ میزان جذب (OD) قرائت‌شده توسط دستگاه بالاتر از عدد ۳/۵ بوده است. نتایج بررسی آنتی‌بادی IgG تخلیص شده از سرم موش‌های ایمن شده با ستون G، بر روی ژل SDS-PAGE (شکل ۲) نشان از تأیید روند استخراج و تخلیص آنتی‌بادی پلی کلونال دارد. بر اساس روش برادفورد غلظت آنتی‌بادی تخلیص شده، µg/µl ۱ محاسبه گردید.

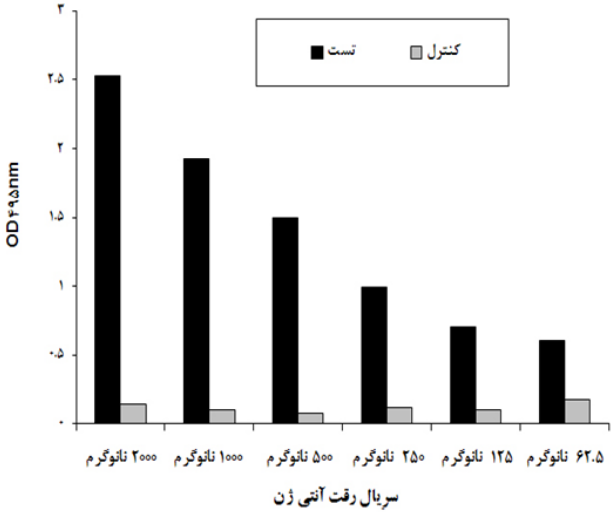
پس از تخلیص آنتی‌بادی و تعیین غلظت آن (mg/ml ۱)، آزمایش الیزا با استفاده از این آنتی‌بادی علیه توکسوئید کزاز انجام شد. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود آنتی‌بادی حاصل توانسته است توکسوئید کزاز را به‌خوبی شناسایی کند.



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-05-19 ]

[ DOI: 10.30505/3.2.101 ]

*Journal of Police Medicine*
Summer 2014; Vol. 3, No. 2: 101-106




**شکل ۳:** بررسی واکنش آنتی‌بادی تخلیص شده با توکسوئید کزاز

## بحث و نتیجه‌گیری

از مهم‌ترین ویژگی‌های این مطالعه انتخاب بخشی یا زیر واحدی از این توکسین با آنتی ژنیسیته بالا بود. استفاده از نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که زیر واحد اتصالی سم تتانی نقش مهمی در عملکرد توکسین از خود نشان می‌دهد و به همین دلیل می‌تواند کاندید خوبی برای استفاده از آن به‌عنوان واکسن باشد [۱۳ و ۱۲]، به همین دلیل در این مطالعه انتخاب پروتئین این زیر واحد جهت تزریق به حیوان و تولید آنتی‌بادی موشی علیه توکسین کزاز مورد توجه و استفاده قرار گرفت. نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که این پروتئین دارای اپی‌توپ‌هایی در ناحیه یک‌سوم بخش انتهایی خود است. اپی‌توپ‌های این بخش از سم در اتصال آن به گیرنده‌های سطحی سلول‌های هدف، نقش کلیدی دارند [۱۴]. بخش زیر واحد اتصالی سم بوتولیسم نیز از این حیث تشابه آمینواسیدی بالایی با تتانی دارند [۱۴ و ۱۲]. بر این اساس مطالعات انجام‌شده بر روی زیر واحد اتصالی سم بوتولیسم توانست کمک زیادی در فهم عملکرد بخش‌های مختلف سم تتانی نماید. از طرفی دیگر نتایج مطالعات قبلی در خصوص استفاده از بخش‌هایی از زیر واحد اتصالی سم بوتولیسم نشان داد که قطعات پروتئینی کوچک‌تر انتخاب شده از زیر واحد اتصالی، به‌اندازه کافی توانایی خنثی نمودن عملکرد سم را ندارند [۱۵]. لذا در مطالعه حاضر به جای استفاده از بخش کوتاهی از زیر واحد اتصالی سم تتانی، به جهت افزایش میزان ایمنی‌زایی، کل زیر واحد اتصالی به صورت نوترکیب تولید و مورد استفاده قرار گرفت. برای تولید پروتئین نوترکیب از سیستم بیانی وکتور pET که امکان دسترسی به بیان و تولید مقدار بالای پروتئین را در میزبان اشریشیاکولی فراهم می‌سازد [۱۶]، استفاده گردید. از ویژگی مهم این سیستم، افزودن توالی شش گانه هیستیدنی به پروتئین هدف می‌باشد که امکان تخلیص پروتئین با روش میل ترکیب را در مدت زمان کوتاهی فراهم می سازد. در نهایت پروتئین نوترکیب با مقدار بالا و خلوص قابل‌قبول تولید شد. ایمنی‌زائی پروتئین نوترکیب به روش الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که در نتایج مشخص گردیده است، تیتر آنتی‌بادی تولید شده در حد بالایی بوده که این امر نشان می‌دهد پروتئین نوترکیب مورد استفاده یک ایمونوژن مناسب می‌باشد. نتایج الیزای مربوط به توکسوئید تتانی حاکی از این مطلب است که آنتی بادی‌های تولید شده بر علیه زیر واحد اتصالی می‌توانند توکسین کامل باکتری را نیز شناسایی کرده و به آن متصل شوند. با درنظر گرفتن نتایج مشابه مربوط به استفاده از زیر واحد اتصالی سم کلستریدیوم بوتولینوم [۱۵] ، می‌توان امیدوار بود که پروتئین نوترکیب مورد مطالعه بتواند عملکرد توکسین تتانی را خنثی نماید. بر اساس نتایج حاضر به نظر می‌رسد زیر واحد اتصالی سم تتانی، کاندید مناسبی برای بررسی توانایی استفاده از آن به عنوان واکسن نوترکیب بر علیه سم تتانی باشد. ارزیابی چنین فرضی نیازمند بررسی کامل پاسخ‌های ایمنی ناشی از واکسیناسیون با پروتئین نوترکیب باشد که در مطالعات بعدی دنبال خواهد شد.

## منابع

1. Hassel B. Tetanus: pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. Toxins 2013; 5: 73 -83.
2. Toivonen JM, Oliván S, Osta R. Tetanus toxin C-fragment: the courier and the cure? Toxins 2010; 2: 2622-44.
3. Farrar JJ, Yen LM, Cook T, Fairweather N, Binh N, Parry J, et al. Tetanus. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2000; 69: 292–301.
4. Matsuda M. Tetanus toxin functional fragment antigen and tetanus vaccine. Google Patents 2002.
5. Calvo AC, Olivan S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. Int J Mol Sci 2012; 13: 6883-901.
6. Yu YZ, Gong ZW, Ma Y, Zhang SM, Zhu HQ, Wang WB, et al. Co-expression of tetanus toxin fragment C in Escherichia coli with thioredoxin and its evaluation as an effective subunit vaccine candidate. Vaccine 2011; 29: 5978-85.
7. Demain AL, Fang A. Method for production of tetanus toxin using media substantially free of animal products. Google Patents 2003.
8. Danilova E, Shiryayev A, Kristoffersen EK, Sjursen



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-05-19 ]

[ DOI: 10.30505/3.2.101 ]

H. Attenuated immune response to tetanus toxoid in young healthy men protected against tetanus. Vaccine 2005; 23: 4980–3.
9. Control CfD, Prevention. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. Atkinson W, Wolfe S, Hamborsky J, McIntyre L, eds 2007; 11.
10. Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, et al. Plant-based vaccines: unique advantages. Vaccine 2001; 19: 2742-8.
11. Bollag DM, Rozycki MD, Stuart J. Protein methods. 2nd ed. Jhon Wiley and Sons Publications 1996.
12. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends Biochem Sci 2002; 27: 552-8.
13. Aref Pour MA, Nazarin Sh, Olad GhR, Rezaie E, Salimian J. Expression and purification of recombinant heavy chain (Hc) of Tetanus toxin in prokaryotic expression system. J Shahrekord Univ Med Sci 2014; 16: 106-13. (Persian)
14. Montecucco C, Schiavo G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. Q Rev Biophys 1995; 28: 423-72.
15. Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Valipour E, Basiri M, Nazarian Sh, Amani j, et al. Immunogenic and protective potentials of recombinant receptor binding domain and a C-terminal fragment of Clostridium botulinum neurotoxin type E. Ir J Biotechnol (IJB) 2011; 9: 181-7.
16. Khalesi R, Nazarian Sh, Amani J, Ehsaei Z, Mansouri M, Moazeni SM. Cloning and expression of enterotoxigenic Escherichia coli heat Labile Toxin B subunit (LTB) as a vaccine candidate. Kowsar Med J 2009; 14: 95-100. (Persian)

[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-05-19 ]

[ DOI: 10.30505/3.2.101 ]