نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۸۵، زمستان ۱۳۸۸

تخلیص و جدا سازی پادگن های اگزو توکسین (PA،LF،EF) *Bacillus anthracis* سویه 34F2 به روش اولترا فیلتر و HPLC

• **فریبا گلچین فر** (نویسنده مسئول) بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
• **رسول مدنی**
بخش بیوتکنولوژی ،موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی
• **غلامرضا موذنی جولا**
بخش تولید واکسن‌های هوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
تاریخ دریافت: آذرماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۲۲۶۵- داخلی ۴۵۷۰۰۳۸_ ۰۲۶۱
Email: f_golchinfar@yahoo.com

چکیده

بیماری آنتراکس(شاربن) یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان ودام می باشد. عامل آن باکتری گرم مثبت و میله ای شکل *B.anthracis* است. *B.anthracis* دارای دو عامل بیماری زای شناخته شده شامل یک سم پروتئینی سه قسمتی ویک کپسول پلی دی گلوتامیک اسید می‌باشد. با توجه به این که توکسین باکتری نقش مهمی در بیماریزایی وتهیه واکسن دارد، لذا جداسازی و تخلیص آن همواره مورد توجه محققین بوده است. سم سه قسمتی شامل پادگن های PA, LF, EF می‌باشد. درک بیشتر اکتیویته سم، نقش هر یک از اجزأ توکسین در بیماری زائی وحفاظت در برابر بیماری وتهیه پادگن برای به کار رفتن در سیستم های تشخیص نیازمند درجات بالای تخلیص می‌باشد. در این تحقیق پس از کشت باکتری روی محیط کشت اختصاصی و جدا نمودن محلول رویی از پیکره باکتری، این محلول از اولترا فیلتر(UF) با Cutoff ۳۰۰۰۰ و ۵۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ عبور داده شد و سپس عملیات ترسیب با سولفات آمونیوم و دیالیز انجام گردید.که نهایتاً با استفاده از دستگاه HPLC پادگن های توکسین *B.anthracis* از یکدیگر جدا شد و در روش الکتروفورز این پادگن ها (EF,LF,PA) به ترتیب با وزن مولکولی های ۸۶، ۸۷، ۸۵ کیلودالتون و با خلوص بالا مشخص گردید.

کلمات کلیدی: *B.anthracis*، HPLC، جداسازی، تخلیص

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 85 pp: 2-7

Purification & separation of *Bacillus anthracis* 34F2 Antigens with UF & HPLC

By: Golchinfar,F. , Madani,R. ,Biotechnology Dept. Razi Vaccine & Serum Research Institute, Moazeni Jula, G. , Aerobic Bacterial Vaccines Dept. Razi Vaccine & Serum Research Institute.

Anthrax is one of the important zoonose disease between human and cattle. *Bacillus anthracis* is a gram- positive bacterium which its tripartite protein toxin contains protective antigen (PA), edema factor (EF) and lethal factor (LF) and a poly D- glutamic acid capsule. A recent resurgence of interest in *B.anthracis* resulted in improved methods for production, separation and purification of the known toxin components. This in turn has lead to development of much more sensitive toxin-detection systems. Further understanding of toxin activity, the role of individual components in protection against the disease and the production of antigens for use in diagnostic requires high-degree of purity. In this study after cultivation of bacteria and separaing the supernatant the solution was passed through different membrane of ultra filter system with 30000, 50000 and 100000 Dalton molecular weight cut off respectively. The final solution was treated with ammonium sulphate and the antigens prepared which after dialysis have passed through gel chromatography of HPLC for separating of *B.anthracis* toxins. Finaly three toxin antigens EF,LF and PA with 86, 87 and 85 K dalton molecular weight of high purity were obtained.

Key words: *B.anthracis* , HPLC, separation , purification, EF,LF,PA Proteins

مقدمه

باسیلوس ها از ارگانیسم های شایع محیطی بوده و در آزمایشگاه ها اغلب به عنوان آلوده کننده محیط های کشت و نمونه های آزمایشگاهی محسوب می شوند.از مهم ترین بیماریزای این جنس *B.anthracis* عامل بیماری آنتراکس (سیاه زخم) از مهمترین بیماری های مشترک بین انسان و دام می باشد. این باکتری بدون حرکت، اسپور دار و به اندازه ۴-۸ ×۱/۵-۱ میکرومتر با انتهای جهار گوش می باشد. اسپور این باکتری بیضی شکل، غیر متورم و مرکزی می باشد و از نظر اندازه مشابه سایر باسیلوس ها است برای مشاهده اسپور از محیط های اختصاصی و رنگ آمیزی اسپور استفاده می شود اسپورها در بافت آلوده در معرض هوا دیده نمی شوند. اسپور در محیط مغذی یا بافت انسان و دام تکثیر یافته و تشکیل زنجیره های کوتاه کپسول دار می دهد. جنس کپسول *B.anthracis* از گلوتامیک اسید می باشد که عامل حدت زای آن می باشد. نقش کپسول در پاتوژنز میکروب بوسیله جلوگیری از مواجهه سیستم ایمنی میزبان با با کتری و تحریک سپتی سمی می باشد. این باکتری گرم مثبت و هوازی بی هوازی اختیاری می باشد. دمای بین ۴۵-۱۲ درجه سانتی گراد را تحمل می کند ولی دمای مناسب آن ۳۵ درجه می باشد (۱). این باکتری روی تمامی محیط های معمولی رشد کرده و تشکیل کلنی هایی با مرکز مواج و محدب می دهد که اصطلاحاً به آن سر مدوزا می گویند(۱۱). توکسین *B.anthracis* یک اگزو توکسین می باشد که از سه جزء پروتئینی تشکیل شده است به نام های PA (Protective antigen) یا پادگن محافظت کننده که به خاطر توانایی آن در ایجاد ایمنی محافظت کننده در برابر آنتراکس به این نام خوانده می شود،EF (Edema Factor) یا فاکتور ادم زا و LF (Lethal factor) یا فاکتور کشنده، هرسه ژن های cya,lef,pag A به ترتیب کدکننده EF,LF, PA هستند که تمامی آنها روی پلاسمید pxo۱ قرار دارند هر سه فاکتور به طور جداگانه کلون و سکانس شده‌اند(۱۳). تخلیص و جداسازی اجزای توکسین *B.anthracis* به منظور مطالعه ساختمان و نحوه عملکرد هر یک از آنها و نیز به منظور تهیه و تولید واکسن‌های انسانی و دامی و بهبود کیفیت اثر این واکسن ها، از سال های گذشته مورد توجه محققان بوده است (۶، ۷).

هدف اصلی این تحقیق نیز تهیه خالص‌ترین پادگن شاربن جهت استفاده در سیستم‌های مختلف تشخیص برای به کارگیری بهترین سیستم‌ها جهت شناسایی عامل مربوطه می‌باشد که در قدم‌های بعدی با دستیابی به پادگن‌های تخلیص یافته به صورت آزمایشگاهی شاید بتوان به پادگن‌های تشخیصی اختصاصی و یا واکسن‌های Sub unit نیز دست یافت.

جهت تخلیص پادگن‌ها از دو تکنیک اولترا فیلتر(میلی پور) که در حقیقت نوعی غربالگر مولکولی است (۹) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) شرکت (waters) با بهره‌گیری از ستون فاز معکوس (RPC۱۸) استفاده شد.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری

ابتدا یک ویال لیوفلیزه از سویه 34F2 (موجود در بخش بی هوازی موسسه رازی) در محیط بلاد آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب رشد داده شد پس از اطمینان از خلوص باکتری بوسیله رنگ آمیزی و کنترل میکروسکوپی باکتری رشد کرده به محیط RM منتقل گردید (۸)، تا به مدت ۱۸ الی ۲۰ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد.

جداسازی توکسین

خلـوص میزان رشـد باکتری‌ها بوسـیله رنـگ‌آمیزی گرم و مشـاهده میکروسـکوپیک انجام شده سپس جداسازی باکتری از مایع رویی توسط سـانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ انجام گرفت و pH آن روی ۸ تنظیم گردید، سپس مایع جدا شده توسط فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون استریل شده و نهایتاً EDTA یک درصد به مایع رویی به منظور حفظ اجزای توکسـین باکتری افزوده گردید.

اولترافیلتراسیون

در انجـام عملیـات ابتدا محلـول رویی جدا شـده از باکتـری را از یک غشـا با حد جداسـازی (cut off) ۳۰۰۰۰ که از جنس اسـتات سـلولز می‌باشد. عبور داده از آنجا که وزن مولکولی پروتئین‌های مورد نظر ما بین ۸۰ KDa و ۹۰ KDa قرار دارد محلول مورد نظر ما قسـمتی از محلول اصلی بوده که از غشـا دسـتگاه عبور نمی‌کند و آن را جمع آوری نموده سـپس از کاتاف ۵۰۰۰۰ از جنس پلی اتر سولفون عبور داده این بار هم محلول باقی مانده جمع آوری شـده و از کاتاف ۱۰۰۰۰۰ از جنس سلولز تغییر یافته عبور داده و این بار محلول خروجی جمع آوری گردید.

ترسیب پروتئین ها

افـزودن سـولفات آمونیـوم ۷۰ درصد و مخلوط نمـودن آن در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب سبب ترسیب پروتئین‌ها شده که با استفاده از سانتریفوژ ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه رسوب بدست آمده را در بافر TEA (pH=۸) حل نموده و علیه همان بافر به مدت ۵ سـاعت بطوری که در هرساعت بافر تعویض می‌گردید: دیالیز شد.

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا(HPLC)

شـرایط و مشـخصات دسـتگاه عبارتسـت از: HPLC مـدل Preparative ۴۸۶ شـرکت Watersمجهـز به دتکتـور UV که به کامپیوتر مدل NEC-Image ۴۶۶۰۳ متصل شده است.
نوع ستون به کار رفته ET25014 Nuclosil 4000-7PEI. سرعت فاز متحرک ۱mg/ml و میـزان تزریق ۱۰۰ میکرولیتر بود. برای تزریق نمونه بدسـت آمده (نمونه دیالیز شده بدست آمده از اولترافیلتر با کاتاف ۱۰۰۰۰۰) به دسـتگاه HPLC ابتـدا آن را از فیلترهای Millipore با سایز ۰/۴۵ میکرون عبور داده وسپس وارد ستون مورد نظر به همراه بافر 20mM Tri Ethanolamine / NaOH / PH=8 گردیـد. محلول خارج شده از ستون در طول موج ۲۵۴ نانومتر بررسی شد.

الکتروفورز SDS-PAGE برای بررسی پادگن‌ها

ژل تنظیم‌کننده ۴ درصد و ژل جداکننده ۱۰ درصد آکریل آمید که شامل محلـول‌های زخیره آکریل آمید وبیس آکریل آمید، آمونیوم پرسـولفات ۱/۵ درصد، SDS ۱۰ درصد و TEMED می‌باشد.
محلول رنگ آمیزی عبارتسـت از: متانول ۳۵ درصد اسـید استیک ۷/۵ درصـد رنگ کوماسـی بلو: ۱ گرم در لیتر و محلـول رنگ بری نیز مانند محلول رنگ تهیه می‌گردد و تنها فاقد رنگ می‌باشد.
همچنین بافر نمونه (Sample buffer) شامل:
Tris/HCl ۰/۰۶۲۵ مولار با ۶/۸ :pH SDS ۲٪-گلیسرول ۱۰ درصد- مرکاپتواتانول ۵ درصد- برومو فنل بلو ۰/۰۰۱ درصد.

آماده سازی نمونه

آماده سـازی نمونـه به این صورت انجام شـد کـه نمونـه و بافر نمونه (در داخل میکروتیوب) به نسبت ۱:۱ به یکدیگر افزوده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار گرفت. در نهایت مقدار بسـیار کمی سوکروز به آن افزوده و ورتکس گردید.

مراحل انجام الکتروفورز پادگن‌ها

۱) پس از تهیه ژل ها، ابتدا ژل جداکننده در فضای دو شیشـه الکتروفوز که قبلاً آماده و با آب مقطر تست شده بود، ریخته و روی آن با آب مقطر پوشانده شد.
۲) بعد از بسته شدن ژل و حذف آب موجود، ژل تنظیم کننده ریخته شد و بلافاصله شانه داخل ژل قرار گرفت.
۳) بعد از بسـته شـدن ژل تنظیم‌کننده، نمونه‌ها داخل چاهک‌ها ریخته شـد و کل مجموعـه داخـل تانک بافر قـرار گرفت به طوری که سـطح نمونه‌ها کاملاً با بافر پوشانده شد.
۴) سـپس جریان برق برقرار گردید و با ولتاژی معادل ۱۲۰ ولت حرکت نمونه‌ها در ژل آغاز شد. بعد از رسیدن نمونه‌ها به انتهای ژل, جریان برق قطع و ژل از فضای دو شیشـه خارج گردید. سـپس ژل بالایی بریده و به مدت ۱ – ۰/۵ ساعت داخل محلول رنگ قرار داده شد. پس از این مرحله ژل از محلول رنگ خارج شـده و داخل محلول رنگ بر قرار داده شد. ژل تا ظهور باندهای روی آن داخل محلول رنگ بر باقی ماند.

تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها

وزن مولکولـی پروتئیـن مورد نظر به آسـانی از روی حرکت نسـبی آن بـر روی ژل تعیین می‌شـود. بطوری کـه در کنار نمونه‌هـای پروتئینی بـه کاربرده شـده (EF،LF،PA) از مارکر پروتئینی اسـتاندارد که وزن مولکولی مشخص دارند در مقایسه استفاده گردید.

نتایج

استخراج پروتئین از محیط کشت

حجم کلی کشت باکتری روی محیط RM ۶ لیتر بود. بعد از سانتریفوژو جدا کردن باکتری از مایع رویی و اسـتریل کردن مایع رویی حجم آن به ۵/۵ لیتـر کاهش یافت. مقدارپروتئین مایع جدا شـده که به روش لوری محاسبه گردید ۱/۴۴ mg/ml بدست آمد.

اولترا فیلتر با کاتاف ۳۰۰۰۰

با انجام اولترافیلتر با کاتاف ۳۰۰۰۰ وتغلیظ مایع رویی اسـتخراج شـده حجم آن به ۵۰۰ میلی لیتر کاهش یافت. مقدار پروتئین محلول بدسـت آمده از اولترافیلتر با کاتاف ۳۰۰۰۰ برابر با ۲/۳ mg/ml محاسبه شد.

اولترافیلتر با کاتاف ۵۰۰۰۰

محلول پروتئینی بدسـت آمده از اولترافیلتر با کاتـاف ۳۰۰۰۰ مجدداً با

کاتاف ۵۰۰۰۰ اولترا فیلتر شد که در نتیجه این عمل حجم محلول به ۷۵میلی لیتر تقلیل یافت.

اولترا فیلتر با کاتاف ۱۰۰۰۰۰

محلول پروتئینی بدست آمده از اولترافیلتر با کاتاف ۵۰۰۰۰ بار دیگر با کاتاف ۱۰۰۰۰۰ اولترا فیلتر شد حجم نمونه در پایان عمل فیلتر ۷۳ میلی لیتر بود.

ترسیب پروتئین‌ها

سولفات آمونیوم توزین شده به تدریج به محلول مورد نظر افزوده گردید و پس از یک شب هم خوردن در ۴ درجه سانتی گراد توسط سانتریفوژ بادور ۱۵۰۰۰پروتئین‌ها رسوب کرده و در بافر TEA pH=۸؛ حل گردید که در مجموع ۱۴ میلی لیتر محلول پروتئین غلیظ بدست آمد. علیه بافر مشابه دیالیز گردید.

HPLC نمونه

نتیجه حاصل از HPLC که در نمودار زیر مشخص می باشد سه فراکسیون مشخص است که شامل :

۱- پیک اول ۰/۷ میلی لیتر (PA)

۲- پیک دوم ۱/۵ میلی لیتر (LF) ۳- پیک سوم ۱ میلی لیتر (EF) می باشد که هر یک جداگانه مورد سنجش پروتئین قرارگرفت و میزان پروتئین هر یک به قرار زیر می باشد.

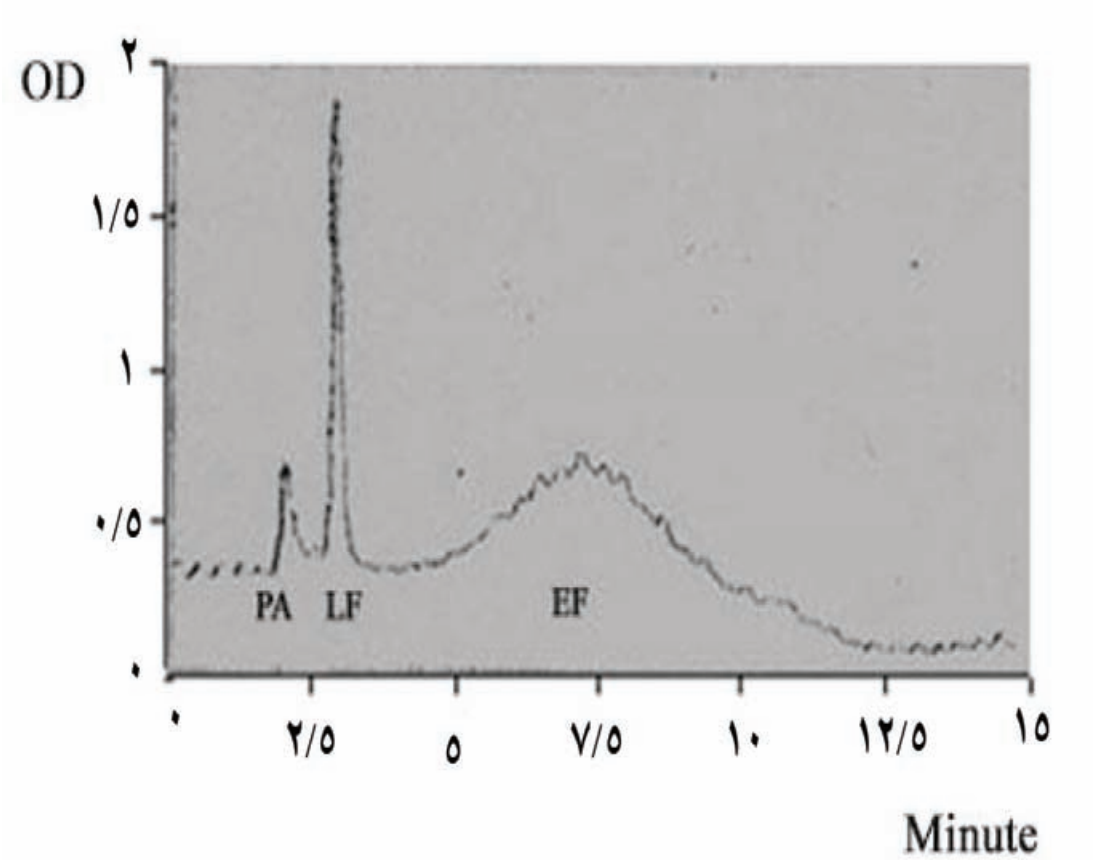
EF = 0.6 mg/ml
LF = 0.77mg/ml
PA = 0.75mg/ml

SDS-PAGE پادتن ها

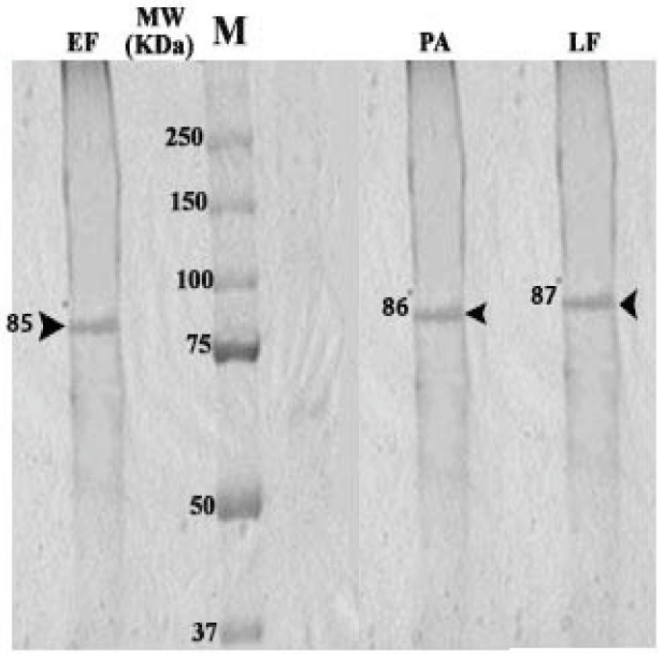
نمونه های بدست آمده از HPLC را به همراه مارکر پروتئینی بر روی ژل برده و در شکل زیر LF،PA و EF به ترتیب با وزن مولکولی های ۸۶، ۸۷ و ۸۵ کیلودالتون مشخص می باشند.

بحث

سویه های باسیلوس آنتراسیس قادر به تولید توکسین می باشند . اجزای تشکیل دهنده این توکسین (LF،EF و PA) از جنس پروتئین هستند که بعد از ساخته شدن در سیتوپلاسم باکتری به محیط خارج ریخته می شوند. سویه V۷۷۰ تنها قادر به تولید PA می باشد و فاقد دو فاکتور دیگر است سویه‌های ۴۲۲۹ ، ۶۶۰۲ از *B.anthracis* بیماریزا نبوده و برای تحقیق مناسب‌اند اما این سوش‌ها قادر به تولید توکسین



شکل ۱- نمودار منحنی پادتن ها PA، LF، EF با HPLC



شکل ۲- الکتروفورز پادگن‌های PA، LF، EF جداشده با HPLC

نیز نمی‌باشند سوش‌هایی مثل Ames، Buffalo، Colorado، AH قادر به تولید توکسین و اجزای آن به صورت کامل هستند اما این سوش‌ها بیماری‌زا می‌باشند(۱۲). سویه 34F2 که در این تحقیق انتخاب شد علاوه بر تولید میزان قابل توجهی PA، LF، EF بیماری زا نیز نمی‌باشد. در انتخاب محیط کشت مناسب محققینی چون Bailie در سال ۲۰۰۱ (۱) , Heclay و Gold در سال ۱۹۴۹ (۷) و Gladstone در سال ۱۹۴۶ (۶) از محیط‌های کشت پروتئینی استفاده کردند اما اشکال عمده در تفکیک پروتئین‌های محیط کشت از توکسین باکتری بود که استفاده از محیط کشت حاوی اسیدهای آمینه و سایر مواد ضروری و حذف پروتئین‌ها وماکرو مولکول های محیطی این مشکل را رفع می‌کند بطوری که در این تحقیق از محیط غیر پروتئینی RM (۸) برای جداسازی و تخلیص اجزای اگزوتوکسین *B.anthracis* استفاده شد.

در سال ۱۹۸۶ Doris و همکارانش(۴) با استفاده از روش Sequential Immunosorbent chromatography و پادگن‌های مونوکلونال موفق به تخلیص و جداسازی PA، LF، EF گردیدند و وزن مولکولی آنها را ۸۷ ، ۸۵ و ۸۶ کیلو دالتون گزارش نمودند. همچنین Quin و همکارانش در سال ۱۹۸۸ (۲) توسط متد ژل فیلتراسیون و HPLC باستون آنیونی و استفاده از کروماتوگرافی با DEAE- Cellolose تجربه‌ایی داشتند. در سال ۱۹۹۵ خالدی موفق به تخلیص جزء PA اگزو توکسین *B.anthracis* در بخش تولید و تحقیق هوازی موسسه رازی گردید و وزن مولکولی PA را KD ۸۶ اعلام نمود وی برای جداسازی از روش کروماتوگرافی با ژل هیدروکسی آپاتیت استفاده نمود که البته به صورت مکتوب در جایی گزارش نشده است، در سال ۱۹۹۶ Chul-soon Choi و همکارانش(۳) توسط متد FPLC۱، کروماتوگرافی با ستون Mono Q موفق به جداسازی پادگن‌های *B.anthracis* شده‌اند که محصول عمل را روی الکتروفورز ۱۰ درصد برده‌اند و موفق به بدست آوردن باند ۸۵ کیلو دالتنی PA شدند. در سال ۱۹۹۷ Frachaus۱ و همکارانش (۵) با بکار بردن ستون کروماتوگرافی تبادلگر یونی و HPLC با فاز معکوس موفق به جداسازی جزء PA با ۹۵ درصد خلوص شدند. در این تحقیق برای جداسازی وتخلیص از دستگاه اولترافیلتر به همراه HPLC استفاده گردید بطوری که اجزای اگزو توکسین به طور کامل در دستگاه HPLC مورد جداسازی و تفکیک قرارگرفت و به ترتیب EF،LF،PA با وزن‌های مولکولی KD ۸۵،۸۷، ۸۶ گزارش شدند. Robert Mabry و همکارانش (۱۰) در سال ۲۰۰۵ از متد اولترا فیلتراسیون با کاتاف ۱۰۰۰۰ برای تخلیص پادگن نوترکیبی که تهیه نموده بودند استفاده کردند. تحقیق حاضر با بررسی و مطالعه برروی نتایج حاصل از تحقیق دانشمندان و بهره‌گیری بهینه از تلفیق دو روش اولترا فیلتراسیون و متد HPLC به نتایج مطلوب‌تری رسید که البته قابل تطبیق با نتایج سایر دانشمندان در این زمینه می‌باشد و همان طور که در شکل‌های ۱ و۲ نشان داده شده است سه پادگن PA،LF وEF با روش HPLC از همدیگر جدا شده و با SDS-PAGE وزن ملکولی دقیق همراه با خلوص را نشان دادند.

منابع مورد استفاده

1. Bailie, L and Read, T.D. (2001) *Bacillus anthracites*, a bug with attitude. *Curr opin microbiol*. 4:78-81

2 - Quinn, C. P., Shone, C. C., Turnbull, P C, and Melling, J. (1988); Purification of anthrax-toxin components by high-performance anion-exchange, gel-filtration and hydrophobic-interaction chromatography. *Biochem J*. 15; 252(3): 753–758

3-Chul-Soon, C., Sang-In, C., Ki-Jeong,K., Chan-Ho, C., Won-Yong, K and Yong-Tae, Y. (1996) Study on the antigens for cell free vaccine and retrospective diagnosis of anthrax: Production of protective antigen of *Bacillus anthracis*. *J.Korean Soc. Microbiol*, 31(6), 631-641

4. Doris, K and Larson ,P (1986) Separation of three exotoxic factors of bacillus anthracis by sequential immuno sorbent chromatography. *J.Toxicon*.26:10:913-921

5.Farchaus, J.W and Ribot, W.J (1998) Fermentation, purification and characterization of protective antigen from a recombinant a virulent strain of *Bacillus anthracis*. *Applied and environ microbial*. 64:3: 982-991

6. Gladstone, G.P (1946) Immunity to anthrax, protective antigen present in cell free culture filtration. *Br.J.EXP.Pathol*.27:394-418

7. Heckly, R.I and Gold wasser, E (1949) Studies on identification Bacillus anthracis the production of an immunizing antigen *invitro*. *I.Infect*. 84-91

8. Leppla, S.H., (1988) Production and purification of anthrax toxin. *Meth.Eny*.165- 168.

9. Muder, S.H (1991) Background for after filtration of protein solutions. *Cent.Afr.I.Med*.42:312-15.

10. Mabry,R., Mridula R., Geiger,R., Hubbard,G., Carrion, Jr R., Brasky,K., Patterson,J.L., Georgiou,G. and Iverson B. L(2005) Passive Protection against Anthrax by Using a High-Affinity Antitoxin Antibody Fragment Lacking an Fc Region. *J. Infection and Immunity*.73(12) 8362- 8368

11. Slack, R.C.B.(2002) *Medical microbiology, a guide to infections: Pathogenesis, Immunity Laboratory diagnosis and control*, 16nd Edn, CChurchill Lvingstone, London.

12. Vincent, P and Guy, P. (1996) Identification and characterization of bacillus anthracis by multiplex PCR and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS.Microbiol*.9-16.

13. Welkos, S.L. and Love. I.R. (1988) Sequenced and analysis of the DNA encoding protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Gene*. 69:287-300.