

چکیده/ نوروتوکسین‌های بوتولینوم (BoNTs) توکسین‌های باکتریایی نیرومندی هستند که در غلظت‌های فمتومولار با جلوگیری از آزاد شدن انتقال دهنده عصبی استیل کولین سبب ایجاد فلج عضلانی شل می‌گردند. هر نوروتوکسین متشکل از یک زنجیره سبک ۵۰ کیلودالتونی و یک زنجیره سنگین ۱۰۰ کیلودالتونی است. ناحیه انتهای کربوکسیلی زنجیره سنگین که سبب اتصال نوروتوکسین به گیرنده‌های ویژه سطح سلولی می‌گردد ناحیه اتصال دهنده نام گذاری شده است. این ناحیه از توانایی ایمنی زایی قابل ملاحظه‌ای نیز برخوردار است. در این مطالعه ژن‌های نواحی اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین تیپ‌های A و B به منظور تولید پروتئین نوترکیب کایمر به عنوان کاندید واکسن دو ظرفیتی به یکدیگر متصل شدند. بدین منظور از ژن‌های صنایع نواحی اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین‌های تیپ A و B در حامل بیانی pET۲۸a (+) استفاده شد. برای ژن ناحیه اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B پرایمر پیشرو حامل جایگاه برشی NcoI و پرایمر پیرو حامل جایگاه برشی NdeI طراحی گردید. با استفاده از آنزیم pfu، ژن یاد شده مورد تکثیر قرار گرفت. در مرحله بعد برش آنزیمی محصولات PCR و ناقل نوترکیب حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A با استفاده از آنزیم‌های NcoI و NdeI انجام شد. سپس با استفاده از آنزیم DNA ligase T۴ الحاق ژن مورد نظر در ناقل pET۲۸a (+) حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A انجام گرفت. در مرحله آخر، حامل نوترکیب حاوی ژن کایمر به باکتری E.coli DH۵a انتقال داده شد. نتایج PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی سازی نهایی بیانگر صحت اتصال دو ژن به یکدیگر بود.

واژگان کلیدی: نوروتوکسین بوتولینوم، ناحیه اتصال دهنده، ژن کایمر، و اکسن کایمر

مقدمه

محسوب می‌گردند (۲). سروتیپ‌های کلاستریدیوم بوتولینوم هفت نوع مختلف از نوروتوکسین که اثر A تا G نام گذاری می‌شوند را تولید می‌نمایند. این نوروتوکسین‌ها عموماً بر روی سیستم عصبی محیطی عمل می‌نمایند، و در آنجا با عملکرد خود سبب مهار آزاد شدن استیل کولین در محل اتصال عصب - عضله می‌گردند که نتیجه نهایی آن بروز علائم بوتولیسم می‌باشد (۳). نوروتوکسین‌های بوتولینوم ابتدا به صورت یک زنجیره پلی‌پپتیدی ۱۵۰ کیلودالتونی تولید می‌شوند سپس در نتیجه عملکرد پروتئازهای داخل و خارج سلولی به زنجیره سنگین (HC) ۱۰۰ کیلودالتونی و زنجیره سبک (LC) ۵۰ کیلودالتونی شکسته شده و به وسیله یک پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل می‌شوند (۱). نیمه انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین، ناحیه اتصال دهنده، و نیمه

نوروتوکسین‌های بوتولینوم (BoNTs)، که به وسیله کلاستریدیوم بوتولینوم تولید می‌شوند، سمی‌ترین توکسین شناخته شده برای انسان می‌باشند (۱۰۰ بلیون بار سمی‌تر از سیانید) (۱) این توکسین‌ها عامل یک بیماری غذایی کشنده به نام بوتولیسم می‌باشند (۱). به علت سمیت زیاد، این توکسین‌ها به عنوان یک سلاح زیستی هولناک

* فیروز ابراهیمی، PhD

استادیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع

امام حسین(ع)، تهران، ایران

پست الکترونیک: febrhimi@ihu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۴/۰۷ • تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۶/۲۰

دهنده‌ی سروتیپ‌های A، B، E که عمده‌ترین سروتیپ‌های بیماری زای انسانی می‌باشند، صورت گرفته است و ایمنی زایی آنتی ژن کایمر حاصل مورد بررسی قرار گرفته است (۳۵). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد استفاده از طول کوتاهی از ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین ایمنی زایی مطلوبی را ایجاد نمی‌کند (۱۳) لذا در این تحقیق برای ایجاد ایمنی زایی موثر، از طول کامل ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین استفاده شد.

روش کار

۲-۱ بهینه سازی و ساخت ژن‌ها

توالی ژن‌های مربوط به نواحی اتصال دهنده توکسین کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ A و B با شماره‌های دسترسی EF۴۷۰۹۸۱ و AF۲۹۵۹۲۸ از بانک ژنی گرفته شد سپس توسط نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مربوطه، توالی مورد نظر اثر نظر محتوای A+T و G+C و رمزهای نادر و نیز پایداری mRNA حاصله مورد بهینه سازی قرار گرفت. سپس به صورت صناعی در داخل ناقل (+) pET-۲۸a با جایگاههای برشی NdeI در ابتدا و NcoI در انتهای ژن‌ها از شرکت shinegene (چین) تهیه گردید.

۲-۲ تکثیر ژن ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین بوتولینوم تیپ B به منظور امتزاج ژن‌های ناحیه اتصال دهنده‌ی نورو توکسین‌های تیپ A و B ابتدا ژن مربوط به تیپ B پس از استخراج پلاسمیدهای حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده تیپ B با روش لیز قلیایی مورد تکثیر قرار گرفت. برای تکثیر ژن ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین تیپ B واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ۵' AATATAAATTTACCAT و ۳' GGTGCCGTTTGACCTTTC پرایمر و NcoI با جایگاه برشی و پرایمر پیرو ۵' AAATAAAAAATCATATGTTTCGGTCCAACCTT و ۳' CGT با جایگاه برشی NdeI در حجم‌های ۲۵ میکرولیتر شامل آنزیم Pfu DNA polymerase (۱ واحد آنزیمی)، dNTPs (۰/۲ میلی مولار)، ۱۰ پیکو مول از هر کدام اثر پرایمرها، ۱۶ میکروگرم اثر پلاسمید حاوی ژن مورد نظر، ۵/۲ میکرولیتر از بافر X10 و MgSO۴ با غلظت نهایی ۴ میلی مولار صورت گرفت. جهت انجام واکنش PCR ابتدا نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۵°C پیش گرما گذاری شدند، سپس ۳۴ چرخه PCR به صورت: ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۸°C (۵۰ ثانیه) و ۷۲°C به مدت ۱/۵ دقیقه انجام شد. پس از آخرین چرخه PCR فرایند به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C ادامه پیدا کرد. اندازه قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگاروز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

انتهای آمینی آن ناحیه انتقال دهنده نامیده می‌شود (۴). ناحیه اتصال دهنده سبب اتصال نورو توکسین به سلول‌های عصبی پیش سیناپسی در سیناپس‌های عصب-عضله می‌گردد (۶ و ۵) و به این ترتیب نورو توکسین از طریق آندوسیتوز با واسطه گیرنده وارد اندوزوم‌ها می‌شود بخش انتهای آمینی نقش مهمی را در انتقال خرنجیره سبک نورو توکسین (ناحیه کاتالیتیک نورو توکسین) اثر غشا اندوزوم‌ها به سیتوزول ایفا می‌نماید (۷). به دلیل سمیت زیاد نورو توکسین، توجه به امر درمان و پیشگیری از بیماری بوتولیسم ضروری است. امروزه پیشگیری اثر بیماری به طور معمول با استفاده از واکسن‌های توکسوئیدی (توکسین غیر فعال شده) صورت می‌گیرد (۸). اما ناخالصی‌های همراه توکسوئید حاصله و نیز اندازه بزرگ پروتئینی، واکنش‌های ناخواسته‌ی عمومی و موضعی را موجب می‌گردد که این امر تلاش برای ساخت واکسن‌های جدیدتر را ضروری می‌سازد (۴ و ۹ و ۱۰ و ۱۱). واکسن‌های تولید شده با استفاده از فن‌آوری DNA نو ترکیب اثر جمله این تلاش‌هاست (۸). با استفاده از فناوری DNA نو ترکیب می‌توان آنتی ژن‌های موثر با درجه خلوص بالا، بدون نیاز به کشت و دست و ریزی حجم بالایی اثر باکتری کلاستریدیوم بوتولینوم را تولید نمود (۱۲). تاکنون نواحی مختلفی از نورو توکسین به صورت نو ترکیب تولید شده و از نظر توان حفاظت کنندگی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۳۴-۱۳). بخشی از توکسین که در این زمینه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، ناحیه اتصال دهنده‌ی نورو توکسین است. نواحی اتصال دهنده‌ی سرو تیپ‌های A تا F به صورت نو ترکیب تولید شده و اثر نظر ایمنی زایی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۳۴-۲۳). تمام این تحقیقات نشان دهنده‌ی قابلیت بالای ایمنی زایی نواحی اتصال دهنده‌ی نورو توکسین می‌باشد (۳۴-۲۳). هم چنین از مخلوط پروتئین‌های نو ترکیب HCA و HCB (نواحی اتصال دهنده نورو توکسین‌های تیپ A و B) که به صورت جداگانه و به صورت نو ترکیب تولید شده‌اند یک واکسن نو ترکیب دو ظرفیتی (r BVA) موثر تولید شده است (۱۲). نتایج مطالعات کلینیکی فاز یک این واکسن نشان دهنده کارایی بالای واکسن تولید شده است. هم اکنون این واکسن در فاز دوم مطالعات کلینیکی خود قرار دارد (۱۲). تا کنون بیشتر تحقیقات صورت گرفته در زمینه واکسن‌های نو ترکیب بوتولینوم در جهت دست یابی به واکسن‌های نو ترکیب تک ظرفیتی متمرکز بوده است. با توجه به وجود سرو تیپ‌های مختلف بوتولینوم و نیز به منظور بهره‌گیری از مزایای واکسن‌های کایمر، تلاش در این زمینه منطقی به نظر می‌رسد. در زمینه واکسن‌های کایمر بوتولینوم، اتصال برخی از اپی توپ‌های حائز اهمیت از نظر ایمنی زایی، نواحی اتصال

بوتولینوم تیپ B و انتقال سازه نوترکیب به سلول‌های مستعد *E. coli* DH5a

پس از تخلیص ژن ناحیه اتصال دهنده تیپ B، که مورد هضم آنزیمی قرار گرفته بود، و نیز پلاسمید حاوی ژن ناحیه اتصالی A از روی ژل، نمونه‌ها مورد غلظت سنجی قرار گرفتند. سپس با استفاده از نسبت‌های مولی ۱:۱ و ۱:۳ اثر ژن مورد نظر به حامل نوترکیب، فرآیند الحاق با استفاده از آنزیم *DNA ligase T4* به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس سازه نوترکیب حاصل به سلول‌های مستعد *E. coli* DH5a (که به صورت شیمیایی تهیه شده بودند) با استفاده از شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه منتقل شد. در گام بعدی سلول‌های ترانسفورم شده به محیط مکانکی آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۸۰ میکروگرم بر میکرولیتر انتقال داده شدند و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد گرماگذاری قرار گرفتند. سپس کلونی‌های حاصله به منظور ارزیابی دارا بودن شرن کایمر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۸۰ میکروگرم در میکرولیتر منتقل شده و پس از رسیدن OD محیط‌های کشت به ۰/۸ استخراج پلاسمید و برش‌های آنزیمی و تعیین توالی به منظور تأیید شکل‌گیری ژن کایمر صورت گرفت.

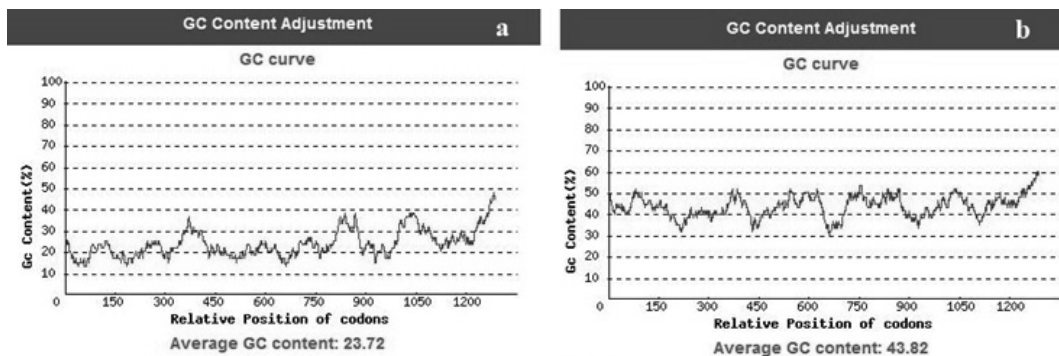
بحث

۳-۱ بهینه‌سازی و ساخت ژن‌ها
بهینه‌سازی کدون‌های ژن‌های نواحی اتصال دهنده تیپ A و B با استفاده از الگوریتم *OptimumGene™* انجام گرفت. در اثر بهینه‌سازی صورت گرفته درصد GC در ژن ناحیه اتصال دهنده تیپ A از ۲۳/۷۲ به ۴۳/۸۲ افزایش یافته است (شکل ۱).

۲-۳ هضم آنزیمی ژن ناحیه اتصال دهنده توکسین بوتولینوم تیپ B تکثیر شده در فرآیند PCR و پلاسمید حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده تیپ A با توجه به وجود جایگاه برش آنزیمی *NdeI* در ابتدا و جایگاه برش آنزیمی *XhoI* در انتهای ژن مربوط به ناحیه اتصال دهنده توکسین بوتولینوم تیپ A، شرن مربوط به تیپ B در بین جایگاه‌های برش آنزیمی *NdeI* و *NcoI* در پلاسمید نوترکیب وارد و ژن کایمر متشکل از دو ژن یاد شده ایجاد گردید. پس از تکثیر ژن ناحیه اتصال دهنده تیپ B، ژن مورد نظر با استفاده از کیت تخلیص محصولات PCR از ژل (*Bioneer*، کره جنوبی) استخراج گردید. در مرحله بعد برش آنزیمی محصولات به دست آمده ابتدا با آنزیم *NdeI* (۳۰ واحد، بافر هضم با غلظت نهایی X1، محصول PCR ۳۶۰ نانوگرم، ۴ ساعت) و سپس با آنزیم *NcoI* (۶۰ واحد، بافر هضم با غلظت نهایی X1، محصولات PCR ۳۶۰ نانوگرم، ۱۲ ساعت) صورت گرفت. پس از هضم آنزیمی به منظوری حذف آنزیم‌ها و سایر اجزا واکنش هضم آنزیمی و آماده‌سازی محصولات برش خورده برای فرآیند الحاق، ژن‌های برش خورده، با استفاده از کیت تخلیص محصولات PCR از ژل، مورد جداسازی قرار گرفت.

پلاسمید حاوی ژن مربوط به تیپ A نیز با استفاده از آنزیم‌های *NdeI* (پلاسمید نوترکیب ۱۷۵۰ نانوگرم، ۳۰ واحد، بافر هضم با غلظت نهایی X1، یک ساعت) و *NcoI* (پلاسمید نوترکیب ۱۷۵۰ نانوگرم، ۶۰ واحد، بافر هضم با غلظت نهایی X1، ۱۲ ساعت) مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. پس از هضم آنزیمی به منظور خالص‌سازی و آماده‌کردن پلاسمید نوترکیب برش خورده برای فرآیند الحاق، پلاسمیدهای برش خورده با استفاده از کیت تخلیص از ژل استخراج گردید.

۲-۴ انجام واکنش الحاق بین پلاسمید نوترکیب حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده بوتولینوم تیپ A و ژن ناحیه اتصال دهنده نوروتوکسین

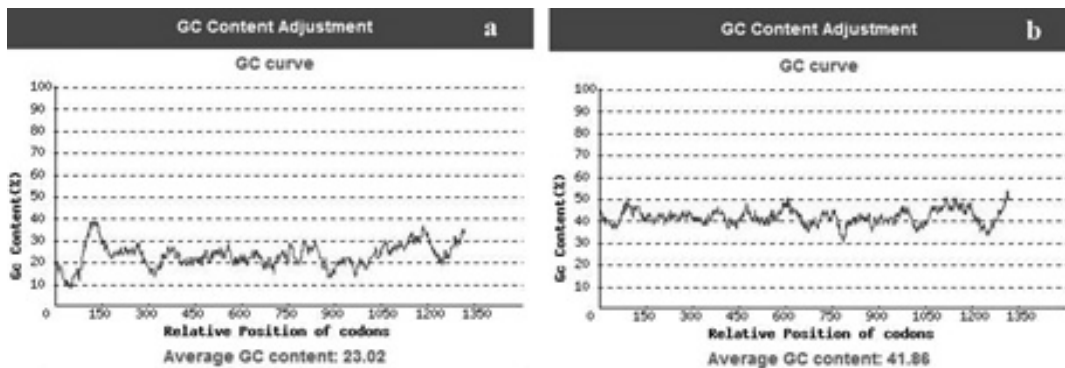


شکل ۱: میانگین محتوی GC ژن ناحیه اتصال دهنده نوروتوکسین تیپ A قبل (a) و بعد (b) از بهینه‌سازی کدون‌ها.

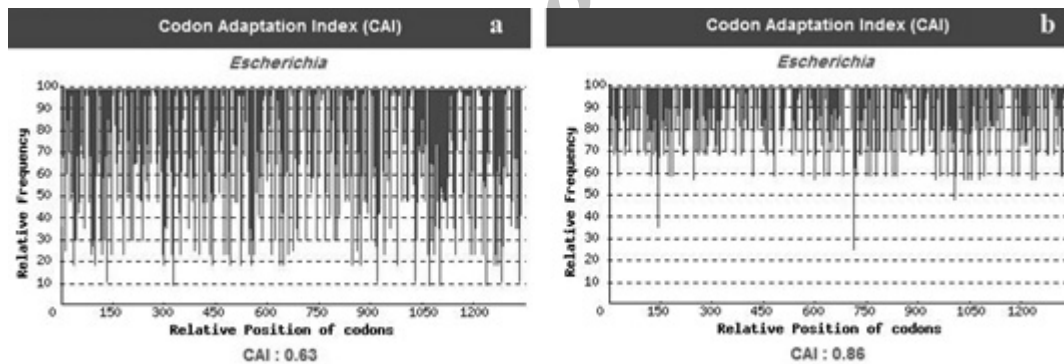
ساختار mRNA ی حاصل از ژن‌های طبیعی و بهینه سازی شده و نیز تغییرات صورت گرفته در انرژی آزاد با نرم افزار mfold مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات انرژی آزاد mRNA ی حاصل از ژن طبیعی ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین تیپ A برابر با ۱۸۲- کیلو کالری می‌باشد که این امر با بهینه سازی صورت گرفته به ۲۵۰- کیلو کالری برمول افزایش پیدا کرده است، این امر شرایط به مراتب مطلوب تری را برای عملکرد

در مورد ژن ناحیه اتصال دهنده تیپ B این میزان از ۲۳/۰۲ به ۴۱/۸۶ افزایش یافته است (شکل ۲).

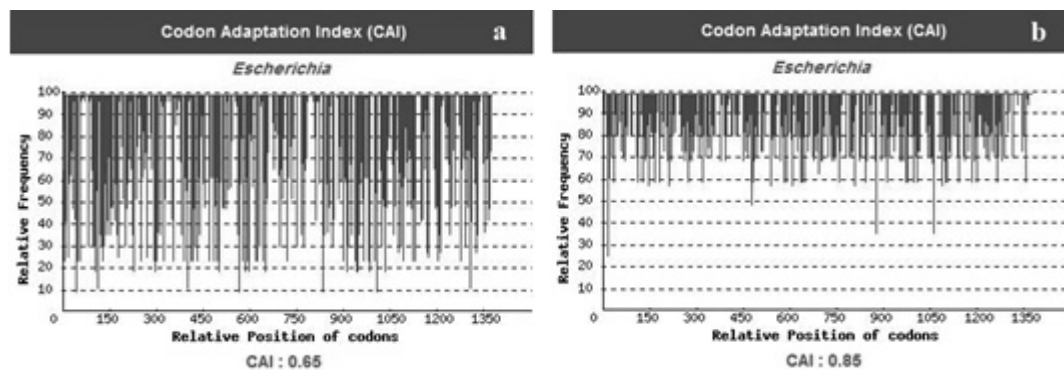
تغییرات ضریب CAI (میزان شباهت کدون‌های ژن مورد نظر به کدون‌های ژن‌های دارای بیان بالا در باکتری E. Coli) در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده بهبود ضریب CAI نسبت به ژن‌های طبیعی مربوطه است. (شکل ۳ و ۴)



شکل ۲: میانگین محتوی GC ژن ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین تیپ B قبل (a) و بعد (b) از بهینه سازی کدون‌ها.



شکل ۳: شاخص سازگاری کدون (CAI) ژن ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین بوتولینوم تیپ A قبل (a) و بعد (b) از بهینه سازی کدون‌ها.



شکل ۴: شاخص سازگاری کدون (CAI) ژن ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین بوتولینوم تیپ B قبل (a) و بعد (b) از بهینه سازی کدون‌ها.

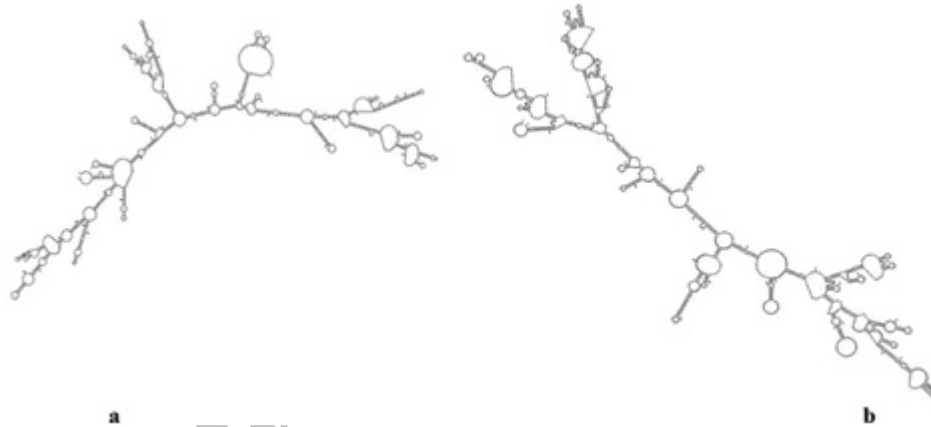
مورد تکثیر قرار گرفت. آنزیم Pfu DNA polymerase با خاصیت غلط‌گیری برای تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. بررسی قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز نشان دهنده قطعات ۱/۴ کیلو بازی تکثیر شده است (شکل ۷).

۳-۳ هضم آنزیمی ژن ناحیه اتصال دهنده توکسین بوتولینوم تیپ B تکثیر شده در فرآیند PCR و پلاسمید حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده تیپ A

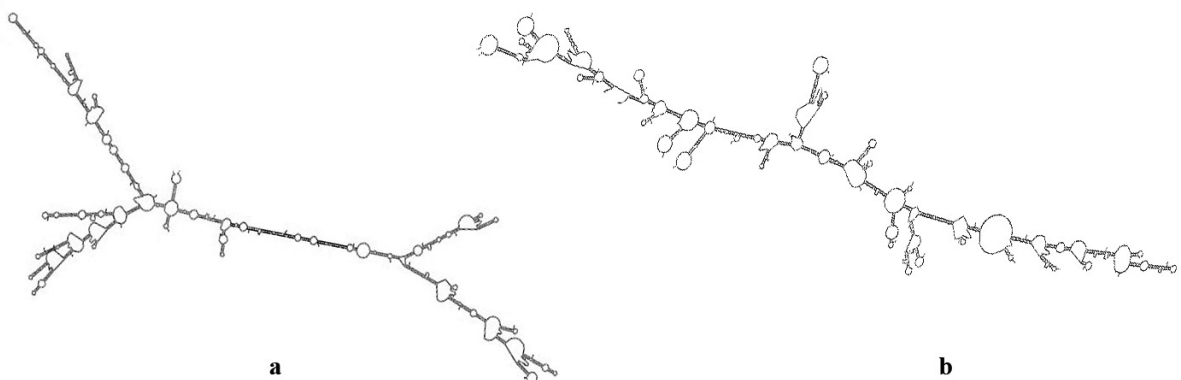
قطعات DNA تکثیر شده و استخراج شده از ژل، و پلاسمید حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده تیپ A به صورت جداگانه با آنزیم‌های NdeI و NcoI مورد برش آنزیمی قرار گرفت، انتقال نتایج برش آنزیمی

ریبوزوم‌ها به منظور ترجمه mRNA فراهم می‌آورد. (شکل ۵) در اثر بهینه سازی صورت گرفته پایداری mRNA ی ژن ناحیه اتصال دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B از ۲۰۷- کیلوکالی بر مول به ۲۳۴- کیلوکالی بر مول افزایش می‌یابد که نشانگر پایداری بیشتر mRNA حاصله در نتیجه بهینه سازی کدونی صورت گرفته است (شکل ۶).

۳-۲ تکثیر ژن ناحیه اتصال دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B قطعه DNA ی کد کننده ناحیه اتصال دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B با استفاده از PCR و پرایمرهای پیشرو و پیرو که به ترتیب دارای جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدود کننده NdeI و NcoI بودند



شکل ۵: ساختار دوم mRNA ی حاصل از ژن ناحیه اتصال دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A قبل (a) و بعد از بهینه سازی (b)



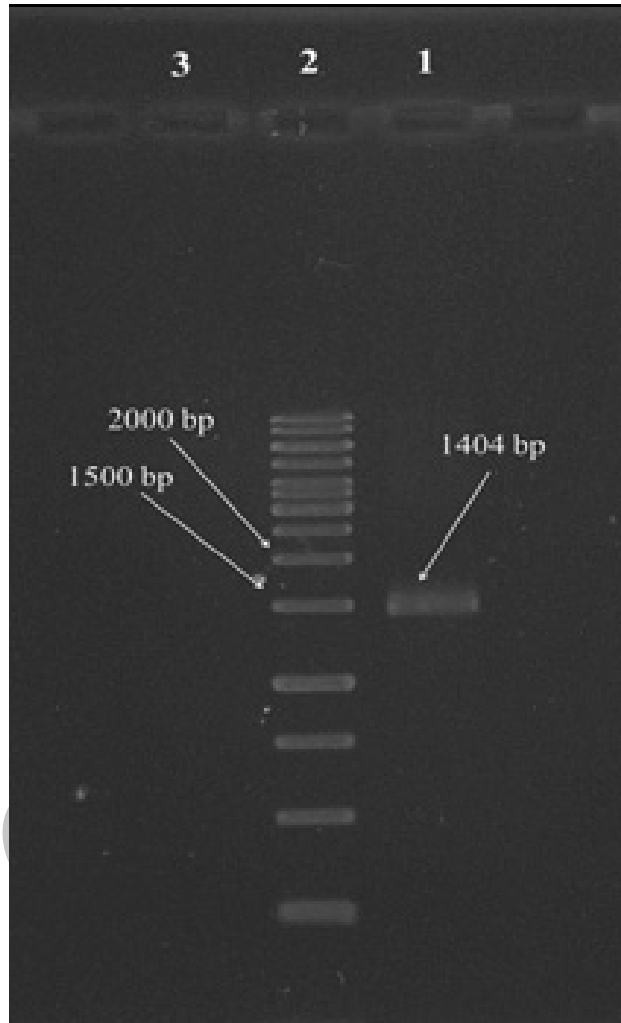
شکل ۶: ساختار دوم mRNA ی حاصل از ژن ناحیه اتصال دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B قبل (a) و بعد از بهینه سازی (b)

بوتولینوم تیپ B و انتقال سازه نوترکیب حاصله به سلول‌های مستعد E.coli DH5 α

ژن ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین بوتولینوم تیپ B پس از برش و استخراج از ژل وارد پلاسمید نوترکیب برش خورده حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده‌ی نورو توکسین بوتولینوم تیپ A گردید. انتقال سازه حاصله به سلول‌های مستعد شده E. Coli DH5 α ، شکل‌گیری کلنی‌ها در محیط حاوی آنتی بیوتیک، استخراج پلاسمید، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن اتصال دهنده توکسین تیپ B و برش‌های آنزیمی با آنزیم‌های XhoI و NcoI (شکل ۹)، نشان دهنده اتصال ژن‌های مورد نظر و شکل‌گیری ژن کایمر ۲۷۲۹ نوکلئوتیدی می‌باشد.

بحث

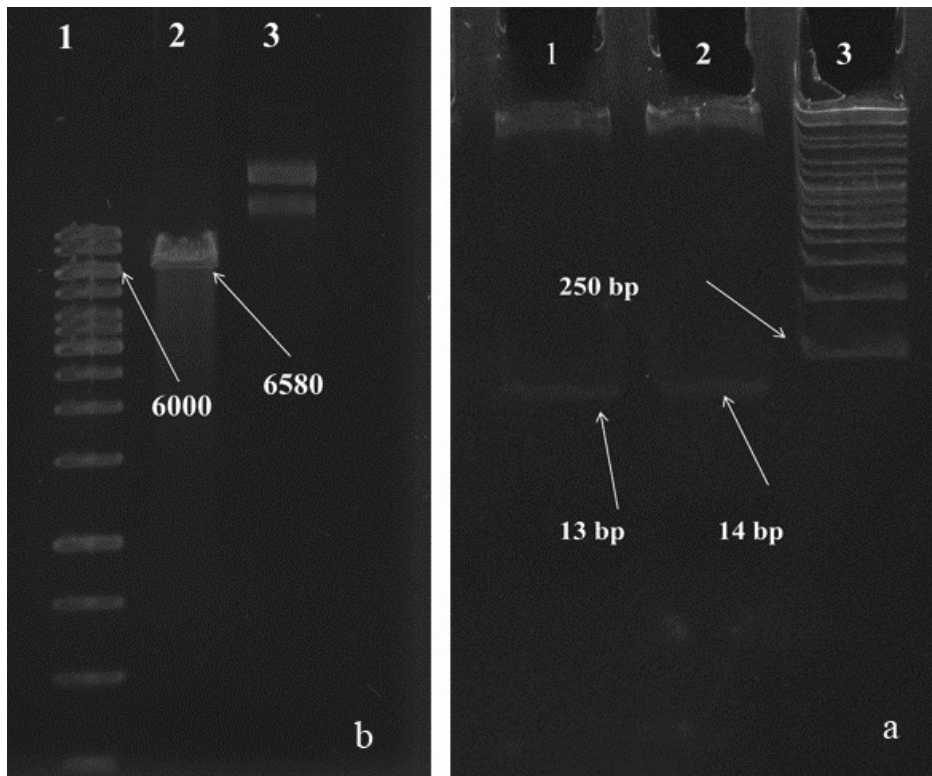
تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد که ناحیه اتصال دهنده توکسین می‌تواند در با کتری E.coli بیان شده و برای تحریک تولید آنتی بادی به کار رود. پژوهش‌های صورت گرفته (۲۷ و ۱۰) هم چنین نشان داده است ناحیه اتصال دهنده‌ی توکسین‌های تیپ A و B می‌تواند به عنوان واکنش بر علیه توکسین‌های ایجاد کننده، مورد استفاده قرار گیرند. تولید و توسعه واکنش‌های جدید با برطرف نمودن مشکلات مرتبط با واکنش‌های توکسوئیدی می‌تواند تولید واکنش بر علیه بوتولینوم را تسهیل نماید. تولید واکنش‌های نوترکیب نسبت به واکنش‌های توکسوئیدی اثر هزینه کمتری برخوردار است چرا که میزان تولید می‌تواند در مقادیر بالایی صورت گیرد. در کنار تمام مزایای واکنش‌های نوترکیب که به آن‌ها اشاره شد به نظر می‌رسد با ترکیب مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین که حاصل آن تولید پروتئین‌های نوترکیب کایمری است می‌توان واکنش‌های موثری را تولید نمود که ضمن برداشتن امتیازات واکنش‌های نوترکیب، مزایایی همچون کاهش پروسه تولید از طریق کاهش فرایندهای تولید و تخلیص پروتئین‌ها و کاهش هزینه تولید را نیز در پی داشته باشند. این عوامل سبب می‌گردد که مصرف کنندگان نیز تمایل بیشتری به استفاده از این واکنش‌ها داشته باشند. در زمینه مقابله با بیماری بوتولیسم تحقیقات صورت گرفته به طور عمده بر استفاده از واکنش‌های توکسوئیدی و واکنش‌های نوترکیب متمرکز بوده است. به علت مشکلات موجود در زمینه تولید و استفاده از واکنش‌های توکسوئیدی، امروزه واکنش‌های نوترکیب بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. تاکنون زنجیره سبک نورو توکسین، توکسین‌های کامل



شکل ۷: الگوی الکتروفورزی محصول PCR ناحیه اتصال دهنده‌ی بوتولینوم تیپ B بر روی ژل آگاروز یک درصد "چاهک ۱: محصول PCR تکثیر شده با آنزیم Pfu DNA polymerase، چاهک ۲: نشانگر اندازه مولکولی DNA، چاهک ۳: کنترل منفی که در آن به جای نمونه از آب مقطر استفاده شد.

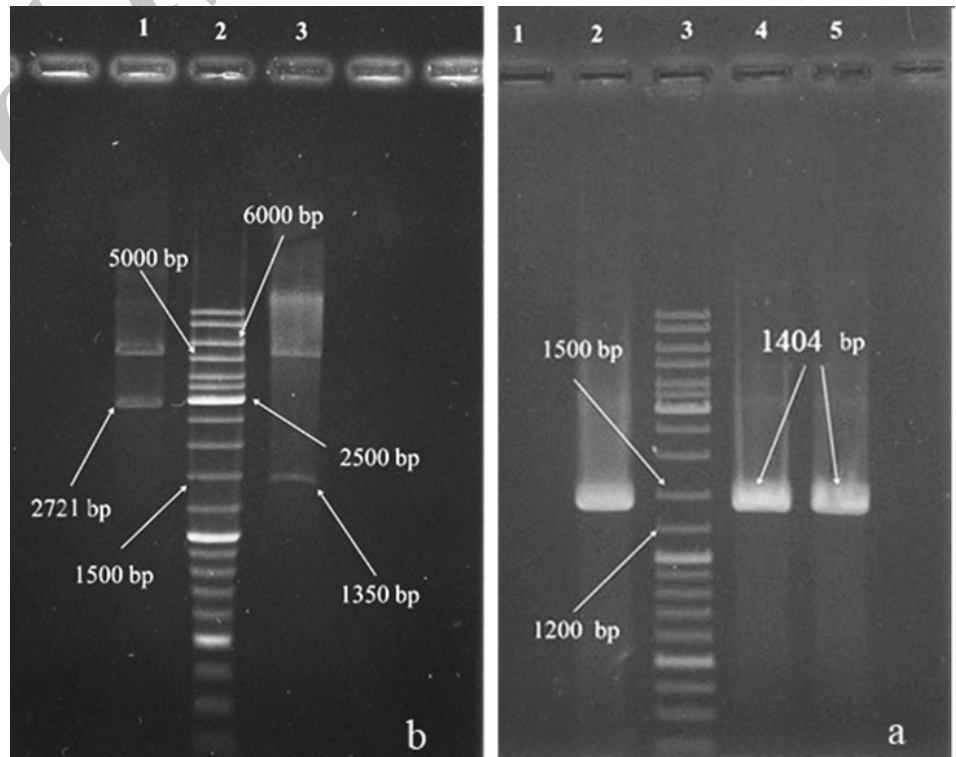
محصولات PCR بر روی PAGE غیردنا توره کننده ۱۲ درصد، نشان دهنده قطعات ۱۳ و ۱۴ نوکلئوتیدی حاصل از برش (a λ) و نیز انتقال پلاسمید برش خورده حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده تیپ A بر روی ژل آگاروز یک درصد نشان دهنده برش ناقل نوترکیب مورد نظر می‌باشد (b λ).

۳-۴ انجام واکنش الحاق بین پلاسمید نوترکیب حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده بوتولینوم تیپ A و ژن ناحیه اتصال دهنده‌ی نورو توکسین



شکل ۸: (a) الگوی الکتروفورزی حاصل از برش آنزیمی ژن ناحیه اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B به وسیله آنزیم‌های NdeI و NcoI بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد". چاهک ۱: برش با NcoI چاهک ۲: برش با NdeI چاهک ۳: مارکر، (b): الگوی الکتروفورزی حاصل اثر هضم آنزیمی (+) pET28a حاوی ژن ناحیه اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A به وسیله آنزیم‌های NdeI و NcoI بر روی ژل آگارز یک درصد". چاهک ۱: مارکر، چاهک ۲: پلاسمید نوترکیب برش خورده، چاهک ۳: پلاسمید نوترکیب دست نخورده

شکل ۹: (a) الگوی الکتروفورزی حاصل از آنالیز کلون‌ها به روش PCR جهت تایید همسانه سازی بر روی ژل آگاروزی یک درصد". چاهک ۱: کلونی فاقد جواب، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳: مارکر چاهک‌های ۴ و ۵: جواب مثبت یکی از کلونی‌ها با دو دمای Tm مختلف که نشان دهنده باند ۱۳۷۷ نوکلئوتیدی است (b). "مقایسه هضم دو گانه پلاسمید pET28a(+) نوترکیب اولیه و (+) pET28a نوترکیب حاوی ژن کایمر با آنزیم‌های XhoI و NcoI و خروج ژن‌های نواحی اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A و B به هم متصل شده". چاهک ۱: هضم دو گانه پلاسمید نوترکیب حاوی ژن کایمر و خروج قطعه ۲۷۲۴ نوکلئوتیدی چاهک ۲: مارکر، چاهک ۳: پلاسمید نوترکیب حاوی ناحیه اتصال دهنده‌ی بوتولینوم تیپ A



دلیل برای نخستین بار در زمینه تحقیقات واکسن‌های نوترکیب بوتولینم از طول کامل این نواحی به منظور ساخت ژن کایمر استفاده شد. انتظار می‌رود به علت استفاده از طول کامل این نواحی و در نتیجه شکل‌گیری ساختاری هر چه شبیه‌تر به ساختار طبیعی این نواحی در نورووتوکسین و نیز دارا بودن تمامی اپی‌توپ‌های موثر در ایمنی‌زایی، پروتئین نوترکیب حاصله از توانایی بالایی برای ایمنی‌زایی موثر برخوردار باشد. با توجه به کارایی بالای واکسن دو ظرفیتی تولید شده بر علیه تیپ‌های A و B (rBVA) که از مخلوط پروتئین‌های نوترکیب نواحی اتصال دهنده تیپ A و B تشکیل شده است، به نظر می‌رسد پروتئین کایمر حاصله ضمن بر خورداری از قابلیت واکسن دو ظرفیتی یاد شده، از مزایای واکسن‌های کایمری نیز برخوردار باشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده اثر برش‌های آنزیمی، PCR و تعیین توالی ژن‌ها در حامل نوترکیب، می‌توان گفت که ژن کایمر مورد نظر که حاصل الحاق نواحی اتصال دهنده نورووتوکسین‌های بوتولینوم تیپ A و B می‌باشد به صورت صحیح در سازه جدید pET۲۸a وارد شده است.

اما غیر فعال از نظر آنزیمی هم چنین پروتئین نوترکیب شامل ناحیه انتقال دهنده و کاتالیتیکی نورووتوکسین به صورت نوترکیب شده‌اند (۱۲ و ۱۶ و ۲۲-۲۰ و ۳۶). خرنجیره سبک نورووتوکسین، ایمنی‌خرایی قابل ملاحظه‌ای را ایجاد نمی‌نماید، پروتئین‌های غیر فعال آنزیمی ایمنی‌زایی مناسبی را ایجاد نمی‌نمایند اما به علت بزرگی پروتئین‌های استفاده شده واکنش‌های ناخواسته‌ای را موجب می‌گردند، پروتئین‌های نوترکیب حاوی نواحی انتقال دهنده و کاتالیزی نیز دوزهای موثر متفاوتی را نشان می‌دهند. اما ناحیه انتقال دهنده نورووتوکسین به علت داشتن اپی‌توپ‌های موثر و ایجاد ایمنی‌خرایی بالا، بیشتر مورد توجه قرار است. همانگونه که ذکر گردید نواحی انتقال دهنده نورووتوکسین‌های تیپ‌های مختلف به صورت تک ظرفیتی تولید شده‌اند (۱۲-۳۴). در تحقیق حاضر با توجه به اهمیت نواحی اتصال دهنده در ایجاد ایمنی‌زایی، اتصال نواحی اتصال دهنده نورووتوکسین‌های تیپ‌های A و B به عنوان اولین گام در تولید پروتئین دو ظرفیتی صورت گرفت. با توجه به اندازه نسبتاً بزرگ ژن‌های نواحی اتصال دهنده نورووتوکسین، امتزاج آن‌ها با یکدیگر جهت ساخت ژن کایمر در گام اول از اهمیت بالایی برخوردار است. به دلیل ایمنی‌زایی نسبتاً پایین حاصل از پروتئین‌های نوترکیب، حاوی بخشی از نواحی اتصال دهنده (۱۳ و ۳)، استفاده از طول بزرگ‌تر نواحی اتصال دهنده ضروری به نظر می‌رسد به همین

References / منابع

1. Singh BR, Intimate detail of the most poisonous poison. Nat Struct Biol. 2000; 7: 617–619.
2. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. J Am Med Assoc 2001; 285: 1059–1070.
3. Arndt JW, Jacobson M J, Abola EE, et al. A structural perspective on the sequence variability between botulinum neurotoxin subtypes A1–A4. J Mol Biol 2006; 362: 733–742.
4. Montecucco C, Schiavo G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. Q Rev Biophys. 1995; 28: 423–472.
5. Kozaki S, Miki A, Kamata Y, et al. Immunological characterization of papain-induced fragments of Clostridium botulinum type A neurotoxin and interaction of the fragments with brain synaptosomes. Infect Immun 1989; 57: 2634–2639.
6. Kamata Y, Kimura Y, Hiroi T, et al. Purification and characterization of the ganglioside-binding fragment of Clostridium botulinum type E neurotoxin. Biochim Biophys Acta 1993; 1156: 213–218.
7. Hoch DH, Romero-Mira M, Ehrlich BE, et al. Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 1692–1696.
8. Yu Zhou Y, Foss S, Lindo P, et al. Hemagglutinin-33 of type A botulinum neurotoxin complex binds with synaptotagmin II. FEBS Journal 2005; 272: 2717–2726.
9. Artin B, Bjorkman P, Cronqvist J. First case of type E wound botulism diagnosed using real-time PCR. J Clin Microbiol 2007; 45: 3589–3594.
10. Byrne, M.P., and Smith, L.A. Development of vaccine for prevention of botulism Biochimie 2000; 82: 955–966.
11. Park J B, Simpson LL. Inhalational poisoning by botulinum toxin and Inhalation vaccination with heavy – chain component. Infect Immun, 2003; 71: 1147–1154.
12. Leonard A. Smith. Botulism and vaccines for its prevention.

- Vaccine 2009;27: D33–D39.
13. Tavalalaie M, Chenal A, Gillet D, et al. Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies. *FEBS Lett* 2004;572: 299–306.
 14. Kiyatkin N, Maksymowych AB, Simpson LL. Induction of an immune response by an oral administration of recombinant botulinum toxin. *Infect Immun* 1997;65: 4586–91.
 15. Jenen MJ, Smith TJ, Ahmed SA, et al. Expression, Purification, and efficacy of type A botulinum neurotoxin catalytic domain fused to two translocation domain variant. *Toxicon* 2003;41: 691–701.
 16. Webb RP, Smith TJ, Wright P, et al. Production of catalytically inactive BoNT/A1 holoprotein and comparison with BoNT/A1 subunit vaccines against toxin subtypes A1, A2, and A3. *Vaccine* 2009;27: 4490–7.
 17. Gilsdorf J, Gul N, Smith LA. Expression, purification, and characterization of *Clostridium botulinum* type B light chain. *Protein Expr Purif* 2006;46: 256–67.
 18. Takahashi T, Joshi SG, Al-Saleem F, et al. Localization of the sites and characterization of the mechanism by which anti-light chain antibodies neutralize the actions of the botulinum holotoxin. *Vaccine* 2009;27: 2616–24.
 19. Smith LA, Byrne M. Vaccines for preventing botulism. In: Brin M, Jankovic J, Hallett M, editors. *Scientific and therapeutic aspects of botulinum toxin*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 427–40.
 20. Chaddock JA, Herbert MH, Ling RJ, et al. Expression and purification of catalytically active, non-toxic endopeptidase derivatives of *Clostridium botulinum* toxin type A. *Protein Expr Purif* 2002;25: 219–28.
 21. Shone C, Agostini H, Clancy J, et al. Bivalent recombinant vaccine for botulinum neurotoxin types A and B based on a polypeptide comprising their effector and translocation domains that is protective against the predominant A and B subtypes. *Infect Immun* 2009;77: 2795–801.
 22. Pier CL, Tepp WH, Bradshaw M, et al. Recombinant holotoxoid vaccine against botulism. *Infect Immun* 2008;76: 437–42.
 23. Byrne MP, Smith TJ, Montgomery VA, et al. Purification, potency, and efficacy of the recombinant vaccine candidate botulinum neurotoxin type A binding domain from *Pichia pastoris*. *Infect Immun* 1998;66: 4817–22.
 24. Potter KA, Zhang W, Smith LA, et al. Production and purification of the heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2000;19: 393–402.
 25. Zhang W, Smith LA, Plantz BA, et al. Design of methanol feed control in *Pichia pastoris* fermentations based upon a growth model. *Biotechnol Prog* 2002;6: 1392–9.
 26. Smith LA, Jensen MJ, Montgomery VA, et al. Roads from vaccines to therapies. *Mov Disord* 2004;19: S48–52.
 27. Smith LA. Development of recombinant vaccines for botulinum neurotoxin. *Toxicon* 1998;36: 1539–48.
 28. Potter KJ, Bevins MA, Vassilieva EV, et al. Production and purification of the heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype B, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 1998;13: 1357–65.
 29. Boles J, West M, Montgomery V, et al. Recombinant C fragment of botulinum neurotoxin B serotype (rBoNTB (Hc)) immune response and protection in the rhesus monkey. *Toxicon* 2006;47: 877–84.
 30. Webb RP, Smith TJ, Wright PM, et al. Protection with recombinant *Clostridium botulinum* C1 and D binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins. *Vaccine* 2007;25: 4273–82.
 31. Loveless BM. *Clostridium botulinum* neurotoxin type E binding domain from *Pichia pastoris* as a recombinant vaccine candidate. Master of Science Thesis. Frederick, MD: Hood College; 2001.
 32. Dux MP, Barent R, Sinha J, et al. Purification and scale-up of a recombinant heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype E in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2006;45: 359–67.
 33. Byrne MP, Titball RW, Holley J, Smith LA. Fermentation, purification, and efficacy of a recombinant vaccine candidate against botulinum neurotoxin serotype F from *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2000;18: 327–37.
 34. Johnson SK, Zhang W, Smith LA, et al. Scale-up of the fermentation and purification of the recombinant heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype F, expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2003;32: 1–9.
 35. Ebrahimi F, Rasaee MJ, Mousavi SL et al. Production and characterization of a recombinant chimeric antigen consisting botulinum neurotoxin serotypes A, B and E binding subdomains. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2010; 35: 1, 9–19.
 36. Jensen MJ, Smith TJ, Ahmed SA, et al. Expression, purification, and efficacy of type A botulinum neurotoxin catalytic domain fused to two translocation domain variants. *Toxicon* 2003;41: 691–701.