Archive of SID

مجله علمی پژوهشی «علوم و فناوری‌های پدافند غیرعامل»
سال چهارم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲؛ ص ۳۸-۳۱

مطالعه ترمودینامیکی پایانه کربوکسیل نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E با روش طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی

مصیب رستمیان[۱]، سید جعفر موسوی[۲*]، فیروز ابراهیمی[۲]
۱- کارشناس ارشد، ۲- استادیار دانشگاه جامع امام حسین (ع)
(دریافت: ۹۱/۰۲/۰۲، پذیرش: ۹۱/۱۲/۱۸)

چکیده

به‌منظور پیشگیری از سندروم بوتولیسم، به‌تازگی محققین به استفاده از واکسن‌های نوترکیب توجه خاصی نشان داده‌اند. یکی از این واکسن‌ها، پروتئین نوترکیب حاوی ۹۳ اسید آمینه انتهای کربوکسیلی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E (rBoNT/E-HCC) است. در این تحقیق پس از بیان و تخلیص rBoNT/E-HCC، به بررسی اثر pH بر این پروتئین توسط طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (Circular Dichroism, CD) پرداخته شده و به دنبال آن مطالعات ترمودینامیکی به‌منظور یافتن شرایط بهینه تخلیص و سنجش امکان استفاده از این کاندید، واکسن به‌صورت خوراکی مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور واسرشتگی حرارتی rBoNT/E-HCC در چهار pH مختلف (۲، ۵، ۷/۴ و ۹) توسط CD مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داده که Tm و ΔG° پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای بازی نسبت به pHهای اسیدی بالاتر است. در نتیجه یافته‌های این تحقیق، بهترین شرایط تخلیص برای پروتئین rBoNT/E-HCC، شرایط با pH خنثی یا باز می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E، واکسن نوترکیب، دورنگ نمایی دورانی، مطالعه ترمودینامیکی.

Thermodynamic Study of Carboxy Terminal of Botulinum Neurotoxin Type E by Circular Dichroism Spectroscopy

M. Rostamian, S. J. Mousavy*, F. Ebrahimi
Imam Hossein University
(Received: 21/04/2012; Accepted: 08/03/2013)

Abstract

Nowadays for prevention of botulism syndrome, researchers have tended to use recombinant vaccines. One of these vaccines is a recombinant protein containing 93 amino acids of C-terminal of botulinum neurotoxin type E (rBoNT/E-HCC). In this study, after expression and purification of rBoNT/E-HCC, the effect of different pH on the protein was carried out by Circular dichroism (CD) spectrometry and followed by thermodynamics studies. The main goal was, to find the optimum purification condition for this protein and also to evaluate the possibility of using this protein as an oral vaccine. For this purpose, thermal danaturation of rBoNT/E-HCC was studied at four different pH (2, 5, 7.4, and 9) by CD. Our results indicated that T_m and ΔG° of rBoNT/E-HCC are higher in alkaline pH in comparison with acidic pH. Finally, our results suggest that; neutral or alkaline pH as the optimum pH for rBoNT/E-HCC purification.

Keywords: Botulinum Neurotoxin Type E, Recombinant Vaccines, Circular Dichroism, Thermodynamic Study.

www.SID.ir

* Corresponding Author E-mail: mosavi@ihu.ac.ir

www.SID.ir

۱. مقدمه

بوتولیسم نوعی فلج عضلانی خطرناک است. دوبینی و تاری دید در مراحل اولیه بیماری و در مراحل بعدی، فلج پیش‌رونده عضلانی و گسترش آن به عضلات تنفسی و در نهایت مرگ از علائم این بیماری هستند [۱]. عامل اصلی بوتولیسم نوروتوکسین‌هایی هستند که از سه ناحیه عملکردی تشکیل شده‌اند که عبارتند از: ناحیه کاتالیتیک، ناحیه انتقال دهنده و ناحیه اتصال دهنده. این نوروتوکسین پس از عبور از خون در مجاورت پایانه‌های عصبی قرار گرفته و از طریق ناحیه اتصال دهنده به گیرنده خود متصل می‌شود. سپس ناحیه انتقال دهنده باعث ورود نوروتوکسین به پایانه عصبی می‌شود. در آنجا ناحیه کاتالیتیک سم با فعالیت آنزیمی وابسته به Zn^{2+}، پروتئین‌های غشایی مانند SNAP-25[1] یا VAMP[2] را می‌شکند. بدین ترتیب حذف این پروتئین‌ها، باعث عدم ترشح استیل کولین، متعاقب آن عدم انتقال پیام عصبی و در نهایت فلج عضلانی می‌شود [۳ و ۲].

امروزه تحقیقات بسیار گسترده‌ای به منظور دست‌یابی به واکسن مناسب برعلیه این نوروتوکسین‌ها انجام می‌گیرد. پژوهشگران و دانشمندان، تحقیق بر روی واکسن‌های نوترکیب را به‌دلیل مشکلات مربوط به واکسن‌های توکسوئیدی در اولویت اول تحقیقات خود قرار داده‌اند [۵ و ۴]. یکی از این نوع واکسن‌ها، پروتئین‌های نوترکیب مشتق از ناحیه اتصال دهنده می‌باشد. گمان بر این است که آنتی بادی‌های ضد این پروتئین نوترکیب می‌توانند باعث خنثی‌سازی اثر نوروتوکسین بوتولینوم شوند [۹-۶ و ۴].

سالانه بررسی‌های فراوانی روی انواع مختلف کاندیدهای واکسن بوتولیسم و امکان استفاده از آن‌ها به‌صورت خوراکی انجام می‌شود [۱۰]. با توجه به اهمیت ناحیه اتصال دهنده در اتصال سم به نورون‌ها، بررسی روی این ناحیه به عنوان کاندید واکسن مورد توجه محققین است. یکی از این نوع کاندید واکسن‌ها، پروتئین نوترکیبی متشکل از ۹۳ اسید آمینه انتهای کربوکسیلی زیر واحد اتصال دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E (rBoNT/E-HCC) می‌باشد. ژن این پروتئین که قبلاً در وکتور pET32a در باکتری E.coli Bl21(DE3) کلون شده بود[۱۱]، در اختیار ما قرار گرفته است.

حالت طبیعی پروتئین حاصل تعادلی بین نیروهای ضعیف متعددی است که به راحتی تحت تأثیر دما و شرایط محیط اطراف آن (پارامترهایی از قبیل pH، قدرت یونی و ...) قرار می‌گیرد. از هم گسیختن ساختار سوم پروتئین که همراه با از دست دادن فعالیت پروتئین است را واسرشتگی[3] می‌نامند. امروزه با اهداف متعددی، واسرشتگی پروتئین مورد مطالعه قرار می‌گیرد، اما هدف اصلی اکثر این مطالعات، کسب اطلاعات بیشتر در مورد ساختار، خصوصیات و فعالیت پروتئین است. یکی از مهم‌ترین انواع واسرشتگی، واسرشتگی حرارتی است که پارامترهای مختلف ترمودینامیکی از تجزیه و تحلیل این نوع واسرشتگی حاصل می‌شود. هر کدام از این پارامترهای ترمودینامیکی حاوی اطلاعات ارزشمندی در مورد ساختار، خصوصیات و یا فعالیت پروتئین می‌باشد. یکی از این پارامترها تغییرات انرژی آزاد گیبس (ΔG) است [۱۲]. تحت شرایط استاندارد، وقتی واکنشگرها و محصولات با غلظت ابتدایی ۱ M وجود دارند، نیروی پیش برنده سیستم به سمت تعادل، به‌صورت تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد (ΔG°)، تعریف می‌شود [۱۳]. با تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی می‌توان این پارامتر را به‌دست آورد [۱۴].

از آنجایی که دانستن خصوصیات بیوفیزیکی- بیوشیمیایی هر کاندید واکسن به‌منظور حصول شرایط مناسب نگهداری، تخلیص، تزریق و امکان استفاده از آن به‌صورت خوراکی، از اهمیت حیاتی برخوردار است، در این مطالعه پس از بیان و تخلیص پروتئین rBoNT/E-HCC به بررسی اثر pH به‌عنوان یک پارامتر بسیار تأثیرگذار روی ساختار پروتئین، با روش طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) پرداخته شده است. به عبارت دیگر هدف این مطالعه این بوده که بررسی شود چه pHی برای نگهداری، تخلیص و تزریق این کاندیدای واکسن مناسب است و برای رسیدن به این هدف، مطالعات ترمودینامیکی به عنوان قدم اولیه انتخاب شده است. بدین منظور واسرشتگی حرارتی rBoNT/E-HCC در چهار pH مختلف (۲، ۵، ۷/۴ و ۹) توسط CD بررسی شده و به‌دنبال آن پارامترهای ترمودینامیکی با تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌دست آمده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد شیمیایی و زیستی

آکریل آمید، بیس‌آکریل آمید، SDS، اوره، اسیدکلریدریک، کلرید سدیم، ایزوپروپانول،کوماسی برلیان بلو R- ۲۵۰، هیدروکسید سدیم، اسید استیک گلاسیال، متانول، اتانول، Tris-base، ایزوپروپیل تیو-D-گالاکتوپیرانوزید (IPTG[4])، پلی اکریل آمید و آمونیوم پرسولفات از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. باکتری E. coli Bl21 حاوی وکتور pET-32a (+) دارای ژن مربوط به rBoNT/E-HCC از دکتر سید لطیف موسوی [۱۱] گرفته شد.

۲-۲. بیان ژن و تخلیص پروتئین نوترکیب rBoNT/E-HCC

باکتری E. coli Bl21 حاوی وکتور pET-32a (+) دارای ژن مربوط به rBoNT/E-HCC در محیط کشت LB مایع[5] حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت نهایی ۴۰μg/ml تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۷۰-۱۵۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور کشت داده شدند. پس از رسیدن مقدار جذب نوری لوله‌ها به ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به هر کدام از لوله‌های تست، IPTG با غلظت

[1] Synaptosomal Associated Protein- 25
[2] Vesicle Associated Mmembrane Protein
[3] Denaturation
[4] Isopropyl-1-Thio-b-D Galactopyranoside, IPTG
[5] LB Broth

Archive of SID

Archive of SID

طول موج ۶۰۰ نانومتر، به هر کدام از لوله‌های تست، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار اضافه و به لوله‌های شاهد، IPTG اضافه نشد. سپس لوله‌های شاهد و تست به مدت شش ساعت در شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه گرما گذاری شدند. سپس سلول‌ها با سانتریفوژ (۱۰ دقیقه، ۵۰۰۰ دور در دقیقه) جمع‌آوری شدند [۱۸-۱۵]. سلول‌های جمع‌آوری شده با بافر لیز کننده (NaH_2PO_4 ۱۰۰ میلی مولار، Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار، اوره ۸ مولار و pH ۸) مخلوط و از طریق سونیکاسیون با قدرت ۷۰ درصد و ۰/۵ پالس در چهار چرخه زمانی (هر کدام شامل ۱۵ ثانیه سونیکاسیون و ۴۵ ثانیه استراحت درون یخ) شکسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی با نسبت یک به پنج با بافر نمونه دارای غلظت 5x مخلوط و به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد [۱۵]. در نهایت نمونه‌های تیمار شده به روش‌های فوق، توسط ژل الکتروفورز SDS-PAGE[1] ۱۲ درصد، از لحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب بررسی شدند. برای مشاهده باندهای پروتئین، از روش رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو استفاده شد. به منظور تخلیص پروتئین نوترکیب طبق پروتکل تخلیص توسط ستون کروماتوگرافی Ni-NTA، از ستون نیکل استفاده گردید [۱۹]. به منظور تعیین غلظت پروتئین موجود در محلول‌های به‌دست آمده حاصل از مرحله قبل از روش برادفورد [۲۰] استفاده شد.

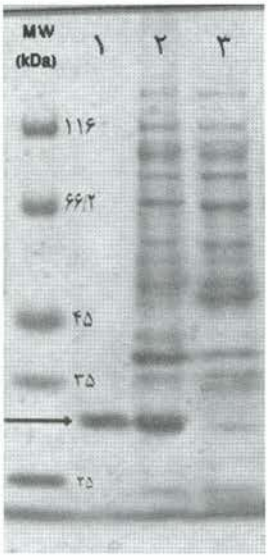
۲-۳. مطالعات واسرشتگی حرارتی

واسرشتگی حرارتی محلول‌های rBoNT/E-HCC با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر Jasco مدل J- ۸۱۰ با استفاده از کووت کوارتز با قطر ۲mm انجام گرفت. کنترل دما توسط کنترل کننده دما دستگاه انجام شد. مقادیر CD محلول‌های rBoNT/E-HCC با غلظت حدود ۰/۲ mg/ml در طول موج‌های ۲۶۰nm- و ۱۹۰ nm در محدوده دمایی ۲۵-۸۰°C با سرعت روبشی ۰/۵°C در دقیقه ثبت شد [۲۱]. در تمام نمونه‌ها غلظت پروتئین حدود ۰/۲mg/ml در حضور بافر ((۱۰۰mM) NaH_2PO_4، (۱۰mM)Tris-base) در چهار pH (۲، ۵، ۷/۴ و ۹) مورد مطالعه بود. از کووت حاوی بافر بدون پروتئین به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. نمودارهای به‌دست آمده توسط برنامه ماکروسافت اکسل[2] رسم شدند.

۳. نتایج و بحث

۳-۱. بیان ژن وتخلیص پروتئین rBoNT/E-HCC

برای بیان این ژن در کاست pET32a(+) با نشان هگزا هیستیدین در انتهای آمینی ژن، از میزبان E.coliBL21 استفاده شد. همان‌طور که در الگوی الکتروفورز پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) (شکل ۱) دیده می‌شود، کلنی‌هایی که ترانسفورم شده بودند، در حضور IPTG، به‌عنوان القاء کننده پروموترهای تحت کنترل T7، بیان داشته‌اند و در عدم حضور آن بیانی از خود نشان ندادند. برای تخلیص این پروتئین از ستون تمایلی Ni-NTA استفاده شد که نتایج قابل قبولی داشت. پروتئین نوترکیب با خلوص به‌نسبت بالا، پس از افزودن بافر شست‌وشو، NaH_2PO_4 ۱۰۰ میلی مولار، Tris-HCl ۱۰ میلی مولار، اوره ۸ مولار، pH ۴/۵ از ستون خارج شد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد از بیان و تخلیص پروتئین rBoNT/E-HCC. ردیف ۱ پروتئین تخلیص شده rBoNT/E-HCC با ستون کروماتوگرافی نیکل، ردیف ۲ و۳، به‌ترتیب کلنی‌های القاء شده و القاء نشده با IPTG و ردیف MW استاندارد اوزان مولکولی را نشان می‌دهند. فلش باند پروتئینی مربوط به rBoNT/E-HCC (۳۰ kDa~) را نشان می‌دهد.

۳-۲.مطالعات واسرشتگی حرارتی rBoNT/E-HCC در شرایط pH مختلف (مطالعات دو رنگ نمایی دورانی)

به منظور مطالعه واسرشتگی حرارتی rBoNT/E-HCC با استفاده از روش دو رنگ نمایی دورانی، مقادیر CD محلول‌های rBoNT/E-HCC در طول موج‌های ۲۶۰ nm- ۱۹۰ nm در محدوده دمایی ۲۵-۸۰ °C با سرعت روبشی ۰/۵ °C در دقیقه ثبت شد. برای مطالعه پایداری پروتئین با CD می‌توان واسرشتگی پروتئین را در طول موج ۲۲۲ nm (معیاری از واسرشتگی مارپیچ‌های آلفا) و طول موج ۲۱۷ nm (معیاری از واسرشتگی صفحات بتا) [۲۲ و ۱۴] مورد مطالعه قرار داد.

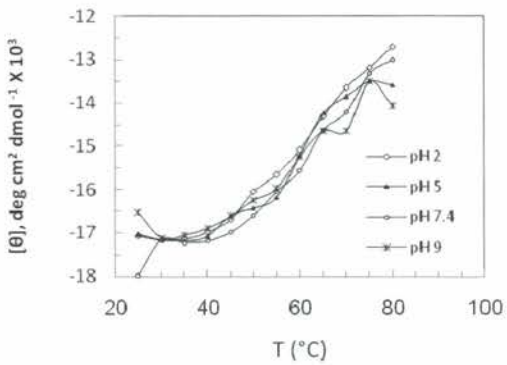
مطالعات دو رنگ نمایی دورانی روی مارپیچ آلفا: واسرشتگی حرارتی مربوط به مارپیچ آلفای پروتئین مورد نظر با اندازه‌گیری تغییرات بیضی‌واری[3] در طول موج ۲۲۲ nm انجام گرفت[۱۴]. نتایج واسرشتگی حرارتی پروتئین rBoNT/E-HCC درpHهای ۲، ۵، ۷/۴ و ۹ در شکل (۲) نشان داده شده است. همچنین شکل (۳) نشان دهنده تغییرات مشتق درجه اول ($\Delta\theta/\Delta T$) بر علیه دما مربوط به

[1] Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
[2] Microsoft Excel
[3] Elipticity

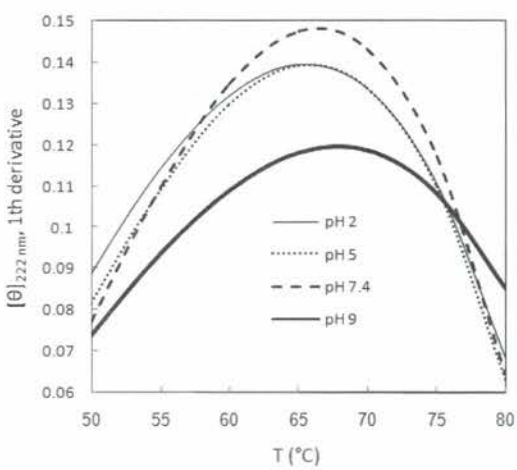
www.SID.ir

Archive of SID

هرکدام ازمنحنی‌های شکل (۲) می‌باشد. نقاط بیشینه در این پروفایل نشان دهنده دمای واسرشتگی (Tm) می‌باشد. Tmپروتئین rBoNT/E-HCC درpHهای ۲، ۵، ۷/۴ و ۹ به‌ترتیب ۶۵، ۶۵، ۶۶/۵ و ۶۸ بود. این نتایج نشان می‌دهد که Tm مربوط به پروتئین rBoNT/E-HCC در pH= ۹/۰ نسبت به pHهای ۷/۴، یک و نیم درجه و نسبت به pHهای ۲ و ۵، سه درجه سانتی‌گراد بالاتر می‌باشد. این افزایش در Tm بیانگر آن است که پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای بازی نسبت به pHهای اسیدی پایداری حرارتی بیشتری دارد.



شکل ۲. نمودار واسرشتگی حرارتی پروتئین rBoNT/E-HCC در شرایط pH مختلف با کاوش واسرشتگی حرارتی مارپیچ آلفا در nm ۲۲۲. پروتئین rBoNT/E-HCC با غلظت حدود ۲۰۰µg/ml در بافر ((NaH_2PO_4(۱۰۰mM)، Tris-base(۱۰mM)) با pHهای ۲، ۵، ۷/۴ و ۹ قرارداد. واسرشتگی با اندازه‌گیری بیضی واری در طول موج ۲۲۲nm با سرعت گرمایش ۰/۵°C/min صورت پذیرفت.



شکل ۳. نمودار تغییرات مشتق درجه اول تغیرات بیضی واری (Δθ/ΔT) در nm ۲۲۲ نسبت به تغییرات دما. مربوط به منحنی‌های واسرشتگی حرارتی پروتئین rBoNT/E-HCC در pH های مختلف. نقاط بیشینه در این پروفایل نشان دهنده Tm است.

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی پروتئین با آنالیز داده‌های CD حاصل از مارپیچ آلفا: با فرض اینکه پروتئین مورد نظر از مدل انتقال دو حالت (Two–State Transition) زیر پیروی کند:

طبیعی ⟷ واسرشته

می‌توان تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد (ΔG°) را از روابط زیر به‌دست آورد [۱۲]:

$$F_d = \frac{Y_N - Y_{obs}}{Y_N - Y_D} \quad (۱)$$

$$K = \frac{F_d}{1 - F_d} = \frac{Y_N - Y_{obs}}{Y_{obs} - Y_D} \quad (۲)$$

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K = -RT \ln \frac{Y_N - Y_{obs}}{Y_{obs} - Y_D} \quad (۳)$$

در این معادله‌ها R ثابت جهانی گازها (۸/۳۱~بر حسب ژول بر مول بر کلوین)، T دمای مطلق (بر حسب کلوین)، Y_{obs} مقدار بیضی‌واری مشاهده شده و ثبت شده توسط دستگاه CD طی افزایش دما، Y_N و Y_D به‌ترتیب مقدار بیضی‌واری مشاهده شده در حالت طبیعی و واسرشته پروتئین، و K ثابت اتصال را نشان می‌دهد.

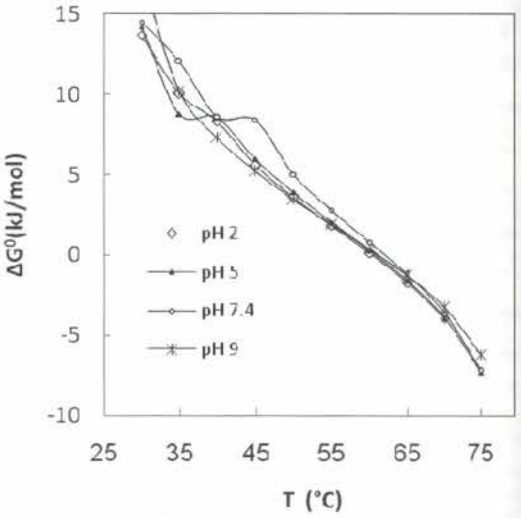
نمودار ΔG در مقابل دما عموماً به شکل یک نمودار زنگوله‌ای شکل است که در بسیاری از پروتئین‌ها قله آن در بین دمای ۱۰- °C تا ۳۵+°C قرار می‌گیرد [۱۲]. طبق تعریف، ΔG پروتئین در شرایط استاندارد (فشار یک اتمسفر، غلظت یک میلی‌مولار واکنش دهنده‌ها و دمای ۲۵ °C) را تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد (ΔG°) پروتئین می‌نامند. ولی می‌توان ΔG° را در دماهای مختلف به‌دست آورد و نمودار ΔG° بر علیه دما را رسم کرد. در صورتی که هدف یک تحقیق، مقایسه چندین پروتئین (یا یک پروتئین در شرایط مختلف) باشد، می‌توان ΔG° پروتئین در دمای ۲۵ °C را به‌عنوان ΔG° مقایسه‌ای در نظر گرفت (با برون یابی نمودار ΔG° بر علیه دما می‌توان ΔG° پروتئین را در دمای ۲۵°C به‌دست آورد که همان ΔG° مقایسه‌ای پروتئین است) [۲۲]. هر چه ΔG° حالت طبیعی پروتئین مثبت‌تر باشد، دمای بیشتری برای واسرشتگی پروتئین مورد نیاز می‌باشد و در نتیجه پروتئین پایدارتر است [۱۳]. با اقتباس از داده‌های حاصل از شکل (۲) و معادله (۳)، نمودارهای تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد (ΔG°) در مقابل دما رسم گردیدند (شکل ۴). با برون‌یابی نمودار ΔG° بر علیه دما، ΔG° پروتئین در ۲۵ °C (ΔG° مقایسه‌ای) به‌دست آمد. مقایسه تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد (ΔG°) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان معیاری از پایداری پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای مختلف در جدول (۱)، ستون دوم آورده شده است. داده‌های این جدول نشان می‌دهد که پروتئین در pH= ۹/۰ تغییرات انرژی آزاد مثبت بزرگ‌تری (+۱۶/۲kJ/mol) نسبت به سایر pH ها دارد که نشان دهنده‌ی پایداری بیشتر پروتئین در این pH است. به همین ترتیب تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد در pH های ۷/۴ و ۵ نیز از pH=۲/۰ بیشتر است که نشان می‌دهد پروتئین در این دو pH هم نسبت به pH=۲/۰ پایدارتر است.

مقدار T_m پروتئین را می‌توان از نمودارهای ΔG° بر علیه دما نیز به‌دست آورد. در این نمودارها دمایی که در آن ΔG° برابر صفر است، برابر T_m پروتئین است [۱۲]. بنابراین با توجه به این امر از طریق

www.SID.ir

Archive of SID

(جدول ۱، ستون چهارم). در اینجا هم مشاهده می‌شود که با افزایش pH از ۲ تا ۹، T_mپروتئین افزایش می‌یابد.



شکل ۴. نمودار تغییرات انرژی آزاد ($\Delta G°$) باز شدن پروتئین rBoNT/E-HCC(در pHهای۲، ۵، ۷/۴ و ۹) در مقابل دما طبق داده‌های حاصل از شکل(۲).

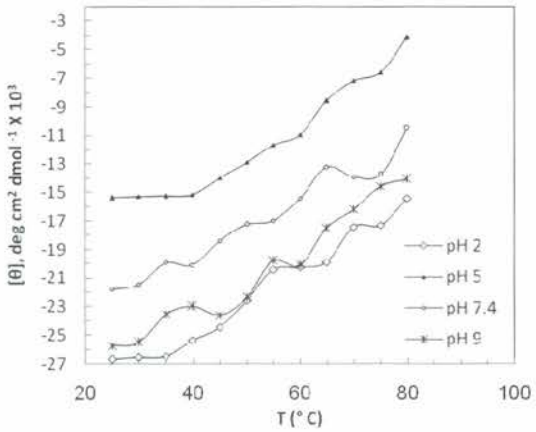
جدول ۱. انرژی آزاد گیبس استاندارد ($\Delta G°$)وTmپروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای مختلف. مقایسه انرژی آزاد گیبس استاندارد ($\Delta G°$) (دمای۲۵°C) مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتای پروتئینrBoNT/E-HCC در pHهای۲، ۵، ۷/۴ و ۹ به‌ترتیب از راست در ستون دوم و سوم آورده شده است. Tm پروتئین rBoNT/E-HCC از نمودارهای$\Delta G°$ بر علیه دما در نقطه صفر=$\Delta G°$ حاصل از مطالعه روی مارپیچ آلفا و صفحات بتا به‌ترتیب در ستون‌های چهارم و پنجم آورده شده است.

pH	$\Delta G°_{\alpha}$ (۲۵°C) kJ/mol	$\Delta G°_{\beta}$ (۲۵°C) kJ/mol	$T_{m\alpha}$ (°C)	$T_{m\beta}$ (°C)
۲/۰	۱۴/۸	۹/۸	۵۹/۶	۵۴/۴
۵/۰	۱۵/۱	۱۰/۰	۵۹/۸	۵۶/۶
۷/۴	۱۶/۰	۱۰/۲	۶۱/۲	۵۶/۶
۹/۰	۱۶/۲	۱۱/۰	۶۱/۴	۵۷/۲

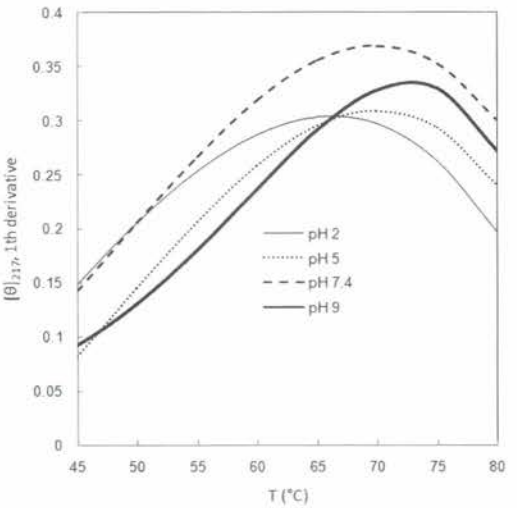
مطالعات دو رنگ نمایی دورانی، روی صفحات بتا: واسرشتگی حرارتی مربوط به صفحه بتا پروتئین مورد نظر با اندازه‌گیری تغییرات بیضی‌واری در طول موج ۲۱۷ nm انجام گرفت [۲۲ و ۱۲]. نتایج واسرشتگی حرارتی پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای ۲، ۵، ۷/۴ و ۹ در شکل (۵) نشان داده شده است. همچنین شکل (۶) نشان دهنده تغییرات مشتق درجه اول ($\Delta\theta/\Delta T$) بر علیه دما مربوط به هر کدام از منحنی‌ها است. نقاط بیشینه در این پروفایل نشان دهنده Tm می‌باشد. دمای واسرشتگی (Tm) پروتئین rBoNT/E-HCC در pH های۲،۵، ۷/۴ و ۹ به‌ترتیب ۶۶، ۶۸، ۶۹ و ۷۱/۵ بود.

www.SID.ir

این نتایج نشان می‌دهد که T_m مربوط به پروتئین rBoNT/E-HCC در pH=۹/۰ نسبت به pH ۷/۴ دو و نیم درجه و نسبت به pHهای ۵ و۲ به‌ترتیب سه و نیم و پنج و نیم درجه سانتی‌گراد بالاتر است. این افزایش در T_m بیانگر این است که پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای بازی نسبت به pHهای اسیدی پایداری حرارتی بیشتری دارد. نتایج حاصل با نتایج مطالعات دو رنگ نمایی روی مارپیچ آلفا تطابق دارد.



شکل ۵. نمودار واسرشتگی حرارتی پروتئین rBoNT/E-HCC در شرایط pH مختلف با کاوش واسرشتگی حرارتی صفحه بتا در ۲۱۷ nm. پروتئین rBoNT/E-HCC با غلظت حدود ۲۰۰ µg/ml در بافر ((۱۰۰mM)NaH_2PO_4، (۱۰mM)Tris-base) باpHهای ۲، ۵، ۷/۴ و ۹ قراردارد. واسرشتگی با اندازه‌گیری بیضی‌واری در طول موج ۲۱۷ nm با سرعت گرمایش ۰/۵°C/min صورت پذیرفت.



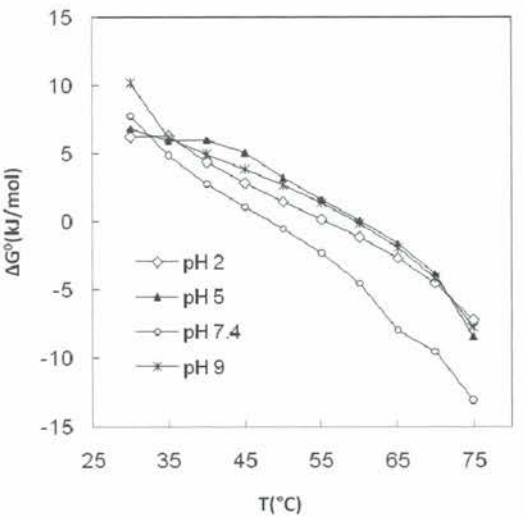
شکل ۶. نمودار تغییرات مشتق درجه اول تغییرات بیضی‌واری ($\Delta\theta/\Delta T$) در ۲۱۷ nm نسبت به تغییرات دما. مربوط به منحنی‌های واسرشتگی حرارتی پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای مختلف. نقطه بیشینه در این پروفایل نشان دهنده Tm است.

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی پروتئین با آنالیز داده‌های CD حرارتی صفحه بتا: با توجه به داده‌های حاصل از شکل (۵) و معادله (۳) نمودارهای تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد ($\Delta G°$) بر

Archive of SID

علیه دما رسم شدند (شکل ۷). مقایسه‌ی تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد (ΔG°) (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به‌عنوان معیاری از پایداری پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای مختلف در جدول (۱)، ستون سوم آورده شده است. داده‌های این جدول نشان می‌دهد که پروتئین در pH=۹/۰ تغییرات انرژی آزاد مثبت بزرگ‌تری (+۱۱kJ/mol) نسبت به سایر pHها دارد که نشان دهنده پایداری پروتئین در این pH است. به‌همین ترتیب تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد در pHهای ۷/۴ و ۵ نیز از pH=۲/۰ بیشتر است که نشان می‌دهد پروتئین در این دو pH هم نسبت به pH=۲/۰ پایدارتر است.

مقادیر T_m از نمودارهای ΔG° بر علیه دما نیز محاسبه شد (جدول ۱، ستون پنجم). در اینجا هم مشاهده می‌شود که با افزایش pH از ۲ تا ۹ مقدار T_m پروتئین افزایش می‌یابد.



شکل ۷. نمودار تغییرات انرژی آزاد (ΔG°) بازشدن پروتئین rBoNT/E-HCC (درpHهای۲، ۵، ۷/۴ و ۹) درمقابل دما طبق داده‌های حاصل ازشکل (۵).

۴. نتیجه‌گیری

مطالعات گذشته نشان داده که سم کامل بوتولیسم تیپ C در مقابل شرایط دستگاه گوارش مقاوم است [۲۳]. بر اساس این پژوهش، این پرسش پیش می‌آید که آیا ممکن است ساختار پروتئین‌های نوترکیب مشتق از سم بوتولیسم نیز در مقابل شرایط دستگاه گوارش دچار تغییر نشود؟ به‌منظور بررسی این مسئله در مورد پروتئین rBoNT/E-HCC و همچنین یافتن شرایط pH مناسب برای تخلیص، تزریق و نگهداری این کاندید واکسن، در این تحقیق چندین pH مختلف (۲، ۵، ۷/۴ و ۹) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از دو رنگ نمایی دورانی مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا نشان داد که پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای بازی پایدارتر است.

در این تحقیق، ΔG° محاسبه شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (با برون‌یابی نمودار ΔG° برعلیه دما) به‌عنوان ΔG° مقایسه‌ای پروتئین در pHهای مختلف در نظرگرفته شد. مقایسه ΔG° حاصل از بررسی‌های روی مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا پروتئین rBoNT/E-HCC نشان داد که این پروتئین در pH=۹/۰ دارای بیشترین مقدار ΔG° مثبت (۱۶/۲ kJ/mol+ با بررسی روی مارپیچ آلفا و ۱۱ kJ/mol+ با بررسی روی صفحات بتا) و در pH=۲/۰ دارای کم‌ترین مقدار ΔG° مثبت (۱۴/۸ kJ/mol+ با بررسی روی مارپیچ‌های آلفا و ۹/۸ kJ/mol+ با بررسی روی صفحات بتا) است. ΔG° محاسبه شده در pHهای ۵ و ۷/۴ مابین این دو مقدار قرار گرفت. در نمودارهای ΔG° بر علیه دما، دمایی که در آن ΔG° برابر صفر می‌باشد، برابر T_mپروتئین است. با در نظر گرفتن این حقیقت، T_m پروتئین با آنالیز داده‌های نمودارهای ΔG°علیه دما به‌دست آمد و نتایج نشان داد که T_m پروتئین درpHهای بازی بیشتر از pHهای اسیدی و خنثی است (جدول ۱، ستون‌های چهارم و پنجم). در کل داده‌های حاصل از نمودارهای ΔG° علیه دما نشان داد که پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای مطالعه شده بالاتر، پایدارتر می‌شود.

همچنین این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین rBoNT/E-HCC در pHهای خنثی و بازی از لحاظ پایداری چندان تفاوتی با هم ندارند (T_m و ΔG° نزدیک به هم دارند) در حالی که کاهش T_m و ΔG° پروتئین در pH=۲/۰ نسبت به سایر pHها مشاهده شد. بنابراین نتایج کلی نشان دهنده اثر ناپایداری pHهای بسیار پایین که معیاری از pH دستگاه گوارش (معده) هست، بر روی پروتئین rBoNT/E-HCC می‌باشد. این تغییرات ممکن است در ایمنی زایی پروتئین بسیار اثرگذار باشند. بنابراین توصیه می‌شود که مطالعات ایمونولوژیکی نیز بر روی این پروتئین به‌منظور بررسی احتمال استفاده از این پروتئین به‌عنوان واکسن به‌صورت خوراکی، انجام گیرد، و در نهایت طبق این بررسی به نظر می‌رسد که بهترین حالت به منظور تخلیص، تزریق و نگهداری این پروتئین شرایط pH خنثی یا بازی باشد.

۵. مراجع

[1] Novak, J.; Peck, M.; Juneja, V.; Johnson, E. "Clostridium Botulinum and Clostridium Perfringens in: Foodborne Pathogens"; Microbiol. Mol. Biol. R. 2005, 40, 383–407.

[2] Li, L.; Singh, B. "Structure– Function Relationship of Clostridial Neurotoxins"; J. Toxicol. Toxin. Rev. 1999, 18, 95-112.

[3] Simpson, L. "Identification of Major Steps in Botulinum Toxin Action"; Annu. Rev. Pharmacol. 2004, 44, 161-193.

[4] Smith, L. "Development of Recombinant Vaccines for Botulium Neurotoxin"; Toxicon. 1998, 36, 1539–1548.

[5] Janice, M.; Rusnak, A.; Smith, L. "Botulinum Neurotoxin Vaccines Past History and Recent Developments"; Hum. Vaccines 2009, 5, 794-805.

[6] Baldwin, M.; Tepp, W.; Przedpelski, A.; Pier, C.; Bradshaw, M.; Johnson, E.; Barbieri, J. "Subunit Vaccine Ageinst the Seven Serotype of Botulism"; Infect. Immun. 2008, 76, 1314-1318.

[7] Dolimbek, B.; Steward, L.; Aoki, K.; Atassi, M. "Immune Recognition of Botulinum Neurotoxin B: Antibody-Binding Region on the Heavy Chain of the Toxin"; Mol. Immunol. 2007, 45, 910-924.

[8] Baldwin, M.; Tepp, W.; Pier, C.; Bradshaw, M.; Hao, M.; Wilson, B.; Fritz, R.; Johnson, E.; Barbieri, J. "Characterization of the Antibody Response to the Receptor Binding Domain of

www.SID.ir

Archive of SID

[16] Bollag, D. M.; Rozycki, M. D.; Edelstein, S. J. "Protein Methods"; 3th Printing, Chapters: 2, 3, 6, and 8. Wiley-Liss: New York, 1992.

[17] Wingfield, P.; Palmer, I.; Liang, S. "Folding and Purification of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from Escherichia Coli"; Curr. Protoc. Protein Sci. 2001; Chapter 6:Unit 6.5.

[18] Ahmed, S. A.; Smith, L. A. "Light Chain of Botulinum a Neurotoxin Expressed As an Inclusion Body from Asynthetic Gene is Catalytically and Functionally Active"; J. Protein. Chem. 2000, 19, 475-487.

[19] Crowe, J.; Masone, B. S.; Ribbe, J. "One-Step Purification of Recombinant Proteins with the 6xhis Tag and Ni-NTA Resin"; Mol. Biotech. 1995, 4, 247-58.

[20] Bradford, M. M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding"; Anal. Biochem. 1976, 72, 248-254.

[21] Benjwal, S.; Verma, S.; Klaus–Heinrich, R.; Gursky, O. "Monitoring Protein Aggregation During Thermal Unfolding in Circular Dichroism Experiments"; Protein Sci. 2006, 15, 635-639.

[22] Karbassi, F.; Haghbeen, K.; Saboury, A. A.; Rezaei-Tavirani, M.; Ranjbar, B. "Calorimetric, Spectrophotometric and Circular Dichroism Studies on the Impact of Sodium Dodecyl Sulfate on the Mushroom Tyrosinase Structure"; Biol. Bratislava 2004, 59, 319-326.

[23] Kiyatkin, N.; Andrew, B.; Lance, L. "Induction of an Immune Response by Oral Administration of Recombinant Botulinum Toxin"; Infect. and Immun. 1997, 12, 4586-4591.

Botulinum Neurotoxin Serotypes A and E"; Infect. Immun. 2005, 73, 6998-7005.

[9] Atassi, M.; Dolimbek, B. "Mapping of the Antibody-Binding Regions on the HN-Domain (Residues 449–859) of Botulinum Neurotoxin A with Antitoxin Antibodies from Four Host Species. Full Profile of the Continuous Antigenic Regions of the H-Chain of Botulinum Neurotoxin A"; Protein J. 2004, 23, 39-52.

[10] Mestecky, J. "The Common Mucosal Immune System and Current Strategies for Induction of Immune Response in External Secretions"; J. Clin. Immunol. 1987, 7, 265-276.

[11] Agheli Mansour, A.; Mousavi, S. L.; Rasooli, I.; Nazarian, S.; Amani, J.; Farhadi, N. "Cloning, High Level Expression and Immunogenicity of 1163-1256 Residues of C-Terminal Heavy Chain of C. Botulinum Neurotoxin Type E"; Biologicals 2010, 38, 260–264.

[12] Saboury, A. A.; Moosavi-Movahedi, A. A. "Derivation of the Thermodynamic Parameters Involved in the Elucidation of Protein Thermal Profiles"; Biochem. Educ. 1995, 23, 164-167.

[13] Nelson, D. L.; Cox, M. M. "Lehninger Principle of Biochemistry"; Fourth Ed., Chapter 13, W. H. Freeman & co: New York, 2004.

[14] Norma, J. "Using Circular Dichroism Collected As a Function of Temperature to Determine the Thermodynamics of Protein Unfolding and Binding Interactions"; Nat. Protoc. 2006, 1, 2527-2535.

[15] Tonello, F. "Recombinant and Truncated Tetanus Neurotoxin Light Chain: Cloning, Expression, Purification, and Proteolytic Activity"; Protein Expression Purif. 1999, 15, 221-227.

www.SID.ir