مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره ۱۴، شماره ۵۸، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۱ تا ۱۰

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین SNAP-25

دکتر سید لطیف موسوی*، شهرام نظریان، جعفر امانی***، دکتر رحیم سروری‌زنجانی******

نویسنده‌ی مسئول: قم، دانشگاه شاهد، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست‌شناسی slmousavi@shahed.ac.ir

دریافت: ۸۶/۲/۲۴ پذیرش: ۸۶/۷/۲

چکیده

زمینه و هدف: *سم‌های عصبی کلستریدیوم آزادسازی نوروترانسمیترها را به‌وسیله‌ی پروتئولیز اختصاصی و انتخابی SNAP-25، سیناپتوبروین VAMP و سینتاکسین، مهار می‌کنند. پروتئین SNAP-25 یکی از پروتئین‌های تشکیل‌دهنده‌ی مجموعه‌ی لنگراندازی (Docking complex) در پایانه‌های عصبی است. این پروتئین سوبسترای سم عصبی بوتولینوم، سروتیپ های C ،A و E می‌باشد. هر کدام از این سروتیپ‌ها به طور اختصاصی و در جایگاه ویژه SNAP-25 را در یک پیوند آمیدی برش داده و از تشکیل مجموعه‌ی لنگراندازی و در نهایت اگزوسیتوز نورترانسمیترها و انتقال پیام عصبی جلوگیری می‌کنند. در آزمایشگاه می‌توان با تولید SNAP-25 به روش نوترکیب از آن به عنوان سوبسترای سم، در تشخیص تیپ‌های E و A سم بوتولیسم بهره برد.*

روش بررسی: *در این مطالعه بر آن شدیم که این پروتئین را به صورت نوترکیب تولید کنیم. برای این منظور cDNA ژن مورد نظر با استفاده از روش از RNA تام استخراج شده از سلول‌های مغز موش صحرایی تهیه و توسط RT-PCR تکثیر شد. محصول PCR روی ناقل pET32a همسانه‌سازی شد و پروتئین نوترکیب بیان شده به کمک روش وسترن بلاتینگ و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی مورد تأیید قرار گرفت و در نهایت با استفاده از یک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی (Ni-NTA) تخلیص و با کمک آنزیم اینتروکیناز فیوژن از پروتئین مورد نظر جدا شد.*

یافته‌ها: *در این تحقیق شرایط بهینه برای بیان پروتئین نوترکیب SNAP-25، استفاده از غلظت یک میلی‌مولار IPTG، مدت زمان انکوباسیون ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین شد. در تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA، غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول باعث جداسازی و تخلیص پروتئین نوترکیب شد. هم‌چنین استفاده از آنزیم اینتروکیناز برای برش فیوژن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به دمای محیط نتایج بهتری را به همراه داشت.*

نتیجه‌گیری: *پروتئین نوترکیب تخلیص شده ساختار خود را در حین تخلیص از دست نداده و جهت برش و انجام آزمایشات بعدی مناسب و قابل استفاده می‌باشد. از آن‌جا که سایر روش‌های تشخیصی سم بوتولیسم از جمله روش استاندارد تزریق به موش بسیار وقت‌گیر می‌باشند لذا استفاده از این محصول نوترکیب به عنوان سوبسترا جهت تشخیص سم در آزمایشگاه می‌تواند تا اندازه‌ای مشکلات موجود در روش‌های قبلی را مرتفع سازد.*

واژگان کلیدی: نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A و E، پروتئین نوترکیب، SNAP-25

---

*دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار دانشگاه شاهد

**کارشناس ارشد سلولی ملکولی، دانشگاه امام حسین

***کارشناس ارشد سلولی ملکولی، دانشگاه امام حسین

****دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... ، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سم‌های عصبی بوتولینوم عوامل نوروپارالیتیک مهمی هستند که انتقال عصبی کلونرژیک را مهار می‌کنند و از این طریق سبب سستی و فلج شل می‌شوند (۴-۱). سم بوتولینوم یک متالواندوپپتیداز است که از دو زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی تشکیل شده است که زنجیره‌ی سنگین به نورون‌های حرکتی کلونرژیک متصل شده و با ایجاد کانال ورود زنجیره‌ی سبک را تسهیل می‌نماید. زنجیره‌ی سبک که نقش پپتیدازی را بازی می‌کند بسیار اختصاصی عمل می‌کند (۹-۵).

سوبسترای این پروتئاز، پروتئین‌های soluble [SNARE](*N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein) می‌باشد. پروتئین‌های SNARE مسؤول تشکیل مجموعه‌ی لنگراندازی بین وزیکول‌های سیناپسی و غشای انتهایی سلول‌های عصبی می‌باشند که از سه پروتئین تشکیل شده‌اند: پروتئین غشای وزیکولی به نام (Vesicle associated membrane protein [VAMP])، پروتئین غشای سیناپسی به نام سینتاکسین (Syntaxnin) و پروتئین دیگری به نام SNAP-25 که یک پروتئین سطح غشایی است (۱۲-۱۰). دو پروتئین اول هر کدام تشکیل یک مارپیچ آلفا را می‌دهند که در ساختمان مجموعه‌ی لنگراندازی شرکت می‌کند و (Synaptosomal associated protein of 25KD [SNAP-25]) تشکیل دو مارپیچ آلفا را می‌دهد که در ساختمان این مجموعه شرکت می‌کند (۱۳). SNAP-25 یک پروتئین آب‌گریز با ۲۰۶ اسیدآمینه می‌باشد و از طریق پلمیتیل با پیوند تیواستری به چهار سیستئین نزدیک به مرکز پروتئین متصل هستند، که این مجموعه به غشا متصل می‌شود. ناحیه‌های موجود در پایانه‌ی آمینی و کربوکسیل این پروتئین بسیار حفاظت شده هستند و پیش‌بینی می‌شود که ساختمان‌های مارپیچی داخل مولکول را ایجاد می‌کنند (۱۴-۱۲). بنابراین مجموعه‌ی لنگراندازی از ابر پیچش چهار مارپیچ آلفا به صورت چپ‌گرد ایجاد می‌شود که سه عدد از این مارپیچ‌ها مربوط به SNAP-25 است و یک عدد مربوط به v-SNARE می‌باشد. این مجموعه زمانی تشکیل می‌شود که غلظت کلسیم به واسطه‌ی رسیدن پیام عصبی به انتهای عصب و باز شدن پمپ‌های وابسته به ولتاژ افزایش یابد. پس از لنگراندازی وزیکول حاوی نوروترانسمیتر به غشای انتهای سیناپتیک و الحاق دو غشا به کمک پروتئین‌های SNARE، نوروترانسمیتر از طریق اگزوسیتوز به داخل فضای سیناپسی رها شده و از این طریق پیام عصبی از یک نورون به نورون دیگر یا به سلول‌های ماهیچه‌ای منتقل می‌شود (۱۷-۱۵). سم‌های عصبی بوتولینوم تیپ A و E قادر هستند پروتئین SNAP-25 که یکی از اجزای تشکیل‌دهنده‌ی این مجموعه است را به ترتیب در موقعیت Gln197-Arg198 و Arg180-Gln181 برش دهند (۱۹، ۱۸). از آن‌جایی‌که سم بوتولینوم بسیار کشنده است تشخیص سریع و دقیق آن امری حیاتی محسوب می‌شود بنابراین می‌بایست روش خاصی انتخاب شود که ساده، ارزان، دقیق و در دسترس باشد. در سال‌های اخیر روش‌های زیادی برای تشخیص آزمایشگاهی سم‌های عصبی کلستریدیوم بوتولینوم از جمله تشخیص ایمونولوژیک با حساسیتی نزدیک به روش‌های قدیمی ابداع شده است (۲۱، ۲۰). در حال حاضر یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌ها تشخیص توسط (Reversed Phase-High Performance [RP-HPLC] Liquid Chromatographic) می‌باشد که پروتئین SNAP-25 را به عنوان سوبسترای آزمایشگاهی برای تشخیص سریع سم عصبی بوتولینوم تیپ A و E نیاز دارد (۲۴-۱۹) و از آن‌جایی‌که تولید آن به روش سنتز آزمایشگاهی در حال حاضر در داخل کشور مقدور نمی‌باشد و تهیه‌ی آن مستلزم هزینه‌ی بالاست، بدیهی است تولید نوع نوترکیب آن می‌تواند بسیار مفید واقع شود. در این مطالعه ما برآن شدیم

Archive of SID

www.SID.ir

تا با همسانه‌سازی SNAP-25 در یک ناقل مناسب، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب، سوبسترای سم عصبی نوع A و E را در آزمایشگاه فراهم کنیم تا در مطالعات بعدی بتوانیم از این سوبسترا برای تشخیص سریع و اختصاصی سموم فوق در آزمایشگاه بهره بریم. هم‌چنین این سوبسترا می‌تواند در تشخیص سم عملکردی از غیرعملکردی کمک شایانی داشته باشد که در گذشته فقط با تزریق به موش انجام می‌گرفت.

روش بررسی

استخراج ترادف ژن مربوط به SNAP-25 انسانی از بانک ژن و طراحی پرایمر: در این مطالعه‌ی تجربی پس از استخراج ترادف ژنی SNAP-25 انسانی از بانک ژن و مقایسه‌ی آن با ترادف ژنی SNAP-25 موش صحرایی با کمک برنامه‌ی BLAST، مشاهده شد که این دو ژن کاملا یکسان و حفاظت‌شده هستند، بنابراین بر اساس ترادف cDNA از SNAP-25 موش‌صحرایی اقدام به طراحی پرایمر و سفارش آن از شرکت MWG-Bio-Tech شد. پرایمر بالادست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر BamHI است و پرایمر پایین‌دست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر EcoRI می‌باشد.

5`-ACT GGATCC ATG GCC GAG GAC G-3 BamHI پرایمر بالادست

5`-GGA GAATTC TTA ACC ACT TCC CAG CAT-3` EcoRI پرایمر پایین‌دست

تهیه‌ی RNA تام از قسمت قشری مغز موش صحرایی: با استفاده از کیت RNX و پروتکل ارایه شده توسط شرکت فروشنده (فرمنتاز)، RNA تام از قسمت قشری مغز موش نر بالغ از نژاد راتوس (Rattus norvegieus wister) که از دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهیه شده و به کمک ازت مایع و هاون به صورت پودر در آمده بود، استخراج شد.

تهیه‌ی cDNA مربوط به SNAP-25 و تکثیر آن به کمک (Polymerase chain reaction [PCR]): ابتدا RNA تام با پرایمر پایین‌دست و آب دوبار تقطیر تیمار شده با DEPC در ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انکوبه شد سپس به آن dNTPs و مهارکننده‌ی RNase (RNAsin) و آب دو بار تقطیر اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد و به آن آنزیم Revert Aid M-Mulv Reverse Transcriptase اضافه و در ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. در پایان برای خاتمه دادن به واکنش، آن را به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه کردیم. cDNA حاصل به کمک واکنش PCR تکثیر شد. واکنش PCR جهت تکثیر cDNA در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی‌مولار از مخلوط نوکلئوتیدهای dATP، dCTP، dGTP و dTTP، ۲ واحد آنزیم Pfu DNA polymerase (فرمنتاز)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR×10، $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار و ۵۰ نانوگرم از cDNA تهیه شده بود. سیکل‌های PCR شامل یک مرحله‌ی واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل سه مرحله‌ای شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته‌ی الگو در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در پایان یک مرحله‌ی تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

همسانه‌سازی قطعه‌ی حاصل از واکنش PCR: محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد (سیناژن) به کمک مارکر مولکولی مورد تأیید قرار گرفت هم‌چنین هضم آنزیمی محصول PCR با کمک آنزیم TaqI (سیناژن) نیز مؤید این

Archive of SID

www.SID.ir

مطلب بود. با استفاده از دو آنزیم BamHI و EcoRI (فرمنتاز) در یک واکنش هضم دوگانه با بافر Y/TANGO، محصول PCR مورد هضم قرارگرفت تا انتهای چسبناک در `۳ و`۵ ایجاد شود. هم‌چنین ناقل انتخاب شده در این مطالعه وکتور PET32a (نواژن) بود که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفت سپس بر روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین (Low-melting point [LMP]) با غلظت یک درصد الکترفورز و در نهایت به کمک کیت خالص‌سازی محصول PCR و وکتور (سیناژن) صورت گرفت. با کمک آنزیم T_4 DNA Ligase (فرمنتاز) عمل اتصال قطعه با ناقل در دمای ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ ساعت انجام شد و سپس پلاسمیدهای نوترکیب با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد E coli سویه‌ی BL21-DE3 (فرمنتاز) تراریخت شدند و روی محیط (Luria Bertani [LB]) آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلن کشت داده در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلون‌های حاوی قطعه‌ی مورد نظر به کمک PCR و هضم آنزیمی و در نهایت با تعیین توالی تأیید گردید.

بیان پروتئین موردنظر: از کشت شبانه‌ی کلون‌های جداسازی شده میزان ۵۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن به OD= ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، (Isopropyl B-D-thiogalactopyranoside [IPTG]) با غلظت یک میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند سپس نمونه‌های قبل و بعد از القا به کمک ژل ([SDS- PAGE] **Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis**) ۱۲درصد مورد مطالعه قرار گرفتند. برای تأیید پروتئین مورد نظر از وسترن بلاتینگ و الیزا با آنتی‌بادی اختصاصی (سیگما) استفاده شد.

تخلیص پروتئین SNAP-25: تخلیص SNAP-25 با استفاده از قطعه‌ی His-tag که توسط وکتور در دو انتهای محصول ایجاد شده است، انجام شد. برای این منظور از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA (کیاژن) که پروتئین‌های حاوی His-tag با تمایل بالا به آن متصل می‌شوند، استفاده شد. پس از شکستن سلول‌ها به کمک سونیکاتور (۵ سیکل ۲۰ ثانیه‌ای) نمونه را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفوژ کردیم سپس محلول رویی را با بافر حاوی ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول و pH=۸ به حجم ۴ میلی‌لیتر رسانده و به آن یک میلی‌لیتر از رزین Ni-NTA اضافه کردیم و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و در حالت به هم زدن به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه کردیم تا اتصال پروتئین موردنظر با یون‌های نیکل صورت گیرد سپس مخلوط واکنش در ستون کروماتوگرافی قرار گرفت. ستون با غلظت‌های مختلف ایمیدازول مورد شست‌وشو قرارگرفت، در نهایت ستون با بافرحاوی ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول شسته شد تا پروتئین موردنظر خارج شود و در پایان خروجی‌های ستون در مراحل مختلف به کمک ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی گردید.

برش قطعه‌ی مربوط به وکتور از SNAP-25 به کمک آنزیم انتروکیناز: برای این منظور ابتدا خروجی ستون را که حاوی پروتئین مورد نظر ماست و به کمک SDS-PAGE آن را تأیید کرده‌ایم، بر علیه بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد دیالیز کردیم، سپس بعد از یک شبانه‌روز دیالیز، نمونه را از کیسه‌ی دیالیز خارج کرده و با نسبت ۱/۲۰ به آن آنزیم انتروکیناز (سیگما) اضافه کردیم و به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. در ادامه حاصل واکنش هضم آنزیمی با کمک ژل SDS-PAGE دوازده درصد مورد مطالعه قرارگرفت.

Archive of SID

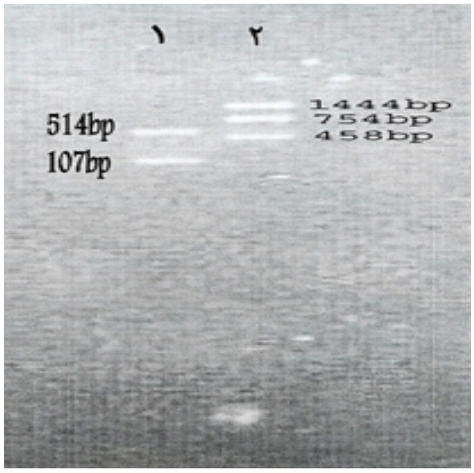
www.SID.ir

یافته‌ها

پس از تهیه و تکثیر cDNA به روش RT-PCR، محصول PCR روی ژل آگارز مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌طور که در تصویر شماره‌ی یک مشاهده می‌شود، قطعه‌ی موردنظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما هم‌خوانی دارد (حدود ۶۲۱ جفت باز). مارکر استفاده شده در این آزمایش pUC18 می‌باشد که با آنزیم TaqI مورد هضم آنزیمی قرار گرفته است.

شکل۱: بررسی محصول PCR بر روی ژل آگارز
- ردیف ۱،۲و۳: محصول PCR
- ردیف ۴: مارکر مولکولی pUC18 هضم شده با آنزیم TaqI: ۴۵۸، ۷۵۴، ۱۴۴۴ جفت باز

در ادامه برای تأیید بیشتر محصول PCR قبل از همسانه‌سازی از آنزیم TaqI استفاده شد. آنالیز کامپیوتری ترادف ژن در برنامه‌ی DNASIS نشان داد که هضم آنزیمی محصول PCR توسط آنزیم TaqI دو قطعه به طول ۱۰۷ و ۵۱۴ جفت باز به وجود خواهد آورد. نتیجه‌ی آزمایش با این امر کاملا مطابقت داشت (شکل ۲).



شکل ۲: تأیید محصول PCR به روش هضم آنزیمی
- ردیف۱: محصول PCR هضم شده با آنزیم TaqI
- ردیف۲: مارکر مولکولی pUC18 هضم شده با آنزیم TaqI: ۴۵۸، ۷۵۴، ۱۴۴۴ جفت باز

پس از الحاق قطعه‌ی موردنظر در ناقل و تراریخت آن به داخل سلول‌های میزبان، عمل استخراج پلاسمید از کلون‌های غربال شده صورت گرفت و برای تأیید کلون‌ها ابتدا پلاسمیدهای نوترکیب را با دو آنزیم BamHI و EcoRI که برای کلونینگ مورد استفاده قرار گرفته بودند، هضم کرده و مشاهده شد که قطعه‌ی مورد نظر از پلاسمید جدا شد. در شکل۳ نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب روی ژل آگارز یک درصد مشاهده می‌شود. هم‌چنین برای تأیید بیشتر از پلاسمیدهای استخراج شده عمل PCR به کمک پرایمرهای طراحی شده نیز انجام پذیرفت. در مرحله‌ی بیان، کلون‌های مختلف را در دو مرحله‌ی قبل و بعد از القا جمع‌آوری کرده و پس از شکستن سلول‌ها، پروتئین‌های آن‌ها روی ژل SDS-PAGE دوازده درصد مورد مطالعه قرار گرفت که نتیجه در شکل۴ مشاهده می‌شود. در نمونه‌های قبل از القا در ناحیه‌ی ۴۵ کیلودالتون باندی مشاهده نمی‌شود اما در نمونه‌های بعد از القا یک باند واضح در این ناحیه مشاهده می‌شود که وجود مارکر اندازه‌ی آن را تأیید می‌کند. بهترین

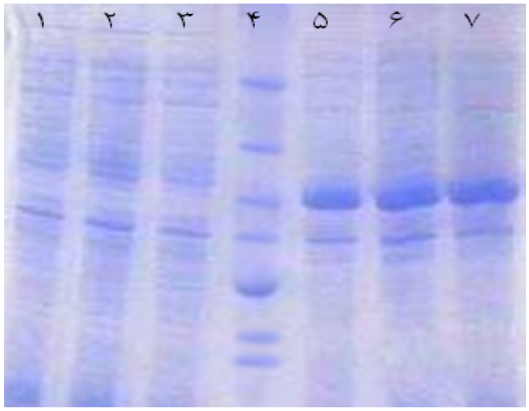
Archive of SID
www.SID.ir

بیان پس از افزودن IPTG با غلظت یک میلی‌مولار به محیط کشت بعد از رسیدن به جذب نوری ۰/۶ و انکوبه کردن آن به مدت پنج ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه به دست آمد.

شکل۳: هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب توسط دو آنزیم BamHI و EcoRI

- ردیف ۱،۲ ،۳ و۴: وکتور pET32a حاوی ژن مورد نظر که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفته است

- ردیف۵: مارکر مولکولی pUC18 هضم شده با آنزیم TaqI: ۴۵۸، ۷۵۴، ۱۴۴۴ جفت باز



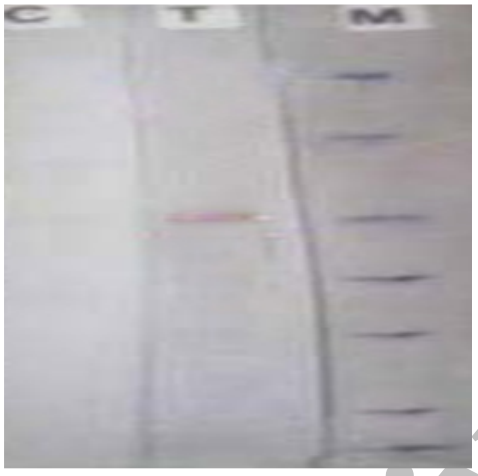
شکل۴: ژل مربوط به SDS-PAGE نمونه‌های قبل و بعد از القا

- ردیف ۱ ،۲ و۳: نمونه‌های قبل از القای سه کلون مختلف

- ردیف ۴: مارکر پروتئینی: ۱۱۶، ۶۶/۲، ۴۵، ۳۵، ۲۵، ۱۸/۴ و ۱۴/۴ کیلودالتون

- ردیف ۶،۵ و۷ : نمونه‌های بعد از القای سه کلون مختلف

برای تأیید محصول پروتئینی از روش وسترن بلاتینگ نیز استفاده شد که در شکل۵ نتیجه‌ی آن مشاهده می‌شود. در ستون تست که نمونه‌ی بعد از بیان را در آن الکتروفورز کرده بودیم، یک باند واضح نزدیک به ۵۰ کیلودالتون مشاهده شد. در این آزمایش در ستون قبل از القا این باند مشاهده نشد و چون برای ظهور باندها از آنتی‌بادی ضد SNAP-25 (سیگما) متصل شده به یک آنزیم استفاده شد، میانکنش بسیار اختصاصی آنتی‌بادی، حضور پروتئین مورد نظر را تأیید کرد.



شکل ۵: وسترن بلاتینگ پروتئین نوترکیب SNAP-25 و قطعه‌ی وکتور

- ردیف M: مارکر پروتئینی: ۱۱۶، ۶۶/۲، ۴۵، ۳۵، ۲۵، ۱۸/۴ و ۱۴/۴ کیلو دالتون

- ردیف T: مربوط به نمونه‌ی بعد از القا

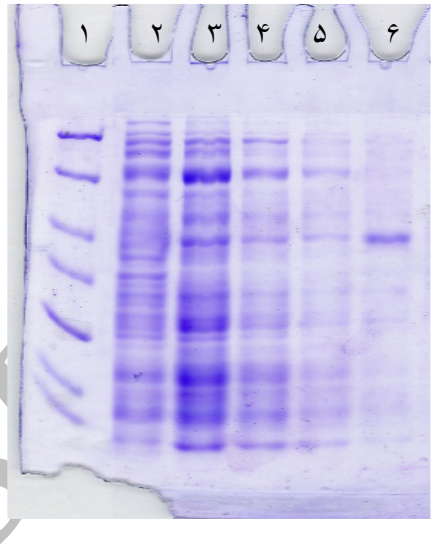
- ردیف C: مربوط به نمونه‌ی قبل از القا

در ادامه با استفاده از ستون میل ترکیبی Ni-NTA اقدام به تخلیص پروتئین نوترکیب SNAP-25 شد. همان‌طور که در شکل۶ مشاهده شد، خروجی‌های ستون شامل شست‌وشو با ایمیدازول ۵۰، ۱۰۰ و هم‌چنین ۲۵۰ میلی‌مولار در ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفته است. پروتئین نوترکیب SNAP-25 و قطعه‌ی ۲۰ کیلودالتونی ناقل متصل به آن در شست‌وشوی با ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول از

Archive of SID

www.SID.ir

ستون خارج شده است و نشان‌دهنده‌ی این است که نشان هیستدین در ابتدای این پروتئین با تمایل بالایی به ستون متصل می‌شود.



شکل۶: ژل SDS-PAGE دوازده درصد مربوط به خروجی‌های ستون تخلیص

– ردیف ۱: مارکر پروتئینی: ۱۱۶، ۶۶/۲، ۴۵، ۳۵، ۲۵، ۱۸/۴ و ۱۴/۴ کیلو دالتون

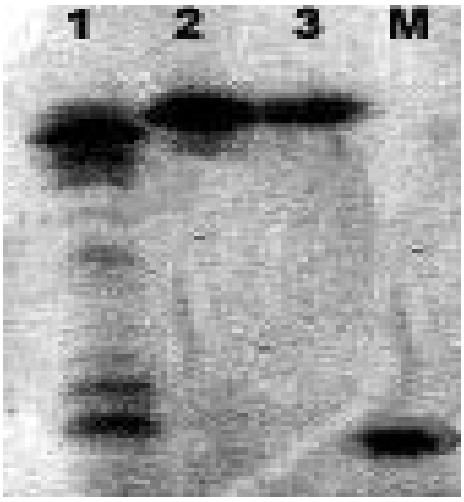
– ردیف۲ و۳: به ترتیب نمونه‌ی قبل و بعد از القا

– ردیف ۴: خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۵۰ میلی‌مولار

– ردیف ۵: خروجی ستون با ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار

– ردیف ۶: خروجی ستون با ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار

قابل ذکر است که میزان کل پروتئین به دست آمده از ۲۵۰ میلی‌لیتر کشت یک گرم و میزان پروتئین SNAP-25 خالص شده ۵۰۰ میلی‌گرم بوده است. برای جدا کردن قطعه‌ی ۲۰ کیلودالتونی وکتور از قطعه‌ی ۲۵ کیلودالتونی SNAP-25 از آنزیم انتروکیناز که دارای جایگاه شناسایی در انتهای بخش فیوژن و ابتدای پروتئین نوترکیب مورد نظر استفاده شد، پس از انجام هضم آنزیمی، نمونه‌های شاهد با نمونه‌ی هضم شده به کمک ژل SDS-PAGE دوازده درصد مورد بررسی قرار گرفتند که در شکل ۷ نتیجه را مشاهده می‌کنید، دو باند ۲۰ کیلودالتونی و ۲۵ کیلودالتونی در نمونه‌ی هضم شده به ترتیب نمایانگر فیوژن وکتور و پروتئین نوترکیب SNAP- 25 می‌باشد. در نهایت میزان پروتئین به دست آمده ۴۰۰ میلی‌گرم بود.



شکل۷: ژل اکریل آمید ۱۲ درصد مربوط به هضم آنزیمی محصول بیان با آنزیم انتروکیناز

– ردیف ۱: پروتئین SNAP-25 + فیوژن هضم شده با آنزیم انتروکیناز به مدت ۵ ساعت

– ردیف ۲: پروتئین SNAP-25 + فیوژن هضم شده با آنزیم انتروکیناز به مدت ۳ ساعت

– ردیف ۳: پروتئین SNAP-25 + فیوژن

– ردیف M: مارکر پروتئینی Lysosyme با وزن مولکول ۱۳ کیلودالتون

بحث

سم‌های عصبی کلستریدیومی، اندوپپتیدازهای وابسته به روی (Zn^{+2}) می‌باشند که به صورت کاملا انتخابی اجزای حفره‌ها یا غشاهای سیناپتیک را در مجموعه‌ی لنگراندازی مورد هدف قرار می‌دهند. تولید نوترکیب مولکول‌های هدف با توجه به عملکرد این سموم در سیناپس می‌تواند وسیله‌ی مناسبی در تشخیص آزمایشگاهی این سموم باشد. ما در این تحقیق برآن شدیم که با تولید پروتئین SNAP-25 به روش

Archive of SID
www.SID.ir

نوترکیب از آن به عنوان سوبسترای سم بوتولیسم در تشخیص آزمایشگاهی استفاده‌کنیم. تا مدت‌ها پیش تنها روش قابل اعتماد تشخیص سم بوتولینم، بررسی سمیت ایجاد شده در موش بود (۲۳). اگر چه این تست حساسیت بالایی دارد (۱۰ تا۲۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) اما استفاده از تعداد زیاد حیوانات آزمایشگاهی، زمان‌بر بودن و هزینه‌ی بالای آن از محدودیت‌های این روش می‌باشد.

در سال‌های اخیر روش‌های جدیدی برای تشخیص‌سموم بوتولیسم ابداع شده‌است که در عین حساسیت کافی محدودیت‌های فوق را نیز تا اندازه‌ای مرتفع نموده‌اند. روش‌های RP-HPLC، HPLC-MS و بررسی فعالیت اندوپپتیدازی از جمله این روش‌ها می‌باشند. استفاده از پپتیدهای مصنوعی(سنتتیک) که از روی قسمتی از سوبسترای طبیعی (SNAP-25 و VAMP-2) ساخته می‌شوند اساس تشخیص محققین در همه‌ی این روش‌ها می‌باشد (۲۲). در تحقیقی که هالیس و همکاران انجام داده‌اند با استفاده از همین روش و به کمک پپتید سنتزی SNAP-25 و VAMP-2 توانسته‌اند توکسین تیپ A و B بوتولیسم را شناسایی کنند (۲۵). آن‌ها در این روش قطعه سنتزی از آمینواسید ۱۳۷ تا آمینواسید ۲۰۶ SNAP-25 را جهت بررسی برش آنزیمی استفاده کردند. پس از برش پلی‌پپتید، قطعه‌ی ۴۷ آمینواسیدی باقی‌مانده بر روی فاز جامد به‌وسیله‌ی سوبسترای آنزیمی مورد شناسایی قرار می‌گیرد. هم‌چنین با استفاده از قطعه‌ی ۳۶ آمینواسیدی سنتتیک پروتئین VAMP-2 فعالیت اندوپپیدازی سم تیپ B را مورد مطالعه قرار دادند. پس از برش اندوپپتیدازی پلی‌پپتید، قطعه‌ی ۱۹ آمینواسیدی باقی‌مانده بر روی فاز ثابت تأیید گردید. در این تست بین این سم و دیگر سم‌ها واکنش متقاطع دیده نشده و حساسیت آن برای BONT/A تا حد ۱/۳ نانوگرم در میلی‌لیتر و برای BONT/B بین ۰/۶ تا ۵/۴ نانوگرم در میلی‌لیتر تعیین‌گردید. از آن‌جایی‌که تولید مصنوعی سوبستراهای فوق در حال حاضر در ایران مقدور نمی‌باشد و از طرفی تهیه‌ی آن‌ها از خارج از کشور مستلزم صرف هزینه‌ی بسیار بالاست لذا هدف از تحقیق حاضر تولید نوترکیب یکی از سوبستراهای اساسی سموم بوتولیسم (SNAP-25) می‌بود تا در ادامه‌ی کار بتوان از آن به عنوان وسیله‌ای جهت شناسایی سریع و دقیق سروتیپ‌های E و A استفاده کرد. در تحقیقی که اکونگ و همکاران انجام داده‌اند با استفاده از همین روش و به کمک پپتید نوترکیب SNAP-25 توانسته‌اند توکسین تیپ A بوتولیسم را تا حد LD_{50} ۰/۸ شناسایی کنند (۱). در تحقیق حاضر پروتئین SNAP-25 به صورت فیوژن با قطعه‌ی ۲۰ کیلودالتونی از وکتور pET32a در سیستم پروکاریوتی Ecoli تولید شد. استفاده از قطعه‌ی فیوژن باعث تسهیل تخلیص پروتئین گردید. استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA ، نیز میزان بالای بیان پروتئین باعث شد که پروتئین خارج شده از ستون از خلوص و غلظت بالایی برخوردار باشد. با مطالعات انجام شده مشخص شد که قطعه‌ی فیوژن در برش آنزیمی توکسین بوتولیسم تأثیری منفی ندارد. میزان پروتئین تخلیص شده بعد از برش با آنزیم اینتروکیناز نیز بالا بود و این تجربه نشان داد که استفاده از سیستم وکتوری pET برای تولید نوترکیب پروتئین SNAP-25 برای بررسی فعالیت اندوپپتیدازی سم بوتولیسم در شرایط داخل آزمایشگاهی مناسب است. در تحقیقی مشابه اکونگ و همکاران جهت تولید پروتئین نوترکیب SNAP-25 از وکتور pMAL-C2 استفاده نمودند. این وکتور نیز دارای فیوژن پروتئین (Maltose Binding Protein [MBP]) است که جهت تخلیص از آن استفاده می‌شود. آنزیم مورد استفاده جهت جداسازی فیوژن پروتئین فاکتورXa بود. از معایب این وکتور بیان هم‌زمان پروتئین MBP بود که مرحله‌ی تخلیص پروتئین نوترکیب را تا حدودی دچار مشکل می‌ساخت. میزان پروتئین تولید شده و هم‌چنین غلظت پروتئین استحصال شده از ستون کروماتوگرافی نیز در تحقیق آن‌ها مناسب گزارش

Archive of SID

www.SID.ir

شده است (۱). بررسی فعالیت اندوپپتیدازی برای شناسایی سموم بوتولیسم و کاربرد آن در آزمایشگاه تشخیصی از دیگر کارهایی است که می‌بایستی بر روی SNAP-25 نوترکیب تولید شده صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

مقاله‌ی حاضر بخشی از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد و مصوب دانشگاه امام حسین(ع) می‌باشد که به این‌وسیله از آن دانشگاه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1- Ekong TN, Feavers IM, Sesardic D. Recombinant SNAP-25 is an effective substrate to clostridium botulinum type A toxin endopeptidase activity in vitro. ***Microbiology.*** 1997; 143: 3337-47.

2- Montecucco C, Molgo J. Botulinal neurotoxins: revival of an old killer. ***Curr Opin Pharmacol.*** 2005; 5: 274-9.

3- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. ***Physiol Rev.*** 2000; 80: 717–66.

4- Agarwal R, Eswaramoorthy S, Kumaran D, Dunn JJ, Swaminathan S. Cloning, high level expression, purification, and crystallization of the full length Clostridium botulinum neurotoxin type E light chain. ***Protein Expr Purif.*** 2004; 34: 95–102.

5- Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K, Verastegui C, Schivao G. The jounery of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. ***Trends Microbiol.*** 2003; 11: 431-7.

6- Schiavo G, Montecucco C. ***Clostridial neurotoxins***. In: Aktories K, editor. ***Bacterial toxins: tools in cell biology and pharmacology***. 2nd ed. Weinheim. Germany: Chapman and Hall; 1997, 169-186.

7- Sharma S, Zhou Y, Singh BR. Cloning, expression, and purification of C-terminal quarter of the heavy chain of botulinum neurotoxin type A. ***Protein Expr Purif.*** 2006; 45: 288-95.

8- Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins : Mechanism of action and therapeutic uses. ***Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*** 1999; 354: 259-68.

9- Zhou JY, Wang ZF, Ren XM, Tang MZ , Shi YL. Antagonism of botulinum toxin type A-induced cleavage of SNAP-25 in rat cerebral synaptosome by toosendanin. ***FEBS Lett.*** 2003; 555: 375-9.

10- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. ***Molecular biology of the cell.*** In: Gibbs S, et al, editors .4th ed. New York: Garland Science press; 2002, 720-726.

11- Hodel A. Molecules in Focus SNAP-25. ***J Biochem & Cell Biol.*** 1998; 30: 1069-73.

12-Sorensen JB. SNARE complexes prepare for membrane fusion. ***Trends Neurosci.*** 2005; 28: 453–455.

13- Sorensen JB, Matti U, Wei SH, et al. The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. ***Proc Natl Acad Sci USA.*** 2002; 99: 1627–32.

Archive of SID

www.SID.ir

14- Humeaua Y, Doussaua F, Grantb NJ, Poulaina B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. ***Biochime.*** 2000; 82: 427−46.

15- Wilson MC, Mehta PP, Hess EJ. SNAP-25, enSNAREd in neurotransmission and regulation and of behaviour. ***Biochem Soc Trans.*** 1996; 24: 670-676.

16- Hanson PI, Heuser JE, Jahn R. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. ***Curr Opin Neurobiol.*** 1997; 7: 310-5.

17- Breidenbach MA, Brunger AT. Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A. ***Nature.*** 2004; 432: 925–9.

18- Chen S, Barbieri1 JT. Unique substrate recognition by botulinum neurotoxins serotypes A and E. ***J biol chem.*** 2006; 281: 10906 –11.

19- Ferreira J, Maslanka S, Johnson E, Goodnough M. Detection of botulinal neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. ***J AOAC Int.*** 2003; 86: 314–31.

20- Ferreira JL, Eliasberg SJ, Edmonds P, Harrison MA. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinal toxin in food. ***J Food Prot.*** 2004; 67: 203–6.

21- Barr JR, Moura H, Boyer AE, et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. ***Emerg Infect Dis.*** 2005; 11: 1578-83.

22- Shone C, Wilton-Smith P, Appleton N, et al. Monoclonal antibody-based immunoassay for type A Clostridium botulinum toxin is comparable to the mouse bioassay. ***Appl Environ Microbiol.*** 1985; 50: 63–7.

23-Binz T, Blasi J, Yamasaki S, et al. Proteolysis of SNAP-25 by types e and A botulinal neurotoxins. ***J Biol Chem.*** 1994; 269: 1617-20.

24- Hallis B, James BA, Shone CC. Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activities. ***J Clin Microbiol.*** 1996; 34: 1934–8.

Archive of SID

www.SID.ir