

بررسی خصوصیات ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب زنجیره‌ی سبک سم بوتولینوم تیپ A (۸۴۰)

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

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

دریافت: ۸۶/۲/۱ پذیرش: ۸۶/۸/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: سم بوتولینوم تیپ A به لحاظ ساختاری از یک زنجیره‌ی سبک به وزن ۵۰ کیلودالتون و یک زنجیره‌ی سنگین به وزن ۱۰۰ کیلودالتون تشکیل شده است که توسط یک باند دی‌سولفید به هم متصل شده‌اند. این پروتئین شامل سه بخش (Domain) است که بخش زنجیره‌ی سبک آن دارای فعالیت آنزیمی می‌باشد. در این پژوهش، هدف ما از تولید نوترکیب بخش عملکردی به دست آوردن یک پروتئین مناسب جهت بررسی ایمنی‌زایی آن است.

روش بررسی: باکتری در شرایط بی‌هوازی رشد داده شد سپس DNA کروموزومی به روش قلیایی استخراج گردید. پس از بررسی ترادف ژن مربوطه و طراحی پرایمر قطعه‌ی موردنظر از طریق واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) فراوان‌سازی شد. محصول PCR بر روی سه ناقل بیانی *pET28a*، *pRSETA* و *pET32a* همسانه‌سازی گردید. پروتئین حاصل از بیان توسط SDS-PAGE بررسی و صحت محصول با روش وسترن‌بلاتینگ و واکنش الیزا مورد تأیید نهایی قرار گرفت و سپس به وسیله‌ی کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص‌سازی شد، ایمنی‌زایی بر روی موش سوری در سه مرحله صورت گرفت و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این تحقیق بالاترین بیان در شرایط غلظت ۰/۵ میلی‌مولار IPTG، جذب نوری ۰/۶ و زمان القای ۱۵ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به دست آمد. پروتئین بیان شده توسط ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص‌سازی گردید. آنتی‌بادی حاصل از تزریق پروتئین نوترکیب توانست مانع از مرگ موش‌ها در دوز LD₅₀ ۱۰۰ شود.

نتیجه‌گیری: هرچند بیان ژن‌هایی با درصد بالایی از AT در سیستم *E. coli* ضعیف می‌باشد ولی ما در این تحقیق توانستیم بیان مناسبی به دست آوریم. تخلیص پروتئین نوترکیب در مراحل اولیه به دلیل اتصال ضعیف هیستیدین انتهایی به ستون دشوار بوده که با تغییر در روش‌ها این پروتئین تا ۹۰ درصد خالص‌سازی شد. در بحث ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب موردنظر نیز مشخص شد که آنتی‌بادی‌های تولید شده در مقایسه با آنتی‌بادی تولید شده علیه بخش اتصال‌دهنده از ایمنی‌زایی پایینی برخوردار است.

واژگان کلیدی: کلاستریدیم بوتولینوم تیپ A، بخش عملکردی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، پروتئین نوترکیب

* دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار دانشگاه شاهد

** کارشناس ارشد سلولی ملکولی، دانشگاه امام حسین

*** کارشناس ارشد سلولی مولکولی، دانشگاه امام حسین

**** دکترای تخصصی میکروبی‌شناسی، استادیار دانشگاه بقیه‌ا... و دانشگاه علوم پزشکی زنجان

مقدمه

جنس کلستریدیوم شامل باسیل‌های درشت و گرم مثبت می‌باشد که بی‌هوازی مطلق یا میکروآئروفیل بوده و تولید اسپور می‌نماید، تاکنون هفت سروتیپ از این نورتوکسین شناخته شده است که عبارتند از: A, B, C₁, D, E, F و G که فقط تیپ‌های A, B, E و F در انسان بیماری‌زا می‌باشند (۱،۲). حساسیت این نوع باکتری نسبت به اکسیژن به علت وجود آنزیم‌های فلاوپروتئین است که می‌تواند اکسیژن را احیا نموده و آن را به مواد سمی تبدیل نماید. سم کلستریدیوم بوتولینوم قوی‌ترین اگزوتوکسین شناخته شده می‌باشد که باعث ایجاد بیماری بوتولیسم می‌شود (۳-۴). ژن کدکننده‌ی سم بوتولینوم تیپ A دارای ۴۹۲۹ جفت باز می‌باشد. توالی ترجمه شده به صورت یک Open Reading Frame [ORF] با ۳۸۹۱ جفت باز شناسایی شده است که با کدون آغازین AUG شروع و به کدون پایان UAA ختم می‌شود. بررسی ژن کدکننده‌ی سم بوتولینوم تیپ A نشان می‌دهد که این ژن در صد بالایی از AT (۷۰ درصد) را شامل می‌شود (۵). ترشح سم بوتولینوم به وسیله‌ی پپتید راهنما وساطت نمی‌شود و تغییرات پس از ترجمه در انتهای آمینی پلی‌پپتید تازه سنتز شده، فقط به حذف یک متیونین محدود می‌شود (۶-۸).

نورتوکسین سم بوتولینوم پروتئینی به وزن ۱۵۰ کیلودالتون بوده که به طور اختصاصی بر روی اعصاب کولینرژیک اثر گذاشته و مانع از آزادسازی نورترانسمیتر استیل‌کولین شده و در نهایت سبب فلج شل می‌گردد. ابتدا سم به صورت یک زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی ساخته شده سپس تحت تأثیر پروتازها به زنجیره‌های سبک و سنگین شکسته می‌شود که به وسیله‌ی یک پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند (۱،۲).

زنجیره‌ی سنگین شامل بخش انتقال‌دهنده در انتهای آمینی و بخش اتصال‌دهنده در انتهای کربوکسیل بوده و زنجیره‌ی

سبک نیز شامل بخش عملکردی سم می‌باشد (۹-۷). مراحل عملکرد عبارتند از:

مرحله‌ی اول اتصال بخش اتصال‌دهنده (Binding domain) با گیرنده‌های سطح سلولی است که بر روی غشای پری‌سیناپتیک قرار دارد این امر منجر به ورود سم به داخل سیناپس با پروسه‌ی اندوسیتوز می‌شود. مرحله‌ی دوم ایجاد کانال توسط بخش انتقال‌دهنده (Translocating domain) بر روی غشای اندوزومی و مرحله‌ی سوم ورود بخش عملکردی (Catalytic domain) به داخل سیناپس می‌باشد که از طریق کانال ایجاد شده توسط بخش انتقال‌دهنده در غشای اندوزوم صورت می‌گیرد (۱۱ و ۱۰، ۷). سم بوتولینوم دارای سه نوع سوبسترا می‌باشد، پروتئین سیناپتوبروین (Vesicle Associated Membrane Protein [VAMP2]) که سوبسترای سروتیپ‌های A, B, D, F و C بوده و پروتئین (Synaptosomal associated protein of 25KD [SNAP25]) که سوبسترای سروتیپ‌های A, B و C بوده و سیناتاکسین (Synaptaxin) که سروتیپ C روی آن اثر می‌گذارد (۱۲-۱۰). بخش عملکردی سم بوتولینوم تیپ A بعد از ورود به سیناپس بر روی پروتئین SNAP25 در موقعیت اسیدآمینه‌های گلوتامین ۱۹۷- آرژنین ۱۹۸ اثر گذاشته و آن را لیز می‌کند و از این طریق مانع از اتصال وزیکول‌های حاوی استیل‌کولین به غشای سیناپس و در نهایت آزادسازی آن از طریق اگزوسیتوز می‌شود (۱۴، ۱۳). با وجود گزارشات مربوط به مطالعه‌ی ایمنی‌زایی بخش‌های اتصال‌دهنده (۱۷-۱۵)، هنوز اطلاعاتی در زمینه‌ی ایمنی‌زایی بخش عملکردی به تنهایی و یا همراه با بخش اتصال‌دهنده به طور شفاف در دست نمی‌باشد. در این تحقیق ما بر آن شدیم که با تولید بخش عملکردی به روش نوترکیب راه برای مطالعه و بررسی کارایی این بخش به صورت مستقل در تحریک سیستم ایمنی هموار شود.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی سوبه‌ی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A جدا شده از بیماران، پس از بررسی به وسیله‌ی تست‌های تشخیص افتراقی (PCR و تست خشتی‌سازی سم) مورد استفاده قرار گرفت. (آنزیم‌های برش‌دهنده، لیگاز و پلی‌مراز از شرکت فرمتاز تهیه گردید. پلاسمیدهای واجد پروموتور T7 نظیر pRSETA، pET28a و pET32a نیز برای الحاق ژن و بیان آن استفاده شد. مواد استفاده شده جهت ژل آگارز معمولی و آگارز (Low-melting point [LMP]) از شرکت فرمتاز و مواد تشکیل‌دهنده‌ی SDS-PAGE و سترن بلاتینگ از شرکت کیاژن تهیه شد و هم‌چنین جهت القا از (Isopropyl B-D-thiogalactopyranoside [IPTG]) تهیه شده از شرکت فرمتاز استفاده گردید. به عنوان شاخص وزن مولکولی از پلاسمید pUC18 هضم شده با آنزیم TaqI و شاخص وزن مولکولی DNA 100bp از شرکت فرمتاز استفاده شد. ستون میل ترکیبی نیکل جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از شرکت کیاژن تهیه شد. ادجوانت کامل و ناقص از مؤسسه رازی و کانبوجیت موشی از شرکت سیگما تهیه

گردید). برای رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A از محیط کشت گوشت پخته در شرایط بی‌هوازی با حضور ۱۵ درصد گاز CO₂ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت استفاده گردید (۱۹-۱۷). سپس DNA کروموزومی طبق روش‌های قبلی (۱۸) استخراج و با استفاده از اسپکتروفوتومتری تعیین غلظت گردید. پس از بررسی ترادف ژن مربوط به بخش عملکردی، با استفاده از نرم‌افزارهای کامپیوتری پرایمرهای اختصاصی برای دو انتهای ژن طراحی گردید. توالی پرایمرها عبارت بودند از:

5'- TGGGGATCCATGCAATTTGTTAATAAAA-3'

BamHI پرایمر بالادست

5'-ATCGAATTCCTCACTTATTGTATCCTTTATC-3'

ECORI پرایمر فرودست

تکنیک PCR با استفاده از آنزیم پلی‌مراز و پرایمرهای اختصاصی و نمونه‌ی DNA استخراج شده با دستگاه ترموسایکلر و با در نظرگرفتن دمای اتصال ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت.

جدول ۱: مواد و مقدار موردنیاز برای یک PCR به حجم ۵۰ میکرولیتر

مواد	مقدار	غلظت نهایی
بافر 10X PCR	۵ میکرولیتر	1X
dNTPs Mix	۱ میکرولیتر	۰/۲ میلی‌مولار
MgSO ₄	۴ میکرولیتر	۴ میلی‌مولار
پرایمر بالادست ۲۰ پیکومول بر میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۰/۴ میلی‌مولار
پرایمر پائین دست ۲۰ پیکومول بر میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۰/۴ میلی‌مولار
آنزیم Pfu DNA پلی‌مراز	۰/۵ میکرولیتر	۲/۵ U
الگو (DNA ژنومیک)	۱ میکرولیتر	۵۰ نانوگرم
آب مقطر	۳۶/۵ میکرولیتر	

شد (فرمتناز)، پس از تعیین غلظت، عمل الحاق ژنی در دمای ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. محصول الحاق به سلول‌های *E. coli* BL21DE3 (سیناژن) تراریخت شد. قطعه‌ی عملکردی بر روی وکتورهای بیانی pET28a و pET32a ساب‌کلون گردید و سپس بر روی وکتور pET28a تعیین ترادف شد. کلون‌های به دست آمده در گلیسرول نگهداری شدند (۲۱).

بیان و تخلیص پروتئین بخش عملکردی سم بوتولینوم تیپ A: به منظور بهینه‌سازی ابراز، شرایط زیر مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲: شرایط اعمال شده به منظور بهینه‌سازی ابراز

محیط کشت	آمیبی سلین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			جذب در طول موج (۶۰۰ نانومتر)				IPTG (میلی‌مولار)				زمان القا (ساعت)				حرارت (درجه سانتی‌گراد)			
	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۰/۵	۰/۷	۰/۹	۱/۱	۰/۵	۱	۱/۵	۶	۱۰	۱۵	۲۰	۲۴	۲۰	۲۵	۳۳	۳۷
لوریا برتانی (LB)	+	+	+	+	+	-	-	++	+	+	+	+	++	+	+	-	+	+	+

پروتئین نوترکیب مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی سلولی حاصل از بیان با ۴ میلی‌لیتر از بافر B (50mM NaH₂PO₄, 10mM Imidazol, 300mM NaCl) و یک میلی‌لیتر رزین Ni-NTA agarose به صورت Bath به مدت ۲ ساعت در دمای محیط انکوبه و مخلوط واکنش به ستون کروماتوگرافی منتقل شد. ستون به ترتیب با غلظت‌های ایمیدازول ۱۰، ۲۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ مورد شست‌وشو قرار گرفت، فراکسیون‌های حاصل پس از الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE ده درصد مورد بررسی قرار گرفت (۲۲).

تزریق پروتئین تخلیص شده به موش آزمایشگاهی: میزان ۵۰ میکرولیتر از پروتئین تخلیص شده (حاوی ۵ میکروگرم پروتئین خالص) را با ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات

واکنش PCR ابتدا با آنزیم Taq DNA پلی‌مراز تنظیم و بهینه‌سازی شد. به منظور احتراز از هرگونه موتاسیون و تغییر ناخواسته تکثیر نهایی ژن با آنزیم Pfu پلی‌مراز که از خاصیت غلط‌گیری برخوردار می‌باشد، صورت پذیرفت. مواد واکنش به ترتیب با غلظت‌های ۰/۴ میلی‌مولار از هر پرایمر، ۴ میلی‌مولار MgSO₄ ۰/۲ میلی‌مولار از dNTPs، ۲/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز و ۵۰ نانوگرم از الگو مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). محصول PCR و وکتور pRSETA هم‌ضم شده با دو آنزیم BamHI و ECORI بر روی ژل آگارز LMP الکتروفورز و با استفاده از کیت خالص‌سازی

پس از اتمام زمان بیان، سلول‌ها با سانتریفیوژ دور پایین جمع‌آوری گردیدند و در بافر A (Tris HCL 10mM, KCL 50mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, Tween 0.5% , Nanidet. 0.5%) حل و سپس از طریق سونیکاسیون (قدرت ۷۰ درصد و ۵ سیکل: ۱۵ ثانیه سونیکاسیون و ۴۵ ثانیه در یخ) شکسته شدند. عصاره‌ی سلولی به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی بعد از پروتئین‌سنجی بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز گردید و به روش کوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شد. به منظور تأیید صحت پروتئین بیان شده از روش وسترن بلائینگ (کیازن) و آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر ضد تیپ A استفاده گردید. به منظور تخلیص

ناقص (سگیما) اضافه و پس از مخلوط‌سازی به صورت صفاقی به هر موش سوری تزریق شد (جدول ۳).

سالین (PBS) مخلوط کرده و برابر حجم به دست آمده در مرحله‌ی اول ادجوانت کامل و در دو مرحله‌ی بعدی ادجوانت

جدول ۳: زمان، نحوه و مقادیر پروتئین نوترکیب در مراحل ایمن‌سازی

دوز	روز	مقدار (هر موش)	همراه	روش تزریق
دوز اول	۱	۵ میکروگرم	ادجوانت کامل	صفاقی
دوز دوم	۱۵	۵ میکروگرم	ادجوانت ناقص	صفاقی
دوز سوم	۳۰	۵ میکروگرم	ادجوانت ناقص	صفاقی
ارزیابی سرم	۴۵	با استفاده از کمپلکس توکسین و پروتئین نوترکیب خالص شده به روش الیزا به عمل آمد		

A غنی از بازهای AT (تقریباً ۷۰ درصد) می‌باشد، در مرحله‌ی طراحی پرایمرها، برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی در دمای پایین، طول پرایمرها بلندتر در نظر گرفته شد. انتخاب جایگاه برش برای آنزیم‌های BamHI و ECORI نیز به دلیل عدم وجود این جایگاه‌ها در ساختار ژن هدف از یک طرف و مناسب بودن جایگاه آن‌ها در (Multiple Cloning Site [MCS]) و کتورهای مورد نظر از طرف دیگر دلیل انتخاب این آنزیم‌ها بود (۲۴). بعد از طراحی پرایمر صحت آن با نرم افزار Blast بررسی شد که با سوش کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A موجود در بانک ژنی همخوانی داشت.

جهت تکثیر قطعه‌ی ژنی هدف از تکنیک PCR استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود وجود بند ۱۳۴۳ جفت باز در ستون‌های ۲، ۳ و ۴ مربوط به واکنش PCR می‌باشد. چنان‌چه پیداست بندها به لحاظ اندازه در مقایسه با نشان‌گر با طول قطعه‌ی مورد انتظار همخوانی دارد، مضافاً این‌که عدم وجود بندهای اضافی بر اختصاصیت پرایمرها به ژن مورد نظر دلالت دارد.

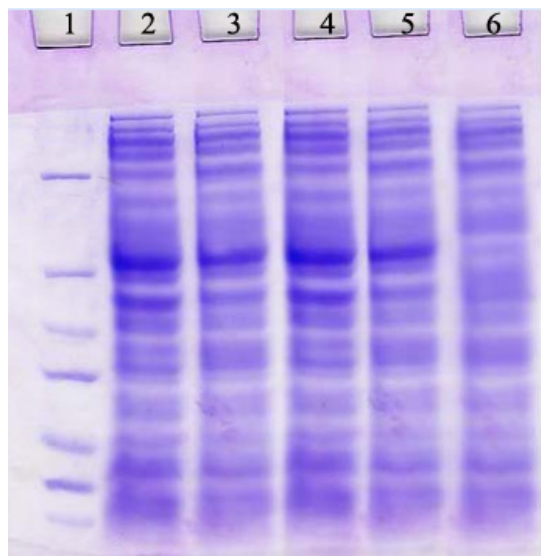
جهت تأیید پاسخ و جلوگیری از بررسی جواب کاذب به چهار موش به عنوان شاهد فقط PBS استریل و ادجوانت تزریق گردید. تزریق‌ها با فاصله‌ی ۱۵ روز انجام شد و قبل از هر تزریق خون‌گیری انجام گرفت. جهت تعیین تیترا آنتی‌بادی تولید شده از روش الیزا استفاده شد (۲۳).

ارزیابی ایمنی‌زایی با تست چالش (challenge):
برای ارزیابی ایمنی‌زایی با تست چالش از روش خنثی‌سازی استفاده شد. رقت‌های تهیه شده سم یک‌بار به میزان ۵۰/۵۰ (حجم به حجم) و یک‌بار نیز به میزان ۳۰/۷۰ با آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه پروتئین نوترکیب، مخلوط و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت نگهداری شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از هر مخلوط آنتی‌ژن _ آنتی‌بادی تهیه شده به روش فوق به هر موش (در مجموع چهار موش) به عنوان تست و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده آنتی‌ژن بدون حضور آنتی‌بادی به هر موش (در مجموع چهار موش) به عنوان کنترل به صورت داخل صفاقی توسط سرنگ انسولین تزریق و رفتار موش‌ها بررسی و ثبت گردید.

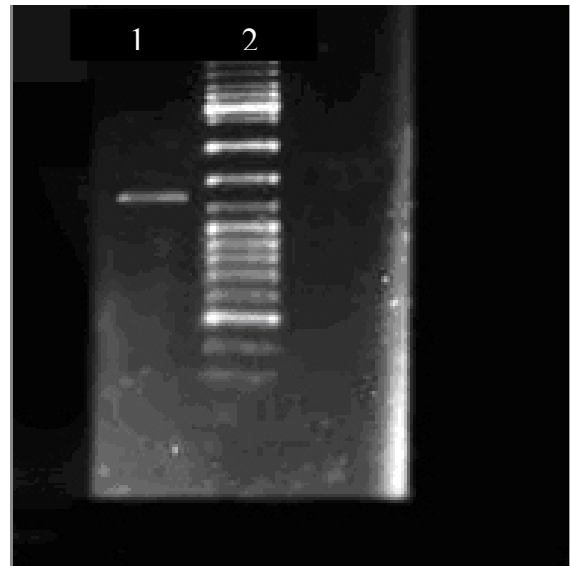
یافته‌ها

چون سکانس نوکلئوتیدی نروتوکسین سم بوتولینوم تیپ

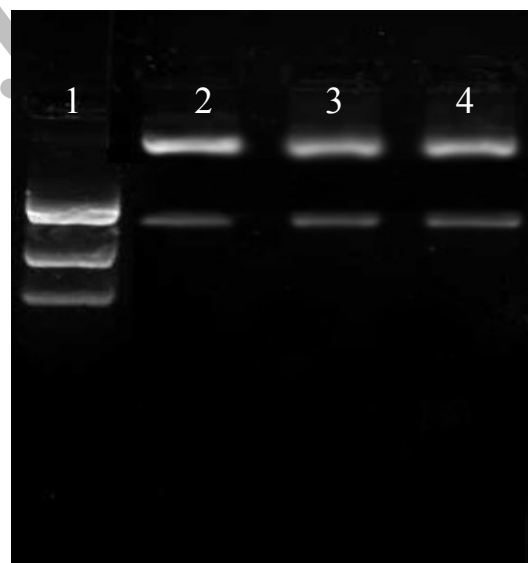
شکل ۲ مربوط به آنالیز کلون‌های به دست آمده از ژن مورد نظر می‌باشد. ستون‌های ۲، ۳ و ۴ در شکل مربوط به کلون‌های مثبت می‌باشند که در اثر هضم آنزیمی قطعه‌ی ژنی کلون شده از وکتور خارج شده است. القای ژن کلون شده در شرایط مختلف توسط IPTG در شکل ۳ نمایش داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود با اعمال شرایط مختلف در پروسه‌ی القا، بیان حاصل از pET32a نسبتاً قوی بوده که با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو قابل رؤیت بود. قابل ذکر است که ژن بخش عملکردی کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ A یک پروتئین ۵۰ کیلودالتونی را ایجاد می‌نماید، چنان‌چه پیشتر ذکر شد وکتور pET32a به ابتدای پروتئین نو ترکیب یک فیوژن ۲۰ کیلودالتونی اضافه می‌نماید به همین دلیل پروتئینی که در شکل ۳ بر روی ژل SDS-PAGE دیده می‌شود دارای وزنی معادل ۷۰ کیلودالتون می‌باشد.



شکل ۳: بررسی بیان کلون‌های دیگر ژن بخش عملکردی که بر روی وکتور pET32a کلون شده است.
ستون ۶) کنترل: بدون القا با IPTG
ستون ۲، ۳، ۴، ۵) تست: القا با IPTG
ستون ۱) نشانگر پروتئین: ۱۱۶، ۶۶/۲، ۴۵، ۳۵، ۲۵، ۱۸/۴ و ۱۴/۴ کیلودالتون

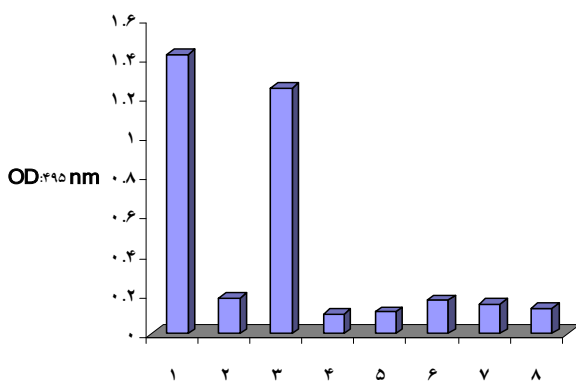


شکل ۱: بررسی محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد
ستون ۱: محصول PCR قطعه‌ی عملکردی
ستون ۲: مارکر مولکولی 100bp DNA



شکل ۲: آنالیز هضم آنزیمی: ساب‌کلون ژن بخش عملکردی بر روی وکتور pET32a که توسط دو آنزیم BamHI و ECORI مورد هضم قرار گرفت.
ستون ۲، ۳، ۴: وکتور pET32a حاوی ژن مورد نظر که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفته است.
ستون ۱: مارکر مولکولی pUC/Taq (۱۴۴۴، ۷۵۴، ۴۵۸) جفت باز).

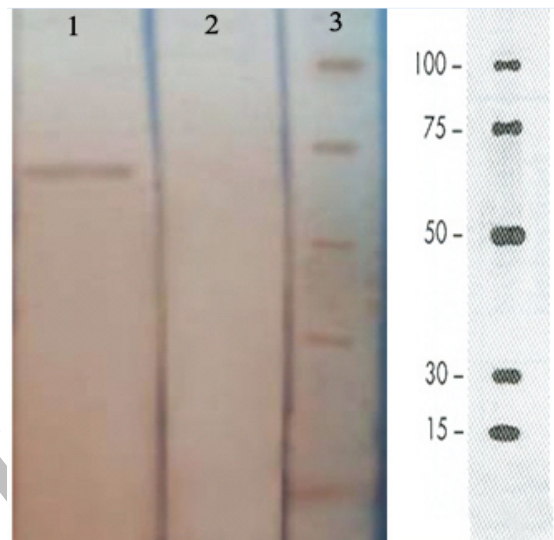
پروتئین نوترکیب بخش عملکردی سم از روش خنثی‌سازی در موش آزمایشگاهی استفاده شد. قبل از انجام آزمایش حداقل دوز کشنده سم تعیین گردید. در این تحقیق دو گروه ۴ موشی جهت بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. ۴ موشی که آنتی‌سرم و دوز کشنده سم را دریافت کردند همگی زنده ماندند. از ۴ موشی که به آن‌ها دوز کشنده LD_{50} ۱۰ توکسین تزریق شده بود سه موش زنده ماند و یکی از آن‌ها تلف شد. در عین حال با تزریق دوز کشنده LD_{50} ۱۰۰ پس از گذشت ۴۸ ساعت موش‌ها همگی مردند. تمامی موش‌های کنترل که فقط دوزهای LD_{50} ۱، ۱۰ و ۱۰۰ سم را دریافت کرده بودند از بین رفتند.



نمودار ۱: الیزا انجام شده بر روی پروتئین‌های حاصل از بیان بخش عملکردی سم کلستریادیوم بوتولینوم تیپ A که بر روی وکتور *pET32a* کلون شده است.

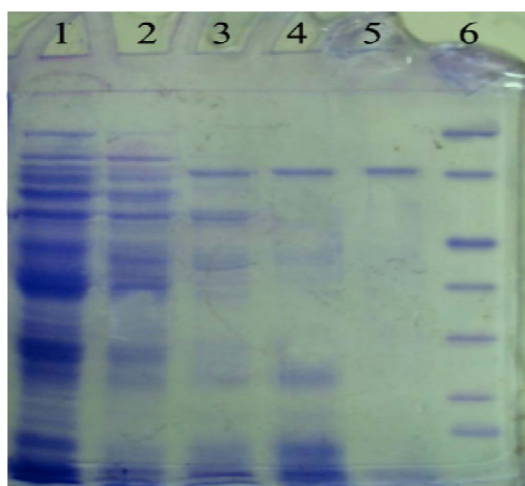
- ۱- تست (وکتور *pET32a* به تنهایی) + آنتی هیستیدین + کونژوگه
- ۲- کنترل + آنتی هیستیدین + کونژوگه
- ۳- تست + آنتی هیستیدین + کونژوگه
- ۴- تست + کونژوگه
- ۵- آنتی هیستیدین + کونژوگه
- ۶- کونژوگه
- ۷- آنتی هیستیدین
- ۸- کنترل + کونژوگه

پروتئین تولید شده توسط وسترن بلائینگ و الیزا مورد آنالیز قرار گرفت و تأیید گردید که نتایج آن در شکل ۴ ارائه شده است. نتایج حاصل از تست تأییدی الیزا نیز در نمودارهای ۲ و ۱ آورده شده است که نشان‌دهنده تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد.



شکل ۴: عمل وسترن بلائینگ بر روی پروتئین‌های حاصل از بیان ژن. بخش عملکردی بر روی وکتور *pET32a* کلون شده است. ستون ۱) کلون شماره‌ی چهارم القا شده با IPTG (ستون ۲) کنترل: بدون القا با IPTG (ستون ۳) نشانگر اندازه‌ی پروتئین (کیلو دالتون)

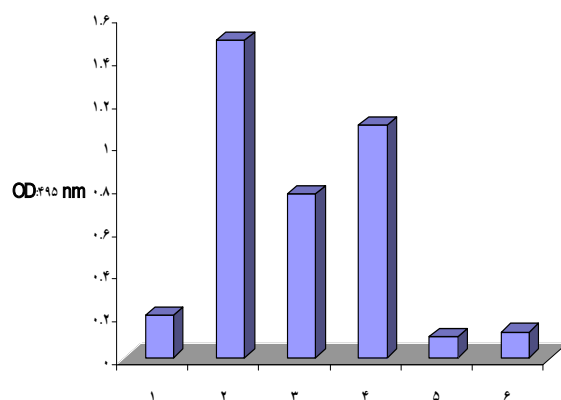
پس از تأیید پروتئین بیان شده به روش‌های وسترن بلات و الیزا، عمل تخلیص انجام گرفت. همان‌طور که در تصویر شماره‌ی ۵ پیداست در غلظت‌های اولیه ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، عمل جداسازی پروتئین صورت نگرفته است ولی در غلظت‌های ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار ایمیدازول پروتئین نوترکیب به همراه بعضی از پروتئین‌های دیگر از ستون خارج شده که از خلوص بالایی برخوردار نمی‌باشد. در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول محلول خارج شده از ستون کروماتوگرافی حاوی پروتئین نوترکیب خالص شده است. برای بررسی میزان ایمنی‌زایی آنتی‌سرم حاصله از تزریق



شکل ۵: تخلیص ژن بخش عملکردی سم بوتولینوم تیپ A توسط ستون Ni-NTA agarose resin

ستون ۱) ایمیدازول ۱۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.
 ستون ۲) ایمیدازول ۲۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.
 ستون ۳) ایمیدازول ۶۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.
 ستون ۴) ایمیدازول ۹۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.
 ستون ۵) ایمیدازول ۱۲۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.
 ستون ۶) نشانگر اندازه‌ی پروتئین: ۱۱۶، ۶۶/۲، ۴۵، ۳۵، ۲۵، ۱۸/۴ و ۱۴/۴ کیلودالتون.

سیستم غالباً برای هم‌سازسازی و بیان آزمایشگاهی پروتئین‌های نو ترکیب در *E coli* استفاده می‌شود. سیستم وکتوری pET دارای پروموتور T7 lac می‌باشد که پروموتوری قوی محسوب می‌شود. وجود نشانگر 6His Tag در دو طرف MCS تخلیص پروتئین نو ترکیب بیان شده را تسهیل می‌کند. نکته‌ی دیگر وجود یک سکانس ۳۰۰ نوکلئوتیدی در ابتدای MCS، pET32a می‌باشد که سبب می‌شود یک پپتید ۲۰ کیلودالتونی به ابتدای پروتئین اضافه گردد. علاوه بر این از آن‌جایی که ژن‌های خانواده‌ی کلاستریدیوم بوتولینوم غالباً غنی از نوکلئوتیدهای A و T می‌باشند لذا بیان آن‌ها توسط سایر وکتورها



نمودار ۲: دومین الیزا انجام شده بر روی پروتئین‌های حاصل از بیان بخش عملکردی سم بوتولینوم تیپ A که بر روی وکتور pET32a کلون شده است:

- ۱- کنترل (کلون ۴) + آنتی بوتولینوم + کونژوگه
- ۲- تست (کلون ۴) + آنتی بوتولینوم + کونژوگه
- ۳- کنترل (کلون ۲) + آنتی بوتولینوم + کونژوگه
- ۴- تست (کلون ۲) + آنتی بوتولینوم + کونژوگه
- ۵- تست + کونژوگه
- ۶- آنتی بوتولینوم + کونژوگه

بحث

بوتولیسم بیماری کشنده‌ای است که توسط نوروتوکسین یکی از سروتایپ‌های هفت‌گانه کلاستریدیوم بوتولینوم ایجاد می‌شود. با توجه به مکانیسم مولکولی عملکرد توکسین، بخش زنجیره‌ی سبک وظیفه‌ی کاتالیزی سم را به عهده دارد. هر چند بیشتر مطالعات در زمینه‌ی تولید واکسن نو ترکیب و آنتی‌بادی بر روی بخش اتصال‌دهنده‌ی توکسین متمرکز شده است (۱۶-۱۹) اما در این تحقیق بر آن بودیم تا میزان ایمنی‌زایی بخش عملکردی را در مقایسه با بخش اتصال‌دهنده‌ی سم مورد مقایسه و بررسی قرار دهیم. در این تحقیق به منظور زیرهم‌سازسازی (Subcloning) و بیان ژن مورد نظر از سیستم وکتور pET استفاده شد. این

به راحتی صورت نمی‌گیرد (۲۴ و ۱۸، ۱۷).

به طور کلی بیان پروتئین نوترکیب، با تراریخت کردن پلاسمید حاوی ژن کدکننده‌ی پروتئین موردنظر به یک سلول میزبان مناسب و رشد دادن سلول‌های میزبان در یک محیط مناسب و تحریک بیان و در پایان با لیزکردن سلول‌ها و بررسی پروتئین‌ها روی ژل SDS-PAGE برای تأیید حضور پروتئین نوترکیب، قابل دسترسی است. با انتخاب دقیق سوش میزبان، وکتور و شرایط رشد اغلب پروتئین‌های نوترکیب می‌توانند در *E coli* کلون شوند و در سطح بالایی بیان شوند. سیستم بیانی pET برای بیان در سطح بالا بهینه‌سازی شده است، اما شرایط بهینه بیانی برای هر پروتئین می‌بایست به صورت تجربی معین شود. یکی از وکتورهای بیانی مورد استفاده وکتور pET32a است که تاکنون گزارشی از بیان ژن توکسین کلسترییدیوم بوتولینوم در آن وجود نداشته است اما قابلیت‌های آن موردتوجه ما قرار گرفت و نتایج حاصل بسیار رضایت‌بخش و سطح بیان بسیار بالا بوده و همین امر نشان می‌دهد که وکتور از نقش تعیین‌کننده‌ای در سطح بیان این ژن برخوردار بوده است. از ویژگی‌های سیستم pET32a این است که پروتئازهای خارج‌سلولی و پروتئازهای متصل به دیواره‌ی سلولی بسیار کم بوده لذا فعالیت پروتئازی روی محصول پایین می‌باشد. در تحقیقات قبلی ما در خصوص تخلیص پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در سیستم pET با مشکلاتی مواجه بودیم از جمله این که در مراحل اولیه‌ی تخلیص، پروتئین در غلظت‌های کم ایمیدازول از ستون خارج می‌شد که در نتیجه عمل خالص‌سازی به طور مطلوب صورت نمی‌گرفت. آنچه مسلم است دلیل این امر را می‌توان به اتصال ضعیف با نشان هیستیدین در انتهای این پروتئین به رزین بیان نمود. چنین مشکلی قبلاً نیز توسط ما و سایر محققین گزارش شده است (۲۵ و ۲۴، ۱۸، ۱۷). این محققین دلیل امر را احتمال مخفی شدن نشان هیستیدین در داخل پروتئین ذکر کرده‌اند و برای حل مشکل از نشان هیستیدین در

دو سر پروتئین (انتهای آمینی و انتهای کربوکسیل) استفاده نموده‌اند. ما پس از بررسی‌های لازم و به کار بردن تجربیات خود در خصوص تخلیص این پروتئین نوترکیب به نتایج مطلوبی دست یافتیم (۲۵-۱۸). همان‌طور که در شکل ۵ پیداست پروتئین موردنظر در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول از ستون خارج شده است که مورد انتظار می‌باشد، قابل ذکر است که ما در این تحقیق با بهینه کردن شرایط تخلیص توانستیم پروتئین را با یک نشان هیستیدین به طور قابل‌قبولی جداسازی نماییم.

برای نشان دادن قابلیت ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب از رابطه‌ی میزان تولید آنتی‌بادی و مقدار توکسین خنثی شده به وسیله‌ی آن استفاده می‌گردد. برای این بررسی در طول فرآیند از روش الیزا بهره‌گیری شده است. تیترا سرم به روش الیزا بیان‌گر پاسخ تام بدن نسبت به آنتی‌ژن تجویز شده می‌باشد اما الزاماً نمی‌تواند بیان‌گر میزان آنتی‌بادی مؤثر در خنثی‌سازی توکسین باشد. ولی مقایسه‌ی رابطه‌ی بالا بین نتایج حاصل از چالش و میزان زنده ماندن موش‌ها و تیترا سرم در تست الیزا بیان‌گر قابلیت بسیار بالای پروتئین نوترکیب تهیه شده در تحریک سیستم ایمنی حیوان مدل بوده و کارایی بالایی برای محافظت حیوان بر علیه توکسین را دارد. در تحقیقی که گیلز دورف و همکاران بر روی بیان، تخلیص و ایمنی‌زایی پروتئین بخش عملکردی تیپ B بوتولیسم انجام دادند، آنتی‌سرم تهیه شده توسط آن‌ها توانست موش‌ها را حداکثر در برابر دوز LD₅₀ ۱۰۰۰ سم محافظت نماید (۲۶). در پژوهش انجام شده توسط جنسن و همکاران، بخش عملکردی سم، هم به طور جداگانه و هم به طور ترکیبی با بخش انتقال‌دهنده‌ی سم، در شرایط آزمایشگاهی تولید و ایمنی‌زایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. موش‌های حاصل از ایمن شدن با غلظت ۵ و ۱۵ میکروگرم از پروتئین‌های خالص شده توانستند میزان LD₅₀ ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ سم را تحمل کنند. لازم به ذکر است میزان ایمنی‌زایی پروتئین فیوژ شده و

بخش اتصال‌دهنده‌ی سم از ایمنی‌زایی پایینی برخوردار است.

نتیجه‌گیری

هرچند بیان ژن‌هایی با درصد بالایی از AT در سیستم Ecoli ضعیف می‌باشد ولی ما در این تحقیق توانستیم بیان مناسبی به دست آوریم. تخلیص پروتئین نوترکیب در مراحل اولیه به دلیل اتصال ضعیف هیستیدین انتهایی به ستون دشوار بوده که با تغییر در روش‌ها این پروتئین تا ۹۰ درصد خالص‌سازی شد. در بحث ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب مورد نظر نیز مشخص شد که آنتی‌بادی‌های تولید شده در مقایسه با آنتی‌بادی تولید شده علیه بخش اتصال‌دهنده از ایمنی‌زایی پایینی برخوردار است.

بخش عملکردی جداگانه هیچ تفاوتی با هم نداشته است. این گروه معتقدند که پروتئین نوترکیب عملکردی می‌تواند ایمنی قابل‌قبولی را ارائه دهد. در عین حال ادجوانت آلبومین را برای ایمنی‌سازی مناسب می‌دانند (۲۷). در سال ۲۰۰۲ نیز چادوک و همکاران با تخلیص این قطعه‌ی پروتئینی به نتایج مشابهی در خصوص ایمنی‌زایی آن دست یافتند (۲۸). پایین بودن نتایج ایمن‌سازی در تحقیق حاضر شاید به علت نوع بافر حل‌کننده پروتئین تخلیص شده باشد. این همان مطلبی است که جنسن و همکارانش بر آن تأکید دارند. نتایج تحقیق بیان‌گر این است که آنتی‌بادی تولید شده علیه زنجیره‌ی سبک سم می‌تواند عامل مؤثری برای ایمنی‌زایی بر علیه سم بوتولیسم تیپ A باشد، هرچند به نظر می‌رسد در مقایسه با

منابع

- 1- Johnson EA, Bradshaw M. *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon*. 2001; 39: 1703-22.
- 2- Humeau Y, Doussau F, Grant NT, Poulainm B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie*. 2000; 82: 427-46.
- 3- Montecucco C, Molgo J. Botulinal neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; 5: 274-9.
- 4- Oguma K, Fujiaga Y, Inoune K. Structure and function of clostridium botulinum toxin. *Microbiol Immunol*. 1995; 39: 161-8.
- 5- Binz T, Kurazono H, Wille M, Frevert J, Wernars K, Niemann H. The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxin. *J Biol Chem*. 1990; 265: 9153-8.
- 6- Dineen SS, Bradshaw M, Johnson EA. Neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* type A strains: sequence comparison and evolutionary implications. *Curr Microbiol*. 2003; 46: 345-52.
- 7- Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K, Verastegui C, Schivao G. The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *TRENDS Microbiol*. 2003; 11: 431-7.
- 8- Dineen SS, Bradshaw M, Karasek CE, Johnson EA. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the type A2 neurotoxin gene cluster in *Clostridium botulinum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 235: 9-16.

- 9- Agarwal R, Eswaremoorthy S, Kumaran D, Dunn J, 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(1): 95-102.
- 10- Kotich DK, Carthy MC, McCarthy EE, Baldini M. Plasma membrane targeting of SNAP-25 increase its local concentration and is necessary for SNARE complex formation. *J Cell Science.* 2002; 115: 3341-51.
- 11- Meunier FA, Schiavo G, Molgo J. Botulinum neurotoxins: from paralysis to recovery of functional neuromuscular transmission. *J Physiol Paris.* 2002; 96: 105-13.
- 12- Thompson DE, Brehm JK, Oultram JD, et al. The complete amino acid sequence of the *clostridium botulinum* type A neurotoxin deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene. *Eur J Biochem.* 1990; 189(1): 73-81.
- 13- Ekong TA, Feavers IM, Sesardic D. Recombinant SNAP25 is an effective substrate for *clostridium botulinum* type A toxin endopeptidase activity *in vitro*. *Microbiology.* 1997; 143: 3337-47.
- 14- Baldwin MR, Bradshaw-M, Johnson EA, Barbeieri JT. The C-terminus of botulinum neurotoxin type A light chain contributes to solubility, catalysis, and stability. *Protein Expr Purif.* 2004; 37(1): 187-95.
- 15- Vertiev IUV, Zdanovskii AG, Bprinskaia SA, Martin T, Gening E, Lankovskii NK. Effective expression of fragments of a botulinum neurotoxin type A gene coding for the L-chain and H-chain in E.coli with formation of products causing protective immunity to administration of the toxin. *Mol Gen Microbiol Virusol.* 2000; 4: 3-7.
- 16- Clayton MA, Clyton JM, Brown DR, Middlebrook JL. Protective, Vaccination with a recombinant fragment of *clostridium botulinum* neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in escherichia coli. *Infect Immun.* 1995; 2738-42.
- 17- Lacy DB, Stevens RC. Rcombinant expression and purification of the botulinum neurotoxin type A translocation domain. *Protein Expr Purif.* 1997; 11: 195-200.
- 18- Mousavi ML, Kouhsari SM, Nazarian S, Rasooli I, Amani J. Cloning, expression and purification of *Clostridium botulinum* neurotoxin type E binding domain. *Iranian J Biotech.* 2004; 2(3); 183-188.
- 19- Holley JL, Elmore M, Mauchline M, Minton N, Titball RW. Cloning expression and evaluation of a recombinant unit vaccine against *clostridium botulinum* type F. *Vaccine.* 2000; 19: 288-97.
- 20- Zyskind JW, Bernstein SI. Recombinant DNA laboratory manual. San Diago: Academic Press; 1989, 11-14.
- 21- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. 3th ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press; 2001, 20-35.
- 22- Daniel MB, Stuart JE. Protein Methods. 3th ed. New York: Wily-Liss; 1992, 45-52.

- 23- Crowthe JR. Methods in molecular biology. Elisa theory and practice. In: Walker JM, editor. New Jersey: Humana press inc; 1995, 119-130.
- 24- Kadkhodayan K, Knapp MS, Schmidt JJ, Fabes SE, Rupp B, Balhorn R. Cloning, expression and one-step purification of the minimal essential domain of the light chain of botulinum neurotoxin type A. *Protein Expr Purif.* 2000; 19: 125-130.
- ۲۵- موسوی سید لطیف، امانی جعفر، تولایی محمود، کمالی مهدی. کلون، بیان و تخلیص ژن بخش اتصال‌دهنده‌ی سم بوتولینوم تیپ A. *علوم پزشکی کوثر* ۱۳۸۳؛ شماره‌ی ۲: صفحات ۹۲-۸۱.
- 26- Gilsdorf J, Gul N, Smith LA. Expression, purification and characterization of *clostridium botulinum* type B light chain. *Protein Expr Purif.* 2006; 46: 256-67.
- 27- Jensen JM, Smith TJ, Ahmed SA, Smith LA. Expression, purification and efficacy of the type A botulinum neurotoxin catalytic domain fused to two translocation domain variants. *Toxicon.* 2003; 41: 691-701.
- 28- 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(2): 219-228.

Archive of SID

Immunological Characterization of Light Chain Recombinant Protein of *Clostridium botulinum* Type A

Mousavi SL, Amani J, Nazarian SH, Sorouri R

Corresponding Author's Address: Department of Biology, Shahed University, Tehran, Iran.

Email: slmousavi@shahed.ac.ir

Background and Objective: Botulinum neurotoxin type A, structurally consists of a 50KD light chain and a 100 KD heavy chain linked by a disulfide bond. The protein can further be divided into three functional domains of which catalytic domain corresponds to the light chain. In this research we aimed to produce recombinant catalytic domain in order to obtain a protective protein.

Materials and Methods: Bacteria were grown in anaerobic conditions and genomic DNA was extracted by alkaline method. Following the gene coding a set of primers was designed and the catalytic domain was amplified through PCR. The PCR product was then cloned into three expression vectors namely pRSETA, pET28a and pET32a. The expressed protein was analyzed on SDS-PAGE and confirmed by ELISA and western blotting and then purified by affinity chromatography.

Results: In this research the maximum expression was obtained at 0.5 mM IPTG, OD₆₀₀:0.6 and 15 hours of induction at 30°C. The protein so expressed was purified by affinity column chromatography. The antibody raised against recombinant protein could protect the rats by 100 LD₅₀.

Discussion: Though the expression of AT- rich genes in E.coli system is low, we could obtain an appropriate level of expression in this study. The purification of recombinant protein in the early stages was elusive in the extreme by affinity chromatography due to the weak binding of histidine N-terminal to the column, however 90% purification was achieved through modification of the technique. The antibody produced against this domain was less protective compared to that of binding domain.

Key words: *Clostridium botulinum* type A, Catalytic domain, PCR, Recombinant protein.