Archive of SID

مجلهٔ علوم پزشکی مدرّس
دورهٔ ۷، شماره ۲: از ۸۱ تا ۹۲
پاییز و زمستان ۱۳۸۳

کلونینگ ، بیان و تخلیص ژن بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپ A

میر لطیف موسوی[۱*]، جعفر امانی[۲]، محمود تولایی[۳]، مهدی کمالی[۴]

۱- استادیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)
۲- کارشناسی ارشد گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه امام حسین (ع)
۳- استادیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)
٤- کارشناسی ارشد گروه علوم زیستی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)

چکیده

هدف: سم بوتولینوم تیپA به لحاظ ساختاری از یک زنجیره سبک به وزن ۵۰KD و یک زنجیره سنگین به وزنKD ۱۰۰ تشکیل شده است که به وسیله یک باند دی سولفید به هم متصل شده اند. این پروتئین شامل سه بخش عملکردی است. بخش آنزیمی با فعالیت کاتالیتیک که همان زنجیره سبک می باشد. بخش انتقال دهنده که نیمه انتهای آمینی زنجیره سنگین است و بخش اتصال دهنده که نیمه انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین را تشکیل می دهد. در این پژوهش، هدف از تولید نوترکیب بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپ A ، مطالعه کارائی این بخش از سم به‌طور مستقل یا همراه با بخش اتصال دهنده توکسین به منظور دستیابی به یک پروتئین ایمنی زا در تحقیقات بعدی بوده است. از طرف دیگر تولید انبوه این بخش از سم، مطالعه ساختار و مکانیزم دقیق بخش انتقال دهنده را هموار خواهد ساخت.

مواد و روشها: باکتری در شرایط بی‌هوازی رشد داده شد سپس DNA کروموزومی به روش قلیایی استخراج گردید.پس از بررسی ترادف ژن مربوطه و طراحی پرایمر، قطعه مورد نظر از طریق واکنشهای زنجیره ای پلیمرازی(PCR) فراوان سازی شد. محصول PCR به وسیله آنالیز آنزیمی ارزیابی شد و بر روی سه ناقل مختلف بیانیpET28a,pRSET A و pET32a همسانه سازی گردید. پروتئین تولید شده به وسیله SDS-PAGE بررسی شد و صحت محصول با روش وسترن بلاتینگ و واکنش الیزا مورد تائید نهایی قرار گرفت و سپس به وسیله کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص سازی شد.

بحث و نتیجه: در این تحقیق بالاترین بیان در شرایط غلظت ۰/۵ میلی مولار IPTG ، جذب نوری ۰/۶ و زمان القاء ۱۵ ساعت در دمای ۳۰°C به‌دست آمد. هر چند بیان ژنهایی که درصد بالائی از AT را برخوردارند در سیستم E.coli ضعیف است اما با این حال بیان مناسبی از این ژن به‌دست آمد. تخلیص پروتئین نوترکیب در مراحل اولیه به دلیل اتصال ضعیف نشان هیستیدین به ستون دشوار بود که ما با تغییر در روشها توانستیم این پروتئین را تا ۹۰٪ خالص سازی کنیم.

کلید واژگان: کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ، ترانس لوکیتینگ دومن ، پروتئین نوترکیب

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه امام حسین ، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی
E-mail: mmousavi@ihu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مجله علوم پزشکی مدرّس
دورهٔ ۷، شماره ۲: از ۸۱ تا ۹۲
پاییز و زمستان ۱۳۸۳

۱- مقدمه

جنس کلستریدیوم شامل باسیلهای درشت و گرم مثبت است که بی هوازی مطلق یا میکرو آئروفیل بوده و تولید اسپور می نماید. تا کنون هفت سروتیپ از این نوروتوکسین شناخته شده است که عبارتند از:A,B,C_1,D,E,F وG که فقط تیپ های A,B,E,F در انسان بیماریزا می باشند. حساسیت این نوع باکتری نسبت به اکسیژن به علت وجود آنزیمهای فلاو پروتئین است که می تواند اکسیژن را احیا نموده و آن را تبدیل به مواد سمی نماید[۲،۱]. کلستریدیوم بوتولینوم ایجاد بیماری بوتولیسم می نماید که به چهار صورت ظاهر می شود بوتولیسم غذایی، بوتولیسم نوزادان ، بوتولیسم زخم، بوتولیسم ناشناخته[۳].

ژن کد کننده سم بوتولینوم تیپA دارای ۴۹۲۹ جفت بازمی باشد. توالی ترجمه شده به‌صورت یکORF[1] با۳۸۹۱ جفت باز شناسایی شده است که با کدون آغازینAUG شروع و به کدون پایان UAA ختم می شود. پلی پپتید سنتز شده مرکب از ۱۲۹۶ اسیدآمینه می باشد. بررسی ژن کد کننده سم بوتولینوم تیپA نشان می دهد که این ژن درصد بالائی ازAT (۷۰ درصد) را شامل می شود. ترشح سم بوتولینوم به‌وسیله پپتید راهنما وساطت نمی شود و تغییرات پس از ترجمه در انتهای آمینی پلی پپتید تازه سنتز شده، فقط به حذف یک متیونین محدود می‌شود[۵،۴].

نروتوکسین سم بوتولینوم، پروتئینی به وزن kD ۱۵۰بوده که به‌طور اختصاصی بر روی اعصاب کولینرژیک اثر می‌گذارد و مانع از آزاد سازی نوروترانسمیتر استیل کولین شده نهایتاً سبب فلج شل می‌شود. ابتدا سم به‌صورت یک زنجیره پلی پپتیدی ساخته می شود سپس تحت تاثیر پروتئاز ها به زنجیره سبک و سنگین بریده می شود که به‌وسیله یک باند دی سولفیدی به هم متصل شده اند. زنجیره سنگین شامل بخش انتقال دهنده در انتهای آمینی و بخش اتصال دهنده در انتهای کربوکسیل بوده و زنجیره سبک نیز شامل بخش عملکردی سم می باشد[۶،۴]. مراحل عملکرد سموم بوتولینوم شامل اتصال بخش اتصال دهنده[2] با رسپتورهای سطح سلولی بر روی غشاء پری سیناپتیک است که

1 . Open reading frame

2 . Binding domain

www.SID.ir

Archive of SID

منجر به ورود سم به داخل سیناپس با پروسه اندوسیتوز می شود. در مرحله بعدی، ایجاد کانال به وسیله بخش انتقال دهنده[1] بر روی غشاء اندوزومی و نهایتاً ورود بخش عملکردی به داخل سیناپس از طریق کانال ایجاد شده به وسیله بخش انتقال دهنده[2] در غشاء اندوزوم .

سم بوتولینوم دارای سه نوع سوبسترا می باشد،پروتئینVAMP [3] یا سیناپتو برووین که سوبسترای سروتیپهای C,F,D,B بوده و پروتئین SNAP25 [4] که سوبسترای سروتیپهایC,B,A بوده و سیناتاکسین[5] که سروتیپC روی آن اثر می گذارد[۸،۷،۴].

از موارد مهم مورد علاقه ای که می توان در رابطه با بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم مورد مطالعه قرار داد تغییر کانفورماسیون این بخش از پروتئین در مواجهه با محیط اسیدی اندوزوم و چگونگی درگیری و نفوذ آن در غشاء اندوزوم که منجر به ایجاد کانال برای عبور پروتئین ۵۰ kD بخش عملکردی می باشد، مشابهت جالب بخش انتقالی سم بوتولینوم در ایجاد کانال در غشاء اندوزوم، با سم دیفتری از نقاط جالب توجه دیگر می باشد. البته مطالعات زیادی در رابطه با پروسه انتقال در سم دیفتری صورت پذیرفته است و با استفاده از روشهای بیوشیمیایی، محققین نقش ساختارهای دوم و اسیدهای آمینه به خصوصی را در این انتقال مطالعه‌کردند[۱۰،۹].

پی بردن به مکانیزم مولکولی تشکیل کانال به وسیله بخش انتقال دهنده می تواند پاسخی باشد به سوالاتی از قبیل اینکه آیا از طریق این بخش می توان پروتئینها یا داروهای دیگری که از لحاظ سایز شبیه یا کوچکتر از بخش عملکردی این سم می باشد، را وارد سلولهای هدف کرد؟ هر چند مطالعاتی در این زمینه صورت گرفته است ولی برای رسیدن به جواب مطلوب هنوز راهی طولانی در پیش است. تولید این بخش از سم به روش نوترکیب اولین قدم در این راه می باشد مضافاً اینکه با وجود گزارش مطالعه ایمنی زایی بخشهای اتصال دهنده و عمل کننده هنوز اطلاعاتی در زمینه ایمنی زایی بخش انتقال دهنده به تنهایی و یا همراه با بخش اتصال دهنده در دست نمی باشد. مجموعه مطالب فوق ما را بر آن داشت که با تولید بخش انتقال دهنده به روش نوترکیب ، راه را برای مطالعه و بررسی کارایی این بخش بصورت مستقل و یا همراه با سایر اجزای توکسین در تحریک سیستم ایمنی و نهایتاً یافتن پاسخی مناسب به سوالات فوق هموار سازیم.

1 .Translocating domain
2 . Catalytic domain
3.Vesicle associated membrane protein
4. Synaptosomal associated protein of 25 kD
5 . Synataxin

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد

سویه کلستریدیوم بوتولینوم تیپA جدا شده از بیماران، پس از بررسی بوسیله تستهای تشخیص افتراقی استفاده شد.

آنزیمهای برش دهنده، آنزیمهای لیگاز و پلی مراز[6] از شرکت فرمنتاز[7] تهیه شد. سلولهای میزبان به‌کار رفته در این تحقیق عبارتند از *E.coli BL21DE3,Ecoli Bl21* پلاسمیدهای واجد پروموتر T7 نظیر pET28a، pRSETA و pET32a نیز برای الحاق ژن و بیان آن استفاده شد. مواد استفاده شده ژل آگارز معمولی و آگارزL.M.P [8] از شرکت فرمنتاز و مواد تشکیل دهنده SDS-PAGE [9]و وسترن بلاتینگ از شرکت کیاژن تهیه شده است، و همچنین برای القاء از IPTG [10] تهیه شده از شرکت فرمنتاز استفاده شد. به‌عنوان شاخص وزن مولکولی از پلاسمید pUC18 هضم شده با آنزیم TaqI استفاده شد. بر اثر هضمpUC18 با آنزیم TaqIسه قطعه به ابعاد ۱۴۴۴،۷۵۴،۴۵۸ جفت باز به‌دست‌می‌آید. ستون میل ترکیبی نیکل[11] برای تخلیص پروتئین نوترکیب از شرکت کیاژن تهیه شد.

۲- ۲- روشها

6 .Taq and Pfu DNA polymerases, T4 DNA Ligase
7 . Fermentas
8 . Low- Melting Point
9 . Sodiom Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
10 . Isopropyl B-D- thiogalactopyranoside
11 . Ni- NTA agarose resin

www.SID.ir

Archive of SID

برای رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپA از محیط کشت گوشت پخته[1] در شرایط بی هوازی با حضور ۱۵ درصد گازCO2 در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد[۴،۶،۱۱]. سپس DNA کروموزومی به روش قلیایی (۱۲) استخراج و با استفاده از اسپکتروفتومتری تعیین غلظت شد.پس از بررسی ترادف ژن مربوط به بخش انتقال دهنده، پرایمرهای اختصاصی برای دو سر ژن طراحی و سپس مورد آنالیز کامپیوتری قرار گرفت و با نرم افزارهای کامپیوتر به لحاظ صحت جایگاه و سایر فاکتورهای موثر ارزیابی گشت. توالی پرایمرهای طراحی شده به قرار زیر می باشد.

پرایمر فرودست

5´GGA TAC GGATCC GCA TTA AAT GAT TTA 3´ BamHI

پرایمر بالادست

5´AGT ATT CTCGAG CTA CTT AAT ATA TTC AGT 3´ XhoI

با استفاده از پرایمرهای فوق وDNA کروموزومی استخراج شده، قطعه ژنی مورد نظر، بر اساس شرایط زیر در واکنشهای زنجیره ای پلیمرازی (PCR) فراوان سازی شد.

جدول ۱ مواد لازم برای انجام عمل PCR

مواد	مقدار	غلظت نهایی
بافرPCR 10X	۵ میکرولیتر	1X
10mM dNTPs Mix	۱میکرولیتر	۰.۲ میلی مولار
۵۰میلی مولار MgCl2	۴میکرولیتر	۴ میلی مولار
پرایمر بالادست ۲۰پیکو مول بر میکرو لیتر	۱میکرولیتر	۰.۴ میلی مولار
پرایمر پائین دست ۲۰پیکو مول بر میکرو لیتر	۱ میکرولیتر	۰.۴میلی مولار
آنزیم Taq DNA پلی مراز	۰.۵ میکرو لیتر	۲.۵ U
الگو (DNA ژنومیک)	۱ میکرو لیتر	۵۰ نانو گرم
آب مقطر	۳۶.۵ میکرو لیتر	—
حجم نهایی	۵۰ میکرولیتر	—

1 . Cooked meat

جدول ۲ نحوه اجرای سیکلهایPCR با آنزیمPfu

	مراحل	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
۱	دناتوره کردن اولیه	۹۴ درجع	۱۰دقیقه	۱ سیکل
۲	دناتوره کردن	۹۴ درجه	۱دقیقه	۵ سیکل
	اتصال	۵۵ درجه	۱دقیقه	
	تکثیر	۷۴ درجه	۴دقیقه	
۳	دناتوره کردن	۹۴ درجه	۱دقیقه	۳۰ سیکل
	اتصال	۶۲ درجه	۱دقیقه	
	تکثیر	۷۴ درجه	۴دقیقه	
۴	تکثیر نهایی	۷۴ درجه	۱۵ درجه	۱ سیکل

www.SID.ir

Archive of SID

واکنشPCR [1] ابتدا با آنزیم Taq DNA پلی مراز تنظیم و بهینه سازی شد اما چون هدف اصلی مطالعه جنبه های مولکولی این قطعه بود، به منظور احتراز از هر گونه موتاسیون و تغییر ناخواسته تکثیر نهائی با آنزیم Pfu پلی مراز صورت پذیرفت . محصول PCR ابتدا به وسیله ژل آگارز با دمای ذوب پائین و کیت [2] خالص سازی شد و سپس با دو آنزیم BamHI وXhoI به مدت ۱۰ ساعت در دمایC ۳۷° مورد هضم آنزیمی قرار گرفت پس از این مرحله وکتور pRSET A به روش قلیایی از سلول استخراج شد و سپس با دو آنزیم فوق به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷° هضم آنزیمی شد.

محصول PCR و وکتور هضم شده به‌طور جداگانه بر روی ژل آگارزL.M.P الکتروفورز و با استفاده از کیت خالص سازی شدند. پس از تعیین غلظت، عمل الحاق ژنی در دمای ۱۲° و به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. محصول الحاق بر روی سلولهای *E.coliBl21DE3* که با استفاده ازCaCl2 سازگار شده بود به روش شوک سرماـ گرما تراریخت شد. عمل غربال‌گری کلونهای به‌دست آمده با دو روش هضم آنزیمی و PCR صورت گرفت. قطعه انتقال دهنده طبق روش بالا بر روی وکتورهای بیانیpET28a و pET32a زیر همسانه سازی شد. و سپس بر روی وکتور pET28a تعیین ترادف انجام گرفت[۸، ۱۳].کلونهای بدست آمده با گلیسرول ۲۰٪ در دمای C ۷۰° – نگهداری شدند [۱۲].

1 . Polymerase Chain Reaction
2 . Gel extraction PCR product

۲-۳- بیان ژن بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپ A

به منظور بهینه سازی ابزار، شرایط زیر مورد بررسی قرار گرفت. (جدول ۳)

محیط کشت	آمپی سیلین (میلی گرم بر میلی لیتر)	جذب در طول موج ۶۰۰ نانو متر	IPTG (میلی مولار)	زمان القاء(ساعت)	حرارت (درجه سانتیگراد)

www.SID.ir

Archive of SID

لوریا برتانی	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۰/۵	۰/۷	۰/۹	۱/۱	۰/۵	۱	۱/۵	۶	۱۰	۱۵	۲۰	۲۴	۲۰	۲۵	۲۲	۲۷

محصول کشت در شرایط بهینه، با سانتریفوژ دور پایین جمع آوری گردید. سلولهای مورد نظر را در بافر A

(Tris HCL 10mM, KCL 50mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, Tween 0.5% , Nanidet. 0.5%)

حل کرده و سپس از طریق سونیکاسیون (قدرت۷۰٪ و ۵ سیکل: ۱۵ ثانیه سونیکاسیون و ۴۵ ثانیه در یخ) شکسته شدند.عصاره سلولی به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانتریوفوژ و محلول روئی بعد از پروتئین سنجی بر روی ژلSDS-PAGE الکتروفورز شد. سپس به روش کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد [۱۴]. به منظور تأیید صحت ژن ابراز شده از روش وسترن بلاتینگ و آنتی بادی ضد بر چسب هیستیدین استفاده شد، بدین منظور ابتدا میزان پروتئین از طریق اسپکتوفتومتری اندازه گیری و سپس مقدار ۳۰ میکروگرم پروتئین بر روی ژلSDS-PAGE لودگردید و بعد از عمل الکتروفورز به روی کاغذ نیترو سلولز منتقل و با مجاورت با آنتی بادی ضد هیستیدین مورد بررسی قرارگرفت. همچنین بروش الیزا نیز ارزیابی کمی صورت پذیرفت[۱۶،۱۵،۶،۴].

۲- ٤- تخلیص پروتئین بیان شده ژن بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپA

مقدار ۵۰۰µl از عصاره سلولی حاصل از سلولهای بیان شده با ۴ میلی لیتر از بافرB

(50mM NaH2PO4,10mMImidazol,300mM NaCL)

و یک میلی لیتر رزین Ni-NTA agarose به صورتBath به مدت ۲ ساعت در دمای محیط انکوبه شد و مخلوط واکنش در ستون کروماتوگرافی قرار گرفت. ستون به ترتیب با غلظتهای مختلف ایمیدازول مورد شستشو قرار گرفت، فراکسیونهای حاصل پس از الکتروفورز بر روی ژلSDS-PAGE ده درصد بررسی شد[۱۶،۶،۴].

۳- نتایج و بحث

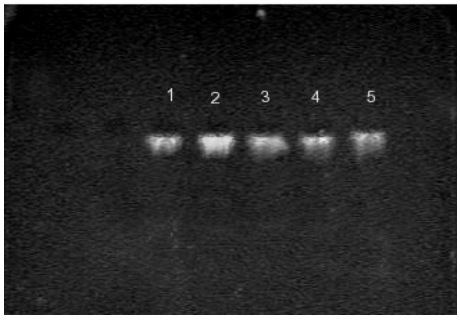
چون سکانس نوکلئوتیدی نروتوکسین سم بوتولینوم تیپ A غنی از AT (تقریباً ۷۰ درصد) می باشد، در مرحله طراحی، پرایمر برای جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی در دمای پائین ، طول پرایمرها بلند تر در نظر گرفته شد. و جایگاه برش برای آنزیمهای BamHI وXhoI نیز به دلیل مناسب بودن جایگاه آنها در MCS[1] وکتورهای مورد نظر انتخاب گردید[۱۷]. بعد از طراحی پرایمر صحت آن با نرم افزارBlast بررسی شده با سوش کلستریدیوم بوتولینوم تیپA موجود در بانک ژنی همخوانی داشت.

جهت انجام PCR ابتدا ژنوم به روشی که قبلاً ذکر شد استخراج گردید.

1 . Multiple cloning site

www.SID.ir

Archive of SID

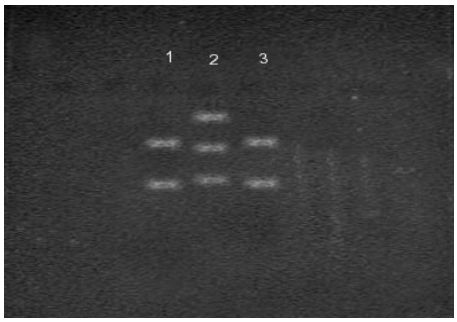


شکل ۱ردیفهای ۱- ۵ استخراج DNA کروموزومی کلستریدیوم بوتولینوم تیپA را نشان می دهد)

شکل ۲ ردیفهای ۱،۵،۴،۳ محصول PCR قطعه انتقال دهنده- ردیف ۲ مارکر مولکولی pUC/TaqI

سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ژن بخش انتقال دهنده از روی ژنوم باکتری به روشPCR فراوان سازی شد محصولPCR بر روی ژل آگارز به همراه مارکر الکتروفورز شد

قبل از انجام عمل همسانه سازی محصولPCR بروش هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیمTaqI بررسی شد و قطعاتbp۹۶۸ وbp۳۰۲ بهدست آمد شکل (۳).

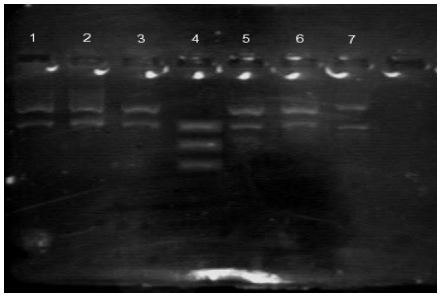


شکل ۳

شکل ۳ ردیف ۱،۳ برش محصول PCR ژن بخش انتقال دهنده به وسیله آنزیم TaqIردیف ۲ مارکر وزن مولکولیpUC/TaqI

محصولPCR به وسیله ژل آگارزL.M.P الکتروفورز و بند مورد نظر توسط کیت تخلیص شد و مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. واکنش هضم آنزیمی به مدت ۱۰ساعت در دمایC ۳۷° انجام گرفت که علت طولانی بودن زمان هضم آن وجود آنزیم XhoI می باشد که یک آنزیم rare cutter می باشد. وکتورpRSETA به وسیله دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفت[۱۲] شکل (۴).

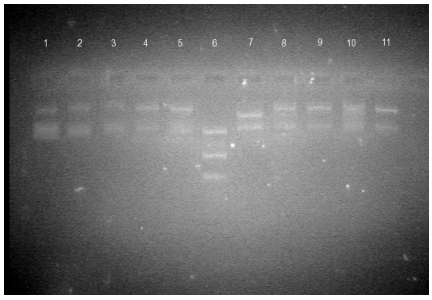
عمل الحاق ژنی در دمای C ۱۲° و به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. سپس درون سلول میزبان مناسب تراریخت شد. نتیجه بررسی کلونها با روش هضم آنزیمی شکل (۴) نشان داده شده



است .

شکل ٤ آنالیز به وسیله هضم آنزیمی: ساب کلون ژن بخش انتقال دهنده بر روی وکتور pRSETA که با دو آنزیم XhoI و BamHI مورد هضم قرارگرفت.

- ۱،۲،۳،۵،٦،۷) وکتور pRSETA حاوی ژن موردنظر که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرارگرفته است.



۳) مارکر مولکولی PC / Taq

شکل ۵ آنالیز به وسیله هضم آنزیمی: ساب کلون ژن بخش انتقال دهنده بر روی وکتور pET32a که با دو آنزیم XhoI و BamHI مورد هضم قرارگرفت. ـ۱،۲،۳،۵،٦،۷) وکتور pET32a حاوی ژن موردنظر که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرارگرفته است. ۳) مارکر مولکولی pUC/ Taq

www.SID.ir

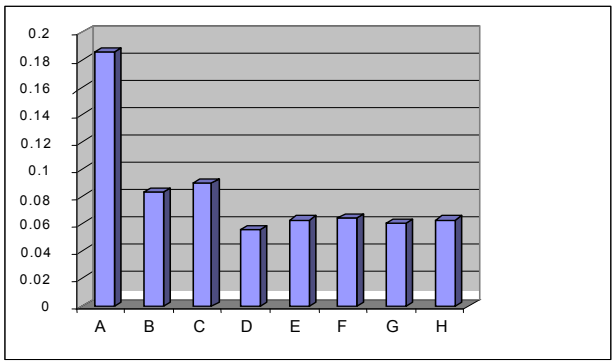
Archive of SID

پروتئین حاصل از بیان ژن بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپA هیدورفوب بوده به همین دلیل باید وکتوری را استفاده کرد که این پروتئین را به‌خوبی بیان کند، مطالعات و تجربیات بر روی وکتورهای مختلف مشخص کرد که سیستم pET شرایط لازم برای بیان این پروتئین را دارا می باشند[۱۷،٦،٤]. لذا برای بیان پروتئین ژن مورد نظر از روی بر روی دو وکتورpRSETA بر روی دو وکتور pET28a وpET32a ساب کلون شد. مشخصه بارز این وکتور پروموتر T7 می باشد که به وسیله LacI کنترل می‌شود. نکته دیگر یک سکانس ۳۰۰ نوکلئوتیدی در ابتدای pET32a، MCS موجود می باشد که سبب می شود یک پروتئین ۲۰kD در ابتدای ژن کلون شده اضافه شود. پس از ساب کلون کردن بر روی وکتورهای pET28a و pET32a (شکل۵ وشکل۶) عمل ترادف یابی بر روی وکتورpET28a انجام گرفت پس از آنالیز و مقایسه با ترادف ژن در بانک ژنی مشخص شد موتان ایجاد نشده است پس اقدام به بیان ژن مورد نظر کردیم . (قابل ذکر است که سکانس مورد نظر با پرایمرT7 فرا دست و فرو دست موجود بر روی وکتورpET28a خوانده شده است.)

[ژن مورد نظر که به وسیله شرکت MWG-Biotech تعیین ترادف شده، در انتها آمده است].

۳-۱- بیان ژن بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپ A

پس از اطمینان از الحاق ژن مورد نظربا جهت گیری صحیح بر روی وکتور بیانی، عمل بیان انجام گرفت که بیشترین بیان در شرایط یک میلی مولار IPTG و القاء ۱۰ ساعت در دمای C °۳۰ به‌دست آمد[۱۸،۱٦،٦]. بیان حاصل از pET28a,pRSETA نتایج بسیار ضعیفی داشت که با ژل SDS-PAGE قابل آشکار سازی نبود فقط از طریق الیزا قابل مشاهده بود. (نمودار۱)



نمودار۱

A) تست + آنتی هیستیدین + کونژوگه

B) کنترل + آنتی هیستیدین + کونژوگه

C) تست + کانژوگه

D) آنتی هیستیدین + کونژوگه

E) کونژوگه

F) آنتی هیستیدین

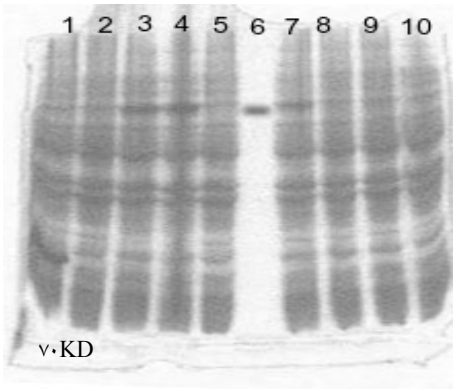
G) کنترل + کونژوگه

H) تست + کونژوگه

ولی بیان حاصل از pET32a به نسبت قوی بوده که با رنگ ـ آمیزی کوماسی بلو قابل رویت بود (شکل۶). قابل ذکر است که ژن بخش انتقال دهنده کلستریدیوم بوتولینوم تیپA یک پروتئین ۵۰ kD را ایجاد می کند، همانطور که گفته شد وکتور pET32a به ابتدای ژن کلون شده پروتئین ۲۰ kD اضافه می کند به همین دلیل پروتئینی که در شکل (۶) به نمایش درآمده است ۷۰ کیلودالتون می باشد . پروتئین تولید شده با وسترن بلاتینگ و الیزا مورد آنالیز قرار گرفت و تائید شد (شکل ۷ و نمودار ۲و۳)لازم به ذکر است از آنجائیکه آنتی هیستیدین تهیه شده از شرکت کیاژن فقط برای اسیدآمینه هیستیدین میل ترکیب نشان می دهد به همین دلیل در ردیف های واکنش علاوه بر باند مورد نظر زمینه های ضعیفی نیز مشاهده می شود(شکل۷). عمل الیزا با آنتی بادی پلی کلونال آنتی بوتولینوم و آنتی هیستیدین انجام گرفت که وجود پروتئین بیان شده را تأیید می کند (نمودار۲و۳).

www.SID.ir

Archive of SID



۲۰KD

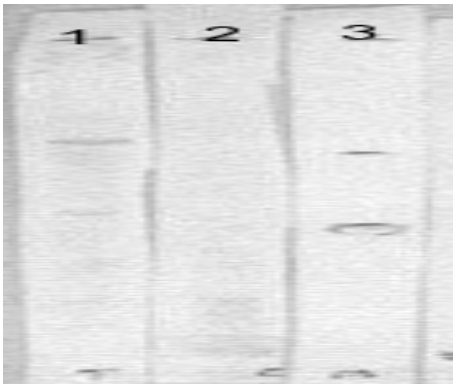
[شکل ۶ بررسی بیان کلونهای دیگر ژن بخش انتقال دهنده که بر روی وکتور pET32a کلون شده است]

۱-) بیان وکتورpET32a که به تنهایی القاءشده است.

۲-) کنترل : بدون القاء با IPTG

۳،٤،٥،٧،٨،٩،١٠)تست:القاء با IPTG

٦) نشانگر پروتئین: BSA :KD ۶۸ همانطور که مشاهده می شود کلونهای شماره ۳،۴و۷ دارای بیان می باشند.]



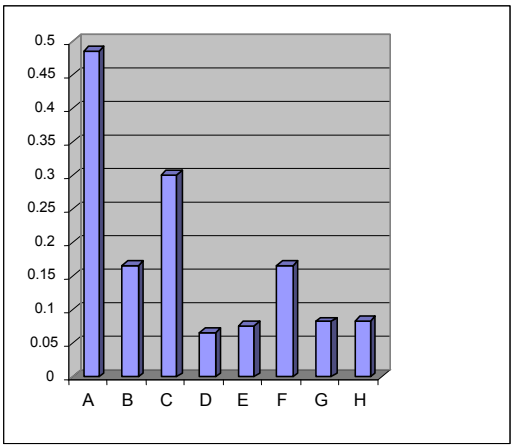
٦٦KD
٤٥KD

۷۰KD

[شکل ۷ عمل وسترن بلاتینگ بر روی پروتیئنهای حاصل از بیان ژن بخش انتقال دهنده بر روی وکتور pET32a کلون شده است].

۱-) کلون شماره چهارم القا شده با IPTG ۲-) کنترل بدون القا با IPTG ۳-) نشانگر اندازه پروتئیKD ۲۹ KD، ٤٥ KD، ٤٤

همانطور که مشاهده می‌شود در ناحیه ۷۰KD باند موردنظر ظاهر شده است.

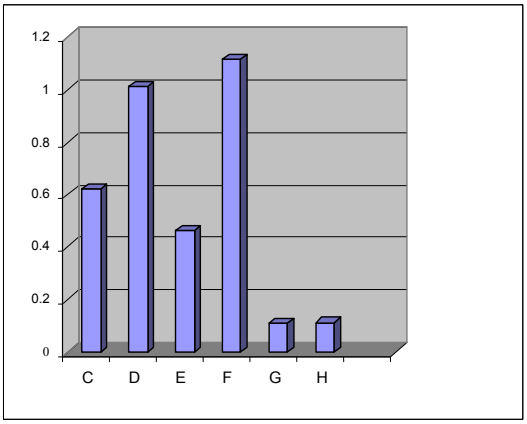


[نمودار ۲ الیزا انجام شده بر روی پروتئینهای حاصل از بیان بخش انتقال دهنده سم کلستریدیوم بوتولینوم تیپA که بر روی وکتورpET32a کلون شده است.]

A) تست (وکتورpET32 به تنهایی) + آنتی هیستیدین + کونژوگه B) کنترل + آنتی هیستیدین + کونژوگه

C) تست + آنتی هیستیدین+ کانژوگه D) تست + کونژوگه E) آنتی هیستیدین + کونژوگه

F) کونژوگه G) آنتی هیستیدین H) کنترل + کونژوگه



www.SID.ir

Archive of SID

[نمودار۳ دومین الیزا انجام شده بر روی پروتئینهای حاصل از بیان بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپ A که بر روی وکتور pET32a کلون شده است]

C) کنترل (کلون ۴)+ آنتی بوتولینوم + کونژوگه

D) تست (کلون ۴) + آنتی بوتولینوم + کونژوگه

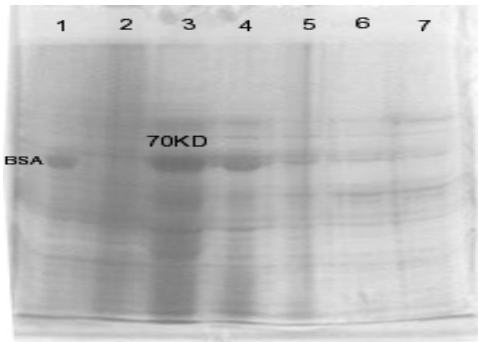
E) کنترل (کلون ۲) + آنتی بوتولینوم + کانژوگه

F) تست (کلون ۲) + آنتی بوتولینوم + کونژوگه

G) تست + کونژوگه H) آنتی بوتولینوم + کونژوگه

۳-۲- تخلیص پروتئین بیان شده

پس از تائید پروتئین بیان شده با روشهای وسترن بلاتینگ و الیزا، تخلیص آن از طریق روش کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام گرفت که نتایج به دست آمده در شکل ۸ و۹ به نمایش در آمده است.



[شکل ۸ مرحله تخلیص ژن بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپ A توسط ستون Ni-NTA agarose resin

۱-) نشانگر اندازه پروتئین BSA :68KD

۲-) ایمیدازول ۱۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

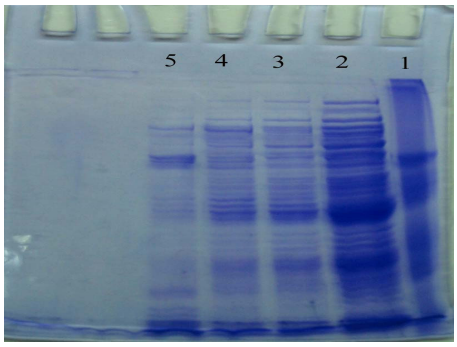
۳-) ایمیدازول ۲۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

۴-) ایمیدازول ۶۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

۵-) ایمیدازول ۱۲۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

۶-) ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

۷-) ایمیدازول ۵۰۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.]



[شکل ۹ مرحله دوم تخلیص ژن بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپA توسط ستونNi-NTA agarose resin]

۱) نشانگر اندازه پروتئین BSA :68 KD

۲) ایمیدازول ۱۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

۳) ایمیدازول ۲۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

۴) ایمیدازول ۶۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

۵) ایمیدازول ۱۲۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

همانطور که در تصویر شماره ۹ پیداست پروتئین مورد نظر در غلظتهای ۶۰ تا ۱۲۰ میلی مولار ایمیدازول از ستون خارج شده است که مورد انتظار می باشد، قابل ذکر است که در مراحل اولیه تخلیص این پروتئین در غلظتهای ۲۰ و ۶۰ میلی مولار ایمیدازول از ستون خارج می شد (شکل۸) ودر نتیجه عمل خالص سازی به طور مطلوب صورت نمی گرفت. آنچه مسلم است دلیل این امر را می توان به اتصال ضعیف نشان هیستیدین در انتهای آمینی این پروتئین به رزین بیان کرد. چنین مشکلی قبلا نیز به وسیله خانم کدخدائیان و آقای لیسی[1]گزارش شده است [۶،۴]. این محققین دلیل امر را احتمال مخفی شدن نشان هیستیدین در داخل پروتئین ذکر کرده و برای حل مشکل، ژن مربوطه را مجدداً در وکتوری کلون کرده اند که در یک سر نشان His-Tag و در سر دیگر نشان S-Tag داشته است، همچنین لی لی و بال رام سینگ در تخلیص زنجیره سبک BoNT/A با همین مشکل مواجه بودند [۱۶] بدین معنی که مقداری از پروتئن با غلظت ۲۰ میلی مولار ایمیدازول از ستون خارج می شد و از طرفی در غلظت ۱۰۰ میلی مولار ایمیدازول علاوه بر زنجیره سبک پروتئینهای دیگری نیز در ژل SDS-PAGE ظاهر می شد این محققین در ادامه تخلیص، خروجی ۱۰۰ میلی مولار ایمیدازول را مجدداً از ستون تعویض یونی DEAE-A50 عبور داده و از این طریق توانسته اند ناخالصیها را حذف کنند . ما در این تحقیق سعی کردیم با بهینه کردن شرایط تخلیص که بیشتر به صورت Batch و آزمون در دما و زمانهای مختلف انکوباسیون می بود از طریق ستون میل ترکیبی نیکل پروتئن با یک نشان هیستیدین و در یک مرحله به‌طور قابل قبولی جداسازی کنیم (۹) پس از جدا سازی ، محلول حاوی پروتئین خالص شده را برعلیه بافر ۱۰ میلی مولار فسفات دیالیز کرده تا ایمیدازول را از محلول پروتئین خارج سازیم .

همان طوری‌که در ابتدای مقاله اشاره شده است بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم قسمتی از یک پروتئین محلول می باشد که بعد از ورود به اندوزومها فعال می شود ، اعتقاد بر این است که pH پایین فضای اندوزوم باعث تغییر در کانفورماسیون بخش انتقال دهنده می باشد و این امر باعث قرار گرفتن آن در غشا اندوروم و نهایتاً حمل بخش کاتالتیکی به وزن ۵۰ کیلو دالتون به داخل سیتوزول می شود . تا کنون تلاشهای زیادی برای درک مکانیزم عمل انتقال در سموم مختلف از جمله سم دیفتری ، ریسین و شیگا بکار رفته است ولی هیچ کدام از سموم ذکر شده ملکولی به بزرگی ۵۰ کیلو دالتون را به داخل سیتوزول حمل نمی کنند؛ لذا توان تولید بخش انتقال دهنده به صورت انبوه این فرصت را به محققین می دهد که پروسه عبور در سم بوتولینوم را بیشتر مورد مطالعه قرار دهند ، درک مکانیزم عبور با این بخش از سم می تواند محققین را در ارسال پروتئینهایی به وزن ۵۰ kD به سیتوزول را با این مکانیزم یاری کند.

ترادف ژن بخش انتقال دهنده سم کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A که بر روی وکتورpET28a کلون شده است این ژن به وسیله شرکت MWG-Biotech با پرایمر استاندارد T7 تعیین ترادف شده است.

<I23_002_t7.fasta

AGCGGATACATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTT
AACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCC
ATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCG
CGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACA
GCAAATGGGTCGCGGATCCGCATTAAATGATTTAT
GTATCAAAGTTAATAATTGGGACTTGTTTTTTAGT
CCTTCAGAAGATAATTTTACTAATGATCTAAATAA
AGGAGAAGAAATTACATCTGATACTAATATAGAAG
CAGCAGAAGAAAATATTAGTTTAGATTTAATACAA
CAATATTATTTAACCTTTAATTTTGATAATGAACC
TGAAAATATTTCAATAGAAAATCTTTCAAGTGACA
TTATAGGCCAATTAGAACTTATGCCTAATATAGAA
AGATTTCCTAATGGAAAAAAGTATGAGTTAGATAA
ATATACTATGTTCCATTATCTTCGTGCTCAAGAAT
TTGAACATGGTAAATCTAGGATTGCTTTAACAAAT
TCTGTTAACGAAGCATTATTAAATCCTAGTCGTGT
TTATACATTTTTTTCTTCAGACTATGTAAAGAAAG
TTAATAAAGCTACGGAGGCAGCTATGTTTTTAGGC
TGGGTAGAACAATTAGTATATGATTTTACCGATGA
AACTAGCGAAGTAAGTACTACGGATAAAATTGCGG

1 . kadkhodayan, k- lacy,D.B

www.SID.ir

Archive of SID

ترادف ژن بخش انتقال دهنده سم کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A که بر روی وکتورpET28a کلون شده است این ژن به وسیله شرکت MWG-Biotech با پرایمر استاندارد T7 معکوس تعیین ترادف شده است.

<I23_003_t7t.fasta

GCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAG
CTACTTAATATATTCAGTAAATGTAGATAATAATC
TTTGATTATCTACGTATTTGGAAAGCTGAAAAGGT
ATATCTGTACTAAGTGTATTATTAACTTTATCTTT
TAACTTATCTACTTGACCAATTAAAGTTCCTCTAT
TATCATATATATACTTTAATAATGCATCTTTAAGA
CTAGCATCAAAATCTTCTAACCGTTTAACACCATA
AGGGATCATAGAATTCATTAAATATGAAACAGAGC
ATTGATTCAAAAATTTATTTATATTAATCATAGCT
TTATTTATAGACTCATTAAGTTTCGAACTTAAATC
ATCAATATTAAAATTAATATTATTTTTCTCTTCCT
CAGTATATTGATTATACTGATAGTTTATTATAGCC
TTTGTTGCTTCTGCTTGATTTTCTAAAGCTTCTTT
CATTTTTTTTCTTATTAGATCAATCTGTGTATTAA
CCTTTGCTAACCAATTTGTTACTATATATTTATAG
ACCTCATCCCATTTTTCATTTCTTTTACTTAAAGC
ATTATCTATTGTTTGAACGGTTAGAACCTTATTCG
CAATATATGATACAAGTGCAAAAGTACCTAATACA
GGTATTGCAATCTCTGGTATAAATTCTAACAGAAT
AACAGCTCCTGAAAATATTAAAGCACCTACAAAA

٤- منابع

[1] Oguma K, Fujinaga Y, Inoue K. Structure and function of clostridium botulinum toxin. Microbiol Immunol 1995; 39 (3): 161-168.

[۲] مهدی فروزنده ، مهدی شمس آرا، میر لطیف موسوی، آشکار سازی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A با استفاده از روش PCR-ELISA . مجله علوم پزشکی مدرس پائیز و زمستان ۱۳۸۰ ; دوره ۴، شماره ۲ : ۱۵۷- ۱۶۵

[3] Bavari S, Pless DD, Torres ER, Lebeda FJ,and Olson A. Identifying the principal protective antigenic determinants of type A botulinum neurotoxin.Vaccine 1998; 16(19): 1850-1856

[4]Lacy DB, Stevens RC. Rcombinant expression and purification of the botulinum nerotoxin type A transloation domain. Protein Exp Purif 1997;11: 195-200.

[5] Clayton MA, Clyton JM, Brown DR, Middlebrook JL. Protective, vaccination with a recombinant fragment of clostridium botulinum neurotoxin serotype A experessed from a synthetic gene in escherichia coli. Infection & Immunity. 1995;63(7): 2738-2742.

[6] 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 Exp Purif 2000;(19): 125-130.

[7] Vertiev IV, 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 dminist - ration of the toxin. Mol Gen Mikrobiol Virusol 2000; 4: 3-7.

[8] Thompson DE, Brehm JK, Oultram JD, Swinfield TJ, Shone CC, Atkinson T, Melling J, Minton NP. 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: 73-81.

[9] Lebeda FJ, Olson MA. Structure predic-tions of the channel forming region of botulinum neurotoxin heavy chain. Toxicon 1995;33(4): 67-559.

[10] Poulain B, Mochida S, Weler U, Hogy B, Habermann E, Wadsworth GDF, Shone CC,Dolly JO,Tauc L. Heterologus

www.SID.ir

Archive of SID

combinantion of heavy and light chain from botulinum neurotoxin A and tetanus toxin inhibit neurotransmitter release in aplysia. J Biological Chemistry 1991; 266(15): 9580-9585.

[11]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(2-3): 97-288.

[12]Russel D, Sambrook J Molecular cloning A laboratory Manual. 3rd ed. NewYork (NY):Cold Spring Harbor Publishers 2001; (1):101-1040, (3):1501- 15-50.

[13] Binz T, Kurazono H, Wille M, Frevert J, Wernars K, Niemann H. The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparision with other clostridial neurotoxin. J Biol Chem 1990; 265 (16): 9153-9158.

[14]Daniel M, Stuart G, Protein Methods. 3rd ed. NewYork (NY):Wily-Liss Publishers 1992; (1): 30-60, 96- 127.

[15] Ahmed SA, Smith LA. Light chain of botulinum type A neurotoxin expressed as an inclusion body from asynthetic gene is catalytically and functionally active. J Protein Chem 2000; 19 (6): 87- 475.

[16]Singh L, Singh B. Higt– level Expression purification characterization of recombinant type A botulinum neurotoxin light chain. Protein Exp Purif 1999; 17: 339-344.

[17]Minton NP, Oultram JD. Host: vector system for gene cloning in clostridium. Microbiol Sci. 1998 ; 5(10): 5-310.

[18] Dineen SS, Bradshaw M, Gohanson EA, Expression of a gene encoding a bactrocin active against clostridium botulinum. Annual Report. 1999; 13-21.

[19]Tavalai M. Cloning, expression and purification of the gene coding binding domain of clostridium boulinum toxin type A [PhD dissertation]: Pasture Institute;2001.34- 55

[20]Shahhosseiny MH. Cloning and expression of cholera toxin B sub unit, gene of vibrio cholerae in Escherichiaecolia and immuno logical evaluation for oral vaccine A [PhD dissertation]: Pasture Institute. 1997;50-100.

www.SID.ir