Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره پنجم، مرداد ۹۵
صفحه ۲۹ الی ۳۷

مقاله پژوهشی
(Original Article)

زیرهمسانه‌سازی و بررسی بیان ژن صناعی ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B (BD/B)

مجید برادران[۱]، فیروز ابراهیمی[۱*]، شهرام نظریان[۱]، عباس حاجی‌زاده[۱]، یوسف تاروردی‌زاده[۱]

[۱]مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سندرم بوتولیسم توسط نوروتوکسین باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* ایجاد می‌شود. این نوروتوکسین دارای ۷ سروتیپ از G-A می‌باشد. بهترین راه برای جلوگیری از سندرم بوتولیسم ایجادشده توسط BoNT/B، استفاده از واکسن‌های نوترکیب ساخته‌شده از ناحیه اتصالی آن (به‌علت داشتن اپی‌توپ‌های کافی برای تحریک سیستم ایمنی) است. در این پژوهش بیان زیرواحد اتصالی نوروتوکسین *بوتولینوم تیپ* B، به‌منظور کاندید واکسن مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: ابتدا توالی ژن ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B از سایت NCBI با کد دسترسی EF028399.1 گرفته شد. بعد از بهینه‌سازی کدون، ژن مورد نظر به‌صورت صناعی در داخل وکتور pUC18 تهیه گردید. سپس این ژن در وکتور بیانی pET32a(+) که دارای مارکر انتخابی آمپی‌سیلین می‌باشد، زیرهمسانه‌سازی شد. جهت تأیید صحت زیرهمسانه‌سازی؛ از PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی و برای بررسی بیان از سوش *E. coli* BL21(DE3) استفاده گردید. صحت بیان پروتئین با الکتروفورز (تحت شرایط مختلف و روش وسترن بلات) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: واکنش‌های PCR، برش آنزیمی را براساس سایت‌های برشی در وکتور و در نهایت، تعیین توالی تأیید کرد که ژن مورد نظر به‌طور مناسب در وکتور pET32a(+)، همسانه‌سازی شد. بررسی بیان با استفاده از SDS- PAGE و متعاقب آن انجام وسترن بلاتینگ نشان داد پروتئین مورد نظر در سویه بیانی مذکور بیان نمی‌شود.

نتیجه‌گیری: اگرچه ژن مورد نظر در داخل وکتور pET32a(+)، به‌طور مناسب زیرهمسانه‌سازی گردید، با این حال هیچ بیان قابل‌مشاهده‌ای از ژن مورد نظر دیده نشد.

کلید واژه‌ها: *کلستریدیوم بوتولینوم*؛ بررسی بیان؛ واکسن نوترکیب.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
فیروز ابراهیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
febrhimi@ihu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۵

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۲۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Baradaran M, Ebrahimi F, Nazarian Sh, Hajizade A, Tarverdizadeh Y. Subcloning and assessment of the expression of synthetic botulinum neurotoxin type B binding domain (BD/B). Qom Univ Med Sci J 2016;10(5):29-37. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کلستریدیوم بوتولینوم، باکتری گرم مثبت بی‌هوازی و میله‌ای شکل است که در خاک یافت شده و نوروتوکسین ترشح می‌کند (۱). تاکنون ۷ سروتیپ از این نوروتوکسین (سم عصبی) شناخته شده که عبارتند از: A, B, C1, D, F, G و فقط تیپ‌های A, B, E و گاهی F در انسان ایجاد بیماری می‌کنند (۲). هریک از نوروتوکسین‌های بوتولینوم پس از بیان ژن به‌صورت یک پروتئین تک‌زنجیره‌ای با وزن ۱۵۰ کیلودالتون درمی‌آیند که به‌وسیله پروتئازها به دو زنجیره سنگین (HC) (۱۰۰ کیلودالتون) و زنجیره سبک (LC) (۵۰ کیلودالتون) تبدیل می‌شوند. این دو زنجیره با یک پیوند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل هستند. زنجیره سنگین، مسئول اتصال به نورون‌های کولینرژیک محیطی و زنجیره سبک یک اندوپپتیداز وابسته به روی بوده که پروتئین‌های مسئول رهاسازی نوروترانسمیتر را به‌طور اختصاصی در محل‌های خاص می‌شکافد (۵-۳). هرچند موارد مسمومیت از طریق زخم (بوتولیسم جراحت) و عفونت در نوزادان (بوتولیسم اطفال) نیز گزارش شده، ولی بسیار کمیاب هستند. بوتولیسم اطفال تنها ۲۰ سال است که مطرح شده و در افرادی‌که دچار مسمومیت با این نوروتوکسین می‌شوند عوارض مختلفی مانند ضعف عضلانی عمومی که ابتدا ماهیچه‌های چشمی و نای، سپس تمام ماهیچه‌های اسکلتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در موارد شدیدتر، فلج عضلانی همراه با تخریب عملکردهای غیرارادی نظیر تنفس رخ داده که منجر به مرگ می‌شود. اقدامات پیشگیرانه و درمانی علیه این بیماری از سال ۱۹۴۰ میلادی تاکنون مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است (۶).

مهار فعالیت سم بوتولیسم در هریک از سه مرحله کلیدی فرآیند ایجاد مسمومیت منجر به مصونیت در برابر بوتولیسم خواهد شد. در حال حاضر برای ایجاد مصونیت اختصاصی افراد در معرض خطر، از یک توکسوئید ۵ ظرفیتی بوتولیسم علیه سروتیپ‌های A-E استفاده می‌شود. تولید توکسین در چندین مرحله صورت می‌گیرد که شامل: کشت انبوه، جداسازی، تخلیص و سمّیت‌زدایی می‌باشد. ساخت توکسوئید برای هریک از سروتیپ‌های بوتولیسم از اواخر دهه ۱۹۶۰ و اوایل دهه ۱۹۷۰ میلادی آغاز شده است.

اولین بار در سال ۱۹۷۱، واکسن‌های تک‌ظرفیتی به‌صورت انبوه تولید و در سال ۱۹۷۸ بسته‌بندی و عرضه شدند. درحالی‌که بوتولیسم با منشأ غذایی، یک مسمومیت به شمار می‌آید، انواع دیگر این بیماری که به بوتولیسم نوزادان و روده بزرگسالان معروف است نیز یک عفونت محسوب می‌شود. برخلاف نوع قبلی، عفونت ایجادشده درون بدن، منشأ تولید سم است. از آنجاکه بوتولیسم نوزادان در سن زیر یک‌سال ایجاد می‌شود، عقیده بر این است که به‌علت عدم توسعه‌یافتگی کافی فلور طبیعی دستگاه گوارش، رقابت کافی و لازم با *کلستریدیوم بوتولینوم* وجود ندارد، لذا امکان کلونیزاسیون باکتری به شکل رویشی در روده بزرگ و در نتیجه تولید سم و ایجاد بیماری فراهم می‌شود. برای ایجاد این بیماری حدود ۱۰۰-۱۰ اسپور مولد باکتری کافی است. برای پیشگیری از این بیماری از طریق واکسیناسیون، بهترین استراتژی، استفاده از واکسن نوترکیب برپایه ناحیه اتصالی نوروتوکسین به‌علت داشتن اپی‌توپ‌های مناسب برای تحریک سیستم ایمنی می‌باشد (۷). در این تحقیق تلاش گردید با استفاده از وکتور pET 32a(+)، ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B بیان شود.

روش بررسی

ژن مصنوعی ناحیه اتصالی نوروتوکسین *کلستریدیوم بوتولینوم تیپ* B و ستون Ni-NTA agarose resin جهت تخلیص پروتئین نوترکیب (شرکت شاین جین، کشور چین)، آنزیم Taq DNA Polymerase (شرکت سیناژن، جمهوری اسلامی ایران)، آنزیم Pfu DNA Polymerase (شرکت متابیون، آلمان) و آنزیم‌های برش‌دهنده (شرکت Thermoscientific، آمریکا) تهیه گردید. از باکتری *E. coli* BL21(DE3) محصول نواژن (آلمان)، به‌عنوان سلول میزبان بیانی استفاده شد. مواد تشکیل‌دهنده SDS-PAGE و وسترن بلات نیز از شرکت Merck (آلمان) و کیاژن (آمریکا) تهیه گردید. همچنین برای القا از IPTG تهیه‌شده از شرکت سیگما استفاده شد. وکتور بیانی pET32a(+) به‌عنوان ناقل ژن از پژوهشگاه ملی ژنتیک تهیه گردید. از محیط‌های LB Broth (Luria-Bertani) و LB Agar (تهیه‌شده از شرکت فلوکا اسپانیا و Merck آلمان) با غلظت‌های ۸۰-۴۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر و

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (تهیه‌شده از شرکت سیگما آمریکا) استفاده گردید. مواد شیمیایی از قبیل EDTA، Tris Hcl، Tris base، Sucrose، کلروفرم، فنل، اسید بوریک، استات سدیم، استات پتاسیم، استیک اسید، اتیدیوم بروماید، NaCl، HCl، SDS، ایزوپروپانول و ایزو آمیل الکل از شرکت Merck (آلمان) و گلوتاتیون احیا از شرکت سیگما (آلمان) تهیه شد.

به‌منظور تأیید زیرهمسانه‌سازی ژن BD/B، با توجه به‌توالی صناعی تهیه‌شده برای آن (که درون پلاسمید pET28a(+) سنتز شده بود)، یک جفت پرایمر طراحی شد. با توجه به توالی ژن BD/B، همچنین الگوی برش آنزیمی آن، ترادف نوکلئوتیدی پرایمرهای پیشرو و پیرو با رعایت اصول استاندارد در طراحی پرایمر تعیین گردید.

ترادف‌های انتخابی با استفاده از نرم‌افزار OLIGO از لحاظ دمای اتصال (Tm)، درصد G+C، تولید لوپ یا حلقه در درون هریک از پرایمرها ارزیابی شد. درنهایت، پرایمرهای طراحی‌شده توسط نرم‌افزار BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI مورد تأیید قرار گرفت تا از عدم مشابهت آن با سایر ژن‌های در دسترس، اطمینان حاصل گردد (شکل‌ها شماره ۱ و ۲).

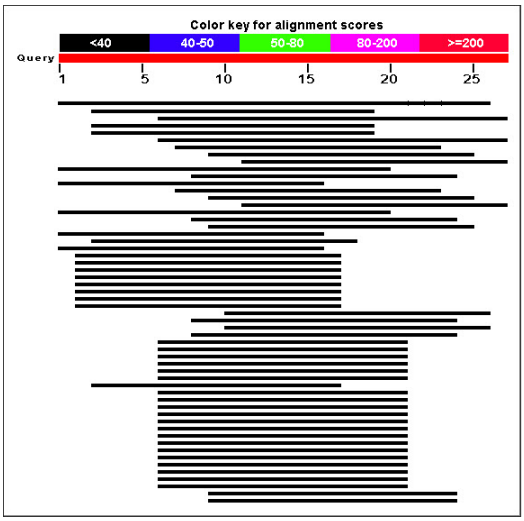
این پرایمرها، به‌منظور سنتز به شرکت سیناژن سفارش داده شدند. توالی پرایمرها به شرح زیر بود:

پرایمر پیشرو:

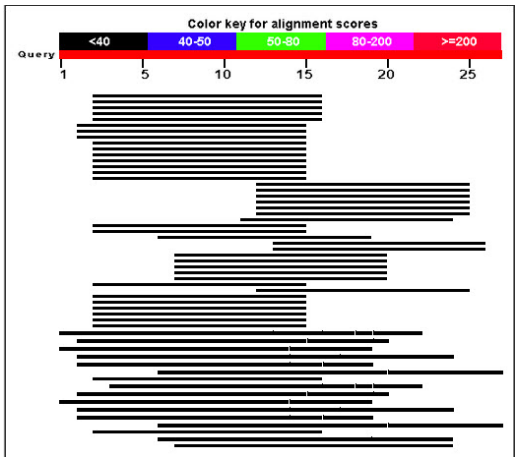
5’ AACCAAGCTTATATCATGCCGTTTGACCTTT’

پرایمر پیرو:

5’ TCAGCTCGAGTTATTCGGTCCAACCTTCAT’



شکل شماره ۱: Blast پرایمر پیشرو با توالی ژنی که نشان‌دهنده ۱۰۰٪ شباهت می‌باشد.



شکل شماره ۲: Blast پرایمر پیرو با توالی ژنی که نشان‌دهنده ۱۰۰٪ شباهت است.

www.SID.ir

Archive of SID

قطعه ژنی BD/B ابتدا با آنزیم Taq پلیمراز طی ۳۵ چرخه تکثیر گردید. این واکنش در غلظت ۴ میلی‌مولار MgCl2، ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP و ۵۰ نانوگرم از پلاسمید pET28a حاوی قطعه ژنی صناعی، در دمای اتصال ۶۱ درجه سانتیگراد بهینه‌سازی شد. چرخه‌های PCR شامل: یک مرحله واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل: مراحل واسرشتی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و در پایان، یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود.
محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید.

مراحل زیرهمسانه‌سازی قطعه ژنی BD/B در پلاسمید pET32a(+):

بعد از استخراج وکتورها از ژل آگارز، تحت اثر دو آنزیم NcoI و XhoI انتظار بر این است که پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های ذکرشده، دو انتهای وکتورهای خطی‌شده، به‌صورت چسبنده (Steaky end) درآیند (۸). مخلوط واکنش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۳ ساعت قرار داده شدند تا عمل هضم آنزیمی صورت گیرد. محصولات برش‌خورده بر روی ژل آگارز ۱٪ با دمای ذوب پایین الکتروفورز گردید. سپس آن نواحی از ژل که حاوی قطعات مورد نظر بود با استفاده از تیغ جراحی استریل بریده شد و با استفاده از کیت تخلیص DNA (کیت Bioneer کره جنوبی) تخلیص گردید. پس از انجام فرآیند تخلیص، مقدار ۳ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و از این طریق کیفیت قطعه تخلیص‌شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش الحاق در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (محصول شرکت فرمنتاز) انجام گرفت، سپس پلاسمید نوترکیب با روش شوک حرارتی به میزبان *E. coli* سویه BL21(DE3) انتقال داده شد. سویه میزبان نوترکیب به مدت یک‌شب بر روی LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر) کشت داده شد و ۵ کلنی رشد یافت. به‌منظور تأیید صحت زیرهمسانه‌سازی، کلنی‌های رشدیافته در محیط کشت LB مایع، کشت داده شدند و بعد از تخلیص پلاسمیدهای نوترکیب، واکنش‌های PCR، واکنش تک‌برش آنزیمی با XhoI و مقایسه باند خطی پلاسمید نوترکیب و پلاسمید فاقد ژن بر روی ژل آگارز، واکنش برش دوگانه آنزیمی با آنزیم‌های NcoI، XhoI و مشاهده تک باند ژنی جداشده از پلاسمید بر روی ژل آگارز و درنهایت، به‌منظور بررسی توالی ژن زیرهمسانه‌سازی‌شده و اطمینان از عدم بروز هرگونه خطا، جهش و یا نوآرایی ناخواسته، پلاسمید نوترکیب تخلیص‌شده توسط شرکت سیناژن با استفاده از پرایمرهای عمومی این پلاسمید، تعیین توالی شد.

برای بررسی بیان سازه ژنی pET32a(+)-BD/B، ابتدا سویه‌های نوترکیب واجد پلاسمید pET32a(+)-BD/B در محیط کشت LB مایع حاوی آمپی‌سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر) کشت گردید و اجازه داده شده تا جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ برسد. سپس ماده IPTG (ایزوپروپیل بتا- دی - تیوگالاکتوپیرانوزید) به‌عنوان القاکننده با غلظت یک‌میلی‌مولار به محیط کشت اضافه و اجازه داده شد تا سلول‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شوند. بعد از جداسازی سلول‌ها با سانتریفوژ (سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۱۰ دقیقه)، رسوب آن در ۱۰۰ میکرولیتر ایمیدازول ۱۰٪ حل شد و از طریق سونیکاسیون (۵ سیکل با قدرت ۷۵٪، زمان ۱۵ ثانیه و ۱۵ ثانیه در یخ) شکسته شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی جدا گردید. رسوب حاصل (بعد از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده حاوی اوره ۸ مولار به آن)، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد و بعد از سانتریفوژ مایع رویی آن جدا گردید. سپس جهت بهینه‌سازی و مشاهده بیان، سه پارامتر اصلی شامل: غلظت IPTG (غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میلی‌مولار)، زمان (زمانهای مختلف بعد از القا: ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت) و دمای بیان (۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد) مورد بررسی قرار گرفت؛ بدین ترتیب‌که باکتری نوترکیب در ۹ لوله مجزا حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB و آمپی‌سیلین (به غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده شد تا جذب نوری آنها به ۰/۵ برسد.

www.SID.ir

Archive of SID

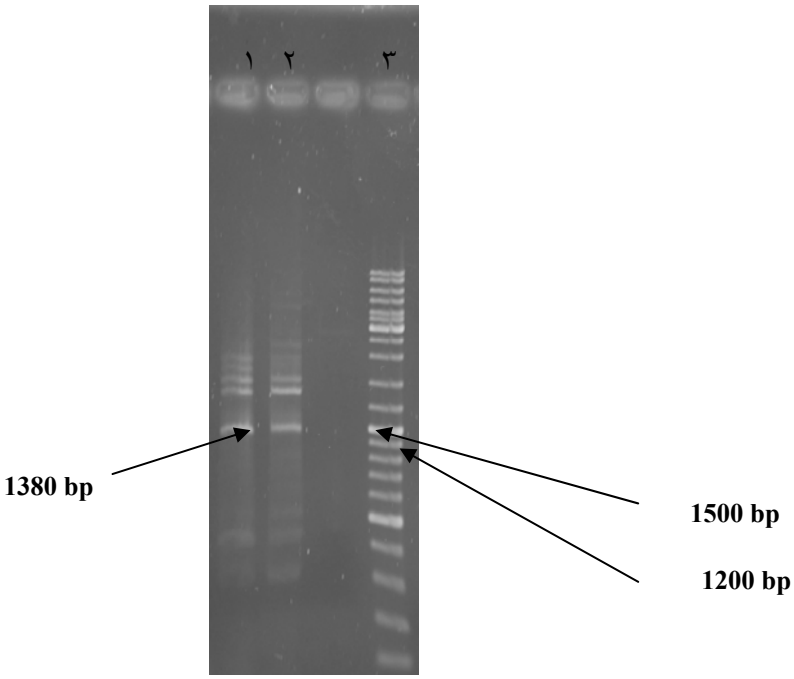
برای هر دما، سه لوله (شامل: یک لوله برای غلظت IPTG ۱ میلی‌مولار، یک لوله برای غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و یک لوله برای کنترل منفی در هر دما)، در نظر گرفته شد.

پس از رسیدن جذب نوری به ۰/۵، القا با IPTG انجام گرفت و سپس لوله با سرعت گردش ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. در سر رسید هرکدام از زمانهای ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از هر لوله، در میکروتیوب‌های مجزا جداسازی گردید، البته از لوله‌های کنترل منفی تنها در پایان ۲۴ ساعت، نمونه‌گیری انجام گرفت. جداسازی سلول‌ها به‌وسیله سانتریفوژ (با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) انجام شد. بعد از جداسازی سلول‌ها به همه آنها بافر لیزکننده حاوی اوره ۸ مولار افزوده شد و سپس تحت سونیکاسیون (مشابه قبل) قرار گرفت و بعد از سانتریفوژ (در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۵ دقیقه)، مایع رویی جدا گردید.

در ادامه، ۲۰ میکرولیتر از آن با ۵ میکرولیتر از بافر نمونه مخلوط گردید و ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. نمونه‌های آماده‌شده همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن) بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE الکتروفورز شدند و به‌منظور تأیید وجود احتمالی پروتئین نوترکیب از واکنش ایمونوبلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B استفاده شد. درنهایت، به‌منظور اطمینان بیشتر و تخلیص بیان پروتئین، از رزین کروماتوگرافی نیکل استفاده گردید.

یافته‌ها

پس از تکثیر قطعه ژنی BD/B، با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪، الکتروفورز شد. در شکل شماره ۳، مطابق انتظار یک قطعه ۱۳۸۶ جفت بازی بر روی ژل مشاهده می‌شود.

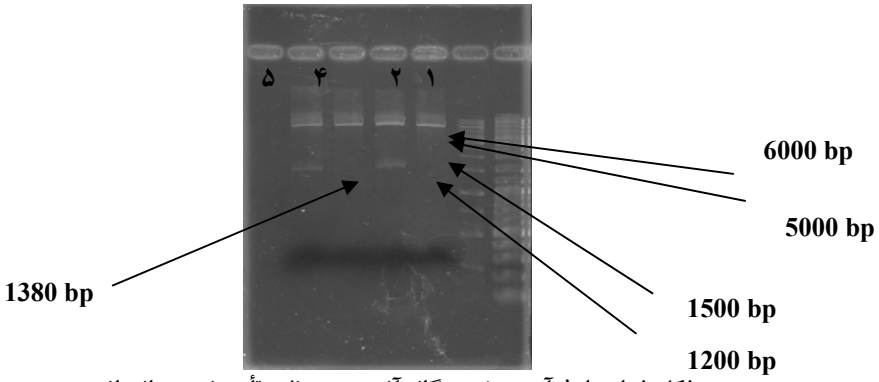


شکل شماره ۳: چاهک‌های ۱ و ۲، محصولات PCR و چاهک ۳، DNA Ladder می‌باشد.

نتایج واکنش تک‌برش آنزیمی با آنزیم XhoI، برش دوگانه آنزیمی با آنزیم‌های NcoI، XhoI و واکنش PCR بر روی پلاسمید نوترکیب pET32a(+)-BD/B، تأیید ابتدایی بر صحت فرآیند زیرهمسانه‌سازی بود (شکل شماره ۴). درنهایت، تعیین توالی ژن زیرهمسانه‌سازی‌شده نیز نشان داد این توالی فاقد کدون خاتمه نابجا، جهش و نوآرایی ناخواسته می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

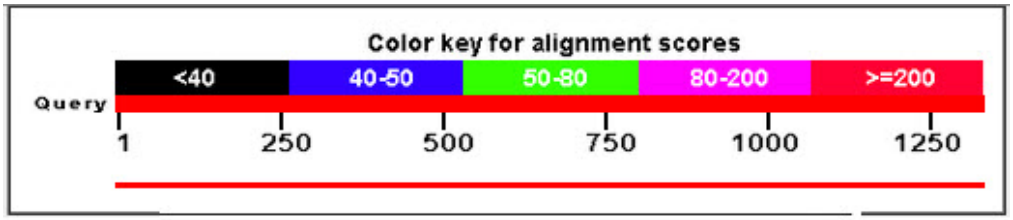


شکل شماره ٤: فرآیند هضم دوگانه آنزیمی به‌منظور تأیید زیرهمسانه‌سازی.

۱) نشانگر مولکولی؛ ۲) پلاسمید pET32a(+) نوترکیب استخراج‌شده؛ ۳) برش دوگانه آنزیمی با NcoI و XhoI که منجر به جداشدن قطعه ژنی با طول ۱۳۸٦ از پلاسمید خطی شده با طول حدود ۵۰۰۰ جفت باز شده است. ٤) پلاسمید pET32a(+) نوترکیب استخراج‌شده و ٥) برش دوگانه آنزیمی با NcoI و XhoI که منجر به جدا شدن قطعه ژنی با طول ۱۳۸٦ از پلاسمید خطی‌شده با طول حدود ۵۰۰۰ جفت باز شده است.

کلنی که نتایج PCR و هضم دوگانه آنزیمی آنها با آنزیم‌های محدودالاثر مثبت شده بود، انتخاب و پس از تخلیص پلاسمید، به شرکت سیناژن برای تعیین توالی ارسال شد. از آنجایی‌که طول قطعه زیرهمسانه‌سازی‌شده، ۱۳۸۶ جفت باز است و دستگاه تعیین توالی‌کننده نیز در هر بار خوانش از هر طرف، قادر به قرائت قطعه‌ای به طول حدوداً ۱۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشد، از این‌رو با خوانش دوطرفه و هم‌ردیف‌کردن نتایج، کل ژن تعیین توالی شد و بدین منظور از هر دو پرایمر استفاده گردید.

پس از تعیین توالی، نتایج Pairwise Allignment نشان داد ژن همسانه‌سازی‌شده با توالی ژن طراحی‌شده اولیه دارای مطابقت است. هم‌ردیف کردن توالی ژن زیرهمسانه‌سازی‌شده با توالی اولیه نشان داد اولاً فرآیند زیرهمسانه‌سازی به‌طور صحیح انجام شده و ثانیاً موتاسیون ناخواسته در طی این فرآیندها اتفاق نیفتاده و قالب بازخواندن آن نیز تغییر نکرده است. در شکل شماره ۵ نتیجه Pair Wise Allignment توالی مورد نظر با توالی اصلی ژن با کد دسترسی Query_69569 نشان داده شده است.



	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	2477	2477	100%	0.0	100%	Query_17703

Query 601 GAAGTTATCGCTAACGGTGAAATCATCTTCAAACTGGACGGTGACATCGACCGTACCCAG 660
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 601 GAAGTTATCGCTAACGGTGAAATCATCTTCAAACTGGACGGTGACATCGACCGTACCCAG 660

Query 661 TTCATCTGGATGAAATACTTCTCTATCTTCAATACGGAACTGTCTCAGTCTAACATCGAA 720
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 661 TTCATCTGGATGAAATACTTCTCTATCTTCAATACGGAACTGTCTCAGTCTAACATCGAA 720

Query 721 GAACGTTACAAAATCCAGTCTTACTCTGAATACCTGAAAGACTTCTGGGGTAACCCGCTG 780
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 721 GAACGTTACAAAATCCAGTCTTACTCTGAATACCTGAAAGACTTCTGGGGTAACCCGCTG 780

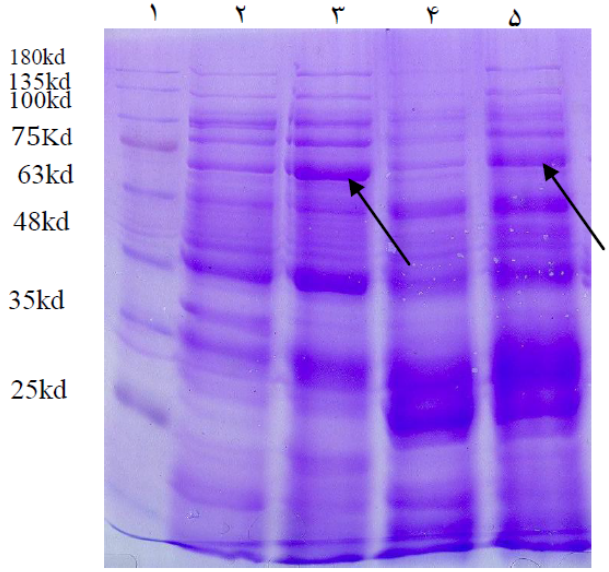
Query 781 ATGTACAACAAAGAATACTACATGTTCAACGCTGGTAACAAAAACTCTTACATCAAACTG 840
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 781 ATGTACAACAAAGAATACTACATGTTCAACGCTGGTAACAAAAACTCTTACATCAAACTG 840

شکل شماره ٥: تأیید صحت زیرهمسانه‌سازی با فرآیند Pair Wise Allignment توالی زیرهمسانه‌سازی‌شده و توالی ابتدایی طراحی‌شده.
برای انجام این فرآیند از سایت NCBI استفاده شده است (به‌علت بزرگی ژن، تنها قسمتی از آن در اینجا آمده است).

www.SID.ir

Archive of SID

در بیان ابتدایی و سپس بهینه‌سازی بیان نمونه‌ها پس از القا در سویه‌های به کارگرفته شده در مقایسه با نمونه کنترل، با اینکه باند مشکوک پروتئینی در محدوده حدود ۷۵ کیلودالتونی مشاهده گردید، ولی پس از وسترن بلاتینگ و درنهایت، استفاده از ستون رزین نیکل؛ پروتئین نوترکیب مورد نظر باز هم باوجود اتصال به پروتئین trx، بیان نشد (شکل شماره ۶).



شکل شماره ٦: بررسی اولیه بیان پروتئین فیوژشده با استفاده از IPTG غلظت یک میلی‌مولار، زمان القا ٤ و ٨ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد.
۱) پروتئین مارکر؛ ۲) محلول رویی محیط کشت کنترل منفی (بدون القا با IPTG) در زمان ٤ ساعت؛ (۳) محلول رویی محیط کشت تست بعد از ٤ ساعت که در محدوده ۷۵ کیلو دالتون یک باند مشاهده می‌شود و احتمال دارد باند بیان پروتئین باشد؛ ٤) محلول رویی محیط کشت کنترل منفی بعد از ۲٤ ساعت و ٥) محلول رویی محیط کشت تست که همان باند دیده می‌شود.

بحث

بیشتر مطالعات در زمینه تولید واکسن نوترکیب و آنتی‌بادی بر روی بخش اتصال‌دهنده نوروتوکسین متمرکز شده است تا بتوان با تولید آنتی‌بادی برعلیه این بخش، مانع از اتصال اولیه توکسین به گیرنده شده و بدین طریق از ورود سم به داخل سلول جلوگیری کرد. در تحقیقی‌که عبدالرضا عاقلی منصور و همکاران در رابطه با انتهای C از ناحیه اتصال‌دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E انجام دادند، موش‌های ایمن‌شده توانستند دوز LD50×۱۰۳ از توکسین بوتولینوم تیپ E را تحمل کنند (۹). در مطالعه‌ای دیگر، Kubota و همکاران آنتی‌بادی منوکلونالی تولید کردند که از اتصال BoNT/E به سلول هدف ممانعت می‌کرد. این آنتی‌بادی به ناحیه اتصالی نوروتوکسین متصل می‌شد (۱۰). Trollet و همکاران نیز در تحقیقی با استفاده از روش انتقال الکتریکی (Electrotransfer)، آنتی‌بادی خنثی‌کننده علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ‌های A, B, E تولید کردند (۱۱). همچنین در مطالعه‌ای‌که توسط Easwaran و همکاران انجام شد، ناحیه اتصالی نوروتوکسین تیپ‌های A, B, E به‌صورت استنشاقی تجویز گردید، موش‌های ایمن‌شده توانستند دوز LD50 ×۱۰۴ از نوروتوکسین‌های فوق‌الذکر را تحمل کنند (۱۲). در تحقیقی دیگر که در آن Michael و همکاران از ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ‌های A و E استفاده کردند، موش‌های ایمن‌شده توانستند دوز LD50×۱۰۵ را تحمل کنند (۱۳)؛ درصورتی‌که محصول این پژوهش به بیان پروتئین ختم می‌شد، پیشنهاد مؤکد در بررسی میزان ایمنی‌زایی پروتئین حاصل شده بود. باوجود تمامی این گزارشها، تلاش ابتدایی جهت همسانه‌سازی و بیان ژن ناحیه اتصالی تیپ B در وکتور pET28a(+)، منتج به نتیجه نشد، لذا در این تحقیق از pET32a(+) استفاده گردید. اما همان‌طورکه در نتایج اشاره شد باوجود کنترل و تأیید تمام مراحل همسانه‌سازی، نتیجه مشخصی در مرحله بیان مشاهده نشد و آنالیزهای لازم بیوانفورماتیکی، به‌منظور بررسی احتمالات عدم بیان انجام گرفت که از جمله بررسی ORF فیوژن پروتئین و BLAST توالی قبل و بعد از تعیین توالی نشان داد نه تنها جابه‌جایی فریم (Frame Shift) اتفاق نیفتاده؛ بلکه هیچ‌گونه جهش ناخواسته‌ای نیز رخ نداده است.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی ساختار دوم mRNA نیز نشان داد نقطه شروع ترجمه، درون ساختار محکمی‌که مانع اتصال کامل ریبوزوم شود، قرار ندارد. به‌علاوه، دارای dG بسیار مناسبی است. در مطالعه حاضر بررسی خصوصیات پروتئین نشان داد pI آن ۸/۶ بوده، نیمه عمری بیش از ۱۰ ساعت داشته و از لحاظ ساختاری در شرایط درون سلولی، قاعدتاً می‌بایست پایدار باشد، ولی با این همه پروتئین موردنظر بیان نشد. درنهایت، مهم‌ترین دلیل احتمالی عدم بیان می‌تواند تجزیه و شکسته شدن پروتئین بلافاصله بعد از بیان باشد (هرچند در آنالیز بیوانفروماتیکی، پایداربودن آن احراز گردید).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، علی‌رغم اینکه گزارشهایی در مورد بیان ژن ناحیه اتصالی *کلستریدیوم بوتولینوم تیپ* B وجود دارد، ولی تلاش‌های انجام‌شده در مورد بیان این ژن در pET32a(+)، نتیجه قابل‌توجهی را دربرنداشت.

References:

1. Capková K, Salzameda NT, Janda KD. Investigations into small molecule non-peptidic inhibitors of the botulinum neurotoxins. Toxicon 2009;54(5):575-82.

2. Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. Biochimie 2000;82(5):427-46.

3. Moe ST, Thompson AB, Smith GM, Fredenburg RA, Stein RL, Jacobson AR. Botulinum neurotoxin serotype A inhibitors: Small-molecule mercaptoacetamideanalogs. Bioorg Med Chem 2009;17(8):3072-9.

4. Hines HB, Kim AD, Stafford RG, Badie SS, Brueggeman EE, Newman DJ, et al. Use of a recombinant fluorescent substrate with cleavage sites for all botulinum neurotoxins in high throughput screening of natural product extracts for inhibitors of Serotypes A, B, and E. Appl Environ Microb 2008;74(3):653-9.

5. Park JG, Sill PC, Makiyi EF, Garcia-Sosa AT, Millard CB, Schmidt JJ, et al. Serotype-selective, small-molecule inhibitors of the zinc endopeptidase of botulinum neurotoxin serotype A. Bioorg Med Chem 2006;14(2):395-408.

6. Zinseer H. Zinseer Micribiology. 20th ed. Norwalk: Appleton and lange; 1995. p. 402-5.

7. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, et al. Botulinum toxin as a biological weapon: Medical and public health management. JAMA 2001;285(8):1059–70.

8. Sambrook J, MacCallum P, Russell D. Molecular cloning: A laboratory Manual. 4th ed. Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. (Chapters 6-12)

9. Mansour AA, Mousavi SL, 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(2):260-4.

10. Kubota T, Watanabe T, Yokosawa N, Tsuzuki K, Indoh T, Moriishi K, et al. Epitope region in the heavy chain of clostridium botulinum type E neurotoxin recognized by monoclonal antibodeis. Appl Environ Microb 1997;63(4):1214-8.

11. Trollet C, Pereira Y, Burgain A, Litzler E, Mezrahi M, Seguin J, et al. Generation of high-titer neutralizing antibodies against botulinum toxins A, B, and E by DNA electrotransfer. Infect Immun 2009;77(5):2221-9.

12. Easwaran R, Fetweh H, Denise M. Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B, and E that can Be administered by the mucosal route. Infect Immun 2007;75(6):3043-4.

13. Baldwin MR, Tepp WH, Pier CL, Bradshaw M, Ho M, Wilson BA, et al. Characterization of the antibody response to the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotypes A and E. Infect Immun 2005;73(10):6998-7005.

www.SID.ir

Archive of SID

Qom Univ Med Sci 2016 July

Original Article

Subcloning and Assessment of the Expression of Synthetic Botulinum Neurotoxin Type B Binding Domain (BD/B)

Majid Baradaran[1], Firouz Ebrahimi[1], Shahram Nazarian[1], Abbas Hajizade[1], Yousof Tarverdizadeh[1]*

[1]*Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Firouz Ebrahimi,** Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Email: febrhimi@ihu.ac.ir

Received: 27 Sep, 2015

Accepted: 15 Nov, 2015

Abstract

Background and Objectives: Botulism syndrome is caused by *Clostridium botulinum* neurotoxin. This neurotoxin has 7 serotypes, from A to G. The best way to prevent botulism syndrome caused by BoNT/B is immunization with recombinant binding domains of BoNT/B (due to containing sufficient epitopes to stimulate the immune system). In this study, the expression of the BoNT/B binding domain as a candidate vaccine, was investigated.

Methods: At first, the sequence of the *BoNT/B* binding domain gene was obtained from NCBI website with accession number of EF028399.1. After codon optimization, the gene was synthesized in pUC18 vector. Then, the gene was subcloned in pET32a(+) expression vector that carries an ampicillin selection marker. PCR, enzymatic digestion, and sequencing were used to confirm subcloning accuracy, and *E. coli* BL21(DE3) was used for the expression analysis. The accuracy of protein expression was evaluated by electrophoresis and western blotting.

Results: PCR reaction, enzymatic digestion, and sequencing confirmed that the gene of interest has been subcloned appropriately in the vector. The expression analysis by SDS-PAGE and subsequently western blotting, showed that the protein of interest is not expressed in the mentioned expression strain.

Conclusion: Although the gene was successfully subcloned in *pET32a(+)* vector, no significant expression of the gene was observed.

Keywords: Clostridium botulinum; Gene expression; Vaccines, Synthetic.

www.SID.ir