Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره ششم، شهریور ۹۵
صفحه ۱۳ الی ۲۳

مقاله پژوهشی
(Original Article)

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

مجید زواری[۱]، فیروز ابراهیمی[۱*]، شهرام نظریان[۱]، عباس حاجی زاده[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 A-G می‌باشد. بهترین روش برای پیشگیری از سندرم حاصل از نوروتوکسین بوتولینوم (BoNT)، استفاده از واکسن‌های نوترکیب ساخته‌شده از ناحیه اتصالی آن (به‌علت داشتن اپی‌توپ‌های کافی برای تحریک سیستم ایمنی) می‌باشد. در این مطالعه ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A (BoNT/A) بررسی گردید

روش بررسی: در ابتدا ژن ناحیه BoNT/A از GenBank با شماره دسترسی CP000727.1 تهیه و براساس ترجیح کدونی *E. coli*، بهینه‌سازی کدون انجام شد. سپس در پلاسمید pET28a، سنتز و بعد از آن در پلاسمید بیانی pGEX-4T-1، زیرهمسانه‌سازی شد. زیرهمسانه‌سازی با استفاده از روش PCR با آنزیم Pfu DNA polymerase و سپس برش دوگانه با آنزیم‌های XmaI و XhoI انجام گرفت. از سویه *E. coli* BL21 به‌عنوان میزبان برای بیان استفاده شد. مارکر انتخابی برای pGEX-4T-1، آمپی‌سیلین بود.

یافته‌ها: روش‌های PCR و برش محدودکننده با آنزیم‌های ذکرشده، زیرهمسانه‌سازی را تأیید کردند. بررسی بیان با استفاده از روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ (با استفاده از آنتی‌بادی اسبی ضدBoNT/A)، سپس کروماتوگرافی تمایلی گلوتاتیون انجام گرفت. با اینکه زیرهمسانه‌سازی با موفقیت انجام شد، ولی با به‌کارگرفتن روش‌های ذکرشده، هیچ‌گونه بیان پروتئین مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این مطالعه، به‌نظر می‌رسد باید میزبان‌های دیگری مانند میزبان‌های یوکاریوتی برای بیان نوترکیب ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A مورد استفاده قرار گیرند.

کلید واژه‌ها: *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ A؛ ناحیه اتصالی؛ زیرهمسانه‌سازی، بیان ژن؛ واکسن نوترکیب.

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

آدرس پست الکترونیکی:
febrhimi@ihu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Zavvary M, Ebrahimi F, Nazarian Sh, Hajizadeh A, Tarverdizadeh Y. Subcloning and assessment of the expression of synthetic gene of botulinum neurotoxin Type A binding domain (BD/A). Qom Univ Med Sci J 2016;10(6):13-23.[Full Text in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کلستریدیوم بوتولینوم، باکتری گرم مثبت بی‌هوازی و میله‌ای شکل است که در خاک و آب یافت می‌شود (۱). ۷ سروتیپ شناسایی‌شده این نوروتوکسین (سم عصبی) از A-G نامگذاری می‌شوند که فقط تیپ‌های A، B، E و گاهی F در انسان ایجاد بیماری می‌کنند (۲). هر نوروتوکسین بوتولینوم یک زنجیره ۱۵۰ کیلودالتونی بوده که از یک زنجیره سنگین (HC) به وزن ۱۰۰ کیلودالتون و یک زنجیره سبک (LC) ۵۰ کیلودالتونی تشکیل شده است. یک پیوند دی‌سولفیدی، این دو زنجیره را به‌هم متصل کرده است. وظیفه زنجیره سنگین، شناسایی و اتصال به نورون‌های کولینرژیک محیطی است و زنجیره سبک با عملکرد اندوپپتیدازی وابسته بر روی خود، مانع رهاسازی نوروترانسمیترها به فضای سیناپسی و در نتیجه مختل‌شدن پیام عصبی می‌شود (۵-۳). مسمومیت با این نوروتوکسین منجر به عوارض مختلفی در افراد ازجمله ضعف عضلانی عمومی (طوری‌که تمام ماهیچه‌های اسکلتی تحت تأثیر قرار می‌گیرند) و در نهایت، با تخریب عملکردهای غیرارادی نظیر تنفس منجر به مرگ می‌شود (۶). بوتولیسم نوزادان و روده بزرگسالان نیز مانند بوتولیسم با منشأ غذایی یک مسمومیت است با این تفاوت که برخلاف آن، منشأ تولید سم، عفونت ایجادشده درون بدن می‌باشد. درباره بوتولیسم نوزادان، عقیده بر این است که علت آن، عدم توسعه کافی فلور طبیعی باکتریایی دستگاه گوارش است. لذا رقابت کافی و لازم با *کلستریدیوم بوتولینوم* به‌وجود نمی‌آید و در نتیجه امکان تکثیر باکتری به شکل رویشی در روده بزرگ و تولید سم فراهم می‌شود. برای تولید بیماری، وجود ۱۰۰-۱۰ اسپور از باکتری مولد کافی می‌باشد. در حال حاضر، از یک واکسن توکسوئیدی ۵ ظرفیتی بوتولیسم علیه سروتیپ‌های A-E، به‌منظور مصونیت‌زایی اختصاصی استفاده می‌شود. ساخت توکسوئید برای هرکدام از سروتیپ‌ها از اواخر دهه ۱۹۶۰ و اوایل ۱۹۷۰ میلادی آغاز شد و اولین بار در سال ۱۹۷۱، واکسن‌های تک‌ظرفیتی به‌صورت انبوه، تولید و در سال ۱۹۷۸ بسته‌بندی و عرضه گردید. با این وجود، بهترین استراتژی برای پیشگیری از این بیماری از طریق واکسیناسیون، تولید و استفاده از واکسن‌های نوترکیب از ناحیه اتصالی نوروتوکسین است؛ چراکه اپی‌توپ‌های کافی برای تحریک سیستم ایمنی را دارا می‌باشند (۹-۷). در این تحقیق تلاش گردید تا با استفاده از وکتور بیانی *pGEX-4T-1*، ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A بیان شود.

روش بررسی

ژن مصنوعی ناحیه اتصالی نوروتوکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ A و ستون میل ترکیبی گلوتاتیون رزین (شرکت شاین جین Shinegene، 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 و کیاژن تهیه گردید. همچنین برای القا از IPTG تهیه‌شده از شرکت سیگما (آلمان) استفاده گردید. وکتور بیانی *pGEX-4T-1* (محصول شرکت GE Healthcare) از پژوهشگاه ملی ژنتیک تهیه شد.

از محیط‌های LB Broth (Luria-Bertani) و LB Agar (تهیه‌شده از شرکت فلوکا اسپانیا و Merck آلمان) با غلظت‌های ۸۰-۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (تهیه‌شده از شرکت سیگما آمریکا) استفاده گردید. مواد شیمیایی از قبیل EDTA، Tris HCl، Tris base، Sucrose، کلروفرم، فنل، اسیدبوریک، 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 زیرهمسانه‌سازی ژن *BD/A*، با توجه به‌توالی صناعی تهیه‌شده برای آن {سنتزشده درون پلاسمید (+)pET28a}، یک جفت پرایمر طراحی گردید. با توجه به توالی ژن *BD/A*، همچنین الگوی برش آنزیمی‌آن، ترادف نوکلئوتیدی پرایمرهای پیشرو و پیرو با رعایت اصول استاندارد در طراحی پرایمر تعیین شد. ترادف‌های انتخابی با استفاده از نرم‌افزار OLIGO از لحاظ دمای اتصال (Tm)، درصد G+C، تولید لوپ یا حلقه در درون هریک از پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

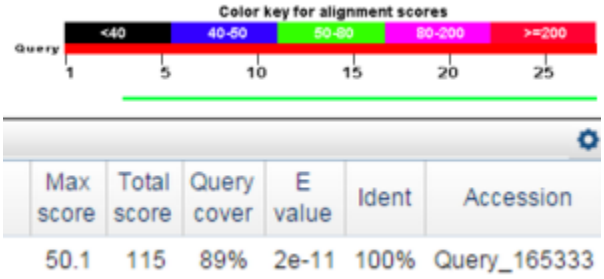
در نهایت، پرایمرهای طراحی‌شده به‌کمک نرم‌افزار BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI تأیید شد تا از عدم مشابهت آن با سایر ژن‌های در دسترس اطمینان حاصل گردد.

این پرایمرها، به‌منظور سنتز به شرکت سیناژن سفارش داده شدند.

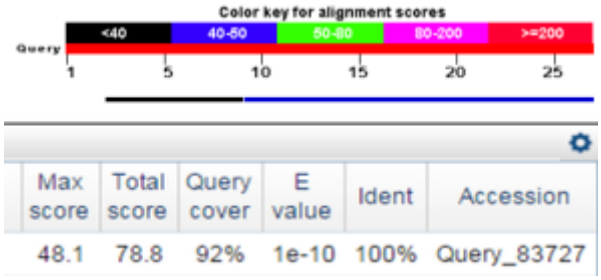
توالی پرایمر پیشرو و پیرو به ترتیب:

5’ATACTCGAGTTACAGCGGACGTTCACC3’
5’ATTCCCGGGTTTCCAGCTGTCTAAATAC3’

بود (شکل شماره ۱ و ۲).



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



شکل شماره ۲: Blast پرایمر پیرو با توالی ژنی، نشان‌دهنده ۱۰۰٪ شباهت می‌باشد.

قطعه ژنی *BD/A* ابتدا با آنزیم Taq پلیمراز، طی ۳۵ چرخه تکثیر گردید. این واکنش در غلظت ۴ میلی‌مولار $MgCl_2$ و 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 و 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.

از آنجایی‌که آنزیم Taq پلیمراز فاقد خاصیت غلط‌گیری است، لذا به‌منظور زیرهمسانه‌سازی با صحت بالا، در مرحله نهایی از آنزیم Pfu پلیمراز استفاده شد. شرایط واکنش بهینه این آنزیم عبارت بود از:

بافر کامل حاوی $MgSO_4$، ۲۰ پیکومول از هر پرایمر؛ ۰/۲ میلی‌مولار dNTP و ۵۰ نانوگرم نمونه الگو.

سیکل‌های PCR شامل: یک مرحله واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل: واسرشتی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و در پایان، یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه بود.

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید.

محصول PCR از ژل خالص‌سازی شد، سپس هم محصول PCR و هم پلاسمید بیانی *pGEX-4T-1* با استفاده از آنزیم‌های برش‌دهنده XmaI و XhoI به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. {لازم به ذکر است براساس نقشه pGEX-4T-1، آنزیم SmaI مناسب این پژوهش تشخیص داده شد. اما به این دلیل که نحوه برش آن به‌صورت بلانت (Blunt end) است، از ایزوشیزومری‌که به‌صورت چسبنده برش می‌زند (XmaI) استفاده گردید. انتظار بر این بود که پس از هضم آنزیمی، دو انتهای قطعه ژنی و پلاسمید خطی‌شده به‌صورت چسبنده (Steaky end) درآیند. بنابراین، محصول برش هر دو، برروی ژل آگارز 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 کمک کیت تخلیص DNA از ژل (محصول شرکت بایونیر، کره جنوبی) تخلیص شدند. مقدار ۳ میکرولیتر از آن نیز به‌منظور تأیید کیفیت قطعه تخلیص‌شده برروی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. واکنش الحاق در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت (اورنایت) با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (محصول شرکت فرمنتاز) انجام گرفت و سپس پلاسمید نوترکیب با روش شوک حرارتی به میزبان *E. coli* سویه BL21(DE3) منتقل شد. سویه میزبان نوترکیب به مدت یک‌شب بر روی LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده شد و دو کلنی

www.SID.ir

Archive of SID

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 XmaI، XhoI و مشاهده تک باند ژنی جداشده از پلاسمید بر روی ژل آگارز و در نهایت، به‌منظور بررسی توالی ژن زیرهمسانه‌سازی‌شده، اطمینان از عدم بروز هرگونه خطا، جهش و یا نوآرایی ناخواسته و پلاسمید نوترکیب تخلیص‌شده توسط شرکت سیناژن با استفاده از پرایمرهای جهانی این پلاسمید، تعیین توالی شدند. ابتدا کشت سویه‌های نوترکیب واجد پلاسمید pGEX4T1-BD/A در محیط کشت LB مایع حاوی آمپی‌سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر) انجام گرفت و اجازه داده شد تا جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ برسد، سپس ماده IPTG (ایزوپروپیل بتا- دی - تیوگالاکتوپیرانوزید) به‌عنوان القاکننده با غلظت یک میلی‌مولار به محیط کشت اضافه و اجازه داده شد تا سلول‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شوند. بعد از جداسازی سلول‌ها با سانتریفوژ (با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۱۰ دقیقه)، رسوب آن در ۱۰۰ میکرولیتر ایمیدازول ۱۰٪، حل و از طریق سونیکاسیون (۵ سیکل با قدرت ۷۵٪، زمان ۱۵ ثانیه و ۱۵ ثانیه در یخ) شکسته شدند. سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ و مایع رویی جدا گردید. به رسوب حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده حاوی اوره ۸ مولار اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد و بعد از سانتریفوژ مایع رویی آن نیز 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 ترتیب که باکتری نوترکیب در ۹ لوله مجزا حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB و آمپی‌سیلین به غلظت ۴۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر کشت داده شد تا جذب نوری آنها به ۰/۵ برسد.

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.

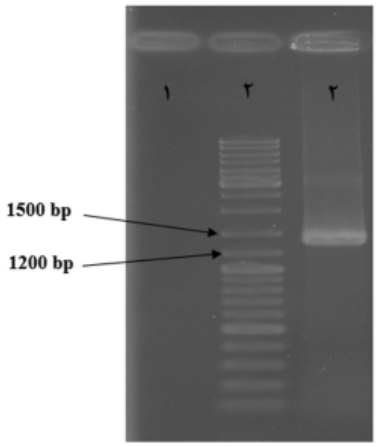
پس از رسیدن جذب نوری به ۰/۵، القا با IPTG انجام گرفت و سپس لوله‌های هر دما در محیط مناسب دارای آن دما و با سرعت گردش ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. در سر رسید هرکدام از زمانهای ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از هر لوله در میکروتیوب‌های مجزا جداسازی گردید؛ البته از لوله‌های کنترل منفی تنها 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 گرفتند و بعد از سانتریفوژ (در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۵ دقیقه)، مایع رویی جدا گردید. ۲۰ میکرولیتر از آن با ۵ میکرولیتر از بافر نمونه، مخلوط و ۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. نمونه‌های آماده‌شده همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن) بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE، الکتروفورز شدند، به‌منظور تأیید وجود احتمالی پروتئین نوترکیب از واکنش ایمونوبلاتینگ همراه با آنتی‌بادی علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A استفاده گردید. در نهایت، جهت اطمینان بیشتر و تخلیص بیان پروتئین، از ستون کروماتوگرافی گلوتاتیون رزین استفاده شد.

یافته‌ها

پس از تکثیر قطعه ژنی BD/A با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪، الکتروفورز شد. مطابق انتظار، یک قطعه ۱۳۶۰ جفت بازی بر روی ژل مشاهده گردید (شکل شماره ۳).

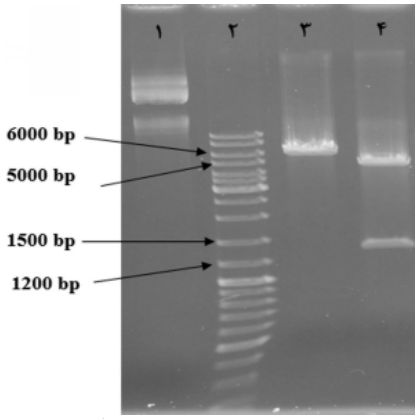
www.SID.ir

Archive of SID

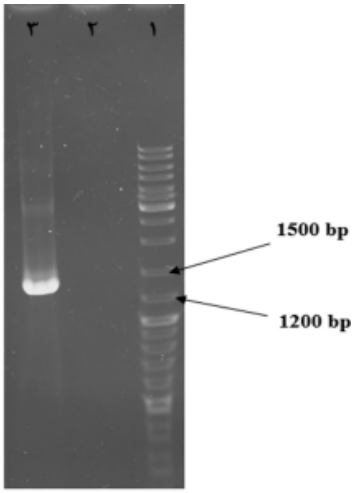


شکل شماره ۳: نتیجه PCR بر روی ژل آگارز.
۱) کنترل منفی؛ ۲) DNA Ladder؛ ۳) تک باند ژن تکثیرشده (۱۳٦۰ جفت باز).

نتایج واکنش تک‌برش آنزیمی با آنزیم XhoI، برش دوگانه آنزیمی با آنزیم‌های XmaI، XhoI و واکنش PCR بر روی پلاسمید نوترکیب pGEX4T1-BD/A؛ تأییـد ابتـدایی بر صحـت فرآیند زیرهمسانه‌سازی بود (شکل شماره ۴ و ۵). در نهایت، تعیین توالی ژن زیرهمسانه‌سازی‌شده نیز نشان داد این توالی فاقد کدون خاتمه نابجا، جهش و نوآرایی ناخواسته می‌باشد.



شکل شماره ٤: فرآیند هضم آنزیمی، به‌منظور تأیید زیرهمسانه‌سازی.
۱) پلاسمید pGEX-4T-1 نوترکیب استخراج‌شده؛ ۲) نشانگر مولکولی DNA؛ ۳) تک‌برش آنزیمی با XhoI که منجر به خطی شدن پلاسمید نوترکیب با طول حدود ٦۲٤۲ جفت باز شده است؛ ٤) برش دوگانه آنزیمی با XmaI و XhoI که منجر به جداشدن قطعه ژنی با طول ۱۳٤۲ از پلاسمید خطی شده با طول ٤۹۰۰ جفت باز شده است.



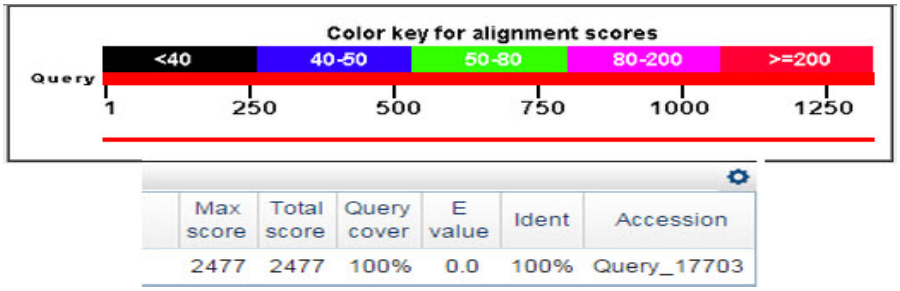
شکل شماره ۱: فرآیند PCR، به‌منظور تأیید زیرهمسانه‌سازی.
۱) نشانگر مولکولی DNA؛ ۲) کنترل منفی؛ ۳) تک باند ژنی با طول ۱۳٦۰ جفت باز.

www.SID.ir

Archive of SID

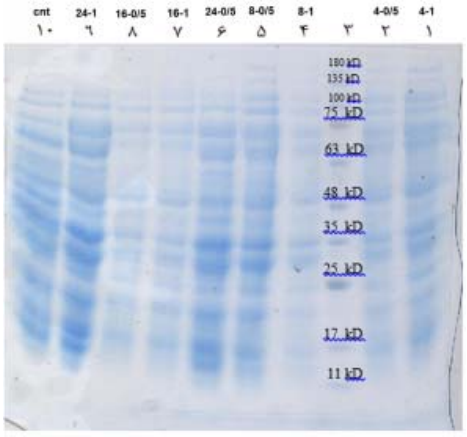
کلنی که نتایج PCR و هضم آنزیمی آن با آنزیم‌های محدودالأثر مثبت شده بود، انتخاب و پس از تخلیص پلاسمید به شرکت سیناژن برای تعیین توالی ارسال گردید. (از آنجایی‌که طول قطعه زیرهمسانه‌سازی‌شده، ۱۳۴۲ جفت باز است، اما دستگاه تعیین توالی‌کننده در هر بار خوانش از هرطرف قادر به قرائت حدود ۱۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشد.) از این‌رو با خوانش دوطرفه و هم‌ردیف‌کردن نتایج، کل ژن تعیین توالی شد.

برای تعیین توالی از هر دو پرایمر پیشرو و پیرو جهانی وکتور pGEX استفاده گردید. پس از تعیین توالی، نتایج Pairwise Alignment نشان داد ژن زیرهمسانه‌سازی‌شده 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 ۶ نتیجه Pairwise Alignment آن با توالی اصلی و کد دسترسی Query_17703 در سایت NCBI نشان داده شده که بیانگره تشابه صددرصدی می‌باشد.



شکل شماره ٦: تأیید صحت زیرهمسانه‌سازی با فرآیند Pair Wise Allignment توالی زیرهمسانه‌سازی‌شده و توالی ابتدایی طراحی‌شده.
برای انجام این فرآیند از سایت NCBI استفاده شده و کد دسترسی آن طبق تصویر query_17703 می‌باشد. همان‌طورکه مشاهده می‌گردد انطباق توالی‌ها ۱۰۰٪ است.

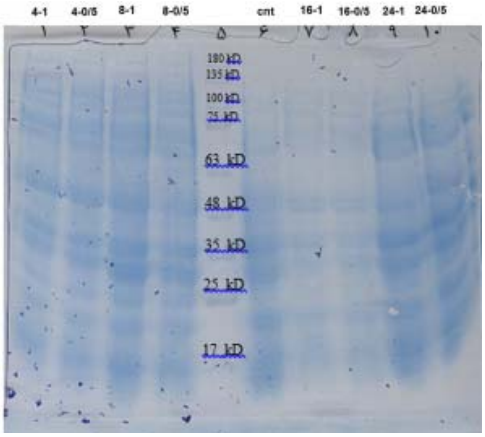
در بیان ابتدایی و سپس بهینه‌سازی بیان نمونه‌ها پس از القا در سویه‌های به‌کار گرفته‌شده در مقایسه با نمونه کنترل، با اینکه باند مشکوک پروتئینی در محدوده حدود ۷۵ کیلودالتونی مشاهده شد، ولی پس از وسترن بلاتینگ و در نهایت، استفاده از ستون گلوتاتیون رزین، پروتئین نوترکیب مورد نظر باوجود اتصال به پروتئین GST (Glutathione S-Transferase) فیوژ، باز هم بیان نشد (شکل ۱۲-۷).



شکل شماره ۷: بررسی بیان در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد.
۱) بیان با غلظت IPTG ۱ میلی‌مولار و زمان ٤ ساعت؛ ۲) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ٤ ساعت؛ ۳) پروتئین مارکر؛ ٤) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ۸ ساعت؛ ۵) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ۸ ساعت؛ ٦) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ۲٤ ساعت؛ ۷) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ١٦ ساعت؛ ۸) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ١٦ ساعت؛ ۹) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ۲٤ ساعت؛ ۱۰) کنترل منفی (عدم القا با IPTG).

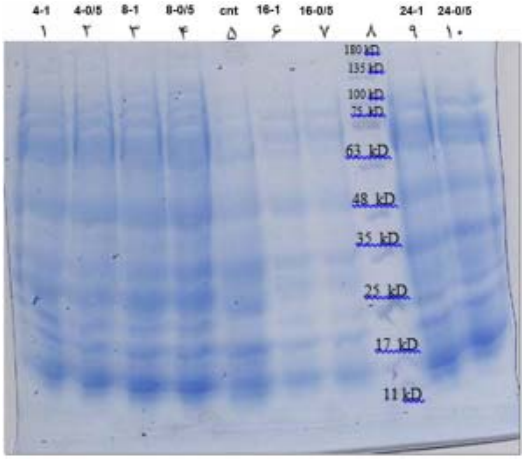
www.SID.ir

Archive of SID



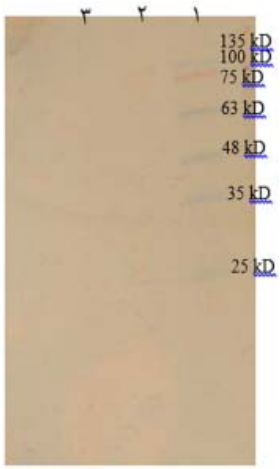
شکل شماره ۸: بررسی بیان در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد.

۱) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ٤ ساعت؛ ۲) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ٤ ساعت؛ ۳) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ۸ ساعت؛ ٤) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ۸ ساعت؛ ۵) پروتئین مارکر؛ ٦) کنترل منفی (بدون القا با IPTG)؛ ۷) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ١٦ ساعت؛ ۸) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ١٦ ساعت؛ ۹) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ٢٤ ساعت؛ ۱۰) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ٢٤ ساعت.



شکل شماره ۹: بررسی بیان در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد.

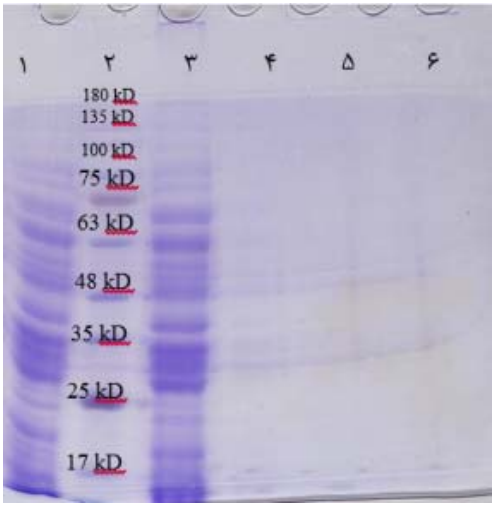
۱) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ٤ ساعت؛ ۲) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ٤ ساعت؛ ۳) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ۸ ساعت؛ ٤) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ۸ ساعت؛ ۵) کنترل منفی؛ ٦) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ١٦ ساعت؛ ۷) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ١٦ ساعت؛ ۸) پروتئین مارکر؛ ۹) بیان با غلظت IPTG یک میلی‌مولار و زمان ٢٤ ساعت؛ ۱۰) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و زمان ٢٤ ساعت.



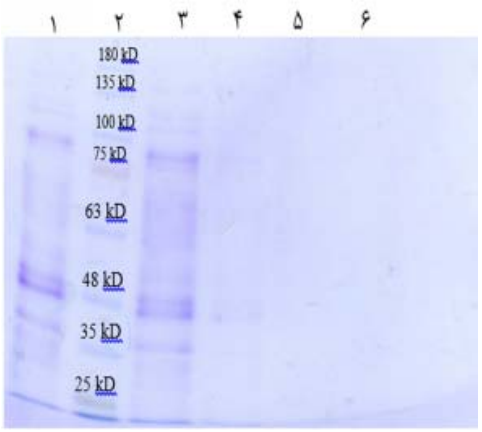
شکل شماره ۱۰: بررسی بیان پروتئین به روش ایمونوبلاتینگ (وسترن‌بلات).
۱) پروتئین مارکر؛ (۲) نمونه تست؛ ۳) کنترل منفی (بدون القا IPTG).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ۱۱: عبور محلول رویی از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی گلوتاتیون رزین.
۱) نمونه بیان قبل از عبور دادن از ستون؛ ۲) پروتئین مارکر؛ ۳) محلول Flow؛ ٤) محلول Wash I؛ ٥) محلول Elution؛ ٦) محلول WashII.



شکل شماره ۱۲: عبور دادن رسوب از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی گلوتاتیون رزین.
۱) نمونه بیان قبل از عبور دادن از ستون؛ ۲) پروتئین مارکر؛ ۳) محلول Flow؛ ٤) محلول Wash I؛ ٥) محلول Elution؛ ٦) محلول WashII

بحث

بیشتر مطالعات در زمینه تولید واکسن نوترکیب و آنتی‌بادی برروی 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 $10^3 \times LD_{50}$ از توکسین بوتولینوم تیپ E را تحمل کنند (۱۰). در تحقیقی دیگر Kubota و همکاران، آنتی‌بادی مونوکلونالی تولید کردند که از اتصال BoNT/E به سلول هدف ممانعت می‌کرد. این آنتی‌بادی به ناحیه اتصالی نوروتوکسین متصل می‌شد (۱۱).

Trollet و همکاران نیز در تحقیقی با استفاده از روش انتقال الکتریکی (Electrotransfer)، DNA آنتی‌بادی خنثی‌کننده علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ‌های E، A و B تولید کردند (۱۲). Ravichandran و همکاران در تحقیق خود، ناحیه اتصالی نوروتوکسین تیپ‌های E، B و A را به‌صورت استنشاقی تجویز کردند که در نتیجه موش‌های ایمن‌شده توانستند دوز $10^4 \times LD_{50}$ از نوروتوکسین‌های فوق‌الذکر را تحمل کنند (۱۳). در تحقیقی دیگر که در آن Baldwin و همکاران از ناحیه اتصالی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ‌های A و E استفاده کردند، موش‌های ایمن‌شده توانستند دوز $10^5 \times LD_{50}$ را تحمل کنند (۱۴). با توجه به ایمنی‌زایی مناسب ناحیه اتصالی که در تحقیقات فوق‌الذکر نشان داده شده است؛ درصورتی‌که محصول این پژوهش به بیان

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین ختم می‌شد، پیشنهاد مؤکد در بررسی میزان ایمنی‌زایی پروتئین حاصل شده بود. اما باوجود همه این گزارشها، تلاش ابتدایی جهت زیرهمسانه‌سازی و بیان ژن ناحیه اتصالی تیپ A، ابتدا در وکتور pET28a(+)، منتج به نتیجه نشد. لذا در این تحقیق به وکتور بیانی pGEX-4T-1 از مجموعه GST-gene fusion system (Glutathione S-Transferase)ها روی آورده شد. این مجموعه، یک سیستم همه‌کاره برای بیان، تخلیص و شناسایی پروتئین‌های متصل‌شده (فیوژ شده) و تولیدشده در *E. coli* می‌باشد. این مجموعه مبتنی بر بیان سطح بالای القاپذیر ژن‌ها یا قطعات ژنی در اتصال با GST به‌دست‌آمده از Schistosoma japonicum، ساخته شده است. بیان در *E. coli* منجر به تولید فیوژن پروتئین‌هایی می‌شود که در N ترمینال آنها GST و در C ترمینال آنها پروتئین موردنظر قرار دارد. این پروتئین‌ها در سیتوپلاسم سلولی جمع می‌شوند. پروتئین‌هایی که به GST متصل شده‌اند را می‌توان با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی، که در آن گلوتاتیون تثبیت شده است، جداسازی و تخلیص کرد. پروتئین‌های متصل به GST به‌وسیله ستون درگیر شده و ناخالصی‌ها با شست‌وشو حذف می‌شوند. فیوژن پروتئین‌ها تحت شرایط متعادل و غیردناتوره با استفاده از گلوتاتیون احیاشده از ستون جدا می‌شوند. فرآیند تخلیص؛ عملکرد و خاصیت آنتی‌ژنتسیته پروتئین موردنظر را حفظ می‌کند. درصورت نیاز، جدا کردن GST از پروتئین نیز با استفاده از پروتئاز مخصوصی که ناحیه اتصالی آن درست بالادست MCS پلاسمیدهای pGEX قرار گرفته، امکان‌پذیر است. از سیستم مذکور به‌طور موفقیت‌آمیزی در مطالعات بسیاری ازجمله ایمونولوژی مولکولی، تولید واکسن‌ها و مطالعات برهمکنش‌های پروتئین - پروتئین و DNA- پروتئین استفاده شده است (۱۵). باوجود همه این ویژگی‌ها، همان‌طورکه در نتایج اشاره گردید علی‌رغم کنترل و تأیید تمام مراحل زیرهمسانه‌سازی، نتیجه مشخصی در مرحله بیان به دست نیامد. در مطالعه حاضر آنالیزهای لازم بیوانفورماتیکی، به‌منظور بررسی احتمالات عدم بیان انجام شد که 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. بررسی ساختار دوم mRNA نیز نشان داد نقطه شروع ترجمه درون ساختار محکمی که مانع اتصال کامل ریبوزوم شود قرار ندارد. به‌علاوه، dG بسیار مناسبی دارد. همچنین 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 با این همه پروتئین موردنظر بیان نشد. در نهایت، مهم‌ترین دلیل احتمالی عدم بیان می‌تواند تجزیه و شکسته‌شدن پروتئین، بلافاصله بعد از بیان باشد (هرچند در آنالیز بیوانفروماتیکی پایدار بودن آن احراز گردید).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، قطعه ژنی BD/A پس از تکثیر به‌وسیله واکنش PCR در پلاسمید pGEX-4T-1 زیرهمسانه‌سازی گردید. بررسی بیان این ژن در میزبان *E. coli* سویه BL21(DE3) نشان داد پروتئین نوترکیب در این سویه‌ها تولید نشده است.

References:

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

2. Humeau Y, Doussau F, Grant NT, Poulainm 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 mercaptoacetamide analogs. Bioorg Med Chem 2009;17(8):3072-9.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Hines H, Kim A, Stafford R, Badie S, Brueggeman E, Newman D, 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 Microbiol 2008;74(3):653-9.

5. Park J, Sill P, Makiyi E, Garcis-Sosa A, Millard C, Schmidt J, 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. Jokklik WK, Smith DT. Zinseer Microbiology. 18th ed. Norwalk: Appleton and Lange Pub; 1984. p. 405.

7. Arnon SS, Schechter R, Ingelsby 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. Crowther JR. Eliza theory and practice: Methods in molecular biology. Berlin: Springer Pub; 1995.

9. Ohish I, Sakagushi G. Oral toxicities of Clostridium botulinum Type C and D toxin of different molecular size. Infect Immun 1980;28(2):303–9.

10. Abdoulreza A, Latif M. 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.

11. 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 Microbiol 1997;63(4):1214-8.

12. 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 electro transfer. Infect Immun 2009;77(5):2221-9.

13. 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 Immu 2007;75(6):3043-54.

14. Michael RB, William H, Christina L. Characterization of the Antibody response to the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotypes A and E. Infect Immun 2005;73(10):6998-7005.

15. Harper S, Speicher DW, Purification of proteins fused to glutathione S-tranferase. Methods Mol Biol 2011;681:259–80.

www.SID.ir

Archive of SID

Qom Univ Med Sci 2016 August

Original Article

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

Majid Zavvary[1], Firouz Ebrahimi[1], Shahram Nazarian[1], Abbas Hajizadeh[1], Yousof Tarverdizadeh[1]*

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

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

Email: febrhimi@ihu.ac.ir

Received: 2 Oct, 2015

Accepted: 24 Nov, 2015

Abstract

Background and Objectives: Botulism syndrome is caused by *Clostridium botulinum* neurotoxin. This neurotoxin has seven serotypes ranging from A to G. The best way to prevent botulism syndrome caused by Botulinum neurotoxin (BoNT), is using recombinant vaccine made from its binding domain (due to having sufficient epitopes to stimulate immune system). In this study, the binding domain of BoNT serotype A (BoNT/A), was investigated.

Methods: Initially, *BoNT/A* gene with accession number CP000727.1, was obtained from GenBank and was codon optimized according to the codon usage of *E. coli*. Then, the sequence was synthesized in pET28a plasmid and then subcloned in pGEX-4T-1 expression plasmid. The subcloning was done using PCR with Pfu DNA polymerase and then double digestion with XmaI and XhoI restriction enzymes. *E. coli* BL21 strain was used as the expression host. The selected marker for pGEX-4T-1 was ampicillin.

Results: PCR and restriction digestion with the mentioned enzymes confirmed the subcloning process. The assessment of gene expression was performed by SDS-PAGE and western blotting (using horse anti-BoNT/A) and then glutathione affinity chromatography was performed. Although, the subcloning was performed successfully, no protein expression was observed.

Conclusion: According to the findings of this study, it seems that other hosts, such as eukaryotic hosts should be used for recombinant expression of BoNT/A binding domain.

Keywords: *Clostridium botulinum* type A; Binding domain; Subcloning; Gene expression; Vaccines, Synthetic.

www.SID.ir