

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)
- ۴- کارشناسی ارشد گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)

چکیده

هدف: سم بوتولینوم تیپ A به لحاظ ساختاری از یک زنجیره سبک به وزن ۵۰KD و یک زنجیره سنگین به وزن ۱۰۰ KD 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 انتهایی آمینی زنجیره سنگین است و بخش اتصال دهنده که نیمه انتهایی کربوکسیل زنجیره سنگین را تشکیل می دهد. در این پژوهش، هدف از تولید نوترکیب بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپ A، مطالعه کارایی این بخش از سم به طور 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 قلبایی 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 بیانی A pET28a, 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 تأیید 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 به دست آمد. هر چند بیان ژنهایی که درصد بالایی از AT را برخوردارند در سیستم E.coli ضعیف است اما با این حال بیان مناسبی از این ژن به دست 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

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^۲ با رستپورهای سطح سلولی بر روی غشاء پری سیناپتیک است که

2 . Binding domain

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 نروتوکسین شناخته شده است که عبارتند از: A, B, C₁, D, E, F, G که فقط تیپ های F, E, B, A 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 تیپ A دارای ۴۹۲۹ جفت باز می باشد. توالی ترجمه شده به صورت یک ORF با ۳۸۹۱۱ جفت باز شناسایی شده است که با کدون آغازین AUG شروع و به کدون پایان UAA ختم می شود. پلی پپتید سنتز شده مرکب از ۱۲۹۶ اسید آمینه می باشد. بررسی ژن کد کننده سم بوتولینوم تیپ A نشان می دهد که این ژن درصد بالایی از AT (۷۰ درصد) را شامل می شود. ترشح سم بوتولینوم به وسیله پپتید راهنما وساطت نمی شود و تغییرات پس از ترجمه در انتهای آمینی پلی پپتید تازه سنتز شده، فقط به حذف یک متیونین محدود می شود [۵،۴].

نروتوکسین سم بوتولینوم، پروتئینی به وزن ۱۵۰ kD بوده که به طور اختصاصی بر روی اعصاب کولینرژیک اثر می گذارد و مانع از آزاد سازی نوروترانسمیتر استیل کولین شده نهایتاً سبب فلج شل می شود. ابتدا سم به صورت یک زنجیره پلی پپتیدی ساخته می شود سپس تحت تاثیر پروتئاز ها به زنجیره سبک و سنگین بریده می شود که به وسیله یک بانده دی سولفیدی به هم متصل شده اند. زنجیره سنگین شامل بخش انتقال دهنده در

1 . Open reading frame

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.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد

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

آنزیمهای برش دهنده، آنزیمهای لیگاز و پلی مرز^۶ از شرکت فرمنتاز^۷ تهیه شد. سلولهای میزبان به کار رفته در این تحقیق عبارتند از *E.coli BL21DE3, Ecoli Bl21* پلاسمیدهای واجد پروموتور T7 نظیر pRSETA، pET28a، و pET32a نیز برای الحاق ژن و بیان آن استفاده شد. مواد استفاده شده ژل آگارز معمولی و آگارز L.M.P.^۸ از شرکت فرمنتاز و مواد تشکیل دهنده دهنده SDS-PAGE^۹ و وسترن بلاتینگ از شرکت کیژن تهیه شده است، و همچنین برای القاء از IPTG^{۱۰} تهیه شده از شرکت فرمنتاز استفاده شد. به عنوان شاخص وزن مولکولی از پلاسمید pUC18 هضم شده با آنزیم TaqI استفاده شد. بر اثر هضم pUC18 با آنزیم TaqI سه قطعه به ابعاد ۱۴۴۴، ۷۵۴، ۴۵۸ جفت باز به دست می آید. ستون میل ترکیبی نیکل^{۱۱} برای تخلیص پروتئین نوترکیب از شرکت کیژن تهیه شد.

۲-۲- روشها

منجر به ورود سم به داخل سیناپس با پروسه اندوسیتوز می شود. در مرحله بعدی، ایجاد کانال به وسیله بخش انتقال دهنده^۱ بر روی غشاء اندوزومی و نهایتاً ورود بخش عملکردی به داخل سیناپس از طریق کانال ایجاد شده به وسیله بخش انتقال دهنده^۲ در غشاء اندوزوم.

سم بوتولینوم دارای سه نوع سوبسترا می باشد، پروتئین VAMP^۳ یا سیناپتو بروین که سوبسترای سروتیپهای C,F,D,B بوده و پروتئین SNAP25^۴ که سوبسترای سروتیپهای C,B,A بوده و سینتاکسین^۵ که سروتیپ C 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 مطالعه کردند [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 سائز 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

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

1 .Translocating domain

2 . Catalytic domain

3 .Vesicle associated membrane protein

4 . Synaptosomal associated protein of 25 kD

5 . Synaptaxin

غلظت نهایی	مقدار	مواد
1X	۵ میکرولیتر	بافر PCR 10X
۰.۲ میلی مولار	۱ میکرولیتر	10mM dNTPs Mix
۴ میلی مولار	۴ میکرولیتر	۵۰ میلی مولار MgCl ₂
۰.۴ میلی مولار	۱ میکرولیتر	پرایمر بالادست ۲۰ پیکو مول بر میکرو لیتر
۰.۴ میلی مولار	۱ میکرولیتر	پرایمر پائین دست ۲۰ پیکو مول بر میکرو لیتر
۲.۵ U	۰.۵ میکرو لیتر	آنزیم Taq DNA پلی مراز
۵۰ نانو گرم	۱ میکرو لیتر	الگو (DNA ژنومیک)
—	۳۶.۵ میکرو لیتر	آب مقطر
—	۵۰ میکرو لیتر	حجم نهایی

برای رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A از محیط کشت گوشت پخته^۱ در شرایط بی هوازی با حضور ۱۵ درصد گاز CO₂ در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد [۱۱، ۶، ۴]. سپس DNA کروموزومی به روش فلیایی (۱۲) استخراج و با استفاده از اسپکتروفوتومتری 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 و DNA 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

1. Cooked meat

جدول ۲ نحوه اجرای سیکلهای PCR با آنزیم Pfu

تعداد سیکل	زمان	درجه حرارت	مراحل
۱ سیکل	۱۰ دقیقه	۹۴ درجه	دنا توره کردن اولیه
۵ سیکل	۱ دقیقه	۹۴ درجه	دنا توره کردن
	۱ دقیقه	۵۵ درجه	اتصال
۳۰ سیکل	۴ دقیقه	۷۴ درجه	تکثیر
	۱ دقیقه	۹۴ درجه	دنا توره کردن
۱ سیکل	۱ دقیقه	۶۲ درجه	اتصال
	۴ دقیقه	۷۴ درجه	تکثیر
۱ سیکل	۱۵ درجه	۷۴ درجه	تکثیر نهایی

مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. محصول الحاق بر روی سلولهای *E.coli* BL21DE3 که با استفاده از CaCl₂ سازگار شده بود به روش شوک سرما- گرما تراریخت شد. عمل غربالگری کلونهای به دست آمده با دو روش هضم آنزیمی و PCR صورت گرفت. قطعه انتقال دهنده طبق روش بالا بر روی وکتورهای بیانی pET28a 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 ۷۰°C - نگهداری شدند [۱۲].

واکنش PCR^۱ ابتدا با آنزیم Taq DNA پلی مراز تنظیم و بهینه سازی شد اما چون هدف 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^۲ خالص سازی شد و سپس با دو آنزیم BamHI و XhoI به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۳۷°C مورد هضم آنزیمی قرار گرفت پس از این مرحله وکتور pRSET A به روش قلبایی از سلول استخراج شد و سپس با دو آنزیم فوق به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C هضم آنزیمی شد.

محصول PCR و وکتور هضم شده به طور جداگانه بر روی ژل آگارز L.M.P الکتروفورز و با استفاده از کیت خالص سازی شدند. پس از تعیین غلظت، عمل الحاق ژنی در دمای ۱۲°C و به

- 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)

حرارت (درجه سانتیگراد)	زمان القاء (ساعت)	IPTG (میلی مولار)	جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر	آمی سیلین (میلی گرم بر میلی لیتر)	۳
---------------------------	-------------------	------------------------	-------------------------------	---	---

۲۷	۲۲	۲۵	۲۰	۲۴	۲۰	۱۵	۱۰	۶	۱/۵	۱	۰/۵	۱/۱	۰/۹	۰/۷	۰/۵	۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	بررسی تاییدی
----	----	----	----	----	----	----	----	---	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----------------

میلی لیتر از بافر B

(50mM NaH₂PO₄, 10mM Imidazol, 300mM NaCl)

و یک میلی لیتر رزین Ni-NTA agarose به صورت Bath 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 ژل SDS-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 و XhoI نیز به دلیل مناسب بودن جایگاه آنها در MCS^۱ وکتورهای مورد نظر انتخاب گردید [۱۷]. بعد از طراحی پرایمر صحت آن با نرم افزار Blast بررسی شده با سوش کلسترییدیوم بوتولینوم تیپ A موجود در بانک ژنی همخوانی داشت.

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

محصول کشت در شرایط بهینه، با سانتیفریژ 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 (قدرت ۷۰٪ و ۵ سیکل: ۱۵ ثانیه سونیکاسیون و ۴۵ ثانیه در یخ) شکسته شدند. عصاره سلولی به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانتیفریژ و محلول روئی بعد از پروتئین سنجی بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد. سپس به روش کوماسی بلو رنگ آمیزی 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 ژل SDS-PAGE لود گردید و بعد از عمل الکتروفورز به روی کاغذ نیترو سلولز منتقل و با مجاورت با آنتی بادی ضد هیستیدین مورد بررسی قرار گرفت. همچنین بروش الیزا نیز ارزیابی کمی صورت پذیرفت [۱۶،۱۵،۶،۴].

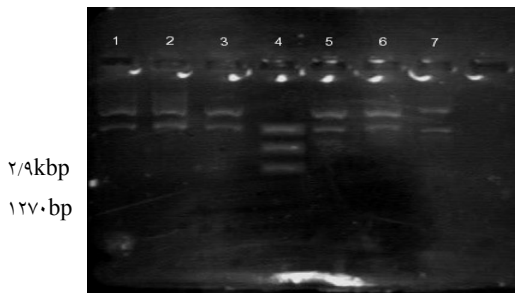
۲- ۴- تخلیص پروتئین بیان شده ژن بخش انتقال

دهنده سم بوتولینوم تیپ A

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

محصول PCR به وسیله ژل آگارز L.M.P الکتروفورز و بند مورد نظر توسط کیت تخلیص شد و مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. واکنش هضم آنزیمی به مدت ۱۰ ساعت در دمای 37°C انجام گرفت که علت طولانی بودن زمان هضم آن وجود آنزیم XhoI می باشد که یک آنزیم rare cutter می باشد. وکتور pRSETA به وسیله دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفت [۱۲] شکل (۴).

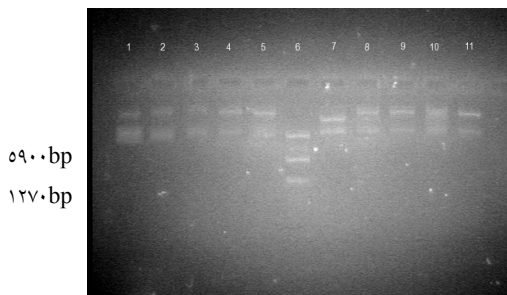
عمل الحاق ژنی در دمای 12°C و به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. سپس درون سلول میزبان مناسب تراریخت شد. نتیجه بررسی کلونها با روش هضم آنزیمی شکل (۴) نشان داده شده



است .

شکل ۴ آنالیز به وسیله هضم آنزیمی: ساب کلون ژن بخش انتقال دهنده بر روی وکتور pRSETA که با دو آنزیم BamHI و XhoI مورد هضم قرار گرفت.

– (۱،۲،۳،۵،۶،۷) وکتور pRSETA حاوی ژن مورد نظر که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفته 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 BamHI و XhoI مورد هضم قرار گرفت. – (۱،۲،۳،۵،۶،۷) وکتور pET32a حاوی ژن مورد نظر که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفته است. (۳) مارکر مولکولی pUC/ Taq

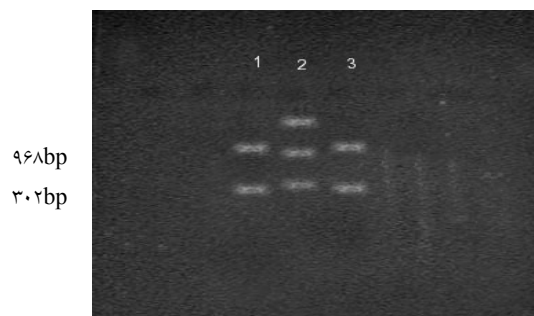


شکل ۱-۵ ایدیهای ۵ استخراج DNA کروموزومی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A را نشان می دهد)



شکل ۲ ایدیهای 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 روش PCR فراوان سازی شد محصول PCR بر روی ژل آگارز به همراه مارکر الکتروفورز شد قبل از انجام عمل همسانه سازی محصول PCR بر روش هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیم TaqI بررسی شد و قطعات ۹۶۸bp و ۳۰۲bp به دست آمد شکل (۳).



شکل ۳

شکل ۳ ایدیهای ۱،۳ برش محصول PCR ژن بخش انتقال دهنده به وسیله آنزیم TaqI ایدیهای ۲ مارکر وزن مولکولی pUC/TaqI

پروتئین حاصل از بیان ژن بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپ A هیدروفوب بوده به همین دلیل باید وکتوری را استفاده کرد که این پروتئین را به خوبی بیان کند، مطالعات و تجربیات بر روی وکتورهای مختلف مشخص کرد که سیستم pET شرایط لازم برای بیان این پروتئین را دارا می باشد [۱۷،۱۶،۴]. لذا برای بیان پروتئین ژن مورد نظر از روی دو وکتور pRSETA بر روی دو وکتور pET28a و pET32a سبب کلون شد. مشخصه بارز این وکتور پروموتور T7 می باشد که به وسیله LacI کنترل می شود. نکته دیگر یک سکانس ۳۰۰ نوکلئوتیدی در ابتدای MCS، pET32a موجود می باشد که سبب می شود یک پروتئین ۲۰ kD در ابتدای ژن کلون شده اضافه شود. پس از سبب کلون کردن بر روی وکتورهای pET28a و pET32a (شکل ۵ و شکل ۶) عمل ترادف یابی بر روی وکتور pET28a 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 پرایمر T7 فرا دست و فرو دست موجود بر روی وکتور pET28a خوانده شده است.)

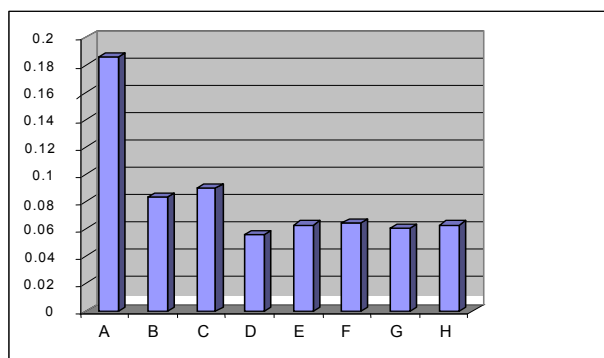
[ژن مورد نظر که به وسیله شرکت MWG-Biotech تعیین ترادف شده، در انتها آمده است].

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

پس از اطمینان از الحاق ژن مورد نظر با 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 30°C به دست آمد [۱۸،۱۶،۶]. 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. (نمودار ۱)

(G) کنترل + کونژوگه

(H) تست + کونژوگه



نمودار ۱

(A) تست + آنتی هیستیدین + کونژوگه

(B) کنترل + آنتی هیستیدین + کونژوگه

(C) تست + کونژوگه

(D) آنتی هیستیدین + کونژوگه

(E) کونژوگه

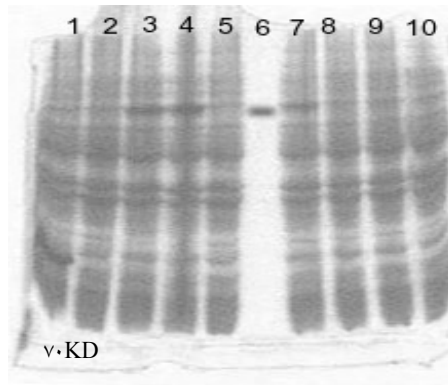
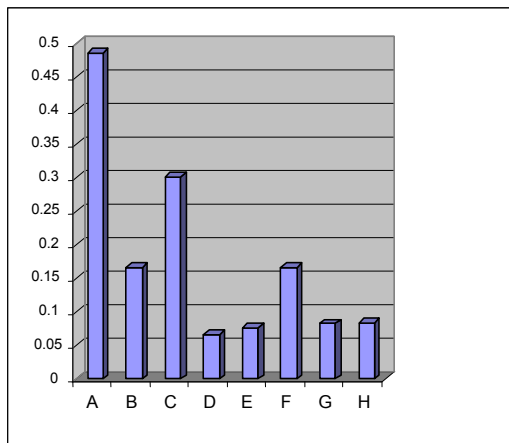
(F) آنتی هیستیدین

ولی بیان حاصل از pET32a به نسبت قوی بوده که با رنگ آمیزی کوماسی بلو قابل رویت بود (شکل ۶). قابل ذکر است که ژن بخش انتقال دهنده کلسترییدیوم بوتولینوم تیپ A 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 کیلوالتون می باشد. پروتئین تولید شده با وسترن بلائینگ و الیزا مورد آنالیز قرار گرفت و تائید شد (شکل ۷ و نمودار ۲ و ۳) لازم به ذکر است از آنجائیکه آنتی هیستیدین تهیه شده از شرکت کیاژن فقط برای اسید آمینه 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 (شکل ۷). عمل الیزا با آنتی بادی پلی کلونال آنتی بوتولینوم و آنتی هیستیدین انجام گرفت که وجود پروتئین بیان شده را تأیید می کند (نمودار ۲ و ۳).

۱- کلون شماره چهارم القا شده با IPTG ۲-) کنترل بدون القا با IPTG ۳-) نشانگر اندازه پروتئینی ۲۹ KD، ۴۵ KD،

۴۴

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



۲۰KD [شکل ۶ بررسی بیان کلونهای دیگر ژن بخش انتقال دهنده که بر روی وکتور pET32a کلون شده است] ۱-) بیان وکتور pET32a که به تنهایی القاء شده است.

۲-) کنترل: بدون القاء با IPTG

۳، ۴، ۵، ۷، ۸، ۹، ۱۰) تست: القاء با IPTG

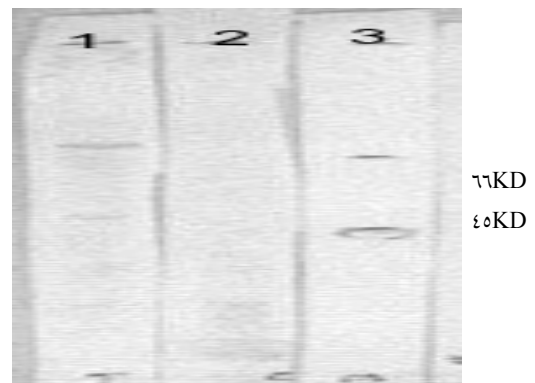
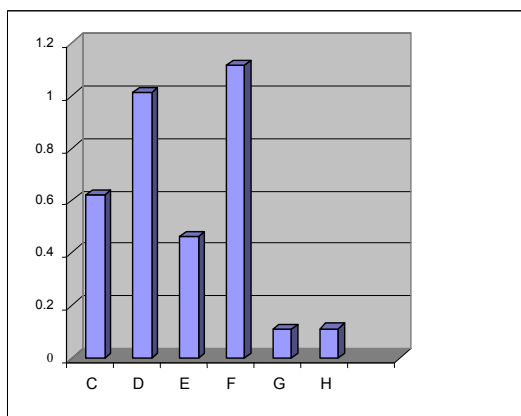
۶) نشانگر پروتئین: BSA: ۶۸ KD همانطور که مشاهده می‌شود کلونهای شماره ۳، ۴ و ۷ دارای بیان می‌باشند.

[نمودار ۲ الیزا انجام شده بر روی پروتئینهای حاصل از بیان بخش انتقال دهنده سم کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A که بر روی وکتور pET32a کلون شده است.]

(A) تست (وکتور pET32a 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



۷۰KD [شکل ۷ عمل وسترن بلاتینگ بر روی پروتئینهای حاصل از بیان ژن بخش انتقال دهنده بر روی وکتور pET32a کلون شده است.]

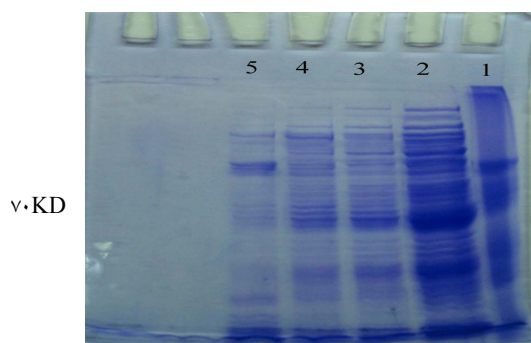
۳- ایمیدازول ۲۰ میلی مولار که از ستون عبور داده شده است.

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.



[نمودار ۳ 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

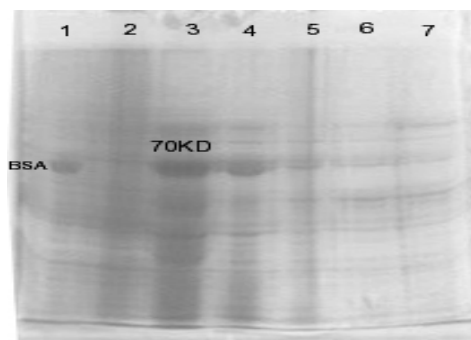
(E) کنترل (کلون ۲) + آنتی بوتولینوم + کونژوگه

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

(G) تست + کونژوگه (H) آنتی بوتولینوم + کونژوگه

۳-۲- تخلیص پروتئین بیان شده

پس از تأیید پروتئین بیان شده با روشهای وسترن بلائینگ و الیزا، تخلیص آن از طریق روش کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام گرفت که نتایج به دست آمده در شکل ۸ و ۹ به نمایش در آمده است.



[شکل ۹ مرحله دوم تخلیص ژن بخش انتقال دهنده سم بوتولینوم تیپ A توسط ستون Ni-NTA agarose resin]

(۱) نشانگر اندازه پروتئین BSA: ۶۸ 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.

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

(۱- نشانگر اندازه پروتئین BSA: ۶۸KD)

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

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 پروتئین با یک نشان هیستیدین و در یک مرحله به طور قابل قبولی جداسازی کنیم (۹). پس از جدا سازی ، محلول حاوی پروتئین خالص شده را بر علیه بافر ۱۰ میلی مولار فسفات دیالیز کرده تا ایمیدازول را از محلول پروتئین خارج سازیم .

همان طوری که 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 اندوزوم و نهایتاً حمل بخش کاتالیککی به وزن ۵۰ کیلو دالتون به داخل سیتوزول می شود . تا کتون تلاشهای زیادی برای درک مکانیزم عمل انتقال در سموم مختلف از جمله سم دیفتری ، ریسین و شیکا 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 وکتور pET28a کلون شده است این ژن به وسیله شرکت MWG-Biotech با پرایمر استاندارد T7 تعیین ترادف شده است.

<I23_002_t7.fasta

```
AGCGGATACATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGT
AACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCC
ATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCG
CGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACA
GCAAATGGGTGCGGATCCGCATTAATGATTTTAT
GTATCAAAGTTAATAATTGGGACTTGTTTTTTAGT
CCTTCAGAAGATAATTTTACTAATGATCTAAATAA
AGGAGAAGAAATTACATCTGATACTAATATAGAAG
```

(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 (شکل ۸) و در 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 قبلاً نیز به وسیله خانم کدخدائیان و آقای لیبی 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 پروتئین 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

1 . kadhodayan, k- lacy,D.B

```
CAGCAGAAGAAAATATTAGTTTATAGATTTAATACAA
CAATATTATTTAACCTTTAATTTTGATAATGAACC
TGAAAATATTTCAATAGAAAATCTTTCAAGTGACA
TTATAGGCCAATTAGAACTTATGCCTAATATAGAA
AGATTTTCCCTAATGGAAAAAAGTATGAGTTAGATAA
ATATACTATGTTCCATTATCTTCGTGCTCAAGAAT
TTGAACATGGTAAATCTAGGATTGCTTTAACAAAT
TCTGTTAACGAAGCATTATTAATCCTAGTCGTGT
TTATACATTTTTTTCTTCAGACTATGTAAAGAAAG
TTAATAAAGCTACGGAGGCAGCTATGTTTTTAGGC
TGGGTAGAACAATTAGTATATGATTTTACCGATGA
AACTAGCGAAGTAAGTACTACGGATAAAAATTGCGG
```


- combinant 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. New-York (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 comparison 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. High-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 bacteriocin active against clostridium botulinum. *Annual Report*. 1999; 13-21.
- [19]Tavalai M. Cloning, expression and purification of the gene coding binding domain of clostridium botulinum 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 immunological evaluation for oral vaccine A [PhD dissertation]: Pasture Institute. 1997;50-100.