

Cloning and Expression of the Catalytic Domain of Botulinum Neurotoxin Type E in E. coli

Hossein Rostami¹,
Seyed Jafar Moosavi²,
Firouz Ebrahimi²,
Abbas Hajizadeh³

¹ MSc Student in Cellular and Molecular Biology, Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

² Department of Biology, Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

³ Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

(Received April 28, 2012 ; Accepted January 9, 2013)

Abstract

Background and purpose: Clostridium botulinum bacteria produces seven types of botulinum neurotoxins among which types A, B, E and F are responsible for human botulism. One of the treatments for botulism is the inhibition of botulinum neurotoxins catalytic domain activity by inhibitors. In this study, botulinum neurotoxin type E catalytic domain has been cloned in pET28a vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3).

Materials and methods: In order to cloning of the catalytic domain, the genomic DNA was extracted. The sequence was amplified by Polymerase chain reaction (PCR) and was inserted into pGEM-T Easy vector. Then, the recombinant vector was transferred to *E. coli* DH5 α cells. Afterwards, the cloning product was removed from pGEM-T Easy vector and inserted into pET28a vector using ligation reaction. Finally, the recombinant pET28a was transferred into *E. coli* BL21 (DE3) cells. Expression of catalytic domain was studied in standard conditions.

Results: The results of enzymatic digestion and PCR reaction confirmed that cloning and subcloning occurred in pGEM-T Easy and pET28a vectors, respectively. The process was verified by sequencing. Finally, expression of this sequence was confirmed by the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis.

Conclusion: The cloning of the sequence was accurately conducted in pGEM-T Easy and pET28a vectors. Also, the results showed that the expression of this sequence has been performed properly.

Keywords: Botulinum neurotoxin type E, catalytic domain, cloning, expression

همسانه سازی و بیان ناحیه کاتالیتیک نورو توکسین بوتولینوم تیپ E در باکتری *E. coli*

حسین رستمی^۱
سید جعفر موسوی^۲
فیروز ابراهیمی^۲
عباس حاجی زاده^۳

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های کلاستریدیوم بوتولینوم هفت نوع نورو توکسین تولید می‌کنند که تیپ‌های A، B، E و F منجر به بوتولیسم در انسان می‌شوند. یکی از روش‌های درمانی بوتولیسم می‌تواند از طریق مهار فعالیت آنزیمی ناحیه کاتالیتیک نورو توکسین بوتولینوم توسط مهارکننده‌ها باشد. در این مطالعه، ناحیه کاتالیتیک نورو توکسین بوتولینوم تیپ E در وکتور بیانی pET28a همسانه‌سازی و در باکتری میزبان *E. coli* سویه BL21(DE3) بیان شده است.

مواد و روش‌ها: به منظور همانندسازی ناحیه مورد نظر، DNA ژنومی باکتری استخراج گردید. با استفاده از واکنش PCR توالی مورد نظر تکثیر شد. سپس محصول PCR در وکتور pGEM-T Easy وارد و وکتور نو ترکیب به سلول‌های میزبان *E. coli* سویه DH5 α منتقل گردید. سپس با واکنش الحاق محصول همسانه‌سازی شده از وکتور pGEM-T Easy به وکتور بیانی pET28a منتقل شد. در نهایت پلاسمید نو ترکیب pET28a به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) انتقال داده شد. بیان ناحیه کاتالیتیک در شرایط استاندارد مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از برش آنزیمی و واکنش PCR بیانگر همانندسازی و زیر همانندسازی به ترتیب در وکتورهای pGEM-T Easy و pET28a بود. نتایج تعیین توالی نیز صحت حضور توالی مورد نظر را تأیید کرد. در نهایت بیان قطعه مورد مطالعه، با استفاده از ژل SDS-PAGE و آزمایش وسترن بلات تأیید گردید.

استنتاج: همسانه‌سازی توالی مورد مطالعه، به ترتیب در وکتورهای pGEM-T Easy و pET28a با صحت کامل انجام گرفت. همچنین نتایج بیان و تأیید محصول بیانی در باکتری *E. coli* BL21(DE3) بیانگر صحت بیان محصول مورد نظر بود.

واژه‌های کلیدی: نورو توکسین بوتولینوم تیپ E، ناحیه کاتالیتیک، همسانه‌سازی، بیان

مقدمه

کلاستریدیوم بوتولینوم یک باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی و باسیلی شکل است. این باکتری دارای هفت تیپ توکسین شامل تیپ‌های A، B، C، D، E، F و G بوده که در بین آن‌ها تیپ‌های A، B، E و به ندرت F بوده که در بین آن‌ها تیپ‌های A، B، E و به ندرت F

بوتولیسم یک سندروم بسیار خطرناک است که به اشکال مختلف با منشاء غذایی، ناشی از زخم، و بوتولیسم نوزادان مشاهده می‌شود. این سندروم در اثر آلوده شدن به نورو توکسین تولید شده توسط دسته‌ای از باکتری‌های جنس کلاستریدیا ایجاد می‌شود.

مؤلف مسئول: سید جعفر موسوی - تهران: بزرگراه شهید بابایی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه E-mail: jmousavy@yahoo.com

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران، تهران، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران، تهران، ایران

۳. مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۱/۵/۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۹/۲۰

ایجاد فلج شل (فلج سست شونده) می‌گردد (۸،۷). مبنای درمان بوتولیسم، مراقبت‌های بهداشتی و ایمونیزاسیون غیر فعال با آنتی‌توکسین اسبی است. در حال حاضر آنتی‌توکسین اسبی سه ظرفیتی (Anti-A, B, E) در ایالات متحده آمریکا دارای مجوز رسمی از CDC بوده، در دسترس است که بعد از در معرض قرار گرفتن سم می‌توان از آن استفاده کرد. تزریق زود هنگام و بموقع این آنتی‌توکسین، از ادامه تخریب و آسیب‌های عصبی و شدت بیماری جلوگیری می‌کند اما نمی‌تواند فلج ایجاد شده را احیاء نماید (۹). استفاده از این آنتی‌سرم‌ها دارای محدودیت درمانی می‌باشد لذا محققین در سال‌های اخیر توجه خاصی به استفاده از مهارکننده‌هایی دارند که بتوانند بعد از ورود توکسین به سلول، فعالیت کاتالیتیک زنجیره سبک را مهار کنند. با توجه به تحقیقات انجام گرفته، طراحی و ساخت مهارکننده‌های مناسب علیه فعالیت زنجیره سبک نورو توکسین بوتولینوم، می‌تواند در آینده منجر به تولید داروی مؤثرتری برای درمان بیماران مبتلا به بوتولیسم گردد (۱۵-۱۰).

Grant و همکاران (۲۰۰۶) از مولکول‌های کوچک غیر پپتیدی به منظور مهار فعالیت زنجیره سبک نورو توکسین بوتولینوم تیپ A استفاده کردند که نتایج قابل قبولی در مهار فعالیت سم به دست آمد (۱۶). Kumaran و همکاران (۲۰۰۸) از مهارکننده‌های تتراپپتیدی به منظور اتصال به جایگاه فعال سم تیپ A استفاده کردند (۱۱).

Roxas-Duncan و همکاران (۲۰۰۹) از مشتقات مولکول کوچک کوینولینول (Quinololinol) به عنوان مهارکننده فعالیت بخش آنزیمی نورو توکسین تیپ A استفاده کردند که نتایج مثبتی در مهار سم به دست آمد (۱۷). Kumar و همکاران (۲۰۱۲) از مهارکننده‌های پپتیدی جدیدی برای مهار فعالیت آنزیمی تیپ A استفاده کردند (۱۸).

برای انسان مسمومیت‌زا هستند و بیماری بوتولیسم ایجاد می‌کنند (۲،۱). بوتولیسم در نقاط مختلف دنیا گزارش شده است و یک مشکل سلامت عمومی در بسیاری از کشورها از جمله ایران می‌باشد (۴،۳). به طوری که طبق گزارش توکلی و همکاران (۱۳۸۸) در یک دوره ۵ ساله (۱۳۸۶-۱۳۸۲) ۳۴۱ مورد مشکوک به مسمومیت غذایی بوتولیسم در ۱۱ استان (کردستان، گلستان، زنجان، گیلان، تهران، مرکزی، قزوین، آذربایجان شرقی و غربی، همدان و خراسان) ایران ثبت گردید. از ۴۰ مورد تعیین تیپ شده، تیپ E با ۱۳ مورد (۳۲/۵ درصد) و تیپ A با ۱۱ مورد (۲۷/۵ درصد) به عنوان شایع‌ترین تیپ‌های ایجادکننده مسمومیت غذایی بوتولیسم در ایران مطرح هستند. در این گزارش مشخص گردید که موارد وقوع بیماری در سه سال پایانی روبه افزایش بوده است، به طوری که تعداد موارد وقوع مسمومیت غذایی بوتولیسم در سال ۱۳۸۶ حدود ۲/۱ برابر سال ۱۳۸۲ بوده است (۴). بنابراین تلاش در زمینه پیشگیری و درمان بوتولیسم در ایران امری ضروری به نظر می‌رسد. توکسین باکتری یک پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۱۵۰ کیلو دالتون است. این پروتئین توسط پروتئازهای خود باکتری یا سلول میزبان به دو زنجیره سنگین (۱۰۰ کیلو دالتون) و سبک (۵۰ کیلو دالتون) شکسته می‌شود. زنجیره سبک با یک پیوند دی‌سولفیدی به زنجیره سنگین متصل می‌شود. زنجیره سنگین در انتهای آمینی (N-terminal) دارای ناحیه انتقال دهنده (Translocation domain (TD) و در انتهای کربوکسیلی (C-terminal) دارای ناحیه اتصال دهنده می‌باشد زنجیره سبک توکسین بوتولینوم (ناحیه کاتالیتیک) یک متالوپروتئاز می‌باشد که با شکستن یکی از سه پروتئین کمپلکس SNARE^۱ (سیناپتورین، SNAP25^۲) و سینتاکسین (Syntaxin) مانع ترشح استیل کولین در انتهای سلول‌های اعصاب حرکتی شده، در نتیجه موجب

1. Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor
2. Synaptosomal-associated protein, 25kDa

مواد و روش‌ها

تکثیر توالی نوکلئوتیدی کدکننده ناحیه کاتالیتیک با روش PCR

ابتدا توالی نوکلئوتیدی کدکننده زنجیره سبک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E با شماره دسترسی GQ244314 از بانک ژن استخراج شد. توالی زنجیره سبک شامل ۱۲۶۳ جفت باز ابتدای توالی کدکننده نوروتوکسین (که در بانک ژنوم به ثبت رسیده است) می‌شود که ۴۲۱ اسید آمینه را کد می‌کند. طراحی پرایمر با نرم افزار Oligo انجام گرفت و توسط شرکت سیناژن ایران سنتز شد. پرایمر بالادست دارای جایگاه برشی آنزیم محدودالایتر Nde I و پرایمر پایین دست دارای جایگاه برشی آنزیم محدودالایتر Hind III است:

توالی پرایمر بالادست:

5'-ATCCATATGATGCCAAAATAATAGTT-3'

توالی پرایمر پایین دست:

5'-ACAAAGCTTTTATTTCCCTTATGCCTTTTAC-3'

باکتری کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E از پژوهشکده کولوژی دریای خزر تهیه شد و در محیط کشت Cooked Meat مایع در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت، DNA ژنومی آن با استفاده از روش فنل کلروفرم تخلیص گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) معمولی به منظور تکثیر DNA با آنزیم Taq پلیمرز (سیناژن، ایران)، در حجم ۲۵ میکرو لیتر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (بیوراد، امریکا) انجام گرفت. هر واکنش شامل ۳ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۴ پیکومول از هر پرایمر، ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار dNTPs و ۲/۵ میکرو لیتر بافر 10X PCR، در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد بهینه شد. به منظور جلوگیری از ایجاد جهش در توالی ژنومی واکنش نهایی PCR با استفاده از آنزیم pfu پلیمرز (فرمنتاز، اکرابین) در حجم

Kukreja و همکاران (۲۰۱۰) طی آزمایشات خود اساس مولکولی فعالیت اندوپیتیدازی نوروتوکسین تیپ E را مشخص کردند (۱۹). بیشتر تحقیقات انجام شده در زمینه استفاده از مهارکننده علیه فعالیت نوروتوکسین تیپ A بوده، تحقیقات مشابه انجام گرفته در خصوص تیپ E خیلی کمتر می‌باشد. بررسی مقالات منتشر شده در این زمینه نشان می‌دهد که تاکنون مهارکننده مناسبی که بتوان از آن به منظور درمان بوتولیسم استفاده کرد، طراحی و تولید نشده است. در آزمایشات بررسی اثر و پتانسیل مهارکننده‌های طراحی شده توکسین فعال مورد نیاز است که تهیه آن از باکتری کلستریدیوم بوتولینوم مشکلات خاص خود را دارد. از طرفی تحقیقات در این زمینه نشان داده است که ناحیه کاتالیتیک سم (زنجیره سبک) به تنهایی و بدون حضور زنجیره سنگین در شرایط بافری مناسب، فعالیت آنزیمی خود را حفظ کرده، سوبسترای خود را می‌شکند (۱۱). تولید نوترکیب بخش آنزیمی توکسین (زنجیره سبک) دارای مزیت‌هایی است و مشکلات استفاده از توکسین تخلیص شده از باکتری را ندارد.

Agarwal و همکاران (۲۰۰۴) به منظور تعیین ساختار ناحیه کاتالیتیک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E اقدام به بیان نوترکیب این پلی‌پپتید کردند. ناحیه مذکور را در وکتور pET32 به خوبی بیان و تخلیص کرده، نشان دادند که پلی‌پپتید نوترکیب تولید شده بدون حضور دیگر نواحی سم دارای فعالیت آنزیمی می‌باشد (۲۰). با توجه به فراوانی بالای آلوده شدن به توکسین تیپ E در کشور و عدم وجود داروی مؤثر بدون محدودیت‌های اشاره شده در بالا، همسان‌سازی و بیان نوترکیب ناحیه کاتالیتیک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در این تحقیق مورد توجه قرار گرفت که می‌تواند در مطالعات بعدی، در زمینه طراحی و ساخت مهارکننده مناسب علیه آن مورد استفاده قرار گیرد.

برش با استفاده از ژل آگارز با دمای ذوب پایین (Low melting) و کیت استخراج از ژل (Bioneer، کره جنوبی) تخلیص گردیدند.

واکنش الحاق توالی مورد نظر با وکتور pET28a(+) برش خورده با آنزیم T4 لیگاز (تاکارا، ژاپن) در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد انجام گرفت. محصول واکنش الحاق به سلول‌های مستعد E. coli سویه BL21 DE3 به روش شوک حرارتی انتقال داده شد و باکتری‌ها روی محیط کشت لوریا برتونی آگار دار (LB Agar) حاوی کانامایسین (غلظت ۸۰ µg/ml) کشت داده شدند. به منظور تأیید همسانه‌سازی توالی مورد نظر، کلنی‌های موجود، در محیط LB مایع حاوی کانامایسین (۸۰ µg/ml) کشت داده شدند و با روش لیز قلیایی استخراج پلاسمید انجام گرفت. برای پلاسمیدها واکنش PCR مطابق شرایط تکثیر اولیه توالی گذاشته شد و سپس برای پلاسمیدهای PCR مثبت، واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی Nde I و Hind III به مدت ۴ ساعت انجام شد (۲۲).

بررسی و تأیید بیان پروتئین

توالی مورد نظر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت ۵ ساعت، تحت القای IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) با غلظت ۱ میلی مولار بیان شد. از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد برای تأیید صحت بیان استفاده گردید (۲۲). برای تأیید پروتئین نو ترکیب بیان شده، از تکنیک ایمونوبلات با آنتی سرم ضد بوتولینوم تیپ E به شرح زیر استفاده شد: پس از جداسازی باندهای پروتئینی نمونه بر روی ژل SDS-PAGE، این باندها با کمک سیستم وسترن بلات (Blotting Western) با بافر الکتروبلات (گلایسین ۱۵ میلی مولار، تریس ۲۰ میلی مولار و متانول ۲۰ درصد) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. کاغذ نیتروسولوز به مدت ۱۵ ساعت در بافر PBST (Phosphate Buffer Saline, 5% Tween-20) حاوی

۲۵ میکرو لیتر انجام گرفت. واکنش PCR شامل ۵ میلی مولار MgSO₄، ۴ پیکومول از هر پرایمر، ۵۰ نانوگرم از DNA الگو، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و ۲/۵ میلی لیتر از بافر PCR 10X در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی گراد بود. مراحل PCR شامل: مرحله واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، دوره سه مرحله‌ای شامل واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها به رشته الگو در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در پایان مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. محصول PCR با ژل آگارز یک درصد مورد تأیید قرار گرفت. محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص DNA فرمتناز خالص سازی شد (۱۹).

همسانه‌سازی و زیر همسانه سازی

برای محصول تخلیص شده PCR و وکتور pGEM-T Easy واکنش الحاق گذاشته شد. محصول واکنش الحاق، به سلول‌های مستعد E. coli سویه DH5α به روش شوک حرارتی انتقال داده شد و باکتری‌ها روی محیط کشت مک کانکی آگار دار (Mac-Conky Agar) حاوی آمپی سیلین (غلظت ۸۰ µg/ml) کشت داده شدند (۲۱). برای تأیید همسانه‌سازی توالی مورد نظر از کلنی‌های سفید رنگ، کشت داده شد و با روش لیز قلیایی استخراج پلاسمید صورت گرفت. برای پلاسمیدها واکنش PCR مطابق شرایط تکثیر اولیه توالی گذاشته شد. سپس برای پلاسمیدهای PCR مثبت، واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی Nde I و Hind III (فرمتناز، اکراین) به مدت ۴ ساعت انجام شد. تأیید نهایی با تعیین توالی قطعه مورد نظر (سیناکلون، ایران) انجام گرفت.

پلاسمید نو ترکیب pGEM-T Easy حاوی توالی مورد نظر و همچنین وکتور pET28a(+) با آنزیم‌های محدودالثر Nde I و Hind III به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برش داده شدند. محصولات

Taq و pfu (تصاویر شماره ۱ الف و ب) نشان داد این قطعه به خوبی تکثیر پیدا کرده است. همچنین نتیجه تخلیص آن با کیت نیز خوب بود (تصویر شماره ۱ ج).

همسان‌سازی در وکتور pGEM-T Easy

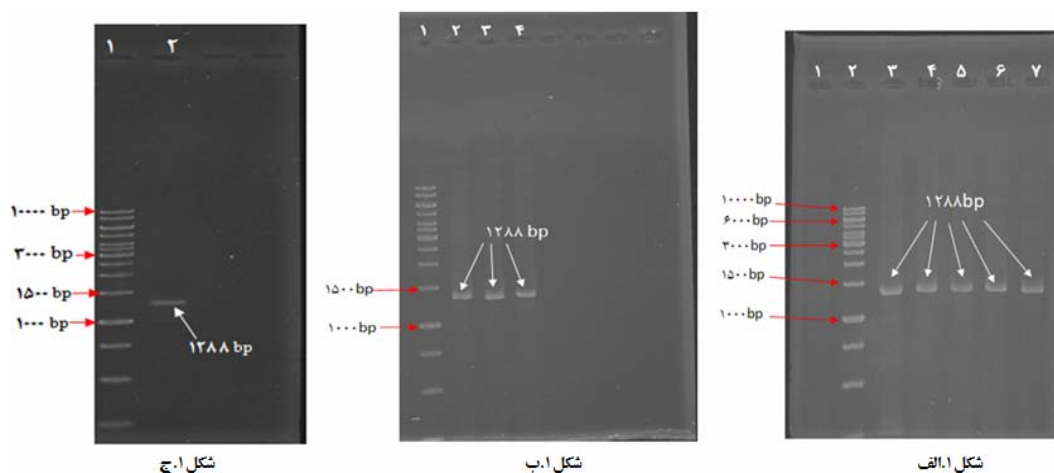
نتیجه همسان‌سازی در وکتور pGEM-T Easy که در تصویر شماره ۲ الف آمده است بیانگر موفقیت آمیز بودن همسان‌سازی ژن مورد مطالعه بود.

همچنین برش وکتور pGEM نوترکیب به وسیله آنزیم‌های Nde I و Hind III به علت وجود دو جایگاه برش در وکتور که در دو سوی قطعه حضور دارند، قطعه مورد نظر از وکتور خارج شده، در ژل الکتروفورز یک باند مجزا تشکیل داد. همچنین هضم تک آنزیمی توسط NdeI انجام شد که در نتیجه پلاسمید نوترکیب به صورت خطی درآمد (تصاویر شماره ۲ ب و ج). در نهایت صحت همسان‌سازی با تعیین توالی قطعه تأیید شد.

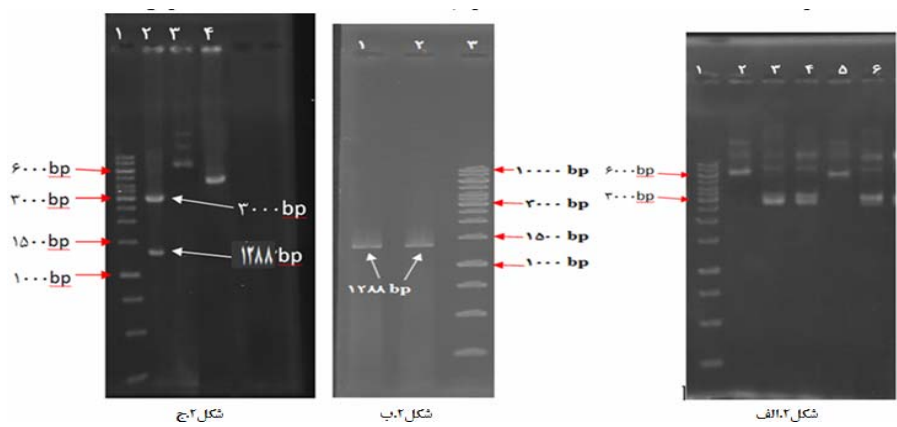
۵ درصد شیرخشک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از مرحله شست و شو (سه بار با بافر PBST) کاغذ نیتروسلولز، با آنتی‌بادی ضد بوتولینوم تیپ E، با رقت نهایی ۱:۳۰۰۰ در بافر PBST به مدت یک ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در مرحله بعد، کانزوگه اسبی با رقت ۱:۱۰۰۰۰ اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور قرار داده شد. در مرحله آخر بعد از شستشو برای آشکارسازی باند مورد نظر از ۱۰ میلی‌لیتر بافر آشکارساز (تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۶ میلی‌گرم دی‌آمینو بنزوئیدین و ۱۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه) استفاده شد. بعد از آشکارسازی باند مورد نظر واکنش با آب مقطر متوقف گردید (۲۳).

یافته ها

تکثیر توالی کدکننده ناحیه کاتالیتیک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E با PCR بررسی نتایج تکثیر قطعه مورد نظر با آنزیم‌های



تصویر شماره ۱ الف: تصویر محصول واکنش PCR ناحیه کاتالیتیک با آنزیم TaqDNA polymerase (۱۲۸۸ bp) روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ کنترل منفی بوده و همه مواد واکنش PCR را دارا بوده و از DNA ژنومی تیپ A به عنوان الگو استفاده شده است. چاهک ۲ مارکر DNA و چاهک‌های ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ نتایج واکنش PCR به ترتیب در دماهای اتصال ۵۰، ۵۲، ۵۴، ۵۶ و ۵۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. ب: تصویر محصول واکنش PCR ناحیه کاتالیتیک با آنزیم Pfu DNA polymerase (۱۲۸۸ bp) روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ مارکر DNA و چاهک‌های ۲، ۳ و ۴ نتایج واکنش PCR به ترتیب در دماهای اتصال ۵۴، ۵۶ و ۵۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. ج: تصویر محصول تخلیص شده از روی ژل با دمای ذوب پایین. چاهک ۱ مارکر DNA و چاهک ۲ محصول PCR تخلیص شده می‌باشد.

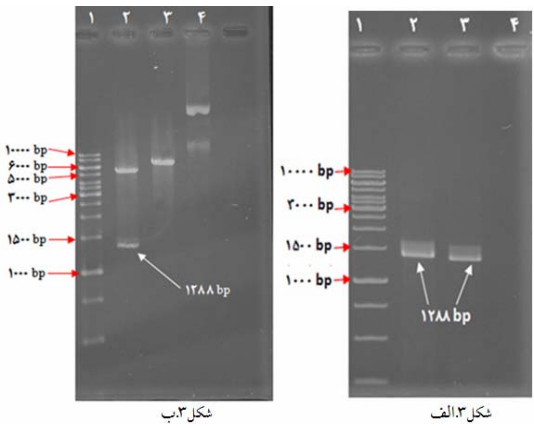


تصویر شماره ۲ الف: تصویر الکتروفورز پلاسمیدهای pGEM تخلیص شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد پس از فرایند تخلیص پلاسمید. چاهک ۱ مارکر DNA و چاهک‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ پلاسمیدهای تخلیص شده کلنی‌های مختلف است. در این شکل الگوی قرارگیری پلاسمیدهای چاهک ۲ و ۵ با بقیه تفاوت دارد و احتمال حضور قطعه در آن‌ها خیلی بالا است. ب: تصویر نتایج PCR و کتور pGEM جهت بررسی و تایید همسانه‌سازی در کلنی‌های نوترکیب روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک‌های ۱ و ۲ نتیجه PCR مثبت دو کلنی می‌باشد. چاهک ۳ مارکر DNA است. ج: تصویر نتایج برش آنزیمی و کتور pGEM جهت بررسی و تایید همسانه‌سازی قطعه مورد مطالعه روی ژل آگارز ۱ درصد چاهک ۱ مارکر DNA، چاهک ۲ هضم آنزیمی و کتور با دو آنزیم Nde I و Hind III، چاهک ۳ و کتور pGEM حاوی قطعه و چاهک ۴ هضم تک آنزیم و کتور pGEM حاوی قطعه ما را توسط آنزیم NdeI نشان می‌دهد.

(تصویر شماره ۴ الف). در نهایت بیان توالی مورد نظر به کمک روش ایمونوبلات با آنتی‌بادی‌های نورو توکسین بوتولینوم تیپ E تأیید گردید (تصویر شماره ۴ ب).

pET28a در وکتور

پس از تخلیص توالی نوکلئوتیدی و pET28a برش خورده با استفاده از ژل با دمای ذوب پایین و کیت تخلیص از ژل، واکنش الحاق گذاشته شد. سپس محصول واکنش الحاق به سلول‌های مستعد BL21 DE3 منتقل گردید. پس از کشت کلنی‌های به دست آمده در محیط LB مایع و تخلیص پلاسمید، صحت زیر همسانه‌سازی با روش واکنش PCR و هضم آنزیمی تأیید شد (تصاویر شماره ۳ الف و ۳ ب).



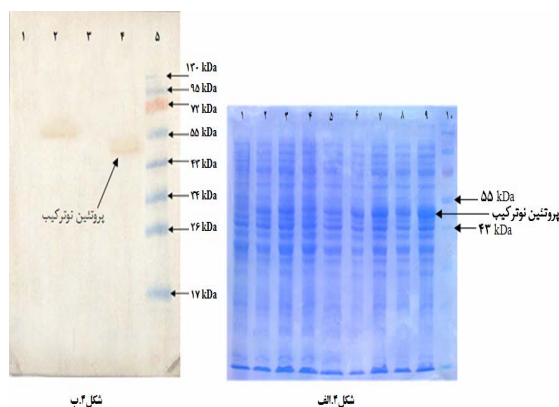
تصویر شماره ۳ الف: تصویر نتایج PCR و کتور pET28a جهت بررسی و تأیید زیرهمسانه‌سازی در کلنی‌های نوترکیب روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ مارکر DNA است. چاهک‌های ۲ و ۳ نتیجه PCR مثبت دو کلنی می‌باشد. چاهک ۴ کنترل منفی است کنترل منفی بوده و همه مواد واکنش PCR را دارا بوده به جز pET28a نوترکیب، که هم حجم آن آب مقطر به مواد واکنش اضافه شد. ب: تصویر نتایج برش آنزیمی و کتور نوترکیب pET28a روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ مارکر DNA، چاهک ۲ برش آنزیمی دوگانه و کتور

بررسی بیان و تأیید پروتئین بیانی

بعد از کشت کلنی در محیط LB مایع و القاء با IPTG سلول‌ها جمع‌آوری شدند. با اضافه کردن بافر لیزکننده به سلول‌های جمع‌آوری شده و انجام سونیکاسیون، ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون حاصل برداشته شد و با بافر نمونه مخلوط و پس از جوشانده شدن بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد، الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو نشان داد که پروتئینی هدف به میزان قابل توجه بیان شده است

خصوص که توالی مورد نظر دارای مقادیر GC پایین و کدون‌های نادر می‌باشد. اما با وجود این مشکلات توالی مورد مطالعه به خوبی در باکتری میزبان *E. coli* BL21 (DE3) بیان شد. به نظر می‌رسد وجود یا عدم وجود کدون‌های نادر در ابتدای توالی نقش تعیین کننده‌ای در بیان آن داشته باشد و در صورت عدم حضور کدون‌های نادر برای چند اسید آمینه ابتدایی توالی، مشکل جدی برای بیان آن ایجاد نکند. در توالی کدکننده ناحیه کاتالیتیک نورو توکسین بوتولینوم تیپ E، برای ۱۵ اسید آمینه ابتدایی آن کدون نادر وجود ندارد و با احتساب کدون‌های برجسب هیستیدین و کدون‌های ناحیه حفاصل برجسب هیستیدین تا کدون آغاز توالی، در مجموع برای ۳۵ اسید آمینه ابتدایی پلی پپتید مذکور کدون نادر وجود ندارد. به نظر می‌رسد این پارامترها باعث شده است تا با وجود کدون‌های نادر پشت سر هم بخش‌های میانی، توالی مورد مطالعه به خوبی بیان شود. Agarwal و همکاران (۲۰۰۴) به منظور تعیین ساختار ناحیه کاتالیتیک نورو توکسین بوتولینوم تیپ E اقدام به بیان نوترکیب پلی پپتید مذکور کردند. به نظر می‌رسد با توجه به نتیجه مثبت بررسی فعالیت آنزیمی توالی مورد مطالعه در گزارش Agarwal و همکاران، پروتئین نوترکیب تولید شده در این تحقیق نیز دارای فعالیت آنزیمی باشد (۲۰). آنتی توکسین‌های موجود با مجوز CDC، دارای محدودیت‌هایی از نظر دسترسی بوده، هزینه استفاده از آن‌ها بالا است. همچنین آنتی توکسین تنها تا قبل از اتصال سم به رسپتور خود در پایانه سلول عصبی و در مدت زمانی که توکسین در جریان خون باشد مؤثر است. بنابراین استفاده از این داروها دارای محدودیت درمانی می‌باشد و تنها در صورتی مؤثر خواهند بود که در یک بازه زمانی محدود (کمتر از ۱۲ ساعت) بعد از تظاهر بالینی اولیه علائم بوتولیسم استفاده شوند. در چند سال اخیر تحقیقات گسترده‌ای در جهت استفاده از مهارکننده‌هایی که بتوانند بعد از اتصال و ورود توکسین به سلول فعالیت کاتالیتیک زنجیره سبک را مهار کنند، انجام گرفته است.

نوترکیب pET28a با آنزیم‌های *Hind* III و *Nde* I، چاهک ۳ برش تک آنزیم و کتور نوترکیب pET28a با *Hind* III و چاهک ۴ و کتور نوترکیب pET28a تخلیص شده را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۴ الف: تصویر نتیجه الکتروفورز پروتئین بیان شده با استفاده از روش دناتورده روی SDS-PAGE ۱۲ درصد. ستون ۱: باکتری لیز شده حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a پیش از القاء با ماده IPTG، ستون ۲ و ۳: باکتری لیز شده کلونی شماره ۱ حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a به ترتیب ۳ و ۱۶ ساعت پس از القاء، ستون ۴ و ۵: باکتری لیز شده کلونی شماره ۲ حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a به ترتیب ۳ و ۱۶ ساعت پس از القاء، ستون ۶ و ۷: باکتری لیز شده کلونی شماره ۳ حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a به ترتیب ۳ و ۱۶ ساعت پس از القاء، ستون ۸ و ۹: باکتری لیز شده کلونی شماره ۴ حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a به ترتیب ۳ و ۱۶ ساعت پس از القاء، ستون ۱۰: نشانگر وزن پروتئین. **ب:** تصویر وسترن بلات ناحیه کاتالیتیک نوترکیب نورو توکسین بوتولینوم تیپ E. ستون ۱: نمونه کنترل منفی (پروتئین BSA). ستون ۲: نمونه کنترل مثبت (پلی پپتید نوترکیب ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین بوتولینوم تیپ E که دارای اپی توپ‌های قابل شناسایی توسط آنتی‌بادی استفاده شده می‌باشد). ستون ۳: نمونه کنترل منفی (محتوی پروتئینی باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب که با ماده IPTG القاء نشده‌اند). ستون ۴: نمونه پروتئین نوترکیب (ناحیه کاتالیتیک نورو توکسین بوتولینوم تیپ E) بلات شده. ستون ۵: نشانگر پروتئینی.

بحث

جهت همسان‌سازی توالی مورد مطالعه از وکتور pGEM-T Easy استفاده گردید. مزیت استفاده از این وکتور این است که نیازی به برش محصولات PCR برای الحاق به وکتور نمی‌باشد. به دلیل بیان هترولوگ، پیش‌بینی می‌شد میزان بیان خیلی ضعیف باشد. به

سم طراحی و ساخته می‌شوند بنابراین تولید سریع و کافی بخش کاتالیتیک سم به منظور بررسی عملکرد انواع مهارکننده‌ها روی فعالیت آنزیمی آن می‌تواند روند تحقیقات در این زمینه را تسریع کند لذا پلی‌پپتید نو ترکیب بیان شده در این تحقیق (که برای اولین بار در ایران انجام گرفته است) حائز اهمیت است و می‌تواند در تحقیقات بعدی جهت بررسی عملکرد انواع مهارکننده روی فعالیت آن، مورد استفاده قرار گیرد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بر اساس نتایج به دست آمده، تکثیر ژن از باکتری کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E و همسانه‌سازی آن در وکتور pGEM-T Easy و زیرهمسانه‌سازی آن در وکتور بیانی pET28a با صحت کامل انجام گرفت. همچنین نتایج بیان و تأیید صحت بیان، نشان داد که توالی مورد نظر در باکتری *E. coli* BL21 (DE3) به خوبی بیان شده است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کمک‌های بی‌شائبه‌ی دکتر علی هاتف سلمانیان دانشیار محترم بخش زیست فن آوری پژوهشگاه ملی ژنتیک ایران و همکاران محترم ایشان تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از زحمات مهندس رضا صفری کارشناس ارشد میکروبیولوژی پژوهشگاه اکولوژی دریای خزر مؤسسه تحقیقات شیلات ایران تشکر و قدردانی می‌گردد. این تحقیق حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد زیست‌شناسی گرایش علوم سلولی-مولکولی حسین رستمی در دانشگاه جامع امام حسین (ع) می‌باشد

از جمله، Adler و همکارانش (۲۰۰۸) طی یکسری آزمایشات اعصاب فرینک موش را جدا کرده، به ترتیب در معرض نوروتوکسین‌های تیپ A، B و E قرار دادند سپس اعصاب آلوده شده را با TSN (Toosendanin) (مشتق تری‌ترپونوئیدی که از پوست و میوه درختی به نام *Melia toosendan in* به دست می‌آید) تیمار کردند. نتایج به دست آمده، نشان داد که TSN اثر قابل ملاحظه‌ای در مهار عملکرد توکسین‌های هر سه تیپ A، B و E دارد. نتایج حاصل از این تحقیقات نشان داد که TSN پتانسیل کاندید شدن به عنوان یک داروی درمان کننده بوتولیسم را دارد و در مقایسه با آنتاگونیست‌ها (Antagonist) که قبلاً استفاده شده بود، عملکرد بهتری دارد (۲۴).

Lai و همکاران (۲۰۰۹) با انتشار نتیجه تحقیقات خود بیان کردند که مشتقات ماده کویونولینول دارای اثر مهاری بر روی فعالیت زنجیره سبک تیپ A می‌باشند (۲۵). تحقیقات دیگری نیز اخیراً در این زمینه انجام گرفته است اما هنوز مهارکننده مناسبی که ویژگی‌های لازم برای مهار فعالیت زنجیره سبک توکسین و درمان بوتولیسم را داشته باشد، طراحی و تولید نشده است علاوه بر آن بیشتر این تحقیقات بر روی زنجیره سبک تیپ‌های A و B انجام گرفته، تحقیقات محدودی در مورد تیپ E در این زمینه صورت گرفته است. از طرفی با توجه به اهمیت و فراوانی تیپ E در ایران، تولید داروی مناسب برای درمان بوتولیسم ناشی از آن ضروری است. بیشتر داروهای مهارکننده فعالیت توکسین در واقع علیه بخش آنزیمی (ناحیه کاتالیتیک)

References

1. van Ermengem E. A New Anaerobic Bacillus and Its Relation to Botulism. *Reviews of Infectious Diseases* 1979; 1(4): 701-719.
2. Dembek ZF, Smith LA, Rusnak JM. Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. *Disaster Med Public Health Pre* 2007; 1(2): 122-134.
3. Aoki KR. Future aspects of botulinum neurotoxins. *J Neural Transm* 2008; 115(4): 567-573.
4. Tavakoli HR, Zeynali M, MehrabiTavana

- A. Scrutiny of Food-Borne Botulism Intoxication in Iran during 2003-2007 with the Food Hygiene View Point. *Hakim* 2009; 11(4): 38-46.
5. Werner E, Cowden M. Botulism in European Unions. *Euro Surveillance monthly archives* 2003; 4: 112-117.
6. Sobel J, Tucker N, Sulka A, McLaughlin J, Maslanka S. Foodborne Botulism in the United States, 1990-2000. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(9): 1606-1611.
7. Aoki KR. Botulinum toxin: a successful therapeutic protein. *Curr Med Chem* 2004; 11(23): 3085-3092.
8. Emmeluth D. Botulism. 2nd ed. New York: Chelsea House; 2010.
9. Sobel J. Botulism. *Clin Infect Dis* 2005; 41(8): 1167-1173.
10. Burnett JC, Wang C, Nuss JE, Nguyen TL, Hermone AR, Schmidt JJ, et al. Pharmacophore-guided lead optimization: The rational design of a non-zinc coordinating, sub-micromolar inhibitor of the botulinum neurotoxin serotype A metalloprotease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009; 19(19): 5811-5813.
11. Kumaran D, Rawat R, Ludivico M, Ahmed S, Swaminathan S. Structure- and substrate-based inhibitor design for Clostridium botulinum neurotoxin serotype A. *J Biol Chem* 2008; 283(27): 18883-18891.
12. Yiadom KP, Muhie S, Yang DC. Peptide inhibitors of botulinum neurotoxin by mRNA display. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335(4): 1247-1253.
13. Dickerson T, Janda K. The use of small molecules to investigate molecular mechanisms and therapeutic targets for treatment of botulinum neurotoxin A intoxication. *ACS Chem. Biol* 2006; 1(6): 359-369.
14. Capkova K, Hixon MS, McAllister LA, Janda KD. Toward the discovery of potent inhibitors of botulinum neurotoxin A: development of a robust LC MS based assay operational from low to subnanomolar enzyme concentrations. *Chem. Commun* 2008; 14(30): 3525-3527.
15. Capkova K, Salzameda NT, Janda KD. Investigations into small molecule non-peptidic inhibitors of the botulinum neurotoxins. *Toxicon* 2009; 54(5): 575-582.
16. Grant E, Boldt Lisa M, Eubanks and Kim D. Boldt GE, Eubanks LM, Janda KD. Identification of a botulinum neurotoxin A protease inhibitor displaying efficacy in a cellular model. *Chem. Commun* 2006(29); 3063-3065.
17. Roxas-Duncan V, Enyedy I, Montgomery VA, Eccard VS, Carrington MA, Lai H, et al. Identification and Biochemical Characterization of Small-Molecule Inhibitors of Clostridium botulinum Neurotoxin Serotype A. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8): 3478-3486.
18. Kumar G, Kumaran D, Ahmed SA, Swaminathan S. Peptide inhibitors of botulinum neurotoxin serotype A: design, inhibition, cocrystal structures, structure-activity relationship and pharmacophore modeling. *Acta Cryst* 2012; 68(Pt 5): 511-520.
19. Kukreja RV, Sharma SK, Singh BR. Molecular Basis of Activation of Endopeptidase Activity of Botulinum Neurotoxin Type E. *Biochem* 2010; 49(11): 2510-2519.
20. Agarwal R, Eswaramoorthy S, Kumaran D, Dunn JJ, Swaminathan S. Cloning, high level expression, purification, and crystallization of the full length *Clostridium botulinum*

- neurotoxin type E light chain. *Protein Express Purif* 2004; 34(1): 95–102.
21. Elaine AE, Pablo M, Lu Y, Elion EA, Marina P, Yu L. Constructing Recombinant DNA Molecules by PCR. *Curr Protoc in Molecular Bio* 2007; Chapter 3: Unit 3.17.
22. Dana MF, Rebecca P, Francis DM, Page R. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci* 2010; Chapter 5: Unit 5.24. p. 1-29.
23. Sean G, Scott EW, Steven AF, John GRH, Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, et al. Immunoblotting and Immunodetection. *Curr Protoc in Cell Bio* 2011; Chapter 6: Unit 6.2.
24. Adler M, Nicholson JD. Evaluation of toosendanin as a botulinum neurotoxin Antagonist. *The Botulinum J* 2008; 1(2): 208-218.
25. Lai H, Feng M, Roxas-Duncan V, Dakshanamurthy S, Smith LA, Yang DC. Quinololinol and peptide inhibitors of zinc protease in botulinum neurotoxin A: effects of zinc ion and peptides on inhibition. *Arch Biochem Biophys* 2009; 491(1-2): 75-84.