

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

Majid Baradaran<sup>1</sup>, Firouz Ebrahimi<sup>1\*</sup>, Shahram Nazarian<sup>1</sup>, Abbas Hajizade<sup>1</sup>, Yousof Tarverdizadeh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biology Research Center,  
Faculty of Basic Sciences,  
Imam Hossein University,  
Tehran, Iran.

### 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.

\*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

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

مجید برادران<sup>۱</sup>، فیروز ابراهیمی<sup>۱\*</sup>، شهرام نظریان<sup>۱</sup>، عباس حاجی‌زاده<sup>۱</sup>، یوسف تاروردی‌زاده<sup>۱</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** سندرم بوتولیسم توسط نوروتوکسین باکتری کلسترییدیوم بوتولینوم ایجاد می‌شود. این نوروتوکسین دارای ۷ سروتیپ از A-G می‌باشد. بهترین راه برای جلوگیری از سندرم بوتولیسم ایجادشده توسط BoNT/B، استفاده از واکسن‌های نو ترکیب ساخته‌شده از ناحیه اتصال آن (به علت داشتن اپی‌توپ‌های کافی برای تحریک سیستم ایمنی) است. در این پژوهش بیان زیر واحد اتصال نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B، به منظور کاندید واکسن مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** ابتدا توالی ژن ناحیه اتصال نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B از سایت NCBI با کد دسترسی EF028399.1 گرفته شد. بعد از بهینه‌سازی کدون، ژن مورد نظر به صورت 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 بر اساس سایت‌های برشی در وکتور و در نهایت، تعیین توالی تأیید کرد که ژن مورد نظر به طور 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، به طور مناسب زیرهمسانه‌سازی گردید، با این حال هیچ بیان قابل مشاهده‌ای از ژن مورد نظر دیده نشد.

**کلید واژه‌ها:** کلسترییدیوم بوتولینوم؛ بررسی بیان؛ واکسن نو ترکیب.

<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

\*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 به صورت 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]

## مقدمه

اولین بار در سال ۱۹۷۱، واکسن‌های تک‌ظرفیتی به صورت 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 یک سال ایجاد می‌شود، عقیده بر این است که به علت عدم توسعه یافتگی 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 نو ترکیب برپایه ناحیه اتصال نوروتوکسین به علت داشتن اپی‌توپ‌های مناسب برای تحریک سیستم ایمنی می‌باشد (۷). در این تحقیق تلاش گردید با استفاده از وکتور pET 32a(+), ناحیه اتصال نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B بیان شود.

## روش بررسی

ژن مصنوعی ناحیه اتصال نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B و ستون Ni-NTA agarose resin جهت تخلیص پروتئین نو ترکیب (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)، به عنوان سلول میزبان بیانی استفاده شد. مواد تشکیل دهنده SDS-PAGE و وسترن بلات نیز از شرکت Merck (آلمان) و کپازن (آمریکا) تهیه گردید. همچنین برای القا از IPTG تهیه شده از شرکت سیگما استفاده شد. وکتور بیانی pET32a(+)-به عنوان ناقل ژن از پژوهشگاه ملی ژنتیک تهیه گردید. از محیط‌های LB Broth (Luria-Bertani) و LB Agar (تهیه شده از شرکت فلوکا اسپانیا و Merck آلمان) با غلظت‌های ۸۰-۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر و

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 به صورت یک پروتئین تک‌زنجیره‌ای با وزن ۱۵۰ کیلودالتون درمی‌آیند که به وسیله 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 اندوپیتیداز وابسته به روی بوده که پروتئین‌های مسئول رهاسازی نوروترانسمیتر را به طور اختصاصی در محل‌های خاص می‌شکافد (۳-۵). هرچند موارد مسمومیت از طریق زخم (بوتولیسم جراحات) و عفونت در نوزادان (بوتولیسم اطفال) نیز گزارش شده، ولی بسیار کمیاب هستند. بوتولیسم اطفال تنها ۲۰ سال است که مطرح شده و در افرادی که 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 سمیت‌زدایی می‌باشد. ساخت توکسوئید برای هریک از سروتیپ‌های بوتولیسم از اواخر دهه ۱۹۶۰ و اوایل دهه ۱۹۷۰ میلادی آغاز شده است.

آنتی بیوتیک آمپی سیلین (تهیه شده از شرکت سیگما آمریکا) استفاده گردید. مواد شیمیایی از قبیل EDTA، Tris Hcl، Sucrose، Tris base، کلو فرم، فنل، اسید بوریک، استات سدیم، استات پتاسیم، استیک اسید، اتیدیوم بروماید، NaCl، SDS، HCl، ایزوپروپانول و ایزو آمیل الکل از شرکت Merck (آلمان) و گلو تاتیون احیا از شرکت سیگما (آلمان) تهیه شد.

به منظور تأیید زیرهمسازیه ژن BD/B، با توجه به توالی صنعتی تهیه شده 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.

ترادف های انتخابی با استفاده از نرم افزار OLIGO از لحاظ دمای اتصال (Tm)، درصد G+C، تولید لوپ یا حلقه در درون هر یک از پرایمرها ارزیابی شد. در نهایت، پرایمرهای طراحی شده توسط نرم افزار BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI مورد تأیید قرار گرفت تا از عدم مشابهت آن با سایر ژن های در دسترس، اطمینان حاصل گردد (شکل ها شماره ۱ و ۲).

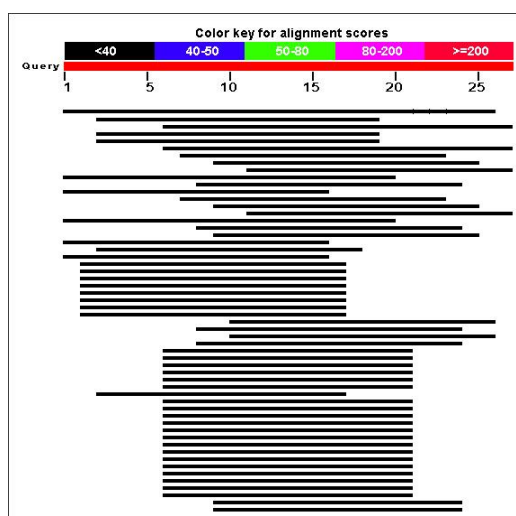
این پرایمرها، به منظور سنتز به شرکت سیناژن سفارش داده شدند. توالی پرایمرها به شرح زیر بود:

پرایمر پیشرو:

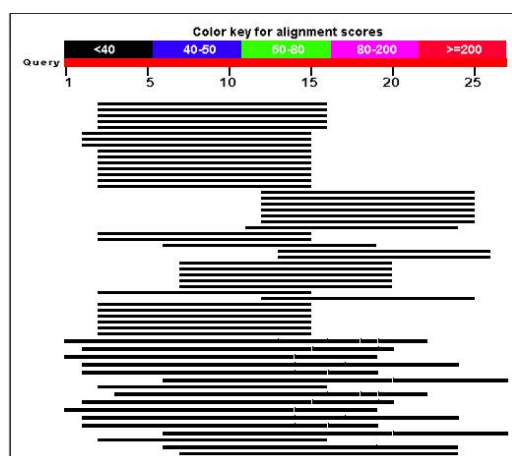
5' AACCAAGCTTATATCATGCCGTTTGACCTTT'

پرایمر پیرو:

5' TCAGCTCGAGTTATTCGGTCCAACCTTCAT'



شکل شماره ۱: Blast پرایمر پیشرو با توالی ژنی که نشان دهنده ۱۰۰٪ شباهت می باشد.



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

بعد از تخلیص پلاسمیدهای نو ترکیب، واکنش های PCR، واکنش تک برش آنزیمی با XhoI و مقایسه باند خطی پلاسمید نو ترکیب و پلاسمید فاقد ژن بر روی ژل آگارز، واکنش برش دوگانه آنزیمی با آنزیم های XhoI، NcoI و مشاهده تک باند ژنی جدا شده از پلاسمید بر روی ژل آگارز و در نهایت، به منظور بررسی توالی ژن زیرهمسانه سازی شده و اطمینان از عدم بروز هرگونه خطا، جهش و یا نوآرایی ناخواسته، پلاسمید نو ترکیب تخلیص شده توسط شرکت سیناژن با استفاده از پرایمرهای عمومی این پلاسمید، تعیین توالی شد.

برای بررسی بیان سازه ژنی pET32a(+)-BD/B، ابتدا سویه های نو ترکیب واجد پلاسمید pET32a(+)-BD/B در محیط کشت LB مایع حاوی آمپی سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کشت گردید و اجازه داده شد تا جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ برسد. سپس ماده IPTG (ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید) به عنوان القا کننده با غلظت یک میلی مولار به محیط کشت اضافه و اجازه داده شد تا سلول ها به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با ۱۲۰ دور در دقیقه گرما گذاری شوند. بعد از جداسازی سلول ها 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 لیز کننده حاوی اوره ۸ مولار به آن)، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرما گذاری شد و بعد از سانتریفوژ مایع رویی آن جدا گردید. سپس جهت بهینه سازی و مشاهده بیان، سه پارامتر اصلی شامل: غلظت IPTG (غلظت های ۱ و ۰/۵ میلی مولار)، 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 نو ترکیب در ۹ لوله مجزا حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع LB و آمپی سیلین (به غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر) کشت داده شد تا جذب نوری آنها به ۰/۵ برسد.

قطعه ژنی BD/B ابتدا با آنزیم Taq پلیمرز طی ۳۵ چرخه تکثیر گردید. این واکنش در غلظت ۴ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی مولار dNTP و ۵۰ نانوگرم از پلاسمید pET28a حاوی قطعه ژنی صنعتی، در دمای اتصال ۶۱ درجه سانتیگراد بهینه سازی شد. چرخه های 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 زیرهمسانه سازی قطعه ژنی BD/B در پلاسمید pET32a(+)

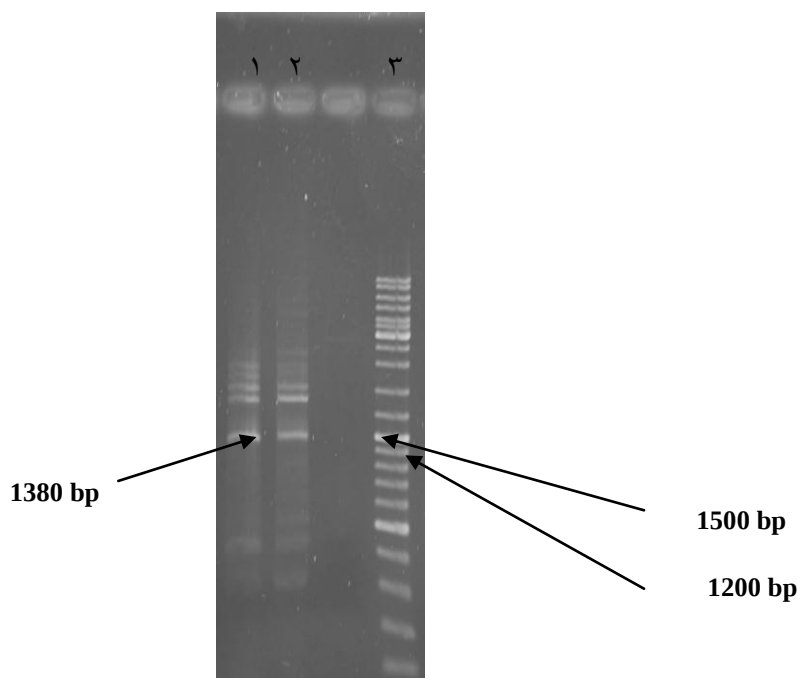
بعد از استخراج وکتورها از ژل آگارز، تحت اثر دو آنزیم NcoI و XhoI انتظار بر این است که پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم های ذکر شده، دو انتهای وکتورهای خطی شده، به صورت چسبنده (Sticky end) درآیند (۸). مخلوط واکنش ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت قرار داده شدند تا عمل هضم آنزیمی صورت گیرد. محصولات برش خورده 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 تخلیص شده، 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 نو ترکیب با روش شوک حرارتی به میزبان *E. coli* سویه BL21(DE3) انتقال داده شد. سویه میزبان نو ترکیب به مدت یک شب بر روی LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کشت داده شد و ۵ کلنی رشد یافت. به منظور تأیید صحت زیرهمسانه سازی، کلنی های رشد یافته در محیط کشت LB مایع، کشت داده شدند و

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 نو ترکیب از واکنش ایمونوبلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B استفاده شد. در نهایت، 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.

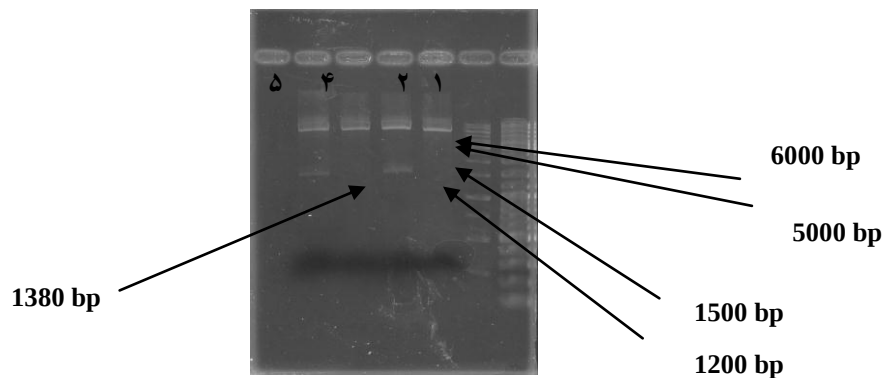
برای هر دما، سه لوله (شامل: یک لوله برای غلظت IPTG ۱ میلی‌مولار، یک لوله برای غلظت IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و یک لوله برای کنترل منفی در هر دما)، در نظر گرفته شد. پس از رسیدن جذب نوری به ۰/۵، القا با IPTG انجام گرفت و سپس لوله با سرعت گردش ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. در سر رسید هر کدام از زمانهای ۴، ۸، 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.



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

فرآیند زیرهمسانه‌سازی بود (شکل شماره ۴). در نهایت، تعیین توالی ژن زیرهمسانه‌سازی‌شده نیز نشان داد این توالی فاقد کدون خاتمه نابجا، جهش و نوآرایی ناخواسته می‌باشد.

نتایج واکنش تک‌برش آنزیمی با آنزیم XhoI، برش دوگانه آنزیمی با آنزیم‌های XhoI، NcoI و واکنش PCR بر روی پلاسمید نو ترکیب pET32a(+)-BD/B، تأیید ابتدایی بر صحت

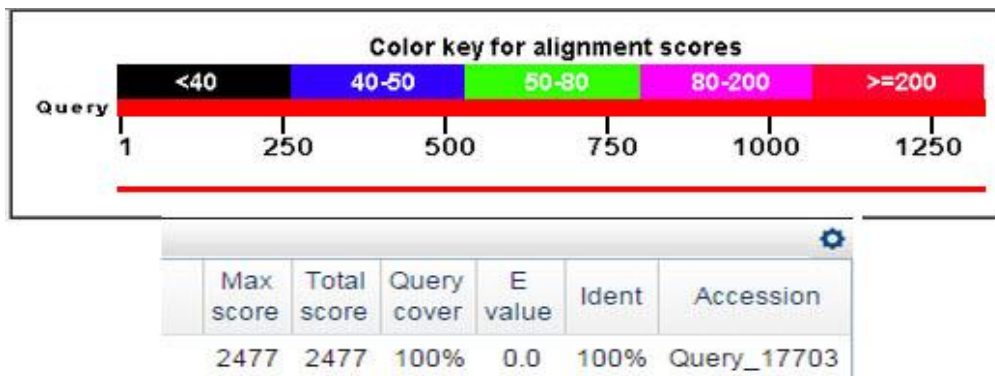


شکل شماره ۴: فرآیند هضم دوگانه آنزیمی به منظور تأیید زیرهمسانه سازی.

(۱) نشانگر مولکولی؛ (۲) پلاسمید pET32a(+) نوترکیب استخراج شده؛ (۳) برش دوگانه آنزیمی با XhoI و NcoI که منجر به جدا شدن قطعه ژنی با طول ۱۳۸۶ از پلاسمید خطی شده با طول حدود ۵۰۰۰ جفت باز شده است. (۴) پلاسمید pET32a(+) نوترکیب استخراج شده و (۵) برش دوگانه آنزیمی با XhoI و NcoI که منجر به جدا شدن قطعه ژنی با طول ۱۳۸۶ از پلاسمید خطی شده با طول حدود ۵۰۰۰ جفت باز شده است.

پس از تعیین توالی، نتایج Pairwise Allignment نشان داد ژن همسانه سازی شده با توالی ژن طراحی شده اولیه دارای مطابقت است. هم ردیف کردن توالی ژن زیرهمسانه سازی شده با توالی اولیه نشان داد اولاً فرآیند زیرهمسانه سازی به طور 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.

کلنی که نتایج PCR و هضم دوگانه آنزیمی آنها با آنزیم های محدودالایر مثبت شده بود، انتخاب و پس از تخلیص پلاسمید، به شرکت سیناژن برای تعیین توالی ارسال شد. از آنجایی که طول قطعه زیرهمسانه سازی شده، ۱۳۸۶ جفت باز است و دستگاه تعیین توالی کننده نیز در هر بار خوانش از هر طرف، قادر به قرائت قطعه ای به طول حدوداً ۱۲۰۰ نوکلئوتید می باشد، از این رو با خوانش دوطرفه و هم ردیف کردن نتایج، کل ژن تعیین توالی شد و بدین منظور از هر دو پرایمر استفاده گردید.



Query 601 GAAGTTATCGCTAACGGTGAAATCATCTTCAAACCTGGACGGTGACATCGACCGTACCCAG 660  
Sbjct 601 GAAGTTATCGCTAACGGTGAAATCATCTTCAAACCTGGACGGTGACATCGACCGTACCCAG 660

Query 661 TTCATCTGGATGAAATACTTCTCTATCTTCAATACGGAACCTGTCTCAGTCTAACATCGAA 720  
Sbjct 661 TTCATCTGGATGAAATACTTCTCTATCTTCAATACGGAACCTGTCTCAGTCTAACATCGAA 720

Query 721 GAACGTTACAAAATCCAGTCTTACTCTGAATACCTGAAAGACTTCTGGGGTAACCCGCTG 780  
Sbjct 721 GAACGTTACAAAATCCAGTCTTACTCTGAATACCTGAAAGACTTCTGGGGTAACCCGCTG 780

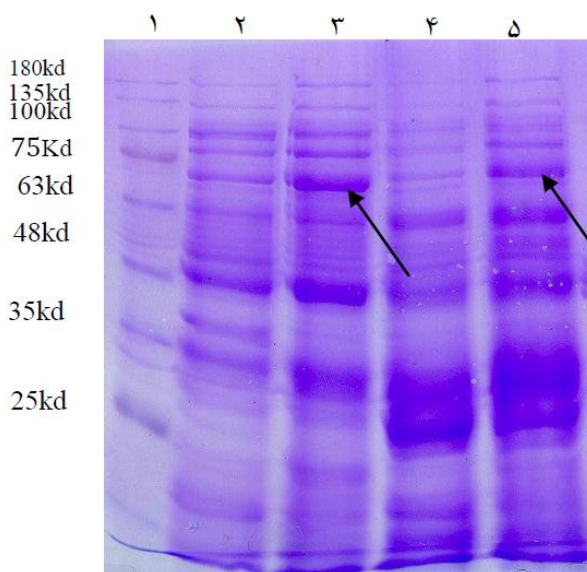
Query 781 ATGTACAACAAAGAATACTACATGTTCAACGCTGGTAACAAAACTCTTACATCAAACCTG 840  
Sbjct 781 ATGTACAACAAAGAATACTACATGTTCAACGCTGGTAACAAAACTCTTACATCAAACCTG 840

شکل شماره ۵: تأیید صحت زیرهمسانه سازی با فرآیند Pair Wise Allignment توالی زیرهمسانه سازی شده و توالی ابتدایی طراحی شده.

برای انجام این فرآیند از سایت NCBI استفاده شده است (به علت بزرگی ژن، تنها قسمتی از آن در اینجا آمده است).

گردید، ولی پس از وسترن بلائینگ و درنهایت، استفاده از ستون رزین نیکل؛ پروتئین نوترکیب مورد نظر باز هم با وجود اتصال به پروتئین trx، بیان نشد (شکل شماره ۶).

در بیان ابتدایی و سپس بهینه سازی بیان نمونه ها پس از القا در سویه های به کار گرفته شده در مقایسه با نمونه کنترل، با اینکه باند مشکوک پروتئینی در محدوده حدود ۷۵ کیلودالتونی مشاهده



شکل شماره ۶: بررسی اولیه بیان پروتئین فیوژن شده با استفاده از IPTG غلظت یک میلی مولار، زمان القا ۴ و ۸ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد. (۱) پروتئین مارکر؛ (۲) محلول رویی محیط کشت کنترل منفی (بدون القا با IPTG) در زمان ۴ ساعت؛ (۳) محلول رویی محیط کشت تست بعد از ۴ ساعت که در محدوده ۷۵ کیلو دالتون یک باند مشاهده می شود و احتمال دارد باند بیان پروتئین باشد؛ (۴) محلول رویی محیط کشت کنترل منفی بعد از ۲۴ ساعت و (۵) محلول رویی محیط کشت تست که همان باند دیده می شود.

## بحث

بیشتر مطالعات در زمینه تولید واکسن نوترکیب و آنتی بادی بر روی بخش اتصال دهنده نوروتوکسین متمرکز شده است تا بتوان با تولید آنتی بادی بر علیه این بخش، مانع از اتصال اولیه توکسین به گیرنده شده و بدین طریق از ورود سم به داخل سلول جلوگیری کرد. در تحقیقی که عبدالرضا عاقلی منصور و همکاران در رابطه با انتهای C از ناحیه اتصال دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E انجام دادند، موش های ایمن شده توانستند دوز  $10^3 \times LD50$  از توکسین بوتولینوم تیپ E را تحمل کنند (۹). در مطالعه ای دیگر، Kubota و همکاران آنتی بادی منوکلونالی تولید کردند که از اتصال BoNT/E به سلول هدف ممانعت می کرد. این آنتی بادی به ناحیه اتصال نوروتوکسین متصل می شد (۱۰). Trollet و همکاران نیز در تحقیقی با استفاده از روش انتقال الکتریکی (Electrotransfer)، آنتی بادی خشتی کننده علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ های A, B, E تولید کردند (۱۱). همچنین در مطالعه ای که توسط Easwaran و همکاران انجام شد، ناحیه اتصال نوروتوکسین تیپ های A, B, E به صورت استنشاقی

تجویز گردید، موش های ایمن شده توانستند دوز  $10^4 \times LD50$  از نوروتوکسین های فوق الذکر را تحمل کنند (۱۲). در تحقیقی دیگر که در آن Michael و همکاران از ناحیه اتصال نوروتوکسین بوتولینوم تیپ های A و E استفاده کردند، موش های ایمن شده توانستند دوز  $10^5 \times LD50$  را تحمل کنند (۱۳)؛ در صورتی که محصول این پژوهش به بیان پروتئین ختم می شد، پیشنهاد مؤکد در بررسی میزان ایمنی زایی پروتئین حاصل شده بود. با وجود تمامی این گزارشها، تلاش ابتدایی جهت همسانه سازی و بیان ژن ناحیه اتصال تیپ B در وکتور pET28a(+)، منتج به نتیجه نشد، لذا در این تحقیق از pET32a(+) استفاده گردید. اما همان طور که در نتایج اشاره شد با وجود کنترل و تأیید تمام مراحل همسانه سازی، نتیجه مشخصی در مرحله بیان مشاهده نشد و آنالیزهای لازم بیوانفورماتیکی، به منظور 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 جابه جایی فریم (Frame Shift) اتفاق نیفتاده؛ بلکه هیچ گونه جهش ناخواسته ای 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. به علاوه، 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 مورد نظر بیان نشد. در نهایت، مهم‌ترین دلیل احتمالی عدم بیان می‌تواند تجزیه و شکسته شدن پروتئین بلافاصله بعد از بیان باشد

(هرچند در آنالیز بیوانفورماتیکی، پایدار بودن آن احراز گردید).

### نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، علی‌رغم اینکه گزارشهایی در مورد بیان ژن ناحیه اتصال کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B وجود دارد، ولی تلاش‌های انجام شده در مورد بیان این ژن در pET32a(+), نتیجه قابل توجهی را دربرداشت.

### References:

1. Capková K, Salzedo 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 mercaptoacetamide analogs. *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 Microbiology*. 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*. 4<sup>th</sup> 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 antibodies. *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.