

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

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

<sup>1</sup>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.

## زیرهمسانه سازی و بررسی بیان ژن صناعی ناحیه اتصال نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A (BD/A)

مجید زواری<sup>۱</sup>، فیروز ابراهیمی<sup>۱\*</sup>، شهرام نظریان<sup>۱</sup>، عباس حاجی زاده<sup>۱</sup>، یوسف تاروردی زاده<sup>۱</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** سندرم بوتولیسم توسط نوروتوکسین باکتری کلسترییدیوم بوتولینوم ایجاد می شود. این نوروتوکسین دارای ۷ سروتیپ از G-A می باشد. بهترین روش برای پیشگیری از سندرم حاصل از نوروتوکسین بوتولینوم (BoNT)، استفاده از واکسن های نو ترکیب ساخته شده از ناحیه اتصال آن (به علت داشتن اپی توپ های کافی برای تحریک سیستم ایمنی) می باشد. در این مطالعه ناحیه اتصال 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*، بهینه سازی کدون انجام شد. سپس در پلاسمید pET28a، سنتز و بعد از آن در پلاسمید بیانی pGEX-4T-1، زیرهمسانه سازی شد. زیرهمسانه سازی با استفاده از روش PCR با آنزیم Pfu DNA polymerase و سپس برش دوگانه با آنزیم های XhoI و XmaI انجام گرفت. از سویه *E. coli* BL21 به عنوان میزبان برای بیان استفاده شد. مارکر انتخابی برای pGEX-4T-1، آمپی سیلین بود.

**یافته ها:** روش های PCR و برش محدود کننده با آنزیم های ذکر شده، زیرهمسانه سازی را تأیید کردند. بررسی بیان با استفاده از روش های SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ (با استفاده از آنتی بادی اسبی ضد BoNT/A)، سپس کروماتوگرافی تمایلی گلو تاتیون انجام گرفت. با اینکه زیرهمسانه سازی با موفقیت انجام شد، ولی با به کار گرفتن روش های ذکر شده، هیچ گونه بیان پروتئین مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** براساس نتایج این مطالعه، به نظر می رسد باید میزبان های دیگری مانند میزبان های یوکاریوتی برای بیان نو ترکیب ناحیه اتصال نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A مورد استفاده قرار گیرند.

**کلید واژه ها:** کلسترییدیوم بوتولینوم تیپ A؛ ناحیه اتصال؛ زیرهمسانه سازی، بیان ژن؛ واکسن نو ترکیب.

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

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

فیروز ابراهیمی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، 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 به صورت 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]

## مقدمه

کلستریدیوم بوتولینوم، باکتری گرم مثبت بی هوازی و میله‌ای شکل است که در خاک و آب یافت می‌شود (۱). ۷ سروتیپ شناسایی شده این نوروتوکسین (سم عصبی) از G-A 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 به هم متصل کرده است. وظیفه زنجیره سنگین، شناسایی و اتصال به نورون‌های کولینرژیک محیطی است و زنجیره سبک با عملکرد اندوپیتدازی وابسته بر روی خود، مانع رهاسازی نوروتورانس‌میتراها به فضای سیناپسی و در نتیجه مختل شدن پیام عصبی می‌شود (۳-۵). مسمومیت با این نوروتوکسین منجر به عوارض مختلفی در افراد از جمله ضعف عضلانی عمومی (طوری که 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 ایجاد شده 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 به وجود 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، به منظور مصونیت زایی اختصاصی استفاده می‌شود. ساخت توکسوئید برای هر کدام از سروتیپ‌ها از اواخر دهه ۱۹۶۰ و اوایل ۱۹۷۰ میلادی آغاز شد و اولین بار در سال ۱۹۷۱، واکسن‌های تک ظرفیتی به صورت انبوه، تولید و در سال ۱۹۷۸ بسته بندی و عرضه گردید. با این وجود، بهترین استراتژی برای پیشگیری از این بیماری از طریق واکسیناسیون، تولید و استفاده از واکسن‌های نوترکیب از ناحیه اتصال نوروتوکسین است؛ چراکه اپی توپ‌های کافی برای

تحریک سیستم ایمنی را دارا می‌باشند (۷-۹). در این تحقیق تلاش گردید تا با استفاده از وکتور بیانی *pGEX-4T-1* ناحیه اتصال نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A بیان شود.

## روش بررسی

ژن مصنوعی ناحیه اتصال نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A و ستون میل ترکیبی گلوکاتینوزین (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) به عنوان سلول میزبان بیانی استفاده شد. مواد تشکیل دهنده SDS-PAGE و وسترن بلات نیز از شرکت Merck و کیاژن تهیه گردید. همچنین برای القا از IPTG تهیه شده 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 (تهیه شده از شرکت فلوکا اسپانیا و Merck آلمان) با غلظت‌های ۸۰-۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (تهیه شده 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 گلوکاتینوزین احیا (از شرکت سیگما، آلمان) تهیه شد.

به منظور زیرهمسانه سازی ژن BD/A، با توجه به توالی صنعتی تهیه شده برای آن {سنتز شده درون پلاسمید (pET28a(+))}، یک جفت پرایمر طراحی گردید. با توجه به توالی ژن BD/A، همچنین الگوی برش آنزیمی آن، ترادف نوکلئوتیدی پرایمرهای پیشرو و پیرو با رعایت اصول استاندارد در طراحی پرایمر تعیین شد. ترادف‌های انتخابی با استفاده از نرم افزار OLIGO از لحاظ دمای اتصال (Tm)، درصد G+C، تولید لوپ یا حلقه در درون هریک از پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت.

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 میلی مولار dNTP و ۵۰ نانوگرم نمونه الگو.

سیکل های 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 خالص سازی شد، سپس هم محصول PCR و هم پلاسمید بیانی *pGEX-4T-1* با استفاده از آنزیم های برش دهنده *XhoI* و *XmaI* 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 به صورت بلانت (*Blunt end*) است، از ایزوشیزومری که به صورت چسبیده برش می زند (*XmaI*) استفاده گردید. انتظار بر این بود که پس از هضم آنزیمی، دو انتهای قطعه ژنی و پلاسمید خطی شده به صورت چسبیده (*Sticky end*) درآیند. بنابراین، محصول برش هر دو، بر روی 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 به منظور تأیید کیفیت قطعه تخلیص شده بر روی 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 نو ترکیب با روش شوک حرارتی به میزبان *E. coli* سویه BL21(DE3) منتقل شد. سویه میزبان نو ترکیب به مدت یک شب بر روی LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر) کشت داده شد و دو کلنی

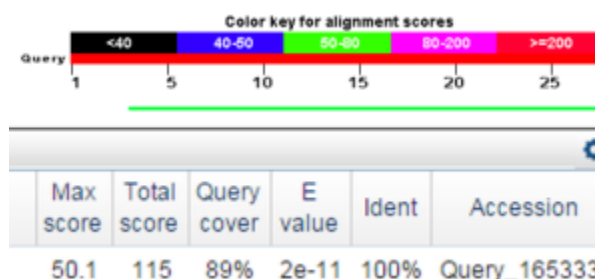
در نهایت، پرایمرهای طراحی شده به کمک نرم افزار BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI تأیید شد تا از عدم مشابهت آن با سایر ژن های در دسترس اطمینان حاصل گردد.

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

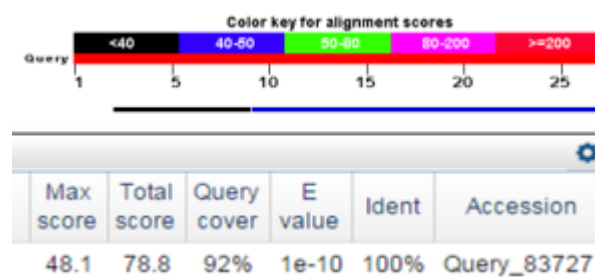
توالی پرایمر پیشرو و پیرو به ترتیب:

5'ATACTCGAGTTACAGCGGACGTTTACC3'  
5'ATTCCCGGGTTTCCAGCTGTCTAAATAC3'

بود (شکل شماره ۱ و ۲).



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



شکل شماره ۲: Blast پرایمر پیرو با توالی ژنی، نشان دهنده ۱۰۰٪ شباهت می باشد.

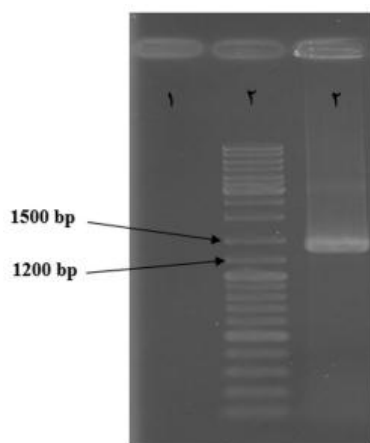
قطعه ژنی BD/A ابتدا با آنزیم Taq پلیمراز، طی ۳۵ چرخه تکثیر گردید. این واکنش در غلظت ۴ میلی مولار  $MgCl_2$  و ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی مولار dNTP و ۵۰ نانوگرم از پلاسمید pET28a حاوی قطعه ژنی صنعتی، در دمای اتصال ۶۱ درجه سانتیگراد بهینه سازی شد. چرخه های PCR شامل: یک مرحله واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه 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 آنجایی که آنزیم Taq پلیمراز فاقد خاصیت غلط گیری است، لذا به منظور زیرهمسانه سازی با صحت بالا، در مرحله نهایی از

رشد یافت. به منظور تأیید صحت زیرهمسانه سازی، کلنی های رشد یافته در محیط کشت LB مایع کشت داده شدند و بعد از تخلیص پلاسمیدهای نوترکیب، واکنش های PCR، واکنش تک برش آنزیمی با XhoI و مقایسه باند خطی پلاسمید نوترکیب و پلاسمید فاقد ژن بر روی ژل آگارز، واکنش برش دوگانه آنزیمی با آنزیم های XhoI، XmaI و مشاهده تک باند ژنی جدا شده از پلاسمید بر روی ژل آگارز و در نهایت، به منظور بررسی توالی ژن زیرهمسانه سازی شده، اطمینان از عدم بروز هر گونه خطا، جهش و یا نوآرایی ناخواسته و پلاسمید نوترکیب تخلیص شده توسط شرکت سیناژن با استفاده از پرایمرهای جهانی این پلاسمید، تعیین توالی شدند. ابتدا کشت سویه های نوترکیب واجد پلاسمید pGEX4T1-BD/A در محیط کشت LB مایع حاوی آمپی سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) 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) به عنوان القاکننده 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 دور ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شوند. بعد از جداسازی سلول ها 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 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 نوترکیب در ۹ لوله مجزا حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع LB و آمپی سیلین به غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر کشت داده شد تا جذب نوری آنها به ۰/۵ برسد.

برای هر دما، سه لوله شامل: یک لوله برای غلظت IPTG ۱ میلی مولار؛ یک لوله برای غلظت IPTG ۰/۵ میلی مولار 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 های هر دما در محیط مناسب دارای آن دما و با سرعت گردش ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. در سر رسید هر کدام از زمانهای ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت، مقدار ۱/۵ میلی لیتر از هر لوله در میکروتیوب های مجزا جداسازی گردید؛ البته از لوله های کنترل منفی تنها در پایان ۲۴ ساعت نمونه گیری انجام گرفت. جداسازی سلول ها به وسیله سانتریفوژ (با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) انجام شد. بعد از جداسازی سلول ها 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. نمونه های آماده شده همراه با مارکر پروتئینی (سیناژن) بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE، الکتروفورز شدند، به منظور تأیید وجود احتمالی پروتئین نوترکیب از واکنش ایمونوبلاتینگ همراه با آنتی بادی علیه نورو توکسین بوتولینوم تیپ A استفاده گردید. در نهایت، جهت اطمینان بیشتر و تخلیص بیان پروتئین، از ستون کروماتوگرافی گلو تاتیون رزین استفاده شد.

### یافته ها

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

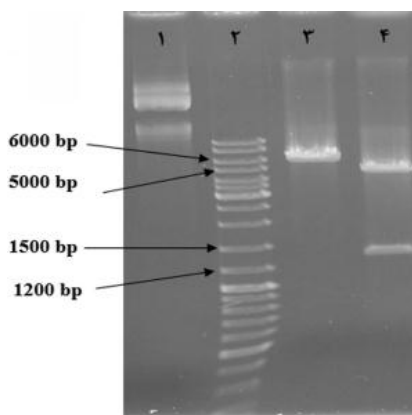


شکل شماره ۳: نتیجه PCR بر روی ژل آگارز.

(۱) کنترل منفی؛ (۲) DNA Ladder؛ (۳) تک باند ژن تکثیر شده (۱۳۶۰ جفت باز).

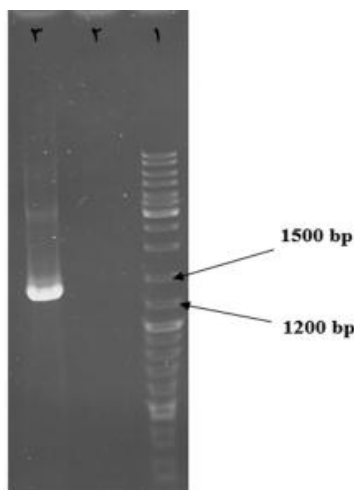
فرآیند زیرهمسانه سازی بود (شکل شماره ۴ و ۵). در نهایت، تعیین توالی ژن زیرهمسانه سازی شده نیز نشان داد این توالی فاقد کدون خاتمه نابجا، جهش و نوآرایی ناخواسته می باشد.

نتایج واکنش تک برش آنزیمی با آنزیم XhoI، برش دوگانه آنزیمی با آنزیم های XhoI، XmaI و واکنش PCR بر روی پلاسمید نو ترکیب pGEX4T1-BD/A تأیید ابتدایی بر صحت



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

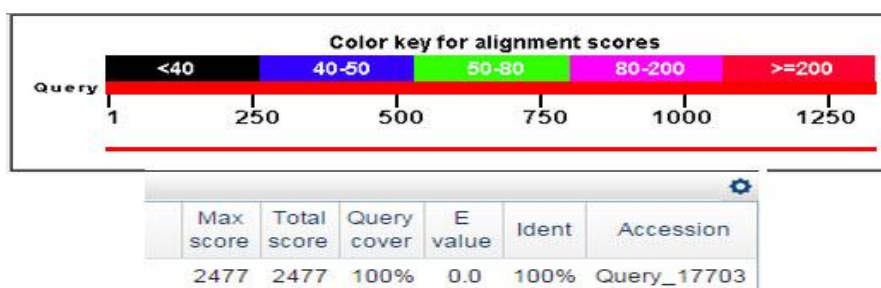
(۱) پلاسمید pGEX-4T-1 نو ترکیب استخراج شده؛ (۲) نشانگر مولکولی DNA؛ (۳) تک برش آنزیمی با XhoI که منجر به خطی شدن پلاسمید نو ترکیب با طول حدود ۶۲۴۲ جفت باز شده است؛ (۴) برش دوگانه آنزیمی با XhoI و XmaI که منجر به جدا شدن قطعه ژنی با طول ۱۳۴۲ از پلاسمید خطی شده با طول ۴۹۰۰ جفت باز شده است.



شکل شماره ۱: فرآیند PCR، به منظور تأیید زیرهمسانه سازی.

(۱) نشانگر مولکولی DNA؛ (۲) کنترل منفی؛ (۳) تک باند ژنی با طول ۱۳۶۰ جفت باز.

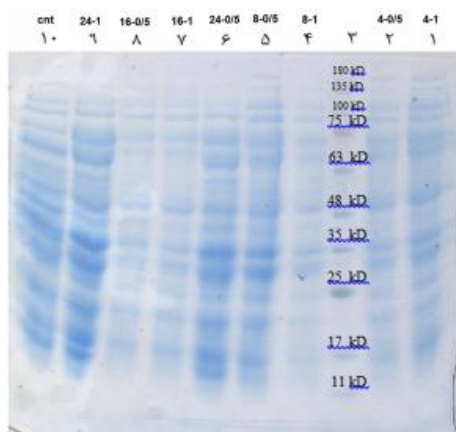
برای تعیین توالی از هر دو پرایمر پیشرو و پیرو جهانی وکتور pGEX استفاده گردید. پس از تعیین توالی، نتایج Pairwise Alignment نشان داد ژن زیرهمسانه سازی شده به طور صحیح انجام شده و ثانیاً موتاسیون ناخواسته در طی این فرآیندها اتفاق نیفتاده و قالب بازخواندن آن نیز تغییر نکرده است. در شکل شماره ۶ نتیجه Pairwise Alignment آن با توالی اصلی و کد دسترسی Query\_17703 در سایت NCBI نشان داده شده که بیانگره تشابه صددرصدی می باشد.



شکل شماره ۶: تأیید صحت زیرهمسانه سازی با فرآیند Pair Wise Alignment توالی زیرهمسانه سازی شده و توالی ابتدایی طراحی شده. برای انجام این فرآیند از سایت NCBI استفاده شده و کد دسترسی آن طبق تصویر query\_17703 می باشد. همان طور که مشاهده می گردد انطباق توالی ها ۱۰۰٪ است.

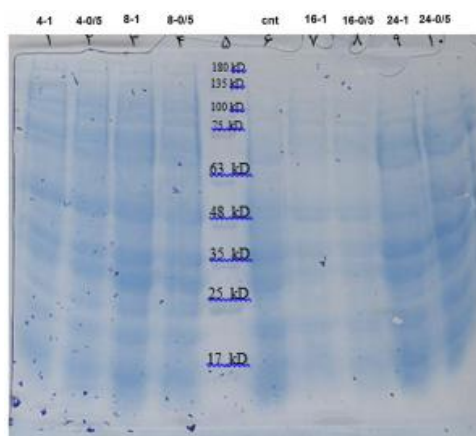
گلو تاتیون رزین، پروتئین نو ترکیب **مورد نظر با وجود** اتصال به پروتئین GST (Glutathione S-Transferase) فیوژ، باز هم بیان نشد (شکل ۱۲-۷).

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 کیلو دالتونی مشاهده شد، ولی پس از وسترن بلاتینگ و در نهایت، استفاده از ستون



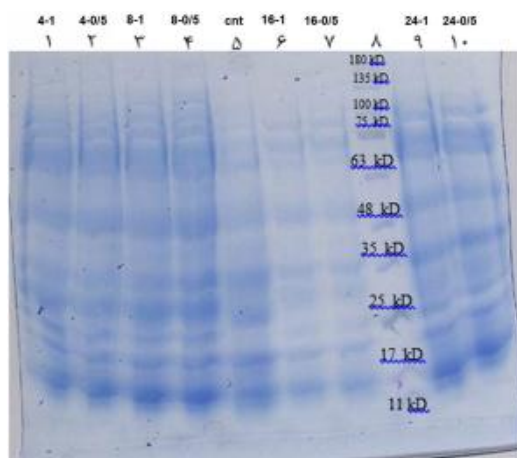
شکل شماره ۷: بررسی بیان در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد.

(۱) بیان با غلظت ۱ میلی مولار و زمان ۴ ساعت؛ (۲) بیان با غلظت ۰/۵ میلی مولار و زمان ۴ ساعت؛ (۳) پروتئین مارکر؛ (۴) بیان با غلظت ۱ میلی مولار و زمان ۸ ساعت؛ (۵) بیان با غلظت ۰/۵ میلی مولار و زمان ۸ ساعت؛ (۶) بیان با غلظت ۰/۵ میلی مولار و زمان ۲۴ ساعت؛ (۷) بیان با غلظت ۱ میلی مولار و زمان ۱۶ ساعت؛ (۸) بیان با غلظت ۰/۵ میلی مولار و زمان ۱۶ ساعت؛ (۹) بیان با غلظت ۱ میلی مولار و زمان ۲۴ ساعت؛ (۱۰) کنترل منفی (عدم القا با IPTG).



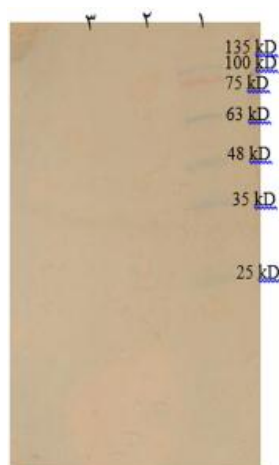
شکل شماره ۸: بررسی بیان در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد.

(۱) بیان با غلظت IPTG یک میلی مولار و زمان ۴ ساعت؛ (۲) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی مولار و زمان ۴ ساعت؛ (۳) بیان با غلظت IPTG یک میلی مولار و زمان ۸ ساعت؛ (۴) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی مولار و زمان ۸ ساعت؛ (۵) پروتئین مارکر؛ (۶) کنترل منفی (بدون القا با IPTG)؛ (۷) بیان با غلظت IPTG یک میلی مولار و زمان ۱۶ ساعت؛ (۸) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی مولار و زمان ۱۶ ساعت؛ (۹) بیان با غلظت IPTG یک میلی مولار و زمان ۲۴ ساعت؛ (۱۰) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی مولار و زمان ۲۴ ساعت.



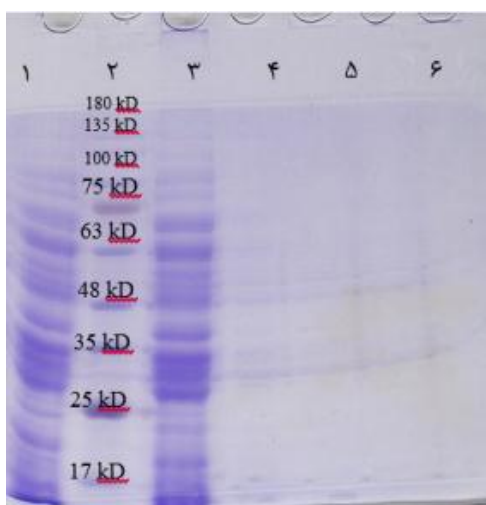
شکل شماره ۹: بررسی بیان در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد.

(۱) بیان با غلظت IPTG یک میلی مولار و زمان ۴ ساعت؛ (۲) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی مولار و زمان ۴ ساعت؛ (۳) بیان با غلظت IPTG یک میلی مولار و زمان ۸ ساعت؛ (۴) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی مولار و زمان ۸ ساعت؛ (۵) کنترل منفی؛ (۶) بیان با غلظت IPTG یک میلی مولار و زمان ۱۶ ساعت؛ (۷) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی مولار و زمان ۱۶ ساعت؛ (۸) پروتئین مارکر؛ (۹) بیان با غلظت IPTG یک میلی مولار و زمان ۲۴ ساعت؛ (۱۰) بیان با غلظت IPTG ۰/۵ میلی مولار و زمان ۲۴ ساعت.



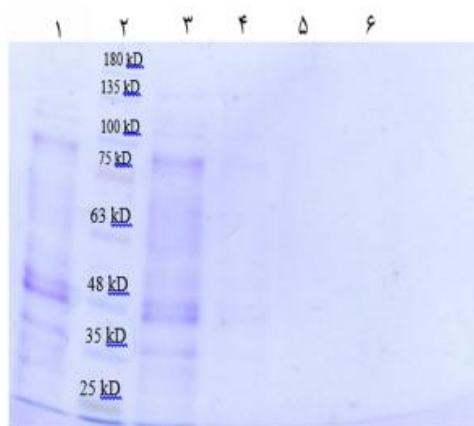
شکل شماره ۱۰: بررسی بیان پروتئین به روش ایمونوبلاتینگ (وسترن بلات).  
(۱) پروتئین مارکر؛ (۲) نمونه تست؛ (۳) کنترل منفی (بدون القا با IPTG).





شکل شماره ۱۱: عبور محلول رویی از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی گلوکاتیون رزین.

(۱) نمونه بیان قبل از عبور دادن از ستون؛ (۲) پروتئین مارکر؛ (۳) محلول Flow؛ (۴) محلول Wash I؛ (۵) محلول Elution؛ (۶) محلول Wash II.



شکل شماره ۱۲: عبور دادن رسوب از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی گلوکاتیون رزین.

(۱) نمونه بیان قبل از عبور دادن از ستون؛ (۲) پروتئین مارکر؛ (۳) محلول Flow؛ (۴) محلول Wash I؛ (۵) محلول Elution؛ (۶) محلول Wash II.

## بحث

Trollet و همکاران نیز در تحقیقی با استفاده از روش انتقال الکتریکی (Electrotransfer)، DNA آنتی بادی خنثی کننده علیه نورو توکسین بوتولینوم تیپ های A، E و B تولید کردند (۱۲). Ravichandran و همکاران در تحقیق خود، ناحیه اتصال نورو توکسین تیپ های A، B و E را به صورت استنشاقی تجویز کردند که در نتیجه موش های ایمن شده توانستند دوز  $10^4 \times LD_{50}$  از نورو توکسین های فوق الذکر را تحمل کنند (۱۳). در تحقیقی دیگر که در آن Baldwin و همکاران از ناحیه اتصال نورو توکسین بوتولینوم تیپ های A و E استفاده کردند، موش های ایمن شده توانستند دوز  $10^5 \times LD_{50}$  را تحمل کنند (۱۴). با توجه به ایمنی زایی مناسب ناحیه اتصال که در تحقیقات فوق الذکر نشان داده شده است؛ در صورتی که محصول این پژوهش به بیان

بیشتر مطالعات در زمینه تولید واکسن نو ترکیب و آنتی بادی بر روی بخش اتصال دهنده نورو توکسین 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 نورو توکسین بوتولینوم تیپ E انجام دادند، موش های ایمن شده توانستند دوز  $10^3 \times LD_{50}$  از توکسین بوتولینوم تیپ E را تحمل کنند (۱۰). در تحقیقی دیگر Kubota و همکاران، آنتی بادی مونوکلونالی تولید کردند که از اتصال BoNT/E به سلول هدف ممانعت می کرد. این آنتی بادی به ناحیه اتصال نورو توکسین متصل می شد (۱۱).

ایمونولوژی مولکولی، تولید واکسن ها و مطالعات برهمکنش های پروتئین - پروتئین و DNA - پروتئین استفاده شده است (۱۵). باوجود همه این ویژگی ها، همان طور که در نتایج اشاره گردید علی رغم کنترل و تأیید تمام مراحل زیرهمسانه سازی، نتیجه مشخصی در مرحله بیان به دست نیامد. در مطالعه حاضر آنالیزهای لازم بیوانفورماتیکی، به منظور بررسی احتمالات عدم بیان انجام شد که 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، 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 قاعداً می بایست پایدار باشد با این همه پروتئین مورد نظر بیان نشد. در نهایت، مهم ترین دلیل احتمالی عدم بیان می تواند تجزیه و شکسته شدن پروتئین، بلافاصله بعد از بیان باشد (هرچند در آنالیز بیوانفورماتیکی پایدار بودن آن احراز گردید).

### نتیجه گیری

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

پروتئین ختم می شد، پیشنهاد مؤکد در بررسی میزان ایمنی زایی پروتئین حاصل شده بود. اما باوجود همه این گزارش ها، تلاش ابتدایی جهت زیرهمسانه سازی و بیان ژن ناحیه اتصال 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 همه کاره برای بیان، تخلیص و شناسایی پروتئین های متصل شده (فیوژ شده) و تولید شده در *E. coli* می باشد. این مجموعه مبتنی بر بیان سطح بالای القاپذیر ژن ها یا قطعات ژنی در اتصال با GST به دست آمده از *Schistosoma japonicum* ساخته شده است. بیان در *E. coli* منجر به تولید فیوژن پروتئین هایی می شود که در N ترمینال آنها GST و در C ترمینال آنها پروتئین مورد نظر قرار دارد. این پروتئین ها در سیتوپلاسم سلولی جمع می شوند. پروتئین هایی که به GST متصل شده اند را می توان با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی، که در آن گلوپتایون تثبیت شده است، جداسازی و تخلیص کرد. پروتئین های متصل به GST به وسیله ستون درگیر شده و ناخالصی ها با شست و شو حذف می شوند. فیوژن پروتئین ها تحت شرایط متعادل و غیردنا توره با استفاده از گلوپتایون احیاء شده از ستون جدا می شوند. فرآیند تخلیص؛ عملکرد و خاصیت آنتی ژن تنسیده پروتئین مورد نظر را حفظ می کند. در صورت نیاز، جدا کردن GST از پروتئین نیز با استفاده از پروتئاز مخصوصی که ناحیه اتصال آن درست بالادست MCS پلاسمید های pGEX قرار گرفته، امکان پذیر است. از سیستم مذکور به طور موفقیت آمیزی در مطالعات بسیاری از جمله

### 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.

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. Joklik WK, Smith DT. *Zinseer Microbiology*. 18<sup>th</sup> 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 antibodies. *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-transferase. *Methods Mol Biol* 2011;681:259-80.