

همسانه‌سازی و بیان ناحیه اتصالی نورو توکسین نوع B باکتری کلاستریدیوم بوتولینوم در باکتری E. coli

سیامک رضائیان^۱، فیروز ابراهیمی^{۲*}، حسین هنری^۳، عباس حاجی زاده^۴، بابک براتی^۵

تاریخ دریافت 1393/02/01 تاریخ پذیرش 1393/04/04

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سندرم بوتولیسم توسط نورو توکسین‌های باکتری کلاستریدیوم بوتولینوم ایجاد می‌شود. این نورو توکسین‌ها دارای هفت سروتیپ از A – G می‌باشند. بهترین راه برای جلوگیری از سندرم بوتولیسم ایجاد شده توسط BONT/B استفاده از واکسن‌های نو ترکیب ساخته شده‌ی ناحیه اتصالی آن می‌باشد. چون دارای اپی توپ‌های کافی برای تحریک سیستم ایمنی می‌باشد. مواد و روش‌ها: ابتدا سکنس ژن ناحیه اتصالی را از سایت NCBI گرفته شد. سپس پرایمرهای مناسب برای آن طراحی شد. سپس باکتری کشت داده شد و ژنوم آن استخراج شد. از PCR برای تکثیر ژن استفاده گردید. ژن در وکتور pGEM-Teasy وارد شد. بعد وکتور نو ترکیب وارد باکتری E. coli DH5α گردید. سپس، زیر همسانه‌سازی در باکتری E. coli BL21 با استفاده از وکتور بیانی pET28a(+) انجام شد. نتایج: واکنش‌های PCR، تعیین توالی و نتایج حاصل از آن توسط IPTG و بررسی بر روی SDS – PAGE و تأیید به روش وسترن نشان‌دهنده صحت کلونینگ و بیان بود. نتیجه‌گیری: کلون و بیان این کاندید واکسن با موفقیت انجام شد و پتانسیل ایمنی‌زایی باید بررسی شود. کلیدواژه: ناحیه اتصالی، همسانه‌سازی، واکسن‌های توکسوئیدی، نورو توکسین بوتولینوم

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره ششم، ص ۵۱۰-۵۰۲، شهریور ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: ایران - تهران - دانشگاه امام حسین (ع) دانشکده و پژوهشکده علوم پایه - گروه زیست‌شناسی، تلفن: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۵

Email: febrhimi@ihu.ac.ir

مقدمه

Clostridium botulinum یا *C. barati* و *C. butyricum* ایجاد می‌شود. علائم بوتولیسم (مسمومیت با نورو توکسین بوتولینوم) عبارت است از ضعف عضلانی عمومی که ابتدا ماهیچه‌های چشمی و نای و سپس تمام ماهیچه‌های اسکلتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در موارد شدیدتر، فلج عضلانی همراه با تخریب عملکردهای غیر ارادی نظیر تنفس رخ خواهد داد که منجر به مرگ می‌شود (۲). هفت نورو توکسین بوتولینوم از لحاظ خصوصیات سرولوژیکی با یکدیگر متفاوت بوده و با حروف A تا G نشان داده می‌شوند. اقدامات پیشگیرانه و درمانی علیه بوتولیسم از سال ۱۹۴۰ میلادی تاکنون مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است.

Botulinum neurotoxins، یکی از سمی‌ترین مواد شناخته شده در علوم بشری هستند. انسان‌ها معمولاً به واسطه مسمومیت غذایی در معرض نورو توکسین‌های تولید شده توسط باکتری *Clostridium botulinum* قرار می‌گیرند (۱). هر چند موارد مسمومیت از طریق زخم (بوتولیسم جراحی) و عفونت در نوزادان (بوتولیسم اطفال) نیز وجود دارد ولی بسیار کمیاب هستند (۲). بوتولیسم اطفال تنها در بیست سال اخیر مطرح گردیده است. بیماری بوتولیسم توسط مسمومیت با یکی از هفت نورو توکسین تولید شده (تحت شرایط بی‌هوازی) توسط سویه‌های سمی

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ریست شناسی سلولی و ملکولی، گروه زیست شناسی دانشگاه امام حسین (ع)

^۲ استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه امام حسین (ع) (نویسنده مسئول)

^۳ دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه امام حسین (ع)

^۴ مربی گروه زیست شناسی دانشگاه امام حسین (ع)

^۵ مربی گروه زیست شناسی دانشگاه امام حسین (ع)

آنزیم‌ها و مواد شیمیایی: از آنزیم‌های برش دهنده BamHI, NcoI (شرکت Fermentas) برای برش ژن ناحیه اتصالی و خارج کردن آن از وکتور همسانه‌سازی استفاده شد. آنزیم T4 DNA Ligase از شرکت Promega تهیه شد. (که به همراه وکتور کلونینگ خریداری شد). آنزیم‌های تکثیر دهنده عبارت بودند از Taq polymerase, Pfu polymerase. به همراه dATP, MgSO4 Buffer, MgCl2, dNTPs Mix 10X (شرکت سیناژن، Fermentas). مواد و آنزیم‌هایی از قبیل Tris Hcl, base, Sucrose, EDTA, کلو فرم، فنل، اسید بوریک، استات سدیم، استات پتاسیم، استیک اسید، اتیدیوم بروماید، لیزوزیم، HCl, NaCl, proteinase K, RNase A، ان- لوریل سارکوزین، SDS، ایزوپروپانل و ایزو آمیل الکل نیز در فرایندهای استخراج DNA استفاده شده است (شرکت Merk).

سویه‌های باکتریایی: سویه کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ B و سویه کلونینگ E. coli DH5 α و نیز سویه E. coli BL21 pLsS جهت تهیه سلول مستعد استفاده شد (از مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شد).

پرایمرهای طراحی شده و آنالیز آن‌ها: پرایمرها به صورت دستی طراحی و بعد با نرم افزارهای Oligo و DNASIS مورد بررسی قرار گرفت. ترادف ژن زنجیره سنگین و به تبع آن ژن ناحیه اتصالی سم بوتولینوم تیپ B، با نرم افزار NEB Cutter، نشان داد که این ژن، برای آنزیم‌های BamHI و NcoI فاقد هر گونه جایگاه برشی است و از این رو، جهت فرایند همسانه‌سازی مناسب می‌باشند.

استخراج DNA کروموزومی: از محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته ۱/۵ میلی‌لیتر برداشته و به مدت (۱۰-۵ دقیقه) با دور ۵۰۰۰ rpm در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب سلول‌ها در ۳۰۰ میکرو لیتر بافر HTE کاملاً حل گردید. ۵۰ میکرو لیتر آنزیم لیزوزیم (۱۰ mg/ml) در بافر TNE به محلول اضافه شد، سپس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۳۰-۱۵ دقیقه) گرما گذاری شد. ۶۰ میکرو لیتر N- لوریل سارکوزین ۱۰٪ (در بافر HTE) به محلول اضافه شد. ۵ میکرو لیتر آنزیم RNase (۱۰ mg/ml) اضافه کرده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۱۵ دقیقه) گرما گذاری شد. سپس ۴۰ میکرو لیتر پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) اضافه گردید و در ۵۶ درجه سانتی‌گراد (۲ ساعت) قرار داده شد. سپس نمونه (دور ۸۰۰۰ rpm در دقیقه به مدت یک دقیقه) سانتریفیوژ شد، محلول رویی در تیوب دیگری ریخته شد. به اندازه حجم نمونه در یک مرحله فنل خالص، در مرحله دیگر مخلوط یک‌به‌یک فنل - کلروفرم و در مرحله بعد از آن هم کلروفرم خالص اضافه کرده و (دور ۸۰۰۰ rpm، یک دقیقه) سانتریفیوژ شد پس

مه‌ار نمودن فعالیت سم بوتولینوم در هر یک از سه مرحله کلیدی فرایند ایجاد مسمومیت منجر به مصونیت در برابر بوتولینوم خواهد شد. در حال حاضر برای ایجاد مصونیت اختصاصی در افراد در معرض خطر از یک توکسوئید پنج ظرفیتی بوتولینوم علیه سروتیپ‌های A-E استفاده می‌شود. تولید توکسوئید در چندین مرحله صورت می‌گیرد که شامل، کشت فراوان، جداسازی، تخلیص و سمیت زدایی می‌باشد. ساخت توکسوئید برای هر یک از سروتیپ‌های بوتولینوم از اواخر دهه ۱۹۶۰ و اوایل ۱۹۷۰ میلادی آغاز شده است. اولین بار در سال ۱۹۷۱ واکسن‌های تک‌ظرفیتی به صورت انبوه تولید و در سال ۱۹۷۸ بسته‌بندی و عرضه شدند (۳). در حالی که بوتولینوم با منشأ غذایی یک مسمومیت بشمار می‌آید، اما انواع دیگر این بیماری که به بوتولینوم نوزادان و روده بزرگ‌سالان معروف است، یک نوع عفونت بشمار می‌آیند. برخلاف نوع قبلی، عفونت ایجاد شده درون بدن منشأ تولید سم است. از آنجاکه بوتولینوم نوزادان در سن زیر یک سال به وقوع می‌پیوندد، عقیده بر این است که به علت عدم توسعه یافتگی کافی فلور طبیعی دستگاه گوارش، رقابت کافی و لازم با کلاستریدیوم بوتولینوم به وجود نمی‌آید، لذا امکان کلونیزاسیون باکتری به شکل رویشی در روده بزرگ و در نتیجه تولید سم و ایجاد بیماری، فراهم می‌شود. برای ایجاد این بیماری وجود ۱۰ تا ۱۰۰ اسپور از باکتری مولد کافی است. برای پیشگیری از این بیماری از طریق واکسیناسیون، بهترین استراتژی استفاده از واکسن‌های نو ترکیب بر پایه ناحیه‌ی اتصالی نورو توکسین به علت داشتن اپی توپ‌های مناسب برای تحریک سیستم ایمنی، می‌باشد. در این تحقیق سعی بر این بوده است که با استفاده از ناحیه اتصالی سم باکتری، واکسنی مناسب برای جلوگیری از ابتلا به این بیماری تهیه شود (۵-۷).

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها: باکتری کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ B در محیط مخصوص باکتری‌های بی‌هوازی رشد داده شد (Cooked Meat شرکت Hi media). از محیط‌های مخصوص باکتری E. coli برای رشد سوش‌های میزبان استفاده گردید (LB Agar و LB Broth). آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده Ampicilin و kanamycin بوده‌اند (شرکت Roche).

پلاسمیدها: از وکتور کلونینگ pGEM-T Easy که به صورت کیت به همراه آنزیم T4-لیگاز، بافر مربوطه و نمونه کنترل از شرکت پرومگا جهت همسانه‌سازی و تعیین توالی ژن استفاده شد و از وکتور بیانی برای بیان ژن مربوطه استفاده شد (پلاسمید (+) pET-28a).

حاوی DNA نوترکیب (واکنش الحاقی) اضافه و پس از مخلوط کردن، به مدت ۳۰ دقیقه تیوب‌ها در داخل یخ قرار گرفتند. تیوب‌ها جهت شوک حرارتی در ۴۲ درجه سانتی‌گراد، ۳ دقیقه گرما گذاری شدند. بعد حرارتی به مدت ۲ دقیقه در داخل یخ قرار داده شدند. سپس به لوله‌ها LB مایع بدون آنتی‌بیوتیک اضافه شد. تیوب‌ها به مدت ۱ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد تیوب‌ها (۳ دقیقه در دور rpm ۵۰۰۰) سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در ۵۰ میکرو لیتر محیط LB مایع دوباره حل شد و بر روی LB آگاردار حاوی Ampicilin به غلظت ۱۰۰-۸۰ $\mu\text{g/ml}$ کشت (۱۵ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) داده شد (۴).

غریبال‌گیری کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب: در این تحقیق از وکتور کلونینگ pGEM-T Easy پواجد نشانگرهای آمپی‌سیلین و lac Z، جهت همسانه‌سازی ژن موردنظر استفاده شد. به‌طوری‌که مارکر دوم قبلاً توسط شرکت‌های سازنده برش خورده و به‌صورت خطی در آمده است و به دو انتهای ۳ آن باز ddT اضافه شده است ژن موردنظر ما آدنیله شده است، پس از ورود، در داخل این مارکر از قبل تخریب‌شده قرار می‌گیرند و وکتور حلقوی می‌گردد. (نکته مهم اینکه وکتورهای خطی در داخل سلول پایدار نمی‌مانند و پس از مدتی حذف می‌شوند. گاهی اوقات امکان دارد که این وکتورها توسط لیگازهای سلولی و یا در مرحله الحاق بدون ورود ژن‌های موردنظر، حلقوی شوند self-ligation که این می‌تواند به از دست رفتن تیمین‌های انتهایی به‌مرور زمان و یا اتصال آدنین‌های موجود در مخلوط واکنش الحاق برگردد که منجر به ایجاد انتهاهای blunt شده و ایجاد پیوندهای فسفودی استری هم توسط آنزیم رخ دهد) سلول‌هایی که حاوی پلاسمید (حلقوی شده) باشند، می‌توانند بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک فوق رشد کنند اما آن‌هایی که فاقد پلاسمید هستند قادر به رشد در محیط آنتی‌بیوتیک‌دار نیستند، مضاف بر اینکه به علت وجود یک نشان‌گر رنگی به نام قرمز خنثی (نوترال رد) در داخل محیط کشت مک کانکی، باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب به رنگ سفید (یا بی‌رنگ) و باکتری‌های حاوی پلاسمید حلقوی شده که ن موردنظر را ندارند به رنگ قرمز دیده می‌شوند. این امر به این دلیل است که در باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، به علت منقطع شدن ژن Lac Z آنزیم غیرفعال می‌شود (۱۶).

کشت باکتری‌های حاوی وکتور کلونینگ: باکتری حاوی وکتور کلونینگ در LB مایع حاوی ۱۰۰-۸۰ $\mu\text{g/ml}$ آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مدت یک شب (Over night) کشت داده شد (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دور rpm ۱۵۰ دور). تخلیص پلاسمید از کلون‌های کشت داده‌شده: به‌منظور

از جداسازی محلول رویی آن را در یک لوله جدید ریخته و ۲ برابر حجم نمونه به آن الکل اتانول ۹۶ درصد اضافه گردید. نمونه به مدت ۴۵ دقیقه در منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. لوله‌های حاوی DNA کروموزومی بعد از سانتریفیوژ (دور rpm ۱۰,۰۰۰، ۱۰ دقیقه) با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد، به رسوب باقیمانده مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه نموده با شرایط قبل سانتریفیوژ شده و رسوب در داخل آون ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک گردید، ۶۰ میکرو لیتر بافر TE به آن اضافه شد و در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. DNA ژنومیک به‌دست‌آمده بر روی ژل آگارز ۱ درصد، مشاهده و پس از تعیین غلظت با روش نانو اسپکتروفوتومتری برای مرحله بعدی کار یعنی PCR مورد استفاده قرار گرفت (۴، ۱۰، ۱۱).

تکثیر ژن ناحیه اتصال‌دهنده نورتوکسین بوتولینوم تیپ B: فرایند PCR با آنزیم Pfu DNA polymerase انجام گرفت.

الحاق ژن مورد مطالعه با pGEM-T Easy Vector: برای قرار دادن ژن مورد مطالعه در وکتور فوق، پس از آدنیله کردن و تخلیص آن، واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 لیگاز انجام پذیرفت (شکل شماره ۲) (۴، ۱۰، ۱۱).

تهیه سلول‌های مستعد (Competent Cells): به‌منظور تهیه سلول‌های مستعد، از سوش E. coli DH5 α استفاده شد. مستعد سازی به روش شیمیایی انجام گرفت. ابتدا سوش (۱۵ ساعت، بدون آنتی‌بیوتیک در LB مایع، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دور rpm ۱۵۰) کشت داده شد. از محیط کشت فوق ۵۰۰ μl میکرو لیتر به LB مایع ۵۰ میلی‌لیتری تلقیح شد و سپس (۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۵۰) گرما گذاری شد. پس از رسیدن OD محیط کشت به ۰/۴ در طول موج ۶۰۰ nm، انکوباسیون متوقف شد. محیط کشت در کنار شعله به داخل لوله‌های بزرگ مخصوص سانتریفیوژ انتقال داده شد. محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب ۲۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی مولار سرد استریل اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده شد. در این مرحله محلول (دور rpm ۳۰۰۰، ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شد. رسوب در ۳ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی مولار حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در یخ قرار داده شد. به سلول‌های فوق گلیسرول استریل به مقدار ۲۰ درصد (حجم به حجم) اضافه و بعد از به هم زدن آرام در لوله‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری تقسیم و در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۸، ۴).

تراریخت نمودن DNA نوترکیب (Transformation) به داخل سلول‌های میزبان E. coli: سلول‌های مستعد از یخچال منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خارج شدند. ۲۰۰ میکرو لیتر از سلول‌های مستعد E. coli DH5 α در شرایط استریل به تیوب‌های

ترسیب نمکی پلاسمید برش خورده: ابتدا حجم واکنش هضم دوگانه فوق با آب مقطر به ۲۰۰ میکرو لیتر رسانده شد و سپس ۰/۱ حجم کل به آن نمک NaAc، ۳ مولار اضافه شد و در ادامه الکل اتانول ۹۷ درصد یا ایزوپروپانول به مقدار دو برابر حجم به آن اضافه (۱۲ ساعت، دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. پس از اتمام زمان فوق، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نمونه سانتریفوژ شد. رسوب با الکل ۷۰ درصد شستشو گردید و دوباره مدت به ۱۰ دقیقه، ۱۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد. در ادامه اجازه داده شد تا رسوب در دمای آزمایشگاه خشک شود و به آن بافر TE اضافه گردید.

الحاق قطعه هدف با وکتور برش خورده: واکنش الحاق بعد از تعیین غلظت وکتور و قطعه الحاقی، انجام گرفت. وکتور خطی شده به میزان ۵ ماکرو لیتر، قطعه DNA به میزان ۲ ماکرو لیتر، 10 XBuffer به میزان ۳ ماکرو لیتر، T4 DNA Ligase به میزان ۳ ماکرو لیتر، آب مقطر تزریقی به میزان ۱۶ ماکرو لیتر، مخلوط فوق به مدت 17 ساعت در دمای ۱۴-۱۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این دما کمک می‌کند تا تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین انتهای چسبناک آسان تر و با پایداری بیشتری انجام شود تا آنزیم لیگاز زمان کافی برای تشکیل پیوند فسفودی استری را داشته باشد.

تهیه سلول‌های مستعد (Competent Cells): به منظور تهیه سلول‌های مستعد، از سوش E. coli BL21 از روش توضیح داده شده در مورد سلول‌های E. coli DH5a استفاده شد. تراریخت نمودن سلول‌های مستعد (Transformation) به داخل سلول‌های میزبان E. coli: در این مرحله از روش توضیح داده شده در تراریخت نمودن مورد سوش‌های E. coli DH5a استفاده شد.

بررسی و آنالیز کلون‌های حاوی DNA نوترکیب: ابتدا کلون‌هایی که بر روی محیط Mackancy آگاردار حاوی کانامایسین رشد کرده بودند، با انتقال به LB مایع حاوی کانامایسین، ۸۰ µg/ml، کشت داده شدند و در شیکر انکوباتور، با ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ساعت گرما گذاری شدند. از محیط‌های کشت فوق عمل تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام گرفت؛ و سپس برای محصولات فوق واکنش PCR انجام شد که مؤید وجود ژن مورد نظر در باکتری تراریخت شده بود.

بیان پروتئین ژن مورد نظر: ابتدا تعدادی از کلون‌های انتخاب و از هر کدام به مقدار ۲۰-۱۰ میکرو لیتر در لوله‌های حاوی ۵ میلی لیتر LB مایع با غلظت کانامایسین ۸۰ µg/ml، ۱۵ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۷۰-۱۵۰ گرما گذاری شدند.

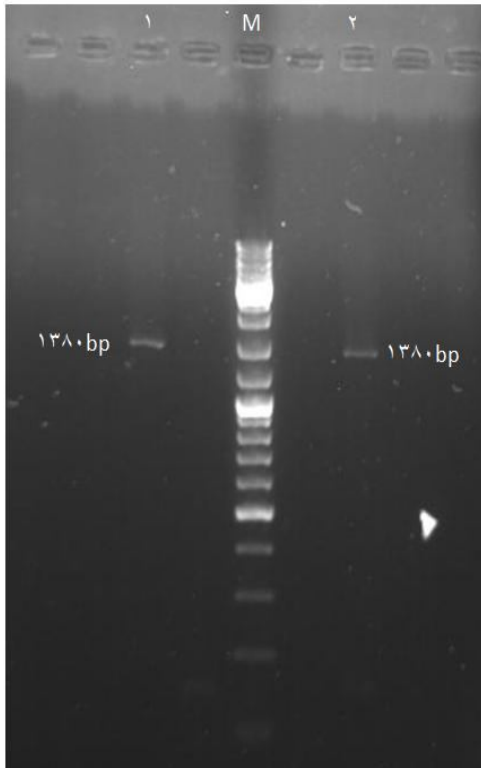
تخلیص پلاسمید از کلون‌های کشت داده شده از روش لیز قلیایی استفاده شد. پس از انجام سانتریفوژ کشت‌های حاوی باکتری نوترکیب، محیط رویی برداشته شد. به رسوب در مراحل مختلف SET بافر، Lysis Buffer و پتاسیم استات افزوده شد. ۴۵۰ میکرو لیتر محلول فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲۴:۲۵ به محلول اضافه شد. سپس به. پس از سانتریفوژ فاز رویی به تیوپ جدید منتقل شد. سپس یک میلی لیتر الکل اتانول ۹۹ درصد به تیوپ‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از اتمام زمان ذکر شده، تیوپ‌ها (۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm) سانتریفوژ شدند. به رسوب یک میلی لیتر الکل ۷۰ درصد اضافه شد. سپس تیوپ‌ها دوباره (۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۴۰۰۰ rpm) سانتریفوژ شدند. سپس به رسوب ۲۵ میکرو لیتر بافر TE اضافه شد. همچنین برای از بین بردن RNA ها ۵ میکرو لیتر RNase (10mg/ml) به آن اضافه شد (۷).

تائید کلون‌ها با PCR، برای ژن مورد نظر: به منظور تائید حضور وکتور نوترکیب در باکتری، برای ژن مورد نظر واکنش PCR گذاشته شد در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد ژن ما رؤیت شد.

هضم آنزیمی وکتور نوترکیب: این واکنش به وسیله آنزیم Taq انجام شد. در این مرحله ناقل Teasy vector حاوی ژن مورد نظر به کمک دو آنزیم BamHI و NcoI که برای کلونینگ در نظر گرفته شده بودند، با مورد هضم قرار گرفت: واکنش فوق به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس مقدار ۵ میکرو لیتر از آن روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد تا نتیجه هضم آنزیمی بررسی شود (اگر قطعه مورد نظر از ناقل جدا شود نشان دهنده وجود وکتور نوترکیب در باکتری است).

تخلیص محصول هضم آنزیمی: در این مرحله محصول هضم آنزیمی در ژل آگارز با دمای ذوب پایین ریخته شد و بعد از الکتروفورز باندهای مشاهده شده به وسیله کیت تخلیص استخراج شد.

آماده سازی وکتور بیانی: به منظور آماده سازی وکتور pET28a+ جهت زیرهمسانه سازی، با توجه به دو انتهای چسبناک قطعه مورد نظر (که دارای جایگاه NcoI در انتهای ۵ و جایگاه BamHI انتهای ۳ است) وکتور به کمک دو آنزیم NcoI و BamHI هضم شد تا دو انتهای چسبناک در وکتور نیز حاصل شود. برای این کار میزان ۵ میکرو لیتر از وکتور برش خورده، ۴ ماکرو لیتر از آنزیم EcoRI، ۱ ماکرو لیتر آنزیم BamHI، بافر ۱۰ ماکرو لیتر، آب تزریقی ۳۲ ماکرو لیتر با هم مخلوط شدند. پس از آماده سازی واکنش فوق به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.



تصویر (۱): تکثیر ژن ناحیه اتصال توسط PCR

الحاق ژن تکثیر شده ناحیه اتصال به وکتور همسانه‌سازی: ژن ناحیه اتصال با توجه به پرایمرهای طراحی شده به درون وکتور PGEM وارد شد، میزبان برای وکتور همسانه‌سازی باکتری *E. coli* DH5 α بود، واکنش‌های PCR و برش آنزیمی وکتور همسانه‌سازی صحت فرایند را تأیید کرد (تصویر ۲).



تصویر (۲): تأیید همسان آنزیمه‌سازی ژن ناحیه اتصال با برش آنزیمی

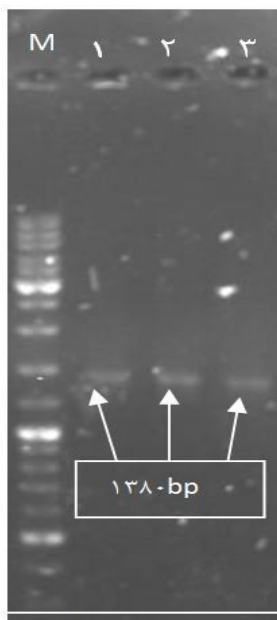
مقدار ۵۰ میکرو لیتر از کشت تازه به‌طور جداگانه در دو لوله (یکی شاهد و دیگری تست) حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع و ۴۰ $\mu\text{g/ml}$ کانامیسین تلقیح و لوله‌ها با شرایط فوق گرما گذاری شدند. پس از رسیدن مقدار جذب نوری لوله‌ها به ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به هرکدام از لوله‌های تست در شرایط استریل (کنار شعله)، ماده ایزوپروپیل-بتا-۱-D-گالاکتو پیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار اضافه و به لوله‌های شاهد هیچ IPTG اضافه نگردید. سپس لوله‌های شاهد و تست به مدت ۶ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۷۰-۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از اتمام زمان فوق، محیط کشت داخل لوله‌های تست و شاهد به میکروتیوب‌های جداگانه منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند تا سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری و در مرحله بعد از لحاظ بیان بررسی گردند. سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در مرحله فوق (اعم از تست و شاهد) به دودسته تقسیم و به دو روش خام و دناتوره تیمار شدند. در روش خام، بخشی از سلول‌ها با سمپل بافر دارای غلظت ۲/۵X مخلوط به مدت ۵ دقیقه، با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. در روش ترکیبی، بخش دیگر سلول‌ها به‌طور جداگانه با ۵۰۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده B مخلوط و از طریق سونیکاسیون با قدرت ۷۰ درصد و ۰/۵ پالس در چهارچرخه زمانی (هرکدام شامل ۱۵ ثانیه سونیکاسیون و ۴۵ ثانیه استراحت درون یخ) شکسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و محلول رویی با نسبت یک (sample buffer) به پنج (نمونه) با سمپل بافر دارای غلظت ۵X مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. همچنین در برخی مراحل، سلول‌ها فقط به روش طبیعی تیمار شدند. این روش مانند روش ترکیبی است ولی با این تفاوت که در روش طبیعی از بافر لیز کننده طبیعی به‌جای بافر لیز کننده B استفاده و نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند در نهایت نمونه‌های تیمار شده به روش‌های فوق، توسط SDS-PAGE ژل الکتروفورز از لحاظ بیان پروتئین‌های نو ترکیب بررسی شدند.

یافته‌ها

تکثیر ژن ناحیه اتصال از ژنوم باکتری: با استفاده به پرایمرهای طراحی شده ژن موردنظر از ژنوم باکتری تکثیر شد (تصویر شماره ۱).

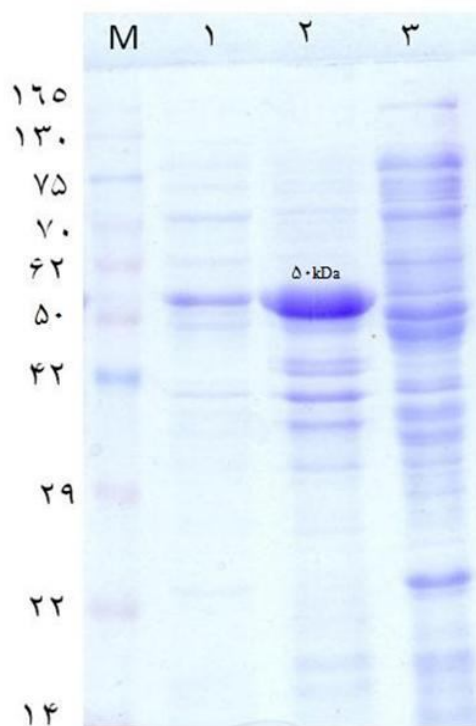
وکتور بیانی در این مرحله باکتری سوش E. coli BL21 بود، واکنش PCR و غربال‌گری کلونی‌های رشد کرده صحت فرایند را تأیید کرد (تصویر ۳).

برش وکتور بیانی pET28a+ و وارد کردن ژن موردنظر به آن: به‌وسیله جایگاه‌های برشی در نظر گرفته‌شده، ژن ناحیه اتصالی در وکتور همسانه‌سازی، همچنین وکتور بیانی از محل‌های موردنظر برش خورده و ژن ناحیه اتصالی در وکتور بیانی وارد شد، میزبان



تصویر (۳): نتایج PCR از وکتور بیانی

بیان پروتئین موردنظر: بیان پروتئین ناحیه اتصالی بعد از القا توسط IPTG روی ژل SDS-PAGE رؤیت شد (تصویر ۴).



تصویر (۴): پروتئین بیان شده

بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر بهترین کاندیدای واکسن برای مقابله با مسمومیت‌های ناشی از نوروتوکسین‌های بوتولینوم به‌ویژه BONT/B استفاده از ناحیه اتصال‌دهنده نوروتوکسین می‌باشد. اولین تحقیقات بر روی واکسن‌های نو ترکیب متشکل از ناحیه اتصال‌دهنده سم بوتولینوم مربوط به پژوهش مایکل کلایتون در سال ۱۹۹۵ است؛ اما در تحقیقات میرلطیف موسوی، تولایی، وود وارد، آریمیتسو، شارما و یو ژو، ژن ناحیه اتصال‌دهنده سم بوتولینوم به‌واسطه تکثیر ژن‌های کلاسترییدیایی طبیعی این ناحیه توسط PCR به‌دست‌آمده و در سایر تحقیقات مذکور از ژن‌های سنتتیک مربوط به ناحیه اتصال‌دهنده سم بوتولینوم استفاده شده است (۱۴-۱۲). به دلیل این‌که توالی ژن‌های کلاسترییدیومی غنی از بازهای آدنین و تیمین است، بیان این ژن‌ها در باکتری اشریشیا کولی پایین می‌باشد. پژوهشگران روش‌های مختلفی برای حل این مسئله اتخاذ نموده‌اند. یکی از این روش‌ها، حذف کدون‌های کمیاب و تنظیم کدون‌ها متناسب با کدون‌های رایج در باکتری اشریشیا کولی است. در یک تحقیق انجام شده توسط مک‌اوف،

ترادف انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین سم کلاسترییدیوم تتانی باهدف حذف کدون‌های کمیاب سنتز و پس از بیان این ژن در باکتری اشریشیاکولی، میزان پروتئین به‌دست‌آمده از ۳ درصد به ۱۴-۱۱ درصد حجم کل پروتئین سلول رسیده است (۱۵). در این تحقیق از ژن اصلی باکتری برای بیان پروتئین استفاده شد. فرایندهای الحاق به وکتور کلونینگ و بیانی به سهولت انجام گرفت؛ اما بیان پروتئین در باکتری میزبان بالا نبود، ازاین‌رو پیشنهاد می‌شود برای تولید واکسن‌های توکسوئیدی که نیاز به تولید مقادیر زیادی از پروتئین می‌باشد از ژن‌های سنتتیک به‌جای ژن‌های اصلی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

در این پژوهش گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم و مهندسی دانشگاه امام حسین (ع) دارای نقشی اساسی بوده به‌خصوص جای دارد از زحمات جناب دکتر فیروز ابراهیمی و جناب عباس حاجی زاده که در راهنمایی علمی نهایت محبت را مبذول این طرح کردند تشکر کنیم.

References:

1. Singh BR. Intimate detail of the most poisonous poison: Nat Struct. Biol 2000; 7: 617-619.
2. Zinseer H. Zinseer Microbiology, 18th ed. Norwalk. Appleton and lange 1984; Jawetz Microbiology-Dr. Athari 9: 405-10.
3. 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.
4. Ralph R. The nucleic acid protocols hand book: Protocol 2000; 14.
5. Crowther J. Eliza theory and practice: Methods in molecular biolog. Human press; 1995.
6. Ohish I, Sakagushi G. Oral toxicities of Clostridium botulinum type C and D toxin of different molecular size. Infect Immun 1980; 28:303-9.
7. Russel D, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory Manual. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
8. Byrne MP, Smith LA. Development of vaccines for prevention of botulism. Biochimie 2000;82(9-10):955-66.
9. Arnon SS, Schechter R, Maslanka SE, Jewell NP, Hatheway CL. Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism. N Engl J Med 2006; 354(5):462-71.
10. Erbguth FJ. From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. J. Neural Transm 2008; 115(4):559-65.
11. Peck MW. Biology and genomic analysis of Clostridium botulinum. Adv Microb Physiol 2009;55:183-265, 320.
12. Mousavi M L, Montaser S, Nazarian S, Rasooli I, Amani J. Cloning expression and purification of Clostridium botulinum neurotoxin type E binding domain. Iran J Biotechno 2004; 2(3):24-7.
13. Tavallaie M, Chenal A, Gillet D, Pereira Y, Manich M, Gibert M, et al. Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the

- generation of protective antibodies. *FEBS Lett* 2004;572(1-3):299–306.
14. Woodward LA, Arimitsu H, Hirst R, Oguma K. Expression of HC Subunits from *Clostridium botulinum* Types C and D and Their Evaluation as Candidate Vaccine Antigens in Mice. *Infection and Immunity* 2003; 71(5): 2941–4.
15. Makoff AJ, Oxe MD, Romanos MA, Fairweather NF, Ballantine S. Expression of tetanus toxin fragment C in *E. coli*: high level expression by removing rare codons. *Nucleic Acids Res* 1989;17(24):10191–202.
16. Russel D, Sambrook J. *Molecular cloning a laboratory Manual*. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

CLONING AND EXPRESSION OF CLOSTRIDIUM BOTULINUM TYPE B BINDING DOMAIN E. COLI

Siamak Rezaeiani¹, Firoz Ebrahimi^{2*}, Hossein Honari³, Abbas Hajizade⁴, Babak Barati⁵

Received: 21 Apr, 2014; Accepted: 25 Jun, 2014

Abstract

Backgrounds & Aims: Botulism is caused by botulinum toxin. The best way to avoid the neurotoxin syndrome caused by BONT/B is to use recombinant vaccine made of BONT/B binding domain because binding domain has sufficient epitops to stimulate immune response.

Materials & Methods: Initially BONT/B binding domain gene sequence were obtained from GenBank. Then the primers were designed. PCR reaction was performed. Then gene was ligated to pGEM-Teasy vector. After verifying the transformation *E.coli DH5α*, subcloning was done. Pet28(a)+ vector was introduced to SDS-PAGE and Western blot confirmed production of the protein.

Results: The results obtained from PCR sequencing via IPTG induction and expression analysis by SDS-PAGE and its confirmation by Western blot indicated the cloning and expression process accuracy.

Conclusion: Finally, this method may be suitable for production of recombinant vaccines without any side effects. Cloning and expression of this vaccine candidate were conducted successfully and its immunization potential should be investigated.

Keywords: Clostridium botulinum, BONT/B, Cloning, Expression, Vaccine

Address: Imam Hossein University, Department of Biology, Faculty of Science, Tehran, Iran

Tel: +98 2177104935

Email: febrhimi@ihu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(6): 510 ISSN: 1027-3727

¹ MA Student in Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran (Corresponding Author)

³ Assistant Professor, Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran

⁴ Instructor, Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran

⁵ Instructor, Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran