Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:14 +0430 on Sunday May 27th 2018

مقاله پژوهشی

همسانه‌سازی و بیان ناحیه اتصالی نوروتوکسین نوع B باکتری کلستریدیوم بوتولینوم در باکتری E. coli

سیامک رضائیانی[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 نوروتوکسین‌های باکتری کلستریدیوم بوتولینوم ایجاد می‌شود. این نوروتوکسین‌ها دارای هفت سروتیپ از A – G می‌باشند. بهترین راه برای جلوگیری از سندرم بوتولیسم ایجاد شده توسط BONT/B استفاده از واکسن‌های نوترکیب ساخته‌شده‌ی ناحیه اتصالی آن می‌باشد. چون دارای اپی توپ‌های کافی برای تحریک سیستم ایمنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا سکانس 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. بعدوکتور نوترکیب وارد باکتری E. coliDH5α گردید. سپس، زیرهمسانه‌سازی در باکتری E. coliBL21 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 تائید 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، نوروتوکسین 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

Botulinum neurotoxins، یکی از سمی‌ترین مواد شناخته‌شده در علوم بشری هستند. انسان‌ها معمولاً به‌واسطه مسمومیت غذایی در معرض نوروتوکسین‌های تولیدشده توسط باکتری Clostridium botulinum قرار می‌گیرند (۱). هرچند موارد مسمومیت از طریق زخم (بوتولیسم جراحت) 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 نوروتوکسین تولیدشده (تحت شرایط بی‌هوازی) توسط سویه‌های سمی Clostridium botulinum یا C.barati و C.butyricum ایجاد می‌شود. علائم بوتولیسم (مسمومیت با نوروتوکسین 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 غیرارادی نظیر تنفس رخ خواهد داد که منجر به مرگ می‌شود (۲). هفت نوروتوکسین بوتولینوم ازلحاظ 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 موردتحقیق و بررسی قرار گرفته است.

---

[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)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:14 +0430 on Sunday May 27th 2018

مهار نمودن فعالیت سم بوتولیسم در هر یک از سه مرحله کلیدی فرایند ایجاد مسمومیت منجر به مصونیت در برابر بوتولیسم خواهد شد. در حال حاضر برای ایجاد مصونیت اختصاصی در افراد در معرض خطر از یک توکسوئید پنج ظرفیتی بوتولیسم 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 بوتولیسم از اواخر دهه ۱۹۶۰ و اوایل ۱۹۷۰ میلادی آغاز شده است. اولین بار در سال ۱۹۷۱ واکسن‌های تک‌ظرفیتی به‌صورت انبوه تولید و در سال ۱۹۷۸ بسته‌بندی و عرضه شدند (۳). درحالی‌که بوتولیسم با منشأ غذایی یک مسمومیت بشمار می‌آید، اما انواع دیگر این بیماری که به بوتولیسم نوزادان و روده بزرگ‌سالان معروف است، یک نوع عفونت بشمار می‌آیند. برخلاف نوع قبلی، عفونت ایجادشده درون بدن منشأ تولید سم است. ازآنجاکه بوتولیسم نوزادان در سن زیر یک سال به وقوع می‌پیوندد، عقیده بر این است که به علت عدم توسعه‌یافتگی کافی فلور طبیعی دستگاه گوارش، رقابت کافی و لازم با کلستریدیوم بوتولینوم به وجود نمی‌آید، لذا امکان کلونیزاسیون باکتری به شکل رویشی در روده بزرگ و درنتیجه 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 نوترکیب بر پایه ناحیه‌ی اتصالی نوروتوکسین 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 (۷-۵).

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها: باکتری کلستریدیوم بوتولینوم تیپ Bدر محیط مخصوص باکتری‌های بی هوازی رشد داده شد (Cooked Meatشرکت Hi media). از محیط‌های مخصوص باکتری E. coli برای رشد سوش های میزبان استفاده گردید (LB Broth و LB Agar). آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده Ampicilin و kanamycin بوده‌اند (شرکت Roche).

پلاسمیدها: از وکتور کلونینگ (pGEM-T Easy که به‌صورت 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).

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 همراهdATP,MgSO4 Buffer,MgCl2,dNTPs Mix 10X, (شرکت سیناژن، Fermentas). مواد و آنزیم‌هایی از قبیل Tris Tris Hcl,base,Sucrose,EDTA, کلروفرم، 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 (شرکتMerk).

سویه‌های باکتریایی: سویه کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B و سویه کلونینگ E. coliDH5α و نیز سویه E. coliBL21pLsS جهت تهیه سلول مستعد استفاده شد (از مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شد).

پرایمرهای طراحی شده و آنالیز آن‌ها: پرایمرها به‌صورت 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 ازاین‌رو، 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 ۵۰۰۰rpm 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 میکرولیتر N– لوریل سارکوزین ۱۰% (در بافر (HTE به محلول اضافه شد. ۵ میکرو لیتر آنزیم RNase (۱۰mg/ml) اضافه کرده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۱۵ دقیقه) گرما گذاری شد. سپس ۴۰ میکرو لیتر پروتئیناز K (۲۰mg/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. به‌اندازه حجم نمونه در یک مرحله فنل خالص، در مرحله دیگر مخلوط یک‌به‌یک فنل- کلروفرم و در مرحله بعدازآن هم کلروفرم خالص اضافه کرده و (دور ۸۰۰۰ rpm، یک دقیقه) سانتریوفیوژ شد پس

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:14 +0430 on Sunday May 27th 2018

از جداسازی محلول رویی آن را در یک لوله جدید ریخته و ۲ برابر حجم منونه 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 نانواسپکتروفوتومتری برای مرحله بعدی کار یعنی PCR مورداستفاده قرار گرفت (۴، ۱۰، ۱۱).

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

الحاق ژن موردمطالعه باpGEM- T Easy Vector : برای قرار دادن ژن موردمطالعه در وکتور فوق، پس از آدنیله کردن و تخلیص آن، واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4لیگاز انجام پذیرفت (شکل شماره ۲) (۴، ۱۰، ۱۱).

تهیه سلول‌های مستعد (Competent Cells): به‌منظور تهیه سلول‌های مستعد، از سوش E. coli DH5α 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 ۵۰۰µl 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 طول‌موج ۶۰۰nm، انکوباسیون متوقف شد. محیط کشت در کنار شعله به داخل لوله‌های بزرگ مخصوص سانتریفوژ 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) سانتریفوژ شد. رسوب در ۳ میلی‌لیتر کلریدسدیم 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).

تاریخت 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 DH5α در شرایط استریل به تیوب‌های 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) سانتریفوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در ۵۰ میکرو لیتر محیط LB مایع دوباره حل شد و بر روی LB آگاردار حاوی Ampicilinبه غلظت ۱۰۰µg/ml -۸۰ کشت (۱۵ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) داده شد (۴).

غربال‌گری کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب: در این تحقیق از وکتور کلونینگ pGEM-T Easyواجد 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 انتهای۳ 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 به‌مرورزمان 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 µg/ml ۱۰۰- ۸۰ آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مدت یک شب (Over night) کشت داده شد (دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد دور ۱۵۰rpm دور).

تخلیص پلاسمید از کلون‌های کشت داده‌شده: به‌منظور

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:14 +0430 on Sunday May 27th 2018

تخلیص پلاسمید از کلون‌های کشت داده‌شده 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 ـ کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵:۲۴:۱ به محلول اضافه شد. سپس به. پس از سانتریفوژ فاز رویی به تیوپ جدید منتقل شد. سپس یک میلی‌لیتر الکل اتانل ۹۹ درصد به تیوپ‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از اتمام زمان ذکرشده، تیوپ‌ها (۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۴۰۰۰rpm) سانتریفوژ شدند. به رسوب یک میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد اضافه شد. سپس تیوپ‌ها دوباره (۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۴۰۰۰rpm) 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 موردنظر: به‌منظور تائید حضور وکتور نوترکیب در باکتری، برای ژن موردنظر واکنش PCR گذاشته شد در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد ژن ما رؤیت شد.

هضم آنزیمی وکتور نوترکیب: این واکنش به‌وسیله آنزیم Taq انجام شد. در این مرحله ناقل Teasy vector حاوی ژن موردنظر به کمک دو آنزیم BamHI وNcoI که برای کلونینگ در نظر گرفته‌شده 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 موردنظر از ناقل جدا شود نشان‌دهنده 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 مشاهده‌شده به‌وسیله‌ی کیت تخلیص استخراج شد.

آماده‌سازی وکتور بیانی: به‌منظور آماده‌سازی وکتور pET28a+ جهت زیرهمسانه‌سازی، با توجه به دو آ نت‌های چسبناک قطعه موردنظر (که دارای جایگاه NcoI در انتهای ´۵ و جایگاه BamHI انتهای ´۳ است) وکتور به کمک دو آنزیمNcoI و BamHI هضم شد تا دو انتهای چسبناک در وکتور نیز حاصل شود. برای این کار میزان ۵ میکرولیتر از وکتور برش خورده، ۴ ماکرولیتر از آنزیم EcoRI، ۱ ماکرولیتر آنزیم BamHI، بافر ۱۰ ماکرولیتر، آب تزریقی ۳۲ ماکرولیتر با هم مخلوط شدند. پس از آماده‌سازی واکنش فوق به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

ترسیب نمکی پلاسمید برش خورده: ابتدا حجم واکنش هضم دوگانه فوق با آب مقطر به۲۰۰ 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 ۱۴۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نمونه سانتریفوژ شد. رسوب با الکل ۷۰ درصد شستشو گردید و دوباره مدت به ۱۰ دقیقه، ۱۴۰۰۰rpm 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 ماکرولیتر، قطعه DNAبه میزان ۲ ماکرو لیتر، 10 XBuffer به میزان ۳ ماکرولیتر،T4 DNA Ligase به میزان ۳ ماکرولیتر، آب مقطر تزریقی به میزان ۱۶ ماکرولیتر، مخلوط فوق به مدت 17 ساعت در دمای ۱۴- ۱۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این دما کمک می‌کند تا تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین انتهاهای چسبناک آسان‌تر و با پایداری بیشتری انجام شود تا آنزیم لیگاز زمان کافی برای تشکیل پیوند فسفودی استری را داشته باشد.

تهیه سلول‌های مستعد (Competent Cells): به‌منظور تهیه سلول‌های مستعد، از سوشE. coli BL21 از روش توضیح داده‌شده در مورد سلول‌های E.coli DH5αاستفاده شد.

تراریخت نمودن سلول‌های مستعد (Transformation) به داخل سلول‌های میزبان E. coli: در این مرحله از روش توضیح داده‌شده در تراریخت نمودن مورد سوش‌های E. coli DH5α 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 موردنظر در باکتری تراریخت شده بود.

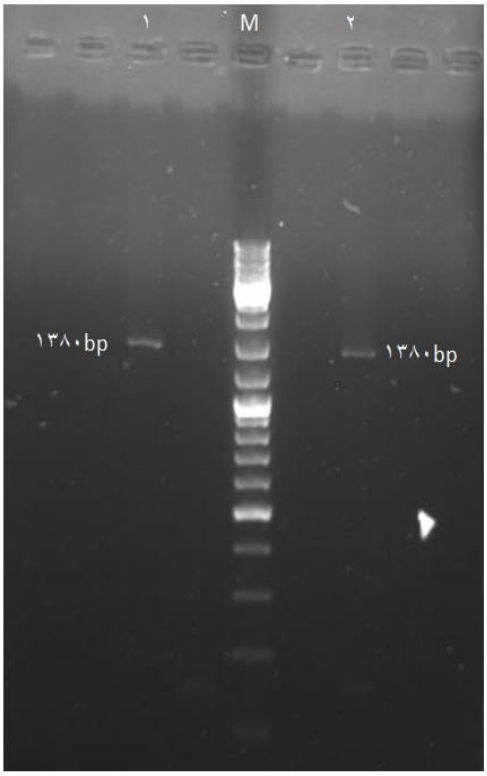
بیان پروتئین ژن موردنظر: ابتدا تعدادی از کلون‌های انتخاب و از هرکدام به مقدار ۲۰-۱۰ میکرو لیتر در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر LB مایع با غلظت کانامیسین ۸۰ µg/ml، ۱۵ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۷۰ rpm- ۱۵۰ گرما گذاری شدند.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:14 +0430 on Sunday May 27th 2018

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 µg/ml کانامیسین تلقیح و لوله‌ها با شرایط فوق گرما گذاری شدند. پس از رسیدن مقدار جذب نوری لوله‌ها به ۰/۸ در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر، به هرکدام از لوله‌های تست در شرایط استریل (کنار شعله)، ماده ایزوپروپیل-بتا- D-۱-گالاکتو پیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار اضافه و به لوله‌های شاهد هیچ IPTG اضافه نگردید. سپس لوله‌های شاهد و تستبه مدت ۶ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰-۱۷۰rpm 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 ازلحاظ بیان بررسی گردند. سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری‌شده در مرحله فوق (اعم از تست و شاهد) به دودسته تقسیم و به دو روش خام و دناتوره تیمار شدند. درروش خام، بخشی از سلول‌ها با سمپل بافر دارای غلظت ۲/۵x مخلوط به مدت ۵ دقیقه، با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. درروش 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 درنهایت نمونه‌های تیمار شده به روش‌های فوق، توسط SDS-PAGE ژل الکتروفورز ازلحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب بررسی شدند.

یافته‌ها

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



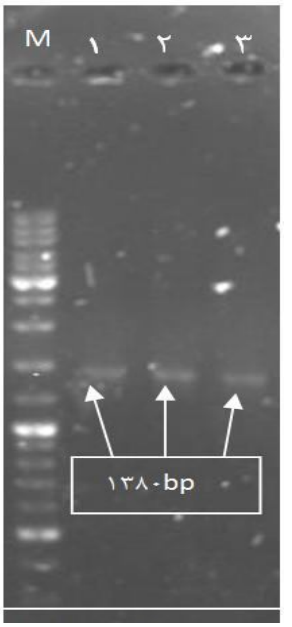
تصویر (۱): تکثیر ژن ناحیه اتصالی توسط PCR

الحاق ژن تکثیرشده ناحیه اتصالی به وکتور همسانه‌سازی: ژن ناحیه اتصالی با توجه به پرایمرهای طراحی شده به درون وکتور PGEM وارد شد، میزبان برای وکتور همسانه‌سازی باکتری E. coli DH5α بود، واکنش‌های PCR و برش آنزیمی وکتور همسانه‌سازی صحت فرایند را تائید کرد (تصویر ۲).

تصویر (۲): تائید همسان آنزیمیه‌سازی ژن ناحیه اتصالی با برش آنزیمی

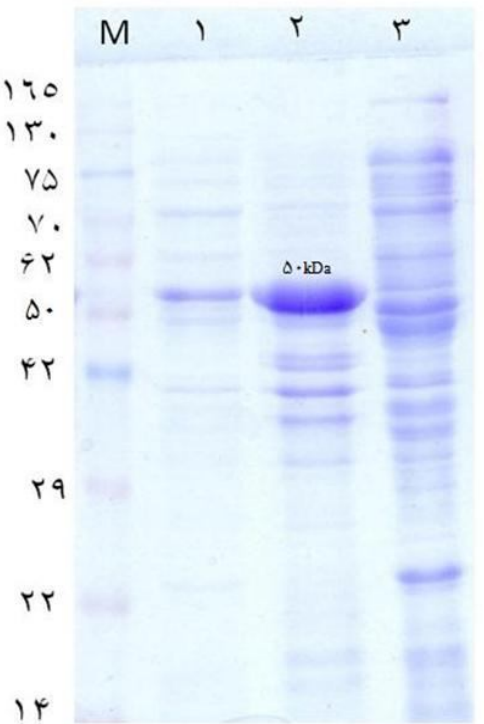
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:14 +0430 on Sunday May 27th 2018

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



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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:14 +0430 on Sunday May 27th 2018

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 نوترکیب 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 کلستریدیایی 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 کلستریدیومی 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 مَک‌اوف، ترادف انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین سم کلستریدیوم 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 وبیانی 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 Micribiology, 18th ed. Norwalk. Appleton and lange 1984; Jawetz Micribiology-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, Oxer 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.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:14 +0430 on Sunday May 27th 2018

Original Article

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

Siamak Rezaeiani[1], Firoz Ebrahimi[2]*, Hossein Honari[3], Abbas Hajizade[4], Babak Barati[5]

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 vactor. 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*

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:14 +0430 on Sunday May 27th 2018