زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ 3، شمارهٔ 2، پاییز و زمستان 1391

بیان نوترکیب و تخلیص زنجیره سبک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A در *E. coli* از یک ژن مصنوعی

علیرضا فراست[1]، فیروز ابراهیمی[2*]، سید جعفر موسوی[3]، سامان حسینخانی[4]، عباس حاجی زاده[5]، شهرام نظریان[6]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
2- استادیار، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
3- استادیار، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
4-استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
5- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
6- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

***تهران، کدپستی 1653765513**
febrhimi@ihu.ac.ir
(دریافت مقاله: 90/7/25، پذیرش: 91/6/20)

چکیده - نوروتوکسین‌های بوتولینوم، سمی ترین ترکیبات بیولوژیک شناخته شده‌اند که باعث ایجاد فلج عضلانی می‌شوند. خاصیت آنزیمی این توکسین‌ها، مهار آزادسازی میانجی عصبی استیل کولین را باعث می‌شود. مطالعه حاضر با هدف تولید نوترکیب بخش کاتالیتیک (زنجیره سبک) سم بوتولینوم تیپ A با درصد خلوص بالا، به‌منظور ارزیابی فعالیت آنزیمی انجام‌شد. توالی ژن زنجیره کاتالیتیک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A از پایگاه ژنی NCBI گرفته‌شد. پس از بهینه‌سازی کدون ترجیحی ژن مورد نظر برای *E.coli*، *توالی نهایی ژن به‌منظور سنتز در وکتور بیانی* pET28a(+) سفارش داده شد. پس از انتقال وکتور بیانی نوترکیب دارای ژن مذکور به میزبان *E.coli BL21-DE3* ، فرایند بیان در شرایط استاندارد انجام شد. در ادامه تولید پروتئین مورد نظر به شکل محلول با بهینه سازی کشت میزبان و بیان پروتئین صورت پذیرفت. پروتئین بیانی به وسیله ستون Ni-NTA تخلیص و با آنتی بادی اختصاصی مورد تأیید قرار گرفت. در این تحقیق بالاترین میزان بیان به شکل محلول، در شرایط غلظت 0/5 میلی مولار IPTG، با جذب نوری 0/5 و زمان القای 18 ساعت در دمای 18 درجه سانتی گراد به‌دست آمد. آزمایش‌های وسترن بلات و الایزا، وجود پروتئین هدف را تأییدکردند. براساس

نتایج، زنجیره سبک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A به شکل محلول تولید شد. فرایند تخلیص نیز با رزین تمایلی با کیفیت عالی انجام شد به طوری‌که پروتئین مورد نظر با درصد خلوص 98 به‌دست آمد.

کلید واژگان: نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A، زنجیره سبک، ناحیه کاتالیتیک، بیان نوترکیب

1- مقدمه

کلستریدیوم بوتولینوم باکتری گرم مثبت بی‌هوازی و میله‌ای شکل است که در خاک یافت می‌شود [1]. تاکنون 7 سروتایپ از این نوروتوکسین(سم عصبی) شناخته شده است که عبارت‌اند از: A،B،C_1،D،E،F،G که فقط تیپ های A،B،E و گاهی F در انسان ایجاد بیماری می کنند [2]. فلج ناشی از نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A بیشترین دوام را داراست [3]. دز کشنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A برای یک انسان 70 کیلوگرمی از طریق تنفس و تزریق به‌ترتیب 70، 0/9 میکروگرم برآورد شده است [4]. هریک از نوروتوکسین‌های بوتولینوم پس از بیان ژن به صورت یک پروتئین تک زنجیره ای با وزن 150 کیلودالتون بوسیله پروتئازها به دو زنجیره سنگین (HC) (100 کیلو- دالتون) و زنجیره سبک (LC) (50 کیلو دالتون) تبدیل می‌شوند. این دو زنجیره با یک پیوند دی سولفیدی به یکدیگر متصل‌اند. زنجیره سنگین مسئول اتصال به نورون های کولینرژیک محیطی است و زنجیره سبک اندوپپتیدازی وابسته به روی که پروتئین‌های مسئول رهاسازی نوروترانسمیتر را به طور اختصاصی در محل-های خاص می‌شکافد [5،6،7]. مطالعات، بیانگر وجود عملکردی چهار مرحله‌ای متمایز در مکانیزم مسمومیت سلولی به‌وسیله نوروتوکسین‌های بوتولینوم است. این عملکرد چهار مرحله ای، به ترتیب زیر است:

1- اتصال سم به غشای نورون‌های موتور.

2- نفوذ سم به درون غشای نورون‌های موتور.

3- عبور و انتقال از غشای نورون های موتور با احیای پیوند دی سولفیدی مابین دو زنجیرهٔ سبک وسنگین.

4- فعالیت کاتالیتیکی درون سلولی به‌وسیله زنجیره سبک [6].

نوروتوکسین‌های بوتولینوم سه نوع سوبسترا دارند: پروتئین سیناپتوبروین[1] VAMP2 که سوبسترای سروتیپ‌های F, D, G, B است؛ پروتئین اسنپ 25[2] SNAP25 که سوبسترای سروتیپ‌های A،C،E بوده و سیناتاکسین[3] که سروتیپ C روی آن اثر می‌گذارد [8]. بر اساس نتایج، نوروتوکسین تیپ A بر پروتئین SNAP – 25 انسانی اثر گذاشته و آن را از محل Gln^{197}–Arg^{198} می-شکافد [9]. از نظر ساختاری، زنجیره سبک نوروتوکسین‌های بوتولینوم پروتئین‌های کروی‌اند و 36/5 درصد شباهت در توالی بین آن ها مشاهده می‌شود [1]. اغلب متالواندوپپتیدازها،به عنصر روی (zn) به‌عنوان یک یون فلزی ضروری برای فعالیت کاتالیتیک خود نیاز دارند. این آنزیم‌ها در جایگاه فعال خود سه اسید آمینه و یک مولکول آب دارند که به فلز روی چسبیده اند. دو اسیدآمینه اول، اسید آمینه هیستیدین است که داخل موتیف HEXXH قرار دارند. در این موتیف گلوتامیک اسید نقش کاتالیتیک را برعهده دارد و برای پایدارسازی یک مولکول آب در مرکز کاتالیتیک واجد فلز روی به‌کار می‌رود. فعالیت بیولوژیکی و ساختمان سوم با برداشتن

1. Vesicle Associated Membrane
2. synaptosomal associated protein
3. Synataxin

فلز روی به صورت برگشت ناپذیر از دست می‌رود؛ به‌این ترتیب فلز روی نقش مهمی در بقای ساختمان فعال بیولوژیک در BoNT/A بازی می‌کند [10]. مبنای درمان بوتولیسم، مراقبت‌های بهداشتی و ایمن کردن غیر فعال با آنتی‌توکسین اسبی است. تزریق زودهنگام و بموقع این آنتی‌توکسین، از ادامه تخریب و آسیب‌های عصبی و شدت بیماری جلوگیری می‌کند. اما، نمی تواند فلج ایجاد شده را برگرداند [12،11]. درمان می تواند هفته ها یا ماه‌ها ادامه داشته باشد. به محض ورود سم به سلول‌های عصبی آنتی‌بادی‌ها غیر قابل دسترس می‌شوند، بنابراین هیچ داروی قابل دسترس به سم برای کاهش آثار ناشی از آن وجود ندارد [14،13]. به سبب فعالیت پروتئازی زنجیره سبک از نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A، تلاش-های زیادی در آزمایشگاه‌ها برای طراحی مهار کننده‌های صورت پپتیدی و غیر پپتیدی به عنوان داروی ضد بوتولیسم در جریان است [1]. با توجه به بالا بودن دز کشنده نوروتوکسین تیپ A ، تلاش‌های گسترده پژوهشگران کشورهای مختلف برای طراحی مهارکننده برای زنجیره سبک تیپ A و همچنین درصد بیان و خلوص پایین پروتئین حاصل از روش مهندسی ژنتیک، ما را بر آن داشت که با تولید مقادیر بالای پروتئین زنجیره سبک حاصل از ژن مصنوعی، راه را برای طراحی مهارکننده های اختصاصی و سپس درمان موفق بیماری ناشی از آن هموار نماییم.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

ژن مصنوعی زنجیره سبک نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A روی وکتور بیانی pET28a از شرکت شاین جین (shinegene) کشور چین تهیه و آنزیم‌های برش‌دهنده از شرکت فرمنتاز اکراین فراهم گردید. از باکتری *E. coli BL21-DE3* (محصولی از شرکت نواژن) به عنوان سلول میزبان بیانی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از پلاسمید pET28a استفاده شد که محصولی از شرکت نواژن است. مواد تشکیل دهنده SDS-PAGE و وسترن بلات نیزاز شرکت کیاژن تهیه شد. همچنین برای القا از IPTG تهیه شده از شرکت فرمنتاز استفاده شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون میل ترکیبی Ni-NTA (محصول شرکت کیاژن) استفاده شد. از فیلتر سوینکس میلی پور با نمره (cut off) 50 کیلو دالتون استفاده شد.

2-2- تراریخت نمودن سلول‌های *E. coli* با پلاسمید نوترکیب pET28a-LC

ابتدا، سلول مستعد با کشت سلول‌های *E. coli* در محیط *LB* به روش شیمیایی تهیه و سپس به روش شوک سرمایی، پلاسمید نوترکیب به سلول‌های مستعد منتقل و با کشت شبانه در محیط کشت مک آنکی آگار دارای آنتی بیوتیک کانامایسین سلول‌های تراریخته غربال گری شدند. از میان کلنی‌های رشد یافته در محیط کانامایسین دار به طور تصادفی چند کلنی در محیط LB رشد داده شد. سپس پلاسمید آن‌ها تخلیص گردید [15]. با توجه به در نظر گرفتن دو جایگاه برش آنزیمی *NdeI* و *XhoI* در ابتدا و انتهای ژن در وکتور، برای تأیید حضور ژن در پلاسیدهای تخلیص شده، هضم دوگانه آنزیمی اجرا شد. نتیجه هضم آنزیمی با ژل آگارز 1 درصد مورد ارزیابی قرارگرفت.

2-3- بیان ژن زنجیره سبک سم بوتولینوم تیپ A در سلول‌های *E. coli BL21-DE3*

ابتدا بیان پروتئین مذکور در شرایط استاندارد اجرا و نتایج بیان با SDS-PAGE بررسی شد. متأسفانه بیان این پروتئین در شرایط یاد شده موجب تولید شکل نامحلول پروتئین (انکلوژن بادی) شد. بنابراین به منظور بهینه سازی بیان، بر اساس جدول 1 شرایط مختلف بررسی شد.

جدول 1 اعمال شرایط مختلف برای بیان پروتئین LC

محیط کشت (5میلی لیتر)	آنتی‌بیوتیک (µg/ml)	جذب نوری در 600 نانومتر	IPTG (میلی مولار)	زمان القا (ساعت)	دما (درجه سانتی گراد)	$Zn\ Cl_2$ میکرومولار
LB	50	./5	./5	5	37	-
LB	50	./5	./5	5	30	-
LB	50	./5	1	5	37	-
LB	50	./5	./3	5	30	-
LB	50	./5	./7	5	30	-
LB	50	./5	./5	18	18	20

در تمام شرایط محصول کشت به مدت 5 دقیقه با دور 5000 سانتریفوژ شد. سلول‌های مورد نظر در بافر لیزکننده (حاوی NaH_2PO_4 50 میلی‌مولار، 300Nacl میلی‌مولار، Imidazole 10 میلی مولار، PMSF 1 میلی مولار با pH = 8) حل و سپس به روش سونیکه شدن (قدرت 75 درصد 4 سیکل: 10 ثانیه سونیکه شدن و 15 ثانیه در یخ) شکسته شدند. عصاره سلولی به مدت 15 دقیقه با دور 14000 سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی جداسازی و رسوب حاصل به مقدار مساوی با محلول رویی در بافر لیزکننده حل شد. در تمام موارد نمونه‌های به‌دست آمده به روش برادفورد و با استفاده از BSA به عنوان پروتئین استاندارد غلظت سنجی شدند. محلول رویی همراه با رسوب به روش SDS-PAGE 12 درصد الکتروفورز و سپس ژل به روش کوماسی بلو رنگ آمیزی شد [16].

2-4- تخلیص زنجیره سبک سم (LC) بوتولینوم تیپ A

تخلیص پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون میل ترکیبی Ni-NTA صورت گرفت. به منظور تخلیص پروتئین، از مقدار 1500 میکرولیتر محلول رویی عصاره سلولی حاصل از بیان برای تخلیص با ستون نیکل در هر بار استفاده شد. برای این منظور، ابتدا ستون کروماتوگرافی نیکل آماده شده از قبل، دو بار با آب مقطر (به حجم کل ستون) و سپس با 1/5 میلی‌لیتر بافر MES (20 میلی‌مولار) شستشو داده شد. بعد از تخلیه کامل بافر MES از ستون، محلول شفاف حاصل از مرحله قبل به ستون اضافه و محلول خروجی آن (flow) در یک ظرف جمع‌آوری شد. ستون به‌ترتیب با غلظت های 20، 40، 120، 170، 250 مورد شستشو قرار گرفت. بخش‌های حاصل از الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE 12 درصد، مورد بررسی قرار گرفت [16].

2-5- فیلتر کردن

برای حذف برخی از ناخالصی‌ها که رزین تمایلی نتوانسته بود آن‌ها را حذف کند از فیلتر استفاده شد. بدین منظور1500 میکرولیتر محلول محصول نهایی حاصل از

رزین تمایلی به داخل لوله فالکون حاوی فیلتر میلی پور با نمره 50 کیلو دالتون منتقل شد. سپس محلول انتقال یافته در دمای 4 درجه به مدت 3 ساعت با سرعت 2000RPM سانتریفوژ گردید تا تمام محلول از فیلتر خارج و ته لوله جمع شود. در ادامه، پروتئین‌های چسبیده به فیلتر در بافر لیزکننده حل گردید و بر روی ژل 12SDS-PAGE درصد مورد بررسی قرار گرفت.

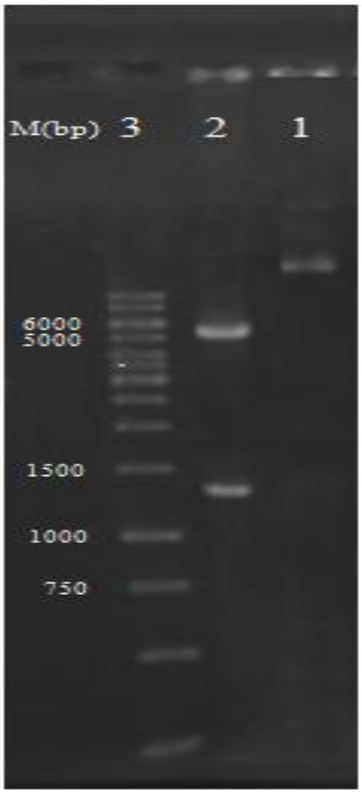
2-6- تأیید پروتئین بیان شده به روش الایزا و وسترن بلات

به منظور اطمینان از صحت پروتئین بیان شده، بعد از تخلیص، از روش وسترن بلات استفاده شد برای این منظور به‌ترتیب 30،20،10 میکروگرم پروتئین حاصل از فرایند تخلیص به ژل 12SDS-PAGE درصد تزریق گردید؛ سپس پروتئین‌های مورد نظر به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد و با مجاورت آنتی بادی پلی- کلونال اسبی ضد نوروتوکسین تیپ A مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین ارزیابی به روش الایزا نیز صورت پذیرفت.

3- یافته‌ها

3-1- تراریخت کردن سلول‌های *E. coli BL21-DE3*

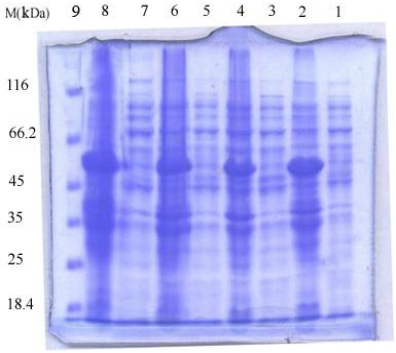
پس از تراریخت کردن سلول‌های *E. coli* با پلاسمید نوترکیب حاوی ژن مصنوعی، به منظور تأیید حضور ژن در وکتور pET28a، پلاسمید مذکور تخلیص و با آنزیم‌های *NdeI* و *XhoI* هضم آنزیمی شد؛ دستیابی به قطعه 1278 جفت بازی در ژل آگارز بیانگر حضور ژن مذکور بود (شکل1).



شکل 1 آنالیز به وسیله هضم آنزیمی.
ردیف 1: وکتور pET28a برش نخورده.
ردیف 2: وکتور pET28a حاوی ژن مورد نظر که با دو آنزیم فوق مورد هضم آنزیمی قرارگرفته است.
ردیف 3: مارکر وزن مولکولی.

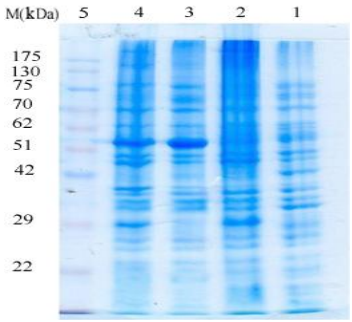
3-2- بیان پروتئین و بهینه‌سازی آن

پس از اطمینان از وجود ژن در پلاسمید مورد نظر، فرایند بیان در شرایط 1 میلی مولار IPTG و القا 5 ساعت در 37 درجه سانتی گراد صورت گرفت. سپس محلول رویی همراه با رسوب در ژل 12SDS-PAGE درصد الکتروفورز و به روش کوماسی بلو رنگ آمیزی شد (شکل2).



شکل 2 بررسی بیان نمونه کنترل و تست همراه با محلول رویی و رسوب آن‌ها. ردیف1: کنترل بدون القا با IPTG، ردیف 2: تست القا با IPTG، ردیف ۳،۵،7: محلول رویی حاصل از القا با IPTG، ردیف ۴،۶،8: رسوب حاصل از القا با IPTG، ردیف 9: نشانگر پروتئین.

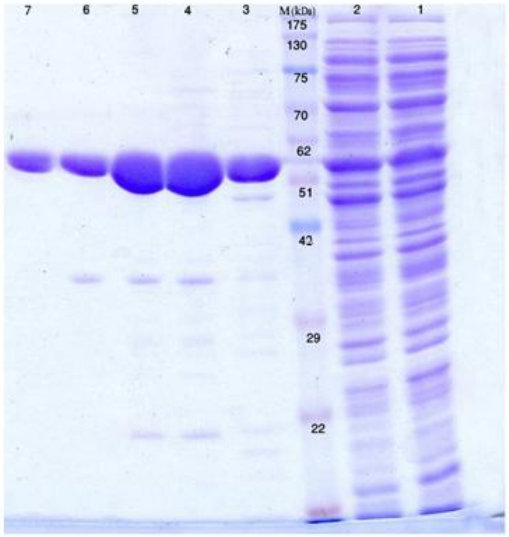
نتیجه به‌دست آمده از بیان (شکل 2)، بیانگر حضور پروتئین به صورت کنجاله‌های نا محلول بود. لذا به منظور تولید پروتئین به شکل محلول (جدول 1)، بیان در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرارگرفت. در نهایت، عمل بیان در شرایط 0/5 میلی مولار IPTG، القا 18 ساعت در 18 درجه سانتی گراد [5] همراه با 20 میکرومولار نمک $ZnCl_2$ به تولید پروتئین محلول منجرشد (شکل3).



شکل 3 بررسی بیان نمونه کنترل و تست در شرایط بهینه. ردیف 1: محلول رویی کنترل، بدون القا با IPTG، ردیف 2: رسوب کنترل، بدون القا با IPTG، ردیف 3 محلول رویی تست، القا با IPTG، ردیف 4: رسوب تست، القا با IPTG، ردیف 5: نشانگر پروتئین.

3-3- تخلیص پروتئین بیانی

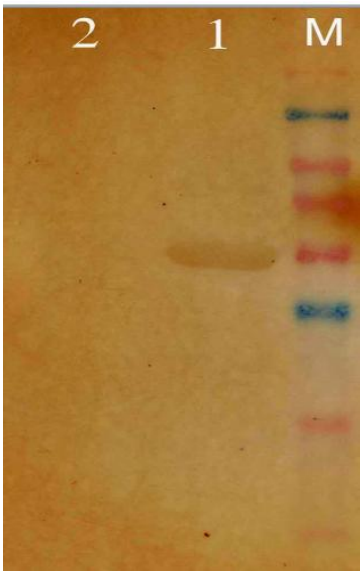
پس از تولید پروتئین محلول، تخلیص از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی در دمای 4 درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (شکل 4).



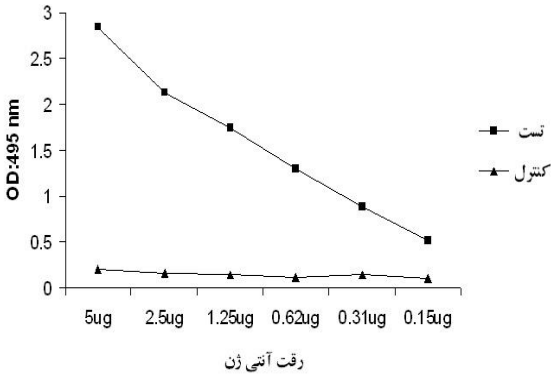
شکل 4 تخلیص پروتئین به روش کروماتوگرافی میل‌ترکیبی همراه با فیلترکردن. ردیف 1: ایمیدازول 10 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف 2: ایمیدازول 20 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف M(kDa): نشانگر پروتئین. ردیف3: ایمیدازول 40 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف4: ایمیدازول 120 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف5: ایمیدازول 170 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف6: ایمیدازول 250 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف7: عبور محلول حاصل از ردیف 7 از فیلتر

4-3- تأیید پروتئین بیان شده

پس از تخلیص، بیان پروتئین با استفاده از روش وسترن بلات و الایزا تایید شد نتایج در شکل 5 و نمودار 1 به نمایش در آمده است.



شکل 5 عمل وسترن بلات بر روی پروتئین حاصل از بیان ژن زنجیره سبک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ **A**. ردیف M(kDa): نشانگر پروتئین. ردیف 1: به‌ترتیب 30 میکروگرم از پروتئین تخلیص شده به چاهک تزریق شد. ردیف 2: 30 میکروگرم BSA به‌عنوان کنترل منفی به چاهک تزریق گردید.



نمودار 1 عمل الایزا بر روی پروتئین حاصل از بیان ژن زنجیره سبک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ **A**. از محصول سلول‌های القا نشده به عنوان کنترل استفاده شد.

■ شکل، تست + آنتی بوتولینوم تیپ **A** با رقت 1/1000+ کونژوگه با رقت 1/10000

▲ شکل، کنترل + آنتی بوتولینوم تیپ **A** با رقت 1/1000 + کونژوگه با رقت 1/10000

4- بحث

از میان نوروتوکسین‌های بوتولینوم، سه سویه ایجاد کننده بیماری بوتولیسم، برای پژوهشگران از اهمیت خاصی برخوردار است. بیشتر کارهای تحقیقاتی، در زمینه اثر اندوپپتیدازی نوروتوکسین‌های تیپ A، B، E که بوتولیسم انسانی ایجاد می‌کنند، صورت پذیرفته است [17]. اما در این تحقیق پروتئین محلول با درصد خلوص بالا تولید شد تا مورد مطالعات بعدی قرار گیرد. بدین منظور توالی نوکلئوتیدی زنجیره سبک نوروتوکسین تیپ A مربوط به سوش ATCC 3505 از بانک ژنی به‌دست آمد. بر اساس مطالعه بالدوین [18] از توالی 425 اسیدآمینه‌ای به علت انحلال پذیری و پایداری بالای پروتئین نسبت به توالی 448 اسیدآمینه‌ای استفاده کردند، در این بررسی توالی نوکلئوتیدی با 425 اسید آمینه، انتخاب شد. توالی نوکلئوتیدی برای بهینه سازی بیان، براساس کدون‌های متداول باکتری *E. coli* با استفاده از نرم افزار تنظیم شد زیرا ژن های کلستریدیوم به شکل طبیعی در باکتری *E. coli* به دلایل گوناگون بسیار ضعیف بیان می‌شوند [21-19]. براساس بهینه‌سازی‌های انجام شده در این تحقیق، درصد بازهای آلی GC در توالی نوکلوتیدی نهایی، از 28 درصد به عدد 46 درصد افزایش یافت و کدون‌های نادر نیز حذف گردید. با توجه به این‌که به طور متوسط، این مقدار در حالت طبیعی در ژن‌های بوتولینوم به‌طور متوسط حدود 30 درصد است بنابراین بهینه‌سازی توانست بیان پروتئین نوترکیب در میزبان انتخاب‌شده را به‌طور چشمگیری افزایش دهد[22]. سرانجام در وکتور بیانی، pET28a با نشان His_6-tag قرارداده شد. حضور این نشان برای تأیید محصول بیانی و تخلیص با کروماتوگرافی تمایلی کمک کننده‌است. بیان این پروتئین در وکتور pET28a بسیار موفقیت آمیز بود.

براساس شکل2 ، بیان پروتئین نوترکیب بالا بود اما این بیان بالا، مشکلاتی نیز داشت. از جمله‌ی این مشکلات، نبود فرصت کافی برای تاخوردگی‌های صحیح پروتئین در سلول بود. به همین دلیل، این پروتئین به شکل کنجاله‌های نامحلول تولید می‌شد که برای بررسی‌های آنزیمی باید به شکل محلول تبدیل می‌شد. برای حذف یا پایین آوردن میزان تولید کنجاله‌ها تلاش شد پروتئین در دمای پایین‌تر از 37 درجه ی سانتی‌گراد (18 درجه سانتی گراد)، غلظت 0/5 میلی مولار IPTG [5] و در حضور 20 میکرومولار نمک $Zn\ Cl_2$ بیان شود. اضافه بر آن، فلز روی نقش مهمی در بقای ساختمان فعال بیولوژیک در BoNT/A بازی می‌کند و به همین سبب در این تحقیق، به محیط کشت میزبان میزان کمی روی اضافه شد [10]. همچنین در دماهای پایین‌تر از دمای بهینه‌ی رشد و تکثیر، سینتیک رشد میزبان افت پیدا کرده و میزان بیان در مقایسه با دمای بهینه کم می‌شود. به همین دلیل برای استحصال مقادیر مناسب از پروتئین نوترکیب زمان القای طولانی (تا 18ساعت) لازم بود. اما در مقابل میزبان فرصت می‌کند تا ضمن بسته‌بندی صحیح پروتئین نوترکیب از تشکیل کنجاله‌های نامحلول جلوگیری کند. شکل 3 بیانگر تولید پروتئین محلول همراه با تولید پروتئین به شکل کنجاله نامحلول است. در این بررسی میزان پروتئین محلول نزدیک به 65 درصد به‌دست آمد. به منظور تخلیص نواحی مختلف نوروتوکسین‌هایی بوتولینوم، پژوهشگران مختلفی با مشکلاتی مانند خروج پروتئین از ستون در غلظت‌های کم ایمیدازول مواجه‌اند. پژوهشگران یاد شده دلیل این موضوع را مخفی شدن نشان هیستیدین در پروتئین ذکر نموده‌اند و برای حل مشکل، از نشان هیستیدین در دو طرف پروتئین (انتهای آمینی و انتهای کربوکسیل) استفاده کرده‌اند [23]. لی‌لی و بال رام سینگ در تخلیص زنجیره سبک بوتولینوم با این مشکل روبرو بودند بدین معنا که مقداری از پروتئین با غلظت 20 میلی مولار ایمیدازول از ستون خارج می‌شد و همچنین در غلظت‌های بالای 100 میلی مولار ایمیدازول علاوه بر زنجیره سبک پروتئین‌های دیگری نیز در ژل SDS-PAGE نمایان می‌شد. این پژوهشگران برای تخلیص بهتر خروجی، 100 میلی مولار ایمیدازول را از ستون تعویض یونی DEAE-A50 عبور دادند و توانستند ناخالصی‌ها را حذف کنند. البته در تخلیص حاضر چنین مشکلی خیلی حاد نبود و اندک ناخالصی باقیمانده به وسیله فیلترکردن حذف شد [24]. به‌دلیل اهمیت زیاد فعالیت اندوپپتیدازی این پروتئین، امکان استفاده از دو نشان هیستیدین در دو طرف پروتئین وجود نداشت زیرا ممکن بود در فعالت آنزیمی اختلال نماید. بنابراین، به منظور رفع مشکلات فوق چنانچه در شکل 4 نمایان است، پروتئین موجود در غلظت 250 میلی مولار ایمیدازول حاوی یک باند اضافی در ناحیه 38 کیلو دالتونی، از فیلتری که اجازه عبور به پروتئین‌های بالای 50 کیلو دالتون را نمی‌داد، عبور دادیم. به این ترتیب حذف باند اضافی ممکن شد و درصد خلوص به 98 درصد رسید. سپس با استفاده از روش وسترن بلات پروتئین حاصل تأیید شد (شکل4). بدین منظور از غلظت‌های مختلف پروتئین BSA به عنوان کنترل و پروتئین هدف استفاده شد تا میزان حساسیت در شناسایی را مورد بررسی قرار دهیم. نتایج بیانگر شناسایی حداقل 10 میکروگرم از پروتئین به‌وسیله آنتی بوتولینوم تیپ A بود در حالی که هیچ‌گونه واکنشی با حداکثر مقدار BSA مشاهده نشد. در مجموع در این تحقیق تولید پروتئینی با درصد خلوص بالا برای ارزیابی فعالیت آنزیمی و طراحی مهارکننده های پپتیدی و غیر پپتیدی امکان‌پذیر شد.

5- منابع

[1] Capkova, K., Salzameda, N., Janda, K. (2009) Investigations into small molecule non-peptidic inhibitors of the botulinum neurotoxins. Toxicon. **54**, 575–582.

[2] Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N. T, Poulainm, B. (2000) How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter relase. *Biochimie*. **82**, 427-46.

[3] Paddle, B. M., (2003) Therapy and prophylaxis of inhaled biological toxins. J ApplToxicol. **23**, 139-170.

[4] Pang Y, Vummenthala A, Mishra R, Park J, Wang S, Davis J, Millard C, Schmidt J. Potent New Small-Molecule Inhibitor of Botulinum Neurotoxin Serotype A Endopeptidase Developed by Synthesis-Based Computer-Aided Molecular Design. PLoS ONE 2009; 4(11): e7730.

[5] Moe S, Thompson A, Smith G, Fredenburg R, Stein R, Jacobson A. Botulinum neurotoxin serotype A inhibitors: Small-molecule mercaptoacetamideanalogs.Bioorganic& Medicinal Chemistry 2009; 17: 3072–3079.

[6] Hines H, Kim A, Stafford R, Badie S, Brueggeman E, Newman D, Schmidt J. 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.APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 2008; 74(3): 653–659.

[7] Park J, Sill P, Makiyi E, Garcia-Sosa A, Millard C, Schmidt J, Pang Y. Serotype-selective, small-molecule inhibitors of the zinc endopeptidase of botulinum neurotoxin serotype A. Bioorganic& Medicinal Chemistry 2006; 14: 395–408.

[8] Kotich DK, Carthy MC, McCarthy EE, Baldini M. Plasma memebrane targeting of SNAP-25 increase its local concentration and is necessary for SNARE complex formation.*J Cell Science*. 2002; 115: 3341-51.

[9] Haliss B, James BAF, Shoane CC. Development of a novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidaseactivities. J of ClinMicrob 1996; 34(8):1934–1938

[10] Lacy, D.B, Stevens, R.C, Sequence homology and structural analysisof the clostridial neurotoxins. J. Mol. Biol. 1999; 291 (5): 1091–1104.

[11] Chin J. Control of Communicable Diseases Manual.American Public Health Association. 17th Edition. 2000; 70-75.

[12] http://www.hhs.gov

[13] Dickerson, T.J, Janda, K.D, The use of small molecules to investigate molecular

mechanisms and therapeutic targets for treatment of botulinum neurotoxin Aintoxication.ACS Chem. Biol. 2006; 1 (6): 359–369.

[14] Burnett, J.C, Opsenica, D, Sriraghavan, K, Panchal, R.G, Ruthel, G, Hermone, A.R, Nguyen, T.L, Kenny, T.A, Lane, D.J, McGrath, C.F, Schmidt, J.J, Vennerstrom, J.L, Gussio, R, Solaja, B.A, Bavari, S. A refined pharmacophore identifies potent 4-amino-7-chloroquinolinebased inhibitors of the botulinum neurotoxin serotype Ametalloprotease.J.Med. Chem. 2007; 50 (9): 2127–2136.

[15] Rusel D, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory Manual. 2001; 3th Edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[16] Bollag D. Protein Methods.Wiley-LISS 1992; 45-160.

[17] Matthew W. Development of an invitro bioassay & for Clostridium botulinum sensitive than the mouse bioassay.Appl Environ Microbio 1999; 65(9): 3787–3792.

[18] BaldwinR. The C-terminus of botulinum neurotoxin type A light chain contributes to solubility, catalysis, and stability. Protein expression purification. 2004;187-195.

[19] Gouy M, Gautier C. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity.Nucleic Acids Research 1982; 10(22):7055-74.

[20] 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.Nucleuic Acids Research 1989; 17(24):10191-202.

[21] Zdanovsky AG, Zdanovskaia MV. Simple and efficient method for heterologo expression of Clostridia proteins. Appl Environ Microbio 2000; 66(8):316673.

[22] Sebaihia M, Peck MW, Minton NP, Thomson NR, Holden MTG, Mitchell WJ, Carter AT, Bentley SD, Mason DR, Crossman L, Paul CJ, Ivens A, Wells-Bennik MHJ, Davis IJ, Cerdeno-Tarraga AM, ChurcherC,Guail MA, Chillingworth T, Feltwell T, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Jagels K, Larke N, Maddison M, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabbinowitsch E, Sanders M, Simmonds M, White B, Whithead S, Parkhill J. Genome sequence of proteolytic (Group I) Clostridium botulinum strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. Genome Res 2007; 17: 1082–1092.

[23] Mousavi ML, Kouhsari SM, Nazarian S, Rasooli I, Amani J. Cloning, expression

and purification of*Clostridium botulinum*neurotoxin type E binding domain.*Iranian J Biotech*. 2004; 2(3); 183-188.

[24] Singh L, Singh B. Higt- level Expression purification characterizsation of recombinant type A botulinum neurotoxin light chain.ProteinExpPurif 1999;17: 339-344.