

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

علیرضا فراست¹، فیروز ابراهیمی^{2*}، سید جعفر موسوی³، سامان حسینخانی⁴، عباس حاجی زاده⁵،
شهرام نظریان⁶

- 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 - نورو توکسین‌های 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، به منظور ارزیابی فعالیت آنزیمی انجام شد. توالی ژن زنجیره کاتالیتیک نورو توکسین بوتولینوم تیپ A از پایگاه ژنی NCBI گرفته شد. پس از بهینه‌سازی کدون ترجیحی ژن مورد نظر برای *E. coli*، توالی نهایی ژن به منظور 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 به دست آمد. آزمایش‌های وسترن بلات و الایزا، وجود پروتئین هدف را تأیید کردند. براساس

نتایج، زنجیره سبک نورو توکسین بوتولینوم تیپ A به شکل محلول تولید شد. فرایند تخلیص نیز با رزین تمایلی با کیفیت عالی انجام شد به طوری که پروتئین مورد نظر با درصد خلوص 98 به دست آمد.

کلید واژگان: نورو توکسین بوتولینوم تیپ A، زنجیره سبک، ناحیه کاتالیتیک، بیان نو ترکیب

1- مقدمه

کلستریدیوم بوتولینوم باکتری گرم مثبت بی هوازی و میله ای شکل است که در خاک یافت می شود [1]. تاکنون 7 سرو تایپ از این نورو توکسین (سم عصبی) شناخته شده است که عبارت اند از: A, B, C, D, E, F, G که فقط تیپ های A, B, E و گاهی F در انسان ایجاد بیماری می کنند [2]. فلج ناشی از نورو توکسین بوتولینوم تیپ A بیشترین دوام را داراست [3]. دز کشنده نورو توکسین بوتولینوم تیپ A برای یک انسان 70 کیلوگرمی از طریق تنفس و تزریق به ترتیب 0/9، 70 میکروگرم برآورد شده است [4]. هر یک از نورو توکسین های بوتولینوم پس از بیان ژن به صورت یک پروتئین تک زنجیره ای با وزن 150 کیلودالتون بوسیله پروتازها به دو زنجیره سنگین (HC) (100 کیلو - دالتون) و زنجیره سبک (LC) (50 کیلو دالتون) تبدیل می شوند. این دو زنجیره با یک پیوند دی سولفیدی به یکدیگر متصل اند. زنجیره سنگین مسئول اتصال به نورون های کولینرژیک محیطی است و زنجیره سبک اندوپیتیدازی وابسته به روی که پروتئین های مسئول رهاسازی نورو ترانسمیتر را به طور اختصاصی در محل های خاص می شکافد [5, 6, 7]. مطالعات، بیانگر وجود عملکردی چهار مرحله ای متمایز در مکانیزم مسمومیت سلولی به وسیله نورو توکسین های بوتولینوم است. این عملکرد چهار مرحله ای، به ترتیب زیر است:

1- اتصال سم به غشای نورون های موتور.

2- نفوذ سم به درون غشای نورون های موتور.

3- عبور و انتقال از غشای نورون های موتور با احیای

پیوند دی سولفیدی مابین دو زنجیره سبک و سنگین.

4- فعالیت کاتالیتیکی درون سلولی به وسیله زنجیره

سبک [6].

نورو توکسین های بوتولینوم سه نوع سوبسترا دارند: پروتئین سیناپتوبروین¹ VAMP2 که سوبسترای سرو تیپ های A, B, D, G, F است؛ پروتئین اسنپ²⁵ SNAP25 که سوبسترای سرو تیپ های A, C, E بوده و سیناتاکسین³ که سرو تیپ C روی آن اثر می گذارد [8]. بر اساس نتایج، نورو توکسین تیپ A بر پروتئین SNAP-25 انسانی اثر گذاشته و آن را از محل¹⁹⁷ Gln-Arg¹⁹⁸ می - شکافد [9]. از نظر ساختاری، زنجیره سبک نورو توکسین های بوتولینوم پروتئین های کروی اند و 36/5 درصد شباهت در توالی بین آن ها مشاهده می شود [1]. اغلب متالواندوپیتیدازها، به عنصر روی (zn) به عنوان یک یون فلزی ضروری برای فعالیت کاتالیتیک خود نیاز دارند. این آنزیم ها در جایگاه فعال خود سه اسید آمینه و یک مولکول آب دارند که به فلز روی چسبیده اند. دو اسید آمینه 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 به کار می رود. فعالیت بیولوژیکی و ساختمان سوم با برداشتن

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

برش دهنده از شرکت فرمتاز اکرین 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 محصولی و وسترن بلات نیز از شرکت کیازن تهیه شد. همچنین برای القا از IPTG تهیه شده از شرکت فرمتاز استفاده شد. برای تخلیص پروتئین نو ترکیب از ستون میل ترکیبی Ni-NTA (محصول شرکت کیازن) استفاده شد. از فیلتر سویینکس میلی پور با نمره (cut off) 50 کیلو دالتون استفاده شد.

2-2- تراریخت نمودن سلول های *E. coli* با پلاسمید نو ترکیب pET28a-LC

ابتدا، سلول مستعد با کشت سلول های *E. coli* در محیط LB به روش شیمیایی تهیه و سپس به روش شوک سرمایی، پلاسمید نو ترکیب به سلول های مستعد منتقل و با کشت شبانه در محیط کشت مک آنکی آگار دارای آنتی بیوتیک کانامایسین سلول های تراریخته غربال گری شدند. از میان کلنی های رشد یافته در محیط کانامایسین دار به طور تصادفی چند کلنی در محیط LB رشد داده شد. سپس پلاسمید آن ها 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 پلاسمید های تخلیص شده، هضم دوگانه آنزیمی اجرا شد. نتیجه هضم آنزیمی با ژل آگارز 1 درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

فلز روی به صورت برگشت ناپذیر از دست می رود؛ به این ترتیب فلز روی نقش مهمی در بقای ساختمان فعال بیولوژیک در BoNT/A بازی می کند [10]. مبنای درمان بوتولیسم، مراقبت های بهداشتی و ایمن کردن غیر فعال با آنتی توکسین اسبی است. تزریق زودهنگام و بموقع این آنتی توکسین، از ادامه تخریب و آسیب های عصبی و شدت بیماری جلوگیری می کند. اما، نمی تواند فلج ایجاد شده را برگرداند [11،12]. درمان می تواند هفته ها یا ماه ها ادامه داشته باشد. به محض ورود سم به سلول های عصبی آنتی بادی ها غیر قابل دسترس می شوند، بنابراین هیچ داروی قابل دسترس به سم برای کاهش آثار ناشی از آن وجود ندارد [13،14]. به سبب فعالیت پروتئازی زنجیره سبک از نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A، تلاش های زیادی در آزمایشگاه ها برای طراحی مهار کننده های صورت پپتیدی و غیر پپتیدی به عنوان داروی ضد بوتولیسم در جریان است [1]. با توجه به بالا بودن دز کشنده نوروتوکسین تیپ A، تلاش های گسترده پژوهشگران کشورهای مختلف برای طراحی مهار کننده 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 مهار کننده های اختصاصی و سپس درمان موفق بیماری ناشی از آن هموار نماییم.

2- مواد و روش ها

2-1- مواد

ژن مصنوعی زنجیره سبک نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A روی وکتور بیانی pET28a از شرکت شاین جین (shingene) کشور چین تهیه و آنزیم های

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].

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

میکرومول Zn Cl ₂	دما (درجه سانتی گراد)	زمان القا (ساعت)	IPTG (میلی مولار)	شدت نور در 600 نانومتر	آنتی بیوتیک (µg/ml)	سخت کشت (کانیل لیتر)
-	37	5	.5	.5	50	LB
-	30	5	.5	.5	50	LB
-	37	5	1	.5	50	LB
-	30	5	.3	.5	50	LB
-	30	5	.7	.5	50	LB
20	18	18	.5	.5	50	LB

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

تپ 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 میلی لیتر بافر MES (20 میلی مولار) 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 به ترتیب 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 منظور 1500 میکرولیتر محلول محصول نهایی حاصل از

در تمام شرایط محصول کشت به مدت 5 دقیقه با دور 5000 سانتریفوژ شد. سلول‌های مورد نظر در بافر لیزکننده (حاوی 50 NaH₂PO₄ میلی مولار، 300NaCl میلی مولار، 10 Imidazole میلی مولار، 1 PMSF میلی مولار با 8 = pH) 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



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 قرار گرفته است.

ردیف 3: مارکر وزن مولکولی.

2-3- 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 بلورنگ آمیزی شد (شکل 2).

رزین تمایلی به داخل لوله فالكون 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 الیزا و وسترن بلات

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

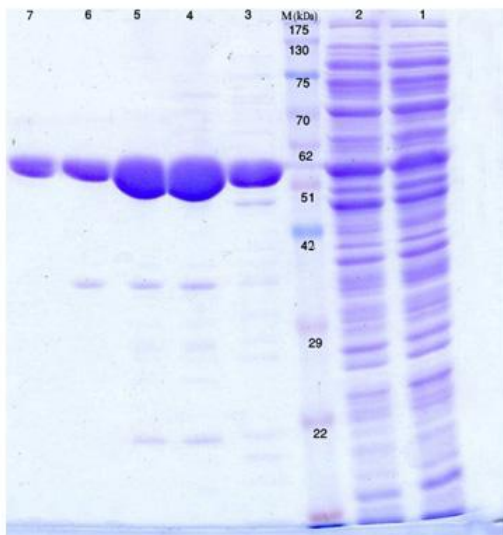
3- یافته‌ها

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

پس از تراریخت کردن سلول‌های *E. coli* با پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن مصنوعی، به منظور تأیید حضور ژن در وکتور pET28a، پلاسمید مذکور تخلیص و با آنزیم‌های *XhoI* و *NdeI* هضم آنزیمی شد؛ دستیابی به قطعه 1278 جفت بازی در ژل آگارز بیانگر حضور ژن مذکور بود (شکل 1).

3-3- تخلیص پروتئین بیانی

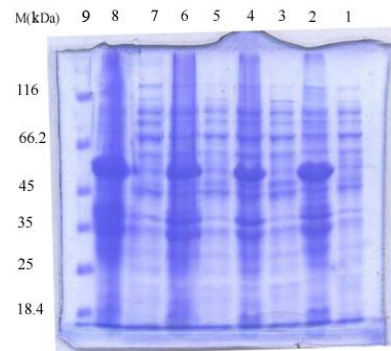
پس از تولید پروتئین محلول، تخلیص از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی در دمای 4 درجه سانتی گراد صورت گرفت (شکل 4).



شکل 4 تخلیص پروتئین به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی 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 3: ایمیدازول 40 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف 4: ایمیدازول 120 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف 5: ایمیدازول 170 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف 6: ایمیدازول 250 میلی مولار که از ستون عبور داده شده است. ردیف 7: عبور محلول حاصل از ردیف 7 از فیلتر

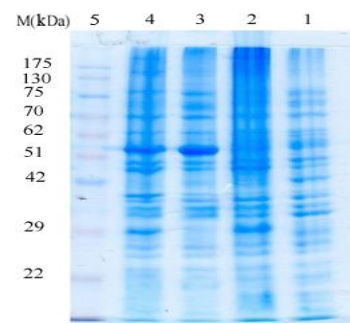
3-4- تأیید پروتئین بیان شده

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



شکل 2 بررسی بیان نمونه کنترل و تست همراه با محلول رویی و رسوب آن‌ها. ردیف 1: کنترل بدون القا با IPTG. ردیف 2: تست القا با IPTG. ردیف 3: رسوب حاصل از القا با IPTG. ردیف 4: رسوب حاصل از القا با IPTG. ردیف 5: رسوب حاصل از القا با IPTG. ردیف 6: رسوب حاصل از القا با IPTG. ردیف 7: رسوب حاصل از القا با IPTG. ردیف 8: رسوب حاصل از القا با IPTG. ردیف 9: نشانگر پروتئین.

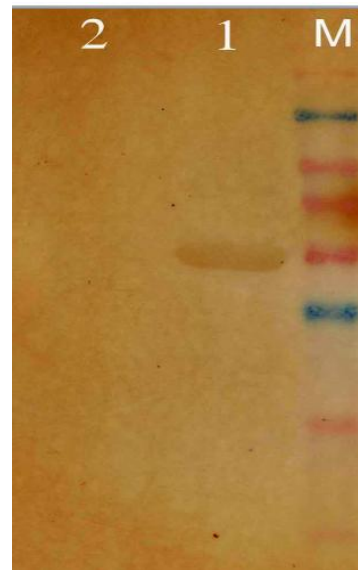
نتیجه به دست آمده از بیان (شکل 2)، بیانگر حضور پروتئین به صورت کنجاله‌های نا محلول بود. لذا به منظور تولید پروتئین به شکل محلول (جدول 1)، بیان در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت، عمل بیان در شرایط 0/5 میلی مولار IPTG، القا 18 ساعت در 18 درجه سانتی گراد [5] همراه با 20 میکرومولار نمک Zn 2 Cl به تولید پروتئین محلول منجر شد (شکل 3).



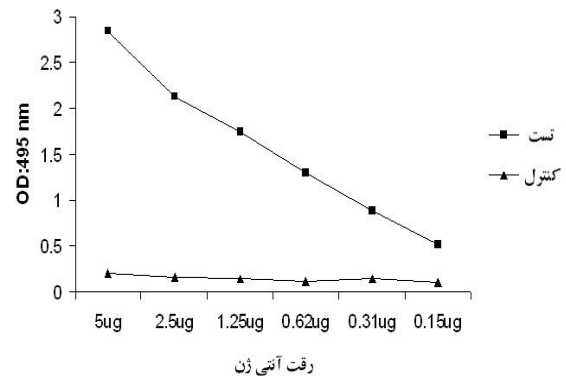
شکل 3 بررسی بیان نمونه کنترل و تست در شرایط بهینه. ردیف 1: محلول رویی کنترل، بدون القا با IPTG. ردیف 2: رسوب کنترل، بدون القا با IPTG. ردیف 3: محلول رویی تست، القا با IPTG. ردیف 4: رسوب تست، القا با IPTG. ردیف 5: نشانگر پروتئین.

4- بحث

از میان نورو توکسین های بوتولینوم، سه سویه ایجاد کننده بیماری بوتولیسم، برای پژوهشگران از اهمیت خاصی برخوردار است. بیشتر کارهای تحقیقاتی، در زمینه اثر اندوپیتیدازی نورو توکسین های تیپ A، B، E که بوتولیسم انسانی ایجاد می کنند، 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 نورو توکسین تیپ A مربوط به سوش ATCC 3505 از بانک ژنی به دست آمد. بر اساس مطالعه بالدوین [18] از توالی 425 اسید آمینه ای به علت انحلال پذیری و پایداری بالای پروتئین نسبت به توالی 448 اسید آمینه ای استفاده کردند، در این بررسی توالی نوکلئوتیدی با 425 اسید آمینه، انتخاب شد. توالی نوکلئوتیدی برای بهینه سازی بیان، بر اساس کدون های متداول باکتری *E. coli* با استفاده از نرم افزار تنظیم شد زیرا ژن های کلاستریدیوم به شکل طبیعی در باکتری *E. coli* به دلایل گوناگون بسیار ضعیف بیان می شوند [19-21]. بر اساس بهینه سازی های انجام شده در این تحقیق، درصد بازهای آلی GC در توالی نوکلئوتیدی نهایی، از 28 درصد به عدد 46 درصد افزایش یافت و کدون های نادر نیز حذف گردید. با توجه به این که به طور متوسط، این مقدار در حالت طبیعی در ژن های بوتولینوم به طور متوسط حدود 30 درصد است بنابراین بهینه سازی توانست بیان پروتئین نو ترکیب در میزبان انتخاب شده را به طور چشمگیری افزایش دهد [22]. سرانجام در وکتور بیانی، pET28a با نشان His₆-tag قرارداد شد. حضور این نشان برای تأیید محصول بیانی و تخلیص با کروماتوگرافی تمایلی کمک کننده است. بیان این پروتئین در وکتور pET28a بسیار موفقیت آمیز بود.



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



نمودار 1 عمل الایزا بر روی پروتئین حاصل از بیان ژن زنجیره سبک نورو توکسین بوتولینوم تیپ A. از محصول سلول های القا نشده به عنوان کنترل استفاده شد.

- تست + آنتی بوتولینوم تیپ A با رقت 1/1000
کونژوگه با رقت 1/10000
- ▲ کنترل + آنتی بوتولینوم تیپ A با رقت 1/1000
کونژوگه با رقت 1/10000

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]. به دلیل اهمیت زیاد فعالیت اندوپیتیدازی این پروتئین، امکان استفاده از دو نشان هیستیدین در دو طرف پروتئین وجود نداشت زیرا ممکن بود در فعال 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 (شکل 4). 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 به وسیله 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 مهارکننده‌های پپتیدی و غیر پپتیدی امکان پذیر شد.

براساس شکل 2، 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 سانتی‌گراد (18 درجه سانتی‌گراد)، 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 میزان کمی روی اضافه شد [10]. همچنین در دماهای پایین‌تر از دمای بهینه‌ی رشد و تکثیر، سیتیک رشد میزان 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 18 ساعت) لازم بود. اما در مقابل میزان 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 به دست آمد. به منظور تخلیص نواحی مختلف نورو توکسین‌هایی 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]. لی لی و بال رام سینگ

- 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 membrane 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 endopeptidase activities. *J of Clin Microb* 1996; 34(8):1934–1938
- [10] Lacy, D.B, Stevens, R.C, Sequence homology and structural analysis of 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
- 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 release. *Biochimie*. **82**, 427-46.
- [3] Paddle, B. M., (2003) Therapy and prophylaxis of inhaled biological toxins. *J Appl Toxicol*. **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 mercaptoacetamide analogs. *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-

- [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. *Nucleic Acids Research* 1989; 17(24):10191-202.
- [21] Zdanovsky AG, Zdanovskaia MV. Simple and efficient method for heterologous expression of Clostridia proteins. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(8):3166-73.
- [22] Sebahia 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, Cerdano-Tarraga AM, Churcher C, 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 mechanisms and therapeutic targets for treatment of botulinum neurotoxin A intoxication. *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 A metalloprotease. *J. Med. Chem.* 2007; 50(9): 2127–2136.
- [15] Rusel D, Sambrook J. *Molecular cloning a laboratory Manual*. 2001; 3rd 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 Microbiol* 1999; 65(9): 3787–3792.
- [18] Baldwin R. The C-terminus of botulinum neurotoxin type A light chain contributes to solubility, catalysis, and stability. *Protein expression purification*. 2004; 187-195.

- [24] Singh L, Singh B. Higt- level Expression and purification of *Clostridium botulinum* neurotoxin type E binding domain. *Iranian J Biotech.* 2004; 2(3); 183-188.
- purification characterisations of recombinant type A botulinum neurotoxin light chain. *ProteinExpPurif* 1999;17: 339-344.