

Expression and Purification of Recombinant Catalytic Domain of Botulinum Neurotoxin Type E from a Synthetic Gene

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Aghaie S.M.¹ MSc,
Mosavi S.J.* PhD,
Ebrahimi F.¹ PhD,
Salehi M.B.¹ PhD,
Nazarian Sh.¹ PhD

How to cite this article

Aghaie S M Mosavi S J, Ebrahimi F, Salehi M B, Nazarian Sh. Expression and Purification of Re-combinant Catalytic Domain of Botulinum Neurotoxin Type E from a Synthetic Gene. Pathobiology Research. 2018;21(2):79-84.

ABSTRACT

Aims Botulinum neurotoxins are the strongest known bacterial toxins that cause muscle paralysis due to inhibition of acetylcholine release. Design of inhibitors is still pursued as a major strategy for intracellular inhibition of poisoning caused by these toxins. Investigation of the potential function of design inhibitors, pure poison or catalytic area is essential. The aims of present study were expression and purification of recombinant catalytic domain of botulinum neurotoxin type E (BoNT/E) Type E from a synthetic gene.

Materials & Methods In this experimental study, the sequence of the botulinum neurotoxin type E light chain was adopted from GeneBank and codons were optimized according to E.coli BL21 (DE3) codon usage. Other bioinformatics tools were exploited to reach the optimum expression of the gene in the mentioned host. The resultant (gene) was then ordered to synthesize and cloning in pET28a (+) expression vector. The recombinant vector was transferred into E. coli BL21 (DE3) host cells. The expression of the protein was induced by addition of IPTG. The expression conditions were changed to obtain a soluble expression of the protein. Then, the protein was purified by an affinity chromatography, followed by a further purification with amicon filter. SDS-PAGE was used to evaluate expression and purification of the protein and Western blotting was performed to confirm the expressed protein.

Findings Codon Adaptation Index of the gene increased to 0.85. The third predicted structure showed good quality. The thermodynamic analysis of the mRNA structure showed that the predicted structure is stable. The soluble expression was obtained in 18°C and 18h induction by 1 mM IPTG. Protein production with higher more than 90% purity was confirmed.

Conclusion Optimization of the protein expression conditions resulted in producing the solution in the culture medium by E. coli BL21 as host.

Keywords Botulinum toxin Type –E; Immunoglobulin Light Chain; Catalytic Domain; Recombinant Proteins

CITATION LINKS

[1] Botulinum neurotoxins and botulism: a novel therapeutic approach [2] Recombinant expression of light chain of botulinum neurotoxin type-A in E. coli and evaluation of its enzymatic activity [3] Tracking sources of Clostridium botulinum type E contamination in seal meat [4] The botulinum toxin as a therapeutic agent: Molecular and pharmacological insights [5] Cloning, expression and purification of botulinum neurotoxin type A heavy chain-crystallographic evidence for a putative tetrameric pore [6] Type E botulism [7] Recent advances in botulinum neurotoxin inhibitor development [8] Cloning, expression and purification of Clostridium botulinum neurotoxin type E binding domain [9] Fusion and cloning of the binding domains of botulinum neurotoxin type A and B in E. coli DH5α [10] Neutralization of botulinum Neurotoxin Type E by a humanized antibody [11] Cloning, high level expression, purification, and crystallization of the full length Clostridium botulinum neurotoxin type E light chain [12] SNAP-25 substrate peptide (residues 180–183) binds to but bypasses cleavage by catalytically active Clostridium botulinum Neurotoxin E- [13] Molecular cloning A laboratory Manual [14] The nucleic acid protocols hand book [15] Production and characterization of a recombinant chimeric antigen consisting botulinum neurotoxin serotypes A, B and E binding subdomains [16] Protein methods [17] Codon usage in bacteria: Correlation with gene expressivity [18] Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins [19] Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins

*Biological Research Department, Basic Sciences Faculty, Imam Hossein University, Tehran, Iran

¹Biological Research Department, Basic Sciences Faculty, Imam Hossein University, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Imam Hossein University, After the Lashgarak Bridge, Shahid Babaei Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 77104934
Fax: +98 (21) 77104935
jmosavi@ihu.ac.ir

Article History

Received: December 10, 2017

Accepted: February 19, 2018

ePublished: July 5, 2018

بیان و تخلیص ناحیه کاتالیتیک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E نو ترکیب از یک ژن صناعی

سیدمجتبی آقایی* MSc

گروه تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین^۱، تهران، ایران

سیدجعفر موسوی PhD

گروه تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین^۲، تهران، ایران

فیروز ابراهیمی PhD

گروه تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین^۳، تهران، ایران

محمدباقر صالحی PhD

گروه تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین^۴، تهران، ایران

شهرام نظریان PhD

گروه تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین^۵، تهران، ایران

چکیده

اهداف: نوروتوکسین‌های بوتولینوم، از قوی‌ترین سم‌های شناخته‌شده هستند که با مهار آزادسازی میانجی عصبی استیل‌کولین، موجب ایجاد فلج شل عضلانی می‌شود. طراحی مهارکننده‌ها هنوز به‌عنوان یک راهبرد اصلی برای مهار درون‌سلولی مسمومیت‌های ناشی از سموم مذکور به‌شمار می‌آید. برای بررسی پتانسیل عملکرد مهارکننده‌های طراحی‌شده، به سم خالص یا ناحیه کاتالیتیک آن نیاز است. هدف مطالعه حاضر، بررسی بیان و تخلیص ناحیه کاتالیتیک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E (BoNT/E) نو ترکیب از یک ژن صناعی بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، توالی زنجیره سبک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E از بانک ژن به‌دست آمد و بهینه‌سازی کدونی براساس *E. coli* BL21 انجام شد. سایر بررسی‌های بیوانفورماتیک لازم برای بیان بهتر ژن صورت گرفت. توالی ژن برای سنتز و همانندسازی در وکتور pET28a(+) سفارش داده شد. وکتور نو ترکیب داخل باکتری *E. coli* BL21 انتقال و بیان پروتئین با ایزوپروپیل تیو-بتا-دی‌گالاکتوزیداز (IPTG) القا شد. برای بیان محلول، در شرایط بیانی تغییر صورت گرفت. سپس به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی و فیلتر آمیکون پروتئین خالص‌سازی شد. برای بررسی بیان و خالص‌سازی پروتئین SDS-PAGE و برای تایید پروتئین بیان‌شده تکنیک وسترن بلات به‌کار رفت.

یافته‌ها: شاخص سازگاری کدون ژن به ۰/۸۵ افزایش یافت. ساختار سوم پیش‌بینی‌شده کیفیت مناسب را نشان داد. ساختار mRNA نشان داد، ساختار پیش‌بینی‌شده پایدار بود. بیان محلول پروتئین در شرایط ۱۸°C به‌مدت ۱۸ ساعت با القای IPTG، یک میلی‌مولار به‌دست آمد. تولید پروتئین و با خلوص بالای ۹۰٪ تایید شد.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی شرایط بیان پروتئین زنجیره سبک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E موجب تولید محلول آن در محیط کشت توسط میزبان *E. coli* BL21 می‌شود.

کلیدواژه‌ها: توکسین بوتولینوم تیپ E، زنجیره سبک، ناحیه کاتالیتیک، پروتئین‌های نو ترکیب

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳۰

*نویسنده مسئول: jmosavi@ihu.ac.ir

مقدمه

نوروتوکسین‌های بوتولینوم، از قوی‌ترین سم‌های شناخته‌شده هستند که به‌علت میزان کشندگی بالا، توسط مرکز پیشگیری و کنترل بیماری‌ها (CDC) به‌عنوان عوامل تهدیدکننده زیستی گروه A و جزء شش عامل خطرناک بیوتروریستی طبقه‌بندی شده‌اند. نوروتوکسین‌های بوتولینوم به‌راحتی تولید شده و قابلیت انتقال از طریق استنشاق را دارند^[۱]. کلاستریدیوم بوتولینوم باکتری

گرم‌مثبت، بی‌هوازی و باسیلی شکل است که اسپورهای آن در خاک، رسوبات دریاها، آبزیان و مواد غذایی مرتبط با خاک به‌وفور یافت می‌شود. تاکنون ۷ سروتیپ (A تا G) از نوروتوکسین بوتولینوم شناخته شده است. از میان تیپ‌های حاضر، تنها تیپ‌های A، B، E و گاهی F، توانایی بیماری‌زایی در انسان را دارند، همچنین تیپ‌های C و D موجب بروز مسمومیت در حیوانات می‌شوند. بیماری بوتولیسم به اشکال مختلف بوتولیسم با منشا غذایی، بوتولیسم ناشی از زخم و بوتولیسم نوزادان مشاهده شده است. سم کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ E در انسان بیماری‌کننده بوتولیسم را ایجاد می‌کند^[۲، ۳]. پس از بیان ژن هر یک از نوروتوکسین‌های بوتولینوم، یک پروتئین تک‌زنجیره‌ای با وزن ۱۵۰ کیلودالتون حاصل‌شده که شامل یک زنجیره سنگین با وزن ۱۰۰ کیلودالتون و یک زنجیره سبک با وزن ۵۰ کیلودالتون هستند که به‌واسطه یک پیوند دی‌سولفید به هم متصل شده‌اند. زنجیره سنگین مسئول اتصال به نورون‌های کولینرژیک محیطی (N-ترمینال) و همچنین انتقال زنجیره سبک به درون نورون‌ها (C-ترمینال) است. زنجیره سبک با خاصیت اندوپیتیدازی وابسته به روی، موجب برش در پروتئین‌های رهاکننده استیل‌کولین شده که در نهایت باعث ایجاد فلج شل عضلانی می‌شود^[۴، ۵]. تمامی زنجیره‌های سبک، شامل یک موتیف اتصالی محافظت‌شده HEXXH هستند. برای فعال‌شدن آنزیم، اتصال حداقل یک اتم روی به موتیف ذکرشده، ضروری است^[۶]. با وجود مشابهت ساختاری بین نوروتوکسین‌ها، هر یک از تیپ‌ها، سوبسترای ویژه‌ای را برش می‌زنند^[۷].

در بررسی‌های اپیدمیولوژی که در ایران صورت گرفته است، بیشترین موارد بوتولیسم در ایران مربوط به تیپ E است. بسیاری از موارد مشکوک گزارش‌شده بوتولیسم در ایران، ناشی از مصرف مواد غذایی (به‌ویژه دریایی) است. همان طوری که بررسی‌ها نشان می‌دهند، در مجموع کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ E شایع‌ترین تیپ باکتری در ماهیان دریایی است^[۸]. نظر به اینکه تیپ‌های A و B بوتولیسم بیشتر در سرتاسر جهان شیوع دارد، بیشترین تحقیقات برای بررسی عوامل درمانی، روی دو تیپ مذکور صورت گرفته و تاکنون تحقیقات چندان روی تیپ E انجام نشده است. پروتئین هدف سم بوتولیسم تیپ E، یک پروتئین اینتگرال غشای پلاسمایی سلول پیش‌سیناپسی به نام SNAP-25 به وزن ۲۵ کیلودالتون است. سم SNAP-25 در کمپلکس SNARE به‌صورت دو زنجیره آمفی‌پاتیک وجود دارد. دو زنجیره این پروتئین به‌وسیله پیوند دی‌سولفید به یکدیگر متصل هستند^[۹]. پروتئین SNAP-25، ۲۰۶ آمینواسید دارد و پیوند آرژنین ۱۸۰- ایزولوسین ۱۸۱ آن توسط بخش عملکردی سم، مورد حمله قرار می‌گیرد. در این حالت اتصال سیناپتوتگمین (نوعی پروتئین موجود در غشای وزیکول‌های حاوی نوروترانسمیتر) به کمپلکس SNARE مختل می‌شود^[۱۰]. نوروتوکسین‌های بوتولینوم، پروتئین‌های بزرگی با سه ناحیه مشخص هستند، ناحیه اتصال، ناحیه انتقال و ناحیه دارای عملکرد آنزیمی که فعالیت ویژه بالای اندوپیتیدازی برای شکستن پروتئین‌های موثر در آزادسازی نوروترانسمیترها دارد. آگاروال و همکاران توالی کامل زنجیره سبک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E (۱۲۶۳ جفت‌باز) را در وکتور بیانی pET9c همسانه‌سازی و در باکتری میزبان BL21 (DE3) بیان کردند. در سال ۲۰۰۸ نیز با سنتز قطعه تتراپپتیدی RIME از اسیدآمین ۱۸۰ تا ۱۸۳ در پروتئین SNAP-25، موفق شدند مهارکننده پیتیدی با مهارکنندگی

دستگاه اولتراسوند (قدرت ۷۵٪ و ۶ سیکل ۱۰ ثانیه) سلول‌ها شکسته شدند. عصاره سلولی به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی جداسازی و به رسوب حاصل، محلول بافر لیزکننده حاوی اوره ۸ مولار اضافه شد. شرایط سانتریفیوژ بالا دوباره تکرار و محلول رویی جداسازی شد. در تمام موارد نمونه‌های به دست آمده به روش برادفورد و با استفاده از BSA به عنوان پروتئین استاندارد غلظت سنجی شدند. محلول رویی همراه با رسوب با SDS-PAGE ۱۲٪، الکتروفورز و سپس ژل به روش کوماسی بلو رنگ آمیزی شد [16, 17].

جدول ۱) اعمال شرایط مختلف به منظور بهینه سازی بیان ژن؛ در کلیه شرایط زیر ۵ میلی لیتر محیط کشت LB و ۵ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین مورد استفاده قرار گرفت. در شرایط ۱۸ ساعت انکوبه نمودن محیط در ۱۸°C و افزودن ۲۰ میکرومولار کلرید روی، بهترین میزان پروتئین محلول بیان شد.

زمان القا (ساعت)	دما (°C)	کلرید روی (میکرومولار)
۵	۳۷	-
۵	۳۰	-
۵	۲۵	-
۵	۲۰	-
۱۲	۱۸	-
۱۸	۱۸	۲۰

تخلص زنجیره سبک سم (LC) بوتولینوم تیپ E: تخلص پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون میل ترکیبی Ni-NTA (کیاژن؛ ایران) صورت گرفت. به منظور تخلص پروتئین، از میزان ۷۰۰۰ میکرولیتر محلول عصاره رویی (حاصل کشت در ۵۰۰ میلی لیتر) برای تخلص با ستون نیکل استفاده شد. برای این منظور، ابتدا ستون نیکل از قبل آماده شده، با آب مقطر (به حجم کل ستون) و سپس با ۱/۵ میلی لیتر بافر MES (۲۰ میلی مولار) شسته شد. سپس یک میلی لیتر از محلول ایمیدازول ۱۰ میلی مولار به ستون اضافه شد تا ستون به تعادل برسد. سپس محلول شفاف حاصل از مرحله قبل، به ستون اضافه و محلول خروجی آن در یک ظرف جمع آوری و ستون به ترتیب با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ شسته شد. نمونه‌های خروجی از ستون روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت [16]. برای حذف برخی از ناخالصی‌ها که رزین تمایلی نتوانسته بود آنها را حذف کند از فیلتر آمیکون استفاده شد. بدین منظور ۱۵۰۰ میکرولیتر محصول نهایی را درون فیلتر آمیکون (۳۰ کیلو دالتون) ریخته و به آن ۶ میلی لیتر بافر هپس (Hepes) اضافه و با ۵۰۰۰ دور در دقیقه تا زمان باقی ماندن حدود یک میلی لیتر محلول در فیلتر، سانتریفیوژ شد. سپس بررسی نمونه حاصل روی SDS-PAGE صورت گرفت. به منظور بررسی میزان خلوص پروتئین نوترکیب از نرم افزار Bio Doc Analyze 2.2 استفاده شد.

تایید پروتئین بیان شده با روش وسترن بلات: بعد از تخلص به منظور اطمینان از صحت پروتئین بیان شده، از تکنیک وسترن بلات استفاده شد، بدین منظور ۲۰ میکروگرم پروتئین حاصل از فرایند تخلص همراه با پروتئین مارکر و محلول BSA به ژل SDS-PAGE تزریق و ژل روی کاغذ نیتروسلولز قرار داده شد. سپس درون تانک وسترن بلات حاوی محلول الکتروبلایکنگ قرار گرفت. عمل انتقال نمونه به کاغذ نیتروسلولز، به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۷۵ ولت صورت گرفت. به مدت یک شب کاغذ نیتروسلولز با بافر بلاکینگ (محلول ۵٪ شیر خشک وزنی/حجمی در بافر فسفات‌سالیین با توپین ۲۰ یا PBST) در ۴°C بلاک شد. سپس آنتی‌بادی ضدتوکسین بوتولینوم تیپ E (تهیه شده از وزارت دفاع)

در حدود ۶۹ میکرومولار را طراحی کنند [11, 12]. با توجه به معایب روش‌های درمانی کنونی (آنتی‌توکسین‌های اسبی) تحقیقات روی مهارکننده‌های پپتیدی با توانایی ورود به پایانه‌های عصبی، همچنان ادامه دارد. به منظور انجام تحقیقات، دسترسی به پروتئین محلول مربوط به ناحیه فوق نیاز است، از طرفی به دلیل درصد پایین پروتئین محلول و خلوص پایین آن از طریق مهندسی ژنتیک، در مطالعه حاضر با طراحی و سفارش توالی نوکلوتیدی بخش کاتالیتیک زنجیره سبک سم در شرایط آزمایشگاهی، بیان محلول آن مورد بررسی قرار گرفت و آنزیم تخلص شد تا برای طراحی مهارکننده‌های اختصاصی و سپس درمان موفق بیماری ناشی از آن، مسیر هموار شود.

بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی بیان و تخلص ناحیه کاتالیتیک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E نوترکیب از یک ژن صناعی انجام شد.

مواد و روش‌ها

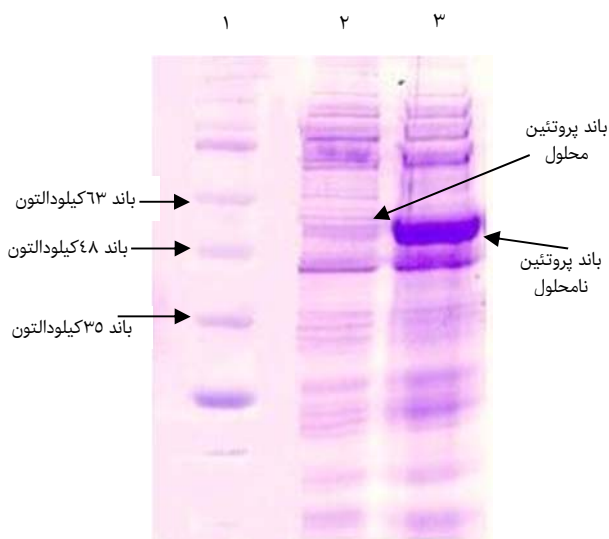
در مطالعه تجربی حاضر توالی نوکلئوتیدی مرتبط با ناحیه کاتالیتیک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E، از پایگاه داده DNA با کد دسترسی X62683 و توالی آمینواسیدی از پایگاه Uniprot با کد دسترسی A2I2S5 به دست آمد. تجزیه و تحلیل ژنی و بهینه‌سازی چندین پارامتر ژن صناعی با استفاده از سرویس GenScript و به کار بردن کدون‌های ترجیحی مورد استفاده در *E. coli* انجام شد. برای پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین، از سرور I-TASSER استفاده شد. با نرم افزار mfold و روش CentroidFold، ساختار mRNA ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن بهینه‌سازی شده به منظور سنتز و همسانه‌سازی در وکتور pET28a به شرکت بیوماتیک (کانادا) سفارش داده شد.

ترانسفورم نمودن سلول‌های *E. coli* با پلاسمید نوترکیب pET28a-LCE: ابتدا سلول مستعد با کشت سلول‌های *E. coli* در محیط لوریابرانی (LB) به روش شیمیایی تهیه و سپس به روش شوک سرمایی، پلاسمید نوترکیب به سلول‌های مستعد منتقل شد [13, 14]. به وسیله کشت شبانه در محیط لوریابرانی - آگار (LB-Agar) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، سلول‌های ترانسفورم شده غربالگری شدند. از میان کلنی‌های رشد یافته در محیط کانامایسین دار، چند کلنی در محیط LB مایع، رشد و سپس تخلص پلاسمید آنها صورت گرفت. با توجه به در نظر گرفتن دو جایگاه برش آنزیمی NdeI و HindIII (فرمنتاز) در ابتدا و انتهای ژن در وکتور، برای تایید حضور ژن در پلاسمیدهای تخلص شده، هضم دوگانه آنزیمی اجرا شد [14, 15]. نتیجه هضم آنزیمی با ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت.

بیان ژن زنجیره سبک سم بوتولینوم تیپ E در سلول‌های *E. coli* BL21(DE3): ابتدا بیان پروتئین مذکور در شرایط استاندارد اجرا و نتایج با SDS-PAGE بررسی شد که نتایج نشان دهنده بیان پروتئین به صورت نامحلول (Inclusion body) تحت شرایط استاندارد بود. بنابراین به منظور بهینه‌سازی بیان، شرایط مختلف بررسی شد (جدول ۱).

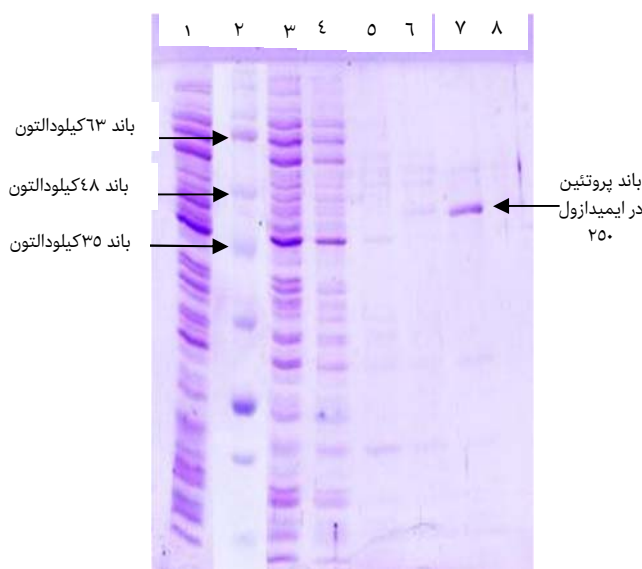
در تمام شرایط، محصول کشت به مدت ۲ دقیقه با ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای آزمایشگاه سانتریفیوژ شد. سلول‌های حاصل در بافر لیزکننده (حاوی NaH₂PO₄ ۵۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار، ایمیدازول ۱۰ میلی مولار و با pH=۸) حل شده و به مدت یک ساعت درون شیکر با دور پایین قرار گرفت و سپس با

پروتئین نوترکیب به صورت نامحلول بیان شد. بنابراین به منظور تولید پروتئین به شکل محلول (جدول ۱)، بیان در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. القای بیان در شرایط ۱۸ ساعت، ۱۸°C و همراه با ۲۰ میکرومولار نمک کلرید روی به تولید پروتئین محلول منجر شد (شکل ۳).



شکل ۳) نمونه بیان شده در ۵۰ میلی لیتر محیط LB در دمای ۱۸°C و به مدت ۱۸ ساعت و اجرای آن روی SDS-PAGE ۱۲% و رنگ آمیزی با کوماسی بلو
ستون ۱: مارکر ۵۰ کیلودالتون؛ ستون ۲: نمونه سوپ حاوی باند پروتئین محلول؛ ستون ۳: حاوی نمونه رسوب و باند پروتئین نامحلول

پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی حدود ۴۹ کیلودالتون با استفاده از ایمیدازول با غلظت ۲۵۰ میلی مولار از رزین جدا شد (شکل ۴) و بیان پروتئین با استفاده از تکنیک وسترن بلات تایید شد. آنتی بادی ضد سم بوتولینوم تیپ E، پروتئین نوترکیب را شناسایی و با آن واکنش اختصاصی داد (شکل ۵).



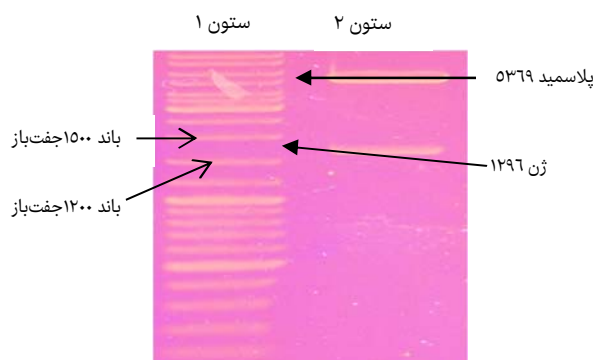
شکل ۴) عبور نمونه سوپ حاصل از بیان ۱۸°C به مدت ۱۸ ساعت از ستون نیکل و اجرای آن روی SDS-PAGE ۱۲% و رنگ آمیزی با کوماسی بلو
ستون ۱: نمونه سوپ قبل از عبور از ستون؛ ستون ۲: مارکر؛ ستون ۳: نمونه حاصل از عبور سوپ از ستون؛ ستون ۴: نمونه ایمیدازول ۲۰ میلی مولار؛ ستون ۵: نمونه ایمیدازول ۴۰ میلی مولار؛ ستون ۶: نمونه ایمیدازول ۱۰۰ میلی مولار؛ ستون ۷: نمونه ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار؛ ستون ۸: نمونه مس، در نمونه ۲۵۰ باند پروتئین محلول

توسط PBST، با رقت نهایی ۱:۳۰۰۰ و در حجم ۵۰ میلی لیتر تهیه و به مدت یک ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷°C انکوبه شد و پس از شست و شوهای لازم در مرحله بعد، کانژوگه آسبی با رقت ۱:۴۰۰۰ در بافر PBST تهیه و روی کاغذ حاوی آنتی بادی استاندارد ضد بوتولینوم تیپ E، اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C در شیکر قرار داده شد. در نهایت بافر دی آمینوبنزدین (DAB) تهیه و روی کاغذ نیتروسولز اضافه و پس از ظاهر شدن باندها، واکنش شیمیایی DAB بلافاصله توسط آب مقطر متوقف شد [17].

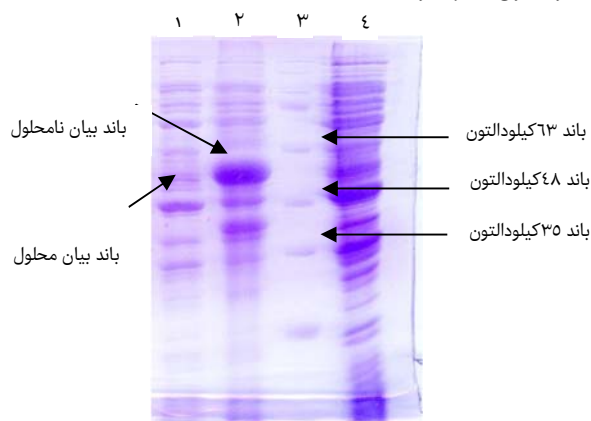
یافته‌ها

توالی ژن، بهینه سازی کدونی شد. شاخص انطباق پذیری کدونی از ۰/۶۲ به ۰/۸۵ تغییر کرد. انتخاب و تغییر کدون مناسب به نحوی بود که محتوای سیتوزین و گوانین از ۲۷% به ۴۸/۵۲% افزایش یافت. تعداد کدون هایی که از کیفیت مناسبی برای افزایش بیان پروتئین برخوردار هستند از ۵۰% به ۶۴% تغییر پیدا کرد. میزان حداقل انرژی برای ساختار mRNA پیش بینی شده بعد از بهینه سازی به ۳۴۱/۴۰- رسید و ساختار پروتئین پیش بینی شده، پایدار بود.

وجود قطعه ۱۲۹۶ جفت بازی در ژل آگارز بیانگر حضور ژن مورد نظر بود (شکل ۱).



شکل ۱) ژل آگارز ۱%، انجام واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم محدود الاثر NdeI و HindIII روی پلاسمیدهای استخراجی از سلول های ترانسفورم شده برای تایید حضور ژن در پلاسمید
ستون ۱: مارکر؛ ستون ۲: شامل ژن ۱۲۹۶ جفت بازی و پلاسمید ۵۳۶۹ جفت بازی
القای بیان با ظاهر شدن پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی حدود ۴۹ کیلودالتون همراه بود (شکل ۲).



شکل ۲) بیان ژن در دمای ۳۷°C به مدت ۵ ساعت و اجرای آن روی SDS-PAGE ۱۲% و رنگ آمیزی با کوماسی بلو
ستون ۱: نمونه سوپ حاوی پروتئین محلول؛ ستون ۲: نمونه رسوب حاوی پروتئین نامحلول؛ ستون ۳: پروتئین مارکر؛ ستون ۴: نمونه شاهد

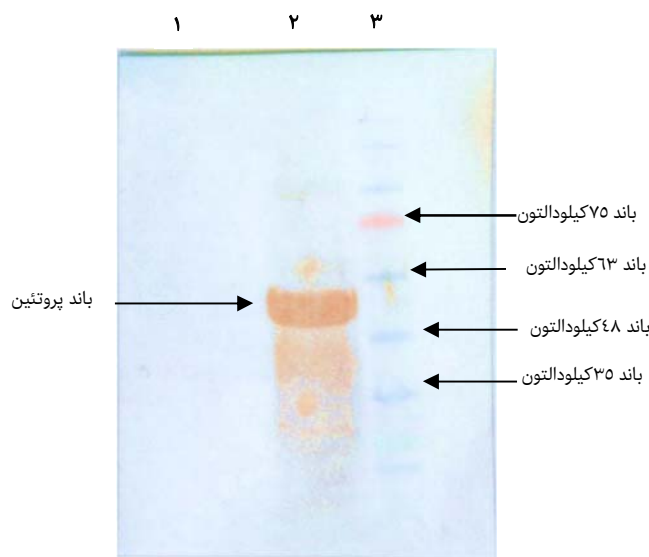
در این روش مشکلاتی مانند سمی بودن پروتئین بیان شده برای سلول میزبان، ناپایداری بودن پروتئین نوترکیب، عدم پردازش مناسب، اصلاحات پس از ترجمه یا ترجمه ناکارآمد وجود دارد. قبل از بیان پروتئین نوترکیب و تخلیص آن باید به نوع کاربرد پروتئین حاصله توجه داشت. اگر پروتئین نوترکیب برای مطالعات بیوشیمیایی و ساختمانی مورد نیاز است باید بیان آن، به گونه ای بهینه شود که پروتئین به صورت محلول تولید شده و از لحاظ عملکردی فعال باشد. پس از سنتز قطعه مورد نظر در pET28a(+) و القای آن با ایزوپروپیل تیو بتا دی گالاتوزیداز (IPTG) موجب آشکار شدن باند پروتئینی کاملاً مشخص در ناحیه مورد انتظار روی ژل شد. سپس با تغییر پارامترهای مختلف دما و زمان، بهترین اثر این پارامترها در تولید پروتئین مورد نظر بررسی شد. ارزیابی ژل های SDS-PAGE حاصل از تغییر پارامترهای مختلف نشان داد که بیشترین میزان بیان در دمای ۳۷°C بعد از گذشت ۵ ساعت از القای IPTG با غلظت یک میلی مولار اتفاق افتاد، پروتئین در این دما به صورت نامحلول بود.

در بیان پروتئین نوترکیب مشکلاتی شامل عدم فرصت کافی سلول برای انجام تآخوردگی های صحیح پروتئین وجود داشت. به همین دلیل، این پروتئین به شکل نامحلول تولید شد که برای بررسی های آنزیمی باید به شکل محلول تبدیل می شد. برای حذف یا پایین آوردن میزان تولید پروتئین نامحلول، همانند مطالعه ای که در سال ۲۰۰۴ توسط آگارول و همکاران صورت گرفت، پروتئین در دمای پایین تر از ۳۷°C و در حضور کلرید روی بیان شد. همچنین در دماهای پایین تر از دمای بهینه، رشد و تکثیر میزبان آفت پیدا کرد و میزان بیان در مقایسه با دمای بهینه کم شد، به همین دلیل برای استحصال مقادیر مناسب از پروتئین نوترکیب زمان القای طولانی (۱۸ ساعت) لازم بود. در عوض میزبان فرصت پیدا کرد تا پروتئین نوترکیب را به طور صحیح بسته بندی و از تشکیل پروتئین نامحلول جلوگیری کند. همچنین میزان بیان پروتئین محلول در شرایط بهینه ۱۰٪ کل پروتئین های باکتری محاسبه شد که میزان قابل قبولی است [11].

پژوهشگران به منظور تخلیص نواحی مختلف نوروتوکسین بوتولینوم، با مشکلاتی مانند خروج پروتئین از ستون در غلظت های کم ایمیدازول مواجه هستند که دلیل این امر، مخفی شدن نشان هیستیدین در پروتئین ذکر شده است، بنابراین برای حل این مشکل، از نشان هیستیدین در دو انتهای پروتئین استفاده کردند [8]. مقدار پروتئین حاصل با روش برادفورد اندازه گیری شد که نشان دهنده میزان ۳/۲ میلی گرم در یک لیتر کشت باکتری القا شده با IPTG بود. همچنین میزان خلوص پروتئین خالص شده با نرم افزارهای بیوانفورماتیک محاسبه شد که میزان خلوص بالای ۹۰٪ بود. عدم دسترسی به پروتئین نوترکیب استاندارد به منظور مقایسه ویژگی های پروتئین به دست آمده، از محدودیت های مطالعه حاضر بود. با توجه به اینکه بیشتر داروهای مهارکننده فعالیت توکسین علیه بخش آنزیمی (ناحیه کاتالیتیک) سم طراحی و ساخته می شوند، پیشنهاد می شود در مطالعات آتی، از پروتئین بیان شده برای بررسی مهارکننده های پپتیدی استفاده شود.

نتیجه گیری

بهینه سازی شرایط بیان پروتئین زنجیره سبک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E موجب تولید محلول آن در محیط کشت توسط میزبان *E. coli* BL21 می شود.



شکل ۵: نتایج وسترن بلات نمونه پروتئینی تخلیص شده، انتقال باندها از ژل SDS-PAGE ۱۲٪ به کاغذ نیتروسلولز مواجهه با آنتی بادی (Anti tox E) توسط PBST با رقت نهایی ۱:۳۰۰۰ و کانژوگه اسبی با رقت ۱:۴۰۰۰ در بافر PBST، و رنگ آمیزی با DAB. ستون ۱: محلول BSA به عنوان شاهد منفی؛ ستون ۲: پروتئین مارکر؛ ستون ۳: نمونه تخلیص شده پروتئین

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی بیان و تخلیص ناحیه کاتالیتیک نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E نوترکیب از یک ژن صناعی انجام شد. استفاده از سم تخلیص شده باکتری محدودیت ها و مشکلاتی دارد و مدت زمان طولانی لازم است تا بتوان مقادیر مورد نیاز (در حد میلی گرم) از آن را تخلیص کرد. به علاوه کار با باکتری و سم آن با توجه به کشندگی بالای آن خطرات خاص خود را دارد، زیرا تمام کمپلکس سم تخلیص می شود و پتانسیل آلوده شدن به آن وجود دارد. هزینه بالای تخلیص سم باکتری نیز یک مساله قابل تامل است. تولید نوترکیب بخش آنزیمی سم دارای مزیت هایی است و در واقع مشکلات استفاده از سم تخلیص شده را ندارد. بنابراین بیان نوترکیب بخش آنزیمی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در مطالعه حاضر به منظور استفاده از آن در مطالعات آتی می تواند حایز اهمیت باشد. قبل از سنتز ژن مورد نظر ابتدا کلیه تجزیه و تحلیل های بیوانفورماتیک برای بهینه سازی بیان، براساس کدون های متداول باکتری *E. coli* با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک صورت گرفت زیرا ژن های کلاستریدیوم به شکل طبیعی در باکتری *E. coli* به دلایل گوناگون خیلی ضعیف بیان می شوند [17، 18]، بنابراین بهینه سازی حاضر توانست بیان پروتئین نوترکیب را در میزبان انتخاب شده به صورت چشمگیر افزایش دهد [19].

نکته قابل توجه در بیان توالی مورد مطالعه این است که توالی مذکور دارای درصد بالایی از بازهای AT (بیش از ۷۳٪) بوده و برای بیان در باکتری *E. coli* بحث کدون های نادر وجود دارد. توالی مورد مطالعه ۳۹ کدون نادر اسید آمینه داشت. در مطالعه حاضر، اقدام به بیان توالی مذکور در باکتری *E. coli* BL21(DE3) شد. این باکتری ویژگی های مهمی دارد، اما از مهم ترین آنها می توان به وجود تعداد کم پروتئین های خارج سلولی و متصل به دیواره سلولی اشاره کرد. از این رو فعالیت پروتئین سازی روی محصول کم است. البته

- 7- Kiris E, Burnett JC, Kane CD, Bavari S. Recent advances in botulinum neurotoxin inhibitor development. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(18):2044-61.
- 8- Mousavi ML, Kouhsari SM, Nazarian Sh, Rasooli I, Amani J. Cloning, expression and purification of Clostridium botulinum neurotoxin type E binding domain. *Iran J Biotechnol*. 2004;2(3):183-8.
- 9- Hamidi B, Ebrahimi F, Hajizadeh A, Hajizadeh A, Keshavarz Alikhani H. Fusion and cloning of the binding domains of botulinum neurotoxin type A and B in E. coli DH5α. *Eur J Experimental Biol*. 2012;2(4):1154-60.
- 10- Derman Y, Selby K, Miethe S, Frenzel A, Liu Y, Rasetti-Escargueil C, et al. Neutralization of botulinum Neurotoxin Type E by a humanized antibody. *Toxins (Basel)*. 2016;8(9):257.
- 11- Agarwal R, Eswaramoorthy S, Kumaran D, Dunn JJ, Swaminathan S. Cloning, high level expression, purification, and crystallization of the full length Clostridium botulinum neurotoxin type E light chain. *Protein Expr Purif*. 2004;34(1):95-102.
- 12- Agarwal R, Swaminathan S. SNAP-25 substrate peptide (residues 180-183) binds to but bypasses cleavage by catalytically active Clostridium botulinum Neurotoxin E-. *J Biol Chem*. 2008;283(38):25944-51.
- 13- Sambrook J, MacCallum P, Russell D. Molecular cloning A laboratory Manual. 3rd Volume. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. pp. 6-12.
- 14- Ralph R. The nucleic acid protocols hand book. New York: Humana Press; 2000.
- 15- Ebrahimi F, Rasaei MJ, Mousavi SL, Babaeipour V. Production and characterization of a recombinant chimeric antigen consisting botulinum neurotoxin serotypes A, B and E binding subdomains. *J Toxicol Sci*. 2010;35(1):9-19.
- 16- Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. Protein methods. New York: Wiley-Liss; 1991.
- 17- Gouy M, Gautier C. Codon usage in bacteria: Correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res*. 1982;10(22):7055-74.
- 18- Zdanovsky AG, Zdanovskaia MV. Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(8):3166-73.
- 19- Lacy DB, Stevens RC. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol*. 1999;291(5):1091-104.

تشکر و قدردانی: از حمایت‌های مرکز علم و فناوری دانشگاه جامع امام حسین^(ع) به‌منظور اجرای مطالعه حاضر تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: به‌دلیل عدم استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نیازی به تاییدیه ندارد.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سیدمجتبی آقایی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ سیدجعفر موسوی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۲۰٪)؛ فیروز ابراهیمی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۱۰٪)؛ محمدباقر صالحی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۱۰٪)؛ شهرام نظریان (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۱۰٪).

منابع مالی: کلیه هزینه‌های این پژوهش از سوی دانشگاه جامع امام حسین^(ع) تامین شده است.

منابع

- 1- Thanongsaksrikul J, Chaicumpa W. Botulinum neurotoxins and botulism: a novel therapeutic approach. *Toxins (Basel)*. 2011;3(5):469-88.
- 2- Mousavi SJ, Rashidani J, Farasat A, Ebrahimi F. Recombinant expression of light chain of botulinum neurotoxin type-A in E. coli and evaluation of its enzymatic activity. *Mol Biol Res Commun*. 2014;3(1):58-60. [Persian]
- 3- Leclair D, Farber JM, Pagotto F, Suppa S, Doidge B, Austin JW. Tracking sources of Clostridium botulinum type E contamination in seal meat. *Int J Circumpolar Health*. 2017;76(1):1380994.
- 4- Kukreja R, Singh B. The botulinum toxin as a therapeutic agent: Molecular and pharmacological insights. *Res Rep Biochem*. 2015;5:173-83.
- 5- Lakshminarasimhan D, Kumaran D, Agarwal R, Singh BR. Cloning, expression and purification of botulinum neurotoxin type A heavy chain-crystallographic evidence for a putative tetrameric pore. *Botulinum J*. 2012;2(2):135-49.
- 6- Horowitz BZ. Type E botulism. *Clin Toxicol (Phila)*. 2010;48(9):880-95.