چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

# همسانه‌سازي ژن بخش اتصال دهنده نروتوكسين كلستريديوم بوتولينوم

**موسوي ميرلطيف[1], كوشكي حميد[1] *, شهرام نظريان[1]**
۱- دانشگاه امام حسين(ع)- پژوهشكده علوم پايه گروه علوم زيستي

**چكيده**
توكسين بوتولينوم عامل سندروم كشنده بوتوليسم در انسان مي باشد. اين توكسين يك عامل بلوكه كننده عصبي- عضلاني بسيار قوي مي باشدكه از طريق ممانعت از آزاد شدن نروترانسميتر استيل كولين از انتهاي اعصاب محيطي باعث ايجاد فلج شل مي شود. نروتوكسين مذبور بصورت يك پلي- پپتيد تك زنجيره اي سنتز مي شود كه وزن مولكولي آن ۱۵۰ كيلودالتون است اما فرم فعال آن بصورت دو زنجيره اي مي باشد كه زنجيره سنگين آن ۱۰۰ و زنجيره سبك آن ۵۰ كيلو دالتون است. اين دو زنجيره توسط يك پيوند دي سولفيدي به همديگر متصل شده اند. در اين تحقيق ژن كد كننده بخش اتصال دهنده سم بوتولينوم تيپBبه روش PCR از ژنوم باكتري جدا و در وكتور pTZ57R كلون شده است حاصل اين تحقيق ابزاري مناسب جهت مطالعه بر روي مكانيسم اتصال اختصاصي هولوتوكسين مي باشد و همچنين مي تواند براي مطالعه توليد آنتي بادي و واكسن مناسب عليه سندروم بوتوليسم باشد.

**كلمات كليدی** بوتولينوم, نروتوكسين تيپB, همسانه‌سازي

# Isolation and Cloning of the Binding Domain of BONT/B Gene

Mousavi, S.L., Kooshky, H., Nazarian, Sh.

## Abstract:
Botulinum neurotoxins constitute of a family of bacterial toxins responsible for botulism syndrome in human. The toxin binds with high affinity to nervous cells where it causes a complete inhibition and the release neurotransmitters and thereby produces flaccid paralysis. In this work we have reported isolation of the binding domain of type B by PCR cloning on the proper cloning vector. The output of this investigation can be used as a tool to study the mechanism of binding of the holotoxins and also can be useful for studying the antibody production against botulism syndrome.

**Key words:** Botulinum, neurotoxin type B, cloning

## كليات

انواع كلستريديوم بوتولينوم قوي‌ترين اگزوتوكسين‌هاي شناخته شده را توليد مي كنند. براساس ويژگي‌هاي آنتي‌ژنيك متفاوت هفت سروتيپ مختلف اين باكتري شناخته شده است (A-G). سروتيپهاي A,B,E در انسان سبب ايجاد بيماريهايي تحت عنوان مسموميت غذائي بوتوليسم, بوتوليسم نوزادان و زخم بوتوليسم مي شوند. وزن مولكولي نروتوكسين تيپ B ۱۵۰ كيلو دالتون مي باشد و از دو بخش Heavy chain و Light chain تشكيل شده است دومين هاي عملكردي نروتوكسين مذبور شامل Binding domain, Catalytic domain, Translocating domain مي باشند مراحل عملكرد سم به شرح زير مي باشد: الف)اتصال به سلول هدف و ورود به درون آن ب)انتقال ج)مهار آزاد سازي نروترانسميترها پروتئين هدف نروتوكسين مذبور VAMP-2 مي باشد كه پيوند پپتيدي ميان گلوتامين ۷٦ و فنيل آلانين۷۷ در اين فعل و انفعالات برش مي خورد(Glu76---phy77) . سروتيپ B از ميزان شيوع بسيار بالائي برخوردار مي باشد و احتمال آلودگي به اين سروتيپ در مسموميتهاي بوتوليسمي ناشناخته بسيار بالا مي باشد. بخش اتصال دهنده سم كه بطور مستقيم با سلول عصبي در گير مي باشد نقش بسيار كليدي در اتصال و به دنبال آن در عملكرد اين سم ايفا مي نمايد و شناخت اين بخش مي تواند به شناخت پذيرنده هاي اين سم منجر شود باتوجه به اينكه اين بخش از ايمني‌زائي برخوردار مي باشد مي توان با همسانه‌سازي اين بخش و نهايتا بدست آوردن پروتئين خالص آن و تزريق به حيوان آزمايشگاهي به آنتي‌توكسين مربوطه جهت رفع مسموميت‌هاي ناشي از اين سم دست پيدا كرد. همچنين بخش اتصال دهنده در مطالعات عصب شناسي كاربرد دارد. باتوجه به جميع مطالب فوق جداسازي و تكثير ژن مورد نظر از ژنوم باكتري به روش PCR و كلون كردن ژن تكثير شده مد نظر قرار گرفت تا در مراحل بعدي نسبت به بيان وتخليص و ايمني‌زائي پروتئين بيان شده بعنوان كانديد مناسب براي تهيه واكسن بر عليه اين سم اقدام گردد.

## مواد و روشها

آنزيمهاي محدودالاثر TaqI, BamHI, EcoRI, HpaII از شركت Rocheتهيه شد. آنزيم T4DNAligaseاز شركت سينا ژن و آنزيمهاي تكثير دهنده Taq DNA polymerase ,Pfu DNA polymerase از شركت Fermentase تهيه شد و همچنين ساير مواد نيز از شركت Fermentase تهيه شد.
ترادف پرايمرهاي طراحي شده:

پرایمر فرادست: 5 ′AATAGGATCCAAAACCAGTATACCATTTG3′
BamHI
پرایمر فرودست: 5 ′ATAGAATTCTTATTCAGTCCACCCTTCATC3′
EcoRI

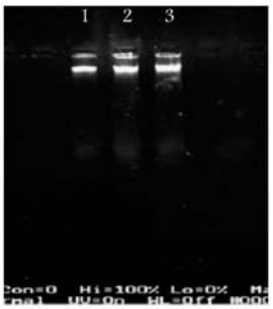
باكتري كلستريديوم بوتولينوم تيپ B در شرايط بيهوازي مطق و فشار ۱۵ درجه دي اكسيد كربن بر روي محيط TPYG به مدت ٤۸ ساعت كشت داده شد. سپس سلول‌هاي جمع‌آوري شد و به روش قليائي DNA كروموزومي آنها استخراج گرديد. با استفاده از پرايمرهاي طراحي شده قطعه ژن مورد نظر با دستگاه PCR تكثير شد و محصول PCR توسط دو آنزيم BamHI و EcoRI كه قبلا در ابتدا و انتهاي پرايمرها تعبيه شده بود مورد هضم آنزيمي قرار گرفت همزمان وكتور مورد نظر pTZ57R نيز توسط آنزيمهاي مذكور مورد هضم آنزيمي قرار گرفت پس از اين مرحله وكتور و محصول PCRبر روي ژل L.M.P الكتروفورز شد و بوسيله كيت عمل تخليص نيز انجام گرفت سپس عمل الحاق (Ligation) بر روي وكتور و محصول PCR بواسطه آنزيم T4Ligase به مدت ۱۲ساعت و در دماي ۱۳ درجه سانتي گراد انجام گرفت و در ميزبان Ecoli. BL21 DE3 عمل ترانسفورماسيون (تراريخت) نيز به انجام رسيد.

**نتايج وبحث**

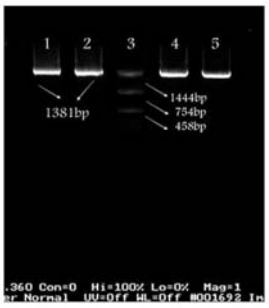
عمل PCR از روي DNA ژنوميك (شكل۱) ابتدا با آنزيم Taq DNA polymerase انجام گرفت و شرايط بهينه تكثير ژن با استفاده از اين آنزيم به دست آمد. تكثير نهائي با استفاده از آنزيمPfu DNA polymerase انجام گرفت بخاطر اينكه اين آنزيم خاصيت اصلاح را دارد. طول قطعه اتصال دهنده ۱۳۸۳ جفت باز مي باشد كه عمل تكثير و جداسازي آن به‌همراه نشانگر اندازه PUC18/Tag (شكل۲) ديده مي شود. آناليزهاي انجام شده بر روي اين قطعه نشان داد كه اگر اين قطعه ژني توسط آنزيم HpaII مورد هضم آنزيمي قرار بگيرد قطعاتي به طول ۸۱۳و٥٦۸ جفت باز ايجاد خواهد شد. محصول PCR توسط آنزيم فوق مورد هضم قرار گرفت و قطعات فوق به دست آمد(شكل۳). در اين تحقيق براي عمل همسانه سازي از روش انتهاي چسبان استفاده شد. به همين دليل در هنگام طراحي پرايمر دو سايت آنزيمي بر روي پرايمر فوروارد و ريورس در نظر گرفته شد تا پس از برش آنزيمي انتهاي چسبان ايجاد نمائيم پس از اين مرحله بر روي وكتور pTZ57Rكلون انجام گرفت . كلونهاي مورد نظر در ابتدا توسط دو آنزيم BamHI و EcoRI مورد هضم قرار گرفتند و قطعه مورد نظر از وكتور جداسازي شد و مشخص گرديد كه كلون صورت پذيرفته است(شكل٤). جهت تائيد مراحل قبلي از روي كانستراكت با شرايط ذكر شده PCR انجام گرفت و قطعه مورد نظر جداسازي شد. در نهايت ترادف يابي شد.

**منابع**

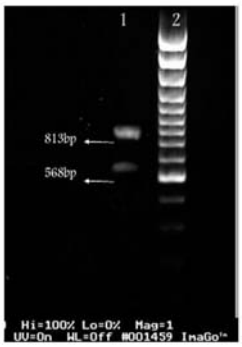
1) International programme on chemical safety poisons information monograph 858(WHO)
2) Identification of clostridium species issued by standards unit, Evalutions and standards laboratory specialist and reference microbiology division ref no: BSOP ID 8i1
3) Allen, S.D., Baron, E. J., Balows, A., Haulser, W.J., Herman, K.L., Shadomy, H.J., eds. Manual of clinical microbiology 5th ed.washington,DC:American society for microbiology; 1991:505-521
4) Schiavo, G., Rosseto, Tonello, F., Montecucco (1995) intracellular targets and metalloprotease activity of tetanus and botulinum neurotoxins. Curr top microbial immunol; 195:257-274
5) Prevot, A.R., (1953) rapport d'introduction du president du sous-comite clostridium l'unification de la nomenclature des types toxigeniques de c. Botulinum. Int bull bacterial nomenclature; 3:120-123
6) Lacy, D.B. and Stevens, R.C., (1999) sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. J.Mol.Biol;291:1091-1104



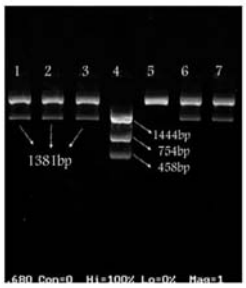

شکل۱: استخراج DNA کروموزومی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B




شکل2: ارزیابی محصول PCR ژن پخش اتصال دهنده سم کلستریدیوم تیپ B
ردیف 1و2:محصول PCR با استفاده از **pfu DNA polymerase**
ردیف4و5: محصول PCR با استفاده از**Taq DNA polymerase**
ردیف3: نشانگر اندازه**pUC18** بریده شده با آنزیم **TaqI**به ترتیب اندازه:
**1444bp,754bp,458bp**




شکل3: هضم انزیمی محصول PCR با استفاده از آنزیم **HpaII**
ردیف1:محصول PCR برش داده شده با آنزیم **HpaII**
ردیف2:نشانگر اندازه، **DNA ladder 1Kb**




شکل4: هضم آنزیمی وکتور **pTZ57R** جهت بررسی کلونینگ
ردیف1,2,3,6و7) پلاسمید برش خورده **pTZ57R**
(واجد ژن اتصال دهنده) با آنزیمهای **EcoRI ,BamHI**
ردیف 5 ) پلاسمید برش خورده **pTZ57R**
(فاقد ژن اتصال دهنده) با آنزیمهای **BamHI , EcoRI**
ردیف 4 ) نشانگر اندازه**pUC18/Taq**
به ترتیب اندازه**1444bp,754bp,458bp**