

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی

مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها

اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

همسانه‌سازی ژن بخش اتصال دهنده نروتوکسین کلستری‌دیوم بوتولینوم

موسوی میرلطیف^۱، کوشکی حمید^{۱*}، شهرام نظریان^۱
۱- دانشگاه امام حسین(ع)- پژوهشکده علوم پایه گروه علوم زیستی

چکیده

توکسین بوتولینوم عامل سندروم کشنده بوتولیسم در انسان می باشد. این توکسین یک عامل بلوکه کننده عصبی- عضلانی بسیار قوی می باشد که از طریق ممانعت از آزاد شدن نروترانسمیتر استیل کولین از انتهای اعصاب محیطی باعث ایجاد فلج شل می شود. نروتوکسین مذکور بصورت یک پلی-پپتید تک زنجیره ای سنتز می شود که وزن مولکولی آن ۱۵۰ کیلودالتون است اما فرم فعال آن بصورت دو زنجیره ای می باشد که زنجیره سنگین آن ۱۰۰ و زنجیره سبک آن ۵۰ کیلودالتون است. این دو زنجیره توسط یک پیوند دی سولفیدی به همدیگر متصل شده اند. در این تحقیق ژن کد کننده بخش اتصال دهنده سم بوتولینوم تیپ B به روش PCR از ژنوم باکتری جدا و در وکتور pTZ57R کلون شده است حاصل این تحقیق ابزاری مناسب جهت مطالعه بر روی مکانیسم اتصال اختصاصی هولوتوکسین می باشد و همچنین می تواند برای مطالعه تولید آنتی بادی و واکسن مناسب علیه سندروم بوتولیسم باشد.

کلمات کلیدی: بوتولینوم، نروتوکسین تیپ B، همسانه سازی

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

کلیات

انواع کلستری‌دیوم بوتولینوم قوی‌ترین آگزوتوکسین‌های شناخته شده را تولید می کنند. بر اساس ویژگی‌های آنتی‌ژنیک متفاوت هفت سروتیپ مختلف این باکتری شناخته شده است (A-G). سروتیپ‌های A, B, E در انسان سبب ایجاد بیماری‌هایی تحت عنوان مسمومیت غذایی بوتولیسم، بوتولیسم نوزادان و زخم بوتولیسم می شوند. وزن مولکولی نروتوکسین تیپ B ۱۵۰ کیلودالتون می باشد و از دو بخش Heavy chain و Light chain تشکیل شده است دومین‌های عملکردی نروتوکسین مذکور شامل Binding domain, Catalytic domain, Translocating domain می باشند مراحل عملکرد سم به شرح زیر می باشد: الف) اتصال به سلول هدف و ورود به درون آن ب) انتقال ج) مهار آزاد سازی نروترانسمیترها پروتئین هدف نروتوکسین مذکور VAMP-2 می باشد که پیوند پپتیدی میان گلوتامین ۷۶ و فنیل آلانین ۷۷ در این فعل و انفعالات برش می خورد (Glu76---phy77). سروتیپ B از میزان شیوع بسیار بالایی برخوردار می باشد و احتمال آلودگی به این سروتیپ در مسمومیت‌های بوتولیسمی ناشناخته بسیار بالا می باشد. بخش اتصال دهنده سم که بطور مستقیم با سلول عصبی درگیر می باشد نقش بسیار کلیدی در اتصال و به دنبال آن در عملکرد این سم ایفا می نماید و شناخت این بخش می تواند به شناخت پذیرنده های این سم منجر شود باتوجه به اینکه این بخش از ایمنی‌زائی برخوردار می باشد می توان با همسانه‌سازی این بخش و نهایتاً بدست آوردن پروتئین خالص آن و تزریق به حیوان آزمایشگاهی به آنتی‌توکسین مربوطه جهت رفع مسمومیت‌های ناشی از این سم دست پیدا کرد. همچنین بخش اتصال دهنده در مطالعات عصب شناسی کاربرد دارد. باتوجه به جمیع مطالب فوق جداسازی و تکثیر ژن مورد نظر از ژنوم باکتری به روش PCR و کلون کردن ژن تکثیر شده مد نظر قرار گرفت تا در مراحل بعدی نسبت به بیان و تخلیص و ایمنی‌زائی پروتئین بیان شده بعنوان کاندید مناسب برای تهیه واکسن بر علیه این سم اقدام گردد.

مواد و روشها

آنزیم‌های محدود الاثر TaqI, BamHI, EcoRI, HpaII از شرکت Roche تهیه شد. آنزیم T4DNA ligase از شرکت سیناژن و آنزیم‌های تکثیر دهنده Pfu DNA polymerase, Taq DNA polymerase از شرکت Fermentase تهیه شد و همچنین سایر مواد نیز از شرکت Fermentase تهیه شد. ترادف پرایمرهای طراحی شده:

پرایمر فرادست: '5 'AATAGGATCCAAAACCAGTATAACCATTTG3'
BamHI

پرایمر فرودست: '5 'ATAGAATTCTTATTTCAGTCCACCCTTCATC3'
EcoRI

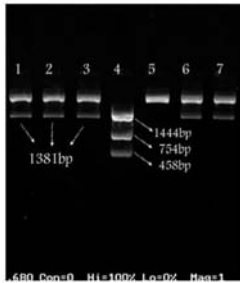
باکتری کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B در شرایط بیهوازی مطلق و فشار ۱۵ درجه دی اکسید کربن بر روی محیط TPYG به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سپس سلول‌های جمع‌آوری شد و به روش قلیانی DNA کروموزومی آنها استخراج گردید. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده قطعه ژن مورد نظر با دستگاه PCR تکثیر شد و محصول PCR توسط دو آنزیم BamHI و EcoRI که قبلاً در ابتدا و انتهای پرایمرها تعبیه شده بود مورد هضم آنزیمی قرار گرفت همزمان وکتور مورد نظر pTZ57R نیز توسط آنزیمهای مذکور مورد هضم آنزیمی قرار گرفت پس از این مرحله وکتور و محصول PCR بر روی ژل L.M.P الکتروفورز شد و بوسیله کیت عمل تخلیص نیز انجام گرفت سپس عمل الحاق (Ligation) بر روی وکتور و محصول PCR بواسطه آنزیم T4Ligase به مدت ۱۲ ساعت و در دمای ۱۳ درجه سانتی گراد انجام گرفت و در میزبان Ecoli. BL21 DE3 عمل ترانسفورماسیون (ترا ریخت) نیز به انجام رسید.

نتایج و بحث

عمل PCR از روی DNA ژنومیک (شکل ۱) ابتدا با آنزیم Taq DNA polymerase انجام گرفت و شرایط بهینه تکثیر ژن با استفاده از این آنزیم به دست آمد. تکثیر نهایی با استفاده از آنزیم Pfu DNA polymerase انجام گرفت بخاطر اینکه این آنزیم خاصیت اصلاح را دارد. طول قطعه اتصال دهنده ۱۳۸۳ جفت باز می باشد که عمل تکثیر و جداسازی آن به همراه نشانگر اندازه PUC18/Tag (شکل ۲) دیده می شود. آنالیزهای انجام شده بر روی این قطعه نشان داد که اگر این قطعه ژنی توسط آنزیم HpaII مورد هضم آنزیمی قرار بگیرد قطعاتی به طول ۵۶۸ و ۸۱۳ جفت باز ایجاد خواهد شد. محصول PCR توسط آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفت و قطعات فوق به دست آمد (شکل ۳). در این تحقیق برای عمل همسانه سازی از روش انتهایی چسبان استفاده شد. به همین دلیل در هنگام طراحی پرایمر دو سایت آنزیمی بر روی پرایمر فرورارد و ریورس در نظر گرفته شد تا پس از برش آنزیمی انتهایی چسبان ایجاد نمایم پس از این مرحله بر روی وکتور pTZ57R کلون انجام گرفت. کلونهای مورد نظر در ابتدا توسط دو آنزیم BamHI و EcoRI مورد هضم قرار گرفتند و قطعه مورد نظر از وکتور جداسازی شد و مشخص گردید که کلون صورت پذیرفته است (شکل ۴). جهت تأیید مراحل قبلی از روی کانستراکت با شرایط ذکر شده PCR انجام گرفت و قطعه مورد نظر جداسازی شد. در نهایت ترادف یابی شد.

منابع

- 1) International programme on chemical safety poisons information monograph 858(WHO)
- 2) Identification of clostridium species issued by standards unit, Evaluations 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



شکل ۱- عظیم آنزیمی وکتور pTZ57R جهت بررسی کلونینگ

 ردیف‌ها ۱، ۲، ۳، ۴ (۱) پلاسمید پرش خورده، pTZ57R

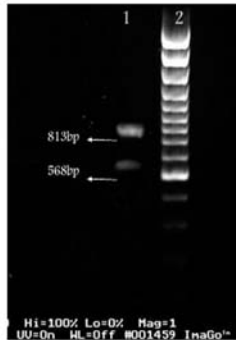
 (۲) ایجاد زن اتصال دهنده با آنزیمهای EcoRI, BamHI

 ردیف ۵ (۳) پلاسمید پرش خورده، pTZ57R

 (۴) قادر زن اتصال دهنده با آنزیمهای BamHI, EcoRI

 ردیف ۴ (۴) نشانگر اندازه، pUC18/Taq

 به ترتیب اندازه، 1444bp, 754bp, 458bp



شکل ۲- عظیم آنزیمی محصول PCR با استفاده از آنزیم HpaII

 ردیف ۱ محصول PCR پرش داده شده با آنزیم HpaII

 ردیف ۲ نشانگر اندازه، DNA ladder 1Kb

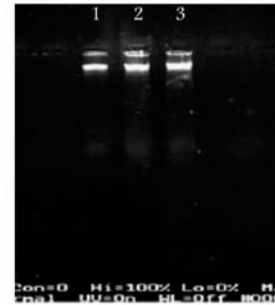


شکل ۳- ارزیابی محصول PCR زن بخش اتصال دهنده سم کشتیراییوم پپ B

 ردیف ۱ ژن محصول PCR با استفاده از pfu DNA polymerase

 ردیف ۲ نشانگر اندازه، pUC18 پر شده شده با آنزیم Taq به ترتیب اندازه:

 1444bp, 754bp, 458bp



شکل ۴: استخراج DNA کروموزومی کشتیراییوم پپ B

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله