

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین SNAP-25

دکتر سید لطیف موسوی*، شهرام نظریان**، جعفر امانی***، دکتر رحیم سروری زنجان****

نویسنده مسئول: قم، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی slmousavi@shahed.ac.ir

دریافت: ۸۶/۲/۲۴ پذیرش: ۸۶/۷/۲

چکیده

زمینه و هدف: سم‌های عصبی کلستریادیوم آزادسازی نوروترانسمیترها را به وسیله‌ی پروتئولیز اختصاصی و انتخابی SNAP-25، سیناپتوپرویین VAMP و سینتاکسین، مهار می‌کنند. پروتئین SNAP-25 یکی از پروتئین‌های تشکیل‌دهنده‌ی مجموعه‌ی لنگراندازی (Docking complex) در پایانه‌های عصبی است. این پروتئین سوپسترای سم عصبی بوتولینوم، سروتپ‌های A، C و E می‌باشد. هر کدام از این سروتپ‌ها به طور اختصاصی و در جایگاه ویژه SNAP-25 را در یک پیوند آمیدی برش داده و از تشکیل مجموعه‌ی لنگراندازی و در نهایت آگزوستوز نوروترانسمیترها و انتقال پیام عصبی جلوگیری می‌کنند. در آزمایشگاه می‌توان با تولید SNAP-25 به روش نوترکیب از آن به عنوان سوپسترای سم، در تشخیص تپ‌های E و A سم بوتولینوم بهره برد.

روش بررسی: در این مطالعه بر آن شدیم که این پروتئین را به صورت نوترکیب تولید کنیم. برای این منظور cDNA ژن مورد نظر با استفاده از روش از RNA تام استخراج شده از سلول‌های مغز موش صحرایی تهیه و توسط RT-PCR تکثیر شد. محصول PCR روی ناقل pET32a همسانه‌سازی شد و پروتئین نوترکیب بیان شده به کمک روش وسترن بلاتینگ و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی مورد تأیید قرار گرفت و در نهایت با استفاده از یک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی (Ni-NTA) تخلیص و با کمک آنزیم اینتروکیناز فیوژن از پروتئین مورد نظر جدا شد.

یافته‌ها: در این تحقیق شرایط بهینه برای بیان پروتئین نوترکیب SNAP-25، استفاده از غلظت یک میلی‌مولار IPTG، مدت زمان انکوباسیون ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین شد. در تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA، غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول باعث جداسازی و تخلیص پروتئین نوترکیب شد. همچنین استفاده از آنزیم اینتروکیناز برای برش فیوژن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به دمای محیط نتایج بهتری را به همراه داشت.

نتیجه‌گیری: پروتئین نوترکیب تخلیص شده ساختار خود را در حین تخلیص از دست نداده و جهت برش و انجام آزمایشات بعدی مناسب و قابل استفاده می‌باشد. از آن‌جا که سایر روش‌های تشخیصی سم بوتولینوم از جمله روش استاندارد تزریق به موش بسیار وقت‌گیر می‌باشند لذا استفاده از این محصول نوترکیب به عنوان سوپسترا جهت تشخیص سم در آزمایشگاه می‌تواند تا اندازه‌ای مشکلات موجود در روش‌های قبلی را مرتفع سازد.

واژگان کلیدی: نوروتوکسین بوتولینوم تپ A و E، پروتئین نوترکیب، SNAP-25

*دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار دانشگاه شاهد

**کارشناس ارشد سلولی ملکولی، دانشگاه امام حسین

***کارشناس ارشد سلولی ملکولی، دانشگاه امام حسین

****دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

مقدمه

سم‌های عصبی بوتولینوم عوامل نوروپارالیتیک مهمی هستند که انتقال عصبی کلونریک را مهار می‌کنند و از این طریق سبب سستی و فلج شل می‌شوند (۴-۱). سم بوتولینوم یک متالواندوپتیداز است که از دو زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی تشکیل شده است که زنجیره‌ی سنگین به نوروئین‌های حرکتی کلونریک متصل شده و با ایجاد کانال ورود زنجیره‌ی سبک را تسهیل می‌نماید. زنجیره‌ی سبک که نقش پپتیدازی را بازی می‌کند بسیار اختصاصی عمل می‌کند (۹-۵).

سوبسترای این پروتئاز، پروتئین‌های (soluble [SNARE] N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein) می‌باشد. پروتئین‌های SNARE مسئول تشکیل مجموعه‌ی لنگراندازی بین وزیکول‌های سیناپسی و غشای انتهایی سلول‌های عصبی می‌باشند که از سه پروتئین تشکیل شده‌اند: پروتئین غشای وزیکولی به نام (Vesicle associated membrane protein [VAMP])،

پروتئین غشای سیناپسی به نام سینتاکسین (Syntaxin) و پروتئین دیگری به نام SNAP-25 که یک پروتئین سطح غشایی است (۱۲-۱۰). دو پروتئین اول هر کدام تشکیل یک مارپیچ آلفا را می‌دهند که در ساختمان مجموعه‌ی لنگراندازی شرکت می‌کند و (Synaptosomal associated protein of 25KD [SNAP-25]) تشکیل دو مارپیچ آلفا را می‌دهد که در ساختمان این مجموعه شرکت می‌کند (۱۳). SNAP-25 یک پروتئین آب‌گریز با ۲۰۶ اسیدآمینو می‌باشد و از طریق پلمیتیل با پیوند تیواستری به چهار سیستمین نزدیک به مرکز پروتئین متصل هستند، که این مجموعه به غشا متصل می‌شود. ناحیه‌های موجود در پایانه‌ی آمینی و کربوکسیل این پروتئین بسیار حفاظت شده هستند و پیش‌بینی می‌شود که ساختمان‌های مارپیچی داخل مولکول را ایجاد می‌کنند (۱۴-۱۲). بنابراین مجموعه‌ی

لنگراندازی از ابر پیچش چهار مارپیچ آلفا به صورت چپ‌گرد ایجاد می‌شود که سه عدد از این مارپیچ‌ها مربوط به SNAP-25 است و یک عدد مربوط به v-SNARE می‌باشد. این مجموعه زمانی تشکیل می‌شود که غلظت کلسیم به واسطه‌ی رسیدن پیام عصبی به انتهای عصب و باز شدن پمپ‌های وابسته به ولتاژ افزایش یابد. پس از لنگراندازی وزیکول حاوی نوروترانسمیتر به غشای انتهایی سیناپتیک و الحاق دو غشا به کمک پروتئین‌های SNARE، نوروترانسمیتر از طریق اگزوسیتوز به داخل فضای سیناپسی رها شده و از این طریق پیام عصبی از یک نورون به نورون دیگر یا به سلول‌های ماهیچه‌ای منتقل می‌شود (۱۷-۱۵). سم‌های عصبی بوتولینوم تیپ A و E قادر هستند پروتئین SNAP-25 که یکی از اجزای تشکیل‌دهنده‌ی این مجموعه است را به ترتیب در موقعیت Arg198-Gln197 و Arg180-Gln181 برش دهند (۱۹، ۱۸)، از آن‌جایی که سم بوتولینوم بسیار کشنده است تشخیص سریع و دقیق آن امری حیاتی محسوب می‌شود بنابراین می‌بایست روش خاصی انتخاب شود که ساده، ارزان، دقیق و در دسترس باشد. در سال‌های اخیر روش‌های زیادی برای تشخیص آزمایشگاهی سم‌های عصبی کلستری‌دیوم بوتولینوم از جمله تشخیص ایمونولوژیک با حساسیتی نزدیک به روش‌های قدیمی ابداع شده است (۲۱، ۲۰). در حال حاضر یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌ها تشخیص توسط Reversed Phase-High Performance [RP-HPLC]) (Liquid Chromatographic) می‌باشد که پروتئین SNAP-25 را به عنوان سوبسترای آزمایشگاهی برای تشخیص سریع سم عصبی بوتولینوم تیپ A و E نیاز دارد (۲۴-۱۹) و از آن‌جایی که تولید آن به روش سنتز آزمایشگاهی در حال حاضر در داخل کشور مقدور نمی‌باشد و تهیه‌ی آن مستلزم هزینه‌ی بالاست، بدیهی است تولید نوع نوترکیب آن می‌تواند بسیار مفید واقع شود. در این مطالعه ما برآن شدیم

تا با همسانه سازی SNAP-25 در یک ناقل مناسب، بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب، سوبسترای سم عصبی نوع A و E را در آزمایشگاه فراهم کنیم تا در مطالعات بعدی بتوانیم از این سوبسترا برای تشخیص سریع و اختصاصی سموم فوق در آزمایشگاه بهره ببریم. هم چنین این سوبسترا می تواند در تشخیص سم عملکردی از غیر عملکردی کمک شایانی داشته باشد که در گذشته فقط با تزریق به موش انجام می گرفت.

روش بررسی

استخراج ترادف ژن مربوط به SNAP-25 انسانی از بانک ژن و طراحی پرایمر: در این مطالعه ی تجربی پس از استخراج ترادف ژنی SNAP-25 انسانی از بانک ژن و مقایسه ی آن با ترادف ژنی SNAP-25 موش صحرایی با کمک برنامه ی BLAST، مشاهده شد که این دو ژن کاملاً یکسان و حفاظت شده هستند، بنابراین بر اساس ترادف cDNA از SNAP-25 موش صحرایی اقدام به طراحی پرایمر و سفارش آن از شرکت MWG-Bio-Tech شد. پرایمر بالادست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایر BamHI است و پرایمر پایین دست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایر EcoRI می باشد.

5'-ACT GGATCC ATG GCC GAG
GAC G-3 BamHI
5'-GGA GAATTC TTA ACC
ACT TCC CAG CAT-3' EcoRI

تهیه ی RNA تام از قسمت قشری مغز موش صحرایی: با استفاده از کیت RNX و پروتکل ارائه شده توسط شرکت فروشنده (فرمتاز)، RNA تام از قسمت قشری مغز موش نر بالغ از نژاد راتوس (Rattus norvegicus wister) که از دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهیه شده و به کمک ازت مایع و هاون به صورت پودر در آمده بود، استخراج شد.

تهیه ی cDNA مربوط به SNAP-25 و تکثیر آن به کمک RNA (Polymerase chain reaction [PCR]): ابتدا RNA تام با پرایمر پایین دست و آب دوبار تقطیر تیمار شده با DEPC در ۷۰ درجه ی سانتی گراد به مدت پنج دقیقه انکوبه شد سپس به آن dNTPs و مهارکننده ی RNase (RNasin) و آب دو بار تقطیر اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه شد و به آن آنزیم Revert Aid M-Mulv Reverse Transcriptase اضافه و در ۴۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. در پایان برای خاتمه دادن به واکنش، آن را به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه ی سانتی گراد انکوبه کردیم. cDNA حاصل به کمک واکنش PCR تکثیر شد. واکنش PCR جهت تکثیر cDNA در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط نوکلئوتیدهای dATP، dCTP، dGTP و dTTP، ۲ واحد آنزیم Pfu DNA polymerase (فرمتاز)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10×PCR، MgCl₂ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار و ۵۰ نانوگرم از cDNA تهیه شده بود. سیکل های PCR شامل یک مرحله ی واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل سه مرحله ای شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته ی الگو در دمای ۶۰ درجه ی سانتی گراد به مدت یک دقیقه و تکثیر قطعه ی مورد نظر در ۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت یک دقیقه و در پایان یک مرحله ی تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

همسانه سازی قطعه ی حاصل از واکنش PCR: محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد (سیناژن) به کمک مارکر مولکولی مورد تأیید قرار گرفت هم چنین هضم آنزیمی محصول PCR با کمک آنزیم TaqI (سیناژن) نیز مؤید این

مطلب بود. با استفاده از دو آنزیم BamHI و EcoRI (فرمتناز) در یک واکنش هضم دوگانه با بافر Y/TANGO، محصول PCR مورد هضم قرارگرفت تا انتهای چسبناک در ۳۰ و ۵۰ ایجاد شود. همچنین ناقل انتخاب شده در این مطالعه وکتور PET32a (نواژن) بود که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفت سپس بر روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین (Low-melting point [LMP]) با غلظت یک درصد الکتروفورز و در نهایت به کمک کیت خالص سازی محصول PCR و وکتور (سیناژن) صورت گرفت. با کمک آنزیم T₄ DNA Ligase (فرمتناز) عمل اتصال قطعه با ناقل در دمای ۱۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۰ ساعت انجام شد و سپس پلاسمیدهای نو ترکیب با روش شوک حرارتی به سلول های مستعد E coli سویه BL21-DE3 (فرمتناز) تراریخت شدند و روی محیط (Luria Bertani [LB]) آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کلون های حاوی قطعه مورد نظر به کمک PCR و هضم آنزیمی و در نهایت با تعیین توالی تأیید گردید.

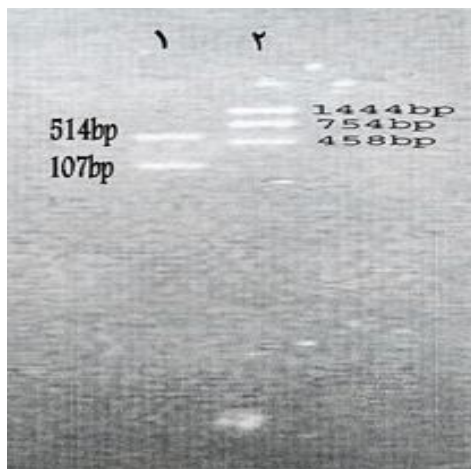
بیان پروتئین مورد نظر: از کشت شبانه ی کلون های جداسازی شده میزان ۵۰ میکرو لیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن به OD= ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، (Isopropyl B-D-thiogalactopyranoside [IPTG]) با غلظت یک میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند سپس نمونه های قبل و بعد از القا به کمک ژل (SDS- PAGE) (Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ۱۲ درصد مورد مطالعه قرار گرفتند. برای تأیید پروتئین مورد نظر از وسترن بلاتینگ و الیزا با آنتی بادی اختصاصی (سیگما) استفاده شد. **تخلیص پروتئین SNAP-25:** تخلیص SNAP-25 با استفاده

از قطعه ی His-tag که توسط وکتور در دو انتهای محصول ایجاد شده است، انجام شد. برای این منظور از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA (کیاژن) که پروتئین های حاوی His-tag با تمایل بالا به آن متصل می شوند، استفاده شد. پس از شکستن سلول ها به کمک سونیکاتور (۵ سیکل ۲۰ ثانیه ای) نمونه را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کردیم سپس محلول رویی را با بافر حاوی ۱۰ میلی مولار ایمیدازول و pH=۸ به حجم ۴ میلی لیتر رسانده و به آن یک میلی لیتر از رزین Ni-NTA اضافه کردیم و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در حالت به هم زدن به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه کردیم تا اتصال پروتئین مورد نظر با یون های نیکل صورت گیرد سپس مخلوط واکنش در ستون کروماتوگرافی قرار گرفت. ستون با غلظت های مختلف ایمیدازول مورد شست و شو قرار گرفت، در نهایت ستون با بافر حاوی ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول شسته شد تا پروتئین مورد نظر خارج شود و در پایان خروجی های ستون در مراحل مختلف به کمک ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی گردید.

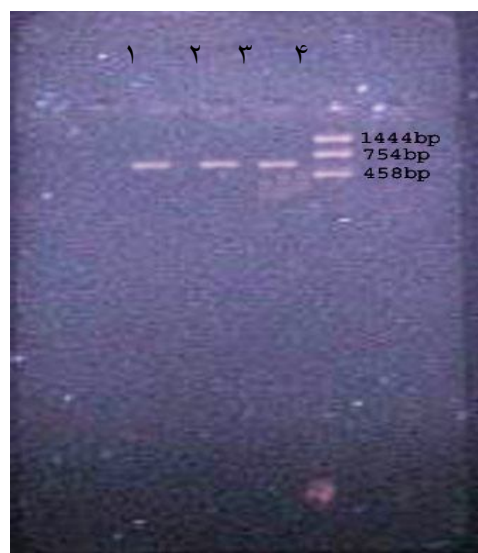
برش قطعه ی مربوط به وکتور از SNAP-25 به کمک آنزیم انتروکیناز: برای این منظور ابتدا خروجی ستون را که حاوی پروتئین مورد نظر ماست و به کمک SDS-PAGE آن را تأیید کرده ایم، بر علیه بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH=۷/۵ در دمای ۴ درجه سانتی گراد دیالیز کردیم، سپس بعد از یک شبانه روز دیالیز، نمونه را از کیسه ی دیالیز خارج کرده و با نسبت ۱/۲۰ به آن آنزیم انتروکیناز (سیگما) اضافه کردیم و به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در ادامه حاصل واکنش هضم آنزیمی با کمک ژل SDS-PAGE دوازده درصد مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها

پس از تهیه و تکثیر cDNA به روش RT-PCR، محصول PCR روی ژل آگارز مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌طور که در تصویر شماره‌ی یک مشاهده می‌شود، قطعه‌ی موردنظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما هم‌خوانی دارد (حدود ۶۲۱ جفت باز). مارکر استفاده شده در این آزمایش pUC18 می‌باشد که با آنزیم TaqI مورد هضم آنزیمی قرار گرفته است.



شکل ۲: تأیید محصول PCR به روش هضم آنزیمی
- ردیف ۱: محصول PCR هضم شده با آنزیم TaqI
- ردیف ۲: مارکر مولکولی pUC18 هضم شده با آنزیم TaqI: ۱۴۴۴، ۷۵۴، ۴۵۸ جفت باز



شکل ۱: بررسی محصول PCR بر روی ژل آگارز
- ردیف ۱، ۲: محصول PCR
- ردیف ۳: مارکر مولکولی pUC18 هضم شده با آنزیم TaqI: ۱۴۴۴، ۷۵۴، ۴۵۸ جفت باز

پس از الحاق قطعه‌ی موردنظر در ناقل و تراریخت آن به داخل سلول‌های میزبان، عمل استخراج پلاسمید از کلون‌های غریبال شده صورت گرفت و برای تأیید کلون‌ها ابتدا پلاسمیدهای نو ترکیب را با دو آنزیم BamHI و EcoRI که برای کلونینگ مورد استفاده قرار گرفته بودند، هضم کرده و مشاهده شد که قطعه‌ی مورد نظر از پلاسمید جدا شد. در شکل ۳ نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب روی ژل آگارز یک درصد مشاهده می‌شود. هم‌چنین برای تأیید بیشتر از پلاسمیدهای استخراج شده عمل PCR به کمک پرایمرهای طراحی شده نیز انجام پذیرفت. در مرحله‌ی بیان، کلون‌های مختلف را در دو مرحله‌ی قبل و بعد از القا جمع‌آوری کرده و پس از شکستن سلول‌ها، پروتئین‌های آن‌ها روی ژل SDS-PAGE دوازده درصد مورد مطالعه قرار گرفت که نتیجه در شکل ۴ مشاهده می‌شود. در نمونه‌های قبل از القا در ناحیه‌ی ۴۵ کیلو دالتون بانندی مشاهده نمی‌شود اما در نمونه‌های بعد از القا یک باند واضح در این ناحیه مشاهده می‌شود که وجود مارکر اندازه‌ی آن را تأیید می‌کند. بهترین

در ادامه برای تأیید بیشتر محصول PCR قبل از همسانه‌سازی از آنزیم TaqI استفاده شد. آنالیز کامپیوتری ترادف ژن در برنامه‌ی DNASIS نشان داد که هضم آنزیمی محصول PCR توسط آنزیم TaqI دو قطعه به طول ۱۰۷ و ۵۱۴ جفت باز به وجود خواهد آورد. نتیجه‌ی آزمایش با این امر کاملاً مطابقت داشت (شکل ۲).

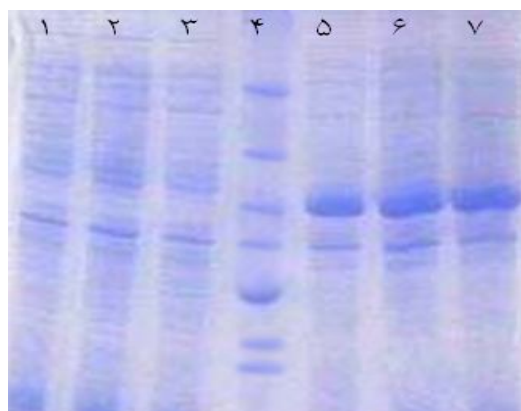
بیان پس از افزودن IPTG با غلظت یک میلی مولار به محیط کشت بعد از رسیدن به جذب نوری ۰/۶ و انکوبه کردن آن به مدت پنج ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه به دست آمد.



شکل ۳: هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب توسط دو آنزیم

EcoRI و *BamHI*

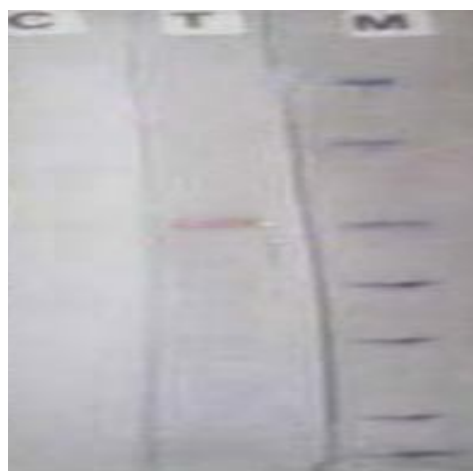
- ردیف ۱، ۲، ۳، ۴: وکتور *pET32a* حاوی ژن مورد نظر که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفته است
- ردیف ۵: مارکر مولکولی *pUC18* هضم شده با آنزیم *TaqI*: ۴۵۸، ۷۵۴، ۱۴۴۴ جفت باز



شکل ۴: ژل مربوط به *SDS-PAGE* نمونه‌های قبل و بعد از القا

- ردیف ۱، ۲، ۳: نمونه‌های قبل از القای سه کلون مختلف
- ردیف ۴: مارکر پروتئینی: ۱۱۶، ۶۶/۲، ۴۵، ۳۵، ۲۵، ۱۴/۴ و ۱۴/۴ کیلودالتون
- ردیف ۵، ۶، ۷: نمونه‌های بعد از القای سه کلون مختلف

برای تأیید محصول پروتئینی از روش وسترن بلائینگ نیز استفاده شد که در شکل ۵ نتیجه‌ی آن مشاهده می‌شود. در ستون تست که نمونه‌ی بعد از بیان را در آن الکتروفورز کرده بودیم، یک باند واضح نزدیک به ۵۰ کیلودالتون مشاهده شد. در این آزمایش در ستون قبل از القا این باند مشاهده نشد و چون برای ظهور باندها از آنتی‌بادی ضد SNAP-25 (سیگما) متصل شده به یک آنزیم استفاده شد، میانکنش بسیار اختصاصی آنتی‌بادی، حضور پروتئین مورد نظر را تأیید کرد.



شکل ۵: وسترن بلائینگ پروتئین نوترکیب SNAP-25 و قطعه‌ی

وکتور

- ردیف M: مارکر پروتئینی: ۱۱۶، ۶۶/۲، ۴۵، ۳۵، ۲۵، ۱۴/۴ و

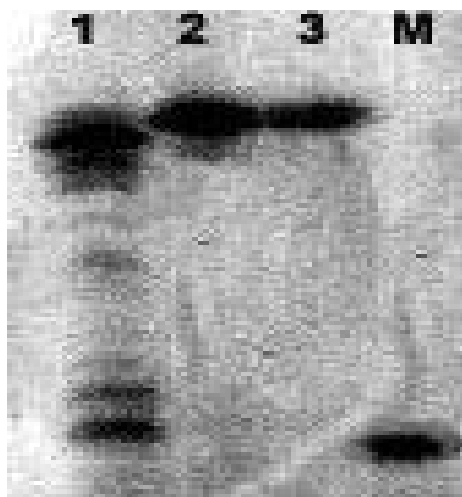
۱۴/۴ کیلو دالتون

- ردیف T: مربوط به نمونه‌ی بعد از القا

- ردیف C: مربوط به نمونه‌ی قبل از القا

در ادامه با استفاده از ستون میل ترکیبی Ni-NTA اقدام به تخلیص پروتئین نوترکیب SNAP-25 شد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده شد، خروجی‌های ستون شامل شست‌وشو با ایمیدازول ۵۰، ۱۰۰ و هم‌چنین ۲۵۰ میلی مولار در ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفته است. پروتئین نوترکیب SNAP-25 و قطعه‌ی ۲۰ کیلودالتونی ناقل متصل به آن در شست‌وشوی با ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول از

کیلودالتونی و ۲۵ کیلودالتونی در نمونه‌ی هضم شده به ترتیب نمایان‌گر فیوژن وکتور و پروتئین نوترکیب SNAP-25 می‌باشد. در نهایت میزان پروتئین به دست آمده ۴۰۰ میلی‌گرم بود.



شکل ۷: ژل اکریل آمید ۱۲ درصد مربوط به هضم آنزیمی محصول بیان با آنزیم انتروکیناز

- ردیف ۱: پروتئین SNAP-25 + فیوژن هضم شده با آنزیم انتروکیناز به مدت ۵ ساعت

- ردیف ۲: پروتئین SNAP-25 + فیوژن هضم شده با آنزیم انتروکیناز به مدت ۳ ساعت

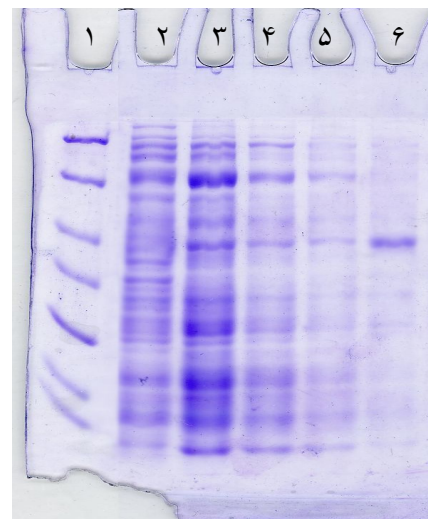
- ردیف ۳: پروتئین SNAP-25 + فیوژن

- ردیف M: مارکر پروتئینی Lysosyme با وزن مولکول ۱۳ کیلودالتون

بحث

سم‌های عصبی کلستریدیومی، اندوپیتیدازهای وابسته به روی (Zn^{+2}) می‌باشند که به صورت کاملاً انتخابی اجزای حفره‌ها یا غشاهای سیناپتیک را در مجموعه‌ی لنگراندازی مورد هدف قرار می‌دهند. تولید نوترکیب مولکول‌های هدف با توجه به عملکرد این سموم در سیناپس می‌تواند وسیله‌ی مناسبی در تشخیص آزمایشگاهی این سموم باشد. ما در این تحقیق برآن شدیم که با تولید پروتئین SNAP-25 به روش

ستون خارج شده است و نشان‌دهنده‌ی این است که نشان هیستدین در ابتدای این پروتئین با تمایل بالایی به ستون متصل می‌شود.



شکل ۶: ژل SDS-PAGE دوازده درصد مربوط به خروجی‌های ستون تخلیص

- ردیف ۱: مارکر پروتئینی: ۱۱۶، ۶۶/۲، ۴۵، ۳۵، ۲۵، ۱۷/۴ و ۱۴/۴ کیلودالتون

- ردیف ۲ و ۳: به ترتیب نمونه‌ی قبل و بعد از القا

- ردیف ۴: خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۵۰ میلی‌مولار

- ردیف ۵: خروجی ستون با ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار

- ردیف ۶: خروجی ستون با ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار

قابل ذکر است که میزان کل پروتئین به دست آمده از ۲۵۰ میلی‌لیتر کشت یک گرم و میزان پروتئین SNAP-25 خالص شده ۵۰۰ میلی‌گرم بوده است. برای جدا کردن قطعه‌ی ۲۰ کیلودالتونی وکتور از قطعه‌ی ۲۵ کیلودالتونی SNAP-25 از آنزیم انتروکیناز که دارای جایگاه شناسایی در انتهای بخش فیوژن و ابتدای پروتئین نوترکیب مورد نظر استفاده شد، پس از انجام هضم آنزیمی، نمونه‌های شاهد با نمونه‌ی هضم شده به کمک ژل SDS-PAGE دوازده درصد مورد بررسی قرار گرفتند که در شکل ۷ نتیجه را مشاهده می‌کنید، دو باند ۲۰

نوترکیب از آن به عنوان سوبسترای سم بوتولیسم در تشخیص آزمایشگاهی استفاده کنیم. تا مدت‌ها پیش تنها روش قابل اعتماد تشخیص سم بوتولینم، بررسی سمیت ایجاد شده در موش بود (۲۳). اگر چه این تست حساسیت بالایی دارد (۱۰ تا ۲۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) اما استفاده از تعداد زیاد حیوانات آزمایشگاهی، زمان‌بر بودن و هزینه‌ی بالای آن از محدودیت‌های این روش می‌باشد.

در سال‌های اخیر روش‌های جدیدی برای تشخیص سموم بوتولیسم ابداع شده‌است که در عین حساسیت کافی محدودیت‌های فوق را نیز تا اندازه‌ای مرتفع نموده‌اند. روش‌های RP-HPLC، HPLC-MS و بررسی فعالیت اندوپیتیدازی از جمله این روش‌ها می‌باشند. استفاده از پپتیدهای مصنوعی (سنتتیک) که از روی قسمتی از سوبستراهای طبیعی (SNAP-25 و VAMP-2) ساخته می‌شوند اساس تشخیص محققین در همه‌ی این روش‌ها می‌باشد (۲۲). در تحقیقی که هالیس و همکاران انجام داده‌اند با استفاده از همین روش و به کمک پپتید سنتزی SNAP-25 و VAMP-2 توانسته‌اند توکسین تیپ A و B بوتولیسم را شناسایی کنند (۲۵). آن‌ها در این روش قطعه سنتزی از آمینواسید ۱۳۷ تا آمینواسید ۲۰۶ SNAP-25 را جهت بررسی برش آنزیمی استفاده کردند. پس از برش پلی‌پپتید، قطعه‌ی ۴۷ آمینواسیدی باقی‌مانده بر روی فاز جامد به وسیله‌ی سوبسترای آنزیمی مورد شناسایی قرار می‌گیرد. هم‌چنین با استفاده از قطعه‌ی ۳۶ آمینواسیدی سنتتیک پروتئین VAMP-2 فعالیت اندوپیتیدازی سم تیپ B را مورد مطالعه قرار دادند. پس از برش اندوپیتیدازی پلی‌پپتید، قطعه‌ی ۱۹ آمینواسیدی باقی‌مانده بر روی فاز ثابت تأیید گردید. در این تست بین این سم و دیگر سم‌ها واکنش متقاطع دیده نشده و حساسیت آن برای BONT/A تا حد ۱/۳ نانوگرم در میلی‌لیتر و برای BONT/B بین ۰/۶ تا ۵/۴ نانوگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. از آنجایی که تولید مصنوعی سوبستراهای فوق در حال حاضر

در ایران مقدور نمی‌باشد و از طرفی تهیه‌ی آن‌ها از خارج از کشور مستلزم صرف هزینه‌ی بسیار بالاست لذا هدف از تحقیق حاضر تولید نوترکیب یکی از سوبستراهای اساسی سموم بوتولیسم (SNAP-25) می‌بود تا در ادامه‌ی کار بتوان از آن به عنوان وسیله‌ای جهت شناسایی سریع و دقیق سروتیپ‌های E و A استفاده کرد. در تحقیقی که اکونگ و همکاران انجام داده‌اند با استفاده از همین روش و به کمک پپتید نوترکیب SNAP-25 توانسته‌اند توکسین تیپ A بوتولیسم را تا حد LD₅₀ ۰/۸ شناسایی کنند (۱). در تحقیق حاضر پروتئین SNAP-25 به صورت فیوژن با قطعه‌ی ۲۰ کیلودالتونی از وکتور pET32a در سیستم پروکاریوتی E coli تولید شد. استفاده از قطعه‌ی فیوژن باعث تسهیل تخلیص پروتئین گردید. استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA، نیز میزان بالای بیان پروتئین باعث شد که پروتئین خارج شده از ستون از خلوص و غلظت بالایی برخوردار باشد. با مطالعات انجام شده مشخص شد که قطعه‌ی فیوژن در برش آنزیمی توکسین بوتولیسم تأثیری منفی ندارد. میزان پروتئین تخلیص شده بعد از برش با آنزیم اینتروکیناز نیز بالا بود و این تجربه نشان داد که استفاده از سیستم وکتوری pET برای تولید نوترکیب پروتئین SNAP-25 برای بررسی فعالیت اندوپیتیدازی سم بوتولیسم در شرایط داخل آزمایشگاهی مناسب است. در تحقیقی مشابه اکونگ و همکاران جهت تولید پروتئین نوترکیب SNAP-25 از وکتور pMAL-C2 استفاده نمودند. این وکتور نیز دارای فیوژن پروتئین (Maltose Binding Protein [MBP]) است که جهت تخلیص از آن استفاده می‌شود. آنزیم مورد استفاده جهت جداسازی فیوژن پروتئین فاکتور Xa بود. از معایب این وکتور بیان هم‌زمان پروتئین MBP بود که مرحله‌ی تخلیص پروتئین نوترکیب را تا حدودی دچار مشکل می‌ساخت. میزان پروتئین تولید شده و هم‌چنین غلظت پروتئین استحصال شده از ستون کروماتوگرافی نیز در تحقیق آن‌ها مناسب گزارش

تقدیر و تشکر

مقاله‌ی حاضر بخشی از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد و مصوب دانشگاه امام حسین (ع) می‌باشد که به این وسیله از آن دانشگاه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

شده است (۱). بررسی فعالیت اندوپپتیدازی برای شناسایی سموم بوتولیسم و کاربرد آن در آزمایشگاه تشخیصی از دیگر کارهایی است که می‌بایستی بر روی SNAP-25 نو ترکیب تولید شده صورت گیرد.

منابع

- 1- Ekong TN, Feavers IM, Sesardic D. Recombinant SNAP-25 is an effective substrate to clostridium botulinum type A toxin endopeptidase activity in vitro. **Microbiology**. 1997; 143: 3337-47.
- 2- Montecucco C, Molgo J. Botulinal neurotoxins: revival of an old killer. **Curr Opin Pharmacol**. 2005; 5: 274-9.
- 3- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. **Physiol Rev**. 2000; 80: 717-66.
- 4- 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: 95-102.
- 5- Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K, Verastegui C, Schivao G. The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. **Trends Microbiol**. 2003; 11: 431-7.
- 6- Schiavo G, Montecucco C. **Clostridial neurotoxins**. In: Aktories K, editor. **Bacterial toxins: tools in cell biology and pharmacology**. 2nd ed. Weinheim. Germany: Chapman and Hall; 1997, 169-186.
- 7- Sharma S, Zhou Y, Singh BR. Cloning, expression, and purification of C-terminal quarter of the heavy chain of botulinum neurotoxin type A. **Protein Expr Purif**. 2006; 45: 288-95.
- 8- Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins : Mechanism of action and therapeutic uses. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 1999; 354: 259-68.
- 9- Zhou JY, Wang ZF, Ren XM, Tang MZ , Shi YL. Antagonism of botulinum toxin type A-induced cleavage of SNAP-25 in rat cerebral synaptosome by toosendanin. **FEBS Lett**. 2003; 555: 375-9.
- 10- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. **Molecular biology of the cell**. In: Gibbs S, et al, editors .4th ed. New York: Garland Science press; 2002, 720-726.
- 11- Hodel A. Molecules in Focus SNAP-25. **J Biochem & Cell Biol**. 1998; 30: 1069-73.
- 12-Sorensen JB. SNARE complexes prepare for membrane fusion. **Trends Neurosci**. 2005; 28: 453-455.
- 13- Sorensen JB, Matti U, Wei SH, et al. The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002; 99: 1627-32.

- 14- Humeau Y, Doussau F, Grantb NJ, Poulaina B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. **Biochimie**. 2000; 82: 427–46.
- 15- Wilson MC, Mehta PP, Hess EJ. SNAP-25, enSNAREd in neurotransmission and regulation and of behaviour. **Biochem Soc Trans**. 1996; 24: 670-676.
- 16- Hanson PI, Heuser JE, Jahn R. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. **Curr Opin Neurobiol**. 1997; 7: 310-5.
- 17- Breidenbach MA, Brunger AT. Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A. **Nature**. 2004; 432: 925–9.
- 18- Chen S, Barbieri1 JT. Unique substrate recognition by botulinum neurotoxins serotypes A and E. **J biol chem**. 2006; 281: 10906 –11.
- 19- Ferreira J, Maslanka S, Johnson E, Goodnough M. Detection of botulinal neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. **J AOAC Int**. 2003; 86: 314–31.
- 20- Ferreira JL, Eliasberg SJ, Edmonds P, Harrison MA. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinal toxin in food. **J Food Prot**. 2004; 67: 203–6.
- 21- Barr JR, Moura H, Boyer AE, et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. **Emerg Infect Dis**. 2005; 11: 1578-83.
- 22- Shone C, Wilton-Smith P, Appleton N, et al. Monoclonal antibody-based immunoassay for type A Clostridium botulinum toxin is comparable to the mouse bioassay. **Appl Environ Microbiol**. 1985; 50: 63–7.
- 23-Binz T, Blasi J, Yamasaki S, et al. Proteolysis of SNAP-25 by types e and A botulinal neurotoxins. **J Biol Chem**. 1994; 269: 1617-20.
- 24- Hallis B, James BA, Shone CC. Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activities. **J Clin Microbiol**. 1996; 34: 1934–8.