مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره شانزدهم/ تابستان ۱۳۹۰/ ۴۴-۳۶

# بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب انتهای کربوکسیل نوروتوکسین بوتولینوم A در باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان کاندیدای تولید واکسن بوتولیسم

**سید صفا علی فاطمی[۱]، خیرالله یاری[۲]، محمود تولائی[۳]، دانیال کهریزی[۴]**

۱- استادیار، گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۲- مربی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۴۲۷۶۴۷۱-۰۸۳۱

khirollah.yari@yahoo.com

۳- دانشیار، گروه زیست فناوری، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

## چکیده

***زمینه و هدف:*** بوتولیسم بیماری کشنده‌ای است که توسط نوروتوکسین یکی از هفت نوع *کلستریدیوم بوتولینوم* ایجاد می‌شود. بخش کربوکسیل زنجیره سنگین نوروتوکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ A(BoNT/A-Hc)، از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی برخوردار است که امروزه برای تولید واکسن نوترکیب علیه بوتولیسم به کار می‌رود. هدف از این پژوهش بیان و تخلیص فرم محلول این بخش از نوروتوکسین در باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب می‌باشد.

***روش بررسی:*** در این تحقیق وکتور *pET28a* حاوی ژن BoNT/A-Hc به باکتری *اشریشیاکلی نوترکیب* انتقال داده شد. در ادامه، بهترین کلنی از سویه نوترکیب بر اساس سه شاخصه مهم میزان رشد باکتری، بیان پروتئین و پایداری پلاسمید انتخاب شد. سپس بیان محصول در محیط کشت LB و M9 اصلاح شده بررسی، و پروتئین مورد نظر با ستون کروماتوگرافی رزینی تخلیص گردید.

***یافته‌ها:*** در شرایط بهینه شده کشت باکتری در مقیاس فلاسک، ۵۲ میلی‌گرم پروتئین محلول BoNT/A-Hc به ازای یک لیتر محیط کشت حاصل شد.

***نتیجه‌گیری:*** براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که انتخاب سویه مناسب براساس شاخصه‌های مهم رشد باکتری، بیان پروتئین نوترکیب و پایداری پلاسمید در افزایش بازدهی تولید پروتئین نوترکیب مؤثر است.

***کلید واژه‌ها:*** بیان پروتئین، *اشریشیاکلی*، *کلستریدیوم بوتولینوم*، بوتولیسم

وصول مقاله: ۸۹/۱۱/۲۶ اصلاحیه نهایی: ۹۰/۲/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۰/۲/۲۸

## مقدمه

باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم*[1]، یک نوروتوکسین قوی تولید می‌کند که قادر است با راه یافتن توکسین از طریق سطوح مخاطی نظیر روده، بافت ریه و یا محل زخم به گردش خون وارد شده و با ممانعت از آزاد شدن استیل کولین در پایانه‌های عصبی، سبب ایجاد فلج عضلانی پیش رونده شود که در موارد حاد، غالباً با مرگ همراه است (۱). انسان در اثر مصرف آب و مواد غذایی آلوده به سم، به بیماری بوتولیسم مبتلا می‌گردد. این بیماری بطور طبیعی به شکل‌های مسمومیت غذایی، بوتولیسم زخم و بوتولیسم روده‌ای تظاهر می‌نماید. احتمال انتقال فرم استنشاقی بیماری، متعاقب کاربردهای بیوتروریستی نیز وجود دارد. بر اساس ویژگیهای

1. Clostridium botulinum

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-09 ]

آنتی‌ژنیک هفت نوع مختلف از باکتری شناسایی شده که با حروف A تا G نام گذاری شده‌اند. نوع‌های A، B و E عمدتاً در انسان بیماریزا بوده و نوع‌های C و D غالباً مسؤول بیماری در حیوان می‌باشند (۲).

سابقه تلاش برای تولید واکسن در برابر این بیماری به دهه ۱۹٤۰ باز می‌گردد اما در حال حاضر تنها واکسن موجود و متداول در برخی کشورهای پیشرفته، یک واکسن توکسوئیدی پنج گانه بر علیه نوع‌هایA تا E می‌باشد. در روش تهیه واکسن‌های توکسوئیدی، با غیر فعال نمودن مایع فوقانی محصول کشت باکتری بوسیله فرمالدئید، توکسین به توکسوئید تبدیل می‌شود. مشکلات موجود در تهیه این واکسن نظیر هزینه بالای تولید، لزوم استفاده از چندین سروتیپ مختلف (که در بسیاری از آنها میزان تولید سم بسیار ناچیز است)، خطرات ناشی از کار با سویه‌های خطرناک فعال و در نهایت ورود پروتئین‌های ناخواسته به بدن در زمان ایمن‌سازی، موجب گردیده تا نسل جدید واکسن‌ها با استفاده از تکنیک‌ها و روشهای ژنتیک مولکولی مورد توجه قرار گیرد.

با توجه به گزارشهای علمی محققین از نقاط مختلف جهان، در حال حاضر عمده تلاشهای دانشمندانی که در زمینه بوتولیسم مشغول هستند تهیه واکسن‌های نوترکیب چند ظرفیتی[1] بر علیه سم می‌باشد (۳). هر چند واکسن‌های تک ظرفیتی نوترکیب به بازار عرضه شده ولی از کارایی بالایی برخوردار نمی‌باشند. در این راستا بخش اتصال دهنده سم به عنوان کاندید، نظر بیشتر محققین را به خود جلب کرده است. اکثر مقالاتی که طی سالهای اخیر چاپ شده و می‌شود مربوط به کلون و بیان بخش اتصال دهنده نوع‌های A، B و E می‌باشد تا ایمنی‌زایی آن را در مراحل بعدی مورد مطالعه قرار دهند و در این راستا پیشرفتهای قابل توجهی نیز کسب نموده‌اند (۶-۴). مطالعات اخیر نشان داده است پروتئین ۵۰ کیلو دالتونی واقع در انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم که وظیفه اتصال توکسین به غشای سلولهای عصبی را بر عهده دارد از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی برخوردار می‌باشد. بیشتر تحقیقات در زمینه تولید واکسن نوترکیب علیه بوتولیسم روی این بخش از توکسین متمرکز شده است تا بتوان با تولید آنتی‌بادی بر علیه آن مانع از اتصال اولیه توکسین به گیرنده‌های سطح سلولی شده و بدین طریق از ورود سم به داخل سلول جلوگیری کرد (۸ و۷). به همین دلیل بیان ژن این قطعه از توکسین در سیستم‌های مختلف پروکاریوتی و یوکاریوتی مورد توجه می‌باشد (۱۱-۹). براین اساس این پژوهش به منظور بیان و تخلیص بخش کربوکسیلیک زنجیره سنگین نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم در باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان کاندید تولید واکسن نوترکیب برضد بوتولیسم انجام گرفت.

## روش بررسی

### میکروارگانیسم و شرایط رشد

در این مطالعه تجربی از سویه *E. Coli* BL21 (DE3) به عنوان میزبان و پلاسمید PET28a به عنوان حامل ژن کدکننده مورد استفاده قرار گرفت. در ساختار این پلاسمید ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامیسین به عنوان نشانگر انتخابی وجود دارد. همچنین پلاسمید حاوی پروموتر T7، اپراتور lac و ژن تنظیمی lacI است، که القای آن توسط IPTG انجام می‌پذیرد. این پلاسمید از شرکت سیناژن تهیه شده بود. از

1. Polyvalent



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-09 ]

غلظت‌های مختلف IPTG به عنوان القا کننده، و غلظت نهایی ۳۰ میکروگرم در لیتر کانامایسین، آنتی بادی‌های اولیه ضد هیستیدین و آنتی بادی ثانویه کنژوگه خرگوشی برای تست وسترن بلات استفاده شد.

**رشد باکتری *اشریشیاکلی* و بیان پروتئین نوترکیب**

در ابتدا به منظور بررسی رشد و بیان بخش کربوکسیل زنجیره سنگین نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم نوع A، پلاسمید pET28a حاوی ژن کدکننده این قسمت در میزبان *E. Coli (BL21)* انتقال داده شد. سپس از بین کلنی‌های رشد کرده ۱۰ مورد انتخاب و از نظر میزان رشد و بیان پروتئین مقایسه شدند. برای رشد باکتری از انکوباتور شیکردار با چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه و از محیط کشت LB (جدول ۱) و M9 اصلاح شده (جدول ۲) در دمای کشت ۳۷ درجه استفاده شد. پس از رسیدن OD به ۱/۲، کشت ها با غلظت ۰/۷ میلی مولار IPTG القا شدند و پس از ۱۵ ساعت کشت متوقف شد. سپس با استفاده از سانتریفیوژ، سلولها جدا شده و نمونه‌ها برای SDS-PAGE آماده سازی شدند.

**بررسی پایداری پلاسمید(pET 28a)**

برای بررسی پایداری پلاسمید از روش رپلیکا (Replica) استفاده شد. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از مایه تلقیح به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB فاقد آنتی‌بیوتیک افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گرماگذاری گردید (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه). مجدداً از کشت حاصله به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به محیط LB فاقد آنتی‌بیوتیک تلقیح و کشت جدید نیز به مدت ۲۴ ساعت با همان شرایط قبل گرماگذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمادهی آن، مجدداً تجدید کشت گردید و این عملیات تا ۶ روز متوالی تجدید کشت ۲۴ ساعته، پی در پی انجام شد. پس از هر کشت ۲۴ ساعته، نمونه‌های یک میلیون بار رقیق شده با سرم فیزیولوژیک (۸/۵ گرم نمک طعام در آب مقطر دو بار تقطیر) تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده در شرایط کاملاً سترون روی بشقابک‌های حاوی محیط LB آگار فاقد آنتی بیوتیک پخش و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. نسبت کل کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط حاوی کانامایسین، به تعداد کل کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط فاقد کانامایسین درصد پایداری پلاسمید است. در طی این ۶ روز پایداری بالاتر از ۹۰ درصد قابل قبول است.

**تهیه بانک سلولی ونگهداری سویه**

به منظور تهیه ذخیره (Stock) باکتریایی بهترین کلنی انتخاب شده به صورت حصیری کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. سپس باکتری‌ها از روی محیط کشت جامد جمع‌آوری و در محیط حاوی گلیسرول (۳۰٪) و پپتون (۱٪) سوسپانسیون شد. سپس در مقادیر ۵۰ تا۱۰۰ میکرولیتری به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری سترون تقسیم شدند. پس از درج مشخصات حامل، سلول میزبان و تاریخ، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و برای هر فرآیند از یکی از آنها استفاده شد.

**وسترن بلات و تأیید پروتئین نوترکیب**

به منظورتأیید صحت ژن ابراز شده از روش وسترن بلات استفاده شد. پروتئین هدف با انجام SDS-PAGE و انتقال ژل آن به روی کاغذ نیتروسلولز، در مجاورت با آنتی بادی اولیه (ضد پروتئین هدف) و ثانویه مورد بررسی قرار گرفت.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-09 ]

**تخلیص پروتئین**

به منظور بیان و خالص سازی پروتئین هدف، مقداری از مایه تلقیح تازه تهیه شده به فلاسکهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB و یا محیط M9 اصلاح و بهینه شده سترون و حاوی آنتی‌بیوتیک به غلظت ۳۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت افزوده شده، بطوری که دانسیته نوری اولیه آن ۰/۱ شد. pH اولیه محیط کشت‌ها با سود ۲ نرمال در حدود ۷ تنظیم شدند. برای تنظیم pH از الکترود سترون و دستگاه pH متر استفاده شد. بعد از تلقیح، کشت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. پس از رسیدن OD۶۰۰ کشت به ۱/۲، IPTG با غلظت نهایی ۰/۷ میلی مولار در شرایط سترون اضافه شد. پس از ۱۵ ساعت کشت خاتمه یافته و دانسیته نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. سپس با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ در دقیقه سلولها از مایع رویی جدا سازی شدند. به رسوب سلولها محلول لیزکننده (50 mM sodium phosphate,300 mM NaCl and 5 mM imidazole, pH 7.6.) به مقدار ۵ برابر وزن سلول اضافه شد و سوسپانیون سلولی حاصل ۴ بار و هر بار به مدت زمان ۳۰ ثانیه با توان ۸۰٪ سونیکاتور شکسته شد. بعد از هر ۳۰ ثانیه به مدت ۱ دقیقه در آب یخ نگه داشته شد. بعد از سونیکاسیون، مجدداً با دور ۱۴۰۰۰ و به مدت نیم ساعت سانتریفیوژ شد و مایع رویی از رسوب جدا گردید. مایع رویی به روی ستون کروماتوگرافی رزینی(NI-NTA) منتقل شد و پس از دو مرحله شستن با بافر شستشو دهنده (50mM Na-phosphate 300mM Nacl , Immidazol 5mM) با استفاده از حدود ۳ میلی‌لیتر بافر جداکننده (500mM Na-phosphate ,300mM Nacl , 150mM Immidazol) پروتئین مورد نظر جدا گردید. خروجی ستون بطور جداگانه در ویالهای مختلف جمع‌آوری شد. پس از آماده سازی، نمونه‌ها با استفاده از SDS-PAGE آنالیز شدند. البته رسوب نیز برای وجود اجسام پروتئینی نامحلول[1] مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس برای حل کردن پروتئین‌ها از اوره ۸ مولار استفاده و در مرحله بعد با ستون کروماتوگرافی و بر اساس شیب pH، پروتئین نوترکیب تخلیص شد.

**تعیین غلظت پروتئین نوترکیب**

در این روش از دو پارامتر استفاده شد که یکی میزان غلظت کل پروتئین محلول موجود در نمونه و دیگری درصد باند پروتئین مورد نظر بود. میزان پروتئین محلول کل، توسط روش پروتئین سنجی برادفورد بدست آمد. برای تعیین درصد باند پروتئین نوترکیب از روش دانسیتومتری ژلهای الکتروفورز توسط دستگاه Pharmacia استفاده شد. در این روش سطح زیر منحنی باند مورد نظر نسبت به سطوح زیر منحنی کل پروتئین‌های محلول موجود در نمونه بدست آمد. از ضرب غلظت کل پروتئین و درصد باند مورد نظر میزان میلی‌گرم پروتئین نوترکیب هدف محلول در فضای سیتوپلاسمی محاسبه شد.

## یافته‌ها

نتایج حاصله نشان داد که ۱۰ کلنی انتخاب شده از نظر رشد باهم تفاوت چشمگیری ندارند بطوری که میکروارگانیسم بعد از طی ۴ ساعت فاز تأخیری، وارد فاز لگاریتمی شده و پس از ۸ ساعت به حداکثر رشد خود رسیده و سپس وارد فاز سکون می‌شود. همچنین اندازه‌گیری وزن خشک سلولی مشخص کرد که هر

1. Inclusion Body



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-09 ]

واحد دانسیته نوری[1] معادل تقریبی ۰/۵ گرم در لیتر وزن خشک سلولی[2] است، یعنی میکروارگانیسم در حداکثر رشد خود به حدود ۱/۸ گرم در لیتر وزن خشک سلولی می‌رسد (نمودار ۱).

دانسیتومتری ژل SDS-PAGE، نشان داد که باند پروتئین BoNT/A-HC در کلنی شماره ۵ ( شکل۲) نسبت به بقیه قویتر و با مقدار ۱۷ درصد از مقدار پروتئین کل محلول سیتوپلاسمی بیشترین میزان درصد بیان را دارد.

در حالی که این میزان بیان پروتئین نوترکیب در کلنی‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰، به ترتیب مقادیر ۱۶، ۱۶، ۱۴، ۱۶ ،۱۵، ۱۵، ۱۰، ۱۴ و ۱۵ درصد از پروتئین کل محلول سیتوپلاسمی است (شکل ۲).

در نتیجه کلنی بهتر یعنی کلنی شماره ۵ جهت تهیه ذخیره باکتریایی آن برای دمای ۷۰ – درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. نتایج بررسی پایداری پلاسمید در طی ۶ روز متوالی نشان داد که به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۹۸، ۹۷، ۹۴ درصد از پلاسمیدها در طول شش روز پایدار بودند (نمودار ۳).

نتایج الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید مربوط به خالص سازی پروتئین نوترکیب-BoNT/A HCبا ستون کروماتوگرافی رزینی (NI-NTA) در شکل ۵ نشان داده شده است، همان طور که در این شکل مشخص است بیشترین میزان تخلیص با ایمیدازول ۱۵۰ میلی مولار می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از آنالیز تشکیل انکلوژن بادی نشان داد که پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc در رسوب وجود ندارد و محلول در مایع رویی است.

## بحث

سابقه تلاش برای تولید واکسن در برابر بیماری بوتولیسم به دهه ۱۹۴۰ باز می گردد اما در حال حاضر تنها واکسن موجود و متداول در برخی کشورهای پیشرفته، یک واکسن توکسوئیدی پنج‌گانه بر علیه نوع‌های A تا E می‌باشد (۸ و۷). مشکلات موجود در تهیه این واکسن نظیر هزینه بالای تولید، لزوم استفاده از چندین سروتیپ مختلف، خطرات ناشی از کار با سویه‌های خطرناک فعال و در نهایت ورود پروتئین‌های ناخواسته به بدن در زمان ایمن‌سازی، موجب گردیده تا نسل جدید واکسن‌ها با استفاده از تکنیک‌ها و روشهای ژنتیک مولکولی مورد توجه قرار گیرد (۳ و۲). مطالعات اخیر نشان داده است پروتئین ۵۰ کیلو دالتونی واقع در انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم دارای شاخص‌های آنتی‌ژنیک است و از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی برخوردار می‌باشد و ایمنی‌زایی آن در حیوانات آزمایشگاهی نیز تأیید شده است (۱۵ و۲ و۱). ولی یکی از مشکلات برای تولید واکسن نوترکیب علیه این قطعه، میزان کم بیان پروتئین نوترکیب در سیستم‌های بیانی است زیرا ژن این قطعه غنی از نوکلئوتیدهای AT است (۱۳ و۵ و۴). به طوری که Yu و همکاران موفق شدند مقدار ۳۰ میلی‌گرم از این پروتئین به ازای یک لیتر محیط کشت از همین پروتئین نوترکیب تولید کنند (۱٤).

1. Optical Density (OD)
2. Cell Dry Weight (CDW)



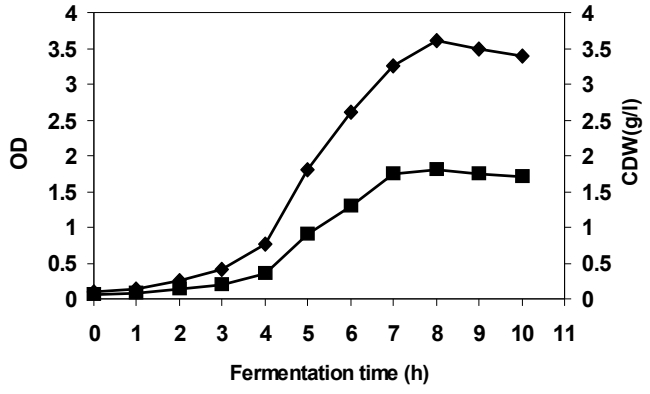
[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-09 ]

**جدول ۱: ترکیب محیط کشت پیچیده LB مایع و جامد برای رشد باکتری *اشریشیاکلی***

| ماده | محیط LB مایع | محیط LB جامد |
|---|---|---|
| ترپیتون (گرم در لیتر) | ۱۰ | ۱۰ |
| عصاره مخمر(گرم در لیتر) | ۵ | ۵ |
| نمک طعام (گرم در لیتر) | ۱۰ | ۱۰ |
| آگار (گرم در لیتر) | _ | ۱۵ |

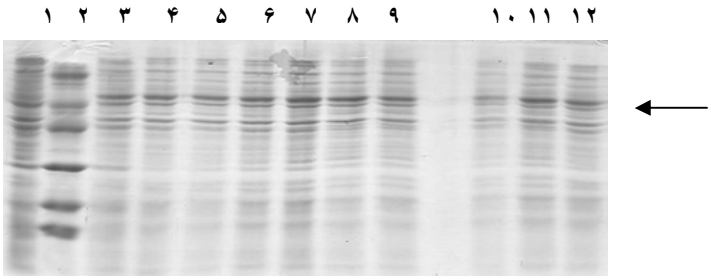
**جدول۲: محیط کشت M9 اصلاح شده**

| ماده شیمیایی | غلظت |
|---|---|
| گلوکز | ۱۰ (گرم در لیتر) |
| $MgSO_4,7\ H_2O$ | ۲ (گرم در لیتر) |
| $(NH4)_2SO_4$ | ۱/۵ (گرم در لیتر) |
| $K_2HPO_4$ | ۱۵ (گرم در لیتر) |
| $KH_2PO_4$ | ۷/۵ (گرم در لیتر) |
| اسید سیتریک | ۲ (گرم در لیتر) |
| Trace element solution contained(g/l in 1M HCL): $FeSo_4.7H_2O$, 2.8; $MnCl_2.4H_2O$, 2; $CoSO_4.7H2O$, 2.8; $CaCl_2.2H_2O$, 1.5; $CuCl_2.2H_2O$, 0.2; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.3 g | ۱ (میلی مولار) |

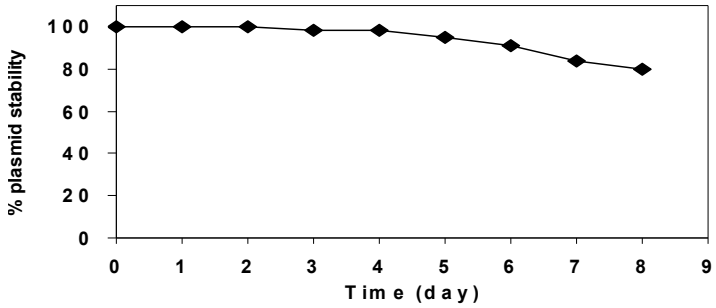



**نمودار ۱: رشد سویه در محیط LB مایع براساس تغییرات دانسیته نوری محیط کشت(♦) و وزن خشک سلولی(■).**

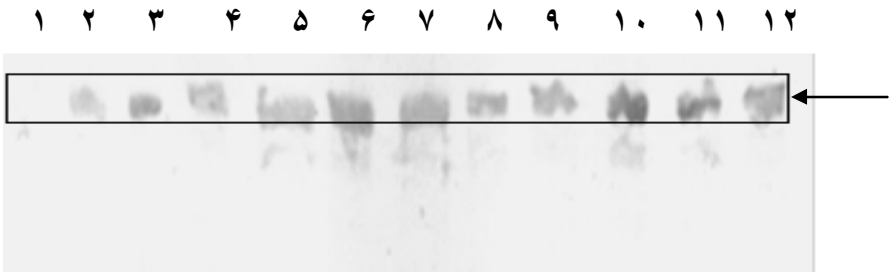
[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-09 ]




**شکل ۲: تصویر ژل SDS-PAGE مربوط به بررسی بیان BoNT/A-Hc در سویه *اشریشیاکلی* نوترکیب. ( ستون اول نمونه قبل از القا، ستون دوم مارکر وزنی پروتئین و ستون۳ تا ۱۲ به ترتیب مربوط به بیان پروتئین در ۱۰ کلنی بررسی شده از نظر بیان).**




**شکل ۳: بررسی درصد پایداری پلاسمید در باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب طی ۸ روز متوالی**

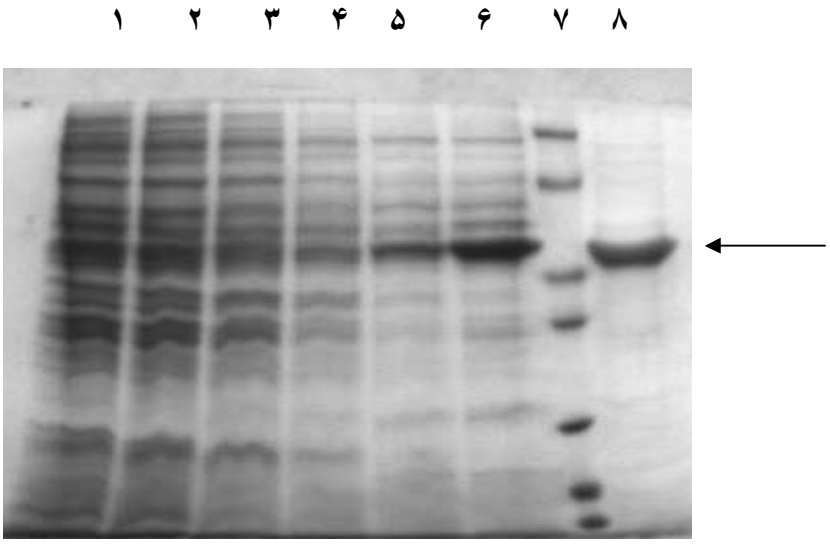



**شکل ۴: تصویر وسترن بلات مربوط به بیان پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc در ۱۰ کلنی بررسی شده که با استفاده از آنتی‌بادی ضد هیستیدین تأیید شده است. (ستون۱ نمونه قبل القا، ستون دوم نمونه پروتئین استاندارد و ستون ۳ تا ۱۲ به ترتیب تأیید بیان در کلنی‌های ۱ تا ۱۰).**

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، یافته‌های حاصل از روش وسترن بلاتینگ صحت بیان پروتئین نوترکیب BoNT/A-HC را تأیید کرد، به طوری که در ستون اول که مربوط به نمونه قبل از القا است هیچ باندی مشاهده نمی‌شود ولی در سایر ستون‌ها بیان پروتئین BoNT/A-Hc مورد نظر مورد تأیید می‌گردد.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-09 ]




**شکل ۵: الکتروفورز نمونه‌های محلول رویی حاصل از فرایند تخلیص با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی رزینی. (ستون۱ تا ۴ نمونه خارج شده ازستون بعد از شستن با بافر شستشو دهنده و ستون۵، ۶ و ۸ به ترتیب نمونه خروجی با بافرشویش، ۵۰، ۱۰۰ و۱۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول)**

نتایج این تحقیق نشان داد که انتخاب سویه مناسب بر اساس شاخص‌های مهم رشد باکتری، میزان بیان پروتئین نوترکیب و پایداری پلاسمید در افزایش تولید پروتئین نوترکیب هدف مؤثر است. این یافته در تأیید نتایج فاطمی و همکاران (۱۲) نشان داد که اگرچه کلنی‌های انتخاب شده از نظر شاخص رشد باکتری باهم تفاوت چشمگیری ندارند ولی بررسی میزان بیان پروتئین نوترکیب و پایداری پلاسمید بیانی در بین کلنی‌های انتخاب شده متفاوت است و بهینه سازی این شاخص‌ها تأثیر قابل توجهی بر میزان بازدهی نهایی تولید پروتئین نوترکیب داشت.

نتایج خالص سازی مؤید خلوص بالای پروتئین هدف با استفاده از ایمیدازول ۱۵۰ میلی مولار در ستون Ni-NTA رزینی حاوی نیکل بود. همچنین نتایج حاصل از فرآیند تخلیص نشان داد پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc به صورت فرم محلول، بیان می‌شود و تشکیل اجسام نامحلول یا انکلوژن بادی ظاهر نشد.

در حقیقت بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب بخش کربوکسیل نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم (mg/l ۵۲) به صورت محلول در فضای سیتوپلاسمی باکتری *اشریشیاکلی* با محیط کشت ساده و با ترکیبات مشخص (محیط کشت M9 اصلاح شده) در این تحقیق برای اولین بار در دنیا انجام شده است.

## نتیجه‌گیری

در این تحقیق سویه مناسب از باکتری نوترکیب *اشریشیاکلی* براساس سه شاخصه مهم رشد باکتری، بیان و پایداری پلاسمید تهیه گردید. همچنین بیان فرم محلول BoNT/A-Hc در محیط کشت ساده با ترکیبات مشخص بهینه سازی شد. نتایج نشان داد که در شرایط بهینه، مقدار ۵۲ میلی‌گرم پروتئین محلول BoNT/A-Hc به ازای یک لیتر محیط کشت حاصل گردید. با توجه به بهینه سازی شرایط تولید این پروتئین نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی، پیشنهاد می‌گردد این پروتئین نوترکیب در مقیاس نیمه صنعتی با استفاده از فناوری



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-09 ]

کشت‌های با تراکم سلولی بالا در محیط کشت ساده و با ترکیبات مشخص تولید شود (در حال انجام توسط نویسندگان این مقاله) تا بتوان گام بزرگی در جهت تولید واکسن نوترکیب علیه بوتولیسم در کشور برداشت. البته برای بررسی ایمنی‌زایی این پروتئین و همچنین تولید واکسن، پژوهش‌های بیشتری لازم است.

**تشکر و قدردانی**

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از راهنمایی‌های علمی دکتر شهرام نظریان و دکتر جعفر امانی و همچنین مساعدتهای همکاران محترم گروه صنایع تخمیری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، بویژه جناب آقای مهندس حسن حبیب قمی، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

## References

1. Tavallaie M, Alexander Ch, Daniel G, Yannik P, Maria M, Maryse G, Stephanie R, Michel R, Jean M. Interaction between two sub domain of the c-terminal part of the BON/A is essential for generation of protective antibodies. FEBS Lett 2004; 572: 299-306.
2. Li L, and Bal RS. High-level expression, purification and characterization of recombinant Type A Botulinum neurotoxin light chain. Protein Expres Purif 1999; 17: 399-344.
3. Siegel L. Human immune response to botulism pentavalent (ABCDE) toxoid determined by a neutralization test and by an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1988; 2: 2351-2356.
4. Clayton M, Clyton J, Brown D, Middlebrook J. Protective vaccination with a recombinant fragment of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A experessed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. Infect Immun 1995; 63: 2738-2742.
5. Yari K, Fatemi SSA, Tavallaei M. Optimization of the BoNT/A-Hc expression in recombinant *Escherichia coli* using Taguchi statistical method. Biotechnol Appl Biochem 2010; 56: 35-42.
6. Zhou Y, Singh, B. Cloning, high-level expression, single-step purification, and binding activity of His6-tagged recombinant type B botulinum neurotoxin heavy chain transmembrane and binding domain. Protein Expr Purif 2004; 34: 8-16.
7. Zdanovsky AG and Zdanovskaia MV. Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins. Appl Environ Microb 2000. 66: 3166-3173.
8. Yu YZ, Li N, Zhu HQ, Wang RL, Du Y, Wang S, and et al. The recombinant Hc subunit of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A is an effective botulism vaccine candidate. Vaccine 2009; 27: 2816-2822.
9. Lin RC, Scheller RH. Mechanism of synaptic vesicle exocytosis. Annu Rev Cell Dev Bi. 2000; 16: 19-49.
10. Sambrook J, Fristsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 15. 14-15 and 60.
11. Zhou H, Zhou B, Johenson EA, Janda KD. Selection and characterization of a human monoclonal neutralizing antibody for Clostridium Botulinum neurotoxin serotype B Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 662-664.
12. Fatemi SSA, Yakhchali B, Towfighi Darian J, Shojaosadati SA, Zomorodipour A, Karkhaneh A, and et al. Selection of suitable strain from recombinant *Escherichia coli* strains with the genetic structure expressing periplasmic hGM-CSF. J Biosci Bioeng 2003; 96: 578-580.
13. Gao YL, Gao S, Kang L, Nie C, wang JL. Expression of Hc fragment from Clostridium botulinum neurotoxin serotype B in *Escherichia coli* and its use as a good immunogen. Hum Vaccin 2010; 6: 462-6.
14. Yu YZ, Sun ZW, Wang S, Yu WY. High-level expression of the Hcc domain of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A in *Escherichia coli* and its immunogenicity as an antigen. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2007; 23: 812-7.
15. Chen R, Shi J, Cai K, Tu W, Hou X, Liu H, and et al. Improved soluble expression and characterization of the Hc domain of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A in *Escherichia coli* by using a PCR-synthesized gene and a Trx co-expression strain. Protein Expr Purif 2010; 71: 79-84.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-09 ]