Expression, Purification and evaluation of the Immunogenicity of RecombinantC-terminus of the Receptor-Binding Domain of Neurotoxin Botulinum Protein Type B (BoNT/B-HcC)

Hossein Samiei Abianeh[1,2], Shahram Nazarizn[3], mohammad ebrahim minaei[4], JafarAmani[5], Amir Sajjad Hojjati razgi [6], mohammad Reza Ramezani[7]

1. Ph.D. Candidate of Medical Biotechnology, Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7743-9594
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
3. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-9124861338, Email: nazarian@ihu.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002- 4693- 877X
4. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-9352219503, Email: mminaii@.ihu.ac.ir. ORCID ID: 0000-0001-5087-891X
5. Professor, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5155-4738
6. MSc student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2279-4719
7. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-8029-2773

ABSTRACT

Background and Aim: Botulism, a syndrome caused by food poisoning, results from use of food contaminated with the botulinum toxin, which is very dangerous and deadly. Botulism is caused by the effects of bacterial toxins on the terminals of the motor nerves. Botulinum neurotoxins are among the most potent toxins. The aim of this study was to investigate expression, purification and, evaluation of the immunogenicity of the recombinant BoNT/B-HcC protein as an immunogen candidate in mice.

Materials and Methods: The C-terminus of the receptor-binding domain of botulinum neurotoxin type B**(**BoNT/B-HcC) was selected as the antigen for bioinformatics evaluations. The pET17b-BoNT/B-HcC plasmid was transferred to *E. coli* BL21(DE3) by heat shock. The recombinant protein was purified and analyzed by SDS-PAGE. After verification of the recombinant protein by western blot, immunization of mice was performed. Antibody titers of recombinant proteins were evaluated by indirect ELISA and the results were compared using t-test.

Results: The codon adaptation index (CAI) of the optimized gene was 0.99. The percentage of codons having high-frequency distribution was improved to 78%. Restriction analysis confirmed the 1119 bp construct gene and the recombinant protein with a molecular weight of 43.8 kDa was expressed in the prokaryotic host. The total yield of purified protein was 23 mg of protein per liter of culture. Immunization of mice induced serum antibody response. Statistical analysis showed that the antibody titer was significantly different compared to that of the control sample.

Conclusion: The designed recombinant antigen showed high antigenicity that could be considered as an immunogen against botulinum type B neurotoxin in future studies.

Keywords: *Clostridium botulinum*, Vaccine, Immunizations, Antibody, Catalytic domain

Received: April 12, 2022 **Accepted:** July 6, 2022

How to cite the article: Hossein Samiei Abianeh, Shahram Nazarizn, mohammad ebrahim minaei, JafarAmani, Amir Sajjad Hojjati razgi**.** Expression, Purification and evaluation of the Immunogenicity of RecombinantC-terminus of the Receptor-Binding Domain of Neurotoxin Botulinum Protein Type B (BoNT/B-HcC).ŞJKU 2023;28(3):13-23.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و هشت / مرداد و شهریور ۱۴۰۲/۲۳-۱۳

(CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بیان، تخلیص و بررسی ایمونوژنیسیتی پروتئین نوترکیب بخش کربوکسیل زیر واحد اتصال‌دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B (BoNT/B-HcC)

حسین سمیعی ابیانه[۱و۲]، شهرام نظریان[۳]، محمد ابراهیم مینایی[۴]، جعفر امانی[۵] ، امیر سجاد حجتی رزگی[۶]، محمدرضا رمضانی[۷]

۱. دانشجو دکتری زیست فناوری پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی و نانوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. کد ارکید: ۹۵۹۴-۰۰۰۲-۷۷۴۳-۰۰۰۰

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

۳. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران ، پست الکترونیک: nazarian@ihu.ac.ir، تلفن: ۰۹۱۲۴۸۶۱۳۳۸ ، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۴۶۹۳-۸۷۷X

۴. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران. ایران، پست الکترونیک: mminaii@.ihu.ac.ir ، تلفن: ۰۹۳۵۲۲۱۹۵۰۳ . کد ارکید:۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۰۸۷-۸۹۱X

۵. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی مسمومیت‌ها، بیمارستان بقیه‌ا... الاعظم، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... . کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۵۱۵۵-۴۷۳۸

۶. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۲۷۹-۴۷۱۹

۷. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۰۲۹-۲۷۷۳

چکیده

زمینه و هدف: بوتولیسم، سندروم ناشی از مسمومیت غذایی، به دنبال استفاده از غذای آلوده به سموم عصبی بوتولینوم به وجود می‌آید که بسیار خطرناک و کشنده هست. بیماری بوتولیسم به علت تأثیر سم باکتری بر پایانه‌های اعصاب حرکتی ایجاد می‌شود. نوروتوکسین‌های بوتولینوم جزء قوی‌ترین سموم شناخته‌شده می‌باشند. هدف از این تحقیق بیان، تخلیص و بررسی میزان ایمونوژنیسیتی پروتئین نوترکیب BoNT/B-HcC به عنوان یک کاندید ایمونوژن در حیوان آزمایشگاهی موش بود.

مواد و روش‌ها: انتهای کربوکسیل ناحیه اتصال‌دهنده نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B به عنوان آنتی‌ژن مورد ارزیابی‌های بیوانفورماتیک قرارگرفت. پلاسمید pET17b-BoNT/B-HcC به روش شوک دمایی به باکتری *E. coli* BL21(DE3) منتقل شد. پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی، تخلیص و با تکنیک SDS-PAGE بررسی گردید. پس از تائید پروتئین نوترکیب با روش وسترن‌بلات، ایمنی‌زایی پروتئین در موش آزمایشگاهی انجام شد. تیتر آنتی‌بادی با استفاده از الایزای غیرمستقیم ارزیابی و نتایج با آزمون آماری t ارزیابی و مقایسه گردید.

یافته‌ها: ژن بهینه سازی شده شاخص سازگاری کدون ۰/۹۹ را دارا شد. درصد کدون‌های با شیوع بالا در ژن به ۷۸ درصد بهبود یافت. توالی ساز ژنی ۱۱۱۹ جفت باز با برش آنزیمی تائید و پروتئین نوترکیب با وزن ۴۳/۸ کیلودالتون در میزبان پروکاریوتی بیان گردید. میزان پروتئین خالص‌شده برای هر لیتر از محیط کشت ۲۳ میلی‌گرم بود. ایمن‌سازی موش‌ها پاسخ آنتی‌بادی سرمی را القا کرد و آنالیزهای آماری نشان داد که میزان تیتر آنتی‌بادی در مقایسه با نمونه کنترل تفاوت معنی‌داری دارد.

نتیجه‌گیری: آنتی‌ژن نوترکیب طراحی‌شده آنتی‌ژنیسیته بالایی نشان داد و می‌تواند به‌عنوان یک ایمونوژن علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپB در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم بوتولینوم*، واکسن، ایمنی‌زایی، آنتی‌بادی، بخش عملکردی

وصول مقاله:۱۴۰۱/۱/۲۳ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۱/۳/۳۱ پذیرش:۱۴۰۱/۴/۱۵

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

مقدمه

بوتولیسم، سندروم ناشی از مسمومیت غذایی، به‌دنبال مصرف غذای آلوده به سموم عصبی بوتولینوم (neurotoxins botulinum) به وجود می‌آید که بسیار خطرناک و کشنده هست. اولین مورد مستند ابتلا به بیماری بوتولیسم در سال ۱۷۳۵ و اولین شیوع آن در آلمان بوده که حدود ۵۰ درصد مرگ‌ومیر به همراه داشته که به دلیل خوردن سوسیس آلوده بوده است(۱). نام بوتولیسم از کلمه لاتین سوسیس (botulus) در قرن نوزدهم گرفته شد. اصطلاح Blood susage، بیماری بوتولیسم را که از خوردن سوسیس به وجود می‌آمد، توصیف می‌نماید. در سال ۱۸۹۷، امیل فون ارمنگم (Emil van Ermengem) نتایج تحقیقات خود را روی شیوع گسترده بوتولیسم در بلژیک منتشر کرد. ارمنگم نشان داد که بیماری براثر توکسینی محلول تولید شده از یک باکتری بی‌هوازی ایجاد می‌گردد و باکتری را *باسیلوس بوتولینوس* (*Bacillus botulinus*) نامید که امروزه آن را *کلستریدیوم بوتولینوم* (*Clostridium botulinum*) می‌نامند(۲و۱).

بیماری بوتولیسم در اثر تأثیر سم باکتری بر پایانه اعصاب حرکتی ایجاد می‌شود و با ممانعت از ارسال پیام عصبی از این پایانه‌ها منتهی به نارسایی تنفسی و نهایتاً مرگ می‌شود. سم باکتری می‌تواند از طریق لایه‌های مخاطی لوله گوارش یا سایر اندام‌ها و دستگاه‌ها مانند چشم یا دستگاه تنفس وارد بدن گردد. این سم سپس، وارد جریان عمومی خون یا لنف شده و با رسیدن به پایانه‌های عصبی هدف، سبب ایجاد فلج شل (فلاسید) می‌گردد(۳).

تمام گونه‌های *کلستریدیوم بوتولینوم* سم بوتولینوم را تولید می‌کنند. این سم دارای انواعی است که ازنظر ایمنی‌شناختی با یکدیگر متفاوت هستند و به هفت تیپ مختلف که با حروف A تا G مشخص می‌شوند، تقسیم می‌گردند(۴). از میان سروتیپ‌های مختلف *کلستریدیوم بوتولینوم* سروتیپ‌های A, B, E و در موارد معدود سروتیپ F در انسان باعث ابتلا به بوتولیسم می‌باشند. از سروتیپ‌هایی که در انسان بیماری‌زا می‌باشند، تیپ A و B دارای منشأ زمینی بوده در حالی که تیپ E بیشتر در آب، ماهی‌ها و رسوبات کف دریاها دیده شده است(۶و۵).

هریک از نوروتوکسین‌های بوتولینوم پس از بیان ژن به صورت یک پروتئین تک زنجیره‌ای با وزن ۱۵۰ کیلودالتون در آمده که به وسیله پروتئازها به زنجیره سنگین (HC) (۱۰۰ کیلودالتون) و زنجیره سبک (LC) (۵۰ کیلودالتون) تبدیل می‌شوند. به طور کلی این دو زنجیره با یک پیوند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل هستند که زنجیره سنگین، مسئول اتصال به نورون‌های کولینرژیک محیطی و زنجیره سبک یک اندوپپتیداز وابسته به فلز روی بوده که پروتئین‌های مسئول رهاسازی نوروترانسمیترها را به طور اختصاصی در محل‌های خاص می‌شکافد(۷).

نوروتوکسین‌های بوتولینوم جزء قوی‌ترین سموم شناخته‌شده می‌باشند. در یک مورد بوتولیسم انسانی، تخمین زده شد که مرگ یک فرد دارای وزن ۱۰۴ کیلوگرم، ناشی از مصرف پنیری حاوی حدوداً MLD_{50} ^{3}۱۰× ۳/۵ از نوروتوکسین تیپ B بوده است(۷). این نوروتوکسین‌ها به‌طور متوسط شامل، ۱۲۸۳ اسیدآمینه هستند؛ البته این میزان در بعضی تیپ‌ها بیشتر و در بعضی دیگر کمتر است. تاکنون سیگنال پپتیدی برای این نوروتوکسین‌ها شناسایی نشده است؛ لذا توکسین شکل ترشحی ندارد و متعاقب رشد باکتری و تخریب غشاء، به‌صورت تأخیری در محیط رها می‌شوند. توکسین در سیتوپلاسم سلول تولیدشده و احتمال می‌رود که

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

در طول مراحل رشد، مقادیری از آن با عبور از غشاء به محیط خارج سلولی وارد شود(۹و۸).

مبنای درمان بوتولیسم، مراقبت‌های بهداشتی و استفاده از آنتی‌توکسین اسبی تهیه شده علیه نوروتوکسین است. مهار فعالیت نوروتوکسین بوتولینوم در هریک از سه مرحله کلیدی فرآیند ایجاد مسمومیت منجر به مصونیت در برابر بوتولیسم خواهد شد .در حال حاضر برای ایجاد مصونیت اختصاصی افراد در معرض خطر، از یک توکسوئید ۵ ظرفیتی بوتولیسم علیه سروتیپ‌های E-A استفاده می‌شود. تزریق زود هنگام و به‌موقع این آنتی‌توکسین، از ادامه تخریب و آسیب‌های عصبی و شدت بیماری جلوگیری می‌کند؛ اما با این حال، نمی‌تواند فلج ایجادشده را احیاء نماید(۱۱و ۱۰).

به‌طورکلی بوتولیسم، یک بیماری واگیردار محسوب نمی‌شود و اپیدمی‌های گسترده‌ای از آن هرگز گزارش نشده است؛ اما توان بالای کشندگی این نوروتوکسین و نرخ بالای موارد منجر به مرگ نسبت به موارد ابتلا اهمیت تهیه واکسن علیه این نوروتوکسین بسیار خطرناک را توجیه می‌کند. در این پژوهش از بخش کوچک‌تری از زیر واحد سنگین نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B استفاده شده که حاوی اپی توپ‌های سلولB وT است. هدف از این تحقیق تولید، تخلیص و بررسی ایمونوژنیستی پروتئین نوترکیب BoNT/B-HcC در حیوان آزمایشگاهی موش بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده شامل اکریل آمید، بیس اکریل آمید، کلروفرم، اتیدیوم بروماید، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، سدیم دی‌هیدروژن فسفات، دی‌سدیم هیدروژن فسفات، بی‌کربنات سدیم، توئین۲۰، اسید فسفریک، سدیم دی دو دسیل دی سولفات، اوره، اسید کلریدریک، کلرید سدیم، ایزوپروپانول، ۲- مرکاپتو اتانول، بروموفنل بلو، کوماسی برلیانت بلو R250، هیدروکسید سدیم، هیدروکسید آمونیوم، اسید استیک گلاسیال، متانول و اتانول، اسید بوریک، باز تریس، ایزوپروپیل بتا تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، پودر ژل آگاروز معمولی، کلسیم کلرید و آمونیوم پرسولفات از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند. کاغذ نیتروسلولز از شرکت کیاژن تهیه گردید. پلاسمید pET17b-BoNT/B-HcC حاوی توالی نوکلوتیدی ژن صناعی از شرکت شاین جین (چین) دریافت شد. میزبان بیانی پروکاریوتی سویه *E. coli* BL21(DE3) از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه گردید. سوبستراهای مولد رنگ O-phenilenediamine (OPD) و Diaminobenzidine (DAB) از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد. آنزیم های محدودکننده NdeI و BamHI از شرکت بایوساینس (آلمان) تهیه شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) agarose resin استفاده شد که از شرکت شاین جن (چین) خریداری گردید. موش‌های آزمایشگاهی BALB/c از موسسه واکسن و سرم سازی رازی ایران تهیه گردیدند و از اجوانت کامل و ناقص فروند موسسه انستیتو پاستور استفاده شد. آنتی بادی کانژوگه موشی، از شرکت داکو(دانمارک) تهیه گردید.آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین مورد استفاده شده جهت کشت باکتری واجد پلاسمید نوترکیب از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

طراحی بیوانفورماتیک پروتئین نوترکیب BoNT/B:

توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی BoNT/B از پایگاه‌های داده GeneBank و Uniprot به آدرس https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ و https://www.uniprot.org/ استخراج و با فرمت FASTA ذخیره گردید. بخش C_ترمینال از دومین اتصال شونده BoNT/B به‌عنوان آنتی‌ژن نوترکیب برای تجزیه‌وتحلیل‌های بیوانفورماتیک انتخاب شد. جهت سهولت در تخلیص یک دنباله‌ی هیستیدینی به انتهای توالی اضافه گردید. هم‌چنین جایگاه برش دو آنزیم محدودکننده NdeI و BamHI در دو انتهای ´۳ و ´۵ توالی نوکلئوتیدی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

اضافه شد. توالی نوکلئوتیدی جهت بیان در میزبان پروکاریوتی با سرور Genscript Optimisation Gene TM algorithm به آدرس https://www.genscript.comبهینه‌سازی گردید. در ادامه تجزیه تحلیل ترمودینامیکی و پیش‌بینی ساختار دوم mRNA با سرور MFOLD پیش‌بینی شد. درنهایت ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میزان آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب BoNT/B-HcC به ترتیب با سرورهای ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/) و Vaxigen http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html) پیش‌بینی شد. توالی نوکلئوتیدی طراحی‌شده به شرکت شاین جین (چین) جهت تولید ارسال گردید.

تراریخت نمودن باکتری *E. coli* BL21(DE_3) با پلاسمید pET17b-BoNT/B-HcC:

پس از مستعد سازی سلول‌های *E. coli* BL21(DE3) با کلسیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار پلاسمید نوترکیب با روش شوک دمایی به سلول‌های مستعد منتقل شد. جهت غربال‌گری سلول‌های حاوی پلاسمید از محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۲۰۰µg/ml استفاده گردید. در ادامه جهت تائید سازه ژنی ابتدا یکی از کلونی‌ها جهت استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انتخاب شد(۱۲). پس از استخراج پلاسمید واکنش برش آنزیمی با دو آنزیم محدودکننده NdelI و BamHI انجام گرفت بدین‌صورت که مقادیر ۱ میکرولیتر از پلاسمید ۵ میکرولیتر بافر Tango و از هر آنزیم محدودکننده ۱ میکرولیتر به نمونه تا حجم ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. درنهایت، نمونه حاصل از برش آنزیمی در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

بیان پروتئین نوترکیب در میزبان پروکاریوتی:

جهت بیان پروتئین نوترکیب از کشت شبانه کلون‌ها میزان ۱ میلی‌لیتر در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰µg/mlتلقیح و پس از رسیدن OD در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری) به ۰/۶ ماده القاکننده پروموتر (IPTG) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه گردید. پس از ۵ ساعت هوادهی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و همزنی ۱۲۰ rpm، رسوب باکتری در دمای ۴ درجه سلسیوس و ۶۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه تهیه گردید.

استخراج و تخلیص پروتئین نوترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی:

با توجه به اینکه پروتئین نوترکیب درون سلول پروکاریوتی به علت بیان بالا تشکیل اجسام می‌دهد جهت استخراج پروتئین نوترکیب از بافر اوره ۸ مولار استفاده گردید. در ادامه فرایند تخلیص پروتئین نوترکیب با رزین کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA صورت گرفت. خروجی‌های ستون تخلیص به‌وسیله روش Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) با ژل ۱۲ درصد ارزیابی گردید. جهت مقایسه تراکم و تجزیه و تحلیل وزن مولکولی باندها، تصاویر ژل ها با نرم افزار بیوانفورماتیکی GelAnalyzer نسخه ۱۹,۱ بررسی شد. در نهایت غلظت پروتئین بیان‌شده به کمک روش بردفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی(BSA) به‌عنوان استاندارد سنجیده شد.

تائید پروتئین نوترکیب تخلیص شده:

برای تائید پروتئین نوترکیب، از روش وسترن‌بلات استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن(Bio-rad (Mini Protean و بافر انتقال (گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH=۹/۳) روی کاغذ نیترو سلولز منتقل شد. به‌منظور پر کردن جایگاه‌های خالی(بلاکینگ) کاغذ به مدت یک‌شب در محلول ۵ درصد شیر خشک درون Phosphate-Buffered Saline/Tween (PBST) در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس سه مرتبه با PBST شستشو داده

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

شد. کـــاغذ با آنتی‌بادی‌های کانژوگه ضد توالی هیستیدینی با رقت ۱:۱۰۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شد. فرآیند شستشو با PBST سه بار انجام گرفت. نهایتاً، کاغذ نیترو سلولز در محلول سوبسترای رنگ‌زا 3,3′-Diaminobenzidine (DAB) (۶۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pHبرابر ۸) تا ظهور باند پروتئینی، قرار گرفت. برای توقف واکنش کاغذ در آب مقطر قرار داده شد.

ایمن‌سازی حیوانات آزمایشگاهی:

به‌منظور بررسی ایمنی‌زایی علیه پروتئین نوترکیب BoNT/B، از ۲۰ عدد موش BALB/c به‌عنوان تست و ۵ عدد به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر موش، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده با حجم یکسان اجوانت کامل فروند در تزریق اول و اجوانت ناقص فروند برای تزریق‌های بعدی در چهار نوبت به‌صورت زیر جلدی تزریق گردید. جهت بررسی و تأیید نتایج حاصل و همچنین جلوگیری از پاسخ کاذب، به یک گروه ۵ تایی به‌عنوان شاهد فقط بافر Phosphate-Buffered Saline (PBS) استریل همراه با اجوانت تزریق گردید.

بررسی تیتر آنتی‌بادی با روش الایزای غیرمستقیم:

خون‌گیری در چهار نوبت و طی دو هفته پس از مراحل اول، دوم، سوم و چهارم، از گوشه چشم موش‌ها (ایمن و غیر ایمن) انجام شد. نمونه‌های خون درون میکروتیوب استریل منتقل و پس از یک ساعت گرما گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، یک‌شب در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای جداسازی سرم، ابتدا لخته خون خارج‌شده، سرم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع شفاف زردرنگ به‌دست‌آمده جهت استفاده در مراحل بعدی جدا گردید. در مرحله بعد سنجش کمی و کیفی آنتی‌بادی پلی کلونال موجود در نمونه سرم فوق به روش الایزا غیر مستقیم موردبررسی و ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب داخل ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ(۰/۲ مولار Na_2Co_3، ۰/۲ مولار $NaHCO_3$) درون چاهک‌های الایزا (Caspian) یک نواخت شد. پس از هر مرحله چاهک‌ها با بافر سه مرتبه شستشو گردید. سپس با شیر خشک ۵ درصد بدون چربی در PBST به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سلسیوس مسدود شد. چاهک‌های شسته شده با نمونه‌های سرم از رقت ۱:۲۰۰ تا ۱:۱۲۵۶۰۰ درون PBST رقیق و به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. چاهک‌ها سه بار با PBST شسته شدند و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ثانویه (آنتی‌بادی بزی ضد آنتی‌بادی موشی کانژوگه با HRP (Horseradish peroxidase) با رقت ۱:۲۰۰۰۰ در بافر PBST به هر چاهک اضافه شد. صفحه به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و سپس چهار بار در PBST شستشو شد. سپس، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول سوبسترا حاوی ۳ میلی‌گرم OPD به هر چاهک اضافه گردید. درنهایت پس از رنگ گرفتن، واکنش با H_2SO_4 ۲/۵مولار متوقف شد و جذب در ۴۹۵ نانومتر بر روی خواننده میکروپلیت الایزا (Bio-Tech) خوانده شد.

آنالیز آماری:

برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلموکراف-اکرنوزوف استفاده گردید. آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین (در سطح تجویز دوم، سوم و چهارم) با استفاده از آزمون t-test انجام گرفت که در این آزمون در صورت مشاهده P-value کمتر از ۰/۰۵ یعنی میانگین داده‌های مقایسه شده با هم برابر نبوده و از اختلاف معنی‌دار بین دو گروه آزمایش مشاهده می‌شود. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد.

یافته‌ها

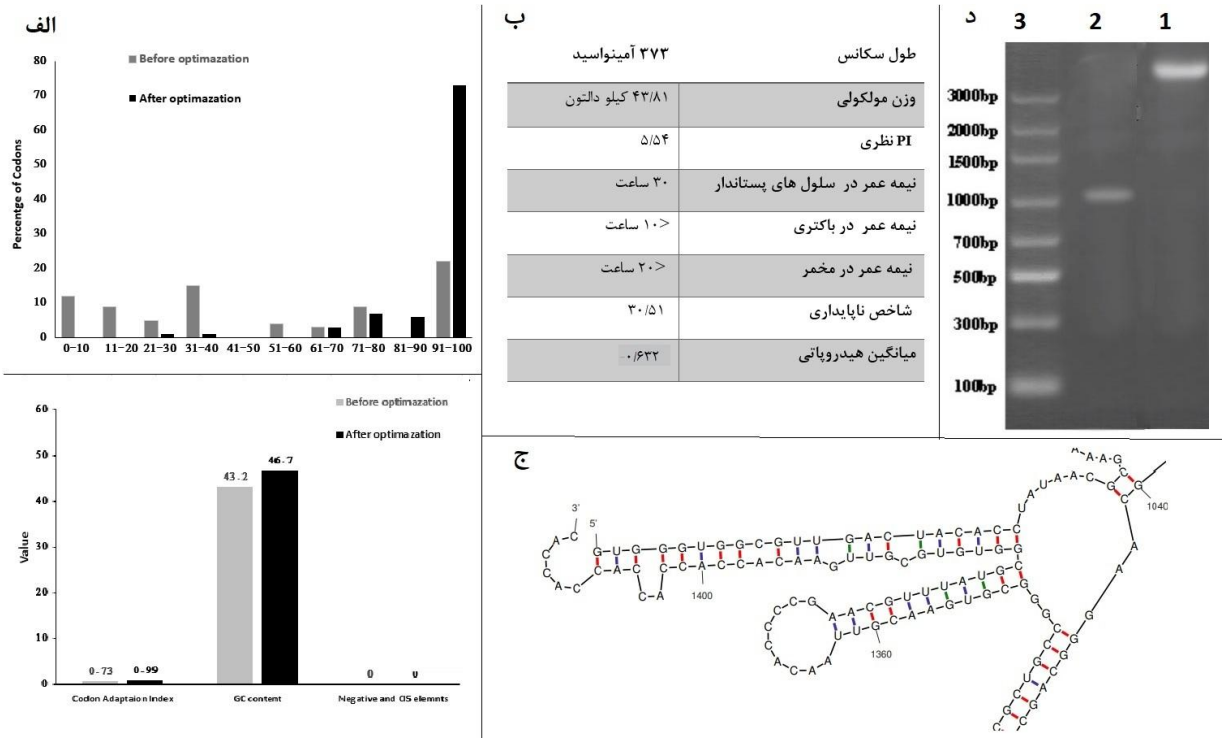
طراحی بیوانفورماتیک و تائید سازه ژنی:

توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی مرتبط با BoNT/B به ترتیب با اعداد دسترسی X71343.1 و P10844 استخراج گردید. ۳۷۳ آمینواسید از انتهای Hc-c نوروتوکسین

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

بوتولینوم تیپ B به‌عنوان آنتی‌ژن انتخاب شد. در ادامه بهینه‌سازی کدونی توالی نوکلئوتیدی صورت گرفت که میزان سازگاری کدونی به ۰/۹۹ افزایش یافت که بیشترین مقدار آن برابر ۱ است (شکل الف-۱). برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین نوترکیب در شکل ب-۱ نشان داده‌شده است که میزان امتیاز ناپایداری آن برابر۳۰/۵۱ بود که نشان‌دهنده پایداری بالای پروتئین نوترکیب طراحی‌شده است. نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل ترمودینامیکی mRNA نیز نشان داد که از پایداری بالایی برخوردار است و در بخش ´۵ لوپ بزرگ دیده نمی‌شود (شکل ج-۱). وزن مولکولی الکتروفورز محصول برش با دو آنزیم محدودکننده، برابر ۱۱۱۹ جفت باز اندازه‌گیری شد که تائید کننده سازه ژنی طراحی‌شده بود (شکل د-۱).



شکل ۱. نتایج حاصل از طراحی بیوانفورماتیک و تائید سازه ژنی.

الف) ارزیابی پارامترهای سازه نوترکیب، قبل و بعد از بهینه‌سازی، ب) برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین نوترکیب پیش‌بینی‌شده با سرور Protparam، ج) ساختار دوم پیش‌بینی‌شده بخش ´۵ از mRNA توالی بهینه‌شده، د) نتیجه الکتروفورز نمونه حاصل از برش آنزیمی، ستون۱ نمونه حاصل از برش آنزیمی با آنزیم محدودکننده NdeI، ستون۲ نمونه حاصل از برش با آنزیم‌های محدودکننده NdeII و BamHI، ستون۳ مارکر DNA

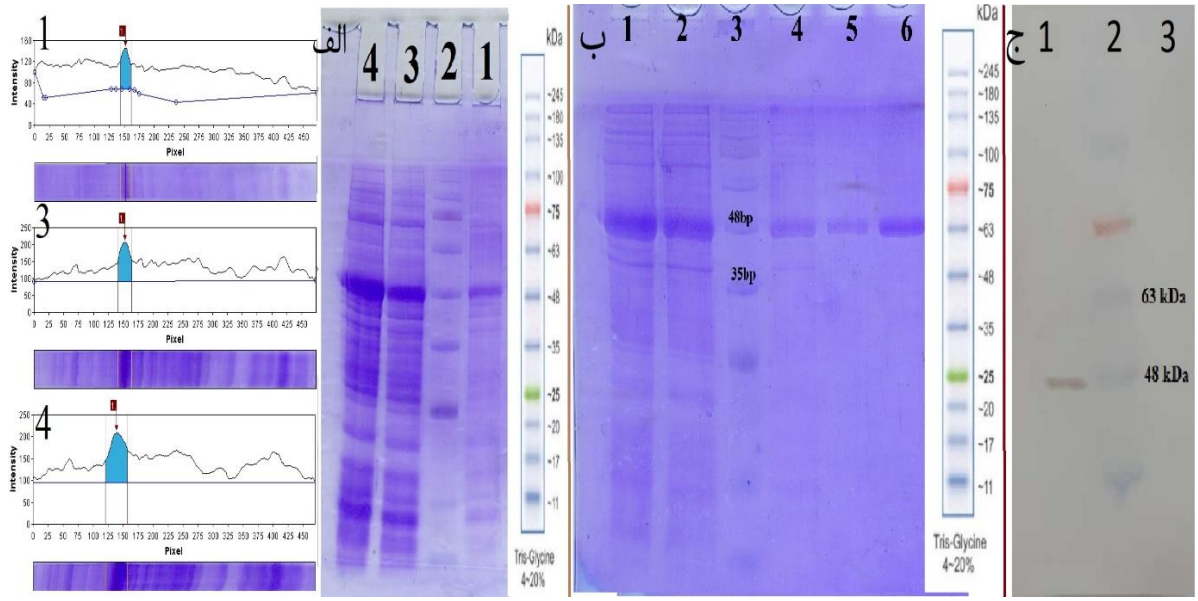
بیان، تخلیص و تائید آنتی‌ژن نوترکیب:

پس دریافت باکتری صلاحیت‌دار شده *E. coli* BL21(DE3) بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از IPTG یک میلی مولار و مدت‌زمان ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس صورت گرفت. میزان بیان پروتئین نوترکیب در ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد موردبررسی قرار گرفت و با توجه به مارکر پروتئینی وزن مولکولی ۴۳/۸ کیلودالتون تائید گردید (شکل الف-۲). جهت خالص‌سازی پروتئین نوترکیب از ستونNi-NTA استفاده شد که پس از عبور نمونه پروتئین استخراج‌شده، در مرحله سوم شستشو با بافر حاوی اوره ۸ مولار با pH برابر ۵ تخلیص انجام شد(شکل ب-۲). به‌منظور تائید محصول پروتئینی از روش وسترن‌بلات استفاده شد. باند وسترن در جایگاه صحیح

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

مدنظر قرار گرفت؛ اما در ستون کنترل (BSA) هیچ باندی دیده نشد(شکل ج-۲).



شکل۲. نتایج تولید و تخلیص آنتی‌ژن نوترکیب.

الف) نتیجه ژل بررسی بیان آنتی‌ژن نوترکیب، ستون۱ نمونه بدون القا، ستون۲ مارکر پروتئینی سیناکلون، ستون۳ نمونه القاشده با IPTG ۰/۵ میلی‌مولار، ستون۴ نمونه القاشده با IPTG ۱ میلی‌مولار، بررسی‌های ستون‌ها با نرم‌افزار GelAnalyzer نشان داد که نمونه ستون ۴ در مقایسه با دیگر نمونه‌ها باند قوی‌تری در ناحیه ۴۵ کیلودالتونی دارد، ب) نتیجه تخلیص آنتی‌ژن نوترکیب با ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA، ستون۱ نمونه قبل از عبور از ستون، ستون۲ نمونه پس از عبور از ستون، ستون۳ مارکر پروتئینی سیناکلون، ستون۴ نمونه شستشو با بافر اوره ۸ مولار pH=۷/۲، ستون ۵ نمونه شستشو با بافر اوره ۸ مولار pH=۶/۸، ستون ۶ نمونه شستشو با بافر اوره ۸ مولار pH=۵، ج) تائید آنتی‌ژن نوترکیب تخلیص شده با استفاده از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضدهیستدین کانژوگه به HRP، ستون۱:نمونه تخلیص شده در ستون ۶ از بخش ب، ستون۲ مارکر پروتئینی سیناکلون، ستون۳ پروتئین BSA به‌عنوان کنترل منفی

میزان تیتر آنتی‌بادی تولیدشده در حیوان ایمن شده:

به‌منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولیدشده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزا غیرمستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر بار تزریق از موش‌های تست و شاهد خون‌گیری از چشم به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها، آزمایش الایزا انجام شد. نمودار میانگین تیتر آنتی‌بادی در هر مرحله در نمودار شماره ۱ نشان داده‌شده است. نتایج به‌دست‌آمده تیتر آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در موش‌های ایمن شده با آنتی‌ژن کایمر به‌صورت زیرجلدی، تیتر آنتی‌بادی به‌صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ($P< ۰/۰۱$) و هم‌چنین تفاوت معنی‌دار تیتر آنتی‌بادی در تزریق چهارم نسبت به سوم بود ($P< ۰/۰۵$). بیشترین میزان ODمربوط به رقت ۱/۲۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۳/۵ بود.

بحث

بوتولیسم بیماری کشنده‌ای است که توسط نوروتوکسین یکی از سروتیپ‌های هفتگانه *کلستریدیوم بوتولینوم* ایجاد می‌شود. با توجه به مکانیسم مولکولی عملکرد توکسین، بخش زنجیره‌ی سبک وظیفه‌ی کاتالیتیکی سم را به عهده دارد. زنجیره سنگین نوروتوکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ B دارای دو دومین هست: بخش انتقالی به‌عنوان نیمه انتهای آمینی و بخش اتصال‌دهنده به‌عنوان نیمه انتهای کربوکسیلی .یکی از راه‌های مؤثر خنثی کردن نوروتوکسین بوتولینوم، مهار اتصال این سم به سیناپس نوروماسکولار با

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

آنتی‌بادی‌هایی علیه بخش اتصال‌دهنده هست.
Fairweatherو همکاران در سال ۱۹۸۷ ثابت کردند که قطعه نوترکیب انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین سم تتانوس (همولوژی بالایی با سم بوتولینوم دارد) که بطورنسبی تخلیص شده بود، موش‌ها را در برابر چالش با دوز LD_{50} ۱۰ این سم مصون می‌نماید(۱۳). ازآنجاکه توالی و ساختار نوروتوکسین تولیدشده توسط *کلستریدیوم تتانی* و *کلستریدیوم بوتولینوم* بسیار شبیه به یکدیگر است، درنتیجه این روش برای ساخت واکسن‌های جدید علیه سم بوتولینوم نیز به کار گرفته شد(۱۴).

در حال حاضر به‌منظور مقابله با بوتولیسم در سطح جهان از واکسن‌های توکسوئیدی استفاده می‌شود. هرچند گزارش نهایی مطالعات نشان داد که واکسن‌های مربوط به هر پنج نوع سروتیپ دارای مصونیت‌زایی کافی می‌باشند؛ ولی به دلیل معایبی که واکسن‌های توکسوئیدی دارند، اخیراً تلاش‌های زیادی در زمینه تولید واکسن‌های نوترکیب انجام‌شده است(۱۵). از جمله معایب این واکسن‌ها، نیاز به امکانات و تجهیزات اختصاصی و در نتیجه هزینه بالا، بازده تولید سم بسیار پایین به‌وسیله باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم*، خطرناک بودن کار با سم بوتولیسم و... می‌باشند(۱۶). به دلیل این مشکلات امروزه برای پیشگیری از ابتلای به این بیماری، به واکسن‌های نوترکیب روی آورده‌اند. مطالعات متعددی درزمینه‌ی تولید واکسن نوترکیب و آنتی‌بادی بر روی بخش اتصال‌دهنده‌ی توکسین متمرکزشده است. یکی از این نوع واکسن‌ها، پروتئین‌های نوترکیب مشتق از ناحیه اتصال‌دهنده می‌باشند که نشان داده‌شده است که آنتی‌بادی‌های ضد این پروتئین نوترکیب می‌توانند باعث خنثی‌سازی اثر نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B شوند(۱۷).

در تحقیق رستمی و همکاران بیان پروتئین نوترکیب زیر واحد اتصال دهنده سم *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E در *E. coli* عمدتاً به دلیل حلالیت کم محصول نوترکیب، منجر به بازده ضعیفی شده است که احتمالاً وجود توالی‌های آلفا هلیکس در این بخش از ساختار سم و در معرض قرار گرفتن آمینواسیدهای آبگریز آن باعث بروز ناپایداری پروتئین نوترکیب و در نتیجه بازده کم است(۱۸). در تحقیق برادران علت احتمالی عدم بیان پروتئین نوترکیب زیر واحد اتصال دهنده سم کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B ، تجزیه و شکسته شدن پروتئین بلافاصله بعد از بیان آن در میزبان پروکاریوتی(*E. coli* BL21 (DE_3) عنوان شده است(۱۹). با در نظر گرفتن نتایج تحقیقات قبلی، استفاده از توالی‌هایی که سبب افزایش خاصیت حلالیت پروتئین می‌شوند می‌تواند در این زمینه کمک کننده باشد. بر این اساس و به جهت رفع چنین موانعی دو راهکار در تحقیق حاضر ارائه گردید. با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی نواحی ایمونوژنیک بخش اتصال دهنده سم انتخاب شد تا نیازی به بیان کل بخش اتصال دهنده سم نباشد. از طرفی نیز در طراحی کاست ژنی، توالی کد کننده پروتئین نوروتوکسین در فرادست ژن کد کننده بخش ایمونوژنیک پروتئین اتصال دهنده سم قرار گرفت تا با افزایش میزان حلالیت امکان بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب فراهم گردد.

برای بیان آنتی‌ژن نوترکیب از سیستم وکتوری pET که دارای پروموتور T_7 lac هست و یک پروموتور قوی محسوب می‌شود، استفاده گردید. ازجمله دیگر ویژگی این سیستم، وجود نشانگر6xHis Tag در دو طرف MCS است که تخلیص پروتئین نوترکیب بیان‌شده را تسهیل می‌کند. برای نشان دادن قابلیت ایمنی‌زایی پروتئین در طول ایمنی‌زایی از روش الایزا بهره‌گیری شده است. تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده پس از تزریق چهارم به روش الایزا بیان‌گر پاسخ تام بدن نسبت به آنتی‌ژن تجویزشده هست که آنالیزهای آماری نمونه تست و شاهد با آزمون t مؤید این فرضیه بود.

در تحقیقی مشخص گردید که میزان ایمنی‌زایی برای نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A کمتر از نوروتوکسین بوتولینوم تیپB می‌باشد(۱۹). با این حال در تحقیقی مشخص گردید که توالی آمینواسیدی نوروتوکسین تیپ B

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

و تیپA نزدیک به ۷۰ درصد و با سم تتانوس ۵۰ درصد شباهت دارند و ایمن‌سازی موش‌ها با سم تتانوس می‌تواند علیه نوروتکسین‌های بوتولینوم نیز ایمن‌زا باشد(۲۰). با توجه به ادله مطرح شده، ایمنی‌زایی با نوروتوکسین تیپ B در مقایسه با تیپ A می‌تواند علیه نوروتوکسین بوتولینوم و سم تتانوس، در عین کارآمدی بالاتر، ایمنی‌زاتر باشد که این فرضیه نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

در حال حاضر مهندسی ژنتیک و تولید نوترکیب قطعات مختلف *نوروتوکسین‌های بوتولینوم*، خصوصاً ناحیه اتصالی و معرفی آن‌ها به‌عنوان کاندیداهای واکسن نوترکیب با سرعت هرچه بیشتر ادامه دارد. در سال ۱۹۹۵ ناحیه اتصالی تیپ A کلون شد و اثر پیشگیری آن در موش تائید شد(۲۱). در سال ۲۰۰۴ ناحیه اتصال‌دهنده نوروتوکسین تیپ B کلون و خصوصیات اتصال‌دهندگی آن بررسی شد(۲۲). ناحیه Hc تمام سروتیپ‌های بوتولینوم در *اشرشیاکلی* به‌طور جداگانه، کلون و بیان‌شده و هم‌اکنون همه آن‌ها به‌عنوان کاندیداهای واکسن بوتولیسم، در مرحله مطالعات بالینی قرار دارند(۱۶). در تحقیقی دیگر، بیان ناحیه کوچکی از زیر واحد Hc-C از نوروتوکسین بوتولینوم تیپ A صورت گرفته که در تحقیق حاضر بخشی کوچکی از زیر واحد Hc-C برای مطالعه بیان و بررسی ایمنی‌زایی در نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B استفاده شده بود(۲۲). در این تحقیق ما توانستیم بخش کوچکی (به وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون) از زیر ناحیه Hc-C سروتیپ B را بیان و تخلیص کنیم که نتایج تیتر آنتی‌بادی پژوهش حاضر با پژوهش دیگر که بخش بزرگ‌تری (به وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون) از این ناحیه را انتخاب کرده بودند یکسان بود(۱۶).

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق بیانگر این است که آنتی‌ژن نوترکیب طراحی‌شده شامل ناحیه کوچک‌تر Hc از نوروتوکسین بوتولینوم تیپB ، قدرت ایمونوژنیسیتی بالایی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک کاندید ایمونوژن علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B باشد و در تحقیقات بعدی به‌عنوان یک کاندید واکسن مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

هیچ‌گونه تعارض منافعی بین نویسندگان مقاله وجود ندارد و سهم نویسندگان بر اساس آیین‌نامه ارتقای اعضای هیئت‌علمی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری است. از دانشگاه جامع امام حسین به‌واسطه فراهم آوردن امکانات لازم جهت اجرای این تحقیق تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1.Van Ermengem E. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. Rev Infect Dis. 1979:701-19.

2.Pickett A. On the discovery of Bacillus botulinus. The Botulinum Journal. 2008;1(1):5-6.

3.Johnson EA, Bradshaw M. Clostridium botulinum and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. Toxicon. 2001;39(11):1703-22.

4.Valipour E, Moosavi ML, Amani J, Nazarian S. High level expression, purification and immunogenicity analysis of a protective recombinant protein against botulinum neurotoxin type E. World J Microbiol Biotechnol. 2014;30(6), 1861-1867.

5.Pourshafie M, Saifie M, Shafiee A, Vahdani P, Aslani M, Salemian J. An outbreak of food-borne botulism associated with contaminated locally-made cheese in Iran. Scand J Infect Dis. 1998;30(1):92-4.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]

6.Baghban R, Gargari SL, Rajabibazl M, Nazarian S, Bakherad H. Camelid-derived heavy-chain nanobody against Clostridium botulinum neurotoxin E in Pichia pastoris. Biotechnol Appl Biochem. 2016;63(2):200-5.

7.Hatheway CL. Clostridium botulinum and other clostridia that produce botulinum neurotoxin. In Clostridium botulinum. 2018; 2-20.

8.Goonetilleke A, Harris J. Clostridial neurotoxins. J Neurol, Neurosurg Psychiatry. 2004;75.

9.Dolly J, Aoki K. The structure and mode of action of different botulinum toxins. Eur J Paediatr Neurol. 2006;13:1-9.

10.Heymann DL. Control of communicable diseases manual. Am J Public Health. 2008;19.

11.McCarty CL, Angelo K, Beer KD, Cibulskas-White K, Quinn K, de Fijter S, et al. Large outbreak of botulism associated with a church potluck meal—Ohio. Morb Mortal Wkl Rep. 2015;64(29):802.

12.Ehrt S, Schnappinger D. Isolation of plasmids from E. coli by alkaline lysis. *E coli* Plasmid Vectors. Springer; 2003. p. 75-8.

13.Fairweather NF, Lyness VA, Maskell DJ. Immunization of mice against tetanus with fragments of tetanus toxin synthesized in *Escherichia coli*. Infect Immun. 1987;55(11):2541-5.

14.Smith LA. Development of recombinant vaccines for botulinum neurotoxin. Toxicon. 1998;36(11):1539-48.

15.Rusnak JM, Smith LA. Botulinum neurotoxin vaccines :Past history and recent developments. Hum Vaccines. 2009;5(12):794-805.

16.Baldwin MR, Tepp WH, Przedpelski A, Pier CL, Bradshaw M, Johnson EA, et al. Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism. Infect Immun. 2008;76(3):1314-8.

17.Dolimbek BZ, Steward LE, Aoki KR, Atassi MZ. Immune recognition of botulinum neurotoxin B: antibody-binding regions on the heavy chain of the toxin. Mol Immunol. 2008;45(4):910-24.

18.Rostami H, Moosavi SJ, Ebrahimi F, Hajizadeh A. Cloning and Expression of the Catalytic Domain of Botulinum Neurotoxin Type E in *E. coli*. J. Mazandaran Univ Med Sci. 2013;22(97):148-57.

19.Baradaran M, Ebrahimi F, Nazarian S, Hajizade A, Tarverdizadeh Y. Subcloning and Assessment of the Expression of Synthetic Botulinum Neurotoxin Type B Binding Domain (BD/B). J Qom Univ Med Sci. 2016;10(5), 29-37.

20.Sharma S, Zhou Y, Singh BR. Cloning, expression, and purification of C-terminal quarter of the heavy chain of botulinum neurotoxin type A. Protein Expression Purif. 2006;45(2):288-95.

21.Clayton MA, Clayton JM, Brown DR, Middlebrook JL. Protective vaccination with a recombinant fragment of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in Escherichia coli. Infect Immun. 1995;63(7):2738-42.

22.Zhou Y, Singh BR. 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 Expression Purif. 2004;34(1):8-16.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.13]