

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

Hossein Samiei Abianeh^{1,2}, Shahram Nazarizn³, mohammad ebrahim minaei⁴, Jafar Amani⁵, Amir Sajjad Hojjati razgi⁶, mohammad Reza Ramezani⁷

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: mminai@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, Jafar Amani, Amir Sajjad Hojjati razgi. Expression, Purification and evaluation of the Immunogenicity of Recombinant C-terminus of the Receptor-Binding Domain of Neurotoxin Botulinum Protein Type B (BoNT/B-HcC). *ŠJKU* 2023;28(3):13-23.

بیان، تخلص و بررسی ایمونوزیستی پروتئین نو ترکیب بخش کربوکسیل زیر واحد

اتصال دهنده نورو توکسین بوتولینوم تیپ B (BoNT/B-HcC)

حسین سمیعی ایبانه^۱، شهرام نظریان^۲، محمد ابراهیم مینایی^۳، جعفر امانی^۴، امیر سجاد حجتی رزگی^۵، محمدرضا رمضانی^۶

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

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

۳. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران، پست الکترونیک: mazarian@ihu.ac.ir، تلفن: ۰۹۱۲۴۸۶۱۳۳۸، کد ارکید: ۸۷۷۸-۰۰۰۰-۰۰۰۲-۴۶۹۳

۴. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران، پست الکترونیک: mmminaii@ihu.ac.ir، تلفن: ۰۹۳۵۲۲۱۹۵۰۳، کد ارکید: ۸۹۱۸-۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۰۸۷

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

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

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

چکیده

زمینه و هدف: بوتولیسم، سندروم ناشی از مسمومیت غذایی، به دنبال استفاده از غذای آلوده به سموم عصبی بوتولینوم به وجود می آید که بسیار خطرناک و کشنده هست. بیماری بوتولیسم به علت تأثیر سم باکتری بر پایانه های اعصاب حرکتی ایجاد می شود. نورو توکسین های بوتولینوم جزء قوی ترین سموم شناخته شده می باشند. هدف از این تحقیق بیان، تخلص و بررسی میزان ایمونوزیستی پروتئین نو ترکیب BoNT/B-HcC به عنوان یک کاندید ایمونوزن در حیوان آزمایشگاهی موش بود.

مواد و روش ها: انتهای کربوکسیل ناحیه اتصال دهنده نورو توکسین بوتولینوم تیپ B به عنوان آنتی ژن مورد ارزیابی های بیوانفورماتیک قرار گرفت. پلاسمید pET17b-BoNT/B-HcC به روش شوک دمایی به باکتری *E. coli* BL21(DE3) منتقل شد. پروتئین نو ترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی، تخلص و با تکنیک SDS-PAGE بررسی گردید. پس از تأیید پروتئین نو ترکیب با روش وسترن بلات، ایمنی زایی پروتئین در موش آزمایشگاهی انجام شد. تیتراژ آنتی بادی با استفاده از الایزای غیرمستقیم ارزیابی و نتایج با آزمون آماری t ارزیابی و مقایسه گردید.

یافته ها: ژن بهینه سازی شده شاخص سازگاری کدون ۰/۹۹ را دارا شد. درصد کدون های با شیوع بالا در ژن به ۷۸ درصد بهبود یافت. توالی ساز ژنی ۱۱۱۹ جفت باز با برش آنزیمی تأیید و پروتئین نو ترکیب با وزن ۴۳/۸ کیلو دالتون در میزبان پروکاریوتی بیان گردید. میزان پروتئین خالص شده برای هر لیتر از محیط کشت ۲۳ میلی گرم بود. ایمن سازی موش ها پاسخ آنتی بادی سرمی را القا کرد و آنالیزهای آماری نشان داد که میزان تیتراژ آنتی بادی در مقایسه با نمونه کنترل تفاوت معنی داری دارد.

نتیجه گیری: آنتی ژن نو ترکیب طراحی شده آنتی ژنیسته بالایی نشان داد و می تواند به عنوان یک ایمونوزن علیه نورو توکسین بوتولینوم تیپ B در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کلستریدیوم بوتولینوم، واکسن، ایمنی زایی، آنتی بادی، بخش عملکردی

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

مقدمه

بوتولیسم، سندروم ناشی از مسمومیت غذایی، به دنبال 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 sausage، 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 بر اثر 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 (۲ و ۱).

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 از نظر ایمنی شناختی 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 (۵ و ۶).

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 اندوپیتیداز وابسته به فلز روی بوده که پروتئین‌های مسئول رهاسازی نوروترانسسمیترها را به طور اختصاصی در محل‌های خاص می‌شکافد (۷).

نوروتوکسین‌های بوتولینوم جزء قوی‌ترین سموم شناخته شده می‌باشند. در یک مورد بوتولیسم انسانی، تخمین زده شد که مرگ یک فرد دارای وزن ۱۰۴ کیلوگرم، ناشی از مصرف پنیری حاوی حدوداً $MLD_{50} \times 10^3 \times 3/5$ از نوروتوکسین تیپ B بوده است (۷). این نوروتوکسین‌ها به‌طور متوسط شامل، ۱۲۸۳ اسید آمینه هستند؛ البته این میزان در بعضی تیپ‌ها بیشتر و در بعضی دیگر کمتر است. تاکنون سیگنال پتیدی 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 تولید شده و احتمال می‌رود که

در طول مراحل رشد، مقادیری از آن با عبور از غشاء به محیط خارج سلولی وارد شود (۸ و ۹).

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 به موقع این آنتی‌توکسین، از ادامه تخریب و آسیب‌های عصبی و شدت بیماری جلوگیری می‌کند؛ اما با این حال، نمی‌تواند فلج ایجاد شده را احیاء نماید (۱۰ و ۱۱).

به‌طور کلی 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 سلول B و T است. هدف از این تحقیق تولید، تخلیص و بررسی ایمونوژنیتی پروتئین نو ترکیب 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 فسفات، بی‌کربنات سدیم، توتین ۲۰، اسید فسفریک، سدیم دی‌دسیل دی‌سولفات، اوره، اسید کلریدریک، کلرید سدیم، ایزوپروپانول، ۲-مرکاپتو اتانول، بروموفل 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 نیتروسولوز از شرکت کیاژن تهیه گردید. پلاسمید pET17b-BoNT/B-HcC حاوی توالی نوکلئیدی 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. سوپسترهای مولد رنگ O-phenylenediamine (OPD) و Diaminobenzidine (DAB) از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد. آنزیم‌های محدودکننده NdeI و BamHI از شرکت بایوساینس (آلمان) تهیه شد. برای تخلیص پروتئین نو ترکیب 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 نو ترکیب از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

طراحی بیوانفورماتیک پروتئین نو ترکیب 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 به عنوان آنتی ژن نو ترکیب برای تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک انتخاب شد. جهت سهولت در تخلیص یک دنباله هیستیدینی به انتهای توالی اضافه گردید. هم‌چنین جایگاه برش دو آنزیم محدودکننده NdeI و BamHI در دو انتهای ۳' و ۵' توالی نوکلئوتیدی

آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ تلقیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای به دست آوردن میزان رشد باکتری) به ۰/۶ ماده القاکننده پروموتور (IPTG) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به محیط کشت اضافه گردید. پس از ۵ ساعت هوادهی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و همزنی rpm ۱۲۰، رسوب باکتری در دمای ۴ درجه سلسیوس و rpm ۶۰۰۰ 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 می دهد 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. خروجی های ستون تخلیص به وسیله 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 بیان شده به کمک روش بردفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد سنجیده شد.

تائید پروتئین نوترکیب تخلیص شده:

برای تائید پروتئین نوترکیب، از روش وسترن بلات استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن (Mini Protean) Bio-rad و بافر انتقال (گلایسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و $\text{pH}=9.3$) روی کاغذ نیترو سلولز منتقل شد. به منظور پر کردن جایگاه های خالی (بلاکینگ) کاغذ به مدت یک شب در محلول ۵ درصد شیر خشک درون Phosphate-Buffered Saline/Tween (PBST) در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس سه مرتبه با PBST شستشو داده

اضافه شد. توالی نوکلئوتیدی جهت بیان در میزبان پروکاریوتی با سرور Genscript Optimisation Gene algorithm به آدرس

<https://www.genscript.com> بهینه سازی گردید. در

ادامه تجزیه تحلیل ترمودینامیکی و پیش بینی ساختار دوم mRNA با سرور MFOLD پیش بینی شد. در نهایت ویژگی های فیزیکوشیمیایی و میزان آنتی ژنیسته 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>)

پیش بینی شد. توالی نوکلئوتیدی طراحی شده به شرکت شاین جین (چین) جهت تولید ارسال گردید.

تراریخت نمودن باکتری *E. coli* BL21(DE₃) با پلاسمید pET17b-BoNT/B-HcC

پس از مستعد سازی سلول های *E. coli* BL21(DE₃) با کلسیم کلرید ۵۰ میلی مولار پلاسمید نوترکیب با روش شوک دمایی به سلول های مستعد منتقل شد. جهت غربالگری سلول های حاوی پلاسمید از محیط کشت LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت $200 \mu\text{g/ml}$ استفاده گردید. در ادامه جهت تائید سازه ژنی ابتدا یکی از کلونی ها جهت استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انتخاب شد (۱۲). پس از استخراج پلاسمید واکنش برش آنزیمی با دو آنزیم محدودکننده NdeI و BamHI انجام گرفت بدین صورت 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. در نهایت، 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 کلون ها میزان ۱ میلی لیتر در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع حاوی

شد. کاغذ 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 pH برابر 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 نو ترکیب 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 تیتراژ آنتی‌بادی با روش الایزا 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 پلی‌کلونال موجود در نمونه سرم فوق به روش الایزا غیر مستقیم مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که ۵ میکروگرم پروتئین نو ترکیب داخل ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوئینگ (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 آنتی‌بادی 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. در نهایت پس از رنگ گرفتن، واکنش با H_2SO_4 ۲/۵ مولار 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 کلموگراف-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.

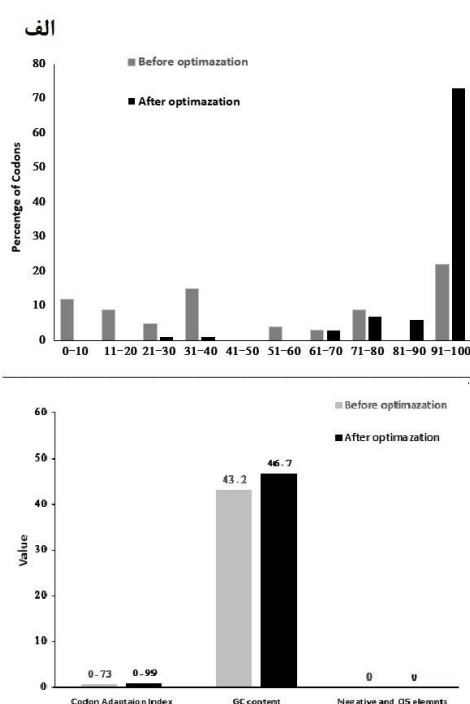
یافته‌ها

طراحی بیوانفورماتیک و تأیید 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 نوروکسین

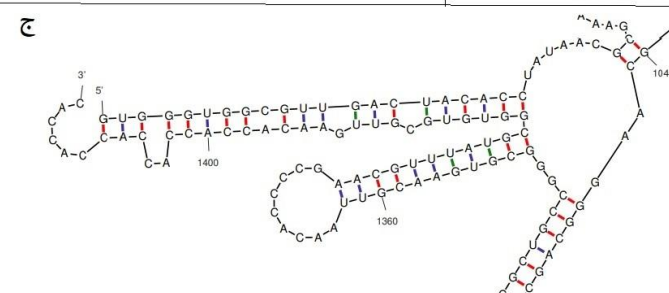
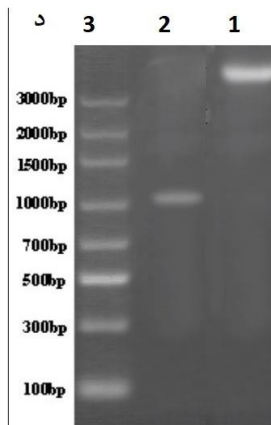
است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی mRNA نیز نشان داد که از پایداری بالایی برخوردار است و در بخش ۵' لوپ بزرگ دیده نمی‌شود (شکل ج-۱). وزن مولکولی الکتروفورز محصول برش با دو آنزیم محدودکننده، برابر ۱۱۱۹ جفت باز اندازه‌گیری شد که تأیید کننده سازه ژنی طراحی شده بود (شکل د-۱).

بوتولینوم تیپ B به عنوان آنتی ژن 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 داده شده است که میزان امتیاز ناپایداری آن برابر ۳۰/۵۱ بود که نشان‌دهنده پایداری بالای پروتئین نوترکیب طراحی شده



ب

طول سکانس	
۲۷۳ آمینواسید	۴۳/۸۱ کیلو دالتون
PI نظری	۵/۵۴
نیمه عمر در سلول های پستاندار	۳۰ ساعت
نیمه عمر در باکتری	> ۱۰ ساعت
نیمه عمر در مخمر	> ۲۰ ساعت
شاخص ناپایداری	۳۰/۵۱
میانگین هیدروپاتی	۰/۶۳۲



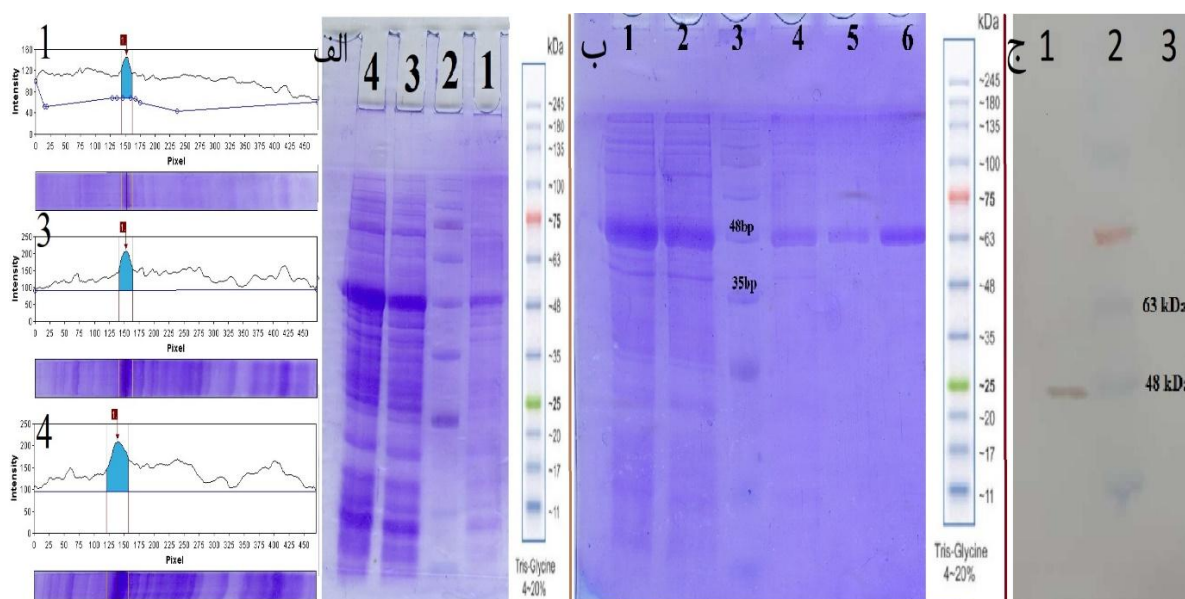
شکل ۱. نتایج حاصل از طراحی بیوانفورماتیک و تأیید سازه ژنی.

الف) ارزیابی پارامترهای سازه نوترکیب، قبل و بعد از بهینه‌سازی، ب) برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین نوترکیب پیش‌بینی شده با سرور ProtParam، ج) ساختار دوم پیش‌بینی شده بخش ۵' از mRNA توالی بهینه‌شده، د) نتیجه الکتروفورز نمونه حاصل از برش آنزیمی، ستون ۱ نمونه حاصل از برش آنزیمی با آنزیم محدودکننده NdeI، ستون ۲ نمونه حاصل از برش با آنزیم‌های محدودکننده NdeI و BamHI، ستون ۳ مارکر DNA

تأیید گردید (شکل الف-۲). جهت خالص‌سازی پروتئین نوترکیب از ستون Ni-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). به منظور تأیید محصول پروتئینی از روش وسترن بلات استفاده شد. باند وسترن در جایگاه صحیح

بیان، تخلیص و تأیید آنتی ژن نوترکیب: پس دریافت باکتری صلاحیت‌دار شده *E. coli* BL21(DE3) بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از IPTG یک میلی مولار و مدت زمان ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس صورت گرفت. میزان بیان پروتئین نوترکیب در ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به مارکر پروتئینی وزن مولکولی ۴۳/۸ کیلودالتون

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



شکل ۲. نتایج تولید و تخلص آنتی ژن نو ترکیب.

الف) نتیجه ژل بررسی بیان آنتی ژن نو ترکیب، ستون ۱ نمونه بدون القا، ستون ۲ مارکر پروتئینی سیناکلون، ستون ۳ نمونه القاشده با IPTG ۰/۵ میلی مولار، ستون ۴ نمونه القاشده با IPTG ۱ میلی مولار، بررسی های ستون ها با نرم افزار GelAnalyzer نشان داد که نمونه ستون ۴ در مقایسه با دیگر نمونه ها باند قوی تری در ناحیه ۴۵ کیلو دالتونی دارد، ب) نتیجه تخلص آنتی ژن نو ترکیب با ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA، ستون ۱ نمونه قبل از عبور از ستون، ستون ۲ نمونه پس از عبور از ستون، ستون ۳ مارکر پروتئینی سیناکلون، ستون ۴ 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 آنتی ژن نو ترکیب تخلص شده با استفاده از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی ضد هیستدین کانژوگه به HRP، ستون ۱: نمونه تخلص شده در ستون ۶ از بخش ب، ستون ۲ مارکر پروتئینی سیناکلون، ستون ۳ پروتئین BSA به عنوان کنترل منفی

OD مربوط به رقت ۱/۲۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۳/۵ بود.

بحث

بوتولسم بیماری کشنده ای است که توسط نوروتوکسین یکی از سروتپ های هفتگانه کلستریدیوم بوتولینوم ایجاد می شود. با توجه به مکانیسم مولکولی عملکرد توکسین، بخش زنجیره ی سبک وظیفه ی کاتالیتیکی سم را به عهده دارد. زنجیره سنگین نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B دارای دو دومین هست: بخش انتقالی به عنوان نیمه انتهای آمینی و بخش اتصال دهنده به عنوان نیمه انتهای کربوکسیلی. یکی از راه های مؤثر خنثی کردن نوروتوکسین بوتولینوم، مهار اتصال این سم به سیناپس نوروماسکولار با

میزان تیر آنتی بادی تولید شده در حیوان ایمن شده:

به منظور ارزیابی آنتی بادی تولید شده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق از روش الایزا غیرمستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر بار تزریق از موش های تست و شاهد خون گیری از چشم به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن ها، آزمایش الایزا انجام شد. نمودار میانگین تیر آنتی بادی در هر مرحله در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده تیر آنتی بادی نشان می دهد که در موش های ایمن شده با آنتی ژن کایمر به صورت زیر جلدی، تیر آنتی بادی به صورت معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود ($P < 0/01$) و هم چنین تفاوت معنی دار تیر آنتی بادی در تزریق چهارم نسبت به سوم بود ($P < 0/05$). بیشترین میزان

آنتی‌بادی‌هایی علیه بخش اتصال‌دهنده هست. Fairweather و همکاران در سال ۱۹۸۷ ثابت کردند که قطعه نو ترکیب انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین سم تتانوس (همولوژی بالایی با سم بوتولینوم دارد) که بطورنسی تخلیص شده بود، موش‌ها را در برابر چالش با دوز LD₅₀ ۱۰ این سم مصنوعی می‌نماید (۱۳). از آنجا که توالی و ساختار نورو توکسین تولید شده توسط کلستریدیوم تتانی و کلستریدیوم بوتولینوم بسیار شبیه به یکدیگر است، در نتیجه این روش برای ساخت واکسن‌های جدید علیه سم بوتولینوم نیز به کار گرفته شد (۱۴).

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

در تحقیق رستمی و همکاران بیان پروتئین نو ترکیب زیر واحد اتصال‌دهنده سم کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E در *E. coli* عمدتاً به دلیل حلالیت کم محصول نو ترکیب، 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 نو ترکیب و در نتیجه بازده کم است (۱۸). در تحقیق برادران علت احتمالی عدم بیان پروتئین نو ترکیب زیر واحد اتصال‌دهنده سم کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B، تجزیه و شکسته شدن پروتئین بلافاصله بعد از بیان آن در میزبان پروکاریوتی *E. coli* BL21 (DE₃) 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 روش‌های بیوانفورماتیکی نواحی ایمونوژنیک بخش اتصال‌دهنده سم انتخاب شد تا نیازی به بیان کل بخش اتصال‌دهنده سم نباشد. از طرفی نیز در طراحی کاست ژنی، توالی کد کننده پروتئین نورو توکسین در فرادست ژن کد کننده بخش ایمونوژنیک پروتئین اتصال‌دهنده سم قرار گرفت تا با افزایش میزان حلالیت امکان بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب فراهم گردد.

برای بیان آنتی‌ژن نو ترکیب از سیستم وکتوری pET که دارای پروموتور T₇ lac هست و یک پروموتور قوی محسوب می‌شود، استفاده گردید. از جمله دیگر ویژگی این سیستم، وجود نشانگر 6xHis Tag در دو طرف MCS است که تخلیص پروتئین نو ترکیب بیان‌شده را تسهیل می‌کند. برای نشان دادن قابلیت ایمنی‌زایی پروتئین در طول ایمنی‌زایی از روش الایزا بهره‌گیری شده است. تیر آنتی‌بادی خنثی‌کننده پس از تزریق چهارم به روش الایزا بیان‌گر پاسخ تام بدن نسبت به آنتی‌ژن تجویز شده هست که آنالیزهای آماری نمونه تست و شاهد با آزمون t مؤید این فرضیه بود.

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

و تیپ A نزدیک به ۷۰ درصد و با سم تتانوس ۵۰ درصد شباهت دارند و ایمن سازی موش ها با سم تتانوس می تواند علیه نوروتوکسین های بوتولینوم نیز ایمن زا باشد (۲۰). با توجه به ادله مطرح شده، ایمنی زایی با نوروتوکسین تیپ B در مقایسه با تیپ A می تواند علیه نوروتوکسین بوتولینوم و سم تتانوس، در عین کارآمدی بالاتر، ایمنی زاتر باشد که این فرضیه نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

در حال حاضر مهندسی ژنتیک و تولید نو ترکیب قطعات مختلف نوروتوکسین های بوتولینوم، خصوصاً ناحیه اتصال و معرفی آنها به عنوان کاندیداهای واکسن نو ترکیب با سرعت هرچه بیشتر ادامه دارد. در سال ۱۹۹۵ ناحیه اتصال تیپ A کلون شد و اثر پیشگیری آن در موش تأیید شد (۲۱). در سال ۲۰۰۴ ناحیه اتصال دهنده نوروتوکسین تیپ B کلون و خصوصیات اتصال دهنده گی آن بررسی شد (۲۲). ناحیه Hc تمام سرو تیپ های بوتولینوم در /شرشیا کلی به طور جداگانه، کلون و بیان شده و هم اکنون همه آنها به عنوان کاندیداهای واکسن بوتولسم، 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 ایمنی زایی 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 سرو تیپ B را بیان و تخلیص کنیم که نتایج تیر آنتی بادی پژوهش حاضر با پژوهش دیگر که بخش بزرگ تری (به وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون) از این ناحیه را انتخاب کرده بودند یکسان بود (۱۶).

نتیجه گیری

یافته های این تحقیق بیانگر این است که آنتی ژن نو ترکیب طراحی شده شامل ناحیه کوچک تر Hc از نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B، قدرت ایمونوژنیتی بالایی دارد و می تواند به عنوان یک کاندید ایمونوژن علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B باشد و در تحقیقات بعدی به عنوان یک کاندید واکسن مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

هیچ گونه تعارض منافی بین نویسندگان مقاله وجود ندارد و سهم نویسندگان بر اساس آیین نامه ارتقای اعضای هیئت علمی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری است. از دانشگاه جامع امام حسین به واسطه فراهم آوردن امکانات لازم جهت اجرای این تحقیق تقدیر و تشکر به عمل می آید.

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

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.