

## بررسی خصوصیات ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب زنجیره‌ی سبک سم بوتولینوم تیپ A (۸۴۰)

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

نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست‌شناسی [slmousavi@shahed.ac.ir](mailto:slmousavi@shahed.ac.ir)

دریافت: ۸۶/۲/۱ پذیرش: ۸۶/۸/۲۸

### چکیده

**زمینه و هدف:** سم بوتولینوم تیپ A به لحاظ ساختاری از یک زنجیره‌ی سبک به وزن ۵۰ کیلودالتون و یک زنجیره‌ی سنگین به وزن ۱۰۰ کیلودالتون تشکیل شده است که توسط یک باند دی‌سولفید به هم متصل شده‌اند. این پروتئین شامل سه بخش (*Domain*) است که بخش زنجیره‌ی سبک آن دارای فعالیت آنزیمی می‌باشد. در این پژوهش، هدف ما از تولید نوترکیب بخش عملکردی به دست آوردن یک پروتئین مناسب جهت بررسی ایمنی‌زایی آن است.

**روش بررسی:** باکتری در شرایط بی‌هوازی رشد داده شد سپس DNA کروموزومی به روش قلیایی استخراج گردید. پس از بررسی ترادف ژن مربوطه و طراحی پرایمر قطعه‌ی موردنظر از طریق واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) فراوان‌سازی شد. محصول PCR بر روی سه ناقل بیانی *pET28a*، *pRSETA* و *pET32a* همسانه‌سازی گردید. پروتئین حاصل از بیان توسط SDS-PAGE بررسی و صحت محصول با روش وسترن‌بلاتینگ و واکنش الیزا مورد تأیید نهایی قرار گرفت و سپس به وسیله‌ی کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص‌سازی شد، ایمنی‌زایی بر روی موش سوری در سه مرحله صورت گرفت و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در این تحقیق بالاترین بیان در شرایط غلظت ۰/۵ میلی‌مولار IPTG، جذب نوری ۰/۶ و زمان القای ۱۵ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به دست آمد. پروتئین بیان شده توسط ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص‌سازی گردید. آنتی‌بادی حاصل از تزریق پروتئین نوترکیب توانست مانع از مرگ موش‌ها در دوز  $LD_{50}$  ۱۰۰ شود.

**نتیجه‌گیری:** هرچند بیان ژن‌هایی با درصد بالایی از AT در سیستم *E. coli* ضعیف می‌باشد ولی ما در این تحقیق توانستیم بیان مناسبی به دست آوریم. تخلیص پروتئین نوترکیب در مراحل اولیه به دلیل اتصال ضعیف هیستیدین انتهایی به ستون دشوار بوده که با تغییر در روش‌ها این پروتئین تا ۹۰ درصد خالص‌سازی شد. در بحث ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب موردنظر نیز مشخص شد که آنتی‌بادی‌های تولید شده در مقایسه با آنتی‌بادی تولید شده علیه بخش اتصال‌دهنده از ایمنی‌زایی پایینی برخوردار است.

**واژگان کلیدی:** کلاستریدیم بوتولینوم تیپ A، بخش عملکردی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، پروتئین نوترکیب

\* دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار دانشگاه شاهد

\*\* کارشناس ارشد سلولی ملکولی، دانشگاه امام حسین

\*\*\* کارشناس ارشد سلولی مولکولی، دانشگاه امام حسین

\*\*\*\* دکترای تخصصی میکروبی‌شناسی، استادیار دانشگاه بقیه‌ا... و دانشگاه علوم پزشکی زنجان