

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

پذیرش: ۸۶/۷/۲

دریافت: ۸۶/۲/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: سم‌های عصبی کلستری‌دیوم آزادسازی نوروترانسمیترها را به وسیله‌ی پروتئولیز اختصاصی و انتخابی SNAP-25، سیناپتوبروین VAMP و سینتاکسین، مهار می‌کنند. پروتئین SNAP-25 یکی از پروتئین‌های تشکیل‌دهنده‌ی مجموعه‌ی لنگراندازی (Docking complex) در پایانه‌های عصبی است. این پروتئین سوپرسترای سم عصبی بوتولینوم، سروتین‌های A، C و E می‌باشد. هر کدام از این سروتین‌ها به طور اختصاصی و در جایگاه ویژه SNAP-25 را در یک پیوند آمیدی برش داده و از تشکیل مجموعه‌ی لنگراندازی و در نهایت آگزوسیتوز نوروترانسمیترها و انتقال پیام عصبی جلوگیری می‌کنند. در آزمایشگاه می‌توان با تولید SNAP-25 به روش نوترکیب از آن به عنوان سوپرسترای سم، در تشخیص تیپ‌های 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 بلائینگ 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 سوپرسترا جهت تشخیص سم در آزمایشگاه می‌تواند تا اندازه‌ای مشکلات موجود در روش‌های قبلی را مرتفع سازد.

واژگان کلیدی: نوروتوکسین بوتولینوم تیپ 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 میکروپزشناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، دانشگاه علوم پزشکی زنجان