

همسانه سازی (کلونینگ)، بهینه سازی شرایط بیان، تخلیص و ارزیابی خواص ایمونولوژیک بخش هیدروفلیک آنتی ژن Core ویروس هپاتیت C، ابراز شده تحت پرموتر T7-araBAD در E.coli

محمدرضا آقاصادقی^۱، سیدمهدی سادات^۲، دکتر صفیه امینی^۳، دکتر آگاتا بودکوسکا^۴، دکتر فرزین روحوند^۵

چکیده

سابقه و هدف

آنتی ژن Core ویروس هپاتیت C، یک پروتئین چندکاره با ارزش های ویژه در اهداف تشخیصی و تحقیقات پاتوفیزیولوژیک می باشد. اکثر این خواص مربوط به بخش هیدروفل (آمینو اسید: ۱۲۲-۲) این آنتی ژن بوده و دسترسی به روشی برای تولید مقادیر انبوه از این پروتئین در فرم خالص و طبیعی، از اهمیت به سزایی برخوردار است.

به این جهت با هدف کلونینگ ژن، ابراز پروتئین با بازدهی بالا، تخلیص در فرم طبیعی و ارزیابی خواص ایمونولوژیک این بخش از پروتئین Core ویروس هپاتیت C در یک سیستم پرموتری T7 تحت القا آرابینوز، مطالعه حاضر صورت پذیرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، از روش PCR برای جداسازی ژن و از حامل pIVEX2.3 جهت کلونینگ ژن با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک استفاده شد. آنالیزهای پروتئین توسط SDS-PAGE، وسترن بلات و الیزا بر روی سرم بیماران HCV مثبت انجام شد و تخلیص پروتئین به روش کروماتوگرافی جذبی بر روی نیکل (Ni-NTA) صورت پذیرفت.

یافته ها

ژن مربوط به بخش هیدروفل HCV Core با موفقیت و با ترادف صحیح، جداسازی و به طور مناسب در کاست بیانی کلون گردید. سیستم القا آرابینوز به طور مؤثر، پس از ۳ ساعت، قابلیت تولید پروتئین نو ترکیب با بازدهی ۳/۵mg/L را داشته و پروتئین تولید شده به سهولت و در یک مرحله قابلیت تخلیص شدن تا حدود ۸۰ درصد بر روی ستون جذبی Ni-NTA را دارا می باشد. پروتئین خواص آنتی ژنیک خود را در ساختمان طبیعی حفظ می نماید.

نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار نشان داده شده که سیستم القا آرابینوز به طور مؤثر، قابلیت کاربرد در تولید بخش هیدروفل پروتئین Core را دارد و پروتئین تخلیص شده، احتمالاً در شرایط طبیعی از لحاظ ایمونولوژیک، قابلیت کاربرد برای اهداف تحقیقی و تشخیصی را داراست.

کلمات کلیدی: آنتی ژن Core ویروس هپاتیت C، کروماتوگرافی Ni-NTA، القا آرابینوز، pIVEX 2.3

تاریخ دریافت: ۸۴/۴/۲۹

تاریخ پذیرش: ۸۴/۸/۲۴

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی- مربی انستیتو پاستور ایران

۲- کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی- انستیتو پاستور ایران

۳- Ph.D ویروس شناسی - استادیار انستیتو پاستور ایران

۴- Ph.D ایمونولوژی - دانشیار انستیتو پاستور پاریس

۵- مؤلف مسئول: Ph.D بیوتکنولوژی- استادیار انستیتو پاستور ایران- خیابان پاستور- پلاک ۶۹ - کد پستی: ۱۳۱۶۴

مقدمه

در حال حاضر عفونت‌های ناشی از ویروس هپاتیت C (HCV)، یکی از مسایل عمده بهداشت جهانی بوده و بیش از ۱۷۰ میلیون نفر به صورت مزمن به این ویروس آلوده می‌باشند. بیشترین میزان آلودگی مربوط به مناطق شمالی و مرکزی آفریقا و شرق و جنوب شرقی آسیا (۱۰٪) می‌باشد. میزان شیوع این آلودگی در کشورهای خاورمیانه حدود ۵ تا ۳ درصد بوده و در حال افزایش است (۱). تا کنون هیچ‌گونه واکسن پیشگیری کننده برای این عفونت فراهم نیامده و درمان‌های ضد ویروسی فقط در ۴۵ درصد بیماران، پاسخگوی درمان بوده‌اند، در نتیجه سالانه حدود ۱۰۰۰۰۰ نفر در جهان دچار عوارض ناشی از این عفونت مانند سیروز و سرطان کبدی می‌گردند (۲).

ویروس هپاتیت C، یک RNA ویروس تک رشته‌ای مثبت با ژنومی حدود ۹/۶kb و عضوی از خانواده فلاوی ویروس‌ها (Flaviviridae) می‌باشد. ژنوم این ویروس، کدکننده یک پلی پروتئین با حدود ۳۰۰۰ آمینواسید است، که در نهایت چهار پروتئین به عنوان پروتئین ساختاری (P, E₂, E₁, C) و بقیه (NS_{5b}, NS_{5a}, NS_{4b}, NS_{4a}, NS₃, NS₂) به عنوان پروتئین‌های غیرساختاری^۱ یا کارآ معرفی شده‌اند (۳).

در این میان پروتئین ساختاری Core (C)، یک پروتئین چندکاره^۲ می‌باشد که علاوه بر ایفای نقش اصلی در تولید بخش کسید ویروس، نقش به‌سزایی هم در پاتوژنز این بیماری داراست و از طریق تداخل با سلوهای دندریتیک، تداخل با گیرنده‌های لفتووکسین و C_{1q} که در تکثیر لفتوسیت‌های T اهمیت دارند و همین‌طور تداخل با سیستم ترانسژنیک Fas/TNF، در القای مرگ سلولی^۳ تأثیرگذار خواهد بود (۴-۷). در مدل‌های موش‌های هپاتیت C، پروتئین Core منجر به خاموشی سیستم ایمنی، تجمع چربی در سلول‌ها^۴ و سرطان کبدی شده است (۹، ۸). تمامی این مشاهدات نمایانگر نقش ویژه این پروتئین در پاتوژنز عفونت هپاتیت C می‌باشد ولی مکانیسم‌هایی که توسط آن پروتئین Core ایفای چنین نقشی را به‌عهده دارد، همچنان ناشناخته است و برای مطالعه و تعیین اجزای سلولی که با پروتئین Core HCV تداخل می‌کند، نیاز به

مقادیر زیادی از این پروتئین به صورت خالص و در شکل طبیعی وجود دارد.

از طرف دیگر، روش‌های تشخیص عمومی مربوط به عفونت HCV، بر پایه ردیابی آنتی‌بادی‌های موجود در سرم علیه پروتئین‌های این ویروس می‌باشد و از آن‌جا که اولین آنتی‌بادی قابل تشخیص علیه این ویروس در سرم خون فرد آلوده برضد پروتئین Core ساخته می‌شود، در نتیجه این آنتی ژن جزء مهمی در ساخت کیت‌های تشخیصی بوده و در نتیجه نیاز به مقادیر فراوان این آنتی ژن برای ساخت کیت‌های تشخیصی می‌باشد (۱۱، ۱۰).

پروتئین Core دارای سه بخش^۵ اصلی است. بخش اول (آمینواسید ۱۲۲-۱) یا بخش هیدروفیلی این پروتئین که بخش اصلی مربوط به اتصال RNA ویروس بوده و بسیاری از اعمال و فعالیت‌های بیولوژیک و یا پاتوفیزیولوژیک این پروتئین توسط این بخش انجام می‌شود و آنتی‌بادی‌های شناخته شده در سرم علیه این بخش از پروتئین ساخته می‌شوند. بخش دوم (آمینواسید ۱۷۴-۱۲۳) هیدروفوبیک بوده و توانایی اتصال به قطرات لیپید را دارا می‌باشد و بخش سوم (۱۹۲-۱۷۴ آمینواسید) که در طی مورفوژن این پروتئین، توسط پپتیدازهای سلولی از پروتئین جدا می‌شوند (۱۲).

در مطالعه حاضر با هدف دست‌یابی به یک سیستم ارزان و ساده برای تولید انبوه و خالص پروتئین Core HCV با بازدهی زیاد، برای نخستین بار بخش هیدروفیل این آنتی ژن به صورت نوترکیب^۶ تحت القا آرایینوز و در سیستم پروموتری T₇-araBAD (کمپانی اینویترژن) در باکتری *E. coli* BL21-AI، ابراز و با ایجاد یک برچسب هیستیدینی (6X His Tag) در بخش انتهایی اسیدی^۷ پروتئین به‌وسیله کروماتوگرافی جذبی نیکل (Ni⁺) در شرایطی طبیعی تخلیص و خواص ایمونولوژیک آن مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۳).

- 1- Non-structural
- 2- Multifunctional
- 3- Apoptosis
- 4- Steatosis
- 5- Domain
- 6- Recombinant
- 7- C-Terminal

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. روش های مولکولی: در این پژوهش ژن مربوط به پروتئین Core و ویروس HCV از ناحیه ۱۲۲-۲ توسط یک جفت آغازگر^۱ طراحی شده به صورت زیر بود:

(Forward): آغازگر جلویی

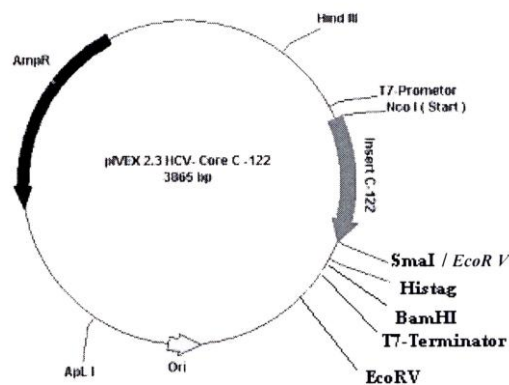
5' gtc cacc ATG ggc acg att ccc aaa cct 3'
NcoI

(Reverse): آغازگر معکوس

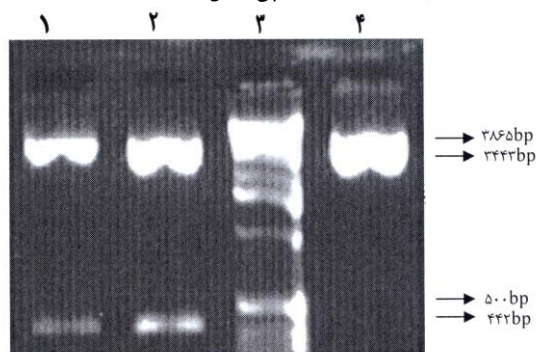
5' gtc tatc ga tat cct tac cca aat tgc gcg a 3'
EcoRV

به کمک آنزیم VentR DNA pol. (بیولب نیو انگلند) دارای خواص اصلاح^۲، از روی ژن اصلی که مربوط به تیپ 1b بوده کپی برداری و در سکانس های برشی NcoI-SmaI در پلاسمید pIVEX 2.3 (روش) کلون گردید (۱۶). انجام مراحل PCR با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد (Hot Start) آغاز گردیده و با انجام ۳۰ سیکل متوالی (۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه) ادامه یافته و در نهایت با مرحله نهایی به مدت ۷۲ درجه سانتی گراد خاتمه یافت. طراحی آغازگرها به صورتی بوده است که دو مکان برشی EcoRV، NcoI در ابتدای 5 آن ها طراحی شود تا ضمن آن که کدون آغازی ATG در خود محل NcoI قرار گیرد، به طور هم خوان^۳ در امتداد برچسب هیستیدینی (6X His tag) و سکانس های تمام کننده (T7 Terminator) نیز مستقر گردد. لازم به ذکر است که مکان های برشی SmaI و EcoRV بعد از برش، به صورت انتهای صاف^۴ بوده و قابل جوش در یکدیگر می باشند (شکل ۱). وکتور نوترکیب حاصل، پس از انجام واکنش های جوشی^۵، به سوی E.coli DH5 α ترانسفورم شده و پس از تکثیر و استخراج پلاسمید برای تأیید حضور قطعه و پلاسمید، مورد بررسی هضم آنزیمی قرار گرفت (شکل ۲-الف). کلیه روش های مولکولی بر طبق پروتکل های شرکت های سازنده کیت ها انجام پذیرفت و برای استخراج پلاسمید از کیت معینی پرپ کورپلاسمید (ساخت بیوسیستم) و برای انجام واکنش جوش از کیت لیگاز T4 DNA (روش) استفاده شد (۱۳). برای اطمینان از عدم بروز موتاسیون و

صحت ترادف کاست بیانی، پلاسمید استخراج شده توسط روش سکانسینگ (Sanger) و با کیت بر طبق روش شرکت سازنده انجام پذیرفت (شکل ۲-ب). در نهایت برای ابراز پروتئین، پلاسمید نوترکیب به باکتری BL21-AI توانا شده^۶ (اینویترژن) توسط کلرید کلسیم، ترانسفورم گردید. این باکتری قابلیت کنترل دقیق بیان ژن خارجی^۷ به خصوص برای پروتئین های سمی، به وسیله یک کپی کروموزومی از RNA پلیمرز مربوط به ara BAD پروموتور که قابل القا توسط آرابینوز می باشد را داراست (۱۴).



شکل ۱: ساختار وکتور بیانی pIVEX2.3 HCV-Core C-122 و محل قرارگیری ژن Core در حد فاصل مکان های برشی (EcoRV) NcoI-SmaI
Ori: مبدا همانندسازی، T7: پروموتورفاژ T7، AmpR: ژن کدکننده مقاومت به آمپی سیلین



شکل ۲: الف: بررسی نقشه آنزیمی وکتور pIVEX2.3 HCV-Core C-122 و تأیید آن توسط آنزیم های محدودکننده
ستون های ۱ و ۲: وکتور بیانی هضم شده با آنزیم NcoI و BmaHI (قطعات با اندازه های ۴۲۲bp، مربوط به محصول PCR ژن Core و ۳۴۴۳bp، بازمانده پلاسمیدی باشد) ستون ۳: مارکر kb (Roche)، ستون ۴: پلاسمید اولیه pIVEX2.3 بریده شده (Cut) به وسیله آنزیم های همسانه سازی (BamHI، NcoI) می باشد که فاقد قطعه کلون شده است (۳۸۶۵bp).

- 1- Primer
- 2- Proof Reading
- 3- In frame
- 4- Blunt end
- 5- Ligation
- 6- Competent
- 7- Tight regulation

شکل ۲: ب: ترادف (سکانس) HCV-Core (2-122aa) در پلاسمید pIVEX2.3 و تأیید صحت کاست بیانی

بیان‌کننده پروتئین و شرایط بهینه بیان پروتئین، تولید پروتئین در مقیاس ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتر انجام شد. برای بررسی مقایسه‌ای بین نمونه‌ها از لحاظ میزان ابراز پروتئین، کلیه نمونه‌ها پس از تعیین دانسیته باکتری‌ها با اندازه‌گیری جذب نوری در ۶۰۰nm و به روش SDS-PAGE در ژل ۱۵ درصد بررسی و مقایسه گردیدند. جهت یکسان‌سازی غلظت کلی پروتئین در نمونه‌های قبل و بعد از القا جهت انجام SDS-PAGE، جذب نوری OD_{۶۰۰} باکتری‌ها در محیط کشت ثبت شده و با ضرب کردن در عدد ۷۱، میزان افزودن بافر نمونه SDS-PAGE (براساس میکرولیتر) به رسوب باکتری‌ها به‌دست آمد. در مرحله بعد به همان میزان نیز آب مقطر به نمونه‌ها افزوده شده، به این ترتیب با ریختن مقدار ۱۲ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک می‌توان انتظار داشت که غلظت کلی پروتئین‌ها در ستون‌های ایجاد شده بر روی ژل تقریباً یکسان باشد و تنها در باند مربوط به پروتئین بیان شده تفاوت دیده شود.

در مطالعه حاضر، با هدف تخلیص پروتئین محلول در شکل فضایی طبیعی^۱ و با توجه به حضور برجسب

پس از ترانسفورماسیون باکتری‌های BL21-AI به‌وسیله پلاسمید نو ترکیب pIVEX2.3، تعدادی از تک کلون‌های حادث بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب و ابتدا یک کشت اولیه در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت TY2X حاوی آمپی‌سیلین تهیه شد و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با چرخش rpm ۱۲۰، در محیط کشت تازه، به میزان ۱/۱۰۰ رقیق شد، به‌دنبال انکوباسیون و رسیدن به جذب نوری ۰/۶ در ۶۰۰nm، القاکننده آرابینوز (سیگما) با غلظت نهایی ۰/۲ درصد به محیط افزوده شده و برای مدت ۳ ساعت دیگر انکوباسیون در همان شرایط قبلی ادامه پیدا کرد. پس از گذشت این زمان، ۱ میلی‌لیتر از کشت مذکور جهت بررسی به‌وسیله SDS-PAGE رسوب داده شد و بر روی آن الکتروفورز صورت گرفت. در مورد نمونه‌های کنترل، شرایط کشت کاملاً به‌صورت بیان شده در بالا صورت گرفته و تنها مرحله اضافه کردن آرابینوز کاملاً حذف شده است. به منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین نو ترکیب، پارامترهایی نظیر نوع محیط کشت، دمای رشد و مدت زمان القا بررسی شدند تا بهترین شرایط بیان از لحاظ تجربی تعیین گردد. پس از دست‌یابی به بهترین کلون

نشده توسط شستشو با محلول PBS-T^۱ از محیط عمل خارج شده و آنتی بادی ثانویه کونژوگه با پراکسیداز با رقت ۱/۵۰۰۰ اضافه گردید و پس از افزودن سوبسترای رنگزا (DAB)، باندهای پروتئینی مورد نظر مشاهده شدند. برای بررسی قابلیت تشخیص پروتئین نوترکیب و جهت انجام الیزا، از آنتی ژن خالص با غلظت ۳ μg/ml در بافر کربنات-بی کربنات، برای چسباندن^۴ در ته پلیت الیزای ۹۶ خانه‌ای به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده شد، پلیت‌ها قبل از افزوده شدن سرم بیماران به وسیله محلول PBS حاوی Twee۲۰، ۰/۰۵ درصد، شستشو و سرم‌ها، شامل ۶ سرم بیمار HCV مثبت، (جمع‌آوری و تأیید شده توسط سازمان انتقال خون ایران) و سرم فرد غیرآلوده، تأیید شده با کیت استاندارد (LTD، لیون بیوتک آسیا، Anti-HCV) با رقت‌های ۱/۱۰۰ الی ۱/۶۴۰۰، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد درون پلیت پوشانده شده و انکوبه شد، پس از شستشوی نهایی، با استفاده از آنتی بادی ضدایمونوگلوبولین انسانی متصل به آنزیم پراکسیداز و سوبسترای TMB، پاسخ در طول موج ۴۵۰ nm قرائت گردید و نتایج حاصل با سرم فرد سالم مقایسه شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آنالیز آنزیمی (شکل ۲-الف) و تعیین ترادف سکانس ژن Core (شکل ۲-ب) نمایانگر آن بود که کاست بیانی به همراه پروموتور T₇، محل اتصال ریبوزوم^۵، کدون آغازی (ATG)، قطعه ژن (Core ۱-۱۲۲)، برچسب هیستیدینی (6X His tag) و سکانس‌های پایانی^۶، در ترادف مناسب^۷ و به صورت پشت سرهم قرار گرفته‌اند.

بررسی و آنالیز الکتروفورز پروتئین نمایانگر آن بود که میزان تولید پروتئین نوترکیب (HCV Core) پس از ۳ ساعت از القای آرابینوز به حداکثر خود می‌رسد و پس از آن میزان تولید نسبتاً ثابت می‌ماند (شکل ۳-الف).

6X His tag در پروتئین نوترکیب، از روش کروماتوگرافی جذبی با استفاده از ژل آگارز Ni-NTA و براساس روش عمومی MCAC^۱، بر طبق پروتکل شرکت سازنده (QIAGEN) با کمی تغییرات استفاده شد، به‌طور خلاصه رسوب باکتریایی پس از القا، در محلول لیزکننده (pH=۸، ۳۰۰ mM NaCl، ۵۰ mM NaH₂PO₄) حاوی ۵ میلی‌مول ایمیدازول کاملاً محلول شد و پس از اضافه کردن محلول لیزوزیم (۱ mg/mL) و ۳۰ دقیقه انکوباسیون در یخ، سلول‌ها به وسیله روش سونیکیشن توسط ۶ پالس، با قدرت ۶۰ مگاهرتز به مدت ۲۰ ثانیه و با تناوب‌های ۱۵ ثانیه‌ای توسط پروب ۱۴ میلی‌متری خرد شد، جرم سلولی به وسیله سانتریفوژ (۱۰ دقیقه در ۱۰/۰۰۰ rpm و ۴ درجه سانتی گراد) جدا گردید. سپس سوپ محلول به ستون آگارز Ni-NTA اضافه شده و پس از خروج کامل محلول از انتهای ستون، محلول شستشو (مشابه محلول لیزکننده، که فقط حاوی ۲۰ میلی‌مول ایمیدازول است) اضافه گردید و پس از خروج کامل، پروتئین نوترکیب با محلول الوشن حاوی ۲۵۰ میلی‌مول ایمیدازول از ستون تخلیص شد. میزان تولید پروتئین نوترکیب پس از تخلیص به روش اندازه‌گیری جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر و همین‌طور با استفاده از کیت BCA (پیرس) تعیین شد. در روش فوق به‌طور خلاصه، پس از تهیه رقت‌های متناسب در نمونه و افزودن محلول‌های A و B با نسبت‌های مشخص شده در کیت، به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس در OD_{۵۶۲nm} عمل قرائت انجام و براساس نمودار استاندارد میزان غلظت پروتئین خالص شده محاسبه گردید.

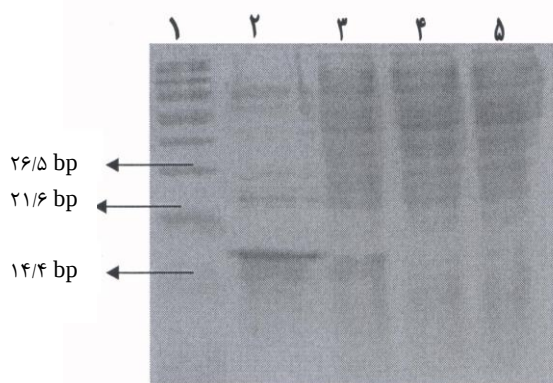
ارزیابی خواص آنتی ژنیک پروتئین Core نوترکیب

برای ارزیابی خواص آنتی ژنیک و بررسی احتمال قابلیت کاربردهای تشخیصی پروتئین Core نوترکیب، از دو روش الیزا و وسترن بلائینگ^۲ استفاده شد. در تحقیق حاضر، وسترن بلائینگ به روش استاندارد با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی اختصاص علیه HCV Core به نام VT (Val بیوتک) انجام پذیرفت (۱۶، ۱۵). به‌طور خلاصه، پس از انتقال باندهای پروتئینی به غشای نیتروسلولزی و انکوباسیون با VT (رقت ۱/۲۰۰۰)، آنتی بادی‌های متصل

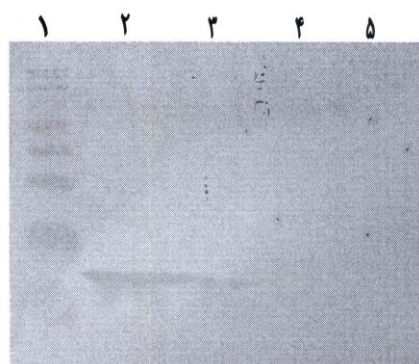
1- Metal Chelated Affinity Chromatography
2- Western blotting
3- Phosphate buffer Salin-Tween20
4- Coating
5-Ribosome binding site
6- T₇ Termination Sequence
7- in Frame

در نهایت آنالیزهای ایمونولوژیک توسط وسترن بلاتینگ نمایانگر آن است که پروتئین نوترکیب به خوبی توسط آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی علیه آنتی ژن VT، Core، Val (بیوتک) شناسایی می شود و خواص آنتی ژنیک لازم را دارا می باشد (شکل ۴).

همچنین استفاده از این آنتی ژن برای تشخیص آنتی بادی علیه Core موجود در سرم مثبت انسانی، که با استفاده از تست الیزا و نتایج حاصل که در رقت ۱/۳۲۰۰ و به صورت تکرار سه تایی انجام شد، نمایانگر آن است که این آنتی ژن احتمالاً قابلیت امکان کاربرد در مصارف تشخیصی را دارا می باشد (نمودار ۱).



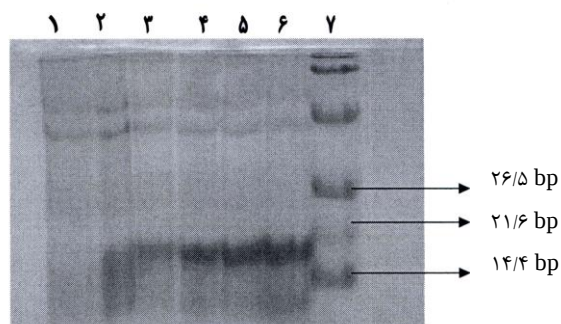
شکل ۴- الف: الکتروفورز SDS-PAGE



شکل ۴- ب: وسترن بلاتینگ

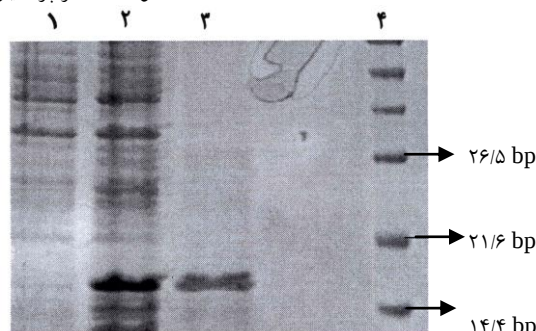
شکل ۴: الکتروفورز و وسترن بلاتینگ نمونه های قبل و پس از القا ستون ۱: مارکر پروتئین Pre-Stained، ستون ۲: پروتئین تخلیص شده به روش Native، ستون ۳: نمونه پس از القا، ستون ۴ و ۵: نمونه قبل از القا

همین طور دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دانسیته سلولی ۰/۶ در OD_{۶۰۰nm} بیشترین بازدهی را در این سیستم داشته است (نتایج نشان داده نشده). همان طور که در شکل ۳-الف به وضوح دیده می شود، پس از القای آرابینوز، ابراز پروتئین نوترکیب آغاز و پس از یک ساعت کاملاً قابل مشاهده است و سیستم تقریباً بدون نشتی^۱ و یا با حداقل نشتی کار می کند (شکل ۳-الف). اندازه باند این پروتئین از لحاظ تئوری و محاسباتی با اندازه ۱۷K.D پیش بینی می شود. همان طور که در شکل ۳-ب دیده می شود، تخلیص پروتئین نوترکیب در یک مرحله تا حدود ۸۰٪ ممکن می باشد (دانستیمتری ژل SDS-PAGE، software Lab Works) که این میزان تخلیص برای اکثر کاربردهای تحقیقی و تشخیصی مناسب است. اندازه گیری های انجام شده به روش اندازه گیری OD_{۲۸۰} و کیت پروتئین سنجی، نمایانگر آن است که با استفاده از این سیستم امکان تولید پروتئین تخلیص شده به میزان ۳/۵mg/L وجود دارد.



شکل ۳-الف: بهینه سازی شرایط بیان- بررسی مدت زمان القا

ستون ۱: نمونه قبل از القا، ستون ۲: نمونه در زمان القا، ستون ۳: نمونه یک ساعت پس از القا، ستون ۴: نمونه دو ساعت پس از القا، ستون ۵: نمونه سه ساعت پس از القا، ستون ۶: نمونه چهار ساعت پس از القا، ستون ۷: Fermentas مارکر پروتئینی



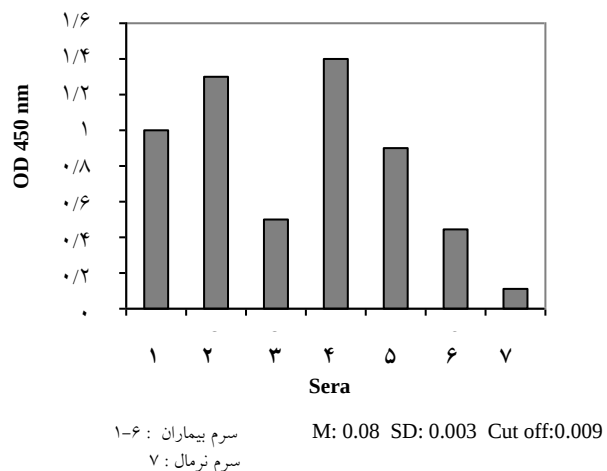
شکل ۳-ب: الکتروفورز نمونه های قبل و پس از القای پروتئین تخلیص شده ستون ۱: نمونه قبل از القا، ستون ۲: نمونه در زمان القا، ستون ۳: پروتئین های تخلیص شده به روش Native، ستون ۴: مارکر Fermentas

برچسب هیستیدینی در ناحیه آمینی و یا سیستم‌های فیوژنی (MBP)^۲ یا (GST)^۳ بررسی شده بود که دارای بازدهی حدود ۱-۳mg/L بوده است (۲۰، ۲۱). اما در تمام روش‌های قبلی، تخلیص پروتئینی به صورت دنا توره و با کاربرد غلظت بالایی از اوره صورت پذیرفته و در نتیجه پروتئین ساختمان طبیعی خود را از دست می‌داده است. به علاوه در گزارش‌های قبلی، حضور محصولات نیمه تمام از HCV Core به دلیل رهاسازی ریبوزوم^۴ گزارش شده است، اما طراحی و کاربرد سیستم pIVEX2.3 در تحقیق حاضر که برچسب هیستیدین را در انتهای اسیدی^۵ تعبیه می‌کند، منجر به تخلیص تنها محصولات کامل پروتئینی می‌گردد و نتایج تحقیق حاضر هم گواه آن است که اندازه محصولات به وجود آمده، با اندازه پیش‌بینی شده از طریق محاسبات نرم‌افزاری Lab Works (17kD) هم‌خوانی داشته و علاوه بر این در آنالیز وسترن‌بلات هم فقط یک باند مربوط به قسمت تخلیص وجود دارد، به علاوه نتایج وسترن‌بلاتینگ و الیزا، دارا بودن خواص مناسب آنتی ژنیک این محصول را هم تأیید می‌کنند.

به طور خلاصه مطالعه حاضر روش جدیدی را برای تولید و تخلیص طبیعی بخش هیدروفیلیک (۱۲۲-۲) آنتی ژن HCV Core با خواص مناسب آنتی ژنیک با بازدهی بسیار زیاد جهت کاربردهای وسیع تحقیقی و احیاناً تشخیص ارایه داده است. چنانچه در ساخت کیت‌های تشخیصی نسل دوم و سوم الیزا، پروتئین Core (3-22)، جزو مهم این کیت‌ها را تشکیل داده است (۲۲). تعیین دقیق، احتمال کاربرد تشخیصی این پروتئین با مطالعه‌ای جامع بر روی سرم بیماران آلوده به هپاتیت C و مقایسه آن با کیت‌های استاندارد تشخیصی، در آینده امکان کاربرد آن را در کیت‌های تشخیصی میسر خواهد ساخت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نمایانگر آن بود که ژن مربوط به بخش هیدروفیل آنتی ژن Core و ویروس هپاتیت C



نمودار ۱: نتایج آزمایش الیزا سرم بیماران HCV با پروتئین نو ترکیب C122

بحث

در مطالعه حاضر بنا به اطلاع ما، برای نخستین بار امکان ابراز پروتئین نو ترکیب HCV Core در یک سیستم القا توسط آرابینوز ارایه شده است. علاوه بر این، نتایج حاصل از این تحقیق امکان تولید بخش هیدروفیلیک آنتی ژن را با بازدهی بالا و تخلیص آن به فرم طبیعی (Native)، میسر می‌سازد.

سیستم القای آرابینوز تاکنون برای ابراز پروتئین‌های دیگر از جمله p53 انجام پذیرفته است (۱۷، ۱۴). تقریباً، تمامی نواحی دارای آنتی ژنیسیته شناخته شده در پروتئین HCV Core، در بخش هیدروفیلیک آن قرار دارند و بسیاری دیگر از خواص بیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک این پروتئین مانند اتصال به RNA یا برهم کنش با Fcy, IgG انسانی مربوط به این بخش بوده که تحقق و انجام آن‌ها وابسته به ساختمان طبیعی این پروتئین می‌باشد (۱۶). در مطالعه حاضر امکان تخلیص طبیعی و یک مرحله‌ای این پروتئین به صورت محلول و بازدهی برابر ۳/۵mg/L ارایه گردید که امکان به کارگیری این پروتئین را در موارد تحقیقی و احیاناً تشخیصی به خوبی میسر ساخت. در گذشته امکان ابراز پروتئین HCV Core در سلول‌های حشره‌ای و سلول‌های حیوانی بررسی شده بودند که با میزان ابراز و بازدهی کم همراه بوده‌اند (۱۸، ۱۹).

همچنین امکان بیان این پروتئین در باکتری *E. coli* و تحت القای IPTG^۱ در سیستم‌های PQE30 با قراردادن

1- Isopropyl β-D-1- Thiogalactopyranoside
2- maltose binding protein
3- Glutathione S- Transferase
4- Ribosomal Release
5- C-Terminal

کاربردهای تحقیقی و احتمالاً تشخیصی به خوبی حفظ می نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله، از حمایت های بی دریغ دکتر تقی خانی رییس محترم سابق انستیتو پاستور ایران و همچنین همکاری صمیمانه خانم دکتر سیما رأفتی و دکتر بهروز وزیری که ما را در انجام تحقیق حاضر یاری فرمودند کمال تشکر و تقدیر را دارند.

به طور مناسب به وسیله آغازگرهای طراحی شده ما قابل تکثیر و جاسازی در حامل pIVEX2.3 می باشد و این حامل و سیستم القای آرابینوز در پروموتور T₇، قابلیت ابراز این آنتی ژن را در باکتری *E.coli* BL21-AI دارا بوده و در شرایط بهینه میزان بازدهی برابر ۳/۵mg/L می باشد و پروتئین نوترکیب حاصله به سهولت به روش یک مرحله ای و در ساختار طبیعی به روش کروماتوگرافی Ni-NTA قابل تخلیص بوده و خواص ایمونولوژیک خود را جهت

References :

- Higuchi R, Tanaka E, Kiyosawa K, *et al.* Epidemiology and clinical aspects on hepatitis C Jpn J Infect Dis 2002; 55: 69-77.
- Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease Trends in Microbiology 2004; 12(2).
- Penin F, Moradpour D, Rey FA, *et al.* Structural biology of HCV Clin Liver Dis 2003; 7: 1-21.
- Maillard P, Krawczynski K, Nitkewicz J, *et al.* Nonenveloped nucleocapsides of hepatitis C virus in the serum of infected patients. Journal of Virology 2001; 75(17): 8240-50.
- Bain C, Fatmi A, Zoulim F, *et al.* Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection Gastroenterology 2001; 120(2): 512-24.
- Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, *et al.* Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. Journal of Virology 1997; 71(2): 1310-9.
- Kittlesen DJ, Yao ZQ, Hahn YS, *et al.* Interaction between complement receptor gCIqR and HCV core protein inhibits T-Lymphocyte proliferation. J Clin Invest 2000; 106(10): 1239-1249.
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, *et al.* The core protein of HCV induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. Nature Medicine 1998; 4(9): 1065-7.
- Disson R, Haouzi D, Desagher S, *et al.* Impaired clearance of virus-infected hepatocytes in transgenic mice expressing the HCV polyprotein. Gastroenterology 2004; 126 (3): 859-72.
- Pawlotski JM. Diagnostic tests for HCV. J hepatol 1999; 31Suppl 1: 71-79.
- Orito E, Mizokami M, Tanakati T, *et al.* Quantification of serum HCV core protein level in patients chronically infected with different HCV genotypes. Gut 1996; 39: 876-880.
- Maclachlan J, Lemberg MK, Hope G, *et al.* Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. EMBO J 2002; 21(15): 3980-8.
- Guzman LM, Dominique B, Michael JC, *et al.* Tight regulation, Modulation, and High-Level Expression by vectors containing the Arabinose PBAD Promoter. J Bact 1995; 4121-4130.
- Samburook J, Russell DM. Molecular Cloning. 3rd ed. CSHL Press; 2001.
- Laemmli V. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4 Nature 1970; 227: 680-85.
- Maillard P, Roohvand F, Lavergne J, *et al.* Fcγ receptor-like activity of HCV core protein. J Biol Chem 2004; 279(4): 2430-7.
- Wycuff DR, Matthews KS Generation of an AraC-araBAD promoter-regulated T7 expression system. Anal Biochem 2000 Jan 1; 277(1): 67-73.
- Selby MJ, Choo QL, Berger K, *et al.* Expression, identification and subcellular focalization of the proteins encoded by the HCV genome J Gen Virol. 1993; 74: 1103-13.
- Ravaggi A, Natoli G, Primi D, *et al.* Intracellular localization of full-length and truncated HCV core protein expressed in mammalian cells. J Hepatol, 1994; 20: 833-6.
- Hitomi Y, McDonnell WM, Baker JR, *et al.* High efficiency prokaryotic expression and purification of a portion of the hepatitis C core protein and analysis of the immune response to recombinant protein in BALB/c Mice Viral Immunology 1995; 8(2): 109-119.
- Gabriele H, Wolfgang H, Caselmann, *et al.* Bacterial expression and purification of HCV capsid proteins of different size. J Hepat 1995; 22: 143-150.
- Lok ASF, Gunaratnam NT. Diagnosis of hepatitis C. Hepatology 1997; 26 Suppl 1: 48-56.

Cloning, optimization of expression condition, purification and immunological characterization of hydrophilic section of HCV core promoter in *E.coli* Ag, expressed by T₇-araBAD

Aghasadeghi M.R.¹ (MS), Sadat S.M.¹ (MS), Amini S.¹ (PhD),
Budkowska A.² (PhD), Roohvand F.¹ (PhD)

¹Hepatitis and AIDS Dep, Pasteur Institute of Iran

²Unite Hepacivirus, Institut Pasteur Paris, France

Abstract

Background and Objectives

The capsid or core Ag of Hepatitis C virus is a multifunctional protein which has the principal pathogenesis and diagnostic role in HCV related infections and most of these properties are attributed to the hydrophilic section (amino acids 1-122) of this protein. For different research and diagnostic applications, high amounts of this protein in pure and original form are required. So, the aim of this study was to clone the gene, optimize the expression condition, purify it in the original form, and immunologically characterize hydrophilic section of HCV Core Ag, expressed by T₇-araBAD promoter system in *E.coli*.

Materials and Methods

The PCR amplified region corresponding to 2-122 section of this Ag from genotype 1b was cloned in pIVEX 2.3, a T₇ promoter derived vector. The proper construct after digestional analysis and sequencing confirmations was transformed into BL21-AI *E.coli*, and protein expression under control of *araBAD* promoter by addition of 0.2% Arabinose was induced.

Results

After optimization of expression condition, purification of protein by NI-NTA agarose gel chromatography in native condition by imidazole yielded about 3.5mg/L of HCV core Ag. Immunological studies by western blotting through application of core specific mAbs and results of ELISA tests indicated that the protein is with desired immunological properties.

Conclusions

AraBAD promoter can be perfectly utilized to produce the hydrophilic section of HCV core in high yields, and purification through NI-NTA in native condition may provide the antigen for different research and diagnostic applications.

Key words: HCV core Ag, Arabinose induction, NI-NTA chromatography, pIVEX 2.3
SJIBTO 2005; 2(5):145-150

Received: 9 Jun 2004

Accepted: 13 July 2005

Correspondence: Farzin Roohvand, PhD of Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Hepatitis and AIDS Department.

Tel.: +98-21-66969291 Fax : +98-21-66465132

E-mail: rFarzin@pasteur.ac.ir