

خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۲ شماره ۶ زمستان (۸۴)

همسانه سازی (کلونینگ)، بهینه‌سازی شرایط بیان، تخلیص و ارزیابی خواص ایمونولوژیک بخش هیدروفیلیک آنتی‌زن Core ویروس هپاتیت C، ابراز شده تحت پرموتر *E.coli* T7-araBAD در

محمد رضا آفاصادقی^۱، سید مهدی سادات^۲، دکتر صفیه امینی^۳، دکتر آگاتا بودکوسکا^۴، دکتر فرزین روحوند^۵

چکیده سابقه و هدف

آنتی‌زن Core ویروس هپاتیت C، یک پروتئین چند کاره با ارزش‌های ویژه در اهداف تشخیصی و تحقیقات پاتوفیزیولوژیک می‌باشد. اکثر این خواص مربوط به بخش هیدروفیل (آمینو اسید: ۲۱۲۲) این آنتی‌زن بوده و دسترسی به روشنی برای تولید مقادیر انبوه از این پروتئین در فرم خالص و طبیعی، از اهمیت به سزاگی 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 آرایینوز، مطالعه حاضر صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

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

یافته‌ها

ژن مربوط به بخش هیدروفیل Core HCV با موقعيت و با ترادف صحیح، جداسازی و به‌طور مناسب در کاست بیانی کلون گردید. سیستم القا آرایینوز به‌طور مؤثر، پس از ۳ ساعت، قابلیت تولید پروتئین نوترکیب با بازدهی ۳/۵mg/L را داشته و پروتئین تولید شده به سهولت و دریک مرحله قابلیت تخلیص شدن تا حدود ۸۰ درصد بر روی ستون Ni-NTA را دارا می‌باشد. پروتئین خواص آنتی‌زنیک خود را در ساختمان طبیعی حفظ می‌نماید.

نتیجه‌گیری

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

کلمات کلیدی: آنتی‌زن Core ویروس هپاتیت C، کروماتوگرافی Ni-NTA، القا آرایینوز، pIVEX 2.3

تاریخ دریافت: ۱۴/۴/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴/۷/۲۴

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی- مریم انتیتو پاستور ایران

۲- کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی- انتیتو پاستور ایران

۳- ویروس شناسی- استادیار انتیتو پاستور ایران

۴- Ph.D ایمونولوژی- دانشیار انتیتو پاستور پاریس

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

۴۵۶

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 ۵۰ 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 ۹/۶ kb و عضوی از خانواده فلاوی ویروس‌ها (Flaviviridea) 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 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 کپسید ویروس، نقش به سزایی هم در پاتوژنز این بیماری دارد و از طریق تداخل با سلوهای دنداریتیک، تداخل با گیرنده‌های لفوتوکسین و C_{1q} که در تکثیر لنفوسيت‌های T اهمیت دارند و همین‌طور تداخل با سیستم ترانسژنیک Fas/TNF در القای مرگ سلولی^۳ تاثیرگذار 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 (۸). تمامی این مشاهده‌ها نمایان گر نقش ویژه این پروتئین در پاتوژنز عفونت هپاتیت C می‌باشد ولی مکانیسم‌هایی که توسط آن پروتئین Core ایفای چنین نقشی را به عهده دارد، هم‌چنان ناشناخته است و برای مطالعه و تعیین اجزای سلولی که با پروتئین Core HCV تداخل می‌کنند، نیاز به

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

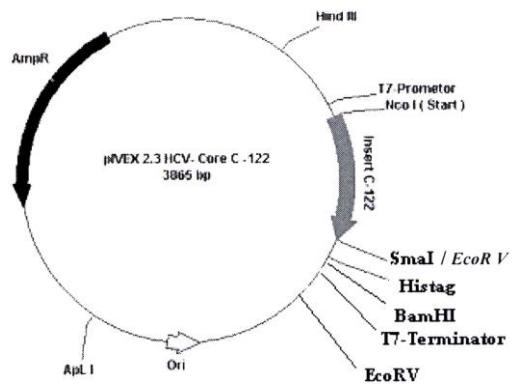
از طرف دیگر، روش‌های تشخیص عمومی مربوط به عفونت HCV، بر پایه ردیابی آنتی‌بادی‌های موجود در سرم علیه پروتئین‌های این ویروس می‌باشد و از آنجا که اولین آنتی‌بادی قابل تشخیص علیه این ویروس در سرم خون فرد آلوده برضد پروتئین Core ساخته می‌شود، در نتیجه این آنتی‌ژن جزء مهمی در ساخت کیت‌های تشخیصی بوده و در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

پروتئین Core دارای سه بخش^۵ اصلی است. بخش اول (آمینواسید ۱-۱۲۲) 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 ۱۲۳-۱۷۴) هیدروفیلیک بوده و توانایی اتصال به قطرات لیپید را دارا می‌باشد و بخش سوم (آمینواسید ۱۷۴-۱۹۲) که در طی مورفوژنز این پروتئین، توسط پیتیدازهای سلولی از پروتئین جدا می‌شوند (۱۲).

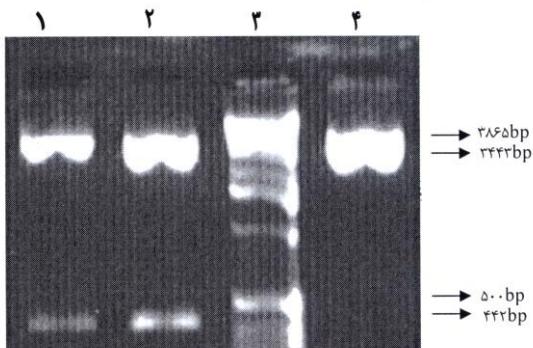
در مطالعه حاضر با هدف دست‌یابی به یک سیستم ارزان و ساده برای تولید انبوه و خالص پروتئین Core HCV با بازدهی زیاد، برای نخستین بار بخش هیدروفیل این آنتی‌ژن به صورت نوترکیب^۶ تحت القا آرایینزو و در سیستم پروموتوری T₇-araBAD (کمپانی اینویتروزن) در باکتری E.coli BL21-AI^۷ ابراز و با ایجاد یک برچسب هیستیدینی (Tag His 6X) در بخش انتهای اسیدی^۸ پروتئین به وسیله 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

صحت ترافق 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 (اینوتیروژن) توسط کلرید کلسیم، ترانسفورم گردید. این باکتری قابلیت کترول دقیق بیان ژن خارجی^۷ به خصوص برای پروتئین‌های سمی، به وسیله یک کپی کروموزومی از RNA پلیمراز مربوط به ara BAD پرموتور که قابل القا توسط آرایبینوز می‌باشد را دارد (۱۴).



شکل ۱: ساختار وکتور بیانی Core C-122 در حد فاصل مکان‌های برشی (EcoRV) و محل قرارگیری ژن Core در حد فاصل مکان‌های برشی Ncol-SmaI
M: مبدأ هماندزازی، T₇: پرموتور تفاز T₇، Ori: ژن کادکتنه مقاومت به آمپیسیلین



شکل ۲-الف: بررسی نقشه آنزیمی وکتور محدود کننده و تأثیر آن توسط آنزیم‌های محدود کننده

ستون‌های ۱ و ۲: وکتور بیانی هضم شده با آنزیم BmaHI و NcoI (قطعات با اندازه‌های ۵۰ و ۲۲۲۸ bp، مربوط به محصول PCR ژن Core و ۳۴۴۳۴ bp، بازمانده پلاسمیدی باشد) ستون ۳: مارکر (Roche) kb (Cut) (۳۸۶۵ bp) پلاسمید اولیه pIVEX2.3 بریده شده (Cut) (به وسیله آنزیم‌های همسانه‌سازی (BamHI, NcoI) باشد که قادر قطعه کلون شده است).

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

مواد و روش‌ها

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

(آغازگر جلوبر) (Forward):

5' gtg cacc ATG ggc acg att ccc aaa cct 3'

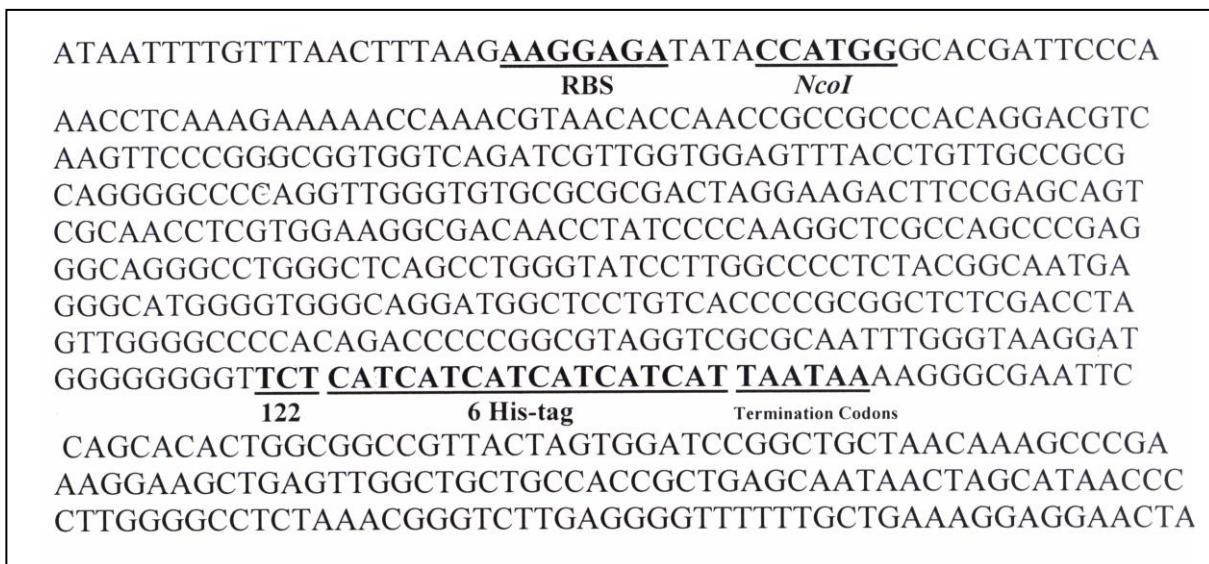
Ncol

(آغازگر معکوس) (Reverse):

5' gtg tatt cct tac cca aat tgc gcg a 3'

EcoR V

به کمک آنزیم VentR DNA pol. (بیولب نیو انگلند) دارای خواص اصلاح^۲، از روی ژن اصلی که مربوط به تیپ ۱b بوده کپی برداری و در سکانس‌های برتری Ncol-SmaI در پلاسمید pIVEX 2.3 با مرحله دنا توراسیون اولیه به (۱۶). انجام مراحل PCR با مرحله دنا توراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (Hot Start) آغاز گردیده و با انجام ۳۰ سیکل متوالی (۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت. طراحی آغازگرها به صورتی بوده است که دو مکان برشی EcoRV Ncol در ابتدای ۵ آن‌ها طراحی شود تا ضمن آن که کدون آغازی ATG در خود محل Ncol قرار گیرد، به طور هم‌خوان^۳ در امتداد برچسب هیستیدینی (T₇ Terminator) و سکانس‌های تمام کننده (His tag) نیز مستقر گردد. لازم به ذکر است که مکان‌های برشی EcoR V و SmaI بعد از برش، به صورت انتهای صاف^۴ بوده و قابل جوش در یکدیگر می‌باشند (شکل ۱). وکتور نوترکیب حاصل، پس از انجام واکنش‌های جوشی^۵، به سوی E.coli DH5 α استخراج پلاسمید شده و پس از تکثیر و استخراج پلاسمید برای تأیید حضور قطعه و پلاسمید، مورد بررسی هضم آنزیمی قرار گرفت (شکل ۲-الف). کلیه روش‌های مولکولی بر طبق پروتکل‌های شرکت‌های سازنده کیت‌ها انجام پذیرفت و برای استخراج پلاسمید از کیت معینی پر پ کورپلاسمید (ساخت بیوسیستم) و برای انجام واکنش جوش از کیت لیگاز T4 DNA (روش) استفاده شد (۱۳). برای اطمینان از عدم بروز موتاسیون و



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

بیان کننده پروتئین و شرایط بهینه بیان پروتئین، تولید پروتئین در مقیاس ۵۰ و ۵۰۰ میلی لیتر 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 یکسان سازی غلظت کلی پروتئین در نمونه‌های قبل و بعد از القا جهت انجام SDS-PAGE، جذب نوری OD_{600nm} باکتری‌ها در محیط کشت ثبت شده و با ضرب کردن در عدد ۷۱، میزان افزودن بافر نمونه SDS-PAGE (براساس میکرولیتر) به رسوب باکتری‌ها به دست آمد. در مرحله بعد به همان میزان نیز آب مقتدر 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.

تخلیص پروتئین نوترکیب به روش طبیعی (Native) در مطالعه حاضر، با هدف تخلیص پروتئین محلول در شکل فضایی طبیعی^۱ و با توجه به حضور برچسب

1- Native Conformation

القای بهینه سازی و ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب

پس از ترانسفورماسیون باکتری‌های BL21-AI به وسیله پلاسمید نوترکیب pIVEX2.3، تعدادی از تک کلون‌های حادث بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین انتخاب و ابتدا یک کشت اولیه در ۵ میلی لیتر از محیط کشت TY2X حاوی آمپیسیلین تهیه شد و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با چرخش ۱۲۰rpm، در محیط کشت تازه، به میزان ۱/۱۰۰ رقیق شد، به دنبال انکوباسیون و رسیدن به جذب نوری ۰/۶ در ۶۰۰nm، القاکننده آرایینز (سیگما) با غلظت نهایی ۰/۲ میکرولیتر از کشت مذکور جهت بررسی گذشت این زمان، ۱ میلی لیتر از کشت مذکور جهت بررسی به وسیله SDS-PAGE رسوب داده شد و بر روی آن الکتروفورز صورت گرفت. در مورد نمونه‌های کترل، شرایط کشت کاملاً به صورت بیان شده در بالا صورت گرفته و تنها مرحله اضافه کردن آرایینز کاملاً حذف شده است. به منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب، 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^۳ از محیط عمل خارج شده و آنتی بادی ثانویه کونژوگه با پراکسیداز با رقت ۱/۵۰۰۰ اضافه گردید و پس از افزودن سوبیسترای رنگزا (DAB)، باندهای پروتئینی مورد نظر مشاهده شدند. برای بررسی قابلیت تشخیص پروتئین نوترکیب و جهت انجام الیزا، از آنتی ژن خالص با غلاظت ۳ μ g/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 Twee^{۲۰} ۰/۰۵ درصد، شستشو و سرم‌ها، شامل ۶ سرم بیمار HCV مثبت، (جمع آوری 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 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 ضدایمونوکلوبولین انسانی متصل به آنزیم پراکسیداز و سوبیسترای TMB، پاسخ در طول موج ۴۵۰nm قرائت گردید و نتایج حاصل با سرم فرد سالم مقایسه شد.

یافته ها

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

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

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

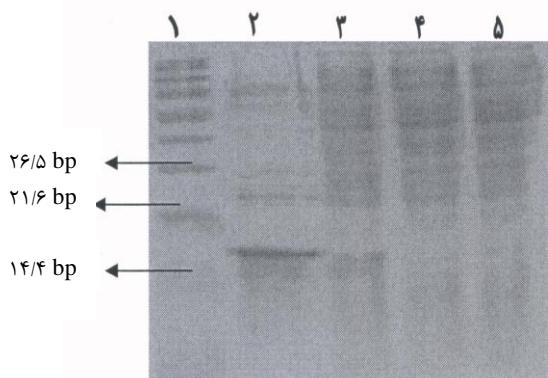
6X His tag در پروتئین نوترکیب، از روش کروماتوگرافی جذبی با استفاده از ژل آگارز Ni-NTA و براساس روش عمومی MCAC^۸، بر طبق پروتکل شرکت سازنده (QIAgen) با کمی تغییرات استفاده شد، به طور خلاصه رسوب باکتریایی پس از القا، در محلول لیزکننده (pH=۸) NaH₂Po₄ ۵۰mM NaCl ۳۰mM ایمیدازول کاملاً محلول شد و پس از اضافه کردن محلول لیزوژیم (1mg/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 رسوب 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 به طور خلاصه، پس از تهیه رقت‌های مناسب 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 غلاظت پروتئین خالص شده محاسبه گردید.

ارزیابی خواص آنتی ژنیک پروتئین Core نوترکیب

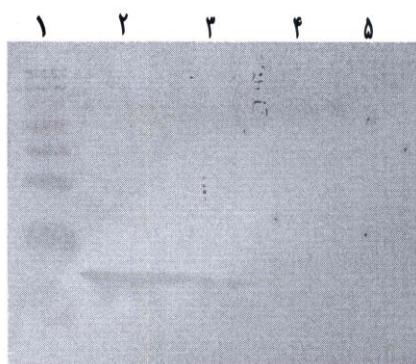
برای ارزیابی خواص آنتی ژنیک و بررسی احتمال قابلیت کاربردهای تشخیصی پروتئین Core نوترکیب، از دو روش الیزا و وسترن بلاستینگ^۹ استفاده شد. در تحقیق حاضر، وسترن بلاستینگ به روش استاندارد با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی اختصاص علیه HCV به نام Val(VT بیوتک) انجام پذیرفت (۱۵، ۱۶). به طور خلاصه، پس از انتقال باندهای پروتئینی به غشای نیتروسلولزی و انکوباسیون با VT (رقت ۱/۲۰۰۰)، آنتی بادی‌های متصل

در نهایت آنالیزهای ایمونولوژیک توسط وسترن بلاستینگ نمایان گر آن است که پروتئین نوترکیب به خوبی توسط آنتی بادی مونوکلولار اختصاصی علیه آنتیژن Core، VT، Val (بیوتک) شناسایی می شود و خواص آنتیژنیک لازم را دارا می باشد (شکل ۴).

همچنین استفاده از این آنتیژن 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، نمایان گر آن است که این آنتیژن احتمالاً قابلیت امکان کاربرد در مصارف تشخیصی را دارا می باشد (نمودار ۱).



شکل ۴-الف: الکتروفورز SDS-PAGE

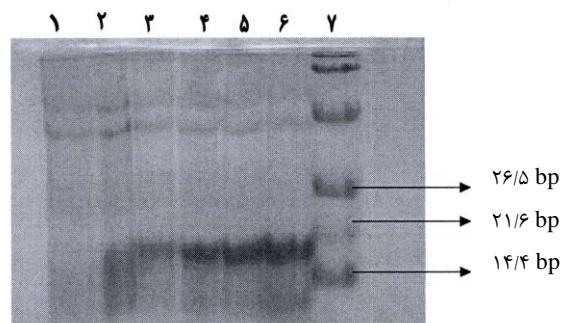


شکل ۴-ب: وسترن بلاستینگ

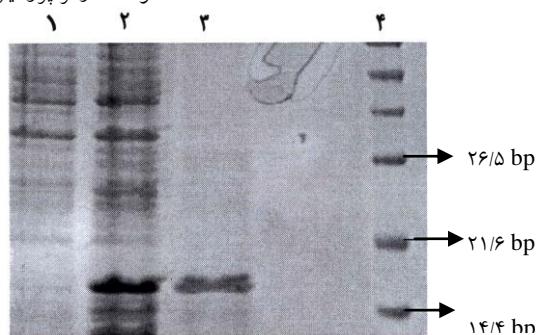
شکل ۴: الکتروفورز و وسترن بلاستینگ نمونه های قبل و پس از القا ستون ۱: مارکر پروتئین Pre-Stained. ستون ۲: پروتئین تخلیص شده به روش Native. ستون ۳: نمونه پس از القا. ستون ۴ و ۵: نمونه قبل از القا

1- Leaking

همین طور دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دانسیته سلولی ۰/۶ در OD_{400nm} 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 (دانستیومتری ژل Lab Works, software SDS-PAGE) که این میزان تخلیص برای اکثر کاربردهای تحقیقی و تشخیصی مناسب است. اندازه گیری های انجام شده به روش اندازه گیری OD₂₈₀ و کیت پروتئین سنجی، نمایان گر 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: مارکر پروتئینی Fermentas



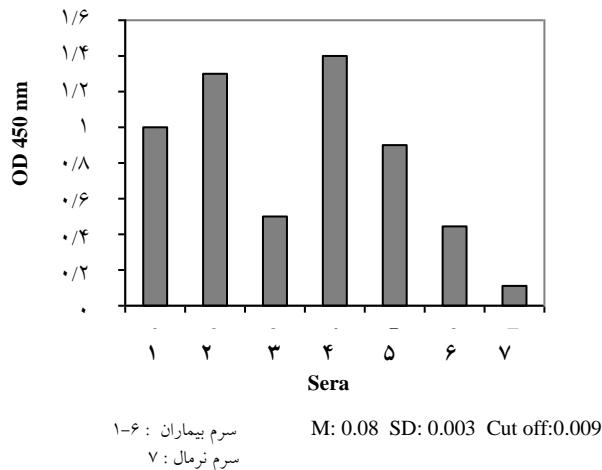
شکل ۳-ب: الکتروفورز نمونه های قبل و پس از القای پروتئین تخلیص شده ستون ۱: نمونه قبل از القاب، ستون ۲: نمونه در زمان القا، ستون ۳: پروتئین های تخلیص شده به روش Native، ستون ۴: مارکر

برچسب هیستیدینی در ناحیه آمینی و یا سیستم‌های فیوژنی (MBP) یا (GST) ۳ برسی شده بود که دارای بازدهی حدود $1-3 \text{ mg/L}$ بوده است (۲۰، ۲۱). اما در تمام روش‌های قبلی، تخلیص پروتئینی به صورت دناتوره 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 تعییه 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 نرم افزاری Lab Works (17kD) هم خوانی داشته و علاوه بر این در آنالیز وسترن‌بلاط هم فقط یک باند مربوط به قسمت تخلیص وجود دارد، به علاوه نتایج وسترن‌بلاستینگ و الیزا، دارا بودن خواص مناسب آنتی‌ژنیک این محصول را هم تأیید می‌کنند.

به طور خلاصه مطالعه حاضر روش جدیدی را برای تولید و تخلیص طبیعی بخش هیدروفیلیک (۲-۱۲۲) آنتی‌ژن HCV با خواص مناسب آنتی‌ژنیک 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 (c22-3)، 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 آنتی‌ژن Core وپروس هپاتیت C



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

بحث

در مطالعه حاضر بنا به اطلاع‌ما، برای نخستین بار امکان ابراز پروتئین نوترکیب HCV Core در یک سیستم القا توسط آرابینوز ارایه شده است. علاوه بر این، نتایج حاصل از این تحقیق امکان تولید بخش هیدروفیلیک آنتی‌ژن 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 آنتی‌ژنیته 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 بر هم کنش با IgG Fcy، 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 $3-5 \text{ mg/L}$ 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 در سلول‌های حشره‌ای و سلول‌های حیوانی برسی شده بودند که با میزان ابراز و بازدهی کم همراه بوده‌اند (۱۸، ۱۹).

همچنین امکان بیان این پروتئین در باکتری *E.coli* تحت القای^۱ IPTG 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 می‌نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندها مقاله، از حمایت‌های بسیاری دریغ دکتر تقی‌خانی رئیس محترم سابق انتیتوپاستور ایران و همچنین همکاری صمیمانه خانم دکتر سیما رافتی و دکتر بهروز وزیری که ما را در انجام تحقیق حاضر یاری فرمودند کمال تشکر و تقدیر را دارند.

به‌طور مناسب به‌وسیله آغازگرهای طراحی شده ما قابل تکثیر و جاسازی در حامل pIVEX2.3 می‌باشد و این حامل و سیستم القای آرایینوز در پروموتر T₇، قابلیت ابراز این آنتیژن را در باکتری *E.coli* BL21-AI دارد بوده و در شرایط بهینه میزان بازدهی برابر ۳/۵mg/L می‌باشد و پروتئین نوترکیب حاصله به سهولت به روش یک مرحله‌ای و در ساختار طبیعی به روش کروماتوگرافی Ni-NTA قابل تخلیص بوده و خواص ایمونولوژیک خود را جهت

References :

- 1- Higuchi R, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. Epidemiology and clinical aspects on hepatitis C Jpn J Infect Dis 2002; 55: 69-77.
- 2- Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease Trends in Microbiology 2004; 12(2).
- 3- Penin F, Moradpour D, Rey FA, et al. Structural biology of HCV Clin Liver Dis 2003; 7: 1-21.
- 4- Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, et al. Nonenveloped nucleocapsides of hepatitis C virus in the serum of infected patients. Journal of Virology 2001; 75(17): 8240-50.
- 5- 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.
- 6- 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.
- 7- Kittlesen DJ, Yao ZQ, Hahn YS, et al. Interaction between complement receptor gClqR and HCV core protein inhibits T-Lymphocyte proliferation. J Clin Investigation 2000; 106(10): 1239-1249.
- 8- 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.
- 9- 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.
- 10- Pawlotski JM. Diagnostic tests for HCV. J hepatol 1999; 31Suppl 1: 71-79.
- 11- 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.
- 12- Maclanchlan 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.
- 13- 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.
- 14- Sambrook J, Russell DM. Molecular Cloning. 3rd ed. CSHL Press; 2001.
- 15- Laemmeli V. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4 Nature 1970; 227: 680-85.
- 16- Maillard P, Roohvand F, Lavergne J, et al. Fc gamma receptor-like activity of HCV core protein. J Biol Chem 2004; 279(4): 2430-7.
- 17- Wycuff DR, Matthews KS Generation of an AraC-araBAD promoter-regulated T7 expression system. Anal Biochem 2000 Jan 1; 277(1): 67-73.
- 18- 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.
- 19- 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.
- 20- 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.
- 21- Gabriele H, Wolfgang H, Caselmann, et al. Bacterial expression and purification of HCV capsid proteins of different size. J Hepat 1995; 22: 143-150.
- 22- 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

²Unité 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 Ib 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 immidazole 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