مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1391، دوره چهارم، شماره سیزدهم، صفحه 6-1

تولید و تخلیص پروتئینTax ویروسHTLV-1 از طریق تکنولوژیDNA نوترکیب و ایمونوافینیتی کروماتوگرافی

محمدرضاذوالفقاری[1]، محمدخوشرو[2]، عبدالرضاوارسته[3]، محمدرضاعباس زادگان[4]، مژده صفری[5]

1- استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران
2- دانشجوی دکتری ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قم، دانشکده پزشکی، قم، ایران
3- استاد ایمونولوژی، مرکزتحقیقات ایمونولوژی، موسسه بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
4- دانشیار ایمونولوژی، مرکزتحقیقات ایمونولوژی، موسسه بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
5- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران

نویسنده مسؤول: محمدخوشرو. دانشگاه علوم پزشکی قم، دانشکده پزشکی، قم، ایران. Mohammad.khoshroo@yahoo.com

دریافت: 91/4/11 پذیرش: 91/6/28

چکیده

زمینه و هدف: عفونت سلولهایT انسان با ویروس(*HumanT Lymphotropic Virus-1*) HTLV-1 باعث نامیرا شدن این سلولها و بروز لوسمی سلول Tبالغین(Adult T Cell Leukemia) می شود.ترانسفورمیشن سلولهای T، در مراحل اولیه توسط پروتئین Taxویروس1-HTLV صورت می گیرد. استان خراسان و بخصوص شهر مشهد یک منطقه اندمیک با شیوع حدود 5 در صد برای این ویروس می باشد. از پروتئین Tax درتهیه کیتهای تشخیصی جهت غربالگری و نیز برای شناسایی آنتی بادی ضد Taxدر سرم افراد آلوده می توان استفاده نمود. بنابراین هدف در این پروژه تهیه پروتئین Taxتوسط تکنولوژی نوترکیب بوده است.

روش بررسی: بعد از ترانسفورمیشن *E.coli* با پلاسمید حاوی ژن Tax برای اطمینان از ترانسفورمیشن واکنش PCR انجام شد. به منظور بیان پروتئین tax در باکتری باکتریهای ترانسفرم شده بر روی محیط کشت LB کشت داده شد و سپس پروتئین تولید شده با سولفات آمونیوم رسوب داده شد. جهت خالص سازی پروتئین از ایمونوافینیتی کروماتوگرافی وجهت بررسی خلوص از رنگ آمیزی نیترات نقره ودات بلات استفاده شد.

یافته ها: نتیجه واکنش PCR که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن tax صورت گرفته بود دلالت بر ترانسفرم شدن باکتری ها داشت. همچنین نتایج حاصل از رنگ آمیزی با نیترات نقره ودات بلات نشانگر بیان پروتئینTax در باکتری و تخلیص آن توسط افینیتی کروماتوگرافی بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می دهند گرچه تولید پروتئین Tax بوسیله این روش صورت گرفته اما میزان پروتئین تولید شده کم بوده است.

واژه‌های کلیدی: ویروس HTLV-1، پروتئین Tax،DNA نوترکیب،ایمونوافینیتی کروماتوگرافی.

www.SID.ir

مقدمه

ویروس لوسمی سلول T انسانی نوع یک یاHTLV-1 اولین ویروس سرطان زای شناخته شده انسانی است. این ویروس عامل نوعی سرطان خون بنام لوسمی سلولT بالغین (ATL) (2-1) و چندین بیماری دیگر شامل پاراپارزی اسپاستیک میلوپاتیک، پلی میوزیت و یووئیت می باشد. مناطق اندمیک ویروس جزایر کارائیب(3) و ژاپن بوده و در ایران استان خراسان و بخصوص شهر مشهد از سال 1370 به عنوان یک منطقه اندمیک با شیوع 5% به دنیا گزارش شده است(5-3). پرووِیروس HTLV-1 ساختاری مشابه با سایر رتروویروسها دارد. یعنی دارای یک تکرار انتهایی بلند یا Long Terminal Repeat (LTR) در دو انتهای ژنوم و توالی های gagوو env وpol است. یکی از ویژگی های ژنوم HTLV-1 وجود ناحیه موسوم به PX می باشدکه بین ژن env و 3′LTR واقع شده است. این ناحیه حاوی چندین ژن کمکی شامل tax,rex,p12,p21,p13 می باشد. در بین این ژنها، ژن tax نقش مرکزی را در رونویسی از ژن همانند سازی ویروس و تکثیر سلولهای آلوده به ویروس دارد. پروتئین Tax رونویسی ژنهای ویروسی را از ناحیهLTR ′5 و از طریق واکنش با پروتئین اتصالی به عنصر پاسخگو بهAMP حلقوی افزایش می دهد. Taxهمچنین با فاکتورهای سلولی واکنش داده و مسیر های سلولی مثلAP-1 وNFkB را فعال می کند (9-6). بعنوان مثال فعال شدن NFkB باعث القای رونویسی از سایتوکین های مختلف وگیرنده آنها و نیز القای ژنهای آنتی آپپتوتیک مثل bcl-xL می شود. ثابت شده است فعال شدن NFkB برای ایجاد تومر توسط ویروس کاملا ضروری است. Tax همچنین با عملکردهای,MAD1 P53,P16 تداخل می کند. این واکنش ها سلول آلوده به ویروس را قادر می سازد تا از آپپتوزیس فرار کرده و ناپایداری ژنتیکی ایجاد شود. گزارش شده است که Tax انتقال علامتTGFβ را مهار می کند و مهار انتقال علامت TGFβ سلول آلوده به ویروس را از مهار رشد بوسیله این سایتوکین می رهاند(10).

پاسخ ایمنی و بخصوص پاسخ ایمنی سلولی نقش مهمی در کنترل رشد سلول آلوده به ویروسHTLV-1 ایفا می کند (10). پاسخ CTL بر ضد ویروس مورد مطالعه فراوانی قرار گرفته است و مشخص شده است پروتئینTax آنتی ژن غالب است که توسط سلول های کشنده شناسایی می شود. همچنین یافته ها نشان داده اند که شروعATL با تکثیر بالای سلول آلوده به ویروس و تیتر کم آنتی بادی ضد Tax ارتباط دارد(10).

هم اکنون تشخیص آلودگیHTLV-1 در مراکز انتقال خون کشور و به خصوص به صورت روتین در شهر مشهد توسط آزمون الایزا و تایید آن با روش وسترن بلات انجام می شود. خرید این کیتها که از خارج وارد می شوند سالیانه هزینه زیادی به کشور تحمیل می کند، از این رو تولید پروتئینTax برای تهیه کیتهای سرولوژیک تشخیص ویروسHTLV-1 ضروری می باشد. هدف در این پروژه تولید و تخلیص پروتئین بوده است. روشی که در این پروژه بکار گرفته شد نسبت به سایر روشها از کارایی کمتری برخوردار بوده است.

روش بررسی

ترانسفورمیشن *E.coli* با پلاسمید حاوی ژن tax ویروسHTLV-1: پس از مستعد کردن باکتری *E.coli* بوسیله کلرید کلسیم 30 mM این سلول ها با روش زیر ترانسفرم شدند. ابتدا 1µL پلاسمید Expression vector pEF حاوی ژن tax (11) به50 µL سلول مستعد اضافه شده و مخلوط گردید. پس از 2 ساعت انکوباسیون در 4 درجه، به مدت 90 ثانیه در 42 درجه به آن شوک گرمایی وارد شد. بوسیله محیط کشت LBآگار حاوی پنی سیلین با غلظت100mg/ml باکتری های ترانسفرم شده جدا شدند.

واکنش PCR برای تایید وجود پلاسمید حاوی ژن tax درداخل باکتریهای ترانسفرم شده: برای حصول اطمینان از وجود پلاسمید حاوی ژن (tax) در *E.coli* تراسفرم شده از PCR با پرایمرهای اختصاصی (Forward,GGA TAC CCA GTCTAC GTG TTT G;Revrese,CGC AAC ATT GGTGAG GAA GGC;GenBank accession no.Lo 3562) استفاده شد(11). پس از جدا سازی پلاسمید از باکتری با روش قلیایی مخلوط PCR حاوی 10 پیکومولار از هر پرایمر، 200 میکرومولار از هر dNTP، 50 میلی مولار KCl، 10 میلی مولار تریس :p H) (8.3 ، 1/5 میلی مولار $MgCl_2$ و1 واحد از آنزیم ترموس اکواتیکوس (Taq ، سیناژن) تهیه شد.

این مخلوط واکنش در دستگاه Thermal(perkin-Elmer) Cycler با پارامترهای 95 درجه سانتی گراد 5 دقیقه، سپس 30 سیکل 95 درجه سانتی گراد 1 دقیقه، 58 درجه سانتی گراد 1 دقیقه؛ 72 درجه سانتی گراد 1دقیقه و سپس 5 دقیقه

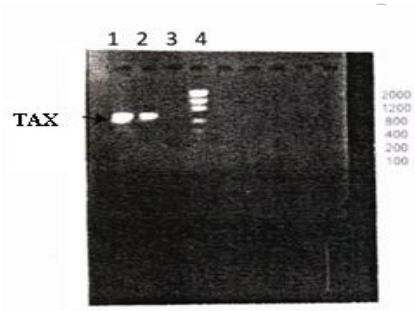
www.SID.ir
Archive of SID

در 72 درجه سانتی گراد قرار داده شد. فرآورده PCR در ژل آگارز 1/5% الکتروفورز شد و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و سپس بوسیله دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده و عکس برداری گردید.

بیان وتخلیص پروتئینTax: برای بیان پروتئینTax، باکتری در دو ارلن یک لیتری حاوی محیط کشت LB و 2میلی لیتر پنی سیلین با غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر در 37 درجه سانتی گراد به مدت 12 ساعت در شیکر انکوباتور با سرعت 150 rpmکشت داده شد(12). برای ترسیب پروتئین Tax توسط سولفات آمونیوم، پس از سانتریفوژ محیط کشت LB در 4درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه با سرعت 4000 rpm و سپس حل کردن رسوب در بافر تخلیص (Tris 50 mM,pH:8، 2ME 10 mM, NaCl 100 mM)، سوسپانسیون حاوی باکتری با روش سونیکات (12مرتبه وهر مرتبه 10 ثانیه با 35 ثانیه زمان استراحت) متلاشی شد. سپس محلول حاصل از سونیکات به لوله از پیش سرد شده اولترا سانتریفوژ انتقال یافت و با سرعت 100000g در 4 درجه به مدت 40 دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله بعد مایع رویی به لوله فالکون 50 میلی لیتر انتقال یافت و به آن سولفات آمونیوم اضافه شد تا محلول سولفات آمونیوم 1 مولار تهیه شود. پس از قرار گیری محلول سولفات آمونیوم بر روی روتاتور در یک حالت افقی به مدت 2 ساعت در یخچال، محلول درون لوله فالکون به مدت 45 دقیقه با دور 100000gدر 4 درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. سپس رسوب در 4 میلی لیتر بافر تخلیص حل شده و در مقابل 4 لیتر بافر تخلیص دیالیز گردید.
برای خالص سازی پروتئینTax از روش ایمونوافینیتی کروماتوگرافی استفاده شد. در این روش سه گرم ژل سفارز 6B در 20میلی لیتر 0/1HCl مولار حل شده و 15 دقیقه بر روی شیکر انکوباتور قرار داده شد. پس از شستشوی ژل با 0/1HCl مولار، محلول حاوی آنتی بادی ضد Tax به آن اضافه شده و 4 ساعت بر روی روتاتور قرار گرفت. در مرحله بعد و پس سانتریفوژبه مدت 4 دقیقه با دور 500g و جدا کردن مایع رویی، 15 میلی لیتر گلایسین 0/2 به آن اضافه گردید و 2 ساعت در دمای محیط بر روی روتاتور قرارداده شد. در نهایت ژل با بافر استات و تریس شستشو داده شد. آنتی بادی ضد Tax از سرم بیماران مبتلا به HTLV-1 که با الایزا و سپس وسترن بلات در سازمان انتقال خون مشهد تایید شده بود با روش ترسیب توسط روش سولفات آمونیوم تهیه گردید.
برای تخلیص، محلول حاوی پروتئین Taxکه با روش ترسیب توسط سولفات آمونیوم تهیه شده بود از ستون عبور داده شد. با تغییر pH، پروتئین Tax از آنتی بادی های متصل به ژل جدا گردید. سپسpH محلولهای خارج شده خنثی گردید. اندازه گیری پروتئین توتال با روش برادفورد انجام شد. برای بررسی خلوص ازSDS-PAGE و رنگ آمیزی نیترات نقره و دات بلات استفاده شد. به جای تست الایزا از دات بلات استفاده شد.

یافته ها

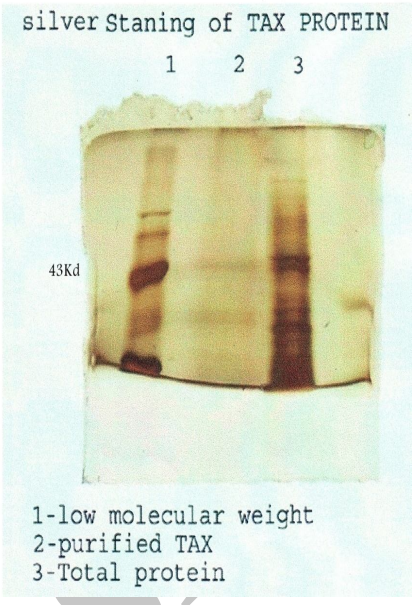
در این پروژه پس از مستعد کردن کردن باکتری *E.coli* بوسیله کلرید کلسیم 30mM این سلول ها با پلاسمید حاوی ژن tax ترانسفرم شدند. برای اطمینان از اینکه پلاسمید درون باکتری قرار گرفته است، پس از رشد *E.coli* مورد نظر در محیط کشت LB، پلاسمید با روش قلیایی جدا شد. سپس با استفاده از پرایمر های اختصاصی، ژنtax تکثیر داده شد. در شکل 1 باند 522 بازی مربوط به tax می باشد. بعنوان کنترل مثبت از سلول آلوده به HTLV-1(رده سلولیMT2) استفاده شد که در ستون 2 مشاهده می شود. ستون 3 کنترل منفی می باشد که فاقد DNA هدف است.



شکل1. الکتروفورز محصول PCR : ستون 1. محصول PCR پلاسمید حاوی ژن tax،ستون 2. محصول PCR نمونه DNA جدا شده از رده سلولی MT2، ستون 3. محصول PCR فاقد DNA هدف، ستون 4- استاندارد وزن مولکولی.

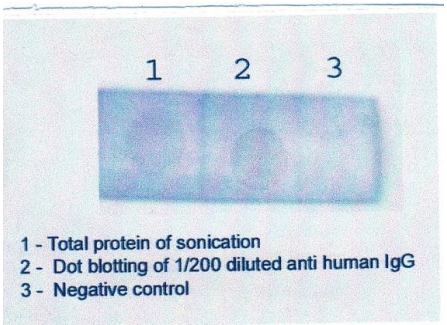
پس از تخلیص پروتئینTax با روش ایمونوافینیتی کروماتوگرافی خلوص آن توسط SDS-PAGE، رنگ آمیزی نیترات نقره(شکل2) و دات بلات (شکل3) بررسی شد.

www.SID.ir



شکل2. رنگ آمیزی نیترات نقره پس از الکتروفورز SDS-PAGE: ستون 1. استاندارد وزن مولکولی، ستون2. نمونه حاصل از سونیکاسیون بعد از گذرانده شدن از ستون افینیتی کروماتوگرافی، ستون3. نمونه حاصل از سونیکاسیون قبل از عبور از ستون افینیتی کروماتوگرافی

باند موجود در محدوده 43 کیلودالتون در رنگ آمیزی نیترات نقره مربوط به پروتئین Taxمی باشد. باند اضافه ای در بخش پایینی هم مشاهده شد که احتمالا حاصل شکست این پروتئین می باشد.



شکل3. آزمون دات بلات. ستون1. نمونه حاصل از سونیکاسیون قبل از عبور از ستون افینیتی کروماتوگرافی، ستون2. نمونه حاصل از سونیکاسیون بعد از گذرانده شدن از ستون افینیتی کروماتوگرافی، ستون3. نمونه بافر سالین به عنوان کنترل منفی.

در دات بلات، واکنشگری مشاهده شده مربوط به پروتئین Taxمی باشد. این واکنشگری هم قبل و هم بعد از عبور از ستون افینیتی کروماتوگرافی دیده می شود.

بحث

پروتئین Tax که محصول ژن P^X است، نقش مهمی در تکثیرویروس HTLV-1 و ترانسفورمیشن لنفوسیت دارد. علاوه بر این، پروتئین Tax نقش در رونویسی ویروس و پاتوژنز بیماری های ایجاد شده بوسیله آن ایفا می کند(6و16). مشخص شده است که Tax انکوژن می باشد چرا که فیبروبلاستهای جوندگان و سلولهای T انسانی را ترانسفرم و نامیرا می کند(16). Tax از طریق مسیرهای CREB, NFκB پروموتورهای سلولی مثل اینترلوکین-13و اینترلوکین-15و نیز گیرنده اینترلوکین-2 و مولکول های کمک تحریکی را فعال کرده و منجر به افزایش این پروتئین ها و فعال شدن ابشار انتقال علامت می شود. Tax همچنین از طریق اتصال مستقیم به کینازهای وابسته به سیکلین و یا غیر فعال کردن ژن های سرکوب گر تومور مستقیما رشد سلول را تحریک می کند. بعلاوه Tax باعث ناپایداری DNA و افزایش احتمال جهش در سلول می گردد(۷،۱۷،۱۸). با استفاده از ترانسفورمیشن باکتری *E.coli* توسط پلاسمید حاوی ژن tax ویروس HTLV-1 و سپس بیان ژن tax در این باکتری این پروتئین به صورت نوترکیب تولید شد. سپس با روش ایمونوافینیتی کروماتوگرافی خالص گردیده و با رنگ آمیزی نیترات نقره و دات بلات تعیین ویژگی گردید. با توجه به وجود سرم های حاوی آنتی بادی ضد Taxو در دسترس بودن آن، در این روش از ایمونوافینیتی استفاده شد(11) . پروتئینTax که توسط افراد مختلفی تا کنون تخلیص شده است به مقاصد متفاوتی بوده و بر اساس نوع مقصود، روش تخلیص نیز متفاوت بوده است. در سال KuanTehJeang1987 با استفاده از وکتور بیانی باکلوویروس پروتئین Taxرا تخلیص نمود(13). این پروتئین دارای فعالیت بیولوژیک بود. در این پروژه برای تولید پروتئین Tax از پلاسمید pEF و باکتری سویه Top10 استفاده شد. هدف در این پروژه تولید Taxبرای مقاصد تهیه کیت و نیز بعنوان مدل آزمایشی تهیه آن ازطریق ایمونوافینیتی کروماتوگرافی بود. مشخص شده است که وجود آنتی بادی ضد Tax احتمال انتقال عمودی و جنسی ویروس را افزایش می دهد. به همین دلیل تولید پروتئین Taxخالص

Archive of SID

www.SID.ir

برای تهیه کیت ضروری است، تا بتوان از آن برای تشخیص آنتی بادی ضد Tax استفاده کرد. در سال Shimotohno1992 و همکارانش نوعی آنتی ژن Taxرا توسط روش نوترکیبی ژنتیکی تولید کردند که به صورت اختصاصی با پنج نوع آنتی بادی مونوکلونال ضد Taxواکنش میداد. وقتی آنتی بادیهای موجود در سرم و آنتی بادیهای مونوکلونال ضد Tax از نظر ویژگی اتصال به آنتی ژن Tax نوترکیب مقایسه شدند، مشاهده شد که آنتی بادیهای مونوکلونال به صورت رقابتی از اتصال آنتی بادیهای موجود در سرم جلوگیری می کنند. یعنی از نظر ویژگی اتصال به آنتی ژن مشابه اند(14). با این استدلال که طی پروسه افینیتی کروماتوگرافی در این پروژه از آنتی بادی ضد Tax موجود در سرم استفاده شده است، بنابراین از این آنتی ژن می توان برای غربالگری سرمهای حاوی آنتی بادی ضد Tax استفاده نمود. احتمالا بدلیل مناسب نبودن پلاسمید و سویه بکار رفته در این پروژه، میزان محصول بدست آمده کمتر از حد انتظار نسبت به سایر روشها بوده است. زیراJohn Brady در سال 1991 محصول تولید شده در پی استفاده از پلاسمیدpX5 و سویهHB101 را یک میلی گرم در لیتر مایع محیط کشت ذکر می کند. در ضمن او از روش zink chelate affinity chromatograph استفاده کرد که در این پروژه این کار عملی نبود(15). بدلیل کم بودن پروتئین تولید شده و محدودیت تشخیصی رنگ آمیزی کوماسی بلو، از رنگ آمیزی با نیترات نقره استفاده شد. آزمون دات بلات نیز که صورت گرفت نشان از وجود Tax در نمونه گذرانده شده از ستون کروماتوگرافی داشت. اما مطابق با نتایج بدست آمده از رنگ آمیزی نیترات نقره ودات بلات میزان کمی از پروتئینTax وجود داشت که همانطور که گفته شد میزان آن کمتر از سایر روشهای مورد استفاده بود. در ضمن ناکارامدی روش احتمالا موجب شکسته شدن پروتئین شده بود که در رنگ آمیزی نیترات نقره به صورت باند اضافی دیده می شود. می توان باند اضافی را به پروتئین های باکتری که لیز شده است نسبت داد اما در صورتی که باند اضافی مربوط به پروتئین های اشریشیا کلی باشد، منطقی به نظر می رسد تعداد باندهای اضافی بیشتر باشد. در نهایت می توان توصیه نمود با اصلاح روشهای مورد استفاده می توان با استفاده از امکانات موجود پروتئینTax را به میزان بیشتری تولید و تخلیص نمود.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشانگر تولید پروتئین Tax ویروس HTLV-1 از طریق تکنولوژی نوترکیب به منظور استفاده در کیت های تشخیصی بوده است. رنگ آمیزی با نیترات نقره و دات بلات وجود پروتئین تخلیص شده را نشان می داد اما میزان آن کم بود به نحوی که روش مورد استفاده نیازمند اصلاح می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پشتیبانی علوم پزشکی مشهد به دلیل حمایتهای مالی از این طرح پژوهشی تقدیر و تشکر می گردد.

References

1- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.* Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:7415–9.
2- Roman GC, Vernant JC, Osame M. *HTLV-1 and the Nervous System.* Neurology and Neurobiology Vol.51, 1989.ed.
3- Safai B, Huang JL, Boeri E, Farid R, Raafat J, Schutzer P, Ahkami R, Franchini G. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 1996; 12:1185-1190
4- Farid R, Etemadi M, Baradaran H, Nikbin B. *Seroepidemiology and virology of HTLV-1 in the city of Mashhad,northeastern Iran.* Serodiagn. Immunother. Infect. Disease .1993; 5: 251-252.
5- Taebi SZ. *Human T Lymphotrophic Virus (HTLV-1) Related Diseases.* Iran Red Crescent Med J.2011; 13(6) 374-376.
6- Yoshida M. *Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control.* Annu Rev Immunol .2001; 19:475-496.
7- Franchini G, Fukumoto R, Fullen JR. *T-cell control by HTLV-1.* Int J Hematol. 2003; 78:280-296.
8- Jeang K, Giam CZ, Majone F, Aboud M. *Life ,death and tax:Role of HTLV- oncoprotein in genetic instability and cellular transformation.* J Biol Chem. 2004:279:31991-31994.
9- Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. *Retrovirology*. 2004; 1:20.
10- Mortreux F, Gabet AS and Watte E. *Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo*. Leukemia. 2003; 17:26-38.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Abbaszadegan MR, Gholamin M, Tabatabaee A, FaridR, Houshmand M, Abbaszadegan M. *Prevalence of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 among Blood Donors from Mashhad, Iran.* Journal of Clinical Microbiology. 2003;2593-2595
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Pr; 2nd edition ;1989
13. Jeang KT, Giam CZ, Nerenberg M, Khoury G. *Abundant Synthesis of Functional Human T-Cell Leukemia Virus Type I p40x Protein in Eucaryotic Cells by Using a Baculovirus Expression Vector*. Journal of Virology. 1987;63:707-713.
14. Tanaka Y, Masuda M, Yoshida A, Shida H, Nyunoya H, Shimotohno K, Tozawa H. *An antigenic structure of the trans-activator protein encoded by human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I), as defined by a panel of monoclonal antibodies.* AIDS Res Hum Retroviruses.1992;8:227-235.
15. Lindholm PF, Marriott SJ, Gitlin SD, Brady JN. *Differential precipitation and zinc chelate chromatography purification of biologically active HTLV-I Tax1 expressed in E. coli.* J Biochem Biophys Methods.1991;22:233-241
16. Grassmann R, Aboud M , Jeang KT. *Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax*. Oncogene. 2005; 24: 5976–5985
17. Kim YM , Rami´rez JA , Mick JE, Giebler HA, Yan JP, Nyborg JK. *Molecular Characterization of the Tax-containing HTLV-1Enhancer Complex Reveals a Prominent Role for CREB Phosphorylation in Tax Transactivation.* THE JB Chmistry. 2007; 282:18750-18757.
18. Ho YK, Zhi H, DeBiaso D, Philip S, Shih HM, Giam CZ. *HTLV-1 Tax-Induced Rapid Senescence Is Driven by the Transcriptional Activity of NF-κB and Depends on Chronically Activated IKKα and p65/RelA*. J. Virol. 2012; 86:9474-9483.

Archive of SID

www.SID.ir