Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۸۳

تخلیص وارزیابی خواص HBeAg نوترکیب به همراه برچسب هیستیدینی با ساختار فیزیولوژیک طبیعی، بدنبال کلونینگ و بیان آن در *E.coli*

آرش آرش کیا [۱و۲]، فرزین روحوند [۱]، سیدمهدی سادات [۱]، مهدی فروزنده [۲]، صفیه امینی [۱]، سعید عندلیبی [۱]

۱- انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز
۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

چکیده

آلودگی به ویروس هپاتیت B (HBV) یکی از مسائل اصلی بهداشت جهانی است بطوریکه درحال حاضر حدود ۳۶۰ میلیون نفر درجهان و دو میلیون نفر در ایران به این ویروس آلوده اند. در میان آنتی ژنهای این ویروس، عملکرد فیزیولوژیک HBeAg هنوز نامشخص می باشد بطوریکه در بیماران HBeAg مثبت حضور این آنتی ژن بعنوان مارکر تکثیر ویروس در نظر گرفته می شود و احتمالا در پاتوژنز و پایداری بیماری نقش دارد در حالیکه در بیماران HBeAg منفی، تفاوت قابل ملاحظه ای در سیر بالینی بیماری مشاهده نشده است. در حال حاضر دسترسی به مقادیر زیاد این آنتی ژن جهت کاربردهای تحقیقی و تشخیصی با استفاده از بیان این آنتی ژن بصورت نوترکیب در سیستمهای بیانی مختلف، میسر گشته است. در تحقیق حاضر با هدف تولید HBeAg نوترکیب به همراه برچسب هیستیدینی، بخشی از ژن HBeAg که دقیقا مطابق با توالی کد کننده آنتی ژن موجود در خون بیماران مبتلا بود، جداسازی و در وکتور pQE-30 کلون گردید. این وکتور برچسب 6x His را به انتهای آمینی پروتئین مورد نظر متصل می کند. وکتور نوترکیب حاصل جهت تایید صحت ساختار، تحت برش با آنزیمهای محدود کننده قرار گرفت و سپس به سلولهای *E.coli* M15 ترانسفورم گردیده و جهت بیان پروتئین، القاء شیمیایی با IPTG انجام شد. پس از انجام عمل تخلیص، نتایج SDS-PAGE، ELISA و وسترن بلاتینگ نشان داد که HBeAg نوترکیب بدست آمده، خواص کامل آنتی ژنیک HBeAg که بطور فیزیولوژیک در خون بیماران مشاهده می شود را داراست و افزوده شدن اپی توپهای His-tag نه تنها اثری بر روی این خصوصیات نداشته است بلکه کاربرد این برچسب امکان استفاده از کروماتوگرافی جذبی با Ni-NTA و تخلیص آسان و یک مرحله ای پروتئین را فراهم می کند. این پژوهش یک روش ساده و کارامد را برای تهیه HBeAg نوترکیب به میزان زیاد و خلوص بالا برای کاربردهای تشخیصی و تحقیقی در باب فیزیولوژی و پاتوژنز این آنتی ژن معرفی می کند.

واژه‌های کلیدی : HBeAg نوترکیب، برچسب هیستیدینی، خصوصیات فیزیولوژیک HBeAg، کروماتوگرافی جذبی Ni-NTA, pQE30.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری هپاتیت B یکی از مسائل اصلی بهداشت جهانی است بطوریکه در حال حاضر حدود ۳۶۰ میلیون نفر در دنیا به این ویروس آلوده اند و ایران با میزان آلودگی ۳ درصد، جزء مناطق با شیوع متوسط می باشد [۱]. این بیماری در ۵ تا ۱۰ درصد موارد به صورت مزمن درمی‌آید و در نهایت ممکن است تبدیل به سیروز یا کارسینوم هپاتوسلولار شود [۲]. ویروس عامل این بیماری (HBV) سه آنتی ژن به نامهای HBsAg، HBcAg وHBeAg را کد می کند که در این میان HBeAg، آنتی ژن ترشحی این ویروس می باشد و علیرغم آنکه نقش فیزیولوژیک آن در بیماریزایی بخوبی شناسایی نشده است، به نظر می رسد که بعنوان عامل تعدیل کننده سیستم ایمنی میزبان در مقابله با ویروس عمل می کند و با تضعیف سیستم ایمنی، مانع پاکسازی ویروس شده و باعث ایجاد عفونت مزمن می گردد [۳و۴]. همچنین حضور و گسترش واریانهایی از این ویروس که بدلیل جهش در ژنوم خود، فاقد توانایی تولید HBeAg هستند و وجود برخی گزارشها در مورد ارتباط میان این واریانهای جهش یافته و هپاتیت برق آسا، نقش ایمونومدولاتوری این آنتی ژن را بیش از پیش مطرح نموده است [۵ و۶ و ۷].

استفاده از داروهایی مانند اینتر فرون آلفا غالبا موجب کاهش تکثیر ویروس و بهبودی می شود ولی به دلیل گرانی، بروز عوارض جانبی و عدم پاسخ به درمان در برخی از مبتلایان، در استفاده از این داروها محدودیت وجود دارد [۵]. مناسبترین روش جهت پی بردن به چگونگی اثر درمانی این داروها، اندازه گیری کمی DNA ویروس به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) است [۸]. از آنجایی که این روش پر هزینه بوده و قابل انجام در همه آزمایشگاهها نمی باشد ، از سنجش کمی HBeAg ویا آنتی بادی علیه آن به روش الایزا که ارزش مشابه با اندازه گیری میزان DNA ویروس دارد،جهت کنترل روند درمان هپاتیتB استفاده می‌شود، زیرا میزان کمی این آنتی ژن رابطه مستقیمی با همانند سازی ویروس دارد و کاهش میزان آن می‌تواند نشانه پاسخ مثبت به درمان باشد [۸].

ویروس هپاتیت B دارای چهار قالب خواندن ژنتیکی (ORF) می باشد که یکی از آنها بنام قالب خواندن ژنتیکی C دارای دو کدون آغاز ترجمه (ATG) به فاصله ۲۹ کدون از یکدیگر می باشد که شروع ترجمه از دومین کدون آغاز باعث ساخته شدن HBcAg و شروع ترجمه از کدون آغاز اول منجر به ایجاد پروتئین precore به وزن ۲۵kD می شود. ۱۹ اسید آمینه اول این پروتئین، توالی سیگنال می باشد که پس از ورود به شبکه آندوپلاسمیک برداشته شده و پروتئینی به وزن ۲۲kD با نام p22 ایجاد می شود که قبل از ترشح از سلول، انتهای کربوکسیل این پروتئین که غنی از آرژنین است، تحت تاثیر آنزیم آسپارتیل پپتیداز قرار گرفته و جمعیت هتروژنی از پلی پپتیدها با وزن ۲۲-۱۷ کیلودالتون ترشح می شود که همان HBeAg بوده و نوع غالب قابل مشاهده آن در خون بصورت kD ۱۷ (p17) می باشد [۹].

امروزه HBeAg مورد نیاز جهت ساخت کیتهای الایزا و مطالعات تحقیقاتی و فیزیولوژیک بصورت نوترکیب در میزبانهای مختلف تولید می شود [۱۰و۱۱و۱۲و۱۳]. در تحقیق حاضرژن کد کننده HBeAg که مطابق با نوع ۱۷ کیلودالتونی (p17) این پلی پپتید در خون مبتلایان به بیماری می باشد، از سویه ayw ویروس هپاتیت B جدا شده و بصورت فیوژن همراه با برچسب هیستیدینی (His-tag) در *E.coli* بیان گردید. استفاده از سیستمهای فیوژن در ابراز پروتئین های نو ترکیب دارای مزایای متعددی از قبیل قابلیت تخلیص ساده تر ، حلالیت بیشتر ، تشخیص سریعتر و آسانتر و افزایش پایداری پروتئین می باشد[۱۴ و۱۵]. یکی از بهترین سیستمهای فیوژنی، سیستم فیوژنی 6xHis-tag

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد که با اتصال به Ni-NTA agarose باعث تخلیص سریع و راحت پروتئین می گردد ولی همزمان افزوده شدن این برچسب (tag) که حاوی چندین اپی توپ می باشد، امکان ایجاد تغییرات آنتی ژنیک در فیوژن پروتئین نوترکیب را محتمل می سازد [۱۶]. هدف از مطالعه حاضر بررسی خواص آنتی ژنیک HBeAg تولید شده در چنین سیستمی با امکان کاربرد آن در مطالعات تشخیصی و تحقیقی می باشد. بنابر اطلاع ما این نخستین بار است که چنین مطالعه ای بر روی HBeAg با ساختاری مشابه آنچه در خون مبتلایان وجود دارد [۵]، صورت می پذیرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از آنزیم *Pwo* DNA polymerase (Roche) جهت انجام PCR استفاده گردید. وکتور pQE-30، Penta-His Ab، Ni-NTA agarose و سویه میزبانی *E.coli* M15 [pREP4] که مقاوم به کانامایسین می‌باشد از شرکت Qiagen تهیه گردیدند. آنزیمهای محدود کننده (Restriction enzyme) از شرکت Fermentas و آنتی بیوتیکها و غشاء نیتروسلولزی از شرکت Sigma خریداری شدند. محیطهای کشت از شرکت Gibco BRL، Monoclonal Anti-HBe از شرکت Biogenesis و سایر مواد از شرکت Merck تهیه گردیدند. سویه میزبانی *E.coli* DH5α که جهت کلونینگ و استخراج پلاسمید بکار رفته است، مربوط به کلکسیون بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور می باشد.

روشهای مولکولی: ژن HBeAg (از کدون شماره ۱۰ ناحیه precore تا قبل از توالی غنی از آرژنین) از پلاسمید pHB320 که حاوی ژنوم کامل HBV سویه ayw می باشد [۱۷]، به روش PCR با استفاده از یک جفت پرایمر (Forward: 5' ACTGTTGGATCCTCCAAGCTGTGC 3' و Reverse: 5' CTCGTCGGGATCCTTAAGTAGTCTCCG 3') که حاوی مناطق شناسایی آنزیم *BamHI* در انتهای ´۵ خود بودند، جداسازی گردید. انجام PCR با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد آغاز گردید و با انجام ۳۰ سیکل متوالی (۹۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۸ °C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه) ادامه یافته و نهایتا با مرحله Final extension (به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C) خاتمه یافت. محصول PCR پس از آنالیزهای آنزیمی و تایید صحت آن، در وکتور pQE-30 کلون شد. این وکتور دارای پروموتر فاژ T5 و دو اپراتور بوده و در سمت ´۵ محل کلون کردن ژن خارجی، دارای کدون آغاز (ATG) و توالی کد کننده هیستیدین (6xHis-tag) می باشد که به صورت فیوژن همراه با ژن خارجی بیان می گردد (شکل ۱). وکتور نو ترکیب حاصل (pQEH) به سویه *E.coli* DH5α ترانسفورم شد وپس از تکثیر و استخراج پلاسمید، صحت جهت کلونینگ و نیز کاست بیانی به روش هضم آنزیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت وکتور نوترکیب تایید شده به سویه بیانی *E.coli* M15 [pREP4] ترانسفورم گردید تا بیان ژن مورد بررسی قرار گیرد. کلیه روشهای مولکولی بر طبق پروتوکلهای استاندارد انجام پذیرفت [۱۸].

القاء، بهینه سازی و بررسی بیان پروتئین نوترکیب: ابتدا یک کشت اولیه در ۵mL از محیط کشت 2xYT حاوی آمپی سیلین و کانامایسین تهیه شد و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، ۲۰۰ میکرولیتر از آن به ۱۰mL محیط 2xYT حاوی آنتی بیوتیک منتقل گردید و در ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با چرخش ۱۵۰rpm قرار داده شد تا جذب نوری آن در ۶۰۰nm به ۰/۵ تا ۰/۷ برسد. در این زمان ۱/۵mL از این محیط بعنوان نمونه قبل از القاء برداشت شده و به بقیه محیط کشت به میزان ۰/۰۵ mM از IPTG بعنوان القاء کننده افزوده شده و ۴ ساعت دیگر در شیکر انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، سه نمونه ۱/۵ میلی لیتری برداشت شده و یکی از نمونه ها

www.SID.ir

Archive of SID

بعنوان نمونه القاء شده و دو نمونه دیگر جهت مراحل تخلیص بصورت native و denaturing در مقیاس کم (miniscale) در نظر گرفته شدند [۱۹].به منظور بهینه سازی بیان پروتئین نوترکیب، پارامترهایی نظیر سویه های میزبان، محیط کشت، دمای رشد، دانسیته سلولی در زمان القاء، غلظت ماده القاء کننده و مدت زمان القاء بررسی شدند تا بهترین شرایط جهت بیان HBeAg نوترکیب بدست آید و پس از دستیابی به این شرایط، بیان و تخلیص پروتئین در مقیاس ۵۰ میلی لیتری انجام شد. کلیه نمونه ها پس از تعیین دانسیته باکتریها با اندازه گیری جذب نوری در ۶۰۰ nm و همگن سازی، به روش SDS-PAGE در ژل ۱۵٪ بررسی ومقایسه گردیدند [۲۰]. برای تعیین میزان تولید پروتئین نوترکیب نیز از دو روش densitometric scanning of the gel و اندازه گیری جذب نوری در ۲۸۰ nm استفاده گردید [۱۸].

تخلیص پروتئین نوترکیب به روش native و denaturing: روند تخلیص بر طبق پروتکل ارائه شده توسط شرکت سازنده (Qiagen) Ni-NTA agarose و بر اساس روش عمومی MCAC (Metal chelated affinity chromatography) صورت پذیرفت [۱۵ و ۲۱]. بافرهای لیز کننده، شستشو و الوشن مورد نیاز جهت تخلیص در حالت native حاوی NaH_2PO_4 ۵۰ mM، NaCl ۳۰۰ mM و به ترتیب ۵، ۲۰ و ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول با pH=۸ بودند. جهت تخلیص پروتئین بصورت native تمام مراحل کار در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد بدین صورت که ابتدا رسوب سلولی در ۵۰ میکرولیتر ازبافر لیز کننده حل شده و مقدار ۱ mg/ml لیزوزیم به آن افزوده شده و سی دقیقه در یخ قرار داده شد. سپس لوله میکروسانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی به لوله میکروسانتریفوژ جدید و از قبل سرد شده، منتقل گردید و ۱۵ میکرولیتر از Ni-NTA agarose به آن افزوده و ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد به همراه تکانهای آرام قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ ثانیه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد و بر روی رسوب، ۱۰۰ میکرولیتر بافر شستشو افزوده شده و پس از ۱۰ ثانیه سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ rpm و دور ریختن مایع رویی مجددا عمل شستشو انجام شد. سپس بر روی رسوب حاصل، ۲۰ میکرولیتر از بافر الوشن افزوده و پس از سانتریفوژ، مایع رویی به لوله میکروسانتریفوژ جدیدی منتقل شد و عمل الوشن دو بار دیگر نیز تکرار شد [۲۱]. در روش denaturing، بافرهای لیز کننده، شستشو و الوشن موردنیاز جهت تخلیص حاوی NaH_2PO_4 ۱۰۰ mM، Tris-HCl ۱۰ mM و Urea ۸ M و pH به ترتیب ۸، ۶/۳ و ۵ بودند. در ابتدا رسوب باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده حل شده و سپس ۱۰ دقیقه سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ rpm انجام گرفت و مایع رویی به لوله میکروسانتریفوژ جدیدی منتقل شده و ۲۵ میکرولیتر از Ni-NTA agarose به آن افزوده گشته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از این مدت، سانتریفوژ به مدت ۱۰ ثانیه در ۱۰۰۰۰ rpm انجام گشت و مایع رویی دور ریخته شد. سپس رسوب حاصل دو بار با ۲۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو، شسته شد و نهایتا بر روی رسوب سه بار به میزان ۲۰ میکرولیتر بافر الوشن افزوده و پس از سانتریفوژ، مایع رویی در سه لوله میکروسانتریفوژ ریخته شد و محتویات هر سه لوله به همراه لوله های روش native و نمونه های قبل و پس از القاء جهت SDS-PAGE آماده شدند [۲۱].

ارزیابی خواص آنتی ژنیک HBeAg تولید شده: برای ارزیابی خواص آنتی ژنیک و قابلیت کاربرد تشخیصی پروتئین نوترکیب از دو روش الایزا و وسترن بلاتینگ استفاده گردید. جهت انجام الایزا از کیت Enzygnost HBe

www.SID.ir

Archive of SID

monoclonal (Behring) طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد که شناسایی HBeAg را به روش الایزای ساندویچ مستقیم (Direct sandwich ELISA) انجام می‌دهد. به این صورت که آنتی ژن نوترکیب تولید شده درون میکروپلیت پوشیده شده از Anti-HBe Ab افزوده گردید و پس از شستشو، آنتی بادی کنژوگه با پراکسیداز (Anti-HBe/POD conjugate) اضافه شد و در نهایت با افزودن کروموژن TMB، شدت رنگ ایجاد شده در طول موج ۴۵۰ nm قرائت گردید. روش الایزای ساندویچ جهت شناسایی آنتی ژن، ۲ تا ۵ برابر حساستر از روشی است که در آن آنتی ژن مستقیما به میکروپلیت متصل گردد [۲۲]. جهت اثبات عدم تداخل HBeAg نوترکیب بیان شده با خصوصیات آنتی ژنیک HBcAg، الایزای رقابتی مستقیم (Direct competitive ELISA) با استفاده از کیت Enzygnost Anti-HBc monoclonal (Behring) بر طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گردید. بطور خلاصه آنتی ژن نوترکیب تولید شده پس از انکوباسیون با Anti-HBc، به میکروپلیت پوشیده شده از HBcAg افزوده گردید و پس از شستشو، Anti-HBc/POD conjugate اضافه شد و شدت رنگ ایجاد شده پس از افزودن کروموژن TMB، در طول موج ۴۵۰nm اندازه گیری شد.

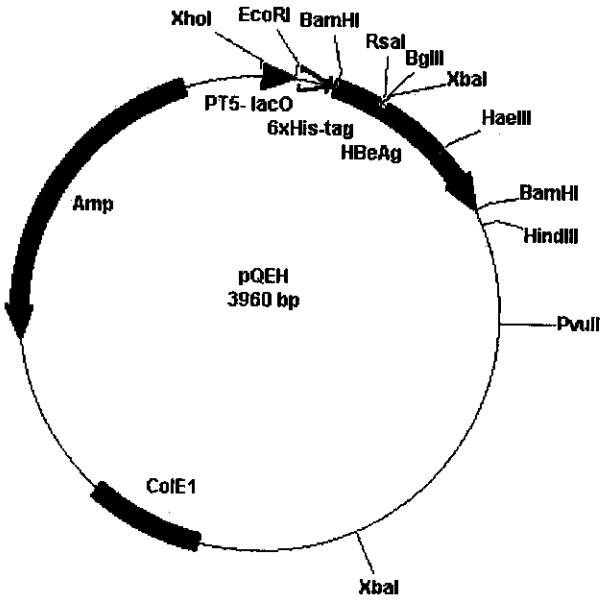
در تحقیق حاضر، وسترن بلاتینگ به روش استاندارد [۱۸] با استفاده از Penta-His Ab (علیه اپی توپ هیستیدنی) ونیز Monoclonal Anti-HBe (علیه اپی توپ خطی HBeAg نو ترکیب) انجام گرفت. بطور خلاصه، پس از انتقال باندهای پروتئینی به غشاء نیتروسلولزی و انکوباسیون با Anti-HBe (رقت ۱/۱۰۰۰)، آنتی بادیهای متصل نشده توسط شستشو با محلول PBS از محیط عمل خارج شدند و آنتی بادی ثانویه کنژوگه با پراکسیداز (رقت ۱/۶۰۰۰) افزوده گردید و پس از افزودن سوبسترای رنگزا (DAB)، باندهای پروتئینی مورد نظر مشاهده شد.

نتایج

آنالیز آنزیمی ژن تکثیر شده HBeAg و پلاسمید نوترکیب:

جهت اطمینان از اینکه ژن حاصل از PCR دارای الگوی هضم آنزیمی ژن HBeAg است، هضم محصول PCR توسط دو آنزیم محدودالاثر *Rsa I* و *Hae III* انجام گرفت و قطعات مورد پیش بینی با توجه به اندازه ۴۹۹ جفت بازی HBeAg بدست آمد (شکل ۲). لازم به ذکر است که جهت تعیین اندازه قطعات بدست آمده، از نرم افزار LabWorks 4.0 (UVP Ltd.) استفاده گردید.

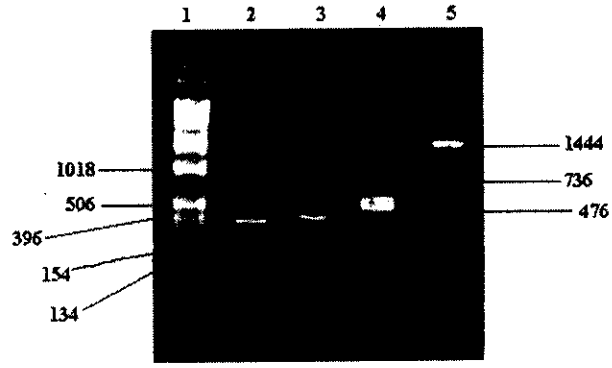
جهت اطمینان از صحت کلونینگ، پلاسمید نوترکیب تحت تاثیر آنزیم *BamH I* قرار گرفت تا خروج قطعه هم اندازه محصول PCR تایید شود. سپس جهت تایید کاست بیانی و صحت جهت کلونینگ، برش با آنزیمهای محدود کننده متعدد در بدنه وکتور و ژن کلون شده انجام شد (شکل ۱) (نتایج برش نشان داده نشده است).



شکل ۱: ساختار وکتور بیانی pQEH و نقشه هضم آنزیمی آن. PT5-lacO: پروموتر فاژ T5 و اپراتورهای *lac*

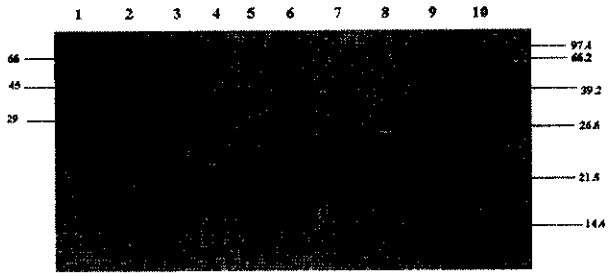
www.SID.ir

Archive of SID



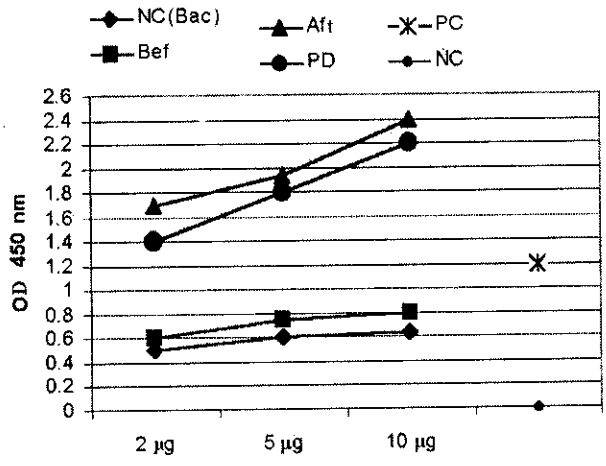
شکل ۲ : بررسی محصول PCR از لحاظ اندازه و تایید آن توسط آنزیمهای محدود کننده. ستون ۱و۵ : مارکر، ستون ۲ : محصول PCR هضم شده با آنزیم *HaeIII* (قطعات با اندازه های ۱۷۷ bp و ۳۲۲ bp)، ستون ۳ : محصول PCR هضم شده با آنزیم *RsaI* (قطعات با اندازه های ۱۲۱ bp و ۳۷۸ bp)، ستون ۴ : محصول PCR بدون هضم آنزیمی (bp ۴۹۹)

تخلیص وارزیابی پروتئین نوترکیب: پس از القاء چهار ساعته باکتریهای حاوی پلاسمید نوترکیب توسط IPTG، نمونه ها به روش SDS-PAGE در ژل ۱۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفتند. الکتروفورز برای نمونه های قبل از القاء و پس از القاء و نیز سه الوت روش native و سه الوت روش denaturing انجام شد که بیان پروتئین در نمونهٔ پس از القاء به وضوح قابل مشاهده بود (شکل ۳) و همانطور که در ستونهای ۴ تا ۹ شکل ۳ مشهود است، نمونه‌های پروتئینی تخلیص شده، در روش denaturing در هر سه الوت وجود دارند و بدلیل بیان پروتئین بصورت اجسام انکلوزیونی نامحلول [۱۵]، در تخلیص به روش native (ستون‌های ۴ تا۶)، پروتئینی مشاهده نگردید. اندازه ۱۹ کیلودالتونی باند پروتئین تخلیص شده که بدنبال افزوده شدن برچسب هیستیدینی بدست آمده نیز مطابق با مقدار از قبل پیش بینی شده است.



شکل ۳ : الکتروفورز نمونه های قبل و پس از القاء و پروتئین تخلیص شده. ستون ۱: مارکر، ستون ۲: نمونه قبل از القاء، ستون ۳: نمونه پس از القاء، ستونهای ۴ و۵ و۶: پروتئینهای تخلیص شده به روش native، ستونهای ۷ و۸ و۹ : پروتئینهای تخلیص شده به روش denaturing

در مرحله بعد آنتی ژنیسیته HBeAg نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش ELISA بر روی غلظتهای۲، ۵ و۱۰ میکروگرمی از نمونهٔ قبل از القاء و نمونهٔ پس از القاء که به روش denaturing لیز و پروتئین آنهاتخلیص شده بود و نیز کنترل مثبت (PC) و کنترل منفی (NC) مربوط به خود کیت انجام گرفت و نتایج حاصل مؤید آنتی ژنیسیته مناسب نمونه‌های پس از القاء بودند (شکل ۴).

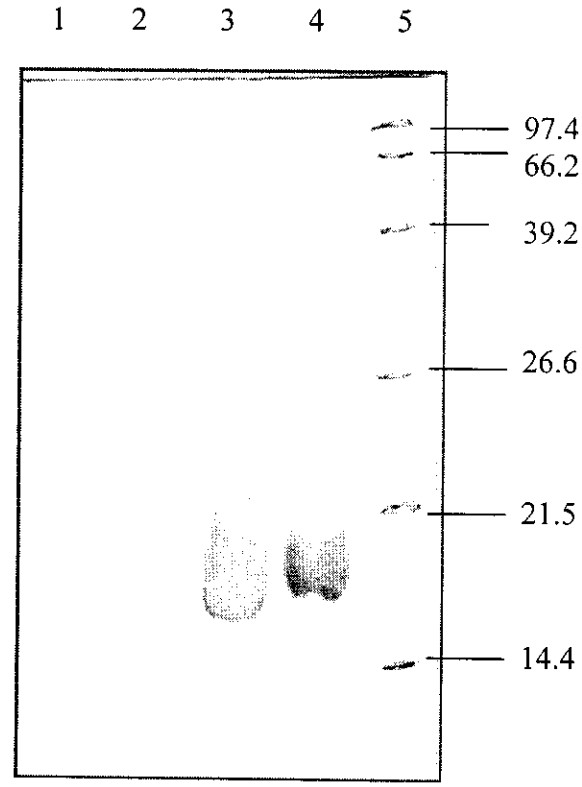


شکل۴ : ارزیابی خصوصیت آنتی ژنیک HBeAg نوترکیب به روش ELISA (OD_{450nm}). NC(Bac) : لیزات باکتری فاقدپلاسمید نوترکیب، Bef : لیزات باکتری قبل از القاء، Aft : لیزات باکتری پس از القاء، PD : پروتئین تخلیص شده به روش denaturing، PC : کنترل مثبت کیت، NC : کنترل منفی کیت

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج آزمایش وسترن بلاتینگ با استفاده از Penta- His Ab و Monoclonal Anti-HBe نیز نشان داد که پروتئین تولید شده حاوی اپی توپ هیستیدینی و نیز اپی توپهای آنتی ژنیک HBeAg می‌باشد (شکل ۵). با انجام آزمون الایزا جهت اثبات عدم تداخل خصوصیات آنتی ژنیک HBeAg نوترکیب تولید شده با HBcAg نیز نشان داده شد که پروتئین تولید شده فقط خصوصیات آنتی ژنیک HBeAg را دارا می باشد. در نهایت پس از بهینه سازی شرایط بیان پروتئین، نشان داده شد که در سویه *E.coli* M15 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و محیط کشت 2xYT و ۴ ساعت پس از القاء با غلظت ۰/۰۵ mM از IPTG در OD_{600} =۰/۷ در زمان القاء در محیط کشت ۵۰ میلی لیتری،



شکل ۵: وسترن بلاتینگ با استفاده از Monoclonal Anti –HBe. ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: نمونهٔ قبل از القاء، ستون ۳: نمونهٔ پس از القاء، ستون ۴: پروتئین تخلیص شده به روش denaturing ،ستون ۵: مارکر

میزان بیان بر اساس روش densitometric scanning of the gel، حدود ۳۳٪ کل پروتئین های باکتری بوده و جذب نوری پروتئین تخلیص شده در ۲۸۰ nm نیز نشان داد که میزان تولید پروتئین نوترکیب ۶ mg/L بوده است.

بحث

در بیماری هپاتیت B که ویروسی به همین نام عامل آن است، کبد دچار نکروز،آماس و تغییرات پاتولوژیک می گردد [۲۳]. سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار از عوارض مهم بیماری هپاتیت B به شماری می روند [۲۴]. در صورت درمان با داروهایی نظیر اینترفرون آلفا، بروز موارد فوق به حداقل می رسد ولی بدلیل وجود عوارض جانبی و گرانی و نیز عدم پاسخ به درمان در تمام بیماران، در استفاده از این داروها محدودیت وجود دارد [۲۵]. بدین جهت از دو روش یعنی اندازه گیری کمی DNA ویروس ونیز میزان HBeAg [۲۶] و یا آنتی بادی علیه آن در سرم بیمار به منظور کنترل پاسخ به درمان استفاده می شود. سنجش میزان HBeAg به روش الایزا که روشی ساده و قابل انجام در همه آزمایشگاهها است، بر روش اول (اندازه گیری کمی DNA ویروس) ارجحیت دارد [۸]. در حال حاضر آنتی ژن مورد نیاز جهت ساخت کیت الایزا به روش نوترکیب و در میزبانهای *E.coli* و ساکاروماسیس سروزیه تهیه می شود[۱۰ و۱۱ و۱۲و۱۳]. دسترسی به HBeAg علاوه بر مصارف تشخیصی، جهت مطالعه بر روی خصوصیات فیزیولوژیک این آنتی ژن نیز مورد نیاز است بطوریکه از این آنتی ژن در تحقیقات متعددی از جمله تفاوت ایمنی زایی سلولی این آنتی ژن با HBcAg [۲۷] ونیز بررسی فعال شدن ایمنی هومورال توسط آن [۲۸] استفاده شده است. مزایای سیستم بیانی *E.coli* [۱۴ و۱۵] و نیز فواید برچسبهای فیوژن (Fusion tags) خصوصا برچسبهای هیستیدینی در تسهیل تخلیص و شناسایی پروتئین [۱۶]، مهمترین عوامل ترغیب

www.SID.ir

Archive of SID

کننده جهت انجام طرح تحقیقاتی حاضر می باشند.

در این مطالعه، ابتدا ژن HBeAg از کدون شماره ۱۰ ناحیه precore تا قبل از توالی غنی از آرژنین انتهای کربوکسیل بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و با استفاده از وکتور pHB-320 بعنوان الگو که حاوی ژنوم کامل ویروس هپاتیت B سویه ayw است[۱۷]، جدا سازی شد(شکل ۲). در مرحله بعد برش محصول PCR و وکتور pQE-30 با آنزیم *BamHI* انجام شده و کلونینگ محصول PCR در پلاسمید فوق منجر به ایجاد ساختار بیانی pQEH گردید(شکل ۱). وکتور pQE-30 حاوی دو اپراتور *lac*، پروموتر T5 و منطقه اتصال ریبوزوم (RBS II) در انتهای ۵ محل ورود ژن خارجی است که باعث بیان بالای پروتئین نوترکیب کلون شده در این وکتور می گردد [۲۱].

وکتور نوترکیب pQEH به *E.coli* DH5α ترانسفورم شد و از آنجایی که دو سر قطعه کلون شده در وکتور با آنزیم *BamHI* برش داده شده بود، امکان کلونینگ در جهت معکوس وجود داشت بنابراین با استفاده هضم آنزیمی (Restriction mapping) علاوه بر تایید صحت جهت قطعه کلون شده، صحت کلونینگ نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از اطمینان از صحت کلونینگ، وکتور pQEH به سویه بیانی M15 باکتری *E.coli* منتقل گردید. این سویه حاوی پلاسمید pREP4 می باشد [۲۱] که قادر است رپرسور $LacI^q$ را تولید کرده و بصورت ترانس (trans) بیان در پلاسمید pQEH را مهار نماید. باکتری فوق تحت القاء با IPTG قرار گرفت و قابلیت تخلیص پروتئین به روش denaturing و عدم توفیق در تخلیص بصورت native نشان داد که پروتئین تولید شده بصورت اجسام انکلوزیونی تجمع یافته است. تشکیل این اجسام در مورد پروتئینهای دارای گروههای پروستتیک و پیوندهای دی سولفیدی می‌تواند باعث از دست رفتن فعالیت و ساختمان پروتئین گردد و گاه نیاز به استفاده از راهکارهایی مانند استفاده از غلظتهای کمتر ماده القاء کننده، کاهش دمای رشد و بیان پروتئینها بصورت فیوژن وجود دارد تا حلالیت پروتئین افزایش یابد [۲۹]. نتایج آزمایشات ELISA و وسترن بلاتینگ نشان داد که HBeAg نوترکیب که بصورت اجسام انکلوزیونی تولید شده بود، علیرغم داشتن یک پیوند دی سولفیدی خصوصیات آنتی ژنیک خود را حفظ نموده و بنابراین نیازی به انجام مراحل مشکل و پرهزینه Refolding نبود [۵]. با توجه به تعیین وزن مولکولی باند HBeAg بر اساس میزان حرکت باندهای مارکر بر روی ژل SDS-PAGE(منحنی استاندارد)، مشاهده شد که وزن مولکولی HBeAg بیان شده، حدود ۱۹ کیلودالتون می باشد که مطابق با وزن مولکولی مورد انتظار بدنبال افزوده شدن برچسب RGS-His [۲۱] بود.

همچنین با توجه به قابلیت تخلیص توسط Ni-NTA agarose و واکنش با Penta-His Ab، انتهای آمینی پروتئین نوترکیب بطور کامل و بصورت فیوژن با برچسب هیستیدینی بیان شده است و این در حالیست که افزوده شدن توالی RGS-His به ابتدای پروتئین نوترکیب، باعث افزوده شدن سه اپی توپ اضافی به انتهای آمینی پروتئین می شود [۱۷]. از آنجائیکه HBeAg نو ترکیب جهت مصارف تشخیصی و تحقیقات فیزیوپاتولوژیک تولید شده و نیز با توجه به نتایج آزمایشات ELISA و وسترن بلاتینگ به نظر می رسد افزوده شدن این سه اپی توپ تاثیری بر خصوصیات آنتی ژنیک پروتئین تولید شده نداشته و از آن می توان بعنوان وسیله ای جهت تسهیل تخلیص (تخلیص یک مرحله ای) و تشخیص پروتئین نوترکیب استفاده کرد بطوریکه در تحقیق حاضر نیز نه تنها از Penta-His Ab بصورت موفقیت آمیزی جهت شناسایی فیوژن پروتئین تولید شده، استفاده گردید بلکه شناسایی خود اپی توپ آنتی ژنیک HBeAg نیز بوسیله Monoclonal Anti-HBe با موفقیت صورت پذیرفت که البته عدم تغییر در ساختمان و

www.SID.ir

Archive of SID

عمل پروتئینها بدنبال افزودن توالی 6xHis-tag در بسیاری از مطالعات قبلی نیز مشاهده شده است [۳۰و۳۱و۳۲].

تا کنون در پژوهشهای انجام شده، پیش ساز ۲۵ کیلودالتونی HBeAg (p25 precore protein) و پیش ساز ۲۲ کیلودالتونی آن (p22) و نیز توالی کد کننده HBeAg نهایی (p17) که شامل ۱۰ اسید آمینه ناحیه precore بوده و فاقد توالی غنی از آرژنین می باشد، در میزبانهای مختلفی از جمله *E.coli* و ساکارومایسس سرویزیه بیان شده اند [۱۳و ۳۳و۳۴و۳۵]. بر طبق این پژوهشها، هر سه پلی پپتید بیان شده، واجد خصوصیات آنتی ژنیک HBeAg بوده اند و واکنش متقاطع با HBcAg نشان نداده اند. بر طبق یکی از این مطالعات [۳۳]، محصول HBeAg نهایی (p17) نسبت به پیش سازهای آن افینیتی بیشتری برای اتصال به سرم بیماران anti-HBe مثبت نشان داده است. در این پژوهش نیز نشان داده شد که علیرغم افزوده شدن برچسب هیستیدینی به ژن کد کننده محصول HBeAg نهایی (p17)، پروتئین بیان شده دارای خصوصیات آنتی ژنیک مناسب بوده است که احتمالا آنرا کاندیدای مناسبی جهت کاربری در تستهای تشخیصی و آزمایشگاهی می نماید که پس از مطالعات سرولوژیک با سرم بیماران Anti-HBe مثبت، مشخص خواهد گردید..

در تحقیق حاضر هدف از بهینه سازی شرایط بیان، افزایش میزان ابراز پروتئین ولو بصورت غیر محلول بوده است. به این منظور چندین پارامتر موثر در میزان بیان پروتئین تغییر داده شد و حتی المقدور در بررسی هر فاکتور نتایج حاصل از بررسی پارامترهای قبل نیز دخالت داده شده است. پارامترهایی که مورد بررسی قرار گرفتند، شامل سویه میزبان، دما و محیط کشت، دانسیته سلولی در زمان القا، غلظت ماده القا کننده (IPTG) و مدت زمان القا بود. در نهایت با بهینه سازی میزان بیان پروتئین، تولید HBeAg نو ترکیب در این تحقیق به۳۳٪ کل پروتئینهای باکتری رسید. این در حالیست که در یک مطالعه میزان بیان این آنتی ژن در *E.coli*، ۱۵٪ کل پروتئینهای باکتری بوده[۱۱] ودر یک پژوهش دیگر،HBeAg بیش از ۶۵٪ کل آنتی ژنهای بیان شده در ساکارومایسس سرویزیه حاوی پلاسمید نوترکیب را تشکیل داده است [۱۳].

بطور خلاصه در این پژوهش برای نخستین بار محصول HBeAg نهایی (p17) بصورت موفقیت آمیزی بصورت فیوژن با برچسب هیستیدینی بیان گردید و طبق نتایج بدست آمده به نظر می رسد که افزوده شدن این برچسب که جهت تسهیل تخلیص و شناسایی پروتئین بکار می رود، تاثیری بر روی خصوصیات آنتی ژنیک این آنتی ژن نداشته است و آنتی ژن تولید شده و تخلیص شده به روش denaturing قابلیت کاربرد در حوزه های تشخیصی و تحقیقی را دارد.

تشکر و قدردانی

در این تحقیق از کمکهای بیدریغ آقایان فرامرز تقوی نژاد، آرش معمارنژادیان و دکتر کیهان آزادمنش برخوردار بوده ایم و بدینوسیله از این عزیزان تشکر می نماییم.

منابع

[1] افضلی، ح.، تقوی اردکانی، ع.، والی، غ. شهرستان کاشان سال ۸۰-۱۳۷۵، *فصلنامه علمی-پژوهشی فیض*، شماره ۲۳، (پائیز ۱۳۸۱)، ۵۰-۴۳.

سرواپیدمیولوژی هپاتیت Bو C در اهداء کنندگان خون

www.SID.ir

Archive of SID

[2] Grann, O.A. and Webstern, R.G. ***Encyclopedia of virology***, 2nd edition, Vol. 1, Academic press, New York, (1999).

[3] Milich, D. and Schodel, F. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: Antigen structure can affect Th cell phenotype, ***J. Virol.,*** 71 (1997) 2192-2201.

[4] Aiba, N. and Mcgarrey, M.J. The precore sequence of hepatitis B virus is required for nuclear localization of the core protein, ***Hepatology,*** 26 (1997) 1311-1317.

[5] Fields, B.V. ***Fields virology,*** 4th edition, Lippincott- Raven publishers, (2001).

[6] Omata, M., Ehata, T., Yokosuka, O. et al. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and sever hepatitis, ***N. Eng. J. Med.,*** 324 (1991) 1699-1704.

[7] Hasegawa, K., Huang, J., Rogers, S.A., Blum, H.E. and Liang, T.J. Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic fulminant hepatitis, ***J. Virol.,*** 68 (1994) 1651-1659.

[8] Bernal, F., Raymond, G., Willems, B. and Villeneuve, J.P. Quantitative assessment of serum hepatitis B e antigen, IgM hepatitis B core antibody and HBV DNA in monitoring the response to treatment in patients with chronic hepatitis, ***J. Viral Hepatitis,*** 4 (1997) 256-272.

[9] Ou, J.H. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen, ***J. Gastro Hepatol.,*** 12 suppl. (1997) S178-S187.

[10] Inada, T., Misumi, Y., Kanezaki, S., Shibata, Y., Oka, Y. and Onada, H. Synthesis of hepatitis B virus e antigen in *E.coli*, ***Virus Res,*** 14 (1989) 27-48.

[11] Wu, G.H. and Huang, Y.X. Synthesis of a recombinant DNA derived HBV e antigen and its application in diagnosis, ***Chin. J. Biotech.,*** 6 (1990) 179-187.

[12] Hollinger, F.B., Lemon, S.M. and Margolis, H. ***Viral hepatitis and liver disease,*** Williams and Wilkins, Baltimore, (1991).

[13] Broker, M., Noah, M., Nassal, M. et al. Expression of hepatitis B virus core gene products with specific immunoreactivity for e antigen (HBeAg) in *Saccharomyces cerevisiae*, ***J. Biotech.,*** 29 (1993) 243-255.

[14] Smith, A. and Dekker, M. ***Gene expression in recombinant microorganisms,*** Marcel Dekker Inc., (1994).

[15] Glover, D.M., and Hames, B.D. ***DNA cloning 2,*** 2nd edition, IRL press, (1995).

[16] Thorner, J., Emr, S.D. and Abelson, J.N. Applications of chimeric genes and hybrid proteins, ***Meth. Enzymol.,*** 326 (2000) 245-254.

[17] Bichko, V., Pushko, P., Dreilina, D., Pumpens, P. and Grens, E. Subtype ayw variant of hepatitis B virus: DNA primary structure analysis, ***FEBS Letters,*** 185 (1985) 208-212.

[18] Sambrook, J. and Russell, D.W. ***Molecular cloning,*** 3rd edition, CSHL press, (2001).

[19] Higgins, S.J. and Hames, B.D. ***Protein expression: A practical approach,*** Oxford university press, (1999).

[20] Laemmeli, V. Cleavage of structural protein during the assembly of the heated bacteriophage T4, ***Nature,*** 227 (1970) 680-685.

[21] ***Qiaexpress detection and assay handbook,*** Qiagen Company, (1999).

[22] Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstone, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G. and Smith, J.A. ***Short protocols in molecular biology,*** 4th edition, John Wiley & Sons Inc., (1999).

[23] Kew, M.C. Hepatitis viruses and hepatocellular carcinoma, ***Res. Virol.,*** 149 (1998) 257-267.

[24] Collier, L., Balows, A. and Sussam, M. ***Topley and Wilson`s microbiology and microbial infections,*** 5th edition, Vol. 1, Arnold publication, (1998).

[25] Heijthink, R.A. and Snobel, J. Quantitative measurment of HBeAg in chronic hepatitis B, ***J. Med. Virol.,*** 47 (1995) 245-250.

www.SID.ir

Archive of SID

[26] Alagiozian, A. and Antonov, K. Clinical significance of serum HBeAg and HBV DNA-specific values of virus replication in chronic hepatitis B virus infection, ***Folia. Med.,*** 40 (1998) 34-41.

[27] Milich, D.R., Mclechnan, A., Stahl, S. et al. Comparative immunogenecity of hepatitis B virus core and e antigens, ***J. Immunol.,*** 141 (1988) 3617-3624.

[28] Lazdina, U., Cao, T., Steinbergs, J., Alheim, M. et al. Molecular basis for the interaction of the hepatitis B virus core antigen with the surface immunoglobulin receptor on naive B cells, ***J. Virol.,*** 75 (2001) 6367-6374.

[29] Georgiou, G. and Valax, P. Expression of correctly folded proteins in *E.coli*, ***Curr. Opin. Biotechnol.,*** 7 (1996) 190-197.

[30] Dobeli, H. et al. Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of recombinant Plasmodium falciparum aldolase, ***Mol. Biochem. Parasitol.,*** 41 (1990) 259-268.

[31] Stuber, G., Vandy, F., Pocsik, E., Benczar, M. and Kleim, E. Expression of interleukin 2 receptor on blood lymphocytes of allogenised individuals and the auto tumor stimulation show similar kinetics of activation, ***Cancer Immunol Immunother.,*** 31 (1990) 76-80.

[32] Takes, B.J. and Girrad, M.F. Prepration of clinical grade proteins produced by recombinant DNA technologies, ***J. Immunol. Meth.,*** 143 (1991) 231-240

[33] Hwang, G.Y., Wang, J.C. and Wu, C.C. Immunological characterization of two major secreted forms of recombinant hepatitis B virus e antigens, ***Virus Res.,*** 59 (1999) 203-210.

[34] Miyanohara, A., Imamura, T., Araki, M. et al. Expression of hepatitis B virus antigen gene in *Saccharomyces cerevisiae*: synthesis of two polypeptides translated from different initiation codons, ***J. Virol.,*** 59 (1986) 176-180.

[35] Fuyuan, Z., Lili, S., Kamgxian, L. and Jinlin, H. Cloning and expression and purification of hepatitis B e-antigen precursor in *Escherichia coli*, ***Chin. Med. J.,*** 115 (2002) 722-725.

www.SID.ir