خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲ شماره ۶ زمستان ۸۴ (۲۳۱-۲۲۳)

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

محمدرضا آقاصادقی[۱]، سیدمهدی سادات[۲]، دکتر صفیه امینی[۳]، دکتر آگاتابودکوسکا[۴]، دکتر فرزین روحوند[۵]

چکیده

سابقه و هدف

آنتی‌ژن Core ویروس هپاتیت C، یک پروتئین چندکاره با ارزش‌های ویژه در اهداف تشخیصی و تحقیقات پاتوفیزیولوژیک می‌باشد. اکثر این خواص مربوط به بخش هیدروفیل (آمینو اسید: ۱۲۲-۲) این آنتی‌ژن 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 همسانه‌سازی (کلونینگ ژن)، ابراز پروتئین با بازدهی بالا، تخلیص در فرم طبیعی و ارزیابی خواص ایمونوژنیک این بخش از پروتئین Core ویروس هپاتیت C در یک سیستم پروموتری T_7 تحت القا آرابینوز، مطالعه حاضر صورت پذیرفت.

مواد وروش‌ها

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 الیزا بر روی 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 HCV Core با موفقیت و با ترادف صحیح، جداسازی و به‌طور مناسب در کاست بیانی کلون گردید. سیستم القا آرابینوز 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 تاحدود ۸۰ درصد بر روی ستون جذبی Ni-NTA را دارا می‌باشد. پروتئین خواص آنتی ژنیک خود را در ساختمان طبیعی حفظ می‌نماید.

نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار نشان داده شده که سیستم القا آرابینوز 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 داراست.

کلمات کلیدی: آنتی‌ژن Core ویروس هپاتیت C، Ni-NTA، آرابینوز، پروموتر

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

Archive of SID
www.SID.ir

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 ۰/۵ 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 (Flaviviridea) می‌باشد. ژنوم این ویروس، کدکنندهٔ یک پلی پروتئین با حدود ۳۰۰۰ آمینواسید است، که در نهایت چهار پروتئین به‌عنوان پروتئین ساختاری (P,E_2,E_1,C) و بقیه ($Ns_{5b},Ns_{5a},Ns_{4b},Ns_{4a},Ns_3,Ns_2$) به‌عنوان پروتئین‌های غیرساختاری[1] یا کاراَ معرفی شده‌اند (۳).

در این میان پروتئین ساختاری Core (C)، یک پروتئین چندکاره[2] می‌باشد که علاوه بر ایفای نقش اصلی در تولید بخش کپسید ویروس، نقش به‌سزایی هم در پاتوژنز این بیماری داراست و از طریق تداخل با سلوهای دندریتیک، تداخل با گیرنده‌های لنفوتوکسین و C_{1q} که در تکثیر لنفوسیت‌های T اهمیت دارند و همین‌طور تداخل با سیستم ترانسژنیک Fas/TNF، در القای مرگ سلولی[3] تأثیرگذار خواهد بود (۷-۴). در مدل‌های موش‌های هپاتیت C، پروتئین Core منجر به خاموشی سیستم ایمنی، تجمع چربی در سلول‌ها[4] و سرطان کبدی شده است (۹، ۸). تمامی این مشاهده‌ها 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 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[5] اصلی است. بخش اول (آمینواسید ۱۲۲-۲) 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 مورفوژنز 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 آنتی‌ژن به‌صورت نوترکیب[6] تحت القا آرابینوز و در سیستم پروموتری T_7-araBAD (کمپانی اینویتروژن) در باکتری *E.coli* BL21-AI، ابراز و با ایجاد یک برچسب هیستیدینی (6X His Tag) در بخش انتهای اسیدی[7] 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- Ricombinant
7- C-Terminal

Archive of SID
www.SID.ir

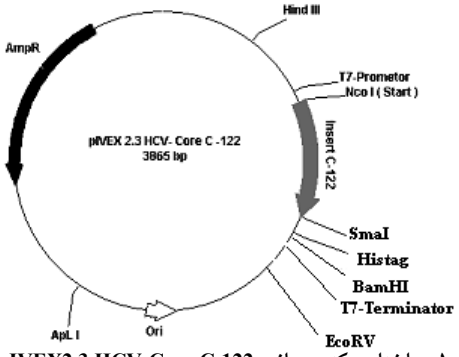
مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. روش‌های مولکولی: در این پژوهش ژن مربوط به پروتئین Core ویروس HCV از ناحیه ۱۲۲-۲ توسط یک جفت آغازگر[1] طراحی شده به‌صورت زیر بود:

آغازگر جلوبر (Forward):
5´ gtg cacc ATG ggc acg att ccc aaa cct 3´
NcoI

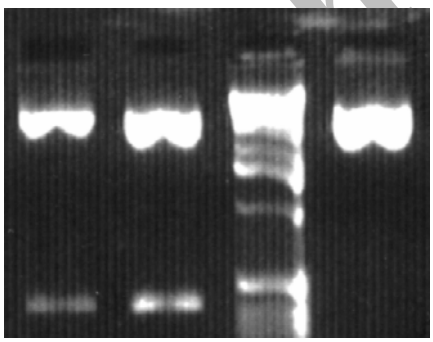
آغازگر معکوس (Reverse):
5´ gtg tatc ga tat cct tac cca aat tgc gcg a 3´
EcoR V

به کمک آنزیم *VentR* DNA pol. (بیولب نیو انگلند) دارای خواص اصلاح[2]، از روی ژن اصلی که مربوط به تیپ 1b بوده کپی برداری و در سکانس‌های برشی *NcoI-SmaI* در پلاسمید pIVEX 2.3 (روش) کلون گردید (۱۴). انجام مراحل PCR با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (Hot Start) آغاز گردیده و با انجام ۳۰ سیکل متوالی (۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه) ادامه یافته و در نهایت با مرحله نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت. طراحی آغازگرها به صورتی بوده است که دو مکان برشی *NcoI*، *EcoR V*، در ابتدای 5´ آن‌ها طراحی شود تا ضمن آن‌که کدون آغازی ATG در خود محل *NcoI* قرار گیرد، به‌طور هم‌خوان[3] در امتداد برچسب هیستیدینی (6X His tag) و سکانس‌های تمام کننده (T_7 Terminator) نیز مستقر گردد. لازم به ذکر است که مکان‌های برشی *SmaI* و *EcoR V* بعد از برش، به‌صورت انتهای صاف[4] بوده و قابل جوش در یکدیگر می‌باشند (شکل ۱). وکتور نوترکیب حاصل، پس از انجام واکنش‌های جوشی[5]، 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 روش‌های مولکولی بر طبق پروتکل‌های شرکت‌های سازنده کیت‌ها 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[6] (اینویتروژن) توسط کلرید کلسیم، ترانسفورم گردید. این باکتری قابلیت کنترل دقیق بیان ژن خارجی[7] به‌خصوص برای پروتئین‌های سمی، به وسیله یک کپی کروموزومی از RNA پلیمراز مربوط به ara BAD پروموتر که قابل القا توسط آرابینوز می‌باشد را داراست (۱۵).



شکل ۱: ساختار وکتور بیانی pIVEX2.3 HCV-Core C-122 و محل قرارگیری ژن Core در حد فاصل مکان‌های برشی(*EcoR V*) *NcoI-SmaI*

Ori : مبدأ همانندسازی، T7 : پروموترفاژ T7 ،
AmpR : ژن کدکننده مقاومت به آمپی‌سیلین

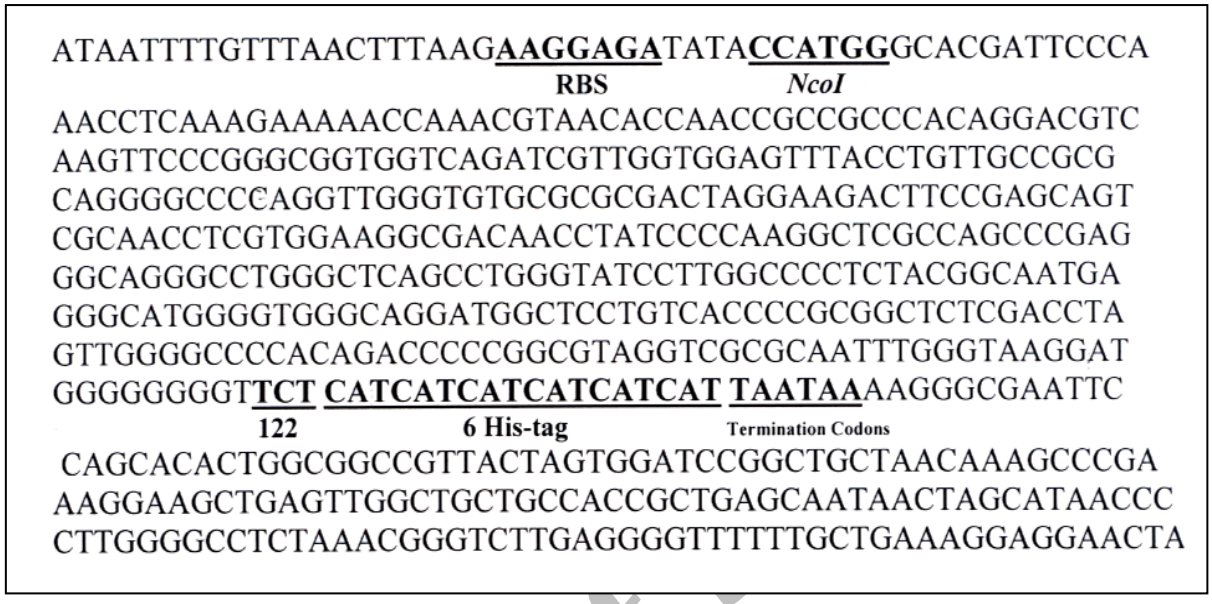


شکل ۲:الف:بررسی‌نقشه‌آنزیمی‌وکتور pIVEX2.3 HCV-Core C-122 و تأیید آن توسط آنزیم‌های محدودکننده

ستون‌های ۱ و۲ : وکتور بیانی هضم شده با آنزیم *BmaHI* و *NcoI* (قطعات با اندازه‌های ۴۲۲bp، مربوط به محصول PCR ژن Core و ۳۴۴۳bp، بازمانده پلاسمیدمی‌باشد) ستون۳: مارکرkb(Roche)، ستون۴: پلاسمید اولیه pIVEX2.3 بریده شده(Cut) به‌وسیله آنزیم‌های همسانه‌سازی (*BamHI*, *NcoI*) می‌باشد که فاقد قطعه کلون شده‌است (۳۸۶۵bp).

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

www.SID.ir
Archive of SID



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

القای بهینه سازی و ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب

پس از ترانسفورماسیون باکتری‌های BL21-AI به‌وسیله 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 میلی‌لیتر از محیط کشت 2XTY 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، 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، ۱میلی‌لیتر 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 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 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 یکسان سازی غلظت کلی پروتئین در نمونه‌های قبل و بعد از القا جهت انجام SDS-PAGE، جذب نوری OD_{600} 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.

تخلیص پروتئین نوترکیب به روش طبیعی (Native)

در مطالعه حاضر، با هدف تخلیص پروتئین محلول در شکل فضایی طبیعی[1] و با توجه به حضور برچسب

1- Native Conformation

Archive of SID
www.SID.ir

6X His tag در پروتئین نوترکیب، از روش کروماتوگرافی جذبی با استفاده از ژل آگارز Ni-NTA و براساس روش عمومی MCAC[1]، بر طبق پروتکل شرکت سازنده (QIAgen) با کمی تغییرات استفاده شد، به‌طور خلاصه رسوب باکتریایی پس از القا، در محلول لیزکننده (pH=۸، Nacl ۳۰۰mM، NaH_2PO_4- ۵۰mM) حاوی ۵ میلی‌مول ایمیدازول کاملاً محلول شد و پس از اضافه کردن محلول لیزوزیم (۱mg/mL) و ۳۰ دقیقه انکوباسیون در یخ، سلول‌ها به‌وسیله روش سونیکیشن توسط ۶ پالس، با قدرت ۶۰ مگاهرتز به‌مدت ۲۰ ثانیه و با تناوب‌های ۱۵ ثانیه‌ای توسط پروب ۱۴ میلی‌متری خرد شد، جرم سلولی به‌وسیله سانتریفوژ (۱۰ دقیقه در ۱۰/۰۰۰rpm و ۴ درجه سانتی‌گراد) جدا گردید. سپس مایع رویی 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 کیتBCA (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 سانتی‌گراد انکوبه و سپس در $OD_{۵۶۲nm}$ عمل قرائت انجام و براساس نمودار استاندارد میزان غلظت پروتئین خالص شده محاسبه گردید.

ارزیابی خواص آنتی‌ژنیک پروتئین Core نوترکیب

برای ارزیابی خواص آنتی‌ژنیک و بررسی احتمال قابلیت کاربردهای تشخیصی پروتئین Core نوترکیب، از دو روش الیزا و وسترن بلاتینگ[2] استفاده شد. در تحقیق حاضر، وسترن بلاتینگ به روش استاندارد با استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی اختصاص علیه HCV Core به نام VT(Val بیوتک) انجام پذیرفت(۱۶، ۱۴). به‌طور خلاصه، پس از انتقال باندهای پروتئینی به غشای نیتروسلولزی و انکوباسیون با VT (رقت۱/۲۰۰۰)، آنتی‌بادی‌های متصل نشده توسط شستشو با محلول PBS-T[3] از محیط عمل خارج شده و آنتی‌بادی 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 آنتی‌ژن خالص با غلظت ۳µg/ml در بافر کربنات-بی‌کربنات، برای چسباندن[4] در ته پلیت الیزای ۹۶ خانه‌ای به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد، پلیت‌ها قبل از افزوده شدن سرم بیماران به‌وسیله محلول PBS حاوی Tween۲۰، 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 سانتی‌گراد درون پلیت پوشانده شده و انکوبه شد، پس از شستشوی نهایی، با استفاده از آنتی‌بادی ضدایمونوگلوبولین انسانی متصل به آنزیم پراکسیداز و سوبسترای TMB، پاسخ در طول موج ۴۵۰nm قرائت گردید و نتایج حاصل با سرم فرد سالم مقایسه شد.

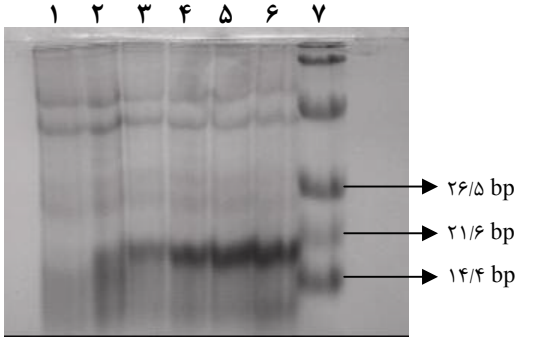
یافته ها

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 پروموتر T_7، محل اتصال ریبوزوم[5]، کدون آغازی (ATG)، قطعه ژن (۱۲۲-۲ Core)، برچسب هیستیدینی (6X His tag) و سکانس‌های پایانی[6]، در ترادف مناسب[7] و به‌صورت 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(شکل۳-الف).

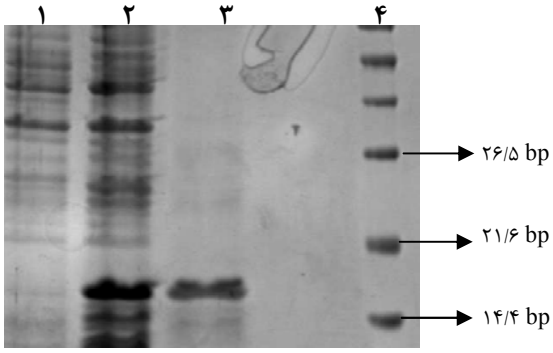
1- Metal Chelated Affinity Chromatography
2- Western blotting
3- Phosphate buffer Salin-Tween20
4- Coating
5- Ribosome binding site
6- T_7 Termination Sequence
7- in Frame

Archive of SID
www.SID.ir

همین‌طور دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دانسیته سلولی ۰/۶ در ۶۰۰ nm OD بیشترین بازدهی را در این سیستم داشته است. همان‌طور که در شکل۳-الف به وضوح دیده می‌شود، پس از القای آرابینوز، ابراز پروتئین نوترکیب آغاز و پس از یک ساعت کاملاً قابل مشاهده است و سیستم تقریباً بدون نشتی[1] و یا با حداقل نشتی کار می‌کند (شکل ۳-الف). اندازه باند این پروتئین از لحاظ تئوری و محاسباتی با اندازه ۱۷K.D پیش‌بینی می‌شود. همان‌طور که در شکل ۳-ب دیده می‌شود، تخلیص پروتئین نوترکیب در یک مرحله تا حدود ۸۰٪ ممکن می‌باشد (دانسیتومتری ژل Lab Works, software SDS-PAGE) که این میزان تخلیص برای اکثر کاربردهای تحقیقی و تشخیصی مناسب است. اندازه‌گیری‌های انجام شده به روش اندازه‌گیری $OD_{۲۸۰}$ 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.



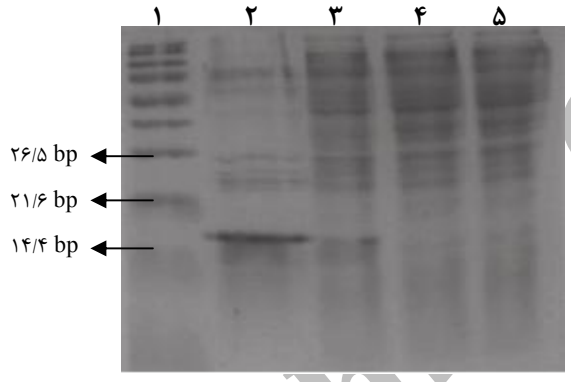
شکل۳-الف: بهینه سازی شرایط بیان- بررسی مدت زمان القا
ستون۱: نمونه قبل از القا، ستون۲: نمونه در زمان القا، ستون۳: نمونه یک‌ساعت پس از القا، ستون۴: نمونه دو ساعت پس ازالقا، ستون۵: نمونه سه ساعت پس از القا، ستون۶: نمونه چهارساعت پس از القا، ستون۷: مارکر پروتئینی Fermentas



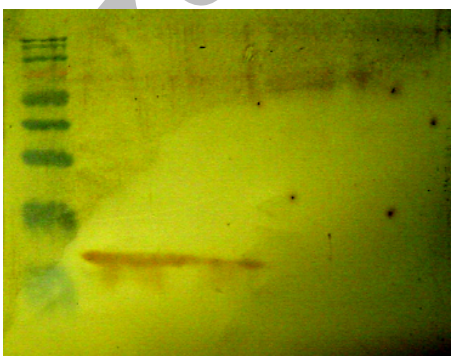
شکل۳-ب: الکتروفورزنمونه‌های‌قبل‌وپس‌ازالقای پروتئین‌تخلیص‌شده
ستون۱: نمونه قبل از القاپ، ستون۲: نمونه در زمان القا، ستون۳: پروتئین‌های تخلیص شده به روش Native ، ستون۴: مارکر Fermentas

در نهایت آنالیزهای ایمونولوژیک توسط وسترن‌بلاتینگ نمایانگر آن است که پروتئین نوترکیب به‌خوبی توسط آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی علیه آنتی‌ژن Core، VT (Val بیوتک) شناسایی می‌شود و خواص آنتی‌ژنیک لازم را دارا می‌باشد (شکل۴).

همچنین استفاده از این آنتی‌ژن برای تشخیص آنتی‌بادی علیه Core موجود در سرم مثبت انسانی، که با استفاده از آزمایش الیزا و نتایج حاصل که در رقت ۱/۳۲۰۰ و به صورت تکرار سه‌تایی انجام شد، نمایانگر آن است که این آنتی‌ژن احتمالاً قابلیت امکان کاربرد در مصارف تشخیصی را دارا می‌باشد (نمودار۱).



شکل ۴- الف: الکتروفورز SDS-PAGE

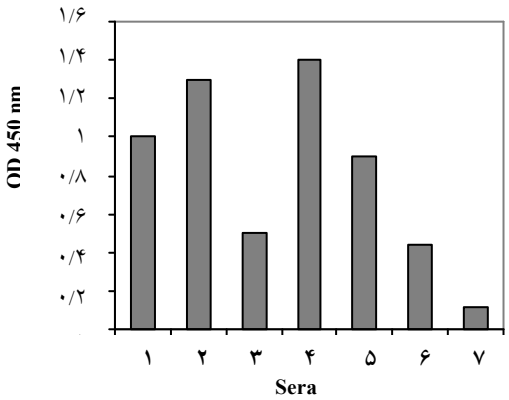


شکل ۴- ب: وسترن بلاتینگ

شکل ۴: الکتروفورز و وسترن بلاتینگ نمونه‌های قبل و پس از القا
ستون۱: مارکر پروتئین Pre-Stained، ستون۲: پروتئین تخلیص شده به روش Native، ستون ۳: نمونه پس از القا، ستون ۴و۵: نمونه قبل از القا

4- Leaking

www.SID.ir
Archive of SID



M: 0.08 SD: 0.003 Cut off:0.009

سرم بیماران : ۶-۱
سرم نرمال : ۷

نمودار۱: نتایج آزمایش الیزا سرم بیماران HCV با پروتئین نوترکیب C122

بحث

در مطالعه حاضر بنا به اطلاع ما، 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، ۱۵). 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 بر هم کنش با Fcγ,IgG انسانی مربوط به این بخش بوده که تحقق و انجام آن‌ها وابسته به ساختمان طبیعی این پروتئین می‌باشد (۱۴). 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 به‌خوبی 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 (۱۹، ۱۸).

همچنین امکان بیان این پروتئین در باکتری *E.coli* و تحت القای IPTG[1] در سیستم‌های PQE30 با قراردادن برچسب هیستیدینی در ناحیه آمینی و یا سیستم‌های فیوژنی (MBP)[2] یا (GST)[3] بررسی شده بود که دارای بازدهی حدود ۳mg/L-۱ بوده است (۲۱، ۲۰). اما در تمام روش‌های قبلی، تخلیص پروتئینی به‌صورت دناتوره و با کاربرد غلظت بالایی از اوره صورت پذیرفته و در نتیجه پروتئین ساختمان طبیعی خود را از دست می‌داده است. به‌علاوه در گزارش‌های قبلی، حضور محصولات نیمه تمام از HCV Core به دلیل رهاسازی ریبوزوم[4] گزارش شده است، اما طراحی و کاربرد سیستم pIVEX2.3 در تحقیق حاضر که برچسب هیستیدین را در انتهای اسیدی[5] تعبیه می‌کند، منجر به تخلیص تنها محصولات کامل پروتئینی می‌گردد و نتایج تحقیق حاضر هم گواه آن است که اندازه محصولات به‌وجود 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، به‌علاوه نتایج وسترن‌بلاتینگ و الیزا، دارا بودن خواص مناسب آنتی‌ژنیک این محصول را هم تأیید می‌کنند.

به‌طور خلاصه مطالعه حاضر روش جدیدی را برای تولید و تخلیص طبیعی بخش هیدروفیلیک (۱۲۲-۲) آنتی‌ژن HCV Core 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 ویروس هپاتیتC به‌طور مناسب به‌وسیله آغازگرهای طراحی شده ما قابل

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

Archive of SID
www.SID.ir

تکثیر و جاسازی در حامل pIVEX2.3 می‌باشد و این حامل و سیستم القای آرابینوز در پروموتر T_7، قابلیت ابراز این آنتی‌ژن را در باکتری *E.coli* BL21-AI دارا بوده و در شرایط بهینه میزان بازدهی برابر ۳/۵mg/L می‌باشد و پروتئین نوترکیب حاصله به سهولت به‌روش یک مرحله‌ای و در ساختار طبیعی به روش کروماتوگرافی Ni-NTA قابل تخلیص بوده و خواص ایمونولوژیک خود را جهت کاربردهای تحقیقی و احتمالاً تشخیصی به خوبی حفظ می‌نماید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله، از حمایت‌های بی‌دریغ دکتر تقی‌خانی رییس سابق انستیتوپاستور ایران و همچنین همکاری صمیمانه دکتر سیما رأفتی و دکتر بهروز وزیری که ما را در انجام تحقیق حاضر یاری فرمودند کمال تشکر و تقدیر را دارند.

References :

1- Higuchi R, Tanaka E, and Kiyosawa K. 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: 96-102.
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, Nitkewicz J, *et al*. Nonenveloped nuncleocapsides 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, Zarsli JP, Trepo C, and Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. Gastroenterology 2001; 120(2): 512-24.
6- Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB,Jeng KS,*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, Chianese-Bullock KA,Yao ZQ, Craciale TJ, and Hahn YS. Interaction between complement receptor gCIqR and HCV core protein inhibits T-Lymphocyte proliferation. J Clinc Investigation 2000; 106(10): 1239-1249.
8- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T,Ishibashi L, *et al*. The core protein of HCV induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. Nature Medicine 1998; 4(9): 1065-7.
9- Disson O, Haouzi D, Desagher S, Loesch K, Hahne M, Kremer EJ, *et al*. Impaired clearance of virus-infected hepatocytes in transgenic mice expressing the HCV polyprotein. Gastroenterlogy 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, Lau JY, Suzuki K, Yamaunchi M, *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, and Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. EMBO J 2002; 21(15): 3980-8.
13- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, and Beckwith J.Tight regulation, Modulation, and High-Level Expression by vectors containing the Arabinose PBAD Promoterr .J Bact 1995:4121-4130.
14- Maillard P, Lavergne JP, Siberil S, Faure G, Roohvand F, Peters S, *et al*. Fcgamma receptor-like activity of HCV core protein. J Biol Chem 2004; 279(4): 2430-7.
15- Samburook J, Russell DM. Molecular Cloning. 3rd ed. CSHL Press; 2001.
16- Laemmeli V. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-85.
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, Kuo G, Eckart M, *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, Albertini A, Levrero M and Cariani E. 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, and Askari FK. 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- Handschuh G and Caselmann WH, Caselmann. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

فصلنامه پژوهشی خون

Cloning, optimization of expression condition, purification and immunological characterization of hydrophilic section of HCV core Ag, expressed in *E.coli* by T_7-araBAD promoter

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

[1] *Hepatitis and AIDS Dep, Pasteur Institute of Iran*
[2] *Unite 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 2-122) 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**:** Hepatitis C core Antigen, Arabinose, NI-NTA, Promoter
SJIBTO 2006; 2(6):223-231

Received: 20 Jul 2005
Accepted:15 Nov 2005

Correspondence: Farzin Roohvand, PhD of Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Hepatitis and AIDS Department. No. 69, Pastour Avenue, Tehran Iran. Tel: (+9821) 66969291 Fax : (+9821) 66465132
E-mail: *rFarzin@pasteur.ac.ir*

Archive of SID
www.SID.ir