Archive of SID

ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2019;22(3):135-140

# Expression of the Recombinant Hsp20-Nef Protein for Evaluation of its Immunogenicity against HIV-1 Nef using Indirect ELISA

ARTICLE INFO

***Article Type***
Original Research

***Authors***
Rostami B.[1] *PhD,*
Irani Sh.[1] *PhD,*
Bolhassani A.*[2] *PhD,*
Ahangari Cohan R.[3] *PhD*

**How to cite this article**
Rostami B, Irani Sh, Bolhassani A, Ahangari Cohan R. Expression of the Recombinant Hsp20-Nef Protein for Evaluation of its Immunogenicity against HIV-1 Nef using Indirect ELISA Pathobiology Research. 2019; 22(3):134-140.

ABSTRACT

**Aims** Nef protein has been considered as an attractive target for the development of therapeutic HIV-1 vaccine. Furthermore, strong immunological properties of heat shock proteins (HSPs) led to their use as an immunomodulator or antigen carrier for subunit vaccine candidates. In the current study, the generation of Hsp20-Nef fusion protein was performed in E. coli expression system, and its immunogenicity was evaluated in BALB/c mice.

**Materials and Methods** At first, expression of Hsp20-Nef recombinant protein was studied in E. coli BL21 and Rosetta strains by SDS-PAGE and western blotting using anti-Nef monoclonal antibody. Then, the recombinant protein was purified by a reverse staining method. Finally, its potency was evaluated to elicit antibody response against HIV-1 Nef antigen using indirect ELISA in mice.

**Findings** Our data showed a clear band of ~1230bp related to Hsp20-Nef fusion on agarose gel indicating the correct gene cloning in pET28a vector. The expression of Hsp20-Nef protein was confirmed as a clear band of ~47 kDa in SDS-PAGE and western blotting. In the immunological assay, the Hsp20-Nef protein and also the Nef protein emulsified with Freund's adjuvant significantly enhanced the level of total IgG as compared to other groups. Moreover, the immunogenicity of Hsp20-Nef was higher than Freund's adjuvant/Nef in protein regimens ($p<0.05$).

**Conclusion** The Hsp20-Nef fusion protein was effectively expressed in E. coli prokaryotic system and significantly induced antibody response against HIV-1 Nef antigen.

**Keywords** HIV; Nef; Hsp20; Prokaryotic System; Immunogenicity

[1]Biology Department, Sciences & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Hepatitis & AIDS Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3]Pilot Nano-Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

***Correspondence***
*Address*: No. 69, Pasteur Institute of Iran, Pasteur Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1316943551
*Phone*: +98 (21) 66953311
*Fax*: +98 (21) 66465132
a_bolhasani@pasteur.ac.ir

***Article History***
Received: September 17, 2018
Accepted: February 7, 2019
ePublished: August 21, 2019

CITATION LINKS

[1] Small heat shock protein 27: An effective adjuvant for enhancement of HIV-1 Nef antigen-specific immunity [2] HIV-1 prophylactic vaccines: State of the art [3] How can improve DNA vaccine modalities as a therapeutic approach against HIV infections? [4] HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview [5] AIDS/HIV, molecular and cell biology [6] Biology of the HIV Nef protein [7] Structure-function relationships in HIV-1 Nef [8] HIV vaccines: A brief overview [9] Heat-shock proteins as activators of the innate immune system [10] Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant [11] Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology [12] Zinc/Imidazole procedure for visualization of proteins in gels by negative staining [13] Evaluation of knowledge and attitude of non-medical students about AIDS [14] Cloning, expression and purification of the recombinant HIV-1 Tat-Nef fusion protein in prokaryotic expression system [15] Peptide-based synthetic vaccines [16] Conservation of Babesia bovis small heat shock protein (Hsp20) among strains and definition of T helper cell epitopes recognized by cattle with diverse major histocompatibility complex class II haplotypes [17] Effect of HSP90 adjuvant on immunogenicity of HbsAg in BALB/c mice [18] Direct association of heat shock protein 20 (HSPB6) with phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in human hepatocellular carcinoma: Regulation of the PI3K activity

*Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.*

www.SID.ir

Archive of SID



# بیان پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef به‌منظور ارزیابی ایمنوژنیسیتی آن در مقابل HIV-1 Nef توسط الایزای غیرمستقیم

**بهاره رستمی PhD**
گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
**شیوا ایرانی PhD**
گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
**اعظم بوالحسنی* PhD**
بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
**رضا آهنگری‌کهن PhD**
بخش نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

**چکیده**
**اهداف:** پروتئین Nef به‌عنوان هدف جذاب برای توسعه واکسن‌درمانی HIV-1 در نظر گرفته شده است. به‌علاوه، خواص ایمنی‌زایی قوی پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) منجر به استفاده از آنها به‌عنوان ایمونومدولاتور و حامل آنتی‌ژنی برای طراحی واکسن‌های ساب‌یونیتی شد. در مطالعه اخیر، بیان پروتئین فیوژن Hsp20-Nef در سیستم بیانی *اشرشیا کلی* (*E. coli*) انجام شد و بررسی ایمنوژنیسیتی آن در موش‌های بالب/سی صورت گرفت.
**مواد و روش‌ها:** در ابتدا، بیان پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef در سویه‌های باکتری *اشرشیا کلی* BL21 و Rosetta توسط SDS-PAGE و وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef بررسی شد. سپس، تخلیص پروتئین نوترکیب توسط تکنیک رنگ‌آمیزی معکوس انجام شد. درنهایت، توانایی آن برای القای پاسخ آنتی‌بادی در مقابل آنتی‌ژن HIV-1 Nef با استفاده از ELISA غیرمستقیم ارزیابی شد.
**یافته‌ها:** نتایج ما باند واضح حدود ۱۲۳۰جفت‌باز مرتبط با فیوژن Hsp20-Nef روی ژل آگارز نشان داد که نشانگر کلونینگ صحیح ژن در وکتور pET28a بود. بیان پروتئین Hsp20-Nef به‌صورت باند واضح حدود ۴۷کیلودالتون در SDS-PAGE و وسترن‌بلات تایید شد. در سنجش ایمنولوژیکی، پروتئین Hsp20-Nef و نیز پروتئین Nef امولسیفیه‌شده با ادجوانت فروند به‌طور مهمی سطح IgG تام را در مقایسه با گروه‌های دیگر افزایش دادند. به‌علاوه، ایمنوژنیسیتی Hsp20-Nef بالاتر از Freund's adjuvant/Nef در رژیم‌های پروتئینی بود ($p<0/05$).
**نتیجه‌گیری:** پروتئین فیوژن Hsp20-Nef به‌طور موثری در سیستم پروکاریوتی *E. coli* بیان شد و به‌طور مهمی پاسخ آنتی‌بادی را در مقابل آنتی‌ژن HIV-1 Nef القا کرد.
**کلیدواژه‌ها:** ویروس HIV، Nef، Hsp20، سیستم پروکاریوتی، ایمنوژنیسیتی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۸
*نویسنده مسئول: a_bolhasani@pasteur.ac.ir

## مقدمه

ویروس HIV (عامل بیماری ایدز) موجب نقص سیستم ایمنی بدن انسان شده و باعث ازدست‌دادن تدریجی سلول‌های CD4 T، اختلال در عملکرد سلول‌های CD8 T و نیز تعدادی از سلول‌های کشنده طبیعی (NK) می‌شود و درنتیجه تهدید جدی برای سلامت انسان است[1, 2]. براساس آمار سازمان بهداشت جهانی، با وجود تلاش‌های بسیاری که برای ساخت واکسن صورت گرفته اما امروزه ایدز جزء ده عامل کشنده اول در جهان است و در حال حاضر، آینده واکسن برعلیه ویروس HIV در پرده‌ای از ابهام قرار دارد[3]. محققان، ویروس HIV را براساس تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی به دو گروه HIV-1 و HIV-2 تقسیم‌بندی کرده‌اند که شایع‌ترین نوع آن HIV-1 است که عامل ایجاد بیماری ایدز در انسان است[4]. ژنوم ویروس HIV، ۹ ژن را کد می‌کند که این ژن‌ها به کمک فرآیندهای برش RNA حداقل ۱۵ پروتئین اختصاصی را به وجود می‌آورند. سه ژن اصلی شامل ژن‌های *gag*، *pol* و *env* هستند که اطلاعات لازم برای تولید پروتئین‌های ساختاری، آنزیمی و پروتئین‌های پوششی ویروس را دارند. شش ژن دیگر شامل *vpu*، *vpr*، *vif*، *tat*، *rev* و *nef* ژن‌های تنظیمی و کمکی هستند که کدکننده پروتئین‌های کنترل‌کننده عفونت‌زایی ویروس و تولید کپی‌های جدید ویروس و درنتیجه بروز بیماری ایدز هستند[5]. در میان ژن‌های کمکی، ژن *nef*، پروتئین ۲۷ تا ۳۵کیلودالتونی را کد می‌کند که به‌وفور طی فاز اولیه از سیکل همانندسازی ویروس به‌صورت حفاظت‌شده یافت می‌شود و موجب کاهش بیان یا مهار فعالیت سلول‌های CD4 T و CD8 و نیز مولکول‌های MHC I & II می‌شود. این پروتئین، موجب ایجاد مکانیزم مهمی برای فرار ویروس از سلول‌های CD8 و عدم شناسایی توسط سلول‌های CD4 می‌شود[6]. بنابراین القای پاسخ ایمنی بر ضد پروتئین Nef می‌تواند تا حدی عفونت ویروسی را مهار کند و کاندید مناسبی برای تهیه واکسن ضد HIV باشد[7]. از خصوصیات ویروس HIV جهش‌های فراوانی است که در ژنوم آن رخ می‌دهد و موجب تغییر آنتی‌ژن‌های سطحی آن و درنهایت غیرموثرشدن آنتی‌بادی‌ها و پاسخ ایمنی می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که با به‌کارگیری توالی‌های ثابت پروتئین‌های حیاتی و با استفاده از ادجوانت موثر برای پاسخ‌دهی هرچه بیشتر سیستم ایمنی بتوان به یک واکسن موثر دسترسی پیدا کرد. در واکسن‌های پروتئینی، پروتئین خالص‌شده فاقد اجزای میکروبی هستند که بتوانند پاسخ ایمنی انسانی را تحریک کنند؛ بنابراین، پژوهشگران در حال جست‌وجو برای یافتن ادجوانت‌هایی هستند که بتوانند پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی موثر را تحریک و پاسخ خاطره‌ای مناسبی را ایجاد نمایند[8]. یکی از انواع ادجوانت‌ها، خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) هستند که جزء ادجوانت‌های مناسب برای القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و آنتی‌بادی‌های خاص برعلیه عفونت‌ها هستند که اخیراً عملکرد خارج سلولی این پروتئین‌ها توجه محققان را به خود جلب کرده است. این پروتئین‌ها، فعال‌کننده سیستم ایمنی ذاتی هستند و قادر به تحریک سایتوکاین‌های التهابی توسط سیستم منوسیت-ماکروفاژ و همچنین فعالیت و بلوغ سلول‌های دندریتیک هستند[9]. به‌علاوه، پروتئین‌های شوک حرارتی خارج سلولی با سلول‌های ارایه‌کننده آنتی‌ژن (APC) برهم‌کنش داده و با عملکرد ادجوانتی باعث تحریک سیستم ایمنی اکتسابی فرد می‌شوند[10, 11]. در این تحقیق، از پروتئین شوک حرارتی کوچک Hsp20 یا HspB6 با وزن مولکولی ۲۰کیلودالتون به‌عنوان ادجوانت به‌صورت کونژوگه با پروتئین Nef استفاده شد و ایمنوژنیسیتی آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### سنتز و تایید صحت فیوژن Hsp20-Nef در داخل وکتور بیان پروکاریوتی

در ابتدا، توالی کامل ژن *Nef* از ویروس HIV-1 pNL4-1 (HIV-1 3, Accession No: AF324493.2) و Hsp20 موشی (Accession No: NM_001012401) با استفاده از بانک‌های اطلاعات ژنی به دست آمد. سپس، سنتز فیوژن Hsp20-Nef در وکتور pET28a توسط شرکت بایوماتیک کانادا صورت گرفت. ژن Hsp20 در سایت آنزیمی NheI/HindIII و به‌دنبال آن ژن Nef در سایت EcoRI/SalI طراحی شد. پس از دریافت وکتور حاوی قطعه فیوژن مربوطه، تکثیر پلاسمید در باکتری *اشرشیا کلی* (*E. coli*) سویه DH5α انجام و تهیه استوک کلون باکتری حامل


www.SID.ir

Archive of SID

فیوژن صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب pET-Hsp20-Nef با استفاده از کیت استخراج DNA در مقیاس زیاد (مگاکیت؛ کیاژن؛ آلمان) تهیه شد و توسط هضم آنزیمی NheI/SalI (فرمنتاز؛ ایالات متحده) تایید گشت. الکتروفورز محصول هضم‌شده با آنزیم‌های محدودالاثر روی ژل ۱% صورت گرفت. به‌علاوه، به‌منظور صحت توالی مورد نظر، فیوژن Hsp20-Nef توسط شرکت پیشگام تعیین توالی شد.

**بیان پروتئین فیوژن نوترکیب** Hsp20-Nef

ابتدا ترنسفورماسیون باکتری *E. coli* سویه‌های Rosetta و BL21 توسط پلاسمید نوترکیب Hsp20-Nef صورت گرفت. سپس دو کلون رشدیافته از هر دو سویه باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط LB Broth (سیگما؛ ایالات متحده) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شدند و به‌مدت یک شبانه‌روز در انکوباتور شیکردار و دمای ۳۷°C انکوبه شدند. در روز بعد، ۵۰۰میکرولیتر از باکتری‌های کشت‌داده‌شده به ۵۰میلی‌لیتر محیط کشت مغذی باکتری Ty2x اضافه و در انکوباتور شیکردار ۳۷°C با حرکت دورانی انکوبه شد. القای بیان پروتئین پس از رسیدن جذب در طول موج ۶۰۰نانومتر به حدود ۰/۷ تا ۰/۸ توسط ایزوپروپیل‌تیوگالاکتوزید (IPTG؛ سیگما؛ ایالات متحده) یک‌میلی‌مولار صورت گرفت. رسوب نمونه‌های قبل از القا و بعد از القا (در مدت‌زمان‌های ۲، ۴ و ۱۶ساعت) برای به‌دست‌آوردن زمان اپتیمم بیان پروتئین نوترکیب توسط الکتروفورز SDS-PAGE ارزیابی شدند. به‌علاوه، تایید پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef توسط روش وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef (Abcam) کونژوگه به پراکسیداز انجام شد. به‌طور خلاصه، آنالیز SDS-PAGE نمونه‌های قبل از القا، بعد از القا و تخلیص‌شده (به‌صورت ذکرشده در بخش بعد) انجام شد. پس از آن، تهیه ساندویچ بلات صورت گرفت و انتقال باندها از ژل به کاغذ نیتروسلولز تحت الکتروفورز در بافر وسترن‌بلات و به‌مدت ۱/۵ساعت انجام شد. پس از آشکارسازی باندها با رنگ غیراختصاصی پانسواس، کاغذ نیتروسلولز به‌مدت یک شبانه‌روز در بافر بلاکینگ انکوبه شد. سپس، آنتی‌بادی ضد Nef با نسبت ۱:۱۰۰۰۰ (حجمی/حجمی) اضافه شد. پس از شست‌وشو، از سوبسترای ´۳، ´۳- دی‌آمینوبنزیدین (DAB؛ سیگما؛ ایالات متحده) به‌منظور آشکارسازی باند مورد نظر روی کاغذ نیتروسلولز استفاده شد. نهایتاً آب مقطر به‌عنوان متوقف‌کننده به کار رفت.

**خالص‌سازی پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef با استفاده از روش رنگ‌آمیزی معکوس**

خالص‌سازی پروتئین فیوژن با استفاده از روش رنگ‌آمیزی معکوس صورت گرفت[12]. به این ترتیب که پس از تایید بیان پروتئین، رسوب‌های جمع‌آوری‌شده پس از القا با بافر لیزکننده تریس/سدیم‌کلرید (مرک؛ آلمان) و سونیکیشن کاملاً لیز شدند. پس از سانتریفوژ، مایع فوقانی (سوپرناتانت) با بافر نمونه مخلوط شده و پس از جوشاندن به‌مدت ۵دقیقه، برای SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام عمل الکتروفورز، ژل مربوطه به‌ترتیب به‌مدت ۵دقیقه در محلول کربنات‌سدیم (بافر ۱؛ مرک؛ آلمان)، به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول حاوی ایمیدازول و سدیم دودسیل سولفات (بافر ۲؛ مرک؛ آلمان) و درنهایت به‌مدت ۲دقیقه در محلول حاوی سولفات‌روی (بافر ۳؛ مرک؛ آلمان) قرار گرفت. پس از ظاهرشدن باند مربوط به پروتئین مورد نظر که باندی شفاف و بی‌رنگ است، باند از ژل جداشده و در محلول آخر (بافر ۴) که محلول استخراج پروتئین از ژل است و حاوی آمونیوم‌کربنات و سدیم‌دودسیل‌سولفات است، قرار گرفت و پس از سانتریفوژ، خارج‌شدن پروتئین از ژل به اتمام رسید. در پایان برای تغلیظ پروتئین به‌دست‌آمده از ستون‌های مخصوص آمیکون با فیلتر ۳/۵میکرون استفاده و الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE ۱۲% برای تایید خالص‌سازی پروتئین انجام شد. آلودگی با اندوتوکسین کمتر از ۰/۵EU در هر میلی‌گرم پروتئین بود که توسط تست LAL به دست آمد (QCL-1000, Lonza). نهایتاً، میزان پروتئین تخلیص‌شده با اسپکتروفتومتری نانودراپ براساس استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) تعیین شد.

**ایمنی‌زایی موش و ارزیابی ایمنوژنیسیتی توسط تعیین میزان IgG تام**

موش‌های بالب/سی ماده ۶ تا ۸ هفته (۳ عدد در هر گروه) از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند. موش‌های نگهداری‌شده تحت شرایط استاندارد از نظر اخلاق پزشکی در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ به طریق زیرپوستی در کف پا با پروتئین‌های نوترکیب Nef و Hsp20-Nef (۱۰میکروگرم) ایمونیزه شدند. لازم به ذکر است که پروتئین نوترکیب Nef سابقاً در بخش هپاتیت و ایدز انستیتوپاستور ایران توسط گروه ما تهیه شده بود[1]. این پروتئین‌ها به‌صورت امولسیون در ادجوانت فروند به نسبت حجمی ۵۰:۵۰ مورد استفاده قرار گرفتند. گروه‌های کنترل، گروه تزریق‌شده با PBS1X و ادجوانت فروند بود (جدول ۱). سه هفته پس از سومین تزریق، سرم‌های مخلوط‌شده از نمونه‌های خونی هر گروه تهیه شدند. سطوح total IgG ویژه Nef در سرم‌ها توسط تکنیک الایزا غیرمستقیم (سوبسترای مورد استفاده TMB یا ´۳، ´۳، ۵، ´۵- تترامتیل‌بنزیدین؛ سیگما؛ ایالات متحده) سنجش شدند. به‌طور خلاصه، یک پلیت الایزای ۹۶چاهکی (گرینر؛ آلمان) برای ۱۶ تا ۱۸ساعت در ۴°C با ۱۰۰میکرولیتر آنتی‌ژن Nef (۵میکروگرم/میلی‌لیتر) رقیق‌شده در PBS1X (pH=۷/۲) کوت شد. سپس پلیت با بافر شست‌وشو (توئین ۰/۵% در PBS) شسته و با بافر بلاکینگ برای ۲ساعت در ۳۷°C (BSA ۱% در PBS) انکوبه شد. سرم‌های مخلوط‌شده برای هر گروه با رقت ۱:۵۰ در بافر رقیق‌سازی (توئین ۰/۵% در بافر بلاکینگ) رقیق شدند (به‌عنوان آنتی‌بادی اول) و به چاهک‌ها اضافه و برای ۲ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. بعد از شست‌وشو با بافر شست‌وشو، پلیت با آنتی‌بادی ضد total IgG موشی کونژوگه با پراکسیداز (رقت ۱:۱۰۰۰۰ حجمی/حجمی) در بافر رقیق‌کننده به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه؛ سیگما؛ ایالات متحده) برای ۲ساعت در ۳۷°C انکوبه شد. پس از شست‌وشوی پلیت‌ها با بافر شست‌وشو، ۱۰۰میکرولیتر سوبسترای TMB (سیگما؛ ایالات متحده) اضافه، پس از ۱۵دقیقه، واکنش با اسیدسولفوریک یک‌مولار متوقف شد و جذب در ۴۵۰نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

**جدول ۱)** برنامه ایمنی‌زایی موش

| گروه | Modality | اولین تزریق | دومین تزریق | سومین تزریق |
|---|---|---|---|---|
| G1 | پروتئین/ پروتئین/ پروتئین | *rNef+complete freund's adjuvant (CFA) | rNef+incomplete freund's adjuvant (IFA) | rNef+incomplete freund's adjuvant (IFA) |
| G2 | پروتئین/ پروتئین/ پروتئین | rHsp20-Nef | rHsp20-Nef | rHsp20-Nef |
| G3 | کنترل | PBS | PBS | PBS |
| G4 | کنترل | CFA | IFA | IFA |

*r: Recombinant


www.SID.ir

Archive of SID



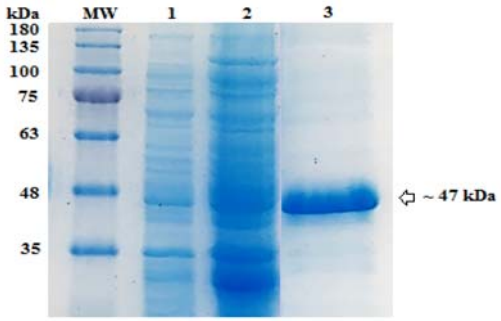
### آنالیز آماری

تفاوت‌های بین گروه‌های کنترل و تست در بررسی ایمنولوژیکی توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (نرم‌افزار Graph-pad Prism 5) انجام شد.

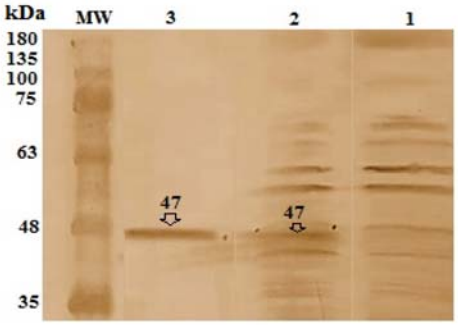
## یافته‌ها

### بیان، تخلیص و تایید پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef

در ابتدا، حضور فیوژن Hsp20-Nef توسط هضم آنزیمی NheI/SalI به‌صورت یک باند واضح حدود ۱۲۳۰جفت‌باز روی ژل آگارز تایید شد. آنالیز توالی فیوژن توسط شرکت پیشگام صورت گرفت که پس از مقایسه با توالی‌های بانک ژن، صحت توالی مورد نظر تایید شد. پس از تایید پلاسمید pET-Hsp20-Nef، ترنسفورم سویه‌های بیانی باکتری BL21 و Rosetta با پلاسمید نوترکیب به‌منظور آنالیز بیان پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef انجام شد. در حقیقت، پس از کشت کلون‌های رشدیافته روی پلیت، القای بیان پروتئین با استفاده از القاکننده IPTG صورت گرفت. نتایج نشان دادند که بیان پروتئین نوترکیب تنها در سویه Rosetta در دمای ۳۷°C و ۴ساعت پس از القا صورت گرفت. حضور باند حدود ۴۷کیلودالتون روی ژل SDS-PAGE تاییدکننده بیان پروتئین فیوژن نوترکیب بود. تخلیص پروتئین نوترکیب توسط روش رنگ‌آمیزی معکوس به‌صورت ذکرشده در بخش روش‌ها صورت گرفت (شکل ۱). هویت پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef توسط آنتی‌بادی ضد Nef در وسترن‌بلات آشکار شد (شکل ۲). پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef یک رنج غلظت بین ۰/۶ و ۰/۸میلی‌گرم/میلی‌لیتر توسط اسپکتروفتومتری نانودراپ نشان داد.



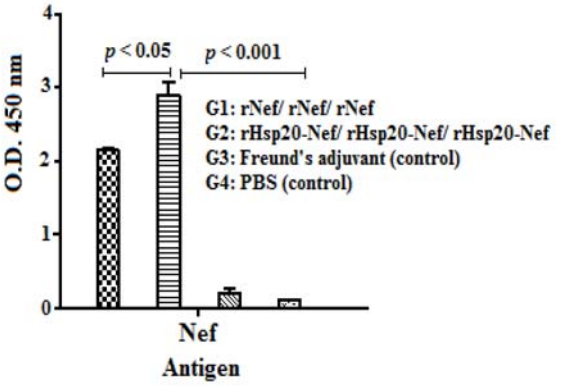

**شکل ۱)** بیان و تخلیص پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef در سیستم بیان *E. coli* توسط آنالیز SDS-PAGE؛ ستون ۱) قبل از القا، ستون ۲) بعد از القا و ستون، ۳) پروتئین تخلیص‌شده توسط رنگ‌آمیزی معکوس؛ علامت MW، مارکر وزن مولکولی (۱۰–۱۸۰کیلودالتون؛ فرمنتاز؛ ایالات متحده) است.




**شکل ۲)** تایید بیان و تخلیص پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef در سیستم بیان *E. coli* توسط آنالیز وسترن‌بلات؛ ستون ۱) قبل از القا، ستون ۲) بعد از القا ستون ۳) پروتئین تخلیص‌شده توسط رنگ‌آمیزی معکوس؛ علامت MW، مارکر وزن مولکولی (۱۰–۱۸۰کیلودالتون؛ فرمنتاز؛ ایالات متحده) است.

### ارزیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی

به‌منظور مقایسه پاسخ‌های آنتی‌بادی القاشده در گروه‌های مختلف، سطوح سرمی total IgG در مقابل پروتئین نوترکیب Nef به‌عنوان آنتی‌ژن با استفاده از الایزا غیرمستقیم آشکار شد. نتایج ما نشان داد که سطح total IgG در سرم موش‌های ایمنی‌زایی‌شده با rHsp20-Nef (G2) به‌طور معنی‌داری بالاتر از آن در گروه‌های ایمنی‌زایی‌شده با rNef به‌همراه ادجوانت فروند (G1) است (p<۰/۰۵). به‌علاوه، هر دو گروه ایمنی‌زایی‌شده با پروتئین‌های نوترکیب در مقایسه با گروه‌های کنترل (G3 و G4) تفاوت معنی‌داری را از نظر القای پاسخ آنتی‌بادی نشان دادند (p<۰/۰۰۱). نمودار ۱ نتایج حاصل از ایمنی‌زایی را نشان می‌دهد.




**نمودار ۱)** ارزیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی (total IgG، رقت ۱:۱۰۰۰۰) در مقابل آنتی‌ژن Nef در رژیم‌های مختلف: سرم موش‌ها از نمونه‌های خونی هر گروه (تعداد: ۳ نفر) سه هفته پس از آخرین تزریق تهیه شدند. رقت ۱:۵۰ برای سرم‌ها استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین جذب در طول موج ۴۵۰نانومتر (مرتبط با سوبسترای TMB)±انحراف‌معیار نشان داده شدند.

## بحث

ایدز بیماری مهلک و خطرناکی است که براساس آمار سازمان بهداشت جهانی یکی از کشنده‌ترین بیماری‌های قرن حاضر است[13]. بنابراین انتظار می‌رود که یک واکسن موثر و کارآ بتواند پاندمی ایجادشده از این بیماری را مهار نماید. یکی از پروتئین‌های مهم ویروس HIV-1، پروتئین Nef است که به‌عنوان کاندید واکسن تحقیقات زیادی روی آن صورت گرفته است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که پروتئین Nef (اسیدآمینه ۱۰۲–۱۱۷) از ویروس HIV برای افزایش تکثیر ویروس به‌منظور پیشرفت هرچه بیشتر به سمت بیماری ایدز لازم است[14]. شواهد نشان می‌دهد که برخی از اپی‌توپ‌های Nef ایمنوژن و حفاظتی بوده و بیشترین سطح پاسخ‌های سایتوتوکسیسیتی برعلیه این توالی‌ها است و درنتیجه می‌تواند کاندید مناسبی برای واکسن‌ها باشد. از انواع واکسن‌های مورد بحث در زمینه HIV، واکسن‌های پروتئینی هستند که به‌منظور افزایش نفوذپذیری آنتی‌ژن و همچنین القای پاسخ‌های ایمنی موثر، از یک ادجوانت به‌همراه آنتی‌ژن مورد نظر استفاده می‌شود[15]. یکی از انواع ادجوانت‌ها پروتئین‌های شوک حرارتی هستند که گروهی از پروتئین‌های حفاظت‌شده هستند که در پاسخ به شرایط استرسی در سلول‌ها بیان می‌شوند. پروتئین‌های شوک حرارتی که براساس وزن مولکولی خود بین ۱۲ تا ۴۳کیلودالتون وزن دارند به پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک معروف هستند و دارای ناحیه بسیار حفاظت‌شده در ناحیه C ترمینال خود هستند که شامل ۸۰ تا ۱۰۰آمینواسید بوده و به دومین آلفاکریستالین معروف هستند. پروتئین Hsp20 یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های



www.SID.ir

Archive of SID

شوک حرارتی کوچک است که دارای ناحیه حفاظت‌شده آلفاکریستالین و همچنین صفحات چین‌خورده بتا (β-sheet) در شکل فضایی خود است. اعتقاد بر این است که خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک به‌همراه آنتی‌ژن، توانایی سیستم ایمنی اکتسابی را افزایش می‌دهند. با توجه به مطالعات انجام‌شده درباره ایمنی‌زابودن Hsp20، این پروتئین به‌عنوان آنتی‌ژن در تحریک سلول‌های T و B و نیز تولید سایتوکاین‌هایی نظیر اینترفرون گاما می‌تواند نقش موثری را ایفا کند[16]. در یک مطالعه مربوط به پروتئین‌های شوک حرارتی، زیرواحد بتای Hsp90 نوترکیب انسانی به‌همراه پروتئین نوترکیب HBsAg ویروس هپاتیت B به موش‌ها تزریق شد. نتایج حاصل از بررسی پاسخ‌های ایمنی نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطوح total IgG و IgG2a بین گروه‌های کنترل و گروه پروتئین/ادجوانت طراحی‌شده وجود دارد[17]. در این بررسی نیز با توجه به نقش مهم پروتئین Nef به‌عنوان کاندید واکسن و نیز اهمیت پروتئین‌های شوک حرارتی به‌عنوان ادجوانت، بیان و تخلیص پروتئین Nef کونژوگه‌شده به Hsp20 در سیستم بیان پروکاریوتی به‌منظور ارزیابی ایمنوژنیسیتی آن در مقایسه با پروتئین نوترکیب Nef صورت گرفت. در این تحقیق، از باکتری *اشرشیا کلی* به‌دلیل تولید زیاد محصول و ارزان‌بودن برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده شد. تایید بیان پروتئین با حضور باند ۴۷کیلودالتونی روی ژل SDS-PAGE و نیز آشکارشدن آن توسط آنتی‌بادی ضد Nef در وسترن‌بلات صورت گرفت. نتایج ایمنی‌زایی در موش بالب/سی نشان داد که سطح تولید total IgG در پروتئین Nef کونژوگه‌شده با Hsp20 در مقایسه با پروتئین Nef به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. داده‌های به‌دست‌آمده نشانگر ایمنوژنیسیتی بالاتر Hsp20 در مقایسه با ادجوانت تجاری فروند در مقابل آنتی‌ژن Nef است. مطالعه سابق ما روی بررسی ایمنوژنیسیتی Hsp27 کونژوگه به Nef نیز نشان داد که پروتئین شوک حرارتی کوچک Hsp27 توانست تولید total IgG را در مقابل آنتی‌ژن Nef افزایش دهد[1]. بررسی حاضر شباهت Hsp20 را با Hsp27 از نظر سطح پاسخ آنتی‌بادی تولیدشده نشان می‌دهد. بررسی‌ها نشان دادند که پروتئین شوک حرارتی ۲۰ (HspB6) به‌طور ثابت در بافت‌های گوناگون با عملکردهای متفاوت بیان می‌شود[18]. برای مثال، گزارش‌ها نشان دادند که سطوح بیان Hsp20 در سلول‌های کارسینومای هپاتوسلولار انسان (HCC) به‌طور معکوس با پیشرفت HCC ارتباط دارد. در حقیقت، Hsp20 رشد سلول‌های HCC را از طریق مسیرهای سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن (MAPK) و AKT مهار می‌کند[18]. یک مطالعه نشان داد که هر دو ناحیه N-ترمینال (آمینواسیدهای ۱-۱۰۵) و C-ترمینال (اسیدآمینه ۴۸-۱۷۷) پروتئین Hsp20 در گاوها ایمنوژن بودند[16]. نتایج ما نشان داد که یک ساختار پروتئینی بیان‌کننده ژن HIV Nef فیوزشده به Hsp20 توانست به‌طور مهمی پاسخ آنتی‌بادی را در مقایسه با گروه‌های کنترل (PBS و ادجوانت) و نیز گروه ایمونیزه‌شده با Nef/ادجوانت فروند افزایش دهد که پیشنهادکننده توانایی ادجوانتی Hsp20 در موش‌های بالب/سی است.

به‌طور کلی، در این مطالعه، طراحی، ساخت و بیان پروتئین نوترکیب کونژوگه Hsp20-Nef صورت گرفت و بهترین شرایط بیان از نظر زمان انکوباسیون پس از القای با IPTG (۴ساعت) و نوع سویه باکتری (رزتا) تعیین شد. پروتئین نوترکیب مورد نظر با روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از رزین Ni-NTA توسط هر دو روش طبیعی و دناتوره خالص‌سازی نشد بنابراین از یک روش کارای رنگ‌آمیزی معکوس استفاده شد. نهایتاً، پاسخ آنتی‌بادی توتال IgG در مقابل ساختار پروتئین نوترکیب تزریق‌شده به موش نشانگر کارآیی Hsp20 در القای پاسخ آنتی‌بادی ضدآنتی‌ژن Nef بود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، مدل حیوانی است که در ایران وجود ندارد. پیشنهاد می‌شود که بررسی ایزوتایپ‌های آنتی‌بادی و پاسخ‌های ایمنی سلولی در آینده صورت گیرد.

## نتیجه‌گیری

پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef در سیستم بیانی *اشرشیا کلی* به‌طور موفقیت‌آمیزی بیان شد که توسط تکنیک‌های SDS-PAGE و وسترن‌بلات تایید شد. به‌علاوه، بررسی ایمنوژنیسیتی پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef در مقایسه با پروتئین Nef تفاوت معنی‌داری را نشان داد. نتایج حاکی از میزان بالای تولید total IgG در موش‌های ایمونیزه‌شده با Hsp20-Nef بود که پیشنهادکننده توانایی ادجوانتی Hsp20 در موش‌های بالب/سی است. به‌منظور ارزیابی بیشتر نقش ادجوانتی Hsp20، آزمایش‌های مرتبط با تعیین ایزوتایپ‌های IgG و نیز پاسخ‌های ایمنی سلولی در حال بررسی است.

**تشکر و قدردانی:** بدین‌وسیله از همکاران محترم بخش هپاتیت و ایدز انستیتوپاستور ایران به‌ویژه خانم *سپیده شهبازی* به‌خاطر کمک‌های کارشناسانه در این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

**تاییدیه‌اخلاقی:** تایید آزمایش‌های حیوانی از کمیته اخلاق پزشکی انستیتوپاستور ایران اخذ شده است.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** بهاره رستمی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰%)؛ شیوا ایرانی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۵%)؛ اعظم بوالحسنی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۳۰%)؛ رضا آهنگری‌کهن (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۵%)

**منابع مالی:** پژوهش حاضر تحت حمایت مالی انستیتوپاستور ایران بوده است.

## منابع

1- Milani A, Bolhassani A, Shahbazi S, Motevalli F, Sadat SM, Soleymani S. Small heat shock protein 27: An effective adjuvant for enhancement of HIV-1 Nef antigen-specific immunity. Immunol Lett. 2017;191:16-22.

2- Lelièvre JD, Lévy Y. HIV-1 prophylactic vaccines: State of the art. J Virus Erad. 2016;2(1):5-11.

3- Habibzadeh N, Bolhassani A, Vahabpour R, Sadat SM. How can improve DNA vaccine modalities as a therapeutic approach against HIV infections?. J AIDS Clin Res. 2015;6(4):1000440.

4- Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. 2010;46(1):5-14.

5- Lever AML. AIDS/HIV, molecular and cell biology. Rev Cell Biol Mol Med. 2006 Sep.

6- Das SR, Jameel S. Biology of the HIV Nef protein.


www.SID.ir

Archive of SID


Indian J Med Res. 2005;121(4):315-32.
7- Geyer M, Fackler OT, Matija Peterlin B. Structure-function relationships in HIV-1 Nef. EMBO Rep. 2001;2(7):580-5.
8- Lema D, Garcia A, De Sanctis JB. HIV vaccines: A brief overview. Scand J Immunol. 2014;80(1):1-11.
9- Wallin RP, Lundqvist A, Moré SH, Von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. Trends Immunol. 2002;23(3):130-5.
10- Wan T, Zhou X, Chen G, An H, Chen T, Zhang W, et al. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. Blood. 2004;103(5):1747-54.
11- Bakthisaran R, Tangirala R, Mohan Rao C. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics. 2015;1854(4):291-319.
12- Simpson RJ. Zinc/Imidazole procedure for visualization of proteins in gels by negative staining. CSH Protoc. 2007;2007:pdb.prot4701.
13- Alipour Z, Eskandari N, Mokhah S. Evaluation of knowledge and attitude of non-medical students about AIDS. J Holist Nurs Midwifery. 2016;26(79):10-20. [Persian]
14- Kadkhodayan S, Irani Sh, Sadat SM, Fotouhi F, Bolhassani A. Cloning, expression and purification of the recombinant HIV-1 Tat-Nef fusion protein in prokaryotic expression system. Arak Med Univ J. 2016;19(4):60-8. [Persian]
15- Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. Chem Sci. 2016;7(2):842-54.
16- Norimine J, Mosqueda J, Palmer GH, Lewin HA, Brown WC. Conservation of Babesia bovis small heat shock protein (Hsp20) among strains and definition of T helper cell epitopes recognized by cattle with diverse major histocompatibility complex class II haplotypes. Infect Immun. 2004;72(2):1096-106.
17- Bandehpour M, Sharifnia Z, Mosaffa N, Kazemi B, Seyed N, Soleimani Darani M. Effect of HSP90 adjuvant on immunogenicity of HbsAg in BALB/c mice. Res Med. 2013;37(2):80-4. [Persian]
18- Matsushima-Nishiwaki R, Kumada T, Nagasawa T, Suzuki M, Yasuda E, Okuda S, al. Direct association of heat shock protein 20 (HSPB6) with phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in human hepatocellular carcinoma: Regulation of the PI3K activity. PLoS One. 2013;8(11):e78440.


www.SID.ir