مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره چهارم (پیاپی ۲۵) زمستان ۱۳۹۴
صفحات ۲۸۰-۲۷۱

Original Article

بررسی بیان توالی کامل ژن گلیکوپروتئین سطحی ۲ ویروس *هپاتیت C* در مخمر *پیکیا پاستوریس*

راحله صولت[۱]، پونه رحیمی*[۲]، غلامرضابخشی خانیکی[۳]، محمدرضا آقا صادقی[۴]، روح الله وهاب پور[۵]، مهدی شکری[۶]

[۱] کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، واحد تهران شرق، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، [۲]استادیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، گروه ویروس شناسی، [۳]استاد، دانشگاه پیام نور، واحد تهران شرق، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، [۴]دانشیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، گروه ویروس شناسی، [۵]دانشجوی دکتری تخصصی، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، [۶]دانشجوی دکتری تخصصی، بخش ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران.

چکیده

سابقه و هدف: عفونت ویروس *هپاتیت C* با اتصال پروتئین E2 ویروس به گیرنده سطح سلول کبد انسان آغاز می شود. بنابراین به عنوان یکی از اهداف تحقیقات دارو و واکسن بر علیه این عفونت مطرح می باشد. این مطالعه برای اولین بار در ایران با هدف انتقال تمام طول ژن E2 (JFH1) *HCV*-2a توسط وکتور نوترکیب pPICZAa–E2 به مخمر *پیکیاپاستوریس* سویه KM71H و بیان ژن یاد شده در این سیستم بیانی انجام شد.

مواد و روش ها: ژن E2 با پرایمرهای واجد جایگاه آنزیم های برش دهنده *EcoR*I و *Xba*I به طور تمام طول تکثیر شد. این ژن به وکتورهای T-PTG19 و pPICZAa وارد و سپس به باکتری *اشریشیا کلی* منتقل گردید. وکتور نوترکیب pPICZAa-E2 با روش الکتروپوریشن به مخمر منتقل شد. انتقال توسط هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی گردید. مخمر به مدت ۵ شبانه روز در محیط کشت بیانی YNB متانول دار رشد کرد و بیان ژن مورد نظر با روش وسترن بلات بررسی شد.

یافته ها: ساخت وکتور نوترکیب واجد ژن تمام طول pPICZAa-(JFH1) E2، انتقال به میزبان های باکتریایی و مخمری و نیز بیان ژن در سیستم مخمری KM71H با موفقیت انجام شد.

نتیجه گیری: در این پژوهش امکان بیان ژن تمام طول E2 ویروس *هپاتیت C* سویه JFH1 (به عنوان سویه مدل در تحقیقات بر روی این ویروس) با موفقیت انجام گرفت. نتایج این مطالعه می تواند راه گشای پژوهش های آینده جهت بررسی ساختار و عملکرد این پروتئین باشد.

واژگان کلیدی: گلیکوپروتئین E2، *ویروس هپاتیت C* سویه JFH1، وکتور pPICZAa، *پیکیا پاستوریس*.

دریافت مقاله: تیر ماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹٤

مقدمه

ویروس هپاتیت C (*HCV*) برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ در آمریکا شناسایی شد و سومین عامل هپاتیت ویروسی در نظر گرفته می شود (۱). ویروس یاد شده انسان را به عنوان اختصاصی ترین میزبان طبیعی خود شناسایی کرده و عامل بروز التهاب در کبد فرد آلوده و یا سرطانی شدن آن می باشد. بنابراین این عفونت به عنوان یکی از عمده ترین عوامل بیماری زای انسانی و مشکل سازترین عامل در سلامت افراد سراسر جهان تلقی می گردد. به طوری که آلودگی بیش از ۱۷۰ میلیون نفری (تقریباً ۳ درصد جمعیت جهان) را به همراه دارد. این در حالی است که از شایع ترین راه های انتقال یعنی خون و فرآورده آلوده به ویروس *هپاتیت C*، قدرت نفوذ به بدن انسان را خواهد داشت (۷-۱).

این ویروس جزء خانواده *فلاوی ویریده* (*Flaviviridae*) و جنس *هپاسی ویروس* (*Hepaci virus*) است (۱ و ۲). از ویژگی های *ویروس هپاتیت C* می توان به قطری در حدود ۵۵-۶۵ نانومتر و ژنومی از جنس *RNA* تک رشته مثبت خطی

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، میدان انقلاب اسلامی، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز. تلفن: ۶۶۹۶۹۲۹۱-۰۲۱ پست الکترونیک: prahimi@pasteur.ac.ir

با طول ٦/٩ کیلوباز و در برگیرنده یک قاب خوانش باز طویل (ORF) متشکل از تمامی ژن های ویروس اشاره نمود (۳-۱). همچنین پلی پروتئین یاد شده با کمک پروتئازهای ویروسی و سلول کبد برش خورده و به ۱۰ پروتئین بالغ ویروسی تبدیل می شود. در این بین پروتئین های ساختمانی در انتهای '5 ژنوم ویروس، پروتئین نوکلئوکپسید هسته C، گلیکوپروتئین های پوششی E1 و E2 گروه غیرساختمانی در انتهای '3 ژنوم ویروس قرار می گیرند (۲ و ۳).

از ویژگی های دیگر ویروس *هپاتیت C* می توان به هتروژنوس بودن آن و طبقه بندی ویروس به هفت ژنوتیپ مختلف با ۳۱ تا ۳٤ درصد واگرایی و چندین زیر تیپ با ۱۰ تا ۳۰ درصد واگرایی در سطح نوکلئوتیدها اشاره نمود (۱).

با وجود داروهای درمانی، ساخت واکسن های متفاوتی علیه این ویروس در مراحل آزمایش های بالینی بر روی انسان و شامپانزه قرار دارد (۷ و ۸). یکی از مهم ترین عواملی که در ناکارآمدی داروها و واکسن ها موثر می باشد وجود ژن E2 است که در محدوده آمینواسیدی از ۳۸٤ تا ۷٤٦ جای گرفته و دارای ۱۱۰۱ نوکلئوتید، ۳٦۷ آمینواسید و ۱۱ جایگاه گلیکوزیلاسیون از نوع ان-گلیکوزیله با تعداد ۹ مانوز است (۲، ۳، ۱۰ و ۱۱).

این گلیکوپروتئین با اتصال به گیرنده های سطحی سلول کبد انسان به نام CD81 با کمک منطقه متغیر اولیه (HVR-1) که در سمت پایانه آمینی این پروتئین قرار دارد، قدرت آلوده کردن سلول های انسان را در پی نفوذ ویروس با روش اندوسیتوز فراهم می نماید (۳، ۵ و ۹). بنابراین در یک محیط اسیدی امکان آزادسازی ژنوم ویروس فراهم می گردد و تکثیر ژنوم و عفونت سلول های کبدی آغاز می شود (۱۱). همچنین به دلیل وجود نواحی متغییر در پروتئین یاد شده، امکان فرار از سیستم ایمنی هومورال (*B-Cell*) برای ویروس فراهم می گردد (۳، ۵ و ۹). از طرف دیگر پروتئین توسط جایگاه های قرارگیری گلیکان هایش در برقراری واکنش با آنتی بادی ها موثر واقع می شوند. بنابراین می توان گفت این گلیکان ها نقش بیولوژیکی پروتئین را تعیین می کنند و جایگاه قرارگیری آن در سلول مهم می باشند. این گلیکان ها که در سمت پایانه آمینی (N) پروتئین قرار گرفته اند می توانند به صورت مستقیم و غیرمستقیم بر روی فولدینگ پروتئین یاد شده اثر گذار باشند. از مکان های گلیکوزیله می توان به (N417) N35، N263 (N623)، (N476) N94 و (N532) N150 اشاره نمود.

از طرفی پروتئین E2 که جزء تیپ یک پروتئین های ترشحی است، در پایانه کربوکسیلی (C) خود دارای ۳۳٤-۳۳۷ آمینو اسید می باشد که به عنوان یک قسمت هیدروفوبیک و تکیه گاه عمل کرده تا پایانه دیگر پروتئین (که تقریباً شامل ۳۰ آمینواسید می شود) از غشا خارج گردد (۲).

با این همه پروتئینی که توسط ویروس ساخته می شود وزنی معادل ۳٦/۵ تا ۷۰ کیلودالتون خواهد داشت که بر حسب گلیکوزیله شدن و یا عدم انجام این فرآیند در پروتئین، تعیین خواهد شد.

از آنجایی که پروتئین یادشده می تواند گلیکوزیله شود در مطالعه حاضر از شاتل وکتور pPICZAa ترشحی استفاده گردید تا در میزبان یوکاریوتی متیلوتروفیک (مخمر *پیکیا پاستوریس*) که قدرت بالایی در هیپرگلیکوزیلاسیون پروتئین نوترکیب دارد تولید پروتئین ترشحی E2 انجام گیرد. همچنین این میزبان امکان دست ورزی ژنتیکی مناسب و دارای پروموتور AOX1 قوی به به منظور بیان ژن می باشد. اما تنها اشکال این میزبان آن است که به صورت طبیعی ترشح پروتئین به میزان کمی به داخل محیط کشت دارد.

این مطالعه برای اولین بار در ایران با هدف بررسی بیان توالی کامل ژن گلیکو پروتئین سطحی ۲ ویروس *هپاتیت C* در مخمر *پیکیاپاستوریس* انجام شد.

مواد و روش ها

الف) طراحی پرایمر: ترادف ژنوم *HCV(2a)* به صورت کامل با شماره دستیابی (KF700370) از پایگاه اطلاعاتی داده (NCBI) تهیه و توالی ژن E2 از سویه JFH1 در آن بررسی گردید.

طراحی پرایمرها به کمک نرم افزار *Gene Runner* و *CLC workbench* انجام گرفت. به طوری که در سمت '5

پرایمرهای جلویی و برگشتی جایگاه آنزیم محدودگر تعبیه گردید. این پرایمرها دارای توالی جلو:

5'-GAATTCGGCACCACCACCGT-3' (E2+EcoRI)

(آغاز از نوکلئوتید ۱٤۹۰ ژنوم) و توالی برگشت:

5'-TCTAGAGACCAACTTCTCCAATGC-3'(E2+XbaI) (آغاز از نوکلئوتید ۲٦۰۸ ژنوم) بودند.

ب) واکنش زنجیره ای پلی مراز به منظور تکثیر ژن: E2 ژنوم کامل ژنوتیپ JFH1 *ویروس هپاتیت C* به صورت کلون شده در وکتور pUC-57، از بانک ژن انستیتو پاستور ایران- تهران تهیه و به عنوان الگو در مرحله تکثیر ژن به کار گرفته شد.

در این مطالعه واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر 10X آنزیم *pfu* پلی مراز، یک میکرولیتر dNTPs mix (۱۰ Mm)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکو مول در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم *pfu* پلی مراز (۲/۵ واحد در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از DNA الگو (۱۳/۲ نانوگرم در میکرولیتر) و ۳۷ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر انجام شد.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Authorized Thermal Cycler, Ependorf, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال در دمای ٦۰ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. صحت فرآیند تکثیر با روش الکتروفورز و با ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

در ادامه به منظور تکثیر ثانویه ژن از ۱ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x آنزیم Taq پلی مراز، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs mix (10 Mm) و ۱۲ میکرولیتر محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز مرحله اول استفاده شد و چرخه تکثیر مشابه قبل تکرار گردید. در این مرحله نیز صحت فرآیند تکثیر با روش الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

در نهایت محصول توسط کیت (QIAquick PCR Purification Kit, Germany) خالص سازی گردید.

ج) ساخت وکتور نوترکیب اولیه: برای این منظور از ۱۰ میکرولیتر وکتور خطی T (PCR Cloning Vector PTG 19) با غلظت ۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر (تهیه شده از شرکت Vivantechnologies) و ۱۰ میکرولیتر محصول خالص سازی شده مرحله قبل با غلظت ۹۲ نانوگرم در ۵ میکرولیتر استفاده شد. به مخلوط یاد شده ۱ میکرولیتر آنزیم لیگاز T4 و ۲ میکرولیتر بافر لیگاز اضافه گردید و به منظور اتصال در دمای ٤ درجه سلیسیوس به مدت ۱٦ ساعت نگهداری شدند.

در مرحله بعد محصول یاد شده در مجاورت سلول مستعد شده *E-coli* DH5a قرار گرفت. وکتور خطی اولیه نوترکیب با روش شوک حرارتی به درون سلول منتقل گردید. به منظور مستعد سازی سلول باکتری یاد شده از بافر FB شامل $2H_2O$، گلیسرول، کلرید کلسیم و کلرید پتاسیم با جذب نوری ۰/٤ در طول موج ٦۰۰ نانومتر استفاده شد.

سپس به منظور غربالگری سلول ها از محیط کشت LB آگار با ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آنتی بیوتیک آمپی سیلین و کشت شبانه در دمای ۳۷ °C استفاده گردید. در ادامه هر کلنی رشد یافته در پلیت یاد شده در محیط کشت تازه LB مایع با همان رقت آنتی بیوتیکی کشت شد. سپس استخراج پلاسمید به کمک کیت (QIAprep spin Miniprep Kit, Germany) انجام گرفت.

به منظور بررسی نوترکیبی وکتور خطی اولیه از روش های واکنش زنجیره ای پلی مراز تک کلنی و هضم آنزیمی استفاده شد. به طور خلاصه مقدار ۲۰ میکرولیتر پلاسمید استخراج شده با غلظت ٥٦ ng/5µl ، ۲/۵ میکرولیتر از آنزیم برش دهنده *XbaI*، ۲/۵ میکرولیتر بافر تانگو با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس قرار داده شدند. سپس به نمونه یاد شده یک میکرولیتر آنزیم *EcoRI* و ۲ میکرولیتر بافر سریع اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. نمونه ها بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. در نهایت باند ژن مورد نظر به کمک کیت (QIAquick Gel Extraction Kit, Hilden, Germany)

استخراج گردید.

د) ساخت وکتور نوترکیب اصلی: باکتری *اشریشیاکلی* حاوی وکتور pPICZAa از بانک ژن انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول یاد شده در محیط کشت LB مایع حاوی ۲۵ µg/ml آنتی بیوتیک زئوسین در محیطی بدون نور به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ °C تکثیر یافت. به منظور استخراج شاتل وکتور، از کیت استخراج پلاسمید (QIAprep spin MAXIprep Kit, Hilden, Germany) استفاده شد. در ادامه وکتور یاد شده توسط آنزیم های برش دهنده ی *EcoR*I و *Xba*I هر کدام به مقدار یک میکرولیتر و با همان غلظت ارائه شده در مرحله قبل، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C به فرم خطی تبدیل شد. مقدار ۵ میکرولیتر از وکتور (غلظت ۹۰ نانوگرم در ۵ میکرولیتر) با ۱۰ میکرولیتر از ژن به دست آمده (غلظت ٤٥ نانوگرم در ۵ میکرولیتر) از مرحله قبل مخلوط گردید تا در حضور آنزیم لیگاز T4 امکان نوترکیب شدن فراهم شود. سپس انتقال به سلول *E-coli* DH5a (مستعد شده با کلرید کلسیم مطابق آنچه در مرحله قبل ذکر شد) به روش شوک حرارتی و غربالگری در محیط حاوی ۲۵ (µg/ml) آنتی بیوتیک زئوسین (Invitrogen, USA) در محیطی بدون نور به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس انجام گرفت. سپس کلنی ها در محیط کشت تازه ای با همان غلظت آنتی بیوتیکی رشد یافتند و پلاسمید آن ها توسط کیت استخراج در مقیاس کم شرکت کیاژن استخراج گردید.

ه) تایید سازه نوترکیب اصلی: پلاسمیدهای استخراجی در حضور ۱ میکرولیتر از آنزیم های عمل کننده سریع *EcoR*I و *Xba*I و ۲ میکرولیتر بافر مخصوص آنها با همان غلظت یاد شده در مرحله قبل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار گرفتند. نمونه های حاصل بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. همچنین صحت نوترکیبی وکتور pPICZAa و عدم جهش در ژن E2 با روش های PCR- Clony توسط پرایمر عمومی جلویی AOX1 با توالی '5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3 و پرایمر برگشتی با توالی '5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3 (BioNEER، کره جنوبی) و تعیین توالی (شرکت ژن فناوران) مورد بررسی قرار داده شد.

و) استفاده از آلکالین فسفاتاز: هم راستا با انجام فرآیند نوترکیبی وکتور اصلی به منظور فسفات دار کردن آن، مقدار یک میکرولیتر آنزیم آلکالین فسفاتاز و ۱/۸ میکرولیتر بافر آنزیم آلکالین فسفاتاز به ۱۷ میکرولیتر از پلاسمیدی که توسط آنزیم های *EcoR*I و *Xba*I هضم شده بود، اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C و سپس ۱۵ دقیقه در دمای ٦٥ °C قرار داده شد. بنابراین فرآیند اتصال وکتور به ژن با نسبت ۱ به ۲ (۵ میکرولیتر وکتور فسفات دار شده: ۱۰ میکرولیتر ژن) صورت گرفت. در ادامه ترانسفورم کردن به درون سلول باکتری *E-coli* DH5a و بررسی کلنی های ایجاد شده در این مرحله مطابق آنچه که در مراحل قبل اشاره شد، انجام گرفت.

ز) نوترکیب ساختن ژنوم مخمر پیکیا پاستوریس:

۱- خطی شدن وکتور pPICZAa نوترکیب با آنزیم *Sac*I: سلول *اشریشیا کلی* حاوی شاتل وکتور نوترکیب در محیط کشت LB مایع حاوی ۲۵ µg/ml آنتی بیوتیک زئوسین به مدت یک شبانه روز رشد یافت. پلاسمید مربوطه به کمک کیت (QIAprep spin MAXIprep Kit, Hilden, Germany) استخراج گردید. سپس ۹٤ میکرولیتر از پلاسمید استخراجی با ۳ میکرولیتر آنزیم *Sac*I و ۱۱ میکرولیتر از بافر آنزیم *Sac*I ترکیب و به مدت یک شب در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. در نهایت با ژل آگارز یک درصد الکتروفورز انجام شد. تک باند مربوطه از ژل به کمک کیت (YTA Plasmid Dna Extraction Mini Kit, IRAN) استخراج و غلظت نمونه معادل ۲/۳۵ میکروگرم تعیین گردید.

۲- آماده سازی سویه های KM71H و X33 مخمر *پیکیاپاستوریس*: هر دو سویه در محیط کشت های کنترلی مانند MDH، MD و YPD آگار حاوی ۱۰۰ µg/ml آنتی بیوتیک زئوسین و بدون آنتی بیوتیک، به مدت ۳ شبانه روز در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلیسیوس قرار گرفتند و تایید شدند.

سپس از سویه هایی که دارای چگالی نوری ۱/۳ تا ۱/۵ در طول موج ٦۰۰ نانومتر بودند سلول های مستعد با سوربیتول ساخته شد.

ح) فرآیند نوترکیب شدن سلول مخمر: وکتور نوترکیب خطی شده به روش الکتروپوریشن (Bio Rad, USA, Gen Pulser X Cell) و با ویژگی های (ولتاژ: ۲۰۰۰ ولت، ظرفیت خازنی: ۲۵ میکرو فاراد، مقاومت: ۲۰۰ اهم، مدت زمان برقراری جریان: ۵ میلی ثانیه) به سلول های مخمر مستعد شده وارد شد و بر روی محیط کشت YPD آگار حاوی غلظت های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک زئوسین (برای سویه X33) و غلظت های ۱۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (برای سویه KM71H) به مدت ۳ شبانه روز در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلیسیوس و در تاریکی رشد یافتند.

ط) تایید نوترکیبی ژنوم مخمر: هر کلنی رشد یافته در مرحله قبل به محیط کشت YPD مایع حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک زئوسین وارد شد و به مدت دو شبانه روز در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلیسیوس گرماگذاری گردید. سپس استخراج ژنوم مخمر هر دو سویه توسط بافر (TENS=TSSET) و مهره های شیشه ای ۳۰۰ و ۷۰۰ میکرونی (SIGMA Glass Beads 710-1, 180 microns ,USA) با روش دستی انجام گرفت. در نهایت نمونه ها با روش PCR-Clony به واسطه پرایمرهای ژن و پرایمر AOX1 عمومی و روش تعیین توالی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

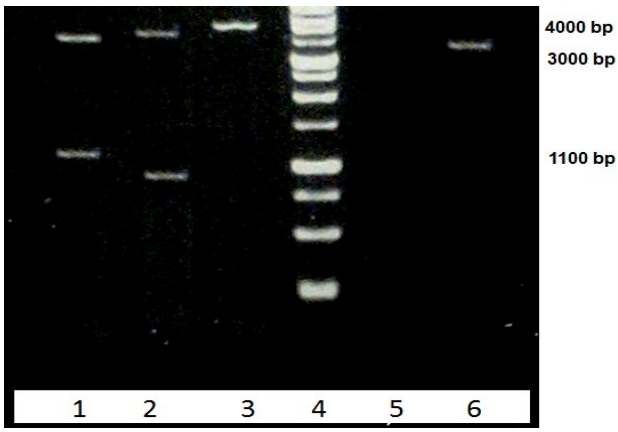
ی) بررسی امکان بیان توالی کامل ژن E2 در سویه KM71H مخمر پیکیاپاستوریس: سویه یاد شده به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلیسیوس گرماگذاری گردید و درون ۵ میلی لیتر از محیط کشت YPD مایع بدون حضور آنتی بیوتیک رشد نمود. سپس از نمونه رشد یافته با دور ۱۳۰۰۰ g رسوب گیری انجام شد. رسوب به دست آمده با ۲۰ میلی لیتر محیط کشت گلیسرول دار BMGY مخلوط گردید. سپس از نمونه یاد شده تا رسیدن به جذب نوری در محدوده ۲ تا ۱۰ در طول موج ٦۰۰ nm در حرارت ۳۰ درجه سلیسیوس نگهداری شد.

سپس مقدار ۲ میلی لیتر از محیط کشت به عنوان نمونه رشد یافته (اما فاقد بیان پروتئین) برداشته شد تا در فرآیند SDS-PAGE قدرت مقایسه نمونه ها از لحاظ بیان پروتئین فراهم آید. همچنین از باقی مانده محیط کشت رسوب گیری با دور بالا به عمل آمد. مقدار ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت YNB حاوی متانول یک درصد به رسوب به دست آمده اضافه گردید. سلول های مخمر در محیط کشت بیانی به مدت ۵ شبانه روز در گرمخانه شیکردار و با هوادهی مناسب در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. روزانه مقدار ۲ میلی لیتر از نمونه برداشت شد و رسوب گیری به عمل آمد. در نهایت هر یک از نمونه های تهیه شده در مدت ۵ شبانه روز توسط روش دستی با واسطه TCA اسید خالص، جداسازی پروتئین ترشحی موجود در مایع روماند، از سایر مواد محیط کشت انجام شد. در روش یاد شده از TCA اسید ۱۰ درصد به مایع روماند حاصل از رسوب گیری نمونه بیانی استفاده شد. سپس نمونه به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت و با دور بالا و دمای اتاق، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت رسوب حاصله با ۱۰۰ میکرولیتر از اتانول سرد به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. خشک شدن رسوب حاصله در دمای اتاق انجام گرفت و با آب مقطر شستشو شد.

ک) تایید امکان بیان ژن E2 در میزبان یوکاریوت: با روش SDS-PAGE (ژل Resolving با بالایی ۱۲ درصد و ژل Stacking با پایینی ۵ درصد) نمونه بیانی مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال آن تایید نهایی با روش وسترن بلات (Bio Rad, USA) با حضور آنتی بادی اولیه 6x His-Tag به نسبت ۱/۲۰۰۰، (Abcam, Ms MAb to 6X His Tag ,100µg (1mg/ml)) و آنتی بادی ثانویه a M IgG-HRP به نسبت ۱/۱۰۰۰۰ (µg 100 Abcam, Ms Mab) صورت گرفت.

یافته ها

الف) نوترکیبی وکتور pPICZAa در این مطالعه از ۱۰ تا ۱۵



شکل ۱: تایید نهایی وکتور pPICZAa نوترکیب شده با ژن *HCV* 2a (JFH1)-E2 توسط آنزیم های برش دهنده *Xba*I و *Eco*RI. ستون ۱) نمونه تاییدی هضم شده با آنزیم های *Xba*I و *Eco*RI و مشاهده باند ژن (۱۱۰۰ جفت باز) و باند وکتور برش خورده (۳٦۰۰ جفت باز)، ستون ۲) نمونه های تایید نشده به دلیل درست نبودن سایز هر دو باند، ستون ۳) وکتور نوترکیب بدون اثر آنزیم های برش دهنده، ستون ٤) مارکر ۱Kb، ستون ٥) چاهک خالی، ستون ٦) پلاسمید pPICZAa بدون ژن، برش خورده با آنزیم *Xba*I.

کلنی به دست آمده در هر یک از نسبت های به کار رفته و متفاوت از ژن هضم شده و وکتور خطی شده با آنزیم های برش دهنده *Xba*I و *Eco*RI (نسبت های ۱:۱، ۲:۱، ۳:۱، ٥:۱ و ۸:۱ (وکتور: ژن))، در نهایت وکتور نوترکیب تولید شد. از بین ۱۰ کلنی مورد بررسی در همین نسبت و با روش هضم آنزیمی، ۲ کلنی نوترکیب ژن مورد نظر را در جایگاه درستی درون وکتور به همراه داشتند (شکل ۱). به منظور اطمینان از فقدان جهش در ژن از روش تعیین توالی استفاده شد و هر دو نمونه مورد تایید قرار گرفت.

ب) تاثیر آنزیم آلکالین فسفاتاز: در یک بررسی موازی با استفاده از آنزیم آلکالین فسفاتاز، به وکتور خطی شده این آنزیم اضافه شد و با نسبت ۲:۱ مرحله اتصال سپری شد. تعداد ۱۰ کلنی به دست آمده از این مرحله نیز مورد بررسی قرار گرفت. اما پس از تکثیر به روش PCR-Clony، باندی در محدوده تقریبی ۱٤۰۰ جفت باز دیده نشد. این امر حاکی از آن است که در این مطالعه، عدم نوترکیبی وکتور اصلی در هر یک از نسبت های وکتور و ژن که در مرحله قبل به آن اشاره شد، به تاخوردگی وکتور بر روی خود و حلقوی شدن مجدد آن بدون حضور ژن، بستگی ندارد.

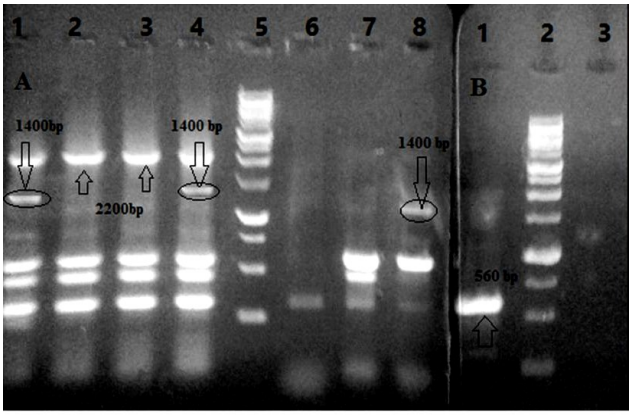
ج) نوترکیبی سویه های مخمر پیکیاپاستوریس: رشد کلنی های سویه (X33 Mut^{+}) و (Mut s KM71H) همان گونه که انتظار می رفت از رقت کم آنتی بیوتیک به زیاد کاهش یافت و به تعداد کلنی های نوترکیب در مرحله تایید افزود. همچنین ۱۰ تا ۲۰ کلنی در رقت های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در هر دو سویه به دست آمد. با بررسی آنها در مورد سویه X33 تعداد ٦ کلنی از سلول های نوترکیب شده از بین ۱۰ کلنی، به دست آمد. همچنین در سویه KM71H دو کلنی مثبت در رقت بالای آنتی بیوتیک یافت شد.

همچنین برای مخمر *پیکیاپاستوریس* در هر دو سویه فرآیند PCR-Clony با پرایمر AOX1 عمومی انجام گرفت. مشاهده باندهایی با طول در حدود ۲٥۰۰ جفت باز امکان وارد شدن دو نسخه از ژن، باندهای در حدود ۲۲۰۰ جفت باز نشان دهنده تکثیر پروموتر AOX1 و عدم حضور ژن در ژنوم مخمر، باندهای در حدود ۱٤۰۰ جفت باز مربوط به ژن E2 که با مقداری از پروموتر AOX1 تکثیر شده می باشد.

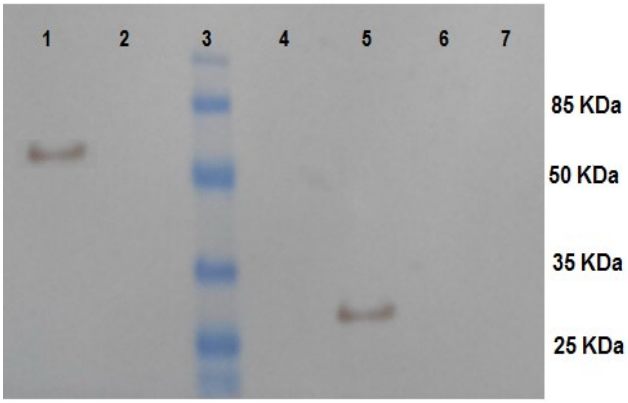
همچنین باندهایی با اندازه پایین تر از آنچه یاد شد نشان دهنده تکثیر برخی از قسمت های ژنوم مخمر می باشد که در شرایط PCR با در دسترس قرار نگرفتن مواد واکنش، به صورت ناقص رونویسی شده اند. بنابراین وجود باندهای دیگر، دلیلی بر نادرست بودن فرایند کار و عدم تایید نوترکیبی ژنوم مخمر نخواهد بود. زیرا باند مورد نظر در محدوده ۱٤۰۰ جفت باز با تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفته است (شکل ۲).

د) امکان بیان ژن و تایید آن : در این مطالعه سویه KM71H از نظر بیان ژن مورد بررسی قرار گرفت. در محیط کشت حاوی گلیسرول این سویه در جذب نوری ۲ تا ٥/۲ با همان طول موج یاد شده برای ادامه کار بررسی گردید.

با استفاده از روش SDS-PAGE مشخص گردید که از روز سوم بیان و قدرت بیان ژن مورد نظر با افزایش همراه بوده است تا اینکه در روز پنجم به خوبی قابل رویت شد. این در حالی است که در روزهای اول و دوم، بیانی از ژن E2 ویروس



شکل ۲: تایید نوترکیبی مخمر *پیکیا پاستوریس* سویه های X33 و KM71H توسط روش PCR-Clony با پرایمر AOX1 عمومی. A: سویه X33. ستون ۱ و ٤) نمونه تاییدی با سایزی در حدود ۱٤۰۰ جفت باز نشان دهنده ورود یک نسخه از ژن به درون ساختار ژنوم است، ستون ۲ و ۳) نمونه های تایید نشده و حاوی ژن کامل AOX 1 با باندی در حدود ۲۲۰۰ جفت باز، ستون ۵) مارکر ۱Kb، سویه KM71H: ستون ٦ و ۷) نمونه های تایید نشده، ستون ۸) نمونه تاییدشده. B : ستون ۱) نمونه تایید نشده، ستون ۲) مارکر ۱Kb ، ستون ۳) کنترل منفی.



شکل ۳: تایید نهایی بیان ژن تمام طول *HCV*-E2 در سویه KM71H مخمر *پیکیا پاستوریس* و محیط کشت بیانی YNB حاوی متانول یک درصد با روش وسترن بلات. ستون ۱) روز پنجم کشت در محیط بیانی مخمر همراه با باندی در محدوده ۵۰ تا ۸۵ کیلو دالتونی به نشانه بیان ژن E2، ستون ۲ و ٤) روز سوم و چهارم کشت مخمر در محیط بیانی بدون نشانه ای از بیان ژن در سلول، ستون ۳) مارکر پروتئین، ستون ۵) نمونه کنترل صحت انتقال نمونه ها در وسترن بلات، پروتئین CRP فاز حاد التهابی با وزن تقریبی ۲۸ کیلو دالتون تهیه شده از گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ستون ٦) نمونه کنترل فرآیند وسترن که در هنگام انجام فرآیند فاقد پروتئین بوده است، ستون ۷) نمونه القانشده تهیه شده از محیط کشت BMGY.

هپاتیت سی دیده نشد. همچنین روش وسترن بلات نیز در روز پنجم حضور پروتئین E2 را در محدوده ۵۰ تا ۸۵ کیلو دالتون به وضوح تایید می نماید. از آنجایی که وزن ۳٦/۵ کیلو دالتونی برای فرم غیرگلیکوزیله و ۵۸ تا ۷٤ کیلو دالتونی برای فرم گلیکوزیله این پروتئین امکان پذیر می باشد، بنابراین باند مشاهده شده در روز پنجم بیان، می تواند دلیل صحت بیان پروتئین ترشحی و گلیکوزیله شده باشد (شکل ۳).

بحث

در مطالعه حاضر نوترکیبی وکتور pPICZAa با ژن کامل *HCV*-E2 سویه JFH1(2a) در کلون سازی سایت وکتور میسر گردید. همچنین انتقال این وکتور به سلول *اشریشیا کلی* با روش شوک حرارتی مورد بررسی و تایید شد. همچنین قابلیت بیان گلیکوپروتئین مورد نظر به شکل ترشحی و با سایزی در محدوده ۵۸ تا ۷٤ کیلودالتون توسط وکتور نوترکیب در محیط کشت مخصوص سویه بیانی بررسی گردید.

تحقیق حاضر این امر را در مورد بیان این ژن در روز پنجم کشت مخمر*پیکیاپاستوریس* سویه KM71H در محیط کشت حاوی متانول در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلیسیوس فراهم نمود. با توجه به این نکته که تاکنون هیچ واکسنی نتوانسته در پیشگیری یا درمان عفونت ناشی از ویروس *هپاتیت C* اثر بخشی کاملی داشته باشد و هنوز عفونت با این ویروس به عنوان یک مشکل سلامت جهانی مطرح می باشد، تحقیقات بر روی امکان استفاده از ژن های مختلف ویروسی از جمله ژن های ساختمانی آن در طراحی واکسن ادامه دارد.

در پروتئین E2 جایگاه های آنتی ژنتیک ٤۱۲ تا ٤۲۳ از مهمترین بخش های این پروتئین هستند و بیان این پروتئین در میزبان های گوناگون شامل سلول یوکاریوتی و یا پروکاریوتی همواره مورد توجه محققین بوده است. این پروتئین جزء تیپ یک پروتئین های غشایی و یک هترودایمر است که در پایانه آمینی خود با ۳۳۷/۳۳٤ آمینو اسید به شدت گلیکوزیله شده است. به طوری که این ویژگی نقش مهمی در شکل گیری پروتئین ایفا می نماید. همچنین این پروتئین در پایانه

کربوکسیلی خود که تقریباً ۳۰ آمینواسید دارد دارای خاصیت هیدروفوب می باشد (۱۰). در مطالعه حاضر یک شاتل وکتور نوترکیب شده با طول کامل ژن E2 ساخته شد تا آماده ورود به میزبان های یوکاریوتی و یا پروکاریوتی باشد. این موضوع پژوهش حاضر را از سایر مطالعات انجام شده متمایز می سازد. وجه دیگر این تحقیق طراحی و ساخت وکتور نوترکیب واجد ژن مورد نظر در سویه JFH1 است که به عنوان یک ژنوتیپ استاندارد در امر مطالعاتی ویروس *هپاتیت C* کاربرد فراوان دارد.

در سال ۲۰۰۵ میلادی واکیتا (Wakita) و همکاران اکتشافات خود در مورد قدرت همانندسازی در سیستم کشت سلول توسط سویه JFH1 ژنوتیپ ۲a را ارائه نمودند (۱۱).

از طرفی این پروتئین دارای ۱۱ جایگاه بالقوه برای اضافه شدن دنباله های قندی می باشد که وظیفه آنها در شکل گیری صحیح، پاسخ دهی در برابر سیستم ایمنی و ورود ویروس به سلول حائز اهمیت است (۲ و ۱۱). همچنین گزارش شده است که این ژن دارای یک گلیکان ویژه در جایگاه N41(N423) می باشد که کمک کننده شکل گیری صحیح ساختار پروتئین خواهد بود. از طرف دیگر نیز جایگاه های N174(N556) و N241(N623) به طور مستقیم در فولدینگ پروتئین E2 موثر هستند (۲). بنابراین به نظر می رسد که استفاده از طول کامل این ژن یا لحاظ نمودن این بخش ها در طراحی وکتور نوترکیب بیانی به دستیابی ساختار صحیحی از پروتئین کمک خواهد نمود. در مطالعات گذشته مشاهده شده که از ادغام ژن E2 ژنوتیپ JFH1 با ژن های دیگر و از ژنوتیپ های دیگر ویروس *هپاتیت C* در فرایند کلونسازی استفاده شده است و توسط میزبان هایی مانند سلول *Huh7.5* صحت نوترکیبی آنها تایید شده است (۱۲).

همچنین ساختار این ژن در کشت سلولی و بیان آن در محیط کشت سلول های پستانداران و یا آنالیزهای ایمنی شناسی آن درون سلول های یوکاریوتی انجام گرفته است (۱۳).

همچنین گزارشی مبنی بر کلون سازی این ژن در وکتورهای دیگری مانند pUC (که فاقد فاکتور آلفا به منظور ترشح پروتئین هستند) نیز وجود دارد (۱۱). در مطالعه دیگری نوترکیبی بخشی از ژن E2 با چند ژن دیگر از این ویروس در وکتور pPICZAa در *پیکیا پاستوریس* بررسی شده است (۱٤). تنها پژوهشی که در مورد ژن تمام طول این پروتئین انتشار یافته، از نظر اهداف تحقیق و نتایج آن قابل قیاس با مطالعه حاضر نمی باشد. زیرا که در آن تحقیق از هورمون رشد برای بیان کامل ژن و در محیط کشت سلولی استفاده شده بود. همچنین وکتور به کار رفته نیز متفاوت از وکتور مطالعه حاضر می باشد (۱۵).

در مطالعه حاضر تاثیر آنزیم آلکالین فسفاتاز در جلوگیری از حلقوی شدن وکتور خطی بررسی گردید. با این وجود نتایج حاکی از عدم چنین تاثیری بودند. بنابراین می توان این امکان را محتمل دانست که کلنی رشد یافته بدون حضور ژن بوده است (۱۱).

نتیجه گیری

در این پژوهش امکان بیان ژن تمام طول E2 ویروس *هپاتیت C* سویه JFH1 (به عنوان سویه مدل در تحقیقات بر روی این ویروس) با موفقیت انجام گرفت. نتایج این مطالعه می تواند راه گشای پژوهش های آینده به منظور بررسی ساختار و عملکرد این پروتئین باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی همکاران بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور تهران-ایران به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Sharma SD. *Hepatitis c* virus: molecular biology and current the rapeuticoptions. Indian J. 2010; 1: 17-34.

2. Iacob RE, Perdivara I, Przybylski M, Tomer KB. Mass spectrometric characterization of glycosylation of *hepatitis c* virus e2 envelope glycoprotein reveals extended micro heterogeneity of n-glycans . NIH. 2008; 19(3): 428-444.

3. Sautto G, Mancini N, Solforosi L, Diotti RA, Clementi M, Burioni R. HCV proteins and immunoglobulin variable gene (*igv*) subfamilies in *hcv*-induced type II mixed cryoglobulinemia: a concurrent pathogenetic role. J Immunol Res. 2012; 1: 1-11.

4. Kong L, Giang E, Nieusma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, Dai X, Stanfield RL, Burton DR, Ward AB, Wilson IA, Law M. Hepatitis c virus e2 envelope glycoprotein core structure. Science. 2013; 342(6162):1090-1094.

5. Sautto G, W. Tarr A, Mancini N, Clementi M. Structural and antigenic definition of *hepatitis c* virus e2 glycoprotein epitopes targeted by monoclonal antibodies. Clin Dev Immunol. 2013; 1: 1-6.

6. Abd YSE, Tabll AA, Bader El Din NG, Hosny AED, Moustafa RI, El-Shenawy R Atef1 K, El-Awady MK. Neutralizing activities of caprine antibodies towards conserved regions of the hcv envelope glycoprotein e2. J Virol. 2011; 8: 391.

7. Zeisel MB, Turek M, Baumert TF. Getting closer to the patient: upgrade of *hepatitis c* virus infection in primary human hepatocytes. J Hepatol. 2010; 53(2): 388-389.

8. Krey T, Meola A, Keck ZY, Damier-Piolle L, Foung SKH, Rey FA. Structural basis of *hcv* neutralization by human monoclonal antibodies resistant to viral neutralization escape. PLOS Pathogens. 2013; e 1003364.

9. Chen Z, Zhu Y, Ren Y, Tong Y, Hua X, Zhu F, Huang L, Liu Y, Luo Y, Lu W, Zhao P, Qi Z. Hepatitis c virus protects human b lymphocytes from fas-mediated apoptosis via e2-cd81 engagement . PLOS One. 2011; 6: 4 e18933.

10. Kong L, Giang E, Nieusma T, Robbins JB, Deller MC, Stanfield RL, Wilson IA, Lawb M. Structure of *hepatitis c* virus envelope glycoprotein e2 antigenic site 412 to 423 in complex with antibody ap33. J Virol. 2012; 86(23): 13085.10.

11. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R. Construction and characterization of infectious inter genotypic *hepatitis c* virus chemeras. PNAS. 2006; 103(19): 7408-7413.

12. Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, Prentoe JC, Hoegh AM, Alter HJ, Eugen-Olsen J, Bukh J .Development of jfh1-based cell culture systems for *hepatitis c* virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. PNAS. 2008; 105(3): 997-1002.

13. Krey T, Meola A, Keck ZY, Piolle LD, Foung SKH, Rey FA. Structural basis of *hcv* neutralization by human monoclonal antibodies resistant to viral neutralization escape. PLOS Pathogens. 2013; 9(5): e1003364.

14. Fazlalipour M, Keyvani H, Monavari SHR, Mollaie HR. Recombinant core e1e2 protein expressed in *Pichia pastoris* yeast a candidate vaccine for hepatitis c virus. J Antivirals. 2014; 6(3): 139-147.

15. Lee KJ, Suh YA, Cho YG, Cho YS, Ha GW, Chung KH. Hepatitis c virus e2 protein purified from mammalian cells Is frequently recognized by e2-specific antibodies in patient sera. J Biol Chem. 1997; 272(48): 30040-30046.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 4, January 2016

Original Article

Expression of full length of *HCV*-E2 gene in *yeast Pichia pastoris*

Raheleh Solat[1], Pooneh Rahimi[2], Gholam Reza Bakhshi Khaniki[3], Mohammad Reza Aghasadeghi[4], Rouhallah Vahabpour [5], Mehdi Shokri [6]

[1]M.Sc., Department of Biology, Payameh Nour University, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. [3] Professor, Department of Biology, Payameh Nour University, Tehran, Iran. [4] Associate Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. [5] Ph.D. student, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. [6] Ph.D. student, Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran,Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Hepatitis C virus* infection initiates through binding of E2 glycoprotein to its specific human liver cell receptor. Therefore, this glycoprotein is considered as one of the important targets in drug and vaccine researches against this infection. This project was accomplished for the first time to transfer the full length of E2 gene by using recombinant pPICZAa-E2 (*HCV-2a, JFH1*) vector into *Pichia pastoris yeast* KM71H strain, and to evaluate the possibility of its expression in this expression system.

Materials & Methods: The E2 gene was amplified by using primers containing the *EcoRI* and *XbaI* restriction sites and was inserted into the (T-PTG 19) and (pPICZAa) vectors to be transferred into the *E. coli.* The recombinant pPICZAa-E2 vector was transferred into the yeast through electroporation, and it was evaluated by digestion and sequencing. The yeast was grown in YNB medium contained methanol for five days. Gene expression was studied by western blot.

Results: Construction of a recombinant vector pPICZAa-(JFH1)E2, transforming the yeast and its expression in KM71H strain were successfully done.

Conclusion: In this study, the whole length of E2 Ag of *HCV* JFH1, as the protype strain of this virus, was successfully expressed. The result of this study can be used for further analysis of the structure and function of this protein.

Keywords: Glycoprotein E2, *Hepatitis C virus* JFH1 strain, pPICZAa vector, *Pichia pastoris.*

Correspondence to: Pooneh Rahimi

Tel: +98 2166969291

E-mail: prahimi@pasteur.ac.ir

Journal of Microbial World 2016, 8(4): 271-280.