مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره دوم (پیاپی ۲۷) تابستان ۱۳۹۵
صفحات ۹۵-۸۵

Original Article

ترانسفکت سلول حشره Sf9 توسط *باکولوویروس* نوترکیب واجد ژن Core+1 ویروس *هپاتیت سی* سویه JFH1 ژنوتایپ 2a به منظور بیان این پروتئین

فریده سادات سجادیان فرد[۱]، پونه رحیمی*[۲]

[۱]کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی-تهران،
[۲]دانشیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، گروه ویروس شناسی پزشکی، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: در سال های اخیر پروتئین جدیدی بنام Core+1 گزارش شده است که به وسیله یک تغییر ریبوزومی ۱+ در ناحیه کد کننده پروتئین Core ویروس *هپاتیت سی* (HCV) تولید می شود. این مطالعه با هدف طراحی و ساخت وکتور *باکولوویروس* واجد توالی *HCV*-2a (JFH1) Core+1 تولید *باکولوویروس* نوترکیب و تایید ترانسفکت آن در سلول های حشره انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، از ژن *HCV*-2a (JFH1) Core+1 که در پلاسمید pUC57 به صورت تجاری سنتز شده بود استفاده گردید. ژن مورد نظر در پلاسمید pFastBac-HTA همسانه سازی مجدد شد و توسط این وکتور انتقالی در میزبان *اشریشیا کلی* DH10Bac با عمل ترانسپوزیشن، بکمید *باکولوویروس* نوترکیب به دست آمد. سازه نوترکیب پس از تایید با واکنش زنجیره ای پلی مراز، برای ساخت *با کولوویروس* نوترکیب در سلول حشره Sf9 ترانسفکت گردید. وجود پروتئین نوترکیب Core+1 در سلول حشره با روش SDS-PAGE و وسترن بلات مورد تایید قرار گرفت.

یافته ها: همسانه سازی صحیح ژن Core+1 در وکتور انتقالی pFastBac با استفاده از برش آنزیمی و تعیین توالی تایید گردید. واکنش زنجیره ای پلی مراز نشان دهنده صحت طول نواحی تکثیر یافته هدف روی بکمید، ایجاد ترانسپوزیشن و نوترکیبی بکمید نوترکیب بود. اثرات سایتوپاتیک سلول Sf9 نشان دهنده ایجاد *باکولوویروس* نوترکیب بود. پروتئین *HCV*-2a (JFH1) Core+1 به طور موفقیت آمیز بیان گردید.

نتیجه گیری: با طراحی و ساخت وکتور *باکولوویروس* و تولید *باکولوویروس* نوترکیب می توان پروتئین Core+1 مشابه با پروتئین ساخته شده ویروسی را بیان نمود. این عمل پایه انجام مطالعات آینده خواهد بود.

واژگان کلیدی: ویروس *هپاتیت سی*، پروتئین Core+1، سویه JFH1، سلول حشره Sf9، سیستم بیانی *باکولوویروس*.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹٤

مقدمه

امروزه عفونت ناشی از ویروس *هپاتیت سی* (HCV) یکی از مشکلات مهم سلامت عمومی در جهان به شمار می رود. مطالعات در مورد شیوع این ویروس در کشورهای مختلف نشان می دهد که حدود ۳ درصد از کل جمعیت جهان (۱۷۰ میلیون نفر) به HCV آلوده بوده و در حال حاضر این عفونت شایع ترین عامل بیماری پیشرفته و بدخیم کبدی در بسیاری از کشورها می باشد (۱). HCV یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری های مزمن کبدی و کارسینوما هپاتوسلولار است (۲). ویروس *هپاتیت سی* تنها عضو از جنس *هپاسی ویروس* (*Hepacivirus*) و در خانواده *فلاوی ویریده* (*Flaviviridae*) می باشد. این ویروس دارای ابعاد ۵۵ تا ٦۵ نانومتر، حاوی RNA تک رشته ای مثبت و دارای پوشش است.

*) آدرس برای مکاتبه: انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز.
تلفن: ۰۲۱٦٦۹٦۹۲۹۱ پست الکترونیک: prahimi@pasteur.ac.ir

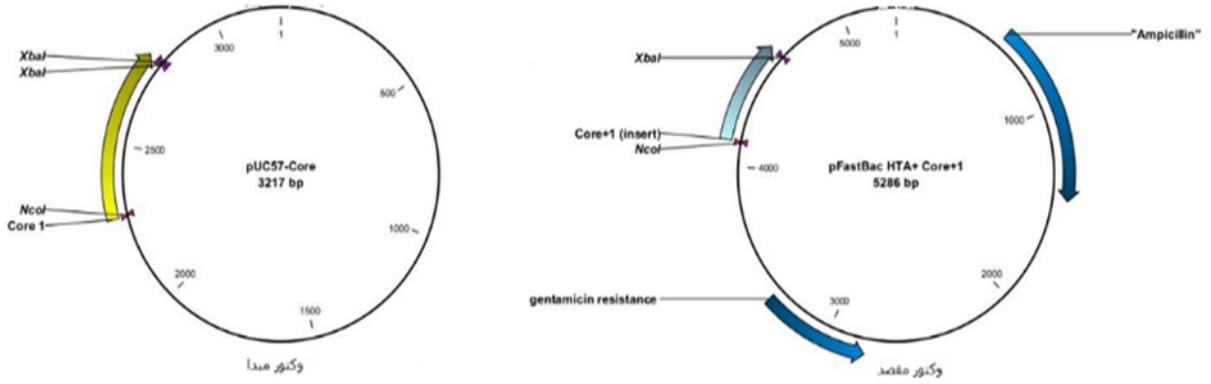
به طوری که در درون هپاتوسیت ها و سلول های تک هسته ای خون محیطی، همانندسازی می نماید (۳ و ٤). ژنوم HCV دارای طول تقریبی ۹/٦ kb بوده و یک پلی پروتئین (حدود ۳۰۰۰ اسید آمینه ای) را کد می کند (۵). پلی پروتئین تولید شده توسط پروتئاز های سلولی و ویروسی به ده پروتئین ساختمانی (C, E2, E1, P7) و پروتئین های غیر ساختمانی (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) پردازش می شود (۳). سویه های HCV بر اساس فیلوژنتیک و آنالیز توالی کل ژنوم های ویروسی، به هفت گروه شناخته شده ۱ تا ۷ طبقه بندی می گردند (٦).

هپاتیت سی در اثر استفاده از مواد مخدر، خون و تزریق داخل وریدی فرآورده های خونی و به طور کمتری توسط مقاربت جنسی، انتقال عمودی توسط مادران آلوده و کارکنان واحدهای بهداشتی در معرض، منتقل می شود (۷). پروتئین Core دارای سه بخش اصلی است. بخش اول (بخش هیدروفیلی) که دارای بار مثبت است، مربوط به اتصال RNA ویروس بوده و بسیاری از اعمال و فعالیت های زیستی و یا پاتوفیزیولوژیک این پروتئین توسط این بخش انجام می شود. همچنین حدود ۲۰ درصد از این بخش را ریشه های لیزین و آرژنین تشکیل می دهند. بخش دوم هیدروفوبیک است و توانایی اتصال به قطرات لیپید را دارد. بخش سوم نیز توسط پپتیدازهای سلولی از پروتئین جدا می شوند (۸). ژن کد کننده پروتئین هسته در ویروس *هپاتیت سی* علاوه بر پروتئین یاد شده، پروتئین دیگری در یک (چارچوب خوانش باز) ORF (open reading frame) جدید نیز تولید می کند. ترتیب قرار گرفتن نوکلئوتید ها در این پروتئین جدید نسبت به ORF پروتئین قبلی به صورت ۱+ تغییر می کند (Core+1 ORF). پروتئین جدید با نام های (Alternative Reading Frame Protein) ARFP، پروتئین F (Frame shift) یا Core+1 خوانده می شود که در شکل های متفاوتی وجود دارد (۹). سویه JFH1-HCV که سویه شاخص ژنوتیپ 2a (GT2a) است، نخستین بار از یک بیمار ژاپنی مبتلا به هپاتیت برق آسا به دست آمد. این سویه می تواند به طور موثر در سلول های Huh7 که در استقرار سیستم کشت سلولی HCV شرکت کردند تکثیر نماید (۱۰ و ۱۱). سیستم بیانی سلول های حشرات بر پایه *باکولوویروس* ها است (۱۲). به طور گسترده (AcMNPV) Autograph californica Multiple Nucleo polyhedro virus به عنوان یک وکتور بیان یوکاریوتی به منظور تولید پروتئین در سلول های حشرات مورد استفاده قرار می گیرد. این وکتور رایج ترین *باکولوویروس* مورد استفاده برای بیان ژن می باشد (۱۳ و ١٤). برخلاف سیستم های بیانی باکتریایی، سیستم پایه *باکولوویروس*، یک سیستم بیانی یوکاریوتی است. به همین دلیل از تغییر و تبدیل بسیاری از پروتئین ها، پردازش کردن و انتقال سیستم های حاضر در سلول های یوکاریوتی عالی استفاده می نماید. همچنین سیستم بیانی *باکولوویروس* به طور مستقل می تواند در مقادیر بالا در سلول های حشره در کشت های سوسپانسیون تکثیر شود که برای به دست آوردن مقادیر زیادی از پروتئین نوترکیب با سهولت نسبی آن را ممکن می سازد. در مقایسه با پروتئین های نا محلول که اغلب از باکتری ها به دست آمده، این پروتئین های بیش از حد تولید شده در سلول های حشرات، به صورت محلول باقی می مانند (۱۵). همچنین، سیستم بیانی *باکولوویروس* پپتید ها و پروتئین هایی را بیان می کند که از نظر تغییرات پسا ترجمه ای شبیه پروتئین های سلول پستانداران هستند (١٦). مزیت دیگر این سیستم، نبود آلودگی با اجزای باکتریایی مانند لیپو پلی ساکارید می باشد (۱۷). تولید پروتئین نوترکیب در سیستم *باکولوویروس* می تواند در تحقیقات تشخیصی آینده کمک کند. هدف از این مطالعه طراحی و ساخت وکتور *باکولوویروس* واجد توالی Core+1 *HCV*-2a (JFH1)، تولید *باکولوویروس* نوترکیب و تایید ترانسفکت آن در سلول های حشره و ارزیابی بیان این پروتئین در این سیستم بود.

مواد و روش ها

الف) کلون سازی مجدد ژن Core+1 درون ناقل وکتور pUC57 به وکتور انتقالی pFastBac-HTA در این مطالعه، از توالی کد کننده ژن Core+1، که به صورت تجاری توسط شرکت بیومتیکا

کانادا سنتز و کلون شده در وکتور pUC57 استفاده گردید. پلاسمید حاوی ژن سنتز شده توسط کیت یکتا تجهیز آزما (YTA Plasmid DNA Extraction Mini Kit, IRAN)، استخراج گردید. به منظور خروج ژن Core+1 از پلاسمید pUC57، هضم آنزیمی توسط آنزیم های برش دهنده NcoI و XbaI (فرمنتاز)، هر کدام به مقدار ۱/۵ میکرولیتر به واسطه استفاده از ۱۰ میکرولیتر پلاسمید استخراج شده و بافر تانگو (فرمنتاز) به مقدار ۲ میکرولیتر صورت گرفت. مخلوط یاد شده به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. در ادامه نمونه بر روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد و باند ژن مورد نظر بررسی و تایید گردید. در گام بعدی پلاسمید برای تکثیر به سویه DH5α باکتری *اشریشیا کلی* به روش شوک حرارتی ترانسفورم شد. شایان یادآوری است که به منظور مستعد سازی سلول باکتری یاد شده از بافر FB متشکل از (Mops, Glycerol, $Cacl_2.2H_2O$) KCL, با جذب نوری ۰/٤ در طول موج ٦۰۰ نانومتر استفاده گردید.پس از تکثیر و استخراج پلاسمید pUC57 حاوی ژن Core+1، ژن مورد نظر به وکتور انتقالی سیستم *باکولوویروسی* Bac-to-Bac یعنی وکتور pFastBac-HTA منتقل و کلون شد. در شکل ۱ وکتور مبدا و وکتور مقصد نشان داده شده است. به منظور استخراج پلاسمید pFastBac-HTA از کیت یکتا تجهیز آزما (YTA Plasmid DNA Extraction Mini Kit, IRAN) ناقل PFastBac-HTA استفاده شد. به منظور خطی شدن و ایجاد دو پایانه چسبنده در هر دو انتها، عمل هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم برش دهنده ی NcoI و XbaI و بافر تانگو هر کدام به مقدار ۲ میکرولیتر با همان غلظت ارائه شده در مطلب قبلی انجام شد. نمونه ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ °C قرار داده شدند. برای اطمینان از خطی شدن، نتیجه توسط الکتروفورز افقی بر روی ژل آگاروز یک درصد بررسی گردید. پلاسمید خطی شده توسط کیت کیاژن (QIAquick Gel Extraction kit, QIAgen, Germany) تخلیص شد. فرآیند لایگیشن (Ligation) با استفاده از ۱ میکروگرم ژن Core+1 (پس از هضم آنزیمی با NcoI و XbaI)، ۵۰۰ نانوگرم پلاسمید PFastBac-HTA (که توسط همان دو آنزیم برش و تخلیص شده)، ۱ میکرولیتر آنزیم T4 لیگاز (فرمنتاز)، ۲ میکرولیتر بافر T4 (فرمنتاز) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. مخلوط یاد شده به مدت ۱٦ ساعت در دمای ٤ °C قرار داده شد. ژن مورد نظر در جایگاه DNA پلاسمیدی، در پلاسمید pFastBac-HTA کلون گردید. ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال به سویه DH5α باکتری *E.coli* (مستعد شده مطابق آنچه در بالا یاد شد) منتقل گردید. پس از آن به منظور غربالگری، این باکتری ها بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر در دمای ۳۷ °C، کشت شبانه داده شدند. پس از رشد کلنی ها، چند کلنی مقاوم به آنتی بیوتیک آمپی سیلین انتخاب گردید و درون محیط LB مایع با همان رقت آنتی بیوتیکی کشت داده شد. نمونه ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شدند. در نهایت،



شکل ۱: وکتور مبدا و وکتور مقصد پس از همسانه سازی (۱۸).

استخراج پلاسمید با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما انجام پذیرفت (۱۹).

ب) تایید همسانه سازی ژن Core+1 در پلاسمید pFastBac-HTA: مقدار ۱۰ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب استخراج شده توسط آنزیم های برش دهنده ی Nco*I* هر کدام به میزان ۱ میکرولیتر به همراه بافر تانگو ۲ میکرولیتر (با همان غلظت های یاد شده در مطالب قبل) هضم شد. پس از ۹۰ دقیقه گرماگذاری در دمای ۳۷ °C، الکتروفورز بر روی ژل ۱ درصد انجام گرفت. همچنین پس از انجام واکنش تایید، تعیین توالی صورت گرفت تا وجود قطعه الحاقی مورد نظر تایید شود و از جهت گیری صحیح ژن در پلاسمید اطمینان حاصل شود که بدین منظور به شرکت ژن فناوران ارسال شد (۱۹).

ج) تولید بکمید نوترکیب: برای این منظور، ابتدا پس از استخراج وکتور pFastBac-HTA حاوی ژن Core+1 (در مقادیر یاد شده در بالا)، در باکتری *E. coli* DH10Bac ترانسفورم گردید تا به وسیله عمل ترانسپوزیشن ژن مربوطه درون بکمید قرار گیرد. DH10Bac شامل یک حامل شاتل *باکولوویروس* (بکمید) و یک پلاسمید کمکی می باشد. عمل ترانسپوزیشن به همان روش شوک حرارتی صورت گرفت. با این تفاوت که به جای یک ساعت، به مدت ٤ ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۷ °C قرار گرفت. متفاوت بودن این زمان در این قسمت، به دلیل شروع بیان ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک می باشد (۱۹).

د) غربالگری همسانه سازی و روش واکنش زنجیره ای پلی مراز تک کلنی (PCR-Clony): باکتری های ترانسفورم شده بر روی محیط LB آگار (Luria-Bertani medium Agar) حاوی آنتی بیوتیک های کانامایسین (غلظت ۵۰ µg/ml)، جنتامایسین (غلظت ٤۰ µg/ml) ، تتراسایکلین (غلظت ۱۰ µg/ml)، القاگر IPTG (غلظت ٤۰ µg/ml) (Invitrogen, USA)، کروموژن X-gal (غلظت ۵۰ µg/ml) (Invitrogen, USA) در دمای ۳۷ °C کشت داده شدند. از آنجایی که ژن هدف در بکمید موجب تخریب شدن اپرون LacZ می شود، بکمیدهای یاد شده به دلیل عدم فعالیت این ژن به رنگ سفید در می آیند. پس از ٤۸ ساعت چندین کلنی نوترکیب سفید رنگ انتخاب گردید. صحت آن با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز تک کلنی با محلول (Master Mix Red-Taq 2x, 1.5 mM $MgCl_2$, Ampliqon, ko) Master Mix Red، و پرایمرهای رفت 5′-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3′ و برگشتی: 5′-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3′ یونیورسال M13 (۱۹) تایید شدند. واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Authorized Thermal Cycler, Ependorf, Germany) و با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ 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 ۷ دقیقه انجام شد. پس از انجام این عمل، مقدار ۲۰µl از محصول بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. بکمید نوترکیب شده توسط کیت اینویتروژن (PureLink HighPure Plasmid DNA Miniprep Kit, Invitrogen, USA) استخراج و غلظت نمونه ها با نانودراپ (Nano drop 1000, Thermo scientific, USA) قرائت گردید (۱۹).

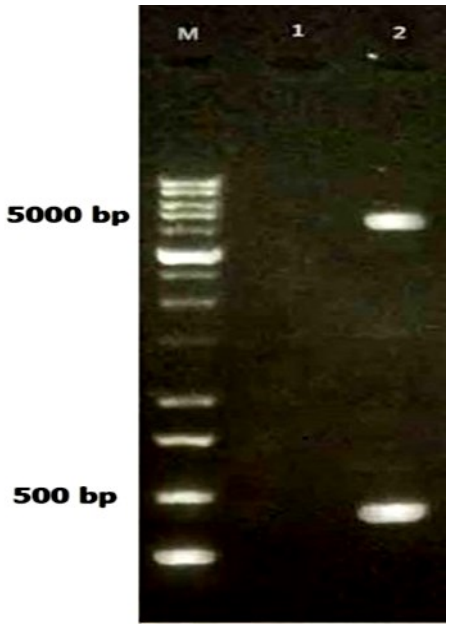
ه) کشت سلول و وارد کردن پلاسمید نوترکیب حاوی ژن Core+1 به درون سلول حشره Sf9: سلول های حشرات (Sf9) Spodoptera Frugipedra از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه و با استفاده از حامل لیپیدی کاتیونیک سلفکتین (Invitrogen, USA) ترانسفکت شدند. در این فرآیند ۸۰۰×۱۰^{۶} سلول جوان در فاز لگاریتمی (در پلیت کشت ٦ خانه ای) در محیط کشت گریس دارای مکمل (Grace's Insect Medium (1X) Supplemented, Gibco, life technologies, USA) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco, Invitrogen, USA) و ۱٪ آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین (Invitrogen, USA) در دمای

°C ۲۷ کشت داده شدند. پس از چسبیدن به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰ میلی لیتر محیط Plating، با مخلوط کردن ۱/۵ میلی لیتر محیط کشت سلول حشره گریس دارای مکمل و بدون آنتی بیوتیک و ۸/۵ میلی لیتر محیط کشت سلول حشره گریس بدون مکمل و بدون آنتی بیوتیک و بدون FBS آماده گردید. محیط کشت حاصل از مرحله اول دور ریخته شد و ۲/۵ میلی لیتر محیط کشت Plating حاصل در هر چاهک اضافه گردید. تشکیل کمپلکس با استفاده از تلفیق ۱۰ میکرولیتر سلفکتین و ۱ میکروگرم DNA بکمید، که هر کدام به طور جداگانه در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلول حشره گریس بدون مکمل و بدون آنتی بیوتیک و سرم رقیق شدند، صورت گرفت. پس از تلفیق این دو ترکیب رقیق شده، آنها به آرامی مخلوط گردیدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. مخلوط کمپلکس DNA–لیپید یا همان مخلوط ترانسفکشن (۲۱۰ میکرولیتر) قطره قطره به سلول اضافه و سلول ها در دمای °C ۲۷ به مدت ۵ ساعت نگهداری گردیدند. ۵ ساعت پس از عمل ترانسفکشن، مخلوط ترانسفکشن حذف شد و با ۲ میلی لیتر محیط کشت کامل، سلول حشره گریس دارای مکمل و ۱۰٪ FBS جایگزین گردید. در نهایت، سلول ها در دمای °C ۲۷ به مدت ۳ روز گرماگذاری شدند. سلول ها هر روز در مقایسه با سلول غیرآلوده مورد بررسی قرار گرفتند. برای افزایش تیتر ویروس به دست آمده، شش پاساژ متوالی نیز بر روی سلول های (Sf9) انجام پذیرفت. بدین صورت ذخیره ویروس نوترکیب با تیترهای مناسب به دست آمد و در °C ٤ نگهداری گردید (۱۹).

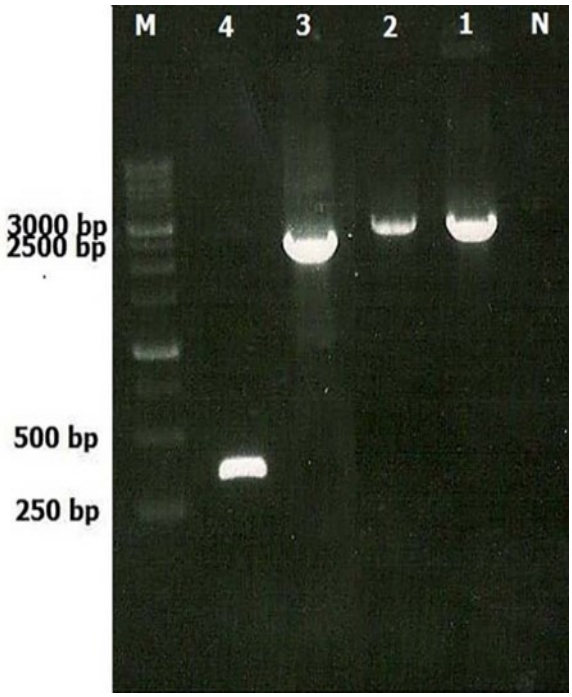
و) جمع آوری پروتئین: برای این منظور از فلاسک های بزرگتر (۷۵ میلی لیتری) حاوی سلول های (Sf9) با تراکم $۲×۱۰^{۶}$ برای آلوده ساختن با ویروس های نوترکیب با عیار TCID50 ۱۰۰۰ استفاده گردید. پس از ظهور اثرات سایتوپاتیک در روز سوم پس از آلوده کردن، سلول ها جمع آوری گردید. سلول ها با سه بار انجماد و ذوب در ازت مایع لیز شدند و با سانتریفیوژ مایع شفاف رویی از زایده های باقی مانده سلولی جداسازی گردید. پروتئین نوترکیب برای بیان پس از حرارت دیدن و مخلوط شدن با رنگ لودینگ به چاهک های ژل کوچک پلی آکریل آمید ۱۵ درصد منتقل و روش SDS-PAGE انجام پذیرفت. قسمتی از آن برای رنگ آمیزی با کوماسی بلو و بخش دوم برای وسترن بلات تر (Bio Rad, USA) به کاغذ نیتروسلولز منتقل گردید و با BSA (Bovin Serum Albumin) ۳ درصد بلوکه شد. پس از شستشو با TBS-T با حضور آنتی بادی اولیه 6x His-tag به نسبت ۱/۱۰۰۰۰ (Abcam, Ms mAb to 6X His Tag, 100µg (1mg/ml)) و آنتی بادی ثانویه αM IgG-HRP به نسبت ۱/۱۰۰۰۰ (Abcam, Ms mAb, 100µg) گرماگذاری گردید. در نهایت مشاهده باند پروتئین با استفاده از سوبسترای (Dio-amino benzidine) DAB انجام گرفت (۱۹).

یافته ها

در این مطالعه موفقیت کلون سازی ژن Core+1 در وکتور pFastBac پس از هضم آنزیمی با آنزیم های برش دهنده ی *Nco*I و *Xba*I، با مشاهده دو باند ٤٨٠٠ (مربوط به وکتور) و ٤٨٣ (مربوط به ژن مورد نظر) جفت بازی تأیید گردید (شکل ۲). همچنین در کنار تایید برش آنزیمی، تعیین توالی پلاسمید نوترکیب pFastBac-Core+1 تخلیص شده نیز نتیجه یاد شده را تایید نمود. برای اطمینان از تأیید انتقال صحیح ژن Core+1 از پلاسمید نوترکیب دهنده، به درون بکمید موجود در میزبان *E. coli* DH10Bac، واکنش زنجیره ای پلی مراز با پرایمرهای یونیورسال M13 بر روی بکمیدهای حاصل از استخراج کلنی های سفید انجام گردید (شکل ۳). آثار سایتوپاتیک به وجود آمده در اثر فعالیت تکثیری بکمید نوترکیب نشان از تکوین *باکولوویروس* های نوترکیب به دنبال ترانسفکت Sf9 با بکمید نوترکیب یاد شده داشتند. این آثار شامل افزایش قطر و اندازه هسته سلول، گرانوله شدن ظاهر سلول، توقف رشد و جدا شدن سلول ها از سطح فلاسک و در نهایت لیز سلول بودند (شکل ٤). جداسازی پروتئین برداشت شده از نمونه سلول های آلوده با *باکولوویروس* حاوی



شکل ۲: تایید وکتور pFastBac نوترکیب شده با ژن *HCV* (JFH1)-Core+1 توسط آنزیم های برش دهنده ی *Xba*I و *Nco*I. (M مارکر Kb ۱، ستون ۱) چاهک خالی، ستون ۲) نمونه تاییدی هضم شده با آنزیم های *Xba*I و *Nco*I و مشاهده باند ۴۸۰۰ جفت بازی وکتور و باند ۴۸۳ جفت بازی ژن مورد نظر.

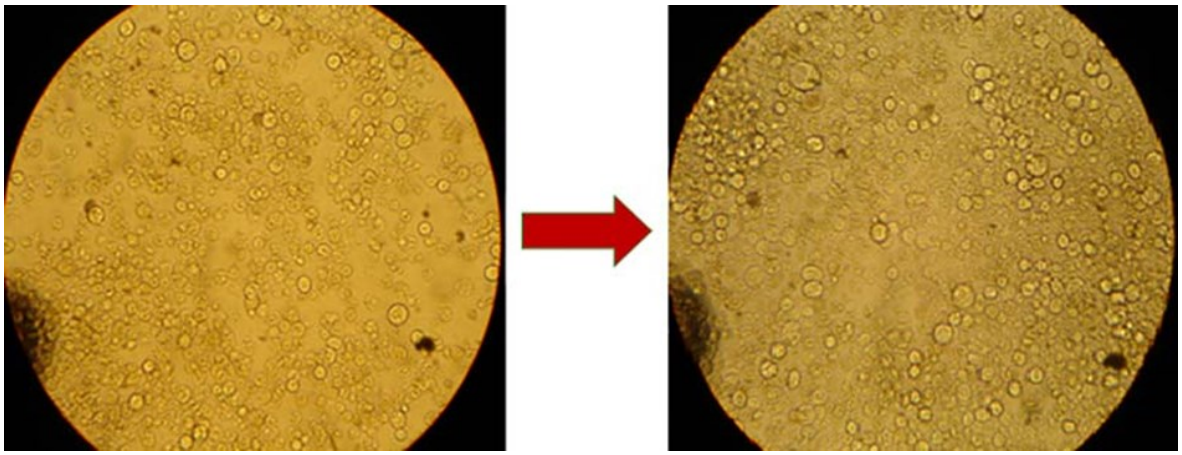


شکل ۳: تایید بکمید نوترکیب حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز. ستون N) کنترل منفی، ستون های ۱ و ۲) نمونه بکمید نوترکیب تایید شده با باند ۲۹۱۳ جفت بازی، ستون ۳) پلاسمید pFastBac خالی با باند ۲۴۳۰ جفت بازی، ستون ۴) بکمید خالی با باند ۳۰۰ جفت بازی، M) مارکر kb ۱.

ژن Core+1 و نمونه سلول غیر آلوده کنترل در کنار مارکر پروتئینی به وسیله SDS-PAGE انجام شد. تعیین هویت پروتئین بیان شده به صورت ایمونولوژیکی به روش وسترن بلات با آنتی بادی منوکلونال هیستیدینی 6x Histag صورت گرفت. وجود باند پروتئینی حدود ۱۷ کیلو دالتونی نشان دهنده بیان این پروتئین بود (شکل ۵).

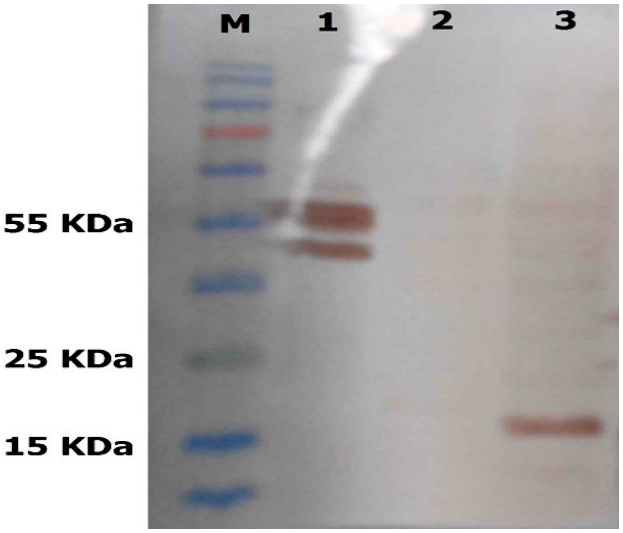
بحث

تا مدت ها ویروس *هپاتیت سی* در گروه Non A-Non B دسته بندی می شد. اما در سال ۱۹۸۹ به عنوان ویروس *هپاتیت سی* شناخته شد (۲۰). این ویروس یکی از عوامل مهم مرگ و میر در دنیا است که عوارضی مانند سیروز، فیبروز و سرطان کبد ایجاد می نماید (۲۱). پروتئین F ویروس *هپاتیت سی* تاکنون در سیستم بیانی *اشریشیا کلی* به دست آمده و در سنجش آنتی بادی F مورد استفاده قرار گرفته است. Core+1 یا پروتئین F، پروتئین جدید شناخته شده ویروس *هپاتیت سی* می باشد. توالی کد کننده آن با توالی پروتئین Core هم پوشانی دارد. بنابراین توسعه و تولید آنتی بادی منوکلونال اختصاصی که بتواند Core+1 را از پروتئین Core متمایز کند، به منظور استفاده در تشخیص و تحقیق ها حائز اهمیت می باشد. چندین مطالعه نشان داده اند که آنتی بادی های ضد Core+1 در برخی افراد مبتلا به *هپاتیت سی* وجود دارد. همچنین پاسخ ایمنی سلولی بر علیه این پروتئین نیز در بیماران گزارش شده است (۲۲). در مطالعه حاضر، ژن Core+1 ویروس *هپاتیت سی* برای نخستین بار در ناقل یوکاریوتی کلون و بیان گردید. پروتئین Core+1 *هپاتیت سی*، یک پروتئین ۱۷ کیلو دالتونی می باشد که در طول عفونت طبیعی توسط برخی از ریز تایپ های ویروس *هپاتیت سی* تولید شده و پاسخ های ایمنی اختصاصی (به خصوص ایمنی هومورال) را تحریک می نماید (۹). این پروتئین در حدود ۴۱ الی ۸۹ درصد از افراد آلوده به این ویروس بیان می شود (۹). پروتئین Core+1 در مطالعات قبلی در سیستم سلولی پستانداران نشان داده شده است. استفاده از سلول های حشرات به عنوان میزبان و سیستم *باکولوویروس*



شکل ۴: نمای میکروسکوپی لایه سلولیSf9. سمت چپ) سلول های Sf9 سالم و آلوده نشده، سمت راست) سلول های Sf9 آلوده با *باکولوویروس* نوترکیب.

به عنوان ناقل ژن های هدف از جمله سیستم هایی هستند که مزایای بیشتری نسبت به سیستم های قبلی دارند (۲۳). از آنجایی که سیستم بیانی *باکولوویروس* با انجام اصلاحات پس از ترجمه به بیان پروتئینی کاملاً مشابه پروتئین ویروسی که در طی عفونت فرد با ویروس ایجاد می شود منجر می گردد، این سیستم به سیستم بیانی باکتریایی مزیت دارد. برای انجام ترانسفکشن در سلول های یوکاریوتی روش های مختلفی



شکل ۵: تایید نهایی بیان پروتئین *HCV* (JFH1)-Core+1 در سیستم *باکولوویروس* با روش وسترن بلات. M) مارکر پروتئینی، ستون ۱) نمونه کنترل صحت انتقال نمونه ها در وسترن بلات، پروتئین VP1 مربوط به ویروس پولیوماویروس با وزن تقریبی حدود ۵۰ کیلو دالتون تهیه شده از بخش هپاتیت و ایدز انستیتوپاستور تهران، ستون ۳) پروتئین Core+1 بیان شده با باند حدود ۱۷ کیلو دالتون.

مانند استفاده از الکتروپوریشن، رسوب کلسیم فسفات، دکستران و لیپید های کاتیونی وجود دارد. لیپید های کاتیونی سلفکتین برای ترانسفکت کردن سلول های حشرات نسبت به روش های دیگر برتری داشته و آسان نیز می باشد.

رده های مختلف سلولی حشرات بدین منظور به کار می رود. با این وجود، سلول های Sf9 و Sf21 علاوه بر ترانسفکشن برای شناسایی پلاک های نوترکیب توصیه می گردد. هرچند پس از تولید *باکولوویروس* نوترکیب می توان از رده های دیگر مانند سلول های های فایو (High Five) یا Mimic Sf9 برای مطالعات بیان استفاده نمود (۲۳). در این مطالعه، بروز علایم آشکار آسیب شناختی سلولی در سلول های حشرات Sf9 نشان دهنده افزایش تیتر ویروس های عفونت زا و کارآیی مناسب فرآیند ترانسفکشن در این رده سلولی می باشد. تاکنون پروتئین های بسیاری در سیستم بیانی *باکولوویروس* به دست آمده است. اما در مورد ویروس *هپاتیت سی*، تنها پروتئین Core و گلیکوپروتئین های سطحی E1 و E2 بیان شده و مورد ارزیابی قرار گرفته اند. به طوری که در مطالعاتی که انجام شده، پردازش از (NS) پروتئین غیر ساختاری فرضی، P70 (NS3)، p4 (NS4A)، P27 (NS4B)، p56 (NS5A)/p58 و p66 (NS5B)، از نوع ژاپنی ویروس *هپاتیت سی* در سلول های حشرات با استفاده از یک سیستم بیان *باکولوویروس* تجزیه و تحلیل شده است (۲٤).

همچنین خواص ساختاری و آنتی ژن از نوع محلول باقی مانده

دومین خارجی (E2661) پروتئین پوشش E2 ویروس *هپاتیت سی* در مقادیر زیاد در یک سیستم سلول حشره *باکولوویروس* به دست آمده است (۲۵). علاوه بر این، گلیکوپروتئین های معروف پوشش ویروس *هپاتیت سی* (*HCV*)، E1 و E2، به عنوان پروتئین های ترشحی نوترکیب در سلول حشره Sf9 در عفونت با *باکولوویروس* نوترکیب نیز بیان شده است (۲۶). همچنین بیان پروتئین E1 ویروس *هپاتیت سی* (*HCV*) در فرم نوترکیب جدید را با استفاده از وکتور انتقال *باکولوویروس* به دنبال بیان پروتئین های متصل به پایانه–کربوکسی گلوتاتیون–S–ترانسفراز (GST) ارائه کرده اند (۲۷). در این پژوهش، پروتئین Core+1 برای نخستین بار در دنیا در سیستم *باکولوویروس* بیان شده است. در این مطالعه، بررسی امکان بیان ژن Core+1 ویروس *هپاتیت سی* سویه JFH1 (که این سویه به عنوان سویه مدل در تحقیقات بر روی این ویروس می باشد) در سیستم بیانی *باکولوویروس* و ترانسفکت آن در سلول حشره Sf9 بود که در نهایت این امر با موفقیت صورت گرفت.

نتیجه گیری

از آنجایی که نقش پروتئین Core+1 در بیماریزایی، پاسخ ایمونولوژیک و مقاومت به درمان بیماری *هپاتیت سی* کاملاً شناخته نشده است، تحقیق حاضر می تواند مقدمه ای برای تحقیقات بعدی در زمینه شناخت بیشتر پروتئین در به دست آوردن روشی برای تشخیص و پیش بینی پاسخ به درمان علیه این ویروس باشد. در این مطالعه، طراحی و ساخت وکتور *باکولوویروسی* واجد توالی Core+1 *ویروس هپاتیت سی* و تولید *باکولوویروس* نوترکیب برای نخستین بار در دنیا انجام شد و در نهایت منجر به تولید پروتئین مربوطه با ساختاری کاملاً مشابه پروتئینی که در حین عفونت طبیعی با ویروس در بدن فرد ساخته می شود خواهد شد. این امر می تواند پایه انجام مطالعات آینده باشد. در ادامه تحقیق، تولید وتخلیص بیشتر پروتئین های هدف در مقیاس و حجم بالاتر پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران بخش هپاتیت و ایدز به ویژه جناب آقای دکتر روح الله وهاب پور و همکاران آزمایشگاه تحقیقات آنفلوآنزا به ویژه سرکار خانم دکتر فاطمه فتوحی چاهوکی در انستیتو پاستور ایران به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Assarehzadegan MA, Shakerinejad Gh, Norouzirad R, Amini A. Distribution of *hepatitis* C virus genotypes among patients with *hepatitis* C infection in Khuzestan province. J Med Sci. 2009; 7(4): 471-478. [In Persian]
2. Khatibi M, Ahmadinejad Z, Nasiri-Toosi M, Hajibaygi B, Zahedipour H. Prevalence of oral lichen planus in *HCV* infected patients: the effective factors. Teh Univ Med J. 2008; 66(8): 585-589. [In Persian]
3. Vassilaki N, Mavromara P. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. IUBLB life. 2009; 61(7): 739-752.
4. Jones AM, Warken K, Tyring Sk. The cutaneous manifestations of viral hepatitis. Dermatol Clin. 2002; 20(2): 233-247.
5. Joyce MA, Tyrrell DLJ. The cell biology of *hepatitis* C virus. Microbes Infect. 2010; 12(4): 263-271.

6. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes, E. Global distribution and prevalence of *hepatitis* C virus genotypes. Hepatol. 2015; 61(1): 77-87.

7. Donald Jensen, Nancy Reau. *Hepatitis* C. Oxford American Infectious Disease Library; 2013: 15-21. Available from: https://books.google.com/books.

8. Aghasadeghi MR, Sadat SM, Amini S, Budkowska A, Roohvand F. Cloning, optimization of expression condition, purification and immunological characterization of hydrophilic section of *HCV* Core Ag, expressed in *E. coli* by -araBAD promotor. SJIBTO. 2006; 2(6): 223-231. [In Persian]

9. Noorbazargan H, Hashemi A, Motavali F, Aghasadeghi MR, Memarnejadian A, Assmar M, Roohvand F. A confocal-microscopic study on *HCV* core+1 protein expression. J Microb World. 2010; 2(4): 217-226. [In Persian]

10. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige k, Mizokami M, Wakita T. Efficient replication of the genotype 2a *hepatitis* C virus subgenomic replicon .Gastroenterol. 2003; 125 (6): 1808-1817.

11. Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, Nagayama K, Tanaka T, Wakita T. Sequence analysis of *hepatitis* C virus isolated from a fulminant *hepatitis* patient. J Med Virol. 2001; 64(3): 334-339.

12. Brown TA. Gene cloning and DNA analysis. 6nd ed. Translated by Tabatabi yazdi M, Zarrini GH, Sepehri zadeh Z, Ghasemian A, Hemat A. Tehran. Biology home publication; 2010. [In Persian]

13. Wang X, Li L, Ding S, Huang X, Zhang J, Yin J, Zhong J. Chicken HS4 insulator significantly improves *baculovirus*-mediated foreign gene expression in insect cells by modifying the structure of neighbouring chromatin in virus mini-chromosome. J Biotechnol. 2009; 142(3-4): 193-199.

14. Guide to *Baculovirus* expression vector systems (BEVS) and insect cell culture techniques. Invitrogen by life technologies. Available from: https://tools.lifetechnologies.com/ content/sfs/manuals/ bevtest.pdf

15. Murphy CI, Piwnica-Worms H, Grünwald S, Romanow WG, Francis N, Fan HY. Expression and purification of recombinant proteins using the *Baculovirus* system. Curr Protoc Mol Biol. 2004; 16: 11.

16. Patterson RM, Selkirk JK, Merrick BA. *Baculovirus* and insect cell gene expression: review of *baculovirus* biotechnology. Environ Health Perspect. 1995; 103(7-8): 756-759.

17. Hervas-Stubbs S, Rueda P, Lopez L, Leclerc C. Insect Baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. J Immunol. 2007; 178(4): 2361-2369.

18. Addgene. Available from: https://www.addgene.org.

19. Bac-to-Bac® Baculovirus expression system. Invitrogen by life technologies. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf.

20. Rabiei M, Mohtasham Amiri Z. Prevalence of *Lichen planus* in *HCV* infected patients of

Gilan province 2002. Shahid Beheshti Med Sci Univ J Dental School. 2003; 21(2): 193-200.

21. Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- α)- mediated apoptosis by *Hepatitis* C virus core protein. J Biol Chem. 1998; 273(4): 2256-2259.

22. Baghbani-arani F, Roohvand F, Aghasadeghi MR, Sadat S M, Motevalli F, Memarnejadian, Amini S. Study the capacity of recombinant *HCV* Core+1 protein to induce immune responses in combination with different adjuvants. J Army Univ Med Sci. 2012; 10(1): 1-9. [In Persian]

23. Behzadian F, Goodarzi Z, Saberfar E. Construction of a new recombinant *Baculovirus* encoding HA, Na, and M1 proteins of swine influenza (H1N1) virus and its expression in insect cells. AMUJ. 2013; 15(67): 16-25. [In Persian]

24. Hirowatari Y, Hijikata M, Tanji Y, Shimotohno K. Expression and processing of putative nonstructural proteins of *Hepatitis* C virus in insect cells using *Baculovirus* vector. Virus Res. 1995; 35(1): 43-61.

25. Rodríguez-Rodrígueza M, Tello D, Yélamos B, Gomez-Gutierrez J, Pacheco B, Ortega S, Serrano A G, Peterson D L, Gavilanes F. Structural properties of the ectodomain of *Hepatitis* C virus E2 envelope protein. Virus Res. 2009; 139(1): 91-99.

26. Hussy P, Faust H, Wagner J-C, Schmid G, Mous J, Jacobsen H. Evaluation of *Hepatitis* C virus envelope proteins expressed in *E. coli* and insect cells for use as tools for antibody screening. J Hepatol. 1997; 26(6): 1179-1186.

27. Ciccaglione AR, Marcantonio C, Equestre M, Jones IM, Rapicetta M. Secretion and purification of *HCV* E1 protein forms as glutathione-S-transferase fusion in the *Baculovirus* insect cell system. Virus Res. 1998; 55(2): 157-165.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 2, June 2016

Original Article

Transfection of Sf9 insect cells by recombinant *Baculovirus* containing Core+1 gene of *HCV* JFH1 genotype 2a in order to express Core+1 protein

Farideh Sadat Sajadian Fard[1], Pooneh Rahimi[2]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Medical Virology Group, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Recently, a new protein, named Core+1, has been reported to be expressed through a +1 ribosomal frame shift in the Core protein coding region of *Hepatitis C* virus. The purpose of this study was to design a recombinant *Baculovirus* vector containing *HCV*-2a (JFH1) Core+1 sequence, and also, to verify the production of this recombinant Core+1 protein in *Baculovirus* expression system.

Materials & Methods: Core+1 gene of *HCV*-2a (JFH1) was synthesized into pUC57 plasmid. The synthesized target gene was sub-cloned into the plasmid pFastBac-HTA. The recombinant vector was used to transform the competent *E. coli* DH10Bac containing the donor clone. The recombinant *Baculovirus* bacmid was produced following transposition. Recombinant bacmid was verified by PCR and then was transfected into Sf9 insect cells to package a new recombinant *Baculovirus*. SDS-PAGE and Western blotting was used to confirm the expression of Core+1 protein in insect cells.

Results: Sequence analysis and white-blue colony selection confirmed a successful cloning of the Core+1 sequence of *HCV* (JFH1) into the pFastBac-HTA vector and transformation of *E. coli* DH10Bac. Production of recombinant *Baculovirus*. The *HCV*-2a (JFH1) Core+1 protein was successfully expressed and confirmed in SDS-PAGE and Western blot.

Conclusions: *Baculovirus* expression system provides a high yield post-translational modification tool for *HCV* Core+1 protein expression, which is similar to Core+1 protein produced during natural infection with *HCV*.

Keywords: *Hepatitis C* virus, Protein Core +1, JFH1 strain, Insect cells (Sf9), *Baculovirus* expression system.

Correspondence to: Pooneh Rahimi
Tel: +98 2166969291
E-mail: prahimi@pasteur.ac.ir
Journal of Microbial World 2016, 9(2): 85-95.