مقاله پژوهشی

همسانه سازی، بهینه سازی شرایط بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3 ویروس HIV-1 در سیستم بیانی پروکاریوتی

نویسندگان:

احمد فقیه [۱]، سید مهدی سادات [۲*]، اعظم بوالحسنی [۳]، شیوا ایرانی [۴]

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- دانشیار ژنتیک مولکولی، بخش هپاتیت، ایدز و ویروس های منتقله از خون، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- دانشیار بیوشیمی بالینی، بخش هپاتیت، ایدز و ویروس های منتقله از خون، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- دانشیار ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.2, Summer 2019

چکیده:

مقدمه: پروتئین تنظیمی Nef و همچنین پروتئین‌های ساختاری مانند MPER و V3 ویروس HIV-1 از اهداف مهم در مطالعات واکسن به شمار می‌روند. از این رو در مطالعه حاضر، پروتئین فیوژن Nef-MPER-V3 در سیستم بیانی پروکاریوتی کلون و بیان شد تا به عنوان کاندید مناسب در مطالعات آتی واکسن مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش کار: توالی ژن Nef-MPER-V3 سنتز و توسط آنزیم‌های NotI /HindIII به داخل وکتور pET-28a الحاق شد. سپس، بیان پروتئین نوترکیب در سیستم بیانی BL21(DE3) انجام شد. به منظور بهینه سازی بیان، فاکتورهایی نظیر زمان القاء، غلظت IPTG و دانسیته نوری (OD) مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA agarose تخلیص و با استفاده از SDS-PAGE 12% ارزیابی شد و نهایتاً، توسط وسترن بلات تایید شد.

یافته‌ها: ژن هدف با موفقیت در وکتور بیانی کلون شد. بهترین شرایط بیان شامل: IPTG ۲ میلی مولار، کدورت نوری OD600nm=۰/۷ و رشد بمدت پنج ساعت پس از القاء تعیین شد. پروتئین نوترکیب بوسیله کروماتوگرافی تمایلی تحت شرایط دناتوره و با استفاده از اوره با غلظت حدود ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تخلیص شد. پروتئین فیوژن تخلیص شده به صورت یک باند واضح حدود ۳۵ کیلودالتون در SDS-PAGE مشاهده و با استفاده از آنتی بادی ضد Nef در وسترن بلات آشکار شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که پروتئین نوترکیب NEF-MPER-V3 در سیستم بیانی BL21 (DE3) بخوبی بیان شده و پروتئین تخلیص شده قابلیت استفاده در آزمایش های آتی به منظور ارزیابی ایمنوژنسیتی آن در موش که در حال انجام می باشد را دارد.

واژگان کلیدی: HIV-1 ، Nef-MPER-V3، کروماتوگرافی تمایلی، پروتئین نوترکیب، بیان ژن

Pars J Med Sci 2019;17(2):46-53

مقدمه:

ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان (HIV-1) عضوی از خانواده رتروویروس ها است. میزبان این ویروس انواع مختلفی از سلول‌ها از قبیل لنفوسیت های محیطی، ماکروفاژها و دیگر سلول‌های CD4+ را شامل می شود. ویروس HIV-1 با نقص عملکرد سیستم ایمنی همراه می‌شود و مسئول برای عفونت‌های فرصت‌طلب است که در بیماری ایدز ایجاد می‌شود. ایدز به عنوان همه‌گیری جهانی شناخته می‌شود که در حال حاضر حوزه شیوع آن بسیار وسیع و در حال گسترش است[۱]. سازمان بهداشت جهانی تعداد مبتلایان را از ابتدا تا انتهای سال ۲۰۱۸، در حدود ۳۶/۹ میلیون نفر در سراسر جهان اعلام کرده که تنها در سال ۲۰۱۸ تعداد ۱/۷ میلیون نفر به تازگی به این عفونت مبتلا شده‌اند[۲]. با پیشرفت سطح بهداشت جهانی و آگاهی عمومی، روند شیوع و گسترش

* نویسنده مسئول، نشانی: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت، ایدز و ویروس های منتقله از خون .
تلفن تماس: ۰۲۱-۶۶۹۶۹۲۹۱ پست الکترونیک:Mehdi_sadat@pasteur.ac.ir
دریافت: ۱۳۹۸/۶/۱۶ اصلاح: ۱۳۹۸ /۷/۲۹ پذیرش:۱۳۹۸/۷/۳۰

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-07]
[DOI: 10.52547/jmj.17.2.46]

این ویروس در سال‌های اخیر کاهش داشته است، اما با وجود پژوهش‌های انجام شده همچنان درمان قطعی برای عفونت HIV وجود ندارد. با این حال با استفاده از داروهای ضد رتروویروسی (ARV) نظیر آنالوگ‌های نوکلئوزیدی و نوکلئوتیدی، مهار کننده‌های غیر نوکلئوزیدی‌ترانس‌کریپتاز معکوس و مهار کننده‌های پروتئازی می‌توان از سرعت پیشرفت ویروس جلوگیری کرد تا طول عمر افراد آلوده طولانی‌تر شود[۳]. طراحی و توسعه واکسن به خصوص در دهه‌های اخیر مورد توجه بسیاری از پژوهشگران بوده است. از این رو شناخت سازوکارهایی که باعث ایجاد پاسخ ایمنی سلولی شدیدتر و طولانی علیه ویروس می‌شوند از اهمیت زیادی برخوردار است. امروزه با به کارگیری روش‌های جدید و ایجاد پاسخ ایمنی علیه ژن‌ها و پروتئین‌های ویروس که خاصیت آنتی ژنسیته بالایی دارند امید است بتوان در طراحی واکسن گام های مهمی برداشت. از بین انواع مختلف واکسن های طراحی شده در مقابل عفونت‌های HIV، پروتئین واکسن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار هستند[۴].

ژن Env یکی از ژن‌های ساختاری ویروس است که محصول آن توسط پروتئاز سلول میزبان به دو زیر واحد gp41 و gp120 شکسته شده و گلیکوپروتئین‌های پوششی ویروس را تشکیل می‌دهد. با بررسی توالی اسیدآمینه‌های gp120 مشخص شده است که در این گلیکوپروتئین پنج ناحیه ثابت (C1-C5) و پنج ناحیه متغیر (V1-V5) وجود دارد که هر دو این مناطق به شدت گلیکوزیله هستند. در واقع همین عامل سبب فرار ویروس از سیستم ایمنی می‌شود[۵-۶]. ناحیه MPER (Membranc Proximal External Region)از پروتئین gp41 یک گلیکوپروتئین درون غشایی و پروتئین gp120 گلیکوپروتئین سطحی پوشش ویروس است[۷]. داربست‌های گلیکوپروتئینی پوشش HIV (gp120) توسط ناحیه آب گریز gp41 به غشای ویروسی متصل شده که ناحیه‌ای محافظت شده است. وجود ناحیه MPER (gp41) برای آلوده کردن سلول‌های میزبان ضروری است[۸].

یکی از اصلی‌ترین مشکلات در طراحی واکسن و درمان HIV وجود تنوع ژنتیکی این ویروس است[۹]. میزان بالای اشتباه در آنزیم Reverse transcriptase سبب شده تا ویروس در ناحیه‌های متعددی از ژنوم با ایجاد جهش‌های تک نوکلئوتیدی شکل‌های گوناگونی از ویروس را ایجاد کند که بیشترین انشعابات در ژن Env قرار دارد که باعث فرار ویروس از سیستم ایمنی می‌شود. پاسخ‌های شدید سیستم ایمنی نسبت به محصول ژن Env و توالی‌های حفاظت شده این ژن در انتخاب آن در مطالعات واکسن نقش مهمی دارد[۷ و۱۰].

در آغاز عفونت، مولکول CD4 سطح سلول‌های ایمنی به پروتئین gp120 ویروس HIV به شکل غیر کوالان متصل می‌شود که به کمک پروتئین CXCR4 وCCR5 (کورسپتور HIV1) به همراه مولکول CD4 با ایجاد تغییراتی در پوشش ویروس ، پپتید gp41 را فعال کرده و باعث ادغام پوشش ویروس و غشای سیتوپلاسمی سلول میزبان می‌شود[۱۱-۱۳]. اتصال ویروس به رسپتورهای پروتئینی سطح سلول‌های ایمنی توسط ناحیه لوپ V3 صورت می‌گیرد که یکی از پنج ناحیه متغیر gp120 است و نقش مهمی در عفونت ویروس ایفا می‌کند[۱۴]. پروتئین MPER و ناحیه V3 هدف طیف وسیعی از آنتی بادی های خنثی کننده است و به عنوان آنتی ژن توسط سلول‌های ایمنی شناسایی می‌شوند و به همین دلیل در مطالعات واکسن مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند[۸]. پروتئین Nef نیز یکی دیگر از کاندیدهای مطالعات واکسن است. این پروتئین ۲۷ کیلودالتونی و سیتوپلاسمی است که در چرخه تکثیر و پیشرفت بیماری ایدز نقش اساسی دارد. اپی‌توپ‌های حفاظت شده متعدد آن توسط لنفوسیت‌های B و T شناسایی می‌شوند ودر افراد آلوده پاسخ‌های ایمنی قدرتمندی ایجاد می‌کند[۷]. بر اساس پژوهش‌های انجام شده روی میمون‌ها، برای رسیدن به سطح بالای ویروس و ایجاد بیماری ایدز عملکرد ژن nef سالم نقش مهمی در این فرایند دارد. در مراحل اولیه عفونت HIV میزان بالایی از پروتئین nef به همراه پروتئین های Tat و Rev تولید می شود. پروتئین nef با کم کردن میزان بیان مولکول‌های سطح سلول میزبان (MHC I ، MHC II ، CD4 ، CD28) به ویروس کمک می کند تا از لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک فرار کرده و با مهار سیگنال‌های آپوپتوز خارج و داخل سلولی باعث بقای ویروس در سلول‌های عفونی شود [۱۵و۱۶]. با توجه به اهمیت پروتئین‌های ذکر شده در القای پاسخ ایمنی در عفونت HIV ، به نظر می‌رسد پروتئین فیوژن Nef-MPER-V3 بتواند با ایجاد ایمنی هومورال و ایمنی سلولی نقش مهمی در مهار HIV ایفا کند. از این رو، در این پژوهش به عنوان اولین گام به منظور استفاده از پروتئین فیوژن Nef-MPER-V3 در طراحی واکسن، کلونینگ و بیان پروتئین Nef-MPER-V3 در سیستم بیانی پروکاریوتی به منظور دستیابی به میزان بالای پروتئین انجام شد.

روش کار:

ساب کلونینگ ژن Nef-MPER-V3 در پلاسمید پروکاریوتی pET-28a

به منظور فراهم کردن قطعه فیوژن Nef-MPER-V3، از روی پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه ژن Nef-MPER-V3 در باکتری DH5α (موجود در بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران)، تحت تاثیر آنزیم‌های محدودالاثر NotI /HindIII (فرمنتاز) قرار گرفت و بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و باندهای

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-07]
[DOI: 10.52547/jmj.17.2.46]

مربوطه بر روی دستگاه ترانس لومیناتور مورد ارزیابی قرار گرفت. قطعه DNA مورد نظر از ژل آگارز جدا و فرایند خالص سازی طبق پروتکل استخراج ژن از ژل (یکتا تجهیز) انجام شد. قطعه DNA مورد نظر و پلاسمید pET-28a هم زمان با دو آنزیم محدودالاثر مذکور برش داده شدند و پس از استخراج از ژل محصولات هضم شد، ژن Nef-MPER-V3 با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز در پلاسمید pET-28a الحاق شد. در مرحله بعد، ترانسفورماسیون باکتری اشرشیاکلی سویه DH5α توسط پلاسمید نوترکیب انجام شد. محیط کشت آگار جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به منظور غربالگری باکتری‌های ترانسفرم شده استفاده شد. کلونی‌های رشد یافته برای مرحله استخراج DNA پلاسمیدی و در پی آن هضم آنزیمی به منظور تایید پلاسمید نوترکیب به کار برده شدند. پس از تایید، جهت بیان ژن، ترانسفورماسیون باکتری اشرشیاکلی در سویه BL21(DE3) توسط پلاسمید نوترکیب Nef-MPER-V3 انجام شد.

بیان پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3

کلونی‌های رشد یافته باکتری BL21 حاوی پلاسمید نوترکیب در ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع (LB) حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری‌های کشت داده شده به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع TY2X منتقل شد و در انکوباتور شیکردار تحت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا جذب نوری محیط کشت حاوی باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۷ رسید. سپس، ۵۰ میکرولیتر IPTG (یک میلی مولار) برای القای بیان پروتئین به محیط کشت اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت انکوبه و سپس رسوب گیری انجام شد. در نهایت، آنالیز SDS-PAGE و وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی Anti-NEF (Abcam,USA) به منظور تایید بیان اختصاصی پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3 انجام شد. به طور خلاصه، پس از انتقال پروتئین‌های باکتریایی از ژل ۱۲/۵ درصد SDS-PAGE به غشای نیتروسلولزی، پروتئین نوترکیب توسط آنتی‌بادی اختصاصی Anti-NEF (۱:۱۰۰۰) و پس از آن با آنتی‌بادی ثانویه Goat anti- mouse IgG-HRP conjugate (Sigma ۱:۱۰۰۰۰) تعیین هویت شد و برای آشکار سازی باند پروتئینی مورد نظر روی کاغذ نیتروسلولزی از سوسبترای پراکسیداز دی آمینو بنزیدین (Sigma ,DAB) استفاده شد.

به منظور بهینه سازی بیان پروتئین، در زمان های متفاوت غلظت پروتئین تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های برداشت شده قبل و بعد از القا در زمان‌های یک تا پنج ساعت و شبانه ارزیابی شدند. در جهت بهبود هرچه بیشتر بیان پروتئین، دانسیته نوری باکتری بیانی در کدورت ۰/۴ الی ۱ در هنگام القای بیان و غلظت‌های مختلف IPTG(غلظت‌های ۰/۵ الی ۲/۵ میلی‌مولار) مورد بررسی قرار گرفت.

تخلیص پروتئین Nef-MPER-V3 با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی تحت شرایط دناتوره شدن

تخلیص پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3 ویروس HIV-1 تحت شرایط دناتوره شدن (Denature Condition) با استفاده از رزین Ni-NTA agarose صورت گرفت. رسوب باکتری حامل پلاسمیدpET-28a-Nef-MPER-V3 پس از القاء با IPTG در ۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده B (حاوی اوره ۸ مولار) حل شد و به مدت یک ساعت بر روی شیکر قرار گرفت سپس به منظور متلاشی کردن سلول‌ها و از هم گسیختگی دیواره باکتری ،محلول فوق سونیکیت گردید. سونیکیت کردن به مدت ۲۰ دقیقه با فواصل استراحت ۳۰ ثانیه، انجام شد. سپس سانتریفوژ در ۱۲۵۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انجام گرفته و مایع رویی به لولهٔ جدیدی منتقل و رزین Ni – NTA agarose به آن افزوده و به مدت یک ساعت روی راکر به همراه تکان های آرام قرار داده شد. پس از این مدت، مخلوط فوق به ستون تخلیص منتقل شده و پس از عبور مایع و جمع‌آوری flow-through، ستون سه بار با ۳ میلی لیتر از بافر B شستشو داده شد. در نهایت ۴ بار و هر بار ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر الوشن D و همین مقدار با بافر الوشن E از ستون عبور داده شده و جمع آوری شد تا برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گیرد. پس از فرایند تخلیص و دیالیز، پروتئین های خالص شده با استفاده از روش برادفورد تعیین غلظت شدند. مراحل تخلیص با ستون بر طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن) انجام گرفت.

یافته‌ها:

ساب کلونینگ ژن Nef-MPER-V3 در پلاسمید pET-28a

به منظور تهیه پلاسمید نوترکیب pET- Nef-MPER-V3، ابتدا ژن فیوژن Nef-MPER-V3 با طول ۸۵۰ جفت باز از پلاسمید نوترکیب حامل ژن هدف موجود در بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران به درون پلاسمید جدید pET28a ساب کلون شد. هضم آنزیمی ژن Nef-MPER-V3 و پلاسمید pET28 توسط آنزیم‌های HindIII وNotI انجام شد. حضور باند اختصاصی ژن Nef-MPER-V3در داخل ژل الکتروفورز به همراه سایز پلاسمیدی وکتور در اثر هضم آنزیمی تاییدی بر صحت انجام ساب کلونیگ می باشد (شکل۱).

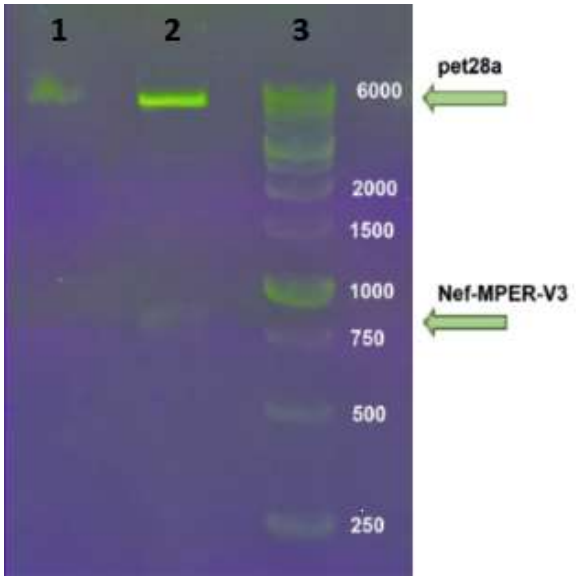
[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-07]
[DOI: 10.52547/jmj.17.2.46]

آنالیز بیان پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3 توسط تکنیک های SDS-PAGE و Western Blot

پس از کلونینگ ژن Nef-MPER-V3 در پلاسمید pET-28a، پنج کلون جهت بیان ژن Nef-MPER-V3 مورد بررسی قرار گرفت. پس از القای بیان توسط ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG)، نتایج الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE نشان داد که پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3 در شرایط بهینه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در زمان های ۴و ۵ ساعت پس از القا، بیشترین بیان پروتئین را دارد. همچنین با در نظر گرفتن دیگر فاکتورها در بهینه سازی بیان پروتئین، بهترین شرایط بیان با غلظت ۲ میلی مولار IPTG درکدورت نوری D600nm:۰/۷ در نظر گرفته شد (شکل ۲). آنالیز وسترن بلات توسط آنتی بادی اختصاصی Anti-NEF و حضور باند ۳۵ کیلودالتونی مربوط به پروتئین مورد نظر نیز هویت این پروتئین را تایید کرد (شکل ۳).

تخلیص پروتئین NEF-MPER-V3

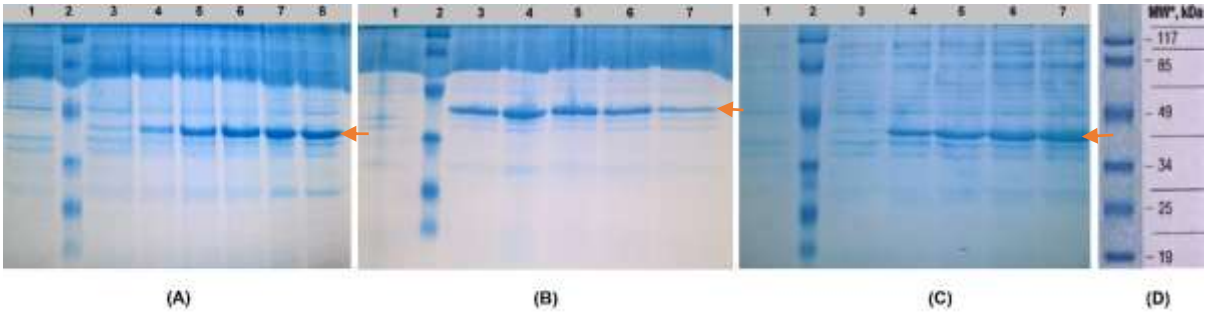
تخلیص پروتئین Nef-MPER-V3 با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی به روش دناتوره انجام شد. لیزات عبورداده شده از ستون، نمونه شستشو و نمونه های تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. همان گونه که در شکل شماره ۲ مشاهد می شود وجود باند آشکار تخلیص شده ۳۵ کیلودالتونی مربوط به پروتئین فیوژن Nef-MPER-V3 روی ژل، تخلیص پروتئین مورد نظر را دیده می شود. در این مطالعه برای اندازه گیری میزان پروتئین از روش برادفورد استفاده شد و غلظت نهایی پروتئین مورد نظر معادل ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر برآورد شد.



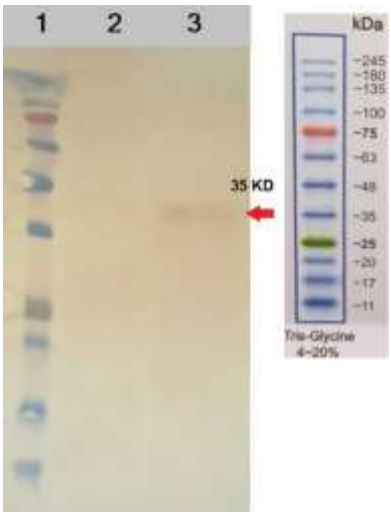
شکل ۱: تایید کلون های حاوی پلاسمید pET-28a-Nef-MPER-V3 با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم های *NotI / HindIII*. مشاهده باند 850 bp مربوط به ژن Nef-MPER-V3 و 5400 bp مربوط به پلاسمید pET-28a : ستون ۱ : پلاسمید pET-28a بدون ژن هدف که تحت تاثیر آنزیم قرار نگرفته است؛ ستون ۲ : هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET-28a-Nef-MPER-V3و مشاهده دو باند مربوط به پلاسمید و قطعه؛ ستون ۳: مارکر (1 kb، فرمنتاز).

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-07]

[DOI: 10.52547/jmj.17.2.46]



شکل ۲: A) آنالیز SDS-PAGE به منظور تعیین بهترین زمان برای تولید پروتئین Nef-MPER-V3 در باکتری BL-21: ستون ۱: نمونه القا نشده, ستون ۲: مارکر(KDa ۱۱۷ –۱۹)؛ ستون های ۳ تا ۷ به ترتیب زمان های یک تا پنج ساعت پس از القای بیان را نشان می دهد؛ ستون ۸: نمونه القا شده شبانه؛ B) آنالیز SDS-PAGE به منظور تعیین بهترین OD: ستون ۱: نمونه القا نشده؛ ستون ۲: مارکر(KDa ۱۱۷ –۱۹)؛ ستون های ۳ تا ۷ به ترتیب القای بیان در OD های ۱ ، ۰/۸ ، ۰/۷ ، ۰/۶ و ۰/۴ را نشان می دهد؛ C) آنالیز SDS-PAGE به منظور تعیین بهترین غلظت IPTG: ستون ۱: نمونه القا نشده, ستون ۲: مارکر(KDa ۱۱۷ –۱۹)؛ ستون های ۳ تا ۷ به ترتیب القای بیان در غلظت های ۰/۵ ، ۱ ، ۱/۵ ، ۲ و ۲/۵ را نشان می دهد. D) مارکر(KDa ۱۱۷ –۱۹).



شکل ۳: آنالیز وسترن بلات: ستون ۱: مارکر(KDa ۲۴۵ –۱۱)؛ ستون ۲: نمونه لیزات باکتری قبل از القای بیان پروتئین؛ ستون ۳: نمونه لیزلت باکتری پس از القای بیان پروتئین.(Abcam,USA)

بحث:

طراحی و توسعه واکسن ها به خصوص در دهه‌های اخیر پیشرفت چشمگیری را در مقابله با بیماری های عفونی داشته و شاخه ایی جدید در علم برای مطالعه واکسن ها فراهم آورده است. با وجود پیشرفت‌های حاصل، طراحی واکسن علیه عوامل پاتوژنی نظیر مالاریا و به خصوص عفونت HIV-1، با موفقیت قابل توجهی همراه نبوده است[۱۷]. شناخت سازوکارهایی که باعث تحریک واکنش‌های ایمنی سلولی طولانی مدت در برابر این عامل پاتوژن می‌شوند می‌تواند اهمیت شایانی داشته باشد. توانایی یک واکسن مؤثر را می‌توان در میزان القاء در پاسخ ایمنی سلولی و هومورال دانست. از این رو پژوهشگران بر این باورند تا با به کارگیری از روش‌های نوین و ایجاد پاسخ ایمنی علیه ژن های این ویروس پیشبردی در این امر حاصل شود[۴].

پروتئین‌های ساختاری و تنظیمی ویروس HIV از اصلی ترین اجزاء آلوده سازی ویروس هستند که از اهداف مهم در مطالعات واکسن بشمار می‌روند. پروتئین Nef با داشتن چندین اپی توپ برای گیرنده های HLA کلاس یک و متعاقب آن القاء پاسخ CTL و سلول‌های CD4 ازجمله مزیت های این پروتئین برای استفاده از آن به عنوان آنتی ژن در طراحی واکسن می‌باشد[۱۸]. ناحیه MPER و همچنین ناحیه V3 نیز هدف طیف وسیعی از آنتی بادی‌های خنثی‌کننده هستندو به عنوان آنتی ژن توسط سلول‌های ایمنی شناسایی می‌شوند[۱۹]. از این رو در مطالعات واکسن به عنوان یک انتی‌ژن ایده آل مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته اند. تلاش های صورت گرفته در راستای طراحی واکسن‌هایی با هدف قرار دادن MPER، منجر به تولید آنتی

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-07]
[DOI: 10.52547/jmj.17.2.46]

بادی‌های خنثی‌کننده با قدرت بالا اهمیت خلق راه کارهای نوینی برای افزایش کارایی واکسن‌هایی بر پایه این پروتئین و پروتئین های مشابه را دو چندان می‌کند[۸]. با توجه به اهمیت پروتئین های ذکر شده در این پژوهش در القای پاسخ ایمنی در عفونت HIV، به نظر می‌رسد پروتئین فیوژن Nef-MPER-V3 بتواند با ایجاد پاسخ ایمنی نقش مهمی در پژوهش‌های آتی مطالعات واکسن علیه HIV ایفا کند. به همین منظور بیان و تخلیص پروتئین فیوژن نوترکیب Nef-MPER-V3 در سیستم بیان باکتریایی انجام شد. ترانسفورماسیون سلول‌ها و ارزیابی بیان ژن‌ها کاری چالش برانگیز می‌باشد. از این رو انتخاب پلاسمید، رده سلولی و سیستم انتقالی مناسب می‌تواند در افزایش بهره وری ترانسفورماسیون نقش مهمی ایفا کند. طراحی و انتخاب وکتور مناسب می تواند در افزایش بیان ژن نیز مؤثر باشد. بنابراین یکی از مهم‌ترین جنبه قابل توجه که در طراحی پلاسمیدها باید در نظر گرفته شود پروموتر مناسب است. پروموترهای ویروسی نظیر T7 جهت بیان پروتئین‌ها در رده سلولی پروکاریوتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله پلاسمیدهایی که بدین منظور مورد استفاده قرار می‌گیرند، پلاسمید pET-28-a می باشد که با داشتن این نوع پروموتر ، مورد نظر بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است[۲۰]. در مطالعه حاضر ساختارهای کدکننده پروتئین های Nef، MPER وV3 در پلاسمید بیان پروکاریوتی pET-28a ساب کلون شد. سپس بیان آن ها در سویه بیانی BL-21 که با استفاده از شوک حرارتی ترانسفورم شد مورد بررسی قرار گرفت. بیان پروتئین در سیستم بیانی BL-21(DE3) انجام و در جهت بهبود بیان پروتئین راه کارهایی برای بهینه سازی بیان پروتئین انجام شد (شکل ۲). نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعه مشابه که توسط کومار و همکاران در سال ۲۰۱۶ به منظور بیان پروتیئن Nef در سویه بیانی BL-21(DE3) از باکتری E.coli که با استفاده از حامل پروکاریوتی pET-28a با موفقیت انجام شد، مطابقت دارد[۲۱]. در راستای بیان پروتئین نوترکیب به طور معمول از سویه های باکتریایی مشخصی استفاده می‌شود که علاوه بر بیان بالا هیچ گونه تغییری در ساختار آن ایجاد نکنند. متداول ترین میزبان بیانی از سویه‌های E.coli، BL-21(DE3) می‌باشد که دارای RNA پلی مراز T7 قابل القاء با IPTG می‌باشند[۲۲]. در بررسی پارزیش و همکاران در سال ۲۰۱۸ و همچنین ایکس یون و همکاران در سال ۲۰۰۵، کارآمد و سازگار بودن این سیستم با حامل پروکاریوتی pET-28a برای کلونینگ و بیان ژن یوکاریوتی را نشان دادند [۲۳،۲۴]، به همین جهت در این پژوهش نیز برای بیان پروتئین فیوژن مذکور نیز از این سیستم استفاده شد که در نهایت سازگاری مناسب و بیان قابل قبول معادل ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد که نسبت به بیان سایر پروتئین ها در این سیستم بالاتر بود.

تخلیص پروتئین مرحله‌ای اساسی برای تشخیص عملکرد، ساختار و تعامل پروتئین‌ها می‌باشد. جداسازی پروتئین مدنظر از انبوه پروتئین‌های موجود در سلول بوسیله راه کارهایی از قبیل اندازه پروتئین، ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی، تمایل اتصال و فعالیت زیستی انجام می‌شود. انتخاب روش مناسب برای تخلیص پروتئین اهمیت به سزایی در کیفیت و کمیت پروتئین به دست آمده دارد[۲۵]. با در نظرگرفتن ویژگی پروتئین فیوژن که دارای توالی هیستیدین است، از میان روش های معمول برای تخلیص پروتئین، از روش کروماتوگرافی تمایلی برپایه رزین Ni-NTA تحت شرایط دناتوره در نمونه رسوبات باکتری استفاده شد. در مقایسه با مطالعات سایرین میزان غلظت و خلوص پروتئین نوترکیب بالاتر بود. همچنین در مطالعه جعفر زاده و همکاران در سال ۲۰۱۶ روش رنگ آمیزی معکوس برای تخلیص پروتئین Nef نیز کارایی بالایی نشان داد [۱۵]. پروتئین نوترکیب تولید شده از حیث اندازه با میزان پیش‌بینی شده به روش نرم‌افزار EXPASY،(www.expasy.org) هم‌خوانی داشته و علاوه بر این در آنالیز با وسترن بلات وجود یک باند اختصاصی، بیان پروتئین نوترکیب را به اثبات رسانده است.

نتیجه‌گیری:

ساختار Nef-MPER-V3 در پلاسمید pET-28a با موفقیت کلون و در سویه بیانی BL21 پروتئین نوترکیب بیان و تولید شد. تخلیص پروتئین فیوز شده Nef-MPER-V3 به روش کروماتوگرافی تمایلی بوسیله Ni-NTA انجام و مشاهده باند ۳۵ کیلودالتون توسط آنالیز وسترن بلات توانست هویت این پروتئین را آشکار کند. نتایج حاصل از این مطالعه، نشان دهنده کارامد و سازگار بودن پلاسمید pET-28a و سلول میزبان BL-21 برای پروتئین نوترکیب مورد مطالعه بوده است و با توجه به غلظت مناسب پروتئین حاصل معادل ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، می‌توان از آن در مطالعات آتی واکسن به عنوان آنتی‌ژن کاندید واکسن مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد است و از حمایت مالی طرح پژوهشی ۸۳۲ انستیتو پاستور ایران برخوردار بوده است.

تعارض منافع:

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-07]
[DOI: 10.52547/jmj.17.2.46]

References:

1. Yanik EL, Katki HA, Engels EA. Cancer risk among the HIV-infected elderly in the United States. AIDS. 2016; 30(10):1663-1668.
2. UNAIDS, 2019. Global HIV & AIDS statistics. http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet.; 2019.
3. Turpin JA. The next generation of HIV/AIDS drugs: novel and developmental anti HIV drugs and targets. Expert Rev Anti Infect Ther. 2003; 1(1):97-128.
4. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. Annu Rev Immunol. 2000; 18(1):927-974.
5. Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F, Wolf H. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. J Virol. 1987; 61(2): 570-578.
6. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS Cell. 1986; 45(5): 637-648.
7. Rajarapu G. Genes and Genome of HIV-1. J Phylogen Evolution Biol. 2013; 2:126.
8. Gach JS, Leaman DP, Zwick MB. Targeting HIV-1 gp41 in close proximity to the membrane using antibody and other molecules. Curr Top Med Chem. 2011; 11(24):2997-3021.
9. Gamble, L.J. and Q.L. Matthews, Current progress in the development of a prophylactic vaccine for HIV-1. Drug Des Devel Ther, 2010. 5: 9-26.
10. Tohidi F, Sadat SM, Bolhassani A, Yaghobi R, Larijani MS. Induction of a Robust Humoral Response using HIV-1 VLPMPER-V3 as a Novel Candidate Vaccine in BALB/c Mice. Curr HIV Res. 2019; 17(1):33-41.
11. Burton D.R., et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. Nat. Immunol. 2004; 5(3): 233-236.
12. Hou P, Chen S, Wang S, Yu X, Chen Y, Jiang M, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. Sci rep. 2015; 5:15577.
13. Didigu CA, Wilen CB, Wang J, Duong J, Secreto AJ, Danet-Desnoyers GA, et al. Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. Blood. 2014; 123(1):61-9.
14. Pantophlet R،Wrin T،Cavacini LA. Neutralizing activity of antibodies to the V3 loop region of HIV-1 gp120 relative to their epitope fine specificity. Virology. 2008; 381(2):251-260.
15. Jafarzade BS, Sadat SM, Yaghobi R, Bolhassani A. Reverse staining: Effective method for purification of HIV-1 Nef protein in prokaryotic expression system. Feyz. 2016; 20(5):420-426.(Persian)
16. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. Nature. 1998; 391(6665):397-401.
17. Hokey DA, Weiner DB. DNA vaccines for HIV: challenges and opportunities. Springer Semin Immunopathol. 2006; 28(3):267-79.
18. Kilpeläinen A, Axelsson Robertson R, Leitner T, Sandström E, Maeurer M, Wahren B. HIV-1 Nef protein carries multiple epitopes suitable for induction of cellular immunity for an HIV vaccine in Africa. AIDS Res Hum Retroviruses. 2014; 30(11):1065-71.
19. Cosma A, Nagaraj R, Bühler S, Hinkula J, Busch DH, Sutter G, et al. Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. Vaccine. 2003; 22(1):21-9.
20. Mierendorf RC, Morris BB, Hammer B, Novy RE. Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. Methods Mol Med. 1998; 13:257-92.
21. Kumar M, Kaur S, Nazir A, Tripathi RK. HIV-1 Nef binds with human GCC185 protein and regulates mannose 6 phosphate receptor recycling. Biochem Biophys Res Commun. 2016;474(1):137-145.
22. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Front Microbiol. 2014;5:172.
23. Parzych EM, Miura K, Ramanathan A, Long CA, Burns JM Jr. Evaluation of a Plasmodium-specific carrier protein to enhance production of recombinant Pfs25, a leading transmission-blocking vaccine candidate. Infect Immun. 2017;86(1).
24. Jiang XY, Wang CF, Zhang PJ, He ZY. Cloning and expression of Mycobacterium bovis secreted protein MPB83 in Escherichia coli. J Biochem Mol . 2006;39(1):22-5.
25. Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. Protein Expr Purif. 2005;41(1):98-105.

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-07]

[DOI: 10.52547/jmj.17.2.46]

Original Article

Cloning, Optimization of Expression Condition and Purification of the Recombinant Nef- MPER-V3 Protein of HIV-1 in Prokaryotic Expression System

Faghih A[1], Sadat SM [2]*, Bolhassani A[2], Irani sh[3]

Received:2019.09.07 Revised:2019.10.21 Accepted: 2019.10.22

1. MSc, Department of Biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate prof., Department of Hepatitis, AIDS and Blood borne diseases, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. Associate prof., Department of Biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.2, Summer 2019

Pars J Med Sci 2019;17(2):46-53

Abstract:

Introduction:
Background: Neff regulatory protein as well as structural proteins such as MPER and V3 of HIV-1 is important targets in vaccine studies. Therefore, in the current study, the Nef-MPER-V3 fusion protein was cloned and expressed in prokaryotic expression system that will be evaluated as a candidate for future vaccine studies.

Materials and Methods:
The Nef-MPER-V3 sequence was synthesized and inserted into pET-28a(+) vector using Not I/HindIII enzymes. Then, the recombinant construct was expressed in BL21 (DE3) strain of E.coli. For optimization of protein expression, several factors such as time of induction, IPTG concentration and optical density (OD) were evaluated. The recombinant protein was purified on a Ni-NTA agarose column and analyzed by 12% SDS-PAGE. Finally, the fusion protein was confirmed by western blotting.

Results:
The target gene was successfully cloned into the recombinant vector. The best condition for the expression such as; 2 m IPTG, OD600 = 0.7 and growth 5 hours post-induction were determined and the recombinant protein was purified by affinity chromatography in denaturing condition with urea at a concentration of about 300 µg/ ml. The purified fusion protein migrated as a clear band of around 35 kDa in SDS-PAGE and was detectable using anti-Neff antibody in western blotting.

Conclusion:
Our results showed that the Nef-MPER-V3 protein was successfully expressed in prokaryotic system and purified protein may provide the antigen for future experiments for immunogenicity evaluation in mice is currently undertaken.

Keywords: HIV-1, Nef-MPER-V3, Affinity chromatography, Recombinant protein, Gene expression

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-07]

[DOI: 10.52547/jmj.17.2.46]

* Corresponding author Email: Mehdi_sadat@pasteur.ac.ir