کلون‌سازی، بیان و تخلیص پروتئین اینتگراز ویروس HIV و بررسی آنتی‌ژنیسیتهٔ آن

زهرا ریخته‌گران تهرانی: دانشجوی دکترا، بخش فرآورده‌های تشخیصی، انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران. z_rikhtegaran@pasteur.ac.ir
کیهان آزادمنش: دکترای تخصصی، بخش ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. azadmanesh@pasteur.ac.ir
احسان مصطفوی: دکترای تخصصی، بخش بخش اپیدمیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. mostafavi@pasteur.ac.ir
محمد عزیزی: دکترای تخصصی، بخش بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. m.azizi@pasteur.ac.ir
* **علیرضا خبیری:** دکترای تخصصی، بخش فرآورده‌های تشخیصی، انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران (*نویسنده مسئول). khabiri@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۴

چکیده

زمینه و هدف: ارتقاء روش‌های تشخیصی جهت شناسایی افراد آلوده به HIV، یکی از راه‌های مقابله با انتشار ویروس به‌شمار می‌رود. به‌دلیل بالابودن میزان موتاسیون در این ویروس، لازم است تا برای راه‌اندازی روش‌های ایمنواسی تشخیصی از پروتئین‌های محافظت‌شده، استفاده شود. به‌دلیل آنکه پروتئین اینتگراز یکی از محافظت‌شده‌ترین پروتئین‌های HIV است، آنتی‌ژن مناسبی برای این منظور به‌شمار می‌رود. در این مطالعه ضمن کلون‌سازی و تخلیص این پروتئین، ایمنوژنیسیتهٔ آن نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: ژن اینتگراز در وکتور بیانی pET28a کلون گردید. پلاسمید نوترکیب حاصله به باکتری *E.coli* انتقال یافته و بیان پروتئین با استفاده از IPTG القاء شد. بررسی ایمنوژنیسیتهٔ پروتئین بیان‌شده با تکنیک وسترن‌بلات صورت گرفت. تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی با رزین‌های Ni-NTA انجام پذیرفت.

یافته‌ها: القاء باکتری‌های ترانسفرم‌شده با IPTG به بیان پروتئین اینتگراز منجر گردید و به این ترتیب پس از بهینه‌سازی شرایط بیان، حدود ۴۰ درصد پروتئین‌های باکتریایی به پروتئین نوترکیب مورد نظر اختصاص پیدا کرد. انجام وسترن بلات نشان‌دهندهٔ واکنش ایمنی اختصاصی با سرم افراد آلوده به HIV بود. به‌ازاء هر یک لیتر کشت باکتری، ۷۵ میلی‌گرم اینتگراز تخلیص گردید.

نتیجه‌گیری: پروتئین تولیدشده به‌واسطهٔ حفظ خاصیت آنتی‌ژنیک خود، قابلیت به‌کارگیری در روش‌های تشخیصی ایمنواسی را دارد. با استفاده از بهینه‌سازی شرایط کشت و بیان پروتئین می‌توان به باکتری‌های نوترکیبی دست یافت که تولید پروتئین در آن‌ها با بازده بالایی صورت می‌پذیرد و بنابراین امکان استفاده از آن‌ها در اهداف صنعتی وجود خواهد داشت.

کلیدواژه‌ها: ویروس نقص ایمنی انسان، اینتگراز، ایمنواسی

مقدمه

ویروس نقص ایمنی انسان یا HIV (Human Immunodeficiency Virus)، از بدو ظهور در سال ۱۹۸۱ تا کنون باعث ابتلاء و مرگ میلیون‌ها انسان شده است. مطابق آمار ارائه‌شده توسط سازمان جهانی بهداشت، در سال ۲۰۱۳ تعداد افراد آلوده به این ویروس برابر با ۳۵ میلیون نفر برآورد گردیده و در همین سال در هر روز ۶۰۰۰ مورد جدید ابتلاء به HIV رخ داده است (۱). با وجود تلاش‌های روزافزونی که در سراسر جهان جهت درمان و پیشگیری از HIV صورت می‌گیرد، کوشش‌های بشر برای مقابله با این ویروس، با توفیق کامل همراه نبوده است. برای رسیدن به موفقیت در اهدافی چون درمان و به‌ویژه پیشگیری از بیماری، شناسایی افراد مبتلا به ویروس یکی از عوامل کلیدی به‌شمار می‌رود. تشخیص عفونت، معمولاً به‌واسطهٔ بررسی آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی انجام می‌گیرد. روش‌های سرولوژیک تشخیصی به دو دستهٔ روش‌های غربالگری و روش‌های تأییدی (Confirmatory) تقسیم می‌شوند (۲). روش الایزا یکی از پرکاربردترین روش‌های غربالگری بیماری محسوب می‌گردد، زیرا ضمن سادگی و هزینهٔ اندک، امکان سنجش دقیق و با حساسیت بالایی را در جهت شناسایی

آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی فراهم می‌آورد. روش وسترن بلات نیز به‌عنوان یک تست مکمل و تأییدی به‌منظور تشخیص قطعی و اختصاصی آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی مطرح است (۲).

روش‌های الایزا در تشخیص HIV، به چهار نسل مختلف تقسیم می‌شوند. در الایزای نسل یک، از لیزات ویروسی به‌عنوان آنتی‌ژن‌های متصل به میکروپلیت‌های الایزا استفاده شده و با آن به شناسایی IgG ضد HIV پرداخته می‌شد، که این نوع الایزا از لحاظ حساسیت و به‌ویژه اختصاصیت در سطح پایینی قرار داشت (۳و ۴). در الایزای نسل ۲ از پپتیدها و پروتئین‌های سنتتیک و نوترکیب در روش غیرمستقیم جهت شناسایی IgG ضد HIV استفاده گردید و در نهایت با استفاده از همین آنتی‌ژن‌ها و به‌کارگیری روش ساندویچ- الایزا، امکان سنجش همزمان تمامی آنتی‌بادی‌های ضد HIV در نسل ۳ کیت‌های الایزا فراهم شد (۷-۵). یک مشکل عمده که در تمام این روش‌ها وجود دارد، عدم شناسایی آنتی‌ژن‌های ویروسی و بنابراین امکان حصول نتیجهٔ منفی کاذب در افرادی است که در دورهٔ پنجره به‌سر می‌برند. در این دوره با وجود آلودگی به HIV، به‌دلیل کوتاه‌بودن زمان ابتلاء، هنوز آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی به میزان قابل شناسایی تولید نشده‌اند و این مسأله تشخیص مبتنی بر وجود آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی را با مشکل مواجه می‌سازد. این وضعیت با روی کار آمدن کیت‌های نسل ۴ الایزا و در نتیجه امکان سنجش همزمان یکی از آنتی‌ژن‌های اصلی کپسید ویروس (p24) و آنتی‌بادی‌های ضد HIV تا حدی برطرف گردید (۸و ۹).

ژنوم ویروس HIV از سه ژن اصلی *gag*، *env* و *pol* تشکیل یافته است. این ژن‌ها مسؤول ساخت پروتئین‌های ساختاری و عملکردی مورد نیاز ویروس می‌باشند. از آنجایی که محصول اصلی ژن *gag*، یعنی پروتئین p24، پیش از تولید آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی، در دورهٔ کوتاهی در افراد آلوده قابل ردیابی است، در کیت‌های نسل چهار الایزا این آنتی‌ژن مورد شناسایی قرار می‌گیرد. معمولاً در روش‌های تشخیصی HIV، به‌منظور شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی از محصولات ژن *env* استفاده می‌شود، در حالی که محصولات ژن *pol* کمتر در روش‌های تشخیصی به‌کار گرفته شده‌اند (۱۰).

محصولات ژن *pol* عبارتند از پروتئاز، ترانسکریپتاز معکوس و اینتگراز (۱۱) که عملکرد این سه آنزیم برای همانندسازی ویروس کلیدی می‌باشد. یکی از مراحل مهم در چرخهٔ تکثیر HIV، ادغام ژنوم ویروس در ژنوم میزبان است که این فرآیند متشکل از سه مرحلهٔ مجزا شامل پردازش انتهای '3، انتقال رشتهٔ DNA و ترمیم بخش‌های تک‌رشته‌ای است. تمامی این مراحل به‌واسطهٔ عملکرد مشترک آنزیم اینتگراز ویروس و احتمالاً آنزیم‌های سلول میزبان صورت می‌گیرند (۱۲و ۱۳).

آنزیم اینتگراز، p31، یک پروتئین ۳۱ کیلودالتونی است که از آن به‌عنوان یکی از اهداف درمان ضد ویروسی استفاده می‌شود. در این نوع درمان با به‌کارگیری مواد دارویی که اثر مهاری بر روی این آنزیم دارند، عملکرد آنزیم متوقف و در نتیجه تکثیر ویروس مهار می‌گردد (۱۴). از این پروتئین تا کنون برای اهداف تشخیصی با روش الایزا استفاده نشده است. اما با توجه به اینکه اینتگراز یکی از پروتئین‌های محافظت‌شده و بسیار ایمنوژن ویروس است (۱۵و ۱۶)، به‌نظر می‌رسد می‌توان با ردیابی آنتی‌بادی‌های ضد اینتگراز، تشخیص سرولوژیک HIV را بهبود بخشید و از آن به‌عنوان یک هدف مناسب جهت طراحی روش‌های تشخیصی HIV، برای افزایش حساسیت و ویژگی تشخیص استفاده نمود.

به‌منظور ارزیابی پاسخ ایمنی بیماران مبتلا به HIV نسبت به پروتئین اینتگراز ویروسی، لازم است تا این پروتئین به‌صورت نوترکیب تولید گردد. در این مطالعه به روند تولید آن در باکتری *E.coli* پرداخته شده است.

روش کار

این مطالعه از نوع مطالعات کاربردی می‌باشد که در سال ۱۳۹۲ در بخش فرآورده‌های تشخیصی

انستیتو پاستور ایران، به‌انجام رسیده است. مواد بیولوژیک مورد استفاده در این مطالعه مانند آنزیم‌های محدودکننده و لیگاز، کیت استخراج پلاسمید و استخراج DNA از ژل و IPTG از طریق شرکت فرمنتاز (Fermentas, USA) و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده، از طریق شرکت سیگما- آلدریچ (Sigma-Aldrich, USA) تهیه گردید.

کلونینگ ژن اینتگراز در باکتری *E.coli*: برای این منظور توالی کدکنندهٔ ژن اینتگراز از پایگاه داده‌های HIV (http://www.hiv.lanl.gov) به‌دست آمد. پس از بهینه‌سازی توالی از لحاظ کدون‌های ترجیحی باکتری *E.coli* و اطمینان از حصول سکانسی با کمترین میزان ساختار ثانویه، تنظیم محتوای GC و طراحی دو سایت برش آنزیمی *BamH-I* و *Hind-III* که به ترتیب در دو انتهای آمینو و کربوکسی توالی مورد نظر قرار می‌گرفتند، ژن مربوطه توسط شرکت Bioneer (Korea) ساخته شد. ژن سنتزشده در وکتور pGEM-B1 ارائه گردید. وکتور دریافتی، پس از انتقال به سویهٔ DH5α باکتری *E.coli* تکثیر یافت. پلاسمیدهای حاصله پس از استخراج، با دو آنزیم محدودکنندهٔ تعبیه‌شده در دو انتهای ژن، برش داده شدند و پس از برشِ وکتور بیانی pET28a با همین آنزیم‌ها، طی یک واکنش لیگاسیون، قطعهٔ مورد نظر در وکتور نهایی کلون‌گردید. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، این توالی با طول ۸۶۴ جفت‌باز توسط دو توالی کدکنندهٔ دنباله‌های هیستیدینی در دو طرف احاطه شده است. محصول لیگاسیون به باکتری *E.coli* سویهٔ BL-21، که با استفاده از کلریدکلسیم به‌صورت پذیرا درآمده بود، انتقال داده شد. کلنی‌های نوترکیب حاصله به واسطهٔ توانایی رشد در محیط LB حاوی کانامایسین (با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) شناسایی شدند.

تأیید کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب: جهت تأیید وجود pET28a حاوی ژن اینتگراز (pINT28a) کلون‌های رشدیافته، به محیط LB مایع حاوی کانامایسین منتقل شده و پس از تکثیر، پلاسمیدهای موجود استخراج شده و با آنزیم‌های *BamH-I* و *Hind-III* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند و طول محصول برش‌یافته با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی گردید. همچنین توالی موجود در پلاسمیدهای حاصله با استفاده از دو پرایمری که امکان تکثیر توالی کلون‌شدهٔ مورد نظر را فراهم می‌نمودند (پرایمر مستقیم: ggatccttcctggacgg و پرایمر معکوس: aagcttgtcttcatcctgg)، طی یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید. طول باند تکثیریافته نیز با استفاده از الکتروفورز بررسی شد. کلون تأییدشده برای ادامهٔ کار مورد استفاده قرار گرفت.

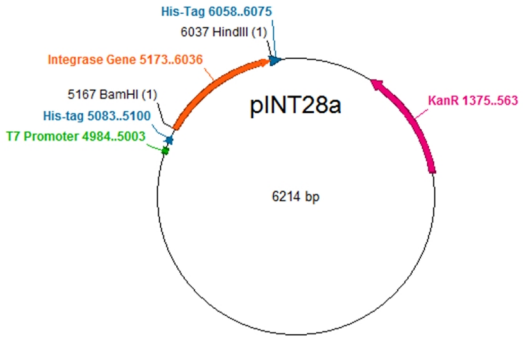
بیان ژن اینتگراز نوترکیب در *E.coli*: جهت بیان ژن اینتگراز، باکتری‌های حاوی pINT28a در محیط‌های مایع LB، Terrific، SOB و SOC حاوی کانامایسین (با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در حالی که با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه هوادهی می‌شدند، انکوبه گردیدند. پس از رشد باکتری و ایجاد کدورتی معادل جذب نوری ۰/۷ تا ۰/۹ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، بیان پروتئین با استفاده از غلظت‌های مختلف IPTG (۰/۵، ۱، ۳ و ۵ میلی‌مولار) القاء گردید. برای بررسی میزان بیان، در فواصل ۱ ساعته و طی ۷ ساعت از محیط‌های کشت نمونه‌برداری انجام گرفت. نمونه‌های باکتریایی توسط سانتریفیوژ رسوب داده شده و با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. میزان بیان با استفاده از نرم‌افزار Image J در مقایسه با سایر پروتئین‌های باکتریایی بررسی گردید. شرایطی که در آن بیشترین میزان بیان حاصل شده بود برای ادامهٔ کار مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی ایمنوژنیسیتهٔ پروتئین نوترکیب حاصله: برای این کار نمونه‌ای از باکتری‌های نوترکیب کشت‌یافته قبل و بعد از القاء، برداشت شده و پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۲ درصد، به غشاء نیتروسلولز انتقال یافتند. غشاها پس از انتقال پروتئین با استفاده از محلول ۱ درصد BSA در PBS، بلوک گردیدند. پس از برش غشاها به‌صورت نوارهای ۵ میلی‌متری، هر

یک با مخلوط‌های سرمی حاصل از افراد HIV مثبت و HIV منفی که به نسبت ۱ به ۱۰ در بافر PBS رقیق شده بودند، در حالی که به‌آرامی حرکت داده می‌شدند، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق مجاور گردیدند. پس از ۵ مرتبه شستشو با بافر PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین، غشاها به‌همراه آنتی‌هیومن کنجوگه با آنزیم پراکسیداز (رقت ۱ به ۴۰۰۰) به‌مدت ۱ ساعت در حالت حرکت آرام و در دمای اتاق، انکوبه گردیدند. غشاها پس از انجام مراحل شستشو، در مجاورت محلول رنگزا و H_2O_2 قرار گرفته و پس از مشاهدهٔ باندهای مربوطه، واکنش رنگزا با شستشوی غشاها با آب پایان پذیرفت.

تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب اینتگراز: برای این منظور باکتری‌ها در محیط LB مایع حاوی ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین، کشت داده شده و پس از ایجاد کدورتی معادل جذب نوری ۰/۷ تا ۰/۹ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، با ۰/۵ میلی‌مولار IPTG القاء شده و باکتری‌ها پس از گذشت سه ساعت از زمان القاء با استفاده از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۹۰۰۰ ×g، رسوب داده شدند. سپس به ازاء هر ۰/۵ گرم باکتری، ۳۰ میلی‌لیتر از محلول لیز حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4، ۱۰ میلی‌مولار Tris-Cl و ۸ مولار اوره (pH:8) به باکتری‌ها اضافه گردید و مخلوط حاصله به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق در حالی که به‌آرامی حرکت داده می‌شد، انکوبه گردید. سپس رزین‌های Ni-NTA به‌طور مستقیم به محلول لیزشدهٔ باکتریایی اضافه شده و انکوباسیون به‌مدت یک ساعت در حالت حرکت آهسته و در دمای اتاق ادامه یافت. در مرحلهٔ بعد، محلول حاوی رزین به دو ستون تخلیص ۲۰ میلی‌لیتری (BIO-RAD) انتقال یافته و پس از خروج محلول، مراحل شستشو و جداسازی (Elution) با استفاده از بافری مشابه بافر لیز اما با اسیدیتهٔ بالاتر، با pH به‌ترتیب ۵/۹ و ۴، انجام گرفت.

ارزیابی مراحل خالص‌سازی و تعیین غلظت اینتگراز تخلیص‌شده: روند تخلیص با استفاده از الکتروفورز محصولات مربوط به مراحل مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت غلظت پروتئین تخلیص‌یافته با استفاده از روش برادفورد (۱۷) تعیین گردید.



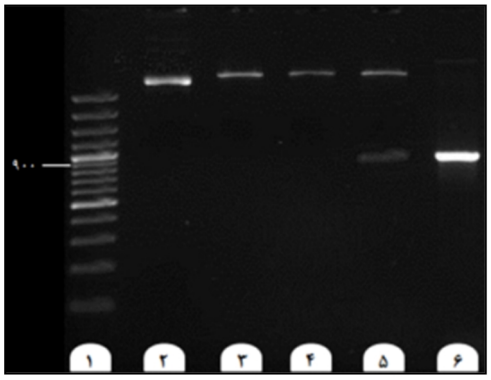
شکل ۱- ساختار وکتور بیانی حاوی ژن اینتگراز

یافته‌ها

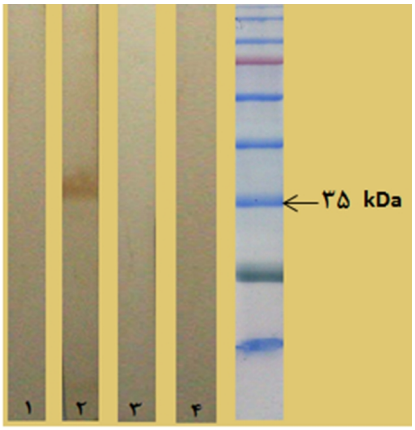
کلونینگ ژن اینتگراز در وکتور بیانی pET28a به‌واسطهٔ ایجاد توانایی رشد باکتری‌های ترانسفرم‌شده در محیط حاوی کانامایسین، مورد تأیید اولیه قرار گرفت. برای انجام مراحل تأییدی بعدی، از تخلیص پلاسمید چند کلنی مختلف و انجام برش آنزیمی و نیز PCR با پرایمرهای اختصاصی توالی الحاقی استفاده گردید. محصول حاصل از هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، با ایجاد باندهایی به‌ترتیب با طول ۸۶۴ جفت‌باز و ۸۸۲ جفت‌باز در ژل آگارز، وجود پلاسمید pET28a حاوی ژن اینتگراز (pINT28a) را تأیید نمود (شکل ۲).

بررسی شرایط مختلف کشت شامل محیط‌های مختلف، غلظت‌های متفاوت IPTG و فواصل زمانی مورد نیاز برای بیان، مشخص نمود که پس از سه ساعت افزودن ۰/۵ میلی‌مولار IPTG به محیط LB مایع، امکان بیان بالایی از پروتئینی با وزن ۳۷ کیلودالتون (پروتئین اینتگراز به‌همراه دو دنبالهٔ هیستیدینی در دو انتها) فراهم می‌گردد. میزان بیان در این شرایط معادل ۴۰ درصد پروتئین‌های باکتریایی برآورد گردید. نتیجهٔ وسترن بلات با سوسپانسیون‌های باکتریایی قبل و

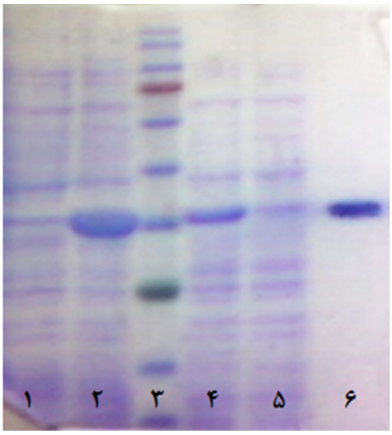
بعد از القاء و مخلوط‌های سرمی حاصل از افراد آلوده به HIV و افراد سالم نشان داد که باند ۳۷



شکل ۲- تأیید وجود توالی ژن اینتگراز در pINT28a،
ستون ۱. DNAمارکر صد جفت‌بازی (.SM#0321 Fermentas Co)، ستون ۲. pINT28a برش‌نیافته، ستون ۳. pINT28a برش‌یافته با *Hind III*، ستون ۴. pINT28a برش‌یافته با *BamH I*، ستون ۵ pINT28a برش‌یافته با *Hind III* و *BamH I*، ستون ۶ محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی قطعهٔ کلون‌شده در pINT28a.



شکل ۳- نتیجهٔ وسترن بلات با لیزات باکتریایی قبل و بعد از القاء.
غشاء ۱و ۲: حاوی لیزات باکتریایی پس از القاء، غشاء ۳ و ۴: حاوی لیزات باکتریایی پیش از القاء. غشاهای ۱و ۳ با مخلوط سرمی افراد نرمال مجاور شده و غشاهای ۲و ۴ با مخلوط سرمی افراد آلوده



شکل ۴- بررسی مراحل مختلف تخلیص با استفاده از SDS-PAGE.
به‌ترتیب از سمت چپ ۱. باکتری قبل از القاء، ۲. پس از القاء با IPTG، ۳. مارکر وزن ملکولی، ۴. لیزات باکتریایی، ۵. محلول خارج‌شده از ستون پس از شستشو، ۶. پروتئین تخلیص‌شده.

کیلودالتونی تولیدشده تنها با سرم افراد آلوده به HIV واکنش ایمنولوژیک دارد، درحالی که در افراد سالم یا وسترن‌بلات با باکتری‌های القاءنشده هیچ‌گونه باندی مشاهده نگردید (شکل ۳).

پروتئین اینتگراز تمایل بسیار زیادی به رسوب و تجمع داشته و بنابراین سانتریفیوژ لیزات باکتریایی منجر به رسوب مقدار زیادی از اینتگراز می‌گردید (داده‌های مربوطه نشان داده نشده است) که این یافته در کارهای مشابه دیگر در ارتباط با این پروتئین مشاهده گردیده است (۱۸و ۱۹). برای جلوگیری از حذف پروتئین‌های رسوب‌یافته از فرآیند تخلیص، لیزات باکتریایی بدون انجام سانتریفیوژ و به‌طور مستقیم با رزین‌های نیکل مجاور گردید. به‌واسطهٔ وجود دنباله‌های هیستیدینی در پروتئین اینتگراز تولیدشده با pINT28a، امکان تخلیص آن از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی با رزین‌های نیکل فراهم می‌باشد. نتیجهٔ SDS-PAGE حاصل از مراحل مختلف تخلیص نشان‌دهندهٔ این است که خلوص پروتئین اینتگراز حاصله، بیش از ۹۵ درصد است (شکل ۴). همچنین میزان پروتئین تولیدشده معادل ۷۵ میلی‌گرم به‌ازاء هر لیتر کشت باکتریایی تعیین گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

تولید پروتئین‌ها به‌صورت نوترکیب، یکی از روش‌های کارآمد در تهیهٔ مواد اولیهٔ پروتئینی مورد نیاز برای اهداف پژوهشی و کاربردی مرتبط با این ملکول‌های پیچیده و ارزشمند محسوب می‌گردد. با طراحی مناسب روند تولید پروتئین نوترکیب، امکان کاهش هزینه‌های تولید و تخلیص آن فراهم خواهد شد. در مطالعات مختلفی به تولید پروتئین اینتگراز پرداخته شده که هدف اصلی در اکثر این مطالعات بررسی عملکرد و تعیین ساختار این پروتئین بوده است (۲۰-۱۸). اما تمایل بالای اینتگراز برای ایجاد رسوب و تجمع، مانع انجام تلاش‌های اولیه برای تعیین ساختار آن بود و بنابراین پیشنهاد شده است که برای ایجاد فرم محلول اینتگراز، از توالی‌های موتان‌یافتهٔ این پروتئین با قابلیت حلالیت بالا و نیز غلظت‌های پایین آن در محلول نهایی استفاده

http://rjms.iums.ac.ir

گردد (۲۱و ۲۲). در مطالعهٔ حاضر نیز با وجود آنکه پروتئین مورد نظر به‌صورت محلول در اورهٔ ۸ مولار تهیه شده بود، با این حال مشکل تمایل به رسوب در آن دیده می‌شد، به‌طوری که حتی با سانتریفیوژ با دور بسیار پایین و زمان اندک (3000×g و ۱۰ دقیقه) نیز مقدار بسیار زیادی از پروتئین‌های موجود، از محلول خارج و ته‌نشین می‌شدند. بنابراین ما در مراحل کار به این نتیجه رسیدیم که مرحلهٔ سانتریفیوژ لیزات باکتریایی را حذف نموده و لیزات حاصله را مستقیماً با رزین‌های نیکل مجاور نماییم. این کار منجر به کندی خروج مایع از ستون شد اما در نهایت موجب افزایش میزان پروتئین نهایی گردید.

در سال ۲۰۰۴، Tan Wang و همکارانش به ارائهٔ روش تخلیص اینتگراز با تکنولوژی کشت در میکروپلیت پرداختند که در این کار پروتئین به‌صورت دناتوره تخلیص و سپس مراحل فولدینگ روی آن انجام گرفت. میزان محصول پروتئینی در این روش معادل ۱۴ میکروگرم به‌ازاء هر میلی‌لیتر کشت باکتریایی گزارش شده است (۲۳). در مطالعهٔ حاضر با توجه به اینکه هدف ما دست‌یابی به پروتئین واجد عملکرد آنزیمی نبوده و حلالیت اینتگراز در اورهٔ ۸ مولار حفظ می‌گردد، امکان تولید پروتئین با غلظت بالا (۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) فراهم آمد حال آنکه در مطالعاتی که هدف اصلی حصول آنزیم دارای عملکرد است، سعی در کاهش میزان غلظت پروتئین می‌شود تا به این واسطه از ایجاد میان‌کنش‌های بین ملکولی و رسوب اینتگراز جلوگیری به‌عمل آید (۲۴). از دیگر دلایل بهبود میزان بیان در این مطالعه می‌توان به فرآیند بهینه‌سازی ژن کدکنندهٔ اینتگراز اشاره نمود. بهینه‌سازی صحیح ژن‌ها پیش از به‌کارگیری آن ها در سیستم‌های بیانی باعث افزایش پایداری mRNA و بهبود قدرت رونوشت‌برداری و ترجمه در آن ها می‌گردد (۲۵). از سوی دیگر استفاده از وکتورهای بیانی کارآمد مانند وکتورهای سری pET با توجه به اینکه تمامی عناصر مورد نیاز جهت افزایش و بهبود بیان در این وکتورها به‌خوبی لحاظ شده‌اند نیز به بهبود بیان پروتئین مورد نظر ما کمک شایانی نموده است.

اولین گزارش در ارتباط با وجود واکنش ایمنی ضد اینتگراز در افراد آلوده به HIV توسط Chang و همکارانش در سال ۱۹۸۵ ارائه گردید، در این بررسی مشخص شد که در سرم تمام بیماران مورد مطالعه، آنتی‌بادی ضد اینتگراز وجود دارد (۲۶). در سال ۱۹۸۶، Steimer و همکارانش به‌منظور بررسی پاسخ ایمنی بیماران مبتلا به HIV و شناسایی پروتئین ۳۱ کیلودالتونی حاصل از ژن *pol* این ویروس، پروتئین اینتگراز را به‌صورت نوترکیب در باکتری اشریشیا کلی تولید نموده و واکنش ایمنولوژیک سرم مبتلایان به ویروس را نسبت به این پروتئین بررسی کردند، طبق نتایج حاصله سرم ۹۵٪ از این افراد حاوی آنتی‌بادی‌های ضد اینتگراز بود. (۱۶). تا کنون گزارشی مبنی بر استفاده از این پروتئین در کیت‌های تشخیصی HIV با روش الایزا ارائه نگردیده است. ولی با توجه به‌اینکه اینتگراز از پروتئین‌های محافظت‌شدهٔ HIV محسوب شده و از ایمنوژنیسیتهٔ بالایی برخوردار است (۱۵و ۱۶)، می‌توان آن را به‌عنوان هدفی مناسب جهت بررسی‌های جامع‌تر در این زمینه به‌کار گرفت. با استفاده از باکتری نوترکیب کدکنندهٔ ژن اینتگراز که در این مطالعه تهیه گردید، ارزیابی پاسخ مبتلایان به عفونت HIV نسبت به این آنتی‌ژن میسر می‌شود و در صورت انجام بررسی‌های بیشتر در زمینهٔ حساسیت و اختصاصیت پاسخ ایمنولوژیک میزبان نسبت به اینتگراز و حصول نتایج مناسب، امکان به‌کارگیری این پروتئین در روش‌های تشخیصی فراهم خواهد شد.

تقدیر وتشکر

این مقاله بخشی از یافته‌های یک پایان‌نامهٔ دکتری بیوتکنولوژی در انستیتو پاستور ایران است. یب بر خود لازم می‌دانیم تا از انستیتو پاستور ایران و همچنین مرکز مدیریت بیماری‌های واگیر در جهت اعطاء مساعدت‌های مالی و پشتیبانی برای انجام این پروژه قدردانی کنیم.

منابع

1. Global Summary of the HIV/AIDS epidemic, December 2013. World Health Organization; July 2013 [updated July 2013; cited]; Available from: http://www.who.int/hiv/data/en/.
2. Nuwayhid NF. Laboratory tests for detection of human immunodeficiency virus type 1 infection. Clin Diagn Lab Immunol 1995 Nov;2(6):637-45.
3. Ward JW, Grindon AJ, Feorino PM, Schable C, Parvin M, Allen JR. Laboratory and epidemiologic evaluation of an enzyme immunoassay for antibodies to HTLV-III. JAMA 1986 Jul 18;256(3):357-61.
4. Sarngadharan MG, Popovic M, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. Science 1984 May 4;224(4648):506-8.
5. Crowl R, Ganguly K, Gordon M, Conroy R, Schaber M, Kramer R, et al. HTLV-III env gene products synthesized in E. coli are recognized by antibodies present in the sera of AIDS patients. Cell 1985;41(3):979-86.
6. Dowbenko DJ, Bell JR, Benton CV, Groopman JE, Nguyen H, Vetterlein D, et al. Bacterial expression of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus p24 gag protein and its use as a diagnostic reagent. Proc Natl Acad Sci USA 1985 Nov;82(22):7748-52.
7. Gallarda JL, Henrard DR, Liu D, Harrington S, Stramer SL, Valinsky JE, et al. Early detection of antibody to human immunodeficiency virus type 1 by using an antigen conjugate immunoassay correlates with the presence of immunoglobulin M antibody. J Clin Microbiol 1992 Sep;30(9):2379-84.
8. Gurtler L, Muhlbacher A, Michl U, Hofmann H, Paggi GG, Bossi V, et al. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. J Virol Methods 1998 Nov;75(1):27-38.
9. van Binsbergen J, Siebelink A, Jacobs A, Keur W, Bruynis F, van de Graaf M, et al. Improved performance of seroconversion with a 4th generation HIV antigen/antibody assay. J Virol Methods 1999 Sep;82(1):77-84.
10. HIV assays : operational characteristics (Phase 1): report 15 antigen/antibody ELISAs World Health Organization; 2004 [updated 2004; cited ss]; Available from: http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js15200e/.
11. Hill M, Tachedjian G, Mak J. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. Curr HIV Res 2005 Jan;3(1):73-85.
12. Yoder KE, Bushman FD. Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. J Virol 2000 Dec;74(23):11191-200.
13. Craigie R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. J Biol Chem 2001 Jun 29;276(26):23213-6.
14. Steigbigel RT, Cooper DA ,Kumar PN, Eron JE, Schechter M, Markowitz M, et al. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. N Engl J Med 2008 Jul 24;359(4):339-54.
15. Allan JS, Coligan JE, Lee TH, Barin F, Kanki PJ, M'Boup S, et al. Immunogenic nature of a Pol gene product of HTLV-III/LAV. Blood 1987 Jan;69(1):331-3.
16. Steimer KS, Higgins KW, Powers MA, Stephans JC, Gyenes A, George-Nascimento C, et al. Recombinant polypeptide from the endonuclease region of the acquired immune deficiency syndrome retrovirus polymerase (pol) gene detects serum antibodies in most infected individuals. J Virol 1986 Apr;58(1):9-16.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976 May 7;72:248-54.
18. Sherman PA, Fyfe JA. Human immunodeficiency virus integration protein expressed in Escherichia coli possesses selective DNA cleaving activity. Proc Natl Acad Sci USA 1990 Jul;87(13):5119-23.
19. Murphy E. Cloning and Biochemical Characterization of HIV Integrase. 1991 July(DAMD17-88-C-8126.
20. Semenova EA, Gashnikova NM, Il'ina TV, Pronyaeva TR, Pokrovsky AG. Characterization of recombinant integrase of human immunodeficiency virus type 1 (isolate Bru). Biochemistry (Mosc) 2003 Sep;68(9):988-93.
21. Jenkins TM, Engelman A, Ghirlando R, Craigie R. A soluble active mutant of HIV-1 integrase: involvement of both the core and carboxyl-terminal domains in multimerization. J Biol Chem 1996 Mar 29;1(13).
22. Sinha S, Pursley MH, Grandgenett DP. Efficient concerted integration by recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase without cellular or viral cofactors. J Virol 2002 Apr;76(7):3105-13.
23. Wang T, John S, Archuleta S, Jonsson CB. Rapid, high-throughput purification of HIV-1 integrase using microtiter plate technology. Protein Expr Purif 2004 Feb;33(2):232-7.
24. Sinha S, Grandgenett DP. Recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase exhibits a capacity for full-site integration in vitro that is comparable to that of purified preintegration complexes from virus-infected cells. J Virol 2005 Jul;79(13):8208-16.
25. Fath S, Bauer AP, Liss M, Spriestersbach A, Maertens B, Hahn P, et al. Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene

expression. PLoS One 2011;6(3):e17596.
26. Chang NT, Huang J, Ghrayeb J, McKinney S, Chanda PK, Chang TW, et al. An HTLV-III peptide produced by recombinant DNA is immunoreactive with sera from patients with AIDS. Nature 1985 May 9-15;315(6015):151-4.

Cloning, expression and purification of HIV integrase and evaluation of its antigenicity

Zahra Rikhtegaran Tehrani, PhD student, Diagnostic Biotechnology Department, Pasteur Production & Research Complex, Karaj, Iran. z_rikhtegaran@pasteur.ac.ir
Kayhan Azadmanesh, MD, PhD, Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. azadmanesh@pasteur.ac.ir
Ehsan Mostafavi, DVM, PhD, Department of Epidemiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. mostafavi@pasteur.ac.ir
Mohammad Azizi, PhD, Department of Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. m.azizi@pasteur.ac.ir
***Alireza Khabiri,** PhD, Diagnostic Biotechnology Department, Pasteur Production & Research Complex, Karaj, Iran (*Corresponding author). khabiri@pasteur.ac.ir

Abstract

Background: Improving the performance of HIV diagnosis assays is one of the most important ways to reduce HIV transmission. Because of the high mutation rate of HIV, it is critical to use the conserved proteins to develop diagnostic immunoassay methods. Because integrase is one of the most conserved proteins of HIV, it may be a good target for this purpose. In this paper cloning, purification and immunogenicity evaluation of integrase are studied.

Methods: Integrase coding sequence was cloned in pET28a expression vector. After transformation of recombinant plasmid to E. coli, protein expression was induced by IPTG. Immunogenicity of recombinant integrase was evaluated by western blotting. The protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography.

Results: Induction by IPTG leads to expression of integrase. The expression level after optimization of conditions was about 40% of total proteins of E. coli. Western blotting showed specific immunoreactivity of recombinant integrase to HIV infected sera. The yield of produced protein was 75 mg per one liter of bacterial culture.

Conclusion: The produced protein retains antigenic properties and can be used in diagnostic immunoassay methods. Optimization of culture and protein expression conditions results in recombinant bacteria producing high yields of protein which may be used in industrial purposes.

Keywords: Human immunodeficiency virus, Integrase, Immunoassay