بررسی مولکولی فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین 3C در پاراکو ویروس انسانی تیپ یک

*دکتر فریده قاضی I
علی‌اکبر گرزین II
دکتر محمود شمس شهرآبادی III
بهاره دبیرمنش IV

چکیده

زمینه و هدف: پاراکوویروس‌های انسانی، جزء خانواده پیکورنا ویروس‌ها می‌باشند که از نظر کلینیکی حائز اهمیت هستند. اخیراً بررسی توالی ژنوم پاراکوویروس تیپ یک نشان داده است که این ویروس، از پیکورنا ویروس‌های دیگر متفاوت بوده و فاقد موتیفی است که در فعالیت پروتئازی 2A دخالت دارد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین 3C در پاراکو ویروس انسانی تیپ یک می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع بنیادی کاربردی می‌باشد. ناحیه کد کننده پروتئین 3C از cDNA(Complementary DNA) تهیه شده از ژنوم پاراکو ویروس انسانی تیپ یک، با آنزیم لیگاز در پلاسمید pUBS(Expression plasmid vector) وارد شد و پلاسمید نوترکیب pFG3(Plasmid Farideh Ghazi) تهیه گردید. پس از انتقال پلاسمید و تکثیر آن در باکتری E.coli MC10.22، به طریق استخراج با فنل، DNA جدا شد و سپس در سیستم پروکاریوتی(E.coli BL21) و روش درون لوله‌ای(In vitro)، تحت پروموتور T7 بیان گردید. نتایج با SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid gel electrophoresis) بررسی شد.

یافته‌ها: با بررسی محصول بیان پلاسمید نوترکیب فاقد ژن 3C در هر دو سیستم پروکاریوتی و In vitro، فقط یک باند بزرگ در حدود ۹۰ کیلو دالتون مشاهده گردید. در صورتی که وقتی محصول بیان پلاسمید نوترکیب حاوی 3C در هر دو سیستم توسط پلی‌آکریل آمید ژل بررسی شد، بجای یک باند بزرگ، چندین باند کوچک مشاهده شد که دلالت بر خاصیت پروتئازی پروتئین 3C می‌کند. در ضمن وقتی آنتی‌پروتئاز به محصول پلاسمید حاوی ژن 3C اضافه گردید، نتیجه، مشابه محصولات حاصل از بیان پلاسمید فاقد ژن 3C بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که پاراکوویروس‌های انسانی تیپ یک، از نظر فعالیت پروتئولیتیکی، متفاوت از دیگر پیکورنا ویروس‌ها می‌باشند و در این ویروس‌ها، فقط پروتئین 3C دارای خاصیت پروتئازی بوده و کلیه کلیواژهای پلی پروتئین اولیه ویروس توسط این پروتئاز انجام می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ۱ – پیکورنا ویروس‌ها ۲ – پاراکو ویروس‌های انسانی ۳ – پروتئاز 3C ۴ – بیان ژن

تاریخ دریافت: ۸٤/٦/۲۸، تاریخ پذیرش: ۸۵/۹/۵

مقدمه

خانواده پیکورنا ویریده، شامل ویروس‌های بدون پوشش با ژنوم RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت می‌باشند. طول ژنوم این ویروس‌ها ۹۵۰۰–۷۰۰۰ نوکلئوتید است که در داخل کپسیدی که از ٦۰ کپی از پروتئین‌های کپسیدی VP1-VP4 (Virus capsid proteins) تشکیل شده است، قرار دارد.[۱-۳]

پاراکوویروس‌های انسانی، یکی از جنسهای پیکورنا ویروس‌ها هستند که شامل دو پاتوژن پاراکو ویروس انسانی تیپ یک و دو می‌باشند.[۳و ٤] این ویروس‌ها در سال ۱۹۵٦ در یک اپیدمی اسهال تابستانی، جدا شده و قبلاً به نام اکوویروس ۲۲ و ۲۳ در گروه اینتروویروس‌ها قرار

I) دانشیار و دکترای(phD) بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).
II) کارشناس ارشد ویروس‌شناسی.
III) استاد و دکترای ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.
IV) کارشناس ارشد بیوشیمی.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

داده شدند، اما اخیراً با تعیین توالی ژنوم و مطالعه خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی، در جنس جدیدی به نام پاراکوویروس‌های انسانی طبقه‌بندی شدند.[۵] این ویروس‌ها، عامل گاستروانتریت، بیماری‌های دستگاه تنفسی و بندرت عامل عفونت سیستم عصبی مرکزی می‌باشند. عفونت با این ویروس‌ها، معمولاً در سالهای اولیه زندگی و با شیوع فصلی بیش‌تر در اواخر تابستان و اوایل پاییز دیده می‌شود.[۶] اسهال، مهم‌ترین عارضه کلینیکی در عفونت‌های پاراکوویروس‌ها می‌باشد.

ترتیب ژنوم پاراکوویروس‌ها شبیه پیکورنا ویروس‌های دیگر می‌باشد، اما از نظر خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی، اختلافاتی با اعضای دیگر این خانواده دارند(عدم برش پروتئین کپسیدی VP0 به VP4 و VP2، عدم ممانعت از سنتز پروتئین سلول میزبان و مقاومت نسبت به گوانیدین هیدروکلراید).[۷-۹]

ژنوم پیکورنا ویروس‌ها، پس از آلوده نمودن سلول، در سیتوپلاسم به صورت یک پلی پروتئین بزرگ ترجمه می‌شود، سپس توسط پروتئازهای ویروسی، به پروتئین‌های ساختمانی و غیرساختمانی می‌شکنند.[۱۰و ۱۱] این عمل کلیواژ توسط پروتئازها، برای چرخه تکثیر ویروس ضروری می‌باشد.

تاکنون سه پروتئاز در پیکورنا ویروس‌ها شناسایی شده که عبارتند از 3C، 2A و L(leader protein).[۱و ۷] پروتئین L فقط در آفتو ویروس‌ها وجود دارد و پاراکوویروس‌ها فاقد پروتئین L می‌باشند.[۳و ۱۲] در اغلب پیکورنا ویروس‌ها، کلیواژ اولیه پلی پروتئین، توسط پروتئاز 2A و بقیه کلیواژها، توسط پروتئاز 3C انجام می‌شود. در این ویروس‌ها، پروتئین 2A یک سیستئین پروتئاز شبیه تریپسین می‌باشد که برای پردازش اولیه پلی‌پروتئین ضروری است. در بین پیکورنا ویروس‌ها، عمل این پروتئین، متفاوت می‌باشد. در هپاتو ویروس‌ها، پروتئین 2A فاقد فعالیت پروتئازی بوده و در پردازش پلی‌پروتئین ویروس دخالتی ندارد و تمام کلیواژها، توسط پروتئاز 3C انجام می‌گیرد.[۱۳] با تعیین توالی اسیدهای آمینه پروتئین 3C، مشخص شد که این پروتئین مشابه کیموتریپسین و جزء سرین پروتئازها می‌باشد.[۱۴]

هدف از انجام این مطالعه، بررسی فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین 3C در پاراکوویروس انسانی تیپ یک می‌باشد.

روش بررسی

cDNA ژنوم پاراکوویروس انسانی تیپ یک (سویه Harris)، توسط آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcriptase=RT) و با استفاده از پرایمر dt17 تهیه گردید و سپس توسط PCR(Polymerase chain reaction) تکثیر داده شد. محصول PCR، در وکتور pBS(plasmid Bluescript) با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده که محل برش آنها در روی پرایمر تعبیه شده بود، کلون گردید.[۱۵]

برای بررسی فعالیت پروتئازی پروتئین 3C در پاراکوویروس انسانی تیپ یک (Human =HPEV1 parechovirus type 1)، سه پلاسمید pFG1.1(plasmid Farideh Ghazi)، pFG3 و pFG1 مورد استفاده قرار گرفت.

پلاسمید pFG1 به طول ۵۵۰۰ جفت باز حاوی cDNA کد کننده پروتئین 2A و قسمتی از VP1، VP0 و 5' UTR (5' untranslated region) (ناحیه ۴۲۰۰-۲۷۰۰) از ژنوم پاراکوویروس انسانی تیپ یک می‌باشد. برای تهیه پلاسمید pFG1، بخشی از cDNA پاراکوویروس که واجد ژن 2A و VP1 بود، با آنزیم‌های محدوده کننده EcoRI و Hind III بریده شد، پس از تخلیص با فنل و جدا کردن DNA، در پلاسمید pUBSVP0 (حاوی ژن 5'-UTR و قسمتی از VP0)، با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده HindIII و SmaI وارد(Ligate) گردید.

پلاسمید pFG1.1 به طول ۴۸۲۸ جفت باز می‌باشد. به علت اینکه تجربیات گذشته با ویروس‌های دیگر نشان داده بود که کوتاه کردن ناحیه غیرقابل ترجمه 5'-UTR، باعث زیاد شدن سنتز پروتئین می‌شود، پلاسمید pFG1 با آنزیم BamHI هضم شد و در وکتور pUBS که با BamHI بریده شده بود،

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

متصل(Ligate) گردید؛ در نتیجه پلاسمید PFG1.1 که به اندازه ٦٧٢ نوکلئوتید کوتاه‌تر از پلاسمید pFG1 بود، تهیه شد.

پلاسمید pFG3 به طول ٨٦٣٨ جفت‌باز، ناحیه کد کننده پروتئین 3C(٧٣٣٨-٤٢٠٠) از ژنوم پاراکوویروس تیپ یک با آنزیم PstI بریده شد و در وکتور pUBS بریده شده با همان آنزیم، وارد گردید، سپس این پلاسمید نوترکیب و پلاسمید pFG1، جداگانه توسط آنزیم HindIII و BpmI هضم شده به هم متصل(Ligate) شدند. در نتیجه پلاسمید نوترکیب pFG3، تهیه گردید.

برای تکثیر، این پلاسمیدها در باکتری E.coli سوش MC1022 که با کلرور کلسیم به حالت سلولهای مستعد (Competent Cells) در آورده شده بود[١٦]، توسط شوک حرارتی، ترانسفورم گردیدند.[١٧]

پلاسمیدهای نو ترکیب با روش فنل و کلروفرم و رسوب دادن توسط اتانول و استات سدیم ٣ مولار[١٨] استخراج شدند و برای تأیید، پلاسمیدها توسط آنزیم‌های محدودالاثر (Pst1، BamHI و HindIII) هضم شده و با ژل آگارز، الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند. سپس به کمک PCR(یک دقیقه در ٩٤ درجه سانتی‌گراد ، یک دقیقه در ٥٦ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ٧٢ درجه سانتی‌گراد و پس از ٣٠ سیکل، ٥ دقیقه در ٧٢ درجه سانتی‌گراد) و یک جفت پرایمر تهیه شده از ژن 3C، تأیید و در نهایت تعیین توالی گردیدند. بعد از تایید نهایی، پلاسمیدهای مورد نظر در سیستم پروکاریوتی بیان شدند.[١٩]

جهت بیان ژن در سیستم پروکاریوتی، از باکتری E.coli سوش BL-21(DE3) به عنوان میزبان استفاده شد. این باکتری به کمک فاژ لامبدا، لیزوژن شده است و در کروموزوم آن، ژن T7 RNA Polymerase قرار دارد. به کمک این آنزیم، از روی ژنهایی که در ابتدای آنها پروموتور T7 قرار دارد، یک mRNA، تولید شد و این mRNA، توسط میزبان به پروتئین ترجمه گردید. برای بیان ژن ابتدا باکتری در محیط SOB (sulfur oxidizing bacteria) حاوی کلرور منیزیم و کلرور پتاسیم، به مرحله لگاریتمی رشد وارد شد(٢ تا ٣ ساعت)، سپس پلاسمیدهای نوترکیب، در باکتری ترانسفورم شدند و توسط IPTG(Isopropyl B-D-Thiogolactoside) با غلظت ٠/١ میلی‌مولار، بیان ژن القا گردید.[٢٠و ٢١]

از این باکتری‌ها، در زمان‌های صفر، ١، ٢و ٣ ساعت پس از القاء با IPTG، نمونه‌برداری صورت گرفت. سپس نمونه سانتریفوژ شد و رسوب حاصل، در بافر لیز کننده محتوی SDS به حالت سوسپانسیون در آمد و نمونه‌های لیز شده، در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، تا همه نمونه‌ها جمع‌آوری گردد. این پلاسمیدها در سیستم درون لوله‌ای و با استفاده از کیت In vitro Cell Free T7/SP6 Transcription Translation محصول شرکت Roche آلمان، تحت پروموتور T7 بیان شدند.[٢٠-٢٢]

پس از بیان پلاسمیدها، محصولات پروتئینی در SDS-PAGE، بررسی و مقایسه گردیدند.

پرایمرهای استفاده شده در PCR، عبارت بودند از:

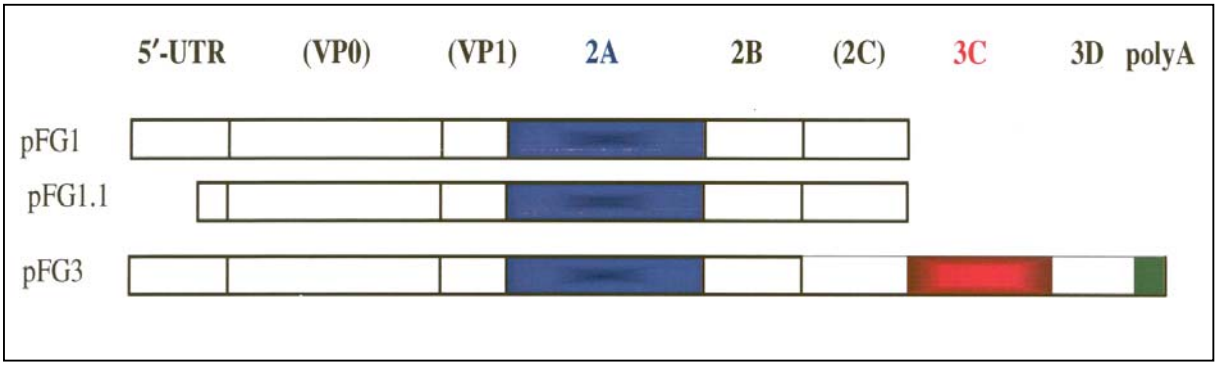
Forward Primer:
5'GGTGTAATAACGGTACCAGCTGG3'

Reverse Primer:
5'GATTTATAAACTCAGTGGTGATCATC3'

یافته‌ها

جهت بررسی خاصیت پروتئولیتیکی ژن 3C، پلاسمیدهای نوترکیب بدون ژن 3C(pFG1.1 و pFG1) و واجد ژن 3C(pFG3) مورد استفاده قرار گرفتند. پلاسمید pFG1، دارای بخشهای 2C، 2B، 2A، VP1، VP0 و 5' UTR بود و ٥٥٠٠ نوکلئوتید، طول داشت. پلاسمید pFG1.1، مشابه pFG1 بود، با این تفاوت که بخش 5'UTR آن، ٦٧٢ نوکلئوتید کوتاه‌تر از pFG1 بود. این پلاسمید، ٤٨٢٨ نوکلئوتید طول داشت. پلاسمید pFG3، واجد همان بخشهای pFG1، بعلاوه بخش کد کننده 3C و یک دنباله poly A بود. این پلاسمید ٨٠٠٠ نوکلئوتید طول داشت(شکل شماره ١).

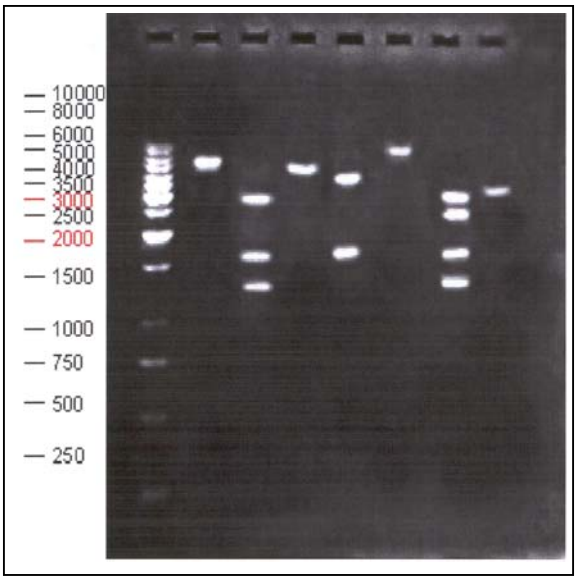
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]



شکل شماره ۱- پلاسمیدهای طراحی شده برای بررسی فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین 3C. نواحی نشان داده شده در پرانتز، بخشهای ناقصی از ژنهای مرتبط می‌باشند. همان گونه که در تصویر آمده است، pFG1 دارای بخشهای کاملی از 5'-UTR، 2B و 2A و بخشهای ناقصی از VP0، VP1 و 2C می‌باشد. در pFG1.1، ناحیه 5'-UTR، به میزان ۶۷۲ نوکلئوتید از pFG1 کوتاه‌تر می‌باشد. پلاسمید pFG3، واجد تمامی نواحی pFG1 بعلاوه توالی‌های 3C و 3D و دنباله polyA است.

پس از تکثیر پلاسمیدها و استخراج DNA آنها، برای تأیید، با آنزیم‌های محدودالاثر، به طور مجزا هضم شدند و الکتروفورز گردیدند و پس از عکسبرداری، توسط Gel document مورد بررسی قرار گرفتند و اندازه هر قطعه با توجه به مارکر DNA مشخص شد.

همان گونه که در شکل شماره ۲ دیده می‌شود، پس از هضم پلاسمید pFG1 با آنزیم PstI، سه باند، پس از هضم پلاسمید pFG1 با آنزیم HindIII، تنها یک باند ۵۵۰۰ نوکلئوتیدی، پس از هضم وکتور pUBS با آنزیم HindIII، تنها یک باند در حدود ۲۶۰۰ نوکلئوتیدی، پس از هضم پلاسمید pFG3 با آنزیم PstI، ٤ باند، پس از هضم پلاسمید pFG1.1 با آنزیم PstI، تنها ۲ باند و پس از هضم پلاسمید pFG1.1 با آنزیم BamHI نیز، ۲ باند مشاهده گردید.

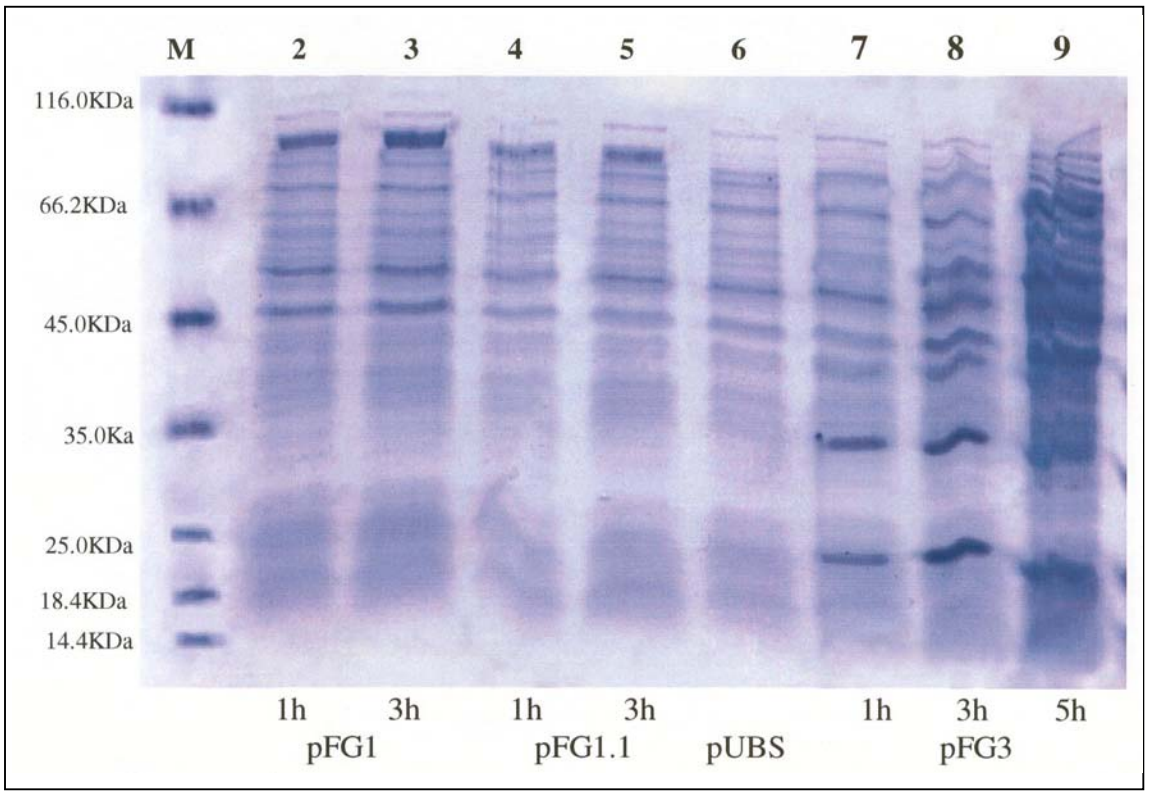


شکل شماره ۲- نتایج بررسی اثر آنزیم‌های محدودالاثر بر روی پلاسمیدهای طراحی شده در سمت چپ مارکر 1kb و وزن مولکولی مربوط به هر باند مشخص شده است. ۱- پلاسمید pFG1 ۲- پلاسمید pFG1 برش داده شده با آنزیم Pstl ۳- پلاسمید pFG1.1 ٤- پلاسمید pFG1.1 برش داده شده با آنزیم Pst1 ٥- پلاسمید pFG3 برش داده شده با آنزیم Pstl ۷- پلاسمید pUBS.(نمونه‌ها در آگارز ۰/۸٪ به مدت ۸۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند.)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

همچنین پلاسمید نوترکیب pFG3 با واکنش PCR و با استفاده از یک جفت پرایمرهای تهیه شده از ژن 3C، بررسی گردید. محصول PCR، یک قطعه DNA به طول ٦٣٠ جفت باز بود. سپس پلاسمیدها برای تایید نهایی، تعیین توالی شدند. در مرحله بعد، این پلاسمیدهای نوترکیب در سیستم‌های پروکاریوتی و درون لوله‌ای(In vitro) تحت پروموتور T7، بیان گردیدند.[۲۱و ۲۲]

همان طور که شکل شماره ۳ نشان می‌دهد، پس از بیان پلاسمیدهای نوترکیب در پروکاریوت‌ها و الکتروفورز پروتئین‌ها، طرح متفاوتی مشاهده شد، بدین ترتیب که در محصولات حاصل از بیان پلاسمیدهای نوترکیب pFG1 و pFG1.1، یک باند سنگین در حدود ۹۰ کیلودالتون دیده شد؛ این باند سنگین در کنترل منفی(وکتور بیانی خالی pUBS) مشاهده نگردید، اما در محصولات حاصل از بیان پلاسمید pFG3، به جای این باند سنگین ۹۰ کیلودالتونی، چند باند سبک(بین ۲۰ تا ٤٥ کیلودالتونی) مشاهده شد(شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- نتایج بیان ژن پلاسمیدهای نوترکیب در سیستم بیانی پروکاریوتی(باکتری E.coli سوش (BL-21(DE3)، شکل فوق بیانگر نمونه‌های جمع‌آوری شده در ساعتهای مختلف بیان ژن پلاسمیدهای نوترکیب می‌باشد. پس از مارکر پروتئینی M در خطوط ۲ و ۳، محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن پلاسمید pFG1، در زمانهای یک و ۳ ساعت پس از القاء بیان ژن با IPTG قرار داده شده‌اند. در خطوط ٤ و ٥، پلاسمید pFG1.1 در زمانهای یک و ۳ ساعت، در خط ششم، وکتور خالی pUBS به عنوان شاهد منفی و در خطوط ۷ الی ۹، محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن پلاسمید pFG3 قرار دارند. همان طور که مشاهده می‌شود پس از القا و بیان ژن، در محصولات پروتئینی حاصل از پلاسمیدهای pFG1 و pFG1.1، در مقایسه با وکتور شاهد pUBS یک باند سنگین در حدود ۹۰ کیلودالتون دیده می‌شود(این پروتئین همان پلی‌پروتئین اولیه است که هیچ کلیواژی روی آن صورت نگرفته است). در نقطه مقابل، در محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن پلاسمید نوترکیب pFG3 این باند پروتئینی سنگین وزن وجود نداشته و در عوض سه باند سبک وزن ۲۰ تا ٤٠ کیلودالتونی مشاهده گردید. این موضوع، بر کلیواژ پلی‌پروتئین اولیه توسط پروتئاز ویروسی دلالت می‌کند. در سمت چپ تصویر، مارکر پروتئینی و وزن‌های مولکولی مرتبط با هر باند آمده است.(لازم به ذکر است که نمونه‌های زمان صفر «قبل از اضافه نمودن IPTG» و ۲ ساعت پس از القاء بیان ژن، در این تصویر لحاظ نگردیده‌اند.)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

پلاسمیدها در سیستم In vitro نیز بیان شدند و نتایج توسط SDS-PAGE، بررسی گردید. نتایج بدست آمده، با نتایج بیان ژن در سیستم پروکاریوتی یکسان بود، با این تفاوت که در سیستم In vitro به علت اینکه بدون سلول می‌باشد، باندها، واضح‌تر دیده می‌شدند.

بحث

در پاراکوویروس‌ها، پروتئین L(L^{pro}) وجود ندارد و از طرفی در تحقیقات قبلی نشان داده شده که بخش 2A نیز در این جنس، فاقد فعالیت پروتئازی می‌باشد، مثل حالتی که در هپاتوویروس‌ها مشاهده می‌شود.[۱۲و ۲۳]

با توجه به این اطلاعات، در این مطالعه سعی شد تا خاصیت پروتئازی 3C(مهم‌ترین پروتئاز در خانواده پیکورنا ویریده) در پاراکو ویروس‌ها بررسی شود. بدین منظور، با طراحی یک پلاسمید نوترکیب واجد ژن 3C به نام pFG3 و مقایسه با دو پلاسمید بدون ژن 3C به نامهای pFG1 و pFG1.1، به بررسی خاصیت پروتئازی بخش 3C پرداخته شد. هنگامی که پلاسمیدهای بدون ژن 3C(pFG1.1 و pFG1) بیان شدند، تنها یک باند سنگین(حدود ۹۰ کیلو دالتون) در ژل SDS-PAGE مشاهده گردید؛ این باند سنگین در کنترل منفی(وکتور خالی) وجود نداشت، اما وقتی پلاسمید واجد بخش 3C یعنی pFG3 در باکتری E.coli و روش In vitro بیان گردید، دیگر باند سنگین ۹۰ کیلو دالتونی در ژل مشاهده نگردید؛ در عوض چند باند سبک(۴۰-۲۰ کیلودالتونی) مشاهده شد. همچنین این باندهای سبک در کنترل منفی(وکتور خالی) مشاهده نشدند؛ این موضوع نشان دهنده فعالیت پروتئازی قطعه 3C در ژنوم پاراکوویروس‌ها می‌باشد. برای تأیید این موضوع، به لوله حاوی پلاسمید pFG3(واجد ژن 3C)، آنتی پروتئاز افزوده شد و نتیجه حاصل، مشابه محصولات حاصل از پلاسمید pFG1(بدون ژن 3C) بود. یعنی فقط یک باند بزرگ ۹۰ کیلودالتونی در ژل مشاهده شد.

با توجه به نتایج این مطالعه، می‌توان عنوان نمود که پاراکوویروس‌های انسانی تیپ یک، از نظر فعالیت پروتئولیتیکی، متفاوت از دیگر اعضای خانواده پیکورنا ویروس‌ها می‌باشند و به نظر می‌رسد که در پاراکوویروس‌ها، فقط پروتئین 3C دارای خاصیت پروتئازی بوده و کلیه کلیواژهای پلی پروتئین اولیه ویروس، توسط این پروتئاز انجام می‌شوند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پاراکوویروس‌های انسانی تیپ یک از نظر فعالیت پروتئولیتیکی متفاوت از دیگر پیکورنا ویروس‌ها می‌باشند و در این ویروس‌ها فقط پروتئین 3C دارای خاصیت پروتئازی بوده و کلیه کلیواژهای پلی‌پروتئین اولیه ویروس، توسط این پروتئاز انجام می‌شوند.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی(شماره ثبت: ۳٦٤) انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن مرکز و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی آن دانشگاه، ابراز می‌دارند.

فهرست منابع

1- Ruecker RR. Picornaviridae, the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 3 rd ed. New york, NY: Raven press Ltd; 1996. p. 609-54.

2- Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9: A resolutions. Science 1985; 229: 1358-65.

3- Ghazi F, PJ Hughes, T Hyypia, G Stanway. Molecular analysis of human parechovirus type 2(formerly echovirus 23). J Gen Virol 1998; 79: 2641-50.

4- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 22nd ed. New york: Appleton & Lange; 2001. p. 418-32.

5- Van Regenmortel HV, Bishop DHL, Fauquet CM. Virus toxonomy: Seventh report of ICTV. Academic press London 2000; 662-712.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

6- Stanway G, Hyypia T. Parechoviruses. J Virol 1999; 73: 5249-54.

7- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalaka AM. Principles of virology. 1st ed. Washington, DC: ASM press; 2000. p. 162-94, 662-712.

8- Gan W, Rhoads RE. Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for elF4G, a factor involved in the picornavirus-induced switch from cap-dependent to internal initiation. J Biol Chem 1996; 271: 623-6.

9- Petersen JF, Cherney MM, Liebig HD, Skern T, Kuechler E, James MN. The structure of the 2A proteinase from a common cold Virus: A proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. EMBO J 1999; 18: 5463-75.

10- Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. Nature 1981; 291: 547-53.

11- Belnap DM, Filman DJ, Trus BL. Molecular tectonic model of virus structural transitions: The putative cell entry states of poliovirus. J Virol 2000; 74: 1342-54.

12- Stanway G, N Kalkkinen, M Roivainen, F Ghazi, M Khan, M Symth, et al. Molecular and biological characteristics of echovirus 22: A representative of a new picornavirus group. J Virol 1994; 68: 8232-8.

13- Jia XY, Summers DF, Ehrenfeld E. Primary cleavage of the HAV capsid protein precursor in the middle of the proposed 2A coding region. Virology 1993; 193: 515-19.

14- Kean KM, Teterina NL, Marc D, Girard M. Analysis of putative active site residues of the poliovirus 3C protease. Virology 1991; 181: 609-19.

15- Hyypia T, C Horsnell, M Maaronen, M Khan, N Kalkkinen, P Auvinen, et al. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 8847-51.

16- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of E.coli and other bacteria. Methods Enzymol 1991; 204: 63-113.

17- Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 1990; 96: 23-8.

18- Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem 1981; 114: 193-7.

19- Sambrook KJ, Russell DW. In molecular cloning. 3rd ed. New York NY: cold spring harbor laboratory press; 2001. p. 1-31.

20- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendroff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods in Enzymology 1990; 185: 60-89.

21- Moffatt BA, Studier FW. Use of Bacteriophage T-7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Molecular Biology 1986; 189(1): 113-30.

22- Villa-Komaroff L, Guttman N, Baltimore D, Lodishi HF. Complete translation of poliovirus RNA in a eukaryotic cell-free system. Proc natl Acad Sci USA 1975; 72: 4157-61.

23- Schultheiss T, Emerson SU, Purcell RH, Gauss-Muller V. Polyprotein processing in echovirus 22: A first assessment. Biochem Biophys res Commun 1995; 217: 1120-7.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]

Molecular Analysis of Proteolytic Activity of 3C Protein in Human Parechovirus Type 1

***F. Ghazi, PhD** [I] ***A.A. Gorzin, MSc** [II] ***M.Sh. Shahrabadi, PhD** [III]
***B. Dabirmanesh, MSc** [IV]

Abstract

Background & Aim: Human parechovirus is a genus of picornaviruses which includes a number of important viruses of clinical significance. Recent sequence analysis suggests that human parechovirus type 1(HPEV-1) is distinct from other picornaviruses and lacks the motives believed to be involved in the protease function of 2A. The aim of this study was to analyse proteolytic activity of 3C protein in human parechovirus type 1.

Materials and Method: The region of HPEV-1 cDNA that was coded for 3C protein was inserted into plasmid pUBS by Ligase enzyme and pFG3 recombinant plasmid was prepared. After transformation and replication of this plasmid in E.coli MC 10.22, DNA was isolated by phenol extraction and then expressed in prokaryotic(E.coli BL-21) and in vitro systems under T7 promoter. The results were detected by SDS-PAGE and analyzed.

Results: The products of expression of recombinant plasmid(not included 3C gene) in both prokaryotic and in vitro systems were analyzed. Just one large band(90 KD) was observed, but with plasmid including 3C gene, several small bands were detected. These results indicated proteolytic activity of 3C protein. After addition of anti protease to the products of plasmid with 3C gene the result was the same as the plasmid without 3C gene.

Conclusion: The results showed that HPEV-1 has a processing strategy different from other members of picornaviruses, and 3C protein seems to be the only virus encoded protease that can catalyze cleavages of all sites in the parechoviruses primery polyprotein.

Key Words: 1) Picornaviruses 2) Human Parechoviruses 3) 3C Protease 4) Gene Expression

***I*)** *Associate Professor, PhD Molecular biology, Medical College, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
***II*)** *MSc Virology.*
***III*)** *Professor, PhD in Virology, Medical College, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*
***IV*)** *MSc Biochemistry.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-17]