

# کلونینگ ژن کدکننده آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B در اشرشیاکولی

## چکیده

زمینه و هدف: عفونت ویروس هپاتیت B در سراسر جهان آندمیک است. حدود ۳۵۰ میلیون ناقل ویروس هپاتیت B در جهان وجود دارد. حدود یک میلیون نفر در سال به دنبال عفونت ویروس هپاتیت B تلف می‌شوند. متاسفانه دارویی که بتواند به درمان کامل هپاتیت B بینجامد، وجود ندارد و تنها راه جهت کنترل اپیدمی‌ها، انجام واکسیناسیون می‌باشد. اندازه‌گیری مقدار DNA ویروسی برای شناسایی افرادی که دارای عفونت مزمن هستند، مورد استفاده قرار می‌گیرد، همچنین بررسی و پیش‌بینی سیر درمان بیماری و تاثیر داروهای ضد ویروسی در رژیمهای درمانی کاربرد دارد. با معرفی Real-time PCR در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، اندازه‌گیری DNA ویروس در نمونه‌های بالینی به طور معنی‌داری توسعه پیدا کرده است. هدف از این مطالعه، کلونینگ و شناسایی ژن کدکننده آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B به عنوان استاندارد خارجی است.

روش بررسی: این تحقیق یک مطالعه توصیفی می‌باشد. برای تکثیر ژن S، ابتدا ژنوم ویروس از نمونه سرم که از نظر [HbsAg] Hepatitis B surface Antigen) با روش PCR (Polymerase chain reaction) مثبت بود، استخراج شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعه‌ای از ژن S با روش pTZ-57R (فرمانتا) استفاده گردید. پس از خالص‌سازی، محصول PCR به داخل وکتور پلاسمیدی کلون شد و به داخل سلول مستعد E.Coli TG1، ترانسفورم شد. باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب با روش‌های مختلف مقاومت به آنتی‌بیوتیک، PCR، برش با آنزیم‌های اختصاصی و در نهایت تعیین توالی، مورد بررسی قرار گرفت. برای آنالیز آماری، از آزمون t و محاسبه میانگین تعداد کلیه‌های شمارش شده بر روی پلت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک و بدون آن استفاده گردید.

یافته‌ها: پس از استخراج DNA ویروسی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ژن S با روش PCR تکثیر شد و قطعه‌ای شامل ۱۷۵ جفت باز حاصل گردید، سپس ژن S با استفاده از پلاسمید pTZ57R کلون گردید. پلاسمید نوترکیب استخراج شد و با روش PCR و برش آنزیمی، مورد تایید قرار گرفت. برای تایید نهایی، پلاسمید نوترکیب تعیین توالی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که قطعه ۱۷۵ جفت بازی ژن S در پلاسمید pTZ57R کلون گردیده است که می‌توان از آن، جهت تهیه استاندارد Real-time PCR یا کنترل مثبت در آزمایش‌ها استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: ۱- کلونینگ ۲- استاندارد خارجی ۳- اشرشیاکولی  
۴- آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۱۹، تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۱۴

(I) استادیار و Ph.D ویروس‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، تهران، ایران (\* مؤلف مسؤول).  
(II) استادیار و Ph.D اینشناختی پزشکی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، تهران، ایران.  
(III) مریمی و عضو هیات علمی و کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، تهران، ایران.  
(IV) استادیار و Ph.D ویروس‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، تهران، ایران.

## مقدمه

HBV DNA  $10^9$  الی  $10^{10}$  کپی در میلی لیتر می باشد. این آزمایش ها از حساسیت پایینی برخوردار می باشند و دامنه شناسایی DNA در این روشها، محدود می باشد.<sup>(۹)</sup> با توسعه و ورود داروهای ضد ویروسی بهتر و جدیدتر، نظرات بر بیماران بسیار اهمیت یافته است، چون استفاده از این داروها باعث ایجاد سویه های ویروسی مقاوم به داروها شده است. بنابراین نیاز به آزمایش های حساس تر، آشکار شده است. مقدار DNA سرمی، مهم ترین فاکتور پیش آگهی دهنده سرطان کبد مرتبط به HBV می باشد، همچنین مقدار HBV DNA می تواند مارکر خوبی برای بررسی کارآیی درمان های مختلف باشد.

چندین روش برای شناسایی و ارزیابی HBV DNA توصیف شده اند که اغلب آنها بر اساس اصول ملکولی مختلف می باشند و شامل Branded DNA، PCR هستند. تعیین مقدار هیبریدیزاسیون مستقیم و PCR در نمونه های بالینی به طور قابل توجهی با ورود Real-time PCR بهبود یافته و این آزمایش، صحت بیشتری در تعیین مقدار DNA نسبت به روش های دیگر دارد. برای ارزیابی کمی نمونه ها با روش Real-time PCR نیاز به استاندارد وجود دارد که بتوان مقدار کمی نمونه ها را بر اساس منحنی استاندارد مشخص نمود.<sup>(۱۰-۱۱)</sup>

هدف از این مطالعه، کلونینگ و شناسایی ژن کدکننده آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B است تا با تولید انبوه ژن مورد نظر با اندازه یکسان، بتوان از آن به عنوان استاندارد برای محاسبه تعداد کپی ژنوم ویروس در نمونه های بالینی با استفاده از دستگاه Real-time PCR بهره برد.

## روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی می باشد. برای تخلیص DNA، ابتدا به ۲۰ میکرولیتر نمونه سرم، ۲۰ میکرولیتر بافر لیز کننده حاوی تریس - هیدروکلرید ۱۰ میلی مولار، سدیم دو سیل سولفات ۲٪، اتیلن دی آمین تراالستیک اسید یک میلی مولار و ۵۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر پروتئیناز K اضافه

حدود دو میلیون مردم در جهان به طور مزمن به هپاتیت B آلوده هستند. هپاتیت B، نهمین عامل مرگ در سراسر جهان است. بیش از ۳۵۰ میلیون مورد جدید (Hepatitis B virus)HBV در جهان بوقوع می پیوندد. روش های آزمایشگاهی استاندارد برای تشخیص HBV شامل روش های سرولوژیکی ELISA بر روی آنتی ژن سطحی هپاتیت B (HbsAg)، آنتی ژن مرکزی هپاتیت (HbsAg) و آنتی باری علیه Hbe Antigen (HBV core Antigen)B می باشد.<sup>(۱-۳)</sup>

با توجه به محدودیت در تشخیص آزمایش های سرولوژی برای بیماری های عفونی منتقله از راه تزریق خون، HBV، بالاترین خطر باقیمانده از عفونت های ویروسی یعنی  $1/630000$  را دارا می باشد که به دلیل پایین بودن بار ویروسی ( $100-200000$  کپی در هر میلی لیتر) در دوره پنجره (Window Period) و عدم حساسیت آزمایش های HBV DNA های قابل دسترس برای شناسایی HbsAg قابل تشخیص باشد، قابل انتقال هفت ها بدون اینکه HbsAg قابل تشخیص باشد، قابل انتقال است.<sup>(۴-۵)</sup>

مطالعات در مورد هپاتیت های پس از انتقال خون، نشان داده است که آزمایش HbsAg حدود  $50-60$  روز پس از عفونت، مثبت می شود که  $2-4$  هفته آن، به دلیل ویرمی پایین، HbsAg تشخیص داده نمی شود. مطالعات نشان داده است که  $10-20$  کپی از ژنوم ویروسی می تواند باعث عفونت در شامپانزه شود؛ این نشان می دهد که برای تشخیص اولیه، چقدر آزمایش ها باید حساس باشند. HBV در مرحله حاد عفونت در خون افراد آلوده ای که از نظر Ag HbsAg مثبت هستند، قابل شناسایی است. اندازه گیری HBV DNA در سرم، مهم ترین ابزار برای شناسایی افرادی است که تکثیر ویروس در آنها بالا است. تشخیص و ارزیابی کمی HBV DNA به طور وسیعی برای نظرات بر پیشرفت بیماری و درمان عفونت HBV استفاده می شود تا مشخص شود آیا درمان ضد ویروسی موفقیت آمیز بوده است یا خیر؟<sup>(۶-۸)</sup> آزمایش های تجاری قابل دسترس برای شناسایی

سانتی گراد قرار داده شد. DNA پلاسمید به روش لیز قلایایی (Mini-Prep Plasmid DNA extraction) استخراج شد. برای تایید کلونینگ ژن S ویروس هپاتیت B، از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن و برش آنزیمی استفاده شد. برای تایید کلونینگ ژن S، از روش برش آنزیمی بر روی DNA پلاسمیدی استفاده شد. برای انجام واکنش، مقدار ۳ میکرولیتر از بافر X<sub>10</sub>, ۱-۳ میکروگرم از DNA پلاسمیدی و یک واحد از آنزیم HindIII مخلوط گردید و با آب مقطر به حجم ۳۰ میکرولیتر رسانده شد و پس از مخلوط کردن، به مدت ۱-۲ ساعت یا یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم HindIII بریده و سپس در کنار مارکر با استفاده از ژل آگارز، الکتروفورز شد. برای تایید نهایی، پلاسمید نوترکیب، تعیین توالی شد.

برای محاسبه پارامتر پایداری پلاسمیدی، درصد نسبت تعداد کلنهای بر روی محیط حاوی آنتی بیوتیک بر تعداد کلنهای بر روی محیط فاقد آنتی بیوتیک با استفاده از آزمون t محاسبه گردید.

تعیین توالی مولکول DNA براساس سنتز ناقص رشته های DNA می باشد. برای تعیین توالی نوکلئوتید های ژن کلون شده، باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب کشت داده شد و عاری از هر گونه آلودگی استخراج شد و توسط روش خاتمه زنجیره DNA نشاندار با رنگ فلوروستن، تعیین توالی شد (توسط شرکت ژن فن آوران).

#### یافته ها

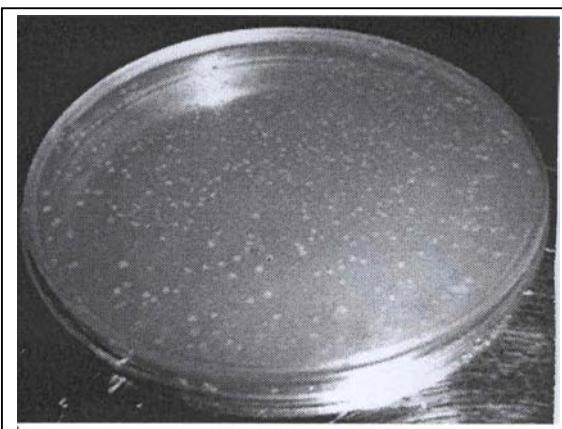
پس از استخراج DNA ویروسی و به کمک آغازگرهای اختصاصی، ژن S با روش PCR تکثیر شد. محصول PCR در کنار مارکر وزن مولکولی بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. همان گونه که در شکل شماره ۱ مشاهده می گردد، با توجه به توالی ژن S و پرایمرهای اختصاصی CACATCAGGATTCTTAGGACC21 bp forward و CAACCCTCCAATCACTCACC 20bp reverse همچنین با استفاده از مارکر وزن مولکولی ۵۰ جفت بان، اندازه محصول PCR ۱۷۵ جفت باز تعیین شد.

شد، پس از مخلوط کردن، به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم انجام شد.<sup>(۱۲)</sup>

تکثیر DNA با روش PCR و با استفاده از ۵ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر غلظت PCR، ۱ میلی مولار TaqDNA پلی مرازن، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار و ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی ۱۰ پیکومولار و طبق برنامه (دنا توره شدن ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال پرایمرهای ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی گراد و پلی مریزه شدن یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد، پلی مریزه شدن نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد) در ترمال سایکلر انجام شد. برای بررسی محصول PCR، از روش ژل الکتروفورز استفاده شد.

برای واکنش اتصال، محصول PCR با استفاده از کیت High pure purification kit Roche کلونینگ ژن S، از کلونینگ وکتور pTZ57RT (فرمتوس) استفاده شد. واکنش اتصال با استفاده از ۱-۵ واحد از آنزیم T<sub>4</sub>DNA لیگاز، ۳ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر غلظت، حدود ۱۵ میکرولیتر محصول PCR و ۲ میکرولیتر DNA پلاسمیدی (vector) به حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر انجام شد. سپس مخلوط فوق ۱۴-۱۶ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. محصول PCR در جایگاه کلونینگ پلاسمیدی، در پلاسمید pTZ57RT کلون شد. محصول واکنش اتصال، به باکتری E.coli TG1 منتقل شد. برای انتقال پلاسمید به درون باکتری، ۵-۱۰ میکرولیتر از واکنش اتصال (ligation) به سلول مستعد، اضافه و به آرامی با هم مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ گذاشته شد. به مخلوط فوق در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلا فاصله بر روی یخ منتقل گردید.<sup>(۱۳)</sup>

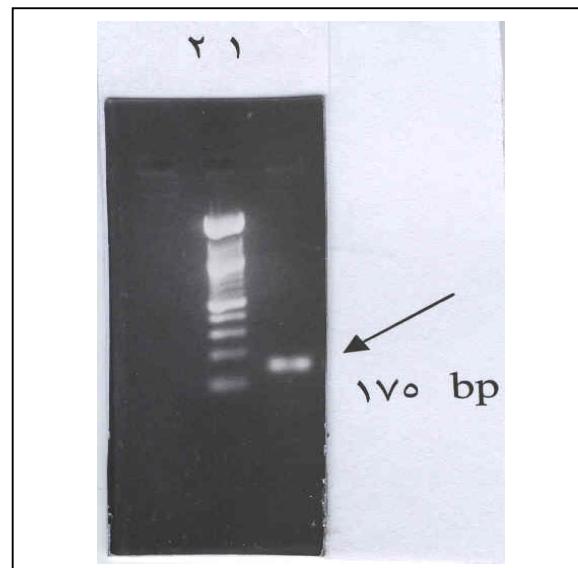
برای انتخاب کلونهای حاوی پلاسمید نوترکیب، کلنهای سفید و آبی مورد بررسی قرار گرفتند. یک کلنی سفید باکتری در ۱۰ میلی لیتر محیط لوریا (L.B.) کشت داده شد و به صورت شبانه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه



شکل شماره ۲- پلیت حاوی کلندی‌های باکتری دارای پلاسمید نوترکیب(کلندی سفید رنگ). سلولهای باکتری دریافت کننده محصول واکنش اتصال(Ligation) بر روی محیط L.B آگار حاوی آمپیسیلین، IPTG و X-Gal کشت داده شدند. کلندی‌های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب می‌باشدند که ژن S در آنها کلون شده است. کلندی‌های آبی، حاوی پلاسمید pTZ-57R می‌باشند که قادر قطعه خارجی است.

برای تایید ورود ژن S در کلون‌های نوترکیب(کلندی سفید)، از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن S استفاده شد. DNA پلاسمیدی استخراج شده از کلون نوترکیب، با آب مقطر به رقت مناسب رسانده شد. آنگاه به کمک پرایمرهای اختصاصی ژن S، واکنش PCR انجام گردید. همانطور که در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود، ستون‌های شماره ۱-۳، محصول PCR بر روی DNA پلاسمید نوترکیب حاوی ژن S می‌باشد که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شده است و در کنار(ستون شماره ۴) مارکر وزن مولکولی DNA (۱۰۰ جفت‌باز فرمانتاس)، ۱۷۵ جفت باز طول دارد. از میان کلون‌های سفید که با روش PCR، وجود ژن S در آنها تایید شده بود، DNA پلاسمیدی آنها با آنزیم‌های برش دهنده III.Hind بریده شد. در ژن S، مکان شناسایی جهت آنزیم برش دهنده وجود ندارد و در پلاسمید، فقط یک جایگاه جهت شناسایی آنزیم وجود دارد؛ بنابراین در اثر برش با این آنزیم، پلاسمیدهای نوترکیب که حاوی ژن S می‌باشند به اندازه قطعه ژن خارجی نسبت به کنترل یعنی پلاسمیدهایی که ژن S را دریافت نکرده‌اند، وزن مولکولی بالاتری دارند.

دوره چهاردهم / شماره ۵۶ / پاییز ۱۳۸۶

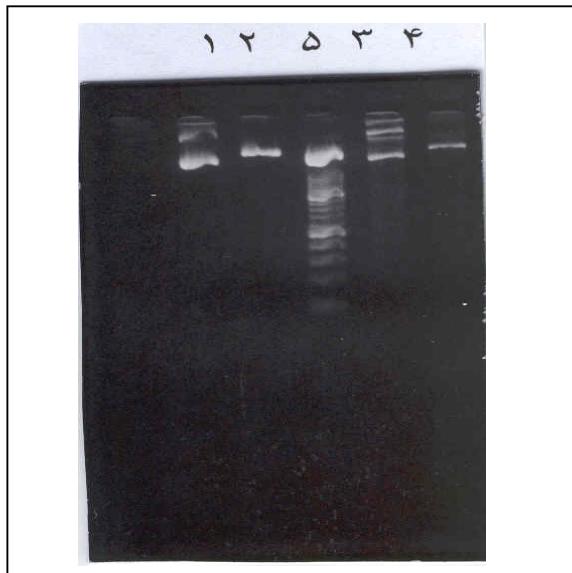


شکل شماره ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن S ویروس HBV بر روی ژل آگار ۱٪. ستون شماره ۱ مارکر وزن مولکولی ۵۰ جفت باز(فرمنتاس). ستون شماره ۲ محصول PCR ژن S با پرایمرهای اختصاصی ژن می‌باشد که ۱۷۵ جفت باز طول دارد.

جهت انتخاب کلون‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب، محصول اتصال(Ligation) ابتدا بر روی پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین، القاء کننده ایزوپروپیل - بتا - دی - تیوگالاكتوپیرانوزید(Isopropyl-Beta-D- IPTG) ۵-bromo - 4 )X-Gal و سوبستران(thiogalactopyranoside ۳- indolyl-beta- D-galactopyranoside ۵- (chloro- - برمتو - ئکلو - ۳ - ایندولیل - بتا - دی - گالاكتوپیرانوزید) کشت داده شد. پلیت‌ها از نظر تشکیل کلندی‌های سفید و آبی مورد بررسی قرار گرفتند(شکل شماره ۲).

جهت بررسی پلاسمید نوترکیب، کلندی‌های سفید همراه با یک کلندی آبی به عنوان کنترل، انتخاب و بر روی محیط LB حاوی آمپیسیلین کشت داده شدند. DNA پلاسمیدی باکتری‌ها به روش لیزقلیایی، استخراج و بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. DNA پلاسمیدهایی که نسبت به کنترل(pلاسمید pTZ-57R بدون قطعه خارجی) وزن مولکولی بالاتری داشتند، انتخاب و با روشهای دیگر مورد بررسی قرار گرفتند.

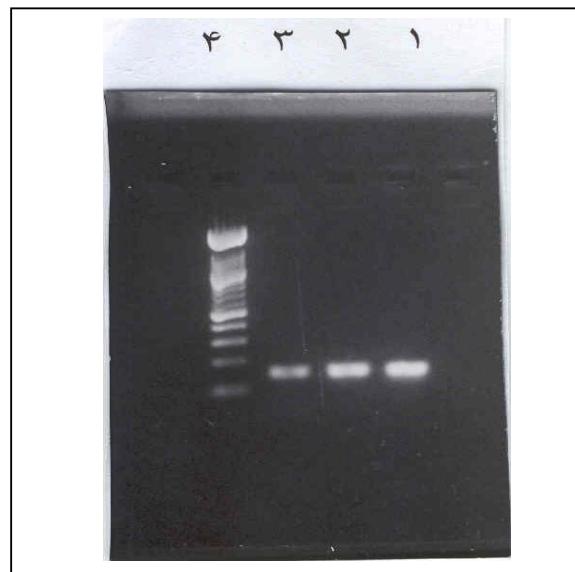
۱۶-۱۲ ساعت، تعداد کلنجها بر روی پلیت‌ها که حدود ۱۰۰ تا ۳۵۰ کلنج بودند، شمارش گردیدند و میانگین تعداد کلنج‌های شمارش شده بر روی سه پلیت، مبنای محاسبه قرار گرفت.



شکل شماره ۴- الکتروفورز محصول برش آنزیمی DNA پلاسمید و کلون نوترکیب حاوی ژن S بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون شماره ۱، ستون شماره ۲، DNA پلاسمید که با آنزیم پلاسمید بریده نشده، ستون شماره ۳، DNA پلاسمید که با آنزیم بریده شده و ۲۸۸۶ جفت باز طول دارد. ستون شماره ۴، DNA پلاسمید نوترکیب که با آنزیم نوترکیب بریده نشده، ستون شماره ۵، DNA پلاسمید نوترکیب که با آنزیم بریده شده است و ۳۰۶۱ جفت باز طول دارد. ستون شماره ۶، مارکر وزن مولکولی است.

#### بحث

بطور کلی برای اندازه‌گیری کمی هدف‌های ژنومی از قبیل DNA ژنومی HBV، یک استاندارد معتبر و صحیح لازم است. برای تهیه استاندارد DNA، اغلب DNA پلاسمید یا محصول PCR، انتخاب اول هستند، چون تهیه آنها ساده و آسان می‌باشد. اولین مرحله در تهیه استاندارد، داشتن قطعه‌ای یکسان و یکنواخت از ژنوم ویروس می‌باشد که در تمام موارد آزمایش به طور ثابت در واکنش وارد شده و تکثیر شود. کلونینگ قطعه ژنی مورد نظر در وکتورهای پلاسمیدی و تولید یکسان و انبوی ژن، بهترین روش برای تهیه استاندارد جهت واکنش Real-time PCR است. این روش دارای مزایایی بر استفاده از تکثیر ژن با روش PCR



شکل شماره ۳- الکتروفورز محصول PCR کلون‌های نوترکیب بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون‌های شماره ۱-۳، محصول PCR بر روی DNA پلاسمید نوترکیب حاوی ژن S می‌باشند که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شده است و ۱۷۵ جفت باز طول دارد. ستون شماره ۴ مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ DNA جفت باز (فرمتوس) می‌باشد.

همانطور که در شکل شماره ۴ مشاهده می‌گردد، ستون شماره ۴، DNA پلاسمید کلون نوترکیب حاوی ژن S می‌باشد که با آنزیم بریده شده است و ۳۰۶۱ جفت باز طول دارد، در مقابل، ستون شماره ۲، pTZ-57R DNA پلاسمید بدون قطعه خارجی می‌باشد که با آنزیم بریده شده و ۲۸۸۶ جفت باز طول دارد.

توالی ژن S ویروس هپاتیت B که در پلاسمید pTZ-57R کلون شده بود، توسط روش خاتمه زنجیره توسط شرکت ژن فن آوران تعیین شد. توالی حاصل از Sequencing، با استفاده از برنامه Blast، با توالی‌های موجود در بانک ژنی مورد بررسی قرار گرفت و آشکار گردید که ۱۷۵ جفت باز از ژن کد کننده آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B(S) در این پلاسمید کلون گردیده است. طی فواصل زمانی معین، باکتری حاوی کلون‌های نوترکیب، بر روی پلیت‌های حاوی محیط لوریا با و بدون آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت

در این مطالعه برای تهیه استاندارد خارجی، از وکتور پلاسمیدی pTZ57R استفاده شد و حدود ۱۷۵ جفت باز از ژن S به داخل وکتور پلاسمیدی کلون گردید و به داخل باکتری اشرشیاکولی سویه TG<sub>1</sub> ترانسفورم شد.

در دو مطالعه PAS<sup>(۱۴)</sup> و Sum<sup>(۱۶)</sup>، از طول متفاوت ژن HBV برای تهیه استاندارد استفاده شده بود، در هر دو مطالعه تغییرات بین آزمایش‌ها و طی یک نوبت کاری (intra&inter assay) معنی‌دار نبود که نشان دهنده دقیق (precision) آزمایش می‌باشد و در هر دو مطالعه از پانل VQC برای استاندارد کردن پلاسمیدها استفاده شده بود. دامنه سنجش HBV DNA در آزمایش Sum، ۱۰۰ کپی در هر میلی لیتر سرم بود که بالاترین حساسیت را دارا می‌باشد. در مطالعه PAS، دامنه سنجش HBV DNA، ۱۰<sup>-۱۰</sup> کپی در هر میلی لیتر بود که نشان دهنده حساسیت بالای این روش می‌باشد. با توجه به اینکه PAS و Sum به ترتیب از ۳/۲ کیلو جفت باز و ۱۱۱ جفت باز، ژنوم ویروس هپاتیت B را جهت تهیه استاندارد کلون کردند، هر دو مطالعه از نظر سنجش مقدار HBV DNA، حساسیت، ویژگی و خطی بودن منحنی استاندارد، نتایج مشابهی داشتند؛ به همین دلیل در این مطالعه از ۱۷۵ جفت باز از ژن S HBV جهت کلونینگ استفاده گردید.

در این مطالعه برای بررسی پایداری پلاسمید نوترکیب به عنوان استاندارد، کلنی باکتری در دمای ۳۷، ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۴، ۱۲ و ۸ ساعت انکوبه گردید، سپس DNA پلاسمید نوترکیب، خالص سازی شد و وجود ژنوم ویروسی در آنها با روش‌های PCR و برش آنزیمی، مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

همچنین جهت بررسی پایداری پلاسمید و حضور ژن در آن، باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب ۱۰ بار به طور مکرر پاساژ داده شد. همچنین پس از طی یک هفته، یک ماه و ۶ ماه بعد، کلنی‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک و بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. پلاسمید آنها استخراج شد

می‌باشد. در روش PCR، احتمال وجود قطعات ژنی با اندازه‌های مختلف وجود دارد که می‌تواند اثر منفی در تهیه استاندارد داشته باشد، بعلاوه در روش کلونینگ، تولید انبوه قطعات ژنی، آسان‌تر و ارزان‌تر صورت می‌پذیرد و فقط با کشت کلونی باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب می‌توان پلاسمید نوترکیب را خالص ساخت و مورد استفاده قرار داد.

مطالعات مختلف، از اندازه‌های مختلف ژن ویروس هپاتیت B و وکتورهای پلاسمیدی مختلف برای تهیه استاندارد استفاده کردند. PAS و همکاران<sup>(۱۴)</sup> در مطالعه خود، از پلاسمید PBR322 به عنوان وکتور استفاده کردند، آنها ۲/۲×۱۰<sup>۳</sup> جفت باز از ژنوم HBV را به درون این پلاسمید کلون کرده و از آن به عنوان استاندارد خارجی در واکنش Real-time PCR استفاده کردند.<sup>(۱۴)</sup> آنها برای استاندارد کردن آزمایش خود، منحنی استاندارد پلاسمیدی را در دامنه ۷×۱۰<sup>-۷</sup>-۳۷۳ کپی در میلی لیتر رسم کردند و برای معتربر سازی (validation) پلاسمید نوترکیب، از پانل

Viral quality control (VQC) استفاده کردند.

Leb و همکاران<sup>(۱۵)</sup> حدود ۱۷۳ جفت باز از ژن HBV را به داخل وکتور پلاسمیدی PCR11-TOPO (که یک وکتور تجاری است) کلون کردند. آنها پلاسمید نوترکیب را خالص سازی کرده و سپس با آنزیم Hind III برش دادند تا به صورت خطی در آید، سپس غلظت DNA را با روش VQC منحنی استاندارد آن را رسم نمودند.<sup>(۱۵)</sup>

و همکاران<sup>(۱۶)</sup> برای تهیه استاندارد HBV، از باکتریوفاژ M13 به عنوان وکتور استفاده کردند، آنها جفت باز از ژن S که اسید آمینه‌های ۱۶۴-۱۲۷ ژن را شامل می‌شد، در فاژ M13 کلون کردند و به داخل سویه JM101 باکتری اشرشیاکولی ترانسفورم نمودند. استفاده از فاژ M13 در تهیه استاندارد خارجی، دارای این مزیت است که استخراج DNA لازم ندارد و براساس تعداد واحدهای تشکیل دهنده پلاک می‌توان مقدار کپی ژنوم را شمارش کرد.<sup>(۱۶)</sup>

6- Shyamala V, Arcangel P, Cottrell J, Coit D, Medina-Selby A, McCoin C, et al. Assessment of Target-capture PCR Hepatitis B virus(HBV) DNA quantitative assay and comparison with commercial HNV DNA quantitative assays. *J of Clin Microbiol* 2004; 42(11): 5199-204.

7- Honkoop P, Niester HGM, De Man RA, Osterhaus ADME, Schalm SW, Man AD. Osterhaus. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B incidence and patterns. *J Hepatol* 1997; 26: 1393-5.

8- Niesters HGP, Honkoop EB, Haagsma RA. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudine treatment. *J Infec Dis* 1998; 177: 1382-5.

9- Zaaijer H1, Borg HT, Cuypers MC, Hermus AH, Lelie PN. Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2088-91.

10- Hendrick DA, Stowe BJ, Hoo BS, Kolberg J, Irvine BD, Neuwald PD, et al. Quantitation of HBV DNA in human serum using branched DNA signal amplification assay. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 537-46.

11- Ho SKN, Chan TM. An overview of assay for serum HBV DNA. *Clin Lab* 2000; 46: 609-14.

12- Quanjun L, Wei Z, Hong W, Jujun Z, Yujie Z, Zuhongl L. Detection YMDD mutation of HBV with a polyacrylamid film immobilized Nan device. IUMRS-ICEM2002; 388-94. [nanotechweb.org/dl/nanomaterials/xian-article-31-was153538.pdf](http://nanotechweb.org/dl/nanomaterials/xian-article-31-was153538.pdf).

13- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory, coldspring. 3rd ed. Ny 2001; 1.31-1.138.

14- Pas S, Fries E, Deman RA, Osterhaus ADM, Niesters H. Development of a quantitative Real-Time detection assay for Hepatitis B virus DNA and comparison with two commerical assays. *J of Clin Microbiol* 2000; 38(8): 2897-901.

15- Leb V, Srocher M, Valentine E, Holzi G, Kessler H, Stekel H. Fully automated, internally controlled quantification of Hepatitis B virus DNA by Real-Time PCR by use of the MagNA pure LC and light cycler instruments. *J of Clin Microbiol* 2004; 42(2): 585-90.

16- Sum SM, Wong DKH, Yuen MF, Yuan HJ, Yu J, Lai CL, et al. Real-time PCR assay using molecular beacon for quantitation of Hepatitise B virus DNA. *J of Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3438-40.

و با روش‌های PCR و برش آنزیمی، مورد بررسی قرار گرفت.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پلاسمید pTZ57R برای کلینیک ژن S HBV مناسب می‌باشد. استفاده از روش کلینیک برای تهیه پلاسمید نوترکیب به عنوان استاندارد، روشی ساده و ارزان می‌باشد. همچنین پلاسمید حاوی ژنوم ویروس، توانایی حفظ ژن را دارا است و می‌توان از آن برای تهیه استاندارد خارجی در واکنش Real-time PCR استفاده نمود.

### تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران در قالب طرح تحقیقاتی (شماره ثبت: ۲۰۱۲۶/خ) انجام گردیده است که بدین وسیله نویسنگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

### فهرست منابع

1- Lai VCH, Guan R, Wood ML, Lo SK, Yung M-F, Lai C-L. Nucleic acid-based cross-linking assay for detection of hepatitis B virus DNA. *J of Clin Microbiol* 1999; 37(2): 161-4.

2- Ohkubo KY, Kato Y, Ichikawa T, Kajiya Y, Takeda Y, Higashi S, et al. Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2663-8.

3- Yuen MF, Lai CL. Debates in hepatitis how to assess HBV DNA reduction in association with therapy. *Viral Hepat Rev* 1999; 5: 159-75.

4- Biswas RE, Tabor E, Hsia CC, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW, et al. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assay for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003; 43: 788-98.

5- Ulrich PP, Bhat RA, Seto B, Mack D, Sninsky J, Vvas Gn. Enzymatic amplification of hepatitis B virus in serum compared with infectivity testing in chimpanzees. *J Infec Dis* 1989; 160: 37-43.

# *Cloning of Hepatitis B Virus Surface Antigen(HbsAg) Encoded Gene in E.Coli*

I                    II                    III  
*\*Z. Sharifi, PhD*      *F. Yari, PhD*      *Sh. Samiee, MSc*  
 IV  
*M. Mahmoodian Shoshtari, PhD*

## *Abstract*

**Background & Aim:** Hepatitis B virus(HBV) infection is endemic worldwide. It is estimated every year more than 350 million people become infected with HBV(new cases) worldwide. Unfortunately, there are no satisfactory drugs to cure HBV and related diseases and the only way to control it is through vaccination. Measurements of HBV DNA levels are routinely used to identify infectious chronic carriers and to predict and monitor the efficacies of antiviral treatment regimens. The quantification of HBV DNA in clinical specimens has significantly improved with the introduction of real-time PCR into routine diagnostic laboratories. The aim of this research is to study cloning and identify hepatitis B virus surface antigen(HbsAg) encoded gene as external standard.

**Material and Methods:** A descriptive study was done on hepatitis B virus suface antigen encoded gene. Genomic DNA was extracted from HbsAg positive serum sample and amplified by PCR. The amplified segments were cloned in pTZ57R plasmid vector. After purification the PCR product was cloned in plasmid vector and transformed into susceptible E.coli(TG1 strain) cell. The bacteria containing the new combination plasmid was than evaluated for antibiotic resistance, PCR, enzyme cleavage and sequencing. The mean of colony numbers that grew in plates with and without ampicilin and also statistical analysis, T-student test was used.

**Results:** After extraction of viral DNA, Sgene was amplified by PCR; 175 bp fragment was generated. S gene was than cloned by PT2 57R plasmid. The new plasmid was extracted and was confirmed by enzyme cleavage and PCR. For final confirmation it underwent sequencing.

**Conclusion:** According to the results the 175 bP fragment of s gene was cloned into PT257R Plasmid. It can be used as external standard for real time PCR or as a positive control in laboratory.

**Key Words:** 1) Cloning    2) External Standard    3) E.Coli    4) Hepatitis B Surface Antigen

I) PhD, Assistant Professor of Medical Virology, Iranian Blood Transfusion Organization Research center, Shaheed Hemmat and Chamran Highway crossing(\*Corresponding Author)

II) PhD, Assistant Professor of Medical Immunology, Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran.

III) MSc in Biochemistry, Instructor, Faculty Member of, Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran.

IV) PhD, Assistant Professor of Medical Virology, Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran.