کلونینگ ژن کدکننده آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B در اشرشیاکولی

*دکتر زهره شریفی I
دکتر فاطمه یاری II
شهرام سمیعی III
دکتر محمود محمودیان شوشتری IV

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 بیانجامد، 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 برای 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 کمی DNA ویروس در نمونه‌های بالینی به طور معنی‌داری توسعه پیدا کرده است. هدف از این مطالعه، کلونینگ و شناسایی ژن کدکننده آنتی‌ژن 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) مثبت بود، استخراج شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعه‌ای از ژن S با روش PCR(Polymerase chain reaction) تکثیر شد. برای کلونینگ ژن S از یک کلونینگ وکتور pTZ-57R(فرمنتاس) استفاده گردید. پس از خالص‌سازی، محصول PCR به داخل وکتور پلاسمیدی کلون شد و به داخل سلول مستعد E.Coli سویه TG1، ترانسفورم شد. باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب با روشهای مختلف از قبیل 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 کلنی‌های شمارش شده بر روی پلیت‌های 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 جفت‌بازی 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 – آنتی‌ژن 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 ایمنی‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، تهران، ایران.
III) مربی 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

مقدمه

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 HBV(Hepatitis B virus) در جهان بوقوع می‌پیوندد.

روشهای آزمایشگاهی استاندارد برای تشخیص HBV، شامل روشهای سرولوژیکی ELISA بر روی آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B(Hepatitis B surface Antigen=HbsAg)، آنتی‌بادی علیه HbsAg، آنتی‌ژن مرکزی هپاتیت B(HBV core Antigen) و Hbe Antigen می‌باشد.[۱-۳]

با توجه به محدودیت در تشخیص آزمایش‌های سرولوژی برای بیماری‌های عفونی منتقله از راه تزریق خون، HBV، بالاترین خطر باقیمانده از عفونت‌های ویروسی یعنی ۱/۶۳۰۰۰۰ را دارا می‌باشد که به دلیل پایین بودن بار ویروسی(۲۰۰۰۰۰-۱۰۰ کپی در هر میلی‌لیتر) در دوره پنجره(Window Period) و عدم حساسیت آزمایش‌های کیفی قابل دسترس برای شناسایی HBV DNA، هفته‌ها بدون اینکه HbsAg قابل تشخیص باشد، قابل انتقال است.[۴و ۵]

مطالعات در مورد هپاتیت‌های پس از انتقال خون، نشان داده است که آزمایش HbsAg حدود ۶۰-۵۰ روز پس از عفونت، مثبت می‌شود که ۴-۲ هفته آن، به دلیل ویرمی پایین، HbsAg تشخیص داده نمی‌شود. مطالعات نشان داده است که ۲۰-۱۰ کپی از ژنوم ویروسی می‌تواند باعث عفونت در شامپانزه شود؛ این نشان می‌دهد که برای تشخیص اولیه، چقدر آزمایش‌ها باید حساس باشند. HBV DNA در مرحله حاد عفونت در خون افراد آلوده‌ای که از نظر HbsAg و HbeAg مثبت هستند، قابل شناسایی است. اندازه‌گیری HBV DNA در سرم، مهم‌ترین ابزار برای شناسایی افرادی است که تکثیر ویروس در آنها بالا است. تشخیص و ارزیابی کمی HBV DNA به طور وسیعی برای نظارت بر پیشرفت بیماری و درمان عفونت HBV استفاده می‌شود تا مشخص شود آیا درمان ضد ویروسی موفقیت‌آمیز بوده است یا خیر؟[۶-۸] آزمایش‌های تجارتی قابل دسترس برای شناسایی HBV DNA، ۷×۱۰^{۵} الی ۵×۱۰^{۹} کپی در میلی‌لیتر می‌باشد. این آزمایش‌ها از حساسیت پایینی برخوردار می‌باشند و دامنه شناسایی DNA در این روشها، محدود می‌باشد.[۹]

با توسعه و ورود داروهای ضد ویروسی بهتر و جدیدتر، نظارت بر بیماران بسیار اهمیت یافته است، چون استفاده از این داروها باعث ایجاد سویه‌های ویروسی مقاوم به داروها شده است. بنابراین نیاز به آزمایش‌های حساس‌تر، آشکار شده است. مقدار DNA سرمی، مهم‌ترین فاکتور پیش‌آگهی دهنده سرطان کبد مرتبط به HBV می‌باشد، همچنین مقدار HBV DNA می‌تواند مارکر خوبی برای بررسی کارآیی درمان‌های مختلف باشد.

چندین روش برای شناسایی و ارزیابی HBV DNA توصیف شده‌اند که اغلب آنها بر اساس اصول ملکولی مختلف می‌باشند و شامل Branched DNA، هیبریدیزاسیون مستقیم و PCR هستند. تعیین مقدار HBV DNA در نمونه‌های بالینی به طور قابل توجهی با ورود Real-time PCR بهبود یافته و این آزمایش، صحت بیش‌تری در تعیین مقدار DNA نسبت به روشهای دیگر دارد. برای ارزیابی کمی نمونه‌ها با روش Real-time PCR، نیاز به استاندارد وجود دارد که بتوان مقدار کمی نمونه‌ها را براساس منحنی استاندارد مشخص نمود.[۱۰و ۱۱]

هدف از این مطالعه، کلونینگ و شناسایی ژن کدکننده آنتی‌ژن 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 نمونه‌های بالینی با استفاده از دستگاه Real-time PCR بهره برد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی می‌باشد. برای تخلیص DNA، ابتدا به ۲۰ میکرولیتر نمونه سرم، ۲۰ میکرولیتر بافر لیز کننده حاوی تریس ـ هیدروکلرید ۱۰ میلی‌مولار، سدیم دوسیل سولفات ۲٪، اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید یک میلی‌مولار و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئیناز K اضافه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

شد، پس از مخلوط کردن، به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم انجام شد.[۱۲]

تکثیر DNA با روش PCR و با استفاده از ۵ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر غلظت PCR، ۱ میلی‌مولار TaqDNA پلی‌مراز، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار و ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی ۱۰ پیکومولار و طبق برنامه (دناتوره شدن/۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرهای ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و پلی‌مریزه شدن یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، پلی‌مریزه شدن نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) 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 purfication kitRoche، خالص‌سازی شد. برای کلونینگ ژن S، از کلونینگ وکتور pTZ57RT(فرمنتاس) استفاده شد. واکنش اتصال با استفاده از ۵-۱ واحد از آنزیم T_4DNA لیگاز، ۳ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر غلظت، حدود ۱۵ میکرولیتر محصول PCR و ۳ میکرولیتر DNA پلاسمیدی (vector) به حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر انجام شد. سپس مخلوط فوق ۱۶-۱۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. محصول PCR در جایگاه کلونینگ DNA پلاسمیدی، در پلاسمید pTZ57RT کلون شد. محصول واکنش اتصال، به باکتری E.coli سویه TG1 منتقل شد. برای انتقال پلاسمید به درون باکتری، ۱۰-۵ 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 سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله بر روی یخ منتقل گردید.[۱۳]

برای انتخاب کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، کلنی‌های سفید و آبی مورد بررسی قرار گرفتند. یک کلنی سفید باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط لوریا(L.B) کشت داده شد و به صورت شبانه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. DNA پلاسمید به روش لیز قلیایی(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 تأیید کلونینگ ژن S، از روش برش آنزیمی بر روی DNA پلاسمیدی استفاده شد. برای انجام واکنش، مقدار ۳ میکرولیتر از بافر ۱۰X، ۳-۱ 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 ۲-۱ ساعت یا یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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.

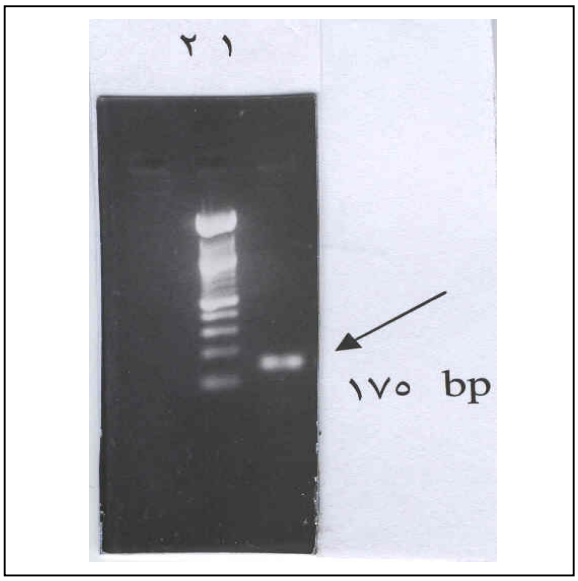
برای محاسبه پارامتر پایداری پلاسمیدی، درصد نسبت تعداد کلنی‌ها بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک بر تعداد کلنی‌ها بر روی محیط فاقد آنتی‌بیوتیک با استفاده از آزمون t محاسبه گردید.

تعیین توالی مولکول DNA براساس سنتز ناقص رشته‌های DNA می‌باشد. برای تعیین توالی نوکلئوتیدهای 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 فلوئورسنت، تعیین توالی شد(توسط شرکت ژن فن‌آوران).

یافته‌ها

پس از استخراج DNA ویروسی وبه 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 می‌گردد، با توجه به توالی ژن S و پرایمرهای اختصاصی CACATCAGGATTCCTAGGACC21 bp forward و CAACCCTCCAATCACTCACC 20bp reverse و همچنین با استفاده از مارکر وزن مولکولی ۵۰ جفت باز، اندازه محصول PCR، ۱۷۵ جفت باز تعیین شد.

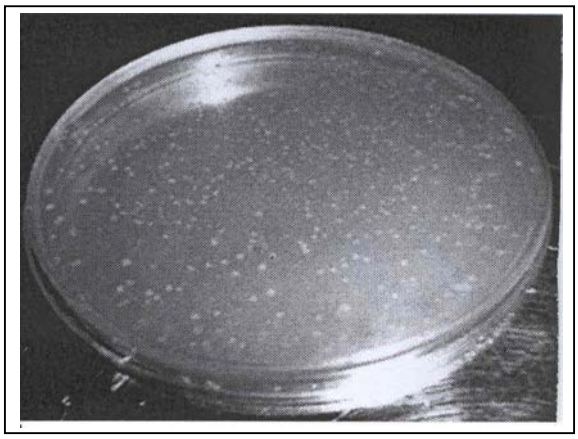
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]



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 - تیوگالاکتوپیرانوزید(Isopropyl-Beta-D-=IPTG thiogalactopyranoside) و سوبسترای X-Gal(5-bromo -4 -chloro- 3- indolyl-beta- D-galactopyranoside)(۵ - برمو - ٤کلرو - ۳ - ایندولیل - بتا - دی - گالاکتوپیرانوزید) کشت داده شد. پلیت‌ها از نظر تشکیل کلنی‌های سفید و آبی مورد بررسی قرار گرفتند(شکل شماره ۲).

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

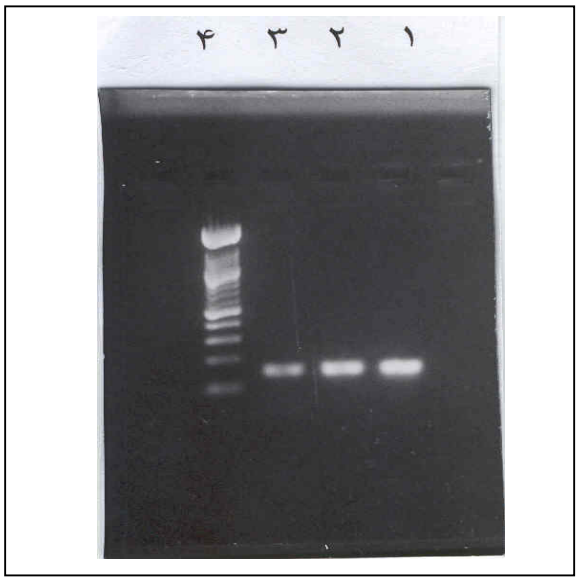


شکل شماره ۲- پلیت حاوی کلنی‌های باکتری دارای پلاسمید نوترکیب(کلنی سفید رنگ). سلولهای باکتری دریافت کننده محصول واکنش اتصال(Ligation) بر روی محیط L.B آگار حاوی آمپی‌سیلین، IPTG و X-Gal کشت داده شدند. کلنی‌های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب می‌باشند که ژن S در آنها کلون شده است. کلنی‌های آبی، حاوی پلاسمید pTZ-57R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

برای تایید ورود ژن S در کلون‌های نوترکیب(کلنی 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 ۳-۱، 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 ٤) مارکر وزن مولکولی DNA (۱۰۰ جفت‌باز فرمنتاس)، 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 Hind III، 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.

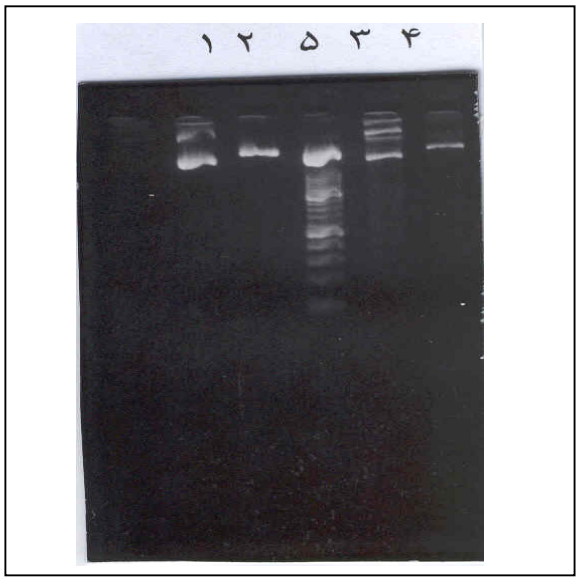
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]



شکل شماره ۳- الکتروفورز محصول PCR کلون‌های نوترکیب بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون‌های شماره ۳-۱، 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 ٤ مارکر وزن مولکولی DNA ۱۰۰ جفت باز(فرمنتاس) می‌باشد.

همانطور که در شکل شماره ٤ مشاهده می‌گردد، ستون شماره ٤، DNA پلاسمید کلون نوترکیب حاوی ژن S می‌باشد که با آنزیم بریده شده است و ۳۰٦۱ جفت باز طول دارد، در مقابل، ستون شماره ۲، DNA پلاسمید pTZ-57R بدون قطعه خارجی می‌باشد که با آنزیم بریده شده و ۲۸۸٦ 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 فن‌آوران 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 جفت‌باز از ژن کد کننده آنتی‌ژن 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 ۱٦-۱۲ ساعت، تعداد کلنی‌ها بر روی پلیت‌ها که حدود ۱۰۰ تا ۳۵۰ کلنی بودند، شمارش گردیدند و میانگین تعداد کلنی‌های 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، DNA پلاسمید بریده نشده. ستون شماره ۲، DNA پلاسمید که با آنزیم بریده شده و ۲۸۸٦ جفت باز طول دارد. ستون شماره ۳، DNA پلاسمید نوترکیب بریده نشده. ستون شماره ٤، DNA پلاسمید نوترکیب که با آنزیم بریده شده است و ۳۰٦۱ جفت باز طول دارد. ستون شماره ۵، 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 انبوه ژن، بهترین روش برای تهیه استاندارد جهت واکنش Real-time PCR است. این روش دارای مزایایی بر استفاده از تکثیر ژن با روش PCR

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

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[۱۴] در مطالعه خود، از پلاسمید PBR322 به عنوان وکتور استفاده کردند، آنها ۳/۲×۱۰۳ 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.[۱۴] آنها برای استاندارد کردن آزمایش خود، منحنی استاندارد پلاسمیدی را در دامنه $۳۷۳-۷\times۱۰^{۶}$ کپی در میلی‌لیتر رسم کردند و برای معتبر سازی(validation) پلاسمید نوترکیب، از پانل VQC(Viral quality control) استفاده کردند.

Leb و همکاران[۱۵] حدود ۱۷۳ جفت باز از ژن HBV را به داخل وکتور پلاسمیدی PCR11-TOPO(که یک وکتور تجارتی است) کلون کردند. آنها پلاسمید نوترکیب را خالص‌سازی کرده و سپس با آنزیم Hind III برش دادند تا به صورت خطی در آید، سپس غلظت DNA را با روش اسپکتروفتومتری تعیین کرده و به کمک پانل‌های VQC، منحنی استاندارد آن را رسم نمودند.[۱۵]

Sum و همکاران[۱۶] برای تهیه استاندارد HBV، از باکتریوفاژ M13 به عنوان وکتور استفاده کردند، آنها ۱۱۱ جفت باز از ژن S که اسید آمینه‌های ۱۶۴-۱۲۷ ژن را شامل می‌شد، در فاژ M13 کلون کردند و به داخل سویه JM۱۰۱ 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.[۱۶]

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_1 ترانسفورم شد.

در دو مطالعه PAS[۱۴] و Sum[۱۶]، 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 دقت(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 میلی‌لیتر سرم بود که بالاترین حساسیت را دارا می‌باشد. در مطالعه PAS، دامنه سنجش HBV DNA، $۳۷۳-۱۰^{۱۰}$ کپی در هر میلی‌لیتر 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 HBV S جهت کلونینگ استفاده گردید.

در این مطالعه برای بررسی پایداری پلاسمید نوترکیب به عنوان استاندارد، کلنی باکتری در دمای ۳۷، ۲۵ و ٤ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲٤، ۱۲و 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 ٦ ماه بعد، کلنی‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک و بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. پلاسمید آنها استخراج شد

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

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

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پلاسمید pTZ57R برای کلونینگ ژن HBV S مناسب می‌باشد. استفاده از روش کلونینگ 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 نویسندگان 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.

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 commericial 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-was 153538.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 Hepatities 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

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

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

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 sufrace 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.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]