Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 15(69): 43-53

Expression and cloning of recombinant VP2 protein of canine parvovirus in bacterial and cell-free prokaryotic systems

Dorostkar R(M.Sc)[1], Bamdad T(Ph.D)[1]*, Saberfar E(Ph.D)[2]

1- Department of Virology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 23 Jul 2012, Accepted: 19 Sep 2012

Abstract

Background: The importance of VP2 protein of canine parvovirus to bind to human cancer cells and to detect the virus in veterinary detection kits has motivated a lot of research on the production of this protein. In this project, a surface gene of canine parvovirus (VP2) was cloned and expressed in a prokaryotic vector system and its expression was optimized in a specific cell-free prokaryotic expression system.

Materials and Methods: In this experimental study, plasmid pET-21aVP2 was constructed by cloning the PCR product of VP2 gene of canine parvovirus into the plasmid expression pET-21a vector. The best sequence was analyzed through PCR and it was followed by confirmation with sequencing and restriction digestion. To produce VP2 protein, plasmid pET-21aVP2 was transferred into *Escherichia coli*, *Rosetta (DE3)* strain, and the expression of this protein was induced by IPTG. The production of VP2 protein in both systems was evaluated using SDS PAGE technique. The expressed protein was checked with monoclonal antibody against VP2 protein by Western blotting technique.

Results: Successful cloning of VP2 protein was confirmed by enzymatic digestion and sequencing. The expression of VP2 protein in bacterial and cell-free prokaryotic systems was verified by SDS PAGE and the specific band in Western blotting also confirmed the VP2 protein.

Conclusion: The results of this study showed that VP2 gene was amplified in the cloning phases and it was successfully cloned in the expression vector. Protein expression was confirmed in both bacterial and cell-free prokaryotic systems.

Keywords: Cell-free system, expression of surface protein, parvovirus, VP2 gene

*Corresponding author:
Address: Department of Virology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: Bamdad_T@modares.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 9 (شماره پیاپی 69)، اسفند 1391، 53-43

کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب VP2 پارو ویروس سگی در دو سیستم باکتریایی و پروکاریوتی بدون سلول

روح الله درستکار[1]، طراوت بامداد[2*]، اسماعیل صابرفر[3]

1- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه ویروس شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2- دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- دانشیار، مرکز تحقیقات ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیهٔ الله، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/5/2 تاریخ پذیرش: 91/6/29

چکیده

زمینه و هدف: اهمیت پروتئین VP2 پارویروس سگی در اتصال به سلول‌های سرطانی انسانی و کیت‌های تشخیصی دامپزشکی سبب شده تا مطالعات گسترده‌ای در زمینه تولید این پروتئین صورت گیرد. هدف از انجام این پژوهش کلونینگ و تایید بیان پروتئین پوششی VP2 پارویروس سگی در سیستم پروکاریوتی و بهینه نمودن بیان پروتئین VP2 در سیستم منحصر به فرد پروکاریوتی بدون سلول می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پلاسمید pET-21a VP2 با کلون کردن محصول PCR ژن VP2 پارویروس سگی در پلاسمید بیانی pET-21a ساخته شد. توالی کلون شده ابتدا با روش کلونی PCR ارزیابی شده، سپس توسط هضم آنزیمی و توالی یابی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تولید پروتئین VP2 پلاسمید pET-21a VP2 در باکتری E.coli سویه روزتا Rosetta(DE3) منتقل و بیان این پروتئین توسط IPTG القاء گردید. پروتئین تولید شده در هر دو شرایط باکتریایی و بدون سلول توسط تکنیک SDS PAGE بررسی گردید و در نهایت به وسیله آنتی بادی منوکلونال علیه VP2 توسط تکنیک وسترن بلات ارزیابی گردید.

یافته‌ها: کلونینگ صحیح ژن VP2 با هضم آنزیمی و تعیین توالی قطعه کلون شده به اثبات رسید. بیان پروتئین VP2 در دو سیستم باکتریایی و بدون سلول توسط SDS PAGE تایید شده و در نهایت پروتئین VP2 به وسیله وسترن بلات تایید گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد، ژن VP2 در طی مراحل کلونینگ تکثیر شده و به خوبی در وکتور مورد نظر کلون گردیده است و بیان پروتئین در هر دو سیستم باکتریایی و بدون سلول به طور کامل مورد تایید قرار گرفته است.

واژگان کلیدی: سیستم بدون سلول، بیان پروتئین سطحی، پارویروس، ژن VP2

***نویسنده مسئول:** تهران، خیابان جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی
Email: Bamdad_T@modares.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

مقدمه

پارو‌ویروس سگی (canine parvovirus-CPV) متعلق به جنس پارو‌ویروس‌های غیر وابسته (Autonomous Parvovirus) می‌باشد که به طور طبیعی باعث بیماری در سگ‌ها می‌شود. این ویروس فاقد انولوپ بوده و ساختار کپسید آن بیست وجهی با قطر 26 نانومتر با ژنوم DNA تک رشته‌ای به طول 5 کیلو باز می‌باشد(1).

کپسید پارو‌ویروس سگی از دو پروتئین به نام VP1 (82 کیلو دالتون) و VP2 (64 کیلو دالتون) تشکیل شده است. پروتئین VP1 دارای همه توالی‌های پروتئین VP2 می‌باشد و علاوه بر آن 143 اسید آمینه اضافه نیز دارد(1).

90 درصد پروتئین‌های کپسید کامل ویروس را پروتئین VP2 و 10 درصد آن را پروتئین VP1 تشکیل داده است. بنابراین بخش عمده‌ای از کپسید پارو ویروس سگی به پروتئین VP2 اختصاص دارد(1). پروتئین VP2 نقش مهمی در چرخه تکثیر پارو‌ویروس سگی بر عهده دارد و بررسی نقشه اپیتوپ‌های این ویروس نشان داده است که همه اپیتوپ‌های تولید کننده آنتی بادی‌های خنثی کننده ویروس در پروتئین VP2 قرار دارد(2).

ایمن سازی حیوانات همیشه به وسیله واکسن غیر فعال پارو‌ویروس سگی انجام می‌گیرد. اما اخیراً واکسن‌های زیر واحدی شامل بخش‌هایی از آنتی ژن‌های پارو‌ویروس سگی به عنوان واکسن مورد بررسی قرار گرفته‌اند که خطر کمتری نسبت به واکسن‌های غیر فعال دارند. با توجه به اهمیت پروتئین VP2 در تکثیر پارو‌ویروس سگی غالب این مطالعات برروی بخش‌های مختلف پروتئین VP2 به عنوان واکسن صورت گرفته است. این مطالعات نشان می‌دهد هرچند قسمتی از پروتئین VP2 می‌تواند تولید آنتی بادی با تیتر بالا را بر علیه پارو‌ویروس سگی القاء نماید اما این آنتی بادی‌ها قادر به خنثی نمودن پارو‌ویروس سگی نمی‌باشند(7-3).

تحقیقات بعدی نشان داده که پروتئین‌های کامل VP2 که به صورت نوترکیب تولید شده است و خالص گردیده‌اند می‌توانند آنتی بادی‌های خنثی کننده علیه ذرات پارو‌ویروس سگی را تولید نمایند. از آنجا که پروتئین کامل VP2 دارای چندین ناحیه خنثی کننده می‌باشد این پروتئین قادر است به تنهایی حیوانات را علیه عفونت پارو‌ویروس سگی ایمن نماید(8).

پروتئین VP2 به تنهایی و بدون نیاز به پروتئین‌های دیگر می‌تواند کپسید کامل بیست وجهی را تشکیل دهد که به آن ذرات شبه ویروسی گفته می‌شود(۹،۱۰). این کپسید قادر است همانند ویروس کامل به سلول هدف متصل شود و وارد سلول گردد(3). گیرنده طبیعی پارو ویروس سگی رسپتور ترانسفرین (Transferrin Receptor -TfR) می‌باشد(11). ترانسفرین پروتئین حمل کننده آهن می‌باشد که در دوران رشد سلول به شدت نیاز می‌باشد(12). تحقیقات پریش و همکاران در سال 2000 نشان داد که ویروس پارو‌ویروس سگی علاوه بر رسپتور تراسفرین سلول‌های سگی می‌توانند به رسپتور تراسفرین سلول‌های انسانی نیز متصل شوند(11). از آنجاکه در سلول‌های سرطانی نیاز به آهن برای رشد زیاد می‌باشد، رسپتور تراسفرین به میزان بسیار زیادی بر روی انواع سلول‌های سرطانی عرضه می‌گردد(18-13). بر این اساس تحقیقات متعددی در زمینه ساخت ذرات شبه ویروسی پارو‌ویروس سگی توسط پروتئین VP2 که توانایی اتصال به رسپتور تراسفرین را دارد در سال‌های اخیر صورت گرفته است(3). با توجه به کاربردهای متعدد پروتئین VP2 در زمینه تشخیص، واکسیناسیون و هم‌چنین هدف‌گیری سلول‌های سرطانی، به کارگیری سیستمی جهت تولید و تخلیص بهینه آن ضروری به نظر می‌رسد. مطالعات گذشته نشان داده است که پروتئین VP2 بیان شده در سیستم‌های بیانی پروکاریوتی به صورت توده‌ای و انکلوژن خواهد بود و این امر سبب دشواری تخلیص پروتئین VP2 می‌گردد(19). تکنولوژی تولید پروتئین بدون سلول به عنوان یک تکنولوژی تولیدی بر بسیاری از محدودیت‌های معمول

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

فرآیند تولید و خالص سازی پروتئین فائق آمده است(24-20). در این سیستم اجازه دسترسی مستقیم و کنترل بر روی رونویسی و ترجمه برای تولید مناسب پروتئین وجود دارد. از مزایای این روش افزایش بازده تولید پروتئین، امکان کنترل شرایط محیطی مناسب مانند pH محیط و از همه مهم‌تر تخلیص آسان پروتئین مورد نظر می‌باشد(21).

بر این اساس در این پروژه بیان پروتئین VP2 در سیستم بیانی باکتریایی و هم‌چنین امکان بیان آن در سیستم بیانی پروکاریوتی بدون سلول مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی برای تکثیر و کلون نمودن ژن VP2 (GenBank accession no. M19296) ابتدا پرایمرهای مناسب طراحی گردید. به منظور کلون نمودن ژن VP2 پاروویروس سگی در ناقل بیانی pET-21a در ابتدا دو جفت پرایمر برای تکثیر این ژن طراحی گردید. طراحی این پرایمرها پس از دریافت توالی مربوطه از مرکز بین المللی اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology Information-NCBI) و استفاده از نرم افزارهای ژن رانر، بایوادیت و NCBI Blast انجام گردید.

پرایمرها برای جداسازی ژن کامل VP2 بگونه‌ای طراحی گردید که ژن VP2 دارای کدون آغازگر و اختتام باشند. جایگاه برش NdeI در پرایمر بالا دست ژن VP2 و جایگاه‌های برش BamHI در پرایمر پایین دست قرار داده شد. توالی آغازگرهای طراحی شده در جدول 1 مشخص شده است.

جدول 1. توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن VP2 (1755 جفت باز)

رفت(Ndel)	5`-TTTCATATGATGAGTGATGGAGCAGTTCAAC-3`
برگشت(BamHI)	5`-GGAGGATCCTTAATATAATTTTCTAGGTGCTAGT -3`

واکنش PCR برای ژن VP2 توسط آنزیم i-pfu ساخت شرکت اینترون انجام شد. با توجه به آن که این آنزیم خاصیت تصحیح اشتباه (Proofreading) را دارد احتمال ایجاد خطا در طی واکنش PCR کاهش می‌یابد.

غلظت مواد استفاده شده در واکنش PCR مطابق یک واکنش استاندارد PCR تنظیم گردید. حجم واکنش 25 میکرولیتر واجد بافر با غلظت 1X، کلرید منیزیوم 1/5 میلی‌مولار، dNTP 0/2 میلی‌مولار، پرایمرها 0/5 میلی‌مولار، 1 واحد آنزیم و 1 میکرولیتر نمونه و تا حجم 25 میکرولیتر آب بود.

برنامه چرخش دمایی مورد استفاده در PCR شامل 5 دقیقه دمای 95 درجه سانتی‌گراد و سپس 28 چرخه به صورت 45 ثانیه دمای 95 درجه سانتی‌گراد، 1 دقیقه دمای 64/5 درجه سانتی‌گراد، 1 دقیقه و 45 ثانیه دمای 72 درجه سانتی‌گراد و در انتهای چرخه نیز 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محصول PCR به وسیله ژل آگارز 1 درصد و توسط رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید، زیر نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

ناقل مورد استفاده در این مطالعه ناقل pET-21a (ساخت شرکت نووژن) می‌باشد. در این وکتور جایگاه Multiple Cloning Site (MCS) واجد چندین جایگاه برش آنزیم‌های با اثر محدود بوده و تحت کنترل پروموتور T7 پلیمراز می‌باشد.

در این پژوهش برای ساخت ناقل واجد ژن VP2 ابتدا محصول PCR و پلاسمید pET-21a توسط آنزیم‌های BamHI و NdeI (ساخت شرکت فرمنتاز) هضم آنزیمی شده سپس محصول PCR و پلاسمید pET-21a روی ژل آگارز بارگذاری شده و قطعات مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل (ساخت شرکت کیاژن) از ژل استخراج شدند. عمل الحاق (ligation) با استفاده از کیت T4 لیگاز (ساخت شرکت متابیون) انجام پذیرفت.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

ترانسفورماسیون در سویه Top 10 انجام شد سپس روی کلونی‌های به دست آمده، برای غربال‌گری و تأیید وجود ژن VP2 آزمایش کلونی PCR انجام پذیرفت. در انتهای این مرحله پس از استخراج پلاسمید نوترکیب حاوی ژن VP2 با کمک کیت تخلیص پلاسمید، با استفاده از هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های BamHI و NdeI و الکتروفورز آن روی ژل آگارز درستی قطعه کلون شده تایید گردید.

تأیید نهایی درستی قطعات کلون شده با تعیین توالی پلاسمید مورد نظر در شرکت بیوتک GATC انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین توالی در جدول 2 آمده است. دلیل استفاده از پرایمرهای اضافی در فرآیند تعیین توالی، بزرگ بودن ژن VP2 بوده است، به طوری که در صورتی که تعیین توالی تنها توسط پرایمرهای اطراف ژن انجام شود امکان مشخص نشدن توالی‌های میانی ژن وجود دارد. به همین دلیل یک جفت پرایمر برای قسمت‌های میانی این ژن نیز طراحی گردید تا توسط این پرایمرها نیز تعیین توالی انجام پذیرد.

جدول 2. توالی آغازگرهای مورد استفاده به منظور تعیین توالی

رفت 1	5`-TTTCATATGATGAGTGATGGAGCAGTTCAAC-3`
برگشت 1	5`-GGAGGATCCTTAATATAATTTTCTAGGTGCTAGT -3`
رفت 2	5' ATTTAACTGCATCATTGATG 3`
برگشت 2	5' TATCTTCCTGTATCTTGATG 3`

پس از تایید ژن کلون شده VP2 در پلاسمید pET-21a، پلاسمید pET-21a VP2 در باکتری اشرشیا کولای روزتا ترانسفورم می‌گردد. سپس بیان پروتئین VP2 در باکتری اشرشیا کولای سویه روزتا حاوی پلاسمید pET-21a VP2 توسط غلظت‌های مختلف IPTG شامل غلظت 0/5، 1، 1/5 و 2 میلی مولار و در مدت زمان‌های متفاوت شامل 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10 القاء گردید.

در طی این تحقیق به منظور بیان پروتئین در شرایط بدون سلول از عصاره سلولی به دست آمده از باکتری اشرشیا کولای(25) و اجزای کیت بیانی شرکت اینویتروژن با عنوان E. coli Expression System Expressway Milligram Cell-Free استفاده گردید(25).

سلول مورد نظر را E. coli strain BL21 (DE3) در 37 درجه در سه لیتر محیط کشت 2X YT در انکوباتور شیکردار کشت داده شود. زمانی که میزان جذب باکتری در جذب نوری 600 به 0/6 رسید IPTG با غلظت 1 میلی‌مولار به محیط اضافه شده و داخل انکوباتور شیکردار گذاشته تا جذب نوری 600 به حدود 4/5 برسد. سپس باکتری‌ها را سانتریفیوژ نموده و رسوب به دست آمده را توسط بافر A شستشو داده می‌شود(25). برای شستشوی سلول‌ها 3 مرتبه هر گرم از رسوب باکتری را در 20 میلی‌لیتر از بافر A حل نموده و سانتریفیوژ می‌گردد.

اجزای بافر A شامل مواد زیر می‌باشد: 10 میلی‌مولار بافر تریس استات(pH=8/2) و 14 میلی‌مولار منیزیوم و 60 میلی‌مولار پتاسیم گلوتامات و 1 میلی‌مولار دی تیو ترتیول و 0/05 درصد 2- مرکاپتواتانول.

در نهایت رسوب باکتری وزن شده و در دمای 80- قرار داده شد. پس از یک شب سلول‌ها از دمای 80- خارج نموده و 10 گرم از آن را در 12/7 میلی‌لیتر بافر B حل گردید. اجزای بافر B مانند بافر A می‌باشد ولی 2- مرکاپتواتانول در بافر B وجود نداشت.

در این مرحله سلول‌ها به طور کامل بر روی یخ توسط سونیکیتور لیز گردیدند. در مرحله بعد سلول‌های لایز شده به مدت 10 دقیقه در 12000 دور در دقیقه سانتریفیوژ

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

شده و در انتها سوپرناتانت آن جمع‌آوری شده و پس از تقسیم شدن در 80- درجه نگهداری گردید(25).

بقیه اجزای سیستم بدون سلول مانند 20 نوع اسید آمینه، انواع tRNA، اسیدهای نوکلوئیک و ATP به وسیله کیت اینویتروژن تامین گردید.

پس از آماده شدن سیستم بیانی بدون سلول در شرایط استریل و بدون RNAse و DNAse در میکروتیوپ پلاسمید حاوی ژن پروتئین VP2 به سیستم اضافه گردید و میکروتیوپ در انکوباتور شیکردار در دمای 37 درجه به مدت 4 ساعت انکوبه گردید.

برای بررسی حضور پروتئین از روش سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمیدژل الکترفور استفاده شد. در این پژوهش از ژل 10 درصد برای قسمت جدا کننده و از ژل 5 درصد برای قسمت متراکم کننده استفاده شد. بعد از باز شدن ساختار پروتئین با بافر نمونه گذاری حاوی سدیم دودسیل سولفات و قرار دادن نمونه در حرارت جوش، پروتئین‌ها روی چاهک‌های ژل بارگذاری شده و سپس با ولتاژ 110 الکتروفورز شد.

نمونه‌های الکتروفورز شده با کمک بافر انتقال و الکتروفورز از روی ژل به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. سپس بلاکینگ توسط شیر بدون چربی 5 درصد انجام شد. مراحل وسترن بلات براساس برنامه متداول و با استفاده از آنتی بادی منو کلونال علیه ژن VP2 خریده شده از شرکت ایبیکم انجام گرفت. رقت 1 به 100 از این آنتی بادی در بافر نمکی تریس رقیق شده و به مدت یک شب در تاریکی در مجاورت کاغذ نیتروسلولز قرار می‌گرفت و سپس به خوبی با بافر نمکی تریس حاوی توئین شسته شد.

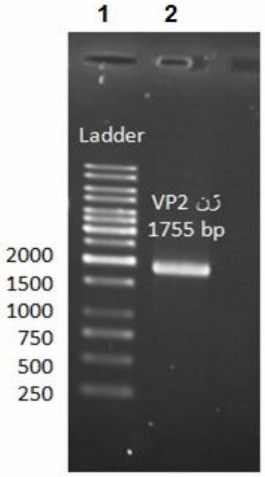
در مرحله دوم آنتی بادی ثانویه کونژوگه با پراکسیداز یعنی آنتی بادی بزی ضد آنتی بادی موشی تهیه شده از شرکت ایبیکم با رقت 1 به 5000 به مدت 1 ساعت در مجاورت غشاء نیتروسلولز قرار گرفته و بعد از آن به خوبی با بافر نمکی تریس حاوی توئین شسته شد.

در انتها محلول رنگ‌زای سوبسترای پراکسیداز و دی آمینو نبزیدین، برای پدیدار شدن رنگ به غشای حاوی پروتئین اضافه و پس از ظهور رنگ با آب شسته شد.

یافته ها

PCR با استفاده از پرایمر طراحی شده بر روی ژن VP2 انجام شد. برای تولید پروتئین VP2 در ابتدا ژن VP2 توسط واکنش PCR با آنزیم pfu جداسازی و تکثیر گردید. با توجه به توانایی آنزیم pfu در تصحیح اشتباهات در طی واکنش PCR، این آنزیم انتخاب گردید. همان طور که در شکل 1 مشخص شده ژن VP2 با طول 1755 جفت باز به طور کاملاً اختصاصی توسط آنزیم pfu تکثیر گردیده است. با این وجود به جهت اطمینان از عدم آلودگی با توالی‌های غیر اختصاصی توالی تکثیر شده از ژل استخراج شده و توسط کیت استخراج از ژل تخلیص گردید.

نتایج حاصل از تکثیر ژن VP2 که یک قطعه 1755 جفت بازی می‌باشد روی ژل آگارز 1 درصد درکنار نشان‌گر ژنی 1 کیلوباز (ساخت شرکت فرمنتاز) در شکل 1 قابل مشاهده می‌باشد.



شکل 1. ستون 1 نتایج حاصل از PCR ژن VP2 به وسیله آنزیم pfu و ستون 2 نشانگرDNA با کدSM0311 فرمنتاز

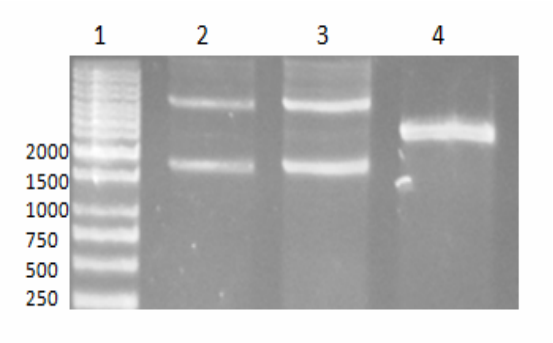
پس از برش قطعه PCR شده VP2 و هم‌چنین پلاسمید pET-21a توسط آنزیم‌های با اثر محدود

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

BamHI و NdeI و خالص سازی آنها از ژل آگارز، ژن VP2 به درون پلاسمید pET-21a کلون گردید. مکان کلون شدن ژن بر روی پلاسمید در قسمت پایین دست پروموتور پلیمراز T7 می‌باشد.

پس از ترانسفورماسیون نمودن پلاسمید pET-21a VP2 به درون باکتری Top 10، بر روی کلونی‌های به دست آمده آزمایش کلونی PCR انجام گرفت.

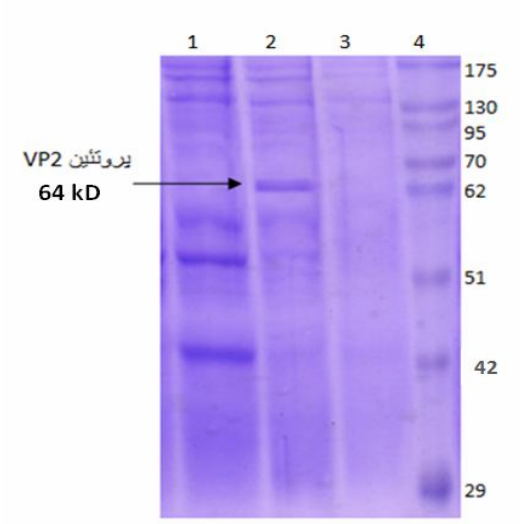
پس از تایید اولیه حامل‌ها توسط PCR، به وسیله کیت استخراج پلاسمید حامل pET-21a VP2 از باکتری تخلیص گردید. پلاسمید pET-21a VP2 تحت اثر دو آنزیم BamHI و NdeI قرار گرفته و قطعه ژنی VP2 با طول 1755 از آن استخراج گردید که نتایج آن در شکل 2 نشان داده شده است. با وجود استفاده از آنزیم pfu به منظور اطمینان از عدم هرگونه تغییر، توالی کلون شده تعیین توالی شده و تایید گردید.



شکل 2. تایید حامل‌های کلون شده توسط هضم آنزیمی دوگانه (در ستون 2 و 3 ژن VP2 با طول 1755 جفت باز از وکتور pET-21a توسط هضم آنزیمی خارج شده است و در ستون 4 حامل حاوی ژن VP2 با یک برش نشان داده شده است. ستون 1 مربوط به نشانگرDNA است با کدSM0311 فرمنتاز)

به منظور تایید درستی ژن کلون شده، نمونه پلاسمید pET-21a VP2 را به همراه پرایمرهای مربوط به ژن VP2 برای انجام تعیین توالی ژنی ارسال گردید. توالی‌های خوانده شده توسط نرم افزار بایوادیت با ژن مرجع دریافت شده از بانک ژنی هم ردیفی چندگانه (Multiple Alignment) شد که نهایتاً درستی توالی کلون شده VP2 به طور کامل تایید گردید.

پلاسمید تایید شده pET-21a VP2 به منظور بیان پروتئین VP2 به درون باکتری اشرشیا کولای سویه روزتا ترانسفورم گردید. بررسی بیان پروتئین VP2 با غلظت‌های مختلف IPTG و در زمان‌های مختلف بررسی گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که بالاترین بیان پروتئین در غلظت 1 میلی‌مولار IPTG و پس از 6 ساعت القاء می‌باشد. بیان پروتئین VP2 با غلظت 1 میلی‌مولار IPTG و پس از 6 ساعت القاء توسط روش سدیم دوسیل سولفات پلی آکریلی آمیژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت که در شکل 3 نشان داده شده است.



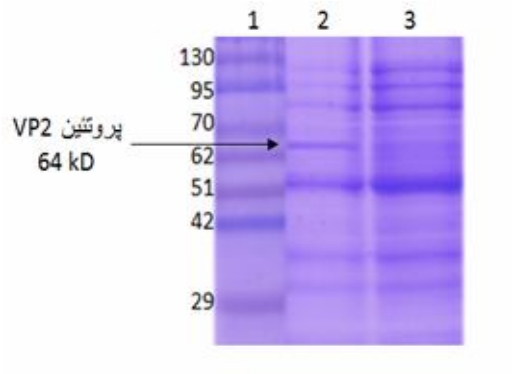
شکل 3. بیان پروتئین VP2 در باکتری اشرشیا کولای سویه روزتا بوسیله القاء با IPTG (ستون 1 باکتری حاوی پلامسید pET-21aفاقد ژن VP2 و القاء شده با IPTG ستون 2 باکتری حاوی پلامسید pET-21a و ژن VP2 و القاء شده با IPTGستون 3 باکتری حاوی پلامسید pET-21a و ژن VP2 و القاء نشده با IPTG می باشد. ستون 4 مربوط به نشانگر پروتئینی می باشد.)

پلاسمید تایید شده pET-21a VP2 به منظور بیان پروتئین VP2 در سیستم بیانی بدون سلول پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید خالص گردید و مقدار دقیق آن توسط دستگاه نانودارپ تعیین گردید.

سپس پلاسمید pET-21a VP2 و پلاسمید pET-21a فاقد VP2 (کنترل منفی) به ویال‌های حاوی محیط بیانی بدون سلول اضافه شده و به مدت 4 ساعت در انکوباتور شیکر دار در دمای 37 درجه قرار داده شد. بیان

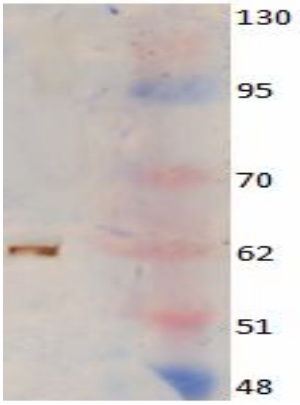
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

پروتئین VP2 در شرایط بدون سلول توسط روش سدیم دو سیل سولفات پلی آکریل امید ژل الکترفورز مورد بررسی قرار گرفت که در شکل 4 نشان داده شده است.



شکل 4. بیان پروتئین VP2 در باکتری در شرایط بدون سلول می باشد. (ستون 1 مربوط به نشانگر پروتئینی می باشد. ستون 2 محیط بدون سلول حاوی پلامسید pET-21a دارای ژن VP2را نشان می هد ستون 3 محیط بدون سلول حاوی پلامسیدpET-21a تنها را نشان می دهد)

تایید نهایی پروتئین تولید شده VP2 توسط وسترن بلات انجام شد. همان طور که در شکل 4 مشخص شده است پس ازانتقال پروتئین از ژل به کاغذ نیتروسلولز، آنتی بادی تک دودمانی و اختصاصی به پروتئین بیان شده VP2 متصل شده و آنتی بادی نشان‌دار ثانویه به آنتی بادی تک دودمانی متصل گردیده و در نهایت سوبسترای پراکسیداز و دی آمینو بنزیدین بروری کاغذ نیتروسلولز تولید رنگ نموده است.



شکل 5. نتیجه آزمایش لکه گذاری وسترن با آنتی بادی منولکونال ضد پارووویروس سگی

بحث

پروتئین VP2 که سازنده 90 درصد از کپسید ویروس پارووویروس سگی است در شرایط پروکاریوت و بدون سلول به طور مناسبی تولید گردید.

به دلیل ساختار منحصر به فرد ویروس پارووویروس سگی و اهمیت این ویروس در دامپزشکی و پزشکی تاکنون مطالعات زیادی در زمینه‌های مختلف بر روی این ویروس صورت گرفته است. در تحقیقات مختلف صورت گرفته بر روی پارووویروس سگی اجزای مختلف این ویروس مانند توالی نوکلئوتیدی، بخش‌های مختلف پروتئینی، مکانیسم تکثیر و عفونت‌زایی پارووویروس سگ به خوبی مورد بررسی قرار گرفته و به طور کامل شناخته شده است.

اهمیت پارووویروس سگی در دامپزشکی به علت ایجاد یک بیماری کشنده در سگ‌ها می‌باشد. تا کنون واکسن‌های مختلفی علیه ویروس پارووویروس سگی ساخته شده است که معمولاً براساس ویروس کشته شده می‌باشد(8). پس از آن که مشخص گردید که ویروس پارووویروس سگی توانایی اتصال به گیرنده سلول‌های سرطانی و داخل شدن به این سلول‌ها را دارد تحقیقات بسیاری در این زمینه نیز بر روی این ویروس صورت گرفته است. هرچند در ادامه این تحقیقات نشان داده شد که پارووویروس سگی قادر به تکثیر در سلول‌های سرطانی انسانی نمی‌باشد و تنها به این سلول‌ها متصل و وارد آنها می‌شود(10، 11).

در میان اجزای تشکیل دهنده پارووویروس سگی پروتئین VP2 اهمیت خاصی دارد. پروتئین VP2 یک پروتئین پوششی می‌باشد که سازنده 90 درصد از کپسید ویروس است(1، 2).

پروتئین VP2 نقش بسیار مهمی در عفونت‌زایی پارووویروس سگی دارد و ویروس به واسطه پروتئین VP2 به سلول هدف خود متصل شده و وارد آن می‌گردد(11).

در صورت تولید آنتی بادی اختصاصی علیه پروتئین VP2، ویروس پارووویروس سگی به طور کامل

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

خنثی شده و قدرت عفونت‌زایی خود را از دست می‌دهد. بر این اساس تحقیقات مختلفی در خصوص استفاده از پروتئین VP2 به منظور تولید واکسن و کیت‌های تشخیصی برای پاروویروس سگی در حال انجام است(2، 8).

یکی از خصوصیات منحصر به فرد پروتئین VP2 پاروویروس سگی توانایی این پروتئین در تولید ساختار شبه ویروسی می‌باشد. پروتئین VP2 پاروویروس سگی به تنهایی می‌تواند ساختار شبه ویروسی تولید کند که از نظر اندازه کاملاً مشابه ویروس کامل پاروویروس سگی می‌باشد و قادر است همانند یک ویروس کامل به سلول هدف متصل و وارد این سلول‌ها گردد(9، 10). بنابراین تولید پروتئین VP2 به صورت نوترکیب می‌تواند زمینه را به منظور استفاده از این پروتئین در تحقیقات مختلف فراهم سازد.

از آنجا که پروتئین VP2 یک پروتئین ویروسی می‌باشد که به طور معمول در سیستم‌های یوکاریوتی بیان می‌شود برای آن که بیان این پروتئین در سیستم پروکاریوتی به طور مناسب و به میزان زیاد صورت پذیرد از باکتری اشرشیا کولای سویه روزتا استفاده شد. باکتری اشرشیا کولای سویه روزتا از نظر کدون های کد کننده اسیدهای آمینه برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی اپتیمایز گردیده است.

در ادامه باکتری اشرشیا کولای سویه روزتا حاوی pET-21aVP2 در محیط کشت مایع حاوی آمپی سیلین کشت داده شد و بیان پروتئین VP2 با غلظت‌های مختلف IPTG القاء گردید. پس از چندین بار آزمایش بیان پروتئین VP2 با اندازه 64 کیلو دالتون توسط القاء به وسیله IPTG با غلظت 1 میلی‌مولار اپتیمایز گردید.

با توجه به مطالعات گذشته پروتئین VP2 در سیستم بیانی پروکاریوتی به صورت انکلوژن و نا محلول تولید می‌گردد، در نتیجه خالص سازی این نوع پروتئین مشکل می‌باشد(19). در تحقیق حاضر نیز بررسی بیان پروتئین نشان داد که بخش عمده پروتئین تولید شده در انکلوزیون‌های سلولی و نه در مایع رویی شیرابه باکتری باقی مانده است.

یکی از روش‌های جدید برای تولید پروتئین، استفاده از روش بیان پروتئین در شرایط بدون سلول پروکاریوتی می‌باشد(25-20). شرایط بدون سلول اجازه دسترسی مستقیم و کنترل بر روی رونویسی و ترجمه را برای تولید مناسب فراهم می‌کند. در شرایط بدون سلول امکان تولید پروتئین‌های ویروس به میزان زیادی فراهم شده است. از مزایای این روش افزایش بازده تولید پروتئین، امکان کنترل شرایط محیطی مناسب مانند pH محیط و از همه مهم‌تر تخلیص آسان پروتئین مورد نظر می‌باشد. راه‌اندازی تولید پروتئین نوترکیت در سیستم بدون سلول بسیاری از مشکلات تولید پروتئین با تکنیک‌های گذشته را مرتفع نموده است(21).

با توجه به نیاز به پروتئین خالص VP2 در مطالعات بعدی بیان پروتئین در شرایط بدون سلول نیز راه‌اندازی گردید.

برای ایجاد سیستم بیانی بدون سلول از عصاره سلولی به دست آمده از باکتری اشرشیا کلی و اجزای کیت بیانی شرکت اینویتروژن با عنوان E. coli Expression System Expressway Milligram Cell-Free استفاده گردید(25).

در این مطالعه با انجام چندین مرتبه آزمایش در نهایت در شرایط کاملاً استریل و بدون RNAase و DNAase پروتئین VP2 در سیستم بدون سلول تولید شد. هر چند میزان بیان پروتئین در این سیستم نسبت به تولید در حضور باکتری پایین‌تر است ولی با توجه به مزایایی که بر شمرده شد و هم‌چنین عدم نیاز به فرایندهای متعدد تخلیص که باعث اتلاف حجم قابل توجهی از پروتئین تولید شده می‌گردد به نظر می‌رسد که با بهینه سازی بیشتر می‌تواند جایگزین مناسبی برای تولید پروتئین در باکتری گردد.

نتیجه گیری

پروتئین VP2 دارای اهمیت فراوانی در دامپزشکی و در زمینه تحقیقات سرطان می‌باشد. تولید پروتئین VP2 در سیستم بیانی بدون سلول می‌تواند امکان

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

استفاده از این پروتئین را به منظور شناسایی سلول‌های سرطانی در تحقیقات آینده فراهم سازد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق براساس رساله دکتری مصوب دانشگاه تربیت مدرس با عنوان ساخت ذرات شبه ویروسی پارووویروس سگی در سیستم پروکاریوتی بدون سلول و با حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

1. Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, et al. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. Science (New York, NY). 1991; 251(5000):1456-64.
2. López TJA, Cortés E, Ranz A, García J, Sanz A, Vela C, et al. Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes. The Journal of general virology. 1991; 72:2445-56.
3. Molina A, Hervás-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM, Veramendi J. High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. Plant biotechnology journal. 2004;2(2):141-53.
4. Dalsgaard K, Uttenthal Å, Jones TD, Xu F, Merryweather A, Hamilton WDO, et al. Plant–derived vaccine protects target animals against a viral disease. Nature biotechnology. 1997; 15(3):248-52.
5. Fernández-Fernández MR, Martínez-Torrecuadrada JL, Casal JI, García JA. Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. FEBS letters. 1998; 427(2):229-35.
6. Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, Catalá R, Martínez-Torrecuadrada JL, Casal I, et al. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. FEBS letters. 2001;488(1):13-7.
7. Langeveld JPM, Brennan FR, Martínez-Torrecuadrada JL, Jones TD, Boshuizen RS, Vela C, et al. Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. Vaccine. 2001;19(27):3661-70.
8. Zeng F, Yeung W, Lu Y, Lun Z, Lv J, Liu F, et al. Expression, purification, and characterization of VP2 capsid protein of canine parvovirus in Escherichia coli. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008; 24(4): 457-63.
9. Yuan W, Parrish CR. Canine parvovirus capsid assembly and differences in mammalian and insect cells. Virology. 2001;279(2):546-57.
10. Singh P, Destito G, Schneemann A, Manchester M. Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. J Nanobiotechnology. 2006;4(2):1-11.
11. Parker JSL, Murphy WJ, Wang D, O'Brien SJ, Parrish CR. Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. Journal of Virology. 2001;75(8):3896-902.
12. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. Drug discovery today. 2005; 10(4): 267-73.
13. Inoue T, Cavanaugh PG, Steck PA, Brünner N, Nicolson GL. Differences in transferrin response and numbers of transferrin receptors in rat and human mammary carcinoma lines of different metastatic potentials. Journal of cellular physiology. 1993;156(1):212-7.
14. Bridges KR, Smith BR. Discordance between transferrin receptor expression and susceptibility to lysis by natural killer cells. Journal of Clinical Investigation. 1985;76(3):913.
15. Becker A, Riefke B, Ebert B, Sukowski U, Rinneberg H, Semmler W, et al. Macromolecular Contrast Agents for Optical Imaging of Tumors: Comparison of Indotricarbocyanine-labeled Human Serum Albumin and Transferrin¶. Photochemistry and photobiology. 2000; 72(2):234-41.
16. Sato Y, Yamauchi N, Takahashi M, Sasaki K, Fukaura J, Neda H, et al. In vivo gene delivery to tumor cells by transferrin-streptavidin-DNA conjugate. The FASEB Journal. 2000;14(13):2108-18.
17. Ryschich E, Huszty G, Knaebel H, Hartel M, Büchler M, Schmidt J. Transferrin receptor is a marker of malignant phenotype in human

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:22 +0330 on Friday September 22nd 2017

pancreatic cancer and in neuroendocrine carcinoma of the pancreas. European journal of cancer. 2004;40(9):1418-22.
18. Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. Pharmacological reviews. 2002;54(4):561-87.
19. Park JS, Choi BK, Vijayachandran LS, Ayyappan V, Chong CK, Lee KS, et al. Immunodetection of Canine Parvovirus (CPV) in clinical samples by polyclonal antisera against CPV-VP2 protein expressed in Esherichia coli as an antigen. Journal of virological methods. 2007;146(1):281-7.
20. Bundy BC, Franciszkowicz MJ, Swartz JR. Escherichia coli-based cell-free synthesis of virus-like particles. Biotechnology and bioengineering. 2007;100(1):28-37.
21. Jewett MC, Swartz JR. Rapid Expression and Purification of 100 nmol Quantities of Active Protein Using Cell-Free Protein Synthesis. Biotechnology progress. 2004; 20(1):102-9.
22. Kim HC, Kim DM. Methods for energizing cell-free protein synthesis. Journal of bioscience and bioengineering. 2009;108(1):1-4.
23. Oh IS, Lee JC, Lee M, Chung J, Kim DM. Cell-free production of functional antibody fragments. Bioprocess and biosystems engineering. 2010;33(1):127-32.
24. Pedersen A, Hellberg K, Enberg J, Karlsson BG. Rational improvement of cell-free protein synthesis. New Biotechnology. 2011;28(3):218-24.
25. Kim TW, Keum JW, Oh IS, Choi CY, Park CG, Kim DM. Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. Journal of biotechnology. 2006;126(4):554-61.