

تولید و تخلیص HBcAg نو ترکیب ویروس هپاتیت ب و بررسی ویژگی های ساختاری و عملکردی آن

مریم حجتی زاده^۱، مریم مبینی^۱، مژگان قائدی^۱، مسعود حسن زاده ماکویی^۱، محمود جدی تهرانی^۲،
فروغ گلساز شیرازی^{۱*}، فاضل شگری^{۱*}

۱-بخش ایمنی شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲-گروه آنتی بادی مونوکلونال، مرکز تحقیقات آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشکده فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران

*نشانی برای مکاتبه: forough_golsaz@yahoo.com

چکیده

بیماری هپاتیت ب یکی از معضلات بهداشتی و یک عفونت تهدید کننده زندگی است که توسط ویروس HBV ایجاد می شود. نوکلئوکسپید HBV از زنجیره پلی پپتیدی منفردی به نام آنتی ژن core یا HBcAg تشکیل شده است. در تحقیقات متعدد از HBcAg به عنوان حامل داروها و سایر مولکول های زیستی استفاده می شود و آنتی بادی تولید شده بر ضد آن نیز به عنوان یکی از نشانگرهای سرولوژیکی، نقش مهمی در بررسی مواجه قبلی با این بیماری دارد. در این مطالعه، برای اولین بار وکتور pColdI حاوی برجسب هیستیدینی، برای کلون سازی ژن HBcAg مورد استفاده قرار گرفت. بالاترین سطح بیان HBcAg در سویه Tuner و سپس در BL21 و Rosetta-gami مشاهده شد. HBcAg متصل به برجسب هیستیدین با استفاده از ستون Ni-NTA خالص سازی شد و شباهت ساختاری و آنتی ژنی آن با شکل طبیعی توسط ELISA و وسترن بلات تایید شد. سپس، از HBcAg نو ترکیب برای تولید آنتی بادی های پلی کلونال ضد HBc در خرگوش استفاده شد و برای تخلیص آنتی بادی های پلی کلونال ضد HBcAg، از ستون میل ترکیبی سفارز HBcAg-CNBr استفاده شد. نتایج نشان داد که آنتی بادی های به دست آمده از خرگوش قادر به شناسایی HBcAg نو ترکیب تولید شده تا غلظت ۰/۱۵ نانوگرم در میلی لیتر در آزمایش الیزا ساندویچ بودند. این مطالعه اطلاعات ارزشمندی را برای تولید پروتئین HBcAg نو ترکیب و آنتی بادی های اختصاصی برای تحقیقات بیشتر و کاربردهای تشخیصی ارائه می دهد.

واژگان کلیدی: ویروس هپاتیت ب (HBV)، Anti-HBc polyclonal antibody HBcAg

مقدمه

دی سولفیدی بین مولکولی بین اسید آمینه سیستئین ۶۱ از یک مولکول با سیستئین ۶۱ از مولکول دیگر برقرار است و همین عامل زمینه ساز ایجاد تفاوت هایی در ساختار آنتی ژنی آن هاست (۲-۵).

دو ژن precore و core که توسط قالب خوانش precore/core کد می شوند، دو کدون ATG آغاز در انتهای ۵' دارند. رونویسی از محل ATG بالادست منجر به تولید پروتئین ۲۵ کیلودالتونی (p25) به نام precore precursor می شود که توالی ۲۹ آمینو اسیدی precore را در N ترمینال خود دارد. طبق قرارداد اولین کدون core و precore به ترتیب +۱ و -۲۹ شماره گذاری می شوند.

ویروس هپاتیت ب یک معضل بهداشت جهانی است که سالانه باعث مرگ تقریباً یک میلیون نفر می شود (۱). ژنوم ویروس هپاتیت ب چهار قالب خوانش^۲ هم پوشان را کد می کند. از میان آن ها قالب خوانش Precore/core دو پروتئین ویروس به نام های HBeAg و HBcAg را کد می کند. این دو آنتی ژن ۱۴۹ اسید آمینه مشترک دارند اما در ۱۰ اسید آمینه در N ترمینال و ۲۹-۳۴ اسید آمینه در C ترمینال متفاوتند. در HBeAg یک پیوند دی سولفیدی درون مولکولی بین اسید آمینه سیستئین در دو جایگاه ۷- و ۶۱ نقش اساسی در حفظ ساختار پروتئین ایفا می کند. در حالیکه در HBcAg پیوند

HBV^۱

ORF^۲

های ساختاری و همینطور قابلیت ایمنی زایی آن در خرگوش مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش ها

۱.۲. مواد و سویه های باکتری

کیت استخراج پلاسمید و کیت استخراج از ژل از شرکت Favorgen، آنزیم T4 DNA ligase و آنزیم های محدود الاثر از شرکت Thermofisher، آنزیم Taq DNA Polymerase از شرکت سیناژن، آنزیم pfu از شرکت Geneall، کاغذ نیتروسولوز و سترن بلات از شرکت Schleicher & schuell، آنتی بادی human Ig-HRP، ادجوانت کامل و ناقص فروند از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شدند. رزین Ni-NTA از شرکت Rosetta-gami (DE3)، BL21(DE3)، Tuner، Novablue (DE3)، plysS (DE3)، و Shuffle (DE3) از انستیتو پاستور تهیه شده اند. TMB از شرکت پیشتاز طب خریداری شد. سرم بیماران از آزمایشگاه قلهک تهران جمع آوری شده اند.

۲.۲. تهیه سازه HBcAg نوترکیب

توالی DNA مربوط به HBcAg (از کدون شماره ۱ تا ۱۴۹ ناحیه Precore) با استفاده از پلاسمید pT-HBV1.3 (هدا شده توسط پروفیسور Protzer) که حاوی ژنوم کامل HBV است به عنوان الگو، طی واکنش PCR توسط یک جفت پرایمر Forward)

5'-GGTTTGTTCATATGATGGACATCGACCCT
(TATAA-3' و

Reverse: 5'-GGTTGTGAAGCTTAACAACAGTAGTCT
(CC-3' تکثیر شد. پرایمر فوروارد و ریورس به ترتیب حاوی جایگاه برش NdeI و HindIII هستند. واکنش PCR در شرایط ذیل انجام شد:

دنا تورا سیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد آغاز گردید و با انجام ۳۵ سیکل متوالی (۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه) ادامه یافت و نهایتاً با مرحله Final extension (به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C) خاتمه یافت.

محصول تکثیر شده توسط آنزیم های محدود الاثر بریده شد و سپس در پایین دست توالی 6-histidine tag بین جایگاه های NdeI و HindIII در وکتور pColdI کلون شد.

سیگنال پپتید ۱۹ آمینواسیدی در ابتدای precore، آن را به سمت مسیر ترشحی هدایت می کند و طی انتقال به درون شبکه اندوپلاسمی بریده می شود و منجر به تولید پروتئین precore بالغ با وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون (p22) می شود. سپس در پی برش های پروتئولیتیکی بیشتر در ناحیه C ترمینال غنی از آرژنین، پروتئین ترشحی به نام HBcAg تولید می شود (۶-۸).

در مقابل، ترجمه از ATG پایین دست باعث تولید پروتئین HBcAg یا آنتی ژن هسته ویروس می شود که دایمریزه می شود و بعد از اسمبل شدن با یکدیگر کپسید ویروس را تشکیل می دهند. HBcAg از ۱۸۳ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی آن ۲۱ کیلودالتون است. این پروتئین از دو دومین تشکیل شده است، یک دومین اسمبل ۱۴۹ آمینواسیدی که باعث دایمریزه شدن و اسمبل شدن کپسید می شود و یک دومین غنی از آرژنین ۳۴ آمینواسیدی (اسید آمینه ۱۸۳-۱۵۰) که در متصل شدن به pgrRNA یا DNA ویروس نقش دارد اما برای اسمبل شدن کپسید مورد نیاز نمی باشد (۲، ۶، ۹). کپسیدهای HBV در دو اندازه وجود دارند که از تعداد ۹۰ یا ۱۲۰ دایمر HBcAg تشکیل شده اند و به ترتیب ساختار بیست وجهی T=3 یا T=4 به خود می گیرند (۱۰، ۱۱).

وجود اپی توپ های متعدد بر روی HBcAg دلیلی بر ایمنونویسیته بالای آن است که در نتیجه می تواند پاسخ های اختصاصی B cell را تحریک کند (۱۲، ۱۳). HBcAg در سرم بیماران عموماً قابل شناسایی نمی باشد اما آنتی بادی تولید شده بر ضد آن قابل ردیابی است. حضور IgM ضد HBcAg نشانگر عفونت حاد HBV است و می تواند تنها علامت در طول دوره پنجره (فاصله بین ناپدید شدن HBsAg و ظهور anti-HBs) باشد (۱۴). خاصیت خود تجمعی^۳ HBcAg باعث شده که از آن به عنوان حامل دارو و دیگر مولکول های زیستی مانند نوکلئاز ها، الیگونوکلوئوتیدها و SiRNA استفاده شود (۱۵، ۱۶).

تاکنون، HBcAg به صورت نوترکیب در سلول های یوکاریوت و پروکاریوت تولید شده است اما تولید آن در سلول های پروکاریوت به دلیل دستکاری ژنتیکی راحت تر، محیط کشت ارزان تر و رشد سریع تر، مقرون به صرفه است و ترجیح داده می شود (۱۷، ۱۸).

در این مطالعه HBcAg در وکتور pColdI و در میزبان E. coli با بازده بالا در مقیاس آزمایشگاهی تولید شد و ویژگی

و ۴۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس سونیکاسیون به شرح زیر انجام شد: ۱۲ سیکل ۲۰ ثانیه ای با وقفه های ۴۰ ثانیه بین هر سیکل، ۹۰٪ amplitude و ۰.۷ cycle در تمام مراحل سونیکاسیون، محلول روی یخ قرار می گیرد. بعد از آن لیزات سلولی در ۱۲۸۵۰g به مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C سانتریفیوژ شد. پلت حاصل از این مرحله در ۷.۵ml بافر لیز ۲ mM Tris-، ۳۰۰mM NaCl، ۱۰۰mM NaH₂PO₄، ۱۰۰mM HCl، ۱۰mM imidazole، ۱۰mM urea و pH=۷.۸ حل شد و ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. سپس با دور ۱۶۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پلت حاصل دور ریخته شد و سوپرناتانت حاوی HbcAg (استخراج شده از انکلوژن بادی) در ادامه برای تخلیص استفاده گردید. پروسه تخلیص به شرح زیر انجام شد: رزین آگارز Ni-NTA (شرکت کیاژن) با استفاده از بافر لیز ۲ همگن شد و بعد از افزودن سوپرناتانت حاوی پروتئین نوترکیب به مدت ۳-۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر انکوبه شد. سپس رزین با بافر لیز ۲ و بعد از آن با بافر شستشو (۳۰۰mM NaCl، ۱۰۰mM NaH₂PO₄، ۱۰۰mM imidazole، ۴۰mM urea، pH=۸) شسته شد تا پروتئین های غیر اختصاصی از رزین جدا شود. سپس پروتئین نوترکیب HbcAg بوسیله بافر الوشن (۵۰۰mM NaCl، ۲M urea، ۱۰۰mM NaHCO₃، ۵۰mM imidazole، pH=۸.۳) تخلیص شد و در بافر دیالیز (۵۰۰mM NaCl، ۱۰۰mM NaHCO₃، ۲M urea، pH=۸.۳) دیالیز شد. خلوص فرکشن های تخلیص شده حاوی HbcAg نوترکیب بوسیله SDS-PAGE تعیین شد.

۵.۲. بررسی ساختار آنتی ژنیک HbcAg

به منظور بررسی صحت ساختار پروتئین نوترکیب HbcAg تولید شده، واکنش آن با سرم بیماران حاوی anti-HBe در آزمون الایزای غیرمستقیم و نیز وسترن بلات بررسی شد. سرم بیماران از آزمایشگاه قلهک تهران تهیه شد و حاوی تیترا بالای anti-HBe بودند. سرم ها با یکدیگر مخلوط شد و برای انجام مطالعه استفاده شد.

۵.۲.۱. آنالیز وسترن بلات

یک میکروگرم از HbcAg نوترکیب به حالت غیر احیا درون چاهک ژل پلی اکریل امید ۱۳ درصد لود شد و در ولتاژ ۱۱۰ به مدت ۷۵ دقیقه الکتروفورز انجام شد. سپس با استفاده از سیستم الکتروبلات (BioRad, Hercules, California USA) در ولتاژ ۱۱۰ و به مدت ۷۵ دقیقه به کاغذ نیتروسولوز

بنابراین، در وکتور نوترکیب، توالی histidine tag-6 در پایانه N ژن HbcAg قرار دارد. صحت قرارگیری مناسب و نیز سکانس HbcAg توسط توالی یابی تایید شد.

۳.۲. بیان HbcAg نوترکیب در E. coli

پلاسمید نوترکیب HbcAg-pColdI همزمان در ۶ سویه بیانی از باکتری E. coli شامل: Rosetta-، BL21(DE3)، Novablue، Origami (DE3)، gami (DE3) plysS (DE3)، Tuner (DE3) و Shuffle (DE3) بیان شد و میزان بیان پروتئین HbcAg در آنها مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت. هر یک از سویه های ترانسفرم شده با پلاسمید نوترکیب مذکور در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB broth حاوی ۱۰۰ug/ml آمپی سیلین، درون انکوباتور شیکردار با دور ۲۵۰RPM و دمای ۳۷°C به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به ۱۰ml محیط حاوی ۱۰۰ug/ml آمپی سیلین اضافه شد و درون انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷°C انکوبه شد تا جذب نوری محیط (O.D) بین ۰.۹-۱ شود. در این هنگام IPTG با غلظت نهایی ۱mM به محیط افزوده شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۱۵°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. نمونه هایی از محیط کشت در زمان های مختلف ۰، ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از القا به منظور بررسی بیشترین میزان تولید پروتئین نوترکیب جمع آوری شدند. نمونه ها به میزان یکسان در سمپل بافر ۲x حل شدند و روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد لود شدند. سپس ژل ها با کوماسی بلو رنگ آمیزی شدند.

برای افزایش بازده تولید HbcAg نوترکیب، اثر پارامترهای مختلفی مانند انواع محیط کشت، غلظت IPTG و دما بهینه سازی شد.

۴.۲. تخلیص HbcAg نوترکیب

سویه E. coli ترانسفورم شده ی مورد نظر در ۱۰ml محیط حاوی ۱۰۰ug/ml آمپی سیلین تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°C به صورت شبانه کشت داده شد. سپس از آن برای تلقیح در ۲۵۰ml محیط حاوی ۱۰۰ug/ml استفاده شد. کشت در ۳۷°C انکوبه شد تا O.D آن به ۰.۹-۱ برسد. سپس IPTG با غلظت نهایی ۱mM به محیط افزوده و در دمای ۱۵°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. باکتری ها توسط سانتریفیوژ در ۴۰۰۰RPM (۲۶۶۵g) به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شدند. پلت باکتری ها حاوی انکلوژن بادی در ۷.۵ml محلول بافر لیز ۱ (۱۰۰mM NaCl، ۳۰mM Tris-HCl، ۱۰۰mM NaH₂PO₄، pH=۷.۸) حل شد

ضد HBcAg (HBcAg-purified anti-HBc)
polyclonal antibodies) از سرم خرگوشها، از ستون
ایمونوآفینیتی HBcAg استفاده شد. برای ساخت این ستون،
۲ میلی گرم از HBcAg تخلیص شده به ۱ گرم رزین
CNBr-activated Sepharose4B (GE Healthcare)
طبق دستور آن متصل شد.

به منظور ارزیابی فعالیت اختصاصی آنتی بادی پلی کلونال
اختصاصی ضد HBcAg تخلیص شده با HBcAg، آزمون
الایزای ساندویچ طراحی شد. ۲۰ میکروگرم بر
میلی لیتر آنتی بادی پلی کلونال ضد HBcAg تخلیص
شده با ستون افینیتی کروماتوگرافی
(HBcAg-purified anti- HBcAg-Sepharose4B
HbC polyclonal antibodies) بر روی پلیت الایزا کوت
شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه
شد. پس از شستشو، چاهک ها با ۲٪ BSA تهیه شده در
۰.۰۵٪ PBST بلاک شدند. سپس غلظت های مختلف
HBcAg نو ترکیب (۲۵، ۶/۲۵، ۱/۲۵، ۰/۳۹ و ۰/۰۹۷ نانوگرم
در میلی لیتر) اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به
مدت ۱ ساعت انکوبه شد. پس از شستشو، آنتی بادی ضد
HbC تخلیص شده با ستون افینیتی کروماتوگرافی
HBcAg-Sepharose4B که با بیوتین کونژوگه شده
(Biotin-conjugated HBcAg-purified anti-HBc)
polyclonal antibody بود، اضافه شد. پس از شستشو و
افزودن استرپتواویدین-HRP، TMB اضافه شد و OD
چاهک ها اندازه گیری شد.

۳. نتایج

۳.۱. کلونینگ، بیان و تخلیص HBcAg نو ترکیب

ژن HBcAg (حاوی اسید آمینه ۱-۱۴۹) تکثیر شد و درون
وکتور بیانی pColdI بین دو جایگاه برش آنزیمی NdeI و
HindIII قرار گرفت. بعد از توالی یابی و تایید سکانس ژن
HBcAg، پلاسمید نو ترکیب

HBcAg-pColdI درون سویه های بیانی RosettaGami

و BL21 باکتری *E. coli* ترانسفورم شد. (شکل ۱ و ۲)

M N H K V H H H H H I E G R H M M D I
D P Y K E F G A T V E L L S F L P S D F F
P S V R D L L D T A S A L Y R E A L E S P
E H C S P H H T A L R Q A I L C W G E L
M T L A T W V G V N L E D P A S R D L V
V S Y V N T N M G L K F R Q L L W F H I
S C L T F G R E T V I E Y L V S F G V W I
R T P P A Y R P P N A P I L S T L P E T T V
V K L V D L Q S R

منتقل شد. کاغذ در ۵٪ skim milk تهیه شده در PBS، به
مدت ۱۶ ساعت در ۴°C انکوبه شد. سپس سه مرتبه با PBS
حاوی ۰.۰۵٪ Tween20 (PBST) شسته شد. بعد از آن با
سرم بیماران حاوی anti-HBe با رقت ۱/۱۰۰۰ به مدت ۲
ساعت در دمای اتاق انکوبه شد و سپس سه مرتبه با محلول
PBST شسته شد. در نهایت با آنتی بادی IgG آنتی هیومن
تولید شده در موش و کونژوگه شده با HRP (-HRP
IgG conjugated mouse anti-human) به مدت یک
ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از شستشو، باندها بر روی
کاغذ توسط ECL Prime (Thermo Scientific, USA) در
مورد بررسی قرار گرفتند.

۵.۲.۲. الایزای غیرمستقیم

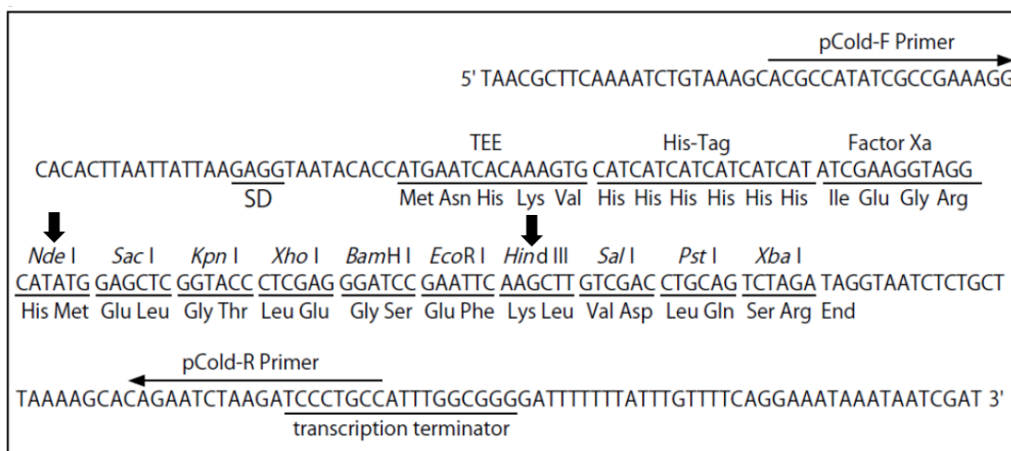
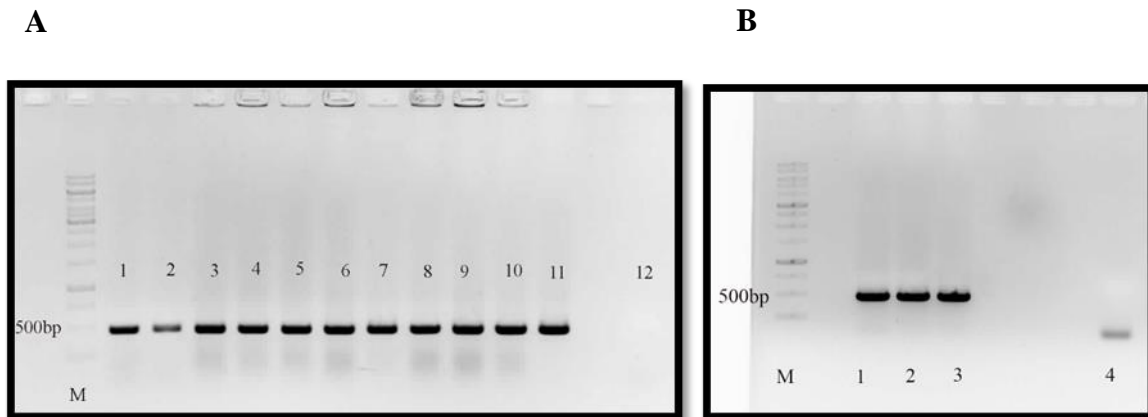
واکنش HBcAg نو ترکیب با سرم بیماران حاوی anti-HBe
در یک ELISA غیرمستقیم ارزیابی شد. به طور خلاصه،
غلظت های مختلف HBcAg نو ترکیب (۱۰، ۵، ۲.۵، ۱.۲۵ و
۰.۶۲ ug/ml) در پلیت الایزا کوت شد و در دمای ۴ درجه به
مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. سپس پلیت ها با PBST شسته و
بلاکینگ با skim milk ۳ درصد به مدت ۱ ساعت در دمای
۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. سرم های بیماران حاوی تیتر
بالای anti-HBe (تهیه شده از آزمایشگاه بالینی قلهک) و نیز
سرم افراد نرمال با رقت ۱/۱۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای
۳۷ درجه سانتی گراد اضافه شدند. در نهایت، mouse anti-
human کونژوگه شده با HRP اضافه شد و به مدت ۱ ساعت
در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از افزودن تترا
متیل بنزیدین (TMB)، جذب نوری (OD) در ۴۵۰ نانومتر
توسط دستگاه ELISA ریدر (Biotek, Winooski, USA)
اندازه گیری شد.

۶.۲. تولید، تخلیص و ارزیابی آنتی بادی پلی کلونال ضد

HBcAg

دو خرگوش سفید نیوزلندی (انیستیتو واکسن و سرم سازی
رازی کرج) هریک با ۵۰ میکروگرم HBcAg نو ترکیب رقیق
شده در ۵۰۰ میکرولیتر PBS و امولسیفای شده با ۵۰۰
میکرولیتر ادجوانت کامل فروند، ایمن شدند. ۴ هفته بعد
خرگوشها با ۲۵ میکروگرم HBcAg امولسیفای شده با
ادجوانت ناقص فروند ایمن شدند و هر دو هفته یکبار این تزریق
تکرار شد تا تیتر آنتی بادی ضد HBcAg به پلاتو برسد. تیتر
آنتی بادی پلی کلونال ضد HBcAg توسط آزمون الایزا
سنجیده شد. سپس به منظور تخلیص آنتی بادی پلی کلونال

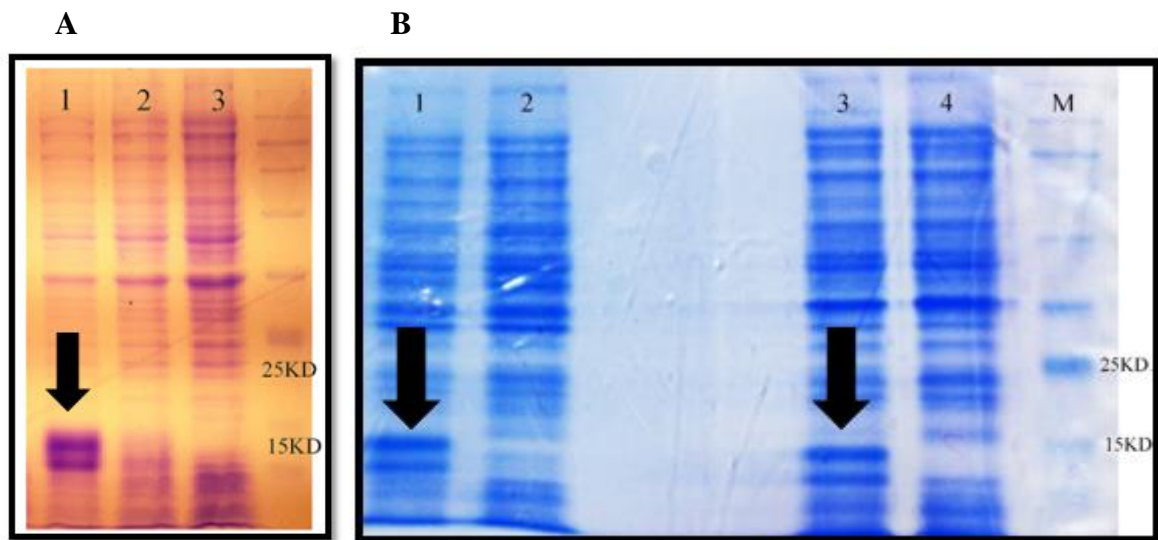
شکل ۱: سکانس *HBcAg* (۱-۱۴۹) مورد استفاده در این مطالعه. ۱۷ اسید آمینه اول و ۸ اسید آمینه آخر از وکتور pColdI مشتق شده است.



شکل ۲: ساخت سازه ی *HBcAg*-pColdI نوترکیب. A: تکثیر ژن *HBcAg* با PCR توسط آنزیم pfu. ردیف ۱ تا ۳: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR تکثیر شده *HBcAg* نوترکیب با اندازه ۴۷۳ جفت: ردیف ۴: کنترل منفی. B: کلنی PCR پس از ترانسفورماسیون پلاسمید *HBcAg*-pColdI در سویه های Rosetta-gami و BL21: DNA سایز مارکر، ردیف ۵-۱: کلونی های انتخاب شده از Rosetta-gami، ردیف ۶-۱۰: کلونی های انتخاب شده از BL21. ردیف ۱۱: کنترل مثبت، *HBcAg* تکثیر شده از پلاسمید pT-HBV1.3، ردیف ۱۲: کنترل منفی. C: نمایش شماتیک از نقشه جایگاه های تشخیص آنزیم های محدود الاثر (MCS) مربوط به وکتور pColdI. فلش ها موقعیت جایگاه های مورد استفاده برای وارد کردن *HBcAg* را نشان می دهد.

tag در N-ترمینال HBcAg است. در میان شش میزبان مختلف بیانی *E. coli* شامل BL21, Rosetta-gami, Shuffle, Tuner, Novablue, Origami بالاترین سطح بیان HBcAg نوترکیب در سویه ی Tuner و بعد از آن در Rosetta-gami و BL21 به دست آمد (شکل ۳).

تجزیه و تحلیل SDS-PAGE کل لیزات سلولی نشان داد که کشت باکتریایی القا شده با ۱ میلی مولار IPTG باعث افزایش بیان HBcAg می شود در حالی که در نمونه قبل از القاء هیچ بیانی از پروتئین مشاهده نشد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، یک نوار واضح از بیان پروتئین با جرم مولکولی تقریباً ۱۹ کیلو دالتون مشاهده شد که حاوی یک نشان His-

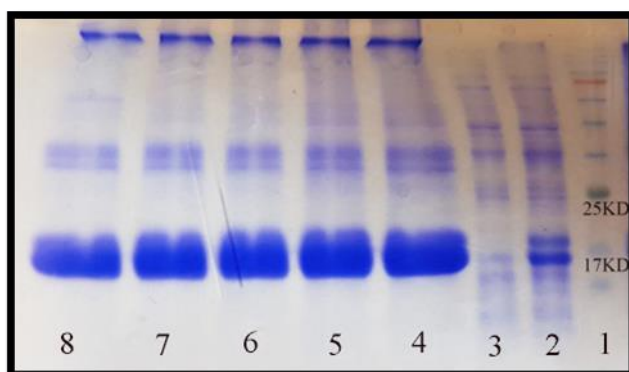


شکل ۳: بررسی بیان HBcAg در آنالیز SDS-PAGE. شکل A: بررسی بیان HBcAg در سویه های BL21 و Rosetta-gami. ردیف ۱ و ۳: ۲۴ ساعت بعد از القا در ۱۵°C به ترتیب در باکتری Rosetta-gami و BL21. ردیف ۲ و ۴: قبل از القا در باکتری Rosetta-gami و BL21. M: سایز مارکر پروتئین. شکل B: ردیف ۱: ۲۴ ساعت بعد از القا در ۱۵°C در باکتری Tuner، ردیف ۲: ۶ ساعت بعد از القا در ۱۵°C در باکتری Tuner، ردیف ۳: قبل از القا در باکتری Tuner.

HBcAg در یک بافر بدون اوره منجر به تجمع و اگرینگ شدن آن شد که با استفاده از ۲ مولار اوره در بافر شستشو از این امر جلوگیری شد.

شکل ۴ تجزیه و تحلیل SDS-PAGE فرکشن های خالص شده HBcAg را نشان می دهد. بازده محاسبه شده از مقدار کل HBcAg نوترکیب خالص شده تقریباً ۴ میلی گرم در هر لیتر محیط کشت باکتری می باشد.

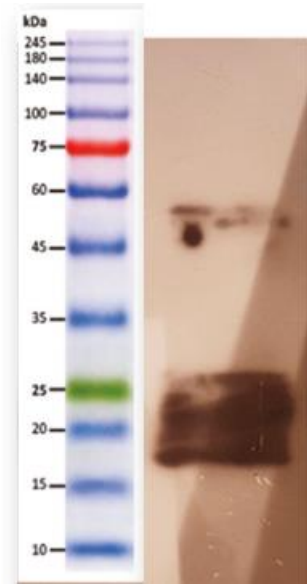
HBcAg نوترکیب حاوی his-tag در پایانه N آن توسط رزین Ni-NTA خالص سازی شد. شایان ذکر است حضور این پروتئین هم به صورت محلول در سوپ ترشخی و هم به صورت نامحلول در آنکلوژیون بادی ها مشاهده شد. اما از آنجایی که دنباله هیستیدینی این پروتئین در فرم ترشخی قابلیت دسترسی برای Ni-NTA را نداشت فلذا از فرم آنکلوژیون بادی در ادامه کار استفاده شد. علاوه بر این، جداسازی



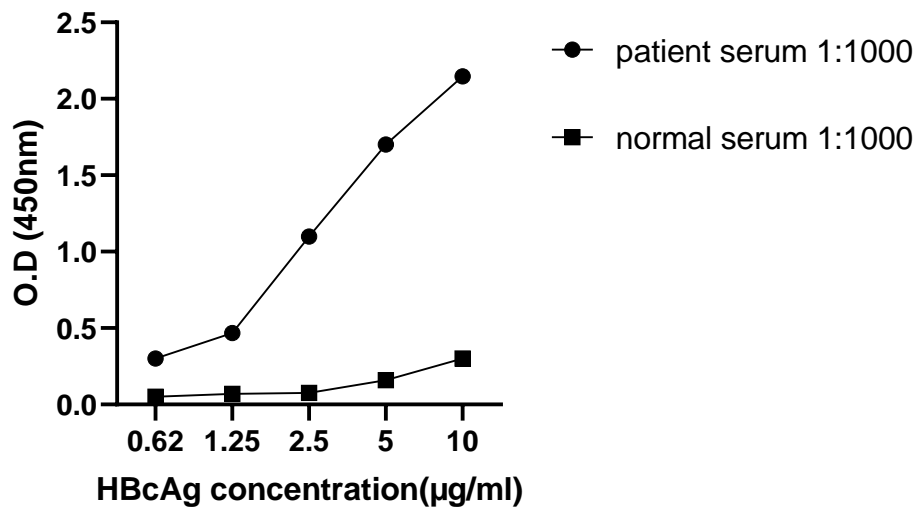
شکل ۴: SDS-PAGE خالص سازی HBcAg توسط کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA. ردیف ۱: سایز مارکر پروتئین، خط ۲: لیزات باکتری RosettaGami ترنسفورم شده با HBcAg-pColdI پس از القای با IPTG، ردیف ۳: پروتئین‌های متصل نشده به رزین، ردیف ۴-۸: فرکشن های شستشو حاوی HBcAg نوترکیب تخلیص شده از ستون میل ترکیبی Ni-NTA

۳.۲. ارزیابی ساختار آنتی ژنیک HBcAg نوترکیب

به منظور تأیید شباهت ساختاری HBcAg نوترکیب خالص شده با نمونه طبیعی، واکنش پذیری آنتی‌بادی‌های ضد HBC در سرم بیماران مبتلا به عفونت مزمن، با HBcAg نوترکیب در وسترن بلات و ELISA بررسی شد. همانطور که نتیجه وسترن بلات در شکل ۵ نشان می دهد، HBcAg در اشکال مونومر و دایمر توسط آنتی بادی های ضد HBC تولید شده علیه HBC طبیعی در سرم بیماران شناسایی شد. سپس یک آزمون الایزا طراحی شد که در آن HBcAg تخلیص شده با غلظت‌های مختلف کوت^۴ شد و سپس سرم بیماران که حاوی تیترا بالای anti-HBe (و همینطور anti-HBc) بودند، اضافه شد و از سرم فرد نرمال به عنوان کنترل استفاده شد. به عنوان آنتی بادی ثانویه از anti-human.HRP با رقت ۱:۱۰۰۰۰ استفاده شد. نتایج شکل ۶ نشان داد که anti-HBC در سرم بیماران قادر به شناسایی HBcAg نوترکیب در آزمون الایزا می باشد.



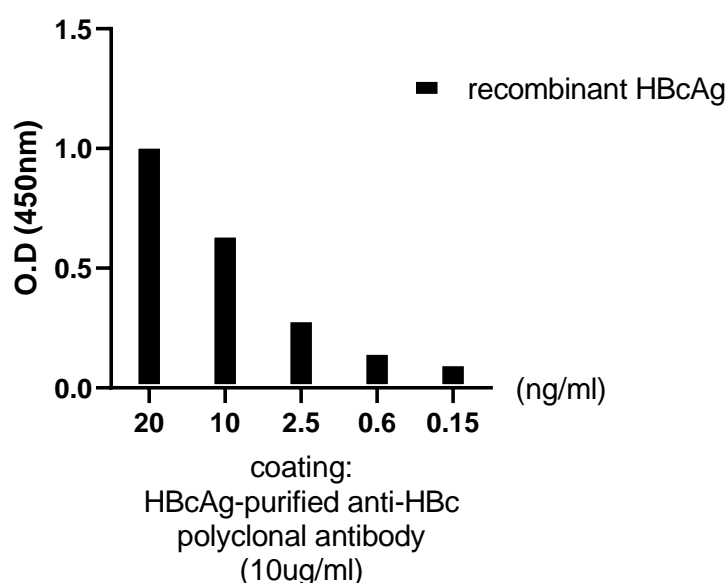
شکل ۵: بررسی واکنش دهی HBcAg نوترکیب با سرم بیماران حاوی anti-HBc در وسترن بلات. HBcAg در اشکال مونومر و دایمر توسط آنتی بادی های ضد HBc تولید شده علیه HBc طبیعی در سرم بیماران شناسایی شد.



شکل ۶: بررسی واکنش دهی HBcAg نوترکیب تولید شده با سرم بیماران حاوی تیتر بالای anti-HBe در الایزای غیر مستقیم. HBcAg تخلیص شده با غلظت های مختلف کوت شد و سپس سرم بیماران که حاوی anti-HBc بودند، اضافه شد و از سرم فرد نرمال به عنوان کنترل استفاده شد. به عنوان آنتی بادی ثانویه از anti-human.HRP استفاده شد.

۱۰µg/ml کوت شد. سپس پروتئین نوترکیب HBcAg با غلظت های ۲۰، ۱۰، ۲.۵، ۰.۶ و ۰.۱۵ اضافه شد و در نهایت کنژوگه ی اختصاصی HBc-purified anti-HBc.Biotin با رقت ۱:۸۰۰۰ استفاده شد. نتایج شکل ۷ نشان داد آنتی بادی های پلی کلونال تولید و تخلیص شده، در آزمون الایزا واکنش پذیری اختصاصی با HBcAg نوترکیب دارند.

۳.۳. تولید، تخلیص و بررسی واکنش پذیری anti-HBc polyclonal antibody
خرگوش ها با HBcAg نوترکیب تخلیص شده ایمن شدند و آنتی بادی های اختصاصی از سرم خرگوش توسط ستون HBcAg-CNBr تخلیص شد. واکنش پذیری اختصاصی آنتی بادی های پلی کلونال ضد HBc خالص شده با HBcAg نوترکیب تولید شده در آزمون الایزا ارزیابی شد. برای این منظور، ابتدا HBc-purified anti-HBc با غلظت



شکل ۷: تشخیص HBcAg نوترکیب توسط آنتی بادی های پلی کلونال ضد HBc خالص شده با ستون افینیتی HBcAg در الایزای ساندویچ. HBc-purified anti-HBc با غلظت ۱۰µg/ml کوت شد. پروتئین نوترکیب HBcAg با غلظت های ۲۰، ۱۰، ۲.۵، ۰.۶ و ۰.۱۵ اضافه شد و در نهایت کنژوگه ی اختصاصی HBc-purified anti-HBc.Biotin استفاده شد.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، ژن HBcAg از سکانس مربوط به اسید آمینه ۱ تا ۱۴۹ از یک پلاسمید حامل ژنوم کامل ویروس هپاتیت ب (pT-HBV1.3) تکثیر شد و سپس در وکتور pColdI، پایین دست دنباله ی هیستیدینی و بین نواحی برش مربوط به دو آنزیم محدودالثر NdeI و HindIII قرار گرفت. شایان ذکر است که در ابتدا ژن HBcAg در وکتور pET22b کلون شد اما به دلیل بیان بسیار کم آن در سویه های بیانی مختلف *E. coli* از وکتور pColdI برای اولین بار استفاده کردیم. اگر چه

HBcAg به عنوان پروتئین اصلی ساختار کپسید شناخته می شود و از ۱۸۳-۱۸۵ اسید آمینه بسته به سویه ویروس تشکیل می شود. انتهای N آن (اسید آمینه ۱-۱۴۹) برای اسبمل شدن و تشکیل کپسید ضروری است و انتهای C (اسید آمینه ۱۸۳-۱۵۰ یا ۱۸۵) در متصل شدن به pre-RNA ویروس نقش دارد (۱۷، ۱۹).

مبتلا به عفونت مزمن، HBcAg نوترکیب را هم در الیزا و هم در وسترن بلات تشخیص دادند (شکل های ۵ و ۶) که نشان می دهد HBcAg نوترکیب خواص ساختاری و آنتی ژنی مناسب خود را در سیستم پروکاریوتی حفظ کرده و شباهت زیادی با فرم طبیعی خود دارد. سپس از HBcAg نوترکیب برای تولید آنتی بادی های پلی کلونال ضد Hbc در خرگوش استفاده شد. حیوانات با موفقیت با HBcAg نوترکیب محلول در بافر حاوی ۲ مولار اوره ایمن شدند که نشان می دهد اوره باعث مهار سیستم ایمنی حیوان نمی شود یا تداخلی در تحریک سیستم ایمنی ندارد.

برای جداسازی آنتی بادی های پلی کلونال اختصاصی ضد HBcAg، ستون افینیتی کروماتوگرافی با استفاده از پروتئین نوترکیب HBcAg تهیه شد. علی رغم وجود ۲ مولار اوره در بافر حاوی پروتئین، فرایند اتصال آن به رزین CNBr به خوبی انجام شد. اوره با وجود دارا بودن گروه NH₂ آزاد، با پروتئین در اتصال به رزین سیانوژن بروماید رقابتی نمی کند. حدودا ۲mg از HBcAg به یک گرم رزین سیانوژن بروماید متصل شد. سرم خرگوش های ایمن شده با HBcAg از ستون افینیتی کروماتوگرافی تهیه شده عبور داده شد. با استفاده از ستون افینیتی کروماتوگرافی HBcAg، حدودا ۵mg آنتی بادی ضد HBcAg تخلیص شد. نتایج نشان داد که آنتی بادی های به دست آمده از خرگوش در آزمون الیزای ساندویچ، HBcAg نوترکیب تولید شده در باکتری را تا غلظت ۰.۱۵ng/ml شناسایی می کند.

به طور کلی، این مطالعه با هدف کلون سازی و بیان ژن HBcAg در سویه های مختلف *E. coli* و بهینه سازی تخلیص آن انجام شد. ژن HBcAg با موفقیت در وکتور pColdI کلون شد و سطح بیان آن در شش سویه مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین بیان در سویه Tuner مشاهده شد و پروتئین نوترکیب با استفاده از رزین کروماتوگرافی Ni-NTA تخلیص شد. همچنین، نشان داده شد که HBcAg نوترکیب تولید شده از نظر ساختاری و ایمونولوژیکی شبیه به فرم طبیعی آن است و از آن برای تولید آنتی بادی های پلی کلونال ضد Hbc در خرگوش استفاده شد. آنتی بادی های پلی کلونال اختصاصی ضد HBcAg پس از تخلیص برای بهینه سازی یک الیزای ساندویچ مورد استفاده قرار گرفتند و الیزای ساندویچ طراحی شده قادر به شناسایی HBcAg به هر دو فرم نوترکیب و طبیعی است.

کلونینگ HBcAg (اسید آمینه ۱۸۳-۱) در pET22b و در سویه بیانی BL21(DE3) قبلا گزارش شده است (۱۵) اما نتایج مطالعه ما نشان داد که میزان بیان HBcAg (اسید آمینه ۱-۱۴۹) کلون شده در pET22b در میزبان های بیانی مختلف بسیار ناچیز بود، لذا تصمیم بر این شد که این ژن در وکتور pColdI کلون شود.

سطح بیان HBcAg در شش میزبان بیانی مختلف، از جمله Rosetta-gami (DE3) plysS, BL21 (DE3), Tuner (DE3), Novablue (DE3), Origami (DE3) و Shuffle (DE3)، مورد ارزیابی قرار گرفت و بالاترین سطح بیان پروتئین در سویه Tuner و بعد از آن در BL21 و Rosetta-gami مشاهده شد

به سبب این که فولدینگ مناسب HBcAg نوترکیب به تشکیل پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولی بین دو سیستمین شماره ۶۱ نیاز دارد، آنتی ژن نوترکیب در سویه ی Rosetta-gami بیان شد؛ چراکه شرایط اکسیداتیو سیتوپلاسم در آن، باعث تشکیل بهتر پیوندهای دی سولفیدی می شود (۲۰-۲۲).

HBcAg هم به صورت انکلوژن بادی در بافر لیز ۲ و هم به فرم طبیعی در فضای پری پلاسمی و در بافر لیز ۱ آزاد شد. اما از آنجا که این پروتئین در فرم طبیعی خود به دلیل در دسترس نبودن دنباله هیستیدینی قادر به اتصال به رزین Ni-NTA نبود، تخلیص این پروتئین از انکلوژیون بادی توسط بافر لیز ۲ که حاوی ۶ مولار اوره برای حل شدن پروتئین های انباشته شده در انکلوژن بادی بود، استفاده شد. پس از اتصال HBcAg نوترکیب به ستون Ni-NTA، پروتئین های حل شده با حذف تدریجی اوره از ۶ به ۰ مولار در طی شستشوی ستون مجددا فولد شدند. اما این فرآیند منجر به رسوب آنتی ژن بر روی ستون و از دست دادن اکثر آنتی ژن ها در طول شستشو شد. حذف ۶ مولار اوره در حین دیالیز نیز منجر به اگریگه شدن آنتی ژن شد. بنابراین، با حفظ ۲ مولار اوره در بافر شستشو و بافر دیالیز از تجمع پروتئین جلوگیری شد. جایگزین های دیگر، مانند افزودن گلیسرول یا SDS نیز نتوانست از اگریگه شدن پروتئین جلوگیری کند. در تخلیص پروتئین با ستون Ni-NTA، به ازای پلت ۵۰۰cc کشت باکتری، به طور میانگین بیش از ۲mg HBcAg به دست آمد. سپس، بررسی شد که آیا HBcAg نوترکیب تولید شده با فرم طبیعی آن شباهت ساختاری و ایمونولوژیکی نشان می دهد یا خیر. بر این اساس، آنتی بادی های ضد Hbc در سرم بیماران

تشکر و قدردانی

۹۷-۰۲-۲۷-۳۷۲۴۷ و شماره قراردادهای مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور ۹۵۸۳۶۴۸۰ و ۹۷۰۱۵۹۰۰ می باشند.

تعارض منافع

تعارض منافع میان نویسندگان مقاله وجود ندارد.

این مقاله نتیجه بخشی از طرح های تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران و همچنین صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور است. شماره قراردادهای مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران ۹۷-۰۲-۲۷-۳۷۲۴۶، ۹۸-۰۱-۲۷-۴۲۲۴۱،

REFERENCE

- .1 WHO. World Hepatitis Day 2018, World Health Organization, 2018 [Available from: <https://www.who.int/campaigns/world-hepatitis-day/2018>].
- .2 DiMattia MA, Watts NR, Stahl SJ, Grimes JM, Steven AC, Stuart DI, et al. Antigenic switching of hepatitis B virus by alternative dimerization of the capsid protein. *Structure* (London, England : 1993). 2013;21(1):133-42.
- .3 Nassal M, Rieger A. An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus. *Journal of virology*. 1993;67(7):4307-15.
- .4 Schödel F, Peterson D, Zheng J, Jones JE, Hughes JL, Milich DR. Structure of hepatitis B virus core and e-antigen. A single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(2):1332-7.
- .5 Wasenauer G, Köck J, Schlicht HJ. A cysteine and a hydrophobic sequence in the noncleaved portion of the pre-C leader peptide determine the biophysical properties of the secretory core protein (HBe protein) of human hepatitis B virus. *Journal of virology*. 1992;66(9):5338-46.
- .6 Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, et al. Hepatitis B virus DNA-negative dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J Biol Chem*. 2005;280(23):21713-9.
- .7 Messageot F, Salhi S, Eon P, Rossignol J-M. Proteolytic processing of the hepatitis B virus e antigen precursor cleavage at two furin consensus sequences. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(5):2783-3.
- .8 Zhuang X, Watts NR, Palmer IW, Kaufman JD, Dearborn AD, Trenbeath JL, et al. Chimeric rabbit/human Fab antibodies against the hepatitis Be-antigen and their potential applications in assays, characterization, and therapy. *J Biol Chem*. 2002;277(40):29201-7.
- .9 Packianathan C, Katen SP, Dann CE, 3rd, Zlotnick A. Conformational changes in the hepatitis B virus core protein are consistent with a role for allostery in virus assembly. *Journal of virology*. 2010;84(3):1607-15.
- .10 Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Stahl SJ, Wingfield PT, Belnap DM, et al. Hepatitis B virus capsid: localization of the putative immunodominant loop (residues 78 to 83) on the capsid surface, and implications for the distinction between c and e-antigens. *Journal of molecular biology*. 1998;279(5):1111-21.
- .11 Kenney JM, von Bonsdorff CH, Nassal M, Fuller SD. Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure* (London, England : 1993). 1995;3(10):1009-19.
- .12 Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2003;38(5):1075-86.
- .13 Milich DR, Chen M, Schödel F, Peterson DL, Jones JE, Hughes JL. Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(26):14648-53.
- .14 Konerman MA, Lok AS. 32 - Epidemiology, Diagnosis, and Natural History of Hepatitis B. In: Sanyal AJ, Boyer TD, Lindor KD, Terrault NA, editors. *Zakim and Boyer's Hepatology* (Seventh Edition). Philadelphia: Elsevier; 2018. p. 474-84.e4.

- .15 Bin Mohamed Suffian IF, Garcia-Maya M, Brown P, Bui T, Nishimura Y, Palermo AR, et al. Yield Optimisation of Hepatitis B Virus Core Particles in E. coli Expression System for Drug Delivery Applications. *Sci Rep.* 2017;7:43160.
- .16 Moradi Vahdat M, Hemmati F, Ghorbani A, Rutkowska D, Afsharifar A, Eskandari MH, et al. Hepatitis B core-based virus-like particles: A platform for vaccine development in plants. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands).* 2021;29:e00605.
- .17 Zhang Y, Guo M, Zhang X, Zhang N, Zhu P, Wang H. Multiple optimizations of recombinant plasmid for improving expression of Hepatitis B core antigen in Escherichia coli. *Protein expression and purification.* 2022;198:106127.
- .18 Watts NR, Palmer IW, Eren E, Steven AC, Wingfield PT. Capsids of hepatitis B virus e antigen with authentic C termini are stabilized by electrostatic interactions. *FEBS Letters.* 2020;594(6.61-1052:(
- .19 Kim H, Ko C, Lee JY, Kim M. Current Progress in the Development of Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulators: Chemical Structure, Mode-of-Action and Efficacy. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2021;26.(24)
- .20 Watts NR, Conway JF, Cheng N ,Stahl SJ, Steven AC, Wingfield PT. Role of the propeptide in controlling conformation and assembly state of hepatitis B virus e-antigen. *Journal of molecular biology.* 2011;409(2):202-13.
- .21 Nazari M, Zarnani AH, Ghods R, Emamzadeh R, Najafzadeh S, Minai-Tehrani A, et al. Optimized protocol for soluble prokaryotic expression, purification and structural analysis of human placenta specific-1(PLAC1). *Protein expression and purification.* 2017;133:139-51.
- .22 Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(24):13703-8.