Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(109): 60-68

Cloning, Expression and Purification of the Recombinant HIV-1 Tat-Nef Fusion Protein in Prokaryotic Expression System

Somayeh Kadkhodayan[1], Shiva Irani[2], Seyed Mehdi Sadat[3], Fatemeh Fotouhi[4], Azam Bolhassani[5*]

1- PhD Student, Department of Biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
4- Associate Professor, Influenza Research Lab., Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
5- Associate Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 8 Feb 2016, Accepted: 6 Apr 2016

Abstract

Background: Nef is one of the HIV-1 critical proteins, because it is essential for viral replication and AIDS disease progression and induction of immune response against it can partially inhibit viral infection. Moreover, a domain of the HIV-1 Trans-Activator of Transcription (Tat, 48-60 aa) could act as a cell penetrating peptide (CPP). In current study, cloning and expression of Tat-Nef fusion protein was performed in *E. coli* for the first time. The protein expression was confirmed by western blot analysis and was purified using reverse staining method.

Materials and Methods: In this experimental study, primarily, cloning of Tat-Nef fusion gene was done in pGEX6p2 expression vector. Then, the expression of Tat-Nef recombinat protein in *E.coli* BL21 (DE3) strain was performed by using IPTG inducer. The protein expression was confirmed by SDS-PAGE and western blotting using anti-Nef monoclonal antibody. Then, the recombinant fusion protein was purified from gel using reverse staining method.

Results: The results of PCR analysis and enzyme digestion showed a clear band of ~ 726 bp in agarose gel indicating the correct Tat-Nef fusion cloning in pGEX6p2 prokaryotic expression vector. In addition, a 54 kDa band of Tat-Nef on SDS-PAGE revealed Tat-Nef protein expression that western blot analysis using anti-Nef monoclonal antibody confirmed it.

Conclusion: The purified Tat-Nef recombinant fusion protein will be used as an antigen for protein vaccine design against HIV infection.

Keywords: HIV virus, Nef, Tat, Recombinant protein, *E. coli,* Vaccine

*Corresponding Author:
Address: Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
Email: A_bolhasani@pasteur.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۴ (شماره پیاپی ۱۰۹)،تیر ۱۳۹۵، ۶۸-۶۰

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب فیوژن Tat-Nef ویروس HIV-1 در سیستم بیانی پروکاریوتی

سمیه کدخدایان[۱]، شیوا ایرانی[۲]، سید مهدی سادات[۳]، فاطمه فتوحی[۴]، اعظم بوالحسنی[۵*]

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استادیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۴- دانشیار، آزمایشگاه تحقیقاتی آنفلوانزا، بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۵- دانشیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: یکی از پروتئین‌های مهم ویروس HIV-1 به نام Nef نقش مهمی در چرخه تکثیر ویروس و پیشرفت بیماری ایدز دارد و القای پاسخ ایمنی بر ضد آن می‌تواند تا حدی عفونت ویروسی را مهار نماید. به علاوه، بخشی از ناحیه پروتئین فعال کننده رونویسی (Tat، اسید آمینه‌های ۴۸ تا ۶۰) از ویروس HIV توانسته است به عنوان یک پپتید نفوذ کننده سلولی (CPP) عمل نماید. در این تحقیق، برای اولین بار کلونینگ و بیان فیوژن Tat-Nef در باکتری اشرشیاکلی صورت گرفت. تأیید بیان پروتئین توسط آنالیز وسترن بلات و تخلیص آن از طریق روش رنگ آمیزی معکوس انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا کلونینگ فیوژن Tat-Nef در وکتور بیانی pGEX6p2 صورت گرفت. سپس القای بیان پروتئین نوترکیب Tat-Nef در باکتری اشرشیا کلی سویه BL21 (DE3) توسط القا کننده IPTG انجام شد. تأیید بیان از طریق تکنیک SDS-PAGE و وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef صورت گرفت. سپس، تخلیص پروتئین فیوژن توسط تکنیک رنگ آمیزی معکوس از روی ژل انجام شد.

یافته‌ها: نتایج آنالیز PCR و هضم آنزیمی، وجود باند واضح حدود ۷۲۶ جفت باز را روی ژل آگارز تأیید کرد که نشان‌گر کلونینگ صحیح فیوژن Tat-Nef در وکتور بیان پروکاریوتی pGEX6p2 بود. هم‌چنین، وجود باند پروتئینی حدود ۵۴ کیلودالتون روی ژل SDS-PAGE نشان‌گر بیان پروتئین Tat-Nef بود که توسط آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef در آنالیز وسترن بلات تأیید شد.

نتیجه‌گیری: پروتئین فیوژن نوترکیب Tat-Nef تخلیص شده به عنوان یک آنتی ژن برای طراحی واکسن پروتئینی در مقابل عفونت ویروس HIV استفاده خواهد شد.

واژگان کلیدی: ویروس HIV، Nef، Tat، پروتئین نوترکیب، باکتری اشرشیاکلی، واکسن

* **نویسنده مسئول:** ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز

Email:azam.bolhassani@yahoo.com

مقدمه

ویروس HIV یک نوع رترو ویروس متعلق به خانواده لنتی ویروس‌ها است. آلودگی به این ویروس سبب ایجاد بیماری ایدز می‌گردد. امروزه ایدز به عنوان یک بیماری رو به رشد که مشکل تمامی کشورهای جهان و بشریت است معرفی می‌گردد. تاکنون بیش از ۶۰ میلیون نفر در جهان به این عفونت مبتلا شده و این ویروس به عنوان یک معضل عمده بهداشت جهانی محسوب می‌گردد. به دلیل بار اقتصادی و بهداشتی سنگینی که به نظام سلامت جهانی وارد کرده است، دستیابی به واکسن موثر در پیش‌گیری و به خصوص درمان این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است(۱). انواع مختلفی از واکسن‌ها وجود دارد که شامل موارد زیر می‌باشد: واکسن‌های زنده ضعیف شده، واکسن‌های غیرفعال یا کشته شده، واکسن‌های ژنی، واکسن‌های پپتیدی/ پروتئینی و واکسن‌های ناقل نوترکیب. در میان انواع مختلف واکسن‌های طراحی شده در مقابل عفونت‌های HIV، پروتئین واکسن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. مزایای این گونه واکسن‌ها شامل سنتز تحت شرایط کنترل شده، عدم تحریک غیرضروری دستگاه ایمنی و عدم تولید واکنش‌های آلرژیک توسط سایر پروتئین‌ها و هم‌چنین تولید کاملاً ایمن آن‌ها می‌باشد(۲). پروتئین Nef ویروس HIV-1، یک پروتئین ۲۷ کیلودالتونی و سیتوپلاسمی است که در چرخه تکثیر ویروس و پیشرفت بیماری ایدز نقش اساسی دارد. این پروتئین، پروتئین کمکی در مراحل اولیه تکثیر ویروس است و موجب کاهش بروز مولکول‌های کلاس I و II مربوط به HLA می‌گردد که این امر ممکن است مکانیزم مهمی برای فرار ویروس از حمله سلول‌های $CD8^+$ سیتوتوکسیک و عدم شناسایی توسط سلول‌های $T\ CD4^+$ باشد. بنابراین، القای پاسخ ایمنی بر ضد پروتئین Nef می‌تواند تا حدی عفونت ویروسی را مهار نماید و کاندید مناسبی برای تهیه واکسن ضد HIV باشد(۳، ۴). واکسن‌های پروتئینی جهت تأثیرگذاری نیاز به سیستم‌های انتقالی مناسب دارند. در سال ۱۹۹۸، گرین و همکاران برای اولین بار نشان دادند که پروتئین Tat ویروس HIV می‌تواند از غشای سلول عبور کرده و وارد سیتوپلاسم شود. پروتئین Tat یک فعال کننده رونویسی در ویروس HIV است که دارای ۸۶ آمینو اسید بوده و دارای بخش غنی از آمینو اسید سیستئین و بخش بسیار بازی ۹ آمینو اسیدی است که از واحدهای آرژنین و لیزین تشکیل شده است و علاوه بر این دارای یک بخش متصل شونده به RNA می‌باشد. این پروتئین توسط دو اگزون کد می‌شود که اگزون ابتدایی بخش ۷۲ اسید آمینه‌ای انتهای آمینو پروتئین را کد می‌کند و برای فعالیت فعال کنندگی رونویسی در این پروتئین کافی است. مشاهده شده است که این پروتئین در محیط کشت سلولی می‌تواند وارد سلول شده و مستقیما به داخل هسته سلول انتقال یابد(۵، ۶). در مجموع، دمین‌های ترانسداکشن مشتق شده از پروتئین Tat، وکتورهای کاندید برای انتقال داخل سلولی ماکروملکول‌های درمانی از قبیل DNA و پروتئین‌ها هستند. توالی ۹ اسیدآمینه‌ای از پروتئین HIV-1 Tat (RKKRRQRRRR) توانایی ورود به سلول‌ها را از طریق غشای پلاسمایی و تجمع درون سلولی دارد. پروتئین Tat به طور فعال توسط سلول‌های آلوده شده با HIV آزاد می‌شود و در سرم افراد آلوده شده با HIV آشکار می‌شود. پروتئین Tat، بیان طیف گسترده‌ای از سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، فاکتورهای رشد و رسپتورهایشان را القا می‌کند. دمین بازی Tat در میان پروتئین‌های Tat جدا شده از سویه‌های مختلف HIV-1 به خوبی حفاظت شده است. با توجه به این مشخصات، Tat کاندید خوبی برای توسعه واکسن ضد ایدز یا داروها است(۹-۷). به منظور طراحی واکسن پروتئینی، انتخاب وکتور و میزبان بیانی مناسب، به طور قابل توجهی در افزایش فعالیت و میزان تولید پروتئین هدف موثر است. وکتور pGEX یکی از انواع وکتورهای بیانی در سیستم باکتریایی می‌باشد که باعث اتصال برچسب GST (GST-tag) به پروتئین می‌شود که برای تخلیص و پایداری پروتئین مفید است و با استفاده از پروموتر Tac بیان بالای پروتئین را موجب می‌شود(۱۰). هدف از این تحقیق، کلونینگ فیوژن Tat-Nef ویروس HIV-1 در وکتور بیانی پروکاریوتی مناسب و بررسی بیان و تخلیص آن در سیستم اشرشیاکلی به منظور استفاده بعدی به عنوان ایمونوژن در تهیه واکسن پروتئینی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کلونینگ فیوژن Tat-Nef داخل وکتور pGEX6p2

ابتدا طراحی و سنتز فیوژن Tat-Nef در وکتور pUC18 توسط شرکت BioMatik کانادا انجام شد. در اینجا طول کامل ژن Nef ویروس HIV-1 به قطعه کوتاه دمین ترانسداکشن (Tat اسید آمینه های ۴۸ تا ۶۰) فیوز گردید. توالی‌های مورد نظر با استفاده از مقالات و بانک ژن (pNL4-3) قابل دسترسی است. به منظور انجام PCR، پرایمرهای مورد نیاز طراحی شدند:

5' AT CGA ATT CGA CAT ATG TAT GGC) پرایمر پیش رو، 5' TGG AGG AAG AAG C 3' (ACT AGC GGC CGC TTA TCA GAA TTC CTG C 3' پرایمر پس رو. ژن Tat-Nef با آنزیم پلی مراز DNAی pfu (شرکت فرمنتاز) در درون دستگاه ترموسایکلر تکثیر شد. برنامه PCR به صورت ذیل می‌باشد:

دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای شروع انتخاب شد. فرآیند واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ سیکل به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و باز آرایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت. محصول PCR در کنار مارکر وزن مولکولی و بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و باندهای مربوطه بر روی دستگاه ترانس لومیناتور مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول PCR از ژل آگارز جدا و فرآیند خالص سازی طبق پروتکل استخراج ژن از ژل (کیاژن) انجام شد. محصول PCR ژن و پلاسمید pGEX6p2 هم زمان با دو آنزیم محدودالاثر *Eco*RI/NotI (بافر Fast) فرمنتاز برش داده شدند و پس از استخراج از ژل محصولات هضم شده، ژن Tat-Nef با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز در پلاسمید pGEX6p2 الحاق گردید. در مرحله بعد، ترنسفورماسیون باکتری اشرشیاکلی سویه *DH5a* توسط پلاسمید حامل ژن انجام شد. محیط کشت آگار جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به منظور غربال‌گری باکتری‌های ترانسفورم شده استفاده گردید. کلونی‌های رشد یافته برای مرحله استخراج DNA پلاسمیدی و در پی آن آنالیز PCR و هضم آنزیمی به منظور تأیید پلاسمید نوترکیب به کار برده شدند. به علاوه، تعیین توالی ژن مورد نظر نیز به منظور صحت توالی صورت گرفت. پس از تأیید، ترنسفورماسیون باکتری اشرشیاکلی سویه BL21(DE3) توسط پلاسمید حامل فیوژن Tat-Nef صورت گرفت.

بیان پروتئین Tat-Nef

کلنی‌های رشد یافته باکتری BL21 حاوی پلاسمید نوترکیب، داخل ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع (LB) حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. ۵۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های کشت داده شده به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع TY2X اضافه شد و در انکوباتور شیکردار تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا جذب محیط کشت حاوی باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۷ تا ۰/۸ رسید. سپس، ۵۰ میکرولیتر IPTG (یک میلی مولار) به عنوان القا کننده بیان پروتئین به محیط کشت اضافه گردید و تحت دماهای مختلف ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای به دست آوردن دمای اپتیمم در زمان‌های مختلف ۲، ۳ و ۴ ساعت قرار گرفت و رسوب‌گیری باکتری در این زمان‌ها انجام شد. در نهایت، آنالیز SDS-PAGE و وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef (شرکت آبکام) به منظور آشکارسازی و تعیین هویت پروتئین نوترکیب Tat-Nef انجام شد. به طور خلاصه، پروتئین‌های باکتریایی روی یک ژل ۱۲/۵ درصد SDS-PAGE جدا شدند و به غشای نیتروسلولز انتقال یافتند. پروتئین نوترکیب توسط آنتی بادی منوکلونال ضد Nef (۱:۱۰۰۰۰ حجمی/حجمی، شرکت آبکام) به عنوان آنتی بادی اول و سپس IgG توتال کونژوگه با پراکسیداز ضد موشی (۱:۱۰۰۰۰ حجمی/حجمی، شکرت سیگما) به عنوان آنتی بادی ثانویه تعیین هویت شد. باند پروتئینی مورد نظر با استفاده از سوبسترای پر اکسیداز به نام دی آمینو بنزیدین (DAB، شرکت سیگما) روی کاغذ نیتروسلولز آشکار شد.

خالص سازی پروتئین Tat-Nef با روش رنگ آمیزی معکوس

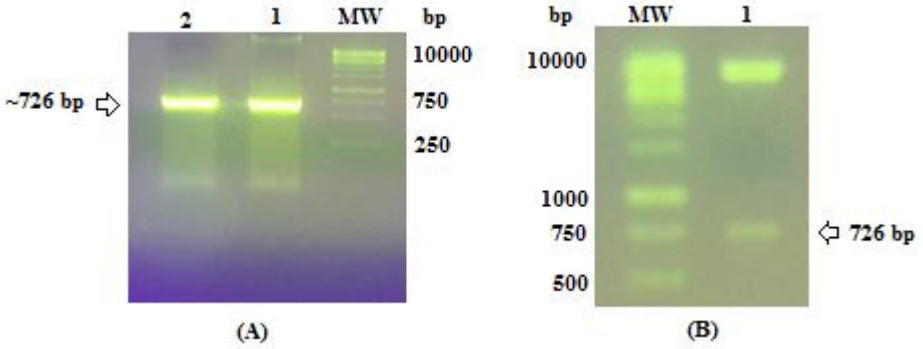
خالص سازی پروتئین Tat-Nef ویروس HIV-1 با استفاده از روش رنگ آمیزی معکوس صورت گرفت(۱۱). به این ترتیب که پس از اتمام مرحله SDS-

PAGE، ژل مربوطه به مدت ۵ دقیقه در بافر حاوی کربنات سدیم (Na_2CO_3)، به مدت ۱۵ دقیقه در بافر حاوی ایمیدازول/ سدیم دودسیل سولفات و در نهایت به مدت ۲دهفته در بافرحاوی سولفات روی قرار گرفت. سپس باند مربوط به پروتئین مورد نظر که به صورت شفاف و بی‌رنگ ظاهر می‌شود، از ژل جدا سازی شد و در بافر استخراج از ژل حاوی آمونیوم کربنات، خروج پروتئین از ژل انجام گرفت. در پایان، تغلیظ پروتئین توسط ستون‌های مخصوص با فیلتر ۳/۵ میکرون (هزار سوراخ) صورت گرفت.

یافته‌ها

کلون کردن ژن داخل وکتور pGEX6p2

تکثیر ژن Tat-Nef توسط پرایمرهای اختصاصی و آنزیم pfu پلیمراز که دارای خاصیت ویرایشی است از پلاسمید سنتزی pUC-Tat-Nef صورت گرفت. پس از هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید pGEX6p2، بقیه مراحل کلونینگ شامل الحاق و ترنسفورماسیون در باکتری DH5α انجام شد. استخراج پلاسمید از دو کلون صورت گرفت. سپس به منظور تأیید پلاسمید نوترکیب، آنالیز PCR و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Eco*RI و *Not*I انجام شد. شکل ۱، نتایج تأیید پلاسمید نوترکیب pGEX-Tat-Nef با استفاده از آنالیز PCR (A) و هضم آنزیمی (B) را توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد نشان می‌دهد. اندازه فیوژن Tat-Nef حدود ۷۲۶ جفت باز بوده است.



شکل ۱. تأیید پلاسمید نوترکیب pGEX-Tat-Nef توسط آنالیز PCR و هضم آنزیمی: A) آنالیز PCR؛ ستون‌های ۱ و ۲ : محصول تکثیر یافته ژن Tat-Nef از دو پلاسمید نوترکیب pGEX-Tat-Nef ؛ B) هضم آنزیمی یکی از پلاسمیدهای نوترکیب pGEX-Tat-Nef با آنزیم *Eco*RI/*Not*I ؛ MW مارکر وزن ملکولی (1kb، فرمنتاز) می‌باشد.

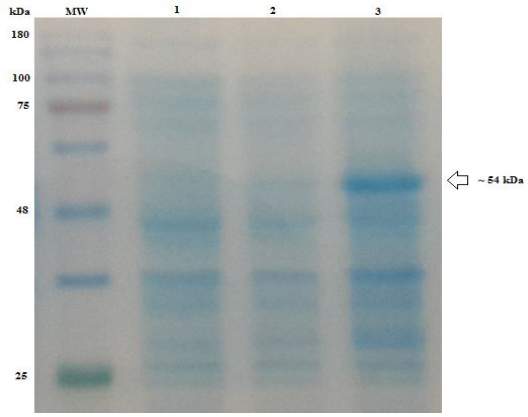
بیان پروتئین نوترکیب Tat-Nef

پس از ترنسفورماسیون سویه بیانی باکتری BL21 با پلاسمید نوترکیب pGEX-Tat-Nef و کشت کلونی‌های حاصل، القای بیان پروتئین با استفاده از القا کننده ایزوپروپیل تیو گالاکتوزید (IPTG) انجام شد. نتایج الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE حاکی از بیان پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود، در حالی که هیچ بیانی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آشکار نشد. شکل ۲ نتایج الکتروفورز روی ژل ۱۲/۵ درصد SDS-PAGE را در دو دمای مختلف ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. نتایج SDS-PAGE وجود باند واضح حدود ۵۴ کیلو دالتون مربوط به بیان Tat-Nef متصل به GST-tag را در دمای ۳۷ درجه نشان داد. به علاوه، نتایج نشان داد که بیان پروتئین در زمان‌های ۳ و۴ ساعت پس از القا با IPTG بیشتر از زمان ۲ ساعت پس از القا بود(شکل ۳).

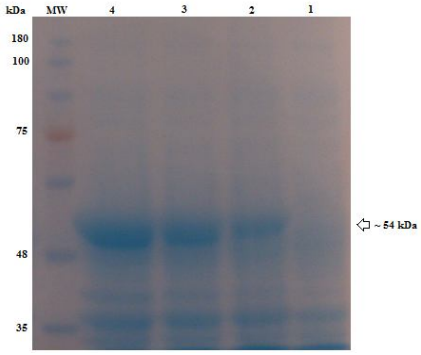
تخلیص پروتئین Tat-Nef

تخلیص پروتئین Tat-Nef با استفاده از روش رنگ آمیزی معکوس انجام گرفت. در این نوع رنگ آمیزی، باندهای مربوط به پروتئین‌ها شفاف و ژل کدر می‌باشد. با توجه به وزن مولکولی و نتایج قبلی الکتروفورز پروتئین روی ژل SDS-PAGE، باند مورد نظر تخلیص گردید. پس از تغلیظ پروتئین، نتایج روی ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد مشاهده گردید. شکل ۴ خلوص باند ۵۴ کیلودالتونی مربوط به Tat-Nef را نشان می‌دهد. آنالیز وسترن بلات توسط آنتی‌بادی منوکلونال Nef نیز هویت پروتئین مورد نظر را تأیید کرد. بر طبق این شکل، هیچ

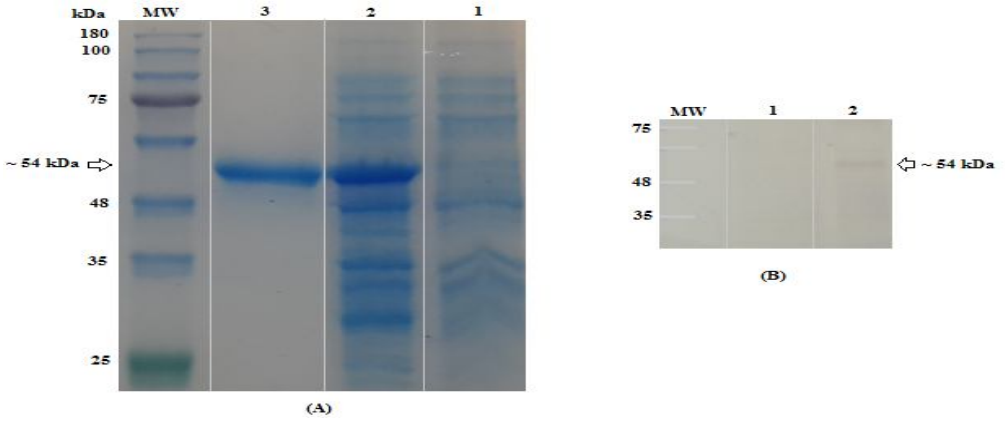
باندی در رسوب باکتری قبل از القا مشاهده نشد، در حالی که پس از القا، باند واضح پروتئینی ۵۴ کیلو باز مشاهده گردید.



شکل ۲. بررسی بیان پروتئین Tat-Nef در باکتری BL21(DE3) در دو دمای متفاوت: ستون ۱: نمونه رسوب باکتری قبل از القا با IPTG؛ ستون ۲: نمونه رسوب باکتری پس از القا با IPTG در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ ستون ۳: نمونه رسوب باکتری پس از القا با IPTG در دمای ۳۷ درجه؛ MW مارکر وزن مولکولی (۱۰ تا۱۷۰ کیلو دالتون، فرمنتاز) می‌باشد.



شکل ۳. بررسی بیان پروتئین Tat-Nef در باکتری BL21(DE3) در سه زمان متفاوت: ستون ۱: نمونه رسوب باکتری قبل از القا با IPTG؛ ستون ۲: نمونه رسوب باکتری در زمان ۲ ساعت پس از القا با IPTG؛ ستون ۳: نمونه رسوب باکتری در زمان ۴ ساعت پس از القا با IPTG؛ ستون ۴: نمونه رسوب باکتری در زمان ۳ ساعت پس از القا با IPTG؛ MW مارکر وزن مولکولی (۱۰ تا۱۷۰ کیلو دالتون، فرمنتاز) می‌باشد.



شکل ۴. تخلیص پروتئین Tat-Nef توسط رنگ آمیزی معکوس: A) ستون ۱: نمونه قبل از القا، ستون ۲: نمونه پس از القا، ستون ۳: نمونه پروتئین تخلیص شده؛ B) آنالیز وسترن بلات نمونه قبل از القای بیان پروتئین (ستون ۱)، نمونه پس از القای بیان پروتئین (ستون ۲)؛ MW مارکر وزن مولکولی (۱۰ تا۱۷۰ کیلو دالتون، فرمنتاز) می‌باشد.

بحث

دانشمندان تلاش زیادی برای درک ماهیت بیماری ایدز و عامل اساسی آن (ویروس HIV) انجام داده‌اند. بررسی‌ها نشان دادند که پروتئین Nef ویروس HIV برای افزایش تیتر ویروس به منظور پیشرفت به موقع به سمت بیماری ایدز لازم است. یکی از اولین اثرات نسبت داده شده به Nef توانایی برای کاهش سطح بیان CD4 در سلول آلوده می‌باشد(۳، ۴). تاکنون، مطالعات مختلفی روی پروتئین Nef برای به دست آوردن واکسن موثر بر علیه HIV انجام شده است؛ برای مثال، در یک پژوهش، DNA واکسن بیان کننده پروتئین HIV-P24-Nef ساخته شد و برای افزایش توانایی ایمنی‌زایی، از پلاسمیدهای بیانی اینترلوکین-۱۵ و GM-CSF به عنوان ادجوانت استفاده شد. در آزمایش دیگری، توانایی ایمنی‌زایی دو استراتژی

واکسیناسیون شامل وکتور ویروسی MVA ناقل ژن Nef و پلاسمید DNA بیان کننده ژن Nef مقایسه شدند. نتایج نشان داد که تزریق Nef-MVA و بعد از ۱۰ ماه تزریق DNA-Nef به عنوان بوستر موجب ایمنی بلند مدت‌تری می‌شود. در این استراتژی، هر دو نوع پاسخ ایمنی سلولی و هومورال بر ضد پروتئین Nef القا شدند. بنابراین این پروتئین می‌تواند به عنوان یک کاندید واکسن کارآمد در برابر عفونت HIV استفاده شود(۱۳-۱۱). با کشف پپتیدهای نفوذ کننده به درون سلول (CPP)، راه تازه‌ای در رساندن دارو به درون سلول به وجود آمده و این سیستم توانسته با بازده بالا، سمیت کم و انعطاف‌پذیری بالا، مواد مورد نظر را به درون سلول وارد نماید(۱۶-۱۴). یکی از بهترین پپتیدهای نفوذ کننده به سلول، بخش بازی پروتئین Tat ویروس نقص سیستم ایمنی انسان نوع HIV-۱ است که می‌تواند برای انتقال پروتئین به صورت کونژوگه به داخل سلول‌ها بدون آشفتگی در پایداری غشای سلولی و با آثار سمی کمتر استفاده شود(۲۰-۱۵). در این بررسی، با توجه به نقش‌های مهم دو پروتئین Nef و Tat به عنوان کاندیدهای واکسن، بیان و تخلیص پروتئین فیوژن نوترکیب Tat-Nef در سیستم بیان باکتریایی انجام شد که تاکنون در هیچ مقاله‌ای گزارش نشده است. در حقیقت، اتصال دمین ترنسداکشن Tat به منظور بهبود انتقال پروتئین Nef در سلول برای طراحی واکسن در بررسی‌های بعدی صورت گرفت. در این‌جا، از سلول بیانی اشرشیا کلی به منظور بیان پروتئین Tat-Nef استفاده شد. استفاده از سیستم بیانی اشرشیاکلی مزایای زیادی را به همراه دارد که از آن جمله می‌توان به میزان بالای تولید محصول نوترکیب در این سیستم و ارزان بودن استفاده از آن در تولید محصولات پروتئینی اشاره کرد؛ هر چند این سیستم دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها عدم تشکیل پیوند دی سولفیدی و عدم وجود پردازش پس از ترجمه می‌باشد(۲۱). پروتئین مورد نظر در این مطالعه مدیفیکاسیون‌های خاص پس از ترجمه را دارا نیست، بنابراین می‌توان از سیستم بیانی اشرشیاکلی برای بیان این پروتئین بهره گرفت(۲۱). همان طور که نتایج نشان داد، کلونینگ فیوژن Tat-Nef با اندازه حدود ۷۲۶ جفت باز به طور صحیح در وکتور بیان پروکاریوتی انجام شد. بیان پروتئین در سیستم بیانی pGEX/BL21 در دمای ۳۷ درجه و پس از ۳ ساعت از القا توسط آنتی رپرسور IPTG در غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار مشاهده گردید. باند واضح حدود ۵۴ کیلودالتون روی ژل SDS-PAGE مشاهده گردید که توسط آنالیز وسترن بلات با به کارگیری آنتی‌بادی ضد Nef تأیید شد. از روش رنگ آمیزی معکوس بر اساس استفاده از ایمیدازول-سدیم دو دسیل سولفات- روی برای خالص سازی پروتئین استفاده شد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تثبیت پروتئین با واسطه اتم روی در ژل برگشت پذیر است و پروتئین استخراج شده از ژل از نظر شیمیایی تغییر نمی‌یابد و با رنگ‌های آلی آلوده نمی‌شود. این روش باندهایی که اندازه‌ی آن‌ها تا ۵ نانوگرم پروتئین است را روی ژل آشکار می‌سازد(۱۱). روش رنگ آمیزی معکوس برای تخلیص پروتئین مورد نظر Tat-Nef نیز کارآیی بالایی نشان داد و باند مناسبی روی ژل SDS-PAGE مشاهده شد. پروتئین نوترکیب به دست آمده در این تحقیق به منظور به کارگیری در طراحی رژیم‌های مختلف واکسیناسیون درمانی و نیز به عنوان آنتی ژن در بررسی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی در مدل حیوانی استفاده خواهد شد.

نتیجه‌گیری

پروتئین فیوژن نوترکیب HIV-1 Tat-Nef در سیستم بیان اشرشیاکلی تولید شود که توسط تکنیک SDS-PAGE و آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef مورد تأیید قرار گرفت. میزان مناسبی از پروتئین با استفاده از تخلیص از طریق روش رنگ آمیزی معکوس به دست آمد. با توجه به بررسی‌های انجام شده، تاکنون گزارشی در زمینه تولید پروتئین فیوژن منتشر نشده است. هدف از تولید این پروتئین، استفاده از آن به عنوان کاندید واکسن پروتئینی در بررسی‌های بعدی است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از همکاران محترم بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران سرکار خانم‌ها متولی، آگی و شهبازی به خاطر کمک‌های کارشناسانه در این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. Journal of clinical virology. 2005; 34(4):233-44.
2. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Understanding Vaccines What They Are How They Work. NIH Publication.2008.
3. Baur A. Functions of the HIV-1 Nef protein. Curr Drug Targets Immune. Endocr Metabol Disord. 2004;4(4):309-13.
4. Amorim NA, da Silva EM, de Castro RO, da Silva-Januário ME, Mendonça LM, Bonifacino JS, et al. Interaction of HIV-1 Nef protein with the host protein Alix promotes lysosomal targeting of CD4 receptor. Journal of Biological Chemistry. 2014; 289(40):27744-56.
5. Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1994; 91(2): 664-8.
6. Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. Methods. 2001; 24(3):247-56.
7. Toro A, Grunebaum E. TAT-mediated intracellular delivery of purine nucleoside phosphorylase corrects its deficiency in mice. The Journal of clinical investigation. 2006; 116(10): 2717-26.
8. Kaplan IM, Wadia JS, Dowdy SF. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. Journal of Controlled Release. 2005; 102(1): 247-53.
9. Rusnati M, Presta M. HIV-1 Tat protein: a target for the development of anti-AIDS therapies. Drug Fut. 2002; 27:481-93.
10. Glutathione S-transferase (GST) gene fusion system. Handbook from GE Healthcare.2009. Available from: http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/GST_gene_fusion_system_handbook.pdf.
11. Bråve A, Gudmundsdotter L, Gasteiger G, Hallermalm K, Kastenmuller W, Rollman E, et al. Immunization of mice with the nef gene from Human Immunodeficiency Virus type 1: Study of immunological memory and long-term toxicology. Infectious agents and cancer. 2007; 2(1): 1-11.
12. Cosma A, Nagaraj R, Bühler S, Hinkula J, Busch DH, Sutter G, et al. Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. Vaccine. 2003; 22(1):21-9.
13. Harrer E, Bauerle M, Ferstl B, Chaplin P, Petzold B, Mateo L, et al. Therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with a recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. Antivir Ther. 2005; 10(2):285-300.
14. Jo J, Hong S, Choi WY, Lee DR. Cell-penetrating peptide (CPP)-conjugated proteins is an efficient tool for manipulation of human mesenchymal stromal cells. Scientific reports. 2014; 4:1-8.
15. Munyendo WL, Lv H, Benza-Ingoula H, Baraza LD, Zhou J. Cell penetrating peptides in the delivery of biopharmaceuticals. Biomolecules. 2012; 2(2):187-202.
16. Madani F, Lindberg S, Langel Ü, Futaki S, Gräslund A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. Journal of Biophysics. 2011; 2011.
17. Di Liddo R, Grandi C, Venturini M, Dalzoppo D, Negro A, Conconi M, et al. Recombinant human TAT-OP1 to enhance NGF neurogenic potential: preliminary studies on PC12 cells. Protein Engineering Design and Selection. 2010; 23(11):889-97.
18. Barka T, Gresik EW, van der Noen H. Transduction of TAT-HA-β-galactosidase fusion protein into salivary gland-derived cells and organ cultures of the developing gland, and into rat submandibular gland in vivo. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2000; 48(11): 1453-60.
19. Cattelan P, Dolcetta D, Hladnik U, Fortunati E. HIV-1 TAT-mediated protein transduction of

human HPRT into deficient cells. Biochemical and biophysical research communications. 2013; 441(1):114-9.
20. Wang Y, Fu L, Liu B, Wang X, Wang K, Ye M. Construction of human LRIG1-TAT fusions and TAT-mediated LRIG1 protein delivery. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2015; 69:396-401.
21. Bell PA. E. coli expression systems. Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide. 2001:461-90.
22. Simpson RJ. Zinc/Imidazole procedure for visualization of proteins in gels by negative staining. Cold Spring Harbor Protocols. 2007; 2007(4): 4701-2.