

طراحی و ساخت سازه ی E2-fliC با استفاده از ژن *fliC* باکتری سالمونلا انتریکا و ژن E2 ویروس هپاتیت C و بیان آن در سیستم یوکاریوتی

محمد مهدی سلطان دلال^۱، ابوالفضل کشاورز^۲، ابراهیم کرد^۳، نسترن انصاری^۳، زمانه حاجی خضری^۳، کتابون صمیمی راد^۴

چکیده

زمینه و هدف: امروزه یکی از راهکارهای طراحی واکسن، تهیه فیوژن پروتئینهای حاصل از عوامل ایمنوژن عامل عفونی با پروتئین ادجوانت می باشد. مطالعه ی حاضر برای طراحی و ساخت سازه ی E2-fliC به عنوان کاندید واکسن با استفاده از ژن *fliC* باکتری سالمونلا انتریکا و ژن E2 ویروس هپاتیت C و بیان آن در سیستم یوکاریوتی اجرا گردید.

روش بررسی: در این مطالعه که به صورت یک تحقیق بنیادی-کاربردی است، برای ساخت سازه ی E2-fliC، دو قطعه ی E2 و *fliC* از پلاسمیدهای pBluescript-E2 و pBluescript-fliC به روش PCR تکثیر شدند. برای تهیه پلاسمید نوترکیب pcDNA-E2-fliC، ابتدا پلاسمید pcDNA3.1(+) از سلولهای DH5 α استخراج و قطعه ی E2 در آن الحاق گردید. با تهیه پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1-E2، در مرحله بعد الحاق قطعه ی *fliC* در آن انجام شد. برای ارزیابی بیان سازه ی E2-fliC، سازه در پلاسمید pEGFP-N3 الحاق گردید و ترانسفکشن پلاسمید نوترکیب pEGFPN3-E2-fliC به سلولهای COS-7 انجام شد تا بیان پروتئین در زیر میکروسکوپ فلورسنت با مشاهده ی نور سبز ارزیابی شود.

یافته ها: ظهور نور فلورسان سبز در سلولهای مورد مطالعه توسط میکروسکوپ فلورسنت، بیشترین بیان از ساختار E2-fliC را ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن نشان داد. به علاوه تهیه پلاسمید نوترکیب pcDNA-E2-fliC با روش PCR، برش آنزیمی و توالی یابی تایید شد.

نتیجه گیری: یافته های ما پیشنهاد می کنند که فیوژن پروتئین E2-FliC به طور موثری بیان شده و ممکن است از لحاظ آنتی ژنیسیته بتواند همانند پروتئین E2 ویروس آلوده کننده، پس از ایمونیزاسیون موش ها با pcDNA-E2-fliC به عنوان کاندید واکسن در تحریک سیستم ایمنی عمل کند.

واژه های کلیدی: ژن *fliC* سالمونلا انتریکا، ژن E2، ویروس هپاتیت C، بیان سازه ی E2-fliC، فیوژن پروتئین

دریافت مقاله : شهریور ۱۳۹۶
پذیرش مقاله : دی ۱۳۹۶

* نویسنده مسئول :
کتابون صمیمی راد؛

دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email :
ksamimirad@tums.ac.ir

^۱ استاد گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ دانشجوی دکتری ویروس شناسی پزشکی، گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۴ دانشیار گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اپی توپ هایی برای تحریک ایمنی سلولار نیز دارد (۱۸).

با توجه به گزارش های موجود که از یک طرف حاکی از ویژگی ادجوانتی پروتئین FliC سالمونلاست و استفاده از آن را در واکسن های ویروسی با سازه ای مرکب از ژن فیوز شده *fliC* و ژن آنتی ژن هدف مطرح می کند و از طرف دیگر پروتئین E2 ویروس هپاتیت C را به عنوان یک ایمونوژن مناسب معرفی می کنند (۱۹)، مطالعه حاضر را با هدف ساخت سازه ای از ژن *fliC* در کنار ژن E2 ویروس هپاتیت C و سپس ارزیابی بیان پروتئین حاصل از این سازه انجام دادیم تا از آن در مطالعه ی بعدی به عنوان کاندید واکسن در ارزیابی ایمونولوژیکی بر روی مدل حیوانی استفاده کنیم.

روش بررسی

• طراحی و ساخت سازه ی E2-fliC

این مطالعه به صورت یک طرح بنیادی-کاربردی با هدف طراحی و ساخت سازه ای شامل قطعه ی ژن E2 از ویروس هپاتیت C که کد کننده ی پروتئین ایمونوژن این ویروس است و قطعه ی ژن *fliC* از باکتری سالمونلا که کد کننده ی پروتئین فلاژلین به عنوان ادجوانت می باشد، صورت پذیرفت. برای طراحی سازه ی E2-fliC، توالی قطعه ی E2 از سویه استاندارد H77 ژنوتیپ 1a ویروس هپاتیت C با شماره بانک ژنی AF011753.1 و توالی قطعه ی *fliC* از ۱۰۰۲ جفت نوکلئوتید ابتدای ژن *fliC* باکتری سالمونلا با شماره بانک ژنی CJRW01000001 انتخاب گردید. از آنجا که سازه ی طراحی شده یک سازه ی بیانی است، لذا در ابتدا و انتهای سازه، کدون های آغاز و خاتمه قرار داده شد. از نظر طراحی و بهینه سازی، سازه ی E2-fliC با نرم افزار BioEdit بررسی و تایید شد. بخش مربوط به قطعه ی E2 و بخش مربوط به قطعه ی *fliC* به طور جداگانه در پلاسمید pBluescriptIISK(+) به صورت pBluescript-E2 و pBluescript-fliC سفارش داده شد و پس از دریافت، ابتدا نمونه ها طبق دستورالعمل همراه آنها در بافر TE آماده سازی شدند. جهت به دست آوردن قطعات E2 و *fliC* از pBluescript حاوی آنها، پرایمرهای PCR با نرم افزارهای Oligo7 و Primer Express طراحی شدند (جدول ۱) و پس از سفارش و دریافت، در بافر TE آماده شدند.

سالمونلاها انواع مختلفی از پروتئین فلاژلین تاژک را بیان می کنند که مهمترین آنها پروتئین FliC است (۱). آنها متعلق به دسته ی ادجوانت های کموکاین/سایتوکاین هستند و می توانند ایمنی محافظت کننده ی موثری را ایجاد کنند. اثرات ادجوانتی آنها پاسخ ایمنی را به سمت هر دو پاسخ ایمنی سلولی و همورال سوق می دهد (۲-۵). آنچه که امروزه تولید فیوژن پروتئین های تشکیل شده از آنتی ژن و فلاژلین را در تحقیقات امکان پذیر کرده است، تعداد رو به افزایش مطالعاتی است که عملکرد فلاژلین را به عنوان یک ادجوانت و یک فعال کننده ی قوی برای طیف وسیعی از انواع سلول هایی که در ایمنی اکتسابی و ذاتی نقش دارند، تایید می کنند (۶). در حال حاضر از استراتژی فیوژن پروتئین ها در تهیه واکسن استفاده می شود و نتایج به دست آمده از تحقیقات صورت گرفته حاکی از آن است که این واکسن ها در مدل های حیوانی می توانند به صورت واکسن های موثری عمل کنند (۷-۱۰). از جمله خصوصیات که فلاژلین را به عنوان ادجوانت، کاندید جذابی برای استفاده در ساختار واکسن های انسانی معرفی می کند، می توان از تحویل آنتی ژن به سیستم ایمنی، به طوری که پردازش آنتی ژن به خوبی صورت گیرد، عدم نیاز به دوز بالای آن، سمی نبودن، سهولت تولید مقدار زیادی از پروتئین و عدم تخریب فعالیت ادجوانتی آن در صورت وجود ایمنی قبلی به آن نام برد (۱۱-۱۴).

امروزه تحقیق در زمینه ی تولید واکسن موثر برای پیشگیری و یا درمان عوامل عفونی از مهمترین اولویت های تحقیقاتی است (۱۵). پیشگیری از هپاتیت C به عنوان یکی از تهدیدات بهداشت عمومی از جمله این اولویت هاست (۱۶). به همین دلیل در حال حاضر بخش قابل توجهی از تحقیقات در زمینه ی ویروس هپاتیت C متوجه تهیه واکسن برای این ویروس می باشد. امروزه شواهد قوی وجود دارد که نقش مهم آنتی بادی های اختصاصی ویروس در بهبودی عفونت را نشان می دهد (۱۷). با توجه به این شواهد و به دلیل سابقه ی استفاده ی موفق از پروتئین های سطحی ویروس ها در طراحی واکسن، محققان پروتئین های سطحی ویروس هپاتیت C (E2, E1) را به عنوان کاندید ایمونوژن در تولید واکسن پیشگیری کننده ی هپاتیت C مورد بررسی قرار دادند. یافته های محققان نشان می دهد که پروتئین E2 ویروس هپاتیت C می تواند به عنوان یک ایمونوژن مناسب در طراحی واکسن استفاده شود، زیرا علاوه بر اپی توپ های محرک ایمنی همورال،

جدول ۱: پرایمرهای مربوط به قطعات E2 و *fliC* برای تکثیر از (+) pBluescript II Sk

ردیف	نام قطعه	پرایمر	توالی (3' → 5')
۱	E2	Forward	GGCGCTAGCATGCTACTAGTAAATCAGTCAC
۲	E2	Reverse	TAGGATCCCTCGGACCTGTCCCTGTCTTC
۳	<i>fliC</i>	Forward	GGATCCATGGCACAAGTCATTAATACAAAC
۴	<i>fliC</i>	Reverse	TCTAGATTAGGTACCTGCATAGCCACCATCAATAACC

• تهیه سازه بیانی *pcDNA3.1-E2-fliC*

در ابتدا به منظور تکثیر قطعه ی E2 از پلاسمید pBluescript-E2 و تهیه سازه ی بیانی *pcDNA3.1-E2*، برای دستگاه ترمال سایکلر دمای واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد تنظیم شد و در هر چرخه از ۳۰ چرخه تکثیر، دمای واسرشت به مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و دمای اتصال به مدت ۱ دقیقه در ۶۶ درجه سانتی گراد و دمای گسترش/طویل شدن در هر چرخه به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد تنظیم شد و نهایتاً دمای گسترش/طویل شدن پایانی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. محصول حاصل از تکثیر در ژل آگارز بارگذاری شد. سپس بقیه محصول PCR در یک ژل آگارز جهت استخراج قطعه ی E2 بارگذاری گردید و با کیت Qiaquick GelExtraction (QIAGEN) باند مورد نظر استخراج شد. در مرحله بعد برای تهیه *pcDNA3.1-E2* ابتدا سلول های باکتریایی DH5α حاوی پلاسمید *pcDNA3.1* در محیط LB broth کشت داده شدند و پس از گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد، سوسپانسیون باکتریایی سانتریفیوژ و رسوب باکتری جدا شد. پلاسمید *pcDNA3.1* به وسیله ی کیت QIAPrep Spin Miniprep (QIAGEN) استخراج گردید و بخشی از محصول استخراج در ژل آگارز بارگذاری شد. پلاسمید *pcDNA3.1* و قطعه ی E2 حاصل از PCR در دو میکروتیوب جداگانه با آنزیم های *NheI* و *BamHI* هضم آنزیمی شدند. قطعه ی E2 و *pcDNA3.1(+)* حاصل از برش آنزیمی در ژل آگارز بارگذاری شدند و با کیت Qiaquick GelExtraction، باندهای مورد نظر استخراج شدند. سپس الحاق قطعه ی E2 در *pcDNA3.1(+)* با آنزیم T4 DNA لیگاز (شرکت Roche) انجام شد. برای تایید الحاق قطعه ی E2 در *pcDNA3.1*، ترانسفورم پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1-E2* در DH5α انجام شد. برای این منظور، محصول الحاق به باکتری DH5α افزوده شد و پس از قرار دادن در یخ، در ۴۲ درجه سانتی گراد گذاشته شد. سلول های DH5α دریافت کننده ی پلاسمید به محیط LB broth اضافه شدند و

در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. از این سوسپانسیون سلولی در LB agar کشت داده شد. در مرحله ی بعد از کلنی های ایجاد شده به محیط LB broth و پلیت LB agar برده و گرمخانه گذاری گردید. استخراج پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1-E2* به وسیله ی کیت QIAPrep Spin Miniprep مطابق دستور العمل انجام شد و محصول استخراج، در ژل آگارز بارگذاری شد. برای تایید الحاق قطعه ی E2 در *pcDNA3.1*، برش آنزیمی با آنزیم های *NheI* و *BamHI* انجام شد. در ادامه به منظور تکثیر قطعه ژنی *fliC* و تهیه سازه بیانی *pcDNA3.1-E2-fliC* با الحاق ژن سنتتیک *fliC* به پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1-E2*، در مرحله اول تکثیر قطعه ی *fliC* از *pBluescript-fliC* انجام شد. برای تکثیر این قطعه، برنامه ترمال سایکلر شبیه برنامه قطعه ی E2 تنظیم شد، با این تفاوت که دمای اتصال به مدت ۱ دقیقه در ۶۴ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. محصول PCR در یک ژل آگارز جهت استخراج قطعه ی *fliC* بارگذاری گردید. سپس از کلون حاوی پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1-E2* که در مرحله ی قبل آماده سازی شده بود، با استفاده از کیت QIAPrep Spin Miniprep استخراج پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1-E2* انجام شد. بخشی از محصول استخراج، در ژل بارگذاری شد. قطعه ی *fliC* حاصل از PCR و پلاسمید *pcDNA3.1-E2*، در دو میکروتیوب جداگانه و هم زمان تحت تاثیر برش با آنزیم های *BamHI* و *XbaI* قرار گرفتند و بخشی از محصول برش آنزیمی در ژل آگارز بارگذاری شد و اثر برش های آنزیمی بررسی شد. محصول برش آنزیمی با کیت Qiaquick Gel Extraction استخراج شد. الحاق قطعه ی *fliC* در *pcDNA3.1-E2* هضم آنزیمی شده، با آنزیم T4 DNA لیگاز انجام شد. برای تایید ایجاد پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1-E2-fliC*، محصول الحاق به سلول های باکتریایی DH5α ترانسفورم شد. سلول های DH5α دریافت کننده ی پلاسمید فوق به محیط LB Broth اضافه شدند و در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس سوسپانسیون سلولی در LB agar کشت داده شد. از کلونی های

و در ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO2 قرار گرفتند. بدین ترتیب برای انجام ترانسفکشن، سلول COS-7 به مقدار کافی فراهم شد.

• ترانسفکشن پلاسمید نو ترکیب pEGFPN3-E2-fliC به

سلول های COS-7

محیط کشت از فلاسک حاوی کشت سلول های COS-7 خارج شد و سلول ها با PBS استریل شستشو داده شدند. پس از تریپسین کردن و تهیه رسوب سلولی، سلول ها در ۱ میلی لیتر محیط کشت RPMI یکنواخت شدند. از آنجا که در هر چاهک از پلیت چهارخانه، 0.5×10^4 سلول مورد نیاز است، ابتدا شمارش سلولی انجام شد. بدین منظور سوسپانسیون سلولی به نسبت یک به ده با تریپان بلو مخلوط شد و سپس به کمک لام نتوبار سلول های زنده شمارش شدند. تعداد 0.5×10^4 سلول در حجم ۰/۵ میلی لیتر به هر چاهک از پلیت چهارخانه اضافه شد و پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO2 گرمخانه گذاری شدند. برای ارزیابی ترانسفکشن پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سه پلیت چهارخانه در نظر گرفته شد. سپس مخلوطی شامل ۵ میکروگرم از پلاسمید pEGFPN3-E2-fliC در بافر (HEPES-Buffered saline) HBS و پلی اتیلن ایمین (PEI) ۱۰ میکرومولار برای NrE هفت به عنوان تست تهیه گردید و از چاهک های سلولی ترانسفکشن نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر کمپلکس به چاهک های سه پلیت چهارخانه ای اضافه شد و به مدت ۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت، محیط کشت هر چاهک خارج شد و با محیط فاقد سرم، یکبار شستشو داده شد. سپس محیط RPMI واجد سرم به هر چاهک اضافه شد و پلیت ها برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به صورت جداگانه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پلیت های مورد نظر پس از زمان های مشخص، در زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. به این ترتیب بیان پروتئین در زیر میکروسکوپ فلورسانس با مشاهده نور سبز ارزیابی گردید.

یافته ها:

• تکثیر ژن E2 و تهیه سازه بیانی pcDNA3.1-E2

جهت جداسازی قطعه ژنی E2 از پلاسمید pBluescript-E2، آزمایش PCR بر روی پلاسمید pBluescript-E2 انجام شد و پس از بارگذاری محصول PCR بر روی ژل آگارز، با کیت Qiaquick Gel Extraction باند قطعه ی E2 از ژل استخراج و بخشی از آن در ژل آگارز بارگذاری شد (شکل 1A). قطعه ی E2 حاصل از PCR و پلاسمید pcDNA3.1(+) استخراج شده از

حاصل به محیط LB broth و پلیت LB agar برده و گرمخانه گذاری شدند. استخراج پلاسمید نو ترکیب pcDNA-E2-fliC به وسیله ی کیت QIAprep Spin Miniprep انجام شد و محصول استخراج، در ژل آگارز بارگذاری شد. برای تایید الحاق قطعه ی fliC در pcDNA3.1-E2 برش آنزیمی با آنزیم های *XbaI* و *BamHI* انجام شد.

• تهیه سازه بیانی pEGFP-N3-E2-fliC

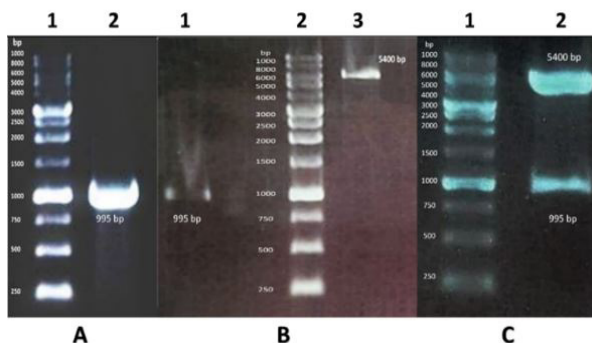
برای ارزیابی بیان سازه ی E2-fliC، این سازه در پلاسمید pEGFP-N3 الحاق گردید. بدین منظور ابتدا باکتری *E. Coli* TOP-10 حاوی پلاسمید pEGFP-N3 و باکتری *E. Coli* DH5α حاوی پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1-E2-fliC کشت داده شدند. استخراج پلاسمید pEGFP-N3 از سلول های TOP-10 و پلاسمید pcDNA-E2-fliC از سلولهای DH5α با کیت QIAprep Spin miniprep انجام شد، سپس پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1-E2-fliC و پلاسمید pEGFP-N3 با آنزیم های *KpnI* و *NheI* در دو مرحله برش خوردند و بخشی از محصول برش آنزیمی در ژل آگارز بارگذاری شد و اثر برش های آنزیمی بررسی شد. باندهای مربوط به سازه ی E2-fliC و pEGFP-N3 هضم آنزیمی شده، از ژل استخراج شدند. الحاق سازه E2-fliC در pEGFP-N3 با آنزیم T4 DNA لیگاز صورت گرفت و محصول الحاق که پلاسمید نو ترکیب pEGFP-N3-E2-fliC بود در DH5α ترانسفورم گردید. پس از انجام مراحل مشابه آنچه در مورد دو سازه ی بیانی قبلی گفته شد، پلاسمید نو ترکیب pEGFP-N3-E2-fliC در محیط های LB agar و LB broth کشت داده شد و در نهایت برای تایید الحاق سازه E2-fliC در pEGFP-N3، استخراج پلاسمید pEGFP-N3-E2-fliC انجام گرفت و برش آنزیمی با آنزیم های *KpnI* و *NheI* صورت پذیرفت.

• آماده سازی و کشت سلول های یوکاریوتی COS-7

برای بیان سازه ی E2-fliC در سلول های یوکاریوتی COS-7، ابتدا قطعه ی E2-fliC برای تعیین توالی ارسال شد و سپس در نرم افزار CLC بررسی گردید. برای تهیه فلاسک حاوی سلولهای COS-7، وقتی که ۷۰ تا ۸۰ درصد کف آن از سلول های مذکور پوشیده شد، سلولهای کف پلیت با PBS استریل شستشو داده شدند. ۲ میلی لیتر تریپسین به فلاسک اضافه شد و با ضربات آرامی که به فلاسک وارد شد، سلول ها از کف فلاسک جدا شدند. به منظور غیرفعال کردن تریپسین، مقداری محیط کشت کامل به فلاسک اضافه شد و محتویات فلاسک به فالكون ۵۰ میلی لیتری منتقل گردید. پس از سانتریفوژ، رسوب سلولی در محیط کشت کامل یکنواخت شد و با توجه به مقدار سلولی که داشتیم، سلول ها در فلاسک های کشت جدید تقسیم شدند

ترانسفورم محصول الحاق در سلول های DH5 α انجام شد. برای تایید الحاق، پلاسمید نو ترکیب pcDNA-E2 تحت تاثیر برش با آنزیم های *NheI* و *BamHI* قرار گرفت و بخشی از محصول برش آنزیمی در ژل آگارز بارگذاری شد (شکل 1C).

سلول های DH5 α در دو میکروتیوب جداگانه، با آنزیم های *NheI* و *BamHI* برش خوردند و پس از بارگذاری در ژل آگارز، با کیت Qiaquick Gel Extraction از ژل استخراج شدند و بخشی از محصولات استخراج در ژل آگارز بارگذاری شد (شکل 1B). سپس قطعه ی E2 در pcDNA3.1 با آنزیم T4 DNA لیگاز الحاق و



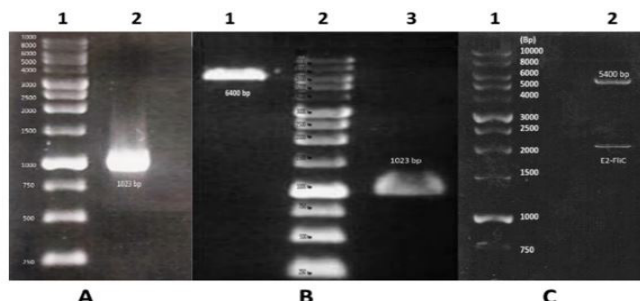
شکل ۱: تکثیر ژن E2 و تهیه سازه بیانی pcDNA3.1-E2

(A) تایید استخراج قطعه ی E2 به دست آمده به روش PCR از ژل آگارز؛ ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۲ قطعه ی E2 حاصل از استخراج محصول PCR. (B) تایید استخراج قطعه ی E2 و پلاسمید pcDNA3.1 هضم آنزیمی شده با آنزیم های *NheI* و *BamHI* از ژل آگارز؛ ستون ۱ قطعه ی E2 استخراج شده از ژل آگارز، ستون ۲ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۳ pcDNA3.1 استخراج شده از ژل آگارز. (C) تایید الحاق قطعه ی E2 در پلاسمید pcDNA3.1 به روش برش آنزیمی؛ ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۲ پلاسمید pcDNA3.1 و ژن E2 که تحت تاثیر برش پلاسمید نو ترکیب pcDNA-E2 با آنزیم های *NheI* و *BamHI* ایجاد شده اند.

خوردند و پس از بارگذاری در ژل آگارز، با کیت Qiaquick Gel Extraction از ژل استخراج شدند و بخشی از محصولات استخراج در ژل آگارز بارگذاری شد (شکل 2B). سپس قطعه ی *fliC* در pcDNA3.1-E2 با آنزیم T4 DNA لیگاز الحاق و ترانسفورم محصول الحاق در سلول های DH5 α انجام شد. برای تایید الحاق، پلاسمید نو ترکیب pcDNA-E2-*fliC* تحت تاثیر برش با آنزیم های *XbaI* و *NheI* قرار گرفت و بخشی از محصول برش آنزیمی در ژل آگارز بارگذاری شد (شکل 2C).

• تکثیر ژن *fliC* و تهیه سازه بیانی pcDNA3.1-E2-*fliC*

جهت جداسازی قطعه ی ژنی *fliC* از پلاسمید pBluescript-*fliC* آزمایش PCR بر روی پلاسمید pBluescript-*fliC* انجام شد و پس از بارگذاری محصول PCR بر روی ژل آگارز، با کیت Qiaquick Gel Extraction باند قطعه ی *fliC* از ژل استخراج و بخشی از آن در ژل آگارز بارگذاری گردید (شکل 2A). قطعه ی *fliC* حاصل از PCR و پلاسمید pcDNA3.1-E2 استخراج شده از سلول های DH5 α در دو میکروتیوب جداگانه و همزمان با دو آنزیم *BamHI* و *XbaI* برش



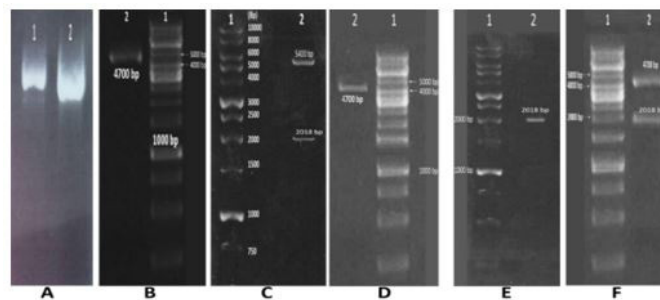
شکل ۲: تکثیر ژن *fliC* و تهیه سازه بیانی pcDNA3.1-E2-*fliC*

(A) تایید استخراج قطعه ی *fliC* به دست آمده به روش PCR از ژل آگارز؛ ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۲ قطعه ی *fliC* حاصل از استخراج محصول PCR. (B) تایید استخراج قطعه ی *fliC* و پلاسمید pcDNA3.1-E2 هضم آنزیمی شده با دو آنزیم *BamHI* و *XbaI* از ژل آگارز؛ ستون ۱ پلاسمید pcDNA3.1-E2 استخراج شده از ژل آگارز، ستون ۲ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۳ قطعه ی *fliC* استخراج شده از ژل آگارز. (C) تایید الحاق قطعه ی *fliC* در پلاسمید pcDNA-E2 و وجود سازه E2-*fliC* به روش برش آنزیمی؛ ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۲ پلاسمید pcDNA3.1 و سازه ی E2-*fliC* که تحت تاثیر برش پلاسمید نو ترکیب pcDNA-E2-*fliC* با آنزیم های *NheI* و *XbaI* ایجاد شده اند.

• تهیه سازه بیانی pEGFPN3-E2-fliC

بارگذاری در ژل آگارز با کیت Qiaquick Gel Extraction از ژل استخراج شدند و بخشی از محصول استخراج در ژل آگارز بارگذاری شد (شکل 3D و 3E). پس از تعیین توالی سازه E2-fliC (شکل 4) سازه در پلاسمید pEGFP-N3 با آنزیم T4 DNA لیگاز الحاق و ترانسفورم محصول الحاق در DH5α انجام شد. برای تایید الحاق قطعه ی fliC در پلاسمید pEGFP-N3 و تایید وجود سازه ی E2-fliC در آن، پلاسمید نوترکیب pEGFPN3-E2-fliC تحت تاثیر برش با آنزیم های NheI و KpnI قرار گرفت و بخشی از محصول برش آنزیمی در ژل آگارز بارگذاری شد (شکل 3F).

برای الحاق سازه E2-fliC در پلاسمید pEGFP-N3 در پلاسمید نوترکیب pcDNA-E2-fliC از E.Coli DH5α و پلاسمید E.Coli TOP-10 استخراج شدند و بخشی از محصول استخراج پلاسمیدها در ژل آگارز بارگذاری شد (شکل 3A). پلاسمید نوترکیب pcDNA-E2-fliC و پلاسمید pEGFP-N3 در دو میکروتیوب جداگانه و در دو مرحله با آنزیم های NheI و KpnI برش خوردند و بخشی از محصول برش آنزیمی در ژل آگارز بارگذاری شد (شکل 3B و 3C). پلاسمید pEGFP-N3 هضم آنزیمی شده و قطعه E2-fliC حاصل از هضم آنزیمی pcDNA-E2-fliC پس از



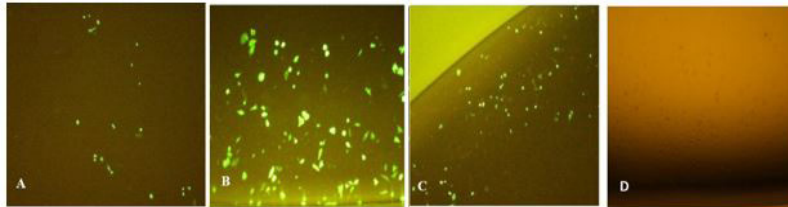
شکل ۳: تهیه سازه بیانی pEGFPN3-E2-fliC

- (A) تایید استخراج پلاسمیدهای pEGFPN3 و pcDNA3.1-E2-fliC (از سلول های باکتریایی؛ ستون ۱ پلاسمید pcDNA3.1-E2-fliC استخراج شده از DH5α، ستون ۲ پلاسمید pEGFPN3 استخراج شده از TOP-10).
- (B) تایید هضم آنزیمی پلاسمید pEGFP-N3 با آنزیم های NheI و KpnI؛ ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۲ پلاسمید pEGFP-N3 هضم آنزیمی شده.
- (C) تایید هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1-E2-fliC با آنزیم های NheI و KpnI؛ ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۲ باند های E2-fliC و pcDNA-E2-fliC حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pcDNA-E2-fliC.
- (D) تایید استخراج pEGFP-N3 هضم آنزیمی شده از ژل آگارز؛ ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۲ pEGFP-N3 استخراج شده از ژل آگارز.
- (E) تایید استخراج قطعه ی E2-fliC هضم آنزیمی شده از ژل آگارز؛ ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۲ سازه ی E2-fliC استخراج شده از ژل آگارز.
- (F) تایید الحاق قطعه ی E2-fliC در پلاسمید pEGFP-N3 به روش برش آنزیمی؛ ستون ۱ نشانگر اندازه مولکولی، ستون ۲ باند های pEGFP-N3 و E2-fliC که تحت تاثیر برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pEGFP-N3-E2-fliC با آنزیم های NheI و KpnI ایجاد شده اند.



شکل ۴: توالی نوکلئوتیدی سازه ی E2-fliC. سازه در انتهای 5' با جایگاه آنزیمی NheI شروع شده، به دنبال آن کدون آغاز، سیگنال پپتید، توالی نوکلئوتیدی شش اسید آمینه هیستیدین و توالی نوکلئوتیدی ژن E2 قرار گرفته است. انتهای 3' ژن E2 به جایگاه آنزیمی BamHI هضم شده و پس از آن ژن fliC قرار گرفته است. در انتهای 3' سازه جایگاه آنزیمی KpnI، کدون خاتمه و جایگاه آنزیمی XbaI قرار گرفته است.

حاوی پلاسمیدهای pEGFPN3-E2-fliC یا pEGFP-N3 به بافر HBS و PEI در چاهک های پلیت کشت سلولی، بررسی پلیت ها در زمان های مختلف، بهترین بیان پروتئین GFP را در ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن در زیر میکروسکوپ فلورسانس نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵: تایید بیان سازهی E2-fliC در سلول های COS-7.

A بیان GFP در سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pEGFP-N3-E2-fliC پس از ۲۴ ساعت.
B بیان GFP در سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pEGFP-N3-E2-fliC پس از ۴۸ ساعت.
C بیان GFP در سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pEGFP-N3-E2-fliC پس از ۷۲ ساعت.
D سلولهای کنترل منفی (ترانسفکت نشده).

از ژن E2 گزارش های سال های اخیر است که پیشنهاد می کنند که پیشگیری برای این ویروس نیازمند واکسنی است که بتواند پاسخ همورال قوی علیه ویروس ایجاد کند (۲۱) و نتایج به دست آمده از تحقیقات هم نشان می دهد که پاسخ آنتی بادی علیه پروتئین E2 در بدن میزبان آلوده می تواند ویروس هپاتیت C را خنثی کند و فرد آلوده را در مقابل ویروس حفاظت نماید (۲۰). با توجه به این نکته که هدف از ساخت سازهی E2-fliC استفاده از آن به عنوان کاندید واکسن و ایجاد ایمنی در مدل موشی در مطالعات بعدی است، بدین ترتیب برای ایجاد ایمنی و ارزیابی آن بیان سازه ساخته شده در مدل حیوانی صورت بگیرد. در این راستا برای اطمینان از بیان این فیوژن پروتئین در مدل حیوانی نیاز بود که در مرحله اول سازه در یک وکتور بیانی کلون شود و پس از ترانس فکشن در یک سلول یوکاریوتیک، بیان آن مشاهده شود. همان طور که در نتایج، ذکر شد بیان این فیوژن پروتئین با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس به کمک حضور GFP در ساختار پلاسمید pEGFP-N3 به عنوان گزارشگر در امتداد و فریم ساختار E2-fliC در سلول های COS-7 تایید شد. به علاوه بیان GFP در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانس فکشن، بیشترین بیان از ساختار E2-fliC را در ۴۸ ساعت پس از ترانس فکشن نشان داد. با در نظر گرفتن بررسی های قبلی که بر اساس تهیه سازه هایی از بعضی از پروتئین های ویروس هپاتیت C به غیر از پروتئین E2 و در مواردی هم همراه با ادجوانتی به جز FliC بوده است، تا آنجا که ما مطلع هستیم این اولین گزارش استفاده از FliC سالمونلا به عنوان ادجوانت همراه با E2 ویروس هپاتیت C می باشد. در این مطالعه در تهیه سازه

• تایید بیان سازهی pEGFPN3-E2-fliC در سلول های COS-7
پس از ترانسفکشن پلاسمید نوترکیب pEGFP-N3-E2-fliC در سلول های یوکاریوتی COS-7 و افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط

بحث

با توجه به عملکرد FliC به عنوان یک ادجوانت مناسب برای طیف وسیعی از سلول های دارای نقش در ایمنی اکتسابی و ذاتی (۶) محققان متعددی در تحقیقات خود فیوژن پروتئین هایی تشکیل شده از آنتی ژن خارجی و FliC را طراحی و تولید کرده اند و از آنها در تهیه واکسن استفاده کرده و پاسخ های ایمنی ایجاد شده از آنها را ارزیابی نموده اند. از جمله این تحقیقات می توان از مطالعه‌ی Skountzou و همکاران نام برد که با استفاده از فلاژلین سالمونلا به صورت ادجوانت یک واکسن مخاطی، توانستند محافظت در افرادی که در اپیدمی های آنفولانزا به این ویروس آلوده شده بودند را افزایش دهند (۲۰). در گزارش دیگری Delaney و همکاران در تحقیق خود واکسنی از فیوژن پروتئین تشکیل شده از فلاژلین سالمونلا و پروتئین LIR ویروس واکسینیا تهیه کردند. نتایج آنها نشان داد که واکسن تهیه شده توانست پاسخ آنتی بادی قوی را در موش هایی که با این واکسن ایمون شده بودند، ایجاد کند و به دنبال آن محافظت بسیار خوبی را علیه ویروس واکسینیا در این موش های ایمون شده مشاهده کردند (۹). نتایج مشابهی نیز توسط Zhang و همکاران در رابطه با اثر ادجوانتی فلاژلین سالمونلا در کنار بعضی از آنتی ژن های خارجی مثل آنتی ژن های ویروسی گزارش شده است (۱۹). با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیقات و نقش ادجوانتی فلاژلین، در مطالعه‌ی حاضر از ژن *fliC* در ساختار سازه‌ی طراحی شده استفاده کردیم. به علاوه ژن E2 ویروس هپاتیت C را به عنوان آنتی ژن خارجی در فیوژن با ژن *fliC* در این ساختار قرار دادیم (E2-fliC). علت استفاده



E2-fliC از همین الگو پیروی کردیم.

نتیجه گیری

یافته های ما پیشنهاد می کنند که فیوژن پروتئین E2-FliC به طور موثری بیان شده و از لحاظ آنتی ژنیسیته ممکن است مثل پروتئین E2 در ساختار ویروس آلوده کننده در تحریک سیستم ایمنی عمل کند. بدین ترتیب فیوژن پروتئین E2-FliC به منظور ارزیابی آنتی ژنیسیته E2 و نقش ادجوانتی FliC سالمونلا برای اهداف واکسن می تواند در مطالعات آینده استفاده شود. پیشنهاد می شود تا ساختار و مورفولوژی پروتئین فیوژن E2-FliC و همچنین اثر ادجوانتی FliC سالمونلا در پروتئین فیوژن E2-FliC در مدل حیوانی ارزیابی گردد. ارزیابی پاسخ ایمنی و چالش با سوش ویروس هپاتیت C در مدل حیوانی و ارزیابی پاسخ ایمنی و چالش با سوش ویروس هپاتیت C در کشت سلول Huh7.5 برای گسترش تحقیقات واکسن نیز پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه ی بخشی از طرح تحقیقاتی مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، به شماره قرارداد ۳۲۶۱۴ مورخ ۹۵/۵/۲۶ می باشد.

E2-fliC، توالی E2 را قبل از انتهای آمینی فلاژلین قرار دادیم. علت فیوژن توالی E2 با انتهای آمینی فلاژلین سالمونلا این بود که تحقیقات صورت گرفته ی قبلی نشان می دهند که در موارد تهیه فیوژن پروتئین با فلاژلین، ایجاد یا عدم ایجاد آنتی بادی های محافظت کننده، به شدت تحت تاثیر شکل فضایی آنتی ژن در داخل فیوژن پروتئین می باشد و شکل فضایی آنتی ژن نیز کاملاً وابسته به موقعیت توالی آن نسبت به فلاژلین سالمونلا در ساختار سازه است. در صورتی که در طراحی فیوژن پروتئین آنتی ژن خارجی در موقعیت نامناسب نسبت به پروتئین فلاژلین قرار بگیرد، مثلاً بجای اینکه مکان آن در انتهای کربوکسیلی توالی آنتی ژن طراحی شود، در ابتدای سازه، قبل از انتهای آمینی قرار بگیرد می تواند شکل فضایی را در آنتی ژن ایجاد کند که آنتی بادی علیه آنتی ژن ایجاد نشود و یا آنتی بادی های ایجاد شده، آنتی ژن را شناسایی نکنند (۶). به عنوان مثال جابجایی ناحیه بسیار متغیر فلاژلین با پروتئین LIR واکسینیا منجر به تولید واکسنی شد که آنتی بادی علیه LIR ایجاد نکرد ولی وقتی که توالی LIR در انتهای آمینی فلاژلین قرار گرفت، آنتی بادی ها ایجاد شدند و به خوبی با آنتی ژن واکنش نشان دادند (۹). اگر چه امکان پیش بینی قطعی در مورد اینکه آیا یک مکان خاص از فلاژلین حتماً مناسب یک آنتی ژن خاص می باشد، وجود ندارد، ولی گزارش ها حاکی از آن است که برای ایجاد یک فیوژن پروتئین، قرار گرفتن آنتی ژن در انتهای آمینی فلاژلین یک نقطه شروع بسیار مناسب است (۶). به همین جهت ما نیز در طراحی سازه ی

منابع

1. Braga CJ, Massis LM, Sbrogio-Almeida ME, Alencar BC, Bargieri DY, Boscardin SB, et al. CD8+ T cell adjuvant effects of *Salmonella* fliC_d flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine* 2010; 28(5): 1373-82.
2. Wang G, Shi B, Li T, Zuo T, Wang B, Si W, et al. Linear antigenic mapping of flagellin (fliC) from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with yeast surface expression system. *Veterinary Microbiology* 2016; 184(1): 20-6.
3. Rady HF, Dai G, Huang W, Shellito JE & Ramsay AJ. Flagellin encoded in gene-based vector vaccines is a route-dependent immune adjuvant. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0148701>. 2016.
4. Honko AN & Mizel SB. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infection and Immunity* 2004; 72(11): 6676-9.
5. Nguyen CT, Hong SH, Sin JI, Vu HV, Jeong K, Cho KO, et al. Flagellin enhances tumor-specific CD8+ T cell immune responses through TLR5 stimulation in a therapeutic cancer vaccine model. *Vaccine* 2013; 31(37): 3879-87.
6. Pandey JP. Comment on "Flagellin as an adjuvant: Cellular mechanisms and potential". *Journal of Immunology* 2011; 186(3): 1299.
7. Song L, Zhang Y, Yun NE, Poussard AL, Smith JN, Smith JK, et al. Superior efficacy of a recombinant flagellin: H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin. *Vaccine* 2009; 27(42): 5875-84.

8. Mizel SB, Graff AH, Sriranganathan N, Ervin S, Lees CJ, Lively MO, et al. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009; 16(1): 21-8.
9. Delaney KN, Phipps JP, Johnson JB & Mizel SB. A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice. *Viral Immunology* 2010; 23(2): 201-10.
10. Hiriart Y, Rossi AH, Biedma ME, Errea AJ, Moreno G, Cayet D, et al. Characterization of structural and immunological properties of a fusion protein between flagellin from *Salmonella* and Lumazine synthase from *Brucella*. *Protein Science* 2017; 26(5): 1049-59.
11. Weimer ET, Ervin SE, Wozniak DJ & Mizel SB. Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 2009; 27(48): 6762-9.
12. Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ & Mizel SB. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity* 2006; 74(2): 1113-20.
13. Ben-Yedidia T & Arnon R. Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. *Immunology Letters* 1998; 64(1): 9-15.
14. Honko AN & Mizel SB. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunologic Research* 2005; 33(1): 83-101.
15. Carlsen THR, Scheel TKH, Ramirez S, Fong SKH & Bukh J. Characterization of Hepatitis C Virus recombinants with chimeric E1/E2 envelope proteins and identification of single amino acids in the E2 stem region important for entry. *Journal of Virology* 2013; 87(3): 1385-99.
16. Von Delft A, Donnison TA, Lourenco J, Hutchings C, Mullarkey CE, Brown A, et al. The generation of a simian adenoviral vectored HCV vaccine encoding genetically conserved gene segments to target multiple HCV genotypes. *Vaccine* 2018; 36(2): 313-21.
17. Vietheer PT, Boo I, Gu J, Mccaffrey K, Edwards S, Owczarek C, et al. The core domain of Hepatitis C Virus glycoprotein E2 generates potent cross-neutralizing antibodies in guinea pigs. *Hepatology* 2017; 65(4): 1117-31.
18. Torresi J, Johnson D & Wedemeyer H. Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for Hepatitis C Virus. *Journal of Hepatology* 2011; 54(6): 1273-85.
19. Zhang L, Pan Z, Kang X, Yang Y, Kang H, Zhang N, et al. Amino acids 89-96 of *Salmonella* Typhimurium flagellin represent the major domain responsible for TLR5-independent adjuvanticity in the humoral immune response. *Cellular & Molecular Immunology* 2015; 12(5): 625-32.
20. Baumert TF, Fauvelle C, Chen DY & Lauer GM. A prophylactic Hepatitis C Virus vaccine: A distant peak still worth climbing. *Journal of Hepatology* 2014; 61(1): 34-44.
21. Major ME. Prophylactic and therapeutic vaccination against Hepatitis C Virus (HCV): Developments and future perspectives. *Viruses* 2009; 1(2): 144-65.

Design and Construction of E2-fliC Construct Using *fliC* Gene from *Salmonella* Enterica and E2 Gene from Hepatitis C Virus and its Expression in Eukaryotic System

Mohammad Mehdi Soltan Dallal¹ (Ph.D.) - Abolfazl Keshavarz²
(B.S.) - Ebrahim Kord³ (M.S.) - Nastaran Ansari³ (M.S.) - Zamaneh
Hajikhezri³ (M.S.) - Katayoun Samimi-Rad⁴ (Ph.D.)

1 Professor, Pathobiology Department, Microbiology Division, School of Public Health, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Master of Science Student in Food Microbiology, Pathobiology Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Ph.D. Candidate in virology, Medical Virology Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 Associate Professor, Medical Virology Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received: Aug 2017

Accepted: Dec 2017

Background and Aim: At the present time one of the strategies in vaccine design is generation of fusion proteins containing (including) immunogen of infectious agents and adjuvants. In this study design and construction of E2-fliC fragment as a vaccine candid was conducted by using *fliC* gene from *Salmonella enterica* and E2 gene from hepatitis C virus.

Materials and Methods: To prepare the E2-fliC construct, E2 and *fliC* fragments were first amplified from pBluscript-E2 and pBluscript-fliC, respectively by PCR method. To generate pcDNA-E2-fliC plasmid, E2 was subcloned into plasmid pcDNA3.1 (+) which was extracted from DH5 α cells. The *fliC* sequence was then cloned into the pcDNA3.1-E2. To evaluate the expression of E2-fliC construct, it was inserted into the pEGFP-N3 expression vector. Then COS-7 cells were transfected with pEGFPN3- E2-fliC to evaluate the expression of the fusion protein by observation of the EGFP signal under the fluorescence microscope.

Results: By development of GFP fluorescent using fluorescence microscopy the most expression of E2-fliC construct was observed at 24h after transfection. The accuracy of the recombinant plasmid pcDNA-E2-fliC was confirmed by PCR, restriction enzymes and DNA sequencing.

Conclusion: Our findings suggest that E2-FliC fusion protein has expressed efficiently and most likely similar to HCV E2 protein induces immune system of mice after their immunization with pcDNA-E2-fliC.

Keywords: *fliC* Gene, *Salmonella enterica*, E2 Gene, Hepatitis C Virus, Expression of E2-FliC, Fusion Protein

* Corresponding Author:
Samimi-Rad K
Email:
ksamimirad@tums.ac.ir