

Reverse staining: Effective method for purification of HIV-1 Nef protein in prokaryotic expression system

Jafarzade BS¹, Sadat M², Yaghoobi R³, Bolhassani A^{2*}

1- Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, I. R. Iran.

2- Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I. R. Iran.

3- Shiraz Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I. R. Iran.

Received February 7, 2016; Accepted September 4, 2016

Abstract:

Background: Nef protein is one of the HIV regulatory proteins. This protein has various conserved epitopes inducing the efficient immune responses in HIV-1 infected individuals. Thus, Nef protein has been proposed as a suitable candidate for vaccine design. In current study, our goal was the cloning and expression of Nef protein in prokaryotic expression system and its purification using the reverse staining method.

Materials and Methods: The coding sequence of Nef protein was amplified from pUC19-*nef* vector by PCR. Then, *nef* gene was inserted into the pGEX6p2 expression vector. This construct was transformed into the *E.coli* BL21 *E.coli* strain and subsequently protein expression was induced by IPTG anti-repressor. The protein expression was confirmed by SDS-PAGE and Western blot using anti-Nef antibody. Protein purification was performed by reverse staining method.

Results: The PCR and digestion analysis showed a clear band of 648 bp in agarose gel indicating the correct cloning of HIV-*nef* in pGEX6p2 expression vector. In addition, the detection of a clear 50 kDa band in Western blotting using Anti-Nef antibody suggests the Nef protein expression induced by IPTG. Finally, the purified protein was obtained by reverse staining method.

Conclusion: The recombinant Nef protein expressed in *E.coli* was purified by reverse staining method. The Nef protein has the potential of antigenicity for vaccine designing against HIV infections.

Keywords: HIV virus, Nef, Cloning, Expression and purification, Reverse staining, *E. coli*

*** Corresponding Author.**

Email: azam.bolhassani@yahoo.com

Tel: 0098 216 995 3311

Fax: 0098 216 646 5132

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2016; Vol. 20, No 5, Pages 420-426

Please cite this article as: Jafarzade BS, Sadat M, Yaghoobi R, Bolhassani A. Reverse staining: Effective method for purification of HIV-1 Nef protein in prokaryotic expression system. *Feyz* 2016; 20(5): 420-6.

رنگ‌آمیزی معکوس: روشی مؤثر برای تخلیص پروتئین Nef HIV-1 در سیستم بیان پروکاریوتی

بهناز سادات جعفرزاده^۱، سید مهدی سادات^۲، رامین یعقوبی^۳، اعظم بوالحسنی^{۴*}

خلاصه:

سابقه و هدف: پروتئین Nef، یکی از پروتئین‌های تنظیمی ویروس HIV، دارای اپی‌توپ‌های حفاظت شده متعددی است که در افراد آلوده به ایدز پاسخ‌های ایمنی قدرتمندی علیه آنها مشاهده شده است. بنابراین، پروتئین Nef کاندید مناسبی برای تولید واکسن می‌باشد. هدف این پژوهش کلونینگ و بیان پروتئین Nef در سیستم بیان پروکاریوتی و تخلیص آن به روش رنگ‌آمیزی معکوس می‌باشد. مواد و روش‌ها: توالی کدکننده پروتئین Nef از وکتور pUC19 توسط PCR تکثیر شد و الحاق آن به داخل وکتور بیانی pGEX6p2 انجام شد. این سازه طی فرایند ترانسفورماسیون به سویه باکتری *E. coli BL21* منتقل شده و القای بیان پروتئین با استفاده از آنتی‌رپرسور IPTG صورت گرفت. تأیید بیان پروتئین با استفاده از آنالیز SDS-PAGE و وسترن بلات توسط آنتی‌بادی ضد Nef بررسی گردید. تخلیص پروتئین با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی معکوس از روی ژل انجام شد. نتایج: نتایج آنالیز PCR و هضم آنزیمی وجود باند واضح حدود ۶۴۸ جفت باز را روی ژل آگاروز تأیید کرد که نشان‌گر کلونینگ صحیح ژن Nef در وکتور بیان پروکاریوتی pGEX6p2 می‌باشد. هم‌چنین، وجود باند حدود ۵۰ کیلودالتون نشان‌گر بیان پروتئین Nef توسط آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef در آنالیز وسترن بلات تأیید شد. در نهایت، باند خالص شده پروتئین توسط تکنیک رنگ‌آمیزی معکوس به دست آورده شد.

نتیجه‌گیری: پروتئین نو ترکیب Nef بیان شده در میزبان *E. coli* با بازده مناسب توسط روش رنگ‌آمیزی معکوس تخلیص شد. پروتئین Nef در آینده به‌عنوان یک آنتی‌ژن برای طراحی واکسن پروتئینی در مقابل عفونت ویروس HIV استفاده خواهد شد.

واژگان کلیدی: ویروس HIV، Nef، کلونینگ، بیان و تخلیص، رنگ‌آمیزی معکوس، اشریشیا کلی

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۵، صفحات ۴۲۶-۴۲۰

مقدمه

بیماری ایدز یکی از معضلات بهداشتی جهان می‌باشد. آمارهای ارایه شده اخیر از سوی سازمان ملل نشان می‌دهد که تقریباً ۳۴ میلیون نفر از مردم جهان به این بیماری مبتلا هستند و هرساله تعداد ۵/۶ میلیون نفر به آنها افزوده می‌گردد [۱]. در حال حاضر داروهای ضد رتروویروسی نظیر آنالوگ‌های نوکلئوزیدی و نوکلئوتیدی، مهارکننده‌های غیر نوکلئوزیدی ترانس کریپتاز معکوس و مهارکننده‌های پروتئازی برای درمان عفونت ویروس HIV، عامل بیماری ایدز، در دسترس هستند، اما عمده‌ترین مشکل در مورد این دسته از داروها مسئله بروز مقاومت دارویی است [۲-۴].

^۱ دانشجوی دکتری، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

^۲ استادیار، بخش هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۳ دانشیار، بخش تحقیقات پیوند، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

^۴ دانشیار، بخش هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش هیپاتیت و ایدز

تلفن: ۰۲۱۶۶۹۵۳۳۱۱ | دورنویس: ۰۲۱۶۶۴۶۵۱۳۲

پست الکترونیک: azam.bolhassani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۸ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۶/۱۴

امروزه تلاش‌های زیادی برای تولید واکسن HIV صورت گرفته است [۵]. ویروس نقص سیستم ایمنی اکتسابی تیپ ۱ (HIV-1) علاوه بر ژن‌های اصلی *gag*، *pol* و *env* دارای هفت ژن تنظیمی دیگر با نام‌های *nef*، *vif*، *vpr*، *vpu*، *rev* و *tat* نیز می‌باشد. محصول ژن *nef* پروتئین Nef می‌باشد [۶، ۷]. مطالعات گسترده نشان داده‌اند که مسیرهای سلولی متعددی توسط بیان این ژن تنظیم می‌شود. پروتئین Nef در مراحل اولیه عفونت با ویروس HIV به‌میزان بالایی همراه با پروتئین‌های Tat و Rev تولید می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که سه‌چهارم mRNAهای ویروسی در اوایل عفونت مربوط به Nef می‌باشد [۵، ۶]. تحقیقات انجام شده روی میمون به‌وضوح نشان داده است که ژن *nef* سالم برای رسیدن به سطح بالای ویروس و ایجاد بیماری ایدز حیاتی است [۸، ۹]. پروتئین Nef میزان بیان ملکول‌های سطح سلول میزبان نظیر MHC I، MHC II، CD4 و CD28 را کم می‌کند. سطح بیان پایین CD28 در سلول‌های لنفوسیت T عفونی شده این اطمینان را فراهم می‌کند که CD28 نمی‌تواند به‌طور موثری به گیرنده‌های لنفوسیت T (TCR) کمک کند؛ به‌همین ترتیب در سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن مانند ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک که اولین سلول‌های عفونی شده با HIV هستند، بیان ملکول‌های

(pNL4-3) به دست آمد. به منظور انجام PCR، پرایمرهای مورد نیاز طراحی شدند:

Forward primer: 5'ATCGA ATT CGA CAT ATG GGT GGC AAG TGG TC3'

Reverse primer: 5'TGG ACT AGC GGC CGC TTA TCA GAA TTC CTG C3'

ژن *nef* با آنزیم pfu DNA polymerase (شرکت فرمنتاز) در درون دستگاه ترموسایکلر تکثیر شد. برنامه PCR به صورت ذیل بود: حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای شروع انتخاب شد. فرایند واسرشت در حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ سیکل به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بازآرایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت. محصول PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز بر اساس پروتوکل استخراج ژن از ژل (کیازن) خالص-سازی شد. محصول PCR ژن و پلاسمید pGEX6p2 هم‌زمان با دو آنزیم محدودالایتر *EcoRI* و *NotI* (بافر Fast) برش داده شدند و پس از استخراج از ژل محصولات هضم شده، ژن *nef* با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز در پلاسمید pGEX6p2 الحاق گردید. در مرحله بعد، ترانسفورماسیون باکتری اشریشیاکلی سویه *DH5a* توسط پلاسمید حامل ژن *nef* انجام شد. به منظور غربال-گری باکتری‌های ترانسفورم شده، از محیط کشت آگار جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین 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. در فرایند هضم آنزیمی از آنزیم‌های محدودالایتر *EcoRI* / *NotI* استفاده شد. به علاوه، تعیین توالی ژن مورد نظر نیز به منظور صحت توالی صورت گرفت. وکتور نوترکیب پس از تأیید صحت کلونینگ به میزبان بیانی *E. coli* BL21 منتقل شده و القاء بیان صورت گرفت.

بیان پروتئین Nef

کلونی‌های رشد یافته باکتری BL21 حاوی پلاسمید نو-ترکیب، داخل ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع (LB) حاوی آنتی-بیوتیک کشت داده شدند. پانصد میکرولیتر از باکتری‌های کشت داده شده به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع TY2X اضافه شد و در انکوباتور شیکردار با درجه حرارت 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 میلی‌مولار، سیگما) به عنوان القاکننده بیان پروتئین به محیط کشت اضافه شد و رسوب باکتری در زمان‌های ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از القا در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرفته شد. در نهایت، آنالیز SDS-

MHC I و MHC II کاهش می‌یابد. این مسئله باعث ارایه ضعیف پپتیدهای ویروس HIV به TCRها روی لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک و لنفوسیت‌های T کمکی می‌شود. علاوه بر این کاهش، بیان ملکول‌های MHC I در سطح سلول‌های آلوده به HIV کمک می‌کند که ویروس از لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک فرار کند. پروتئین Nef با مهار سیگنال‌های مرگ خارج و داخل سلولی باعث بقای این ویروس در سلول‌های عفونی می‌شود [۱۷-۱۰]. یافته‌های علمی نشان می‌دهد که اپی‌توپ‌های ایمونوژن متعددی در سطح Nef وجود دارد که توسط لنفوسیت‌های B و T شناسایی می‌شود و پاسخ ایمنی مؤثری در مقابل آنها بروز می‌کند. بنابراین، به نظر می‌رسد که استفاده از پروتئین Nef در ساختار واکسن بتواند کارایی واکسن را ارتقا بخشد [۵]. لذا، در این تحقیق به عنوان اولین گام به منظور استفاده از پروتئین Nef در طراحی واکسن، کلونینگ و بیان پروتئین Nef در سیستم بیان باکتریایی صورت گرفت. هدف ما دست‌یابی به میزان بالای پروتئین تخلیص شده برای انجام تحقیقات واکسن می‌باشد. علت توجه دانشمندان به سیستم‌های باکتریایی، قابلیت رشد بسیار سریع گونه‌های باکتریایی، کم‌هزینه بودن فرایند تولید از نظر ترکیبات محیط کشت، شناخته شده بودن ویژگی‌های ژنتیکی آنها و وجود تعداد زیادی از سویه‌های موتان میزبان و وکتورهای بیانی است. چندین سیستم بیانی باکتریایی وجود دارد که سیستم بیانی *E. coli* شناخته شده‌ترین و پرکاربردترین آنهاست [۱۸]. بنابراین، با توجه به مزایای ذکر شده در مورد سیستم‌های بیانی پروکاریوتی، *E. coli* می‌تواند میزبان مناسبی برای تولید پروتئین Nef باشد. به علاوه، در این پژوهش برای اولین بار از روش رنگ‌آمیزی معکوس روی ژل آکریل امید به منظور خالص‌سازی پروتئین Nef استفاده شد. این تکنیک نوعی روش رنگ‌آمیزی منفی است که طی آن پروتئین‌ها به صورت نوارهای شفاف روی پس زمینه کدر ژل مشخص می‌شوند. در این روش رنگ‌آمیزی از ایمیدازول و نمک روی برای تشخیص پروتئین در ژل الکتروفورز استفاده می‌شود. رنگ‌آمیزی معکوس به دلیل حساسیت بالا، سهولت استفاده و مقرون به صرفه بودن مورد توجه است [۱۲].

مواد و روش‌ها

کلونینگ ژن *nef* داخل وکتور pGEX6p2

ابتدا طراحی و سنتز فیوژن *nef* در وکتور pUC19 توسط شرکت BioMatik کانادا انجام شد. در اینجا توالی کامل ژن *nef* ویروس HIV-1 با استفاده از مقالات و Gene bank

ساخت وکتور نو ترکیب بیان کننده پروتئین، ...

شد، توسط بافر استخراج از ژل حاوی آمونیوم کربنات، از ژل جدا گردید. لازم به ذکر است که میزان و زمان انکوباسیون در روش به-کار رفته در این تحقیق نسبت به روش ذکر شده در رفرنس شماره ۱۲ اندکی تغییر یافته است که منجر به وضوح بیشتر باند پروتئینی به منظور استخراج گردید. در نهایت، تغلیظ پروتئین توسط ستون-های مخصوص با فیلتر ۳/۵ میکرون (Millipore) صورت گرفت.

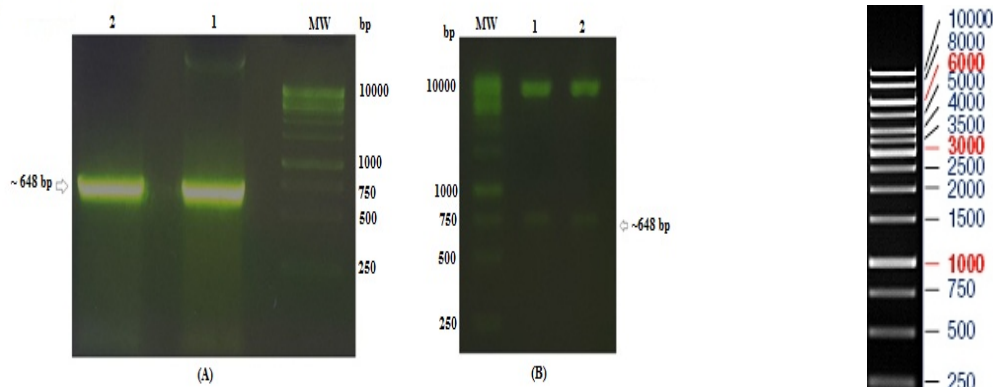
نتایج

کلون کردن ژن *nef* داخل وکتور بیانی pGEX6p2 تکثیر ژن *nef* توسط پرایمرهای اختصاصی و آنزیم pfu پلیمرز که دارای خاصیت ویرایشی است، از پلاسمید سنتزی pUC- *nef* صورت گرفت. پس از هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید pGEX6p2، بقیه مراحل کلونینگ شامل الحاق و ترانسفورماسیون در باکتری DH5 α انجام شد. استخراج پلاسمید از دو کلون صورت گرفت. سپس، به منظور تأیید پلاسمید نو ترکیب، آنالیز PCR و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI* و *NotI* انجام شد. شکل شماره ۱ نتایج تأیید پلاسمید نو ترکیب pGEX- *nef* با استفاده از آنالیز PCR (A) و هضم آنزیمی (B) را توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد نشان می‌دهد. اندازه *nef* حدود ۶۴۸ جفت باز بوده است.

PAGE و وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef (Abcam) به منظور آشکارسازی و تعیین هویت پروتئین نو-ترکیب Nef انجام شد. به طور خلاصه، پروتئین‌های باکتریایی روی یک ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد جدا شدند و به غشای نیترو-سلولز انتقال یافتند. پروتئین نو ترکیب توسط آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef (۱:۱۰۰۰۰ حجمی/حجمی، Abcam) به عنوان آنتی‌بادی اول و سپس IgG توتال کونژوگه با پراکسیداز ضد موشی (۱:۱۰۰۰۰ حجمی/حجمی، Sigma) به عنوان آنتی‌بادی ثانویه تعیین هویت شد. باند پروتئینی مورد نظر با استفاده از سوپسترای پراکسیداز به نام دی‌آمینوبنزدین (DAB, Sigma) روی کاغذ نیتروسلولز آشکار شد.

خالص سازی پروتئین Nef با روش رنگ‌آمیزی معکوس

خالص سازی پروتئین Nef و ویروس HIV-1 با استفاده از روش رنگ‌آمیزی معکوس صورت گرفت؛ بدین ترتیب که پس از اتمام مرحله SDS-PAGE ژل مربوطه ابتدا در بافر حاوی کربنات سدیم (Na₂CO₃) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس، ژل در بافر حاوی ایمیدازول/ سدیم دودسیل سولفات به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و در نهایت ژل مورد نظر در بافر حاوی سولفات روی به مدت ۲ دقیقه قرار گرفت. در این بافر، باند مربوط به پروتئین مورد نظر که به صورت شفاف و بی‌رنگ روی ژل ظاهر



1kb standard GeneRuler (Fermentase)

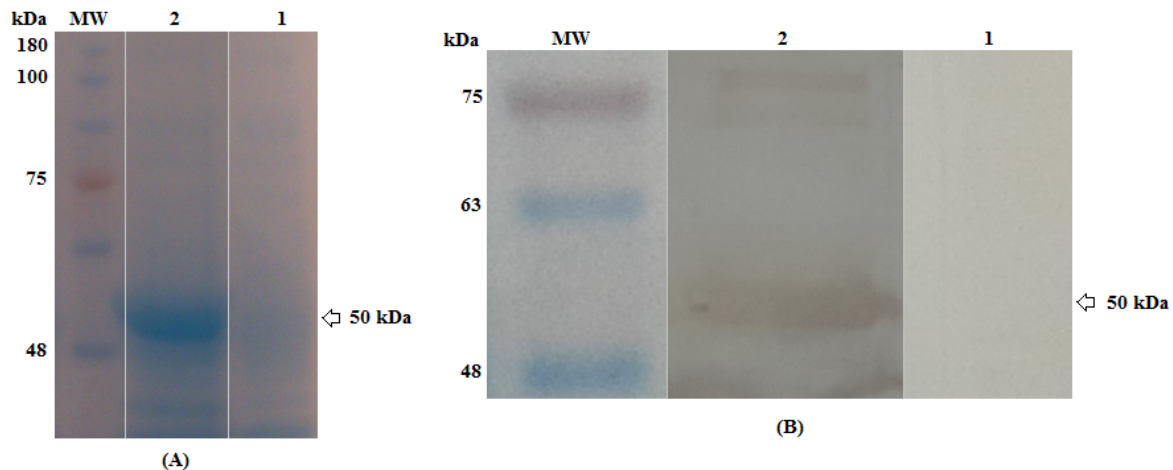
شکل شماره ۱- تأیید پلاسمید نو ترکیب pGEX- *nef* توسط آنالیز PCR و هضم آنزیمی: (A) آنالیز PCR؛ ستون‌های ۱ و ۲: محصول تکثیر یافته ژن *nef* از پلاسمید نو ترکیب pGEX-*nef*; ستون‌های ۱ و ۲: هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pGEX-*nef* با آنزیم *EcoRI/NotI*؛ و MW مارکر وزن ملکولی (1kb، فرمنتاز) می‌باشد.

بیان پروتئین با استفاده از القا کننده ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG) انجام شد. نتایج الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE نشان داد که پروتئین Nef در شرایط بهینه شامل غلظت IPTG ۱mM، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محیط TY2X و ۴ ساعت

آنالیز بیان پروتئین نو ترکیب Nef توسط تکنیک‌های SDS-PAGE و وسترن بلات پس از ترانسفورماسیون سویه بیانی باکتری BL21 با پلاسمید نو ترکیب pGEX-*nef* و کشت کلونی‌های حاصل، القای

هویت پروتئین مورد نظر را تأیید کرد (شکل شماره ۲). به صورت مشاهده شده در شکل، هیچ بانندی در رسوب باکتری قبل از القا مشاهده نشد، درحالی که پس از القا باند واضح پروتئینی ۵۰ کیلو باز مشاهده گردید.

انکوباسیون پس از القا بیان مناسبی را نشان می دهد (شکل شماره ۲). نتایج SDS-PAGE وجود باند واضح حدود ۵۰ جفت باز مربوط به بیان Nef متصل به GST-tag را در دمای ۳۷ درجه نشان داد. آنالیز وسترن بلات توسط آنتی بادی منوکلونال Nef نیز



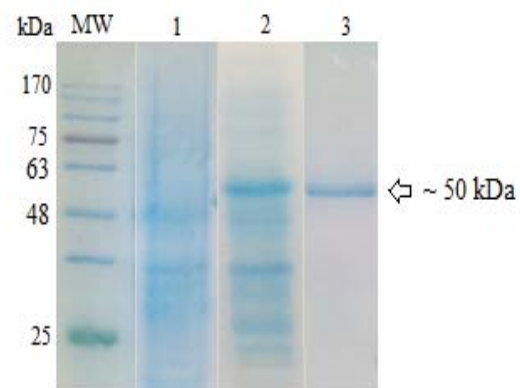
شکل شماره ۲- بررسی بیان پروتئین Nef در باکتری (A: BL21(DE3)) تکنیک الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE؛ ستون ۱: نمونه رسوب باکتری قبل از القا با IPTG؛ ستون ۲: نمونه رسوب باکتری در زمان ۴ ساعت پس از القا با IPTG؛ (B) آنالیز وسترن بلات؛ ستون ۱: نمونه قبل از القا بیان پروتئین، ستون ۲: نمونه پس از القا بیان پروتئین؛ و MW مارکر وزن ملکولی (۱۰-۱۷۰ کیلو دالتون، فرمتتاز) می باشد.

بحث

با وجود تلاش های فراوان در مورد ساخت واکسن موثر و کارای ضد ویروس نقص سیستم ایمنی انسان (HIV)، دسترسی به آن کماکان در پرده ای از ابهام قرار دارد [۱۹-۲۲]. داروهای ضد عفونت ایدز در پاک سازی کامل بدن از عفونت ناتوان بوده و به نظر می رسد یک واکسن موثر و کارآمد بتواند مشکل پاندمی جهان را برطرف کند [۲۳، ۲۲]. در بین انواع واکسن ها، واکسن های زیر-واحدی مورد توجه قرار گرفته اند. واکسن های زیر واحدی یک یا چند آنتی ژن خاص را در معرض سیستم ایمنی قرار می دهند، بدون اینکه از ذرات ویروسی استفاده شود. این دسته از واکسن ها از طریق سنتز شیمیایی آنتی ژن پپتیدی و یا از طریق بیان ژن کدکننده آنتی ژن های مورد نظر (تولید پروتئین نوترکیب) تولید می شوند [۲۴]. شواهد نشان می دهد که برخی از اپی توپ های موجود در ساختار ویروس HIV ایمونوژن هستند و پاسخ های ایمنی را به خوبی تحریک می نمایند. یکی از ژن های تنظیمی ویروس HIV که در چرخه زندگی ویروس نیز نقش حیاتی دارد ژن nef است [۲۱-۱۹] که به عنوان کاندید واکسن مورد توجه قرار گرفته است [۵]. در این بررسی با توجه به نقش های مهم پروتئین Nef به عنوان کاندید واکسن، بیان و تخلیص پروتئین Nef در سیستم بیان باکتریایی انجام شد. در اینجا از سلول بیانی *E. coli* به منظور بیان

تخلیص پروتئین Nef

تخلیص پروتئین Nef با استفاده از روش رنگ آمیزی معکوس انجام گرفت. در این نوع رنگ آمیزی باندهای مربوط به پروتئین ها شفاف و ژل کدر می باشد. با توجه به وزن ملکولی 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 شماره ۳ خلوص باند ۵۰ کیلو دالتونی مربوط به Nef را نشان می دهد.



شکل شماره ۳- تخلیص پروتئین Nef توسط رنگ آمیزی معکوس؛ (A) ستون ۱: نمونه قبل القا، ستون ۲: نمونه پس از القا، ستون ۳: نمونه پروتئین تخلیص شده؛ و MW مارکر وزن ملکولی (۱۰-۱۷۰ کیلو دالتون، فرمتتاز) می باشد.

نیست. در روش رنگ آمیزی معکوس کمپلکس سفید و غیر محلول ایمیدازول- روی، پس زمینه سفید روی سطح ژل ایجاد می کند. در حالی که باندهای پروتئین با سدیم دودسیل سولفات کمپلکس تشکیل داده و باندهای شفاف و واضحی را آشکار می سازند. بنابراین، در این روش می توان نمونه ها را از روی ژل بازیافت و تخلیص نمود [۲۵]. پروتئین نو ترکیب به دست آمده در این تحقیق به منظور به کارگیری در طراحی رژیم های مختلف واکسیناسیون درمانی و نیز به عنوان آنتی ژن در بررسی پاسخ های ایمنی همورال و سلولی در مدل حیوانی استفاده خواهد شد.

نتیجه گیری

پروتئین نو ترکیب HIV-1 Nef در سیستم بیان پرو-کاریوتی *E. coli* به دلیل عدم تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکو-زیلاسیون به خوبی بیان گردید. حضور باند حدود ۵۰ کیلو دالتون توسط تکنیک SDS-PAGE و نیز آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد Nef مورد تأیید قرار گرفت. به منظور تخلیص پروتئین از روش رنگ آمیزی معکوس استفاده شد که توانست میزان مناسبی از پروتئین خالص را تولید نماید. پروتئین تخلیص شده حاضر به عنوان کاندید واکسن پروتئینی در بررسی های بعدی استفاده خواهد شد.

تشکر و قدردانی

نتایج این تحقیق حاصل بخشی از پایان نامه دانشجوی دکتری میکروبیولوژی سرکار خانم بهناز جعفر زاده و طرح انستیتو پاستور ایران به شماره ۷۷۲ می باشد.

References:

- [1] Epidemic Update. UNAIDS Report on the global AIDS epidemic; 2010. Chapter2. Available at: http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalR_eport_Chap2_em.pdf
- [2] Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004; 350(10): 1023-35.
- [3] Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 2009; 17(5): 138-45.
- [4] Kozal MJ, Hullsiek KH, Macarthur RD, Berg-Wolf Mv, Peng G, Xiang Y, et al. The Incidence of HIV drug resistance and its impact on progression of HIV disease among antiretroviral-naïve participants started on three different antiretroviral therapy strategies. *HIV Clin Trials* 2007; 8(6): 357-70.

پروتئین استفاده شد. استفاده از سیستم بیانی *E. coli* مزایای زیادی را به همراه دارد که از آن جمله می توان به میزان بالای تولید محصول نو ترکیب در این سیستم و ارزان بودن استفاده از آن در تولید محصولات پروتئینی اشاره کرد [۱۸]; همان طور که نتایج ما نشان دادند کلونینگ ژن nef با اندازه حدود ۶۴۸ جفت باز به طور صحیح در وکتور بیان پروکاریوتی انجام شد. بیان پروتئین در سیستم بیانی pGEX/BL21 در دمای ۳۷ درجه و ۴ ساعت پس از القا توسط آنتی رپرسور IPTG در غلظت نهایی ۱ میلی مولار مشاهده گردید. باند واضح حدود ۵۰ کیلو دالتون روی ژل SDS-PAGE مشاهده گردید که توسط آنالیز وسترن بلات با به کارگیری آنتی بادی 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. این روش به منظور خالص سازی پروتئین Nef تاکنون گزارش نشده است. بررسی ها نشان داده اند که تثبیت پروتئین با واسطه اتم روی در ژل برگشت پذیر است و پروتئین استخراج شده از ژل از نظر شیمیایی تغییر نیافته و با رنگ های آلی آلوده نمی شود. این روش باندهای تا ۵ نانوگرم پروتئین را روی ژل آشکار می سازد [۱۲]. روش رنگ آمیزی معکوس برای تخلیص پروتئین مورد نظر Nef نیز کارایی بالایی نشان داد و باند مناسبی روی ژل SDS-PAGE مشاهده شد. بررسی ها نشان داده اند که روش رنگ آمیزی معکوس بر پایه روی و ایمیدازول حساسیت بیشتری نسبت به روش رنگ آمیزی با کوماسی بلو دارد. در حقیقت، حساسیت رنگ آمیزی با کوماسی به نسبت کم بوده و باندهای تا حدود ۵۰ نانوگرم را نشان می دهد. از طرفی این روش تمایل کمی برای پروتئین های اسیدی دارد. از طرف دیگر، روش رنگ آمیزی نقره نیز برای پروتئین ها اختصاصی

- [5] Mahdavi M, Ebtakar M, Azadmanesh K, Khorrakhorshid HR, Rahbarizadeh F, Yazdi MH, et al. HIV-1 Gag p24-Nef fusion peptide induces cellular and humoral immune response in a mouse model. *Acta Virol* 2010; 54(2): 131-6.
- [6] Terwilliger E, Sodroski JG, Rosen CA, Haseltine WA. Effects of mutations within the 3' orf open reading frame region of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. *J Virol* 1986; 60(2): 754-60.
- [7] Luciw PA, Cheng-Mayer C, Levy JA. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(5): 1434-38.

- [8] Kestler HW, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, et al. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991; 65(4): 651-62.
- [9] Cullen BR. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 1998; 93(5): 685-92.
- [10] Skowronski J, Parks D, Mariani R. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO J* 1993; 12(2): 703-13.
- [11] Bell I, Schaefer TM, Triple RP, Amedee A, Reinhart TA. Down-modulation of the costimulatory molecule, CD28, is a conserved activity of multiple SIV Nefs and is dependent on histidine 196 of Nef. *Virology* 2001; 283(1): 148-58.
- [12] Simpson RJ. Zinc/Imidazole procedure for visualization of proteins in gels by negative staining. *CSH protocols* 2007.
- [13] Swigut T, Shohdy N, Skowronski J. Mechanism for downregulation of CD28 by Nef. *EMBO J* 2001; 20(7): 1593-604.
- [14] Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 323-58.
- [15] Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Le Gall S, Raposo G, Schwartz O, Benaroch P. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(21): 12144-9.
- [16] Stumptner-Cuvelette P, Jouve M, Helft J, Dugast M, Glouzman AS, Jooss K, et al. Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Biol Cell* 2003; 14(12): 4857-70.
- [17] Schindler M, Wurfl S, Benaroch P, Greenough TC, Daniels R, Easterbrook P, et al. Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J Virol* 2003; 77(19): 10548-56.
- [18] Sodoyer R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *Biodrugs* 2004; 18(1): 51-62.
- [19] Geyer M, Peterlin BM. Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS Lett* 2001; 496(2-3): 91-5.
- [20] Arold ST, Baur AS. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends Biochem Sci* 2001; 26(6): 356-63.
- [21] Geyer M, Munte CE, Schorr J, Kellner R, Kalbitzer HR. Structure of the AnchorDomain of Myristoylated and Non-myristoylated HIV-1 Nef Protein. *J Mol Biol* 1999; 289(1): 123-38.
- [22] Watkins DI. The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8+ T lymphocytes: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(2): 119-29.
- [23] Cristillo AD, Wang S, Caskey MS, Unangst T, Hocker L, He L, et al. Preclinical evaluation of cellular immune responses elicited by a polyvalent DNA prime/protein boost HIV-1 vaccine. *Virology* 2006; 346(1): 151-68.
- [24] Moyle PM, Toth I. Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. *Chem Med Chem* 2013; 8(3): 360-76.
- [25] Gillespie AS, Elliott E. Comparative advantages of imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 2005; 345(1): 158-60.