Original Article

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

Jafarzade BS[1], Sadat M[2], Yaghobi R[3], 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, Yaghobi R, Bolhassani A. Reverse staining: Effective method for purification of HIV-1 Nef protein in prokaryotic expression system. ***Feyz*** 2016; 20(5): 420-6.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-17]

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

بهنازسادات 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 به‌دست آورده شد.

نتیجه‌گیری: پروتئین نوترکیب 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، *اشریشیاکلی*

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 تقریبا 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 غیرنوکلئوزیدی ترانس‌کریپتاز 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 [۴-۲].

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

[۲] استادیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

[۳] دانشیار، بخش تحقیقات پیوند، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

[۴] دانشیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت 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*، *tev*، *rev* و *tat* نیز می‌باشد. محصول ژن *nef* پروتئین Nef می‌باشد [۷،۶]. 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 [۶،۵]. 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 [۹،۸]. 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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-17]

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، به‌نظر می‌رسد که استفاده از پروتئین Nef در ساختار واکسن بتواند کارایی واکسن را ارتقا بخشد [۵]. لذا، در این تحقیق به‌عنوان اولین گام به‌منظور 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. به‌علاوه، در این پژوهش برای اولین‌بار از روش رنگ‌آمیزی معکوس روی ژل آکریل آمید به‌منظور خالص سازی پروتئین Nef استفاده شد. این تکنیک نوعی روش رنگ‌آمیزی منفی است که طی آن پروتئین‌ها به‌صورت 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 به‌دلیل 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 (pNL4-3) به‌دست آمد. به‌منظور 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 به‌صورت ذیل بود: حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه برای شروع انتخاب شد. فرایند واسرشت در حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ سیکل به‌مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در ۶۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و بازآرایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه انجام گرفت. محصول PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز بر اساس پروتوکل استخراج ژن از ژل (کیاژن) خالص-سازی شد. محصول PCR ژن و پلاسمید pGEX6p2 هم‌زمان با دو آنزیم محدودالاثر *Eco*RI و *Not*I (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، ترنسفورماسیون باکتری *اشریشیاکلی* سویه *DH5a* توسط پلاسمید حامل ژن *nef* انجام شد. به‌منظور 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 به‌منظور تأیید پلاسمید نوترکیب به‌کار برده شدند. در فرایند هضم آنزیمی از آنزیم‌های محدودالاثر *Eco*RI / *Not*I استفاده شد. به‌علاوه، تعیین توالی ژن مورد نظر نیز به‌منظور صحت توالی صورت گرفت. وکتور نوترکیب پس از تائید صحت کلونینگ به میزبان بیانی *E. coli* BL21 منتقل شده و القاء بیان صورت گرفت.

بیان پروتئین Nef

کلونی‌های رشدیافته 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) به‌عنوان 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-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-17]

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

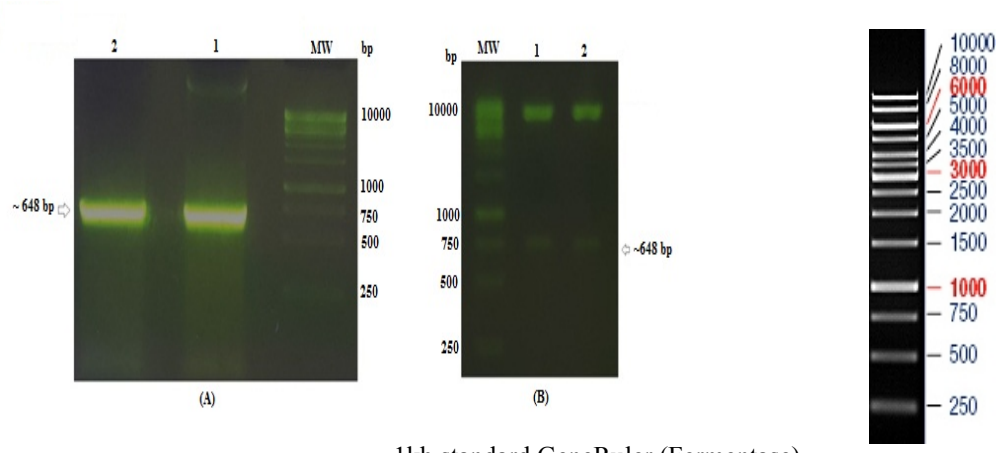
خالص‌سازی پروتئین Nef با روش رنگ‌آمیزی معکوس

خالص‌سازی پروتئین Nef 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 (Na_2CO_3) به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس، ژل در بافر حاوی ایمیدازول/ سدیم دودسیل سولفات به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و در نهایت ژل مورد نظر در بافر حاوی سولفات روی به‌مدت ۲ دقیقه قرار گرفت. در این بافر، باند مربوط به پروتئین مورد نظر که به‌صورت شفاف و بی‌رنگ روی ژل ظاهر شد، توسط بافر استخراج از ژل حاوی آمونیوم کربنات، از ژل جدا گردید. لازم به‌ذکر است که میزان و زمان انکوباسیون در روش به-کار رفته در این تحقیق نسبت به‌روش ذکر شده در رفرنس شماره ۱۲ اندکی تغییر یافته است که منجر به‌وضوح بیشتر باند پروتئینی به‌منظور 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 پلیمراز 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 ترنسفورماسیون در باکتری DH5α انجام شد. استخراج پلاسمید از دو کلون صورت گرفت. سپس، به‌منظور تأیید پلاسمید نوترکیب، آنالیز PCR و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Eco*RI و *Not*I انجام شد. شکل شماره ۱ نتایج تأیید پلاسمید نوترکیب 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.



1kb standard GeneRuler (Fermentase)

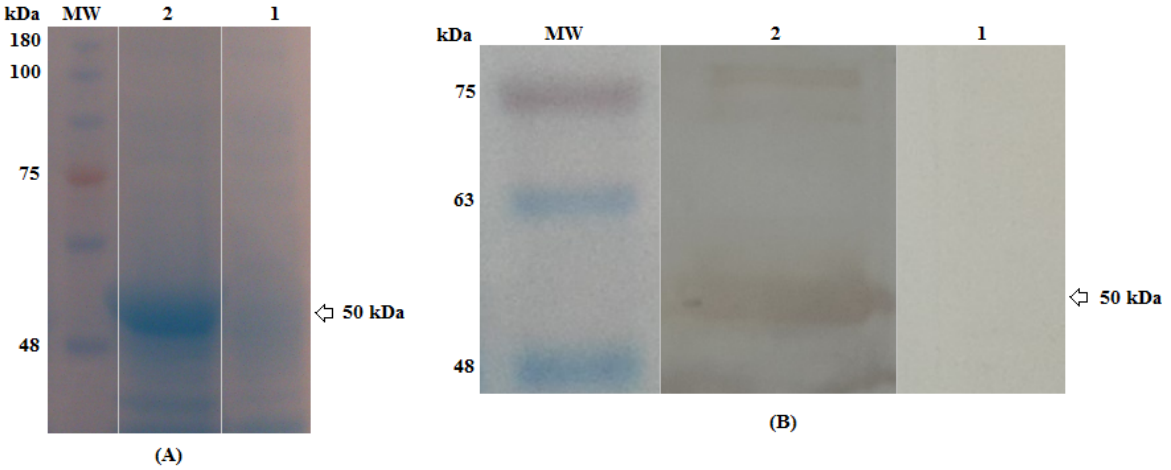
شکل شماره ۱- تأیید پلاسمید نوترکیب pGEX- nef توسط آنالیز PCR و هضم آنزیمی: A) آنالیز PCR؛ ستون‌های ۱ و ۲: محصول تکثیر یافته ژن *nef* از پلاسمید نوترکیب pGEX-nef؛ B) ستون‌های ۱ و ۲: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pGEX-nef با آنزیم *Eco*RI/ *Not* I؛ و MW مارکر وزن ملکولی (1kb، فرمنتاز) می‌باشد.

آنالیز بیان پروتئین نوترکیب Nef توسط تکنیک‌های SDS-PAGE و وسترن بلات

پس از ترنسفورماسیون سویه بیانی باکتری BL21 با پلاسمید نوترکیب pGEX-nef و کشت کلونی‌های حاصل، القای 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 1mM، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محیط TY2X و ۴ ساعت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-17]

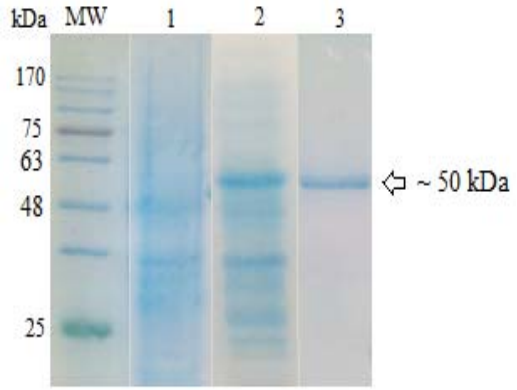
انکوباسیون پس از القا بیان مناسبی را نشان می‌دهد (شکل شماره ۲). نتایج SDS-PAGE وجود باند واضح حدود ۵۰ جفت باز مربوط به بیان Nef متصل به GST-tag را در دمای ۳۷ درجه نشان داد. آنالیز وسترن بلات توسط آنتی‌بادی منوکلونال Nef نیز هویت پروتئین مورد نظر را تأیید کرد (شکل شماره ۲). به‌صورت مشاهده شده در شکل، هیچ باندی در رسوب باکتری قبل از القا مشاهده نشد، درحالی‌که پس از القا باند واضح پروتئینی ۵۰ کیلوباز مشاهده گردید.



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 القای با IPTG؛ ستون ۲: نمونه رسوب باکتری در زمان ۴ ساعت پس از القای با IPTG؛ B) آنالیز وسترن بلات؛ ستون ۱: نمونه قبل از القای بیان پروتئین، ستون ۲: نمونه پس از القای بیان پروتئین؛ و MW مارکر وزن ملکولی (۱۰-۱۷۰ کیلو دالتون، فرمنتاز) می‌باشد.

تخلیص پروتئین Nef

تخلیص پروتئین Nef با استفاده از روش رنگ‌آمیزی معکوس انجام گرفت. در این نوع رنگ‌آمیزی باندهای مربوط به پروتئین‌ها شفاف و ژل کدر می‌باشد. باتوجه 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 کیلودالتونی مربوط به Nef را نشان می‌دهد.



شکل شماره ۳- تخلیص پروتئین Nef توسط رنگ‌آمیزی 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، فرمنتاز) می‌باشد.

بحث

با وجود تلاش‌های فراوان در مورد ساخت واکسن موثر و کارای ضد ویروس نقص سیستم ایمنی انسان (HIV)، دسترسی به آن کماکان در پرده‌ای از ابهام قرار دارد [۲۲-۱۹]. داروهای ضد عفونت ایدز در پاک‌سازی کامل بدن از عفونت ناتوان بوده و به‌نظر می‌رسد یک واکسن موثر و کارآمد بتواند مشکل پاندمی جهان را برطرف کند [۲۳،۲۲]. در بین انواع واکسن‌ها، واکسن‌های زیر-واحدی مورد توجه قرار گرفته‌اند. واکسن‌های زیرواحدی یک یا چند آنتی‌ژن خاص را در معرض سیستم ایمنی قرار می‌دهند، بدون اینکه از ذرات ویروسی استفاده شود. این دسته از واکسن‌ها از طریق سنتز شیمیایی آنتی‌ژن پپتیدی و یا از طریق بیان ژن کدکننده آنتی‌ژن‌های مورد نظر (تولید پروتئین نوترکیب) تولید می‌شوند [۲۴]. شواهد نشان می‌دهد که برخی از اپی‌توپ‌های موجود در ساختار ویروس HIV ایمونوژن هستند و پاسخ‌های ایمنی را به‌خوبی تحریک می‌نمایند. یکی از ژن‌های تنظیمی ویروس HIV که در چرخه زندگی ویروس نیز نقش حیاتی دارد ژن *nef* است [۲۱-۱۹] که به‌عنوان کاندید واکسن مورد توجه قرار گرفته است [۵]. در این بررسی با توجه به نقش‌های مهم پروتئین Nef به‌عنوان کاندید واکسن، بیان و تخلیص پروتئین Nef در سیستم بیان باکتریایی انجام شد. در اینجا از سلول بیانی *E. coli* به‌منظور بیان

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-17]

پروتئین استفاده شد. استفاده از سیستم بیانی *E. coli* مزایای زیادی را به‌همراه 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 [۱۸]؛ همان‌طور که نتایج ما نشان دادند کلونینگ ژن nef با اندازه حدود ۶۴۸ جفت باز به‌طور 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 آنتی‌رپرسور IPTG در غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار مشاهده گردید. باند واضح حدود ۵۰ کیلودالتون روی ژل SDS-PAGE مشاهده گردید که توسط آنالیز وسترن بلات با به‌کارگیری آنتی‌بادی ضد Nef تأیید شد. از روش رنگ‌آمیزی معکوس بر اساس استفاده از ایمیدازول-سدیم دو دسیل سولفات- روی برای خالص سازی پروتئین استفاده شد. این روش به‌منظور خالص سازی پروتئین Nef تاکنون گزارش نشده است. 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 نیافته و با رنگ‌های آلی آلوده نمی‌شود. این روش باندهای تا ۵ نانوگرم پروتئین را روی ژل آشکار می‌سازد [۱۲]. روش رنگ‌آمیزی معکوس برای تخلیص پروتئین مورد نظر Nef نیز کارآیی بالایی نشان داد و باند مناسبی روی ژل SDS-PAGE مشاهده شد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که روش رنگ‌آمیزی معکوس بر پایه روی و ایمیدازول حساسیت بیشتری نسبت به روش رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو دارد. در حقیقت، حساسیت رنگ‌آمیزی با کوماسی به نسبت کم بوده و باندهای تا حدود ۵۰ نانوگرم را نشان می‌دهد. از طرفی این روش تمایل کمی برای پروتئین‌های اسیدی دارد. از طرف دیگر، روش رنگ‌آمیزی نقره نیز برای پروتئین‌ها اختصاصی نیست. در روش رنگ‌آمیزی معکوس کمپلکس سفید و غیر محلول ایمیدازول- روی، پس زمینه سفید روی سطح ژل ایجاد می‌کند، درحالی‌که باندهای پروتئین با سدیم دودسیل‌سولفات کمپلکس تشکیل داده و باندهای شفاف و واضحی را آشکار می‌سازند. بنابراین، در این روش می‌توان نمونه‌ها را از روی ژل بازیافت و تخلیص نمود [۲۵]. پروتئین نوترکیب به‌دست آمده در این تحقیق به‌منظور به‌کارگیری در طراحی رژیم‌های مختلف واکسیناسیون درمانی و نیز به‌عنوان آنتی‌ژن در بررسی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی در مدل حیوانی استفاده خواهد شد.

نتیجه‌گیری

پروتئین نوترکیب HIV-1 Nef در سیستم بیان پرو-کاریوتی *E. coli* به‌دلیل عدم تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکو-زیلاسیون به‌خوبی بیان گردید. حضور باند حدود ۵۰ کیلودالتون توسط تکنیک SDS-PAGE و نیز آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef مورد تأیید قرار گرفت. به‌منظور تخلیص پروتئین از روش رنگ‌آمیزی معکوس استفاده شد که توانست میزان مناسبی از پروتئین خالص را تولید نماید. پروتئین تخلیص شده حاضر به‌عنوان کاندید واکسن پروتئینی در بررسی-های بعدی استفاده خواهد شد.

تشکر و قدردانی

نتایج این تحقیق حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجوی دکتری میکروبیولوژی سرکار خانم بهناز جعفر زاده و طرح انستیتو پاستور ایران به‌شماره ۷۷۲ می‌باشد.

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.

[5] Mahdavi M, Ebtekar M, Azadmanesh K, Khorramkhorshid 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-17]

[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, Trible 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-17]