مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم ، شماره بیست و یکم - زمستان ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بهبود و توسعه میزان بیان ، حلالیت و تسهیل تخلیص آنزیم نوترکیب پروتئاز (rPR) ویروس HIV با روش TOPO-Cloning در باکتریBL۲۱ E.coli

اسعد آذر نژاد[۱] ، ارشد حسینی[۱*]، زهره شریفی[۲]

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران ، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه تحقیق و پژوهش در انتقال خون، تهران ، ایران

چکیده

سابقه و هدف : پروتئاز HIV نقش مهمی در بلوغ ویروس و تحریک پاسخ ایمنی میزبان دارد. به همین دلیل می تواند هم به عنوان یک هدف درمانی و هم در تست های تشخیصی کاربرد داشته باشد. در مطالعات قبلی، تولید rPR با مشکلاتی مثل سمیت، آب گریز بودن و تخلیص روبرو بوده است. هدف از این مطالعه، استفاده از سیستم بیانی pET۱۰۲/D.TOPO برای غلبه بر مشکلات اشاره شده بود.

مواد و روش ها: پس از جداسازی ژن پروتئاز از ژنوم HIV، فرایند کلونینگ با استفاده از سیستم TOPO Cloning در وکتور بیانی pET۱۰۲/D.TOPO انجام شد. بعد از القای بیان ژن با IPTG، پروتئین تولید شده با استفاده از روش کروماتوگرافی حاوی ستون Ni-NTA تخلیص شد و غلظت آن با استفاده از کیت بررسی پروتئین BCA سنجیده شد. تولید پروتئین نوترکیب با SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ بررسی شد.

یافته ها : کلونینگ ژن پروتئاز HIV-۱با استفاده از سیستم کلونینگ TOPO در وکتور بیانی pET۱۰۲/D به وسیله PCR با موفقیت صورت گرفت و با sequencing تایید شد. غلظت rPR پس از تخلیص بین ۶۰ تا ۸۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. بیان و تولید rPR به شکل محلول، با موفقیت انجام شد. و با SDS-PAGE و وسترن بلات تایید شد.

بحث و نتیجه گیری : در سیستم کلون سازی مورد استفاده به دلیل بیان rPR به صورت فیوز شده با تیوردوکسین و دارای برچسپ های هیستیدینی، مشکل سمیت،آب گریز بودن و تخلیص تا حد زیادی برطرف شد. با توجه به میزان rPR تولید شده، می توان از آن در تست های تشخیصی و جهت بررسی و طراحی مهارکننده های پروتئاز در مطالعات بعدی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: HIV، کلون سازی مولکولی، پروتئاز، پروتئین نوترکیب

مقدمه

ایدز یک بیماری پیش‌رونده و قابل پیش گیری است. این بیماری حاصل تکثیر ویروسی به نام HIV در بدن میزبان است که باعث تخریب جدی دستگاه ایمنی بدن انسان می شود که خود زمینه‌ساز بروز عفونت‌های موسوم به فرصت طلب است که یک بدن سالم معمولا قادر به مبارزه با آن هاست ولی بدن بیمار مبتلا به ایدز در برابر آن ها مقاومتی ندارد(۱۴).

یکی از دلایل اصلی و مهمی که باعث شده که تا کنون راهی مطمئن برای کنترل این ویروس در دسترس نباشد وجود جهش های فراوان و متنوع در ژنوم ویروس و توان نوترکیبی بالای ویروس می باشد(۲۱،۱۴،۷). بنا براین تشخیص زود هنگام آلودگی اهمیت بسیار بالایی در مشاوره و جلوگیری از شیوع ویروس دارد(۴). و جستجوی آنتی بادی های تولید شده علیه اپی توپ های پروتئاز می تواند در کنار سایر آنتی ژن های ویروس به افزایش اخصاصیت و حساسیت روش های تشخیصی هم چون الایزا و وسترن بلات کمک کند(۴-۶،۱۰ ، ۱۱ ، ۲۰)

یکی دیگر از جنبه های مقابله با عفونت ناشی از ویروس HIV، درمان آن است. مراحل متنوع و مختلفی از چرخه تکثیر ویروس را می توان هدف داروهای ضد ویروسی قرار داد. پروتئاز HIV به دلیل نقش مهمی که در تولید ذرات ویروسی بالغ و عفونت زا دارد، می

*نویسنده مسئول :

گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران ، تهران، ایران

پست الکترونیکی : ash-hosseini@tums.ac.ir

تاریخ دریافت :۱۳۹۲/۱۰/۲۰
تاریخ پذیرش :۱۳۹۴/۰۴/۰۸

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.12.1]

تواند هدف مناسبی جهت درمان HIV باشد(۵-۲, ۱۱)، و با گذشت ۲۰ سال از تحقیق در مورد HIV، آنزیم پروتئاز هم چنان به عنوان یک هدف مهم در زمینه درمان و پیش گیری بیماری ایدز محسوب می شود(۲۱).

در مطالعات پیشین از روش های مختلفی برای تولید rPR استفاده شده است. آب گریز بودن[۱]، سمیت در سیستم میزبان، مشکل بیان و تخلیص از جمله مشکلات مشاهده شده در مطالعات قبلی در تولید rPR بوده است (۲۱).

از سوی دیگر چون که متاسفانه برای بررسی مهارکننده ها و استفاده از rPR در کارهای تشخیصی به میزان به نسبت زیادی از شکل نوترکیب پروتئاز نیاز است، بنابراین به روشی نیاز است که بتوان با هزینه پایین مقدار زیادی پروتئاز نوترکیب را به صورت محلول تولید کرد. مطالعات زیادی در زمینه های مختلف برای برطرف سازی مشکلاتی نظیر حلالیت پروتئین های هیدروفوب، میزان پایین، تولید پروتئین، مشکل تخلیص، کلون سازی آسان و سریع و... (پروتئین هایی مثل پروتئاز به دلیل بیان پایه برای میزبان سمی می باشند در نتیجه تولید آن ها پایین است) انجام شده اند. در هیچ کدام از این مطالعات همه محدودیت های ذکر شده به صورت یکجا و در یک سیستم واحد برطرف نشده بود (۱۳-۱۲ ,۱۹-۱۵ , ۹, ۸, ۲۲).

به همین دلیل در این تحقیق از وکتور بیانی Pet۱۰۲/D.TOPO Cloning استفاده شد، چون که شرکت Invitrogene با تولید این سیستم توانسته اغلب مشکلات ذکر شده را به طور یک جا برطرف سازد. **برای بار اول**، در این وکتورها پروتئین نوترکیب به صورت فیوز شده با تیوردوکسین بیان می شود واز آن جایی که تیوردوکسین باعث باز شدن پروتئین و حلالیت آن می شود بنابراین مشکل عدم حلالیت در هنگام بیان و تخلیص وجود نخواهد داشت. **برای بار دوم**، در این وکتورها توالی های هیستیدینی به ابتدا و انتهای پروتئین اضافه می شود که موجب سهولت استخراج آن از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل می شود. **برای بار سوم**، با توجه به بیان آنزیم T۷ RNA polymerase توسط E.coli BL۲۱ و وجود ژن های T۷ Lac promoter و Lac I در وکتور Pet۱۰۲.DTOPO میزان بیان، افزایش و مشکل سمیت، کاهش می یابد.

هدف از این مطالعه استفاده از سیستم TOPO-Cloningبرای غلبه بر مشکلات بیان، سمیت و تخلیص مشاهده شده در مطالعات قبلی و تولید میزان مناسبی از آنزیم نوترکیب پروتئاز HIV به صورت محلول در سیتم پربازده و ارزانE.coli BL۲۱ بود.

مواد و روش ها

۱ . hydrophobicity

نمونه سرم فرد مبتلا به HIV از آزمایشگاه ویروس شناسی سازمان انتقال خون ایران(IBTO) تهیه شد. این نمونه با روش های وسترن بلات و Real-time PCR از لحاظ مثبت بودن تایید شده بود.

جداسازی RNA و سنتز cDNA

RNA ویروس با استفاده از Viral RNA extraction Mini Kit (Qiagen, USA) از نمونه سرم جدا شد و سنتز cDNA براساس شرایط زیر انجام شد: µg ۵ از RNAجداشده به مخلوط واکنش RTحاوی ۴۰ واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس MuLV ،pmol۱۰۰ پرایمر هگزامر راندوم، ۴µl بافر ۵X RT ، ۲۰ واحد مهارکننده RNase و مخلوط dNTP (شرکت فرمنتاز) اضافه شد و به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ ° C و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ ° C گرماگذاری شد. برای متوقف کردن واکنش ، مخلوط به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۵ ° C قرار داده شد.

انجام PCR و کلون سازی به درون وکتور

با استفاده از پرایمرهای لیست شده در **جدول- ۱** واکنش nested PCR بر روی cDNA به دست آمده صورت گرفت. با استفاده از آنزیم Taq polymerase (شرکت فرمنتاز)، محصولات دارای دنباله A [۲] تولید شده و بعد از تخلیص آن از ژل با استفاده از کیت PCR Cleanup Kit (شرکت Roche) به داخل وکتور PTZ۵۷R (T) کلون شد(TA-Cloning kit ، فرمنتاز). تمامی مراحل ذکر شده براساس دستورالعمل سازنده کیت ها انجام شد. الحاق توالی پروتئاز به داخل وکتور از طریق تعیین توالی[۳] تایید شد.

جدول ۱ .توالی پرایمرهای برگزیده جهت تکثیر ناحیه دربردارنده ژن پروتئاز

Primer name	Primer sequence
ExternalProtF	5TAA TTT TTT AGG GAA GAT CTG GCC TTC C3
EeternalProtR	5GCA AAT ACT GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA GG3
InternalProtF	5TCA PR CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A3
InternalProtR	5 AAT GCT TTT ATT TTT TCT TCT GTC AAT GGC3

ساخت وکتور بیانی

با استفاده از پرایمرهای لیست شده در **جدول- ۲**، توالی کدکننده ژن پروتئاز الحاق شده در وکتور PTZ۵۷R (T) به وسیله آنزیم Pfu polymerase(شرکت Invitrogen) تکثیر گشت. قطعه تکثیر شده به دلیل داشتن توالی CACC در جهت صحیح به داخل وکتور pET۱۰۲D/TOPO (Invitrogen, USA)الحاق گشته

۲ A-tailed product .
۳ sequencing .

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.12.1]

و به باکتری E.coli (DE۳) BL۲۱ انتقال[۴] داده شد.الحاق توالی پروتئاز به داخل وکتور بیانی از طریق PCR و تعیین توالی تایید شد.

جدول ۲ .توالی پرایمرهای لازم جهت تکثیر ژن PR برای ساخت وکتور نوتوکیب بیانی Pet۱۰۲-PR

Primer name	Target sequence on HXB2 reference sequence(GenBank: FJ392737.1)	Primer sequence
FPR(PR)	1-25	5CACCCCTCAAATCACTCTTTGGCAA3
RPR(PR)	299-273	5GGGAAATTTAAAGTACAACCAATCTG3

بیان آنزیم نوترکیب پروتئاز (rPR)

باکتری های به دست آمده از مرحله قبل به مدت ۱۸ ساعت در محیط مایع LB حاوی ng/µl ۱۰۰ آمپی سیلین در شرایط دمایی ۳۷ درجه کشت داده شدند. سپس µl ۵۰۰از کشت به ۲۵۰ میلی لیتر محیط تازه اضافه شد و در همان شرایط کشت نگه داشته شد تا باکتری ها به فاز لگاریتمی رسیدند(OD۶۰۰=۰.۶-۰.۵). باکتری ها به وسیله IPTG دارای غلظت mM ۱/ به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه القا شدند. بعد از ۴ ساعت محیط کشت حاوی باکتری های القا شده با سرعت RPM ۳۵۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ شده و باکتری های رسوب کرده برای استفاده در آنالیز های بعدی مانند استخراج پروتئین، SDS-PAGE و وسترن بلات نگه داشته شدند.

تخلیص و استخراج پروتئین نوترکیب rPR

تخلیص پروتئین با استفاده از روش nickel affinity chromatography به وسیله His-Tag و HP-thioredoxin که قابلیت اتصال به یون های نیکل را دارند انجام شد. در Ni-NTA purification system از ستون های حاوی رزین که مملو از شلاتورهای Ni^{2+} می باشد بهره گیری شده است، به طوری که آن را به یک سیستم با قدرت تمایل[۵] و غربال گری بالا تبدیل نموده است. پروتئین نوترکیب ما که دارای دنباله هیستیدینی در انتهای خود می باشد تمایل زیادی به نیکل دارد و میان کنش محکمی با آن برقرار می کند. این پروتئین توسط یک بافر با PHپایین و یا بر اثر رقابت با ایمیدازول یا هیستیدین مورد شستشو (elute) قرار گرفته و از رزین جدا می شود.

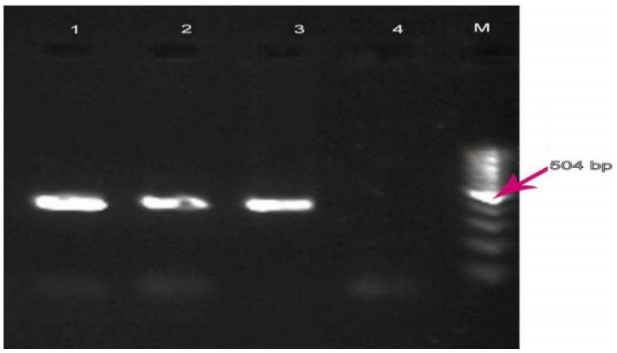
خلوص پروتئین تخلیص شده به وسیله روش SDS-PAGE و با استفاده از ژل ۱۲٪ پلی آکریل آمید و comassie-blue staining ارزیابی شد. برای تعیین دقیق غلظت پروتئین در محلول Elution از Micro BCA protein assay kit (PIERCE, USA) استفاده گردید.

۴ transform .
۵ affinity .

وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال Anti-His C-terminus موشی و سرم پلی کلونال افراد آلوده به ویروس HIV-۱ انجام شد (شکل ۳) و (شکل۵).

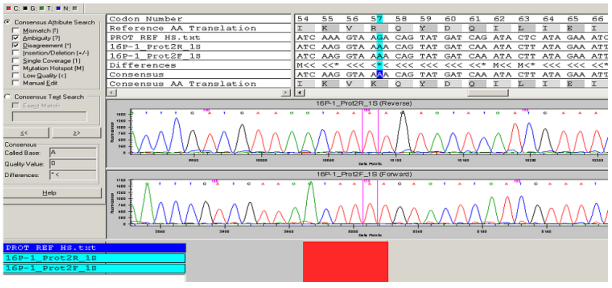
نتایج

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن پروتئاز ویروس HIV۱ به صورت Nested PCR برروی cDNA به دست آمده با موفقیت انجام شد و محصول PCRبا استفاده از الکتروفورز برروی ژل آگارز۱٪ مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱.الکتروفورزمحصولPCR با پرایمرهای اختصاصی ژن پروتئازکه قطعه ای به طول تقریبی۵۰۷ جفت باز را ایجاد کرد.

نتایج به دست آمده از تعیین توالی قطعه کدکننده ژن پروتئاز نشان دهنده الحاق صحیح و توالی صحیح ژن پروتئاز در وکتور مورد نظر بود. کروماتوگرام های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Chromas مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تطابق توالی های به دست آمده با کروماتو گرام رسم شده نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم افزار (CEQ۸۰۰۰)Genetic Analysis System محصول Beckman) باژن رفرانس مقایسه شدو صحت باز های آن هاکنترل شد(شکل ۲).



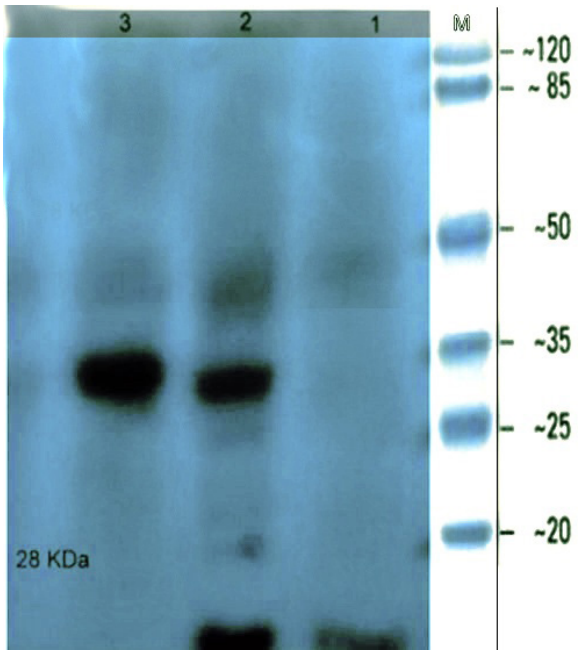
شکل۲: بررسی تطابق کروماتوگرامها با توالی مربوطه وژن رفرانس

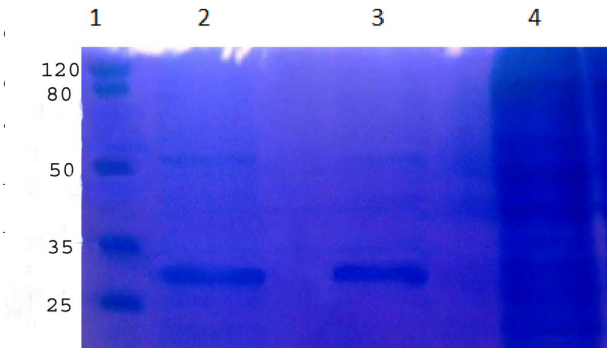
بررسی بیان پروتئین با استفاده از روش SDS-PAGE و وسترن بلات نشان داد که پروتئین مورد نظر به خوبی بیان می شود (شکل ۳ و ۴). تصاویر به دست آمده از نتایج وسترن بلات، بیان پروتئین

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

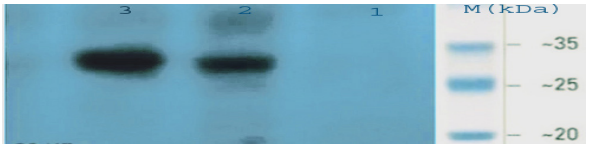
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.12.1]

نوترکیب مورد نظر را تایید کرد (شکل۵)، در حالی که در باکتری هایی که القا نشده بودند هیچ گونه بیانی مشاهده نشد. تخلیص پروتئین با استفاده از روش nickel affinity chromatography به وسیله His-Tag و HP-thioredoxin که قابلیت اتصال به یون های نیکل را دارند انجام شد. بررسی به وسیله روش SDS-PAGE و comassie-blue staining نشان داد که پروتئین مورد نظر در بخش(fraction) اول و دوم دارای بیش ترین غلظت است. بررسی با روش Micro BCA protein assay kit (PIERCE, USA) حضور ۸۵ میکروگرم در میلی لیتر از پروتئین را در فراکسیون اول و ۶۰ تا ۷۵ میکروگرم را در فراکسیون های بعدی به اثبات رساند.





شکل ۴: نتیجه آنالیز SDS-PAGE پروتئین PR. ستون ۱: مارکر پروتئین، ستون ۲: محلول لیزات باکتری BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمیدنوترکیب بعد از القا توسط IPTG (پروتئین مورد نظر ما وزن مولکولی ۲۸ کیلو دالتون دارا می باشد)، ستون سه: پروتئین PRنوترکیب بعد از تخلیص به وسیله ستون نیکل، ستون ۴: لیزات BL۲۱(DE۳) E.coliبدون پلاسمید(کنترل منفی)



شکل ۵: نتیجه آنالیز وسترن بلات پروتئین نوترکیب PR با سرم بیمار مبتلا به HIV. M: مارکر پروتئینی از شرکت پیرس؛ ستون ۱: لیزات سلول فاقد پلاسمید نوترکیب TOPO-PR؛ ستون ۲: لیزات سلول حاوی پلاسمید نوترکیب TOPO –PR؛ ستون ۳: پروتئین تخلیص شده PR با استفاده از ستون نیکل

آنزیم پروتئاز (PR) دارای وزن مولکولی حدود KD ۱۱ می باشد. اما از آن جایی که در این وکتور یک توالی HP-thioredoxin در انتهای N و یک ۶X His-tag در انتهای c پروتئین بیان شده اضافه شده است، وزن مولکولی پروتئین نوترکیب حاصل KD ۲۸است.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه های پیشین مشاهده شده است که آنزیم پروتئاز به خاطر هیدروفوب بودن و سمیت در سیستم میزبان با مشکل بیان، حلالیت و تخلیص روبروست. در این مطالعه از وکتور بیانی .Pet۱۰۲/D TOPO Cloning استفاده شد تا بتوان به این مشکلات غلبه کرد. به دلیل بیان پروتئین نوترکیب به صورت فیوز شده با تیوردوکسین، مشکل عدم حلالیت وجود نخواهد داشت. تیوردوکسین باعث باز شدن پروتئین و حلالیت آن می شود. هم چنین تیوردوکسین به افزایش بیان و کاهش مشکل سمیت کمک می کند. در این وکتورها توالی های هیستیدینی به ابتدا و انتهای پروتئین اضافه می شوند که موجب سهولت استخراج آن از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل می شود.

هم چنین، برای جداسازی ژن پروتئاز از آنزیم pfu DNA polymerase و پرایمرهای ویژه ای استفاده شد که سبب تولید یک محصول با انتها های صاف و اضافه شدن یک توالی CACC به ابتدای ژن مورد نظر می شد. یکی دیگر از مزیت های سیستم TOPO-Cloning در مقایسه با سایر روش ها، کلون سازی این محصولات با انتهای صاف در جهت درست و باسرعت و سهولت بالا و بدون نیاز به برش های آنزیمی بود.

Shaukat H.Rangwala و همکارانش در سال ۱۹۹۲ برای برطرف کردن مشکل سمی بودن این پروتئین در E.coli آن را به صورت فیوزشده با یک توالی پروتئولیتیک خودبرنده (Autocleavage) بیان کردند(۱۲).Alison Taylor در سال ۱۹۹۲ برای بهینه کردن سطح تولیدی پروتئاز نوترکیب در E.coli از پروموتر araBAD استفاده کرد. در این تحقیق نیز پروتئین تولید

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.12.1]

شده به صورت انکلوزیون بادی بود(۱۳).Andreas leuthardt و همکارانش در سال ۱۹۹۳ با افزودن توالی های هیستیدین به ابتدا و انتهای ژن پروتئاز روشی را طراحی کردند که بتوان براساس آن و به سهولت با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل پروتئاز را تخلیص و جدا کرد. آن ها در این مطالعه برای محلول کردن پروتئاز از گوانیدین هیدروکلراید استفاده کردند(۱۵). Yih-Shyun ECheng و همکارانش در سال ۱۹۹۰ برای افزایش سطح تولید پروتئین پروتئاز از سیستم بیانی فاژ T۷ استفاده کردند. در این تحقیق از سویه E.coli BL۲۱(DE۳) استفاده شد و تا حدی مشکل سمیت پروتئاز برای سلول میزبان کاهش یافت(۱۸).

Chen Ming و همکارانش در سال ۲۰۰۸ ، rPR را با استفاده از وکتور pET-۳۲a در E.coli به صورت انکلوزیون بادی بیان کردند. برای تخلیص پروتئین از ستون نیکل استفاده شد و مشکلات حلالیت را با استفاده از بافر MES تا حدی برطرف کردند. غلظت پروتئین تولید شده توسط این گروه،mg/ml ۲/۵۴گزارش شد(۲۰).

Dubendorff و همکارانش برای رفع مشکل سمیت پروتئین پروتئاز برای میزبان از وکتورهای دارای پروموتر القاء پذیر T۷ و مهارکننده lac استفاده کردند. و توانستند با مهار بیان پایه ژن مورد نظر، سمیت آن را کاهش دهند. ولی مشکل حلالیت هم چنان وجود داشت(۲۱). Yih-Shyun E.cheng و همکارانش در سال ۲۰۰۶ از خاصیت سمی بودن پروتئاز برای غربال گری مهارکننده پروتئاز استفاده کردند. آن ها از E.coli در بردارنده وکتور نوترکیب برای غربال گری استفاده کردند زیرا مهارکننده باعث زنده ماندن سلول های میزبان می شد(۲۲). Federica Volontè و همکارانش در سال ۲۰۱۱ برای بهینه کردن میزان تولید پروتئین پروتئاز در E.coli آن را به صورت فیوز شده با bacterial periplasmic protein dithiol oxidase (DsbA) و glutathione S-transferase(GST) و توالی هیستیدین کلون کردند و توانستند با این روش تا حدی میزان بیان این پروتئین را بالا ببرند(۲۷).

نتایج حاصل از این مطالعه چند مورد متمایز را نسبت به مطالعات قبلی برای ما آشکار کرد که عبارتنداز:

۱)لایگشن و کلونینگ ژن مورد نظر با سرعت و سهولت بیش تر(در عرض ۵ تا ۳۰ دقیقه) صورت میگیرد.

۲)کلونینگ قطعه ژن مورد نظر در جهت صحیح با سهولت و کارایی بیش تر از ۹۰٪ بدون نیاز به برش آنزیمی و انتهای چسپنده انجام می شود.

۳) ژن پروتئاز کلون شده به دلیل وجود آنزیم T۷ RNA polymerase و T۷ Lac promoter بیان بالا و قابل القایی دارد (بیان پرونئین نوترکیب پروتئاز در این مطالعه ۸۵ میکروگرم در میلی لیتر بود). وجود آنزیم T۷ RNA polymerase و T۷ Lac promoter برای کاهش مشکل سمیت نیز از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

۴) برچسپ His (His-tag) در انتهای C و برچسپ His-Patch thiorredoxin در انتهای N پروتئین نوترکیب تولید شده موجب تخلیص آسانتر، حلالیت بیش تر و کارایی بیش تر ترجمه پروتئین بیان شده گردید(یکی از مشکلات مطالعات قبلی ، مشکل حلالیت و تخلیص پروتئین تولید شده بود).

۵)وجود ژن Lac I در وکتور مورد استفاده در این مطالعه باعث مهار رونویسی پایه ژن مورد نظر می شود و این خود مزیتی برای پروتئین هایی است که بیان آن ها برای میزبان سمی است (مانند پروتئاز). بنابراین، این ویژگی باعث پایداری بیشتر وکتور ما در میزبان شد.

با توجه به ویژگی های مشاهده شده در سیستم کلون سازی مورد استفاده در این مطالعه تا حد زیادی بر مشکلات سمیت، حلالیت و تخلیص مشاهده شده در مطالعات قبلی غلبه شد. هم چنین با بهره گیری از این روش میزان به نسبت بالایی از شکل محلول rPR را تولید کرد. با توجه به اهمیت پروتئاز به دلیل عملکردش در ویروس و هم چنین به دلیل داشتن نواحی ایمونوژنیک به عنوان یک گزینه بسیار مهم در بحث درمان و تشخیص آلودگی، که با تولید میزان به نسبت بالایی از این آنزیم، این روش بتواند به مسیر روبه جلوی درمان و پیش گیری بیماری ایدز کمک کند.

سپاسگزاری

با تقدیر و تشکر فراوان از کارشناسان زحمت کش آزمایشگاه ویروس شناسی سازمان انتقال خون ایران و آزمایشگاه بیوتکنولوژی پزشکی به خاطر همکاری های بسیار خوب و بی دریغشان.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.12.1]

منابع

1. *AID*S epidemic update : November 2009-2010 [cited; Available from: www.unaids.org]

2. Boucher, C M. De Jager, et al. Antibody response to human immunodeficiency virus type 1 protease according to risk group and disease stage. J. clinical microbiology (1989); 27(7): 1577.

3. Ceccherini-Silberstein F. F Erba, et al. Identification of the minimal conserved structure of HIV-1 protease in the presence and absence of drug pressure. Aids (2004); 18(12): 11.

4. 27. Cheng, Y S E. K H Lo, et al. Screening for HIV protease inhibitors by protection against activity-mediated cytotoxicity in Escherichia coli. J. virological methods (2006); 137(1): 82-87.

5. Cheng Y S E. McGowan M H. Kettner C A. Schloss J V. Erickson-Viitanen S. & Yin F H. High-level synthesis of recombinant HIV-1 protease and the recovery of active enzyme from inclusion bodies. Gene, (1990); 87(2), 243-248.

6. Croix D A. H Y Yeh, et al. A dominant epitope of HIV-1 protease recognized by hamster monoclonal antibodies. JAIDS J. Acquired Immune Deficiency Syndromes (1993); 6(6): 558.

7. Dergousova N I. Amerik A Y. Volynskaya A M. & Rumsh L D. HIV-I protease. Applied biochemistry and biotechnology. (1996); 61(1), 97-107.

8. Ehnlund M and E Björling. Fine characterization of the antigenic site within the flap region in the protease protein of HIV-1. Archives of virology (2000); 145(2): 365-369.

9. Holmgren A. Thioredoxin. Ann. Rev. Biochem. (1985); 54, 237-271.

10. Katti S K. LeMaster D M. and Eklund H. Crystal Structure of Thioredoxin from E. coli at 1.68 Angstroms Resolution. J. Mol. Biol. (1990); 212, 167-184.

11. Komai T. Ishikawa Y. Yagi R. Suzuki-Sunagawa H. Nishigaki T. & Handa H. Development of HIV-1 protease expression methods using the T7 phage promoter system. Applied microbiology and biotechnology, (1997); 47(3), 241-245.

12. Lescar J. Brynda, J. Bentley G A. Riottot M M. Chitarra V. Rezacova P. et al. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by a monoclonal antibody. Protein Science, (1999); 8(12), 2686-2696.

13. LaVallie E R. DiBlasio E A. Kovacic S. Grant K. L. Schendel P F. and McCoy J M. A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the E. coli Cytoplasm. Bio/Technology. (1993); 11, 187-193

14. Lu Z. DiBlasio-Smith E A. Grant K L. Warne N W. LaVallie E R. Collins-Racie L A. Follettie M T. Williamson M J and McCoy J M. Histidine Patch Thioredoxins. J. Biol. Chem. (1996); 271, 5059-5065.

15. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. (1982); 31(27): p. 365-7.

16. Rosenberg A H. Lade B N. Chui D S. Lin, S W. Dunn J J and Studier F W. Vectors for Selective

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.12.1]

Expression of Cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. Gene (1987); 56, 125-135.

17. Shuman S. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. J. Biol. Chem. (1994); 269, 32678-32684.

18. Shuman S. Recombination Mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in Escherichia coli is Sequence Specific. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991); 88, 10104-10108.

19. Studier F W and Moffatt B A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. J. Mol. Biol. (1986); 189, 113-130.

20. Studier F W. Rosenberg A H. Dunn J J and Dubendorff J W. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. Meth. Enzymol. (1990); 185, 60-89.

21. Taylor A. D P Brown et al. High-level expression and purification of mature HIV-1 protease in Escherichia coli under control of the araBAD promoter. Applied microbiology and biotechnology (1992); 37(2): 205-210.

22. Volonte F. L Piubelli et al. Optimizing HIV-1 protease production in Escherichia coli as fusion protein. Microbial Cell Factories (2011); 10(1): 53.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.12.1]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.12.1]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]