مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۸۵، صفحات ۱۹۱ تا ۱۹۹

Original Article

بررسی اثرات آپوپتوزیس القاء شده پروتئین ژن VP_2 کلون شده از ژنوم ویروس بورس عفونی بر سلولهای سرطانی لنفوسیتی B انسان در in vitro

مهرداد هاشمی[۱]، سید علی قرشی[۲]، کاظم پریور[۳]، عبدالخالق دیزجی[۲]،
مهدی شمس آرا[۴]، یوسف دوستار[۵]، معصومه بخشایش[۶]

[۱] دانشجوی دکترای ژنتیک ملکولی، گروه ژنتیک ملکولی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم وتحقیقات
[۲] استاد، پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک وفن آوری زیستی
[۳] استاد، گروه زیست جانوری، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم وتحقیقات
[۴] استادیار، گروه ژنتیک ملکولی، پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک وفن آوری زیستی
[۵] استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد تبریز
[۶] کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: *آپوپتوزیس یا مرگ سازمان‌یافته، اصلی‌ترین مکانیسم در تکامل و هوموستاز بافت‌های بالغ در جهت حذف سلول‌های غیر ضروری است که القای آن روشی موثر در درمان سرطان می‌باشد. .هدف این مطالعه بررسی القای آپوپتوزیس پروتئین VP2 کلون شده از ژنوم بورس عفونی بر سلول‌های سرطانی لنفوسیتی B انسان می‌باشد.*

روش بررسی: *در این تحقیق پس از کلونینگ ژن VP_2 در داخل مخمر پیکیا پاستوریس، پروتئین بیان گردید. توان حیاتی سلول‌ها با روش MTT ارزیابی شد. سپس اثر پروتئین VP_2 بر سلول‌های سرطانی لنفوسیتی B انسان با رنگ‌آمیزی Hoechst و فلوسایتومتری مورد سنجش قرار گرفت.*

یافته‌ها: *در روش MTT سلول‌های سرطانی لنفوسیتی B انسان در غلظت‌های ۱ و ۵ میکروگرم، مرگ سلولی معنی‌داری را نسبت به گروه‌های شاهد نشان دادند ($p<0/01$). با رنگ‌آمیزی Hoechst اجسام آپوپتوتیک مشخص گردید و با ارزیابی فلوسایتومتری، ۴۸ ساعت زمان مناسبی برای القای آپوپتوز بود.*

نتیجه‌گیری: *در این بررسی برای اولین بار مشخص گردید، پروتئین حاصل از کلونینگ ژن VP2 از ویروس IBDV قادر است به‌تنهایی در محیط خارج از بدن بر سلول‌های سرطانی لنفوسیت B آپوپتوزیس را القا نماید.*

واژگان کلیدی: *کلونینگ، آپوپتوزیس، ژن VP2، سلول‌های سرطانی لنفوسیتی B انسان*

مقدمه

بیماری گامبورو (Gumboro disease) نوعی بیماری حاد و واگیردار ویروسی پرندگان است که توسط ویروسی از خانواده بیرناویروس به‌نام ویروس بیماری بورس عفونی Infectious bursal disease virus (IBDV) ایجاد می‌گردد. ویروس با تأثیر بر سلول‌های لنفوسیتی B نابالغ در بورس فابریسیوس و سایر اندام‌های لنفوئیدی باعث تخریب سلولی بافت بورس و طحال می‌گردد. در مواردی از تخریب بافتی، پاسخ‌های آماسی وجود نداشته و به نظر می‌رسد که در این موارد مکانیسم اساسی تخریب بافتی از طریق آپوپتوزیس باشد (۲،۱). رخداد آپوپتوزیس در سلول‌های آلوده به ویروس می‌تواند در بقاء ویروس و انتشار آن حائز اهمیت باشد، زیرا که در سلول‌های

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، مهرداد هاشمی (email: Hashemi_mehrdad@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۲۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

آلوده به ویروس سیگنال‌های آپوپتوزیس زمانی آغاز می‌شود که ویروس در انتهای مراحل رپلیکاسیون خود بوده و به دنبال آپوپتوزیس سلول آلوده ذرات ویروسی منتشر و سایر سلول‌ها را آلوده می‌نماید (۳).

ویروس بورس عفونی دارای ژنوم ریبونوکلئیک اسید دوبخشی و قطعه‌قطعه می‌باشد. بر روی بخش بزرگ‌تر ریبونوکلئیک اسید، ۳ پروتئین کد شده است. قسمت عمده پروتئین‌های ساختمان ویروس را پروتئین‌های ۲ و ۳ (VP2, VP3) تشکیل می‌دهند و پروتئین چهارم (VP4) غیرساختاری است و پیش‌ساز پلی‌پروتئین‌های ویروس است. پروتئین ۱ ویروس (VP1) بر روی بخش کوچک ریبونوکلئیک اسید کد شده است و وظیفه آن تکثیر ویروس است (۴). مشخص شده است پروتئین‌های VP2 و VP5 از طریق آپوپتوز سلول در آزاد شدن ویروس نقش دارند (۷-۵).

مطالعات خارج از بدن (in vitro) پروتئین‌های ویروس عامل بیماری بورس عفونی توسط Fernandez در سال‌های اخیر بیانگر این است که بیان پروتئین VP2 درون رده سلولی اپیتلیال BSC40 اثرات القائی آپوپتوزیس می‌باشد. پروتئین VP2 احتمالا از طریق مهار ژن BCL-2 اثرات القائی خود را ایفا می‌کند (۸). در بررسی اخیر مشخص گردید همواره مابین شدت ویروس و شدت تغییرات آپوپتوزیس در بورس فابریسیوس ارتباط معنی‌داری وجودارد. در تفسیر شدت تغییرات آپوپتوزیس می‌توان گفت که حضور کافی پروتئین‌های ویروسی و سیتوکین‌ها می‌توانند در بروز آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی B موثر واقع گردد (۹).

آپوپتوزیس یا مرگ سازمان یافته، اصلی‌ترین مکانیسم در تکامل و هوموستاز بافت‌های بالغ در جهت حذف سلول‌های غیرضروری، آلوده، موتاسیون یافته و یا آسیب دیده بواسطه مسیرهای خودکشی داخلی است. آسیب در برابر اشعه‌های یونیزان، عفونت‌های ویروسی و سیگنال‌های خارجی عواملی از سیگنال‌های توانا در به‌راه انداختن آپوپتوزیس هستند. مسیرهای انتقال سیگنال‌ها که باعث آغاز فعال شدن آبشاری آنزیم‌هایی بنام کاسپاز می‌گردند، آسیب‌های سلولی که باعث افزایش نفوذپذیری غشا میتوکندری‌ها وفعال شدن آنزیم‌های کاسپازی می‌شوند، آسیب DNA که منجر به تجمع پروتئین P53 و تسهیل ترمیم DNA توسط پروتئین فوق می‌گردد و مسیر آسیب‌های غشا سلولی که باعث فعال شدن آنزیم اسفنگومیلیناز و در نهایت تولید عامل سرآمیدی از ترکیبات لیپیدی غشا سلول میشود، چهار سیستم اصلی در راه‌اندازی آپوپتوریس می‌باشند (۱۳-۱۰).

ویروس‌های خیلی حاد به‌طور انتخابی لنفوسیت‌های B را آلوده می‌کنند. اگر این ویروس‌ها بصورت مصنوعی وارد سلول‌های لنفوئیدی غیر B شوند، به همانندسازی خود ادامه می‌دهند. بنابراین آلوده نشدن سلولهای لنفوئیدی غیر B توسط ویروس‌های خیلی حاد باید ناشی از ناتوانی در تشخیص یک گیرنده باشد. بنابراین چنین به‌نظر می‌رسد که ویروس‌های خیلی حاد گیرنده خاصی را روی سلول‌های لنفوئیدی B تشخیص می‌دهد (۱۴). بر پایه نتایج فلوسیتومتری، طیف میزبانی ویروس به‌وسیله یک گیرنده N-گلیکوپروتئینی، که روی لنفوسیت‌های B پوشیده شده با IgM است، تعیین می‌شود (۱۵، ۱۶). ویروس با پروتئین‌های غشاء سلول بر هم کنش می‌دهند. با توجه به ساختار ژنومی عامل بورس عفونی، ژن مولد VP_2 زمانی‌که در داخل سلول بیان می‌گردد در القاء آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی B نابالغ نقش اساسی داشته و برای ایجاد آپوپتوزیس در سلول‌های یاد شده از طریق افزایش بیان ژن‌های Bax و مهار ژن Bcl_2 باعث ایجاد آپوپتوزیس می‌گردد (۸). پروتئین VP2 ایمونوژن اصلی ویروس است و اپی‌توپهای خنثی‌کننده ویروس روی آن قرار دارند. بخش میانی ژن VP2 (نوکلئوتیدهای ۷۶۲ تا ۱۱۵۱) متغیر است و باعث اختلافات آنتی‌ژنی، خواص پاتوژنی و گرایش سلولی در سویه‌های مختلف ویروس می‌شود (۱۷، ۱۸). سایتوکاین‌های آزاد شده از سلولهای T و ماکروفاژها خودشان نقش القائی در آپوپتوزیس دارند، به‌طوری که با هدف قرار دادن نفوذپذیری میتوکندری‌ها سبب تخلیه پروتئین‌های میتوکندریایی به سیتوزول سلول شده که از آن جمله می‌توان سیتوکروم C را نام برد. سیتوکروم C نیز در حضور ATP با Apf-1 ترکیبی را ایجاد می‌نماید که قادر است پروکاسپاز-۹ را فعال نماید. بنابراین پلی را مابین محرک‌های مختلف آپوپتوزیس و آغاز آبشار کاسپازی برقرار می‌کند (۱۹، ۲۰). معمولا به دنبال اثر سیتوکین‌ها و آنتی‌ژن‌های ویروسی عامل بسیار مهمی به نام NF-kB به عنوان کوفاکتور فعال کننده رونوشت‌برداری برخی از ژن‌های مولد آپوپتوزیس در لنفوسیتهای B نقش ایفا می‌کند. نقش این پروتئین‌ها در بیماری‌های ویروسی ثابت شده است. از سیتوکین‌های آزاد شده دیگر، TNF-α است که با اتصال به گیرنده‌های ویژه خود به نام $TNF\text{-}R_1$ و $TNF\text{-}R_2$ باعث تریمریزاسیون در گیرنده‌های فوق شده و جایگاهی به نام جایگاه مرگ یا TRADD (TNFR-Associated Death Domain) ایجاد می‌گردد. این جایگاه توانایی به‌کارگیری TRAFs (TNFR-Associated Factors) را در جهت فعال سازی NF-kB و مسیر JNK/AP_1

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

داراست. از طرف دیگر TRADD با FADD کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که قادر است کاسپاز ۸ را به خدمت درآورد و به همراه آن گیرنده $TNF\text{-}R_1$ قادر است آپوپتوزیس را از طریق مولکول سازگار RAIDD (RIP Associated Ich-1/CED) و واکنش با جایگاه جایگاه مرگ RIP و واسطهٔ CARD باعث فعال شدن کاسپاز ۲ و در نهایت آپوپتوزیس می‌گردد (۲۱، ۲۲). بر این اساس، بر آن شدیم پس از کلونینگ و استخراج پروتئین VP_2 نقش آن را در القای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی B انسان بررسی کنیم تا شاید در آینده بتوان از آن در درمان بیماری‌ها استفاده کرد.

مواد و روشها

در این مطالعه مداخله‌ای پس از کلونینگ ژن VP2 داخل مخمر پیکیاپاستوریس، پروتئین بیان شد و اثر غلظت‌های مختلف آن بر سلول‌های لنفوسیتی B مورد بررسی قرار گرفت. برای کلونینگ ژن و استخراج پروتئین VP2 ویروس در مخمر پیکیا پاستوریس Pichia pastoris، از سیستم راه‌اندازی شده در بخش ژنتیک ویروس پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی استفاده گردید. ابتدا RNA کل سلول به‌روش کیت RNAfast (تهیه شده در پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی) که بر اساس استفاده از گوانیدیوم ایزوسیانات است، از نمونه‌های آلوده بافت بورس استخراج گردید و پس از بررسی نتیجه استخراج روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز، RNA تا زمان استفاده در ۷۰- °C نگهداری شد. برای واکنش رونویسی معکوس (Reverse transcription (RT به منظور ساخت cDNA، از (Roche Expand First Strand cDNA Synthesis Kit Molecular Biochemicals, Germany) استفاده شد. در این کیت با جهش‌زایی در انتهای کربوکسیل آنزیم نسخه‌بردار معکوس (M-MuLV) molony murin leukemia virus خاصیت RNaseH آن از بین رفته است. جهت طراحی پرایمرها، توالی ژن VP2 ویروس بیماری بورس عفونی از GenBank گرفته شد و دوجفت پرایمر طراحی شد.

۱- پرایمرهای جفت یک بنام VP2-F (Forward) و VP2-R (Reverse) که برای تکثیر و کلون کردن طول کامل ژن VP2 به‌کار رفتند. این پرایمرها بر اساس توالی قطعه A ویروس بورس عفونی سویه CEF94 (AF194428) طراحی شدند. پرایمرها در انتهای ′۵ حاوی محل برش آنزیم محدود الاثر بودند. جایگاه آنزیم‌های انتخاب شده روی توالی ژن VP2 وجود نداشتند. توالی این پرایمرها به‌شرح زیر است:

VP2-F (نوکلئوتید ۱۳۹-۱۲۲):

5′- CG**GAATTC**ATCGCAGCGATGACAAAC -3′
*Eco*RI

محل برش آنزیم EcoRI روی پرایمر نمایش داده شده است.

VP2-R (نوکلئوتید ۱۴۸۶-۱۴۶۷):

5'-TA**CTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTG**
CCTTATGGCCCGGATTATGT -3'

پرایمر VP2R در بخش ′۵ حاوی محل برش آنزیم XhoI، کدون خاتمه ترجمه و توالی کدکننده برچسب هیستیدینی (6XHis) بود. CTCGAG محل برش آنزیم XhoI، TTA کدون خاتمه ترجمه و ATGGTGATGGTGATGGTG برچسب هیستیدینی (6XHis) بود.

۲- پرایمرهای جفت دو شامل (Forward) ′۵-AOX1 و (Reverse) ′۳-AOX1 که برای بررسی کلونهای ترانسفورم شده پ. پاستوریس استفاده شدند. ژن الکل اکسیداز ۱ (AOX1) مولد آنزیمی است که آنزیم ۸۵٪ مصرف متانل را توسط آنزیم‌های الکل اکسیداز در پ. پاستوریس برعهده دارد. توالی این پرایمرها بدین شرح است:

′۵-AOX1: 5′- GACTGGTTCCAATTGACAAGC -3′
′۳-AOX1: 5′- GCAAATGGCATTCTGACATCC -3′

در واکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) دمای اتصال برای پرایمرهای AOX1 ۵۵ درجه سانتی‌گراد و برای جفت پرایمر دیگر ۶۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. زمان ساخت رشته‌ها برای دو جفت پرایمر ۶۰ ثانیه در نظر گرفته شد.

از پلاسمید pPICZA(Invitrogen) جهت بیان پروتئین VP2 در مخمر استفاده شد. این وکتور دارای طولی به اندازه ۳۳۲۹ جفت باز بوده و برای بیان داخل سلولی مناسب می‌باشد. پلاسمید pPICZA با آنزیم‌های EcoRI و XhoI هضم شد و پس از تخلیص محصول، هضم آنزیمی به‌وسیله High Pure PCR Purification Kit (Roche) از روی ژل آگارز، واکنش لیگاسیون pPICZA با قطعه VP2 به‌مدت یک شب در ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام و محصول لیگاسیون تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. محصول لیگاسیون منجر به تولید پلاسمیدهای نوترکیب pPICZA/VP2 شد که به سلول‌های مستعد شده E.coli سویه ′TOP10F ترانسفورم شد. انتخاب کلونی‌های نوترکیب روی پلیت‌های LB با نمک پایین و در حضور ۲۵ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر زئوسین صورت گرفت. چندین کلونی مقاوم به زئوسین برداشته شده، سپس استخراج پلاسمید

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

به‌وسیله High Pure Plasmid Isolation Kit(Roche) انجام شد. (شکل ۱)

برای ترانسفورم کردن سلولهای پیکیا پاستوریس ابتدا پلاسمید pPICZA/VP2 بوسیله آنزیم SacI خطی و پس از آماده شدن سلولهای پیکیا پاستوریس برای ترانسفورماسیون، به‌علت بازده بالا ترانسفورماسیون به‌روش الکتروپوریشن انجام شد. سویه مورد استفاده پیکیا پاستوریس، سویه X-33 بود که همانند تیپ وحشی +Mut قادر است در محیط حاوی متانول رشد کند. الکتروپوریشن در شرایط ۱/۵ kV، ۲۵ µF و ۲۰۰ Ω به‌مدت ۸-۷ میلی‌ثانیه اعمال شد و بلافاصله ۱ میلی‌لیتر سوربیتول ۱M سرد اضافه گردید. محتویات کووت به یک فالکن ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و ۲-۱ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد (بدون شیک شدن) انکوبه و محصول الکتروپوریشن روی پلیتهای YPDS حاوی ۱٪ عصاره مخمر، ۲٪ پپتون و ۲٪ گلوکز به‌همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر زئوسین در ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ روز کشت شد تا کلونی‌ها تشکیل گردند. جهت تعیین چگونگی مصرف متانل توسط ترانسفورمت‌های پ. پاستوریس، فنوتیپ‌های MutS و +Mut بوسیله رشد در پلیت‌های MD (Minimal Dextrose Medium) و MM (Minimal Methanol Medium) تعیین شدند و ترانسفورمتهای پ. پاستوریس با فنوتیپ +Mut انتخاب گردیدند. جهت تایید ادغام ژن VP2 به‌درون ژنوم ترانسفورمت پیکیا پاستوریس، DNA کروموزومی مخمر به‌روش DNAfast (تهیه شده در پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی) استخراج و با استفاده از پرایمرهای AOX1 ، واکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) انجام شد و پس از الکتروفورز، نتاج آنالیز گردید (شکل ۲).

کلون انتخاب شده در ۱۰ میلی‌لیتر محیط BMGY (حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر و ۲۰ گرم پپتون در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۱M (۶ pH)، ۱۰۰ میلی‌لیتر 10X YNB، ۲ میلی‌لیتر بیوتین ۵۰۰X و ۱۰۰ میلی‌لیتر گلیسرول ۱۰X) تا رسیدن OD600 به ۶-۲ کشت شد. سلول‌ها با سانتریفوژ در ۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند. پس از خارج کردن محلول رویی، پلت سلولی در ۱۰ میلی‌لیتر محیط BMMY (در مورد محیط BMMY به‌جای گلیسرول، ۱۰۰ میلی‌لیتر متانل ۱۰X اضافه شد) سوسپانسیون شد. جهت القاء بیان پروتئین، هر ۲۴ ساعت، متانل در غلظت نهایی ۱٪ اضافه شد. القاء بمدت ۱۴۴ ساعت ادامه یافت. سلول‌ها با سانتریفوژ در ۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند. محلول رویی خارج و پلت سلولی روی یخ قرار گرفتند. به هر میلی لیتر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلول اضافه و مخلوط شد. هم‌حجم محتوی لوله، بید شیشه‌ای اضافه شد. هشت بار متوالی ۱ دقیقه ورتکس و ۱ دقیقه انکوباسیون روی یخ انجام شد. سانتریفوژ در rpm ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محلول رویی به میکروتیوب جدید منتقل گردید. از آنجایی‌که هدف نهایی بررسی تاثیر پروتئین نوترکیب VP2 بر سلول‌های سرطانی بود، پروتئین‌ها در حالت طبیعی و غیردناتوره تخلیص شدند. تخلیص پروتئین نوترکیب VP2 حاوی برچسب 6XHis با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از رزین Ni-NTA در یک سرنگ انسولین ریخته شد که از قسمت زیرین بوسیله پنبه یا پشم شیشه مسدود شده بود. رزین با ۵ حجم بافر اتصال شسته شد. عصاره سلولی با سرعت جریان حدود ۱ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد. فاز خارج شده از ستون در یک لوله نگهداری شد. ستون با ۵ حجم بافر شستشو حاوی ۲۰ mM ایمیدازول شسته شد و محلول خارج شده جمع گردید. مجدداً ستون با ۵ حجم بافر شستشو حاوی ۳۰ mM ایمیدازول شسته شد و مایع خارج شده در لوله‌ای جمع‌آوری شد. سپس شستشوی ستون با ۵ حجم بافر حاوی ۴۰ mM ایمیدازول ادامه یافت و بخش خارج شده جمع آوری شد. در آخر ستون پروتئین با ۵ حجم بافر خارج‌کننده حاوی ۲۵۰ mM ایمیدازول شسته شد و بخش خارج‌شده نگهداری گردید. فازهای جمع آوری شده در SDS-PAGE بررسی شدند (شکل۳). از آنجایی‌که ایمیدازول باعث رسوب پروتئین هنگام یخ زدن می‌شود، مابقی پروتئین تخلیص شده پس از دیالیز در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شرایط تخلیص پروتئین با افزایش غلظت NaCl و افزودن توین ۲۰ بهینه شد. اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد انجام شد (۲۳).

چهار رده سلول سرطانی لنفوسیت B انسان شامل Ramos (Burkitt's Lymphoma)، Raji (Burkitt's Lymphoma)، 183-E95 (Human chronic Lymphocytic Leukemia) و Nalm6 (Pre B cell Leukemia) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط RPMI1610 (Sigma) به‌علاوه ۱۰٪ سرم جنین گاوی FBS (Fetal Bovine Serum)، ۲ میلی مولار L – گلوتامین، ۲۵ میلی مولار HEPES، ۲/۲۴۰ گرم‌در-لیتر بی‌کربنات‌سدیم، ۱۰۰ واحددرمیلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ واحددرمیلی‌لیتر استروپتومایسین در دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۰٪، CO2 ۵٪ رشد کردند. در شروع کشت در هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی، 5×10^{5} سلول ریخته شد و زمانی‌که رشد

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

سلول‌ها به مرحله لگاریتمی رسید پس از ارزیابی سیتوتوکسیسیتی و سنجش توان حیاتی، سلولها با غلظت ۰/۵ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر پروتئین نوترکیب VP2 تیمار شدند. هم‌چنین پس از کلیه مراحل القای بیان پروتئین مخمر X33/pPICZA با فنوتیپ +Mut و استخراج پروتئین آن به‌روش ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی به‌عنوان کنترل تیمار گردید. جهت حذف ایمیدازول عمل دیالیز انجام شد.

سلول‌های سرطانی Ramos به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر خانه ظرف ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه با غلظت‌های مندرج در نمودار ۱ از پروتئین VP2 تیمار و برای هر غلظت کنترل در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۴۸ ساعت، توان حیاتی سلول‌ها با استفاده از 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (sigma) ارزیابی شد. به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر محلول MTT حل‌شده در محیط RPMI1610 با غلظت ۵ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر به هر کدام از خانه های ۹۶ تایی اضافه شد و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۳ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و جذب نوری آنها در ۵۷۰ نانومتر در دستگاه ELIZA reader بررسی و با استفاده از فرمول زیر میزان اندکس تحریک سلول‌ها محاسبه شد.

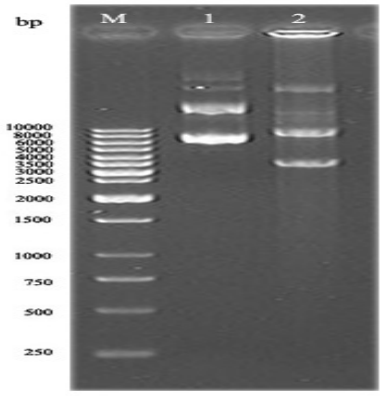
اندکس تحریک= جذب سلولهای تحریک شده تقسیم بر جذب سلولهای تحریک نشده

۱×۱۰^{۶} سلول سرطانی Ramos کشت شده در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی تحت تیمار با پروتئین VP2 با غلظت ۰/۵ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر به همراه کنترل پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۴۸ ساعت، با عمل سانتریفوژ (سرعت ۵۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) جمع‌آوری و در PBS (Phosphate buffer saline) محتوی ۳/۷٪ پارافرم آلدئید به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند و پس از فیکس شدن در حرارت اتاق، سلول‌ها چند بار با محلول PBS شستشو شدند و سپس با ۱۰ میکرولاندادرمیلی‌لیتر رنگ Hoechst در حرارت اتاق بمدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۳۶۰ نانومتر قابل رویت شدند.

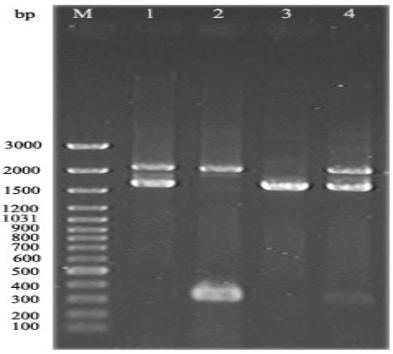
۱×۱۰^{۶} سلول از ۴ رده مختلف سلول‌های سرطانی کشت‌شده در فلاسک های ۲۵ سانتی‌متر مربعی تحت تیمار با پروتئین VP2با غلظت ۰/۵ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر به همراه کنترل پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه در مدت زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، با عمل سانتریفوژ (سرعت ۲۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) جمع‌آوری و یک بار با محلول PBS شستشو و عمل سانتریفوژ تکرار گردید. از کیت Annexin-V-fluos stainig (Roche) جهت آنالیز فلوسایتومتری استفاده گردید. پس از عمل سانتریفوژ، با اضافه کردن ۱۰۰میکرولیتر محلول Annexin-V-fluos Labeling شامل (Annexin-V-fluorecein, Propidium iodide) به سلول‌ها انکوباسیون در دمای ۱۵الی ۲۵ درجه به‌مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه انجام و بلافاصله با دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شدند (۲۴).

یافته‌ها

در شکل ۱ پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده از کلونی‌های مقاوم به زئوسین و در شکل ۲ PCR از روی DNA ژنومی مخمر پس از اینتگریت شدن پلاسمید داخل ژنوم مخمر نشان داده شده است.



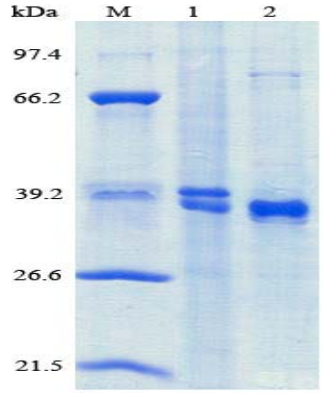
شکل ۱- استخراج پلاسمید از کلونی‌های مقاوم به زئوسین. ردیف M نشانگر وزن مولکولی DNA؛ ردیف ۱ پلاسمید pPICZA/VP2؛ ردیف ۲ پلاسمید pPICZA



شکل ۲- PCR از روی DNA ژنومی مخمر با استفاده از پرایمرهای AOX1 (ردیف M نشانگر وزن مولکولی DNA؛ ردیفهای ۱ و ۴ X33/pPICZA/VP2 با فنوتیپ Mut^{+}؛ ردیف ۲ X33/pPICZA با فنوتیپ Mut^{+}؛ ردیف ۳ X33/pPICZA/VP2 با فنوتیپ Mut^{S})

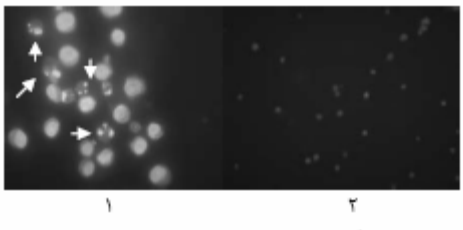
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

برای تخلیص پروتئین VP2 به انتهای کربوکسیل آن ۶ اسید آمینه هیستیدین اضافه شد و به‌روش IMAC (با استفاده از ستون Ni-NTA) تخلیص شد. در شکل ۳ پروتئین VP2 با وزن مولکولی حدود kDa ۴۰ همراه با بند پروتئینی دیگری در حدود kDa ۳۵ مشاهده می‌شود. هم‌چنین محصول تخلیص شده از مخمرهای حاوی pPICZA/VP2 و pPICZA با هم مقایسه شدند .



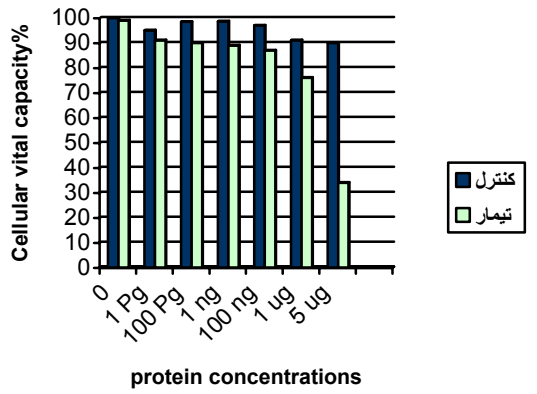
شکل ۳- مقایسه محصول تخلیص شده از مخمرهای حاوی pPICZA/VP2 و pPICZA (ردیف M نشانگر وزن مولکولی پروتئین؛ ردیف ۱ محصول تخلیص شده از مخمر X33/pPICZA/VP2؛ ردیف ۲ محصول تخلیص شده از مخمرX33/pPICZA)

مطابق شکل ۴ سلولهای سرطانی Ramos تحت تیمار با پروتئین نوترکیب VP2 نسبت به کنترل هسته‌های آپوپتوزی را نشان دادند.



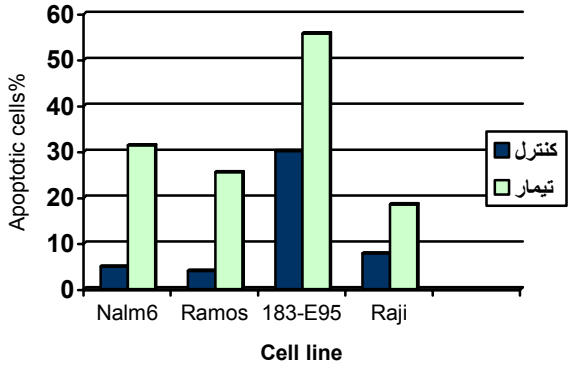
شکل ۴ – عکس رنگ آمیزی با میکروسکوپ فلورسنت: ۱-تیمار با پروتئین VP_2 ۲-کنترل

طبق نمودار ۱ میزان جذب نوری در سنجشMTT در غلظت‌های (۱و۱۰۰پیکوگرم و۱و۱۰۰نانوگرم) تفاوت چندانی با کنترل ندارد اما در غلظت‌های (۱و۵ میکروگرم) توان حیاتی سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می دهند ($p<۰/۰۱$).



نمودار ۱- نتایج بدست آمده از سنجش MTT در غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب VP_2

با توجه به شکل ۵ در رده سرطانی راموس پس از تیمار با پروتئین VP2 تعداد سلولهای آپوپتوز در مقایسه با کنترل افزایش یافته و با گذشت زمان این میزان بیشتر می‌شود. نمودار ۲ درصد سلولهای آپوپتوز در رده های مختلف سلول سرطانی پس از گذشت ۴۸ ساعت را در مقایسه با کنترل نشان می دهد. تمام ۴ رده سلولی در اثر تیمار با پروتئین، تفاوت معنی‌داری با کنترل دارند ($p<۰/۰۱$).



نمودار ۲-نتایج بدست آمده از سنجش درصد سلولهای آپوپتوز رده های سلولی پس از گذشت ۴۸ ساعت

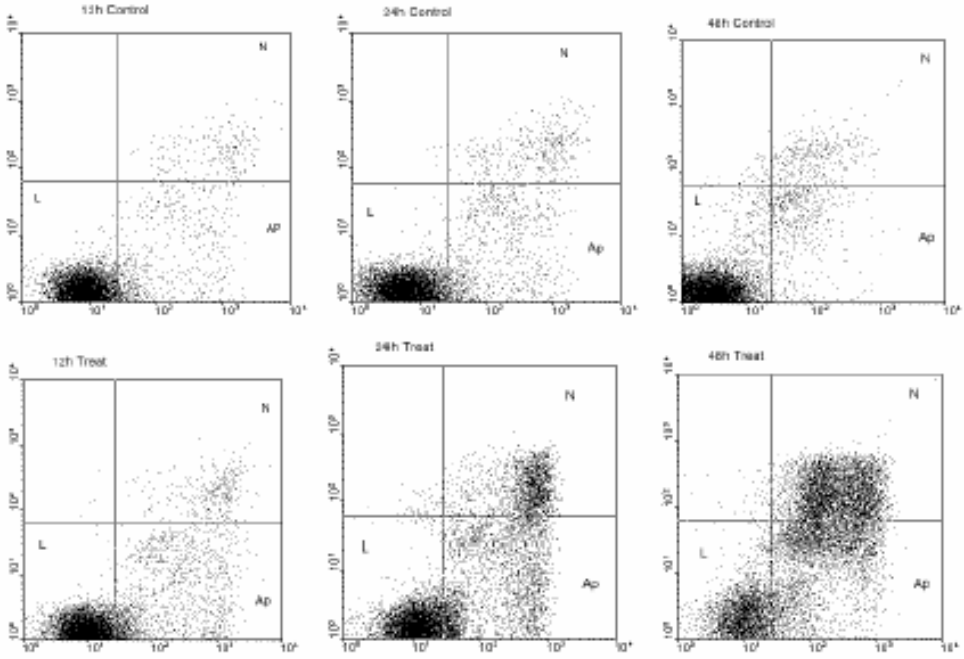
بحث

مطالعات انجام‌شده پیرامون پروتئین‌های ویروس Bluetague (BTV) توسط Mortola و همکاران بیانگر این است پروتئین‌های VP2 و VP5 این ویروس قادر به القای آپوپتوز در سلول‌های پستانداران هستند و با فعال شدن کاسپاز ۳ این عمل انجام می‌گردد (۲۵). در مطالعه‌ای که بر روی آپوپتوزیس القا شده توسط ویروس عامل بورس عفونی انجام پذیرفت، مشخص گردید همواره بین شدت ویروس و شدت تغییرات

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

شکل ۵- افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوز در مقایسه با کنترل در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت

(سلولهای زنده=L ، سلولهای آپوپتوز= AP ، سلولهای نکروز=N)



آپوپتوزیس در بورس فابریسیوس ارتباط معنی داری وجودارد که می‌تواند بعلت حضور کافی پروتئین‌های ویروسی و سیتوکین‌ها در بروز آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی B باشد (۹) که این موضوع در این مطالعه نیز مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه ما برای اولین بار مشخص گردید، پروتئین حاصل از کلونینگ ژن VP2 از ویروس IBDV قادر است به تنهایی در in vitro در سلول‌های سرطانی لنفوسیت B آپوپتوز را القا نماید. برای افزایش دقت در تشخیص آپوپتوزیس از روش دقیق فلوسایتومتری با Annexin-V-fluos stainig استفاده شد. در طول مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین (PS) بر روی سطح سلول ظاهر می‌شود. اساس این روش ترکیب پروتئین اتصالی وابسته به کلسیم Annexin V به فسفولیپیدهای غشایی است. این پروتئین تمایل بسیاری به PS دارد. در کیت‌های تشخیصی این پروتئین با مواد نشان‌دار مختلف و یا کروموفسفر برای سهولت در تشخیص به‌کار می‌رود. با بهره گیری ازاین روش، آپوپتوز در مراحل اولیه و سلول‌های زنده قابل تشخیص هستند. به این نکته باید اشاره کرد که سلول‌های نکروتیک نیز در سطح خود مولکولهای PS را عرضه می‌کنند. از آنجایی‌که سلول‌های نکروتیک تمامیت غشاء خودرا از دست می‌دهند، با همراه کردن رنگی مانند یدید پروپایدیوم با Annexin V می‌توان این دو مرحله را از هم تشخیص داد.

به‌منظور سهولت در تخلیص، پروتئین VP2 به برچسب هیستیدینی (6XHis) فیوز شد. این برچسب امکان تخلیص فیوژن پروتئین را به‌وسیله ستون IMAC فراهم می‌آورد. براساس نوع پروتئین، برچسب هیستیدینی به انتهای آمینی یا کربوکسیلی متصل می‌شود. قرار دادن برچسب در یک انتها ممکن است باعث پوشیده شدن آن در اثر تاخوردن پروتئین شود. در چنین مواردی برچسب را به انتهای دیگر پروتئین متصل می‌کنند. بر اساس مطالعات قبلی، فیوز کردن برچسب هیستیدینی به انتهای کربوکسیل پروتئین VP2 در باکولوویروس تخلیص آن به‌روش غیر دناتوره را امکان‌پذیر کرده است (۲۶، ۲۷). بر این اساس در پژوهش حاضر برچسب هیستیدینی به انتهای کربوکسیل پروتئین متصل شد.

استفاده از ستون IMAC منجر به خلوص ۱۰۰٪ پروتئین نمی‌شود. زیرا سلول پروتئین‌های غنی از هیستیدین دارد که به‌طور غیراختصاصی به ستون متصل می‌شوند. این مساله در سیستم‌های یوکاریوتی حادتر است، زیرا یوکاریوتها پروتئین‌های غنی از هیستیدین بیشتری دارند. به همین علت در سلول‌های یوکاریوتی برای کاستن از پروتئین‌های غیراختصاصی، شرایط اتصال به ستون و شستشو با افزایش غلظت NaCl تا ۲M و اضافه کردن دترجنت‌ها مانند Tween 20 سخت‌تر می‌شود. در مطالعه حاضر نیز تخلیص فیوژن پروتئین VP2 با مشکل پروتئین‌های غیراختصاصی مواجه بود

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

که با سخت‌تر کردن شرایط تخلیص تا حدی از این مشکل کاسته شد. پروتئین متصل‌شده به ستون IMAC از طریق کاهش pH و یا افزایش غلظت ایمیدازول خارج می‌شود. از آنجایی‌که تاثیر تغییرات pH روی ساختار پروتئین VP2 مشخص نبود، از روش دوم که مبتنی بر افزایش غلظت ایمیدازول بود استفاده شد. سادگی و کم‌هزینه بودن سیستم-های بیان پروکاریوتی، تولید پروتئین VP2 را در آنها توصیه می‌کند. البته تاخوردن این پروتئین در پروکاریوت‌ها با مشکلاتی همراه است که احتمالا ناشی از کمبود غلظت چپرون‌های داخل سلولی می‌باشد. بنابراین بیان هم‌زمان پروتئین VP2 و چپرون‌های سلولی در E.coli جهت تقویت سیستم تازدن پروتئین‌ها پیشنهاد می‌شود.

امید است با افزایش هر چه بیشتر مطالعات در زمینه اثر پروتئین VP2 ویروس بورس عفونی بر سلول‌های سرطانی، اطلاعات هر چه مفیدتری در خصوص درک چهره واقعی اثر آن حاصل گردد تا در آینده بتوان از آن در درمان بیماری‌ها استفاده کرد.

REFERENCES

1. Martinez-Torrecuadrada JL, Saubi N, Pages-Mante A, Caston JR, Espuna E,Casal JI. Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines .Vaccine 2003; 21: 3342-50.
2. Kuo PL, Lin CC. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and fas-mediated pathways. J Biomed Sci 2003;10(2):219-27.
3. Azad AA, McKern NM, Macreadie IG, Failla P, Heine HG, Chapman A, et al. Physiochemical and immunological characterization of recombinant host protection antigen (vp2) of infections Bursal disease virus .Vaccine 1991;9:715-72.
4. Dobos P. Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 1995;208:19-25.
5. Annet J, Nieter H, Muller H. Apoptosis induced by IBDV replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. J virol 2001;82:1107-15.
6. Yao K, Vakharia VN. Induction of apoptosis in vitro by the 17-kda nonstructural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. Virology 2001;285:50-58.
7. Yehuda H, Pitcovski J, Michael A, Gutter B, Goldway M. Viral protein 1 sequence analysis of three infectious bursal disease virus strains: a very virulent virus, its attenuated form, and an attenuated vaccine. Avian Dis 1999;43:55-64.
8. Fernandez A, Martinez S, Rodriguez JF. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. J Virol 1997;71(10):8014-18.
9. دوستار ی، نقشینه ر، طروقی ر، هاشمی م، رهبرقاضی ر. مطالعه آزمایشی آپوپتوزیس القا شده توسط ویروس عامل بورس عفونی به روش تانل. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴؛ دوره ۶، شماره ۴، صفحات ۳۱۳ تا ۳۲۰.
10. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. fas and fasl in the homeostatic regulation of immune responses. Immuol Today 1995;16:569-74.
11. Nozawa K. Soluble fas (apo- 1, CD95) and soluble fas lig and in rheumatic disease. Arthritis Rheum 1997;40:1126-29.
12. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA Fragmentation. J Cell Biol 1992;119:493-501.
13. Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ. Apoptosis. In: Potten CS (Ed). Perspectives on mammalian cell death., Oxford: Oxford University Press; 1987: 93.
14. Boot HJ, Huurne AA, Hoekman AJ, Peeters BP, Gielkens AL. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. J Virol 2000;74:6701-11.
15. Ogawa M, Yamaguchi T, Setiyono A, Ho T, Matsuda H, Furusawa S, et al. Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. Arch Virol 1998;143:2327-41.
16. Ogawa M, Nakamura S, Atsuchi T, Tamiya T, Tsuchiya T, Nakai S. Macromolecular antimicrobial glycoprotein, achacin, expressed in a methylotrophic yeast Pichia pastoris. FEBS Lett 1999;448:41-44.
17. Azad AA, Jagadish MN, Brown MA, Hudson PJ. Deletion mapping and expression in Escherichia coli of the large genomic segment of a birnavirus. Virology 1987;161:145-52.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

18. Von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirrmeier H, Behrens SE, Letzel T, Mundt E. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. J Gen Virol 2004;85:2221-29.

19. Dallaporta B, Marchetti P, de Pablo MA, Maisse C, Duc HT, Metivier D, et al. Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. J Immunol 1999;162(11):6534-42.

20. Durant S. In vivo effects of catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis. Cell Immunol 1986;102(1):136-43.

21. Ye X, Georgoff I, Fleisher S, Coffman FD, Cohen S, Fresa KL. The mechanism of epipodophyllotoxin-induced thymocyte apoptosis: possible role of a novel Ca(2+)-independent protein kinase. Cell Immunol 1993;151(2):320-35.

22. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. Nature 1992;356:397-400.

23. Tong L, Shen JG, Qiu XS. Study on preventive effect of buyang huanwu decoction on cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia-reoxygenation in rats. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 2002;22(7):522-24.

۲۴. شمس آرا م. بیان پروتئین ویروس بیماری بورس عفونی و بررسی ایمنی زایی آن در فیبروبلاست جنین جوجه. پایان نامه دکتری ژنتیک مولکولی، تهران، دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۵.

25. Mortola M, Noad R, Roy p. Bluetangue virus outer capsid protein are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. J Virol 2004;78(6):2875-83.

26. Wang MY, Kuo YY, Lee MS, Doong SR, Ho JY, Lee LH. Self-assembly of the infectious bursal disease virus capsid protein, rVP2, expressed in insect cells and purification of immunogenic chimeric rVP2H particles by immobilized metal-ion affinity chromatography. Biotechnol Bioeng 2000 ;67:104-11.

27. Wang P, Zhang J, Sun ZY, Chen YH, Liu JN. Glycosylation of prourokinase produced by Pichia pastoris impairs enzymatic activity but not secretion. Protein Expr Purif 2000;20:179-85.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]