مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۸۶، صفحات ۱۷۷ تا ۱۸۱

Original Article

بررسی ساختار ایمونوژنیسیته پروتئین نو ترکیب HIV به دست آمده از ویروس gp41-p24

فاطمه روح‌الله[۱]، قادر خلیلی[۲]، سروش سرداری[۳]، معصومه توسطی‌خیری[۴]،
عارف امیرخانی[۵]، طاهر نژادستاری[۶]، فریدون مهبودی[۳]

[۱] دانشجوی دکترای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاداسلامی، واحدعلوم و تحقیقات تهران
[۲] مربی، هیئت علمی بخش ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۳] استادیار، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۴] استادیار، بخش آنفولانزا، انستیتو پاستور ایران
[۵] دانشیار، بخش اپیدمیولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۶] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: *پروتئینهای نوترکیب به دست آمده از ویروس HIV می‌توانند به عنوان یک ایمونوژن و تحریک‌کننده سیستم ایمنی باشند. از مهمترین آنها می‌توان به پروتئینهای داخلی (gag) و سطحی ویروس (Env) اشاره کرد. در این تحقیق به بررسی ساختار ایمونوژنیسیته پروتئین نوترکیب gp41-p24 به دست آمده از ویروس HIV می‌پردازیم.*

روش بررسی: *در مطالعه تجربی حاضر، پروتئین نوترکیب gp41-p24 که قبلا توسط روشهای کلونینگ تهیه گردیده و به حالت Unfold نگهداری می‌شد با روشهای رقیق‌سازی پروتئین از حالت Unfold به حالت Refold در آمد. وزن مولکولی و غلظت پروتئینها با روشهای الکتروفورز و اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. Refolding پروتئین با استفاده ازالکتروفرز با ژل Native و دستگاه CD (Circular Dichroism) براساس تغیرات ساختار دوم پروتئین ارزیابی شد. فعالیت ایمنی و ساختار ایمونوژنیسیته این دو پروتئین با استفاده از تست الایزا و وسترن بلات بر اساس نوع پروتئین و میزان جذب نوری (OD) ثبت شد.*

یافته‌ها: *نتایج نشان داد که وزن مولکولی این دو پروتئین ۳۲ کیلودالتون می‌باشد و از خلوص کامل برخوردارند. Refolding پروتئین از طریق ژل Native مشاهده شد. در این پروتئین افزایش ساختارهای Helix و Beta و کاهش ساختار Random (درمقایسه با پروتئین Unfold) پدیدارگردید. همچنین واکنش ایمنی در پروتئین استاندارد و Refold شده با آنتی‌بادهای موجود در سرم بیماران کنترل مثبت HIV مشاهده گردید و با استفاده ازآنالیز واریانس یکطرفه اختلاف معنی‌داری برحسب نوع پروتئین مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *تحقیقات نشان داد که پروتئین نوترکیب gp41-p24 به دست آمده از ویروس HIV بعد از Refolding دارای فعالیت ایمونوژنی می‌باشد و از آن می‌توان به عنوان یک ایمونوژن در ایمونیزاسیون و تحریک سیستم ایمنی استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: *پروتئین نوترکیب، ایمونوژنیسیته، Gp41-p24، ویروس HIV.*

مقدمه

یکی از مهمترین بیماریهای واگیرداری که درسرتاسر جهان باعث افزایش روز افزون مرگ و میر می‌شود، بیماری ایدز است (۱). این بیماری توسط یکی از اعضای خانواده لنتی ویروسها به نام HIV (Human Immunodeficiency Virus) ایجاد می‌شود (۲). این ویروس دارای پروتئینهای ویژه از جمله پروتئینهای پوششی، ماتریکسی، کپسیدی و نوکلئوپروتئینها می‌باشد و دو سروتیپ مختلف HIV-1 و HIV-2 از این ویروس شناسایی شده است. این دو سروتیپ از لحاظ پروتئینهای داخلی gagکه شامل پروتئینهای p24، p17، p7

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاداسلامی، واحدعلوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، فاطمه روح‌الله (**email**: paniroholah@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۷/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۹/۲۰

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]

وp6 است بـه هـم شـباهت دارنـد ولـی از لحـاظ پروتئینهـای پوششیgp120 و gp41 و همچنین سکانسهای ژنی حـدود ۷۰ تا ۸۰ درصد اختلاف دارند (۳).

Env از دسته پروتئینهـای سـطحی ویـروس اسـت کـه نقـش مهمی دراتصال و ورود ویروس به داخـل سـلول میزبـان دارد، همچنین gag از پروتئینهای داخلی ویروس می‌باشد (۴،۵). در بین پروتئینهای gag پروتئین p24 از جمله پروتئینهایی اسـت که اولین پاسخهای آنتی‌بادی علیه آن ایجاد مـی‌شـود وgp41 نیز قادر به تحریک سیستم ایمنی می‌باشـد (۵). در تحقیقـات انجام شده حضور برخـی از سکانـسهای ایمونوژنیـک پـروتئین gp41 به همراه سایر پروتئینهای به دست آمـده از ویروسـهای مختلف نظیر ویروس آنفولانزا، هرپس ویروسها و پاپیلوویروسها مشاهده شده است. از جمله این پروتئینهای نوترکیب می‌توان به پروتئین نوترکیب gp41-HA به دست آمـده از سکانـسهای ایمونوژنیـک gp41 ویـروس HIV-1 و سکانـسهای ویـژه‌ای از پروتئین هماگلوتینین ویروس HA2 آنفولانزا اشـاره کـرد (۶). پـروتئین نوترکیـبrHSV-HIVgp120 از سکانـسهای gp120 ویروس HIV-1 و بخشی از سکانسهای هـرپس ویـروس تهیـه شده اسـت (۶،۷). همچنـین پـروتئین نوترکیـب p24-Hsp71 ازسکانسهای ایمونوژنیـک p24 و پروتئینهـای شـوک حرارتـی HSp71 تهیه شده است (۸).

در تحقیقات انجام شده به بررسی ساختارهای ایمونوژنیسیته و همچنین به نقش هر یـک از ایـن پروتئینهـای نوترکیـب بـه عنوان ایمونوژن وتحریک‌کننده سیستم ایمنی اشاره شده است که این بررسیها در فازهای تحقیقاتی مختلف می‌باشند (۹). در ایـن تحقیـق بـه مطالعـه سـاختار ایمونوژنیـسیته پـروتئین نوترکیب gp41-p24 به دست آمده از ویروس HIV می‌پردازیم که این پروتئین نیـز از نـوترکیبی بـین سکانـسهای ایمونـوژن gp41 و p24 بـا روشـهای کلونینـگ بـه دسـت آمـده اسـت (۱۰،۱۱).

مواد و روشها

تعیین غلظت پروتئین: در مطالعه تجربی حاضر میزان غلظـت نمونه‌ها توسط دسـتگاه اسـپکتروفتومتری و بـا روش بردفـورد اندازه‌گیری شد. داخل کوت دسـتگاه ۵۰ میکرولیتـر پـروتئین با۹۵۰ میکرولیتر محلول بردفورد ریخته شد (درمقابل بلانـک) و میزان شدت جذب نور ثبت گردید.

Refolding پروتئین نوترکیب gp41-p24: پروتئین با اسـتفاده از بافر هپس ۲۰ میلـی مـولار رقیـق شـد و بـا کیـسه دیـالیز (Cut off ۱۰ کیلودالتون) تغیرات بافری و حذف اوره انجام شد. مقدار اوره از ۸ مولار به ۰/۱ مولار رسید و میزان تغیـرات اوره توسط کیت (من) ارزیابی شد و توسط لوله‌های سنتری پرپ و سانتریفوژ غلظت پروتئین مجددا به مقدار اولیه رسید.

تعیین وزن مولکولی: نمونه‌ها با استفاده از ژل پلی‌آکریـل‌آمیـد ۱۲٪ به همراه یک مارکر پروتئینـی بـا جریـانی بـین ۲۵-۲۲ میلی‌آمپر Run شـد. رنـگ‌آمیـزی ژل توسـط کوماسـی بلـو و شستشوی آن توسط الکل ۶۰ درصد انجام گرفت.

بررسی ساختار دوم پروتئین: نمونه‌هـای قبـل از Refolding و بعـد از Refolding داخـل لولـه‌هـای میکروکـون (بـا Cutoff ۱۰کیلودالتون) قرار داده شد و به مـدت ۱۰ تـا ۱۵ دقیقـه بـا دور۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند. محلول منتقـل شـده بـه تیـوب پائین خالی شد و روی نمونه‌هـا ۳۰۰ میکرولیتـر آب دیـونیزه ریخته شد و مجددا با همان شرایط سـانتریفوژ گردیـد. تیـوب حاوی فیلتـر بطـور واژگـون روی تیـوب دوم قـرار داده شـد و دوباره با همان شرایط سانتریفوژ انجام شـد و تمـام محتویـات داخل تیوب فیلتردار به تیوب دوم منتقل گردید به این طریـق یک تعویض بافر در پروتئینهای مورد آزمایش انجام شد.

غلظـت هـر دو پـروتئین (قبـل از Refohding و بعـد از Refohding) با روش بردفورد اندازه‌گیری شد و با دستگاه CD ساختاردوم این دو پروتئین مورد بررسی قرارگرفـت. محاسـبه میزان ساختار دوم توسط Jang deta basse انجام شد.

بررسی واکنش ایمنی پروتئین:

الایـزا: پـروتئین gp41-p24 بـه غلظـت ۱۰µg /ml بـه مقدار۱۰۰میکرولیتر، کف پلیتهای الایزا کت شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز قرارداده شـد. بعـد از خـالی کـردن محتویـات داخـل چاهکهـا و شستـشو بـا Washing buffer (۳بار) مقدار ۱۰۰میکرولیتر بـافر بلاکینـگ در هر چاهک ریخته شد و در ۴درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز قرارداده شد. محتویات داخل چاهکها خالی گردیـد و بعد از شستشو (۳الی ۴بار) با Washing buffer بـه مـدت ۱۰ دقیقه دردمای ۳۷درجـه سـانتی‌گـراد قـرار داده شـد. داخـل چاهکهای میکروپلیت، سرم کنتـرل مثبـت (مربـوط بـه کیـت تشخیصی HIV که با sample dilution مربـوط بـه کیـت بـه مقدار ۱ به ۱۰۰رقیـق شـده بـود) بـه میـزان ۱۰۰میکرولیتـر ریخته شد. چندین اسـتاندارد بـا غلظتهـای مختلـف در کنـار استریپهای پروتئین مورد نظر طراحـی شـد کـه یکـی از آنهـا مربوط به پروتئین استاندارد کیت تشخیصی HIV بـود سـپس به مدت ۱ساعت در ۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد قـرار داده شـد و 1.5ml از آنتی‌بادی کونژوگه رقیق شده بـا کونژوگـه dilution (رقت ۱ به ۱۰۰۰) به مقدار۱۰۰ میکرولیتردرداخل هرچاهک

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]

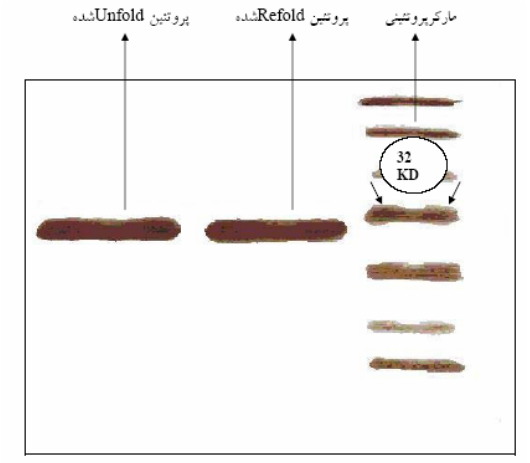
ریخته شد و به مدت یک ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد و بعد از ۴ بار شستشو با Washing buffer به هر کدام از چاهکها ۱۰۰میکرولیتر سوبسترا کروموژن (TMB) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه درجای تاریک قرار داده شد و توسط اسید سولفوریک ۲ نرمال واکنش متوقف گردید و با دستگاه ELISA Reader با طول موج ۴۵۰ نانومتر میزان جذب نوری (OD) ثبت شد.

وسترن بلات: پروتئین gp41-p24 ریفولد شده و پروتئین استاندار gp41-p24 مربوط به کیت HIV به ترتیب به عنوان نمونه وکنترل مثبت توسط الکتروفرز با ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲٪ Run شد. ژل به همراه مقداری کاغذ نیتروسلولزی و فیلتر در داخل محلول ترانسفر به مدت ۱۵دقیقه قرار داده شد. با استفاده از روش وسترن بلات نیمه خشک و با جریان ۱۲ میلی آمپر نمونه‌ها از روی ژل به کاغذ نیتروسلولزی انتقال داده شد. با قرار دادن ژل داخل رنگ کوماسی بلو میزان انتقال نمونه‌ها به غشاء نیتروسلولزی مشخص شد. بعد از رنگ‌آمیزی غشاء نیتروسلولز با محلول پانسوS باندهای مربوط به انتقال پروتئین از روی ژل به کاغذ مشخص گردید بعد از شستشوی محلول پانسو S ازروی کاغذ، غشاء نیتروسلولز داخل بافر بلاکینگ (Skim milk) دردمای ۴درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز قرار داده شد. بعد از خارج کردن غشاء نیتروسلولز از بافر بلاکینگ و شستشو با Washing buffer (۲بار) سرم کنترل مثبت مربوط به کیت HIV (به مقداری که سطح روی کاغذ را بپوشاند) ریخته شد و به مدت ۱تا ۲ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آرامی shake شد. بعد از ۴بار شستشو آنتی‌بادی دوم کونژوگه اضافه شد و به مدت ۱تا ۲ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آرامی shake شد. بعد از اضافه کردن سوبسترا کروموژن (DAB) به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی باندها روی کاغذ نیتروسلولزی آشکار گردید.

داده‌های مربوط به الایزا با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey مورد تحلیل قرار گرفتند. ملاک معنی‌دار بودن تفاوتهای مشاهده شده از نظر آماری با $p<0/05$ درنظر گرفته شد.

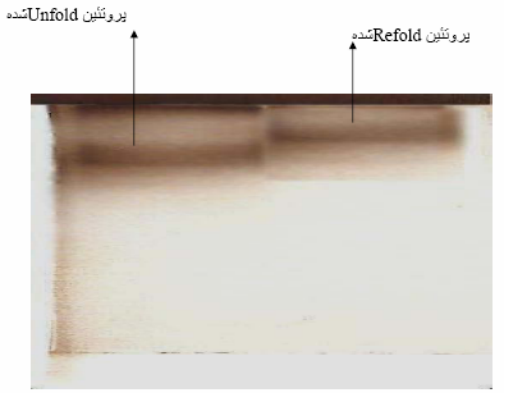
یافته‌ها

با بررسیهای انجام شده مشخص شد که غلظت پروتئین unfold ۳/۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بوده ودر پروتئین Refold شده بعد از مراحل رقیق‌سازی و تغیرات بافری این غلظت توسط روش تغلیظ پروتئین با سنتری پرب مجددا به همان غلظت اولیه برگشته است. همچنین مشخص شد که وزن مولکولی پروتئین مورد نظر ۳۲کیلودالتون بوده ودارای خلوص می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- وزن مولکولی پروتئین Refold و Unfold شده روی ژل الکتروفورز در مقایسه با یک مارکر پروتئینی. وزن مولکولی این دو پروتئین ۳۲کیلودالتون می‌باشد و دارای خلوص می‌باشند

با بررسیهای انجام شده توسط ژل Native مشخص شد که Refolding پروتئین مورد نظر به خوبی انجام گرفته است (شکل۲).

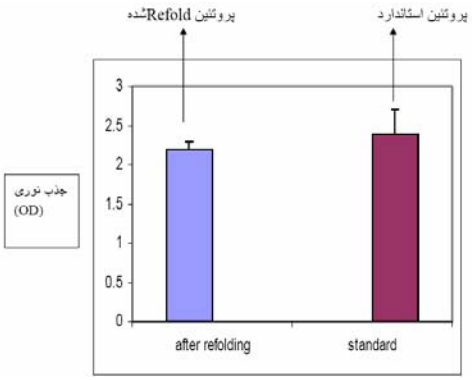


شکل ۲- موقعیت قرارگیری پروتئین Unfold و Refold شده روی ژلNative. پروتئین Refold شده در مقایسه با Unfold شده در موقعیت بالاتری قرار دارد

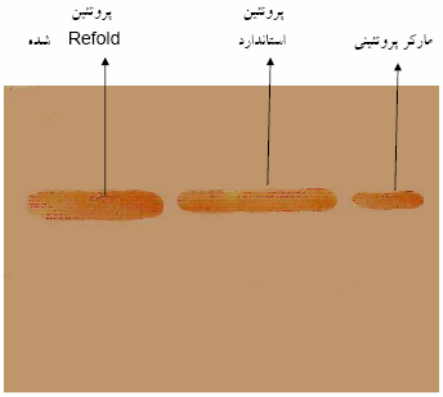
همچنین در بررسیهایی که روی ساختار دوم پروتئینها انجام گرفت مشخص شد که در پروتئینهای Refoldشده میزان ساختارهای Helix و Beta درمقایسه با پروتئین Unfold شده به مراتب افزایش یافته و میزان ساختارهای Random در آنها به مراتب کاهش یافته است. با بررسیهای انجام شده توسط تست الایزا مشخص شد که پروتئین Refold شده در مقایسه

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]

با استاندارد قابلیت واکنش ایمنی با آنتی‌بادیهای موجود در سرم بیماران کنترل مثبت HIV را دارد (نمودار ۱). نتایج به دست آمده از وسترن بلات نیز این مطلب را تائید می‌کند (شکل ۳).



نمودار ۱- میانگین و انحراف معیار ایمونوژن بودن پروتئین نوترکیب gp41-p24 ریفولد شده درمقایسه با استاندارد (پروتئین gp41-p24 نوترکیب موجود درکیتهای تشخیصی HIV)



شکل ۳- موقعیت قرارگیری پروتئین Refold شده در مقایسه با پروتئین استاندارد و مارکرپروتئینی روی غشاء نیتروسلولزدرپاسخ به آنتی‌بادیهای موجود درسرم بیماران کنترل مثبت HIV

بحث

در این تحقیق، بررسی ارزیابی ساختارایمونوژنیسیته پروتئین نوترکیب gp41-p24 به دست آمده از سکانسهای ایمونوژنیک ویروس HIV انجام شد. مطالعات دیگر در مورد سایر سکانسهای پروتئینی gp41 و p24 است (۱،۲). مطالعات انجام شده سایر محققین بر روی پروتئینهای نوترکیبی چون gp41-HA (۲)، Gcn4-gp41 (۴)، p24-Hsp71(۳) و rHsv-gp120 (۱۱) گزارش شده است. همچنین تعیین غلظت پروتئین با دستگاه اسپکتروفوتومتری با روش بردفورد در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است. درحالیکه در سایر تحقیقات این ارزیابی توسط روشهای چون لوری و جذب در ۲۸۰ نانومتر (UV) انجام گرفته است (۴،۲). همچنین بررسی وزن مولکولی و خلوص پروتئین با استفاده از الکتروفورز در این مطالعه و در تحقیقات دیگر مشابه یکدیگر گزارش شده است (۳،۴). بررسیهای انجام شده در مورد روش Refolding در این پروتئین دقیقا مشابه با روشها و نتایجی است که در تحقیقات مختلف بر روی پروتئینهایی چون انسولین (۵)، Gcn4-gp41 و سایر پروتئینها انجام شده است (۶،۵).

نتایج بدست آمده از ساختار دوم این پروتئین و سایر پروتئینهای نوترکیب توسط دستگاه CD و ارزیابی ساختارهای چون مارپیچ آلفا، صفحه بتا و پیچهای Random در تحقیقات دیگر گزارش نشده است. همچنین بررسی عملکرد ایمونوژنیسیته این پروتئین و نتایج حاصل از فعالیت ایمنی آن در شرایط In vitro با روشهای الایزا و وسترن بلات مشابه تحقیقات انجام شده بر روی سایر پروتئینهای نوترکیب می‌باشد (۹-۷)، با این تفاوت که بررسی عملکرد ایمونوژنیسیته این پروتئین نوترکیب در هیچ تحقیقی گزارش نشده است.

باتوجه به عملکرد ایمنی این پروتئین می‌توان در تحقیقات آینده از این پروتئین به عنوان یک ایمونوژن در ایمونیزاسیون و تحریک سیستم ایمنی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از همکاران بخش بیوتکنولوژی، آنفولانزا، اپیدمیولوژی، ایمونولوژی و مدیریت حقوقی انیستیتو پاستور تهران و بخش بیوتکنولوژی انیستیتو پاستورکرج ودانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران و علوم تحقیقات تهران.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]

REFERENCES

1. Feredon M, Nickolaeva A, Alexander C, Ahmade A, Samade A, Farzaneh B, et al. Serological screening assay of human immunodeficiency virus typ1 antibodies based on recombinant protein p24-gp41 as a fusion protein expressed in Escherichia coli. Biotechnohogy 2006;19:4281-89.
2. Nicholas J, Pamela A, Danil W, Winfried W, Marian R, et al. Immunization of mice with recombinant gp41 in a systemic prime/mucosal boost protocol induces HIV-1 specific serum IgG and secretory IgA antibodies. Vaccine 2001;19:3990-4001.
3. Ivan S, Robert D, Damian F, Stephen J. Vaccines and vaccine strategies against HIV. Current Drug Targets 2004;5:71-88.
4. Winfried W, Lesley J, Andrea D, Tom L, John J. Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 ectodomain expressed in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:6065-69.
5. Taegeum K, Natasha B, William H. Co-immunization with an HIV-1 Tat transduction peptide-rotavirus enterotoxin fusion protein stimulates aTh1 mucosal immune response in mice. Vaccine 2004;22:431-38.
6. Yingying L, Shibo J, Jinyue H, Wanghua G, Shabo S, Nancy M. N36 a synthetic N-terminal heptad repeat domain of the HIV-1envelope protein gp41,is an activator of human phagocytes. Clin Immunol 2002;96:236-42.
7. Hagan D, Gozzoli M, Barackman J, Singh M, Kazzaz J, Higgins K, et al. Microparticles in MF59, apotent adjuvant combination for arecombinant protein vaccine against HIV-1.Vaccine 2000;18:1793-801.
8. Lawrence D, Anthony D, Huacheng W, Heather S, Leslie J, Boux L, Mizzen A, et al. Priming of CD8+ CTL effector cells in mice by immunization with a stress protein-influenza virus nucleoprotein fusion molecule. Vaccine 1999;17:373-83.
9. Huiyan C, Richard R, Michael K, Michael P, Xia J, et al. Establishment of an alternative intracellular cytokine staining assay for HIV/AIDS clinical studies. Virological Methods 2005;123:131-40.
10. Geoffrey J, Lawrence C, Gira B, Mahendra M, Rayhahn H, Thomas J, Matthew S, et al. HIV-1MN recombinant glycoprotein 160 vaccine-induced cellular and humoral immunity boosted by HIV-1MN recombinant glycoprotein 120 vaccine. AIDS Research and Human Retroviruses 1999;15:115-32.
11. Patricia L, Linda S, David C, Miroslawa B, Ruth W, Phillip D, et al. Comparison vaccine strategies using recombinant env-gag-pol MVA with or without an oligomeric Env protein boost in the SHIV rhesus macaque model. Virology 2002;294:270-81.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]