Original Article

# Recombinant Expression of Domain III of Dengue Virus Envelope Protein (Serotype-1)

*Fahimi H., Sadeghizadeh M.*, Heidari S., Mohammadipoor M.*

** Corresponding address: Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, E-mail: sadeghma@modares.ac.ir*

**Received: May 2012** **Accepted: Jul 2012**

***Abstract***

**Aim:** The aim of this study is to produce a recombinant antigen from the envelope protein of dengue virus serotype 1, as a dengue vaccine candidate. Therefore, we intend to study expression efficiency of domain III in a bacterial host.

**Materials and Methods:** We used the following software: Megalign (sequence alignment); Modeller (protein structure prediction), and Optimizer (coding gene sequence optimization). The optimum coding sequence was synthesized and cloned in a pET21 expression vector. Stable protein expression and optimization of antigen production was performed in an Origami strain of *E. coli*.

**Results:** A consensus sequence for the domain III of dengue virus serotype 1 was produced by multiple alignment of sequences and named EDIII1. Next, we predicted EDIII1 properties by using bioinformatic software. To achieve a high expression level in the bacterial host, the coding sequence of this protein was optimized for appropriate CAI and GC content. The optimized gene was synthesized and cloned at the *Nde*I and *Xho*I sites of the pET21 expression vector in an *E. coli* DH5α strain. In order to have efficient protein expression and the formation of disulfide bounds, we optimized expression of EDIII1 in the Origami strain. Protein purification, using His-tag affinity chromatography columns was performed and the results identified by Western blot analysis.

**Conclusion:** The results of this study showed the efficiency of a bacterial system to highly express domain III of the dengue virus envelope protein.

**Keywords:** Dengue virus, Envelope protein, Vaccine

*Copyright © 2012, Police Force Medicine, All rights reserved.*



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-11-01 ]

[ DOR: 20.1001.1.22286241.1391.1.1.7.4 ]

[ DOI: 10.30505/1.1.57 ]

مقاله تحقیقی

# بیان دومین III پروتئین پوششی ویروس تب دانگ (سروتیپ ۱) به‌صورت نوترکیب

**حسین فهیمی[۱]، مجید صادقی‌زاده[۲*]، سیامک حیدری[۳]، مهشید محمدی‌پور[۱]**

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. استاد گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

**تاریخ دریافت: خرداد ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۹۰**

## چکیده

**هدف:** هدف این مطالعه ایجاد آنتی‌ژن نوترکیبی از پروتئین پوششی سروتیپ ۱ ویروس، به‌منظور دستیابی به کاندیدای واکسن دانگ است. بنابراین قابلیت تولید دومین III این پروتئین در باکتری بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** به منظور دستیابی به یک توالی مورد توافق، هم‌ردیفی توالی‌های مختلف مربوط به دومین III با نرم‌افزار Megalign انجام شد. برای پیش‌بینی ساختار پروتئین از نرم‌افزار Modeller و برای بهینه‌سازی توالی ژن برای بیان در *E. coli* از نرم‌افزار Optimizer استفاده شد. پس از سنتز و کلونینگ ژن در وکتور بیانی pET21، انتقال وکتور و بهینه‌سازی بیان پروتئین در سویه بیانی *E. coli* انجام شد. برای تأیید بیان پروتئین نوترکیب از روش‌های استاندارد الکتروفورز پروتئین‌ها و لکه‌گذاری وسترن استفاده شد.

**یافته‌ها:** یک توالی مورد توافق برای دومین III پروتئین پوششی سروتیپ ۱ ویروس دانگ با استفاده از روش هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های مختلف به دست آمد که تحت عنوان EDIII1 نامیده شد. پیش‌بینی ویژگی‌های پروتئین هدف با روش‌های بیوانفورماتیک انجام شد. به منظور بیان حداکثری پروتئین نوترکیب در باکتری، توالی ژن از لحاظ الگوی کدونی و درصد GC بهینه‌سازی شد. همسانه‌سازی ژن هدف پس از سنتز، در وکتور بیانی pET21 در جایگاه‌های *Nde*I و *Xho*I انجام شد. به منظور ایجاد پیوند دی‌سولفیدی در ساختار پروتئین، بهینه‌سازی بیان EDIII1 در میزبان بیانی Origami انجام شد. در نهایت پس از خالص‌سازی پروتئین هدف با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی، برای شناسایی آن از آزمون لکه‌گذاری وسترن استفاده شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه کارایی سیستم بیانی باکتریایی را در بیان دومین III پروتئین پوششی ویروس دانگ نشان داد.

**کلید واژه‌ها:** ویروس دانگ، پروتئین پوششی، واکسن

## مقدمه

ویروس دانگ متعلق به جنس فلاوی‌ویروس‌ها و از خانواده فلاوی‌ویریده و از ویروس‌های منتقل شونده توسط پشه است. این ویروس که از راه گزیده شدن انسان توسط پشه منتقل می‌شود، عامل بیماری شدید و بسیار گسترده در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است. ویروس دانگ دارای چهار سروتیپ مشخص به لحاظ ژنوتیپی است که با ورود به بدن انسان موجب بیماری می‌شوند. نشانه‌های بیماری دانگ از یک تب خفیف تا حالات بسیار شدید و کشنده تب خونریزی دهنده و سندرم شوک دانگ متفاوت است. سالیانه ۵۰ تا ۱۰۰ میلیون مورد تب دانگ و ۲۵۰ هزار تا ۵۰۰ هزار مورد تب خونریزی دهنده دانگ رخ می‌دهد. میزان کشندگی در کشورهای مختلف متفاوت است؛ چنانچه در برخی مناطق ۱۰ تا ۱۵٪ و در برخی دیگر کمتر از ۱٪ است. در حال حاضر دارو یا واکسن مؤثری علیه این ویروس وجود ندارد. ولی در عین حال تلاش‌های بسیار گسترده‌ای در زمینه درک دقیق مکانیسم بیماری‌زایی و نیز طراحی واکسن‌های مؤثر در حال انجام است [۱].

* **آدرس مکاتبه:** گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
**E-mail**:sadeghma@modares.ac.ir



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286241.1391.1.1.7.4 ]
[ DOI: 10.30505/1.1.57 ]

ژنوم این ویروس از یک RNA با مفهوم مثبت تشکیل شده است که به صورت یک ORF (Open reading frame) ترجمه شده و پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری ویروس را کد می‌کند. مهمترین پروتئین ساختاری پروتئین پوششی (پروتئین E) است که امروزه به عنوان گزینه اصلی در استراتژی‌های طراحی واکسن مورد توجه قرار گرفته است [۲].

پروتئین E با وزن مولکولی حدود ۵۳ کیلو دالتون و حدود ۴۹۵ آمینواسید، پروتئین اصلی موجود در سطح ویروس است که وظیفه اتصال ویروس به گیرنده و الحاق به غشا را میانجی‌گری می‌کند. پروتئین E از سه دومین تشکیل شده است؛ دومین I (دومین C)، دومین II (دومین A) و دومین III (دومین B). دومین III که فولدینگ شبیه ایمونوگلوبولین دارد؛ شامل آمینواسیدهای ۳۰۰ تا ۴۰۰ است. دومین III در ایجاد تغییر شکل فضایی لازم برای الحاق غشاها بعد از اتصال ویروس نقش ایفا می‌کند و آنتی‌بادی‌های خنثی کننده این دومین می‌توانند مرحله ورود ویروس را خنثی کنند [۳]. بنابراین دومین III در اتصال به گیرنده دخالت داشته و هدف اصلی آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده است. به دلیل وجود پیوندهای دی‌سولفیدی، پیش‌بینی می‌شود دومین III دارای اپی‌توپ‌هایی باشد که به ایجاد باند دی‌سولفیدی وابسته‌اند. اهمیت باندهای دی‌سولفید در شکل فضایی پروتئین E و خنثی‌سازی ویروس با واسطه آنتی‌بادی از مطالعاتی حاصل شد که نشان می‌داد پروتئین E احیا شده و نیز پپتیدهای سنتتیک قادر به القای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در موش نیستند [۴]. علاوه بر این؛ مشخص شده که آنتی‌بادی‌های منوکلونال ویژه دومین III قوی‌ترین بلوکه‌کننده جذب سطحی ویروس به سلول‌ها است [۵]. دومین III تاخوردگی مستقلی را در ساختار پروتئین E نشان می‌دهد؛ بنابراین می‌توان این دومین را به صورت یک قطعه مستقل در سیستم بیانی مناسب تولید کرد [۶].

روش‌های مختلفی به منظور ساخت واکسن علیه ویروس تب دانگ وجود دارد که از آن جمله می‌توان به ایجاد ویروس تخفیف حدت یافته (با روش‌های کشت سلولی، جهش ژنتیکی یا تیمار شیمیایی)، ایجاد ویروس نوترکیب با استفاده از یک سویه واکسن ویروسی مانند YF17D، ایجاد واکسن‌های زیرواحدی با استفاده از پروتئین‌های ساختاری یا استفاده از حامل‌های پلاسمیدی حاوی این ژن‌ها به‌عنوان واکسن ژنتیکی اشاره کرد. هر کدام از روش‌های طراحی واکسن دانگ مزایا و معایبی دارد. مهمترین مشکل واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته ایجاد پاسخ ایمنی نامتوازن، برگشت‌پذیری به حالت وحشی و خطر تداخل ویروسی است. از طرف دیگر؛ واکسن‌های مبتنی بر پروتئین و DNA نوترکیب خطرات بیولوژیکی موجود در واکسن‌های ویروسی زنده تخفیف حدت یافته یا غیرفعال شده را ندارد. علاوه بر این؛ تولید واکسن‌های پروتئینی زیرواحدی و افزایش مقیاس تولید آن‌ها راحت‌تر است که باعث مقرون به صرفه بودن این روش نسبت به روش‌های قبلی می‌شود [۱]. بنابراین در این مطالعه کارایی سیستم باکتریایی در بیان قطعه اصلی پروتئین پوششی سروتیپ ۱ ویروس دانگ، بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

### ایجاد و بهینه‌سازی توالی آمینواسیدی و توالی ژن کدکننده دومین III پروتئین E

برای انجام هم‌ردیفی چندگانه و به دست آوردن توالی مورد توافق، از نرم‌افزار معمول Megalign با روش Clustal W استفاده شد. به منظور اطمینان از ماهیت توالی حاصل شده آنالیز BlastP انجام شد. برای پیش‌بینی ساختار پروتئین هدف از روش homology modeling و نرم‌افزار پیش‌بینی کننده Modeller استفاده شد. مدل‌های ساخته شده با استفاده از نرم‌افزارهای Pymol و Swiss-Pdb Viewer بررسی شد. به‌منظور بهینه‌سازی توالی ژن کدکننده پروتئین از نرم‌افزار آنلاین Optimizer (http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/) استفاده شد.

### تهیه توالی ژنی و همسانه‌سازی در حامل

ژن هدف توسط شرکت ژن فن‌آوران ساخته شد. توالی ژنی حاصل در حامل بیانی pET21 و در جایگاه‌های *Nde*I و *Xho*I همسانه‌سازی شد. درستی توالی ژن کلون شده با روش توالی‌یابی تأیید شد. سپس با انجام هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده و طبق روش استاندارد هضم آنزیمی شرکت Fermentase، درستی کلونینگ در جایگاه‌های NdeI و XhoI تأیید شد. در همه مراحل کشت باکتری‌ها از محیط کشت LB استفاده شد. در مواردی که نیاز به آنتی‌بیوتیک بود، آنتی‌بیوتیک مورد نظر پس از سترون کردن با فیلترهای Millipore (۰/۲ میکرون)، به محیط اضافه شد.

### آماده‌سازی باکتری *E.coli* و ترانسفورماسیون حامل پلاسمیدی

برای تکثیر و نگهداری پلاسمیدها از باکتری *E.coli* سویه DH5α



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286241.1391.1.1.7.4 ]
[ DOI: 10.30505/1.1.57 ]

استفاده شد. از یک کلونی در کشت جامد *E.coli* در محیط LB مایع کشت شبانه تهیه شد. سپس یک کشت جدید با دانسیته نوری حدود ۰/۵ آماده شد. پس از دو مرحله شستشو با $CaCl_2$ و تیمار سرمایی، به مخلوط باکتریایی یک میکرولیتر از پلاسمید آماده شده اضافه شد. پس از نیم ساعت تیمار سرمایی، شوک حرارتی به مدت یک دقیقه در دمای ۴۱ ºC اعمال شد. سپس حدود ۰/۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع به مخلوط باکتری اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ ºC و دور ۲۰۰ rpm قرار داده شد. سپس به منظور انتخاب باکتری‌های ترانسفورم شده، تعلیق باکتریایی حاصل روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی بیوتیک کشت داده شد. کلونی‌های حاصل، برای بررسی حضور پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر، با روش هضم آنزیمی بررسی شدند.

## استخراج پلاسمید

یک کلونی از باکتری *E. coli* حاوی پلاسمید در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کشت شبانه داده شد. پلاسمید pET21 حاوی ژن عامل مقاومت به آمپی‌سیلین است، بنابراین به محیط مذکور آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ µg/ml اضافه شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج شرکت Bioneer به روش Miniprep انجام شد. سپس نمونه پلاسمید در دمای ۲۰ ºC- نگهداری شد.

## هضم آنزیمی پلاسمید و الکتروفورز DNA

با توجه به اینکه همسانه‌سازی در جایگاه‌های *Nde*I و *Xho*I انجام شده است، بنابراین برای تأیید کار از روش هضم آنزیمی حامل با همان آنزیم‌های محدودکننده استفاده شد. شرایط هضم طبق دستور کاتالوگ آنزیم‌ها (محصول شرکت Fermentase) و در دمای ۳۷ ºC به مدت یک ساعت بود. به منظور تأیید قطعات مورد انتظار در اثر هضم آنزیمی پلاسمید، مخلوط واکنش هضم، الکتروفورز شد. برای انجام الکتروفورز از ژل آگارز ۱٪ در بافر TAE (Tris base, acetic acid and EDTA buffer) استفاده شد. محلول واکنش هضم به چاهک‌ها منتقل شده و برای بررسی قطعات از نشانگر وزن مولکولی (1kb ladder) محصول شرکت Fermentase استفاده شد.

## بیان آنتی‌ژن‌های نوترکیب

به منظور بیان پروتئین هدف از میزبان بیانی *E.coli* سویه Origami (DE3) استفاده شد. پلاسمید بیانی ساخته شده به درون سویه Origami ترانسفورم شد. این سویه دارای ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و کانامایسین است که طبق دستور کاتالوگ سیستم pET (محصول شرکت Novagen)، باکتری در محیط کشت حاوی این آنتی‌بیوتیک‌ها با غلظت‌های ۱۲/۵ µg/ml و ۱۵ µg/ml کشت داده شد. برای انتخاب باکتری‌های ترانسفورم شده از محیط کشت حاوی ۳ نوع آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، کانامایسین و تتراسایکلین استفاده شد. پس از ایجاد کلونی، از این کلونی‌ها با هدف آماده‌سازی باکتری، کشت شبانه تهیه شد. سپس از سوسپانسون حاصل به‌مقدار ۱٪ حجم محیط کشت هدف، باکتری به محیط جدید بدون آنتی‌بیوتیک تلقیح شد. پس از رسیدن OD رشد باکتری به حدود ۰/۵ تا ۰/۶ عمل القا توسط IPTG (با غلظت نهایی یک میلی‌مولار) انجام شد. باکتری‌های به دست آمده پس از گذشت زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت از طریق سانتریفیوژ جمع‌آوری و در دمای C ۷۰° - نگهداری شدند. سپس به منظور بررسی بیان آنتی‌ژن‌های نوترکیب از روش استاندارد SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) پروتئین‌های باکتریایی استفاده شد. در این مرحله نمونه‌های سوسپانسیون باکتری بیانی با حجم یک میلی‌لیتر و با سانتریفوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه جدا و پس از لیز شدن از طریق جوشاندن به مدت پنج دقیقه و ۱۰ ثانیه ورتکس، در ژل SDS-PAGE بررسی شدند.

## تخلیص پروتئین EDIII1 و آزمایش لکه‌گذاری وسترن

با توجه به وجود توالی بر چسب پلی‌هیستیدینی در انتهای کربوکسیلی پروتئین هدف، از کیت حاوی ستون‌های Ni-NTA محصول شرکت Qiagen برای تخلیص پروتئین طبق دستور کارخانه سازنده، استفاده شد. آزمون لکه‌گذاری وسترن طبق روش استاندارد شرکت تولیدکننده آنتی‌بادی (شرکت abCam) انجام شد. به‌طور خلاصه پس از انجام الکتروفورز پروتئین، عمل انتقال پروتئین به غشای نیتروسلولزی با روش نیمه‌خشک انجام شد. غشا به مدت یک شب در محلول مسدودسازی (شامل پنج درصد شیر خشک بدون چربی در بافر



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286241.1391.1.1.7.4 ]
[ DOI: 10.30505/1.1.57 ]

PBS (Phosphate buffered saline) در دمای ۴°C قرار گرفت. پس از سه بار شستشو با محلول PBS، غشا به مدت دو ساعت در محلول آنتی‌بادی اولیه (شناسایی کننده برچسب هیستیدینی، محصول شرکت abCam و با غلظت ۱ به ۱۰۰۰ در PBS) همراه با تکان دادن آرام در دمای محیط قرار گرفت. پس از سه بار شستشو با محلول PBS حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰، غشا به مدت دو ساعت در محلول آنتی‌بادی ثانویه (کونژوگه با آنزیم پراکسیداز محصول شرکت abCam و با غلظت ۱ به ۲۰۰۰ در PBS) با شرایط مرحله قبل قرار گرفت. پس شستشو و به منظور ظهور باند مورد نظر، غشای نیتروسلولزی در محلول سوبسترا (شامل ۰/۵ میلی‌گرم دی‌آمینوبنزیدین محصول سیگما و آب اکسیژنه ۰/۱ درصد در PBS) قرار گرفت.

## یافته‌ها

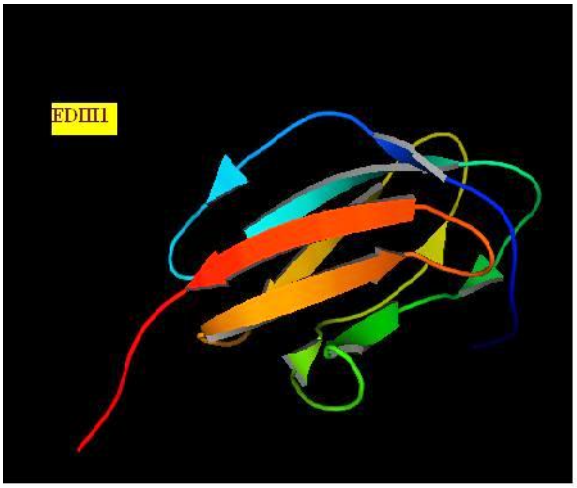
### ایجاد توالی مورد توافق برای دومین III پروتئین E و بررسی نرم‌افزاری آن

در این مرحله توالی پروتئین E مربوط به سروتیپ ۱ از بانک ژن NCBI جستجو شد. با توجه به اینکه در مورد اغلب ژن‌ها یک حالت تکراری بودن در مورد اطلاعات موجود در بانک ژنی وجود دارد، بنابراین توالی‌های اخذ شده بررسی شد و پس از مطالعه اطلاعات ثبت شده، توالی‌های مشابه، اضافی و توالی‌های سنتتیک یا مهندسی شده حذف شد. در نهایت تعداد ۴۸ توالی برای سروتیپ ۱ انتخاب شد. در انتخاب توالی‌ها سعی شد تا حد امکان بالاترین تنوع لحاظ شود؛ به این ترتیب که توالی‌هایی از مناطق جغرافیایی مختلف انتخاب شد. توالی آمینواسیدی مربوط به دومین III (آمینواسید ۳۰۰ الی ۴۰۰) از توالی کامل پروتئین E جدا شد. برای انجام هم‌ردیفی چندگانه و به دست آوردن توالی مورد توافق، از نرم‌افزار Megalign و روش Clustal W استفاده شد. در نهایت یک توالی مورد توافق برای دومین III سروتیپ ۱ تعیین شد که تحت عنوان EDIII1 نامیده می‌شود. حفظ شدگی ۱۰۰٪ دو ریشه سیستئین در موقعیت ۸ و ۳۹ دیده می‌شود (شکل ۱).

EDIII1:
KGMSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSTQDE
KGVTQNGRLITANPIVTDKEKPVNIEAEPPFGESYIVVGAGEKALKLSWF
KKGSS

**شکل ۱.** توالی آمینواسیدی به دست آمده به عنوان EDIII1.

برای پیش‌بینی ساختار سوم از روش homology modeling و نرم‌افزار پیش‌بینی کننده Modeller استفاده شد. مدل‌های ساخته شده با استفاده از نرم‌افزارهای Pymol و Swiss-Pdb Viewer بررسی شد تا ساختار نهایی پروتئین تعیین شود. ایجاد چندین صفحه بتا که ویژگی مشخص دومین III پروتئین E است در اغلب این پیش‌بینی‌ها تأیید شد. نتایج این پیش‌بینی‌ها در توافق با ساختار دوم و سوم دومین III پروتئین پوششی ویروس دانگ است [۷] (شکل ۲).




**شکل ۲.** نتایج حاصل از پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین EDIII1 توسط نرم‌افزار Pymol و Spdbv بررسی شد.

از جمله عوامل مهم در بالا بردن میزان بیان ژن‌های بیگانه در میزبان‌های بیانی، بهینه‌سازی توالی ژن هدف برای بیان در میزبان انتخابی است. دو شاخص عمده که در این زمینه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، الگوی به‌کارگیری کدون و درصد بازهای GC است. هر چه کدون‌های استفاده شده به الگوی ترجیح کدونی میزبان نزدیکتر باشد، میزان بیان پروتئین نوترکیب بیشتر خواهد شد. برای بهینه‌سازی کدون از شاخصی به نام CAI ( codon adaptation index) استفاده می‌شود. علاوه بر این درصد GC به‌کار رفته در ژن هدف نیز بر میزان بیان پروتئین تأثیر دارد. حالت بهینه این است که درصد GC ژن هدف به درصد GC ژنوم میزبان نزدیکتر باشد. به منظور بهینه‌سازی این شاخص‌ها از نرم‌افزار آنلاین Optimizer استفاده شد [۸]. شاخص‌های CAI و درصد GC در مورد ژن کد کننده پروتئین EDIII1 به ترتیب به صورت ۱/۰۰ و ۵۰/۴٪ بهینه شد.

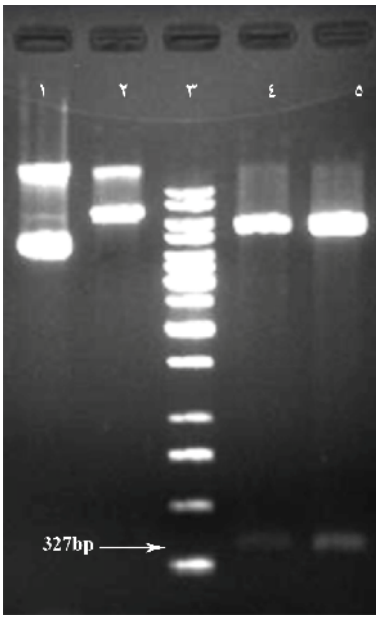
### سنتز و کلون‌سازی ژن کدکننده پروتئین هدف

سنتز توالی ژن EDIII1در حامل بیانی pET21a انجام شد. حامل



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286241.1391.1.1.7.4 ]
[ DOI: 10.30505/1.1.57 ]

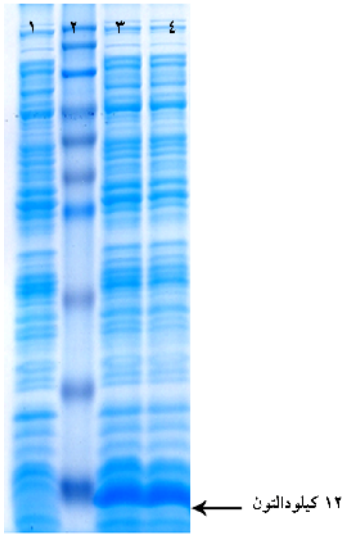
ساخته شده از دو نظر بررسی شد؛ ابتدا درستی توالی ژنی کلون شده تأیید شد (توالی ژنی نشان داده نشده است) و سپس با انجام هضم آنزیمی درستی کلونینگ در جایگاه‌های *Nde*I و *Xho*I تأیید شد (شکل ۳). به منظور تسهیل در شناسایی و تخلیص آنتی‌ژن نوترکیب، کلون‌سازی ژن در وکتور بیانی به نحوی صورت گرفت که یک توالی 6His-tag در انتهای کربوکسیلی پروتئین وجود داشته باشد.




**شکل ۳.** نتیجه هضم آنزیمی پلاسمید pET21EDIII1. چاهک ۱: نمونه پلاسمید هضم نشده، چاهک ۲: پلاسمید هضم شده (با آنزیم *Xho*I)، چاهک ۴ و ۵: پلاسمید هضم شده با دو آنزیم *Xho*I و *Nde*I که خروج قطعات ژنی مربوط مشخص شده است، چاهک ۳: نشانگر وزن مولکولی از نوع ۱ کیلو بایت است.

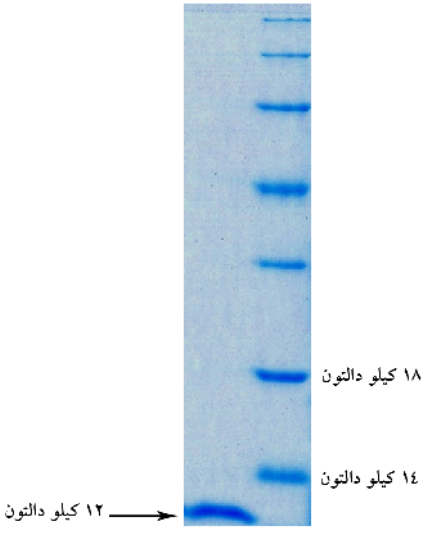
## بیان آنتی‌ژن‌های نوترکیب

به منظور دستیابی به بیان بالا و محلول پروتئین هدف از میزبان بیانی باکتری *E. coli* سویه Origami (DE3) استفاده شد. پلاسمید pET21EDIII1با استفاده از روش اشاره شده به درون سویه بیانی ترانسفورم شد. پس از ایجاد تک کلونی و تهیه محیط کشت بیانی، عمل القا توسط IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) صورت گرفت. پس از بررسی شرایط مختلف بیان، از لحاظ بهترین دانسیته نوری (OD رشد) جهت القا، زمان لازم برای بیان و نیز آزمون چندین کلونی مختلف، در نهایت بیان آنتی‌ژن هدف بهینه‌سازی شد. شرایط دمایی ۳۷°C، زمان بیان ۴ ساعت و القا در دانسیته نوری ۰/۶ ($OD_{600\ nm}$=0.6) بهترین نتیجه را در پی داشت. طبق آنالیزهای نرم‌افزاری وزن این پروتئین حدود ۱۲ کیلو دالتون تعیین شده است که در ژل الکتروفورز اندکی پایین‌تر از نشانگر وزن مولکولی ۱۴ کیلو دالتون قرار می‌گیرد (شکل ۴).




**شکل ۴.** الکتروفورز پروتئین‌های کل باکتری. ستون ۱: پروتئین حاصل از لیز سوسپانسیون باکتری قبل از القا، ستون‌های ۳ و ۴: نمونه کشت دو کلونی پس از القا با IPTG، ستون ۲: نشانگر وزن مولکولی (از بالا به پایین به ترتیب ۱۷۵، ۱۳۰، ۹۵، ۷۰، ۶۲، ۵۱، ۴۲، ۲۹، ۲۲ و ۱۴کیلو دالتون)

با توجه به وجود توالی بر چسب پلی هیستیدینی در انتهای کربوکسیلی پروتئین هدف، از کیت حاوی ستون‌های Ni-NTA برای تخلیص پروتئین، استفاده شد. سپس خلوص بالای پروتئین تخلیص شده به روش الکتروفورز تأیید شد (شکل ۵).




**شکل ۵.** الکتروفورز پروتئین ۱۲ کیلودالتونی EDIII1 تخلیص شده با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی کیت Ni-NTA



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286241.1391.1.1.7.4 ]
[ DOI: 10.30505/1.1.57 ]

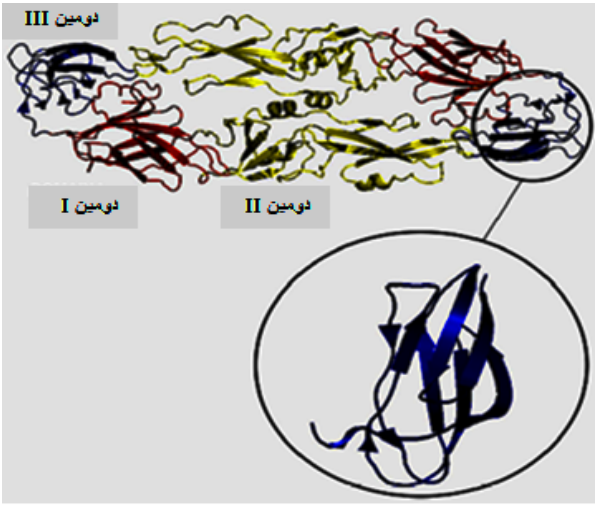
غلظت پروتئین به دست آمده در حدود ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به روش برادفورد تعیین شد. با توجه به وجود برچسب پلی هیستیدینی، از آنتی‌بادی اختصاصی این برچسب برای آزمون لکه‌گذاری وسترن استفاده شد که ظهور باند مورد نظر درستی بیان و تخلیص پروتئین هدف را تأیید کرد (شکل ۶).




**شکل ۶.** تأیید پروتئین EDIII1 حاوی برچسب پلی هیستیدینی به روش لکه‌گذاری وسترن. اندازه وزن مولکولی بر حسب کیلودالتون (kD) مشخص شده است.

## بحث و نتیجه‌گیری

پروتئین E نوترکیب و مشتقات آن در سیستم‌های بیانی مختلفی شامل *E. coli* [۱۳-۹]، مخمر [۱۶-۱۴] و باکولوویروس [۱۷] بیان وتخلیص شده است. نتایج نشان داده است که پروتئین E بیان شده در *E.coli* و باکولوویروس به نامحلول شدن گرایش دارد و بیان در مخمر نیز بازده پایینی دارد. این مشکلات بر لزوم بهینه‌سازی بیشتر شرایط بیان و روش‌های تخلیص قوی‌تری تأکید دارد. در سال‌های اخیر شاهد گرایش زیادی در زمینه طراحی واکسن‌های زیرواحدی دانگ بر مبنای دومین III از پروتئین E هستیم (شکل ۷). چنین رویکردی با مشخص شدن این واقعیت تقویت شد که چندین ویژگی اصلی پروتئین E به ساختار دومین III وابسته است. دومین III شکل فضایی به شکل β-Barrel، بدون مارپیچ آلفا و تاخوردگی شبیه IgG دارد. خصوصیات فوق باعث می‌شود که EDIII به عنوان دومین متصل شونده به گیرنده سلولی در پروتئین E معرفی شود. آنتی‌بادی‌های القا شده توسط این دومین می‌تواند اتصال ویروس به سلول را بلوکه کنند و اینکار اساساً با اتصال به اپی‌توپ‌هایی در دومین III صورت می‌گیرد [۴]. بنابراین واکسن‌های تک ظرفیتی (منووالان) آزمایشگاهی EDIII مبتنی بر آنتی‌ژن‌های نوترکیب، حامل‌های پلاسمیدی [۱۸] و ویروسی [۲۱-۱۹] ایجاد شده است. به‌طور ویژه در برخی از این مطالعات از بیان دومین III در *E. coli* استفاده شده است که نشان‌دهنده امکان انجام این راهکار در سیستم باکتریایی است. به عنوان مثال جیسوال (Jaiswal) و همکاران توانستند EDIII ویروس دانگ سروتیپ ۲ را با کارایی بالایی در *E. coli* بیان کنند. محصول پروتئینی به لحاظ بیولوژیکی عملکرد داشته و می‌تواند اتصال سروتیپ ۲ ویروس به سلول‌های BHK را بلوکه کند [۲۲]. اغلب تحقیقات اشاره شده که در آن از استراتژی واکسن پروتئینی استفاده شده است، با مشکلاتی نظیر میزان بیان پایین و ایجاد اجسام نامحلول (inclusion body) همراه بوده‌است.




**شکل ۷.** انتخاب دومین III پروتئین پوششی E برای طراحی واکسن

در این مطالعه توالی دومین III پروتئین پوششی سروتیپ ۱ ویروس دانگ از بانک ژن NCBI جمع‌آوری شد. برای پوشش دادن تنوع موجود توالی مورد توافقی تعیین و برای طراحی ژن استفاده شد. برای به دست آوردن بالاترین بیان، توالی ژن کدکننده برای بیان در باکتری *E. coli* بهینه‌سازی شد. به دست آوردن سطح بالای بیان پروتئین بسیار مهم است تا مراحل تولید و تخلیص پروتئین مقرون به صرفه باشد. با توجه به اینکه در ساختار دومین III وجود پیوند دی‌سولفیدی برای تاخوردگی صحیح پروتئین لازم است، بنابراین به منظور تسهیل تشکیل این پیوند و بیان پروتئین محلول از میزبان بیانی سویه Origami (DE3) استفاده شد. این سویه بیانی دارای جهش‌های مهندسی شده‌ای در ژن‌های آنزیم‌های احیاکننده پیوندهای دی‌سولفیدی (گلوتاتیون ردوکتاز و تیوردوکسین ردوکتاز) است که به ایجاد پیوند دی‌سولفیدی در محیط سیتوپلاسم باکتری کمک می‌کند. پس از تخلیص آنتی‌ژن، تأیید دوباره پروتئین بیان شده با استفاده از الکتروفورز در ژل SDS-PAGE و نیز آزمون وسترن انجام شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که بیان آنتی‌ژن در حد مطلوب و در فاز محلول است. مشخص شد که ساختار ژنی طراحی شده می‌تواند با کارایی خوبی بیان شود و پروتئین EDIII1 را به صورت نوترکیب تولید کند. در نهایت حجم مطلوبی از آنتی‌ژن برای انجام



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286241.1391.1.1.7.4 ]
[ DOI: 10.30505/1.1.57 ]

فرمولاسیون مناسب، تزریق به حیوان و انجام آزمون‌های ایمنی‌زایی تولید شد. انتظار می‌رود پروتئین بیان شده بتواند پاسخ ایمنی خوبی را علیه سروتیپ ۱ ویروس ایجاد نماید.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به خاطر حمایت مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنند.

## References

**1.** Swaminathan S, Khanna N. Dengue vaccine – current progress and Challenges. Curr Sci 2010; 98: 369-78.

**2.** Ramanathan MP, Kuo YC, Selling BH, Li Q, Sardesai NY, Kim JJ, et al. Development of a novel DNA SynCon tetravalent dengue vaccine that elicits immune responses against four serotypes. Vaccine 2009; 27: 6444-53.

**3.** Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, Diamond MS, Fremont DH. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. Nature 2005; 437: 764-9.

**4.** Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. Vaccine 2005; 23: 849-56.

**5.** Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most ef.cient blockers of virus adsorption to vero cells. J Virol 2001; 75: 7769–73.

**6.** Mason PW, Dalrymple JM, Gentry MK, McCown JM, Hoke CH, Burke DS, et al. Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein. J Gen Virol 1989; 70: 2037-49.

**7.** Roehrig JT. Antigenic structure of flavivirus proteins. Adv Virus Res 2003; 59: 141-75.

**8.** Puigbò P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. Nucleic Acids Research, 2007; 35: W126-31.

**9.** Simmons M, Murphy GS, Hayes CG. Short report: antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. Am J Trop Med Hyg 2001; 65: 159-61.

**10.** Chiu, MW, Yang YL. Blocking the dengue virus 2 infections on BHK-21 cells with purified recombinant dengue virus 2 E protein expressed in Escherichia coli. Biochem Biophys Res Commun 2003; 309: 672-8.

**11.** Mason PW, Zügel MU, Semproni AR, Fournier MJ, Mason TL.The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in Escherichia coli. J Gen Virol 1990; 71: 2107-14.

**12.** Hermida L, Rodríguez R, Lazo L, Silva R, Zulueta A, Chinea G, et al. A dengue-2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. J Virol Methods 2004; 115: 41-9.

**13.** Chen S, Yu M, Jiang T, Deng Y, Qin C, Qin E. Induction of tetravalent protective immunity against four dengue serotypes by the tandem domain III of the envelope protein. DNA Cell Biol 2007; 26: 361-7.

**14.** Muné M, Rodríguez R, Ramírez R, Soto Y, Sierra B, Rodríguez Roche R, et al. Carboxy-terminally truncated Dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in Pichia pastoris induced neutralizing antibodies and resistance to Dengue 4 virus challenge in mice. Arch Virol 2003; 148: 2267-73.

**15.** Wei HY, Jiang LF, Xue YH, Fang DY, Guo HY. Secreted expression of dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in Pichia pastoris. J Virol Methods 2003; 109: 17-23.

**16.** Etemad B, Batra G, Raut R, Dahiya S, Khanam S Swaminathan S, et al. An envelope domain III-based chimeric antigen produced in Pichia pastoris elicits neutralizing antibodies against all four dengue virus serotypes. Am J Trop Med Hyg 2008; 79: 353-63.



[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286241.1391.1.1.7.4 ]
[ DOI: 10.30505/1.1.57 ]

**17.** Kelly EP, Greene JJ, King AD, Innis BL. Purified dengue 2 virus envelope glycoprotein aggregates produced by baculovirus are immunogenic in mice. Vaccine 2000; 18: 2549-59.

**18.** Mota J, Acosta M, Argotte R, Figueroa R, Méndez A, Ramos C. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. Vaccine 2005; 23: 3469-76.

**19.** Khanam S, Etemad B, Khanna N, Swaminathan S. Induction of neutralizing antibodies speci.c to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes. Am J Trop Med Hyg 2006; 74: 266-77.

**20.** Khanam S, Rajendra P, Khanna N, Swaminathan S. An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. BMC Biotechnol 2007; 7: 10.

**21.** Brandler S, Lucas-Hourani M, Moris A, Frenkiel M-P, Combredet C, Février M, et al. Pediatric measles vaccine expressing a dengue antigen induces durable serotype-specific neutralizing antibodies to dengue virus. PLoS Negl Trop Dis 2007; 1: 96.

**22.** Jaiswal S, Khanna N, Swaminathan S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type-2 envelope domain III protein in Escherichia coli. Protein Exp Purif 2004; 33: 80-91.

[ Downloaded from jpmed.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286241.1391.1.1.7.4 ]
[ DOI: 10.30505/1.1.57 ]