جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب روتا ویروس انسانی و بررسی ایمنی زایی آن در شرایط آزمایشگاهی و حیوان آزمایشگاهی

*زهره شریفی*و**[1] محمد باقر یخچالی[2] دکترشمس شهرآبادی[3] فاطمه غفاری فر[4]*
1- سازمان انتقال خون تهران 2- مرکز تحقیقات ژنتیک تهران 3-دانشگاه علوم پزشکی ایران 4- دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

روتا ويروس ها علت اصلي بيماري اسهال در انسان و حيوانات اهلي در بيشتر نقاط دنيا هستند. 80 درصد علت اسهال هاي ويروسي مربوط به ويروس روتا بوده و عامل 140 ميليون مورد اسهال در سال است. ميزان مرگ و مير در كشورهاي در حال توسعه حدود 870-600 هزار مرگ در سال مي باشد. مكانيسم مسئول ايمني عليه بيماريها و عفونت هاي روتا ويروس به طور كامل فهميده نشده است.
هدف از اين تحقيق كلونينگ و بيان ژن كامل NSP4 روتاويروس انساني(Wa) در *E.coli* و توليد آنتي بادي عليه آن به منظور تقليد پاسخ هاي ايمني در ميزبان به عفونت طبيعي است كه مي توان با خوراندن آنتي بادي عليه NSP4 به مدل حيواني و ايجاد پاسخ ايمني روده اي، اثر حفاظت دهندگيNSP4 را پس از در معرض قرار گرفتن به روتاويروس مورد بررسي قرار داد و مشاهده نمود تا چه ميزان به كمك آنتي بادي عليه NSP4، اتصالNSP4 به رسپتورش مهار مي شود.

مواد و روشها

كشت سلول

سلولBSC 1 به تكثير ويروس روتا حساس مي باشد. بنابراين براي تهيه بذر (Seed) ويروس و توليد انبوه ويروس از اين رده سلولي استفاده شد سلولها در محيط DMEM حاوي 10% سرم كه حاوي 5×10^4-1×10^5 سلول در هر ميلي ليتر بود كشت داده شدند و در دماي $37\ ^0C$ 5 درصدCO_2 انكوبه گرديد. پس از گذشت 48-24 ساعت مونولاير كاملي از كشت سلول جهت تلقيح ويروس آماده گرديد.

تهيه ويروس

دراين پژوهش از ويروس روتا (simian 11 rotavirus(SA11 استفاده شد. از رقتهاي مختلف ويروس بذر حاوي 5µg/ml تريپسين به كشت سلول اضافه شد و روزانه بروزCPE يادداشت گرديد و با استفاده از فرمول Reed and Muenchتيترويروس تعيين گرديد

توليد آنتي بادي در خرگوش

مقدار 0/5 ميلي ليتر محلول پروتئين هاي سلول آلوده با 0/5 ميلي ليترFCA مخلوط گرديد و در 8-6 جاي مختلف پشت خرگوش به صورت زير جلدي تزريق شد. يك ماه بعد دو ترزيق يادآور با فاصله 15 روز با 0/25 ميلي ليتر از محلول پروتئين با 0/25FIC ميلي ليتربه طور عضلاني در هر دو ران خرگوش انجام شد

آزمايش ايمونوفلوئورسانس غير مستقيم

آزمايش ايمونوفلوئورسانس غير مستقيم با استفاده از آنتي بادي جذب شده با سلول BSC1 بر رويCoverslip انجام شد.
آزمايش ايمونوفلوئورسانس غير مستقيم با استفاده از آنتي بادي جذب شده با سلول BSC1 بر رويCoverslip انجام شد.
.در اين آزمايش از سرم خرگوس ايمونيزه نشده به عنوان كنترل منفي همچنين از آنتي سرم تهيه شده عليه ويروس روتا به عنوان كنترل مثبت استفاده شد وبر روي سلول آلوده به ويروس روتا آزمايش ايمونوفلوئورسانس غير مستقيم انجام شد

PCR

تكثير cDNA با روش PCR و با استفاده از ,10XPCR buffer TaqDNA Polymerase ,10mMdNTP, $50mMMgcl_2$ پرايمرهای اختصاصیRWR10PomolR ,10Pomol RWF, و طبق برنامه(1 دقيقه $96\ ^oC$ Denaturation و 30 ثانيه$62\ ^0C$ 1Annealing و دقيقه$72\ ^0C$ Extension, 10 دقيقه $72\ ^0C$ Final Extension) درThermal cycler انجام شد.

كلونينگ در ناقلهای پلاسميدي

ساخت پرايمر براي كلونينگ ژن*nsp4* روتا ويروس انساني سويه Wa، كه cDNA آن از دكتر Palombo دريافت شده بود. به گونه اي طراحي شد كه جايگاه هاي مناسب جهت برش DNA با آنزيم *Bam* HI و *KPn*I (كه درون ژن *nsp4*وجود نداشت) فراهم گرديد براي كلونينگ ژن*nsp4* از كلونينگ وكتور(+)pBS-KS استفاده شد. پس از تاييد كلونينگ ژن كامل قطعه 10 ويروس روتا، پلاسميد نوتركيب توام با پلاسميد بياني(Expression Vector) , pQE-30 توسط دو آنزيم *Bam* HI و *KPn*1 بريده سپس در كنار ماركر با استفاده از ژل آگارز، الكتروفورز شد.DNA توسط كيت Agarose gel DNA extraction kit استخراج شد . . با استفاده ازDNA خالص شده واكنش اتصال (Ligation) به طور شبانه در دماي$16\ ^oC$ -14 انجام شد

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تعيين توالي

براي تعيين توالي نوكلئوتيدهاي ژن كلون شد، باكتري حاوي پلاسميد نوتركيب كشت داده شد و توسط روش خاتمه زنجيره DNA نشاندار با رنگ فلوئورسنت با استفاده از دستگاه Applied Biosystem تعيين توالي شد(توسط شركت MWG آلمان).

بررسي بيان پروتئين

10 ميلي ليتر محيط L.B مايع همراه با آنتي بيوتيك مناسب به داخل فلاسك 50 ميلي ليتري ريخته شد يك كلني از كشت تازه برداشته و به داخل آن تلقيح شد و دردماي C ^{0} 37يا$30^{o}C$) در انكوباتور شيكردار به طور شبانه انكوبه گرديد.
براي القاء جهت بيان پروتئين، IPTG به غلظت نهايي 1mM به آن اضافه شد. رشد باكتري ها به مدت 5-4 ساعت ادامه يافت.

خالص سازي پروتيين نوتركيب

رسوب باكتري به ازاي هر گرم وزن مرطوب در 5-2 ميلي ليتر از بافر ليز كننده حل شد كشت باكتري سانتريفوژ گرديد و رسوب حاصله در 5 ميلي ليتر بافر دناتوره كننده، حل گرديد يك ميلي ليتر از محلول 50 درصد Ni-NTA به 4 ميلي ليتر از مايع رويي حاصله از ليز باكتري اضافه گرديد و به مدت يك ساعت در دماي اتاق شيكر شد. ستون دو بار با 4 ميلي ليتر از بافر شستشو، شسته و مايع خروجي براي بررسي SDS-PAGE جمع آوري شد.پروتئين با 0/5 ميلي ليتر بافر جداسازي elution buffer از رزين جدا گرديد.

آزمايش الايزا

ابتدا براي تعيين غلظت مناسب آنتي ژن و رقت مناسب آنتي سرم از پليت چكربورد استفاده شد. براي Coat كردن پليت الايزا با نمونه آماده شده پروتئيني، ابتدا در بافر كربنات – بي كربنات pH :9/6-0/1M رقيق گرديد. بدين ترتيب كه مقدار 200 ميكروليتر نمونه با غلظت 80 ميكروگرم در ميلي ليتر بافر كربنات بي كربنات به تمامي حفرات ستون اول پليت الايزا اضافه شد.به حفرات ستون اول پليت، آنتي سرم(تهيه شده عليه ليزات سلول آلوده به روتاويروس كه با سلول BSC1 جذب شده است) با رقت 50 : 1 در بافرTBST اضافه شد.

بررسي ايمني پاسيو موضعي روده اي

جهت بررسي اثر آنتي بادي از راه دهان، مقدار 100µl از 6/5 TCID50/ml 10 ويروس SA11 به طور خوراكي به سه گروه نوزادان موش 5-4 روزه داده شد به يك گروه آنتي بادي عليه NSP4 انساني به گروه ديگر سرم خرگوش ايمونيزه نشده به عنوان كنترل داده شد. خوراندن آنتي بادي ها با فاصله يك ساعت پس از تلقيح شروع شد و به مدت 48 بعد ادامه يافت. به 5 نوزاد موش ديگر نيزمحيط كشت (كه ويروس ها در آن تهيه شده بود)داده شد. 24-6 ساعت پس از تلقيح نوزادان موش با فشار ملايم در ناحيه شكم از نظر وجوداسهال مورد بررسي قرار گرفتند.

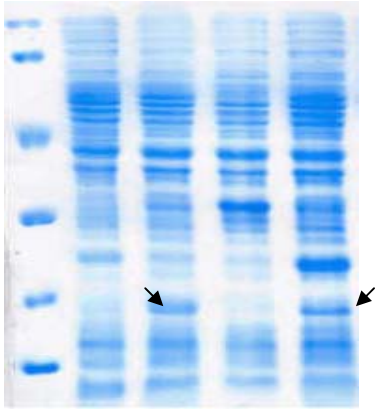
نتايج و بحث:

- بيان Nsp4 نو تركيب سويه Wa

بيان ژن *nsp4* تحت كنترل پروموترT5. از كليه كشت هاي (در حضور يا عدم حضورIPTG) الكتروفورز پروتئين (SDS-PAGE)و وسترن بلاتينگ انجام شد. شكل 1بيان پروتئين NSP4 را در كلون هاي كه با IPTG القاء است(ستون هاي شماره 5و3)در مقايسه با كلون (القاء نشده باIPTG) (ستون شماره 2) و كلون حاوي پلاسميد pQE-30(القاء شده با IPTG) نشان مي دهد. با توجه به ماركروزن مولكولي پروتئين و حركت آن برروي ژل، وزن مولكولي پروتئين بيان شده NSP4 حدود 20 كيلو دالتون تعيين شد. بيان پروتئينNSP4 با استفاده از وسترن بلاتينگ و با استفاده از آنتي بادي تهيه شده عليه عصاره سلول آلوده با روتاويروس ميموني سويه SA11 مورد تاييد قرار گرفت..

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

4 5



شكل(1). الكتروفورز عصاره باكتري (سويه DH5 α) حاوي پلاسميد نو تركيبpYS46 بيان كننده پروتئين NSP4 و پلاسميده pQE-30، توسط ژل SDS-PAGE 13/5 درصد. ستون شماره 1 ماركروزن مولكولي پروتئين. ستون شماره 2 .عصاره باكتري pYS46 (القاء نشده).ستون هاي شماره 5و3 عصاره باكتريpYS46 (القاء شده با IPTG) كه پروتئين NSP4 در آن به صورت باند حدود 20 كيلو دالتوني با پيكان مشخص شده است. ستون شماره 4 عصاره باكتري حاوي پلاسميد pQE-30 فاقد قطعه خارجي (القاء شده با IPTG).

بررسي بيان پروتئين NSP4نو تركيب باروش اليزا

براي تعيين رقت مناسب آنتي سرم توليد شده، عليه عصاره سلول آلوده به ويروس روتا ميموني (سويهSA11) همچنين غلظت مناسب پروتئين جهت Coat كردن پليت اليزا، از پليت چكر بورد استفاده شد. براي كنترل مثبت از سلول آلوده به ويروس روتا و براي كنترل منفي از سلول هاي سالم (بدون آلوده سازي با ويروس روتا) استفاده شد. جذب نوري نمونه ها در طول موج 450 نانومتر با دستگاه اليزا ريدر خوانده شد. غلظت مطلوب محلول پروتئين جهت Coat كردن پليت اليزا 5µg/ml و رقت مناسب آنتي سرم 400: 1 بدست آمد.

جدول 2-4- ميزان جذب پليت چكر بورد در طول موج 450 نانومتر جهت تعيين رقت آنتي سرم عليه عصاره سلول آلوده به ويروس روتا و غلظت مطلوب آنتي ژن(عصاره باكتري) در آزمايش اليزا.

غلظت µg/ml	0	1/52	2/5	5	10	20	40	80
1 :50	0/140	1/70	1/90	2/00	2/75	2/85	2/90	2/99
1 :100	0/24	2/30	2/40	2/60	2/80	2/90	2/94	2/99
1 :200	0/18	2/00	2/23	2/50	2/83	2/81	2/89	2/99
1 :400	0/15	0/80	1/10	1/80	2/48	2/34	2/40	2/50
1 :800	0/1	0 /40	0/31	0/64	0/70	0/80	1/0	1/24
1 :1600	0/08	0/20	0/30	0/37	0/43	0/48	0/51	670

توليد آنتي بادي عليه NSP4 نو تركيب روتاويروس انساني سويه Wa

پس از تاييد بيان پروتئين NSP4 نو تركيب با روش هايSDS-PAGE ، سترن بلاتينگ پروتئين نو تركيب خالص گرديدن NSP4 نو تركيب با روش SDS-PAGE مورد بررسي قرار گرفت. خالص سازي تحت شرايط nativeو denaturing انجام گرديد كه خالص سازي تحت شرايط دناتوره شدن حاوي محصول خالص بيشتري بود و اين نشان مي دهد كه بيشتر پروتئين توليد شده در باكتري به صورت نامحلول مي باشند.

ايمنی زايی آنتي بادي توليد شده در شرايط آزمايشگاهی

آزمايش اليزا بر روي عصاره كلون هاي حاوي پلاسميد نو تركيب PYS46 همچنين عصاره با كتري حاوي پلاسميد pQE-30 انجام گرديد. از عصاره سلول آلوده به روتا ويروس ميموني به عنوان كنترل مثبت و از عصاره سلول غير آلوده

به ويروس روتا به عنوان كنترل منفي استفاده گرديد. نتايج اليزا نشان داد كه پروتئين نو تركيب حاصله توانايي تحريك پاسخ هاي ايمني جهت توليد آنتي بادي را دارا مي باشد و مي توان در مطالعات جهت بررسي ايمونوژنيسيته پروتئين NSP4 از آن استفاده نمود.

بررسی ایمنی زایی آنتي بادي توليد شده در حيوان آزمايشگاهی

اثر آنتي بادي هاي توليد شده عليه پروتئين نوتركيب NSP4 انساني جهت حفاظت عليه بيماري ايجاد شده توسط ويروس روتا ميموني (SA11) مورد بررسي قرار گرفت به 15 نوزاد موش 5-4 روزه مقدار1 μ 100ويروس روتا ميموني سويهSA11 كه عيار آن TCID 50/ml $10^{6/5}$ بود، بطور خوراكي داده شد. نوزاداني كه آنتي بادي عليه پروتئين نو تركيب روتا ويروس انساني را دريافت كرده بودند 60 درصد موش ها اسهال را نشان ندادند. نوزادان موشي كه به جاي ويروس، محيط كشت دريافت كرده بودند، هيچ كدام بيماري اسهال را نشان ندادند. كاهش بيماري اسهال در موش هاي فوق با آزمون فيشر با سطح 0/05 خطا مورد بررسي قرار گرفت. بيماري اسهال در گروه هايي كه آنتي بادي عليه پروتئين نو تركيب انساني دريافت كرده بودند بطور معني داري در مقابل گروه كنترل (كه سرم خرگوش ايمونيزه نشده دريافت كرده بودند) كاهش يافته بود. بر اساس نتايج فوق مي توان نتيجه گرفت آنتي بادي هاي توليد شده عليه پروتئين NSP4 نو تركيب قادر به مهار اسهال ناشي از بيماري مي باشد. و ايمني پاسيو موضعي روده اي ناشي از آنتي سرم عليه پروتئين N SP4 از يك گونه قادر به خنثي نمودن ويروس از گونه ديگري مي باشند ولي هنگامي كه آنتي سرم توليد شده عليه پروتئين NSP4 از همان گونه ويروس باشد اثر حفاظت دهندگي آن بيشتر است.