مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۵، بهار و تابستان ۱۳۹۰، صفحات۵۲ -۴۳

تولید پروتئین نوترکیب Tax ویروس $HTLV_1$ در سویه باکتریایی Rosetta(DE3)

سمانه صفار، مجید گل کار، مهدی امینیان، حسام میرشهابی، هوشنگ رفعت پناه، تقی گل محمدی*، کیهان آزادمنش*

۱. سمانه صفار، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، saffar_samaneh@yahoo.com، ۰۹۱۹٤۰٦٥۳۸۳
۲. مجید گل کار، استادیار، بخش انگل شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، majid.golkar@gmail.com، ۰۹۱۲٦۲۷٥٦۲۹
۳. مهدی امینیان، استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، amminian@yahoo.com ، ۰۹۳٥۲۱۲٤۲٤۱
٤. حسام میرشهابی، دانشجوی دکتری ویروس شناسی، گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، hessammirshahabi@yahoo.com، ۰۹۱۹۳۱٤۸۷٦۹
٥. هوشنگ رفعت پناه، استادیار گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۰٥۱۱۸۰۱۲۷٦۲
٦. تقی گل محمدی، استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، golmoham@sina.tums.ac.ir، ۰۹۱۲۲۹۷٤۸۹۰
۷. کیهان آزادمنش، استادیار، بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، azadmanesh@pasteur.ac.ir ، ۰۹۱۲۱٤۸۲۹۸٦
نویسندگان رابط: تقی گل محمدی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، golmoham@sina.tums.ac.ir، ۰۹۱۲۲۹۷٤۸۹۰
۲. کیهان آزادمنش، استادیار، بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، azadmanesh@pasteur.ac.ir ، ۰۹۱۲۱٤۸۲۹۸٦

چکیده :

زمینه و اهداف: $HTLV_1$ اولین رتروویروس انسانی شناخته شده است که در انسان تولید بیماری می کند. عمده فیزیوپاتولوژی بیماری های مربوط به $HTLV_1$، به خصوصیات پروتئین Tax این ویروس مربوط می شود. استفاده از گونه های جهش یافته پروتئین Tax در کنار داروهای تنظیم کننده سیستم ایمنی می تواند به عنوان تعدیل کننده پاسخ های ایمنی قوی در طراحی واکسن بکار گرفته شود. این پاسخ های ایمنی مضر، باعث بیماری HAM-TSP می شود و تعدیل آنها راه امیدی را برای درمان بیماران در پیش رو قرار می دهد . به این علت تولید پروتئین نوترکیب Tax هدف این مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی: توالی کد کننده پروتئین Tax (حاوی جهش R222K) موجود در وکتور pcDNA3.1(+) توسط برش با آنزیم های BamHI و XhoI خارج شده و در وکتور بیانی pET32a(+) با همین جایگاههای برش در سویه E.coliDH5α کلون گردید. وکتور نوترکیب پس از تایید صحت کلونینگ توسط فرایندهای هضم آنزیمی، colony PCR و تعیین توالی ژن کلون شده، به میزبان بیانی E.coli Rosetta(DE3) منتقل و القاء بیان صورت گرفت. سپس بیان پروتئین با آنالیز SDS-PAGE و وسترن بلات بررسی شد. در نهایت خصلت آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب از طریق وسترن بلات با سرم افراد بیمار تایید گردید.

یافته ها: حضور باند پروتئینی Tax در بررسی های مربوط به SDS-PAGE و وسترن تایید شد. وسترن بلات پروتئین نوترکیب با سرم افراد بیمار، حضور باند مربوط به پروتئین Tax را نشان داد.

نتیجه گیری: پروتئین به دست آمده می تواند به عنوان آنتی ژن نوترکیب ویوسی بیان شده و توسط آنتی بادی بیماران به درستی شناسایی گردد.

واژگان کلیدی: $HTLV_1$، Tax، کلونینگ، SDS-PAGE، وسترن بلات

مقدمه :

(Human T Lymphotropic Virus $HTLV_1$ type 1)، اولین رتروویروس انسانی است که در سال ۱۹۸۰ کشف شد (۱). جایگاه $HTLV_1$، از لحاظ مرفولوژی در تیپ C از دسته دلتاویروسهاست که مشابه با لنتی ویروسها (Human (HIVI/ II) Immunodeficiency Virus)، قادر به ایجاد عفونت طولانی مدت در بدن موجود زنده می باشد. $HTLV_1$ توانایی ترانسفورم سلولهای T اولیه انسانی و ایجاد رده سلولی فناناپذیر سلول T را در محیط آزمایشگاهی دارا میباشد (۲). اولین پیامد پاتولوژیکی این ویروس یعنی لوکمی (سرطان لنفوئیدی) سلولهایT در بالغین یا ATL (Adult T cell Leukemia) سه سال قبل از کشف این ویروس مشخص شد (۳). به دنبال آن دومین بیماری ایجاد شده به وسیله این ویروس شناخته شد که یک بیماری مزمن عصبی شامل فلج ناقص اندامهای تحتانی (Tropical Spastic Paraparesis) (TSP) است (٤) که بعدها تحت عنوان میلوپاتی وابسته به $HTLV_1$ ($HTLV_1$ Assocaiated Myelopathy) (HAM) نامگذاری شد (۵). پراکندگی این ویروس در همه نقاط دنیا یکسان نمی باشد و در برخی از مناطق به شکل کانون های اندمیک متمرکز شده است (٦). از جمله کشورهای حوزه کارائیب،جنوب ژاپن،آمریکای جنوبی و اخیرا تمرکز این ویروس در شمال شرقی ایران و شهرستان مشهد گزارش شده است؛ به نحوی که آلودگی به این ویروس تا ۳٪ در برخی مناطق خراسان دیده شده است (۷, ۸). از آنجا که شایع ترین روش انتقال این ویروس از طریق شیردهی مادر به فرزند است، جلوگیری از شیردهی نوزادان بوسیله مادران مبتلا می تواند تا ۹۷٪ اثر حفاظتی داشته باشد (۹). انتقال از طریق روابط جنسی نیز توسط پیشگیری های فیزیکی قابل کنترل است. غربالگری سیستماتیک خون های اهدایی در سازمان انتقال خون نیز یکی دیگر از روش های پیشگیری است که در برخی کشور ها از سال ۱۹۸٦ آغاز شده است و در چند سال اخیر این روند در کشور ما و در استان خراسان نیز به دلیل شیوع بالای این بیماری انجام می شود (۸). با بکارگیری این متدها گسترش بیماری می تواند به خوبی و بدون نیاز به واکسن کنترل شود. با این حال نه ایمن زایی جهت پیشگیری و نه روشهای ذکر شده در بالا قادر نیستند به حدود ۲۰-۱۵ میلیون نفری که تا اکنون آلوده شده اند و ۱۰-۵٪ آنها عوارض پیشرفته ای را در آینده نزدیک بروز خواهند داد، کمک کند. بنابراین در چند سال اخیر تلاشهایی در جهت گسترش دارو درمانی و یا واکسن های درمان بخش برای $HTLV_1$ صورت گرفته است (۱۰-۱۳). مشخص شده که فیزیوپاتولوژی بیماری های مربوط به $HTLV_1$، به خصوصیات ویژه Tax این ویروس مربوط می شود که مهم ترین نقش را در تکثیر ویروس و پاتوژنز بیماری های ناشی از $HTLV_1$ دارا می باشد (١٤). درحقیقت Tax عامل اصلی انکوژنیک در $HTLV_1$ بوده که باعث بیماری ATL می شود و همچنین پاسخ ایمنی شدید به آن می تواند عامل اصلی ایجاد HAM-TSP شود. به عبارت دیگر این پروتئین در سیکل زندگی و بیولوژی ویروس نقش مهمی داشته و برای همانندسازی ویروس و نیز تغییر ساختار سلول میزبان به منظور تامین نیازهای ویروس لازم است (۱۰, ۱۵, ١٦). از طرف دیگر Tax یک پروتئین حفاظت شده در این ویروس می باشد؛ این خصوصیت یک مزیت مهم است که آن را کاندید مناسبی برای تهیه واکسن می کند. چرا که یک آنتی ژن حفاظت شده می تواند علیه همه ساب تایپ های پاتوژن که واکسن علیه آنها تهیه می شود، عمل کند. به این منظور، هر تلاشی برای استفاده از آن در یک طراحی واکسیناسیون بایستی پس از غیر فعال سازی مضرات این پروتئین و با استفاده از تغییراتی بر روی ژنوم آن صورت گیرد. در این طرح، برای بیان پروتئین از cDNAی Tax که قبلاً جهش R222K در آن گزارش شده بود استفاده شده و این جهش به منظور کاهش دخالت Tax در مسیرهای پیام رسانی سلولی در نظر گرفته شده است. در پروتئین موتانت در ناحیه ۲۲۲، اسید آمینه لیزین به جای آرژنین وجود دارد (۱۷). دیده شده است که یوبی کویتینه شدن Tax در فعال سازی مسیر NFkB نقش مهاری دارد (۱۸, ۱۹). لذا وجود لیزین به جای آرژنین در این ناحیه باعث ایجاد یک جایگاه برای یوبی کویتینه شدن

Tax شده و فعالسازی NFkB را تا حد قابل توجهی کاهش می دهد (۱۷).

به این ترتیب استفاده از گونه های مختلف جهش یافته پروتئین Tax در کنار داروهای تنظیم کننده سیستم ایمنی می تواند به عنوان تعدیل کننده پاسخ های ایمنی قوی (immunomodulator) در طراحی واکسن مورد استفاده قرار بگیرد. این پاسخ های ایمنی مضر، باعث بیماری HAM-TSP می شود و تعدیل آنها راه امیدی را برای درمان افراد مبتلا به این بیماری در پیش رو قرار می دهد (۲۰, ۲۱). به این منظور تولید پروتئین نوترکیب Tax با خصوصیات ذکر شده هدف این مطالعه قرار گرفت.

مواد وروش ها :

جهت تکثیر ژن *tax* نوترکیب، ابتدا توالی کد کننده پروتئین Tax شامل ۱۰۵۹ جفت باز و حاوی جهش R222K موجود در وکتور یوکاریوتی pcDNA3.1(+) توسط برش با آنزیم های محدود کننده *Bam*HI و *Xho*I خارج شده و در وکتور بیانی pET32a(+) با همین جایگاههای برش در سویه *E.coli* DH5α کلون گردید. صحت کلونینگ توسط فرایندهای هضم آنزیمی، colony PCR و تعیین توالی ژن کلون شده (شرکت تکاپوزیست) انجام گرفت. در روند colony PCR با استفاده از جفت پرایمرهای:

***Forward Primer : T7 promoter**

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

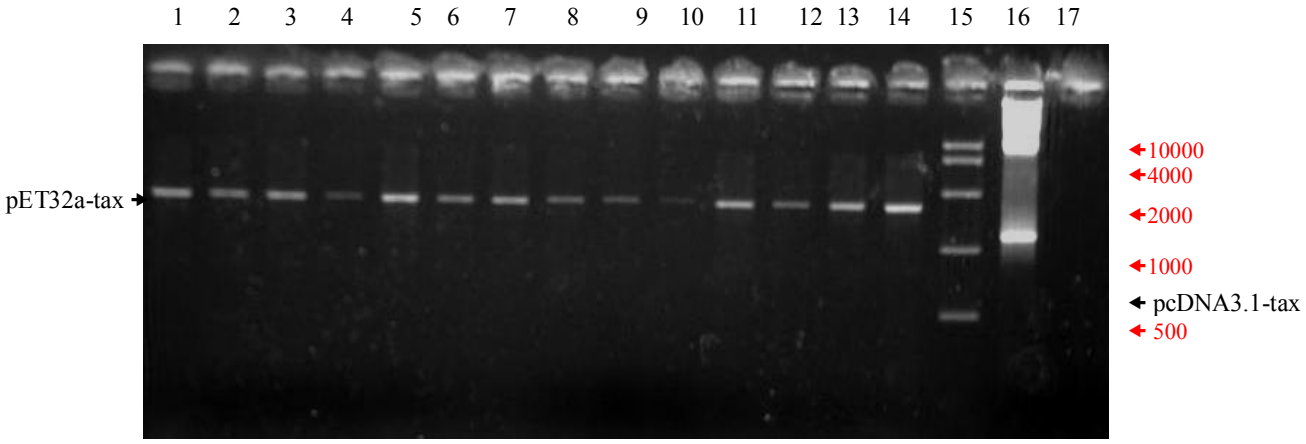
***Reverse primer**

5'-TGT CTC GAG GAC TTC TGT TTC AC-3'

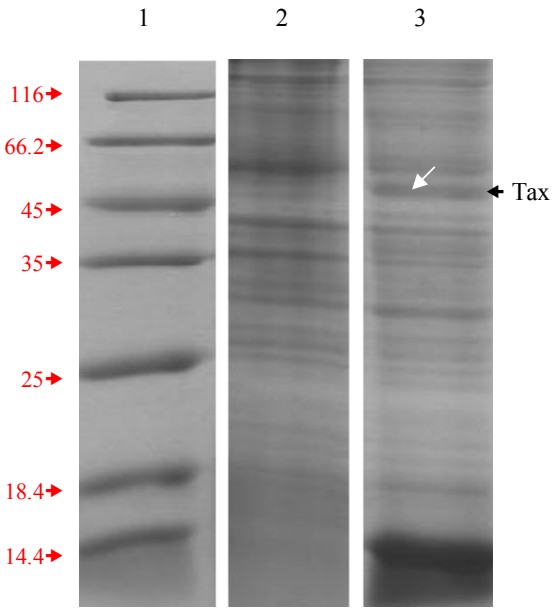
وجود توالی *tax* در وکتور pET32a(+) تایید شد، در این مرحله از پلاسمید pcDNA3.1-tax نیز به عنوان کنترل مثبت و از پلاسمید pET32a(+) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. وکتور نوترکیب پس از تایید صحت کلونینگ به میزبان بیانی *E.coli* Rosseta(DE3) منتقل و القاء بیان صورت گرفت. پس از بررسی شرایط موثر بر بیان، پروتئین نوترکیب در شرایط بهینه شامل غلظت IPTG ۱mM، دمای ۳۰ درجه، محیط کشت 2xYT+1%Glc و ٦ ساعت انکوباسیون پس از القاء به صورت فیوژن با His-tag بیان گردید و ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب با آنالیز SDS-PAGE و وسترن بلات انجام شد. به این ترتیب جهت تایید پروتئین و بیان آن به صورت فیوژن با His-tag، وسترن بلات با آنتی بادی های Mouse anti-Tax monoclonal Ab محصول شرکت Abcam (با رقت ۱/۲۰۰) و penta anti-His monoclonal Ab محصول شرکت Sigma (با رقت ۱/۲۰۰۰) انجام گرفت. همچنین بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین Tax با وسترن این پروتئین در حضور سرم افراده آلوده به ویروس $HTLV_1$ در مقایسه با افراد کنترل انجام گرفت. به این منظور نمونه های سرمی افراد بیمار و افراد سالم با رقت ۱/۵۰۰ تهیه گردید و پس از جذب آنتی بادی های غیر اختصاصی با لیزات باکتری (جهت حذف زمنیه)، با باند پروتئینی Tax برروی غشاء مجاور شدند. کل نمونه ها در این بررسی ۱۵ عدد و شامل ۱۰ نمونه بیمار (مبتلا به HAM-TSP) و ۵ نمونه کنترل می باشد.

یافته ها :

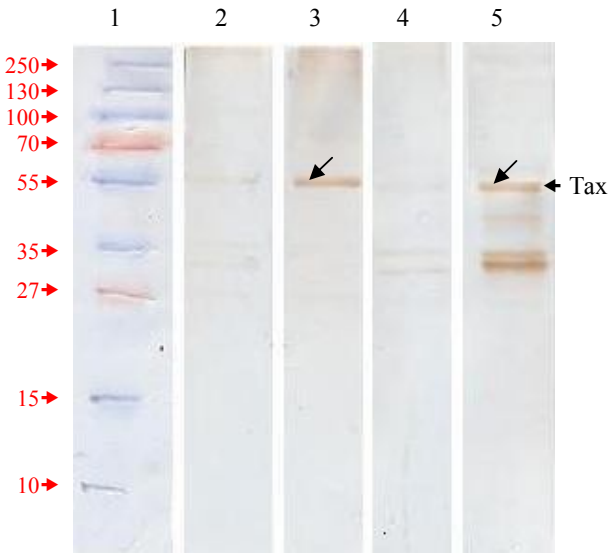
نتایج مربوط به colony PCR وکتور نوترکیب pET32a(+)-tax در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. ظهور باند ۱٦۰۰ جفت بازی در ستون های ۱ تا ١٤ مربوط به ژن *tax* کلون شده در وکتور pET32a(+) می باشد. حضور باند پروتئینی در محدوده ۵۰ کیلودالتونی در نمونه بعد از القاء نسبت به نمونه قبل القاء در نتایج مربوط به آنالیز SDS-PAGE (شکل ۲) بیان موفقیت آمیز پروتئین Tax را نشان می دهد. باند پروتئینی مذکور در نتایج وسترن بلات با Mouse anti-Tax monoclonal Ab و penta anti-His monoclonal Ab نیز در محدوده ۵۵ کیلودالتونی مشاهده گردید (شکل۳). بررسی های مربوط به وسترن بلات با سرم افراد بیمار، حضور باند ۵۵ کیلودالتونی مربوط به پروتئین Tax را نشان می دهد (شکل٤). جهت مقایسه، نتایج وسترن بلات با سرم افراد کنترل در شکل ۵ مشاهده می شود.



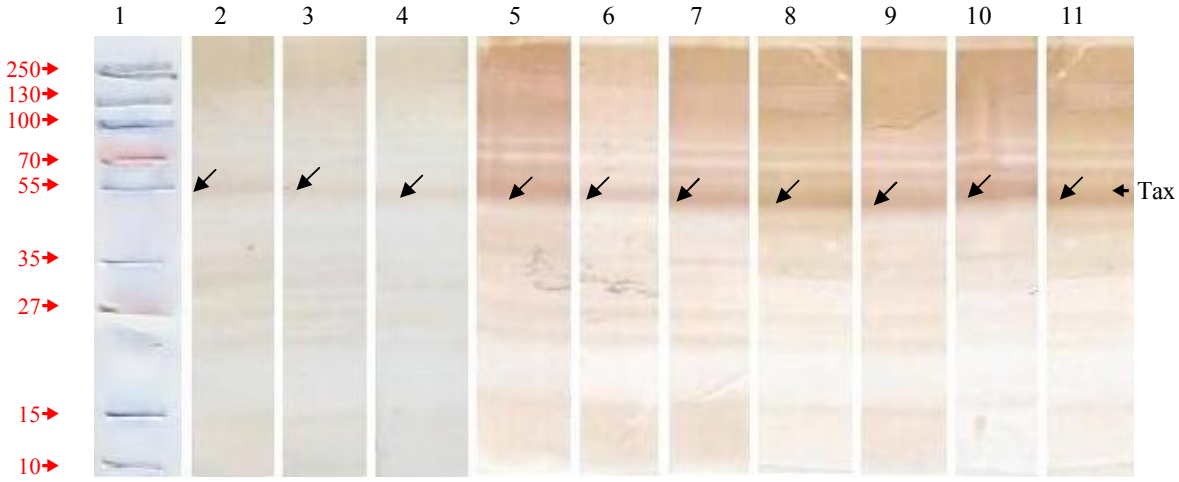
شکل ۱: تست Colony PCR به منظور تایید ورود ژن *tax* در ناقل. ستون ۱۴-۱: محصول PCR با استفاده از کلنی های حاصل از ترانسفرماسیون. ستون ۱۵: شاخص وزن مولکولی Fermentas (SM1123). ستون ۱۶: محصول PCR با استفاده از pcDNA3.1-tax به عنوان کنترل مثبت. ستون ۱۷: محصول PCR با استفاده از pET32a(+) به عنوان کنترل منفی.



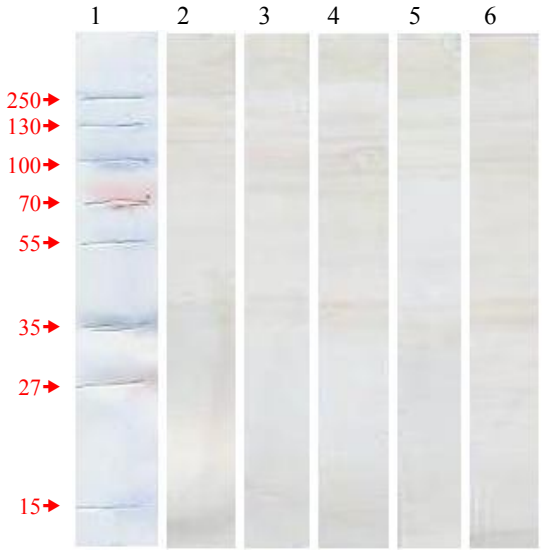
شکل ۲: آنالیز SDS-PAGE باکتری های حاوی پلاسمید pET32a-tax برای بیان پروتئین نوترکیب. ستون ۱: شاخص وزن مولکولی Fermentas (SM0431). ستون ۲: نمونه کشت قبل از القاء با IPTG. ستون ۳: نمونه کشت بعد از القاء.



شکل ۳: بررسی بیان پروتئین نوترکیب Tax از طریق بلاتینگ با α-Tax monoclonal Ab و Penta α-His monoclonal Ab. ستون ۱: شاخص وزن مولکولی Fermentas (SM1811). ستون ۲: نمونه قبل از القاء بلات شده با α-Tax monoclonal Ab ستون ۳: نمونه بعد از القاء بلات شده با α-Tax monoclonal Ab. ستون ٤: نمونه قبل از القاء بلات شده با Penta α-His monoclonal Ab. ستون ٥: نمونه بعد از القاء بلات شده با Penta α-His monoclonal Ab.



شکل ٤: بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب Tax از طریق بلاتینگ با سرم افراد بیمار. ستون ۱: شاخص وزن مولکولی Fermentas (SM1811). ستون های ۱۱-۲: نمونه های بعد از القاء بلات شده با سرم افراد بیمار HAM-TSP.



شکل ۵: بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب Tax از طریق بلاتینگ با سرم افراد سالم به عنوان کنترل. ستون ۱: شاخص وزن مولکولی Fermentas (SM1811). ستون های ٦-۲: نمونه های بعد از القاء بلات شده با سرم افراد سالم.

بحث :

ویروس $HTLV_1$ یک مشکل مهم برای سلامت جامعه در برخی مناطق ایران می باشد و آلودگی به این ویروس تا ۳٪ در برخی مناطق خراسان دیده شده است. همه افراد مبتلا با ناامیدی دراضطراب ظهور عوارض مختلف این ویروس در خود بوده و در انتظار راههای کمک به درمان این بیماری می باشند، از سوی دیگر، پیشگیری از ابتلای به این ویروس، قادر نیست به کسانی که هم اکنون مبتلا هستند و ۱۰-۵٪ از آنها عوارض پیشرفته ای را در آینده ای نزدیک بروز خواهند داد، کمک کند. واکسن های درمانی می تواند یک راه موثر در کمک به درمان این بیماران باشد، لذا در سالهای اخیر تلاشهایی برای پیشرفت درمان با دارو و نیز واکسن های درمانی برای $HTLV_1$ صورت پذیرفته است (١٤).

Tax یک پروتئین ایمونودامینت (immunodominant) برای پاسخ CTL علیه $HTLV_1$ است. از طرف دیگر Tax یک پروتئین حفاظت شده در این ویروس می باشد؛ این خصوصیت یک مزیت مهم است که آن را کاندید مناسبی برای تهیه واکسن می کند (١٤, ٢٢). با این حال مهمترین مشکل نگران کننده در مورد Tax این است که تولید درون سلولی آن باعث ایجاد اثرات نامطلوب گردد؛ به این منظور، هر تلاشی برای استفاده از آن در یک طراحی واکسیناسیون بایستی پس از غیر فعال سازی مضرات این پروتئین و با استفاده از تغییراتی بر روی ژنوم آن صورت گیرد. لذا تولید پروتئین نوترکیب Tax با جهش نقطه ای R222K انجام گرفت (٢٣-٢٦). از آنجا که فرایند کلونینگ نه از طریق PCR بلکه از طریق sub cloning انجام گرفته است لذا ژن از اثرات نامطلوب فرایند PCR (از جمله بروز جهش های نقطه ای) مصون مانده و به این ترتیب احتمال اشتباه در کلونینگ بسیار بعید به نظر می رسد. با این حال به منظور تایید صحت کلونینگ، colony PCR حضور *tax* در وکتور pET32a(+) را تایید نمود. از آنجا که پرایمر Forward (T7) از روی قسمتی از توالی وکتور طراحی و انتخاب گردید لذا قطعه *tax* تکثیر شده بایستی اندکی (حدود ۵۰۰ جفت باز) بزرگتر از قطعه متناظر آن در نمونه کنترل مثبت باشد لذا بر اساس شکل ۱، پس از الکتروفورز محصول PCR، در تمام کلنی های انتخاب شده مذکور

باند ۱۶۰۰ جفت بازی نسبت به باند تقریبا ۱۱۰۰ جفت بازی در نمونه کنترل مثبت در ژل آگارز مشاهده شد؛ در حالی که هیچ قطعه ای از PCR پلاسمید pET32a(+) حاصل نگردید. به این ترتیب پس از حصول اطمینان از کلونینگ صحیح و کارایی لازم وکتور بیانی، شرایط تاثیر گذار بر روند بیان از جمله غلظت القاء کننده، مدت زمان پس از القاء، دمای القاء، محیط کشت باکتری و میزبان بیانی به تدریج مورد بررسی قرار گرفتند. انتظار می رود که پروتئین نوترکیب Tax با ۳۵۳ اسید آمینه و وزن مولکولی حدود ٤٠ کیلودالتون به همراه یک دنباله نسبتا طولانی (که دنباله هیستیدینی نیز در آن قرار دارد) در انتهای آمینی بیان گردد، به این ترتیب دنباله پلی پپتیدی مذکور با ۱۷۰ آمینو اسید حدود kDa ۱۸-۱۵ به وزن ملکولی پروتئین نوترکیب می افزاید. بنابراین در صورت بیان موفق یک باند در محدوده kDa ۵۵ مشاهده خواهد شد. با این حال، پروتئین نوترکیب Tax با اندازه تقریبی ۵۰ کیلو دالتون در ژل SDS-PAGE مشاهده گردید (شکل ۲) که تا حدودی با اندازه مورد انتظار ۵۵ کیلو دالتون، تخمین زده شده از طریق محاسبات همخوانی ندارد چنین مشاهده ای ممکن است به دلیل خطای اندازه گیری مربوط به مارکر استفاده شده در SDS-PAGE نسبت به مارکر به کار برده شده در وسترن بلات (با توجه به استفاده از مارکرهای مختلف در این دو تکنیک) باشد. بررسی های بیوانفورماتیکی نشان می دهند که ژن Tax در مجموع دارای ٤٤ کدون نادر شامل ۵ کدون مربوط به آمینواسید آرژنین، ۵ کدون مربوط به آمینو اسید ایزولوسین، ۱۰ کدون کد کننده لوسین و ٢٤ کدون کد کننده پرولین است که در سیستم بیانی *E.coli* به ندرت استفاده می شوند (http://nihserver.mbi.uda.edu/RACC/). همین امر می تواند میزان بیان Tax در *E.coli* را کاهش دهد. سویه Rosetta(DE3)، واجد پلاسمیدی است که tRNA های مربوط به کدون های نادر موجود در یوکاریوت ها را کد می کند. در نتیجه بیان پروتئین Tax در این سویه افزایش می یابد (۲۷-۲۹).

در بررسی عوامل موثر بر بیان پروتئین، مشخص شد که کاهش دما از۳۷ به ۳۰ درجه پس از القاء با IPTG، باعث افزایش بیان پروتئین نوترکیب Tax می گردد. کاهش دما با ایجاد تاخوردگی مناسب، پایداری پروتئین محلول و در نتیجه بازده پروتئین را در فرم محلول خود افزایش می دهد (۲۷). از آنجا که حداکثر فعالیت پروتئازهای سلولی در دمای $37^{\circ}C$ می باشد، لذا چنانچه حتی بیان پروتئین Tax در این دما در حد بهینه باشد اثر پروتئازها ممکن است باعث تجزیه پروتئین شده و از مشخص شدن بیان جلوگیری کند. بنابراین کاهش دما با جلوگیری از عملکرد پروتئازهای سلولی می تواند در بیان موفقیت آمیز پروتئین موثر باشد.

در بهینه سازی بیان پروتئین Tax، وجود ۱٪ گلوکز در محیط کشت 2xYT بیان را به طور معنی داری نسبت به محیط فاقد آن افزایش داد. بیان بهتر پروتئین Tax در حضور گلوکز را می توان به اثر مهاری گلوکز در بیان نشتی RNA T7 پلیمراز تا قبل از القاء با IPTG نسبت داد (۳۰-۳۵). وسترن بلات پروتئین Tax با آنتی بادی منوکلونال اختصاصی علیه اپی توپهای Tax، یک باند ۵۵ کیلودالتونی را که کاملا با وزن مولکولی مورد انتظار از پروتئین بیان شده همخوانی داشت، نشان داد (شکل ۳). به منظور تایید بیان پروتئین Tax با دنباله هیستیدینی، وسترن بلات پروتئین نوترکیب بیان شده با آنتی بادی اختصاصی علیه این دنباله نیز انجام گرفت. نتایج حاصل از بلاتینگ، یک باند kDa ۵۵ در تطابق با پروتئین Tax و یک باند kDa ۳۵ را نشان داد (شکل۳) و به نظر می رسد که این باند ۳۵ کیلودالتونی مربوط به پروتئینی از باکتری *E.coli* می باشد که به دلیل محتوای هیستیدینی خود، به طور غیر اختصاصی به Penta α-His monoclonal Ab متصل شده است. از آنجا که هدف نهایی از انجام این طرح استفاده از این پروتئین در طراحی واکسن می باشد، به منظور تایید خصلت آنتی ژنی پروتئین Tax، حضور آنتی بادی علیه Tax در سرم افراد بیمار و ناقل در مقایسه با افراد سالم (به عنوان کنترل) از طریق وسترن بلات بررسی گردید. طبق فرضیات، Tax خصلت آنتی ژنی داشته و باعث ایجاد آنتی بادی می گردد؛ بنابراین در افراد بیمار (که دارای آنتی بادی علیه آنتی ژن های $HTLV_1$ هستند) آنتی بادی علیه پروتئین Tax وجود دارد. بر اساس شکل ٤،

حضور باند ۵۵ کیلودالتونی در نمونه بعد از القاء، حاکی از وجود آنتی بادی علیه پروتئین Tax در سرم بیمار است. از آنجا که بلاتینگ با سرم بیمار به دلیل وجود آنتی بادی های غیر اختصاصی علیه باکتری *E.coli*، همواره دارای پس زمینه می باشد می توان از مثبت بودن نتیجه آزمایش با مقایسه باندها در نمونه قبل از القاء اطمینان حاصل نمود و همانطور که در شکل ٤ مشاهده می گردد این باند در نمونه قبل القاء دیده نمی شود.

نتیجه گیری :

پس از بهینه سازی شرایط بیان، مشاهده شد که سویه میزبان بیانی، بیشترین تاثیر را در میزان بیان پروتئین نوترکیب دارد. در واقع سویه Rosetta(DE3) از باکتری *E.coli* با داشتن پلاسمیدی که tRNA های مربوط به کدون های نادر در *E.coli* را کد می کند، تاثیر به سزایی در بیان Tax نوترکیب داشت.

فهرست مراجع :

1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* USA1980;**77**(12):7415-9.

2. Joseph A, Sparono. HIV and HTLV-1 Associated Malignancies. 2001. p. 19-53.

3. Uchiyama T. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu Rev Immunol*1997;**15**:15-37.

4. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*1985;**2**(8452):407-10.

5. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*1986;**1**(8488):1031-2.

6. Gessain A, Hollsberg P, Hafler DA. *Epidemiology of HTLV-I and associated diseases Human T-cell lymphotropic virus I*. NY: John Wiley and Sons 1996. p. 34-64.

7. Safai B, Huang JL, Boeri E, Farid R, Raafat J, Schutzer P, et al. Prevalence of HTLV type I infection in Iran: a serological and genetic study. *AIDS Res Hum Retroviruses*1996;**12**(12):1185-90.

8. Abbaszadegan MR, Gholamin M, Tabatabaee A, Farid R, Houshmand M, Abbaszadegan M. Prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 among blood donors from Mashhad, Iran. *J Clin Microbiol*2003;**41**(6):2593-5.

9. Kawase K, Katamine S, Moriuchi R, Miyamoto T, Kubota K, Igarashi H, et al. Maternal transmission of HTLV-1 other than through breast milk: discrepancy between the polymerase chain reaction positivity of cord blood samples for HTLV-1 and the subsequent seropositivity of individuals. *Jpn J Cancer Res*1992;**83**(9):968-77.

10. Mahieux R, Pise-Masison C, Gessain A, Brady JN, Olivier R, Perret E, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1- and type 2-infected cells by a caspase-3-dependent mechanism

بررسی وسترن بلات پروتئین نوترکیب با سرم بیماران حاکی از وجود آنتی بادی علیه Tax (علاوه بر آنتی بادی علیه $HTLV_I$) می باشد. بنابراین بررسی میزان آنتی بادی علیه پروتئین Tax می تواند در پیش آگهی بیماری نقش موثری داشته باشد.

تقدیر وتشکر :

بدینوسیله کمال تشکر و قدردانی خود را از پرسنل محترم بخش انگل شناسی و ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی مشهد، گروه باکتری شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، خانم ها و آقایان غزاله صادقیانی، مریم رضائی، جلال بابایی، دکتر مجتبی فتاحی، دکتر جلیل فلاح و تمام عزیزانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش یارای ما بودند، اعلام می نمایم.

involving Bcl-2 cleavage. *Blood*2001;**98**(13):3762-9.
11. Wang X, Miyake H, Okamoto M, Saito M, Fujisawa J, Tanaka Y, et al. Inhibition of the tax-dependent human T-lymphotropic virus type I replication in persistently infected cells by the fluoroquinolone derivative k-37. Mol *Pharmacol*2002;**61**(6):1359-65.
12. Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Tateno H, Takemura F, Tsukahara T, et al. Prevention of adult T-cell leukemia-like lymphoproliferative disease in rats by adoptively transferred T cells from a donor immunized with human T-cell leukemia virus type 1 Tax-coding DNA vaccine. *J Virol*2000;**74**(20):9610-6.
13. Wodarz D, Nowak MA, Bangham CR. The dynamics of HTLV-I and the CTL response. *Immunol Today*1999;**20**(5):220-7.
14. Green PL, Chen ISY. Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al., editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2001.
15. Jeang KT, Giam CZ, Majone F, Aboud M. Life, death, and tax: role of HTLV-I oncoprotein in genetic instability and cellular transformation. *J Biol Chem*2004;**279**(31):31991-4.
16. Marriott SJ, Lemoine FJ, Jeang KT. Damaged DNA and miscounted chromosomes: human T cell leukemia virus type I tax oncoprotein and genetic lesions in transformed cells. *J Biomed Sci*2002;**9**(4):292-8.
17. Azadmanesh K, Roohvand F, Amini S, Arashkia A. The R222K mutation in HTLV1 Tax abrogates stimulatory effect on NFkB pathway(abstract). 3rd Iranian congress on virology; tehran2006.
18. Chiari E, Lamsoul I, Lodewick J, Chopin C, Bex F, Pique C. Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding. *J Virol*2004;**78**(21):11823-32.
19. Peloponese JM, Jr., Iha H, Yedavalli VR, Miyazato A, Li Y, Haller K, et al. Ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax modulates its activity. *J Virol*2004;**78**(21):11686-95.
20. Barmak K, Harhaj E, Grant C, Alefantis T, Wigdahl B. Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology*2003;**308**(1):1-12.
21.Bangham CR. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol*2003;**84**(Pt 12):3177-89.
22. Goren I, Tavor E, Honigman A. Gene regulation mediated by interaction between HTLV-1 promoter elements and transcription factors Tax and CREB. *Virology*1999;**256**(2):303-12.
23. Agwale SM, Shata MT, Reitz MS, Jr., Kalyanaraman VS, Gallo RC, Popovic M, et al. A Tat subunit vaccine confers protective immunity against the immune-modulating activity of the human immunodeficiency virus type-1 Tat protein in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*2002;**99**(15):10037-41.
24. Asakura Y, Hamajima K, Fukushima J, Mohri H, Okubo T, Okuda K. Induction of HIV-1 Nef-specific cytotoxic T lymphocytes by Nef-expressing DNA vaccine. *Am J Hematol*1996;**53**(2):116-7.
25. Allen TM, Mortara L, Mothe BR, Liebl M, Jing P, Calore B, et al. Tat-vaccinated macaques do not control simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol*2002;**76**(8):4108-12.
26. Betti M, Voltan R, Marchisio M, Mantovani I, Boarini C, Nappi F, et al. Characterization of HIV-1 Tat proteins mutated in the transactivation domain for prophylactic and therapeutic application. *Vaccine*2001;**19**(25-26):3408-19.
27. Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol*2005 May;**67**(3):289-98.
28. Peti W, Page R. Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost. *Protein Expr Purif*2007 Jan;**51**(1):1-10.
29. Tegel H, Tourle S, Ottosson J, Persson A. Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta(DE3). *Protein Expr Purif*2010 Feb;**69**(2):159-67.
30. Hogema BM, Arents JC, Inada T, Aiba H, van Dam K, Postma PW. Catabolite

repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in Escherichia coli. *Mol Microbiol*1997 May;**24**(4):857-67.
31. Kimata K, Takahashi H, Inada T, Postma P, Aiba H. cAMP receptor protein–cAMP plays a crucial role in glucose–lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*1997;**94**(24):12914.
32. Ishizuka H, Hanamura A, Kunimura T, Aiba H. A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in Escherichia coli. *Mol Microbiol*1993 Oct;**10**(2):341-50.
33. Moses V, Prevost C. Catabolite repression of beta-galactosidase synthesis in Escherichia coli. *Biochem J*1966 Aug;**100**(2):336-53.
34. Wanner BL, Kodaira R, Neidhardt FC. Physiological regulation of a decontrolled lac operon. *J Bacteriol*1977 Apr;**130**(1):212-22.
35. Tagami H, Inada T, Kunimura T, Aiba H. Glucose lowers CRP* levels resulting in repression of the lac operon in cells lacking cAMP. *Mol Microbiol*1995 Jul;**17**(2):251-8.