بهینه‌سازی بیان سازه پلی‌توپیک حاوی ژن‌های E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی در میزبان بیانی *اشرشیاکلی*

آرین رحیمی[۱]، آرش آرش‌کیا[۲]
امیر میرزایی[۳]، حسن نوربازرگان[٤]
سیدعطاالله سادات شاندیز[٥]
رقیه رحیمی[٦]، مهدی مهدوی[۷*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
٤- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
٥- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
٦- گروه ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۷- گروه ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش ایمونولوژی. کدپستی: ۱۳۱٦۹٤۳٥٥۱
تلفن: ٦٦۹٦۸۸٥۷-۰۲۱
E-mail: mahdavivac@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹٤/۰۳/۰۸ پذیرش: ۱۳۹٤/۰٦/۰۸ آنلاین: ۱۳۹٤/۰۸/۲۲

زمینه و هدف: ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) یکی از شایع‌ترین ویروس‌هایی است که در ایجاد سرطان دهانه رحم نقش دارد و پژوهش‌ها نشان داده است که در بیشتر موارد سرطان دهانه رحم، پروتیین‌های E6 و E7 ویروس پاپیلوما وجود دارد. هدف از مطالعه کنونی بهینه‌سازی بیان سازه پلی‌توپیک حاوی ژن‌های E6 و E7 ژنوتیپ‌های مختلف ویروس پاپیلومای انسانی به‌عنوان کاندیدای واکسن بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از مهر ۱۳۹۲ تا شهریور ۱۳۹۳ در بخش ویروس‌شناسی انستیتوپاستور ایران انجام شد. ابتدا نواحی ایمنی‌زای پروتیین‌های E6 و E7 در ژنوتیپ‌های مختلف پاپیلوما ویروس انسانی (HPV16, 18, 31, 45) به‌صورت بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفتند. سازه بیانی سنتتیک کدکننده پروتیین‌های E6 و E7 در *اشرشیاکلی* ترانسفورم شده و سپس بیان پروتیین مربوطه انجام گرفت و به‌منظور بهینه‌سازی بیان پروتیین نوترکیب مورد نظر، دانسیته سلولی، مدت زمان انکوباسیون، دمای رشد، غلظت‌های مختلف isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) و محیط‌های کشت مختلف مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از بهینه‌سازی بیان، بهترین بیان پروتیین نوترکیب مورد نظر در محیط کشت Super Optimal Broth (SOB) (Merck, Germany) به‌دست آمد. در این محیط کشت، بیش‌ترین میزان بیان در OD_{600}=۰/۸ (Optical density)، غلظت ۰/۱ mM از IPTG، زمان انکوباسیون یک ساعت در دمای ۳۷ °C در میزان بیانی (A1) BL21/*اشرشیاکلی* به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیان پروتیین‌های E6 و E7 ژنوتیپ‌های مختلف ویروس پاپیلومای انسانی قابل انجام بوده و در نهایت می‌توان از آن به‌عنوان یک کاندیدای واکسن علیه ویروس استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ویروس پاپیلومای انسانی، پروتیین E6 و E7، واکسن‌های پلی‌توپیک، *اشرشیاکلی*.

مقدمه

سرطان دهانه رحم دومین سرطان شایع پس از سرطان پستان در زنان به‌شمار می‌رود.[۱] ویروس پاپیلومای انسانی، عامل بیش از ۹۰٪ از سرطان‌های دهانه رحم می‌باشد. بیش از ٤۰ گونه ژنوتیپی از این ویروس عفونت‌زا بوده و از بین آنها حدود ۱٥ ژنوتیپ، کارسینوژن هستند که تحت عنوان ژنوتیپ‌های پرخطر نام برده می‌شوند.[۲و۳] در این میان، ژنوتیپ‌های ۱٦ و ۱۸، عامل بیش از ۸۰٪ سرطان‌های مرتبط با این ویروس هستند.[٤] ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی، از سه ناحیه مجزا تشکیل شده است که شامل نواحی کنترلی غیر کدکننده، اولیه و ثانویه می‌باشد. ناحیه اولیه شش پروتیین غیر ساختمانی E1، E2، E4، E5، E6، E7 و ناحیه ثانویه دو پروتیین کپسیدی L1 و L2 را کددهی می‌کند. قدرت سرطان‌زایی ژنوتیپ‌های پرخطر ویروس پاپیلوما، در دو نوع پروتیین E6 و E7 خلاصه می‌شود، که به‌طور دایم در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

سلول‌های سرطانی بیان‌شده و جهت درمان سرطان ناشی از این ویروس مورد توجه قرار گرفته شده است.[۳و۵] بسیاری از پژوهش‌ها، بیان پروتیین‌های E6 و E7 پاپیلوما در بیشتر سرطان‌های دهانه رحم را نشان داده است. این پروتیین‌ها قادر به القای پاسخ‌های ایمنی هستند که در آزمایش‌های ایمونولوژیک قابل ردیابی هستند. امروزه پروتیین‌های E6 و E7 به‌عنوان کاندیدای واکسن علیه پاپیلوما ویروس مورد استفاده قرار گرفته شده است و بنابراین در القای سیستم ایمنی برای اهداف مختلف مفید خواهند بود.[۶و۷]

بیان پروتیین‌های E6 و E7 باعث وقفه در تمایز و چرخه سلول می‌شوند که در این توقف تکثیر اپی‌زومال ویروس در سلول‌های اپی‌تلیالی افزایش می‌یابد و منجر به تشکیل زگیل می‌شود. در سلول اپی‌تلیال آلوده به ویروس پاپیلومای انسانی، سلول‌های پردازشگر آنتی‌ژن درون اپی‌تلیالی حذف می‌شوند.[۸]

پاسخ‌های ایمنی هومورال به‌تنهایی برای از بین بردن عفونت ویروسی کافی نبوده و به پاسخ موثر ایمنی سلولی نیز نیاز دارند. ایمنی هومورال مسئول غیرفعال نمودن ویروس پاپیلومای انسانی است و از انتشار این ویروس جلوگیری می‌کند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که تخریب سلول‌های آلوده به HPV و بهبود ضایعات ناشی از ویروس به‌طور عمده به‌وسیله واکنش‌های ایمنی سلولی انجام می‌گیرد.[۹] پاسخ ایمنی سلولی نسبت به ایمنی هومورال نقش بیشتری در پاسخ موثر علیه ویروس پاپیلومای انسانی داشته و پژوهش‌های اپیدمیولوژیکی و نیز مطالعه روی مدل‌های حیوانی این مساله را تایید می‌کند. در پژوهش‌های مختلف مشخص شده لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک نقش مهمی را در دفاع علیه حذف ویروس، از طریق کشتن مستقیم سلول‌های آلوده ایفا می‌کنند.[۹و۱۰]

در حال حاضر واکسن‌های متفاوتی مانند Virus Like Particle (VLPs)، واکسن‌های پروتیینی نوترکیب، واکسن‌های وکتوری، پروتیین‌های زیرواحدی، واکسن‌های DNA بیان‌کننده پروتیین‌های ساختمانی و غیر ساختمانی علیه ویروس در مراحل کارآزمایی‌های بالینی بر روی انسان قرار دارند.[۱۰] در این میان واکسن‌های چند اپی‌توپی (Polytope vaccine) با متمرکز نمودن پاسخ ایمنی بر اپی‌توپ‌های محافظت شده و یا مهم ویروس پتانسیل خوبی جهت تحریک سیستم ایمنی علیه چندین اپی‌توپ منحصر به سلول‌های $CD4^+$ و $CD8^+$ به‌طور همزمان و کامل اختصاصی را دارا هستند.[۱۱]

هدف از مطالعه کنونی بهینه‌سازی بیان پروتیین نوترکیب چند اپی‌توپی متشکل از اپی‌توپ‌های انتخابی پروتیین‌های E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی بود. بر این اساس، وکتور بیانی کدکننده پروتیین‌های E6 و E7 (الگو گرفته‌شده از ژنوتیپ‌های مختلف پاپیلومای انسانی) طراحی شد تا بتواند توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی علیه پلی‌توپ‌های ویروس پاپیلومای انسانی را داشته باشد. برای این منظور بهینه‌سازی بیان پروتیین‌های E6 و E7 در سیستم بیانی پروکاریوتی جهت دستیابی به واکسنی موثر علیه پاپیلوما ویروسی انسانی انجام گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از مهر ۱۳۹۲ تا شهریور ۱۳۹۳ در بخش ویروس‌شناسی انستیتو پاستور ایران انجام شد.

در این مطالعه، ابتدا به کمک نرم‌افزارهای پیش‌بینی اپی‌توپ مانند (Immune Epitope Database and Analysis Resource, IEDB, La Jolla Institute, CA, USA) و NetMHC (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University, Denmark) و نیز پردازش پروتئازوم استفاده شد. شناسایی و ارزیابی اپی‌توپ‌های Cytotoxic T lymphocytes (CTL) دو پروتیین E6 و E7 شش سروتایپ پرخطر ۱۸، ۱۶، ۳۱ و ۴۵ و دو سروتایپ کم‌خطر شش و ۱۱ ویروس پاپیلومای انسانی که میل اتصال بالاتری برای HLA-A2.1 و H2-Dd قابل ارزیابی در موش BALB/c در ساختارهای چند اپی‌توپی این پژوهش در نظر گرفته شد.

ساختار بیان‌شده به‌گونه‌ای طراحی شد که کمترین اپی‌توپ‌های بینابینی در حد فاصل آنها ایجاد شود و شرایط برای پردازش اپی‌توپ‌ها توسط پروتئازوم و در نتیجه عرضه آنها به بهترین نحو باشد. سازه طراحی‌شده در پلاسمید pET28a (Biomatik Corp., Cambridge, ON, Canada) سنتز شد. در دو انتهای توالی بیان‌شده محل اثر آنزیم‌های محدودکننده *BamHI* و *XhoI* پیش‌بینی شده بود که برای تایید درستی توالی دریافت‌شده از هضم آنزیمی استفاده شد. از آن‌جایی که در ساختار پلاسمید، ژن مقاومت در برابر کانامایسین وجود داشت، تمامی کشت باکتری‌های حاوی پلاسمید در حضور کانامایسین انجام گرفت. میزبان‌های بیانی *اشرشیاکلی (E.coli)* استفاده

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

شده در این پژوهش از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت Luria-Bertani (LB) Broth, Miller (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) در دمای ۳۷ °C کشت داده و در نهایت جهت تهیه تک کلونی از پلیت LB Agar استفاده شد.

ابتدا سویه بیانی *E.coli* BL21 (DE3) آماده گردید و به‌منظور ترانسفورماسیون، ۵۰ ng از پلاسمید حاوی توالی موردنظر به ۲۰۰ µl از باکتری‌های آماده‌شده اضافه شد و عمل ترانسفورماسیون به‌کمک شوک حرارتی انجام گرفت. غربالگری باکتری‌های ترانسفورم شده به‌کمک آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۱۰۰ µg/ml) صورت گرفت. جهت بررسی بیان در سویه‌های مختلف بیانی از سه سویه BL21 (DE3)، BL21 (Plys-S) و BL21 (A1) /*شرشیاکلی* استفاده شد. از تمامی سویه‌ها سلول مستعد تهیه شد و در مرحله بعد به‌روش شوک حرارتی، ترانسفورماسیون صورت گرفت. برای تایید نهایی پروتیین نوترکیب مورد نظر از تکنیک وسترن‌بلات و آنتی‌بادی پلی‌کلونال و ضد دنباله هیستیدنی استفاده شد.

از کشت شبانه سویه بیانی */شرشیاکلی* AI ترانسفورم شده با توالی پلی‌اپی‌توپی مورد نظر در محیط LB Broth و در حضور کانامایسین (۱۰۰ µg/ml) چند کشت تازه انجام گرفت و پس از رسیدن به OD_{600}= ۰/۶–۰/۸ (Optical density) در تمامی آنها جهت بهینه‌سازی غلظت IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) مقادیر متفاوتی از آن در غلظت‌های ۰/۱ mM تا ۱ mM به هر کدام از این کشت‌ها افزوده شد و برای سه تا چهار ساعت در دمای ۳۷ °C ادامه یافت.

پس از آن محتوای کشت هر کدام از ارلن‌ها به‌طور جداگانه سانتریفیوژ و رسوب حاصله جهت انجام تکنیک SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) و مقایسه میزان بیان پروتیین انجام شد.

به‌منظور تعیین غلظت (OD) بهینه باکتری‌ها برای القای بیان پروتیین، کشت‌هایی در OD بین ۱–۰/۶ در محیط کشت LB Broth استریل، دمای ۳۷ °C و در حضور کانامایسین (۱۰۰ µg/ml)، از کشت شبانه سویه بیانی *E.coli* AI ترانسفورم‌شده با توالی چند اپی‌توپی موردنظر انجام گرفت. تعیین غلظت باکتری در هر مورد با کمک NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) انجام گرفت. پس از رسیدن OD باکتری به هر یک از جذب‌های ۰/۶، ۰/۸ و یک به کشت حاصل از هر یک به‌طور جداگانه برای القای بیان پروتیین غلظت بهینه IPTG اضافه شد و میزان بیان در هر مورد به‌کمک SDS-PAGE ارزیابی شد.

به‌منظور تعیین بهترین زمان انکوباسیون پس از القا با غلظت بهینه IPTG برای به‌دست آوردن بالاترین میزان بیان پروتیین، انکوباسیون در زمان‌های مختلف یک تا شش ساعت پس از القا و در دمای ۳۷ °C انجام گرفت. پس از سپری شدن هر بازه زمانی ۱ ml از کشت باکتری رسوب داده شد و میزان بیان پروتیین مورد بررسی قرار گرفت.

در پژوهش کنونی به‌منظور بررسی وضعیت رشد باکتری و میزان بیان پروتیین، چند محیط کشت مرسوم *E.coli* شامل محیط‌های کشت LB Broth، 2x YT، Super Optimal Broth (SOB) حاوی ترکیبات با فرمول ۳/۲٪ پپتون، ۲٪ عصاره مخمر، ۰/۵٪ سدیم کلرید و محیط کشت Terrific Broth (TB) با فرمول ۱/۲٪ پپتون، ۲/۴٪ عصاره مخمر، ۷۲ mM دی پتاسیم فسفات مورد مقایسه قرار گرفتند (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

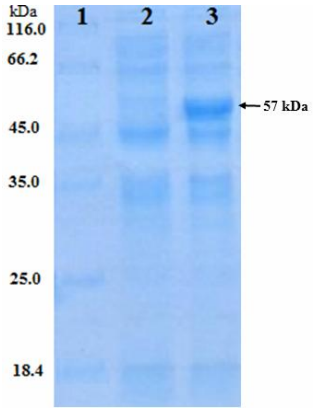
یافته‌ها

در این مرحله دُمین‌های مختلف شش ژنوتایپ مختلف HPV با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف بیوانفورماتیکی از لحاظ ایمنی‌زایی مورد بررسی قرار گرفت و بهترین مناطق از نظر ایمنی‌زایی انتخاب شد. به‌منظور تایید حضور پلاسمید مورد نظر در باکتری *E.coli* پس از ترانسفورماسیون، از آنجایی که پلاسمید موردنظر حاوی ژن مقاومت به کانامایسین بود، غربالگری باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط LB Broth حاوی کانامایسین (۱۰۰ µg/ml) انجام گرفت و به‌عنوان کنترل از کشت باکتری ترانسفورم نشده در محیط گفته‌شده نیز استفاده شد.

براساس انتظار، صرفا باکتری ترانسفورم‌شده توانایی رشد در محیط کشت حاوی کانامایسین را داشتند. پس از القای سلول توسط IPTG، نمونه‌های باکتری رسوب داده شد و میزان بیان پروتیین به‌کمک تکنیک SDS-PAGE بررسی شد. پروتیین نوترکیب موردنظر با اندازه مولکولی ۵۷-kDa در نمونه‌های القا شده وجود داشت (شکل ۱).

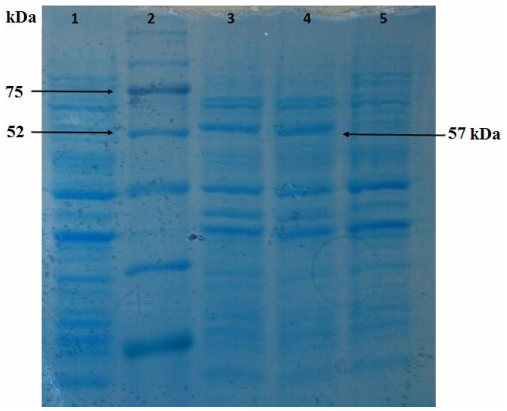
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، باند قهوه‌ای پروتیین نوترکیب موردنظر در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

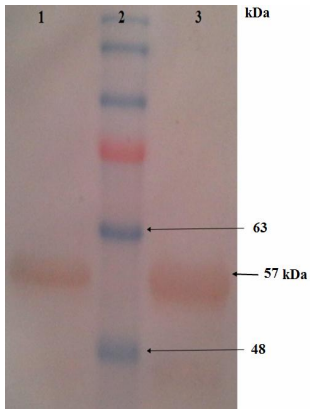


شکل ۱: بررسی بیان پروتیین نوترکیب بر روی ژل SDS-PAGE رنگ‌آمیزی‌شده با رنگ کوماسی‌بلو

ستون ۱: نشانگر پروتیین SM 0671 (Fermentas Molecular Biology Solutions, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)، ستون ۲: نمونه پیش از القا، ستون ۳: نمونه پس از القا

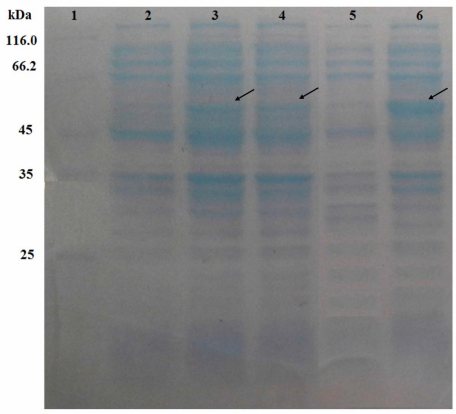


شکل ۳: بهینه‌سازی بیان پروتیین نوترکیب موردنظر در سویه‌های مختلف بیانی (پیکان‌ها بیانگر پروتیین نوترکیب موردنظر می‌باشند). ستون ۱: نشانگر پروتیین (SM0671)، ستون ۲: نمونه پیش از القا BL21 (DE3)، ستون ۳: نمونه پس از القا BL21 (DE3)، ستون ٤: نمونه پس از القا BL21 (plys-s)، ستون ٥: نمونه پیش از القا BL21 (AI)، ستون ٦: نمونه پس از القا BL21(AI)



شکل ۲: وسترن‌بلات پروتیین ۵۷-kDa کیلودالتونی نوترکیب

ستون ۱: وسترن‌بلات با آنتی‌بادی ضد دنباله هیستیدینی، ستون ۲: مارکر پروتیین، ستون ۳: وسترن‌بلات با آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی



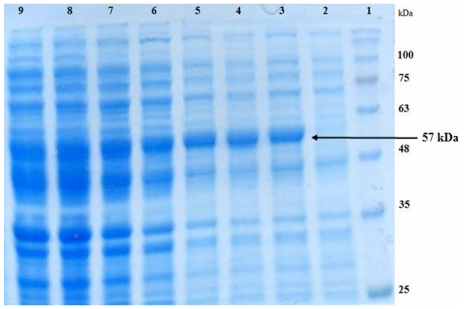
شکل ٤: بررسی بهینه‌سازی غلظت باکتری *E.coli* BL21 (DE3)

ستون ۱: نمونه پیش از القا، ستون ۲: نشانگر پروتیین (SM0671)، ستون ۳: القا در OD:۰/٦، ستون ٤: القا در OD: ۰/۸، ستون ٥: القا در OD:۱

کاغذ Polyvinylidene difluoride (PVDF) با اندازه ۵۷-kDa مشاهده شد (شکل ۲). در مورد بیان سلول‌های القا شده توسط mM IPTG ۱ در دمای ۳۷ °C در محیط کشت LB نتایج نشان داد که سویه بیانی BL21 (A1)/*شرشیاکلی* بیشترین بیان را داشته در صورتی که میزان بیان در دو سویه BL21(DE3)، BL21 (Plys-S)/*شرشیاکلی* تفاوتی وجود نداشت (شکل ۳).

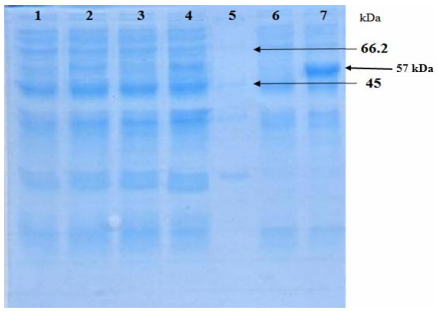
بیان پروتیین نوترکیب موردنظر در غلظت‌های mM ۰/۱ تا mM ۱/۲ IPTG نیز نشان داد که بیشترین میزان بیان در غلظت بین mM ۰/۱ تا mM ۱ بود (شکل ٤). میزان بیان نوترکیب در غلظت‌های مختلف باکتری بررسی شد که بیشترین میزان بیان OD_{600}= ۰/۸ (Optical density) به‌دست آمد (شکل ۵).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]



شکل ۵: بررسی بهینه‌سازی مدت زمان القای بیان با IPTG

ستون ۱: نشانگر پروتیین (SM0671)، ستون ۲: نمونه پیش از القا، ستون ۳: نمونه پس از القا پس از یک ساعت، ستون ٤: نمونه پس از القا پس از دو ساعت، ستون ۵: نمونه پس از القا پس از ۳ ساعت، ستون ٦: نمونه پس از القا پس از چهار ساعت، ستون ۷: نمونه پس از القا پس از ۱۰ ساعت، ستون ۸: نمونه پس از القا پس از ۱٦ ساعت، ستون ۹: نمونه پس از القا پس از ۲٤ ساعت



شکل ٦: بررسی بهینه‌سازی نوع محیط کشت

ستون ۱: محیط 2xYT، ستون ۲: محیط LB Broth، ستون ۳: محیط کشت Terrific Broth (TB)، ستون ٤: نشانگر پروتیین (SM0671)، ستون ۵: نمونه پیش از القا، ستون: ٦: محیط SOB

شکل ٦ نشان می‌دهد که بیان پروتیین از همان ساعت اول در بالاترین سطح نشان داده شد و تفاوتی بین بیان پروتیین در ساعت‌های مختلف وجود نداشت. بیان سلول‌های القا شده توسط ۱ mM IPTG در دمای ۳۷ °C در چهار محیط کشت مختلف نشان داد که در بیشترین بیان در محیط کشت SOB مشاهده شد که نتایج آنها در شکل ٦ نشان داده شده است.

بحث

در پژوهش کنونی، سلول‌های مختلف صلاحیت‌دار *اشرشیاکلی* (سویه‌های BL21 (DE3)، BL21 (pLysS) و BL21-AI) ترانسفورم شد. پس از القای بیان در شرایط متعارف و بیان پروتیین نوترکیب توسط روش SDS-PAGE بررسی شد و شرایط بیان در جهت بالا بردن میزان بیان پروتیین نوترکیب بهینه‌سازی شد. بیشترین میزان بیان در سویه مهندسی‌شده AI/*اشرشیاکلی* مشاهده شد در صورتی که تفاوت زیادی در میزان بیان در دو میزبان BL21(DE3) pLysS و BL21 دیده نشد. بدین‌ترتیب که القای بیان پروتیین نوترکیب به‌منظور صرفه‌جویی، با غلظت بهینه‌شده ۱ mM IPTG صورت گرفت و بیشترین میزان بیان در ابتدای فاز لگاریتمی یعنی OD_{600}= ۰/٦–۰/۸ باکتری‌های در حال رشد به‌دست آمد چراکه سلول در این مرحله بیشترین میزان تکثیر را دارد.

سوش BL21-AI برای افزایش سطح بیان پروتیین نوترکیب توسط هر وکتور بیانی مستقر بر روی T7 مناسب است. برای اینکه ژن T7 RNA پلیمراز در داخل لوکوس araB در اپرون آرابینوز (Arabinose operon) وارد شده است. بیان T7 RNA پلیمراز می‌تواند به‌وسیله قندهایی مثل ال–آرابینوز (L-arabinose) و گلوکز تنظیم شود. در غیاب گلوکز، بیان پایه‌ای پروموتور araBAD به‌طور کلی کم است.[۱۲و۱۳] همچنین گلوکز اضافی نیز بیان پروموتور araBAD را به‌وسیله کاهش سطح 3,5-c AMP کاهش می‌دهد[۱٤] که نتایج ما تاییدکننده این مطلب است که بیان پروتیین نوترکیب در غلظت ۰/۱٪ گلوکز محیط کشت و ۰/۲٪ ال–آرابینوز بیشتر شده بود. افزون بر این تعیین بهترین غلظت القاکننده ال–آرابینوز و نیز زمان القای باکتری‌ها در چرخه رشد (OD_{600}) و مدت زمان انکوباسیون پس از القا و همچنین میزان گلوکز محیط کشت شرایط مناسب بیان را روشن ساخت.

از پژوهش‌های فراوانی که دو پروتیین E6 و E7 را به‌عنوان کاندیدا انتخاب کرده‌اند می‌توان به مطالعه Yan و همکارانش اشاره کرد که با طراحی DNA واکسن، پاسخ‌های ایمنی سلولی به پپتیدهای E7 و E6 پاپیلوماویروس تیپ ۱٦ را ارزیابی کردند و نشان دادند که پاسخ‌های ایمنی سلولی به پپتید E7 و E6 ارتباط معناداری با بهبودی بیماری دارد.[۱۵]

در پژوهش کنونی دو پروتیین E6 و E7 تنها از یک ژنوتایپ

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

ویروس پاپیلوما مورد بررسی قرار گرفته بود در صورتی که در مطالعه ما پروتیین‌های E6 و E7 از ژنوتایپ‌های مختلف ویروس پاپیلوما مورد مطالعه قرار گرفته است و در صورت تولید واکسن کاندید، از حفاظت‌بخشی بیشتری برخوردار می‌باشد. در مطالعه Li، پروتیین‌های E6 و E7 را به‌کمک IPTG در میزبان بیانی Rosseta بیان گرفته و پس از تخلیص به موش C57BL/6 تزریق کردند و پس از آلوده‌سازی به موش با سلول TC-1 نشان دادند که واکسیناسیون با HPV16 E6 یا پروتیین E7 توانایی ایجاد مصونیت خاص در برابر رشد تومور را داشته است.[۱۶] Huang و همکارانش، یک واکسن DNA کدکننده پروتیین شوک حرارتی ۶۰ که با آنتی‌ژن‌های E6 و E7 ویروس پاپیلوما جفت شده بود را ساخته و ایمنی‌زایی آن را در موش مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که پروتیین نوترکیب موردنظر دارای توانایی مناسب برای تحریک سیستم ایمنی علیه پروتیین‌های E6 و E7 می‌باشد.[۱۷]

اما مهم‌ترین واکسنی که در دست بررسی است در مطالعه Merck و همکارانش است که واکسن ساخته شده یک واکسن نانووالنت می‌باشد که محتوی VLPهای ۹ نوع از HPVهای ۶، ۱۱، ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۴۵، ۵۲، ۵۸ می‌باشند. این پژوهش در حال حاضر در فاز III آزمایشات بالینی بوده و نتایج آن به‌تدریج منتشر می‌گردد.[۱۸]

به این دلیل که تولید بالای پروتیین نوترکیب یکی از نکات مهم در تهیه کاندیدای واکسن می‌باشد، بهینه‌سازی تولید و تخلیص پروتیین امری مهم در این زمینه می‌باشد. جهت تولید این پروتیین به‌صورت نوترکیب وکتورهای پلاسمیدی زیادی وجود دارد که در این مطالعه از سیستم وکتور pET28a استفاده شد که از نظر کارآمدی و تولید پروتیین نوترکیب بازدهی پذیرفتنی داشت. در این مطالعه برای بهینه‌سازی بیان پروتیین نوترکیب از محیط کشت‌های مختلف، میزبان بیانی، غلظت‌های مختلف IPTG، ODهای باکتری در شرایط مختلف مورد استفاده قرار گرفت تا بهترین شرایط برای بیان انتخاب شود.

در ادامه می‌توان به‌دنبال تخلیص پروتیین نوترکیب حاصله و ارزیابی ایمنی‌زایی آن به‌عنوان یک کاندیدای واکسن علیه ویروس پاپیلومای انسانی مورد توجه قرار داد.

در این مطالعه نشان داده شد که امکان ساخت و بیان پلی‌اپی‌توپ‌های پروتیین‌های E6 و E7 منشا گرفته از ژنوتایپ‌های مختلف ویروس پاپیلومای انسانی وجود دارد.

سپاسگزاری: این مطالعه بخشی‌از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد با عنوان "طراحی و ساخت واکسن کاندید یونیورسال علیه ویروس‌های پاپیلومای انسانی" با شماره ۱۱۴۳۸۵۳ می‌باشد که از مهر ۱۳۹۲ تا شهریور ۱۳۹۳ در بخش ویروس‌شناسی انستیتو پاستور ایران انجام گردیده است و از حمایت‌های این انستیتو قدردانی می‌گردد.

References

1. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518-27.
2. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370(9590):890-907.
3. Bolhassani A, Mohit E, Rafati S. Different spectra of therapeutic vaccine development against HPV infections. *Hum Vaccin* 2009;5(10):671-89.
4. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* 2007;356(19):1928-43.
5. Madrid-Marina V, Torres-Poveda K, López-Toledo G, García-Carrancá A. Advantages and disadvantages of current prophylactic vaccines against HPV. *Arch Med Res* 2009;40(6):471-7.
6. Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(11):2006-11.
7. Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci* 2009;34(1):113-23.
8. Bellanger S, Blachon S, Mechali F, Bonne-Andrea C, Thierry F. High-risk but not low-risk HPV E2 proteins bind to the APC activators Cdh1 and Cdc20 and cause genomic instability. *Cell Cycle* 2005;4(11):1608-15.
9. Handisurya A, Schellenbacher C, Reininger B, Koszik F, Vyhnanek P, Heitger A, et al. A quadrivalent HPV vaccine induces humoral and cellular immune responses in WHIM immunodeficiency syndrome. *Vaccine* 2010;28(30):4837-41.
10. Lin K, Roosinovich E, Ma B, Hung CF, Wu TC. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunol Res* 2010;47(1-3):86-112.
11. Tine JA, Firat H, Payne A, Russo G, Davis SW, Tartaglia J, et al. Enhanced multiepitope-based vaccines elicit CD8+ cytotoxic T cells against both immunodominant and cryptic epitopes. *Vaccine* 2005;23(8):1085-91.
12. Lee N. Molecular aspects of ara regulation. In: Miller JH, Reznikoff S, editors. The Operon. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1980. p. 389-410.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

13. Lee N, Francklyn C, Hamilton EP. Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(24):8814-8.
14. Miyada CG, Stoltzfus L, Wilcox G. Regulation of the araC gene of Escherichia coli: catabolite repression, autoregulation, and effect on araBAD expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(13):4120-4124.
15. Yan Q, Cheung YK, Cheng SC, Wang XH, Shi M, Hu MH, et al. A DNA vaccine constructed with human papillomavirus type 16 (HPV16) E7 and E6 genes induced specific immune responses. *Gynecol Oncol* 2007;104(1):199-206.
16. Li YL, Qiu XH, Shen C, Liu JN, Zhang J. Vaccination of full-length HPV16 E6 or E7 protein inhibits the growth of HPV16 associated tumors. *Oncol Rep* 2010;24(5):1323-9.
17. Huang CY, Chen CA, Lee CN, Chang MC, Su YN, Lin YC, et al. DNA vaccine encoding heat shock protein 60 co-linked to HPV16 E6 and E7 tumor antigens generates more potent immunotherapeutic effects than respective E6 or E7 tumor antigens. *Gynecol Oncol* 2007;107(3):404-12.
18. Gattoc L, Nair N, Ault K. Human papillomavirus vaccination: current indications and future directions. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2013;40(2):177-97.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

TUMJ Tehran University Medical Journal, December 2015; Vol. 73, No. 9: 624-631 Original Article

Optimization the expression of human papilloma virus E6 and E7 polytopic construct in E. coli expression system

Arian Rahimi M.Sc.[1]
Arash Arashkia Ph.D.[2]
Amir Mirzaie Ph.D.[3]
Hassan Noorbazargan M.Sc.[4]
Seyed Ataollah Sadat Shandiz Ph.D.[5]
Roghayeh Rahimi Ph.D.[6]
Mehdi Mahdavi Ph.D.[7*]

1- Department of Sciences, Islamic Azad University of Urmia, Urmia, Iran.
2- Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3- Young Researchers Club and the elite of Tehran East, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4- Department of Biotechnology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5- Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
6- Department of Immunology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
7- Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: 12 Farvardin St., Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, P.O.Box: 1316943551
Tel: +98-21-66968857
E-mail: mahdavivac@gmail.com

Abstract

Received: 29 May 2015 Accepted: 30 Aug. 2015 Available online: 13 Nov. 2015

Background: Human papilloma virus is a DNA virus from the papillomavirus family that is most prevalent in human cervical cancers and many studies showed the E6 and E7 proteins are present in the majority of cervical cancer cases. Development of universal HPV peptide-based vaccine with more serotypes coverage has considerable value. The aim of the study was to design a multi-epitope universal vaccine for major HPV based on E6 and E7 proteins and optimization the expression of polytopic construct contains E6 and E7 genes from different genotypes of human papilloma virus as a candid vaccine.

Methods: In this experimental study that was carried out in Pasteur Institute of Iran, Virology Department from October 2013 to November 2014. In order to design the polytypic construct, we predicted the most probable immunogenic epitopes of E6 and E7 from common high risk HPV16, 18, 31, 45 along with high prevalent type 6 and 11 using bioinformatics methods. The synthetic pET28a expression vector harboring E6 and E7 protein was transformed into Escherichia coli hosts and its expression was analyzed by SDS-PAGE and western blotting. Finally, in order to expression optimization of recombinant protein, cell density, induction time, growth temperature, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) concentration and cultures media were studied.

Results: In the present study the recombinant fusion protein was expressed successfully and the highest expression of target protein was achieved in super broth medium containing 0.1% glucose and 0.2% L-arabinose. In Super broth medium, the optimum condition for recombinant protein expression was occurred at OD600 of 0.8, 0.1mM IPTG, one hour's incubation time at 37 °C and BL21 (A1) host.

Conclusion: The results of this study show that the optimum expression of E6 and E7 proteins from different genotypes of human papilloma virus can be performed. Moreover, by purification of recombinant protein and evaluation of its immunogenicity in mice, it can be used as a vaccine candidate against the human papilloma virus.

Keywords: human papilloma virus, E6 and E7 proteins, polytopic vaccine, *E.coli*.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]