مجلهٔ علوم پزشکی مدرس
دورهٔ ۹ ، شمارهٔ ۱: از ۹ تا ۱۸
بهار ۱۳۸۵

کلون سازی، تعیین ترادف و بیان ژن Core ویروس هپاتیت C جدا شده از یک بیمار ایرانی مبتلا به هپاتیت مزمن

نسرین راستگو[۱]، علی کرمی[۲*]، فرزانه صباحی[۳]

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دکتری تخصصی بیوتکنولوژی، دانشیار دانشگاه علوم‌پزشکی بقیةالله، تهران، ایران
۳- دکتری تخصصی ویروس شناسی، دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: ویروس هپاتیت C یکی از مهمترین عوامل ایجادکنندهٔ هپاتیت حاد ومزمن، سیروز و سرطان کبد در سطح جهان محسوب می‌شود. به دلیل روند رو به رشد ابتلا به HCV در سطح دنیا تحقیقات گسترده‌ای در نقاط مختلف جهان برای افزایش کیفیت روشهای تشخیصی و تعیین ژنوتیپ ویروس در حال انجام است.

روشها: در این تحقیق ناحیه ژنی مربوط به پروتئین نوکلئوکپسید ویروس (ژن core) که یک ناحیه بسیار حفاظت شده درطول ژنوم ویروس است، از سرم یک بیمار ایرانی با روش RT-PCR جدا شده و پس از کلون‌سازی در وکتور pUC ۱۸ با پرایمرهای یونیورسال تعیین ترادف شد. به منظور تولید پروتئین نوترکیب Core ژن تعیین ترادف شده در وکتور بیانی PET ۲۸ A کلون شد و پلاسمید نوترکیب حاصل به باکتری (DE ۳) BL ۲۱ منتقل گردید.

نتایج و بحث: نتیجه تعیین ترادف نشان داد که ژن Core جداشده از یک بیمار ایرانی ۹۶ درصد شباهت با سویه ۱a و ۹۵ درصد شباهت با سویه ۱b ویروس هپاتیت C دارد. این نتیجه با نتایج سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه مطابقت دارد. وجود باند ۲۳/۵کیلودالتون در ژل SDS-PAGE و تست وسترن بلات با آنتی‌بادیهای مونوکلونال بیان پروتئین Core را اثبات نمود. با تولید انبوه این پروتئین، می‌توان از آن برای استفاده در کیتهای تشخیصی بهره جست.

کلید واژگان: هپاتیت C، ژن Core، تعیین ترادف، بیان پروتئین Core

۱- مقدمه

ویروس هپاتیت C که تقریبا ۱ درصد جمعیت جهان را آلوده کرده، مهمترین عامل به‌وجود آورنده هپاتیت غیر A وB پس از تزریق خون، محسوب می‌شود. در بیش از ۷۵ درصد موارد عفونت با HCV، بیماری پیشرفت کرده و به مرحلهٔ مزمن و سیروز کبدی می‌رسد. حدود ۵ درصد موارد نیز، خطر ابتلا به سرطان کبد برای فرد آلوده وجود دارد [۲،۱]. ویروس هپاتیت C یک ویروس RNA دار تک رشته‌ای مثبت، متعلق به خانواده فلاوی ویروسهاست[۱]. ژنوم این ویروس بسیار متنوع بوده که بر

* **نشانی مکاتبه**: تهران، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیةالله، بخش بیوتکنولوژی و بیولوژی مولکولی، تلفن: ۸۸۰۵۷۰۲۳ ، صندوق پستی ۵۸۱-۱۹۹۴۵ ، دورنگار ۸۸۰۳۹۸۸۳
E-mail: Alika95@nregeb.ac.ir

1. Flaviviruses

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

اساس این تنوع به شش ژنوتایپ اصلی طبقه‌بندی می‌شود. در بین این ژنوتایپها موقعیت نوکلئوتیدی روی ژنوم ۳۱ تا ۳٤ درصد تفاوت نشان می‌دهند. هر گروه ویروسی به چند زیر گروه تقسیم می‌شود که ترادف نوکلئوتیدی در آنها ۲۰ تا ۳۰ درصد تفاوت دارند[۳]. RNA ژنومی‌حدود ۹۵۰۰ bp طول دارد و از یک چهارچوب خواندنی بزرگ تشکیل شده است که یک پروتئین با طول ۳۰۱۰ تا ۳۰۳۳ اسید آمینه را کد می‌کند [٤،٥]. ترادف کدکنندهٔ ژنوم به دو ناحیه غیرکدشوندهٔ ´۵ و ´۳ به نام ناحیه UTR ختم می‌شود[٦]. ناحیه ژنومی‌کدکنندهٔ پروتئین core ویروس HCV در انتهای ´۵ ژنوم پس ازناحیهٔ UTR قرار دارد. پروتئین core از طریق یک سیگنال پپتید موجود در غشای شبکه آندوپلاسمی‌به کمک پروتئازهای سلولی از پلی پروتئین جدا می‌شود [۷]. این پروتئین یک مولکول هیدروفیل با بار مثبت است که حدود ۲۰ درصد آن را ریشه‌های لیزین و آرژنین تشکیل می‌دهند که از طریق این اسید آمینه‌های با بار مثبت به ژنوم، که دارای بار منفی است، متصل می‌شوند[۸]. طول این ژن ۵۷۳ باز است که با نوکلئوتید ۳٤۲ که اولین باز کدن شروع ATG است آغاز شده و تا نوکلئوتید ۹۱٤، که آخرین باز باقیماندهٔ آرژنین است، ادامه دارد. مطالعات نشان می‌دهند که ناحیهٔ کدکنندهٔ پروتئینcore در ژنوم ویروس بسیار حفاظت شده است و درصد جهش در این ناحیه بسیار کم است بنابراین در مطالعات تعیین ژنوتیپ حایز اهمیت است [۹]. از طرفی پروتئینcore در ایجاد پاسخ ایمنی هم بسیار مؤثر ظاهر شده است. در یک بررسی وجود ٤ اپی‌توپ آنتی‌ژنی در پروتئینcore شناسایی شده که قادر به ایجاد پاسخ ایمنی همورال و القای تولید آنتی‌بادی ضد این پروتئین ویروسی می‌باشد [۱۰]. همچنین اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی القاکنندهٔ لنفوسیتهای T سیتوتوکسیک ضد ویروسی هم در انتهای کربوکسیل پروتئین core در محل اسید آمینه‌های ۱۲۱ تا ۱٤۰ شناسایی شده است [۱۱]. از طرفی چندین بررسی نشان داده است که در تستهای سرم‌شناسی برای تشخیص آنتی‌بادیهای ضد HCV آنتی‌ژن core بسیار حساستر از آنتی‌ژنهای موجود دیگر از جمله C-۱۰۰ (پپتید مشتق از پروتئین NS_3-NS_4) عمل می‌کند [۱۳،۱۲]. و نیز به دلیل درصد بالای حفظ‌شدگی در این پروتئین می‌توان سیستمهای تشخیصی بر پایهٔ پروتئینcore طراحی کرد که از حساسیت و ویژگی بسیار بالاتری برخوردار باشند [۱٤]. در این تحقیق ژن core از سرم یک بیمار ایرانی با هپاتیت مزمن جداسازی و ردیف نوکلئوتیدی آن تعیین شده است و با ترادف ژنی موجود در بانک ژنی مقایسه شد. ادامه کلون کردن و بیان ژن Core به منظور استفاده در سیستمهای تشخیصی نیز انجام گرفت.

۲- مواد و روشها

۲-۱- استخراج RNA

نمونه سرم از یک بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن که با تستهای سرم شناسی و کیتهای تجاری ELISA و RIBA وجود آنتی‌بادیهای ضد HCV در آنها مثبت و تأیید شده بود، تهیه شد.

استخراج RNA ژنومی‌از سرم فرد بیمار anti-HCV مثبت با استفاده از کیت استخراج RNA به نام تجاری RNX_{TM}-plus (شرکت سیناژن) انجام شد. روش انجام کار به این ترتیب بود که ۵۰µl نمونه سرم به ٤۵۰µl محلول استخراج سرد اضافه شد و بعد از ورتکس کردن به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس ۱۰۰µl کلروفرم-ایزوآمیل‌الکل (۲٤:۱) به مخلوط اضافه شده و پس از هم زدن در ۱۲۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. به فازآبی یک حجم ایزوپروپانل اضافه شده و با واژگون کردن لوله آزمایش هم زده شد و ۲۰ دقیقه در ۲۰°C- قرار داده شد و پس از مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. پس از شستشوی رسوب با اتانل ۷۵ درصد و خشک کردن آن در آب مقطر تزریقی تیمار شده با DEPC حل شد.

۲-۲- ساخت cDNA

ساخت cDNA مربوط به ژن core با پرایمرهای ویژه (۱bext و ٤ext) انجام شد. این پرایمرها از روی نقشه ژنتیکی ژنوم سویه‌های ۱b و ٤ ویروس هپاتیت C طراحی شده بود. ترادف این پرایمرها مکمل ناحیهٔ فرودست ژن core ویروس هپاتیت C بود. به منظور تکثیر cDNA حاصل دو سری پرایمر حاوی جایگاه برش آنزیمی برای آنزیمهای محدودگر *Eco*RI و *BamH*I طراحی شد. پرایمر Forward که دارای جایگاه برش مخصوص آنزیم *Eco*RI در انتهای ۵ درجه خود بود، مکمل ناحیه فرادست ژن core (ناحیه ´۵UTR) که ناحیهٔ حفظ شده در ژنوم است، بود. پرایمرهای معکوس که دارای جایگاه برش آنزیمی‌برای آنزیم *BamH*I بود، مکمل ناحیه فرودست ژن core و بر اساس نقشه ژنتیکی سویه‌های ۱b و ٤ طراحی شدند (به‌ترتیب پرایمرهای R_1 و R_2). تکثیر cDNA با پرایمرهای F و R_1 و نیز F و R_2 انجام گرفت.

۲-۳- کلون‌سازی ژن Core در پلاسمید pUC18

محصول PCR قطعات cDNA پس از خالص‌سازی با روش فنل

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

کلروفرم، با آنزیمهای *EcoR*I و *BamH*I بریده شد. به این ترتیب که به ازای هر میکرولیتر محصول PCR تخلیص شده یک واحد از هر یک از آنزیمهای فوق اضافه شده و به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷°c قرار داده شد. محصول هضم حاصل با روش فنل-کلروفرم تخلیص شد. پلاسمید pUC۱۸ نیز با دو آنزیم فوق برش داده شد و محصول هضم از روی ژل آگاروز ۱ درصد تخلیص گشت. سپس به نسبت مولی ۱:۳ محصول برش و DNA پلاسمیدی توسط آنزیم T٤ DNA ligase به هم متصل شدند. واکنش اتصال به مدت ۱٦ ساعت در دمای ۱٦°c انجام گرفت. محصول الحاق به باکتری DH٥α منتقل شد و در پلیت LB آگار حاوی 7µl از IPTG (۲۰٪w/v) و ٤۰µl از X-Gal (۲۰٪w/v) و آنتی بیوتیک Ampicilin کشت داده شد. از آنجا که سایت کلونینگ وکتور pUC۱۸ در وسط ژن LacZ قرار گرفته است، کلونهای نوترکیب به دلیل عدم فعالیت این ژن کلونیهای سفید رنگ و کلونهای طبیعی ترانسفورم نشده یا کلون نشده کلونیهای آبی رنگ بر روی این محیط افتراقی ایجاد می‌کنند. چندین کلون نوترکیب که در این محیط به رنگ سفید ظاهر شده بودند انتخاب شده و صحت کلونینگ در آنها با روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ۱b و ٥'UTR و هضم آنزیمی با آنزیمهای محدودگر *EcoR*I و *BamH*I تایید شد. برای تأیید توالی صحیح، یکی از پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با پرایمرهای M۱۳/pUC reverse sequencing primer و M۱۳/pUC sequencing primer تعیین ترادف شد (شرکت Primm ایتالیا) و با ترادفهای موجود در بانک ژنی مقایسه گردید.

بیان پروتئین نوترکیب Core در باکتری

ژن HCV Core در سایتهای *HindIII* و *EcoR*I وکتور بیانی pET۲۸A ساب کلون شد. پس از تأیید حضور پلاسمیدهای نوترکیب با PCR و آنالیز هضم آنزیمی‌پلاسمید pET۲۸A-Core به سویه BL۲۱(DE۳) باکتری کشت داده شد. رقت ۱:۱۰۰ محیط کشت در مایع کشت ۲XTY (۱۰g/L yeast extract, ۱٦g/L tripton, ٥g/L NaCl) حاوی کانامایسین (٥۰ uL/m) و گلوکز ۱ درصد قرار داده شد و در انکوباتور ۳۷°c برای ۲ ساعت قرار گرفت و سپس در دور ٤۰۰۰g برای ٥ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب با محیط ۲XTY شسته شده و با اضافه نمودن B-D-thiogalactopyranoside (IPTG) و رساندن غلظت نهایی به ۱mM آماده شد. در مرحله بعدی، باکتری به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸°c قرار گرفت و به‌وسیلهٔ عمل سانتریفوژ و سونیکاسیون، محلول رویی ورسوب حاصل برای تولید پروتیین Core با آنالیز وسترن بلات جمع‌آوری گردید. به طور خلاصه نمونه‌های پروتئینی به چاهکهای ژل پلی آکریل آمید ۱۲/٥ درصد وارد شده و SDS-PAGE انجام گرفت. سپس بر روی غشای PVDF الکتروترانسفر شد. پس از بلوکه کردن غشا به‌وسیلهٔ non-fat dry milk با آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی Core (Biogenesis, UK) و آنتی‌بادی ضد His (Roche, Germany) انکوبه گردید و مشاهده باندهای پروتئینی با استفاده از آنتی‌بادی کونژوگه شده با HRP (DAKO, Denmark) انجام پذیرفت.

۳- نتایج

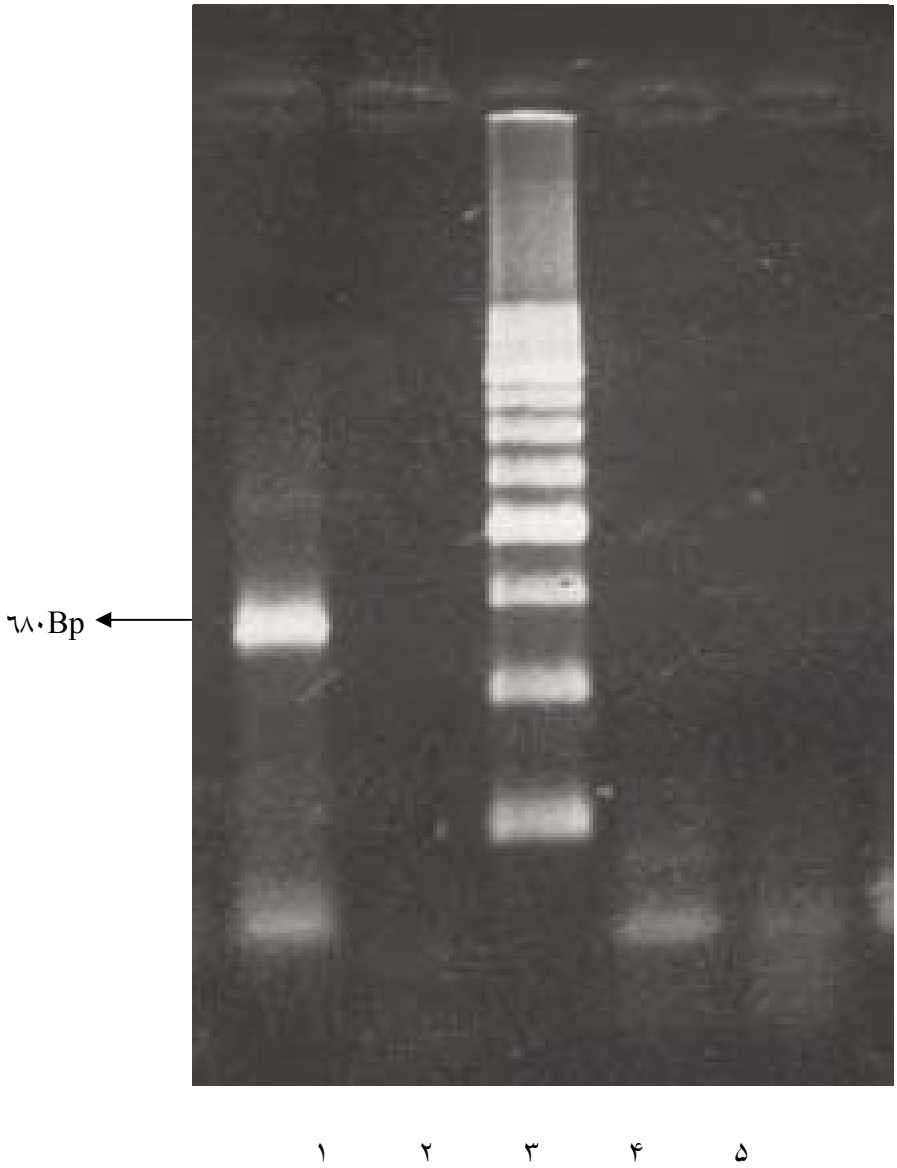
۳-۱- جداسازی ژن core از سرم فرد بیمار anti-HCV مثبت با پرایمرهای ویژه ژنوتیپهای ۱b و ٤ ویروس

RNA ژنومی از سرم بیمار anti-HCV مثبت استخراج شد و جذب آن در طول موج ۲٦۰ اندازه‌گیری شد. سپس با پرایمرهای ٤ext و ۱bext cDNA سنتز شد و به روش PCR با پرایمرهای F و R_1 و نیز F و R_2 تکثیر شد. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که فقط واکنش PCR ای که از پرایمرهای تایپ 1b برای تکثیر استفاده شده بود، جواب مثبت داده و برای پرایمرهای تایپ ٤ نتیجه منفی بود (شکل ۱). همانطور که در شکل مشخص است وجود باند تقریباً bp ٦۸۰ در نمونه‌هایی که از پرایمرهای ۱bext برای سنتز cDNA آنها استفاده شده و بعد با پرایمرهای یونیورسال و ۱b تکثیر شد، نشاندهنده تکثیر ژن Core با این پرایمرهاست. هیچ باندی در لاینهای PCR مربوط به پرایمر ٤ext بر روی ژل دیده نمی‌شود.

۳-۲- کلون‌سازی ژن core در وکتور pUC۱۸ و تعیین ترادف ژن

همانطور که قبلاً اشاره شد محصول PCR ژن Core و نیز وکتور pUC۱۸ با آنزیمهای *EcoR*I و *BamH*I هضم شده و واکنش الحاق و ترانسفورم کردن انجام شد. از چندین کلونی سفید و نیز یک کلونی آبی به عنوان کنترل منفی استخراج پلاسمید صورت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

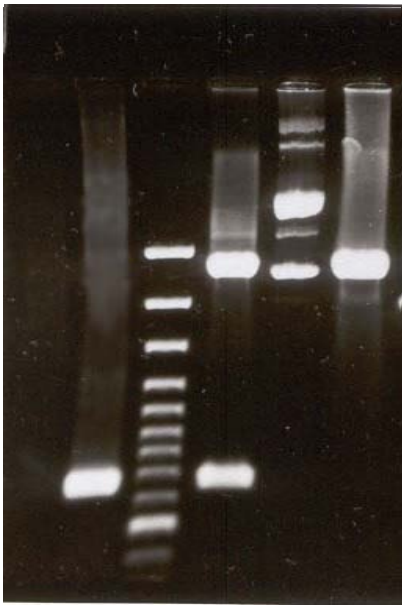


شکل ١ جدا سازی ژن core از سرم بیمار ایرانی

چاهک ١: cDNA ساخته شده با پرایمر ١bext و تکثیر شده با پرایمرهای ٥'UTR,١b، **چاهک ٢:** cDNA ساخته شده با پرایمر ١bext و تکثیر شده با پرایمرهای ٥'UTR,٤ ، **چاهک ٣:** نشانگر وزن مولکولی ٢٥٠ جفت بازی، **چاهک ٤:** cDNA ساخته شده با پرایمر٤ext و تکثیر شده با پرایمرهای ٥'UTR,1b، **چاهک ٥:** cDNA ساخته شده با پرایمر٤ext و تکثیر شده با پرایمرهای ٥'UTR,٤

گرفت و روی ژل آگاروز یک درصد برده شد (شکل ٢). کلونهایی که نسبت به کنترل منفی دارای وزن مولکولی بیشتری بودند به عنوان کلونهای نوترکیب انتخاب شده و با روش PCR و هضم آنزیمی‌صحت کلونینگ در آنها تأیید شد. وجود باند ٦٨٠bp در محصول PCR و نیز هضم آنزیمی با آنزیمهای *EcoR*I و *BamH*I نشان‌دهنده موفقیت کلونینگ بوده است (شکل ٢). یکی از کلونهای نوترکیب با پرایمرهای مخصوص وکتور pUC١٨ از دو نظر تعیین ترادف شد و نتایج کروماتوگرام به‌دست آمده مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه تعیین ترادف نشان داد که حدود ٩٦ درصد همولوژی بین این ترادف با ژن core سویهٔ ١a و ٩٥ درصد شباهت با ژن core سویهٔ ١b وجود دارد (شکل٣ – الف و ب)

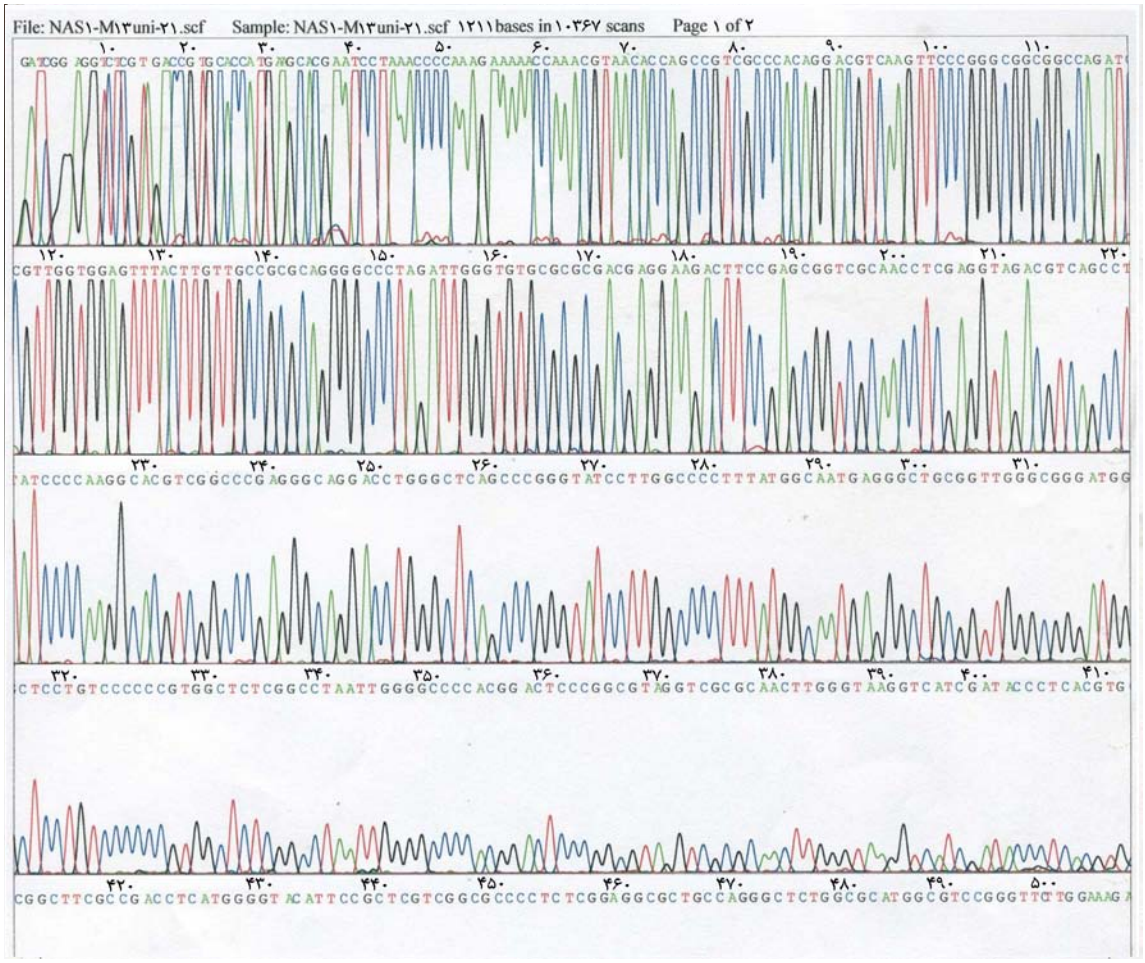
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]



۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶

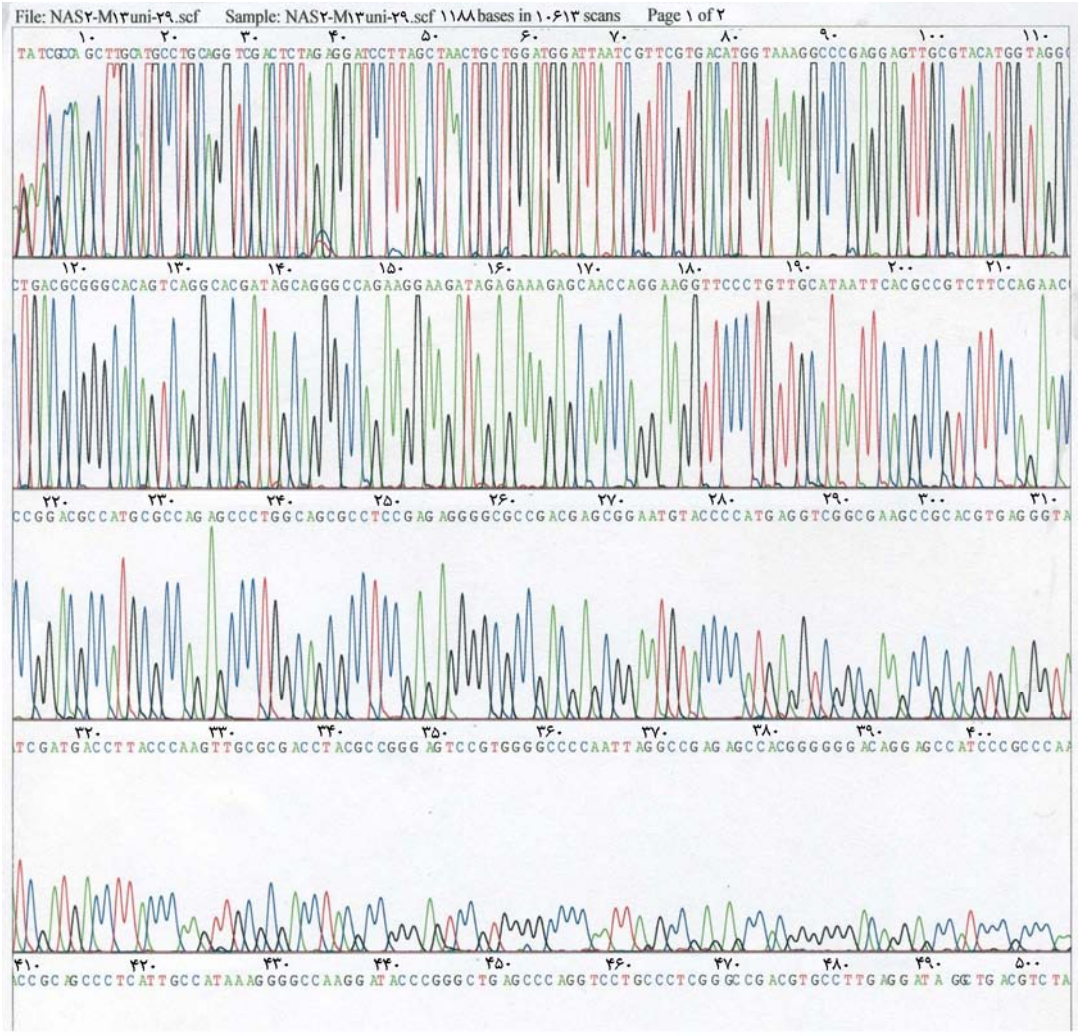
شکل ۲ تأیید صحت کلونینگ با روش PCR و هضم آنزیمی

چاهک ۱: کنترل منفی، **چاهک ۲**: محصول ژن Core ، **چاهک ۳**: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، **چاهک ٤**: محصول هضم آنزیمی rpUC۱۸ با آنزیمهای *Eco*RI و *Bam*HI، **چاهک ٥**: محصول هضم آنزیمی pUC۱۸ با آنزیمهای *Bam*HI, *Eco*RI، **چاهک ٦**: پلاسمید rpUC۱۸ هضم نشده



شکل ۳ – الف نتیجه تعیین ترادف پلاسمید نوترکیب حاوی ژن Core با پرایمر M۱۳ /pUC sequencing primer

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]



شکل۳ - ب نتیجه تعیین ترادف پلاسمید نوترکیب حاوی ژن Core با پرایمر M۱۳/pUC reverse sequencing primer

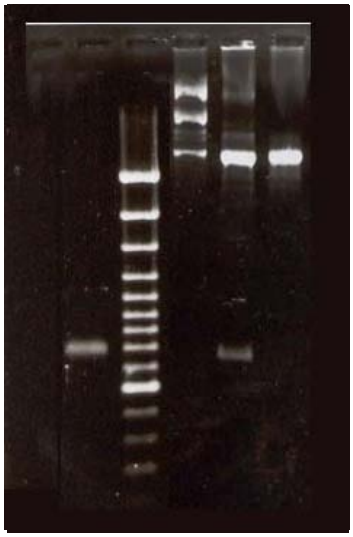
۳-۳- کلون کردن ژن core در وکتور pET۲۸a و بیان در E.Coli

ژن Core تعیین ترادف شده در محل سایتهای آنزیمی *Eco*RI و *Bam*HI در وکتور pET۲۸a کلون شد و نتیجه به‌وسیلهٔ PCR و هضم آنزیمی‌تأیید گردید (شکل ٤). پس از تایید پلاسمید نوترکیب rpET۲۸a ، ترانسفورماسیون در سویه (DE۳) BL۲۱ باکتری E. Coli انجام گرفت. در این باکتری و با استفاده از pET۲۸a ، ژن کلون شده به صورت پروتئین فیوز شده با قطعه پپتیدی حاوی ٦-His بیان می‌گردد. در نتیجه پروتئین Core نوترکیب دارای His-tag در ناحیه انتهایی N بود. نتیجه SDS-PAGE وجود یک پروتئین KD ۲۳/۵ را نشان داد (شکل ۵) و آنالیز وسترن بلات با آنتی بادیهای مونوکلونال (ضد His و اختصاصی Core) بیان پروتئین Core را تعیین نمود (شکل ۶).

٤- بحث

همانطور که ذکر شد، ژنوم ویروس هپاتیت C بسیار متنوع است که بر اساس این تنوع به ٦ ژنوتایپ و حدود ۷۰ زیرگروه طبقه‌بندی می‌شود. مطالعات ژنوتیپی ناحیه‌ای و منطقه‌ای برای تعیین زیرگروههای ویروسی رایج در یک منطقه جغرافیایی، بسیار حایز اهمیت است؛ زیرا شدت بیماری و الگوی درمان با توجه به نوع ژنوتایپ متغیر است. بنابراین با تعیین نوع ژنوتایپ رایج در یک منطقه می‌توان روش درمانی مناسب را انتخاب کرد[۱۵]. ژنوتایپ رایج در آسیای میانه کویت، عراق و عربستان صعودی ژنوتایپ ٤ است [١٦] در حالی که در ترکیه و جنوب شرقی اروپا بیشتر ژنوتایپ ۱b شایع است[۱۷]. با توجه به این اطلاعات پرایمرهایی که طراحی شد از روی ترادف ژنی این دو نوع سویهٔ ویروس که در میان همسایگان ایران شایعتر بود، ساخته شد. در این مطالعه نتایج PCR و تعیین ترادف ژن core

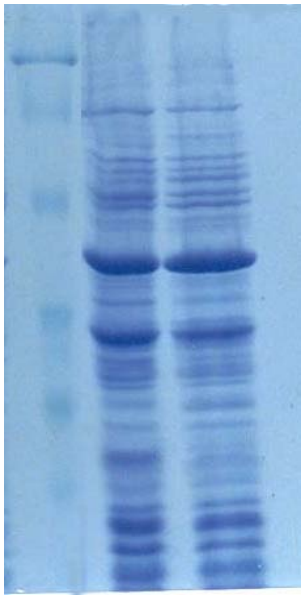
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]



۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶

شکل ٤ تأیید کلونینگ ژن Core در pET۲۸a با روش PCR و هضم آنزیمی

چاهک ۱: کنترل منفی، نتیجه PCR وکتور PET۲۸a با پرایمرهای اختصاصی ژن Core، **چاهک ۲:** نتیجه PCR وکتور rPET۲۸a با پرایمرهای اختصاصی ژن Core، **چاهک ۳:** نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، **چاهک ٤:** محصول هضم آنزیمی rPET۲۸a با آنزیمهای *EcoR*I و *BamH*I، **چاهک ۵:** محصول هضم آنزیمی PET۲۸a با آنزیمهای *BamH*I, *EcoR*I



۱ ۲ ۳

شکل ۵ آنالیز SDS-PAGE پروتئین Core نوترکیب

چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی (از بالا به پایین(KD ۱۹/۵-۲٦-۳۳-٤٦-۸۵-۱۱۸)، **چاهک ۲:** نمونه پروتئین مربوط به rPET۲۸a پس از القا با IPTG، **چاهک۳:** نمونه پروتئین مربوط به PET۲۸a پس از القا با IPTG (کنترل منفی)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱ ۲ ۳

شکل ٦ آنالیز وسترن بلات ژن Core نوترکیب

چاهک ۱: نمونه پروتئین از rPET۲۸a ، **چاهک ۲:** کنترل منفی، **چاهک ۳:** نشانگر وزن مولکولی پروتئین

بیشترین شباهت را با سویه‌های ۱a و ۱b نشان داد. تحقیقی در ایران نیز در سال ۲۰۰۰ انجام شده و با تستهای سرولوژیکی و نیز PCR نشان داد که ژنوتایپهای رایج در ایران ۱a و ۱b هستند[۱۸]. در این تحقیق ژن core برای مطالعه انتخاب شد. علت این امر این بود که پروتئین core در بین سویه‌های مختلف HCV بسیار حفظ شده، به طوری که در مطالعات ژنوتایپینگ حایز اهمیت است. از طرفی پروتئین core در ایجاد پاسخ ایمنی بسیار مؤثر ظاهر می‌شود در یک بررسی وجود ٤ اپی‌توپ آنتی‌ژن در زیرگروه core گزارش شده، در یک تحقیق دیگر یک اپی‌توپ به‌وجودآورندهٔ لنفوسیتهای سیتوتوکسیک در پروتئین core شناسایی شده است [۲۰،۱۹]. این بررسیها نشان می‌دهد که زیرگروه core قادر است پاسخ ایمنی هموژال و سلولی راتحریک کند و از طرفی به دلیل نداشتن جایگاه گلیکولیزاسیون، ساخت پروتئین سنتتیک core با خواص آنتی‌ژنی مشابه با پروتئین طبیعی میسر است.

از طرف دیگر در تستهای سرولوژیکی برای تشخیص آنتی‌بادیهای ضد HCV آنتی‌ژن core بسیار حساستر از آنتی‌ژنهای موجود دیگر مثل C-۱۰۰ عمل می‌کنند. بررسیها نشان می‌دهند که آنتی‌ژن core از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار بوده و به دلیل این که آنتی‌بادی ضد این زیرگروه خیلی زودتر از سایر آنتی‌بادیها یعنی حدود ٤ هفته پس از ورود ویروس به بدن در خون ظاهر می‌شود. بنابراین وجود عفونت HCV خیلی سریعتر تشخیص داده می‌شود[۲۲،۲۱]. بنابراین در طراحی کیتهای تشخیصی آنتی‌ژن core کاندیدی مناسب محسوب می‌شود. در نتیجه می‌توان با بیان این پروتئین به صورت نوترکیب در سلول باکتری و استخراج آن با روشهای مرسوم این آنتی‌ژن را تخلیص کرده و در مقیاس بالا تولید کرد و برای اهداف تشخیصی و نیز پیشگیری از عفونت با HCV از طریق واکسیناسیون به کار برد[۲۳].

۵- منابع

[1] Kiyosawa K, Sodeyama E, Tanaka Y, Gibo K, Koshizama Y, Nakano S, et al. Interrelationship of blood transfusion non A non B hepatitis and hepatocellular carcinoma:analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. Hepatology. 1999, 12: 671-675.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[2] Saito IT, Miyamura A, Ohbayashi H, Harada T, Katayama S, Kikuchi Y, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990, 87: 6547-6549

[3] Kay R, mengji LU, Bellers S, Fumiko C, Yoshida M. Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection. Virus Genes. 2000, 21(3): 179-188

[4] Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. Proc. Natl. Acad, Sci.USA. 1991, 88:2451-55

[5] Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice C. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein. J Virol. 1993, 67:1385-1395

[6] Han JH, Shyamala V, Richman KH, Braver MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp P. Characterization of the terminal region of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5 untranslated region and polyA tails at the 3 end. Proc Natl Acad Sci. 1991, 88:1711-1715

[7] Selby MJ, Choo QL, Berger K, Kuo G, Glazer E, Eckart M, Lee C. Expression identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. J Gen Virol. 1993. 74:1103-1113

[8] Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. Hepatology, 14:381-388.

[9] Yasui K, Wakita T, Tsukijama K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kahara M, Kajita T, Moradpour D, Wands R. The native form and maturation process of hepatitis C Virus core qrotein. J Virol. 72(7):6048-6055. (1998)

[10] Ferroni P, Mascolo G, zaninetti M, Colzani F, Pirisi M, Barbone F, Gasparini V.Identification of four epitopes in hepatitis C virus core protein. J Clinical Microbiol. 1993, 31(2): 1586-1591.

[11] Chen Z, Berkower I, Ching WM, Wang RY, Alter HJ, Shin JW. Identification of a murine CD4 T-lymphocyte response site in hepatitis C virus core protein. Mol Immunol.1996, 33(78): 703-709.

[12] Alberti A, Benvegnu L. Management of hepatitis. J Hepatology, 2003, 38:s104-s118

[13] Muerhoff AS, Jiang L, Shach Do. Detection of HCV Core antigen in human and plasma with an automated chemiluminescent immunoassay. Transfution, 2002, 42:349-356

[14] Stuyrer L.Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. J Gen Virol.1993, 74: 1093-102.

[15] Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, etal. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon alpha therapy: Relationship to genetype of hepatitis C virus. Hepatology, 1992, 16:293-299.

[16] Simmonds P. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and series of subtypes by phylogenic analysis of the NS5 region. J Gen Virol. 1993, 74: 2391-2399.

[17] Lau JY. Signification of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. Lancet. 1993, 341:1501-1504.

[18] Zali MR, Mayumi M, Raoufi M, Noroozi A. Hepatitis C virus genotypes in the Islamic Republic of Iran: A preliminary study. Eastern Mediterranean Health Journal. 2000, 6:372-377.

[19] Kamei A, Tamaki S, Taniyama H, Takamura S, Nishimura Y, Kagawa Y, et al. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. Virology. 2000, 273: 120-126.

[20] Nishimura Y, Kamei A, Furuta S, Tamaki S, Kim G, Adaeli Y, Kuribayashi Y, Matsuura Y, Yasutomi Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus structural proteins under the elongation factor 1-a promoter

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

elicits HCV-specific cytotoxic T-lymphocytes. Vaccine. 2000, 18:675-680.

[21] Tobias G, Hubert M, Muller, Jin YE, Eberhard P, Lorenz T. Characterization of antigenic determinants in the core antigen of the hepatitis C virus. Virology. 1994, 205: 462-469.

[22] Fabrizio F, Giovanna L, Flippo A, Mangano S, Barbisoni F, Bisegna S, et al. Novel assay using total hepatitis C virus (HCV) core antigen quantification for diagnosis of HCV infection in dialysis patients. J Clin Microbiol. 2005, 43: 414-420.

[23] Masahiko T, Hidetsugu S., Makiko H, Kazuhiro A, Hiromasa I. Benefit of hepatitis C virus core antigen assay in prediction of therapeutic response to interferon and Ribavirin combination therapy. J. Clin. Microbiol. 2005, 43: 186-91.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]