

تولید کلون و بررسی بیان توالی همپوشانی از ژن NS3 ویروس هپاتیت C به وسیله سازه بیانی DNA

سید یونس حسینی^۱، فرزانه صباحی^{۲*}، محمد حسین مدرسی^۳، سید محمد مؤذنی^۴، مهدی صابری فیروزی^۵،
مهر داد روانشاد^۶، داوود مهربانی^۷، مجید مجرد^۸

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- دانشیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشکده علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۶- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۷- استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشکده علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۸- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۹/۰۹/۲۹

دریافت مقاله: ۸۹/۰۸/۱۹

چکیده

هدف: هدف تولید یک سازه بیان کننده توالی یک ناحیه همپوشان از ژن NS3 از ویروس ایزوله ایرانی است.
مواد و روش‌ها: ابتدا بخش میانی ژن NS3 با روش Nested-RT-PCR و با استفاده از سرم بیمار مبتلا به ژنوتیپ 1a ویروس هپاتیت C تکثیر شد. بعد از کلون آن درون ناقل کلونینگ TA و غربالگری کلون‌ها براساس روش سفید-آبی و Colony-PCR این کلون‌های منتخب با روش تعیین توالی و هضم آنزیمی با BglIII ارزیابی شد. توالی جدید با استفاده از نرم‌افزار با توالی‌های دیگر مرجع مقایسه و درخت تکاملی ترسیم شد. بخش میانی ژن NS3 تأیید شده و سپس به درون سازه بیانی، کلون شد و کلون‌های مناسب با استفاده از دو نوع Colony-PCR شناسایی شد. ارزیابی نهایی بیان ژن با مشاهده GFP توسط میکروسکوپ فلورسانس، روش RT-PCR و وسترن بلات روی سلول‌های ترانسفکت شده با سازه بیانی تأیید شد.

نتایج: توالی میانی NS3 از روی سرم بیمار تکثیر و نتایج توالی‌یابی و مقایسه ژنی نشان داد که این توالی به توالی‌های مرجع شباهت داشته و در شاخه ژنوتیپ 1 ویروس هپاتیت C قرار دارد. با روش Colony-PCR وجود و نیز جهت ژن درون پلاسمید بیانی تأیید شد. مشاهده GFP توسط میکروسکوپ فلورسانس، روش RT-PCR و وسترن بلات به ترتیب نمایانگر انتقال موفق سازه، بیان ژن و نیز تولید پروتئین در سلول‌های ۲۹۳ بود.
نتیجه‌گیری: سازه بیانی حاوی بخش میانی ژن NS3 که بایستی فاقد فعالیت پروتئازی باشد، نسبت به طول کامل ژن NS3 می‌تواند در القای بهتر ایمنی توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی ژنی در موارد واکسن ویروس هپاتیت C مفیدتر واقع شود.

کلیدواژگان: سازه DNA، ویروس هپاتیت C، ژن NS3

۱- مقدمه

تاکنون واکسن مؤثری برای پیشگیری از ویروس هپاتیت C یا HCV (Hepatitis C Virus) ساخته نشده است، بنابراین این ویروس همچنان از مشکلات مهم بهداشتی به‌شمار می‌رود [۱]. طراحی و ساخت سازه‌های مختلف به‌عنوان واکسن در بیماری هپاتیت نوع C همواره از مهم‌ترین اولویت‌های دانشمندان برای کنترل عفونت محسوب می‌شود.

تاکنون از سیستم‌های رهاسازی مختلف، ژن‌های گوناگون و نیز سازه‌های متنوعی برای القای ایمنی قدرتمند علیه ویروس HCV با هدف درمانی - پیشگیری استفاده شده است [۱، ۲]. از بین کاندیدهای مورد استفاده به‌عنوان واکسن می‌توان به حامل‌های ویروسی و واکسن‌های ژنی بیان‌کننده ژن‌های مختلف ویروس، پپتیدها و پروتئین‌های نو ترکیب اشاره کرد.

پس از گذشت سال‌ها از ایده به‌کارگیری DNA واکسن‌ها (واکسن‌های ژنی) به‌عنوان ابزاری به‌منظور ایجاد ایمنی بر ضد عوامل بیماری‌زا [۳] آزمون و خطاهای بسیاری روی کارایی این نوع واکسن‌ها به‌عمل آمده است [۴، ۵]. در مقایسه با دیگر واکسن‌ها، واکسن‌های ژنی دارای مزایای فراوانی نظیر طراحی و ساخت آسان، تحریک هر دو بازوی سیستم ایمنی، پایداری ساختار در شرایط دمایی و تولید پروتئین مورد نظر درون سلول است [۴، ۵]. بیان درون سلولی آنتی‌ژن منجر به عرضه آن بر سطح مولکول‌های MHC (Major Histocompatibility Complex) کلاس یک و تحریک لنفوسیت‌های CD⁺ خواهد شد که از مهم‌ترین مزایای استفاده از DNA واکسن‌ها است [۴، ۵]. اما با این حال با وجود معایبی چون کارایی پایین آن در انسان [۵]، امروزه پژوهش‌های گسترده‌ای به‌منظور افزایش کارایی این نوع واکسن‌ها در انسان در جریان است [۶-۸].

تاکنون سازه‌های پلاسمیدی حامل ژن‌های مختلف ویروس HCV به‌عنوان واکسن درمانی - پیشگیری برای ایجاد، راه‌اندازی یا ارتقای ایمنی علیه ویروس به‌کارگرفته شده است [۹-۱۱]. ژن‌های غیرساختاری به‌خصوص ژن NS3 (Non-Structural 3) ویروس به دلیل توالی حفاظت شده خود همواره به‌عنوان

آنتی‌ژن مناسبی در واکسن‌های DNA علیه ویروس به‌کار رفته است [۴، ۱۲]. در یک مطالعه پیش‌بالینی، تزریق واکسن DNA حامل ژن‌های غیرساختاری NS3، NS4، NS5 به‌صورت رژیم یادآور منجر به افزایش ایمنی و تحریک طیف زیادی از سلول‌های CD₄ و CD₈ در مدل شامپانزه شد [۵، ۱۲]. در سال ۲۰۰۸ میلادی، یک گروه سوئدی به سرپرستی پروفیسور سالبرگ (Sallberg) با کمک شرکت Tripep اولین واکسن DNA درمانی بیان‌کننده دو ژن NS3-NS4 را در اولین کارآزمایی بالینی روی بیماران فرم مزمن ارزیابی نمودند و نشان دادند که لنفوسیت‌های اختصاصی پس از ۴ تجویز مجزا به‌طور مناسبی تکثیر و گسترش یافته و نقش شوک الکتریکی پس از تجویز در افزایش جذب سازه‌های ژنی و کارایی واکسن بسیار مؤثر است [۵، ۱۳].

محصول ژن NS3 یک پروتئین دوکاره با خاصیت آنزیمی پروتئازی - هلیکازی است [۱۴] که همواره به‌عنوان آنتی‌ژن مناسبی در طراحی‌های واکسن برای HCV به‌کار می‌رود [۵، ۱۲]. مطالعات نشان می‌دهد که ایمنی علیه این پروتئین در بیماران که ویروس را پاک‌سازی کرده‌اند، یافت می‌شود؛ بنابراین این ایمنی از اهمیت زیادی برخوردار است [۱۵]. با این حال از نظر تئوریک به دلیل وجود خاصیت پروتئازی - هلیکازی پروتئین، احتمال تداخل آن‌ها در عملکرد سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن اختصاصی یا APCs (Antigen-Presenting Cells) به دلیل بیان داخل سلولی به دنبال تجویز DNA واکسن وجود دارد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بیان طول کامل ژن NS3 در سلول‌های دندریتیک انسانی (Human Dendritic Cells) می‌تواند منجر به کاهش عملکرد، نقص فنوتیپی یا مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) این سلول‌ها در لوله آزمایش شود [۱۶، ۱۷]. از این رو با به‌کارگیری قسمتی از ژن با خاصیت ایمنی‌زایی به‌جای طول کامل ژن و حذف فعالیت آنزیمی ژن می‌توان باعث ارتقای ایمنی سلولی توسط واکسن طراحی شده گردید [۱۸].

در بررسی حاضر با هدف ساخت یک سازه ژنی حاوی

نرم‌افزار Bioedit، و Clustal X هم‌ردیفی (Alignment) توالی‌ها انجام و سپس با استفاده از نرم‌افزار Generunner و Primer3 طراحی آغازگر برای بخش میانی در بر گیرنده پایانه C (C-Terminal) دو من پروتئاز و پایانه N دو من هلیکاز ژن NS3 ویروس HCV انجام شد. حین استخراج توالی‌های ژنومی HCV از بانک داده‌ها، ژنوتیپ ۱ ویروس را در اولویت قرار داده، و حین طراحی آغازگر نیز توالی آن به‌گونه‌ای انتخاب شد که در واکنش تکثیری PCR بیشتر ژنوتیپ 1a را در سرم بیماران شناسایی و تکثیر نماید. همچنین در قسمت انتهای 5' آن‌ها، جایگاه برش آنزیمی برای BglIII و کدون آغاز و اختتام ترجمه نیز اضافه شد. نام، فرمول، موقعیت، قطبیت (Polarity) و طول آغازگرهای یاد شده در جدول ۱ آمده است.

بخشی از NS3 بدون فعالیت پروتئازی، قسمتی از مرکز ژن که دو سوم انتهایی پروتئاز و قسمت کوچکی از هلیکاز را در بر می‌گیرد، تکثیر و درون یک سازه بیانی کلون شد. این پلاسمید حاوی بخشی از ژن NS3 است که می‌تواند در طراحی واکسن علیه HCV کاربرد بیشتری داشته باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- طراحی آغازگر (Primer)

ابتدا ترادف کامل جدایه‌های مختلف از جمله توالی‌های مرجع ژنوتیپ‌های شش‌گانه ویروس HCV را از بانک‌های مرجع داده مثل (National Center for Biotechnology Information) NCBI و Los Alamos تهیه و با یکدیگر هم‌ردیف شد. با استفاده از

جدول ۱ نام، فرمول، موقعیت، قطبیت و طول آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق در جدول مشخص است. توالی مرجع برای مقایسه با توالی آغازگر در این مطالعه توالی سوش H77 ویروس HCV بود.

آغازگر	عملکرد	موقعیت	توالی 3'-5'
NS3-1F	مرحله اول تکثیر NS3	۳۵۱۰-۳۴۹۱	GGGACAAAAACCAAGTGGAG
NS3-2R	مرحله اول تکثیر NS3	۴۷۷۱-۴۷۵۳	GCGTGGTTGTCTCAATGGT
NS3-3F	مرحله دوم تکثیر NS3	۳۶۴۲-۳۶۲۵	<u>GGAAGATCTATGGGTCCTGTTCATCCAGATG</u>
NS3-4R	مرحله دوم تکثیر NS3	۴۷۹۸-۴۷۷۹	<u>GGAAGATCTTCAGAGCTCGTCGCACTTCTTCT</u>
آغازگر CMV	تشخیص جهت ژن درون سازه	۱۴۵۴-۱۴۳۴	TGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCT

Cytomegalo Virus :CMV

R: برگشتی (Reverse)

F: جلویی (Forward)

۲-۲- انجام Nested-RT-PCR برای تکثیر بخشی

از ژن NS3 (pNS3)

نمونه سرم ۴ بیمار با ژنوتیپ 1a که در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد از آزمایشگاه مرکز تحقیقات گوارش و کبد شریعتی با همکاری آقای دکتر شاهین مرات تأمین شد. RNA ویروس از این سرم‌ها با استفاده از کیت Qiagen و مطابق با توصیه شرکت سازنده استخراج و سپس با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Biophotometer) مدل اپندورف (Eppendorf) غلظت آن با قرائت جذب نوری

برای انجام روش رونویسی معکوس یا RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) از روی RNA ویروس با استفاده از آنزیم Mulv شرکت Fermentas و مطابق پیشنهادات آن همه اجزای واکنش شامل dNTPs، بافر آنزیم، راندوم هگزامر، ممانعت کننده آنزیم ریبونوکلاز و آنزیم Mulv پس از مخلوط شدن در لوله آزمایش، برای مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) نگهداری شد تا DNA مکمل ساخته شود.

نمونه سرم ۴ بیمار با ژنوتیپ 1a که در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد از آزمایشگاه مرکز تحقیقات گوارش و کبد شریعتی با همکاری آقای دکتر شاهین مرات تأمین شد. RNA ویروس از این سرم‌ها با استفاده از کیت Qiagen و مطابق با توصیه شرکت سازنده استخراج و سپس با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Biophotometer) مدل اپندورف (Eppendorf) غلظت آن با قرائت جذب نوری

اتصال با کمک آنزیم T4 لیگاز شرکت N.E.Biolab به هم متصل شدند. پس از ترانسفورماسیون (Transformation) محصول اتصال در باکتری مستعد DH5- α ، کلونی‌های رشد یافته روی پلیت کشت LB (Luria Bertani) جامد براساس غربالگری آبی / سفید بررسی شد. سپس روی کلونی‌های سفید، برای غربالگری و تأیید وجود ژن pNS3 روش Colony PCR انجام پذیرفت. در این روش ابتدا باکتری‌ها توسط حرارت بالای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ترموبلاک (Thermoblock) لیز شده و به دنبال یک سانتیفریز ۱۲۰۰۰ دور، روی ۱ میکرولیتر سوپ رویی حاوی پلاسمید باکتری Colony PCR برای شناسایی وجود ژن انجام گرفت.

در انتهای این مرحله پس از استخراج پلاسمید نوترکیب با کمک کیت، الکتروفورز آن روی ژل آگارز و تعیین غلظت آن با دستگاه بیوفتومتر، از آن برای انجام هضم آنزیمی با *Bgl/II* در مقیاس کم استفاده شد و وجود ژن مورد نظر در ناقل TA تأیید شد. برای تخلیص پلاسمید از کیت استخراج در مقیاس کم یا مینی‌پرپ (Miniprep) شرکت Bioneer کره استفاده شد. اساس این سیستم بر لیز قلیایی باکتری و اتصال پلاسمیدها به غشای سیلیکا ژل استوار است. این روش به ترتیب شامل لیز باکتری‌ها، اتصال پلاسمیدها به غشای سیلیکا ژل و سپس آزادسازی پلاسمیدها از غشا با کمک آب است.

۲-۴- تأیید با تعیین توالی

برای تأیید نهایی و بررسی عدم وجود جهش در ژن pNS3 نمونه پلاسمید نوترکیب انتخابی، پس از استخراج پلاسمید توسط کیت، تعیین توالی دوطرفه با استفاده از دو آغازگر داخلی طراحی شده با نام‌های NS3-3F و NS3-3R در شرکت SEQLAB آلمان و به وسیله دستگاه ABI PRISM® Genetic Analyzer انجام پذیرفت. پس از حصول اطمینان از وجود ژن سالم و کارا در ناقل کلونینگ، باکتری واجد پلاسمید نوترکیب در حجم انبوه کشت داده شد و استخراج پلاسمید نیز در مقیاس بیشتر انجام شد.

سپس این محصول به‌عنوان الگو در دو مرحله واکنش PCR برای تکثیر بخشی از ژن NS3 یا pNS3 استفاده شد.

غلظت مواد مورد استفاده در هر دو واکنش PCR از جمله آغازگرهای عنوان شده در جدول ۱ براساس واکنش استاندارد PCR تنظیم شد با این تفاوت که غلظت آغازگر در مرحله اول نصف میزان آن در مرحله دوم یعنی ۰/۲ میکرومول در نظر گرفته شد. پس از مخلوط کردن کلیه مواد مورد نیاز بر طبق روش استاندارد [۱۹] با آنزیم *HL Taq* از شرکت Bioneer کره، PCR شامل مرحله اول ۲۰ و مرحله دوم ۳۰ چرخه انجام گرفت. در هر دو مرحله از برنامه PCR شامل ۳ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس چرخه‌های مورد نظر به‌صورت ۱ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای دورگه شدن و ۱ دقیقه دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در انتها یک دمای بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه‌ای برای تکثیر قطعات استفاده شد.

محصولات PCR مرحله دوم در کنار نشانگر DNA روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. با توجه به شدت باند، در نهایت یکی از این ۴ محصول مربوط به PCR روی سرم بیماران انتخاب و در مقیاس زیاد (به میزان ۱۵۰ میکرولیتر) مجدداً تولید شد. محصول نهایی PCR با استفاده از کیت تخلیص از ژل مربوط به شرکت Bioneer کره از روی ژل آگارز با غلظت نیم درصد و براساس توصیه شرکت سازنده استخراج شد.

۲-۳- کلون کردن محصول PCR ژن به درون

ناقل کلونینگ

در این پژوهش از کلونینگ ناقل خطی pTZ57R/T شرکت Fermentas به‌منظور کلون کردن مستقیم DNA تکثیر یافته طی واکنش PCR استفاده شد. بدین طریق که ابتدا محصول PCR تخلیص شده از ژل را به نسبت ۵ به ۱ غلظت مولی با ناقل خطی تجاری مخلوط و سپس با استفاده از واکنش

۲-۵- بررسی نتایج تعیین ترادف و تجزیه و

تحلیل فیلوژنتیک

قبل از شروع تجزیه و تحلیل ترادف کامل جدایه‌های مختلف توالی‌های مرجع ویروس HCV موجود در بانک داده Los Alamos تهیه و سپس با کمک نرم‌افزار با یکدیگر هم‌ردیف شد. توالی ژن pNS3 تعیین توالی شده توسط نرم‌افزار Chromas تصحیح شد. در این تجزیه و تحلیل ابتدا کلیه نتایج تعیین توالی ژن‌ها توسط برنامه BioEdit و CLUSTAL X که خاص دسته‌بندی و هم‌ردیفی چندگانه (Multiple Alignment) توالی است، منظم شد. فاصله ژنتیکی به وسیله ماتریکس Kimura-two Parameter تخمین زده شد. درخت فیلوژنتیک به وسیله روش NJ (Neighbor-Joining) که متداول‌ترین روش است با نرم‌افزار Mega3 ترسیم شد. برای ارزیابی روش، با انجام ۵۰۰ بار ریسامپلینگ بوت‌استرات (Resampling Bootstrap) درستی درخت فیلوژنتیک ترسیم شده ارزیابی شد.

۲-۶- ساب کلون کردن ژن pNS3 در ناقل بیانی

در این مرحله ژن مورد نظر در سازه بیانی مناسب کلون شد تا بتواند در سلول‌های یوکاریوت منجر به بیان پروتئین pNS3 شود. در این پژوهش از سازه بیانی pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP از شرکت Q.Biogene که برای راحتی آن را IRES (Internal Ribosome Entry Site) می‌نامیم، استفاده شد. این پلاسمید حاوی پروموتور ژن‌های اولیه CMV5، توالی‌های پلی A مربوط به BGH (Bovine Growth Hormone) و منشا همانندسازی مربوط به Cole1 است و در جایگاه کلون‌سازی آن محل اثر آنزیم Bg/II جای‌سازی شده است. وجود توالی ژن GFP (Green Fluorescent Protein) یا پروتئین سبز فلورسانس تحت هدایت توالی IRES از دیگر خصوصیات این ناقل است که علاوه بر یک کنترل برای ارزیابی ترانسفکشن (Transfection) سازه، به دلیل تولید یک

RNA پیک دو سیسترونی تا حدی نشانگر تولید پروتئین تحت هدایت پروموتور CMV یا ویروس سیتومگال نیز هست.

برای این کار ابتدا پلاسمید TA-pNS3 توسط آنزیم Bg/II هضم و پس از تأیید برش، ژن بریده شده از روی ژل بازیابی شد. سپس واکنش اتصال با کمک آنزیم T4 لیگاز بین ژن تخلیص شده و سازه IRES خطی شده با آنزیم Bg/II در دمای اتاق و مطابق توصیه شرکت سازنده انجام گرفت. به دنبال ترانسفورم کردن محصول واکنش اتصال به درون باکتری‌های مستعد DH5- α ، براساس مقاومت به کانامایسین (Kanamycin) و نیز دو نوع Colony-PCR کلونی‌های مثبت انتخاب شد. در نوع دوم PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پروموتور CMV، جهت درست ژن درون سازه IRES-pNS3 ارزیابی شد که در حقیقت تأییدی بر Colony-PCR اول نیز بود. برای انجام این PCR جدید از روش Touch-down با ۳۰ چرخه تکثیر و در محدوده دمایی ۵۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد (با افت دمایی ۲ درجه به ازای هر ۵ چرخه) بهره گرفته شد. مواد مورد استفاده در واکنش فوق نیز مشابه مواد مصرفی در یک PCR استاندارد به همراه آنزیم Taq پلیمرز شرکت Fermentas بود. برنامه PCR شامل ۳ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس چرخه‌های مورد نظر به صورت ۱ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه محدوده دمایی ۵۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد برای دورگه شدن و ۷۰ ثانیه دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در انتها یک دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه‌ای برای تکثیر قطعات استفاده شد. کلون مناسب حاوی سازه بیانی IRES-pNS3 با این دو روش انتخاب، در مقیاس انبوه تکثیر و پلاسمید استخراج شد.

۲-۷- بررسی بیان ژن توسط سازه نوترکیب

IRES-pNS3

در این پژوهش از رده سلولی HEK293 (رده سلولی کلیه جنین انسانی) نگهداری شده در بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده شد. این سلول در محیط DMEM حاوی

۲-۸- ارزیابی بیان پروتئین با وسترن بلات (Western Blot) و الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل

پلی آکریل آمید

برای بررسی حضور پروتئین از روش SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) مطابق برنامه‌های متداول استفاده شد [۲۰]. در این پژوهش از ژل ۱۲ درصد برای قسمت جدا کننده و از ژل ۵ درصد برای قسمت متراکم کننده استفاده شد. بعد از باز شدن ساختار پروتئین با بافر نمونه‌گذاری حاوی ۲- مرکاپتواتانول و سدیم دودسیل سولفات و قرار دادن نمونه در حرارت جوش، پروتئین‌ها روی چاهک‌های ژل بارگذاری شده و سپس با ولتاژ ۱۲۰ الکتروفورز شد. نمونه‌های الکتروفورز شده سپس با کمک بافر انتقال و الکتروفورز از روی ژل به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. وسترن بلات براساس برنامه متداول و با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال (Polyclonal) بزی علیه ژن NS3 خریداری شده از شرکت Abcam انجام گرفت. رقت ۱ به ۲۵۰ از این آنتی‌بادی در بافر نمکی TBS (Tris Buffered Saline) تهیه و به مدت ۲ ساعت در حالت چرخان با غشای حامل پروتئین مواجه گردیده و سپس به خوبی با بافر TBST (حاوی توئین) شسته شد. در مرحله دوم آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با پراکسیداز یعنی آنتی‌بادی خرگوشی ضد آنتی‌بادی بزی تهیه شده از شرکت Sigma نیز با رقت ۱ به ۵۰۰۰ به مدت ۱ ساعت با غشای نیتروسلولزی مواجه شد. پس از شستشوی این آنتی‌بادی با بافر TBST، در انتها محلول رنگزای سوبسترای پراکسیداز [شامل بافر نمکی و دی آمینو بنزیدین یا DAB (Diaminobenzidine)] برای پدیدار شدن رنگ به غشای حاوی پروتئین اضافه و پس از ظهور رنگ با آب شسته شد.

۳- نتایج

۳-۱- نتیجه حاصل از Nested-RT-PCR روی سرم بیمار

پس از انجام روش RT-PCR محصول DNA مکمل آن

۱۰ درصد سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (Penicillin) و استرپتومایسین (Streptomycin) نگهداری شد. به منظور بررسی بیان ژن pNS3 و تولید پروتئین نوترکیب آن‌ها، سلول‌های ۲۹۳ در روز قبل از ترانسفکشن به میزان ۱ میلیون سلول به هر چاهک پلیت ۶ خانه پاساژ داده شد. مقدار تقریبی ۱ میکروگرم سازه IRES-pNS3 و نیز سازه بدون ژن IRES (به عنوان کنترل منفی) با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamine 2000) مخلوط و براساس برنامه پیشنهادی شرکت Invitrogen به این سلول‌ها ترانسفکت شد. ۴۸ ساعت پس از آلوده‌سازی، ابتدا ارزیابی بیان GFP توسط میکروسکوپ فلورسانس انجام گرفت و به دنبال آن سلول‌ها جمع‌آوری و پس از شستشو با بافر سالین فسفات‌ها یا PBS (Phosphate Buffer Saline) سرد برای بررسی ارزیابی بیان در سطح mRNA و نیز تولید پروتئین در دو لوله مجزا تقسیم شد.

برای استخراج RNA از سلول‌ها، از کیت استخراج RNA با نام تجاری RNX-Plus (CinnaGen) استفاده شد. با استفاده از آنزیم دزوکسی ریبونوکلیئاز I (DNase I) آلودگی احتمالی با بقایای DNA سازه یا سلول حذف شد. RNA تهیه شده برای ارزیابی کیفیت روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفور و سپس به عنوان الگو در واکنش پلیمرز معکوس (RT) استفاده شد.

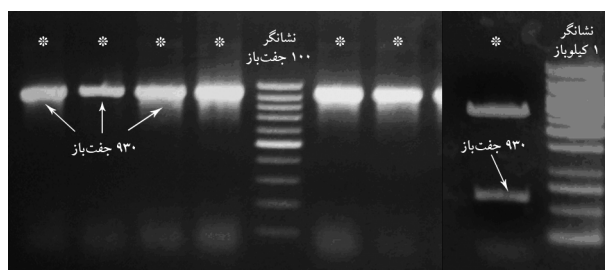
با استفاده از آنزیم Mulv و مخلوط راندوم هگزامر به علاوه الیگوتیمییدین تجاری در روش RT-PCR از روی mRNA های سلولی یک کتابخانه cDNA ساخته شد که سپس این محصول به عنوان الگو در واکنش PCR اختصاصی با آغازگرهای داخلی مرحله دوم PCR (جدول ۱) استفاده شد. به دنبال مخلوط کردن مواد واکنش، آنزیم ترانس کریپتاز معکوس Mulv آغازگر مورد نظر را شناسایی و با استفاده از بافر و مخلوط dNTPs و رشته الگو، شروع به طویل سازی و پلیمریزاسیون می‌نماید.

این محصول به درون باکتری ابتدا کلونی‌های سفید انتخاب و از روی آن‌ها Colony-PCR انجام گرفت. کارایی این روش مطابق انتظار محققان حاضر بسیار بالا بود به گونه‌ای که در این پژوهش صد درصد نمونه‌های کنترل منفی دارای کلونی آبی و ۹۰-۹۵ درصد نمونه‌های کنترل مثبت دارای کلونی سفید بود. در ضمن روی پلیت کشت باکتری نیز کلونی‌های سفید بسیار زیادی نسبت به تعداد کمی کلونی آبی وجود داشت. روش Colony-PCR با آغازگرهای داخلی اختصاصی نشان داد که درصد بسیار بالایی از کلونی‌های انتخاب شده حاوی ژن pNS3 در پلاسמיד بود (شکل ۱). پس از تأیید کلون شدن ژن، ژن تکثیر شده pNS3 با کمک هضم آنزیمی با *Bgl*II از میان پلاسמיד نو ترکیب بریده شده (شکل ۱) و توسط کیت استخراج از ژل از روی ژل با خلط مناسب بازیابی شد.

به‌عنوان الگو در دو مرحله واکنش Nested-PCR برای تکثیر ژن pNS3 مورد استفاده و واکنش روی آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. نتایج PCR روی ۴ بیمار نشان داد که این روش قادر است در ۳ بیمار ژن مورد نظر را به میزان مناسب تکثیر نماید. عدم تکثیر در یکی از نمونه‌ها شاید به دلیل مشکلات مربوط به نگهداری صحیح سرم یا عوامل تکنیکی دیگر بود. به دنبال تکثیر ژن در مرحله‌های اول و دوم به ترتیب قطعات ۱۲۸۵ و ۹۳۳ جفت‌بازی طی واکنش PCR روی ژل به دست آمد.

۳-۲- کلون نمودن ژن تکثیر شده در ناقل کلونینگ

پس از تخلیص ژن از ژل، ژن pNS3 با استفاده از آنزیم T4 لیگاز به درون پلاسמיד TA کلون شد. بعد از ترانسفورماسیون



شکل ۱ نتایج کلون نمودن توالی pNS3 در ناقل کلونینگ؛ سمت راست) بررسی وجود ژن pNS3 درون ناقل کلونینگ TA با استفاده از هضم آنزیمی با *Bgl*II وجود دو قطعه با اندازه‌های ۹۳۰ و تقریباً ۳ کیلوباز به ترتیب نمایش گر وجود ژن و ناقل TA ساختار صحیح در کنار نشانگر ۱ کیلوبازی از شرکت Fermentas است. سمت چپ) نتایج حاصل از Colony PCR برای تشخیص توالی pNS3 درون ناقل TA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی؛ وجود موارد زیاد مثبت (ستون‌هایی که با ستاره * مشخص شده‌اند) در بین کلون‌های انتخابی و تولید قطعه ۹۳۰ جفت‌بازی در کنار نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی از شرکت Fermentas قابل توجه است.

تفاوت‌های قابل توجهی بین توالی ژن کلون شده بررسی حاضر و ژن‌های مرجع حتی در مقایسه با ژن‌های ژنوتیپ ۱ ویروس نیز وجود داشت. با وجود آن‌که این ژن در حال حاضر نقشی در تعیین ژنوتیپ ویروسی ندارد؛ اما نتایج درخت فیلوژنی ترسیم شده با نرم‌افزار Mega3 به خوبی تفاوت‌های ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گوناگون ویروس را به نمایش گذاشت. این درخت فیلوژنی ضمن افتراق ژنوتیپ‌ها از هم با یک فاصله

۳-۳- نتیجه تعیین توالی pNS3 و مقایسه آن با

ویروس‌های مرجع

برای تأیید درستی ژن کلون شده دو نمونه از کلون‌های انتخاب شده حاوی ژن برای انجام توالی‌یابی ژنی ارسال شد. توالی خوانده شده توسط نرم‌افزار تصحیح و بازیابی شده و سپس با ژن‌های ویروس‌های مرجع با ژنوتیپ‌های دیگر مقایسه شد. با وجود آن‌که ژن NS3 نسبتاً حفاظت شده است، اما

۳-۴- نتایج کلون‌سازی ژن در سازه بیانی

IRES-pNS3

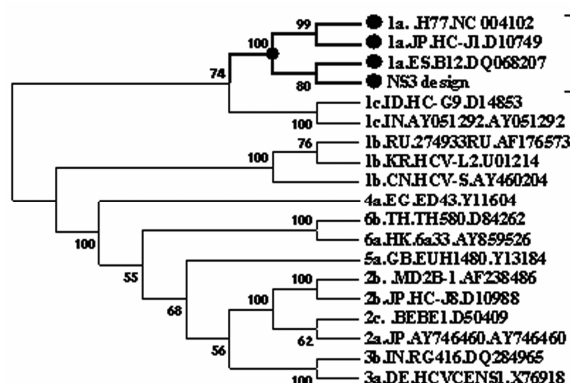
توالی استخراج شده pNS3 از ناقل کلونینگ با واکنش اتصال به درون سازه بیانی IRES کلون شد. نتایج Colony-PCR نشان داد که درصد متوسطی از کلونی‌های باکتری حاوی pNS3 درون پلاسمید بودند و روی ژل آگارز قطعه حدود ۹۳۰ جفت‌باز ایجاد می‌کردند (شکل ۳). با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پرموتر CMV تعیین جهت ژن درون سازه IRES-pNS3 با استفاده از یک Colony PCR دیگر انجام گرفت. به دلیل این‌که آغازگر حدود ۱۵۰ باز بالاتر از کدون ATG ژن طراحی شده بود، قطعه‌ای حدود ۱۱۵۰ نوکلئوتید روی ژل پدیدار می‌شد که نشانگر جهت درست توالی pNS3 درون سازه بود (شکل ۳).

۳-۵- ارزیابی بیان pNS3 در سلول‌های

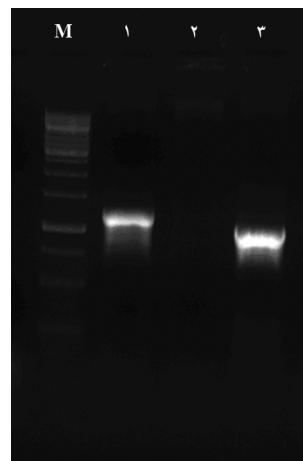
یوکاریوتی ۲۹۳

قبل از جمع‌آوری سلول‌ها، بیان پروتئین GFP توسط میکروسکوپ فلورسانس به‌عنوان یک روش غربالگری انجام گرفت. وجود GFP در سلول‌ها در درجه اول نشانگر انتقال مناسب سازه بیانی به درون سلول‌های ۲۹۳ است. RNA سلول‌ها پس از لیز، با کیت استخراج RNA جداسازی شد. عبور این قطعات روی ژل آگارز، وجود باندهای RNA ریبوزومی به‌عنوان ابزاری برای تعیین کیفیت آن‌ها را نشان داد. RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مرحله دوم نیز با تولید یک باند ۹۳۰ جفت‌بازی وجود RNA پیک اختصاصی توالی pNS3 را تأیید کرد که در شکل ۴ نمایش داده شده است. با توجه به تولید RNA پیک توالی pNS3 و نیز تولید پروتئین GFP و با توجه به این‌که در سازه بیانی IRES ژن GFP و ژن مورد نظر اغلب توسط یک RNA دو سیستمی بیان می‌شود، بنابراین ظهور GFP نشانه‌ای از تولید احتمالی پروتئین pNS3 نیز هست. با این حال برای تأیید بیشتر از روش وسترن بلات استفاده شد.

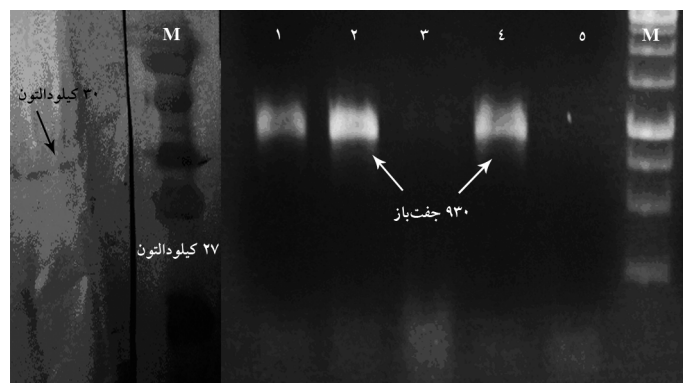
ژنتیکی مناسب، نشان می‌داد که با وجود تفاوت‌هایی در توالی pNS3 کلون شده بررسی حاضر با انواع ژن‌های مرجع، این توالی به سر شاخه ژنوتیپ 1a ویروس وابسته است که در شکل ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲ درخت فیلوژنی رسم شده برای تعیین ژنوتیپ و تشابه توالی pNS3 تکثیر یافته از بیمار ایرانی؛ توالی تکثیر یافته با نام «NS3 design» در سرشاخه ژنوتیپ 1a قرار گرفته است.



شکل ۳ تشخیص الحاق و تعیین جهت توالی pNS3 به درون سازه بیانی با کمک دو Colony-PCR متفاوت؛ ستون ۱) PCR روی پلاسمید حاوی pNS3 و وجود قطعه تقریبی ۱۱۵۰ جفت‌باز نشانگر راست جهت بودن ژن الحاق یافته pNS3، ستون ۲) کنترل منفی، پلاسمید IRES خالی، ستون ۳) PCR روی پلاسمید حاوی pNS3 و وجود قطعه تقریبی ۹۳۰ جفت‌باز نشانگر وجود توالی pNS3، ستون M) نشانگر DNA ۱ کیلوباز از شرکت Fermentas به‌صورت کنترل استفاده شده است.



شکل ۴ ارزیابی بیان pNS3 با روش RT-PCR و تولید پروتئین pNS3 با وسترن بلات توسط سازه بیانی IRES در سلول‌های ۲۹۳؛ سمت راست) نتیجه RT-PCR و بیان یک باند نزدیک به ۹۳۰ جفت‌بازی به نشانه مثبت بودن بیان ژن pNS3. ستون ۱) نمونه ترانسفکت سازه IRES-pNS3 (ستون اول، ستون ۲) نمونه ترانسفکت سازه IRES-pNS3 (ستون دوم، ستون ۳) نمونه کنترل سازه IRES بدون ژن، ستون ۴) کنترل مثبت، نمونه پلاسمید حاوی ژن pNS3 (ستون ۵) کنترل منفی PCR. ستون M) نشانگر DNA ۱ کیلو بازی از شرکت Fermentas به‌عنوان کنترل استفاده شده است. سمت چپ) نتیجه وسترن بلات و ظهور یک باند به اندازه تقریبی ۳۰ کیلو دالتون نشانگر بیان پروتئین pNS3 است. ستون M) نشانگر پروتئینی با شماره کاتالوگ SM1811 از شرکت Fermentas خریداری شده بود.

گرفته شده است [۲۲، ۲۳]. با نتایج امیدبخش اخیری که در کارآزمایی بالینی واکسن‌های درمانی DNA بیان‌کننده ژن NS3 در سوندد به‌دست آمده است [۵، ۱۳]؛ اهمیت این ژن در موارد طراحی و تولید واکسن‌های آتی برای ویروس HCV به‌ویژه سازه‌های DNA دو چندان شده است. با وجود آن‌که اکثر مطالعات گذشته به مزیت‌های مختلف ایمنی‌زایی ژن کامل NS3 اشاره نموده‌اند، اما نتایج چند مطالعه در لوله آزمایش نشان داده است که ژن کامل NS3 آثار سرکوب‌گری بر سلول‌های APC دارد [۱۷، ۲۴]. مطالعه دیگری نیز نشان داده که این ژن منجر به مرگ سلولی در سلول‌های APC می‌شود [۱۶]. از نظر تنوریک شاید یکی از علل این امر وجود خاصیت پروتئازی- هلیکازی پروتئین باشد. از این رو حذف قسمت‌های مربوط به فعالیت پروتئازی- هلیکازی و به‌کارگیری قسمتی از ژن با خاصیت ایمنی‌زایی به‌جای طول کامل ژن می‌تواند به ارتقای ایمنی سلولی حاصل از واکسن کمک بیشتری نماید [۱۸]. در تحقیق حاضر به دلیل اهمیت ایمنی‌زایی ژن NS3 یک سازه بیانی حامل بخش میانی آن طراحی و ساخته شد. با توجه به آثار احتمالی کاهش ایمنی توسط طول کامل این ژن، از ناحیه‌ای در میانه ژن به‌عنوان توالی ایمنی‌زا سود برده شد که در

وسترن بلات با لیز سلول ۲۹۳ ترانسفکت شده با سازه بیانی و با بهره‌گیری از آنتی‌بادی پلی‌کلونال اولیه انجام گرفت و نتایج وجود یک باند هرچند ضعیف را در محدوده ۳۰-۳۱ کیلو دالتونی نشان داد. هر چند وزن واقعی این قطعه به دلیل جدید بودن توالی برای محققان حاضر مشخص نیست؛ با این حال نتایج به‌دست آمده از دیگر مقالات مشابه و توالی‌های مشابه بیانگر همین اندازه است که در شکل ۴ نیز نشان داده شده است.

۴- بحث

سازه‌های پلاسمیدی بیان‌کننده ژن‌های مختلف ویروس HCV از اوایل دهه اخیر در موارد زیادی به‌عنوان واکسن درمانی- پیشگیری برای ایجاد، راه‌اندازی یا ارتقای ایمنی علیه ویروس به‌کار گرفته شده است تا به آن‌جا که در حال حاضر چندین مورد کارآزمایی بالینی با استفاده از این پلاسمیدها انجام شده و در حال بررسی بیشتر است [۴، ۹، ۱۱، ۱۳، ۲۱]. ژن غیرساختاری NS3 یک پروتئین دوکاره با خاصیت آنزیمی پروتئازی- هلیکازی است که همواره به‌عنوان آنتی‌ژن مناسب در واکسن‌های مختلف علیه ویروس HCV به‌کار رفته

فاصله ژنتیکی به‌خوبی تعلق توالی pNS3 تکثیر شده به شاخه 1a را مشخص نمود. به‌عبارت دیگر؛ شاید بتوان از ژن کامل یا ناکامل NS3 در مواردی که امکان دسترسی به توالی‌های دیگر ژنی وجود ندارد برای تمایز ژنتیکی بین سوش‌های ویروسی استفاده نمود.

مشاهده GFP در سلول‌های ۲۹۳ در درجه اول نشانگر انتقال مناسب سازه بیانی به درون سلول‌های ۲۹۳ بود؛ با این‌حال با توجه به دو سیستمی بودن RNA پیک مربوط به آن با ژن pNS3 که تحت هدایت پروموتور CMV بیان می‌شود، دیدن GFP احتمالاً نشانه‌ای از تولید پروتئین pNS3 نیز بود که این امر با نتایج بعدی RT-PCR و وسترن بلات تأیید شد.

ارزیابی بیان ژن با روش‌های RT-PCR و وسترن بلات نیز نمایانگر بیان مناسب ژن و تولید پروتئین توسط سازه بیانی IRES- pNS3 در سلول‌های یوکاریوتی ۲۹۳ بود.

سازه جدید طراحی شده می‌تواند به دلیل حذف فعالیت پروتئازی ژن NS3 برای مطالعات واکسن‌های درمانی یا پیشگیری برای کنترل عفونت هپاتیت C و با هدف ارتقای ایمنی‌زایی واکسن در آینده، بیشتر استفاده شود.

۵- تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی و مساعدت معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و براساس طرح مصوب شماره ۸۸-۸-۶۴ انجام پذیرفته است. نویسندگان از زحمات و راهنمایی‌های سرکار خانم دکتر رجیبی و همچنین کارشناسان گروه ویروس‌شناسی کمال تشکر را دارند.

برگیرنده دو سوم انتهای دومین پروتئاز و ناحیه کوچکی از ابتدای هلیکاز است. در تحقیقی که اخیراً انجام گرفته توالی مشابه این ناحیه برای ایمنی‌زایی در یک واکسن مخمر بیان کننده یک ساختار مرکب ژن‌های NS3 و کور (Core) استفاده شده که نتایج نشان می‌دهد ایمنی سلولی به میزان مناسب در مدل موشی تحریک شده است و روش از سلامت کامل برخوردار است [۱۸]. تاکنون مطالعات چندانی با استفاده از قسمت‌های کوتاه شده از ژن NS3 انجام نشده [۲۵] و اغلب از طول کامل آن با یا بدون ژن‌های دیگر بهره گرفته شده است [۲۶، ۲۷]. با این وجود به‌نظر می‌رسد این طراحی جدید بیم ناشی از احتمال تداخل آنزیمی پروتئین کامل NS3 در عملکرد سلول‌های APC را به میزان زیادی کاهش خواهد داد.

به دلیل فراوانی ژنوتیپ ۱ ویروس در کشور و نیز پاسخ نامناسب این گروه در مقابل درمان [۲۸]، در این مطالعه از سرم بیماران مبتلا به ژنوتیپ ۱ ویروس و آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر توالی اختصاصی مربوط به ژنوتیپ 1a ویروس استفاده شده است. نتایج تعیین توالی روشن ساخت که به دنبال توالی‌یابی و هم‌ردیف نمودن توالی‌ها و مقایسه با توالی‌های مرجع و رسم درخت فیلوژنی، توالی pNS3 تکثیر شده متعلق به ژنوتیپ 1a است و بنابراین محققان حاضر به هدف خود مبنی بر تکثیر pNS3 با ژنوتیپ ۱ رسیدند. از سویی با وجود آن‌که این ژن در حال حاضر نقشی در تعیین ژنوتیپ ویروسی ندارد، اما نتایج درخت فیلوژنی به‌خوبی فاصله‌های ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گوناگون ویروس را به نمایش گذاشت [۲۹]. این درخت فیلوژنی ضمن توانایی در افتراق ژنوتیپ‌ها از هم با یک

۶- منابع

- [1] Houghton M, Abrignani S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436(7053): 961-6.
- [2] Martin P, Inchauspe G. Hepatitis C vaccines. *Drug disco today* 2006; 3(2): 203-9.
- [3] Weiner DB. DNA vaccines: crossing a line in the sand. Introduction to special issue. *Vaccine* 2008; 26(40): 5073-4.
- [4] Alvarez-Lajonchere L, Dueñas-Carrera S. Advances in DNA immunization against

- hepatitis C virus infection. *Hum Vaccin* 2009; 5(8): 568-71.
- [5] Sällberg M, Weiland M, Frelin L. Therapeutic vaccines: challenges of chronic viral infections. *Drug Discov Today Ther Strateg* 2007; 4(4): 253-66.
- [6] Restifo NP, Ying H, Hwang L, Leitner WW. The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Ther* 2000; 7(2): 89-92.
- [7] Ulmer JB, Wahren B, Liu MA. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med* 2006; 12(5): 216-22.
- [8] Wang B, Godillot AP, Madaio MP, Weiner DB, Williams WV. Vaccination against pathogenic cells by DNA inoculation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 226: 21-35.
- [9] Encke J, Geissler M, Stremmel W, Wands JR. DNA-based immunization breaks tolerance in a hepatitis C virus transgenic mouse model. *Hum Vaccin* 2006, 2(2): 78-83.
- [10] Inchauspé G, Michel ML. Vaccines and immunotherapies against hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Viral Hepat* 2007; 14 Suppl 1: 97-103.
- [11] Simon BE, Cornell KA, Clark TR, Chou S, Rosen HR, Barry RA. DNA vaccination protects mice against challenge with *Listeria monocytogenes* expressing the hepatitis C virus NS3 protein. *Infect Immun* 2003; 71(11): 6372-80.
- [12] Lang KA, Yan J, Draghia-Akli R, Khan A, Weiner DB. Strong HCV NS3- and NS4A-specific cellular immune responses induced in mice and Rhesus macaques by a novel HCV genotype 1a/1b consensus DNA vaccine. *Vaccine* 2008; 26(49): 6225-31.
- [13] Frelin L, Alheim M, Chen A, Söderholm J, Rozell B, Barnfield C, Liljeström P, Sällberg M. Low dose and gene gun immunization with a hepatitis C virus nonstructural (NS) 3 DNA-based vaccine containing NS4A inhibit NS3/4A-expressing tumors in vivo. *Gene Ther* 2003; 10(8): 686-99.
- [14] Lemon SM, Walker C, Alter MJ, MY. Hepatitis C virus: Fields Virology. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; p: 1253-304.
- [15] Arribillaga L, Sarobe P, Arina A, Gorraiz M, Borrás-Cuesta F, Ruiz J, Prieto J, Chen L, Melero I, Lasarte JJ. Enhancement of CD4 and CD8 immunity by anti-CD137 (4-1BB) monoclonal antibodies during hepatitis C vaccination with recombinant adenovirus. *Vaccine* 2005; 23(27): 3493-9.
- [16] Siavoshian S, Abraham JD, Thumann C, Kieny MP, Schuster C. Hepatitis C virus core, NS3, NS5A, NS5B proteins induce apoptosis in mature dendritic cells. *J Med Virol* 2005; 75(3): 402-11.
- [17] Krishnadas DK, Ahn JS, Han J, Kumar R, Agrawal B. Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms. *Int Immunol*; 22(6): 491-502.
- [18] Haller AA, Lauer GM, King TH, Kemmler C, Fiolkoski V, Lu Y, Bellgrau D, Rodell TC, Apelian D, Franzusoff A, Duke RC. Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent T cell responses targeting HCV NS3 and Core proteins. *Vaccine* 2007; 25(8): 1452-63.

- [19] McPherson MJ, Moller SG, Beynon R, Howe C. *Pcr (Basics: from Background to Bench)*. Springer-Verlag Telos, 2000; p: 23-65.
- [20] Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Mol Biol* 2008; Chapter 10: Unit 10.8.
- [21] Hartoonian C, Ebtekar M, Soleimanjahi H, Karami A, Mahdavi M, Rastgoo N, Azadmanesh K. Effect of immunological adjuvants: GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor) and IL-23 (interleukin-23) on immune responses generated against hepatitis C virus core DNA vaccine. *Cytokine* 2009; 46(1): 43-50.
- [22] Folgori A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, Pezzanera M, Tafi R, Arcuri M, Fattori E, Lahm A, Luzzago A, Vitelli A, Colloca S, Cortese R, Nicosia A. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 2006; 12(2): 190-7.
- [23] El-Gogo S, Staib C, Lasarte JJ, Sutter G, Adler H. Protective vaccination with hepatitis C virus NS3 but not core antigen in a novel mouse challenge model. *J Gene Med* 2008; 10(2): 177-86.
- [24] Amjad M, Abdel-Haq N, Faisal M, Kamal M, Moudgal V. Decreased interferon-alpha production and impaired regulatory function of plasmacytoid dendritic cells induced by the hepatitis C virus NS 5 protein. *Microbiol Immunol* 2008; 52(10): 499-507.
- [25] Mansilla C, Gorraiz M, Martinez M, Casares N, Arribillaga L, Rudilla F, Echeverria I, Riezu-Boj JI, Sarobe P, Borrás-Cuesta F, Prieto J, Lasarte JJ. Immunization against hepatitis C virus with a fusion protein containing the extra domain A from fibronectin and the hepatitis C virus NS3 protein. *J Hepatol* 2009; 51(3): 520-7.
- [26] Jiao X, Wang RY, Feng Z, Hu G, Alter HJ, W-K Shih J. DNA immunization encoding the secreted nonstructural protein 3 (NS3) of hepatitis C virus and enhancing the Th1 type immune response. *J Viral Hepat* 2004; 11(1): 18-26.
- [27] Simon BE, Cornell KA, Clark TR, Chou S, Rosen HR, Barry RA. DNA vaccination protects mice against challenge with *Listeria monocytogenes* expressing the hepatitis C virus NS3 protein. *Infect Immun* 2003; 71(11): 6372-80.
- [28] Alavian SM, Adibi P, Zali MR. Hepatitis C Virus in Iran: epidemiology of an emerging infection. *Arch Iranian Med* 2005; 8(2): 84-90.
- [29] Rispeter K, Lu M, Behrens SE, Fumiko C, Yoshida T, Roggendorf M. Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection. *Virus Genes* 2000; 21(3): 179-88.