

مقایسه تیتروختی سازی آنتی بادی پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 بیان شده در سلول های یوکاریوت، و پروکاریوت

سحر کریمی^۱، شهرام نظریان^۲، فتاح ستوده نژاد نعمت الهی^۳، روح الله درستکار^۴، جعفر امانی^{۵*}

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

۳- دکتری سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دکتری ویروس شناسی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۵- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه

(عج)، تهران، ایران

*صندوق پستی ۵۴۸۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

jafar.amani@gmail.com

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۲

دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۹

چکیده

با توجه به همه گیری کووید ۱۹ به عنوان یک بحران جهانی، طراحی واکسن برای پیشگیری حایز اهمیت است. این ویروس جز خانواده بتا کرونا ویروس بوده و بر سطح غشای ویروس گلیکوپروتئین اسپایک ساختارهای زائده مانندی را تشکیل می دهد. مطالعات روی SARS-CoV-1 و واکسن های MERS-CoV مربوطه نشان داد که پروتئین اسپایک روی سطح ویروس یک هدف مناسب برای واکسن است. در این پژوهش تجربی، قطعات پروتئین اسپایک نو ترکیب (rfsp) recombina nt fragment of spike protein (rfsp) بیان شده در میزبان یوکاریوتی سلول CHO-K1 و پروکاریوتی *E. coli*، از نظر قدرت ایمنی زایی، فعالیت خنثی سازی، توانایی شناسایی اپی توپ های مشابه با سویه ویروس و توانایی اتصال به سرم بیماران بهبود یافته کووید ۱۹ از دو نوع واریانت آلفا و دلتا مقایسه شد. نتایج نشان داد که هر دو پروتئین rfSP یک کاندید آنتی ژن بالقوه جدید برای توسعه واکسن کووید ۱۹ هستند. اما سلول CHO-K1 با انجام فرایند تغییرات پس از ترجمه مانند گلیکولیزاسیون سبب حفظ فعالیت بیولوژیکی پروتئین می شود. همین امر احتمال ایجاد اپی توپ های مشابه با سویه ویروس را بالا می برد و افزایش تیتروختی بادی های ویژه rfsp در سرم موش های ایمن شده را در سطح بالاتری قرار می دهد. بنابراین، برای ارزیابی کارایی واکسن اولویت به rfsp بیان شده در سلول CHO-K1 داده می شود.

واژگان کلیدی: کووید ۱۹، واکسن، پروتئین اسپایک، گلیکولیزاسیون، سلول CHO-K1

۱- مقدمه

همه گیری کووید ۱۹ به عنوان یک بحران بهداشتی در سراسر جهان شکست اقتصادی عظیمی را به همراه داشته است [۱]. این ویروس جز خانواده بتا کرونا ویروس بوده [۲] و بر سطح غشای ویروس، گلیکوپروتئین اسپایک (S) ساختارهای زائده ماندنی را تشکیل می دهد [۳]. سازمان بهداشت جهانی کووید ۱۹ را به عنوان یک وضعیت اضطراری بهداشت عمومی بین المللی اعلام کرده است [4]. بنابراین، برای پیشگیری از بیماری، طراحی واکسن حائز اهمیت است. مطالعات روی SARS-CoV-1 و واکسن های MERS-CoV مربوطه نشان داد که پروتئین اسپایک روی سطح ویروس یک هدف مناسب برای واکسن است [5]. پاسخ ایمنی اولین خط دفاعی در برابر عفونت SARS-CoV-2 است که باعث بیماری همه گیر کروناویروس (COVID-19) شده است [6]. گلیکوپروتئین اسپایک که از سطح ویروس بیرون زده است، هدف بسیاری از آنتی بادی های خنثی کننده [3] و هدف اصلی در تولید واکسن می باشد [4]. پروتئین اسپایک از دو زیر واحد پروتئینی S1 و S2 تشکیل شده است [7, 8].

پروتئین S1 حاوی یک دومین اتصال به گیرنده (RBD) ۲ حفاظت شده است که آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE2) ۳ را شناسایی می کند [9]. پروتئین S2 حاوی پپتید فیوژن (FP) ۴ است [10]. پروتئین اسپایک ویروسی محل برش S1/S2 را در خود جای داده است که فورین پروتئاز سلولی محل برش را در پروتئین اسپایک می شکافد و این برش برای همجوشی سلول-سلول با واسطه پروتئین S و ورود به سلول های ریه انسان ضروری است [11]. گیرنده ACE2 و پروتئین اسپایک به شدت گلیکوزیله شده اند و نقش گلیکوزیلاسیون در اتصال به رسمیت شناخته شده است [12]. انواع واریانت های کووید ۱۹ با استفاده از

توالیابی سکانس ژنی اسپایک شناسایی شده اند [13]. افزایش واریانت های اسپایک که در سرتا سر جهان ظاهر شده اند، نگرانی هایی را در مورد تداوم اثربخشی واکسن ها ایجاد می کند [14]. متأسفانه، این جهش ها در محل اتصال بین RBD و ACE2 انسانی قرار دارد [14]. مانند نوع B.1.617.2 (واریانت دلتا) [13] که راندمان ورود را نسبت به نوع D614G (واریانت آلفا) در ارگانوئیدهای تنفسی و همچنین سلول های دیگر افزایش داده است [15]. پروتئین S دارای ۲۲ مکان بالقوه N-گلیکوزیلاسیون است [16]. گلیکوزیلاسیون ویروسی نقش های گسترده ای در پاتوبیولوژی ویروسی از جمله پپیش و تا خوردگی پروتئین و تروپسم ویروس به سلول میزبان دارد [17]. درک گلیکوزیلاسیون اسپایک های ویروسی می تواند ویژگی های اساسی زیست شناختی ویروسی را آشکار و الگویی جهت طراحی واکسن باشد [7]. به طور سنتی پاتوژن های ضعیف شده یا غیرفعال شده به عنوان واکسن استفاده می شوند. از سوی دیگر، امروزه واکسن های پروتئین نو ترکیب، به ویژه واکسن های کایمیریک، مزایای متعددی برای شبیه سازی، بیان و خالص سازی ژن ها از عوامل اتیولوژیک مختلف برای آزمایش به عنوان واکسن ارائه می دهند. توانایی ساختار کایمیریک برای ارائه آنتی ژن های متعدد به طور همزمان می تواند نقش مهمی در ایمن سازی ایفا کند [18]. در حال حاضر، تولید پروتئین در کمیت و کیفیت مناسب برای اهداف درمانی یک نیاز ضروری می باشد. بنابراین، سیستم های بیانی مختلف، برای تولید پروتئین نو ترکیب مانند سیستم باکتریایی، مخمر، باکلو ویروس-سلول حشرات و سلول های پستانداران توسعه یافتند. ترجمه پروتئین نو ترکیب بسیار مهم است. بیان در سیستم های یوکاریوتی، به ویژه استفاده از سلول های پستانداران، نه تنها ارگان های لازم برای تا خوردگی مناسب و تغییرات پس از ترجمه را فراهم می کند، بلکه بیان

3 Angiotensin-converting enzyme 2

4 fusion peptide

1 spike glycoprotein

2 Receptor Binding Domain

پروتئین‌های بزرگ و پیچیده را نیز ممکن می‌کند. با این حال، یک سیستم بیانی باید بتواند تولید بالا، بیشترین فعالیت بیولوژیکی، آسانی خالص سازی و کمترین زمان تولید برای پروتئین نوترکیب را با هم ترکیب کند [۱۹]. به طور کلی، استفاده از سیستم‌های پروکاریوت آسان تر می‌باشد. اما با توجه به عدم تغییرات پس از ترجمه تولید برخی از پروتئین‌ها با چالش همراه است. سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) اغلب برای تولید پروتئین نوترکیب در سیستم پستانداران استفاده می‌شوند [۲۰]. از سوی سیستم *E. coli* برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقادیر زیاد مناسب می‌باشد [۲۱]. از دیگر مزایای استفاده از *E. coli* به کوتاه بودن زمان تقسیم سلولی و ویژگی‌های مناسب فیزیولوژی و ژنتیکی آن می‌توان اشاره کرد. همچنین، نرخ رشد بالای این باکتری، به همراه توانایی بیان سطوح بالای پروتئین، منجر به بهره‌وری حجمی بالایی در این سویه شده است [۱۹]. در این پژوهش تجربی، پروتئین نوترکیب اسپایک (rfsp) بیان شده در میزبان یوکاریوتی CHO-K1 به نام rfsp-CHO و پروکاریوتی *E. coli* به نام rfsp-Ecoli از نظر قدرت ایمنی‌زایی، فعالیت خنثی‌سازی، توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های مشابه با سویه ویروس و توانایی اتصال به سرم بیماران بهبود یافته کوید ۱۹ از دو نوع واریانت آلفا و دلتا برای ارزیابی کارایی واکسن با یکدیگر مقایسه شده است.

۲- مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر توالی کامل ژن اسپایک پروتئین به شماره دسترسی YP_009724390.1 از پایگاه داده‌های پروتئینی NCBI استخراج شد. با استفاده از ارزیابی بیوانفورماتیکی ساختار کایمریک شامل RBD است که به محل برش S1/S2 و پروتئین FP متصل شد. برای مراحل همسانه سازی و بیان ژن، سویه باکتری/شریشیا کلی سویه Rosetta-gami از شرکت اینویترژن؛ ایالات متحده

وسلول یوکاریوتی CHO-K1 از موسسه تحقیقاتی انیستوتوپاستور ایران تهیه شدند. پلاسمید pUC57 به عنوان یک ناقل هم‌سانه سازی و تکثیر (فرمتاز؛ ایالات متحده) و پلاسمید pET-28a به عنوان ناقل بیانی باکتری/شریشیا کلی برای بیان قطعه کلون شده در سیستم پروکاریوتی (نواژن؛ ایران) و پلاسمید pCDNA3 به عنوان ناقل بیانی سلول CHO-K1 برای بیان قطعه کلون شده در سیستم یوکاریوتی (اینویترژن؛ ایالات متحده) تهیه شد. برای دست‌ورزی ژن مصنوعی و وکتورهای موردنظر از آنزیم‌های محدودکننده HindIII و EcoRI و آنزیم‌های T4 لیگاز، pfu پلی‌مراز (فرمتاز؛ ایالات متحده) و Taq پلی‌مراز (فرادید دانش؛ ایران) استفاده شد. کیت استخراج محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، کیت استخراج پلاسمید (روچ؛ سوئیس) و ویروس غیر فعال شده SARS-COV-2 (موسسه تحقیقاتی انیستوتوپاستور ایران) تهیه شدند.

۲-۱ تعیین غلظت و وزن مولکولی پروتئین rfsp

غلظت پروتئین تولید شده در میزبان/شریشیا کلی (rfsp-*E. coli*) و سلول همستر چینی (rfsp-CHO) با روش بردفورد تعیین شد. و نمونه پروتئین تخلیص شده روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE تجزیه و تحلیل شد.

۲-۲ ایمن‌سازی حیوان آزمایشگاهی با پروتئین

نوترکیب

۱۵ سر موش BALB/c ۶ تا ۸ هفته‌ای با وزن ۲۵-۲۰ گرم تهیه شده از مؤسسه رازی تهران، انتخاب و به سه گروه کنترل و آزمایش rfsp-E.coli و rfsp-CHO تقسیم شدند. حیوانات سه بار واکسینه شدند. اولین واکسیناسیون به صورت زیر جلدی با ۱۵ میکروگرم rfSP های تخلیص شده مخلوط با همان حجم ادجوانت کامل فروند انجام شد. دوز دوم و سوم ۱۵ میکروگرم پروتئین با ادجوانت فروند ناقص به صورت زیر جلدی (در فواصل زمانی ۱۵ روز) به عنوان تقویت کننده داده شد. گروه کنترل فقط PBS و ادجوانت دریافت کردند. نمونه خون در روز ۲۹،

۴۴ از گوشه چشم موش با لوله مویشن جمع آوری شد. سرم‌های جدا شده از نمونه‌های خون تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۳ تعیین تیتروختی بادی به روش الایزا (ELISA)

پس از اندازه‌گیری میزان پروتئین نوترکیب محلول با روش برادفورد، میزان ۵۰۰ نانوگرم از پروتئین خالص شده rfsp در بافر پوشاننده سدیم بی‌کربنات ۰/۲ مولار و با pH برابر ۹/۸ حل شد و در هر چاهک از میکروپلیت ریخته شد. سرم موش‌های ایمن شده با دو نوع rfsp به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ضد موش کانژوگ به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد. آزمایش با سه تکرار انجام شد و نتایج در نمودار استاندارد قرار داده شدند. براساس آنالیزها میزان تیتروختی و قدرت واکنش آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن نوترکیب به‌دست آمد.

۲-۴ توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های مختلف توسط سرم موش‌های واکسینه‌شده با rfsp

برای بررسی کارایی پروتئین rfsp برای ایجاد ایمنی متقاطع با ویروس SARS-COV2 الیزا استفاده شد. تعداد 106 PFU ویروس SARS-COV2 تکثیر شده در سلول‌های vero cell و غیر فعال شده با استفاده از پارافرمالدهید ۴ درصد با غلظت ۱۰۰ ماکروگرم از موسسه تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. پس از بهینه سازی در شرایط آزمایشگاهی غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم از ویروس غیر فعال شده برای انجام تست الیزا انتخاب شد. محیط DEME حاوی vero cell به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. به روش شرح داده شده در بالا، مقدار ۱۰۰۰ نانوگرم از ویروس کشته شده SARS-CoV-2 در ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوشش در پلیت ELISA پوشانده شد و سرم موش‌های واکسینه شده با rfsp ها در رقت ۱:۱۰۰ با PBST به هر چاهک اضافه شد.

۲-۵ بررسی قابلیت ایمنی‌زایی rfsp به‌عنوان واکسن در انسان

برای بررسی قابلیت ایمنی‌زایی rfSP به‌عنوان واکسن در انسان، نمونه‌های سرمی از ۳۰ بیمار بهبود یافته پس از ابتلا به واریانت آلفا SARS-CoV-2 از بیمارستان بقیه الله تهران و ۳۰ بیمار بهبود یافته پس از ابتلا به واریانت دلتا SARS-CoV-2 از بیمارستان نبی اکرم (ص) استان سیستان و بلوچستان و همچنین ۲۰ اهداکننده سرم از افراد سالم که به بیماری مبتلا نشده‌اند جمع آوری شد. با توجه به معیارهای ورود به مطالعه حاضر، در این مطالعه از بیماران nCoV 2019 مورد تأیید از نظر معیارهای بالینی، ویژگی‌های سببی، تست RT PCR مثبت و مایل به همکاری، استفاده شد. در مقابل، بر اساس معیارهای خروج از مطالعه حاضر، بیماران nCOVID-19 با سابقه بیماری‌های مزمن، مانند بیماری‌های عفونی هپاتیت مزمن B یا C، بروسلوز مزمن، HIV و سرطان‌ها (لوسمی و لنفوم) و اختلالات آلرژیک حذف شدند. اتصال آنتی‌بادی سرم افراد شرکت کننده در طرح به rfSP با الیزا مطابق با توضیحات بالا بررسی شد. به‌طور خلاصه، rfSP برای پوشش صفحات پلیت الیزا استفاده شد. پس از مسدود کردن با شیر بدون چربی ۵ درصد، سرم‌ها در رقت ۱:۵ اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند و سپس چهار بار شستشو با PBST انجام شد. آنتی‌بادی‌های متصل با آنتی‌بادی‌های ضد انسانی کوئزوگه با horse radish peroxidase شناسایی شدند.

۲-۶ خصوصیات سرم حیوانات واکسینه‌شده

برای بررسی فعالیت مسدودکننده اتصال RBD به گیرنده ACE2، سرم موش‌های واکسینه شده با rfsp با استفاده از کیت الیزا آنتی‌بادی خنثی کننده SARS-CoV-2 (پیش‌تاز طب، ایران)، و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آزمایش شدند.

۲-۷ تحلیل‌های آماری

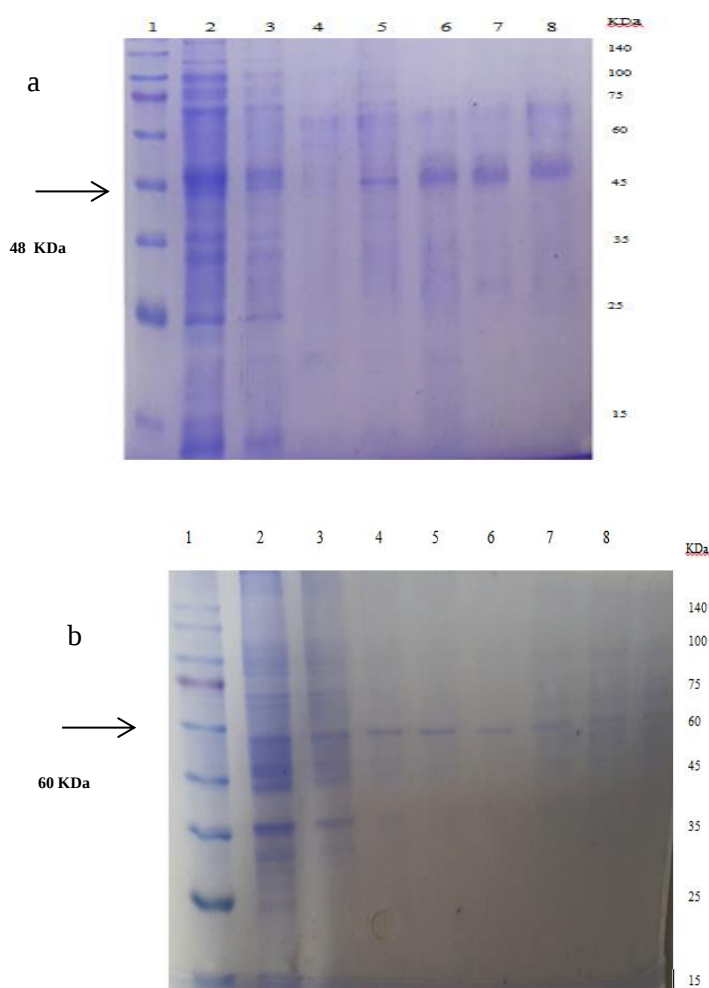
نتایج الیزا برای پاسخ‌های آنتی‌بادی بین گروه‌های ایمن شده و غیر ایمن شده و آنتی‌بادی‌های خنثی کننده

بیان پروتئین نو ترکیب بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد آنالیز شد و مشخص شد وزن مولکولی rfsp-E.coli ۴۸ کیلو دالتون می باشد؛ در صورتی که rfsp-CHO وزن ۶۰ کیلو دالتون را دارد. تخمین غلظت پروتئین نو ترکیب خالص شده با روش برادفورد نشان داد که غلظت rfsp در میزبان E.coli و CHO-K1 به ترتیب ۲۱۳ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر است (شکل ۱).

SARS-CoV-2 با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و آنالیز واریانس یک طرفه تحلیل شد. اگر $P < 0.05$ تفاوتها از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

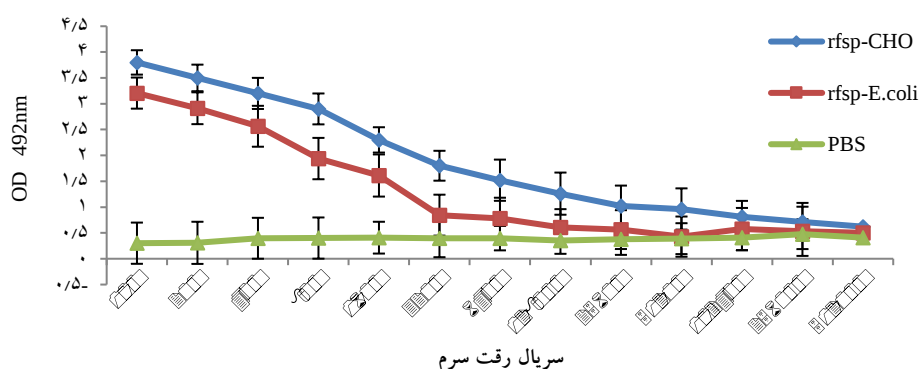
۳-۱ تعیین خصوصیات پروتئین های rfsp بیان شده



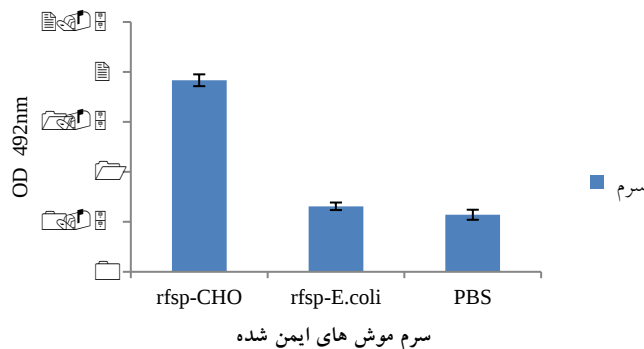
شکل ۱ بیان، خالص سازی و ارزیابی ژن نو ترکیب rfsp (a) الگوی SDS-PAGE تخلیص پروتئین نو ترکیب rfsp-E.coli از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA (روش دنا توره) توسط SDS-PAGE؛ ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین (۱۰ تا ۱۷۰ کیلو دالتون)، ستون ۲: لیزت باکتریایی، ستون های ۳ تا ۷: خروجی ستون با بافر شست و شو، ستون ۸: خروجی ستون با بافر احیا کننده، (b) الگوی SDS-PAGE تخلیص پروتئین نو ترکیب rfsp-CHO از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA توسط SDS-PAGE؛ ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ستون ۲: لیزت سلولی، ستون های ۳ تا ۷: خروجی ستون با بافر شست و شو، ستون ۸: خروجی ستون با بافر احیا کننده.

۲-۳ ارزیابی تولید آنتی بادی به روش الایزا

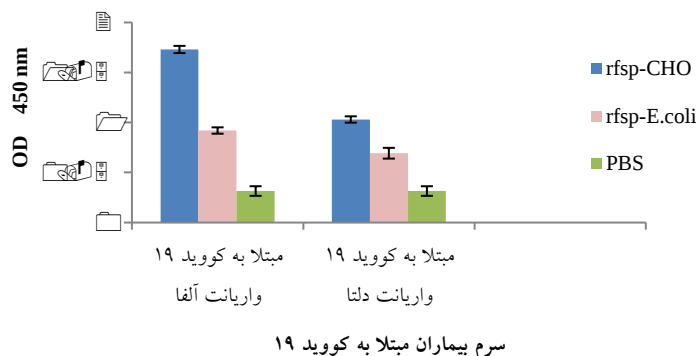
برای ارزیابی پاسخ های ایمنی هومورال حاصل از rfsp بیان شده در سلول های CHO قادر به ایجاد پاسخ های آنتی بادی اختصاصی قوی تری از *E.coli* می باشد (نمودار ۱).
 ۳-۳ توانایی شناسایی اپی توپ های مختلف توسط سرم موش های واکسینه شده با rfsp
 یافته ها نشان داد که سرم موش های واکسینه شده با rfsp_CHO در مقایسه با گروه rfsp_E.coli می توانند با توانایی بیشتری به ویروس غیر فعال شده SARS-CoV-2 به عنوان آنتی ژن متصل شوند. همچنین، اتصال با ویروس کشته شده در سرم موش هایی که به عنوان کنترل PBS تزریق کرده اند وجود نداشت. سطح اختلاف معنی دار بین گروه های تست و کنترل مشهود بود ($P < 0.05$) (نمودار ۲).



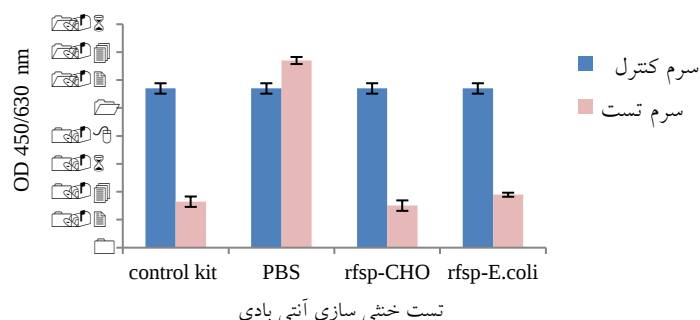
نمودار ۱ (منحنی الایزا برای تعیین تیتراژ آنتی بادی) از کلاس IgG علیه پروتئین نوترکیب rfsp



نمودار ۲ تشخیص ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از سرم موش های ایمن شده با rfsp



نمودار ۳ تشخیص rfsp توسط سرم بیماران مبتلا به SARS-CoV-2 واریانت آلفا و دلتا



نمودار ۴ توانایی خشتی سازی آنتی بادی ها در موش های ایمن شده با rfsp

بازدارندگی اتصال RBD به گیرنده ACE2 دارد (نمودار ۴).

۴- بحث

انتخاب یک میزبان مناسب برای بیان و تولید پروتئین کایمریک، یکی از موارد دارای اهمیت در تحقیقات در زمینه واکسن های زیرواحدی حائز اهمیت است. میزبان *E.coli* به عنوان یکی از رایج ترین و کم هزینه ترین میزبان ها برای تولید پروتئین های نو ترکیب مطرح است. اگرچه این سیستم بیانی قادر به اجرای اصلاحات پس از ترجمه پروتئین های یوکاریوتی نیست [۲۲]، اما از آنجایی که بسیاری از پروتئین های یوکاریوتی، ساختار سه بعدی و فعالیت کامل زیستی خود را در شکل غیر گلیکوزیده نیز

۳-۴ بررسی قابلیت ایمنی زایی rfSP به عنوان واکسن در انسان

گروه rfsp-CHO در مقایسه با گروه rfsp-E.coli تمایل بیشتری به اتصال به سرم بیماران بهبود یافته واریانت دلتا و آلفا دارد و سطح اختلاف معنی داری بین گروه های تست و کنترل در آنالیز آماری مشاهده شد ($P < 0.05$) (نمودار ۳).

۳-۵ خصوصیات سرم حیوانات واکسینه شده

یافته ها نشان می دهد که آنتی بادی های سرم های موش های ایمن سازی شده با هر دو نوع rfsp می توانند به طور مؤثری اتصال RBD به گیرنده ACE2 در سلول های انسانی را مسدود کنند. در عین حال، rfsp-CHO توانایی بیشتری در

حفظ می کنند، می توانند در *E. coli* بیان شوند [۲۳]. در مواردی که بهینه سازی کدون های ژن به خوبی بر کدون های میزبان *E. coli* منطبق نباشد. از سویه های خاصی برای بیان ژن مورد نظر استفاده می شود. سویه Rosetta-gami (DE3) حاوی tRNA های مربوط به کدون های نادری است که به ندرت در *E. coli* مورد استفاده قرار می گیرند [۲۴]. Kireeva و همکاران در سال ۲۰۲۱ قطعه گلیکوپروتئین سطحی اسپایک را در *E. coli* BL21 (DE3) بیان کردند که قادر به شناسایی آنتی بادی های متصل به RBD می باشد [۲۵]. نتایج این مطالعه نشان می دهد rfsp-*E. coli* بیان شده در Rosetta-gami DE3 نیز علی رغم عدم وجود تغییرات پس از ترجمه نظیر اضافه شدن مولکول های قندی همچنان ویژگی های آنتی ژنیک خود را حفظ کرده و قادر است سیستم ایمنی را به نحو مناسبی تحریک کند (نمودار ۱). تولید پروتئین یوکاریوتی نو ترکیب به دلیل فقدان ماشین اصلاح پس از ترجمه در باکتری ها، چالش بزرگی را ایجاد می کند که همواره منجر به تولید پروتئین بیولوژیکی غیرفعال در این میزبان می شود [۲۶]. سیستم بیان سلولی پستانداران یک سیستم یوکاریوتی نسبتاً بالغ برای بیان پروتئین های نو ترکیب است. این سیستم می تواند به طور موقت یا پایدار آنتی ژن های نو ترکیب را بیان کند، سنتز سیگنال را تقویت کند، و پیچش صحیح پروتئین تا مرحله گلیکوزیلاسیون و ترشح را انجام دهد [۲۷]. پروتئین های نو ترکیب بیان شده به این روش ممکن است شکل اصلی و آنتی ژنی و ایمنی زایی خود را حفظ کنند. بنابراین، سیستم بیان سلولی پستانداران اخیراً برای بیان انواع پروتئین های هترو لوگ، از جمله پروتئین های ساختاری ویروسی و پپتید های فعال زیستی، استفاده شده است [۲۸]. مزیت اصلی سیستم سلولی پستانداران نسبت به دو سیستم بیانی حشره و اشریشیاکلی شانس بسیار بیشتر برای دریافت پروتئین های محلول با پیچش صحیح و گلیکوزیلاسیون مناسب

است، که باعث می شود پروتئین بیان شده ساختار اصلی و فعالیت بیولوژیکی خود را حفظ کند [۲۹]. دلیل انتخاب سلول CHO در مطالعه حاضر مناسب بودن این میزبان برای بیان rfsp به دلیل تغییرات پس ترجمه و گلیکوزیلاسیون است [۳۰]. گلیکوزیلاسیون اسپایک علاوه بر نقش حفاظتی با پوشاندن اپی توپ های پلی پپتیدی ویروسی به فرار ایمنی کمک می کند [۳۱]. Lanying Du و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کرد RBD بیان شده در *E. coli* نسبت به سلول های پستانداران و حشرات، ایمنی زایی کمتری دارد [۲۱]. برای تشخیص و اندازه گیری آنتی بادی های پلی کلونال تولید شده توسط لنفوسیت های B مختلف علیه اپی توپ ها در سرم موش، از روش الایزای نیمه کمی استفاده شد. نتایج حاصل از سه دوره تجویز با پروتئین rfsp خالص نشان داد که هر دو نوع پروتئین rfsp مورد نظر موجب تحریک پاسخ های ایمنی و تولید تیترو بالای آنتی بادی از کلاس IgG شده اند. اما پروتئین های rfsp بیان شده در سلول های CHO قادر به ایجاد پاسخ های آنتی بادی اختصاصی قوی تری از *E. coli* می باشد (نمودار ۱). آزمایش سرولوژیکی روش مهمی برای تشخیص عفونت SARS-CoV-2 است [۳۲]. جوهری و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که سلول های CHO میزبان مناسبی برای تولید مقادیر بیشتری از تریمر نو ترکیب SARS-CoV-2 هستند که می توانند به عنوان آنتی ژن برای آزمایش های سرولوژیکی انبوه استفاده شود [۶]. در پژوهش حاضر نیز آنتی بادی های سرم بیماران بهبود یافته کوید ۱۹ واریانت الفا و دلتا، rfsp-CHO را با قدرت بیشتری به عنوان آنتی ژن شناسایی کردند (نمودار ۳). علاوه بر این، واکنش پذیری با ویروس غیرفعال شده SARS-CoV-2 با سرم های موش های ایمن شده با پروتئین rfsp ها نشان داد که پروتئین rfsp-CHO نسبت به rfsp-*E. coli* قادر به ارائه اپی توپ های مشابه بیشتری با سویه ویروسی است (نمودار ۲). در مقایسه با سیستم های بیان سلول حشرات و *E. coli*

تجهیزات لازم برای انجام آزمون چالش با ویروس استاندارد SARS-CoV-2 اشاره کرد.

۵- نتیجه گیری

به طور خلاصه، برای ارزیابی کارایی واکسن اولویت به rfsp بیان شده در سلول های پستانداران داده می شود. زیرا میانگین تیتراژ آنتی بادی ها پس از آخرین تزریق در موش های ایمن سازی شده با rfsp-CHO به طور قابل توجهی بالاتر از سرم موش های واکسینه شده با rfsp-E.coli بود و همچنین میزبان CHO با انجام فرایند تغییرات پس از ترجمه مانند گلیکولیزاسون به عنوان یک گزینه مفید برای توسعه سنجش های تشخیص سرمی عفونت SARS-CoV2 می باشد و توانایی القای سطح بالاتری از پاسخ های آنتی بادی خنثی کننده نسبت به rfsp بیان شده در E.coli را دارد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از شرکت ژن سبز تشکر و قدردانی می شود.

تاییدیه اخلاقی: گواهی می شود طی مراحل ایمنی زایی روی حیوان مدل (موش بالبی) کلیه نکات اخلاقی رفتار با حیوانات رعایت شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می دارند هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سحر کریمی، پژوهشگر اصلی (۴۵٪)؛ شهرام نظریان: استاد راهنمای دوم (۱۰٪)؛ فتاح ستوده نژاد نعمت الهی: استاد مشاور (۵٪)؛ روح الله در ستکار: استاد مشاور و تحلیل گر آماری (۵٪)؛ جعفر امانی: استاد راهنما (۳۵٪).

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت هیچ نهادی نمی باشد.

۶- منابع

- [1] Liu, A. and Y. Li, Antibody responses against SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. Journal of medical virology, 2020.
- [2] Liu, C., et al., Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and

سیستم سلولی پستانداران هزینه تولید نسبتاً بالاتر و بهره وری کمتری دارد [۲۹]. یافته های ما نیز نشان داد. غلظت rfsp در میزبان E. coli و CHO-K1 به ترتیب ۲۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر با وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتون و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر با وزن مولکولی ۶۰ کیلودالتون می باشد. علت این اختلاف وزن گلیکولیزاسیون rfsp در میزبان CHO است. پروتئین S می تواند آنتی بادی های خنثی کننده (nAbs) و ایمنی محافظ را در بین تمام پروتئین های ساختاری دیگر القا کند [۳۳]. نتایج نشان داد که آنتی بادی ها در موش های واکسینه شده با rfsp-CHO با توانایی بالاتری نسبت به rfsp-E.coli می توانند تعامل RBD و گیرنده ACE2 آن را مسدود کنند و بر خنثی سازی در برابر SARS-CoV-2 تأثیر بگذارند (نمودار ۴). سیستم های بیان E.coli نسبت به سیستم بیان سلولی پستانداران می توانند با تراکم بالا در دمای اتاق بدون عرضه CO₂ رشد کنند و پروتئین نو ترکیب را بیان کنند. بنابراین، پروتئین ها به روشی سریع، آسان و قابل اطمینان تولید شده و در نتیجه هزینه مربوط به تولید و بهره وری کاهش می یابد [۲۱]. اگرچه در مطالعه حاضر پاسخ آنتی بادی قوی تر توانایی ارایه انواع اپی توپ های آنتی ژنی و پاراتوپ های آنتی بادی قوی تر و قدرت خنثی سازی بالاتری در rfsp-CHO بیان شده مشاهده شد. اما انتخاب بهترین سیستم بیانی نیاز به بررسی گزینه های عملکرد، گلیکوزیلاسیون، تاخوردگی مناسب، اقتصاد و ... دارد [۱۹]. پیشنهاد می شود که در مطالعات آتی علاوه بر ایمنی همورال، ایمنی سلولی نیز در موش های ایمن شده با پروتئین نو ترکیب rfsp ارزیابی شود. همچنین، می توان با بهره گیری از نانوذرات در کپسوله کردن و تحویل پروتئین نو ترکیب rfsp به سیستم ایمنی حیوان مدل، پتانسیل این روش را برای ساختن یک کاندیدای واکسن علیه بیماری SARS-CoV-2 مورد بررسی قرار داد. از محدودیت های مطالعه حاضر می توان به عدم فراهم شدن امکانات و

- and OmpW from *Vibrio Cholerae* and Evaluation of Its Immunogenicity. Iranian Journal of Immunology, 2018. 15(3): p. 207-220.
- [19] Tahmoorespur, M., *Evaluation of Different Expression Systems for the Production of Pharmaceutical Recombinant Proteins with Emphasis on Mammalian Cells*. Journal of Biosafety, 2016. 9(1): p. 51-65.
- [20] Van Hove, J., et al., *High-level production of recombinant human lysosomal acid alpha-glucosidase in Chinese hamster ovary cells which targets to heart muscle and corrects glycogen accumulation in fibroblasts from patients with Pompe disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. 93(1): p. 65-70.
- [21] Du, L., et al., *Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and E. coli cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity*. Virology, 2009. 393(1): p. 144-150.
- [22] Takrim, S., et al., *Expression, Purification and Immunogenicity Evaluation of Recombinant Fusion Protein (F) from Newcastle Virus in Animal Model*. Modares Journal of Biotechnology, 2019. 10(1): p. 15-21.
- [23] Kamionka, M., *Engineering of therapeutic proteins production in Escherichia coli*. Current pharmaceutical biotechnology, 2011. 12(2): p. 268-274.
- [24] Sørensen, H.P. and K.K. Mortensen, *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli*. Journal of biotechnology, 2005. 115(2): p. 113-128.
- [25] Fitzgerald, G.A., et al., *Expression of SARS-CoV-2 surface glycoprotein fragment 319–640 in E. coli, and its refolding and purification*. Protein expression and purification, 2021. 183: p. 105861.
- [26] Sahdev, S., S.K. Khattar, and K.S. Saini, *Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies*. Molecular and cellular biochemistry, 2008. 307(1): p. 249-264.
- [27] Rosser, M.P., et al., *Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system*. Protein Expression and Purification, 2005. 40(2): p. 237-243.
- [28] Eifler, N., et al., *Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells*. Journal of structural biology, 2007. 159(2): p. 179-193.
- [29] Du, L., et al., *Antigenicity and immunogenicity of SARS-CoV S protein receptor-binding domain stably expressed in CHO cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2009. 384(4): p. 486-490.
- related human coronavirus diseases. 2020 ,ACS Publications.
- [3] Yuan, M., et al., *Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2*. Science, 2020. 369(6507): p. 1119-1123.
- [4] Kar, T., et al., *A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2*. Scientific reports, 2020. 10(1): p. 1-2.۴
- [5] Amanat, F. and F. Krammer, *SARS-CoV-2 vaccines: status report*. Immunity, 2020. 52(4): p. 583-589.
- [6] Johari, Y.B., et al., *Production of trimeric SARS-CoV-2 spike protein by CHO cells for serological COVID-19 testing*. Biotechnology and bioengineering, 2021. 118(2): p. 1013-1021.
- [7] Watanabe, Y., et al., *Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike*. Science, 2020. 369(6501): p. 330-333.
- [8] Walls, A.C., et al., *Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein*. Cell, 2020. 181(2): p. 281-292. e6.
- [9] Ansarin, K., et al., *Effect of bromhexine on clinical outcomes and mortality in COVID-19 patients: a randomized clinical trial*. BioImpacts: BI, 2020. 10(4): p. 209.
- [10] Coutard, B., et al., *The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade*. Antiviral research, 2020. 176: p. 104742.
- [11] Hoffmann, M., H. Kleine-Weber, and S. Pöhlmann, *A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells*. Molecular cell, 2020. 78(4): p. 779-784. e5.
- [12] Mehdipour, A.R. and G. Hummer, *Dual nature of human ACE2 glycosylation in binding to SARS-CoV-2 spike*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021. 118(19): p. 11819.
- [13] Lopez Bernal, J., et al., *Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B. 1.617. 2 (Delta) variant*. N Engl J Med, 2021: p. 585-594.
- [14] Liu, H., et al., *The basis of a more contagious 501Y. V1 variant of SARS-COV-2*. Cell research, 2021. 31(6): p. ۷۲۲-۷۲۰ .
- [15] Mlcochova, P., et al., *SARS-CoV-2 B. 1.617. 2 Delta variant emergence and vaccine breakthrough*. 2021.
- [16] Shajahan, A., et al., *Deducing the N-and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2*. Glycobiology,. 2020. 30(12): p. 981-988
- [17] Watanabe, Y., et al., *Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2019. 1863(10): p. 1480-1497.
- [18] Vakili, A., et al., *Designing and Expression of Recombinant Chimeric Protein Containing CtxB*

[32] Djukic, T., et al., *Expression, purification and immunological characterization of recombinant nucleocapsid protein fragment from SARS-CoV-2*. Virology, 2021. 557: p. 15-22.

[33] Graham, R.L., E.F. Donaldson, and R.S. Baric, *A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses*. Nature Reviews Microbiology, 2013. 11(12): p. 836-848.

[30] Tegel, H., et al., *Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta (DE3)*. Protein expression and purification, 2010. 69(2): p. 159-167.

[31] Reis, C.A., R. Tauber, and V. Blanchard, *Glycosylation is a key in SARS-CoV-2 infection*. Journal of Molecular Medicine, 2021: p. 1-9.

Comparison of the headline and neutralization of the spike spikes of the Sars-COV-2 protein expressed in eukaryot cells, and prokaryot

sahar karimi¹, Shahram Nazarian², fattah Sotoodehnejadnematalahi³, Roohollah Dorostkar⁴, Jafar Amani⁵

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran,

2- Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran

3- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran,

4- Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran,

5- Applied Microbiology Research Center, System Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran,

Receipt: 2022/02/08

Accepted: 2022/06/12

jafar.amani@gmail.com

Abstract

Given the global epidemic of COVID-19, it is important to design a vaccine for prevention. The virus belongs to the beta-coronavirus family and forms appendages on the surface of the glycoprotein spike virus membrane. Studies on SARS-CoV-1 and related MERS-CoV vaccines have shown that the spike protein on the virus surface is a suitable target for the vaccine. In this experimental study, we compare the recombinant fragment of spike protein (rfsp) expressed in the eukaryotic host CHO-K1 cell and prokaryotic *E.coli* in terms of immunogenicity, neutralizing activity, and epitopes recognition. Similar to the virus strain and the ability to bind to the serum of improved patients, in two types of alpha and delta variants. The results showed that both rfSP proteins are a potential new antigen candidate for the development of the Covid 19 vaccine, but the CHO-K1 cell maintains the biological activity of the protein by performing post-translational modification processes such as glycolysis. This increases the present likelihood of developing virus-like epitopes and increases the titer of rfsp-specific antibodies in the serum of immunized mice. Therefore, priority is given to rfsp expressed in CHO-K1 cells to evaluate vaccine efficacy.

Keywords: COVID-19, vaccine, spike protein, glycolysis, CHO-K1 cell