زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

تخلیص RBD ژن اسپایک ویروس SARS-COV-2 بیان شده در سلول پروکاریوتی و بررسی تمایل اتصال پپتیدهای ضدویروسی به این پروتئین با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیکی

نرگس معززی طهرانخواه[1]، مجید صادقی‌زاده[2*]

۱-کارشناس ارشد، گروه ژنتیک ، دانشکده علوم زیستی ، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲-استاد، گروه ژنتیک ، دانشکده علوم زیستی ، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۷۵-۱٤۱۱۵، تهران، ایران

sadeghma@modares.ac.ir

دریافت: ۱٤۰۲/۱۱/۲٤ پذیرش: ۱٤۰۳/۰۲/۲٦

چکیده

همه‌گیری کرونا و مرگ شمار کثیری از انسان‌ها در جهان، شرایط اجتماعی و اقتصادی کشورها را با خطر روبرو کرده است. ویروس SARS-CoV-2 از خانواده کرونا ویروید، عامل بیماری کرونا و مسبب شیوع آن در قرن اخیر است. به‌دلیل استفاده ویروس کرونای جدید از پروتئین اسپایک سطح خود برای ورود به سلول‌های میزبان و اتصال به پروتئین سطحی ACE2 برای ورود ماده ژنتیکی و عفونت‌زایی، مطالعه ناحیه اتصال به گیرنده (RBD) در پروتئین اسپایک برای دانشمندان بسیار مهم است؛ با مهار این پروتئین و ناحیه اتصال به گیرنده آن، می‌توان مانع از ورود ویروس به سلول شد. با استفاده از کلونینگ می‌توان ژن های این ویروس را تکثیر و پروتئین آن را خالص‌سازی کرد. به کارگیری پپتید های ضدویروسی برای درمان بیماری‌ها یکی از روش‌های بسیار کاربردی است و در درمان SARS-CoV-2، پپتیدهای ممانعت کننده از اتصال RBD به گیرنده ACE2، بسیار مورد توجه دانشمندان است. در پژوهش حاضر، کلونینگ RBD در وکتور بیانی PET28a، بیان پروتئین RBD و فیوژن پروتئین GFP/RBD در میزبان پروکاریوتی انجام شد. به‌دلیل محلول نبودن این پروتئین در میزبان پروکاریوت، ستون بازتاخوردگی (Column Refolding) با شیب اوره با ستون نیکل-آگارز انجام و پروتئین سنتز شده از طریق تکنیک وسترن بلات تایید شد. از مقالات ۳ پپتید برای مقایسه اتصال آنها با RBD با استفاده از بیوانفورماتیک کاندید و تمایل اتصال آنها به همدیگر با روش داکینگ مولکولی بررسی و مشخص شد می‌توان از پپتیدهای یاد شده به‌دلیل اتصال به RBD در صورت تایید میانکش بین آنها در درمان عفونت این ویروس استفاده کرد.

کلید واژگان: SARS-CoV-2 ، RBD، بازتاخوردگی، پپتید ضد ویروسی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

۱-مقدمه

دسته وسیعی از ویروس‌ها به نام کروناویروس‌ها می‌توانند طیف وسیعی از حیوانات را آلوده کرده و باعث عفونت‌های تنفسی متوسط تا شدید در انسان شوند. دو کروناویروس مشتق شده از حیوانات که بسیار بیماری‌زا هستند، به ترتیب SARS-CoV و MERS-CoV، برای اولین بار در سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۱۲ در انسان ظاهر شدند و باعث عفونت‌های تنفسی کشنده شدند. این ویروس‌ها نگرانی مهم بهداشت عمومی در قرن بیست‌ویکم بودند[۱]. تعداد قابل توجهی از بیمارستان‌های ووهان چین موارد ذات‌الریه با علت نامشخص را در پایان دسامبر ۲۰۱۹ گزارش کردند[۲]. این بیماران از ذات‌الریه ویروسی رنج می‌بردند که به صورت تب، سرفه، درد قفسه سینه و در بیشتر موارد ارتشاح دو طرفه ریه و تنگی نفس ظاهر می شد. این علائم به‌طور مشابه در بیماران مبتلا به SARS و MERS وجود داشت[٦]. علت ذات‌الریه شدید یک بتاکرونا ویروس ناشناخته بود که عامل ایجاد آن توسط جداسازی ویروس از نمونه‌های خلط بیماران و تعیین توالی RNA متاژنومیک آنها مشخص شد[۳].

پروتئین اسپایک از دو زیر واحد S1 و S2 تشکیل شده است که از سطح ویروس به‌عنوان یک هوموتریمر کامل گسترش یافته و یک اسپایک سطحی مجزا را تشکیل می دهد. پروتئین اسپایک دارای ۱۲۷۳ اسید آمینه در طول کل است که ۳۱۹-٥٤١ آن در حوزه اتصال گیرنده (RBD) یافت می‌شود[٥و٤]. دامنه N ترمینال (NTD) و دامنه C ترمینال (CTD) که هر دو در تشکیل RBD نقش دارند، بخش اصلی زیرواحد ساختاری S1 را تشکیل می‌دهند. RBD یک بخش کلیدی در CTD این ویروس است که یک ناحیه‌ی مرکزی و یک حلقه گسترده به‌عنوان موتیف اتصال به گیرنده (RBM) دارد.

ویروس SARS-CoV-2 حفاظت بالایی از اکثر اسیدهای آمینه مورد نیاز برای اتصال به ACE2 انسانی را نشان می دهد. مطالعات نشان می‌دهد که میل اتصال RBD-ACE2 نقش مهمی در تعیین عفونت‌زایی SARS-CoV ایفا می کند[٦].

از آنجا که، ویروس SARS-CoV-2 غشای خود را با غشای سلول میزبان ترکیب می‌کند و از طریق گیرنده ACE2 و فعال کننده‌های ورودی مانند پروتئازهای انسانی وارد سلول می‌شود، داروهایی که از ورود ویروس به سلول جلوگیری می‌کنند ممکن است در درمان عفونت موثر باشند. درمان مبتنی بر پپتید یکی از مرزهای جدید در مبارزه با ویروس ها است [۷].. با هدف قرار دادن اختصاصی ویروس یا میزبان آن، پپتیدها می‌توانند عفونت را متوقف کنند[۸]. هدف قرار دادن ارتباط پروتئین-پروتئین هدف اصلی تولید دارو در ده سال گذشته بوده است، زیرا اساس فرایندهای سلولی مهم است[۹].

در این مطالعه RBD پروتئین سطحی ویروس SARS-CoV-2 کلون گردیده و ترکیب پروتئین GFP/RBD به مرحله خالص‌سازی رسانده شد. علاوه بر این، با توجه به اهمیت اتصال این پروتئین به گیرنده سطح سلولی انسانی ACE2 برای ورود و عفونت ویروس، نتیجه‌گرفته شد که مسدود کردن ارتباط این پروتئین با ویروس، گامی مهم در مهار آن و جلوگیری از آلوده کردن سلول های جدید توسط ویروس است. پپتیدها جایگزین مناسبی در این زمینه برای شکستن پیوند بین ACE2 و RBD هستند. با بررسی مقالات، ۳ پپتید که ظرفیت اتصال به RBD را دارند برگزیده شده و از نظر قدرت اتصال بررسی شدند. این پپتیدها با استفاده از PEP-FOLD مدل سازی شدند و سپس قدرت اتصال هر یک با RBD با استفاده از روش docking مقایسه شد. پپتید برتر انتخاب شده و در آینده برای کلونینگ و انجام داده‌های آزمایشگاهی استفاده خواهد شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱ محیط‌های کشت سلول‌های باکتریایی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

محیط کشت LB مایع که از۱ گرم سدیم کلراید، ۱ گرم تریپتون، ۰,۵ گرم عصاره‌ی مخمر، و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر در آزمایشگاه تشکیل شد. برای تهیه محیط LB جامد، به محتویات محیط مایع میزان ۱,۵ گرم در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر آگار اضافه شد. محیط کشت 2x YT با میزان ۱ گرم عصاره‌ی مخمر، ۱,٦ گرم تریپتون، ، ۰,۵ گرم سدیم کلراید و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر است، نیز در آزمایشگاه تهیه شد. این محیط، یک محیط استاندارد برای رشد میکروبی است که برای کشت باکتریوفاژ M13 و سویه‌های *E.coli* تهیه می‌شود.

۲-۲ بهینه سازی ژن RBD و ترانسفر کردن آن به درون باکتری

توالی ژن RBD از پایگاه داده NCBI گرفته شد و بهینه سازی کدون برای بیان پروتئین آن در میزبان باکتریایی انجام شد. ترادف ژنی در وکتور PET28a بین دو محل برش مورد نظر مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس آن توالی به شرکت Molecular Biotech Shinegene برای سنتز ارسال شد. در این مرحله پلازمید نوترکیب به درون سلول باکتری *E.coli* سویه DH5α به عنوان میزبان وارد شد. سلول‌های مورد نظر در ابتدا برای انتقال مستعد شدند و سپس انتقال وکتور به درون سلول صورت گرفت. پلازمید نوترکیب وارد سلول میزبان شد. در این پژوهش به منظور بیان پروتئین از باکتری *E.coli* سویه BL21 و Shuffle به عنوان میزبان استفاده شد. در این مرحله نیز سلول‌های مورد نظر برای انتقال وکتور مستعد شده و سپس به درون سلول وارد می‌شوند.

۲-۳ استخراج پلازمیدهای نوترکیب

برای انتقال پلازمید به درون باکتری از روش شوک حرارتی استفاده شد. سلول مستعد در معرض پلازمید کنترل مثبت، پلازمید حاوی ژن سفارش داده شده و یا محصول لایگیشن قرار می‌گیرد و مخلوط می‌شود. ویال‌های حاوی سلول مستعد به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند و سپس به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد شوک حرارتی داده و دوباره روی یخ قرار گرفتند. سپس، بعد از گذشت ۵ دقیقه به هر ویال ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع بدون آنتی‌یوتیک بر روی یخ اضافه شد و ویال‌ها با شیکر ۲۵۰ دور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ الی ۲ ساعت قرار گرفتند تا باکتری‌ها فرصت رشد داشته باشند. پس از انتقال پلازمید نوترکیب به درون سلول در این مرحله هدف ایجاد تمایز در بین کلنی های واجد پلازمید نوترکیب و سایر کلنی‌ها بود. بدین منظور برای به دست آوردن تک کلنی، این باکتری‌ها بر روی محیط کشت جامد کشت داده شدند.

تک کلنی برداشته شده که حاوی پلازمید است، در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد و به مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه، بر ری شیکر انکوبه گردید. روز بعد پس از انجام سانتریفیوژ (۳۵۰۰ rpm) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق)، مقداری از رسوب در ۰,۵ سی سی محیط کشت مایع حل شده و هم حجم آن گلیسرول ٦۰ درصد برای نگه‌داری در فریزر ۸۰- اضافه شد. با استفاده از رسوب باقی‌مانده توسط کیت Favorgen استخراج پلازمید انجام شد.

۲-٤ تکثیر ژن و برش GFP و پلازمید توسط آنزیم های NdeI و BamHI

در این واکنش الگوی مورد نیاز برای تکثیر GFP، پلازمید PET21a دارای ژن GFP بود. بویسیله‌ی پرایمرهای طراحی شده واکنش PCR انجام و قطعه GFP تکثیر شد. فرایند برش آنزیمی برای پلازمید و قطعه GFP تکثیر شده با دو آنزیم NdeI و BamHI با حجم‌های یک میکرولیتر و با بافر مشترک (2x Tango) به صورت همزمان انجام شد و صحت و تایید برش از طریق الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. این مواد در میکروتیوپ ۰,۵ ریخته شده و به مدت ٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

بعد از گذشت مدت زمان لازم برای فرایند هضم آنزیمی، محصول هضم برای تایید برش توسط آنزیم محدود کننده بر روی ژل آگارز برده شد.

۲-۵ اتصال پلازمید و GFP برش‌خورده به هم و انتقال آن به باکتری

برای حذف قطعات غیراختصاصی و جلوگیری از پایین آمدن کارایی لایگیشن(اتصال قطعه تکثیر شده به پلازمید برش خورده)، محصول برش خورده توسط آنزیم‌های محدودالاثر، روی ژل آگارز برده شده و از روی ژل برش داده و تخلیص می‌گردند. تخلیص قطعه DNA از ژل آگارز با استفاده از کیت شرکت Favorgen انجام شد. باکتری مستعد تهیه و سپس ترنسفورم محصول اتصال انجام شد.

۲-۶ کلونی PCR

برای این کار چند کلنی از بین کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت را انتخاب و در میکروتیوب حاوی ۲۰ میکرولیتر آب حل کرده و از آن به عنوان الگو برای انجام واکنش PCR استفاده شد. ۵ میکرولیتر مستر PCR، ۰,۵ میکرولیتر از پرایمرها، ۱ میکرولیتر از کلنی حل شده در آب و ۳ میکرولیتر آب در میکروتیوب ۰,۲ ریخته و برای چند کلنی این کار انجام شد. در این مرحله بهتر است که از پرایمرهای مربوط به بدنه وکتور برای انجام PCR و تایید حضور قطعه استفاده شود.

۲-۷ تکثیر و برش ژن RBD و پلازمید توسط آنزیم‌های HindIII و XhoI

در این واکنش الگوی مورد نیاز برای تکثیر RBD، پلازمید PET28a دارای ژن RBD سنتز شده بود. بوسیله‌ی پرایمرهای طراحی شده واکنش PCR انجام و قطعه RBD تکثیر شد. فرایند برش آنزیمی برای پلازمید و قطعه RBD تکثیر شده با دو آنزیم HindIII و XhoI با حجم‌های یک میکرولیتر و با بافر مشترک R به صورت همزمان انجام شد. این مواد در میکروتیوپ ۰,۵ ریخته شده و به مدت ٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از گذشت مدت زمان لازم برای فرایند هضم آنزیمی، محصول هضم برای تایید برش توسط آنزیم محدود کننده بر روی ژل آگارز برده شد.

۲-۸ اتصال پلازمید و RBD برش خورده به هم و انتقال آن به باکتری

برای حذف قطعات غیراختصاصی و همچنین برای جلوگیری از پایین آمدن کارایی لایگیشن(اتصال)، محصول برش خورده توسط آنزیم‌های محدودالاثر، روی ژل آگارز برده شده و از روی ژل برش داده و تخلیص می‌شوند. تخلیص قطعه DNA از ژل آگارز با استفاده از کیت شرکت Favorgen انجام شد. باکتری مستعد تهیه شده و سپس ترنسفورم محصول اتصال انجام شد.

۲-۹ بیان پروتئین RBD و GFP+RBD در میزبان‌های بیانی

هدف اصلی در بیان پروتئین نوترکیب به‌دست آوردن مقادیر بالایی از پروتئین محلول در سلول باکتریایی است. برای بیان پروتئین مورد نظر از محیط کشت 2X YT استفاده شد و برای القا از IPTG با غلظت ۰,۱، ۰,۳، ۰,۵، ۰,۷ و ۱ میلی مولار استفاده شد. باکتری *E.coli* BL21(DE3) حاوی پلازمید نوترکیب پس از کشت در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، شبانه بر روی شیکر(۱۸۰ دور در دقیقه) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عمل تلقیح سپس از همین کشت‌های شبانه در فالکون‌های محتوی محیط کشت 2X YT و حاوی کانامایسین بود انجام شد. از باکتری‌های رشد کرده، کشت مجدد در فالکون حاوی محیط کشت 2X YT، انجام شد و باکتری‌ها مجددا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه انکوبه گشتند. وقتی کدورت باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰,٦ رسید، IPTG با غلظت‌های ذکر شده به فالکون‌ها افزوده شد. دمای بیان برای RBD ۳۰ درجه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

سانتی‌گراد و برای GFP+RBD ۲۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان بیان ١٤ ساعت در نظر گرفته شد. سپس، نمونه های پروتئین پیش و پس از القا بر روی ژل آکریل آمید ۱۲,۵ درصد بررسی شدند.

۲-۱۰ سونیکاسیون، الکتروفورز و SDS-PAGE

پس از پایان مدت زمان لازم برای بیان پروتئین، باکتری روی یخ گذاشته شده و تمامی مراحل پیش‌رو روی یخ انجام می شود. محیط حاوی باکتری القا شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با دور 4000rpm سانتریفیوژ شده و پس از تخلیه کامل مایع رویی، رسوب سلولی حاصل از هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط در ۵ میلی‌لیتر بافر لیز سوسپانسیون شده و ۳۰ دقیقه روی یخ باقی‌مانده و سپس روی یخ سونیکیت شدند. سونیکاسیون در مدت ۵ دقیقه به صورت ۱۰ ثانیه سونیکیت ۱۵ ثانیه استراحت روی یخ انجام شد. سلول‌های شکسته شده با سانتریفیوژ g ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد ته‌نشین شده و فاز رویی و رسوب برای بررسی روی ژل SDS از هم جدا شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شوند.

برای آماده‌سازی نمونه برای SDS-PAGE به میزان ۱۰ میکرولیتر از نمونه رسوب و مایع رویی برداشته شده و به نسبت ١:٤ با بافر نمونه حاوی مرکاپتو اتانول ترکیب شده و به مدت ۳ دقیقه در ۱۰۰ درجه قرار داده می‌شوند. این نمونه‌ها آماده برای لود بر روی ژل آکریل‌آمید می‌باشند. نمونه‌های پروتئینی آماده شده بر روی ژل SDS لود شده، و ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ٤۰ دقیقه اعمال شد. پس از انجام الکتروفورز، ژل به مدت ۹۰ دقیقه در ظرف حاوی رنگ قرار داده شد و سپس رنگ خارج و رنگ‌بر اضافه شد. پس از ٦۰ دقیقه، رنگ‌بر با رنگ‌بر جدید تعویض شد. این کار طی ۲ مرحله انجام و در انتها رنگ‌بر اضافه شده در مرحله آخر در طول شب (١٦ ساعت) باقی ماند.

۲-۱۱ تخلیص پروتئین نوترکیب محلول

به ازای رسوب به‌دست آمده از هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت باکتری ۵۰ میلی‌لیتر بافر لیز به رسوب اضافه شد و به حالت سوسپانسیون درآمد. سپس، با توجه به حجم نهایی مقداری به آن محلول پودر اوره اضافه شد تا غلظت نهایی اوره ۲ مولار، ٤ مولار، ٦ مولار و ۸ مولار شود. سپس، به مدت ٦ ساعت محلول حاصل بر روی Rotator در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه حاصل برای انجام سونیکیشن به شیوه‌ی ذکر شده آماده و سپس بر روی ژل SDS ران شدند.

برای خالص‌سازی پروتئین‌های Refold شده با اوره، کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل آگارز انجام شد. نمونه پروتئینی روی ستونی که توسط بافر لیز به تعادل رسیده بود، برده شد و به ترتیب با بافر دارای اوره ٦ مولار سپس ٤ مولار و بعد ۲ مولار اوره شسته شد و در آخر برای جداسازی پروتئین نوترکیب متصل به ستون، از بافر Elution فاقد اوره استفاده شد. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با دنباله هیستیدینی[1] متصل به پروتئین برای اتصال به نیکل ستون، سبب خروج پروتئین از ستون می‌شود.

۲-۱۲ وسترن بلات

برای انجام وسترن بلات پس از آماده سازی نمونه‌ها به شیوه‌ی ذکر شده و ران کردن نمونه‌ها بر روی ژل SDS آماده شده، مارکر پروتئینی ۲۰ کیلودالتونی نیز در کنار نمونه ها لود می‌شود. پس از پایان الکتروفورز ژل از کاست جدا شده و برای انجام مرحله انتقال از ژل به کاغذ آماده می‌شود. کاغذ PVDF به اندازه ژل بریده شده و برای فعال شدن به مدت ۱ دقیقه در متانول شیک شده و با آب مقطر شسته می‌شود و درون بافر انتقال قرار می‌گیرد. انتقال پروتئین از ژل به کاغذ در دستگاه وسترن بلات انجام می‌شود. دستگاه و با ولتاژ ۱۲۰ میلی‌ولت به مدت ٤۰

[1] His tag

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

دقیقه به منبع مولد جریان متصـــل شـــده و پروتئین‌های موجود در ژل به کاغذ منتقل می شود. در مرحله بلاکینگ، برای پوشـــانـدن کـاغـذ برای جلوگیری از واکنش غیراختصـــاصـــی آنتی بادیه اولیه، محلول متوقف کننده (Blocking) به‌کار می رود. برای ســـاختن این محلول ۲ درصـد شـیر خشـک بدون چربی در بافر TBS–T اضـافه می شـــود، پس از اتمام انتقال پروتئین‌ها بر ســـطح کاغذ PVDF کاغذ به مدت ۷۵ دقیقه در دمای اتاق با محلول بلاکینگ شیک می شود. پس از پایان یافتن زمان بلاکینگ کاغذ با آنتی‌بادی اولیه‌ای که با محلول بلاکینگ به مقدار معین آنتی‌بـادی اولیـه His-Probe (sc-8036) مخلوط و رقیق شده است، به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه می‌شود. پس از اتمام مرحله قبل، کاغذ ۳ بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با بافر TBS-T شست‌وشو داده می‌شود. سپس، کاغذ با آنتی‌بادی ثانویه Anti-Rabbit با غلظت (۱:۱۰۰۰) برای تمام آنتی‌بادی‌های اولیه به مدت ۷۵ دقیقه در دمای اتاق شیک می‌شود. در پایان این مرحله نیز کاغذ ۳ بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با بافر TBS-T شست‌وشو داده می‌شود.

از جمله دقیق‌ترین و حساس‌ترین تکنیک‌های آشکارسازی باند پروتئینی مورد نظر (که با آنتی‌بادی اولیه اختصـاصـی خود شـــناســـایی شـــده اســـت) اســـتفاده از کیت‌های Chemiluminescence می باشـــد. کیت ECL advanced reagents که در این برر سی ا ستفاده شد شامل non-fat milkو Reagents A,B است.

۲-۱۳ مطالعات بیوانفورماتیکی

توالی فیوژن پروتئین‌هـای GFP/RBD و SUMO/RBD تو سط نرم‌افزار آلفا فولد ۲ که یکی از برترین نرم‌افزارهای پیش‌بینی ساختار پروتئین مشخص شد.

بهترین پپتیدهای انتخابی ۳ مطالعه مختلف که در هر یک به روش متفاوتی تعدادی پپتید که توانایی اتصال به RBD را دارند [۱۰۶-۱۰۴]، پیش‌بینی شـــده‌اند، انتخاب شـــد (جدول ۱). ســـاختار این پپتیدها با اســـتفاده از نرم‌افزار PEP-FOLD-3 پیش‌بینی شد.

اولین کمپلکس به‌دســـت آمده از هر نتیجه داکینگ به نرم‌افزار PDBSUM داده شـــد. این نتـایج از نظر آمینواسیدهای درگیر و انرژی اتصال بررسی شده و مقایسه شدند.

۳-نتایج

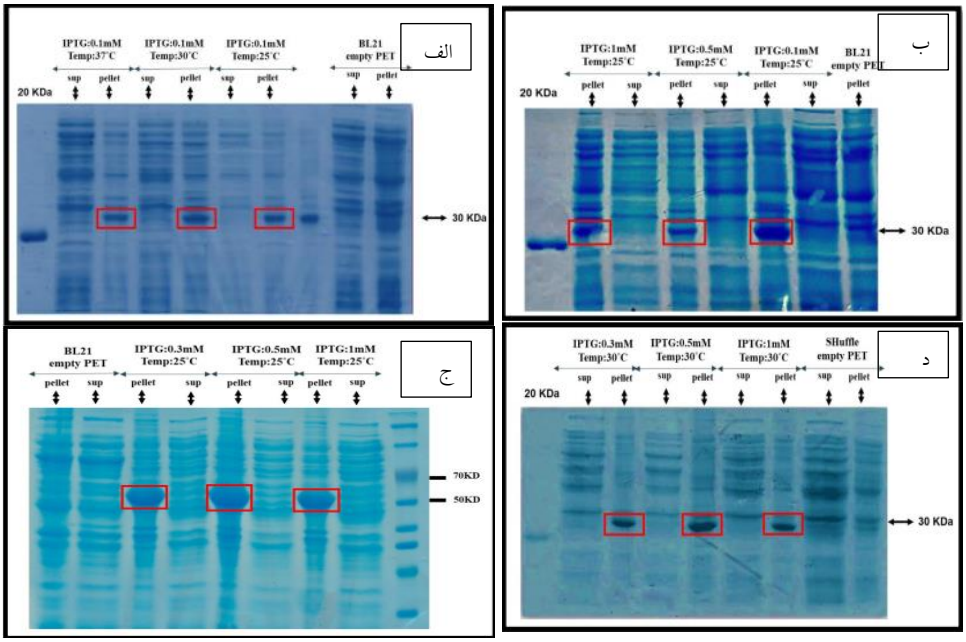
۳-۱ بیان پروتئین RBD و بیان فیوژن پروتئین GFP/RBD

برای بیان پروتئین مورد نظر از ســـویه‌ی *E.coli* BL-21 و Shuffle اســـتفاده شـد. باکتری دارای پلازمید نوترکیب در محیط کشت مایع 2XYT کشت داده شد.

جدول ۱ لیست پپتیدهای انتخابی

روش انتخاب پپتید	مقاله مربوطه	توالی پپتید کاندید شده
Phage display	https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04873	SCFDFLNWASCD
In silico study	https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104759	AWDFGSIGGVFTSVGKLVHQVFGTAYGVL
In silico study	https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05739	CRHCPKDWTFFQGNCYFMSN

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

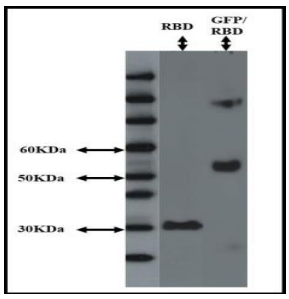


شکل ۱ شرایط بهینه بیان RBD و GFP/RBD. الف) بیان پروتئین RBD در میزبان BL21 با غلظت‌های مختلف IPTG. ب) بیان پروتئین RBD در میزبان BL21 با غلظت ۰,۱ میلی‌مولار IPTG در دماهای مختلف. ج) بیان پروتئین RBD در میزبان Shuffle با غلظت‌های مختلف IPTG . د) بیان فیوژن پروتئین GFP/RBD در میزبان BL21 در غلظت‌های مختلف IPTG

برای فراهم شدن بهترین شرایط بیان، باکتری‌ها در دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. همچنین، تاثیر غلظت‌های مختلف IPTG (۰,۱، ۰,۵ و ۱ میلی مولار) بر روی بیان در ۱٤ ساعت ارزیابی شد. نتایج این آزمایشات نشان داد که بهترین شرایط بیان در میزبان BL21 با غلظت ۰,۱ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٤ ساعت و در میزبان SHuffle با غلظت ۰,۵ میلی‌مولار IPTG، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٤ ساعت تعیین شد (شکل ۱).

۳-۲ تعیین صحت هویت پروتئین‌های بیانی به روش وسترن بلاتینگ

بیان پروتئین نوترکیب مورد نظر و محلولیت آن توسط SDS-PAGE برر سی و به کمک متد و سترن بلات تعیین هویت شدند. برای تأیید هویت این پروتئین‌های RBD و GFP/RBD نمونه باکتریایی لیز شده پس از الکتروفورز در ژل ۱۲,۵ درصد SDS-PAGE تفکیک و با روش وسترن بلاتینگ به کاغذ pvdf انتقال داده شدند. سپس، با آنتی بادی Anti-His Tag و آنتی‌بادی ثانویه انکوبه شد. برای مشاهده باندها از سوبسترا استفاده شد. پروتئین‌های نوترکیب تولید شده دارای دنباله‌ی هیستیدینی بودند (شکل ۲).



شکل ۲ وسترن بلات با آنتی‌بادی anti-His-Tag نشانگر باند RBD با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون و پروتیین GFP/RBD با وزن مولکولی ۵۵ کیلو دالتون است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

۳-۳ تخلیص پروتئین های تولیدی به روش کروماتوگرافی تمایلی

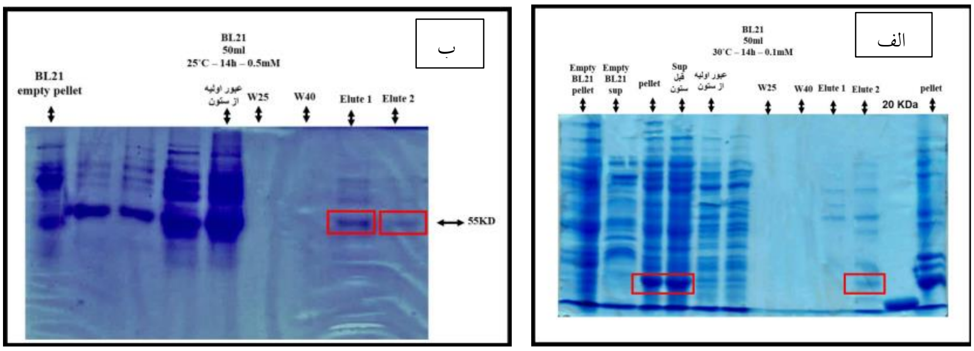
از روش کروماتوگرافی تمایلی برای خالص سازی پروتئین ا ستفاده شد. در این روش از ستون نیکل ا ستفاده شد و نتایج در شکل ۳ از نظر شدت باندها قابل رویت است.

۳-٤ نتایج بیوانفورماتیکی

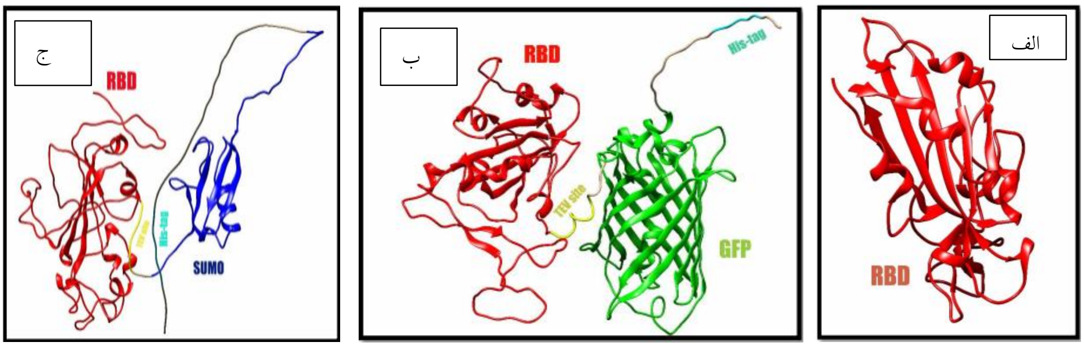
فا یل PDB کمپلکس RBD/ACE2 که به روش X-ray diffraction به‌دســـت آمده با کد 6M0J برای این کار انتخاب شد.

انتخاب فایل با کد ذکر شـــده از پایگاه داده‌ها به دو دلیل روش ساختار سنجی پروتئین به کمک ا شعه ایکس و بالا بودن امتیازهای مربوط به شـــاخص‌های Rfree، Clash score، معیارهای راماچاندران[۲] انجام شد.

برای حذف ACE2، فایل PDB با نرم‌افزار Chimera باز و زنجیره ACE2 از آن حذف شـــد و مجددا برای ادامه کار فایل به فرمت PDB ذخیره شد. تصویر فولد صحیح RBD ، GFP+RBD و SUMO+RBD در شکل ٤ آمده است.



شکل ۳ الف) تصویر ژل تخلیص پروتئین RBD به روش column refolding ب) تصویر ژل تخلیص پروتئین GFP/RBD به روش column refolding

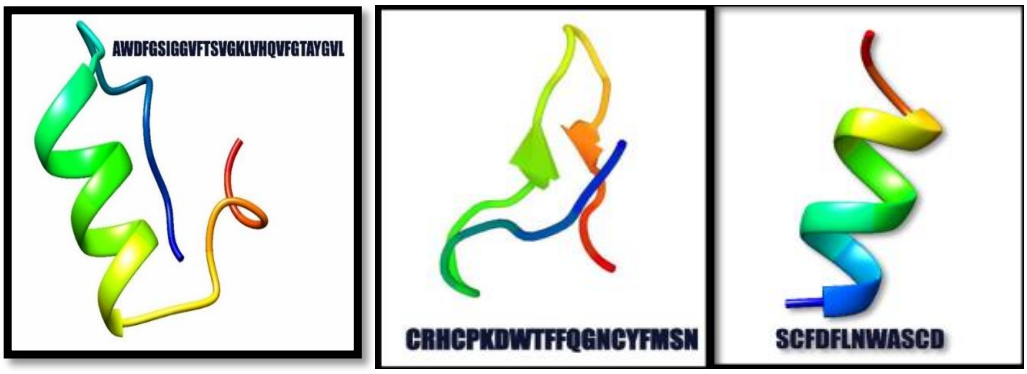


شـــکل ٤ الف) شـــکل ســـاختار شـــماتیک RBD با اســـتفاده از نرم‌افزار Chimera. ب)تصـــویر ســـاختار پیش‌بینی شـــده‌ی فیوژن پروتئین GFP+RBD توسط نرم‌افزار آلفافولد۲. ج)تصویر ساختار پیش‌بینی شده‌ی فیوژن پروتئین SUMO+RBD توسط نرم‌افزار آلفافولد۲

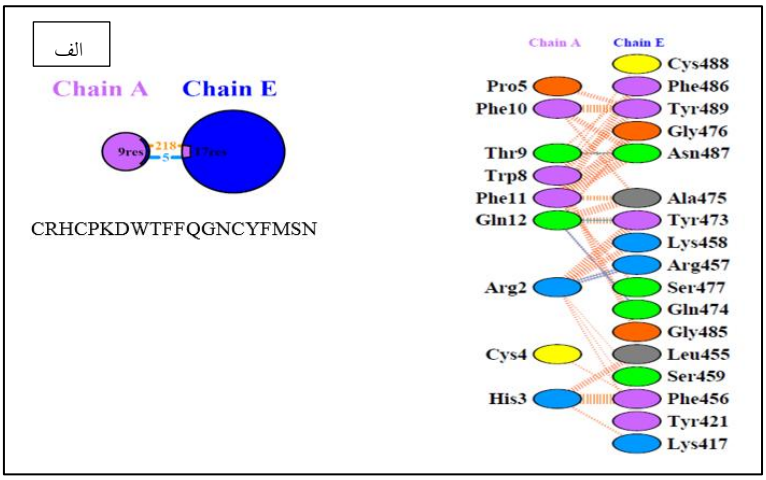
[۲] Ramachandran Outliers

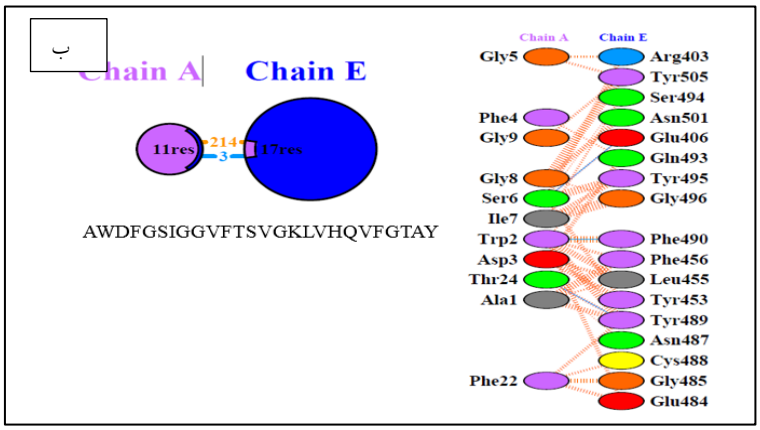
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

نرم‌افزار PEP FOLD 3 یکی از بهترین پایگاه های داده برای ساختار پپتیدهای طراحی شده است. ما با استفاده از این نرم‌افزار توالی ۳ پپتید انتخابی خود را پیش‌بینی کردیم. شکل ۵ تصاویر مربوط به هر ۳ پپتید تصویرسازی با نرم‌افزار Chimera است. در نهایت داکینگ پپتیدها با RBD با استفاده از سرور Z-DOCK انجام شد (شکل٦) .

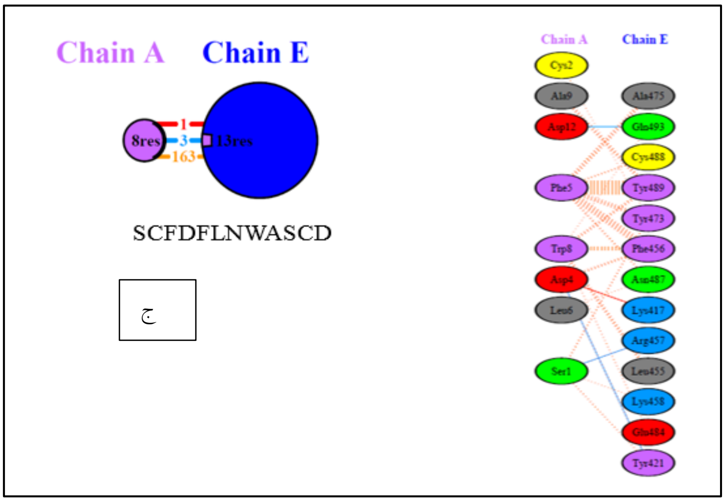


شکل ۵ ساختار شبیه‌سازی شده پپتیدهای انتخاب شده توسط نرم‌افزار PEP-FOLD-3





[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]



شـــکل ٦ الف) نتیجه داک مولکولی پپتید CRHCP با پروتئین RBD (نتایج داکینگ پروتئین RBD با ۳ پپتید انتخابی توســـط ســـرور Z-DOCK). ب) نتیجه داک مولکولی پپتید AWDFG با پروتئین RBD. ج) نتیجه داک مولکولی پپتید SCFD با پروتئین RBD.

٤- بحث و نتیجه‌گیری

ثبات سیستم بهداشت جهانی به شدت تحت تأثیر SARS-CoV در ســـال ۲۰۰۳/۲۰۰۲، ســـندرم تنفســـی خاورمیانه (MERS-CoV) در ســـال ۲۰۱۳/۲۰۱۲ و بیماری همه‌گیر فعلی SARS-CoV-2 قرار گرفته ا ست. گروهی از بیماران با شرایط ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی و پز شکی تخ صصی باید از احتمـال جهش‌هـای تهـاجمی SARS-CoV-2 کـه میـل پیوندی بالایی در محل‌های اتصـال غشـایی (گیرنده‌های عملکردی) دار ند، آ گاه باشـــند که می‌توا ند تکثیر دا خل ســـلولی ویروس، نرخ، میزان انتقال و میزان مرگ‌ومیر را افزایش دهد. در حال‌حا ضر، WHO در حال شنا سایی و طبقه‌بندی انواع وســـیع‌تری از گو نه‌های ژنتیکی SARS-CoV-2 است. این گونه‌ها عامل نگرانی بوده و مورد بحث می‌باشـــند و نام آنها بر اســـاس الفبای یو نانی (آلفا تا اومیکرون) اســـت. اولین قدم حیاتی در توســـعه منطقی و مؤثر و کاربرد تاکتیک‌های ضـــد کووید، درک ویژگی‌های مولکولی ســـویه‌های مختلف اســـت[۱۰]. همانطور که در بخش‌های مختلف این مطالعه توضـیح داده شـد، پروتئین ا سپایک ویروس به گیرنده سطح سلولی ان سانی ACE2 متصل می‌شود. این اتصال سبب بروز وقایع بعدی می‌شود که در نهایت منجر به ورود ویروس به ســـلول و عفونت می‌شـود. از بین اجزای مختلف این پروتئین، دامنه اتصـال گیرنده (RBD) جزء اصـلی اسـت که در اتصـال و اجازه ورود ویروس به سلول نقش دارد. با توجه به اهمیت بالای این دامنه در زمینه‌ی طراحی دارو و واک سن برای درمان و پیشـــگیری از این بیماری، در این پژوهش پروتئین RBD ویروس SARS-CoV-2 در میزبان پروکاریوتی بیان شد تا بتوان از آن برای انجام کارهای پایین دســـت من جمله طراحی پپتیدی با توانایی اتصـــال به RBD و نیز ایجاد اختلال در اتصال بین RBD و ACE2، استفاده کرد.

ت صور می شود که اولین و مهم‌ترین کاربرد فناوری DNA نوترکیب در صـــنعت، افزایش تولید پروتئین‌های درمانی است. بیان پروتئین نوترکیب هدف اصلی در آغاز پیشرفت های بیوتکنولوژی بود. پیشـــرفت‌ها در زمینه‌های ژنتیک، زی ست شنا سی مولکولی و علوم پروتئین، راه‌های جدیدی را برای سنتز پروتئین‌های نوترکیب باز کرده ا ست که می تواند برای بهبود انتخاب دارو و مدیریت بیماری اســـتفاده شود[۹].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

بیان این پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی رخ می‌دهد. برای بیان آن در میزبان‌های پروکاریوتی، کدون‌ها بر اساس ترجیحات باکتریایی اصلاح شدند و سپس توالی مورد نظر سفارش داده شدند. یکی از مسائلی که در این پژوهش مطرح شد، حل نشدن پروتئین های بیانی بود که برای از بین بردن مشکل راهبردهای متمایز تا کردن مجدد استفاده شد. استفاده از اوره برای Refolding یکی از روش‌های متداول بوده اما کاربرد کارایی و کیفیت ستونی که مورد استفاده قرار میگیرد را به شدت کاهش می‌دهد. کاهش پایداری حلالیت پروتئین بیانی و اگریگه شدن پروتئین بعد از ٢٤ ساعت، در اوره با غلظت ٨ مولار یکی دیگر از مشکلات خالص سازی بود. بنابراین تخلیص به شیب اوره از طریق ستون نیکل-آگارز پس از انکوبه شدن پروتئین با اوره گزینه مناسب‌تر حلالیت آن در میزبان و عدم تشکیل IB می باشد. در این پژوهش ما از تگ SUMO در ناحیه N پروتئین برای حلال‌سازی و افزایش میزان بیان پروتئین استفاده شد.

GFP پروتئین فلورسنت مشتق شده از عروس دریایی Aequorea victoria بود که توانایی بالایی از تابش نور مرئی دارد. GFP با جهش در کدون‌های مختلف رنگ‌های مختلفی را ساطع می‌کند و برای ردیابی پروتئین‌ها، بررسی بیان ژنی و بررسی برهمکنش میان پروتئین‌ها به‌عنوان یک نشانگر استفاده می‌شود [١١].

در این مطالعه، برای پیش برد پروژه و انجام آزمایش‌هایی نظیر الایزا در تحقیقات آینده از فیوژن پروتئین GFP/RBD و نور منتشر شده از آن استفاده شد. تشکیل انکلوژن بدی و محلول نبودن پروتئین تولید شده مسیر رسیدن به هدف را دشوار کرد، به طوری که حتی پس از انجام بازتاخوردگی(Refolding) بوسیله‌ی اوره نور تولید شده از فیوژن پروتئین در مقایسه با پروتئین EGFP بسیار کمتر بوده و نظر بر این است که با انجام باز تاخوردگی (Refolding) الزامی به برگشت پروتئین به ساختار و فولد صحیح وجود ندارد.

تاکنون بیش از صد نوع کروناویروس شناسایی شده است، اما هیچ درمان قطعی برای کرونا ویروس جدید SARSCoV2، عامل بیماری کووید-١٩ گزارش نشده است و این بیماری همچنان یکی از مهمترین علل مرگ ومیر در جهان است. راهبردهای درمانی فراوانی مانند بررسی داروهای ضدویروسی موجود، بررسی ماکرو مولکول‌های، طراحی ترکیبات مسدود کننده کمپلکس‌های همانندسازی ویروس، بلوکه کردن محورهای اتصال و ورود ویروس به سلول میزبان و تولید واکسن برای COVID-19 ، ارائه شده است [١٣و١٢].

همانطور که قبلا اشاره شد، مسیر ورود ویروس SARS-CoV به سلول میزبان بوسیله‌ی تعامل بین پروتئین اسپایک ویروس و گیرنده ACE2 سلول میزبان است. بنابراین، اختلال در اتصال اسپایک و گیرنده سطح سلولی آن می تواند از ورود ویروس به سلول‌های انسانی جلوگیری کرده و یک مکانیسم درمانی مناسب باشد[١٤].

از سویی داروهای پپتیدی با دوز مصرفی پایین، فعالیت بالایی را از خود نشان می‌دهند. این داروها با سمیت کم و اختصاصیت بالا و نیمه عمر پایین درون بدن تجمع نمی یابند. علاوه بر آن پپتیدها نسبت به پروتئین‌های بزرگ و آنتی‌بادی‌ها، در میزبان‌های بیانی پروکاریوتی آسان‌تر بیان شده و از لحاظ هزینه و زمان مقرون به صرفه می‌باشد. بنابراین، مهار تعامل ACE2 و RBD از طریق پپتید یکی از بهترین روش‌ها است[١٥و١٣].

تاکنون پپتیدهای زیادی طراحی و بررسی شده‌اند. این پپتیدهای مسدود کننده شبیه دامین RBD پروتئین اسپایک بوده و توانایی به گیرنده ACE2 اتصال دارند و یا از توالی طبیعی پروتئین ACE2 منشأ گرفته و از ورود به ویروس به درون سلول میزبان جلوگیری می‌کنند. با توجه به نقش کلیدی گیرنده ACE2 در بدن، در این پروژه تصمیم بر آن

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

شـد پپتیدی ضـد دامین RBD ویروس طراحی و ارزیابی شـود. در راسـتای پیدا کردن پپتید مناسـب برای اتصـال رقابتی آن با RBD و اختلال در اتصـــال آن به گیرنده‌ی خود یعنی ACE2، با مطالعه‌ی مقالات چاپ شده ۳ مطالعه که به روش‌های بیوانفورماتیکی و نمایش فاژی پپتیدهایی را برای اتصـــال به RBD به‌دســـت آورده بودند، انتخاب شـــدند و بهترین پپتیدهای این مقالات برای انجام داکینگ و مقایسه اتصال آها به RBD برگزیده شدند.

تقدیر و تشکر: نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و بنیاد ملی علم ایران (INSF) با توجه به طرح مصوب شماره ۹۹۰۱۵۱۰۰ قدردانی می‌کنند.

۵- منابع

[1] Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature reviews microbiology. 2019;17(3):181-92.

[2] Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. New England journal of medicine. 2020;382(8):727-33.

[3] Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. nature. 2020;579(7798):270-3.

[4] Walls AC, Tortorici MA, Bosch B-J, Frenz B, Rottier PJ, DiMaio F, et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. Nature. 2016;531(7592):114-7.

[5] Shajahan A, Archer-Hartmann S, Supekar NT, Gleinich AS, Heiss C, Azadi P. Comprehensive characterization of N-and O-glycosylation of SARS-CoV-2 human receptor angiotensin converting enzyme 2. Glycobiology. 2021;31(4):410-24.

[6] Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. Journal of virology. 2020;94(7):10.1128/jvi. 00127-20.

[7] Agarwal G, Gabrani R. Antiviral peptides: identification and validation. International journal of peptide research and therapeutics. 2021;27:149-68.

[8] Chew M-F, Poh K-S, Poh C-L. Peptides as therapeutic agents for dengue virus. International journal of medical sciences. 2017;14(13):1342.

[9] Lee AC-L, Harris JL, Khanna KK, Hong J-H. A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design. International journal of molecular sciences. 2019;20(10):2383.

[10] Papanikolaou V, Chrysovergis A, Ragos V, Tsiambas E, Katsinis S, Manoli A, et al. From delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants. Gene. 2022;814:146134.

[11] Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. Chemical reviews. 2002;102(3):759-82.

[12] Song HC, Seo M-Y, Stadler K, Yoo BJ, Choo Q-L, Coates SR, et al. Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. Journal of virology. 2004;78(19):10328-35.

[13] Chi XS, Landt Y, Crimmins DL, Dieckgraefe BK, Ladenson JH. Isolation and characterization of rabbit single chain antibodies to human Reg Iα protein. Journal of immunological methods. 2002;266(1-2):197-207.

[14] Barbas 3rd C, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991;88(18):7978-82.

[15] Groves D, Morris B. Veterinary sources of nonrodent monoclonal antibodies: interspecific and intraspecific hybridomas. Hybridoma. 2000;19(3):201-14.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

Purification of the RBD of SARS-COV-2 spike gene expressed in prokaryotic cells and studying the binding affinity of antiviral peptides to this protein using bioinformatics studies

Narges Moazezi Tehrankhah[1], Majid Sadeghizadeh[2]*

1. Master of Sciences, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Sadeghma@modares.ac.ir

Receipt: 2024/02/13 Accepted: 2024/05/15

Abstract

The countries' social and economic conditions have been threatened by corona epidemic and a large number of people's death in the world. SARS-CoV-2 virus, a form of corona virus family, is responsible for corona disease and its spread in the present century. The study of the receptor binding region (RBD) in the spike protein is very important for scientists because the new corona virus uses its surface spike protein for binding to the ACE2 surface protein and entering its genetic material to the host cells. By this protein and its receptor binding region inhibition, the prevention of virus entrance to the cell is possible. The virus's genes can be multiplied by cloning and its protein can be purified. The usage of antiviral peptides as the most practical methods and binding inhibitory peptides of RBD to the ACE2 receptor for SARS-CoV-2 treatment, are of great interest to scientists. In the present research, RBD cloning in PET28a expression vector, RBD protein expression and GFP/RBD fusion protein were performed in prokaryotic host. Due to this protein's insolubility in the prokaryotic host, column refolding was performed with urea gradient with a nickel-agarose column and the synthesized protein was confirmed through western blot technique. Three nominated peptides from articles used to compare their binding to RBD using bioinformatics and their tendency to bind to each other was investigated by molecular docking. The mentioned peptides can be used in this virus infection treatment due to their binding potential to RBD, if their interaction is proven.

Keywords: SARS-CoV-2, RBD, Refolding ،Antiviral peptides

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]