فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۱ ص.۵۰-۳۹

مقاله پژوهشی

بیان ترشحی پروتئین هترولوگ L1 ویروس پاپیلومای انسانی ژنوتیپ ۱۱ در میزبان پروکاریوتیک *لاکتوباسیلوس*

اکرم امانی[۱]، پروانه جعفری[۲*]، رودابه بهزادی اندوهجردی[۳]، جلیل فلاح[۴]

[۱] کارشناس ارشد گروه زیست فناوری میکروبی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۴] استادیار، گروه میکروب شناسی، آزمایشگاه میکروب شناسی لیستر، تهران، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): p-jafari@iau-arak.ac.ir

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۱

چکیده

ویروس پاپیلومای انسانی، ویروسی است که از طریق آمیزش جنسی و تماس مستقیم بین پوست افراد، انتقال می‌یابد. از بین گونه‌های مختلف این ویروس، سویه‌های ۱۸و۱۶ شایع‌ترین سویه‌ها در ایجاد سرطان سرویکس می‌باشند و همچنین سویه‌های ۱۱و۶ شایعترین سویه‌ها در ایجاد ضایعات تناسلی یا زگیل‌های تناسلی می‌باشند که در این مطالعه از سویه ۱۱ جهت تولید پروتئین ترشحی کپسید بزرگ L1 در میزبان لاکتوباسیلوس کرموریس استفاده شده است که این باکتری یک باکتری ساکن در دستگاه تناسلی زنان است و در واقع یک فلور نرمال دستگاه تناسلی زنان می‌باشد. برای تولید پروتئین L1 از ویروس پاپیلومای انسانی از روش‌های تولید پروتئین بصورت نوترکیب و با کلون کردن ژن L1 از این ویروس درون یک وکتور که در میزبان پروکاریوتی مانند باکتری لاکتوباسیلوس کرموریس بیان دارد استفاده شده است، که با روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات برای تأیید پروتئین تولید شده بیان و تولید این پروتئین مشاهده و بررسی شده است. باندهای نوکلئوتیدی در آزمایش تکثیر قطعه ژنی در ژل الکتروفورز و همچنین مشاهده باندهای پروتئینی در ژل SDS-PAGE و وسترن بلات به تایید رسید. با استفاده از تولید پروتئین عامل بیماریزایی در ویروس پاپیلومای انسانی به روش نوترکیبی و در میزبان باکتریایی لاکتوباسیلوس که یک فلورنرمال دستگاه تناسلی زنان می‌باشد، می‌توان در آینده جهت پیشگیری و درمان بیماری‌های مرتبط با سویه ۱۱ این ویروس استفاده کرد، این باکتری بدلیل اینکه جزو فلور نرمال و جمعیت میکروبی ساکن در دستگاه تناسلی زنان می‌باشد می‌توان با استفاده ازاین باکتری لاکتوباسیلوس بصورت زنده در مخاط داخلی دستگاه تناسلی زنان، که سبب تحریک سیستم ایمنی این ناحیه می‌شود و باعث می‌شود بطور نسبی ایمنی مخاطی برعلیه این پروتئین ایجاد شود که این پروتئین یک پروتئین ایمونوژن است و آنتی بادی‌هایی که بر علیه این قسمت تولید می‌شوند، ایمنی محافظت بخشی نسبت به مخاط داخلی واژن زنان ایجاد می‌کند، با تولید پروتئین به این روش می‌توان از آن همراه کرم‌های واژینال برای پیشگیری و درمان بیماری‌های مرتبط با عفونت‌های HPV استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: باکتری لاکتوباسیلوس، پروتئین هترولوگ L1، زگیل‌های تناسلی، سرطان سرویکس، ویروس پاپیلومای انسانی.

مقدمه

ویروس پاپیلومای انسانی یا Human Papilloma Virus، ویروسی است که از طریق آمیزش جنسی و تماس مستقیم بین پوست افراد انتقال می‌یابد. ویروس حتی می‌تواند از راه دست هم پخش شود و یا تماس ژنیتال و هر دو افراد علامتی و غیر علامتی می‌توانند عفونت را انتقال دهند [۱]. بعلاوه بیماری‌های انتقال داده شده جنسی مانند: Human Immuno deficiency Virus – هپاتیت B (HBV) - ویروس هرپس سیمپلکس۲ (Herpes Simplex Virus)- نایسریا گنوره آ- و HPV تناسلی می‌توانند از مادر به جنین در طی بارداری ویا در طی سیکل قاعدگی انتقال یابند [۱]. پاپیلوما ویروس‌ها گروهی از ویروس‌های کوچک هستند که در بسیاری از مهره داران بزرگ ازجمله انسان، زگیل‌هایی را ایجاد می‌کنند. این ویروس‌ها تاریخچه ارزشمند طولانی بیشتر از ۳۰۰ میلیون سال دارند و شامل یک گروه متنوع از بیشتر از ۱۵۰ ویروس مرتبط که به مرور زمان از میزبان‌های انسانی و حیوانی، میزبان‌های حیوانی شامل: خزندگان و پرندگان و گونه‌های حیوانی دیگر جدا شده اند. بعلاوه انسان‌ها تنها مخزن شناخته شده برای این ویروس‌ها است [۱]. این ویروس‌ها توانایی ایجاد بدخیمی در انسان و حیوانات را دارند. بعضی از پاپیلوما ویروس‌های انسانی عامل ایجاد سرطان گردن رحم و تومورهای اپی‌تلیالی دیگر هستند [۱]. بیش از ۱۰۰ سویه مختلف از HPV شناخته شده است که انواع خاصی از آنها می‌توانند ضایعات پیش سرطانی یا سرطان ایجاد کنند. این سویه‌ها تیپ‌های HPV16,HPV18 می‌باشند [۲]. که موجب بیشتر از ۷۰% از موارد بیماری در سراسر دنیا می‌شوند [۳]. تقریبا ۴۰ نوع از این ویروس‌ها را HPVهای نوع تناسلی می‌نامند سویه‌های کم‌خطر ویروس پاپیلوما مانند ژنوتیپ‌های ۱۱و۶ می‌باشندکه ممکن است موجب زگیل تناسلی شوند [۴]. سایرگونه‌های کم خطر HPV شامل: تیپ‌های ۴۰/۴۲/۴۳/۴۴/۵۴/۶۱/۷۲ می‌باشند و سایر انواع گونه‌های پر خطر نیز شامل: تیپ‌های ۱۶/۱۸/۳۱/۳۵/۳۹/۴۵/۵۱/۵۲/۵۶/۵۸/۶۶/۶۸ می‌باشند [۳]. عفونت HPV متداول‌ترین بیماری انتقال داده شده از طریق جنسی درسراسر دنیا است که بیش از ۵۰% از بزرگسالان فعال از نظر جنسی در طی زندگی‌شان با این ویروس عفونی می‌شوند که خطر این عفونت با تعداد شرکای جنسی در طی یک زندگی مشخص افزایش می‌یابد. در بیشتر موارد ویروس بطور طبیعی حذف می‌شود و در صورتی که ویروس مقاومت زیادی داشته باشد می‌تواند موجب زگیل تناسلی- شرایط پیش سرطانی یا سرطان شود [۵]. HPV یک ویروس تومور DNA است که منجر به تکثیر اپیتلیال در هر دو سطح موکوسی و جلدی می‌شود [۵]. در حال حاضر بیشتر از ۹۰% از سرطان‌های مقعد وابسته به عفونت‌های HPV هستند، بخصوص همراه با زیرگونه‌های HPV پرخطر (High-risk Human Papilloma Viruses)؛ و گونه HPV16 می‌باشد. بیشتر از ۹۰% از سرطان‌ها در سراسر دنیا بعلت ویروسHPV می‌باشد [۶]. در بین زنان ایرانی ویروس پاپیلومای انسانی ژنوتیپ ۱۶ شیوع بیشتری دارد. در دنیا توسعه سرطان سرویکس در زنان حدود ۵۳۰۰۰۰ زن است و ۲۷۵۰۰۰ زن بعلت این بیماری در سال می‌میرند. با این حال بروز انواع متنوع سرطان سرویکس در زنان در کشورهای توسعه یافته و کمتر توسعه یافته مشابه است [۷]. در سال ۱۹۷۶، زارهاسن، برای اولین بار تشخیص داد که بین وجود زگیل‌های جنسی و سرطان گردن رحم ارتباط معنی‌داری وجود دارد [۸]. در سال ۱۹۸۱ اولین ژنوم پاپیلوما ویروس در وکتور باکتریایی کلون شد [۹]. ژنوم HPV یک DNA دو زنجیره‌ای غیرحلقوی با حدود 8kb نوکلئوتید می‌باشد که سویه‌های پرخطر توسط ۲ پروتئین E6,E7 که آنکوپروتئین‌های اصلی در ایجاد سرطان می‌باشند و به وسیله سویه‌های پرخطر ۶ و ۷ (HPV6, HPV7) کد می‌شوند (۱۰). این ژنوم برای ۶ پروتئین تنظیمی اولیه E1,E2,E4,E5,E6,E7 و ۲ پروتئین ساختاری L2 .L1 کدگذاری می‌شود [۱۱]. ژنوم HPV از نظر عملکردی به سه منطقه تقسیم می‌شود: اولین ناحیه، ناحیه غیرکدشونده بنام ناحیه کنترلی طولانیLength Control Region یا ناحیه تنظیمی می‌باشد [۱۲]. دومین ناحیه، منطقه زودرس بوده که شامل E1, E2, E4, E5, E6, E7 می‌باشد و در همانندسازی و سرطان‌زایی ویروس دخالت دارد. سومین ناحیه، منطقه تأخیری می‌باشد که پروتئین‌های ساختار L1, L2 را برای کپسید ویروس کد می‌کند. آنکوپروتئین‌های HPV-E6, E7، آنکوپروتئین‌های اصلی برای تهاجم و برقراری بدخیمی هستند [۱۳]. پیشگیری یک نقش مهم در کاهش بروز سرطان ایفا می‌کند. واکسیناسیون ۴ ظرفیتی، فاکتور مهمی در کاهش سریع برای پیشگیری موفقیت‌آمیز سرطان

مقعد و بیماری‌های دیگر مرتبط با HPV مانند سرطان‌های سرویکال است [۱۴]. دستاوردهای جدید در واکسن‌های پروفیلاکسی پاپیلوما ویروس انسانی برای پیشگیری از سرطان سرویکس شامل واکسن‌های HPV مجوز گرفته شده اخیر که هم ایمن هستند و هم تأثیر بالایی در پیشگیری از عفونت HPV دارند و همچنین باعث کاهش بروز پیشروی‌های سرطان سرویکس می‌شوند. این واکسن‌ها اگرچه محدود و گران هستند و نیاز به فریز کردن و تزریق داخل عضلانی و همچنین چند دزی هستند ولی تا حدودی باعث پیشگیری از سرطان سرویکس می‌شوند [۱۵]. سیستم‌های بیانی جدید و وکتورهای ویروسی و باکتریایی برای دریافت پروتئین کپسید HPV-L1 و استفاده از پروتئین کپسید HPV-L2 بطور امیدوارکننده‌ای در کاهش هزینه و سهولت افزایش استفاده و وسعت محافظت، کمک کننده هستند [۱۶]. اخیرا واکسن‌های عمومی ثانویه توسعه یافته‌اند که می‌توانند ایمنی‌زایی قابل ملاحظه در زنان در کشورهای توسعه یافته، قسمت‌هایی که بروز سرطان سرویکس بالاست، ایجاد نمایند [۱۶]. در حال حاضر امید بخش ترین واکسن برعلیه عفونت HPV-16 بر روی پروتئین کپسید بزرگ، پایه گذاری شده است که خودتجمعی از ذرات شبه ویروسی می‌باشد. واکسن‌های لیست شده اخیر ذرات شبه ویروسی هستند که زیرواحدهای تکراری هستند و محتوی هیچ نوع جزء عفونی نیستند [۱۷]. دو واکسن HPV پروفیلاکسی در دسترس می‌باشدکه هر دو شامل ذرات شبه ویروسی (VLPs) L1 مشتق شده از سروتایپ‌های HPV در ارتباط با سرطان سرویکس مانند HPV-16, HPV-18 می‌باشند [۱۸]. واکسن‌های HPV پروفیلاکسی ثانویه‌ای نیز در دسترس می‌باشند که شامل: واکسن‌های 2,4 ظرفیتی مجوز گرفته شده L1 (پروتئین بزرگ) یا VLPs (ذرات شبه ویروسی) ایمن می‌باشند که البته با یکسری محدودیت‌ها مانند هزینه بالا همراه می‌باشد [۱۸]. واکسن‌های HPV اخیر بی نهایت در پیشگیری از عفونت و بیماری‌های نئوپلازی مؤثرند، علاوه بر آنکه پروفیلاکتیک هستند عفونت‌های واضحی را هم ایجاد نمی‌کنند [۱۸]. واکسن دیگری که برای پیشگیری استفاده می‌شود واکسن ۹ ظرفیتی نوترکیب گارداسیل می‌باشد که در پسران ودختران بالای ۹ سال استفاده می‌شود [۱۹]. دختران قبل از بلوغ در سن ۹تا ۱۵سال فرصت دریافت ۲ دوز واکسن HPV در یک دوره ۶ ماهه یا یک سال متناوب برای محافظت از عفونت‌های مرتبط با HPV دارند. این دوره از واکسیناسیون حفاظت بالایی برای دختران از عفونت HPV تا زمانی که وارد برنامه روتین غربالگری شوند ایجاد می‌کند [۲۰].

سازمان جهانی بهداشت از سال ۲۰۱۵ برای زنان ۱۵ سال و بزرگتر دو برنامه جهت واکسیناسیون پیشنهاد کرده است که ۳ دوز واکسن طبق برنامه زمان‌بندی شده پیشنهاد شده است [۲۰]. در حال حاضر پیشگیری برعلیه سرطان‌های سرویکال، استفاده از تست غربالگری پاپ اسمیر و واکسیناسیون جهت پیشگیری از سرطان‌های مرتبط با عفونت‌های HPV می‌باشد [۲۱]. در سال‌های اخیر غربالگری سلول شناسی بر پایه مایع در بسیاری از موارد جایگزین تست پاپ اسمیر شده است [۲۱].

در سال ۲۰۰۶ آنتی‌ژن HPV-16 - E7 روی سطح لاکتوباسیلوس کازئی بوسیله بکارگیری یک سیستم نمایش جدید بیان شد سپس سطح بیان پروتئین HPV-16 E7 بوسیله وسترت بلات- ایمونوفلئورسناس میکرواری و فلوسایتومتری بررسی شد. سپس موش‌ها از طریق دهانی با لاکتوباسیلوس کازئی تلقیح شدند. بعد از این تلقیح، سرم مخصوص ایمونوگلوبولین IgG.E7 و تولید ایمونوگلوبولین A موکوسی افزایش یافت. این نتایج نشان دادند که تلقیح دهانی از E7 نمایش داده شده روی لاکتوباسیلوس، ایمنی سلولی و تأثیرات آنتی تومور در موش‌ها را القاء کرد [۲۲]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ Bermudoz-Humaran و همکارانش انجام دادند، تولید هترولوگی پروتئین L1 نوع HPV-16 بوسیله باکتری اسید لاکتیک بررسی شد که در این مطالعه بیان پروتئین کپسید بزرگ L1؛ HPV تیپ ۱۶ در مدل لاکتوکوکوس لاکتیس و توانایی نتیجه‌گیری سویه نوترکیب با تولید کپسومر یا ذرات شبه ویروسی بررسی شد، ژن L1 داخل دو وکتور کلون شد [۲۳]. بر این اساس و با توجه به اهمیت شیوع بیماری‌های مقاربتی و بیماری‌های مرتبط با پاپیلوما ویروس‌ها و همچنین گستره وسیع مطالعات تهیه واکسن بر علیه این نوع ویروس‌ها، مطالعه حاضر با هدف ارائه روش‌هایی برای تولید داروهای موثر بر علیه این نوع بیماری‌ها با استفاده از باکتری‌هایی که توانایی تولید پروتئین‌های نوترکیب جهت اهداف پیشگیرانه بر علیه این بیماری‌ها دارند، انجام گرفته است که باکتری استفاده

شده بعنوان میزبان نهایی در این مطالعه، از خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک: لاکتوباسیلوس کرموریس می‌باشد.

همراه با ظهور مهندسی ژنتیک باکتری‌های اسید لاکتیک بعنوان وکتورهای بیانی برای تحویل مولکول‌های درمانی در بافت‌های موکوسی از سطوح و مجاری دهانی، بینی و واژینال استفاده‌های مؤثری داشته‌اند [۲۴]. و می‌توانند بعنوان یک فاکتور بیانی برای تحویل پروتئین‌های درمانی مورد استفاده قرار گیرند [۲۴]. همچنین بعنوان محموله‌های درمانی برای درمان بیماری‌های دیابت، سرطان‌ها، عفونت‌های ویروسی بسیاری از عفونت‌های دستگاه گوارش استفاده می‌شوند [۲۴].

باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌هایی هستند که غیر بیماریزا هستند و اسپور تولید نمی‌کنند، میکروآئرو فیل و گرم مثبت هستند که نتیجه تخمیر آنها اسید لاکتیک می‌باشد (۲۵) و در مکمل‌های غذایی- فرآورده‌های پزشکی - آرایشی- استارترهای کشت برای تخمیر مواد غذایی - فاکتورهای سلولی برای تولید ماکرومولکول‌های غذایی، دارویی و صنعتی در سلامت انسان کاربرد دارند [۲۶]. علاوه

براین باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی تولید باکتریوسین‌ها جهت افزایش نیمه عمر قفسه‌ای مواد غذایی دارند [۲۷]. این باکتری‌ها بعنوان پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی جهت حفظ جمعیت میکروبی و میکروفلور نرمال در دستگاه گوارش در فراورده‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند که برای درمان یک سری از بیماری‌ها مانند: اسهال - بیماری‌های روده ای- بیماری‌های خود ایمنی - عفونت‌های دستگاه گوارش و عفونت‌های سطوح موکوسی مانند مجاری واژینال در زنان مفید هستند [۲۸].

بدلیل توانایی کافی در تولید پروتئین‌های نوترکیب، کاندید خوبی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در پزشکی و صنعتی و بیوتکنولوژی هستند [۲۹].

مواد و روش‌ها

تکثیر ژن:

اندازه ژنوم ویروسHPV، 8kb می‌باشد و اندازه قطعه ژنی کد کننده پروتئین L1، از ژنوتیپ ۱۱ ویروس HPV، (پروتئین کپسید بزرگ از ویروس)، حدود 1518 bp نوکلئوتید می‌باشد که برای بیان ژنی و تولید پروتئین L1 از این ویروس، نیاز به قطعه ژنی کد کننده پروتئین L1 می‌باشد. بعد از کشت ویروس و استخراج DNA ژنومی آن، قطعه ژنی کد کننده پروتئین L1 را استخراج کرده و برای اینکه بتوان آن را در یک وکتور جهت تولید پروتئین نوترکیب کلون کرد آن را باید با روش PCR تکثیر کرد. برای تکثیر نیاز به قطعات پرایمر برای ابتدا و انتهای قطعه ژنی مورد نظر است. بنابراین برای این قطعه ژنی پرایمر طراحی می‌شود.

طراحی پرایمر:

طراحي پرایمر یکی از اصلی‌ترین موارد در روش PCR است و در صورتی که این طراحی به درستی انجام نشود باعث ناکارآمدی روش و یا ایجاد واکنش‌های غیراختصاصی مي‌گردد. در صورتی که توالی ژن مورد نظر مشخص باشد طراحی پرایمر به منظور تکثیر هر بخشی از آن امکان‌پذیر است و می‌توان با کمک نرم‌افزارهای کامپیوتری آن را طراحی نمود. از معروف‌ترین نرم‌افزارها که در این پژوهش نیز مورد استفاده قرار گرفت نرم‌افزارهای vOligo و Gene runner بودند. بعد از طراحی پرایمرها، ترادف آنها از طریق برنامه BLAST مورد بررسی قرارگرفت. در مواردی که هدف کلون کردن ژن مورد نظر است، می‌توان در انتهای ۵' هر دو پرایمر جایگاه برش آنزیم در نظر گرفت. پرایمرهای استفاده شده در تحقیق حاضر به صورت زیر بود: (L1: 5'- TAGTCAGAGCTCACCATGTGGCGGCCTAGCG -3`، AC 5'- 11 TYPE :

TAGTCCAAGCTTTTACCTTTTAGTTTTGGCG - 3)،

با در اختیار داشتن پرایمرها و قطعه ژنی کد کننده پروتئین L1 از ژنوتیپ ۱۱ ویروس، آزمایش PCR به روش زیر جهت تکثیر قطعه ژنی مورد نظر انجام شد.

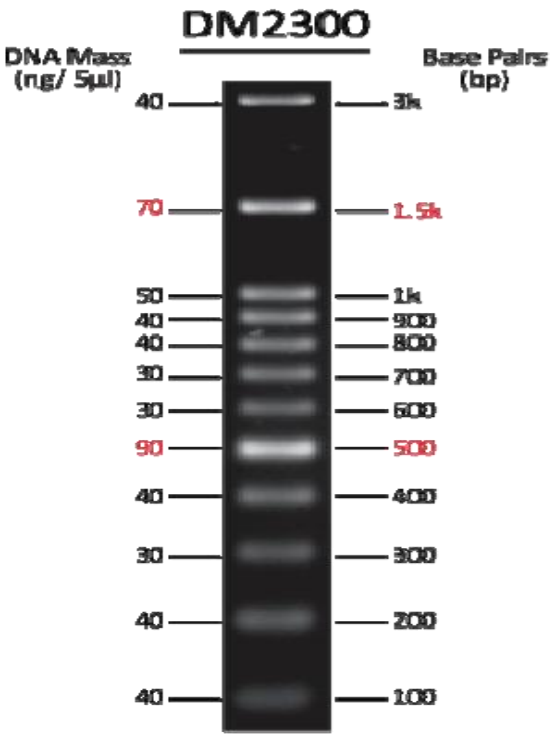
تکثیر ژن L1 PCR:

بعد از اتمام مراحل PCR، محصول PCR را روی ژل الکتروفورز برای اینکه مشخص شود آیا تکثیر قطعه ژنی مورد نظر صورت گرفته یا نه، قرار داده می‌شود و در صورت مشخص شدن باندهای نوکلئوتیدی بر روی ژل آگارز نشان دهنده این است که قطعه ژن

تکثیر یافته و نتیجه PCR مطلوب بوده است. بعد از مشخص شدن و تأیید اینکه ژن مورد نظر تکثیر یافته (با ژل الکتروفورز)، در این مرحله محصول PCR درون یک وکتور پلاسمیدی که در باکتری لاکتوباسل بیان دارد کلون می‌شود. این وکتور که بنام وکتور PNZ می‌باشد، بطور معمول در باکتری لاکتوباسیل بیان دارد ولی برای اینکه محصول کلون شده تکثیر یابد و راحتتر در لاکتوباسیل بیان شود ابتدا در باکتری اشرسیا کلی یا *E.coli* تکثیر داده می‌شود سپس به درون لاکتوباسیل ترنسفورم یا انتقال داده می‌شود.

مارکر DNA:

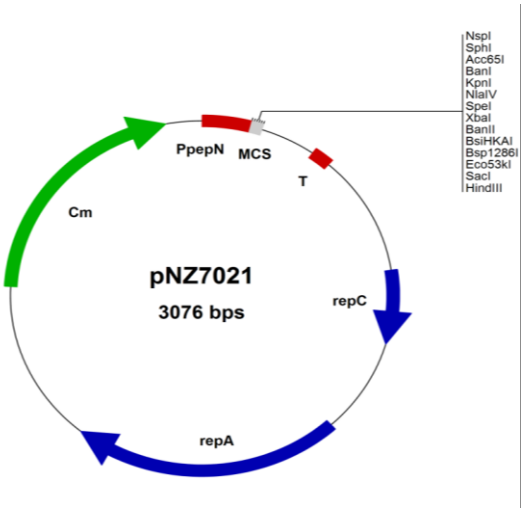
از سایز مارکر DM2300، ساخت شرکت SMOBIO 100bp کشور تایوان، برای مقایسه قطعات تکثیری وتایید وجود قطعات مورد نظر به کار گرفته شد.



شکل ۱: اندازه قطعات تکثیری بکار رفته

مراحل کلون محصول PCR ژنL1 درون کلونینگ وکتور:

در این پژوهش از کلونینگ وکتور pBlue script و وکتور بیانی PNZ استفاده شد



شکل۲: وکتور بیانی PNZ7021

واکنش اتصال در وکتور pBluescript:

واکنش اتصال یعنی قرار دادن قطعه ژنی مورد نظر درون پلاسمید هضم شده که از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده می‌شود. شرایط بهینه برای عملکرد آنزیم لیگاز ۱۶ تا ۲۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت می‌باشد. ابتدا وکتور pBluescript توسط آنزیم EcoRI برش داده شده و در ادامه محصول PCR با آنزیم pfu DNA polymerase که از ژل تخلیص شده بود، مورد استفاده قرار گرفت.

انجام مرحله Sub-cloning ژن L1 در وکتور PNZ7021:

برای انجام این مرحله، ابتدا وکتور pBluescript حاوی ژن L1 توسط آنزیم‌های EcoRI, Xbal برش داده شده و وکتور PNZ7021 نیز با این دو آنزیم برش داده شد. در ادامه طبق روش استخراج DNA از ژل، قطعه برش داده شده با روش لیگاسیون (اتصال) به داخل وکتور PNZ7021 انتقال داده شده و در میزبان *E.coli* وارد گردید. پس از تایید کلونینگ ژن L1 در وکتور PNZ7021، وکتور نوترکیب PNZ/L1 با استفاده از روش الکتروپوریشن به داخل میزبان لاکتوباسیلوس منتقل شد.

انتقال پلاسمید یا وکتور کلون شده در باکتری *E.coli*: (Transportetion)

برای ترنسفورم وکتور داخل باکتری *E.coli* باید این باکتری را مستعد پذیرش وکتور مورد نظر کرد یعنی آن را Competent (مستعد) کرد. باکتری که برای مستعد شدن پذیرش وکتور در این

بررسی استفاده شده بنام DH5α می‌باشد. سپس وکتور به این باکتری مستعد شده انتقال داده می‌شود. برای این کار ۱۰ میکرولیتر از وکتور را به ۱۰۰ میکرولیتر باکتری مستعد شده اضافه کرده و ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده می‌شود و سپس ۱۲۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد گذاشته و بلافاصله آن را در یخ به مدت ۵ دقیقه گذاشته و سپس به آن ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط Nutrian Broth اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده می‌شود.بعد از یک ساعت با rpm ۹۰۰۰ سانتریفیوژ می‌شود. از این محلول، به مقدار ۹۰۰ میکرولیتر از محلول رویی را دور ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر باقی مانده را داخل یک میکروتیوپ ریخته و پیپتاژ کرده و سپس روی محیط کشت مقاوم به آمپی‌سیلین کشت داده می‌شود و یک روز زمان لازم است تا کشت صورت پذیرد. فردای آن روز اگر روی محیط کشت تک کلونی مشاهده شد، نشان دهنده این است که کلونینگ و تکثیر وکتور به درستی انجام شده است. برای اطمینان حاصل پیدا کردن از آنکه کلونینگ درست انجام شده است، ابتدا محیط Nutrian Broth مقاوم به آنتی بیوتیک (آنتی بیوتیک آمپی سیلین) درست کرده (به ازای هر ۱ میلی لیتر محیط، ۱ میکرولیتر آنتی بیوتیک) سپس یک تک کلونی از محیط کشت حاوی باکتری محتوی وکتور برداشته و به این محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک انتقال داده می‌شود. فردای آن روز مقداری از محیط کشت حاوی باکتری برداشته و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، از باکتری *E.coli* استخراج پلاسمید (یا وکتور حاوی ژن مورد نظر) انجام می‌شود و روی ژل الکتروفورز پخش می‌شود. اگر باندهای نوکلئوتیدی در ژل مشاهده شد یعنی پلاسمید استخراج شده است.

کشت باکتری *E.coli* و رسوب‌گیری آن

باکتری که وکتور یا پلاسمید حاوی ژن L1 را دریافت کرده بود در این زمان جهت افزایش وکتور داخل آن، کشت داده می‌شود. سپس جهت جدا سازی باکتری برای مراحل بعد، از محیط کشت مذکور رسوب‌گیری انجام می‌شود. در حال حاضر باکتری که کشت داده شده است و پلاسمید کلون شده در آن وجود دارد بدست آمده است. در این زمان یک وکتوروجود دارد که قبلا ژن مورد نظر را داخل آن کلون کرده و آن داخل باکتری ترنسفورم شده است. این وکتور یا پلاسمید مقاوم به آنتی بیوتیک آمپی سیلین است و چون دراین زمان پلاسمید باکتری یا همان وکتور ترنسفورم شده جهت مشاهده روی ژل الکتروفورز و تأیید کلونینگ لازم است نه خود باکتری، پس بنابراین برای اینکه بتوان فقط پلاسمید را بدست آورد از یک آنتی بیوتیکی که باکتری را از بین می‌برد و به پلاسمید صدمه‌ای وارد نمی‌کند استفاده می‌شود که این آنتی بیوتیک، آنتی بیوتیک آمپی سیلین است که در پلاسمید وجود دارد. این آنتی‌بیوتیک باعث می‌شود باکتری از بین برود و پلاسمید باقی بماند. برای این کار به ازای هر ۱ میلی لیتر محیط کشت، ۱ میکرولیتر آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین به محیط کشت آگار اضافه کرده. باکتری را ابتدا در محیط کشت آگار، کشت داده و سپس یک تک کلونی از آن برداشته و در محیط کشت براث برده می‌شود. بعد از افزایش و تکثیر وکتور یا پلاسمید و همچنین به منظور اطمینان از داخل شدن پلاسمید مورد نظر به باکتری و نیز استفاده‌های بعدی از پلاسمید، باید آن را از درون باکتری استخراج نمود.

استخراج پلاسمید:Plasmid DNA Extraction

طبق کیت استخراج پلاسمید، رسوبی که از قبل از باکتری کشت داده شده تهیه شده بود. بعد از استخراج پلاسمید، برای اینکه تشخیص داده شود پلاسمید یا وکتور استخراج شده همان وکتور به همراه قطعه ژنی L1 می‌باشد و یا به عبارتی برای تأیید کلونینگ و تکثیر پلاسمید در باکتری، نمونه استخراج شده روی ژل الکتروفورز جهت مشاهده باندهاب برش خورده مورد نظر برده می‌شود.

بررسی پلاسمید استخراج شده در ژل آگاروز:

در این مطالعه از ژل آگاروز یک درصد استفاده شد. هرچه میزان اندازه DNA بزرگتر باشد درصد ژل نیز کمتر خواهد شد. در مرحله بعد از اینکه مشخص و تأیید شد که کلونینگ درست انجام شده و وکتور مورد نظر به خوبی تکثیر یافته، این وکتور افزایش یافته که حاوی قطعه ژنی L1 است برای بیان به داخل باکتری لاکتوباسیل ترنسفورم می‌شود. در واقع بیان ژنی و تولید پروتئینL1 کپسید ویروس HPV درون باکتری لاکتوباسیل صورت می‌پذیرد که از طریق میزبان حد واسط باکتری *E.coli*

این قطعه ژنیL1 برای ترنسفورم کردن راحتتر درون لاکتوباسیل، تکثیر داده می‌شود. بنابراین با وجود وکتور تکثیر یافته در این زمان این وکتور به درون باکتری لاکتوباسیل ترنسفورم یا انتقال داده می‌شود.

انتقال پلاسمید به درون باکتری لاکتوباسیل: Transportation

پلاسمید یا وکتوری که از باکتری *E.coli* طبق کیت استخراج پلاسمید بدست آمد به باکتری لاکتوباسیل انتقال داده می‌شود. برای انتقال و ترنسفورم کردن وکتور یا پلاسمید با لاکتوباسیل، باید باکتری لاکتوباسیل را مجددا مستعد پذیرش وکتور کرد.

بررسی بیان ژن L1 درباکتری لاکتوباسیل:

حال که وکتور یا پلاسمید حاوی قطعه ژنی L1 وارد باکتری لاکتوباسیل شده است انتظار می‌رود این وکتور یا پلاسمید کد کننده پروتئین L1 باشد یا به عبارتی پروتئین L1 در باکتری لاکتوباسیل تولید شود. بیان اصلی ژن L1 در باکتری لاکتوباسیل است که این باکتری یک میکروفلور نرمال واژن محسوب می‌شود. برای تولید و بیان این پروتئین در باکتری لاکتوباسیل باید ابتدا باکتری را کشت داده و سپس سانتریفیوژ کرد و محلول رویی را بعد از سانتریفیوژ برداشته، وقتی محیط کشت سانتریفیوژ می‌شود یک پلیت سلولی وجود دارد که رسوب کرده و روی آن محلول حاوی پروتئین وجود دارد. بخاطر اینکه این محلول حاوی پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری می‌باشند. باکتری لاکتوباسیل برخلاف باکتری *E.coli* پروتئین ترشحی تولید می‌کند و مستقیما پروتئین‌های تولید شده به محیط کشت باکتری وارد می‌شوند پس بنابراین برای استخراج پروتئین نیازی به لیز کردن باکتری و تخلیص پروتئین آن نیست و مستقیم می‌توان پروتئین‌های تولید شده در باکتری را بدست آورد. سپس برای تأیید تولید پروتئین در باکتری لاکتوباسیل باید نمونه‌ها را روی ژل Sudiom 2 Desil Solfat برد که در اینجا، هم از محلول رویی و هم از خود پلیت سلولی روی ژل مذکور برده می‌شود که مشخص شود پروتئین ترشحی درون محیط کشت بیشتر است یا درون محلول رویی محیط یا درون سلول باکتری باقی مانده است. تولید پروتئینی باکتری لاکتوباسیل بصورت کلی است بخاطر اینکه کل ژنوم باکتری بیان شده و در حال حاضر کل پروتئین باکتری در دسترس است که برای همین در ژل SDS-PAGE باندهای متفاوتی مشاهده می‌شود. به همین خاطر برای اینکه مشخص شود پروتئین تولید شده کدام باند روی ژل است، از شاخص به همراه نمونه لود شده روی ژل SDS-PAGE استفاده می‌شود. به این صورت که وقتی باندهایی که بر اساس وزن مولکولی شان روی ژل می‌ایستند، مشابه شاخص باشند، همان پروتئین L1 مورد نظراست. برای مشاهده پروتئین تولید شده توسط باکتری لاکتوباسیل از ژل SDS-PAGE استفاده می‌شود.

روش انجام تست SDS-PAGE

بعد از آماده شدن ژل و رنگ آمیزی آن رنگ روی آن را بعد از چند ساعت خالی کرده و به آن رنگ بر اضافه می‌شود تا باندهای پروتئینی مشخص شوند. در صورت مشاهده باندهای پروتئینی، پروتئین مورد نظر بیان و تولید شده است. در مرحله بعد برای تأیید بیان پروتئین در باکتری لاکتوباسیل از روش وسترن بلات استفاده می‌شود.

تأیید بیان پروتئین با روش وسترن بلات؛Western blotting

برای این منظور از بافرهای تریس سالین توئین (TBST) ،بافر انتقال و محلول دی آمینو بنزیدین؛ استفاده شد. از بافر انتقال در پروسه الکتروبلاتینگ، جهت انتقال باندهای پروتئینی از ژل به کاغذ نیتروسلولز استفاده می‌شود. همچنین محلول دی آمینو بنزیدین سوبسترای آنزیم پراکسیداز است که در مرحله پایانی آزمایش وسترن بلاتینگ با غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر به همراه پراکسید هیدروژن ۰/۱ درصد در بافر TBS برای ظاهر کردن باندهای پروتئینی مورد ستفاده قرار می‌گیرد.

روش انجام وسترن بلات:

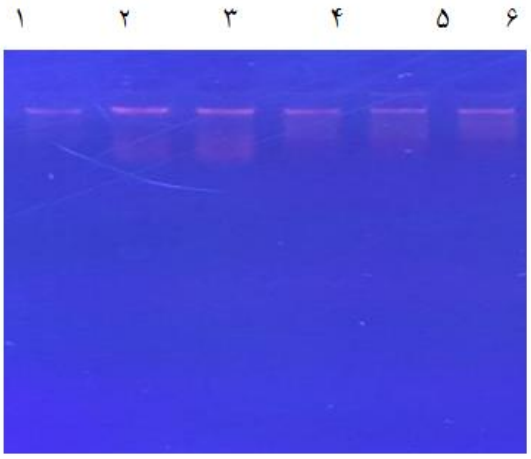
بعد از انجام الکتروفورز، ژلSDS-PAGE به مدت حداقل ۱۰ دقیقه درون بافر انتقال قرارداده شد. با پنس و قیچی تمیز، ورقه‌ای از کاغذ نیترو سلولز به اندازه ژل برش داده و پشت آن با مداد علامت گذاری می‌شود و کاغذ درون بافر انتقال خیس می‌شود. همچنین ۸-۶ کاغذ صافی به اندازه ژل برش داده شد. ابتدا یکی از اسفنج‌های روی سمت ثابت قاب پلاستیکی مخصوص بلاتینگ قرار داده می‌شود. به ترتیب؛ ۴-۳ برگ کاغذ صافی، ژل،

غشاء نیتروسلولز و ۴-۳ برگ دیگر کاغذ صافی روی هم قرار داده می‌شود و پس از گذاشتن اسفنج دوم، قاب پلاستیکی به کمک حلقه‌های کشی بسته می‌شود. بایستی دقت کرد که حباب هوا بین ژل و غشاء وجود نداشته باشد. در ادامه تانک انتقال به اندازه کافی از بافر انتقال پر شده و قاب بلاتینگ داخل آن قرار داده می‌شود بطوری‌که ژل در سمت قطب منفی و غشاء نیترو سلولز در سمت قطب مثبت قرار گرفت. دستگاه به جریان برق متصل شده و عمل انتقال در ولتاژ ۲۰-۱۰ و در طول مثبت انجام شد. پس از اتمام عمل انتقال، قاب پلاستیکی از تانک خارج شده و پس از باز کردن قاب، غشاء نیترو سلولز به کمک پنس برداشته می‌شود. در این مرحله می‌توان بخش مربوط به مارکر وزن ملکولی را از غشاء بریده و جداگانه نگهداری کرد. برای آغاز مرحله ایمنوبلاتینگ و به منظور جلوگیری از واکنش‌های غیراختصاصی ابتدا زمینه کاغذ نیتروسلولز توسط یکی از مواد مسدود کننده، بلوکه شد. پس از مرحله مسدود سازی، غشاء سه بار و هر بار ۵ دقیقه در بافر TBS-T شستشو داده شد. غشاء به مدت ۲-۱ ساعت درون بافر حاوی آنتی بادی منوکلونال Anti-his6، بر روی Shaker با دور کم قرار داده می‌شود. این آنتی بادی بایستی توسط بافر TBS-T رقیق گردد. غشاء ۴ بار، هر بار ۵ دقیقه در TBS-T شستشو داده شد. مجددا در مرحله بعد این بار غشاء به مدت ۲-۱ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه نشانه‌دار که با TBS-T رقیق شده بود، قرار داده شد. رقت مناسب این آنتی بادی نیز از طریق تکرار آزمایش و دستور شرکت سازنده، بدست می‌آید. آنتی‌بادی‌های کونژوگه را بطور معمول ۱۰۰۰۰-۱۰۰۰ بار رقیق کرده و مورد استفاده قرار می‌دهند. مجددا غشاء ۴ بار، هر بار ۵ دقیقه در بافر TBS-T شستشو داده شد. غشاءدرمعرض مقدار کافی از محلول سوبسترای پراکسیداز شامل دی آمینو بنزیدین ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر و پراکسید هیدروژن ۰/۱ درصد در TBS قرار داده می‌شود. پس از ظهور باندها، غشاء نیتروسلولز با مقدار زیادی آب مقطر شستشو داده و در محل تاریک نگهداری شد.

نتایج

استخراج DNA از نمونه بالینی:

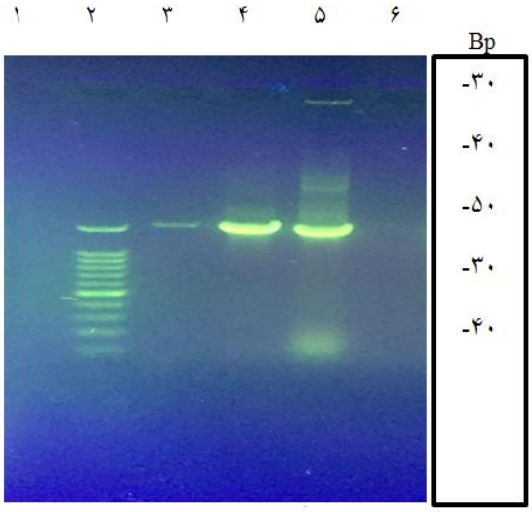
برای تکثیر ژن L1 نیاز بود تا ابتدا از نمونه بالینی DNA استخراج گردد. نتیجه استخراج DNA در زیر نشان داده شده است.



شکل ۳. استخراج DNA از نمونه بالینی

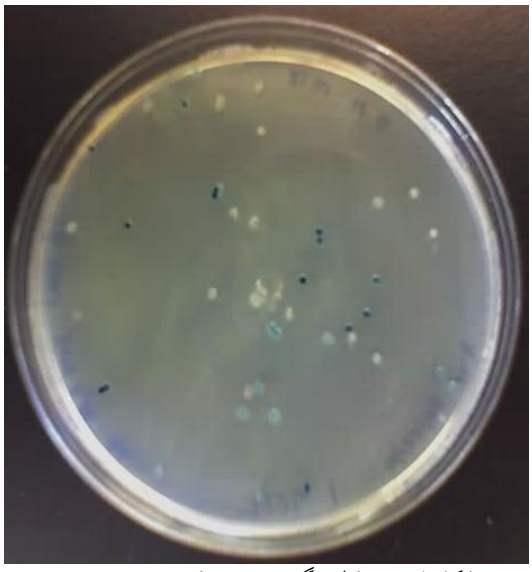
تکثیر ژن L1 توسط آنزیم pfu DNA polymerase

پس از استخراج DNA، تکثیر ژن L1 با استفاده از آنزیم pfu DNA polymerase انجام گردید. نتیجه در ادامه آورده شده است.



شکل ۴. کلونینگ ژن L1 در وکتور pBluescript

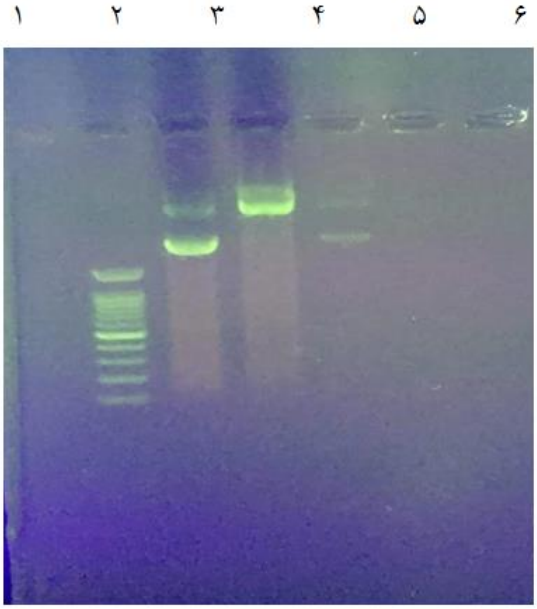
پس از تکثیر ژن L1 ، نیاز بود تا این قطعه در یک وکتور کلونینگ وارد گردد. لذا وکتور pBluescript با استفاده از آنزیم EcoRI برش داده شده و محصول PCR در آن وارد شد. در ادامه باکتری ترنسفرم شده در محیط کشت حاوی آنتیبیوتیک، X-gal و IPTG کشت داده شده و با غربالگری آبی- سفید، کلنی‌های حاوی وکتور نوترکیب شناسایی و کشت داده شدند. در زیر نتیجه کشت آورده شده است.



شکل ۵. نتیجه کلونینگ ژن L1 در وکتور pBluescript

نتیجه استخراج پلاسمید pBluscript/L1

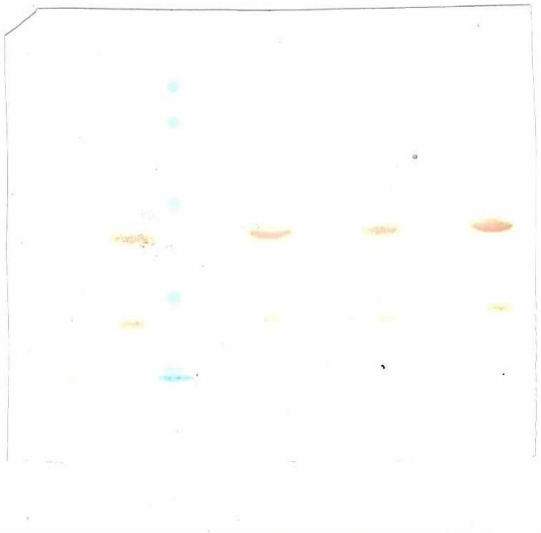
پس از غربالگری کلنی‌های آبی - سفید، یک کلنی سفید انتخاب شده و در محیط Lb broth حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شدند. همچنین، یک کلنی آبی نیز با همان شرایط کشت داده شد تا در مراحل بعد به عنوان کنترل از آن استفاده شود. در ادامه، استخراج پلاسمید انجام شده و روی ژل آگاروز بررسی گردید. وکتور pBluescript/L1 به دلیل دارا بودن قطعه L1، نسبت به وکتور خالی pBluescript سنگین‌تر بوده و بالاتر از آن قرار گرفت. شکل زیر نتیجه را نشان می‌دهد.



شکل۶. نتیجه کلون شدن قطعه L1 در وکتور pBluescript

ساب کلونینگ قطعه L1 در وکتور بیانی PNZ۷۰۲۱

در ادامه، وکتور نوترکیب pBluescript با استفاده از آنزیم‌هایXbal EcoRI, برش داده شده و قطعه L1 از آن خارج گردید. همچنین، وکتور PNZ7021 با همان آنزیم‌های ,EcoRI Xbal برش داده شده و مرحله لیگاسیون بین وکتور PNZ7021 و قطعه L1 انجام شد. پس از تایید ساب کلونینگ قعطهL1 در وکتور PNZ7021، با استفاده از روش الکتروپوریشن، میزبان بیانی لاکتوباسیلوس لاکتیس مستعد شده و محصول لیگاسیون به میزبان انتقال داده شد. بیان ژن L1با استفاده از روش وسترن بلات بررسی گردید. نتیجه در ادامه نشان داده شده است.



شکل ۷. نتیجه انجام وسترن بلات و تایید بیان پروتئین L1

بحث ونتیجه گیری

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که می‌توان پروتئین هترولوگ L1 ویروس پاپیلومای انسانی ژنوتیپ ۱۱ را در باکتری لاکتوباسیل که یک میکروفلور نرمال واژن می‌باشد، با روش نوترکیبی و کلون کردن ژن کد کننده این پروتئین در یک وکتور و انتقال آن به باکتری فوق، تولید کرد. با بیان و تولید این پروتئین که مسئول بیماری‌زایی در مخاط دستگاه تناسلی انسان می‌باشد، در میزبان لاکتوباسیل می‌توان از باکتری فوق جهت ایمنی‌زایی در مخاط دستگاه تناسلی استفاده کرد. برای چنین استفاده‌های درمانی و پیشگیرانه برای بیماری‌های مرتبط با ویروس HPV ژنوتیپ ۱۱ در آینده می‌توان از پروتئین تولید شده به روشی که در این تحقیق بدست آمده، استفاده کرد. در مطالعه های قبلی برای تولید واکسن از ذرات شبه

ویروسی استفاده می‌شد. که می‌توان نتیجه گرفت مزیت این روش نسبت به روش‌های قبلی در این است که در این بررسی بعلت امکان بیماری‌زایی از ذرات شبه ویروسی و یا سایر اجزای ویروس، استفاده نشده است بلکه از خود باکتری‌هایی که فلور نرمال دستگاه تناسلی می‌باشد استفاده شده است که خطری برای افراد نخواهد داشت، ولی در روش‌های قبلی با توجه به کاربرد ذرات شبه ویروسی امکان آلودگی در افرادی که این واکسن‌ها برای آنها استفاده می‌شود وجود دارد. با انتقال یا ترنسفرم کردن وکتور حاوی قطعه ژنی L1 به درون باکتری لاکتوباسیلوس، می‌توان پروتئین تولید شده بوسیله باکتری لاکتوباسیلوس را افزایش داد که با کشت این باکتری می‌توان پروتئین L1 را تکثیر داد و سپس با استفاده از باکتری لاکتوباسیلوس بصورت زنده در مخاط داخلی دستگاه تناسلی زنان، بطور نسبی ایمنی مخاطی ایجاد کرد که سبب تحریک سیستم ایمنی این ناحیه می‌شود و باعث می‌شود بطور نسبی ایمنی مخاطی برعلیه این پروتئین ایجاد شود که این پروتئین یک پروتئین ایمونوژن است و آنتی‌بادی‌هایی که بر علیه این قسمت تولید می‌شوند، ایمنی محافظت بخشی نسبت به مخاط داخلی واژن زنان ایجاد می‌کند، با تولید پروتئین به این روش امکان استفاده از آن همراه کرم‌های واژینال برای پیشگیری و درمان بیماری‌های مرتبط با عفونت‌های HPV استفاده کرد. در این بررسی با توجه به تولید پروتئین L1 توسط باکتری لاکتوباسیلوس بصورت ترشحی، نیازی به خالص کردن پروتئین تولیدی نیست، بخاطر اینکه خود باکتری پروتئین خالص شده را به محیط ترشح می‌کند پس بنابراین با تولید این پروتئین که عامل اصلی بیماری‌زایی در ویروس HPV است، یک ایمنی مخاطی ایجاد می‌شود که به نسبت واکسن‌هایی که قبلا تولید شده‌اند خطر کمتری دارد. با توجه به اینکه در این تحقیق با روش تولید پروتئین در باکتری لاکتوباسیلوس نیازی به تخلیص پروتئین تولیدی نیست و خود باکتری پروتئین خالص را به بیرون از محیط باکتری ترشح می‌کند، پس بنابراین می‌توان خود این باکتری یعنی سلول مولد آنتی ژن را بصورت زنده در فرد استفاده کرد و باکتری با تولید پروتئین L1 و ترشح آن به محیط واژن، باعث ایجاد یک ایمنی مخاطی در واژن می‌شود و از آنجایی که این باکتری یک میکروفلور نرمال واژن زنان است، خطری برای افراد استفاده‌کننده ندارد. با این روش به نسبت تولید پروتئین در مقایسه با روش‌های دیگر که قبلا کار شده است روش آسان تری می‌باشد. در آینده می‌توان با تولید پروتئین به این روش سایر داروهای نوترکیب برای درمان و پیشگیری بسیاری از بیماری‌ها را تولید کرد، بخصوص در تهیه واکسن‌های پیشگیری که به نسبت واکسن‌های چند ظرفیتی تولید آن آسان‌تر است و احتمال بروز عوارض با توجه به اینکه پروتئین تولید شده جزعی از اجزای ویروس نیست و به صورت نوترکیب ساخته شده است، هم کمتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

در پایان از کلیه دوستان و همکاران عزیزی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

[1] Krzowska-Firych J, Lucas G, Lucas C, Lucas N, Pietrzyk Ł. An overview of Human Papillomavirus (HPV) as an etiological factor of the anal cancer. Journal of infection and public health. 2019; 12 (1):1-6.

[2] Gersch ED, Gissmann L, Garcea RL. New approaches to prophylactic human papillomavirus vaccines for cervical cancer prevention. Antiviral therapy. 2012; 17 (3).

[3] Chabeda A, Yanez RJ, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. Papillomavirus Research. 2018;5:46-58.

[4] Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. Virology. 2013; 445 (1-2): 169-74.

[5] Yang A, Jeang J, Cheng K, Cheng T, Yang B, Wu T-C, et al. Current state in the development of candidate therapeutic HPV vaccines. Expert review of vaccines. 2016; 15 (8): 989-1007.

[6] Steinau M, Unger ER, Hernandez BY, Goodman MT, Copeland G, Hopenhayn C, et al. Human papillomavirus prevalence in invasive anal cancers in the United States prior to vaccine introduction. Journal of lower genital tract disease. 2013;17 (4):397.

[7] Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. Vaccine. 2012; 30 (2): 12-23.

[8] Zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. Human pathogenic papillomaviruses. 1994:131-56.
[9] Munday JS, Thomson NA, Luff JA. Papillomaviruses in dogs and cats. The Veterinary Journal. 2017; 225: 23-31.
[10] Chan PK. Human papillomavirus type 58: the unique role in cervical cancers in East Asia. Cell & bioscience. 2012; 2 (1): 1-3.
[11] Ribeiro AL, Caodaglio AS, Sichero L. Regulation of HPV transcription. Clinics. 2018; 73 (4): 397.
[12] Tsakogiannis D, Papadopoulou A, Kontostathi G, Ruether I, Kyriakopoulou Z, Dimitriou T, et al. Molecular and evolutionary analysis of HPV16 E6 and E7 genes in Greek women. Journal of medical microbiology. 2013; 62 (11): 1688-96.
[13] Senapati R, Senapati NN, Dwibedi B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. Infectious Agents and Cancer. 2016; 11 (1): 1-11.
[14] French DP, Maissi E, Marteau T. Psychological costs of inadequate cervical smear test results. British Journal of Cancer. 2004; 91 (11): 1887-92.
[15] Hellner K, Dorrell L. Recent advances in understanding and preventing human papillomavirus-related disease. F1000 Research. 2017; 6.
[16] Ghorban Hosseini N, Tebianian M, Farhadi A, Hossein khani A, Rahimi A, Mortazavi M, et al. In silico analysis of L1/L2 sequences of human papillomaviruses: implication for universal vaccine design. Viral Immunology. 2017; 30 (3): 210-23.
[17] Garland SM, Brotherton J, Moscicki A-B, Kaufmann A, Stanley M, Bhatla N, et al. HPV vaccination of immunocompromised hosts. Papillomavirus Research. 2017; 4: 35-8.
[18] [18]Schiller JT, Müller M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. The Lancet Oncology. 2015; 16 (5): e217-e25.
[19] Villa LL. Overview of the clinical development and results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) vaccine. International Journal of Infectious Diseases. 2007; 11: S17-S25.
[20] Harper DM, DeMars LR. HPV vaccines–a review of the first decade. Gynecologic oncology. 2017; 146 (1): 196-204.
[21] Yin F, Wang Y, Chen N, Jiang D, Qiu Y, Wang Y, et al. A novel trivalent HPV 16/18/58 vaccine with anti-HPV 16 and 18 neutralizing antibody responses comparable to those induced by the Gardasil quadrivalent vaccine in rhesus macaque model. Papillomavirus Research. 2017; 3: 85-90.
[22] Poo H, Pyo HM, Lee TY, Yoon SW, Lee JS, Kim CJ, et al. Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on Lactobacillus casei induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice. International journal of cancer. 2006; 119 (7): 1702-9.
[23] Bermúdez-Humarán LG. Lactococcus lactis as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. Human vaccines. 2009;5 (4): 264-7.
[24] Kazi TA, Acharya A, Mukhopadhyay BC, Mandal S, Arukha AP, Nayak S, et al. Plasmid-Based Gene Expression Systems for Lactic Acid Bacteria: A Review. Microorganisms. 2022; 10 (6): 1132.
[25] Waters DM, Mauch A, Coffey A, Arendt EK, Zannini E. Lactic acid bacteria as a cell factory for the delivery of functional biomolecules and ingredients in cereal-based beverages: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2015; 55 (4): 503-20.
[26] Guan C, Yuan Y, Ma Y, Wang X, Zhang C, Lu M, et al. Development of a novel expression system in lactic acid bacteria controlled by a broad-host-range promoter PsrfA. Microbial Cell Factories. 2022; 21 (1): 1-10.
[27] Garay-Novillo JN, García-Morena D, Ruiz-Masó JÁ, Barra JL, Del Solar G. Combining modules for versatile and optimal labeling of lactic acid bacteria: two pMV158-family promiscuous replicons, a pneumococcal system for constitutive or inducible gene expression, and two fluorescent proteins. Frontiers in microbiology. 2019; 10: 1431.
[28] Guan C, Yuan Y, Ma Y, Wang X, Zhang C, Lu M, et al. Development of a novel expression system in lactic acid bacteria controlled by a broad-host-range promoter PsrfA. Microbial Cell Factories. 2022; 21 (1): 1-10.
[29] Kosler S, Strukelj B, Berlec A. Lactic acid bacteria with concomitant IL-17, IL-23 and TNFα-binding ability for the treatment of

inflammatory bowel disease. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2017; 18 (4): 318-26.

The expression and secretion of Human papilloma L1 heterologous protein of genotype11 in *lactobacillus*

Amani A.[1], Jafari P.[2*], Behzadi Andohjerdi R.[3], Fallah J.[4]

[1] M.Sc. Student, Department of Microbial Biotechnology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University of Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University of Arak, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University of Tehran Iran
[4] Assistant Professor, Department of Microbiology, Lister Microbiology Laboratory, Tehran, Iran

* (Corresponding author): p-jafari@iau-arak.ac.ir

Received: January 2022 Accepted: September.2022

Abstract

Human papillomavirus is a virus that transmitted through sexual intercourse and direct contact between human skin. Among the different strains of this virus, strains 18 and 16 are the most common strains in the development of cervical cancer, and also strains 11 and 6 are the most common strains in the development of genital lesions or genital warts. In this study, we used strain 11 capsid for secretory protein production Large *L1* in the *Lactobacillus* host.To produce *L1* protein from human *papillomavirus,* recombinant protein production methods were used by cloning the *L1* gene of this virus into a vector expressed in a prokaryotic host such as *Lactobacillus*, which was analyzed by *SDS-PAGE* methods. *SDS-PAGE* and Western blotting have been evaluated to confirm the expression of the protein.Nucleotide bands were confirmed in the gene fragment amplification experiment in gel electrophoresis as well as the observation of protein bands in *SDS-PAGE* and Western blot gels.By using the production of pathogenic protein in human *papillomavirus* by the recombinant method and in the bacterial host *Lactobacillus*, which is a fluorescence of the female reproductive system, can be used in the future to prevent and treat diseases associated with strain 11 of this virus. *Lactobacillus* bacteria, Heterologous L1 protein, Genital warts, cervical cancer, Human papilloma virus.

Keywords: *Lactobacillus* bacteria, heterologous protein L1, genital warts, cervical cancer, human papilloma virus.