

تولید، تخلیص و ارزیابی ساختار پروتئین نو ترکیب RBD-His Tag ویروس SARS-CoV-2 در سلول های CHO-K1

فائزه مقصود^۱، طناز بهادری^۲، فاضل شکری^{۳*}، محمدمهدی امیری^{۴*}

۱- دکترای تخصصی، گروه ایمنولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- کارشناسی ارشد، گروه ایمنولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- استاد تمام، گروه ایمنولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*نشانی برای مکاتبه: fshokri@tums.ac.ir, m_amiri@tums.ac.ir

پذیرش برای چاپ: بهار ۱۴۰۴

دریافت مقاله: زمستان ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: دومین متصل شونده به رسیپتور (RBD) یکی از مهم ترین آنتی ژن های مورد استفاده در مطالعات مرتبط با ویروس SARS-CoV-2 است که به منظور تولید واکسن، آنتی بادی های اختصاصی، آزمون های تشخیصی و بررسی های ساختاری به کار می رود.

مواد و روش ها: در این مطالعه، فرایند ساخت، کلونینگ، بیان، تخلیص و ارزیابی ساختار این پروتئین نو ترکیب در سیستم بیانی یوکاریوتیک انجام شد. ابتدا توالی ژنی RBD-His Tag، شامل ۷۶۲ جفت باز به صورت تجاری سنتز شد. پس از هضم آنزیمی، قطعه مورد نظر به وکتور بیانی PEE 12.4 وارد شد. پس از تایید تعیین توالی، وکتور نهایی به سلول های یوکاریوتی CHO-K1 ترانسفکت شده و پس از انتخاب کلون پایدار با بیان بالا، سلول ها در محیط فاقد سرم کشت داده شدند و سوپ رویی حاوی پروتئین نو ترکیب جمع آوری شد. تخلیص پروتئین با استفاده از ستون NiNTA و ستون میل پیوندی آنتی بادی های مونوکلونال ضد RBD انجام شد. با استفاده از آزمون های الایزا و SDS-PAGE واکنش پذیری پروتئین نو ترکیب با آنتی بادی های مونوکلونال و سرم بهبود یافتگان از بیماری کرونا و صحت وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب تولید شده بررسی شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که پروتئین نو ترکیب RBD-His Tag با وزن مولکولی مورد انتظار با موفقیت تولید و تخلیص شده است. همچنین نتایج الایزا نشان داد که این پروتئین ساختار فضایی مشابه با پروتئین طبیعی داشته و آنتی بادی های مونوکلونال و پلی کلونال ضد RBD قادر به شناسایی آن هستند.

نتیجه گیری: این مطالعه گامی مؤثر در توسعه ابزارهای تحقیقاتی و درمانی مرتبط با ویروس SARS-CoV-2 محسوب می شود.

واژگان کلیدی: پروتئین نو ترکیب RBD-His Tag، SARS-CoV-2، سلول CHO-K1، کروماتوگرافی میل ترکیبی

مقدمه

شناخته می شود و هدف اصلی بسیاری از واکسن ها و کیت های تشخیصی است (۲). پروتئین RBD علاوه بر کاربرد در تولید آنتی بادی های مونوکلونال و پلی کلونال، در توسعه کیت های تشخیصی الایزا و آزمون های سرولوژیک نیز نقش کلیدی دارد. همچنین، این پروتئین به عنوان آنتی ژن مهم در مطالعات ایپی توبی و بررسی پاسخ ایمنی مورد استفاده قرار می گیرد. با توجه به اهمیت روزافزون این پروتئین در تحقیقات مرتبط با SARS-CoV-2، بهینه سازی فرایند تولید، بیان و تخلیص آن از اهمیت بالایی برخوردار است (۳). در سال های اخیر،

ویروس SARS-CoV-2 به عنوان عامل بیماری کووید-۱۹، از زمان شیوع خود در اواخر سال ۲۰۱۹، به سرعت به یک بحران جهانی تبدیل شد. این ویروس متعلق به خانواده کروناویروس ها بوده و ساختار ژنومی آن از RNA تک رشته ای مثبت تشکیل شده است (۱). پروتئین اسپایک این ویروس که مسئول اتصال به گیرنده ACE2 سلول های میزبان است، نقش کلیدی در ورود ویروس به سلول های انسانی دارد (۲). ناحیه RBD (Receptor Binding Domain) این پروتئین، به عنوان ناحیه اتصال مستقیم به گیرنده ACE2

می تواند به توسعه واکسن ها، کیت های تشخیصی و درمان های مبتنی بر آنتی بادی های مونوکلونال کمک شایانی نماید و درک عمیق تری از تعاملات ویروس- میزبان فراهم آورد. همچنین، با توجه به ظهور گونه های جدید ویروس، تولید سریع و مطمئن پروتئین های نو ترکیب RBD اهمیت استراتژیک دارد.

۱- مواد و روش ها

۱-۲- طراحی و ساخت سازه RBD-His Tag

توالی ژنی بخش RBD ویروس SARS-CoV-2 (NC_045512.2) به همراه سیگنال پپتید و تگ هیستیدین (His Tag) در انتهای C ترمینال به طول ۷۶۲ جفت باز به صورت تجاری در وکتور pGEM®-T Vector سنتز شد. این توالی شامل ۲۲۳ آمینواسید RBD ، ۸ آمینواسید His Tag و ۲۳ آمینواسید سیگنال پپتید بود که در مجموع پروتئینی ۲۳۱ آمینواسیدی را تشکیل می داد.

۲-۲- تهیه سازه بیانی PEE 12.4 برای RBD-His Tag

سازه تجاری حاوی ژن RBD-His Tag با آنزیم های محدود الاثر BsiWI و BclI برش داده شد. پس از انجام هضم آنزیمی، محصولات روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و باند ژنی مورد نظر جدا شد، قطعات ژنی از ژل با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل ()

FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech) استخراج شدند. در این فرآیند، قطعات ژل بریده شده به میکروتیوب منتقل شدند و به اندازه سه برابر وزن ژل بافر Gel-B اضافه شد. پس از ورتکس و انکوباسیون در ۵۵ درجه سانتی گراد، ژل حل شد و محلول به ستون های تخلیص DNA منتقل شد تا با سانتریفوژ و شستشوی متوالی طبق دستورالعمل کیت، DNA خالص شده در آب مقطر بدست آید. وکتور بیانی PEE 12.4 نیز به طور مشابه با آنزیم های BsiWI و BclI هضم شد. سپس ژن استخراج شده وارد وکتور شد. جهت ترنسفورماسیون، باکتری JM109 به روش شیمیایی-حرارتی آماده شد (۱۰). پس از رشد اولیه، سلول ها روی یخ انکوبه شده و با محصولات لیگاسیون مخلوط شدند. سپس در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد حرارت داده شدند و مجدداً روی یخ قرار گرفتند. پس از انکوباسیون در محیط LB Broth ، نمونه ها روی پلیت های LB آگار حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند. کلونی های رشد

تولید پروتئین های نو ترکیب RBD با تگ هیستیدین (His Tag) در انتهای C ترمینال، به عنوان ابزاری مؤثر برای مطالعات ساختاری، عملکردی و ایمنی شناسی مورد توجه قرار گرفته است. تگ هیستیدین با فراهم آوردن امکان تخلیص سریع و اختصاصی پروتئین از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی (affinity chromatography) مبتنی بر رزین NiNTA، روند تولید پروتئین های نو ترکیب را تسهیل می کند (۴، ۵).

با توجه به اهمیت RBD در فرایند پاتوژنز ویروس و نقش آن در تحریک پاسخ ایمنی، تولید نسخه های نو ترکیب از این پروتئین با کیفیت بالا و حفظ ساختار طبیعی آن، یکی از اهداف مهم پژوهش های زیست فناوری در دوران پاندمی کرونا بوده است. سیستم های مختلفی برای بیان این پروتئین مورد استفاده قرار گرفته اند، که از جمله آن ها می توان به سیستم های باکتریایی مانند *E. coli* ، سیستم های مخمری مانند *Pichia pastoris* و همچنین سیستم های پستانداران مانند HEK293 اشاره کرد (6-8). هر یک از این سیستم ها دارای مزایا و محدودیت هایی هستند. به عنوان مثال، با وجود آن که باکتری ها سیستم های مناسبی برای تولید سریع و ارزان پروتئین ها هستند، اما عدم توانایی آن ها در گلیکوزیلاسیون و تاخوردگی صحیح پروتئین ها، کارایی این روش را در تولید پروتئین های پیچیده محدود می سازد. در مقابل، سیستم های بیان پستانداران، مانند سلول های CHO-K یا HEK293T، با توجه به توانایی انجام اصلاحات پس از ترجمه، گلیکوزیلاسیون و تاخوردگی صحیح، انتخاب مناسب تری برای تولید پروتئین های پیچیده و حساس مانند RBD هستند. همچنین، این سیستم ها قادرند پروتئین هایی با ساختار سه بعدی طبیعی و ایمونوژنیسیته نزدیک به حالت طبیعی تولید نمایند که برای مطالعات عملکردی، تولید آنتی بادی های مونوکلونال و طراحی واکسن بسیار مهم است (۹).

هدف اصلی این مطالعه، تولید، بیان و تخلیص پروتئین RBD-His Tag بود تا بتوان از آن در تولید آنتی بادی های مونوکلونال و کیت های تشخیصی استفاده کرد. انتخاب سلول های CHO-K1 به عنوان میزبان بیان پروتئین، به دلیل قابلیت انجام اصلاحات پس از ترجمه و تولید پروتئین های با ساختار طبیعی و فعالیت بیولوژیکی مناسب، اهمیت ویژه ای دارد.

در این مطالعه، روش های کلونینگ، ترنسفورماسیون، ترانسفکشن و تخلیص پروتئین به دقت به کار گرفته شدند تا پروتئینی با خلوص و عملکرد مطلوب تولید شود. این مطالعه

هفته، سوپ رویی حاوی پروتئین نوترکیب جمع‌آوری و تا زمان تخلیص در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۶- تخلیص پروتئین RBD-His Tag با ستون NiNTA

برای تخلیص پروتئین، ابتدا ستون NiNTA با آب مقطر و بافر تعادل (NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 300 mM, Tris -) (HCl 10 mM, Imidazole 10 mM, $\text{pH}=8$) شستشو داده شد. سوپ رویی فیلتر شده با سرعت کنترل شده از ستون عبور داده شد و فراکشن‌های متصل نشده جمع‌آوری شدند. سپس بافر شستشو (NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM, Imidazole 25 mM, $\text{pH}=8$) عبور داده شد تا جذب نوری به صفر رسید. پروتئین با شیب افزایشی ایمیدازول (NaCl 300 mM, Tris-HCl) (Imidazole 500-1000 mM, $\text{pH}=8$) 50 mM) الوت و از ستون جدا شد و فراکشن‌های یک میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند. جذب نوری فراکشن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و فراکشن‌های حاوی پروتئین ترکیب شدند. محلول نهایی در برابر بافر دیالیز (NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 500 mM, $\text{pH}=8$) دیالیز و سپس سانتریفوژ شد تا اگر بقیه‌ها حذف شوند. پروتئین تخلیص شده برای استفاده‌های بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۷- ساخت ستون میل ترکیبی آنتی بادی مونوکلونال موشی ضد RBD

در این مطالعه، به دلیل عدم موفقیت در تخلیص پروتئین Tag RBD-His با ستون NiNTA، ستون میل ترکیبی اختصاصی با استفاده از مخلوطی از ۱۳ کلون آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد RBD ساخته شد (۱۱، ۱۲). ابتدا ۲۲ میلی‌گرم از مجموع ۱۳ کلون آنتی‌بادیتخلیص شده در حجم ۱۷ سی‌سی با هم مخلوط و پس از دیالیز در برابر بافر اتصال (NaHCO_3 100mM, NaCl 500 mM, $\text{pH}=8.3$)، به ژل CNBr-activated sepharose 4B اضافه شدند. این مخلوط به صورت شبانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوبه و سپس به ستون کروماتوگرافی منتقل شد. ستون با بافر اتصال شستشو و سپس با بافر بلاکینگ (Tris-HCl 200 mM, $\text{pH}=8$) و بافرهای شستشوی اسیدی (Acetic acid , $\text{pH}=4$, Sodium Acetate 500 mM, 100 mM) و بازی (Tris-HCl 200 mM, NaCl 500 mM, $\text{pH}=8$) بازی پاکسازی شد. برای الوشن پروتئین، بافر Glycine-HCl

یافته با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و کتور تحت PCR قرار گرفتند. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و کلونی‌های حاوی سازه مورد نظر انتخاب شدند. سپس، کلونی‌های مثبت برای تهیه گلیسرول استوک و استخراج پلاسمید کشت داده شدند. پلاسمیدها با کیت Miniprep استخراج و کیفیت آن‌ها با نانودراپ و الکتروفورز بررسی شد. پلاسمیدهای استخراج شده با پرایمرهای اختصاصی و کتور تعیین توالی شدند تا صحت توالی ژن RBD-His Tag تایید شود.

۲-۳- ترانسفکشن سلول‌های CHO-K1

سلول‌های CHO-K1 در محیط RPMI با ۱۰٪ سرم کشت داده شدند. پس از رسیدن به تراکم مناسب، محیط کشت با Opti-MEM تعویض شد. DNA پلاسمید حاوی ژن RBD-His Tag با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ مخلوط و به سلول‌ها اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط تعویض و پس از ۴۸ ساعت، سوپ رویی سلول‌ها برای ارزیابی بیان پروتئین جمع‌آوری شد.

۲-۴- اندازه‌گیری بیان پروتئین با الایزا

برای تعیین میزان پروتئین RBD-His Tag، آزمون الایزا ساندویچ با استفاده از دو آنتی‌بادی مونوکلونال ضد RBD تولید شده در مطالعات قبلی انجام شد (۱۱). آنتی‌بادی اولیه 2C5 به عنوان گیرنده به چاهک‌ها اضافه شد و پس از بلاکینگ و شستشو، سوپ رویی سلول‌ها با رقت‌های مختلف به چاهک‌ها افزوده شد. پروتئین نوترکیب RBD-His tag تجاری (SinoBiological) از غلظت ۱۰۰۰ تا ۱۲۵ ng/ml به عنوان استاندارد تیتراژ شد. به آنتی‌بادی 3G5 کونژوگه شده با آنزیم HRP به عنوان آنتی‌بادی ثانویه اضافه و پس از واکنش با سوبسترای TMB، جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۲-۵- کشت انبوه سلول‌های مولد RBD-His Tag

سلول‌های پایدار بیان‌کننده پروتئین نوترکیب RBD-His Tag ابتدا در محیط حاوی ۱۰٪ سرم تا رسیدن به تراکم کامل کشت داده شدند، سپس محیط کشت به محیط فاقد سرم First CHOice تعویض و در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO_2 نگهداری شدند. پس از حدود دو

کوماسی بلو رنگ آمیزی و سپس به مدت دو ساعت در بافر رنگبری قرار گرفت تا باندهای پروتئینی واضح شوند. این روش امکان بررسی خلوص و اندازه پروتئین های نو ترکیب را فراهم می کند.

۲-۹- بررسی اتصال پذیری سرم افراد بهبود یافته و آنتی بادی های مونوکلونال با RBD-His Tag تخلیص شده

برای تعیین میزان اتصال پذیری آنتی بادی های مونوکلونال موشی و سرم افراد بهبود یافته از COVID-19 با پروتئین RBD-His Tag و مقایسه آن با RBD تجاری، آزمون الایزای مستقیم با استفاده از کو تینگ آنتی ژن نو ترکیب و تجاری (RBD-His Tag, Recombinant) انجام شد. پس از بلاکینگ و شستشو، ده آنتی بادی مونوکلونال موشی Anti-RBD (۱۱، ۱۳) با غلظت 250 ng/ml و شش سرم گرفته شده از افراد بهبود یافته (۱۴، ۱۵) با رقت ۱:۲۰۰ به عنوان لایه دوم به چاهک ها اضافه شد و سپس آنتی بادی پلی کلونال علیه IgG موشی یا انسانی کوئز وگه شده با HRP به عنوان آنتی بادی ثانویه اضافه و پس از واکنش با سوبسترای TMB، جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد.

۲- نتایج

۳-۱- تایید هضم آنزیمی، استخراج ژن و ساخت سازه

بیانی

الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ باندی با اندازه ۷۶۲ جفت باز را نشان داد که نشان دهنده موفقیت در هضم و استخراج ژن RBD-His Tag بود. کیفیت DNA استخراج شده با نانودراپ و الکتروفورز تایید شد. پس از لیگاسیون ژن با وکتور PEE 12.4 و ترنسفورماسیون به باکتری JM109، تعداد زیادی کلونی روی پلیت های آگار رشد کردند. Colony PCR بر روی ۳۰ کلونی به صورت تصادفی انتخاب شده نشان داد که ۲۴ کلونی (۸۰٪) حاوی سازه مورد نظر بودند که بیانگر راندمان بالای لیگاسیون و ترنسفورماسیون بود. پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی های مثبت با کیفیت بالا و غلظت مناسب بودند (شکل های ۱ و ۲). تعیین توالی DNA صحت توالی ژن RBD-His Tag و اتصال صحیح آن به وکتور بیانی را تایید کرد.

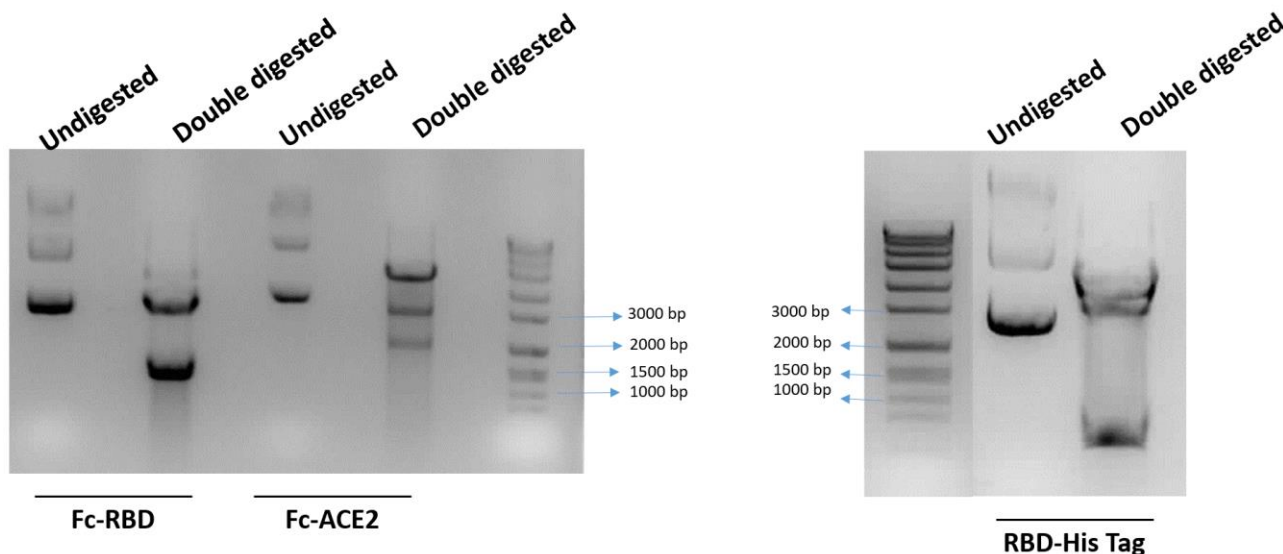
با pH=2.5 استفاده شد و فراکشن ها جمع آوری و جذب نوری آنها اندازه گیری شد. پس از خنثی سازی pH با بافر PBS و افزودن سدیم آزاید به ستون، ستون برای استفاده های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تخلیص پروتئین نو ترکیب RBD-His Tag با استفاده از ستون میل ترکیبی آنتی بادی مونوکلونال موشی ضد RBD

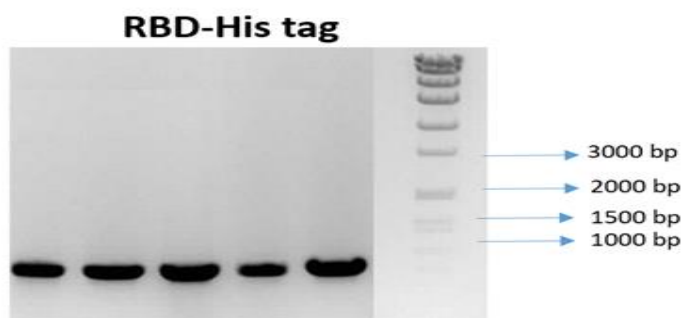
برای تخلیص پروتئین RBD-His Tag، ستون ابتدا با عبور بافر Tris-HCl حاوی NaCl و PMSF (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH=7.4) به تعادل رسید و سپس سوپ رویی حاوی PMSF یک میلی مولار با سرعت کنترل شده از ستون عبور داده شد. ستون با بافر شستشو (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1M Urea, pH=7.4) شستشو داده شد و پروتئین با بافر الوشن (0.2 M Glycine-HCl, 1 mM PMSF, 1 mM Urea, pH=2.5) الوت شد. فراکشن های حاوی پروتئین با هم ترکیب و دیالیز شدند. در نهایت، ستون با بافر PBS 1X و PBS حاوی سدیم آزاید 0.1% شستشو و برای نگهداری آماده گردید.

۲-۸- تعیین خلوص و وزن مولکولی پروتئین های نو ترکیب تخلیص شده به روش SDS-PAGE

برای تعیین خلوص و وزن مولکولی پروتئین های نو ترکیب تخلیص شده، از روش SDS-PAGE استفاده شد (۱۰). در این آزمون، ژل متراکم کننده ۵ درصد و ژل جدا کننده ۱۰ درصد ساخته شد. ابتدا ژل جدا کننده در بین دو شیشه قرار گرفت و سطح آن با الکل ایزوپروپانول صاف شد. پس از بسته شدن ژل جدا کننده، فضای باقی مانده با ژل متراکم کننده پر شد و شانه مخصوص برای ایجاد چاهک ها قرار داده شد. ژل ها به مدت شبانه در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای پلی مریزاسیون کامل نگهداری شدند. سپس ژل در تانک الکتروفورز حاوی بافر Tris-Glycine-SDS Buffer (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 0.1% (w/v) قرار گرفت. نمونه های پروتئینی با بافر نمونه سازی، در دو حالت حاوی و فاقد ۵ درصد ۲-مرکاپتواتانول (احیا کننده) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش انکوبه شدند. نمونه ها به همراه مارکر وزن مولکولی در چاهک ها بارگذاری و الکتروفورز با ولتاژهای ۹۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه و سپس ۱۱۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. پس از اتمام، ژل از شیشه ها جدا و به مدت یک ساعت در رنگ



شکل ۱. سازه تجاری حاوی ژن RBD-His Tag با آنزیم های BclI و BsiWI بریده شده و بعد از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ از ژل آگارز استخراج شد. (D.dig: Double digest, Un dig: Undigest). Ladder: 1 kb DNA ladder (Sinaclone)



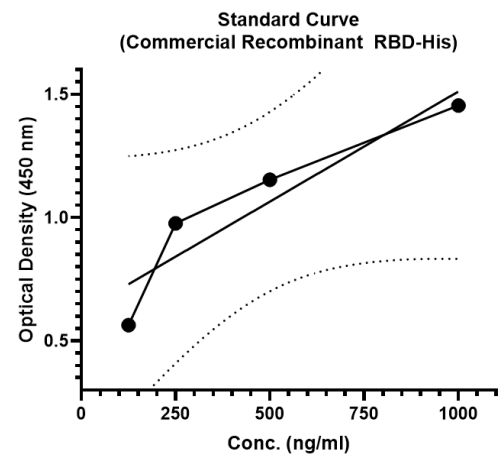
شکل ۲

۲-۳- بیان پروتئین در سلول های CHO-K1

پس از ترانسفکشن، سوپ رویی سلول ها با روش الایزا بررسی شد. نتایج نشان داد که پروتئین RBD-His Tag به میزان قابل توجهی بیان شده است. نتایج الایزای غیر مستقیم در شکل ۳ نشان داد که پروتئین RBD-His Tag به میزان حدود ۲۵۰ نانوگرم در میلی لیتر تولید شده و فرایند ساخت

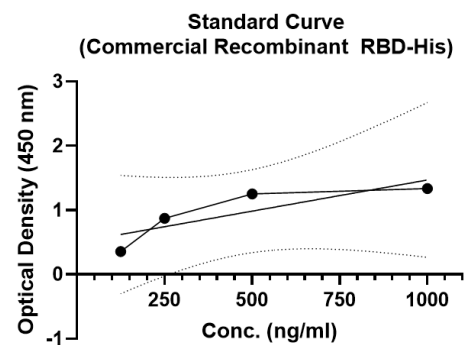
سازه و ترانسفکشن موفقیت آمیز بوده است. در مرحله بعد، کلون نهایی در محیط فاقد سرم بصورت انبوه کشت داده شد و سپس سوپ های سلولی در فریزر ۲۰- تا زمان تخلیص نگهداری شدند. جهت تایید بیان پروتئین نو ترکیب مورد نظر و تعیین میزان تولید آن، الایزای ساندویچ انجام شد. پروتئین RBD-His Tag به طور میانگین به میزان ۱۶ µg/ml تولید شد (شکل ۴).

Commercial RBD-His (ng/ml)	OD	RBD-His Supernatant	OD	Intrapolated Conc. (ng/ml)
1000	1.454	Well 1	0.865	276.39
500	1.153	Well 2	0.930	349.19
250	0.976	Well 3	0.815	220.39
125	0.464	Well 4	0.743	139.75



شکل ۳

Commercial RBD	OD	RBD-His Final clone supernatant	OD	Interpolated Conc. (ng/ml)
1 µg/ml	1.334	1:8	1.534	8543.386
0.5 µg/ml	1.253	1:16	1.363	14263.98
0.25 µg/ml	0.872	1:32	1.267	25358.5
0.125 µg/ml	0.354	1:64	0.835	22191.92



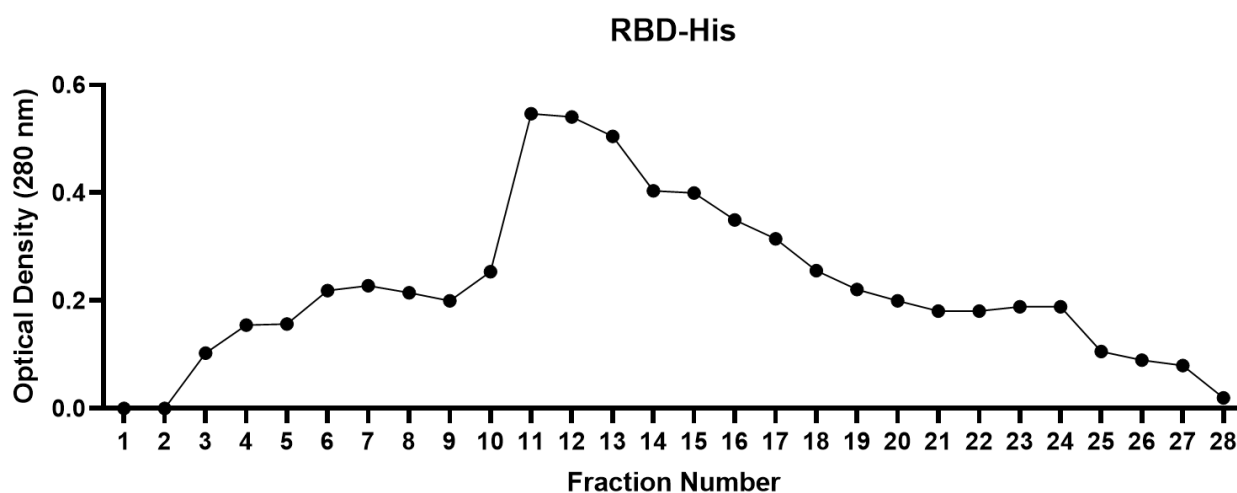
شکل ۴

۳-۳- تخلیص پروتئین با ستون NiNTA و

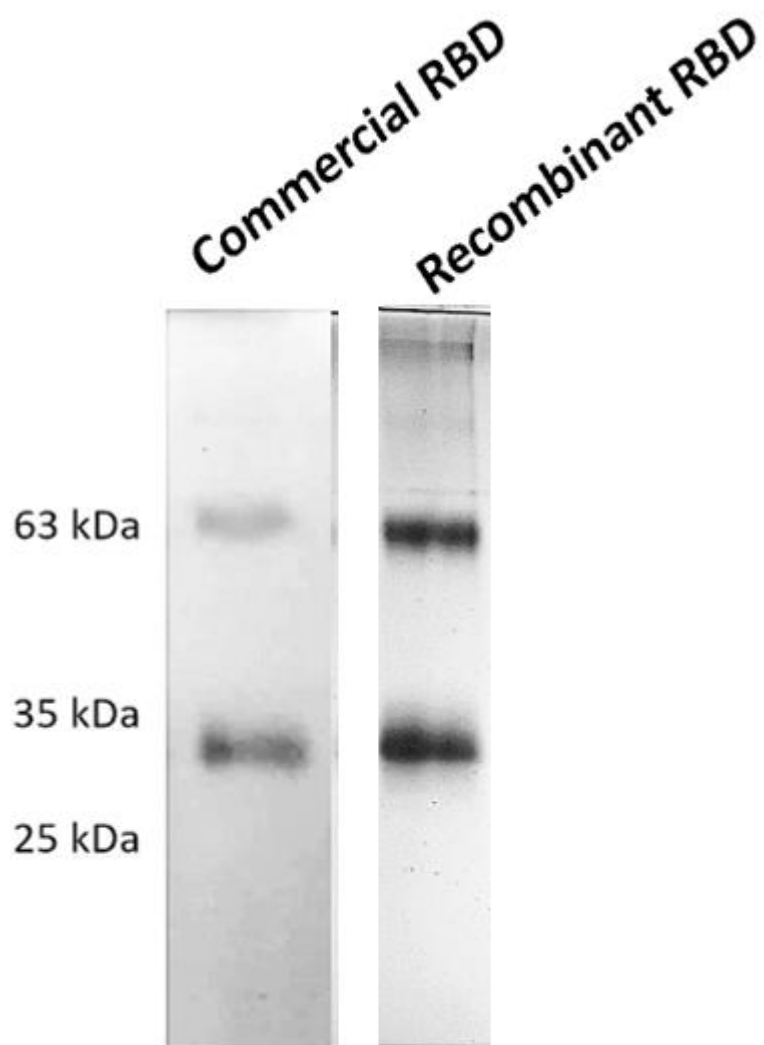
ستون آنتی بادی های مونوکلونال موشی ضد RBD

کروماتوگرافی میل ترکیبی NiNTA منجر به تخلیص پروتئین RBD-His Tag نشد. جذب نوری فراکشن های جمع آوری شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر نشان داد که پروتئین در فراکشن های الوشن وجود ندارد که علت آن حضور سورفکتانت در محیط کشت مذکور و عدم اتصال پروتئین به ستون Ni-NTA بود. در مرحله بعد، از ستون افینیتی حاوی ۱۳ آنتی بادی مونوکلونال ضد پروتئین RBD که قبلا تولید شده بود، برای اتصال به رزین سفارز استفاده شد. برای ساختن ستون، پس از تخلیص آسیت کلون های مختلف آنتی بادی های مونوکلونال ضد RBD، به میزان ۲۲ میلی گرم به رزین های فعال شده سفاروز 4B متصل شد. پس از ساخت ستون اختصاصی، سوپ رویی سلول های تولید کننده پروتئین نوترکیب RBD از روی ستون عبور داده شد و پس از شستشوی ستون با بافر PBS 1X و الوت آن با بافر الوشن Glycine-HCl 0.2M pH=2.5، مشخص شد که پروتئین مدنظر به سفاروز متصل می شود اما الوت نمی شود. بعبارت دیگر، در حالی که در unbound حاصل از تخلیص هیچ RBD در الایزا وجود نداشت، در فراکشن های الوت شده هم میزان RBD تقریبا صفر بود. بنابراین احتمال می رفت که پروتئین RBD طی مراحل الوشن تخریب می شود و تصمیم

گرفته شد در مراحل بهینه سازی تخلیص از مهارکننده پروتئاز استفاده شود. پروتکل تخلیص بهینه سازی شد تا در نهایت با شستشوی ستون با بافر شستشوی Tris-HCl ۵۰ میلی مولار حاوی ۱۵۰ میلی مولار NaCl و ۱ میلی مولار PMSF به عنوان مهارکننده پروتئاز و ۱ مولار اوره و الوت آن با بافر الوشن RBD-His Tag Gly-HCl 0.2M pH=2.5 پروتئین تخلیص شده را در طول موج ۲۸۰ نانومتر نشان می دهد. بر اساس شکل ۵، فراکشن های شماره ۱۰ تا ۱۸ با هم مخلوط شدند و پس از خوانش جذب نوری در برابر بافر Tris-HCl 50 mM حاوی 150 mM NaCl دیالیز شدند. سپس پروتئین حاصل روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد الکتروفورز شد (شکل ۶). نتایج شکل ۶ نشان داد که فراکشن تخلیص شده در شرایط غیر احیا دارای یک باند مونومر RBD با وزن مولکولی ۳۰ کیلودالتون و یک باند دایمر با وزن مولکولی حدود ۶۰ کیلودالتون است. همانطور که ملاحظه می شود RBD تجاری نیز دارای همین الگو است (شکل ۶). همچنین جهت تعیین غلظت فراکشن تخلیص شده، الایزای ساندویچ انجام شد. نتایج شکل ۷ نشان داد که در مقایسه با RBD تجاری به عنوان استاندارد، از تخلیص ۱۲۰ سی سی سوپ، حدود ۲ میلی گرم (۱۰ سی سی با غلظت 200 µg/ml) پروتئین نوترکیب بدست آمده است.

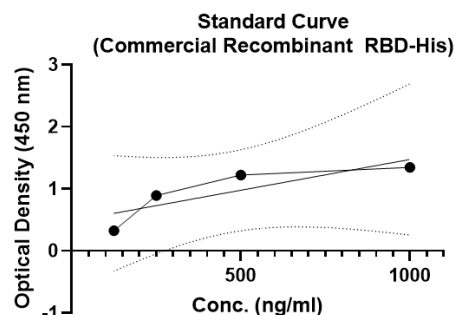


شکل ۵



شکل ۶

Commercial RBD	OD	Unbound	OD	Purified RBD	OD	Interpolated Conc. (ng/ml)
1 µg/ml	1.344	1:2	0.149	1:100	1.525	105254.9
0.5 µg/ml	1.223	1:4	0.103	1:200	1.343	173823.9
0.25 µg/ml	0.892	1:8	0.09	1:400	1.247	308946.2
0.125 µg/ml	0.324	1:16	0.03	1:800	0.837	287316.8

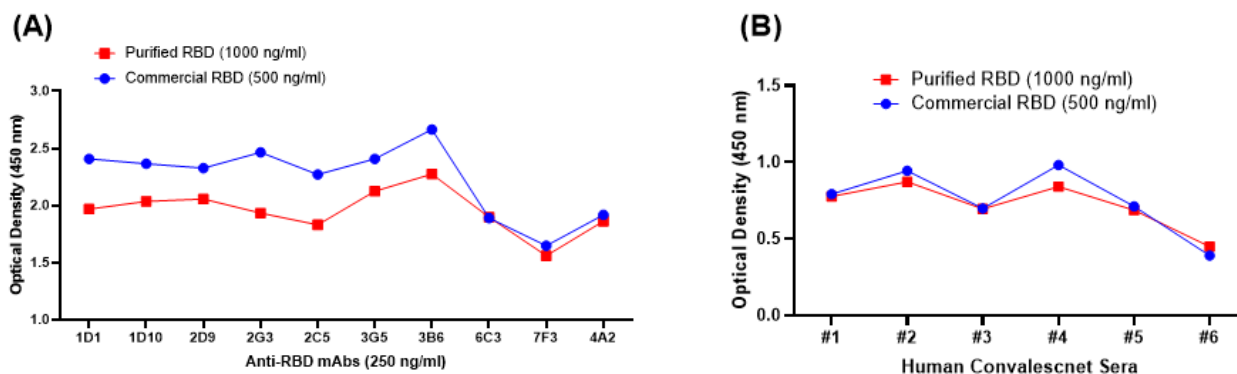


شکل ۷

است که RBD-His Tag تا حد زیادی ویژگی‌های آنتی‌ژنیک RBD تجاری را حفظ کرده و حاوی اپی‌توپ‌های ضروری برای شناسایی توسط آنتی‌بادی مونوکلونال می‌باشد. هر شش سرم گرفته شده از افراد بهبودیافته از COVID-19 الگوی اتصال مشابهی به هر دو نوع آنتی‌ژن نشان دادند. میانگین جذب نوری برای RBD-His Tag برابر 1.25 و برای RBD تجاری 1.35 بود (شکل 8B). نتایج حاصل از دو آنتی‌ژن تأیید می‌کند که RBD-His Tag قابلیت تشخیص قابل اطمینان پاسخ‌های آنتی‌بادی پلی‌کلونال در سرم بهبودیافتگان را دارد. تحلیل آماری تفاوت معنی‌داری بین واکنش پذیری دو آنتی‌ژن نشان نداد (آزمون t -test، $p < 0.05$).

- ارزیابی عملکرد پروتئین تخلص شده و مقایسه آن با RBD-His Tag تجاری

آزمایش الیزای غیرمستقیم برای مقایسه توانایی اتصال آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موشی و سرم بهبودیافتگان COVID-19 به آنتی‌ژن RBD-His Tag تولید شده در این مطالعه و RBD تجاری انجام شد. همانطور که نتایج شکل ۸ نشان می‌دهد، هر دو آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد RBD ارزیابی شده واکنش قوی با هر دو نوع آنتی‌ژن نشان دادند. میانگین جذب نوری (OD450) برای RBD-His Tag برابر 1.3 و برای RBD تجاری کمی بالاتر و برابر 1.55 بود. تحلیل آماری تفاوت معنی‌داری بین دو آنتی‌ژن نشان نداد (آزمون t -test، $p < 0.05$). (شکل 8A). این نتایج بیانگر آن



شکل ۸

۱- بحث و نتیجه گیری

تولید پروتئین نوترکیب RBD-His Tag با استفاده از روش های کلونینگ مولکولی، بیان در سلول های یوکاریوتی و تخلیص میل ترکیبی، یک رویکرد موفق و کارآمد برای فراهم آوردن آنتی ژن های با کیفیت بالا جهت مطالعات ویروس SARS-CoV-2 است.

انتخاب سلول های CHO-K1 به عنوان میزبان بیان پروتئین، به دلیل توانایی انجام اصلاحات پس از ترجمه و تولید پروتئین های با ساختار و فعالیت طبیعی، مزیت مهمی است که در دستیابی به پروتئین های عملکردی موثر بوده است. نتایج الایزا نشان داد که میزان بیان پروتئین در این سلول ها به حد مطلوبی رسیده است.

نتایج این مطالعه با یافته های سایر تحقیقات در زمینه بیان RBD هم راستا بود. در مطالعه ای توسط Amanat و همکاران، بیان پروتئین RBD در سیستم CHO-K1 منجر به تولید آنتی ژنی با توانایی تشخیص قوی سرم بیماران شد (۱۶). مشابه این یافته ها در مطالعه ما، پروتئین تولیدی قابلیت تشخیص دقیق آنتی بادی های اختصاصی علیه SARS-CoV-2 را دارا بود. یکی از روش های بررسی صحت ساختار و حفظ ساختار فضایی پروتئین های نوترکیب استفاده از آزمون الایزا است. از طرفی، یکی از روش های تاییدی ارزیابی اختصاصیت پروتئین های نوترکیب آزمون وسترن بلات است که در این مطالعه انجام نشد. با اینحال، آنتی بادی های مونوکلونال تولید شده در مطالعه قبلی ما (۱۱، ۱۲) قادر به شناسایی پروتئین طبیعی ویروس کرونا در آزمون خنثی سازی ویروس و سودوویروس SARS-CoV-2 و نیز RBD تجاری در آزمون وسترن بلات هستند و در این مطالعه نیز قادر به شناسایی فرم نوترکیب پروتئین RBD تولید شده و تجاری در آزمون الایزا هستند که نشان دهنده صحت ساختار فضایی این پروتئین است. همچنین در برخی مطالعات که از E. coli برای بیان RBD استفاده شده بود، با وجود بازده بالا، مشکلاتی مانند تجمع غیرمحلول (inclusion body) و نیاز به Refolding مانع از کاربرد مستقیم آن پروتئین ها شده بود (۱۷). این مقایسه ها بیانگر مزیت سیستم بیان یوکاریوتی در تولید پروتئین های عملکردی است.

این مطالعه نشان داد که روش های مولکولی و بیوشیمیایی به کار گرفته شده، امکان تولید سریع و مطمئن پروتئین های نوترکیب ویروسی را فراهم می آورد و در مواجهه با گونه های

جدید ویروس SARS-CoV-2 یا ویروس های مشابه، می تواند به سرعت به کار گرفته شود تا به توسعه واکسن ها و درمان های هدفمند کمک نماید. تولید پروتئین نوترکیب RBD ویروس SARS-CoV-2 در سیستم های بیانی مختلف، به ویژه سلول های پستانداران مانند CHO-K1 و HEK293T، نقش کلیدی در توسعه کیت های تشخیصی، واکسن ها و مطالعات ایمونولوژیک دارد (18) (۱۹) (۲۰). در این مطالعه، پروتئین RBD-His Tag در سلول های CHO-K1 بیان و تخلیص شد و عملکرد آن با نمونه تجاری تولید شده در HEK293T مقایسه گردید. یافته ها نشان داد که اگرچه تفاوت های جزئی و غیرمعناداری در واکنش پذیری آنتی بادی ها وجود دارد، RBD-His Tag تولیدی از نظر ساختاری و عملکردی معادل نمونه تجاری است. این نتایج با مطالعات پیشین که بیان RBD در CHO-K1 یا HEK293T را گزارش کردند، همسو است (18) (۱۹) (۲۰) (۱۶)، اما مزیت های CHO-K1 در تولید انبوه و پایداری پروتئین را برجسته می سازد. سلول های HEK293T اما چالش هایی مانند هزینه بالا و ناپایداری در کشت طولانی مدت دارند. در مقابل، CHO-K1 با قابلیت کشت در بیوراکتورهای صنعتی و انجام گلیکوزیلاسیون نزدیک به انسان، برای تولید پایدار پروتئین های درمانی و تشخیصی مناسب تر است (21, 22). در این مطالعه، CHO-K1 با بازده بیان ~۱۶ میکروگرم/میلی لیتر، عملکردی قابل رقابت با HEK293T (۵۰-۲۰ میکروگرم/میلی لیتر) در مطالعات دیگر نشان داد (۲۳، ۲۴). آنالیز SDS-PAGE و الایزا تأیید کرد که RBD-His Tag تولید شده در CHO-K1، مانند نمونه تجاری، دارای باندهای مونومر (۳۰ کیلودالتون) و دایمر (۶۰ کیلودالتون) است که نشان دهنده تاخوردگی صحیح پروتئین است.

علی رغم موفقیت های حاصل شده در این تحقیق، محدودیت هایی نیز وجود داشت. یکی از چالش ها، هزینه بالای کشت سلول های CHO-K1 و مواد مورد نیاز برای تخلیص پروتئین بود. همچنین، بازده بیان نسبت به سیستم های باکتریایی پایین تر بود. از سوی دیگر، در این مطالعه تنها واکنش پروتئین با سرم بیماران و آنتی بادی های مونوکلونال موشی بررسی شد و مطالعه دقیق تری از جنبه های

ایمونولوژیک در مدل های حیوانی انجام نگرفت که می تواند در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد. در ادامه مسیر تحقیق، پیشنهاد می شود مطالعاتی در زمینه بررسی پایداری طولانی مدت پروتئین RBD-His در شرایط مختلف نگهداری انجام شود. همچنین، بررسی واکنش

ایمونولوژیک در مدل های حیوانی و مقایسه پاسخ های سلولی و هومورال نیز می تواند در توسعه واکسن یا کیت های پیشرفته تشخیصی مفید باشد. افزودن جایگاه های جهش یافته از انواع مختلف ویروس مانند Omicron یا Delta نیز می تواند گستره کاربرد این آنتی ژن را در شناسایی ویروس های جهش یافته افزایش دهد.

REFERENCE

- .1 Maghsood F, Ghorbani A, Yadegari H, Golsaz-Shirazi F, Amiri MM, Shokri F. SARS-CoV-2 nucleocapsid: Biological functions and implication for disease diagnosis and vaccine design. *Reviews in Medical Virology*. 2023;33(3):e2431.
- .2 Ghotloo S, Maghsood F, Golsaz-Shirazi F, Amiri MM, Moog C, Shokri F. Epitope mapping of neutralising anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibodies: implications for immunotherapy and vaccine design. *Reviews in Medical Virology*. 2022;32(5):e2347.
- .3 Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen TH, Chromikova V, McMahon M, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature medicine*. 2020;26(7):1033-6.
- .4 Sinegubova MV, Orlova NA, Kovnir SV, Dayanova LK, Vorobiev II. High-level expression of the monomeric SARS-CoV-2 S protein RBD 320-537 in stably transfected CHO cells by the EE1A1-based plasmid vector. *PLoS One*. 2021;16(2):e0242890.
- .5 Islam MD, Islam MM, Kuroda Y. Ni²⁺-induced selective precipitation of His-tagged recombinant proteins shortens purification time while maintaining high yield. *Journal of Biotechnology*. 2025;399:38-46.
- .6 He Y, Qi J, Xiao L, Shen L, Yu W, Hu T. Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences*. 2021;21(6):453-60.
- .7 Limonta-Fernández M, Chinea-Santiago G, Martín-Dunn AM, Gonzalez-Roche D, Bequet-Romero M, Marquez-Perera G, et al. An engineered SARS-CoV-2 receptor-binding domain produced in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen. *New Biotechnology*. 2022;72:11-21.
- .8 Dash S, Farnós O, Yang Z, Sudalaiyadum Perumal A, Chaves Fulber JP, Venereo-Sánchez A, et al. A rapid procedure to generate stably transfected HEK293 suspension cells for recombinant protein manufacturing: Yield improvements, bioreactor production and downstream processing. *Protein Expression and Purification*. 2023;210:106295.
- .9 Boggiano-Ayo T, Palacios-Oliva J, Lozada-Chang S, Relova-Hernandez E, Gomez-Perez J, Oliva G, et al. Development of a scalable single process for producing SARS-CoV-2 RBD monomer and dimer vaccine antigens. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11:1287551.
- .10 Hojatizadeh M, Amiri MM, Mobini M, Hassanzadeh Makoui M, Ghaedi M, Ghotloo S, et al. Cross-Reactivity of HBe Antigen-Specific Polyclonal Antibody with HBc Antigen. *Viral Immunology*. 2023;36(6):378-88.
- .11 Maghsood F, Amiri MM, Zarnani A-H, Salimi V, Kardar GA, Khoshnoodi J, et al. Epitope mapping of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 neutralizing receptor binding domain-specific monoclonal antibodies. *Frontiers in Medicine*. 2022;9:973036.
- .12 Maghsood F, Dashti N, Bahadori T, Golsaz-Shirazi F, Moog C, Amiri MM, et al. Comparative assessment of four virus neutralization assays for detection of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Analytical Biochemistry*. 2025;702:115860.
- .13 Ghorbani A, Maghsood F, Yadegari H, Bahadori T, Zarnani A-H, Razavi SA, et al. Novel neutralizing mouse-human chimeric monoclonal antibodies against the SARS-CoV-2 receptor binding domain. *Journal of Medical Microbiology*. 2023;72(6):001728.
- .14 Maghsood F, Hassani D, Salimi V, Kardar GA, Khoshnoodi J, Ghaderi A, et al. Differential Antibody Response to SARS-CoV-2 Antigens in Recovered and Deceased Iranian COVID-19 Patients. *Viral Immunology*. 2021;34(10):708-13.
- .15 Maghsood F, Shokri M-R, Jeddi-Tehrani M, Torabi Rahvar M, Ghaderi A, Salimi V, et al. Identification of immunodominant epitopes on nucleocapsid and spike proteins of the SARS-CoV-2 in Iranian COVID-19 patients. *Pathogens and Disease*. 2022;80(1):ftac001.
- .16 Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen THO, Chromikova V, McMahon M, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*. 2020;26(7):1033-6.

- .17 Srichandan S, Meena J, Ahuja R, Panda AK. Expression and Characterization of SARS-CoV-2 RBD Recovered from Inclusion Bodies in *E. coli* by Using Mild Solubilization Method and Immunogenicity Improvement Thereof. *Indian Journal of Microbiology*. 2025.
- .18 Wang Q, Wang Y, Yang S, Lin C, Aliyu L, Chen Y, et al. A linkage-specific sialic acid Labeling strategy reveals different site-specific glycosylation patterns in SARS-CoV-2 spike protein produced in CHO and HEK cell substrates. *Frontiers in Chemistry*. 2021;9:735558.
- .19 Wright HL, Evans C, Jackson PJ, James DC, Tee KL, Wong TS, et al. Glycoprofile comparison of the SARS-CoV-2 spike proteins expressed in CHO and HEK cell lines. *Molecular Biotechnology*. 2024:1-16.
- .20 Samuelsson E, Mirgorodskaya E, Nystrom K, Backstrom M, Liljeqvist J-Å, Norden R. Sialic acid and fucose residues on the SARS-CoV-2 receptor-binding domain modulate IgG antibody reactivity. *ACS Infectious Diseases*. 2022;8(9):1883-93.
- .21 Croset A, Delafosse L, Gaudry JP, Arod C, Glez L, Losberger C, et al. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol*. 2012;161(3):336-48.
- .22 Lalonde M-E, Durocher Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*. 2017;251:128-40.
- .23 Halff EF, Versteeg M, Brondijk THC, Huizinga EG. When less becomes more: Optimization of protein expression in HEK293-EBNA1 cells using plasmid titration – A case study for NLRs. *Protein Expression and Purification*. 2014;99:27-34.
- .24 Laignon M, Perret S, Kelly J, Boulais D, Cass B, Bisson L, et al. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol*. 2008;8:65.