

Research Paper



Expression and Purification of SARS CoV-2 RBD Protein in the Prokaryotic Expression System to Evaluate the IgG Antibody in the Serums of COVID-19 Recovered Cases

Fatemeh Hosseini¹, Taravat Bamdad¹, Behrokh Farahmand², Kazem Baesi³

1. Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Department of Influenza and Respiratory Diseases, Pasteur Institute, Tehran, Iran.
3. Hepatitis and AIDS Department, Pasteur Institute, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online



Citation Hosseini F, Bamdad T, Farahmand B, Baesi K. [Expression and Purification of SARS CoV-2 RBD Protein in the Prokaryotic Expression System to Evaluate the IgG Antibody in the Serums of COVID-19 Recovered Cases (Persian)]. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2023; 22(1):1-10. 10.61186/JSMJ.2022.341969.2843

[10.61186/JSMJ.2022.341969.2843](https://doi.org/10.61186/JSMJ.2022.341969.2843)

ABSTRACT

Background and Objectives One of the most important proteins of the SARS-COV-2 virus is S protein, which consists of S1 and S2 subunits. The most important region in subunit S1 is the receptor binding region (RBD), which plays a key role in binding to ACE receptors. The RBD is a conserved region in S protein that is the target of the immune system and the production of antibodies against the virus. Due to the importance of this region in the production of neutralizing antibodies, it can be a good candidate for vaccine development and production of diagnostic kits. Therefore, the present study aimed to assess the response rate of antibodies in the serum of recovered COVID-19 cases using recombinant RBD protein produced in the prokaryotic expression system as an inexpensive expression system.

Subjects and Methods In this study, the recombinant PET22b-RBD construct was transformed to the Escherichia coli (BL21) host, and the bacterial cells were cultured in a culture medium; thereafter, protein expression was induced using isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG). The expression of recombinant RBD protein was confirmed by acrylamide gel (SDS-PAGE) and Western blotting. Finally, the desired protein was extracted using a Ni-NTA column and applied in an indirect ELISA.

Results In comparison with the serum of healthy individuals (cut off: 0.412), no significant increase was observed in the response of 30 serum samples to the recombinant RBD protein.

Conclusion The recombinant RBD protein produced in the prokaryotic host did not respond significantly to the antibodies in the serum of recovered COVID-19 patients and cannot be used for diagnostic purposes.

Keywords COVID-19, Receptor binding domain, SARS-COV-2

Received: 12 May 2022
Accepted: 20 July 2022
Available Online: 21 Mar 2023

* Corresponding Author:

Tarvat Bamdad; Behrokh Farahmand

Address: Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Department of Influenza and Other Respiratory Diseases, Pasteur Institute, Tehran, Iran.

Tel: +98 21 82884525; 21-66953311-15

E-Mail: Bamdad_t@modares.ac.ir; b_farahmand@pasteur.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

SARS-CoV-2, the cause of COVID-19 disease, appeared in Wuhan, China in late 2019. It is one of the members of the subfamily of beta coronaviruses. The single-stranded RNA genome of SARS-CoV-2 consists of two structural and non-structural regions. One of the most important proteins in the structural region is glycoprotein S, which consists of S1 and S2 subunits. The most critical region in subunit S1 is the receptor binding region (RBD), which plays a key role in binding to ACE receptors. The RBD is a conserved region in S protein that is the target of the immune system and the production of antibodies against the virus. Due to the importance of this region in the production of neutralizing antibodies, it can be a good candidate for vaccine development and production of diagnostic kits. Prokaryotic expression systems are one of the cost-effective expression systems that have good efficiency in protein production. The simplicity of these systems has made it easier to work with them. One of the disadvantages of prokaryotic systems is the lack of post-translational modifications. Post-translational modifications lead to the addition of sugar molecules to the protein. Protein glycosylation exerts a marked effect on its function as a biomolecule. Therefore, to investigate the function of the prokaryotic protein, this study assessed the response rate of antibodies in the serum of recovered COVID-19 individuals using recombinant RBD protein produced in the prokaryotic expression system as an inexpensive expression system.

Methods

In this study, the recombinant PET22b-RBD construct was transformed into the *Escherichia coli* (BL21) host using the calcium chloride chemical method. The bacterial cells were cultured in a medium containing ampicillin antibiotic; thereafter, protein expression was induced using isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG). The expression of recombinant RBD protein was confirmed by acrylamide gel (SDS-PAGE) and Western blotting. In brief, the protein solution was electrophoresed using 10% gel and then transferred to nitrocellulose paper. It was blocked to prevent non-specific binding. Primary antibody (Rabbit anti-RBD) and secondary antibody (goat-anti-rabbit conjugate) were added to the paper containing the protein, and after incubation, the protein bands were visualized using TMB. To extract protein from the bacterial host, the lysing buffer was added to the bacterial sediment; thereafter, it was frozen and thawed three times in liquid nitrogen. Sonication was performed to ensure the destruction of the bacterial wall. Finally, the desired protein was extracted using a Ni-NTA column and applied in an indirect ELISA. To set up the ELISA reaction, the serums of patients with COVID-19 four weeks after the onset of their symptoms were used. The recombinant RBD protein was coated at the bottom of the ELISA plate. Following that, non-specific sites were blocked using a blocking buffer. After 3-5 washes, 1/100

dilutions of patient serum were added to the wells. After incubation, a secondary antibody was added to the wells, and TMB was used to measure colorimetric changes. The data obtained from the indirect ELISA test were analyzed in Prism-GraphPad software using the t-test.

Results

The RBD region of protein S consists of 223 amino acid residues. Considering that post-translational modifications are not fully applied by the bacterial host, the RBD region protein expressed in the bacterial host will have a molecular weight of about 27-30 kDa. The 30 kDa band appeared on the SDS page. The results obtained from western blot analysis using polyclonal anti-RBD antibody (Rabbit-anti-RBD) demonstrated the presence of a protein of about 30 kDa; therefore, the RBD protein was confirmed. In the next step, the protein was extracted from the bacterial host, and the solution containing the protein was purified using Ni-NTA columns. The results of the analysis of the purified protein on acrylamide gel illustrated that the RBD protein was extracted from bacteria with a suitable concentration and purity. To evaluate the IgG antibody in the serum of convalescence patients, an indirect ELISA reaction using RBD protein was launched, the results of which indicated that compared to the serum of healthy individuals (cut off: 0.412), no significant increase was observed in the response of 30 serum samples to the recombinant RBD protein.

Conclusion

The RBD region in glycoprotein S is a strategic and important region that is one of the most conserved regions of the virus genome. Due to its interaction with cell surface receptors, it is one of the most important targets of the humoral immune system and antibodies. In the current study, the recombinant RBD protein was expressed in the bacterial host, and after confirmation, it was extracted and confirmed using the western blot method. The obtained protein concentration was determined to be 0.3 mg/ml. Following that, an indirect ELISA reaction was launched using recombinant RBD protein, and antibodies present in the serum of patients with COVID-19 were investigated. The results of this test demonstrated that recombinant RBD protein does not show an effective reaction to the antibodies in the serum of patients infected with COVID-19. This finding is in line with the results of a study conducted in 2021 on the proteins of nucleoprotein (N), and A fragment of the S protein (Spike protein fragment) was performed. In the mentioned study, the S fragment (S2 subunit) produced in the bacterial host, unlike the N protein, did not display a proper reaction to the serum of COVID-19 patients.

Considering the presence of four sugar sites in the RBD region and the importance of these sites in the formation of critical epitopes in the protein structure, it seems that the non-effective reaction of the serum of recovered COVID-19 cases to the proteins produced in the bacterial host is due to

the lack of post-translational modifications in the bacterial host. In addition, in natural infection, glycan molecules have covered the surface of glycoprotein S, causing essential epitopes to remain hidden in different areas of protein S, including the RBD region. The virus produces antibodies against these glycan shields, and the non-recognition of the antibodies produced in natural infection with the virus by the recombinant protein produced in the bacterial host can be caused by this problem.

It seems that the lack of effective reaction of the proteins produced in the prokaryotic host with the serum of patients recovered from natural virus infection does not mean the lack of antigenicity and non-functionality of prokaryotic recombinant protein. Nonetheless, to evaluate the characteristics of these proteins, it is necessary to carry out more in vivo studies. These proteins are still considered suitable candidates for the production of subunit vaccines due to the high efficiency of prokaryotic systems. Nevertheless, it seems that for the development of laboratory kits based on glycoproteins, post-translational modifications in determining the spatial shape of these proteins are more important in protein production in eukaryotic systems.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The Ethics Committee of Tarbiat Modares University ((IR.MODARES.REC.1400.040) approved the study.

Funding

This research was funded by school of medical sciences, Tarbiat Modares University (Grant number Med.3003).

Authors contributions

The authors confirm contribution to the paper as follows: study conception and design: Bamdad T and Farahmand B; data collection: F Hosseini; analysis and interpretation of results: All authors; All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declared that they have no conflict of interest associated with this study.



Acknowledgements

None.

مقاله پژوهشی

بیان و خالص سازی پروتئین RBD نو ترکیب ویروس SARS COV-2 در سیستم بیانی پروکاریوتی
به منظور ارزیابی آنتی بادی IgG موجود در سرم افراد بهبود یافته از بیماری کوید ۱۹فاطمه حسینی^۱، طراوت بامداد^۱، بهرخ فرهمند^۲، کاظم باعی^۳

۱. گروه ویروس شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲. گروه آنفلانزا و سایر بیماری های تنفسی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۳. گروه هیپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

| | |
|--|--|
| <p>Use your device to scan and read the article online</p>  | <p>Citation Hosseini F, Bamdad T, Farahmand B, Baesi K. [Expression and Purification of SARS CoV-2 RBD Protein in the Prokaryotic Expression System to Evaluate the IgG Antibody in the Serums of COVID-19 Recovered Cases (Persian)]. <i>Jundishapur Scientific Medical Journal</i>. 2023; 22(1):1-10. 10.61186/JSMJ.2022.341969.2843</p> <p> 10.61186/JSMJ.2022.341969.2843</p> |
|--|--|

چکیده



زمینه و هدف یکی از مهم ترین پروتئین های ویروس SARS -COV-2 پروتئین S است که از دو زیر واحد S1 و S2 تشکیل شده است. مهم ترین ناحیه در زیر واحد S1 ناحیه اتصال به رسپتور (RBD) است که نقش کلیدی در اتصال به رسپتورهای ACE را ایفا می کند. RBD یک ناحیه حفاظت شده در پروتئین S است که هدف سیستم ایمنی و تولید آنتی بادی علیه ویروس است. با توجه به اهمیت این ناحیه (در تولید آنتی بادی های خنثی کننده) که می تواند انتخاب مناسبی جهت توسعه واکسن و تولید کیت های تشخیص سرولوژی باشد، از این رو در این مطالعه، میزان واکنش آنتی بادی های موجود در سرم بیماران بهبود یافته از بیماری کوید ۱۹ با استفاده از پروتئین RBD نو ترکیب تولید شده در سیستم بیانی پروکاریوت به عنوان یک سیستم بیانی ارزان قیمت بررسی شد.

روش بررسی در این مطالعه سازه نو ترکیب PET22b-RBD به میزبان باکتری اشرشیاکلی (BL21) انتقال و سلولهای باکتری در محیط کشت داده شد. سپس بیان پروتئین با استفاده از ایزوپروپیل بتادی تیوگالاکتوزید (IPTG) القا شد. بیان پروتئین نو ترکیب RBD با استفاده از ژل اکریل آمید (SDS-PAGE) و وسترن بلات به تأیید نهایی رسید. در پایان پروتئین مورد نظر با استفاده از ستون نیکل استخراج و در یک سنجش الیزای غیر مستقیم استفاده شد. یافته ها در مقایسه با سرم افراد سالم (Cut off: 0.412) افزایش معنی داری در میزان جذب نوری ۳۰ نمونه سرمی به پروتئین RBD نو ترکیب مشاهده نشد.

نتیجه گیری پروتئین نو ترکیب RBD تولید شده در میزبان پروکاریوتی واکنش قابل توجهی به آنتی بادی های موجود در سرم بیماران بهبود یافته از خود نشان نمی دهد و نمی توان جهت اهداف تشخیصی از آن استفاده کرد.

کلیدواژه ها کوید ۱۹، سارس، کرونا ویروس ۲، ناحیه اتصال به رسپتور

تاریخ دریافت: ۲۲ اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۲۹ تیر ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۰۱ فروردین ۱۴۰۲

نویسنده مسئول:

طراوت بامداد؛ بهرخ فرهمند

نشانی: گروه ویروس شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛ گروه آنفلانزا و سایر بیماری های تنفسی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تلفن: ۲۱۶۶۹۵۳۳۱۱؛ ۲۱۸۲۸۴۵۲۵

رایانامه: b_farahmand@pasteur.ac.ir; Bamdad_t@modares.ac.ir

مقدمه

در اواخر سال ۲۰۱۹ به دنبال شیوع یک پنومونی شدید تنفسی در منطقه ووهان چین، همه توجه‌ها به این بیماری معطوف شد. مدت زمانی طول نکشید که این بیماری به نقاط زیادی از جهان منتقل و کشورهای بسیاری را درگیر کرد [۱-۳]. در مارس ۲۰۲۰ سازمان بهداشت جهانی یک کرونا ویروس جدید را به عنوان عامل این بیماری تنفسی اعلام کرد [۳، ۴]. کرونا ویروس دسته‌ای از ویروس‌های با ژنوم RNA هستند که طیف وسیعی از جانداران را آلوده می‌کنند. مهم‌ترین کرونا ویروس‌ها در ارتباط با عفونت‌های انسانی در جنس بتا کرونا ویروس‌ها قرار گرفته‌اند. SARS-COV-2 عامل بیماری کوید ۱۹ در کنار ویروس MERS و SARS-COV نیز در این جنس قرار گرفته‌اند [۵، ۶]. همانند سایر کرونا ویروس‌ها SARS-COV-2 نیز دارای یک ژنوم RNA تک‌رشته‌ای بزرگ است که پروتئین‌های مختلف ساختاری و غیرساختاری ویروس را کد می‌کند. یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های ساختاری ویروس پروتئین اسپایک (S) است که مهم‌ترین نقش را در شروع عفونت ویروسی ایفا می‌کند. این گلیکوپروتئین به صورت زوائد مشخصی در پوشش لیپیدی ویروس قرار گرفته و با اتصال به گیرنده‌های ACE سطح سلول‌های میزبان موجب ورود ویروس به سلول و آغاز عفونت می‌شود. از نظر ساختاری، گلیکو پروتئین S از ۱۲۷۳ اسید آمینه تشکیل شده است پروتئین S در مسیر تولید، جهت پردازش وارد دستگاه ترشحی میزبان شده و در حین عبور از شبکه اندوپلاسمی و دستگاه گلژی مولکول‌های قندی را دریافت می‌کند [۷]. حدود ۲۲ مولکول قندی به صورت N-glycosylation در ساختار پروتئین S دیده می‌شود که تأثیر قابل توجهی در شکل فضایی پروتئین و فرار ویروس از سیستم ایمنی دارد [۸]. پروتئین S از دو زیر واحد S1 و S2 تشکیل شده است که هر کدام از این زیر واحدها عملکردی مختص به خود داشته و در ورود ویروس به سلول حائز اهمیت هستند. ناحیه S1 متشکل از چند قسمت است که مهم‌ترین قسمت‌های آن در انتهای C-terminal قرار گرفته و مسئول اصلی اتصال به گیرنده سلولی است و ناحیه اتصال به رسپتور (receptor binding domain) نامیده می‌شود [۹]. دو جایگاه از سایت‌های N-glycosylation در ناحیه RBD واقع شده است. علاوه بر آن ناحیه RBD دارای دو جایگاه قندی به شکل O-glycosylation نیز هست که این مولکول‌های قندی تأثیرات مهمی در نحوه شکل‌گیری ساختار فضایی پروتئین و در دسترس بودن اپی‌توپ‌های ضروری پروتئین دارد [۱۰]. مطالعات نشان می‌دهد ناحیه RBD مهم‌ترین نقش را در اتصال به گیرنده‌های ACE دارد. حدود ۱۷ اسید آمینه از این ناحیه در ارتباط مستقیم با ۲۰ آمینواسید از مولکول‌های ACE هستند که این تعامل، نقش مهمی در اتصال ویروس به گیرنده مذکور دارد؛ به این ترتیب می‌تواند هدف سیستم ایمنی به‌ویژه بازوی ایمنی هومورال و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده

جهت جلوگیری از ورود ویروس به سلول باشد [۱۱]. با توجه به اهمیت این ناحیه در شروع عفونت این بخش از ژنوم می‌تواند باعث توسعه واکنش‌های ساب یونیت، کیت‌های تشخیص آزمایشگاهی و همچنین یکی از اهداف مهم طراحی دارو باشد. با توجه به اینکه کار کردن با سیستم‌های بیانی پروکاریوتی کم‌هزینه‌تر و آسان‌تر است و تولید پروتئین با سرعت بالاتر و بازدهی بیشتری انجام می‌شود، هدف این مطالعه، تولید پروتئین نوترکیب RBD ویروس SARS COV-2 در میزبان باکتری به منظور ارزیابی واکنش آنتی‌بادی‌های تولیدشده در سرم بیماران مبتلا به کوید ۱۹ است. همچنین تأثیر سیستم‌های تولید پروتئین بدون اعمال تغییرات پس از ترجمه در شناسایی آنتی‌بادی‌های اختصاصی S در این پژوهش بررسی شده است. به این امید که کارایی این پروتئین جهت استفاده در مطالعات بعدی نظیر واکنش‌های ساب‌یونیت و توسعه کیت‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد.

روش بررسی

در این تحقیق ناحیه RBD پروتئین S ویروس SARS COV-2 سوبه ووهان چین به عنوان ناحیه هدف انتخاب شد. ناحیه مورد نظر از بانک اطلاعاتی Gene از سایت NCBI استخراج شد و با استفاده از نرم‌افزار Gene script جهت بیان در میزبان پروکاریوتی کدون اپتیمایز شد توالی مورد نظر به صورت یک سازه کلون شده در وکتور PET22b از شرکت بیومتیک کشور کانادا تهیه شد.

جمع‌آوری نمونه‌های سرمی و شرط ورود به مطالعه

مطالعه حاضر با کد اخلاق (IR.MODARES.REC.1400.040) به انجام رسید. نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل ۳۰ بیمار مبتلا به کوید ۱۹ واریانت دلتا بود که بیماری آن‌ها توسط آزمایش Real time PCR مشخص شده بود. نمونه‌گیری از این بیماران چهار هفته پس از شروع علائم بالینی انجام شد. وجود آنتی‌بادی ضد پروتئین S در نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت تجاری به تأیید رسیده بود. به منظور تعیین Cut off آزمایش، از ۲۰ نمونه فرد سالم که مربوط به پیش از بروز پاندمی بود استفاده شد.

بیان سازه PET22b-RBD در میزبان باکتری

به منظور بیان سازه PET22b-RBD در میزبان پروکاریوتی نخست پلاسمید مورد نظر با استفاده از روش شیمیایی کلریدکلسیم به داخل باکتری اشرشیاکلی سوبه BL21 ترنسفورم شد، سپس کلنی‌های باکتری حاصل از ترنسفورم به محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تلقیح و در آنکوباتور ۳۷ درجه شیکردار نگه‌داری شد تا کدورت حاصل از رشد باکتری به OD حدود ۰/۴ - ۰/۶ در ۶۰۰ نانومتر برسد. در این مرحله القا کننده ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG) با غلظت‌های

جندی شاپور

سپس در بن ماری ۳۷ درجه ذوب شد. سوسپانسیون مذکور هفت مرتبه و در هر بار ۶۰ پالس با سیکل ۵/۰ و قدرت ۸۵ وات مورد سونیکاسیون قرار گرفت و در ادامه به مدت ده دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سانتیگراد رسوب حاصل از آن در چهار میلی لیتر بافر لیزکننده حاوی اوره هشت مولار حل شده و به ترتیب مرحله قبل سونیکاسیون انجام شد. محلول رویی حاصل از آن که حاوی پروتئین RBD بود، با استفاده از ژل اکریل آمید (SDS page) مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه مایع حاوی پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA خالص سازی شد؛ به این شکل که مایع حاوی پروتئین به ستون خالص سازی انتقال داده شده و در پی آن با استفاده از بافر شستشو مورد شستشو قرار گرفت. در پایان پروتئین موجود در ستون با استفاده از Elution buffer که حاوی ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول بود، از ستون خارج شد. مایعات خارج شده از ستون در همه مراحل خالص سازی جمع آوری شده و جهت بررسی در ژل ۱۰ درصد پلی اکریل آمید بارگذاری شد. در مرحله آخر پروتئین استخراج شده در مقابل بافر PBS با PH:7.4 دیالیز شد.

بهینه سازی آزمایش In house ELISA به منظور بررسی آنتی بادی در سرم بیماران بهبودیافته

برای راه اندازی یک آزمایش الیزای غیرمستقیم، چاهک های میکروپلیت های مخصوص الیزا (شرکت SLP کره جنوبی) به وسیله پروتئین RBD نوترکیب پوشیده شد؛ به این منظور ۱۰۰ نانوگرم از پروتئین مورد نظر با بافر پوشاننده (ELISA PBS, PH:7.2) ترکیب شده و به هریک از چاهک های پلیت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب حاصل اضافه شد. در ادامه پلیت الیزا به مدت ۱۶ ساعت در دمای چهار درجه نگهداری شد، سپس همه چاهک ها با استفاده از بافر شستشو دهنده (PBS-Tween20) 0.05% سه تا پنج مرتبه شستشو داده شد. جهت جلوگیری از ایجاد اتصال های غیراختصاصی فضاهای خالی باقی مانده کف چاهک ها با استفاده از بافر مسدود کننده (BSA3%) مسدود شد. پس از انجام مراحل شستشو ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰ سرم های بیمار به چاهک ها اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد.

در ادامه پس از سه تا پنج مرتبه شستشو آنتی بادی ثانویه (آنتی بادی کوئزگه شده به آنزیم) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ به چاهک ها اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. در مرحله آخر ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای رنگی تترامیتیل بنزدین (TMB) به چاهک ها اضافه شده و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جهت متوقف کردن واکنش ۵۰ میکرولیتر از بافر متوقف کننده (H₂SO₄, 0.4) به سوبسترای رنگی اضافه شده و نتایج حاصل در جذب نوری ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. جهت تعیین cut off، ۲۰ نمونه سرمی افراد سالم به مانند

۰/۱، ۰/۵ و ۱) به کشت حاصل از باکتری اضافه شد. به منظور بررسی بیان پروتئین در بازه زمانی یک تا چهار ساعت پس از القا میزان جذب نوری حاصل از رشد باکتری با استفاده از روش اسپکتوفوتومتری اندازه گیری و سپس محیط کشت باکتری در دور ۹۰۰۰ RPM به مدت سه دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد رسوب گیری شد.

بررسی بیان پلاسمید نوترکیب PET22b-RBD با استفاده از روش SDS PAGE

جهت بررسی اولیه میزان بیان پروتئین بهترین روش موجود بارگذاری رسوب های باکتری تهیه شده بر روی ژل اکریل آمید و الکتروفورز عمودی است؛ به این منظور تمامی رسوب های باکتری جمع آوری شده از غلظت های مختلف القاکننده در بازه های زمانی تعیین شده طبق دستورالعمل استاندارد با بافر نمونه (sample buffer) به غلظت 5x مخلوط شد. ترکیب حاصل، پس از آماده سازی نهایی بر روی ژل اکریل آمید ۱۰ درصد بارگذاری و در کنار شاخص وزن مولکولی استاندارد الکتروفورز شد. در پایان باندهای پروتئینی با استفاده از محلول رنگی کوماسی بلو طبق دستورالعمل استاندارد رنگ آمیزی و قابل رؤیت شد.

تأیید نهایی پروتئین بیان شده با استفاده از روش وسترن بلات

برای تأیید نهایی پروتئین بیان شده با روش وسترن بلات، پروتئین های تفکیک شده در ژل اکریل آمید ۱۰ درصد با استفاده دستگاه الکتروتانسفر (semidry) به غشا کاغذی نیتروسولوز انتقال داده شد. برای جلوگیری از ایجاد اتصال های غیراختصاصی غشا نیتروسولوزی به مدت ۱۶ ساعت در دمای چهار درجه در بافر مسدود کننده نگهداری شد. پس از دو مرحله شستشو با استفاده از بافر شستشو، آنتی بادی پلی کلونال anti-RBD Rabbit به عنوان آنتی بادی اولیه به رقت ۱/۱۰۰ به کاغذ نیتروسولوز اضافه به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از انجام مجدد مرحله شستشو لایه دوم آنتی بادی (goat-anti rabbit conjugate) با رقت ۱/۵۰۰۰۰ اضافه شده و بعد از ۶۰ دقیقه و شستشو کاغذ باندهای پروتئینی با سوبسترا رنگی TMB قابل رؤیت شد.

استخراج و خالص سازی پروتئین نوترکیب RBD

به منظور استخراج پروتئین از سلول های باکتری در مقیاس بالا، باکتری BL21 حاصل از کشت شبانه در ۲۵۰ میلی لیتر از محیط کشت LB تلقیح شد تا به کدورت مناسب برسد. سپس غلظت ۰/۵ میلی مولار IPTG جهت افزایش میزان بیان به محیط کشت اضافه شده و به مدت ۳/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس در دور ۹۰۰۰ به مدت سه دقیقه سانتیفریژ شده و رسوب گیری انجام شد. به رسوب حاصله ۱۰ میلی لیتر بافر لیزکننده اضافه و سوسپانسیون حاصل سه مرتبه در ازت مایع فریز و

کامل اعمال نمی‌شود، پیش‌بینی می‌شود پروتئین ناحیه RBD بیان شده در میزبان باکتری وزن مولکولی حدود ۲۷ تا ۳۰ کیلودالتون داشته باشد. برای بیان پروتئین RBD، با توجه به نتایج به دست آمده از بهینه‌سازی بیان پروتئین، همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، باند پروتئین مورد نظر در محدوده ۳۰ کیلودالتون شاخص وزن مولکولی نمایان شده و بهترین بیان پروتئین در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار IPTG و در ساعت‌های سه و چهار پس از القا است. به این ترتیب شرایط ذکر شده جهت بیان پروتئین در مقیاس بالا در نظر گرفته شد.

تأیید نهایی پروتئین با استفاده از وسترن بلات

نتایج به دست آمده از آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال ضد RBD (Rabbit- anti RBD) نمایانگر وجود باند حدود ۳۰ کیلو دالتون بوده و تأییدکننده اصالت پروتئین RBD است (شکل شماره ۲).

نمونه‌های افراد مبتلا، با روش الیزا غیرمستقیم مورد بررسی قرار گرفت و میانگین نتایج حاصل از آن‌ها با سه برابر انحراف معیار محاسبه شد (mean+3sd).

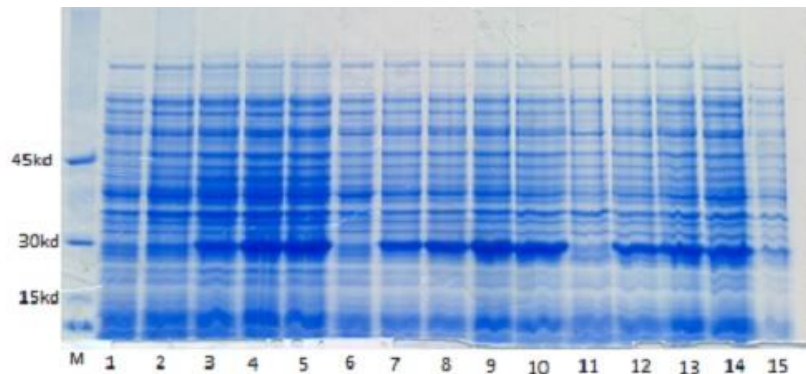
آنالیز آماری

داده‌های حاصل از واکنش الیزا با استفاده از نرم‌افزار Prism-GraphPad و آزمون T.test مورد آنالیز قرار گرفت.

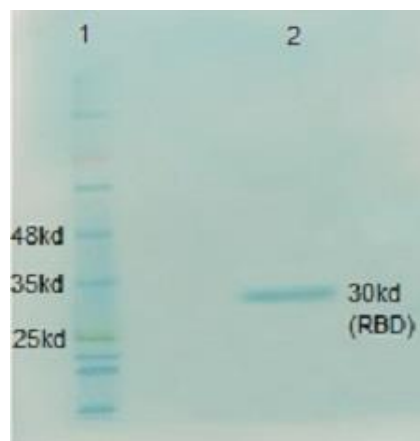
یافته‌ها

بیان پروتئین نوترکیب RBD در میزبان باکتری

ناحیه RBD از پروتئین S از ۲۲۳ رزیدو اسید آمینه تشکیل شده است که با توجه به اینکه با بیان در میزبان باکتری تغییرات پس از ترجمه به طور



شکل شماره ۱. نمایی از ژل اکریل امید جهت بررسی بیان پروتئین RBD پس از اضافه کردن IPTG با غلظت‌های متفاوت و در ساعات مختلف، چاهک‌های یک تا پنج مربوط به غلظت یک میلی‌مولار IPTG که به ترتیب قبل از القا و در ساعات یک تا چهار می‌باشد چاهک‌های شش تا ۱۰ مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌مولار IPTG و به ترتیب شماره قبل از القا و تا چهار ساعت بعد از القا است. چاهک‌های ۱۱ تا ۱۵ مربوط به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار IPTG به ترتیب قبل از القا تا چهار ساعت پس از القا است.



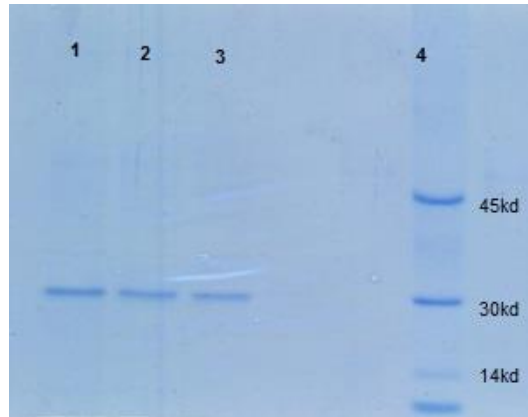
شکل شماره ۲. نمایی از آزمایش وسترن بلات بیان سازه PET22b-RBD. مارکر 1kd پروتئینی ۲. پروتئین نوترکیب RBD.

نتایج حاصل از الیزا

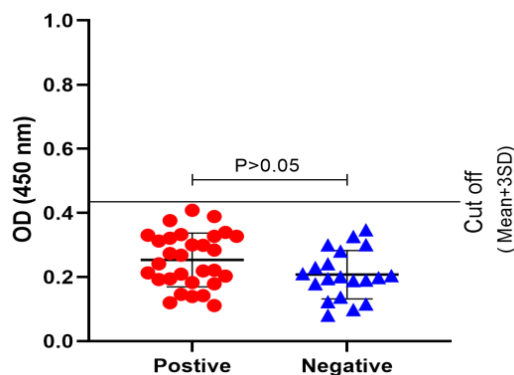
نتایج به دست آمده از ۳۰ نمونه سرمی بیماران بهبود یافته از بیماری کوید ۱۹ با استفاده از واکنش الیزا غیرمستقیم In house با پروتئین نوترکیب RBD نشان داد که در مقایسه با Cut off تعیین شده (۰/۴۱۸) افزایش قابل چشمگیری نداشته است (شکل شماره ۴).

استخراج و خالص سازی پروتئین نوترکیب

نتایج حاصل از بررسی پروتئین استخراج و خالص سازی شده از باکتری با استفاده از ژل اکریل امید نشان داد که پروتئین RBD با غلظت و درجه خلوص مناسبی از سایر پروتئین های بیان شده در باکتری جدا شده است. وجود تک باند موجود در ناحیه ۳۰ کیلودالتون شاخص وزن مولکولی در شکل شماره ۳ بیانگر صحت این موضوع است.



شکل شماره ۳. نتایج حاصل از خالص سازی پروتئین نوترکیب RBD بر روی ژل اکریل امید شماره های ۱، ۲، ۳ نمونه های پروتئین RBD خالص سازی شده است. شماره ۴ مارکر پروتئینی را نشان می دهد.



شکل شماره ۴. نمایی از نتایج به دست آمده از آزمایش الیزا است. همان طور که مشخص است OD نمونه های سرمی بیماران مثبت (نقاط قرمز) در مقایسه با نمونه های سالم افزایش قابل توجهی ندارد.

ویروس بوده و از طرفی با توجه به تعاملی که با گیرنده های سطح سلولی دارد یکی از مهم ترین هدف های سیستم ایمنی هومورال و آنتی بادی های خنثی کننده است [۱۳]. در مطالعه حاضر پروتئین نوترکیب RBD در میزبان باکتری بیان شده و پس از تأیید با استفاده از روش وسترن بلات استخراج و تلخیص شد. غلظت به دست آمده پروتئین 0.3 mg/ml تعیین شد. در ادامه یک واکنش الیزا غیرمستقیم با استفاده از پروتئین نوترکیب

بحث

همان طور که گفته شد گلیکوپروتئین S یک فیوژن پروتئین است که مسئول ورود ویروس به سلول های میزبان از طریق اتصال به گیرنده های ACE سطح سلولی است [۱۲]. ناحیه RBD در گلیکوپروتئین S یک ناحیه استراتژی و مهم است. این ناحیه یکی از حفاظت شده ترین ناحیه های ژنوم

توجه به موتاسیون‌هایی که در ناحیه RBD در این واریانت اتفاق افتاده و تغییرات احتمالی که در شکل فضایی پروتئین ایجاد و موجب در معرض قرار گرفتن اپی‌توپ‌های جدید در پروتئین شده است پاسخ آنتی‌بادی ایجاد شده در این بیماران متفاوت باشد.

نتیجه گیری

با همه این تفاسیر، عدم واکنش مؤثر پروتئین‌های تولید شده در میزبان پروکاریوتی با سرم بیماران بهبود یافته از عفونت طبیعی با ویروس، به معنای عدم آنتی ژنیسیته و غیرعملکردی بودن این پروتئین‌ها نیست؛ بلکه ارزیابی ویژگی‌های این پروتئین، نیاز به انجام بررسی‌های بیشتری در *In vivo* دارد؛ چه بسا این پروتئین‌ها با توجه به بازدهی بالای سیستم‌های پروکاریوتی بتوانند همچنان به‌عنوان کاندید مناسبی برای تولید واکسن‌های ساب یونیت در نظر گرفته شوند. با این حال به نظر می‌رسد جهت توسعه کیت‌های آزمایشگاهی بر مبنای گلیکوپروتئین‌ها با توجه به اهمیت تغییرات پس از ترجمه در تعیین شکل فضایی این پروتئین‌ها، تولید پروتئین در سیستم‌های یوکاریوتی ارجحیت بالاتری داشته باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس با کد اخلاق IR.MODARES.REC.1400.040 مورد تصویب قرار گرفته است و کلیه اصول اخلاقی در انجام آن رعایت شده است.

حامی مالی

پژوهش حاضر با استفاده از حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (شماره گرنت Med.3003) اجرا شده است.

مشارکت نویسندگان

طراحی و نظارت بامداد ط و فرهنگند ب؛ جمع آوری داده‌ها: حسینی ف؛ آنالیز و تحلیل نتایج: کلیه مولفین؛ کلیه نویسندگان متن نهایی را خوانده و مورد تایید قرار داده اند.

تعارض منافع

هیچگونه اشتراک یا تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

راه‌اندازی شده و آنتی‌بادی‌های موجود در سرم بیماران مبتلا به کوید ۱۹ مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، ابتدا پلیت‌های مخصوص الیزا با پروتئین نوترکیب تولید شده پوشانده شده، سپس سرم‌های بیماران بهبودیافته از بیماری کوید ۱۹ با رقت ۱/۱۰۰ به چاهک‌های حاوی پروتئین اضافه شد. در پایان میزان واکنش آنتی‌بادی‌های موجود در سرم با استفاده از سوبسترا رنگی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که این پروتئین واکنش مؤثری نسبت به آنتی‌بادی‌های موجود در سرم بیماران مبتلا به کوید نشان نمی‌دهد. این نتیجه در راستای نتایج حاصل از مطالعه‌ای است که در سال ۲۰۲۱ بر روی پروتئین‌های نوکلئوپروتئین (N) و قطعه‌ای از پروتئین S (Spike protein fragment) انجام گرفت. در مطالعه مذکور قطعه S fragment (S2 subunit) تولید شده در میزبان باکتری برخلاف پروتئین N واکنش مناسبی به سرم افراد مبتلا به کوید از خود نشان نداد [۱۴]. با توجه به وجود چهار جایگاه قندی در ناحیه RBD و اهمیت این جایگاه‌ها در شکل‌گیری اپی‌توپ‌های حیاتی در ساختار پروتئین، به نظر می‌رسد عدم واکنش مؤثر سرم افراد بهبودیافته از بیماری کوید ۱۹ به پروتئین‌های تولید شده در میزبان باکتری ناشی از عدم اعمال تغییرات پس از ترجمه در میزبان باکتری باشد. علاوه بر آن در عفونت طبیعی با ویروس، لایه‌هایی از مولکول‌های گلیکان سطح گلیکوپروتئین S را فراگرفته است، که ممکن است موجب مخفی ماندن اپی‌توپ‌های ضروری در نواحی مختلف پروتئین S از جمله ناحیه RBD گردد به این ترتیب سیستم ایمنی بدن در مواجهه با عفونت طبیعی ویروس علیه این سپرهای گلیکانی آنتی‌بادی تولید کرده که عدم شناسایی آنتی‌بادی‌های تولید شده در عفونت طبیعی با ویروس توسط پروتئین نوترکیب تولید شده در میزبان باکتری می‌تواند ناشی از این مسئله باشد. مطالعه دیگری که Carolina De Marco Verissimo و همکارانش انجام دادند، نشان داد که پروتئین RBD نوترکیب تولید شده در باکتری توانایی شناسایی آنتی‌بادی‌های موجود در افرادی که واکسن شرکت فایزر را در دو دوز دریافت کرده بودند، داشت [۱۵] که با توجه به تفاوتی که در نحوه تحریک سیستم ایمنی توسط عفونت طبیعی و واکسن وجود دارد، نتایج به دست آمده نمی‌تواند منافاتی با نتایج حاصل از مطالعه کنونی داشته باشد. در مطالعه‌ای که در اوایل سال ۲۰۲۲ به چاپ رسید Luliia A. Merkuleva و همکارانش مدعی شدند که پروتئین نوترکیب RBD که در میزبان پروکاریوتی تولید شده بود قابلیت شناسایی آنتی‌بادی‌های موجود در سرم بیماران بهبود یافته را داشته است [۱۳]. با توجه به اینکه جمعیت مطالعه در این تحقیق ۱۰ بیمار بهبود یافته بوده به نظر می‌رسد استفاده از این جمعیت کوچک، تفسیر نتایج را با مشکل مواجه کرده است. از طرفی نوع سرم‌های استفاده شده در مطالعه مذکور مشخص نشده؛ چه بسا در مقایسه با مطالعه کنونی که از سرم بیماران مبتلا به واریانت دلتا استفاده شده، با

References

- [1] Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*. 2020; 382(8):727-33. [DOI:10.1056/NEJMoa2001017] [PMID] [PMCID]
- [2] Parasher A. COVID-19: Current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. *Postgraduate medical journal*. 2021; 97(1147):312-20. [DOI:10.1136/postgradmedj-2020-138577] [PMID] [PMCID]
- [3] Alimolaie A. [A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19)(Persian)]. *Iranian Journal of Biology*. 2020; 3(6):152-7. [Link]
- [4] Fahmi I. World Health Organization coronavirus disease 2019 (Covid-19) situation report. *DroneEmprit*. 2019. [Link]
- [5] Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020; 581(7807):215-20. [DOI:10.1038/s41586-020-2180-5] [PMID]
- [6] Kakodkar P, Kaka N, Baig M. A comprehensive literature review on the clinical presentation, and management of the pandemic coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Cureus*. 2020; 12(4):e7560. [DOI:10.7759/cureus.7560] [PMID] [PMCID]
- [7] Fung TS, Liu DX. Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function. *Future virology*. 2018; 13(6):430-05. [DOI:10.2217/fvl-2018-0008] [PMID]
- [8] Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020; 369(6501):330-3. [DOI:10.1126/science.abb9983] [PMID] [PMCID]
- [9] Chen W, Hui Z, Ren X, Luo Y, Shu J, Yu H, Li Z. The N-glycosylation sites and Glycan-binding ability of S-protein in SARS-CoV-2 Coronavirus. *bioRxiv*. 2020. [DOI:10.1101/2020.12.01.406025]
- [10] Shin Y-J, König-Beihammer J, Vavra U, Schwestka J, Kienzl NF, Klausberger M, Laurent E, Grünwald-Gruber C, Vierlinger K, Hofner M, Margolin E. N-glycosylation of the SARS-CoV-2 receptor binding domain is important for functional expression in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2021; 12: 689104. [DOI:10.3389/fpls.2021.689104] [PMID]
- [11] Almehti AM, Khoder G, Alchakee AS, Alsayyid AT, Sarg NH, Soliman SS. SARS-CoV-2 spike protein: Pathogenesis, vaccines, and potential therapies. *Infection*. 2021; 49(5):855-76. [DOI:10.1007/s15010-021-01677-8] [PMID] [PMCID]
- [12] Prahlad J, Struble LR, Lutz WE, Wallin SA, Khurana S, Schnaubelt A, et al. Bacterial expression and purification of functional recombinant SARS-CoV-2 spike receptor binding domain. *bioRxiv*. 2021: 2021-02. [DOI:10.1101/2021.02.03.429601]
- [13] Merkuleva IA, Shcherbakov DN, Borgoyakova MB, Shanshin DV, Rudometov AP, Karpenko LI, Belenkaya SV, Isaeva AA, Nesmeyanova VS, Kazachinskaia EI, Volosnikova EA. Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems. *Vaccines*. 2022; 10(1):96. [DOI:10.3390/vaccines10010096] [PMID] [PMCID]
- [14] Verissimo CDM, O'brien C, Corrales JL, Dorey A, Cwiklinski K, Lalor R, Doyle JM, Field S, Masterson C, Martinez ER, Hughes G. Improved diagnosis of SARS-CoV-2 by using nucleoprotein and spike protein fragment 2 in quantitative dual ELISA tests. *Epidemiology & Infection*. 2021; 149: e140. [DOI:10.1017/S0950268821001308] [PMID] [PMCID]
- [15] Verissimo CDM, Lopez-Corrales J, Dorey AL, Cwiklinski K, Lalor R, Calvani NED, Jewhurst HL, Flaus A, Doyle S, Dalton JP. Production of a functionally active recombinant SARS-CoV-2 (COVID-19) 3C-Like protease and a soluble inactive 3C-like protease-RBD chimeric in a prokaryotic expression system. *Epidemiology & Infection*. 2022; 150:e128. [DOI:10.1017/S0950268822001078] [PMID] [PMCID]