

## کلونینگ و بیان دومین III پروتئین پوششی ویروس دنگی نوع ۲ در باکتری E. coli

حسین فهیمی<sup>۱</sup>، مجید صادقی زاده<sup>۲</sup>، مهشید محمدی پور<sup>۱</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** هدف این مطالعه بیان آنتی ژن نو ترکیبی از پروتئین پوششی ویروس دنگی، به منظور دستیابی به بیان بیشتر و به شکل محلول بود. بنابراین، قابلیت بیان دومین III این پروتئین در میزبان باکتریایی بررسی گردید.

**روش‌ها:** هم‌ریدی توالی‌های مختلف دومین III با استفاده از نرم‌افزار Megalign انجام شد. پیش‌بینی ساختار پروتئین با نرم‌افزار Modeller و بهینه‌سازی توالی ژن برای بیان در E. coli با نرم‌افزار Optimizer صورت گرفت. سنتز و کلونینگ ژن در حامل pET21a و بهینه‌سازی بیان پروتئین نو ترکیب در E. coli انجام شد. برای تخلیص پروتئین از ستون‌های کروماتوگرافی Ni-NTA استفاده گردید. کارایی بیان پروتئین با روش‌های الکتروفورز و لکه‌گذاری وسترن بررسی شد.

**یافته‌ها:** یک توالی مورد توافق برای دومین III پروتئین پوششی سروتیپ ۲ ویروس دنگی، ایجاد شد. ویژگی‌های ساختاری پروتئین هدف با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی ارزیابی شد. با هدف دستیابی به بیان بالا، توالی ژن از لحاظ الگوی به کارگیری کدون و درصد GC بهینه‌سازی گردید. توالی ژن هدف با استفاده از روش‌های توالی‌یابی و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت. به منظور ایجاد پیوند دی‌سولفیدی در ساختار پروتئین، از میزبان بیانی Origami (DE3) استفاده شد. در نهایت بهینه‌سازی شرایط بیان پروتئین هدف انجام شد و غلظت مناسبی از پروتئین نو ترکیب به صورت محلول به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که بهینه‌سازی توالی دومین III منجر به تولید محصول پروتئینی با غلظت بالا (۲۰ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت) گردید. این سیستم بیانی می‌تواند جهت تولید دومین III پروتئین پوششی ویروس دنگی استفاده شود.

**واژگان کلیدی:** ویروس دنگی، نو ترکیب، پروتئین پوششی

**ارجاع:** فهیمی حسین، صادقی‌زاده مجید، محمدی پور مهشید. کلونینگ و بیان دومین III پروتئین پوششی ویروس دنگی نوع ۲ در باکتری E. coli. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۴): ۵۴۴-۵۵۷

## مقدمه

ویروس دنگی (Dengue virus) دارای چهار سروتیپ است که هر چهار نوع قادر به ایجاد عفونت دنگی می‌باشند. این ویروس متعلق به خانواده‌ی فلاوی ویریده (Flaviviridae) است که با واسطه‌ی پشه‌ی آئدس اجیپتی (Aedes aegypti) بین

انسان‌های آلوده و سالم منتقل می‌شود. ویروس دنگی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شیوع دارد و امروزه به عنوان یک مشکل عمده در بهداشت جهانی مطرح شده است. نواحی نیمه گرمسیری و معتدل، برای ورود و شیوع این ویروس در فصول تابستان مستعد هستند. با وجود تلاش‌های گسترده در جهت

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

نویسنده‌ی مسؤول: مجید صادقی‌زاده

Email: sadeghma@modares.ac.ir

طراحی و ساخت واکسن بر علیه ویروس دنگی، هنوز دارو یا واکسن تأییدشده‌ای بر علیه آن ساخته نشده است (۱). حدود ۲/۵ میلیارد نفر در بیش از ۱۰۰ کشور جهان در معرض عفونت ویروس دنگی قرار دارند و سالانه میلیون‌ها مورد عفونت دنگی از سراسر جهان گزارش می‌شود. وجود چهار سروتیپ بیماری‌زا در عفونت دنگی ایجاد واکسن مؤثر را بر علیه آن به چالش کشیده است. آزمایشگاه‌های متعددی تلاش‌های گسترده‌ای را به منظور طراحی و ساخت واکسن بر علیه این بیماری انجام می‌دهند. راهکارهای مختلفی برای ساخت واکسن بر علیه ویروس دنگی وجود دارد (۲). از جمله آن‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ایجاد واکسن‌های حاوی ویروس‌های تخفیف حدت یافته (۳)، ویروس‌های تضعیف‌شده و غیر فعال (۴-۶)، حامل‌های ویروسی حاوی ژن‌های آنتی‌ژن‌های ویروس دنگی (۷-۹)، پلاسמיד کدکننده‌ی آنتی‌ژن (۱۰-۱۱) و پروتئین‌های ویروسی، که در سیستم‌های بیانی به صورت نوترکیب بیان می‌شوند (۱۲-۱۸).

اغلب راهکارهای مبتنی بر DNA نوترکیب، بر استفاده از پروتئین پوششی E (Envelope protein E) ویروس متمرکز شده‌اند. شواهد متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد پروتئین E می‌تواند به عنوان یک کاندیدای واکسن زیر واحدی عمل کند. این پروتئین ۵۳ کیلودالتونی دارای حدود ۵۰۰ ریشه‌ی آمینواسیدی است و مهم‌ترین جزء پوشش ویروس است که در القای ایمنی محافظتی نقش اصلی را ایفا می‌کند (۱۹-۲۱). همچنین پروتئین E دارای چند عملکرد مهم از جمله شناسایی و اتصال به گیرنده‌های سطح سلول میزبان می‌باشد (۲۲-۲۳). به همین دلیل برای

بیان پروتئین E نوترکیب با هدف دستیابی به یک واکسن زیر واحدی بر علیه ویروس دنگی، تلاش‌های گسترده‌ای در حال انجام است. اغلب تحقیقات انجام شده به منظور تولید پروتئین E نوترکیب نشان می‌دهد که بازده تولید این پروتئین در میزبان‌های مختلف به نسبت پایین است و در اغلب موارد نیز با مشکلاتی مانند ایجاد اجسام اینکلوزن (Inclusion body) و یا هضم پروتئولیتیکی همراه است (۲۴، ۱۷، ۱۳). به دلیل وجود مشکلات متعدد در بیان پروتئین پوششی، گرایش به استفاده از یکی از دومین‌های اصلی این پروتئین، به جای پروتئین کامل وجود دارد. پروتئین E از سه دومین I، II و III تشکیل شده است. بسیاری از خصوصیات اصلی این پروتئین مربوط به دومین III (E domain III یا EDIII) می‌باشد. این دومین از لحاظ ساخت واکسن دارای خصوصیتی است که آن را به عنوان دومین هدف در طراحی واکسن مطلوب می‌کند. از خصوصیات EDIII می‌توان به وجود اپیتوپ‌های فضایی ویژه‌ی سروتیپ (۲۵، ۲۰) و نیز جایگاه شناسایی گیرنده‌های سطح سلول میزبان در این پروتئین اشاره کرد (۲۳). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پروتئین‌های نوترکیب حاوی دومین III، ایمنی‌زا هستند و قادر به القای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده‌ی ویروس در حیوانات آزمایشگاهی می‌باشند (۲۶، ۱۴). همچنین شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد EDIII نوترکیب بیان‌شده در *E. coli*، ممکن است با رقابت جهت اتصال به گیرنده‌های سطحی سلول میزبان، از عفونت سلول‌های کشت شده توسط ویروس دنگی جلوگیری کند (۲۷-۲۸).

در این مطالعه ما بر بیان و تخلیص دومین III

پروتئین E ویروس دنگی نوع ۲ متمرکز شدیم. دومین III از حدود ۱۰۰ اسید آمینه (اسیدهای آمینه ی ۳۰۰ تا ۴۰۰) در انتهای کربوکسیل پروتئین E تشکیل شده است و پایداری آن به شکل گیری یک پل دی سولفیدی بین دو ریشه ی سیستمی بسیار حفظ شده، وابسته است (۲۹-۳۰). ایجاد پیوند دی سولفیدی برای بروز اپیتوپ های فضایی اصلی در این دومین الزامی است (۳۱). به همین دلیل در این مطالعه از سویه ی بیانی اوریگامی (Origami (DE3)) جهت بیان EDIII سروتیپ ۲ ویروس دنگی استفاده گردید.

ایجاد و بهینه سازی توالی اسید آمینه ها و توالی ژن کدکننده ی دومین III: برای انجام هم ردیفی چندگانه و به دست آوردن توالی مورد توافق، از نرم افزار Megalign با روش Clustalw استفاده گردید. به منظور اطمینان از ماهیت توالی حاصل شده آنالیز BlastP انجام شد. برای پیش بینی ساختار پروتئین هدف از روش Homology modeling و نرم افزار پیش بینی کننده ی Modeller استفاده شد. مدل های ساخته شده با استفاده از نرم افزارهای Pymol و Swiss-Pdb Viewer مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بهینه سازی توالی ژن کدکننده ی پروتئین از نرم افزار Optimizer استفاده گردید.

تهیه ی توالی ژنی و هم سانه سازی (Cloning) در حامل: توالی ژنی حاصل در حامل بیانی pET21a و در جایگاه های XhoI و NdeI هم سانه سازی گردید، به نحوی که تحت کنترل پیشبر فاژ T7 قابل القا با IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) قرار گیرد. به منظور تسهیل در شناسایی و تخلیص آنتی ژن نو ترکیب، هم سانه سازی ژن در وکتور بیانی به نحوی صورت گرفت که یک توالی برجسب پلی هیستیدینی در انتهای کربوکسیلی پروتئین وجود

پروتئین E ویروس دنگی نوع ۲ متمرکز شدیم. دومین III از حدود ۱۰۰ اسید آمینه (اسیدهای آمینه ی ۳۰۰ تا ۴۰۰) در انتهای کربوکسیل پروتئین E تشکیل شده است و پایداری آن به شکل گیری یک پل دی سولفیدی بین دو ریشه ی سیستمی بسیار حفظ شده، وابسته است (۲۹-۳۰). ایجاد پیوند دی سولفیدی برای بروز اپیتوپ های فضایی اصلی در این دومین الزامی است (۳۱). به همین دلیل در این مطالعه از سویه ی بیانی اوریگامی (Origami (DE3)) جهت بیان EDIII سروتیپ ۲ ویروس دنگی استفاده گردید.

### روش ها

باکتری اشرشیا کلی (Escherichia coli یا E. coli) سویه ی DH5α برای اهداف کلون سازی و تکثیر پلاسمید سویه ی اوریگامی به عنوان میزبان بیانی و پلاسمید pET21a به عنوان حامل بیان، محصول شرکت نواژن Novagen استفاده شد. توالی ژن کدکننده ی دومین III توسط مؤسسه ی بیوتکنولوژی مولکولی Shingene چین ساخته شد. محیط کشت LB (Luria-bertani) در کلیه ی مراحل جهت کشت باکتری استفاده شد. در مواردی که نیاز به آنتی بیوتیک بود، آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، تتراسایکلین و کانامایسین پس از سترون کردن با فیلترهای ۰/۲ میکرون ساخت شرکت Millipore، به محیط اضافه گردیدند. آنتی بادی منوکلونال موشی (Mouse monoclonal antibody) شناسایی کننده ی برجسب پلی هیستیدینی (به شماره ی ab5000 محصول شرکت abCam)، آنتی بادی منوکلونال موشی اختصاصی دومین III پروتئین پوششی ویروس تب دانگ (به شماره ی MAB4043 محصول شرکت

۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت یک ساعت ایجاد شد. به منظور تأیید قطعات مورد انتظار در اثر هضم آنزیمی پلاسمید، مخلوط واکنش در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. برای بررسی اندازه ی قطعات از نشانگر وزن مولکولی (Ikilo base ladder) محصول شرکت Fermentase استفاده شد.

بیان آنتی ژن های نو ترکیب: پلاسمید بیانی ساخته شده به درون سویه ی اوربگامی منتقل شد. این سویه دارای ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و کانامایسین است که طبق دستور سیستم PET (محصول شرکت Novagen)، باکتری در محیط کشت حاوی این آنتی بیوتیک ها با غلظت های نهایی ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر و ۱۵ میکروگرم در میلی لیتر کشت داده شد. برای انتخاب باکتری های ترانسفرم شده از محیط کشت حاوی ۳ نوع آنتی بیوتیک آمپی سیلین، کانامایسین و تتراسایکلین استفاده شد. پس از ایجاد کلونی، چندین کلونی که در آزمایش PCR (Polymerase chain reaction) مثبت بودند، در لوله های آزمایش با حجم ۵ میلی لیتر و آنتی بیوتیک های مربوط کشت داده شدند. شرایط کشت در شیکر انکوباتور (Shaker-incubator) با دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه بود. پس از این که دانسیته ی نوری رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ رسید، عمل القا توسط IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار انجام شد. پس از گذشت ۲ ساعت باکتری های به دست آمده از طریق سانتریفیوژ جمع آوری شدند و در دمای ۷۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند. به

داشته باشد. در مرحله ی بعد با انجام هضم آنزیمی توسط آنزیم های محدودکننده و طبق روش استاندارد شرکت Fermentase، درستی هم سانه سازی در جایگاه های XhoI و NdeI مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت، توالی ژن هم سانه سازی شده با روش توالی یابی تأیید شد.

آماده سازی باکتری E. coli و ترانسفورماسیون حامل پلاسمیدی: این مرحله بر اساس روش استاندارد انجام شد (۳۲). به منظور انتخاب باکتری های حاوی پلاسمید، تعلیق باکتریایی حاصل بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی بیوتیک کشت داده شد. کلنی های حاصل، برای بررسی حضور پلاسمید حاوی قطعه ی مورد نظر، با روش هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج پلاسمید: یک کلونی از باکتری E. coli حاوی پلاسمید در ۱۰ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کشت شبانه داده شد. پلاسمید pET21a حاوی ژن عامل مقاومت به آمپی سیلین می باشد، بنابراین به محیط مذکور آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اضافه گردید. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج شرکت Bioneer به روش Miniprep انجام شد. سپس نمونه ی پلاسمید در دمای ۲۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شد.

هضم آنزیمی پلاسمید و الکتروفورز DNA: با توجه به این که هم سانه سازی در جایگاه های NdeI و XhoI انجام شد، جهت تأیید کار از روش هضم آنزیمی حامل با همان آنزیم های محدودکننده استفاده شد. شرایط هضم طبق دستور کاتالوگ آنزیم ها (محصول شرکت Fermentase) و در دمای

محلول آنتی بادی اولیه (با غلظت ۱ به ۱۰۰۰ در PBS) همراه با تکان دادن آرام در دمای محیط قرار گرفت. پس از سه بار شستشو با محلول PBS حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰، غشا به مدت دو ساعت در محلول آنتی بادی ثانویه (کونزوگه با آنزیم پراکسیداز با غلظت ۱ به ۲۰۰۰ در PBS) تحت شرایط مرحله ی قبل قرار گرفت. پس از شستشو و به منظور ظهور باند مورد نظر، غشای نیتروسولوزی در محلول سوبسترا (شامل ۰/۵ میلی گرم دی آمینوبنزیدین یا Diaminobenzidine یا DAB) محصول سیگما و آب اکسیژنه ۰/۱ درصد در PBS) قرار گرفت.

#### یافته‌ها

ایجاد توالی مورد توافق برای دومین III پروتئین E ویروس دنگی نوع ۲ و بررسی نرم افزاری آن: در این مرحله توالی پروتئین E مربوط به سروتیپ ۲ از بانک ژن NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مورد جستجو قرار گرفت و تعداد ۵۳ توالی انتخاب شد. در انتخاب توالی ها سعی شد تا حد امکان بالاترین تنوع لحاظ شود. به این ترتیب که توالی هایی از مناطق جغرافیایی مختلف انتخاب شدند. توالی اسید آمینه ای مربوط به دومین III (L=اسید آمینه های ۳۰۰ تا ۴۰۰) از توالی کامل پروتئین E جدا گردید. پس از انجام هم ردیفی چندگانه در نهایت یک توالی مورد توافق برای دومین III سروتیپ ۲ تعیین گردید و تحت عنوان EDIII2 نامیده شد. حفظ شدگی ۱۰۰ درصد دو ریشه ی سیستمین در موقعیت ۸ و ۳۹ دیده می شود (شکل ۱).

برای پیش بینی ساختار سوم از روش Homology modeling استفاده شد. مدل های

منظور بررسی بیان پروتئین هدف از روش استاندارد الکتروفورز پروتئین ها در ژل پلی آکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات SDS-PAGE (Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) استفاده شد (۳۳). در این مرحله، یک میلی لیتر از تعلیق باکتری بیانی با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب باکتریایی حاصل شده ۵۰ میکرولیتر بافر نمونه ی الکتروفورز اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد و پس از ۱۰ ثانیه ورتکس، در ژل SDS-PAGE بررسی گردید. به طور هم زمان کشت های القاننده نیز به عنوان شاهد منفی بررسی شدند و بالاخره کلونی هایی که بیشترین بیان را نشان می دادند، انتخاب شدند.

تخلیص پروتئین EDIII2 و آزمایش لکه گذاری وسترن: با توجه به وجود توالی برچسب پلی هیستیدینی در انتهای کربوکسیلی پروتئین هدف، از کیت حاوی ستون های Ni-NTA جهت تخلیص پروتئین طبق دستور کاتالوگ کیت، استفاده گردید. غلظت پروتئین تخلیص شده در محلول های حاصل، به روش Bradford تعیین شد (۳۴). آزمون لکه گذاری وسترن طبق روش استاندارد شرکت تولیدکننده ی آنتی بادی انجام شد. به طور خلاصه، پس از انجام الکتروفورز عمل انتقال پروتئین به غشای نیتروسولوزی با روش نیمه خشک انجام شد. غشا به مدت یک شب در محلول مسدودسازی (شامل پنج درصد شیر خشک بدون چربی در بافر PBS (Phosphate buffered saline) در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد قرار گرفت. پس از سه بار شستشو با محلول PBS، غشا به مدت دو ساعت در

**EDIII2:**

KGMSYSMCTGKFKVVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPC<sup>R</sup>KIPFEIM  
DLEKRHVLGRLITVNP<sup>R</sup>IVTEK<sup>R</sup>DS<sup>R</sup>VNIEAEP<sup>R</sup>PF<sup>R</sup>GDSY<sup>R</sup>IIIG<sup>R</sup>VE<sup>R</sup>PG<sup>R</sup>QLK  
LNWF<sup>R</sup>KKG<sup>R</sup>SS

شکل ۱. توالی اسید آمینه‌ی مورد توافق برای پروتئین EDIII2 که پس از انجام هم‌ردیفی چندگانه در مورد توالی‌های متعدد به دست آمد. دو ریشه‌ی سیستمین حفظ‌شده در موقعیت‌های ۸ و ۳۹ با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

می‌باشد. هر چه کدون‌های استفاده شده به الگوی ترجیح کدونی میزبان نزدیکتر باشد میزان بیان پروتئین نوترکیب بیشتر خواهد شد. برای بهینه‌سازی کدون از شاخصی به نام CAI (codon adaptation index) استفاده می‌شود. علاوه بر این درصد GC به کار رفته در ژن هدف نیز بر میزان بیان پروتئین تأثیر دارد. حالت بهینه این است که درصد GC ژن هدف به درصد GC ژنوم میزبان نزدیک‌تر باشد. به منظور بهینه‌سازی این شاخص‌ها از نرم‌افزار Optimizer استفاده گردید (۳۶). شاخص‌های CAI و درصد GC در مورد ژن کدکننده‌ی پروتئین EDIII2 به ترتیب ۱ و ۵۰/۴ درصد بهینه شد.

ساخت و هم‌سانه‌سازی ژن کدکننده‌ی پروتئین هدف: ساخت توالی ژن EDIII2 در حامل بیانی pET21a انجام شد و پلاسمید حاصل تحت عنوان pET-EDIII2 نام‌گذاری شد. طرح شماتیک این پلاسمید در شکل ۳ نشان داده شده است.

حامل ساخته شده از دو نظر بررسی شد. ابتدا صحت توالی ژن کلون شده، مورد تأیید قرار گرفت (توالی ژن نشان داده نشده است) و سپس با انجام هضم آنزیمی صحت هم‌سانه‌سازی در جایگاه‌های XhoI و NdeI تأیید شد (شکل ۴).

ساخته‌شده با استفاده از نرم‌افزار مورد بررسی قرار گرفتند. ایجاد چندین صفحه‌ی بتا (Beta-sheet) که ویژگی مشخص دومین III پروتئین E است (۳۵) در اغلب این پیش‌بینی‌ها مورد تأیید قرار گرفت. نتایج این پیش‌بینی‌ها در توافق با ساختار دوم و سوم دومین III پروتئین پوششی ویروس دنگی بود (شکل ۲).

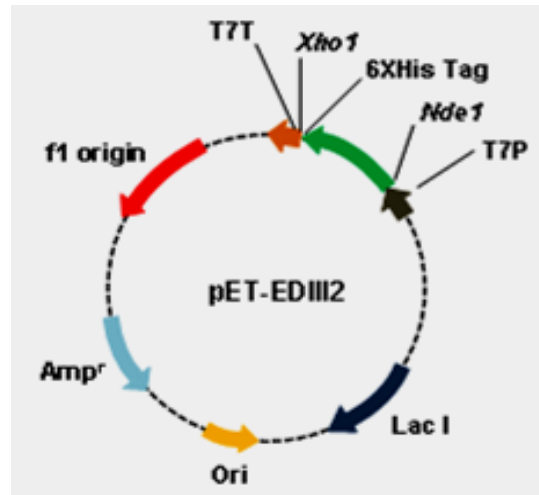


شکل ۲. نتایج حاصل از پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین EDIII2 که توسط نرم‌افزار Pymol و Spdbv بررسی شد.

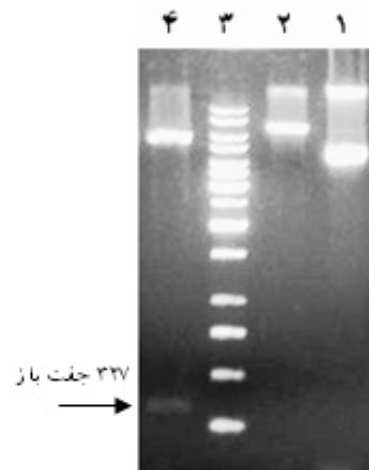
از جمله عوامل مهم در بالا بردن میزان بیان ژن‌های بیگانه در میزبان‌های بیانی، بهینه‌سازی توالی ژن هدف جهت بیان در میزبان انتخاب شده می‌باشد. دو شاخص عمده که در این زمینه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد الگوی بکارگیری کدون و درصد بازهای GC



بیان دومین III پروتئین پوششی ویروس دنگی نوع ۲ در باکتری *E. coli* بر اساس ساختار پلاسمیدی ایجاد شده انتظار می رفت که پلاسمید pET-EDIII2، پروتئین نو ترکیبی را با وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلو دالتون و حاوی ۱۱۰ اسید آمینه ایجاد کند. در این پروتئین متیونین ابتدایی توسط حامل کد می شود. ۱۰۳ اسید آمینه ی بعدی مربوط به توالی دومین III است و ۶ اسید آمینه ی انتهای کربوکسیلی اسیدهای آمینه ی هیستیدین هستند. این سازه ی ژنی به درون میزبان باکتریایی *E. coli* سویه ی اوریگامی که حاوی RNA پلیمراز فاژ T7 برای بیان پروتئین های نو ترکیب بود، منتقل شد. همچنین این سویه ی بیانی دارای جهش های مهندسی شده ای در ژن های *trxB/gor*، کدکننده ی آنزیم های تیوردوکسین ردوکتاز (Thioredoxin reductase) و گلو تاتیون ردوکتاز (Glutathione reductase) است که ایجاد پیوند دی سولفیدی در محیط سیتوپلاسم باکتری را تسهیل می کند. این موضوع به دلیل وابستگی ساختار طبیعی دومین III و اپیتوپ های فضایی آن به وجود پیوند دی سولفیدی، از اهمیت زیادی برخوردار است. کشت هایی با مقیاس کم از کلونی های تأیید شده جهت القا با IPTG و بررسی بیان پروتئین تهیه شد. مقایسه ی الگوی باندهای پروتئینی در نمونه های کشت *E. coli* القاشده و القاشده در شکل ۵ نشان داده شده است. این بررسی نشان داد که کشت های القاشده با IPTG، به صورت مشخصی پروتئین ۱۲ کیلو دالتونی مورد انتظار را بیان می کنند. بیان پروتئین نو ترکیب در ساعت های مختلف پس از القا (۲، ۴ و ۶ ساعت) بررسی شد. در نهایت بیان پروتئین در شرایط دمایی ۳۷ درجه ی سانتی گراد، القا

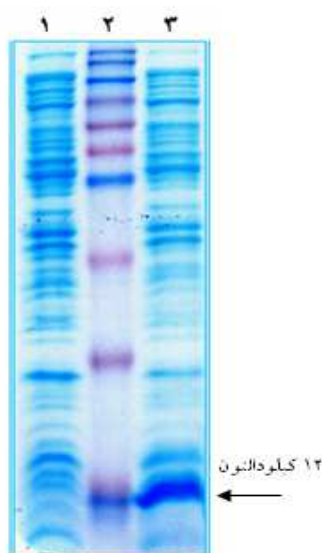


شکل ۳. نقشه ی پلاسمیدی pET-EDIII2: در این پلاسمید قطعه ی ژنی کدکننده ی پروتئین EDIII2 که با رنگ سبز مشخص شده است، به صورت هم قالب (in-frame) با کدون آغازین حامل و 6×His-Tag در انتهای ژن، بین جایگاه های Nde1 و Xho1 کلون شده است. T7T: پایانبیر رونوشت برداری فاژ T7، lacI: ژن رپرسور Amp<sup>r</sup> lacI: نشانگر انتخابی آمبی سیلین، Ori: توالی شروع همانندسازی از پلاسمید pBR322 و T7P: پیشبر فاژ T7 می باشد. جهت پیکان ها جهت رونوشت برداری را نشان می دهد.



شکل ۴. نتیجه ی هضم آنزیمی پلاسمید pET-EDIII2 (۱) پلاسمید هضم نشده، (۲) پلاسمید هضم شده (با آنزیم Xho1)، (۳) مارکر وزن مولکولی از نوع ۱ kb و ۴) پلاسمید هضم شده با دو آنزیم Xho1 و Nde1 (خروج قطعه ی ژنی ۳۲۷ جفت بازی با علامت پیکان مشخص شده است) می باشند.

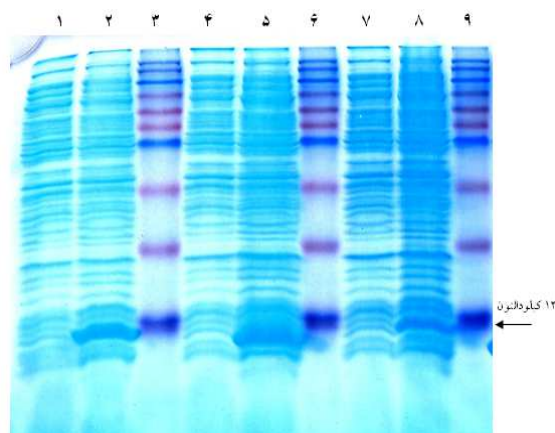
فاز محلول نشان‌دهنده‌ی بیان پروتئین به صورت محلول بود. در مقابل در فاز رسوب نامحلول باند قابل توجهی مشاهده نشد (شکل ۶).



شکل ۶. حضور پروتئین EDIII2 در فاز محلول. ستون ۱) الکتروفورز نمونه‌ی پروتئینی حاصل از فاز رسوب سلول‌های هضم‌شده، ستون ۲) نشانگر وزن مولکولی و ستون ۳) الکتروفورز نمونه‌ی پروتئینی فاز محلول سلول‌های هضم‌شده‌ی بیان‌کننده‌ی EDIII2.

بنابراین با توجه به این که بیان پروتئین به صورت محلول به اثبات رسید، روش تخلیص در شرایط طبیعی (بدون استفاده از مواد دناتورکننده) انتخاب گردید. به منظور خالص‌سازی پروتئین EDIII2، از پروتکل روش طبیعی استخراج، طبق کاتالوگ کیت تخلیص استفاده شد. این روش کارایی خوبی در تخلیص نشان داد، بدون این که نیازی به انجام مراحل واسرشت‌سازی (Denaturation) و رفلدینگ (Refolding) باشد. بررسی الگوی الکتروفورز نمونه‌ی پروتئین تخلیص شده در شکل ۷ نشان داده شده است. یک باند مشخص در ناحیه‌ی حدود ۱۲

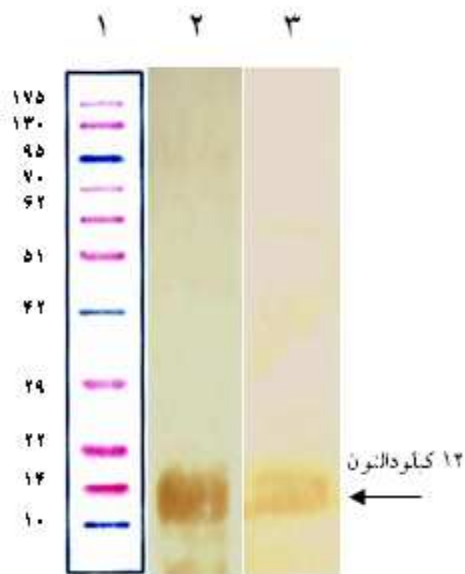
در دانسیته‌ی نوری ۰/۶، غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG و در مدت ۴ ساعت پس از القا انجام شد.



شکل ۵. بررسی بیان پروتئین نو ترکیب EDIII2 با استفاده از روش SDS-PAGE: ژل رنگ‌آمیزی شده با رنگ کوماسی بلو نشان‌دهنده‌ی نمونه‌ی پروتئینی باکتری E. coli القاشده (ستون ۱، ۴ و ۷) و القاشده (ستون ۲، ۵ و ۸) است. نشانگر وزن مولکولی در ستون ۳، ۶ و ۹ مشخص می‌باشد. ستون‌های ۲، ۵ و ۸ به ترتیب مربوط به بیان در ساعت‌های ۲، ۴ و ۶ است. اندازه‌ی باندهای نشانگر وزن مولکولی بر حسب کیلودالتون به ترتیب ۱۷۶، ۱۳۰، ۹۵، ۷۰، ۶۲، ۵۱، ۴۲، ۲۹، ۲۲، ۱۴ و ۱۰ می‌باشد. موقعیت پروتئین EDIII2 در محدوده‌ی ۱۲ کیلودالتون، توسط پیکان مشخص شده است.

به منظور بررسی بیان پروتئین از لحاظ قرار گرفتن در فاز محلول یا نامحلول و با هدف انتخاب روش مناسب جهت تخلیص پروتئین، یک نمونه از کشت القاشده تحت شرایط طبیعی و بدون عوامل واسرشت‌کننده‌ی پروتئین‌ها مانند اوره، لیز شد. در این مرحله از آنزیم لیزوزیم و سونیکاسیون به مدت ۶۰ ثانیه استفاده گردید. پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ گراد به مدت ۱۰ دقیقه فاز رویی (فاز محلول) و فاز رسوب (فاز نامحلول) با الکتروفورز مورد آزمایش قرار گرفت. ظهور باند مربوط به پروتئین نو ترکیب در



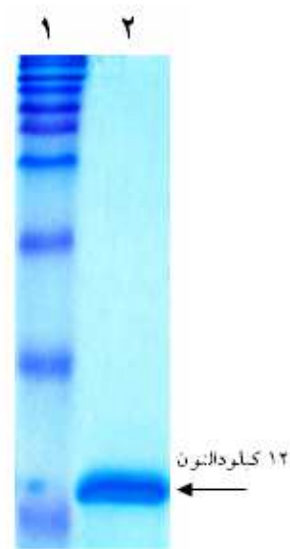


شکل ۸. بررسی پروتئین نوترکیب EDIII2 به روش لکه گذاری وسترن. ستون ۱: نشانگر رنگی وزن مولکولی، ستون ۲: نتیجهی آزمون لکه گذاری وسترن با آنتی بادی منوکلونال اختصاصی برجسب پلی هیسیتیدینی، ستون ۳: نتیجهی وسترن با آنتی بادی منوکلونال اختصاصی دومین III اندازهی نشانگر وزن مولکولی در سمت چپ شکل بر حسب کیلودالتون مشخص شده است.

### بحث

پروتئین E ویروس دنگی به دو دلیل عمده به عنوان کاندیدای واکسن دنگی مطرح است. نخست به دلیل نقش مهم آن در الحاق و ورود ویروس به درون سلول میزبان، با توجه به برهم کنش این پروتئین با گیرنده های سطح سلول (۲۳) و دوم به دلیل این که پروتئین E، آنتی ژن اصلی ویروس است و باعث القای آنتی بادی های محافظت کننده و ایمنی پایدار بر علیه ویروس می شود (۱۷). پروتئین E نوترکیب و مشتقات آن در میزبان های مختلف از جمله *E. coli* (۱۲-۱۳)، مخمر (۱۵) و سلول حشره ای (۱۷-۱۸) بیان شده است. محققین مختلف در طراحی راهکارهای مختلف برای بیان و خالص سازی پروتئین E، از روش های متفاوتی مانند استفاده از روش الحاق

کیلودالتون با خلوص بالا به دست آمد. این نتایج در مقایسه با کارهای قبلی که همراه با تولید اجسام اینکلوزن بود روش مناسب تر و مطلوب تری بود.



شکل ۷. تخلیص پروتئین نوترکیب EDIII2 با استفاده از کیت Ni-NTA از فاز محلول سوسپانسیون باکتری هضم شده تحت شرایط طبیعی. موقعیت پیکان نشان دهندهی باند پروتئین تخلیص شده است (به دلیل استفاده از مادهی ۲-مرکاپتواتانول در بافر نمونه، باند پروتئینی اندکی بالاتر از موقعیت مورد انتظار قرار گرفته است). ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی است.

پروتئین خالص شده، توسط آزمون لکه گذاری وسترن و با استفاده از آنتی بادی منوکلونال بر علیه برجسب پلی هیسیتیدینی و آنتی بادی اختصاصی دومین III پروتئین پوششی ویروس دنگی، بررسی شد. نتیجهی این آزمون بیان پروتئین هدف را تأیید کرد (شکل ۸). بر اساس نتیجهی تعیین غلظت پروتئین خالص شده، میزان خلوص محصول و حجم محیط کشت استفاده شده جهت بیان، مشخص گردید که بازده سیستم بیانی ارائه شده در این مطالعه حدود ۲۰ میلی گرم در لیتر محیط کشت بود.

بیان بخش مهم پروتئین E یعنی دومین III بررسی شد. این قطعه به تنهایی اغلب ویژگی های اصلی پروتئین E را به عنوان کاندیدای واکسن دنگی دارد. ساختار دومین III پروتئین E ویروس دنگی نوع ۲ تعیین شده است (۳۷). این دومین با داشتن اپیتوپ های فضایی و خنثی کننده ی اختصاصی هر سروتیپ (۲۰) و جایگاه شناسایی کننده ی گیرنده ی سلول میزبان (۲۳)، اهمیت زیادی دارد. مطالعات مختلف نشان داده است که آنتی بادی های اختصاصی دومین III قادر به مهار اتصال ویروس نوع ۲ به سلول های Vero می باشند (۲۱). علاوه بر این، مشخص شده است که آنتی بادی های منوکلونال موشی 4E11 که به طور مؤثری هر ۴ سروتیپ ویروس را خنثی می کنند، به دومین III پروتئین E متصل می شوند (۳۸). این یافته ها در مجموع انتخاب دومین III را به عنوان هدف اصلی ساخت واکسن های پروتئینی توجیه می کند. قابلیت بیان دومین III پروتئین E ویروس دنگی نوع ۳ در سیستم باکتریایی در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است (۸). برخی از محققین قطعه ی حاوی دومین III را به صورت الحاق شده به پروتئین های دیگر مانند TrpE (۳۹)، پروتئین A (۱۲) و MBP (۱۴) تولید کرده اند. در یکی از این مطالعات، پروتئین ۵۳ کیلودالتونی حاوی دومین III و پروتئین الحاقی MBP با بازده پایین تری نسبت به بازده گزارش شده در این مطالعه، تولید شد که نیاز به خالص سازی چند مرحله ای داشت (۱۴).

در این مطالعه برای بیان دومین III پروتئین E ویروس دنگی نوع ۲، باکتری *E. coli* سویه ی اوریگامی انتخاب شد. این باکتری، میزبان در دسترس

پروتئین هایی مانند گلوتاتیون S-ترانسفراز (Glutathione S-transferase یا GST) (۱۳)، پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP) یا پروتئین (Maltose binding protein) (۱۴)، پروتئین A (۱۲) و 6×HisTag (۱۷) استفاده کرده اند. مهم ترین دلیل استفاده از راهکار پروتئین الحاقی اطمینان از بیان پروتئین هدف به صورت محلول و در نتیجه عدم نیاز به مراحل تخلیص پروتئین های نامحلول می باشد. در هر حال، بازده پایین روش های تخلیص تک مرحله ای از نکات منفی راهکارهای مورد اشاره بوده است. از طرف دیگر پروتئین E کامل که به نسبت پروتئین بزرگی است، به همراه قطعه ی الحاقی مانند GST یا MBP، محصول پروتئینی بزرگتری را ایجاد می کند که منجر به کاهش سطح بیان می شود. علاوه بر این، لزوم جداسازی و حذف قطعه ی الحاقی طی مراحل پیچیده و زمان بر هضم پروتئین و تخلیص مجدد، به کاهش بازده تولید منجر می گردد. در یکی از مطالعات انجام شده که پروتئین E به طور کامل و بدون نیاز به پروتئین الحاقی تولید شد، محصول پروتئین به صورت تجمعات پروتئینی نامحلول در سلول های حشره ای به دست آمد و برای بازیافت آن نیاز به اولتراسانتریفیوژ بود (۱۸). بنابراین، سطح پایین بیان و مشکلات ناشی از مراحل خالص سازی پروتئین های نامحلول باعث بالا رفتن هزینه های تولید می شود.

تولید واکسن دنگی باید به نحوی انجام شود که در نهایت هزینه های هنگفتی را به کشورهای فقیر که به طور عمده درگیر این ویروس هستند، تحمیل نکند. از این نظر ایجاد یک سیستم بیانی کارا با بازده مطلوب در یک میزبان باکتریایی، اهمیت زیادی دارد. به منظور دستیابی به اهداف مذکور، در این مطالعه

نرم‌افزار Optimizer و سنتز مصنوعی توالی ژن استفاده شد. مشخص گردید که سیستم بیانی ارائه شده می‌تواند با بازده بالا و بدون نیاز به قطعه‌ی الحاقی (نظیر MBP یا GST) دومین III پروتئین پوششی ویروس دنگی نوع ۲ را به صورت محلول تولید کند و تحت شرایط طبیعی غلظت مناسبی از محصول را فراهم کند. به روش مشابهی می‌توان دومین III مربوط به سه سروتیپ دیگر ویروس را هم به صورت نوترکیب بیان کرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان، از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می‌کنند.

و ارزانی است که به راحتی می‌توان مقیاس تولید بر مبنای آن را افزایش داد. سویه‌ی اوریگامی حاوی جهش‌هایی در ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های احیاکننده است و از این طریق تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی را تسهیل می‌کند. تشکیل پیوند دی‌سولفیدی به منظور تاخوردگی و ایجاد شکل فضایی مناسب دومین III پروتئین E و حفظ فعالیت بیولوژیک آن اهمیت زیادی دارد (۳۰). از توالی حاوی ۶ اسید آمینه‌ی هیستیدین در انتهای کربوکسیل پروتئین جهت تسهیل شناسایی و تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده گردید. بهینه‌سازی توالی ژن کدکننده از نظر الگوی به کارگیری کدون‌ها و درصد GC، جهت بیان در سیستم باکتریایی نیز اهمیت زیادی در بالا بردن میزان بیان پروتئین هدف دارد (۴۰). به این منظور از

### References

- Leyssen P, de Clercq E, Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1): 67-82, table.
- Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv* 2011; 29(2): 239-47.
- Bhamarapavati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 2000; 18(Suppl 2): 44-7.
- Lai CJ, Bray M, Men R, Cahour A, Chen W, Kawano H, et al. Evaluation of molecular strategies to develop a live dengue vaccine. *Clin Diagn Virol* 1998; 10(2-3): 173-9.
- Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol* 2001; 75(16): 7290-304.
- Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, et al. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis* 1996; 174(6): 1176-84.
- Fonseca BA, Pincus S, Shope RE, Paoletti E, Mason PW. Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 1994; 12(3): 279-85.
- Men R, Wyatt L, Tokimatsu I, Arakaki S, Shameem G, Elkins R, et al. Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine* 2000; 18(27): 3113-22.
- Khanam S, Pilankatta R, Khanna N, Swaminathan S. An adenovirus type 5 (AdV5) vector encoding an envelope domain III-based tetravalent antigen elicits immune responses against all four dengue viruses in the presence of prior AdV5 immunity. *Vaccine* 2009; 27(43): 6011-21.
- Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, Gozalo AS, et al. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine* 2000; 18(27): 3166-73.
- Konishi E, Yamaoka M, Kurane I, Mason PW. A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus

- premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* 2000; 18(11-12): 1133-9.
12. Srivastava AK, Putnak JR, Warren RL, Hoke CH, Jr. Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. *Vaccine* 1995; 13(13): 1251-8.
  13. Sugrue RJ, Cui T, Xu Q, Fu J, Chan YC. The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J Virol Methods* 1997; 69(1-2): 159-69.
  14. Simmons M, Nelson WM, Wu SJ, Hayes CG. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58(5): 655-62.
  15. Hermida L, Rodriguez R, Lazo L, Lopez C, Marquez G, Paez R, et al. A recombinant envelope protein from Dengue virus purified by IMAC is bioequivalent with its immune-affinity chromatography purified counterpart. *J Biotechnol* 2002; 94(2): 213-6.
  16. Staropoli I, Clement JM, Frenkiel MP, Hofnung M, Deubel V. Dengue virus envelope glycoprotein can be secreted from insect cells as a fusion with the maltose-binding protein. *J Virol Methods* 1996; 56(2): 179-89.
  17. Staropoli I, Frenkiel MP, Megret F, Deubel V. Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine* 1997; 15(17-18): 1946-54.
  18. Kelly EP, Greene JJ, King AD, Innis BL. Purified dengue 2 virus envelope glycoprotein aggregates produced by baculovirus are immunogenic in mice. *Vaccine* 2000; 18(23): 2549-59.
  19. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002; 108(5): 717-25.
  20. Megret F, Hugnot JP, Falconar A, Gentry MK, Morens DM, Murray JM, et al. Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology* 1992; 187(2): 480-91.
  21. Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 2001; 75(16): 7769-73.
  22. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 91-1041.
  23. Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol* 1996; 70(12): 8765-72.
  24. Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, Harada KE, et al. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine* 2010; 28(15): 2705-15.
  25. Izquierdo A, Bernardo L, Martin J, Santana E, Hermida L, Guillen G, et al. Serotype-specificity of recombinant fusion proteins containing domain III of dengue virus. *Virus Res* 2008; 138(1-2): 135-8.
  26. Simmons M, Murphy GS, Hayes CG. Short report: Antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(2): 159-61.
  27. Block OK, Rodrigo WW, Quinn M, Jin X, Rose RC, Schlesinger JJ. A tetravalent recombinant dengue domain III protein vaccine stimulates neutralizing and enhancing antibodies in mice. *Vaccine* 2010; 28(51): 8085-94.
  28. Babu JP, Pattnaik P, Gupta N, Shrivastava A, Khan M, Rao PV. Immunogenicity of a recombinant envelope domain III protein of dengue virus type-4 with various adjuvants in mice. *Vaccine* 2008; 26(36): 4655-63.
  29. Volk DE, Lee YC, Li X, Thiviyanathan V, Gromowski GD, Li L, et al. Solution structure of the envelope protein domain III of dengue-4 virus. *Virology* 2007; 364(1): 147-54.
  30. Roehrig JT, Volpe KE, Squires J, Hunt AR, Davis BS, Chang GJ. Contribution of disulfide bridging to epitope expression of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *J Virol* 2004; 78(5): 2648-52.
  31. Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine* 2005; 23(7): 849-56.
  32. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1998.
  33. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
  34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

- protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
35. Roehrig JT. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res* 2003; 59: 141-75.
36. Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(Web Server issue): W126-W131.
37. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(12): 6986-91.
38. Thullier P, Demangel C, Bedouelle H, Megret F, Jouan A, Deubel V, et al. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. *J Gen Virol* 2001; 82(Pt 8): 1885-92.
39. Fonseca BA, Khoshnood K, Shope RE, Mason PW. Flavivirus type-specific antigens produced from fusions of a portion of the E protein gene with the *Escherichia coli* trpE gene. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44(5): 500-8.
40. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 2004; 22(7): 346-53.

## Cloning and Expression of Domain III of Dengue Virus Type 2 Envelope Protein in *Escherichia Coli*

Hossein Fahimi MSc<sup>1</sup>, Majid Sadeghizadeh PhD<sup>2</sup>, Mahshid MohammadpoorMSc<sup>1</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** The aim of this study was production of a recombinant antigen from envelope protein of dengue virus, in order to achieve high level expression in soluble form. Therefore, the possibility of envelope protein domain III expression in bacterial host was studied.

**Methods:** Multiple sequence alignment for domain III sequences was carried out using Megalign software. The Modeller and Optimizer software were used for protein structure prediction and sequence optimization. After gene synthesis and subcloning in the pET21a expression vector, the optimization of recombinant protein expression was carried out in *Escherichia coli*. Ni-NTA chromatography columns were used for protein purification. The efficiency of protein expression was analyzed using electrophoresis and western blotting methods.

**Findings:** A consensus sequence for domain III of dengue virus type 2 envelope protein was provided. The structural properties of target protein were predicted using bioinformatics methods. For high expression level, the sequence of EDIII2 gene was optimized for appropriate codon usage and GC content. The coding gene sequence was approved by sequencing and enzymatic digestion. For disulfide bound formation in protein structure, the Origami (DE3) expression host was used. At the final step, expression of target protein was optimized, and a high concentration of recombinant protein was achieved in soluble form.

**Conclusion:** The results of this study showed that the optimization of domain III sequence led to obtain high concentration (20 mg/l) of produced protein. This expression system can be used for production of dengue virus envelope protein domain III.

**Keywords:** Dengue virus, Recombinant, Envelope protein

**Citation:** Fahimi H, Sadeghizadeh M, Mohammadpoor M. **Cloning and Expression of Domain III of Dengue Virus Type 2 Envelope Protein in *Escherichia Coli***. J Isfahan Med Sch 2013; 31(234): 544-57

1- PhD Student, Department of Genetics, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Genetics, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Majid Sadeghizadeh PhD, Email: sadeghma@modares.ac.ir