دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و پنجم، شماره ۵، صفحه ۴۲۱-۴۰۸ (آذر و دی ۱۴۰۱)

Iran South Med J 2022; 25(5): 408-421

طراحی و کلونینگ ژن L1 بهینه شده ویروس پاپیلوما انسانی تیپ ۱۸ در وکتور بیانی pcDNA3 و ارزیابی بیان آن در سیستم یوکاریوتی

مریم رحیم‌پور (MSc)[*1]، سیروس نعیمی (PhD)[1]، اعظم رحیم‌پور (PhD)[2]، فاطمه فرشادپور (PhD)[3]، رضا طاهرخانی (PhD)[**3]

[1] گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون
[2] گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[3] مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس، پژوهشکدهٔ علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۴/۲۹- پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰)

چکیده

زمینه: واکسن‌ها نقش ویژه‌ای در مهار و کاهش میزان مرگ ومیر ناشی از بیماری‌های عفونی داشته‌اند. در این راستا DNA واکسن‌ها با هدف سهولت تولید و کاهش خطرات ناشی از واکسن‌های سنتی ایجاد شده‌اند. ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) به عنوان عامل ایجاد کننده سرطان دهانه رحم معرفی شده است. در این راستا پروتئین کپسید ویروس (L1) به منظور ایجاد واکسن‌های زیر واحدی و نیز DNA واکسن مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از این پژوهش تجربی طراحی و ساخت سازواره بیانی ژن L1 ویروس HPV 18 و بررسی بیان آن در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ژن L1 ویروس HPV 18 پس از بهینه‌سازی و سنتز، در وکتور بیانی pcDNA 3.1 hygro ساب کلون گردید. تأئید کلونینگ با استفاده از آزمون colony PCR و واکنش هضم آنزیمی انجام شد. انتقال وکتور بیانی به سلول‌های HEK293 با استفاده از واکنشگر Turbofect انجام شد. پس از ۷۲ ساعت، RNA کل از سلول‌های ترانسفکت شده و سلول‌های کنترل استخراج شده و cDNA ساخته شد. بررسی بیان ژن در سطح mRNA در سلول‌ها با انجام PCR بر روی cDNA انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بدنبال بهینه‌سازی توالی ژن L1، شاخص‌های CAI و Fop در سطح ایده‌آل افزایش یافت. کلونینگ ژن بهینه شده HPV 18-L1 در وکتور بیانی pcDNA3 با استفاده از آزمون کلونی PCR و واکنش هضم آنزیمی با موفقیت تأیید گردید و نتایج بیانگر تشکیل پلاسمید نوترکیب pCDNA3.1-L1 است. متعاقباً بررسی بیان ژن L1 در سطح mRNA نشان دهنده بیان موفقیت‌آمیز ژن L1 در سیستم یوکاریوتی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق، کارایی وکتور بیانی ایجاد شده در بیان مؤثر ژن L1 در شرایط in vitro را نشان می‌دهد. این وکتور بیانی قابلیت استفاده به عنوان DNA واکسن در مطالعات آینده در شرایط in vivo را دارا می‌باشد.

واژگان کلیدی: ویروس پاپیلومای انسانی، ژن L1، واکسن ژنی، بهینه‌سازی کدون، سرطان دهانه رحم

** بوشهر، مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس، پژوهشکدهٔ علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
E.mail: taherkhanireza2005@yahoo.com
*ORCID: 0000-0002-4272-6198
**ORCID: 0000-0001-6499-0531

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]
[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

مقدمه

ویروس پاپیلوما انسانی (Human papillomavirus-HPV) دارای کپسید بیست وجهی، بدون پوشش، دارای ۸۰۰۰ جفت باز، با ژنوم DNA دو رشته‌ای و با اندازه ۵۵ نانومتر می‌باشد. تاکنون حدود ۲۰۰ ژنوتایپ HPV شناسایی شده است. ویروس HPV، اپیتلیوم سنگفرشی را از طریق خراش‌های و زخم‌های میکروسکوپی آلوده می‌کند و چرخه تکثیر ویروس، وابسته به وضعیت تمایز بافت اپیتلیال میزبان می‌باشد (۱). استقرار و بقای ژنوم ویروس، در ارتباط با بیان پروتئین‌های اولیه می‌باشد که در همانندسازی و رونویسی DNA، در سلول میزبان دخیل هستند. همزمان با تمایز سلول‌های آلوده، بیان ژن‌های تأخیری و تولید پروتئین‌های کپسید L1 و L2 اتفاق می‌افتد و در لایه‌های فوقانی ویریون تشکیل می‌شود (۱ و ۲).

با اینکه برخی از پاپیلوما ویروس‌ها پتانسیل سرطان‌زایی ندارند، اما برخی از ژنوتیپ‌های پاپیلوما ویروس‌ها در توسعه بدخیمی در انسان و حیوانات دخالت دارند. بدخیمی مرتبط با پاپیلوما ویروس در انسان، شامل چندین سرطان اپی‌تلیال مخاطی ناحیه تناسلی مثل دهانه رحم، فرج، آلت تناسلی، مقعد و سرطان‌های دهان و حنجره می‌باشد (۳ و ۴). سرطان سرویکس چهارمین سرطان شایع در زنان جهان می‌باشد، که سالانه بیش از ۶۰۰۰۰۰ خانم را گرفتار می‌کند و عامل مرگ بیش از ۳۴۲۰۰۰ خانم می‌باشد، شواهد یک ربع قرن نشان می‌دهند، HPV علت نزدیک به ۱۰۰ درصد سرطان‌های سرویکس است و ژنوتیپ‌های HPV-16 و HPV-18 عامل اکثریت سرطان دهانه رحم در سراسر دنیا هستند (۵ و ۶). ویروس HPV بواسطه انکوپروتئین‌های E6 و E7 باعث مهار پروتئین‌های سرکوب کننده تومور و تغییر شکل سلول و ایجاد سرطان می‌شوند. در اکثر سرطان‌های وابسته به HPV، ژنوم ویروسی به صورت تصادفی شکسته شده و در داخل ژنوم سلول میزبان ادغام می‌شود. ورود DNA ویروسی به داخل DNA میزبان، یک رویداد مهم در گسترش سرطان سرویکس می‌باشد که این امر، اغلب از طریق شکسته شدن ژنوم از ناحیه E2 اتفاق می‌افتد. ادغام شدن سبب از دست رفتن خاصیت تنظیمی ژن E2 و افزایش بیان انکوپروتئین‌های ویروسی می‌شود (۷ و ۸).

واکسن‌های مؤثر در پیشگیری از عفونت HPV و بیماری‌های مرتبط با HPV در دهه اخیر پیشرفت عظیمی داشته است. تولید این واکسن‌ها که از قطعات شبه ویروسی (viral like particle-VLPs) که شامل پروتئین بزرگ کپسید (HPV-L1) است با هزینه بالا همراه می‌باشد (۹). واکسن‌های نسل سوم واکسن‌های ژنی یا DNA واکسن هستند. این واکسن‌ها در واقع تزریق مستقیم پلاسمیدی است که قدرت بیان ژن مورد نظر در داخل سلول‌های بدن را دارد و می‌تواند باعث ایمنی‌زایی در برابر بیماری‌های ناشی از پاتوژن‌های مختلف مانند ویروس‌ها و حتی هدف قراردادن عوامل مسبب بیماری‌های غیرعفونی همچون سرطان و روماتیسم و بیماری‌های با منشأ ژنتیکی نیز می‌تواند کاربرد داشته باشند (۱۰). در مدل‌های حیوانی مشاهده شده که واکسیناسیون به وسیله DNA سبب ایجاد ایمنی علیه بسیاری از عوامل عفونی شده است (۱۱). واکسن‌های ژنی در مقایسه با سایر واکسن‌ها دارای مزایایی چون: تولید ساده‌تر، خالص‌تر بودن محصول، ذخیره‌سازی و نگهداری آسان می‌باشند. واکسن DNA به لحاظ ژنتیکی، قابلیت دست‌ورزی داشته و می‌توان به کمک آن یک یا چند آنتی‌ژن اختصاصی، از انواع مختلف عوامل عفونی و پاتوژن‌ها را در سلول میزبان

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

بیان نمود (۱۴-۱۲). با توجه به مشکلات ناشی از عفونت پاپیلوما ویروس و اهمیت واکسیناسیون جهت پیشگیری و با توجه به مزایای واکسن‌های DNA، هدف ما از این مطالعه طراحی و ساخت سازواره ژنی جهت بیان ژن L1 ویروس HPV-18 به عنوان کاندیدای واکسن ژنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، وکتورها و سلول جانوری

در این مطالعه تجربی از باکتری E.coli سویه DH5-Alpha (شرکت Novagen، آمریکا) جهت کلون‌سازی و تکثیر پلاسمید حاوی ژن L1 استفاده گردید. همچنین در این تحقیق به منظور بررسی بیان ژن L1 در سلول جانوری، از رده سلولی کلیه جنین انسان HEK 293(Human Embryonic Kidney 293) (بانک سلولی ایران) استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی بهینه شده ژن L1 ویروس HPV-18 توسط شرکت بایومتیک کانادا (Biomatik ،Canada) سنتز و در وکتور پایه pUC کلون گردید. از وکتور بیانی (+) cDNA 3.1 hygro (ساخت شرکت Invitrogen، آمریکا) به عنوان وکتور بیان شونده در سیستم یوکاریوتی جهت ساب کلونینگ استفاده شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آمپی‌سیلین (شرکت سیگما، آمریکا) برای انتخاب سلول‌های باکتریایی ترانسفورمه شده، از ویژگی‌های این وکتور است. اندازه وکتور (+) pcDNA 3.1 hygro، ۵۴۲۷ جفت باز می‌باشد. اندازه پلاسمید برای اهداف بالینی اهمیت داشته و به‌طور معمول بین ۳ الی ۱۲ کیلوباز می‌باشد و باید مورد توجه قرار گیرد.

ترانسفورماسیون وکتور PUC-HPV-L1 در سلول‌های E.coli

پلاسمید HPV 18-L1 pUC در باکتری E. coli سویه DH5-Alpha که به روش شیمیایی با استفاده از کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) مستعد شده بودند، ترانسفورمه گردید. سپس باکتری‌های ترانسفورمه شده روی پلیت LB-Agar (هایمدیا، هند) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شبانه داده شدند. سپس یک کلون از باکتری E.coli ترانسفورمه شده (دارای پلاسمید HPV 18-L1) در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به صورت شبانه در انکوباتور شیکردار و دمای C ۳۷ کشت داده شد. از باکتری‌های رشد یافته در این مرحله، با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (شرکت Bioneer، کره جنوبی) صورت گرفت. جهت بررسی کیفیت پلاسمید تخلیص شده، ۲ میکرولیتر از آن توسط ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز گردید. غلظت پلاسمید با تعیین جذب نوری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در این مطالعه از دستگاه نانودراپ جهت تعیین غلظت و خلوص پلاسمید و قطعات DNA استفاده گردید.

کلون‌سازی ژن در وکتور بیانی pcDNA 3.1 Hygro

هضم آنزیمی دوگانه پلاسمیدهای pUC-HPV 18 L1 و pcDNA 3.1 Hygro با آنزیم‌های XhoI و NheI جهت خارج نمودن ژن L1 از پلاسمید pUC-HPV 18 L1 و ساب کلون نمودن آن در ناحیه پلی‌لینکر پلاسمید pcDNA 3.1 Hygro انجام شد. محصول هضم آنزیمی در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. به منظور تخلیص قطعه وکتور بیانی و ژن دایجست شده از ژل آگاروز، با کیت تخلیص DNA از ژل شرکت BIONEER ساخت کشور کره استفاده شد. به منظور ایجاد اتصال بین ژن L1 و حامل بیانی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]
[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

pcDNA 3.1 Hygro خالص شده، از آنزیم DNA لیگاز T4 استفاده گردید. واکنشگرهای مرحله اتصال به صورت، ۲ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از حامل pcDNA 3.1 Hygro، ۴/۵ میکرولیتر (۹۵ نانوگرم) از ژن L1، ۲ میکرولیتر از بافر لیگاز ۱۰ برابر غلظت (۱۰X) و ۲ میکرولیتر از آنزیم DNA لیگاز T4 (شرکت NEB، آمریکا) در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با افزودن آب مقطر، با یکدیگر مخلوط شدند. سپس مراحل انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری E.coli و کشت باکتری ترانسفورمه بر روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک، مطابق مرحله قبل انجام شد. به منظور شناسایی کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب واکنش کلونی PCR بر روی تعدادی از تک کلون‌های رشد کرده بر روی محیط جامد جدید حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به صورت ماتریکس انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. یکی از کلون‌ها با واکنش PCR مثبت انتخاب گردید و جهت تخلیص پلاسمید کشت شبانه داده شد. تأیید درستی سازواره نهایی pcDNA 3.1 Hygro-HPV18 L1 با هضم آنزیمی، با آنزیم‌های NheI و XhoI (شرکت NEB، آمریکا) جهت تأیید خروج قطعه با وزن تقریبی ۱۷۱۰ جفت‌باز انجام شد و محصول واکنش بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید (۱۵).

انتقال سازواره نهایی pcDNA 3.1 HPV 18 L-Hygro به سلول‌های جانوری

پلاسمید نوترکیب pcDNA 3.1 Hygro-HPV18 L1 ابتدا با کیت تجاری تخلیص پلاسمید استخراج گردید. در روند تخلیص پلاسمید، استفاده از روش‌هایی که فرم اصلی پلاسمید یعنی فراپیچیده یا سوپرکویل را جداسازی نماید، اولویت دارند. چرا که استفاده از فرم خطی پلاسمید می‌تواند احتمال وارد شدن تصادفی آن به ژنوم میزبان را افزایش دهد. انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول‌های HEK293 با استفاده از واکنشگر Turbofect (شرکت ترموفیشر، آمریکا) که یک پلیمر کاتیونی می‌باشد انجام شد. ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن تعداد ۱۰۵ سلول در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه ریخته شد بنابراین در روز بعد سلول‌ها در فاز رشد لگاریتمی بودند. حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم، ۲ میکرولیتر واکنشگر Turbofect و ۱ میکروگرم DNA پلاسمیدی به یک میکروتیوب اضافه شده بخوبی پیپت شده و ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. محلول فوق قطره قطره به سلول‌ها اضافه شده و پلیت به آرامی تکان داده شد. سلول‌ها به انکوباتور $^{\circ}C$ ۳۷، حاوی ۵ درصد CO_2 منتقل شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل سلول‌های ترانسفکت نشده (کنترل)، سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA 3.1 Hygro (کنترل) و سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pcDNA 3.1 Hygro-HPV18 L1 می‌باشد که برای هر گروه تعداد ۲ چاهک از پلیت ۶ خانه در نظر گرفته شد.

بررسی بیان ژن در سطح RNA با استفاده از واکنش RT-PCR

۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌های هر چاهک با بافر PBS استریل شسته و جمع‌آوری شده و استخراج و ساخت cDNA انجام شد. تخلیص RNA از سلول‌های HEK293 با استفاده از کیت تجاری Qiagen RNeasy (کیاژن، آلمان) انجام شد. غلظت RNA تخلیص شده با استفاده از نانودراپ (شرکت ترموفیشر، آمریکا) تعیین شد. به منظور از بین بردن احتمال آلودگی RNA با DNA سلولی،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

تیمار با آنزیم RNase Free DNase صورت گرفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت تجاری (شرکت ترموفیشر، آمریکا) انجام شد به این منظور به حجم ۱۰ میکرولیتر از RNA حاصل از مرحله قبل، ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo dT افزوده شد. واکنش بمدت ۵ دقیقه در ۷۰ °C قرار داده شده و بلافاصله به یخ منتقل شد. سپس ۴ میکرولیتر از بافر RT با ۵ برابر غلظت (5x) و ۲ میکرولیتر از dNTP با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و ۰/۵ میکرولیتر از مهارکننده RNase با غلظت ۴۰ واحد در میکرولیتر و ۱/۵ میکرولیتر از آب استریل عاری از RNase به ترتیب افزوده و واکنش بمدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه شد. سپس ۲۰۰ واحد (۱ میکرولیتر) آنزیم رونویسی کننده معکوس (MMLV Reverse Transcriptase) به واکنش اضافه شده و بمدت یکساعت در ۴۲ °C انکوبه شد. در نهایت واکنش بمدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ °C غیرفعال شد. واکنش PCR بر روی cDNA حاصل از سلول‌های ترانسفکت شده و نیز سلول‌های کنترل با استفاده از پرایمرهای

Forward	AAGGAGCACAAATCTGACCATCTG
Reverse	TCTCCTTCAGGTCCACATTCCAG

انجام شد. مواد مورد نیاز جهت آزمون PCR از شرکت سیناکلون تهیه گردید. اجزاء PCR شامل بافر PCR ۱ برابر غلظت (۱X) با میزان $MgCl_2$ برابر ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP و ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر رفت و برگشت و ۱ میکرولیتر cDNA بعنوان الگو به ازای هر واکنش ۲۵ میکرولیتر خواهد بود. شرایط PCR شامل ۵ دقیقه ۹۵ °C، سپس ۳۵ سیکل: دما تقلیب (denaturation) ۹۴ °C بمدت ۳۰ ثانیه، دما اتصال (annealing) ۶۰ °C بمدت ۳۰ ثانیه و دما بسط (extension) ۷۲ °C بمدت ۳۰ ثانیه و مرحله نهایی بسط (final elongation) ۵ دقیقه خواهد بود. بعد از انجام RT-PCR، محصولات این مرحله بروی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز می‌گردد (۱۶). طول محصول PCR برابر ۳۵۳ جفت باز می‌باشد.

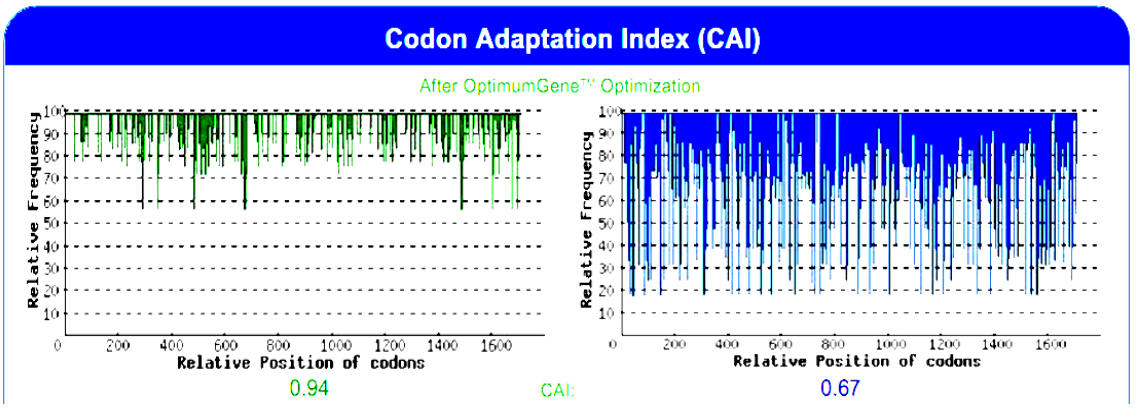
یافته‌ها

بهینه‌سازی ژن L1

بررسی توالی نوکلئوتیدی اولیه ژن L1 نشان داد که توالی مورد نظر دارای کدون‌های نادر (Rare or low-Usage Codon) پشت سر هم می‌باشد که می‌تواند اثربخشی ترجمه را کاهش دهد یا حتی سبب جدا شدن mRNA از ماشین پروتئین‌سازی گردد، که با بهینه‌سازی کدون‌ها در توالی ژن L1 براساس کدون‌های کاربردی انسان، کدون‌های نادر تغییر داده شدند. آنالیز شاخص سازگاری کدون (Codon Adaptation Index-CAI) که قدرت کدون بایاس انتخابی در یک ژن را نشان می‌دهد قبل و بعد از بهینه‌سازی توالی ژنL1 ویروس HPV-18 با کمک نرم‌افزار GenScript به‌ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۹۴ بود بعبارتی بعد از بهینه‌سازی توالی مقدار CAI در سطح ایده‌آل افزایش یافت (شکل ۱).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

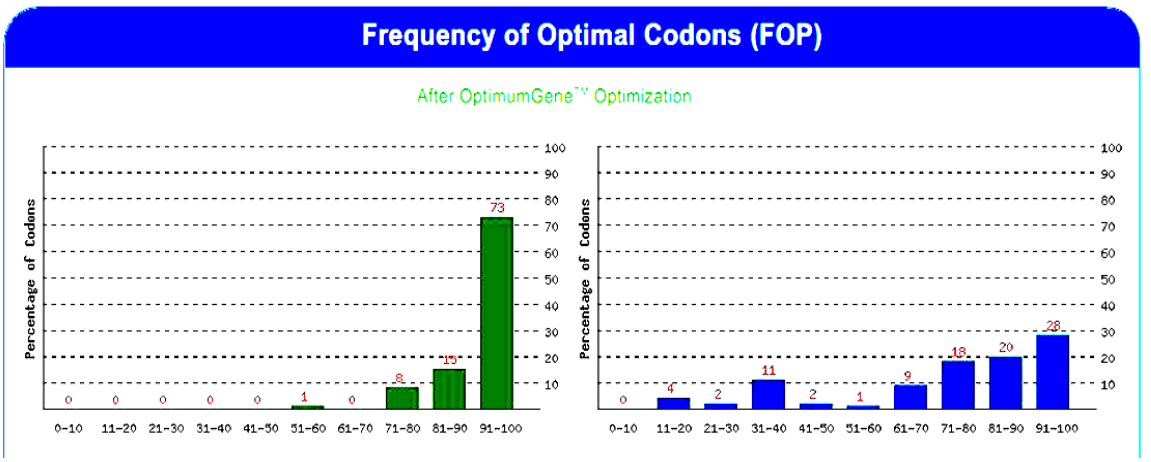
[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]



شکل ۱) توزیع فراوانی کدون کاربردی در طول توالی ژن ((Codon Adaptation Index (CAI). بعد از بهینه‌سازی ژن L1 میزان CAI از ۰/۶۷ به ۰/۹۴ افزایش یافت.

Fig 1) Distribution of codon usage frequency in the gene sequence (Codon Adaptation Index-CAI). After optimizing L1 gene, CAI increased from 0.67 to 0.94.

یکی دیگر از شاخص‌های کدون کاربردی (Codon Usage Index) که توسط Ikemura معرفی گردید. فراوانی کدون‌های بهینه (frequency of optimal codon usage-Fop) است که برای پیشگویی سطح بیان ژن نیز استفاده می‌شود (۱۷ و ۱۸). نسبت تعداد کدون‌های بهینه به مجموع تعداد کل کدون‌های مترادف بیانگر Fop می‌باشد. یک عدد ۱۰۰ نشان‌دهنده بالاترین فراوانی کدون فعال برای یک اسیدآمینه در یک میزبان اختصاصی است. قبل از فرآیند بهینه‌سازی توالی ژن L1 میزان ۲۸ درصد از کدون‌ها دارای FOP value با دامنه‌ای از ۹۱ تا ۱۰۰ بودند. در صورتی که بعد از بهینه‌سازی توالی فوق، ۷۳ درصد از کدون‌ها دارای FOP value با دامنه‌ای از ۹۱ تا ۱۰۰ داشتند (شکل ۲).



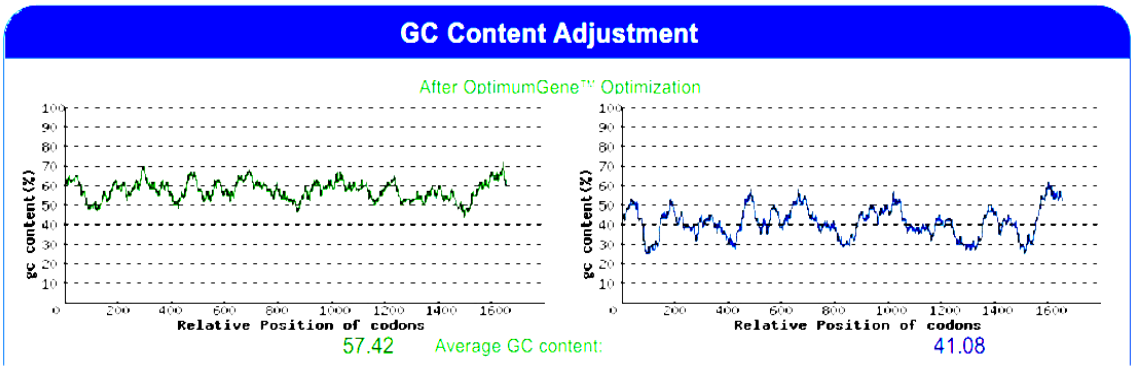
شکل ۲) درصد توزیع کدون‌های بهینه ((Frequency of Optimal Codons (FOP). بعد از بهینه‌سازی توالی ژن L1 (نمودار سبز)، مقادیر FOP value با دامنه‌ای از ۹۱ تا ۱۰۰ از ۲۸٪ کدون بهینه به ۷۳٪ کدون بهینه افزایش یافت.

Fig 2) Percentage distribution of optimal codons (Frequency of Optimal Codons-FOP). After the optimization of the L1 gene (green diagram), the FOP value with a range of 91 to 100 increased from 28% of the optimal codon to 73% of the optimal codon.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

همچنین جهت پایداری و طولانی شدن نیمه عمر mRNA، پیک‌های نامطلوب و تجمعات ناحیه‌ای در محتویات GC یا AT بهینه گردید و ساختمان‌های ساقه حلقه که برروی اتصال ریبوزوم و پایداری mRNA اثر می‌گذارد، شکسته شدند. علاوه‌براین در طی فرآیند بهینه‌سازی عناصر CIS-Acting Elements شامل PolyA(AATAAA)، Splice (GGTGAT)، PolyA(ATTAAA)، Destabilizing(ATTTA) و PolyT (TTTTTT) و Antiviral Motifs از توالی بهینه نشده ژن L1 تغییر داده شد. عناصر فوق، موتیف‌هایی هستند که بیان ژن در سطح رونویسی و ترجمه را بطور منفی تنظیم می‌کنند (شکل ۳).



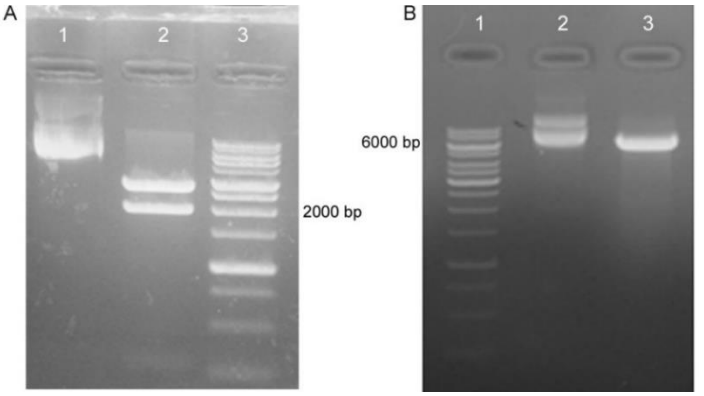
شکل ۳) نتایج بررسی پیک محتویات GC قبل (نمودار آبی) و بعد (نمودار سبز) از بهینه‌سازی توالی ژن L1. دامنه درصد مطلوب محتوی GC میان ۳۰٪ تا ۷۰٪ می‌باشد و پیک‌های محتوی GC در یک پنجره ۶۰bp شناسایی و حذف می‌شود.

Fig 3) Evaluation results of the GC content peak before (blue graph) and after (green graph) L1 gene sequence optimization. The optimal percentage range of GC content is between 30% and 70%, and GC content peaks are identified and removed in a bp60 window.

ساب کلونینگ ژن L1: جهت کلونینگ ژن HPV 18-L1 در وکتور بیانی pcDNA 3.1 hygr، هضم آنزیمی پلاسمیدهای pUC-HPV 18-L1 و pcDNA 3.1 hygro با استفاده از آنزیم‌های XhoI و NheI با موفقیت انجام شده و وکتورهای هضم شده بر روی ژل ۱ درصد الکتروفورز شدند (شکل ۴). قطعات ژن L1 و وکتور بیانی pcDNA 3.1 hygro هضم شده از ژل آگازر بریده شده و از ژل تخلیص گردید. به منظور اطمینان از صحت تخلیص ۳ میکرولیتر از هر تخلیص بر ژل ۱ درصد الکتروفورز شد (شکل ۵). همچنین غلظت پلاسمید هضم شده ۷۰ نانوگرم به ازای هر میکرولیتر و غلظت قطعه ۵۰ نانوگرم به ازای هر میکرولیتر بود.

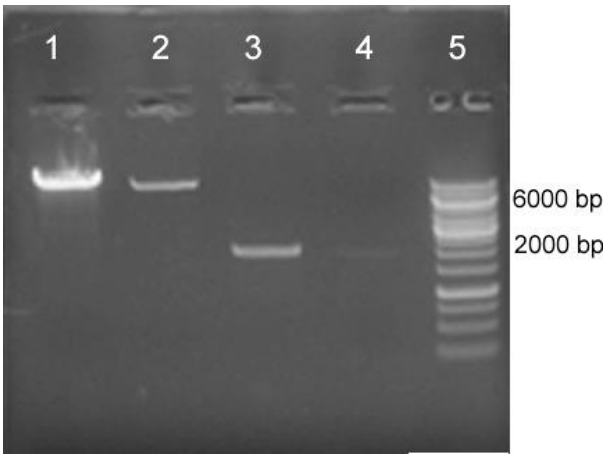
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]



شکل ۴) نتیجه انجام هضم آنزیمی وکتورها. A. هضم آنزیمی وکتور pUC-HPV 18-L1. ستون ۱ وکتور هضم نشده، ستون ۲ وکتور هضم شده و ستون ۳ مارکر DNA. B. هضم آنزیمی وکتور pcDNA 3.1 hygro. ستون ۱ مارکر DNA، ستون ۲ وکتور هضم نشده و ستون ۳ وکتور هضم شده.

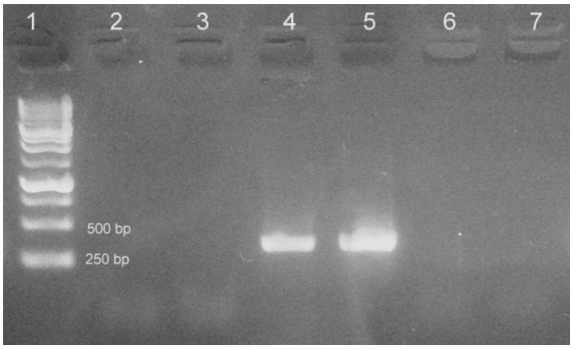
Fig 4) Result of restriction enzyme digestion of vectors. A. Enzymatic digestion of pUC-HPV 18-L1 vector. Column 1 undigested vector, column 2 digested vector, and column 3 DNA ladder. B. Enzymatic digestion of pcDNA 3.1 Hygro vector. Column 1 DNA ladder, column 2 undigested vector, and column 3 digested vector.



شکل ۵) نتیجه الکتروفورز وکتور و قطعه ژنی تخلیص شده. ستون ۱ و ۲ وکتور pcDNA 3.1 hygro تخلیص شده، ستون ۳ و ۴ قطعه ژن L1 از pUC-HPV 18L1 تخلیص شده، ستون ۵ مارکر DNA.

Fig 5) The electrophoresis result of purified vector and gene fragment. Columns 1 and 2 purified pcDNA 3.1 Hygro vector, columns 3 and 4 purified L1 gene fragment from pUC-HPV 18L1, and column 5 DNA ladder.

پس از ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون، واکنش کلونی PCR بر روی کلونی‌ها انجام شد. وجود باند در ناحیه ۳۵۰ جفت باز در کلون‌های شماره ۴ و ۵ نشان دهنده وارد شدن پلاسمید نوترکیب به باکتری در این کلون‌های نوترکیب می‌باشد (شکل ۶).



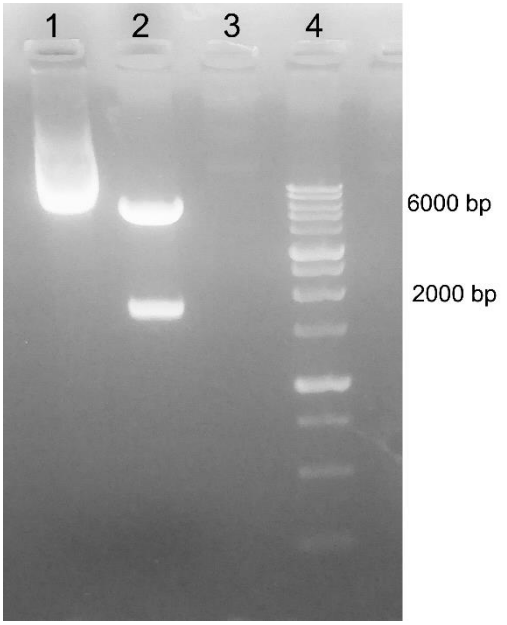
شکل ۶) نتیجه انجام واکنش کلونی PCR. باند اختصاصی با اندازه ۳۵۰ جفت باز در ستون‌های ۴ و ۵ قابل مشاهده است. ستون ۱ مارکر DNA و ستون ۶ کنترل منفی را نشان می‌دهد.

Fig 6) The result of PCR colony reaction. The specific band of 350 bp can be seen in columns 4 and 5. Column 1; DNA ladder and column 6; the negative control.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

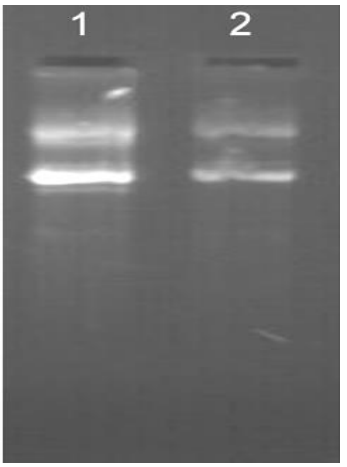
به منظور تأیید کلونینگ، پلاسمید نو ترکیب از کلون ۴ تخلیص شده و هضم آنزیمی با دو آنزیم XhoI و NheI انجام شد. همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است خارج شدن قطعه به طول ۱۷۱۰ جفت باز از پلاسمید تخلیص شده تأیید کننده انجام کلونینگ می‌باشد.



شکل ۷) تأئید کلونیگ با استفاده از واکنش هضم آنزیمی. ستون ۱ وکتور هضم شده، ستون ۲ وکتور هضم شده و ستون ۳ مارکر DNA.

Fig 7) Confirmation of cloning using restriction enzyme digestion method. Column 1; digested vector, column 2; digested vector and column 3; DNA ladder.

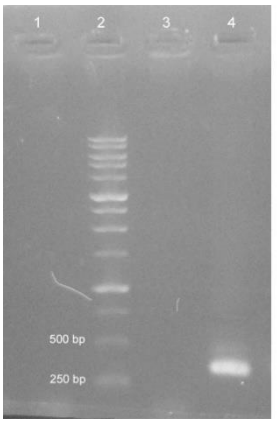
ترانسفکشن و بررسی بیان ژن L1: سلول‌های HEK293 کشت شده پس از ۲۴ ساعت و زمانی که تراکم حدود ۷۰ درصد داشتند، با پلاسمید نوترکیب pcDNA 3-L1 ترانسفکت شدند. ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌های ترانسفکت شده و سلول‌های کنترل ترانسفکت نشده جمع‌آوری شده و تخلیص RNA انجام شد. غلظت RNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده و کنترل به‌ترتیب حدود ۸۰۰ نانوگرم به ازای هر میکرولیتر و ۴۵۰ نانوگرم به ازای هر میکرولیتر اندازه‌گیری شد. پس از الکتروفورز RNA استخراج شده در ژل الکتروفورز ۱ درصد، مشاهده دو باند مشخص 18S rRNA و 28S rRNA تأئید کننده صحت تخلیص RNA می‌باشد (شکل ۸).



شکل ۸) نتیجه الکتروفورز توتال RNA تخلیص شده. ستون ۱ RNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب و ستون ۲ RNA استخراج شده از سلول‌های کنترل

Fig 8) The electrophoresis result of isolated total RNA. Column 1; extracted RNA from transfected cells with recombinant plasmid and column 2; extracted RNA from control cells.

نتیجه واکنش RT-PCR در شکل ۹ نشان داده شده است. وجود باند اختصاصی در ناحیه ۳۵۰ جفت بازی در نمونه سلول‌های ترانسفکت شده نشان دهنده بیان ژن در سطح mRNA می‌باشد.



شکل ۹) نتایج الکتروفورز محصولات RT-PCR. ستون ۱ سلول‌های ترانسفکت نشده (کنترل)، ستون ۲ مارکر DNA، ستون ۳ سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA 3.1 (کنترل) و ستون ۴ سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pcDNA 3.1 Hygro-HPV18 L1.

Fig 9) The electrophoresis results of RT-PCR products. Column 1; non-transfected cells (control), column 2; DNA ladder, column 3; transfected cells with pcDNA 3.1 plasmid (control) and column 4; transfected cells with pcDNA 3.1 Hygro-HPV18 L1 recombinant plasmid.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]
[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

بحث

در این پژوهش تجربی طراحی و ساخت سازواره بیانی ژن L1 ویروس HPV 18 و بررسی بیان آن در سلول‌های یوکاریوتی انجام گردید. یکی از تدابیر جهت افزایش قدرت واکسن‌هایی بر پایه DNA، بهینه‌سازی کدون‌های ژن هدف می‌باشد (۱۹ و ۲۰). همچنین سیمابوکا (Simabuco) و همکاران، نشان دادند زمان استفاده از واکسن‌های DNA حامل ژن‌های بهینه شده در مقایسه با ژن‌های غیربهینه، پاسخ ایمنی هومورال و سلولی قوی‌تر ایجاد می‌گردد (۲۱). در پژوهش حاضر بدنبال بهینه‌سازی توالی کامل ژن L1 ویروسHPV-18 با کمک نرم‌افزار GenScript مقدار CAI در سطح ایده‌آل افزایش یافت و ۷۳ درصد از کدون‌ها دارای FOP value با دامنه‌ای از ۹۱ تا ۱۰۰ شدند. همچنین موتیف‌ها و عناصری که بیان ژن در سطح رونویسی و ترجمه را به‌طور منفی تنظیم می‌کنند، از توالی ژن بهینه شده حذف شدند. بهینه‌سازی این عوامل می‌تواند سبب افزایش سطح بیان ژن L1 در in vitro و in vivo شود (۱۷ و ۱۸). در پژوهش حاضر تأیید ساب کلونینگ ژن HPV 18-L1 در وکتور بیانی pcDNA 3.1 hygr، با تکنیک کلونی PCR و واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های XhoI و NheIبا موفقیت انجام گردید. پس از ترانسفکشن و انتقال پلاسمید نوترکیب pcDNA3-L1 به سلول‌های HEK293از روش RT-PCR به منظور بررسی بیان ژن در سطح mRNA استفاده گردید که مشاهده باند اختصاصی در این آزمون تأئید کننده بیان موفق ژن L1 در سلول‌های ترانسفکت شده بود.

آلودگی با ویروس‌های پاپیلومای انسانی (HPV) شایع‌ترین بیماری منتقل شونده جنسی در جهان می‌باشد. همچنین ارتباط بین ابتلا به سرطان سرویکس و آلودگی شدید HPV نیز به خوبی اثبات شده است. ایجاد واکسن‌های پیشگیری کننده علیه انواع پرخطر HPV از جمله انواع ۱۶ و ۱۸ می‌تواند خطر ابتلا به این نوع عفونت را تا حد زیادی کاهش دهد. به صورت سنتی اغلب واکسن‌های پیشگیری کننده از ویروس‌های زنده ضعیف شده یا غیرفعال شده تشکیل شده‌اند. با این وجود دشواری‌هایی که در زمینه تهیه مقادیر کافی از ویروس پاپیلوما در کشت سلولی در آزمایشگاه وجود دارد و در کنار خطرات احتمالی که می‌تواند پس از وارد شدن انکوژن‌های ویروسی به بدن ایجاد شود، باعث شده تا ایجاد واکسن‌های زیرواحدی برای HPV مورد توجه قرار گیرد (۲۲).

از بین انواع آنتی‌ژن‌های موجود در HPV پروتئین اصلی کپسید L1 بیشترین استفاده را در تهیه واکسن‌های زیرواحدی علیه HPV داشته است. در مطالعات قبلی نیز نقش واکسن‌های DNA حامل ژن L1 مربوط به ویروس پاپیلوما گاوی هم بعنوان کاندیدای واکسن پیشگیرانه و هم بعنوان کاندیدای واکسن درمانی نیز مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج رضایت‌بخشی حاصل شده است (۲۳). همچنین در صورت بیان مؤثر L1 در میزبان‌های بیانی، امکان گردهمایی این پروتئین و شکل‌گیری ذرات شبه ویروس موسوم به VLP وجود دارد. ذرات شبه ویروس از ایمنی‌زایی بالایی برخوردار می‌باشند و به عنوان واکسن مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۴). در این زمینه شناسایی سیستم‌های بیانی مؤثر برای بیان مقادیر کافی از پروتئین L1 از اهمیت زیادی برخوردار است. بیان پروتئین‌های نوترکیب در میزبان‌های پروکاریوتی غالباً از بازده بالاتری نسبت به میزبان‌های یوکاریوتی برخوردار بوده و ارزانتر می‌باشد. امروزه رده‌های سلولی پستانداران به عنوان اصلی‌ترین و مهم‌ترین سیستم بیانی جهت تولید محصولات نوترکیب شناخته شده‌اند. مزیت اصلی و مشترک سیستم‌های بیانی پستانداران قابلیت ایجاد

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

تاخوردگی صحیح در پروتئین‌ها، بسته‌بندی محصول پروتئینی و انجام تغییرات پس از ترجمه مناسب از جمله گلیکوزیلاسیون و فسفریلاسیون در آن‌ها می‌باشد که این تغییرات جهت به دست آوردن فرم کامل فعالیت بیولوژیکی از اهمیت فراوانی برخوردار هستند (۲۵). بیان ژن در سلول‌های پستانداران به دو صورت گذرا و پایدار امکان‌پذیر است. بیان گذرا روش مناسبی برای بررسی کارایی یک سازه بیانی در فاصله زمانی کوتاه می‌باشد (۲۶). باتوجه به اینکه ژن L1 یا پروتئین نوترکیب حاصل از آن، ویژگی‌های لازم برای کاربرد در زمینه تحقیقات واکسن را دارد، در مطالعه حاضر پس از طراحی و ساخت وکتور بیانی حاوی ژن L1 از ویروس HPV 18، بررسی کارایی بیان آن از طریق بیان موقتی در سلول‌های HEK293 انجام گردید. رده سلولی HEK293 میزبان مناسبی برای بیان موقتی ژن L1 می‌باشد. زیرا امکان انتقال ژن با کارایی بالا با استفاده از روش‌های معمول به این رده سلولی وجود دارد (۲۷).

نامور و همکاران، سازه ژنی مولتی اپی توپی از ژن‌های L1 و L2 را در وکتور بیانی pcDNA3 ساب کلون کردن و ارزیابی ایمنولوژیک را در موش‌های C57BL انجام دادند، نتایج مطالعه آن‌ها ایجاد پاسخ ایمنی مؤثر را نشان داد، با این وجود بررسی بیان ژن حتی در سطح mRNA بعد از ساب کلون کردن در وکتور بیانی pcDNA3 توسط این محققان انجام نشده است (۲۸). در مطالعه ما بعد از ساب کلون کردن ژن بهینه شده L1 در وکتور بیانی pcDNA3، بررسی بیان تنها در سطح رونویسی انجام شده است که نتایج رضایت‌بخشی حاصل گردید، با این وجود یکی از محدودیت‌های مطالعه ما عدم بررسی بیان ژن در سطح سنتز پروتئین می‌باشد که بایستی در مطالعات آینده قبل از بررسی‌های ایمنولوژیک در in vivo، با تکنیک ایمنوفلورسانت یا وسترن بلات مورد تأیید قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر ساخت وکتور بیانی pcDNA3-L1 حاوی توالی بهینه شده ژن L1 و همچنین کارایی وکتور در بیان مؤثر ژن L1 در شرایط in vitro را نشان می‌دهد. بیان موفق ژن بهینه شده و کلون شده L1 در وکتورpcDNA3 و متعاقبا بیان آن در سیستم یوکاریوتی (in vitro)، نوید موفقیت بیان آن در بافت‌های جانوری (in vivo) و قابلیت استفاده در مطالعات DNA واکسن در آینده را می‌دهد تا جهت ارزیابی واکسن مورد استفاده قرار گیرد. هر چند واکسن پروتئینی علیه HPV-18 وجود دارد ولی بدلیل هزینه بالای واردات این واکسن‌ها، همچنان نیاز به تحقیقات بیشتر تا دستیابی به واکسنی مؤثر و کم هزینه و بومی می‌باشد.

سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامهٔ مقطع کارشناسی ارشد ژنتیک می‌باشد که تحت حمایت مالی سازمانی یا موسسه‌ای نیست. محققان و نویسندگان این مقاله بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاری صمیمانه ریاست محترم مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس اعلام می‌نمایند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Yousefi Z, Aria H, Ghaedrahmati F, et al. An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy. Front Immunol 2022; 12: 805695. doi: 10.3389/fimmu.2021.805695.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

2.Magalhaes GM, Vieira EC, Garcia LC, et al. Update on human papilloma virus - part I: epidemiology, pathogenesis, and clinical spectrum. An Bras Dermatol 2021; 96(1): 1-16. doi: 10.1016/j.abd.2020.11.003.

3.Araldi RP, Sant'Ana TA, Modolo DG, et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. Biomed Pharmacother 2018; 106: 1537-56. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.149.

4.Soheili M, Keyvani H, Soheili M, et al. Human papilloma virus: A review study of pidemiology, carcinogenesis, diagnostic methods, and treatment of all HPV-related cancers. Med J Islam Repub Iran 2021; 35: 65. doi: 10.47176/mjiri.35.65.

5.Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, et al. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet 2013; 382(9895): 889-99. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60022-7.

6.Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 2021; 71(3): 209-49. doi: 10.3322/caac.21660.

7.Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, et al. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. Medicina (Kaunas) 2019; 55(7): 384. doi: 10.3390/medicina55070384.

8.Wilting SM, Steenbergen RDM. Molecular events leading to HPV-induced high grade neoplasia. Papillomavirus Res 2016; 2: 85-8. doi: 10.1016/j.pvr.2016.04.003.

9.Roden RBS, Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. Nat Rev Cancer 2018; 18(4): 240-54. doi: 10.1038/nrc.2018.13.

10.Lee J, Arun Kumar S, Jhan YY, et al. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. Acta Biomater 2018; 80: 31-47. doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.033.

11.Marc MA, Dominguez-Alvarez E, Gamazo C. Nucleic acid vaccination strategies against infectious diseases. Expert Opin Drug Deliv 2015; 12(12): 1851-65. doi: 10.1517/17425247.2015.1077559.

12.Williams JA. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production. Vaccines (Basel) 2013; 1(3): 225-49. doi: 10.3390/vaccines1030225.

13.Stenler S, Blomberg P, Smith CI. Safety and efficacy of DNA vaccines: plasmids vs. minicircles. Hum Vaccin Immunother 2014; 10(5): 1306-8. doi: 10.4161/hv.28077.

14.Sadeghi M, Doosti A. Cloning and Study of Expression of Helicobacter Pylori FlaAGene in Eukaryotic System. Iran South Med J 2017; 20(3): 245-56. (Persian) URL: http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-876-en.html .

15.Taherkhani R, Farshadpour F, Makvandi M, et al. Cloning of fliC Gene From Salmonella typhimurium in the Expression Vector pVAX1 and Evaluation of its Expression in Eukaryotic Cells. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(11): e12351. doi: 10.5812/jjm.12351.

16.Taherkhani R, Farzaneh MR, Taherkhani S, et al. Molecular Detection of Epstein-Barr virus in Biopsy Samples of Patients Suffering from Bladder Cancer in Bushehr Province, Iran. Iran South Med J 2022; 25(4): 326-39. URL: http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-1640-en.html .

17.Ikemura T. Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system. J Mol Biol 1981; 151(3): 389-409. doi: 10.1016/0022-2836(81)90003-6.

18.Ikemura T. Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. J Mol Biol 1981; 146(1): 1-21. doi: 10.1016/0022-2836(81)90363-6.

19.Farshadpour F, Makvandi M, Taherkhani R. Design, Construction and Cloning of Truncated ORF2 and tPAsp-PADRE-Truncated ORF2 Gene Cassette From Hepatitis E Virus in the pVAX1 Expression Vector. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(12): e26035. doi: 10.5812/jjm.26035.

20.Farshadpour F, Taherkhani R, Makvandi M, et al. Codon-Optimized Expression and Purification of Truncated ORF2 Protein of Hepatitis E Virus in Escherichia coli.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

Jundishapur J Microbiol 2014; 7(7): e11261. doi: 10.5812/jjm.11261.
21.Simabuco FM, Tamura RE, Carromeu C, et al. Gene optimization leads to robust expression of human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein in human cells and induction of humoral immunity in mice. J Virol Methods 2009; 158(1-2): 93-9. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.01.024.
22.Harper DM, DeMars LR. HPV vaccines - A review of the first decade. Gynecol Oncol 2017; 146(1): 196-204. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.04.004.
23.Yang B, Yang A, Peng S, et al. Co-administration with DNA encoding papillomavirus capsid proteins enhances the antitumor effects generated by therapeutic HPV DNA vaccination. Cell Biosci 2015; 5: 35. doi: 10.1186/s13578-015-0025-y.
24.Kumar S, Biswas M, Jose T. HPV vaccine: Current status and future directions. Med J Armed Forces India 2015; 71(2): 171-7. doi: 10.1016/j.mjafi.2015.02.006.
25.Lalonde ME, Durocher Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. J Biotechnol 2017; 251: 128-40. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.04.028.
26.Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. Biotechnol Adv 2012; 30(5): 1158-70. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.022.
27.Nettleship JE, Watson PJ, Rahman-Huq N, et al. Transient expression in HEK 293 cells: an alternative to E. coli for the production of secreted and intracellular mammalian proteins. Methods Mol Biol 2015; 1258: 209-22. doi: 10.1007/978-1-4939-2205-5_11.
28.Namvar A, Bolhassani A, Javadi G, et al. In silico/In vivo analysis of high-risk papillomavirus L1 and L2 conserved sequences for development of cross-subtype prophylactic vaccine. Sci Rep 2019; 9(1): 15225. doi: 10.1038/s41598-019-51679-8.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]

Iran South Med J 2022; 25(5): 408-421

Original Article

Design and Cloning of the Optimized L1 Gene from Human Papilloma virus 18 into the Expression Vector PcDNA3 and Evaluating its Expression in a Eukaryotic System

M. Rahimpour (MSc)[1*], S. Naeimi (PhD)[1], A. Rahimpour (PhD)[2], F. Farshadpour (PhD)[3], R. Taherkhani (PhD)[3**]

[1] Department of Genetics, Colleague of Science, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
[2] Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 20 Jul, 2022 Accepted 10 Jan, 2023)

Background: Vaccines have played a special role in controlling and reducing mortality from infectious diseases. In this regard, DNA vaccines were developed to ease the production and reduce the risks of traditional vaccines. Human papillomavirus (HPV) has been introduced as the causing agent of cervical cancer. The capsid protein (L1) of HPV has been used to produce subunit and DNA vaccines. The aim of this experimental research is to design and construct the L1 expression system of HPV 18 and to investigate its expression in eukaryotic cells.
Method and Materials: In this experimental study, the L1 gene of HPV 18 was subcloned in the expression vector pcDNA 3.1 Hygro after optimization and synthesis. Cloning was confirmed through colony PCR test and enzyme digestion reaction. The expression vector was transfected into HEK293 cells using the Turbofect reagent. After 72 hours, total RNA was extracted from transfected cells and control cells and cDNA was synthesized. Gene expression was examined at the mRNA level in cells by performing PCR on cDNA.
Results: The results showed that following the optimization of the L1 gene sequence, the CAI and Fop indices increased to an ideal level. The cloning of the optimized HPV 18-L1 gene in the pcDNA3 expression vector was successfully confirmed by colony PCR test and enzyme digestion reaction, and the results indicate the production of recombinant plasmid pCDNA3.1-L1. Finally, the evaluation of the L1 gene at the mRNA expression level showed the successful expression of the L1 gene in the eukaryotic system.
Conclusion: The results of this research show the effectiveness of the constructed expression vector in the effective expression of the L1 gene *in vitro*. This expression vector can be used as a DNA vaccine in future studies.

Keywords: Human Papillomavirus, *L1* gene, DNA vaccine, codon-optimization, cervical cancer

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Rahimpour M, Naeimi S, Rahimpour A, Farshadpour F, Taherkhani R. Design and Cloning of the Optimized L1 Gene from Human Papilloma virus 18 into the Expression Vector PcDNA3 and Evaluating its Expression in a Eukaryotic System. Iran South Med J 2022; 25(5): 408-421

***Address for correspondence:* The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. E.mail: taherkhanireza2005@yahoo.com
*ORCID: 0000-0002-4272-6198
**ORCID: 0000-0001-6499-0531

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.25.5.408]