ORIGINAL ARTICLE

Designing a Recombinant Construct of pEGFP-N1 Containing the Full Length of Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) Vpr Gene

Maedeh Ramezanpour[1],
Pooneh Rahimi[2],
Mehrdad Hashemi[3],
Seyed Mehdi Sadat[4]

[1] MSc Student in Genetic, Faculty of Biology, Islamic Azad University, Tehran Medical branch, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Biology, Islamic Azad University, Tehran Medical branch, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received July 28, 2015 ; Accepted February 1, 2016)

Abstract

Background and purpose: The purpose of this study was to design a recombinant vector pEFGP- N1 containing the full length of HIV-1Vpr gene. To the best of our knowledge, the cloning of Vpr gene in pEGFP_N1 is not previously done.

Materials and methods: As a source of Vpr gene the pUC19-Vpr recombinant vector was confirmed by digestion with restriction enzymes BglII and NotI in order to separate the Vpr gene. The specific primers for Vpr gene including the restriction sites of XhoI and KpnI were designed according to the multiple cloning site of pEGFP-N1 and PCR reaction was performed using the pUC 19-Vpr vector as a template. The PCR product was undergone electrophoresis and gel extraction. Digestion reaction was done on both the extracted PCR product and the pEGFP-N1vector. The recombinant pEGFP-N1-Vpr vector was achieved by the ligation reaction using the T4 DNA ligase and it was transformed into the E-coli (DH5α) and propagated. Finally, confirmation was done through the restriction enzyme digestion and PCR amplification.

Results: The recombinant vector pUC19-Vpr was confirmed using the restriction enzymes digestion, and then Vpr gene was successfully amplified using its specific primers including restriction sites for XhoI and KpnI. The PCR product was confirmed by electrophoresis. Finally, a recombinant vector pEGFP-N1 containing the full length of human immunodeficiency virus-1 Vpr gene (pEGFP-N1-Vpr) was successfully constructed.

Conclusion: HIV-1 Vpr gene in its full length size could be ligated into the pEGFP-N1.

Keywords: Human Immunodeficiency Virus-1, Vpr gene, pEGFP-N1

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(137): 23-31 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۳۷ خرداد سال ۱۳۹۵ (۳۱-۲۳)

طراحی و ساخت وکتور نوترکیب واجد ژن Vpr ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسانی (HIV) با استفاده از وکتور EGFP-N1

مائده رمضان پور[۱]
پونه رحیمی[۲]
مهرداد هاشمی[۳]
سیدمهدی سادات[۴]

چکیده

سابقه و هدف: در این پروژه، هدف کلی تحقیق طراحی و ساخت وکتور نوترکیب واجد ژن تمام طول Vpr ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسانی (HIV-1) با استفاده از وکتور pEGFP-N1 بود. کلونینگ ژن Vpr قبلاً درون وکتور pEGFP_N1 صورت نگرفته بود.

مواد و روش‌ها: وکتور pUC19 دارای ژن تمام طول Vpr جهت تایید با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده برش داده شد. سپس جهت اضافه کردن سایت‌های برش آنزیمی (XhoI, KpnI) در ژن مورد نظر مطابق با سایت های موجود در وکتور pEGFP-N1 با طراحی پرایمر واکنش PCR بر روی ژن Vpr با استفاده از پلاسمید نوترکیب pUC19-Vpr به عنوان الگو انجام گرفت. محصول پس از الکتروفورز، مورد استخراج از ژل قرار گرفته و تخلیص گردید. سپس هر دو محصول PCR و وکتور pEGFP-N1 تحت واکنش هضم آنزیمی قرار گرفتند. در مرحله بعد، واکنش الحاق توسط آنزیم T4 انجام گرفت و این ژن به درون وکتور pEGFP-N1 کلون شده و به درون باکتری DH5a ترنسفورم گردید. در نهایت سازه استخراج شده و با هضم آنزیمی و PCR مورد تایید قرار گرفت.

یافته‌ها: در این پروژه ابتدا ژن Vpr درون وکتور pUC19 پس از برش آنزیمی مورد تایید قرار گرفت. سپس این ژن به طور تمام طول و با قرار دادن توالی‌های برش از ۲ آنزیم محدودالاثر در طراحی پرایمرهای اختصاصی در واکنش PCR تکثیر داده شد و اندازه محصول در الکتروفورز مورد تایید قرار گرفت. محصول واکنش الحاق ژن Vpr به طور تمام طول در وکتور pEGFP-N1 نیز هم در هضم آنزیمی و هم در PCR مورد تایید قرار گرفت.

استنتاج: ساخت وکتور نوترکیب واجد ژن تمام طول Vpr ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسانی با استفاده از وکتور pEGFP-N1 با موفقیت انجام گرفت.

واژه های کلیدی: ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسانی، ژن Vpr، وکتور pEGFP-N1

مقدمه

ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسانی یک رتروویروس غیر انکوژن از خانواده رتروویده است و تنها ویروس شناخته شده در جنس لنتی ویروس‌هاست که برای انسان ایجاد بیماری می‌کند. بیماری ایدز برای اولین بار در

مولف مسئول: پونه رحیمی– تهران: انیستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز E-mail: prahimi@pasteur.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. دانشیار، بخش هپاتیت وایدز، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. استادیار، بخش هپاتیت وایدز، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۵/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۵/۱۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱۱/۱۲

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

سال ۱۹۸۱ گزارش شد. تیپ I این ویروس عامل اصلی اکثر موارد بیماری ایدز در سراسر جهان است و تیپ II بیش‌تر در نواحی آفریقایی شایع است(۱). علت عمده مرگ و میر مبتلایان به این بیماری، ابتلا به عفونت‌های فرصت‌طلب و سرطان‌های متفاوت به دلیل تضعیف شدید سامانه ایمنی بدن است(۲). ویروس HIV به شکل کروی و پوشش دار با قطری حدود ۱۰۰-۸۰nm است. ژنوم ویروس حاوی دو رونوشت از RNA تک رشته‌ای سنس مثبت است که ۹/۲ کیلو باز می‌باشد و حدوداً حاوی شش ژن اضافی تکثیری می‌باشد. ویروس دارای نوکلئوکپسید مارپیچی درون یک کپسید ۲۰ وجهی است(۳). ژن ویروسی Vpr(Viral Protein R) حاوی ۲۹۲ جفت باز است و از باز شماره ۵۱۰۵ تا باز شماره ۵۳۹۶ در ژنوم کامل ویروس HIV را شامل می‌شود(۴). این ژن پروتئین ویروسی Vpr،پروتئینی با ۹۶ آمینواسید و با وزن ۱۴کیلو دالتون را تولید می‌کند(۵). این پروتئین دارای دو ساختار مجزای پپتیدی است که به صورت یک ساختار(۵۱-۱) و قطعه دیگر(۹۶-۵۲) شناسایی شده است. قطعه(۵۱-۱) دارای یک موتیف طولانی از آلفا هلیکس/ پیچش/آلفا هلیکس/ پیچش است که اکثراً در منطقه ۱۷، حاوی آسپارژین و در منطقه ۴۶ اکثراً حاوی ایزولوسین است و در قسمت انتهایی نیز به صورت گاما turn است. در Vpr (۹۶-۵۲) که شامل یک قطعه آلفا هلیکس در منطقه(۷۸-۵۳) می‌باشد، اکثراً شامل ایزولوسین است(۶). پروتئین Vpr دارای نقش‌های مختلفی است که از جمله می‌توان به نقش آن در نورتوکسیسیتی اشاره کرد که باعث آپوپتوز سلول‌های عصبی می‌شود(۷). این پروتئین سبب آسیب به سد خونی مغزی می‌شود و پیشرفت آسیب‌های آکسونی را تسریع می‌کند. در نفروتوکسیسیتی نیز موثر است و سبب گلومرواسکروزیس در موش می‌شود(۸). هم‌چنین سبب اختلال در کار سیستم ایمنی می‌شود و ایجاد بی‌پاسخی (آنرژی) می‌کند. Vpr هم‌چنین در فرآیند بسته‌بندی ذرات ویروس قبل از ادغام به هسته در مراحل اولیه عفونت دخالت دارد. Vpr مانع تکثیر سلول میزبان در فاز G2 چرخه سلولی شده و مرگ سلولی از طریق مسیر میتوکندریال القا می‌شود(۹). یافته‌ها نشان داده است که Vpr نقش محوری در پاتوژنز ویروسی ایفا می‌کند و فعالیت‌های Vpr نظیر گسترش عفونت ویروسی در ماکروفاژهای غیر تقسیمی و مونوسیت‌ها، جلوگیری از گسترش کلونال سلول‌های T و کاهش سلول‌های +CD4 عواملی هستند که با پاتوژنز ویروس در ارتباط هستند. بنابراین استراتژی مهار این عوارض جانبی که توسط Vpr ایجاد می‌شود، می‌تواند در کاهش تاثیر ویروس کمک کند. به‌طور خاص برخی از داروهای فعلی ضد HIV به مرحله چرخه سلولی حساس هستند، بنابراین پیدا کردن عوامل سلولی که قادر به محدود کردن فعالیت Vpr باشد، می‌تواند فرصتی را در جهت درمان ضد HIV ایجاد کند(۱۰). در این تحقیق از وکتور pEGFP-N1 برای کلون کردن ژن Vpr استفاده شد که دارای نور فلورسانس و بیان بالایی در سلول پستانداران است(۱۱).

در مهندسی ژنتیک، مراحل متعددی وجود دارد که هر کدام از این مراحل نیازمند ابزارهایی است. این مراحل شامل: ۱- انتخاب ژن مورد نظر، ۲- جداسازی ژن مورد نظر، ۳- تکثیر ژن مورد نظر، ۴- کلون کردن ژن مورد نظر، ۵- تکثیر وکتور نوترکیب واجد ژن مورد نظر در میزبان مناسب، ۵- انتقال حامل ژن به سلول هدف و ۶- تکثیر سلول هدف(۱۲). برای کلون کردن ژن از وکتورهای مختلفی می‌توان استفاده کرد که آن‌ها را براساس سایز، copy number، سازگاری، مارکر انتخابی (آمپی سیلین– تتراسیکلین –کلرامفنیکل–کاناماسین و...) و site cloning ژنی که قرار است به داخل وکتور transfer شود، یکی از آن‌ها را انتخاب می‌کنیم(۱۳). در این تحقیق هدف دستیابی به وکتور نوترکیب pEGFP-N1با استفاده از ژن Vpr بود. این سازه در مطالعات آتی جهت طراحی سلول پایدار بیان‌کننده ژن Vpr و طراحی مولکول‌های اختصاصی siRNA برای بررسی مهار بیان ژن مزبور مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

مواد و روش ها

این کار تحقیقی در بخش هپاتیت و ایدز انیستیتو پاستور ایران انجام شد و نوع مطالعه پایه‌ای ملکولی بود. ابتدا از وکتور نوترکیب pUC19-Vpr+Tat به عنوان الگوی ژن تمام طول Vpr استفاده شد. بدین‌منظور ترانسفورم پلاسمید pUC19– Vpr+ Tat به درون E.coli DH5α به روش شوک حرارتی انجام گرفت: در محیط پلیت LB Agar(Luria-Betani)، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، کشت داده و پلیت کشت داده شده به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. کلنی‌هایی که ظاهر گردیدند، حاصل رشد باکتری‌های ترانسفورم شده بودند. سپس چند کلنی مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب و آن را درون محیط LB مایع، کشت و بعد از ۲۴ ساعت، در انکوباتور ۳۷°C، پلاسمید pUC19 -Vpr +Tat با استفاده از کیت Plasmid DNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزما) استخراج شد. غلظت پلاسمید استخراج شده توسط نانودراپ قرائت شد. این پلاسمید به عنوان الگو برای تکثیر ژن Vpr مورد استفاده قرار گرفت.تأیید سازه ژنی pUC19-Vpr+ Tat: پلاسمید pUC19-Vpr +Tat توسط آنزیم (10u/ µL(لیتوانی – fermentas) NotI و آنزیم BglII (10u/ µL) برش داده وبعد الکتروفورز افقی بر روی ژل ۱ درصد انجام گردید.

تمام آنزیم های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Thermo Fisher Scientific, Fermentas محصول کشور لیتوانی بود.

کلون ژن Vpr در وکتور pEGFP-N1

کشت باکتری حاوی وکتور pEGFP-N1/از استوک تهیه شده در گلیسیرول: از استوک حاوی وکتور pEGFP-N1 برداشته شد و در محیط LB BROTH که حاوی ۵ میکرولیتر کاناماسین بود، کشت داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از طی این زمان، استخراج پلاسمید pEGFP-N1 با استفاده از کیت Plasmid DNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزما) انجام شد. غلظت پلاسمید استخراج شده توسط نانودراپ قرائت شد. طراحی پرایمر جهت تکثیر ژن Vpr: جهت اضافه کردن سایت‌های برش آنزیمی (XhoI(10u/ µL) (KpnI(10u/ µL) در ژن مورد نظر، مطابق با سایت‌های موجود در وکتور pEGFP-N1 با طراحی پرایمر، واکنش PCR بر روی ژن Vpr انجام گرفت. این پرایمرها توسط شرکت ژن فناوران سنتز گردید. در انتهای یکی از پرایمرها جایگاه آنزیمی XhoI (10u/ µL) و در دیگری جایگاه آنزیم KpnI (10u/ µL) قرار داده شد. الگوی پرایمرهای ژن Vpr مورد بررسی آورده شده است.

Vpr frw-XhoI 5´-TACCACTCGAGGCTAGCACCATG-3´

Vpr Rev-KpnI 5´- ATCCGGTACCGCGGCCGCCT-3´

تکثیر ژن Vpr با PCR: در مرحله بعد برای به دست آوردن قطعه ژنی Vpr و تکثیر آن، PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر آماده شد. بعد از آماده کردن مخلوط واکنش، در میکروتیوپ و تحت شرایط دمایی جدول شماره ۱، در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت.

جدول شماره ۱: برنامه مورد استفاده برای تکثیر ژن Vpr

نوع عملیات	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۴ درجه	۴ دقیقه	۱
واسرشت	۹۴ درجه	۴۵ ثانیه	۳۵
اتصال	۵۸ درجه	۴۵ ثانیه	۳۵
طویل سازی	۷۲ درجه	۴۵ ثانیه	۳۵
طویل سازی نهایی	۷۲ درجه	۴ دقیقه	۱

تخلیص محصول PCR یا قطعات ژنی از ژل آگارز جهت آماده‌سازی واکنش اتصال به روش Gel extraction شرکت یکتا تجهیز آزما) GEL/PCR PURIFICATION MINI KIT ابتدا محصول PCR در حجم بالا توسط الکتروفورز افقی و به کمک چاهک بزرگ به ژل ۱/۵ درصد آگارز انتقال داده شد و پس از خاتمه الکتروفورز، ژل برش داده شد

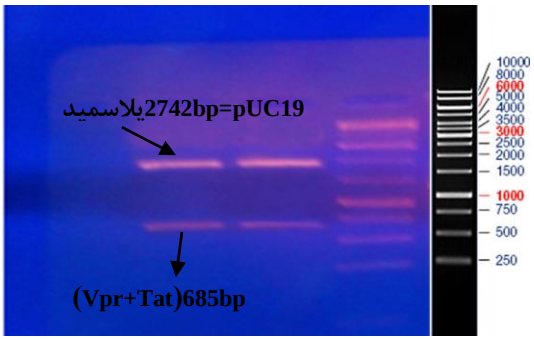
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

و سپس طبق دستور کیت، استخراج و تخلیص صورت گرفت. محصول PCR و وکتور pEGFP-N1 توسط آنزیم‌های محدودالاثر XhoI و Kpn برش داده شدند که سبب خروج ژن Vpr از وکتور pUC19 و خطی شدن وکتور pEGFP-N1 جهت انجام واکنش اتصال شد. واکنش الحاق (ligation): در این پژوهش واکنش الحاق بین ژن Vpr و وکتور پلاسمید pEGFP-N1 که هر دو هضم آنزیمی و تخلیص شده و سپس توسط آنزیم T4 1 weiss/ µL در شرایط دمایی ۴ °C و مدت زمان ۱۶ ساعت واکنش اتصال صورت پذیرفت. پس از این مدت ۱۰ میکرولیتر از محصول لیگاسیون را جهت ترانسفورم کردن باکتری استفاده شد. محصول لیگیشن در باکتری E.coli ترنسفورم شد که درون محیط LB مایع (۵ CC) و حاوی ۵ میکرولیتر کانامایسین کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباتور در ۳۷°C پلازمید آن ها تخلیص گردید. تأیید کلون با هضم آنزیمی روش اول: جهت تایید کلون pEGFP-N1+Vpr توسط آنزیم‌های BglII و AgeI برش داده شد. واکنش هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد پس از الکتروفورز افقی، در دستگاه Gel DOC مشاهده شد. تایید کلون با استفاده از روش PCR: جهت تایید کلون تخلیص شده PCR انجام شد وکلون مورد تایید قرار گرفت.

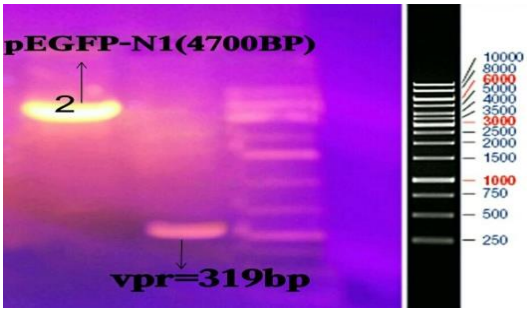
یافته ها

پلاسمیدواجد PUC19-Vpr+Tat دورن باکتری E-coli DH5a ترنسفورم شده تکثیریافت و سپس از باکتری استخراج گردید. به منظور تایید ژن مورد نظر واکنش هضم آنزیمی بر روی پلاسمید استخراج شده با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثرانجام گرفت که نتیجه و اکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم BglII و Not1 در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است: بعد از تایید ژن مورد نظر جهت اضافه کردن سایت‌های برش آنزیمی (XhoI, KpnI) در ژن مورد نظر با طراحی پرایمر، واکنش PCR بر روی ژن Vpr انجام گرفت و محصول پس از الکتروفورز مورد استخراج از ژل قرار گرفته و تخلیص گردید. سپس هر دو محصول PCR و وکتور pEGFP-N1 تحت واکنش هضم آنزیمی قرار گرفتند. نتیجه هضم آنزیمی با آنزیم XhoI KpnI در تصویر شماره ۲ مشاهده می‌شود.

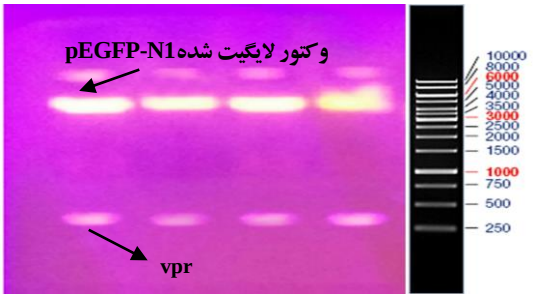
سپس قطعه 319bp که در واقع همان ژن Vprبود، برای لایگیشن از روی ژل بریده شد و بعد از لایگیشن به درون باکتری DH5α ترنسفورم شد. در مرحله بعد، جهت تایید با آنزیم BglII و AgeI برش داده شد و سپس الکتروفورز انجام شد که در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۱: پلاسمید pUC19 (حدود 3427bp) پس از هضم آنزیمی، دو قطعه حدود 685bp و 2742bp را نشان می دهد.



تصویر شماره ۲:یک قطعه حدود (Vpr)319bp و قطعه دیگر وکتور pEGFP-N1



[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

تصویر شماره ۳: یک قطعه حدود 4381bp مربوط به وکتور لایگیت شده pEGFP-N1 و قطعه حدود 319 bp مربوط به ژن Vpr

بحث

ایدز بیماری با گستره جهانی است و بیش از ۴۰ میلیون نفر از آن رنج می‌برند. طبق آخرین تحقیقات، آفریقای جنوبی در صدر کشورهای آلوده جهان است و بعد از آن کشور هندوستان در رده دوم قرار دارد. در کشورهای فوق و ایالات متحده امریکا، اغلب مبتلایان را افراد هم جنس باز و کسانی که بیش از یک شریک جنسی دارند، تشکیل می‌دهند. آمار تجمعی وزارت بهداشت از سال ۱۳۶۵ تا ۱۳۹۴، ۷۴ هزار نفر مبتلا به HIV در کشور ایران را ثبت کرده است. از این تعداد، ۴۰ هزار نفر هم دچار مرگ شده‌اند(۱۴). ویروس HIV دارای ژن‌های اصلی pol (polymerase)، env(Envelope) و gag(Group specific antigen) وحداقل شش ژن مکمل Rev (regulator of expression of virion protein)، Nef(negative effector)، Tat، Vpr، Vpu (viral protein u)، Vif (virion infectivity factor) است که همین مسئله سبب پیچیدگی این ویروس شده است. Vpr دارای نقش‌های متنوعی می‌باشد که شامل مدولاسیون و رونویسی از ژنوم ویروسی، القای آپپتوز، اختلال در کنترل چرخه سلولی، االقا نقص در میتوز، موثر در حمل ونقل کمپلکس هسته‌ای قبل از ادغام (PIC)، تسهیل در رونویسی معکوس و سرکوب فعالیت سیستم ایمنی است(۱۵). Vpr سومین پروتئین جانبی از ویروس HIV-1 به شمار می‌آید. بیش از دو دهه تحقیق در مورد نقش Vprتا حدود زیادی به دانشمندان در مورد بیماری‌زایی این ویروس کمک کرده است. یافته‌ها نشان داده است که Vpr نقش بیولوژیکی مهمی در عفونت سلول‌های تقسیمی و غیر تقسیمی از جمله ماکروفاژ و استراحت سلول‌های T بازی می‌کند(۱۷،۱۶). ویروس HIV در انسان، اکثریت سلول‌های آلوده خون محیطی و سلول‌های غدد لنفاوی را به صورت راکد و یا به صورت غیر کار آمد تبدیل می‌کند. Vpr در واقع کد کننده یک پروتئین ۱۴ کیلودالتونی است. ژن Vpr برای افزایش تکثیر T سل‌ها و مونوسیت‌ها و ماکروفاژها در شرایط آزمایشگاهی استفاده شده است. قبلاً گزارش شده که بیان Vpr در تومورهای مختلف سبب عدم رشد و تمایز آن می‌شود. در مطالعات انجام شده نشان داده شد که پروتئین Vpr به‌طور قابل توجهی در سرم بیماران مبتلا به ایدز وجود دارد. سرم تخلیص شده Vpr بیان ویروسی در ۵ خط سلولی LL58،U1, OM.10.1, ACH-2, J1.1 دچار عفونت راکد را به فرم فعال تبدیل کرد. سرم حاوی Vpr هم چنین بیان ویروس در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد آلوده به HIV-1 را فعال می‌کند. این نتایج پیامدهای گسترده‌ای در چرخه زندگی ویروس دارد(۱۸). تولید بیش از حد HSPs (Heat Shock Protein) در پاسخ به Vpr می‌تواند به عنوان یک عامل کمکی برای تقویت فعالیت ضد HIV باشد. به علاوه HSP16، فعالیت ضد Vpr بسیار قوی و غیر سمی برای سلول‌های انسانی دارد. Ef2 نامزد دیگری است که از آن می‌توان برای سرکوب آپپتوز ناشی از Vpr استفاده کرد. این مهارکننده‌های Vpr می‌توانند منجر به توسعه روش‌های درمانی ضد HIV برای بیماران مبتلا به این ویروس در آینده باشند(۱۹). در طی مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۹ توسط Shimura و همکارانش انجام دادند، نشان دادند که Vpr با تجمع در فاز G2/m و افزایش پلوئیدی سبب ایجاد اختلال در چرخه سلول می‌شود. این اختلال سبب بی‌ثباتی در ژنوم می‌شود. در این تحقیق، اثرات Vpr در یکپارچگی ژنتیکی با استفاده از یک کلون پایدار به نام MIT-23 که در آن بیان Vpr توسط پروموتور داکسی سایکلین تغییر کرد، مورد مطالعه قرار گرفت(۲۰). در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۵ صورت گرفت، از مخمر ساکارومایسز سروزیه به عنوان یک مدل برای بررسی پروتئین‌های کمکی استفاده شد که متوجه شدند Vpr سبب عدم رشد و نقص در ساختار سلولی می‌شود که به‌وسیله حساسیت اسمزی و بزرگی نابرابر سلول شناسایی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

شد(۲۱). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ انجام شد، نشان دادند که وکتور لنتی ویروس، توانایی بیان ژن Vpr را دارد و می‌تواند در بدن اثر ضد سرطانی علیه تومور پوستی ایجاد کند. سلول‌های AT-84 از سلول‌های سرطانی دهان موش به دست آمده بود. وکتور لنتی ویروسی که Vpr را بیان می‌کند، می‌تواند اثرات ضد توموری روی سلول‌های سرطانی داشته باشند(۲۲).

در مطالعه دیگری در مورد پروتئین Vpr، محققین دریافتند که Vpr با مکانیسم ناشناخته‌ای موجب افزایش عفونت در ماکروفاژهای اولیه می‌گردد(۲۳). مطالعات اخیر نشان داد که Vpr در فعال‌سازی محدود لیگاز یوبی کوئیتین E3 از ایمنی سلولی و القا اینترفرون از ایمنی ذاتی تداخل می‌کند(۲۳). در پژوهش دیگری بر روی فعالیت بیولوژیکی مهم Vpr در SIV(Simian immunodeficiency viruses) و HIV، توانایی آن برای القاء توقف فاز G2 چرخه سلولی در سلول‌های T آلوده شده در حال تکثیر انسانی و میمون مانند را نشان داد. برای توقف چرخه سلولی نیازی به سنتز (از نو) Vpr نیست. این نشان می‌دهد که القاء توقف چرخه سلولی در فاز G2 ممکن است قبل از مرحله ادغام ژنوم DNA ویروسی رخ دهد. قابل توجه است که S. cerevisiae و مخمر S. pombe که بیان بالایی از Vpr HIV-1 دارند، نیز فاز G2 چرخه سلولی را متوقف می‌کنند که این مشاهده از این ایده که مسیر سلولی تغییر یافته توسط Vpr به خوبی در تمام سلول‌های یوکاریوتی حفظ شده است، حمایت می‌کند(۲۵،۲۴). به تازگی ژن درمانی بر پایه وکتورها از ویروس HIV در حال گسترش است. در تحقیقی که توسط گروهی از دانشمندان انجام شد، وکتوری طراحی شد که به طور ناقص دارای همه ژن‌های HIV-1 بود، اما عناصر CIS مورد نیاز جهت بسته‌بندی کارآمد، عفونت و بیان را به طور کامل دارا بود. در این بررسی از وکتورهای مختلفی استفاده شد. یکی از این وکتورهای مورد استفاده، pEGFP-N1 است که از عناصر آن در ساخت این وکتور استفاده شده است. در نهایت این وکتور ساخته شده به سلول T انتقال داده شد که با بیان کمی در این سلول همراه بوده است. اگرچه این وکتور ساخته شده سبب ژن درمانی خاصی نمی‌شود، اما حضور آن به تنهایی برای جلوگیری از گسترش عفونت کافی است. مکانیسم این مهار به احتمال زیاد در سطح رقابتی برای محدود کردن سوبسترای مورد نیاز برای بسته‌بندی و یا رونویسی معکوس است. در نتیجه، این مقابله مانع انتشار نوع وحشی HIV-1 می‌شود و این وکتور می‌تواند به صورت بالقوه برای درمان بیماری HIV مورد استفاده قرار گیرد(۲۶). امکان طراحی وکتورهای نوترکیب که دارای ژن کامل و تمام طول ویروس HIV-1 باشند، همواره نقش مهمی در طراحی تحقیقات آتی به منظور بررسی بیان پروتئین و یا مطالعات ایمنی شناختی و ساختاری داشته است. در مطالعه حاضر، گام نخست جهت طراحی و ساخت وکتور نوترکیب دارای ژن کامل ناحیه Vpr ویروس HIV-1 با موفقیت انجام گرفت. البته یکی از محدودیت‌های این تحقیق، عدم توالی‌یابی ژن وارد شده به وکتور می‌باشد. البته کلون ژن Vpr به طور تمام طول در وکتور pEGFP-N1 هم توسط هضم آنزیمی و هم PCR مورد تایید قرار گرفت.

سپاسگزاری

نویسندگان بدین وسیله مراتب قدردانی خود را از تمامی دوستان عزیز و کارکنان محترم بخش هپاتیت و ایدز انسیتو پاستور اعلام می نمایند.

References

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

1. Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps B. HIV medicine 2007. 15th ed. Paris: Flying Publisher; 2007.
2. Daloi M, Daneshpajo M, Daloi A. Molecular genetics HIV: current status, importance and its prospective. Horizon Med Sci 2008; 13(4): 5-20 (Persian)
3. Le Rouzic E, Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. Retrovirology 2005; 2(11): 1-14.
4. Morellet N, Bouaziz S, Petitjean P, Roques BP. NMR Structure of the HIV-1 Regulatory Protein VPR. J Mol Biol 2003; 327(1): 215-227
5. Romani1 B, Engelbrecht S. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. J Gen Virol 2009; 90(8): 1795-1805.
6. Wecker K, Roques B. NMR structure of the (1–51) N-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr. Eur J Biochem 1999; 266(2): 359-369.
7. Piller SC, Jans P, Gage PW, Jans DA .Extracellular HIV-1 virus protein R causes a large inwardcurrent and cell death in cultured hippo campal neurons: implications for AIDS pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(8): 4595-4600.
8. Wang L, Mukherjee S, Jia F, Narayan O, Zhao L. Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminalrepeat. J Biol Chem 1995; 270(43): 25564-25569.
9. Kogan M, Rappaport J. HIV-1 accessory Protein Vpr: Relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. Retrovirology 2011; 8(25): 1-22.
10. Zhao RY, Bukrinsky MI. HIV-1 accessory proteins: VpR. Methods Mol Biol 2014; 1087: 125-134.
11. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res 1987; 15(20): 8125-8148.
12. Mullis KB. Recombinant DNA technology and molecular cloning. Sci Am 1990; 262(36): 181-231.
13. Brown T. Gene cloning and DNA analysis. 6th ed. Manchester: Wiley-Blackwell; 2010.
14. Haghdoost A, Mostafavi E, Mirzazadeh A, Navadeh S, Feizzadeh A, Fahimfar N, et al. Modelling of HIV/AIDS in Iran up to 2014. Journal of AIDS and HIV Research 2014; 3(12): 231-239.
15. Chang F, Re F, Sebastian S, Sazer S, Luban. HIV-1Vpr induces defects in mitosis, cytokinesis, nuclear structure, and centrosomes. Mol Biol Cell 2004; 15(4): 1793-1801.
16. Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virustype 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(15): 7311-7315
17. DeHart J, Planelles V. Human Immunodeficiency Virus Type 1Vpr Links Proteasomal Degradation and Checkpoint Activation. J Virol 2008; 82(3): 1066-1072
18. Levy D, Refaeli Y, MacGregor R, Weiner D. Serum Vpr regulates productive infection and latency of human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(23): 10873-10877.
19. Li G, Bukrinsky M, Zhao RY. HIV-1 viral protein R (Vpr) and its interactions with the host cell. Curr HIV Res 2009; 7(2): 178-183.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

20. Shimura M, Tanaka Y, Nakamura S, Minemoto Y, Yamashita K, Hatake K, et al. Micronuclei formation and aneuploidy induced byVpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus type 1. FASEB 1999; 13(6): 621-637.
21. Macreadie I, Castelli L, Hewish D, KirkpatrickiI A, Ward A C, Azad AA. A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F) RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(7): 2770-2774.
22. Pang S, Kang MK, Kung S, Yu D, Lee A, Poon B, et al. Anticancer Effect of a Lentiviral Vector Capable of Expressing HIV-IVpr. Clin Cancer Res 2001; 7(11): 3567-3573.
23. Mashiba M, Collins DR, Terry VH, Collins KL. Vpr overcomes macrophage-specific restriction of HIV-1 Env expression and virion production. Cell Host Microbe 2014; 16(6): 722-735.
24. Zhang C, Rasmussen C, Chang LJ. Cell cycle inhibitory effects of HIV and SIV Vpr and Vpx in the yeast Schizosaccharomyces pombe. Virology 1997; 230(1): 103-112.
25. Yao XJ, Lemay J, Rougeau N, Clement M, Kurtz S, Belhumeur P, et al. Genetic selection of peptide inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. J Biol Chem 2002; 277(50): 48816-48826.
26. An DS, Morizono K, Li QX, Mao SH, Lu S, Chen IS. An inducible human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vector which effectively suppresses HIV-1 replication. J Virol 1999; 73(9): 7671-7677.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]