Applied molecular biology
Vol.4, issu.7, Summer. 2025
P.P 5-18

Design and construction of a recombinant construct of the E2 gene of hepatitis C virus genotype a1 for future vaccine studies

Somaieh Sabzali[1], **Kiana Shahzamani**[2*]
1. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
2. Associate Professor, Hepatitis Research Center, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran (Corresponding author: shahzamani.k@lums.ac.ir, ORCID: 0000-0002-7485-6034)
Article history:
Received:25/06/2025 Revised:26/07/2025 Accepted:11/07/2025

Abstract
Introduction: Hepatitis C virus has spread globally and is one of the main causes of liver cirrhosis and death worldwide. Currently, there is no suitable vaccine to prevent this virus. Glycoprotein E2 of this virus can stimulate the immune system. The main aim of this study was to construct an expression construct of the hepatitis C virus E2 gene in a bacterial host. In this study, glycoprotein E2 gene from serotype a1 was isolated and identified from patients, E2 gene was isolated by using RT-PCR and amplified Nested-PCR. The gene expression construct was made in pET21α vector and transferred into susceptible bacteria (DH5-α) E. coli Colonies containing the desired vector were selected based on ampicillin resistance and using the Colony PCR method. For final analysis of E2 gene cloning, the cloned fragments were sequenced and the sequencing results were blasted in the NCBI database. The results obtained from this study showed the correctness of the testing and cloning of the second protected E2 gene in pET21α vector and the expression of this gene in E. coli DH5α bacteria. Considering the role of glycoprotein E2 in binding and entering the cell, as well as its ability to stimulate the humoral and cellular immune system, E2 is a good candidate to study for the preparation of a vaccine. The recombinant structure of this study should be studied in the next steps for further investigation and investigation of protein structure and immunogenicity

Keywords: Hepatitis C virus, glycoprotein E2, Nested-PCR, cloning

زیست‌شناسی مولکولی کاربردی
سال چهارم/ شماره ۷/ تابستان ۱۴۰۴
صفحات : ۵-۱۹

طراحی و ساخت سازهٔ نوترکیب ژن E2 ویروس هپاتیت C ژنوتیپ a1 برای مطالعات بعدی واکسن

سمیه سبزعلی،[۱] کیانا شاهزمانی[۲*]
۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
(نویسنده مسئول: shahzamani.k@lums.ac.ir, ORCID: 0000-0002-7485-6034)
تاریخ بارگزاری: ۱۴۰۴/۰۴/۰۴ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۵/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۰

چکیده

ویروس هپاتیت C گسترش جهانی داشته و از علل اصلی ابتلا به سیروز کبدی و از مهم‌ترین دلایل مرگ‌ومیر در سرتاسر جهان است. در حال حاضر واکسن مناسبی برای پیشگیری از ابتلا به این ویروس وجود ندارد. گلیکوپروتئین E2 یکی از این پروتئین‌ها است که عامل اصلی در اتصال و ورود به سلول میزبان است. هدف اصلی این مطالعه ساخت سازه بیانی از ژن E2 ویروس هپاتیت C در میزبان باکتریایی بود. به منظور انجام این مطالعه ژن گلیکوپروتئین E2 از سروتیپ a1 از بیماران جداسازی و شناسایی شد. با استفاده از RT-PCR ژن جداسازی شد و در ادامه با استفاده از Nested-PCR تکثیر شد. سازه بیانی ژن در وکتور pET21α ساخته شد و به درون باکتری‌های مستعد E.col (DH5-α) ، انتقال داده و کلنی‌های حاوی وکتور مدنظر را براساس مقاومت به آمپی‌سیلین و با استفاده از روش Colony PCR انتخاب شد. به منظور آنالیز نهایی و تأیید کلونینگ ژن E2 قطعات کلون شده تعیین توالی شد و نتایج تعیین توالی، در

پایگاه NCBI بلست شد. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان‌دهنده صحت مراحل انجام آزمایش و کلون شدن دومین حفاظت شده ژن E2 در وکتور pET21α و بیان این ژن در باکتری E.coli DH5α بود. با توجه به نقش گلیکوپروتئین E2 در اتصال و ورود به سلول و همچنین توان تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی توسط آن، E2 کاندید مناسبی برای مطالعه برای تهیه واکسن است. سازه نوترکیب این مطالعه برای بررسی بیشتر و بررسی ساختار پروتئین و ایمنی‌زایی باید در مراحل بعدی مورد مطالعه قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: ویروس هپاتیت C، گلیکوپروتیئن E2، Nested-PCR، کلون‌سازی

مقدمه

ویروس هپاتیت C در سال ۱۹۷۰ به‌عنوان هپاتیت نان A، نانB شناخته شده[۱] و در سال ۱۹۸۹ با گزارش توالی ژنوم ویروسHCV نامیده شد[۲]. طبق اعلام سازمان جهانی بهداشت (WHO) حدود ۵۸ میلیون نفر مبتلا به HCV هستند و سالانه ۱,۵ میلیون نفر به این تعداد افزوده می‌شود. تخمین زده می‌شود که در سال ۲۰۱۹ تعداد ۲۹۰۰۰۰ نفر بر اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست داده باشند[۳]؛ اکثر افراد به نوع مزمن (پایدار) این بیماری مبتلا می‌شوند[۴]. تنها ۲۰٪ از افراد مبتلا، فرم حاد بیماری را نشان داده و حدود ۸۰٪ از موارد، عفونت ناشی از ویروس را به شکل مزمن نشان می‌دهند. ۱٪-۵٪ از بیماران به سیروز کبدی مبتلا می‌شوند[۵-۷].

HCV ویروس RNAدار با پلاریته مثبت، دارای پوشش، متعلق به خانواده هپاسی ویروس (hepaci virus) و جنس فلاوی‌ویریده (Flavi varidae) است[۸-۱۰]. ژنوم ویروس ۹۶۰۰ نوکلئوتید دارد و تنها حاوی یک ژن است که یک پلی‌پروتئین با ۳۰۰۰ اسید آمینه را که به چندین پروتئین ساختاری تبدیل می‌شود را کد می‌کند[۷ و ۸ و ۱۰-۱۲]. شش ژنوتیپ اصلی و بیش از ۷۰ زیرگونه مختلف از این ویروس در سرتاسر دنیا شناسایی شده است. ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ این ویروس گسترش جهانی داشته و بقیه ژنوتیپ‌ها مربوط به مناطق جغرافیایی خاص هستند. متأسفانه ایران از لحاظ جغرافیایی در منطقه پرشیوع خاورمیانه قرار گرفته است و طبق آمارهای رسمی وزارت بهداشت

میزان شیوع HCV در ایران ۱ درصد گزارش شده است. رایج‌ترین ژنوتیپ در ایران 1a است که از ۵۶۱۱۱ نفر شرکت‌کننده در مطالعه ۴۴/۹ درصد ژنوتیپ 1a و میزان ۳۹/۶ درصد مبتلا به ژنوتیپ 3a بودند. از این افراد ۲/۵ درصد عفونت HCV با دو یا چند ژنوتیپ داشتند که ژنوتیپ ترکیبی 1a و 3a رایج‌ترین ژنوتیپ‌های گزارش شده بودند. در ایران معتادان تزریقی منبع اصلی عفونت HCV هستند. شیوع HCV در بین معتادان تزریقی در زندان‌های کشور بین ۴۰ تا۹۰ درصد گزارش شده است[۱۳ و ۱۴]. در کل می‌توان گفت معتادان تزریقی مهم‌ترین فاکتور خطر برای ابتلا به HCV در ایران هستند و با توجه به افزایش میزان این افراد روند ابتلا به HCV در ایران سیر صعودی دارد[۱۵]. پیشگیری از هپاتیت C به‌عنوان یکی از تهدیدات بهداشت عمومی از جمله این اولویت‌هاست[۱۶]. در حال حاضر واکسن مناسبی برای پیشگیری از ابتلا به این بیماری وجود نداشته و تلاش‌ها برای ساختن واکسن مناسب در سراسر دنیا ادامه دارد. استفاده از نواحی با توالی ثابت و تحریک‌کننده سیستم ایمنی گزینه مناسبی برای ساخت و طراحی واکسن در این زمینه هستند. شواهد و مطالعات نشان‌دهنده استفاده از گلیکوپروتئین E2 ویروس در طراحی واکسن است[۱۷]. گلیکوپروتئین‌های E1 و E2، پروتئین‌های ضروری ویروس برای ورود و ادغام در سلول میزبان، همچنین فرار از سیستم ایمنی هستند[۱۸]. پروتئین E2 ویروس می‌تواند به‌عنوان یک ایمنوژن مناسب در طراحی واکسن استفاده شود، زیرا علاوه بر اپی‌توپ‌های محرک ایمنی هومورال، اپی‌توپ‌هایی برای تحریک ایمنی سلولار را نیز داراست[۱۷]. با توجه به موارد ذکر شده، هدف مطالعه حاضر ساخت سازه‌ای از ژن E2 از ویروس HCV-1a که سویه شایع در ایران است و از بیماران مبتلا به این بیماری جداسازی و تعیین توالی و شناسایی شده در باکتری *E.coli* DH5α بود تا در مطالعهٔ بعدی به‌عنوان کاندید واکسن در ارزیابی ایمنولوژیکی مورد بررسی قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق بیماران مبتلا به هپاتیت C مراجعه‌کننده به درمانگاه بیمارستان شهدای عشایر خرم‌آباد، به‌عنوان جمعیت مورد مطالعه در نظر گرفته شدند، با توجه به شیوع

ژنوتیپ 1a در ایران، این ژنوتیپ مورد بررسی قرار گرفت. روش کار در این پروژه Reverse Transcriptase-Nested Polymerase Chain Reaction (RT-Nested PCR) بود.

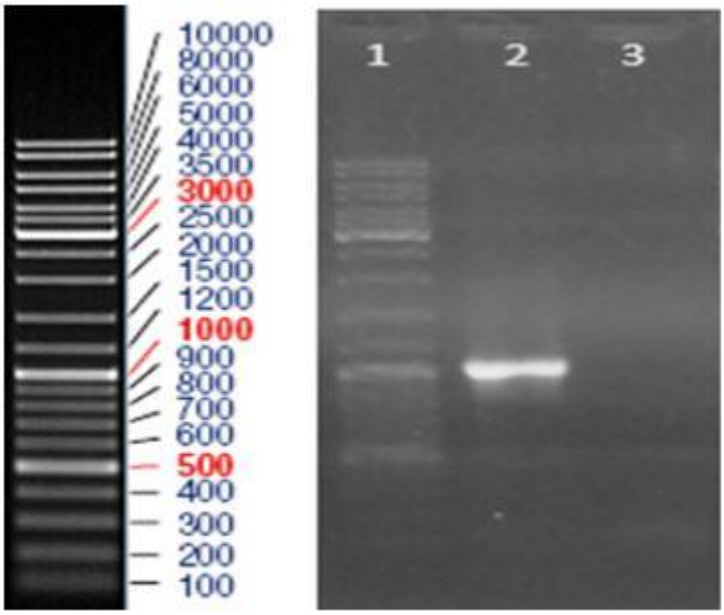
اولین مرحله برای انجام RT-Nested PCR استخراج ژنوم ویروس از پلاسمای بیماران بود که با استفاده از کیت QIAamp Viral RNA Mini (ایتالیا) مطابق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. با توجه به حساسیت بالای RNA استخراج شده نسبت به دمای محیط، بلافاصله بعد از استخراج RNA ویروس، مرحله سنتز cDNA انجام شد. در این پژوهش، برای جلوگیری از خطای احتمالی در طی واکنش از پرایمر رندوم هگزامر استفاده شد. مخلوط حاصل از پرایمرها و RNA به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۶۵ انکوبه شد. در ادامه بافر، RT،dNTPs، RNasin و DDW اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ انکوباسیون صورت گرفت. در انتها به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم RT مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۹۵ انکوبه شد. تا زمان انجام مرحله بعد آزمایش، محصول در فریزر $^{\circ}C$ ۲۰- قرار داده شد.

در ادامه برای تکثیر ژن مدنظر از واکنش PCR و Nested PCR استفاده شد. برای این منظور ابتدا واکنش PCR با شرایط دمایی $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۴ دقیقه، $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه، $^{\circ}C$ ۶۱ به مدت ۴۵ ثانیه، $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۱ دقیقه (به تعداد ۳۵ سیکل)، $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول این مرحله برای ادامه آزمایش و انجام Nested-PCR به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. مواد با غلظت‌های مشخص در حجم نهایی µl ۲۵ انجام شد و سیکل‌های واکنش مطابق شرایط دمایی $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۴ دقیقه، $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه، $^{\circ}C$ ۶۱ به مدت ۴۵ ثانیه، $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۱ دقیقه (به تعداد ۳۰ سیکل)، $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۷ دقیقه انجام شد. کیفیت محصول نهایی واکنش‌های PCR بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از آنزیم‌های NdeI و BamHI هضم آنزیمی بر روی محصول PCR صورت گرفت. در ادامه وکتور pET21α نیز توسط آنزیم‌های ذکر شده خطی گردید. در نهایت قطعه مذکور با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase به وکتور pET21α وارد شد. در ادامه وکتورهای حاوی ژن خارجی را با استفاده از روش شوک حرارتی به درون باکتری‌های مستعد (DH5-α)

E.coli، انتقال داده و کلنی‌های حاوی وکتور مدنظر را براساس مقاومت به آمپی‌سیلین و با استفاده از روش Colony PCR انتخاب کنیم. در مرحله نهایی آزمایش به منظور آنالیز نهایی و تایید کلونینگ ژن E2 در وکتور pET21α، هضم آنزیمی بر روی پلاسمید pET21α-HCV1α با آنزیم‌های محدودکننده NdeI و BamHI انجام شد و قطعات حاصل جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. بعد از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Bio Edith بررسی شد و در پایگاه NCBI بلست شد. نتایج نشان‌دهنده صحت مراحل انجام آزمایش و کلون شدن دومین حفاظت شده ژن E2 بود.

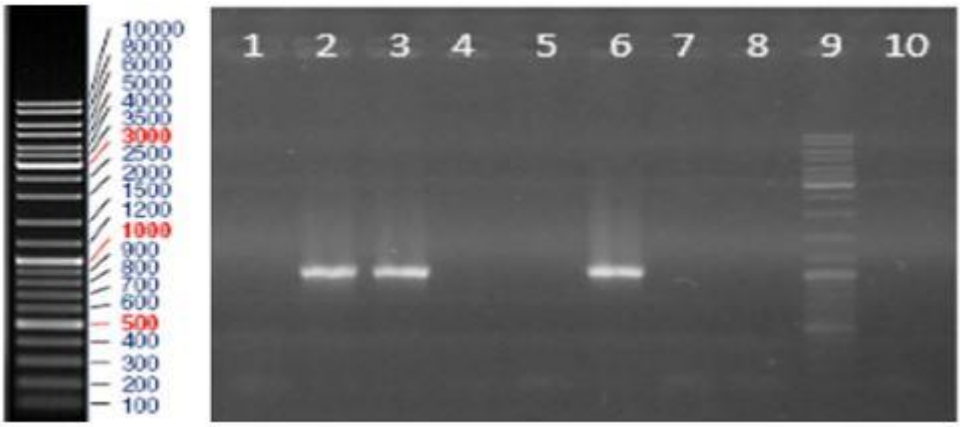
نتایج

این آزمایش به منظور ساخت سازه برای دومین حفاظت شده ژن E2 از ویروس HCV تیپ ۱α جداسازی شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان شهدای عشایر شهر خرم‌آباد انجام شد. بعد از استخراج ژن و سنتز cDNA و انجام PCR محصول آن بر روی ژل آگارز مشاهده شد. در ادامه واکنش Nested-PCR انجام شد و نتیجه آن روی ژل آگارز بررسی شد که نتایج آن در شکل ۱ نشان داده شده است.

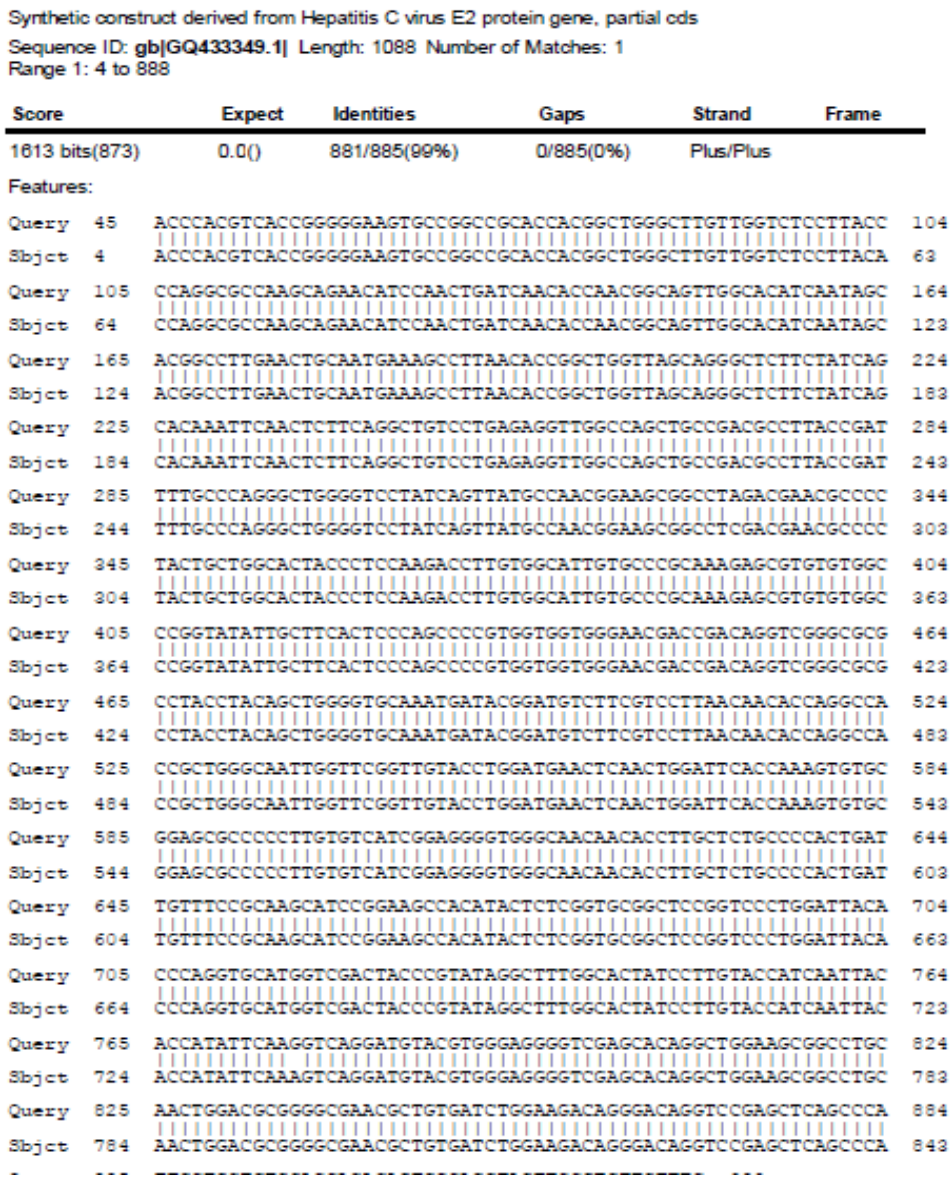


شکل ۱. محصول Nested-PCR: ۱: مارکر ۱kb، ۲: محصول Nested-PCR ۳: کنترل منفی

پس از مراحل لیگاسیون ژن E2، وکتورpET21 ، سلول‌های صلاحیت‌دار از E.Coli DH5α تهیه شد. سپس ترانسفورماسیون وکتور به درون باکتری و نهایتاً رشد کلنی باکتری روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین صورت گرفت. برای تأیید حضور pET21-E2 از روش Colony PCR استفاده شد. تمامی ۸ کلنی رشدیافته به‌عنوان الگو برای واکنش PCR قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تنها در کلنی‌های ۲، ۳ و ۶ ترانسفورماسیون موفق وکتور و ژن هدف صورت گرفته است (شکل ۲). در ادامه و به‌عنوان آخرین مرحله واکنش PCR برای تأیید حضور ژن در پلاسمید جداسازی شده صورت گرفت و محصول واکنش تعیین توالی شد و نتایج در پایگاه NCBI بلست شد که نتایج آن نشان‌دهنده شباهت ۹۵٪ با ژن E2 از ویروس هپاتیت C ثبت شده در این پایگاه بود (شکل ۳).



شکل ۲. بررسی نتایج Colony PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد، چاهک‌های ۸-۱ *کلون‌های ۸-۱*، چاهک شماره ۹: مارکرkb ۱، چاهک شماره ۱۰: کنترل منفی


Synthetic construct derived from Hepatitis C virus E2 protein gene, partial cds

Sequence ID: **gb|GQ433349.1|** Length: 1088 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 888

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1613 bits(873)	0.0()	881/885(99%)	0/885(0%)	Plus/Plus	

Features:

```
Query  45   ACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGGCCGCACCACGGCTGGGCTTGTTGGTCTCCTTACC  104
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4    ACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGGCCGCACCACGGCTGGGCTTGTTGGTCTCCTTACA  63

Query  105  CCAGGCGCCAAGCAGAACATCCAACTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAATAGC  164
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  64   CCAGGCGCCAAGCAGAACATCCAACTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAATAGC  123

Query  165  ACGGCCTTGAACTGCAATGAAAGCCTTAACACCGGCTGGTTAGCAGGGCTCTTCTATCAG  224
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  124  ACGGCCTTGAACTGCAATGAAAGCCTTAACACCGGCTGGTTAGCAGGGCTCTTCTATCAG  183

Query  225  CACAAATTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAGAGGTTGGCCAGCTGCCGACGCCTTACCGAT  284
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  184  CACAAATTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAGAGGTTGGCCAGCTGCCGACGCCTTACCGAT  243

Query  285  TTTGCCCAGGGCTGGGGTCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCTAGACGAACGCCCC  344
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  244  TTTGCCCAGGGCTGGGGTCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCTCGACGAACGCCCC  303

Query  345  TACTGCTGGCACTACCCTCCAAGACCTTGTGGCATTGTGCCCGCAAAGAGCGTGTGTGGC  404
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  304  TACTGCTGGCACTACCCTCCAAGACCTTGTGGCATTGTGCCCGCAAAGAGCGTGTGTGGC  363

Query  405  CCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCG  464
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  364  CCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCG  423

Query  465  CCTACCTACAGCTGGGGTGCAAATGATACGGATGTCTTCGTCCTTAACAACACCAGGCCA  524
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  424  CCTACCTACAGCTGGGGTGCAAATGATACGGATGTCTTCGTCCTTAACAACACCAGGCCA  483

Query  525  CCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTCACCAAAGTGTGC  584
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  484  CCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTCACCAAAGTGTGC  543

Query  585  GGAGCGCCCCCTTGTGTCATCGGAGGGGTGGGCAACAACACCTTGCTCTGCCCCACTGAT  644
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  544  GGAGCGCCCCCTTGTGTCATCGGAGGGGTGGGCAACAACACCTTGCTCTGCCCCACTGAT  603

Query  645  TGTTTCCGCAAGCATCCGGAAGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATTACA  704
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  604  TGTTTCCGCAAGCATCCGGAAGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATTACA  663

Query  705  CCCAGGTGCATGGTCGACTACCCGTATAGGCTTTGGCACTATCCTTGTACCATCAATTAC  764
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  664  CCCAGGTGCATGGTCGACTACCCGTATAGGCTTTGGCACTATCCTTGTACCATCAATTAC  723

Query  765  ACCATATTCAAGGTCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCGGCCTGC  824
            ||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  724  ACCATATTCAAAGTCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCGGCCTGC  783

Query  825  AACTGGACGCGGGGCGAACGCTGTGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCA  884
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  784  AACTGGACGCGGGGCGAACGCTGTGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCA  843
```

شکل ۳. نتیجه BLAST توالی و مشابهت ژن با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت با ویروس هپاتیت C به‌عنوان یک معضل مهم کلینیکی در سراسر جهان رو به گسترش است. به‌طور تقریبی هر سال ۳ تا ۴ میلیون مورد جدید عفونت HCV وجود دارد و برآوردهای کنونی نشان می‌دهد که حداقل ۳ درصد از مردم جهان دارای عفونت مزمن این ویروس می‌باشند. در ایران کمتر از ۱ درصد کل جمعیت کشور طبق آمارهای رسمی مبتلا به HCV بوده و ژنوتیپ‌های 1a و 3a رایج‌ترین ژنوتیپ‌های ایجادکننده این بیماری می‌باشد. معتادان تزریقی مهم‌ترین افراد در معرض خطر هستند. ابتلا به HCV در ایران در بین افراد مبتلا به تالاسمی، هموفیلی و دیالیزی نیزشایع است، اما میزان شیوع آن در مقایسه با کشورهای همسایه مثل عربستان، عراق و پاکستان بسیار کمتر است. عمده‌ترین راه انتقال این ویروس در ایران استفاده از سرنگ مشترک در بین معتادان تزریقی است.

درمان رایج و استاندارد به‌کارگیری peg IFN-α و ریباویرین است؛ هرچند در سال‌های اخیر داروهای جدیدی از جمله Sofosbuvir و Ledipasvir با اثربخشی بالاتر و عوارض جانبی کمتر معرفی شده‌اند، اما مهم‌ترین مشکل در استفاده از آن‌ها هزینه درمانی بالای این داروها است. متأسفانه در حال حاضر هزینه درمان با این داروها بسیار بالاست؛ بنابراین در حال حاضر درمان روتین برپایه peg IFN-α و ریباورین است. این روش درمانی کارآمد نبوده و بر روی همه ژنوتیپ‌ها اثر درمانی قطعی ندارد[۱۹]. ژنوتیپ 1a بیشترین مقاومت را به این نوع درمان نشان می‌دهد؛ بعلاوه این روش درمانی عوارض جانبی شدیدی دارد که از جملۀ آن‌ها می‌توان به افسردگی، کم‌خونی و لنفوپنی اشاره کرد[۲۰]. امروزه تلاش‌های بسیاری برای به‌کارگیری یک روش پیشگیرانه برای مقابله با HCV در سراسر جهان توسط محققین در حال انجام است. بخش‌های زیادی از ژنوم و پروتئین‌های ویروس برای این هدف مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته‌اند. از جمله پروتئین کپسید ویروس، گلیکوپروتئین‌های انولوپ ویروس، پروتئازهای ویروسی و پلیمراز ویروس که در میان تمامی موارد ذکرشده گلیکوپروتئین E2 دارای بیشترین قابلیت برای تولید واکسن است[۲۱].

قوی‌ترین پاسخ ایمنی در بدن در برابر ناحیه E2 ایجاد می‌شود. این پروتئین هدف

اصلی ایمنی هومورال محسوب می‌شود. در این ناحیه دو بخش به نام اپی‌توپ ۱ و اپی‌توپ۲ وجود دارد که دارای توالی‌های حفاظت شده هستند. گلیکوپروتئین E2، اصلی‌ترین بخش ویروس برای ورود به سلول هدف بوده و اولین گام در سیر پیدایش عفونت به‌شمار می‌رود. این گلیکوپروتئین به گیرنده‌هایی مثل CD-81 و SR-B1 متصل می‌گردد. در واقع بخش pePHD از گلیکوپروتئین E2 و بخش PKR-bd از NS5A نقش اساسی در مهار PKR ایفا می‌کنند. PKR، یکی از کینازهای داخل سلولی است که پس از ورود اینترفرون به سلول تولید می‌شود. این کیناز موجب فسفریلاسیون یکی از عوامل شروع ترجمه به‌نام elF2α می‌شود. به‌طوری‌که پروتئین سازی مهار گشته و به‌دنبال آن تکثیر ویروس در سلول‌های آلوده متوقف می‌شود. در واقع القاء تولید PKR یکی از راهکارهای مهم اینترفرون در حذف ویروس‌های RNA دار در سلول‌های آلوده است[۲۲]. واکسن‌های تولیدی برپایه DNA نوترکیب در حوزه تولید واکسن برای این بیماری مورد توجه ویژه قرار دارند. در این مطالعه ژن ساختاری E2 که خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی سلولی و هومورال آن ثابت شده است[۲۳] و در مطالعات مختلف از بخش‌های مختلف این پروتئین، به‌همراه سایر پروتئین‌ها و ادجوانت‌ها، به منظور تحریک بهتر سیستم ایمنی تهیه شده است[۲۴ و ۲۵] و به‌عنوان کاندید مناسب جهت تهیه واکسن زیرواحدی انتخاب شد و به‌طور موفقیت‌آمیزی در وکتور کلون شده و در میزبان نهایی وارد شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد باید در ادامه بیان پروتئین و ساختار پروتئین تولیدی و میزان پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه این سازه در بدن میزبان، مورد بررسی قرار بگیرد. ساخت این وکتور می‌تواند گامی برای توسعه واکسن اختصاصی برای ژنوتیپ ۱a (شایع‌ترین ژنوتیپ شناسایی شده در ایران) باشد، که پیشنهاد می‌شود در ادامه این مسیر، بیان این وکتور بیانی در سلول‌های مستعد بررسی شده و ساختار پروتئین تولیدی مورد بررسی قرار گرفته و در ادامه میزان ایمنی‌زایی آن مورد بررسی قرار بگیرد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

منابع

1. Alexopoulou, A., Dourakis, S. (2005). "Genetic heterogeneity of hepatitis viruses and its clinical significance". *Current drug targets-inflammation & allergy*, 4(1):47-55. doi: 10.2174/1568010053622867.
2. Choo, Q-L., Kuo, G., Weiner, A.J. (1989). "Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome". *Science*, 244(4902):359-62. doi: 10.1126/science.2523562
3. Taha, G., Ezra, L. (2023). "Abu-Freha N. Hepatitis C elimination: opportunities and challenges in 2023". *Viruses*,15(7):1413. doi: 10.3390/v15071413
4. Anwar, M.I., Rahman, M., Hassan, M.U., Iqbal, M. (2013). "Prevalence of active hepatitis C virus infections among general public of Lahore, Pakistan". *Virology journa*,10(1):351. doi: 10.1186/1743-422X-10-351
5. Cai, Z., Zhang, C., Chang, K-S., Jiang, J., Ahn, B-C., Wakita, T., et al. (2005). "Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells". *Journal of virology*, 79(22): 13963-73 doi: 10.1128/JVI.79.22.13963-13973.2005.
6. Lee, K.J., Suh, Y-A., Cho, Y.G., Cho, Y.S., Ha, G.W., Chung, K-H., et al. (1997). "Hepatitis C virus E2 protein purified from mammalian cells is frequently recognized by E2-specific antibodies in patient sera". *Journal of Biological Chemistry*, 272(48):30040-6. doi: 10.1074/jbc.272.48.30040
7. Sharma, S.D., Hepatitis, C. (2010). "virus: molecular biology & current therapeutic options". *Indian J Med Res*, 131: 17-34.
8. Bianchi, A., Crotta, S., Brazzoli, M., Foung, S.K., Merola, M. (2010). "Hepatitis C virus e2 protein ectodomain is essential for assembly of infectious virions". *International journal of hepatology*, 2011. doi: 10.4061/2011/968161
9. Kong, L., Giang, E., Nieusma, T., Robbins, J.B., Deller, M.C., Stanfield, R,L., et al. (2012). "Structure of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 antigenic site 412 to 423 in complex with antibody AP33". J*ournal of virology*, 86(23):13085-8 doi: 10.1128/JVI.01939-12.
10. Weng, L., Du, J., Zhou, J., Ding, J., Wakita, T., Kohara, M., Toyoda, T. (2009). "Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain". *Archives of virology*, 154(5): 765-73. doi: 10.1007/s00705-009-0366-0
11. Inamullah, I., Idrees, M., Ahmed, H., Ali, M., Ali, L., Ahmed, A. (2011). "Hepatitis C virus genotypes circulating in district Swat of Khyber Pakhtoonkhaw, Pakistan". *Virology journal*, 8(1): 16. doi: 10.1186/1743-422X-8-16.
12. Owsianka, A.M., Tarr, A.W., Keck, Z-Y., Li, T-K., Witteveldt, J., Adair, R., et al. (2008). "Broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the hepatitis C virus E2 glycoprotein". *Journal of General Virology*, 89(3): 653-9.

doi: 10.1099/vir.0.83386-0
13. Taherkhani, R., Farshadpour, F. (2015). "Epidemiology of hepatitis C virus in Iran. World Journal of Gastroenterology": *WJG*, 21(38): 10790. doi: 10.3748/wjg.v21.i38.10790
14. Shahzamani, K., Sabzali, S. (2019). "Therapeutic vaccines of hepatitis C virus with emphasis on DNA" v*accine. Govaresh*, 24(1):12-21.
15. Sefidi, F.J., Keyvani, H., Monavari, S.H., Alavian, S.M., Fakhim, S., Bokharaei-Salim, F. (2013) "Distribution of hepatitis C virus genotypes in Iranian chronic infected patients". *Hepatitis monthly*,13(1). doi: 10.5812/hepatmon.7991
16. von Delft, A., Donnison, T.A., Lourenço, J., Hutchings ,C., Mullarkey, C.E., Brown, A., et al. (2018). "The generation of a simian adenoviral vectored HCV vaccine encoding genetically conserved gene segments to target multiple HCV genotypes". *Vaccine* , 36(2):313-21. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.10.079
17. Torresi, J., Johnson, D., Wedemeyer, H. (2011). "Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus". *Journal of hepatology*, 54(6):1273-85. doi.org/10.1016/j.jhep.2010.09.040
18. Chen, Z., Zhu, Y., Ren, Y., Tong, Y., Hua, X., Zhu, F., et al. (2011). "Hepatitis C virus protects human B lymphocytes from Fas-mediated apoptosis via E2-CD81 engagement". *PLoS One*, 6(4):e18933. doi: 10.1371/journal.pone.0018933
19. Roohvand, F., Kossari, N. (2012). "Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities". *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(4):391-415. doi: 10.1517/13543776.2012.673589
20. Roohvand, F., Kossari, N. (2011). "Advances in hepatitis C virus vaccines, Part one: Advances in basic knowledge for hepatitis C virus vaccine design". *Expert opinion on therapeutic patents*, 21(12):1811-30. doi: 10.1517/13543776.2011.630662
21. Holmström, F., Pasetto. A., Nähr, V., Brass. A., Kriegs. M., Hildt. E., et al. (2013). "A synthetic codon-optimized hepatitis C virus nonstructural 5A DNA vaccine primes polyfunctional CD8+ T cell responses in wild-type and NS5A-transgenic mice". *The Journal of Immunology*, 190(3):1113-24. doi: 10.4049/jimmunol.1201497
22. Raza, A., Zafeer, M., Arshad, B.G., Shakeel, S.N. (2012). "Mutational analysis of various sub genomic regions of HCV and their role in interferon therapy response". I*nternational Journal of Science & Emerging Technologies*, 4(3).
23. Johnson, J., Freedman, H., Logan, M., Wong, J.A.J-X., Hockman, D., Chen, C. et al. (2021). "A recombinant hepatitis C virus genotype 1a E1/E2 envelope glycoprotein vaccine elicits antibodies that differentially neutralize closely related 2a strains through interactions of the N-terminal hypervariable region 1 of E2 with scavenger receptor B1". *Journal of Virology*, 22(1) jvi. 00810-19.

doi: 10.1128/JVI.00810-19
24. Yazdanian, M., Memarnejadian, A., Khanahmad Shahreza, H., Soleimanjahi, H., Motevali, F., Roohvand, F. (2013). "Construction and evaluation of DNA vaccine encoding fusion protein of hepatitis C virus core protein and hepatitis B surface antigen as a vaccine candidate". *Journal of Isfahan Medical School*, 31(226):150-60.
25. Kord, E., Dubuisson, J., Vausselin, T., Amirzargar, A.A., Yekaninejad, M.S., et al. "A DNA Vaccine Expressing Fusion Protein E2-NT(gp96) Induces Hepatitis C Virus Cross-Neutralizing Antibody in BALB/c Mice". *Hepat Mon*, 19(9):e96347.