کلونینگ و تخلیص پپتید (P-99B) مهارکننده گیرنده اسپایک SARS-Cov2

1-سید علیرضا طبیب 2- فرنوش فرزام 3- خسرو خواجه 4-حسن جلیلی 5-بهاره دبیرمنش 6-سید شهریار عرب

1-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس

2-دانشجوی دکتری بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس

3-استاد گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

4- دانشیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

5-استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

6-دانشیار گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

سید علیرضا طبیب:**tabibalireza@yahoo.com**

فرنوش فرزام:**farnooosh.farzam@gmail.com**

خسرو خواجه :**khajeh@modares.ac.ir**

حسن جلیلی:**hjalili@yahoo.com**

بهاره دبیرمنش:**dabirmanesh@modares.ac.ir**

سید شهریار عرب:**sh.arab@modares.ac.ir**

چکیده

در سال2019 ویروسی به نام SARS-CoV-2 باعث وقوع همه‌گیری جهانی بیماری COVID-19 شد. از میان پروتئین‌های مختلف این ویروس، پروتئین اسپایک با میانکنش با گیرنده ACE-2 نقش مهمی در ورود ویروس به سلول ایفا می‌کند.در این پژوهش،با هدف اختلال در این میانکنش، پپتیدی با کمک مطالعات بیوانفورماتیکی به نام P-99B طراحی‌شد. توالی ژن همراه با تگ مناسب سفارش داده‌شد.بهینه‌سازی بیان، تخلیص، جداسازی تگ و تخلیص پپتید انجام و ساختار توسط تکنیک دورنگ

نمایی‌دورانی(CD) بررسی‌شد.میزان سمیت و عملکرد توسط تکنیک‌های MTT و VNT سنجیده شد.نتایج نشان‌داد که این پپتید توان رقابتی بالایی با اسپایک در اتصال به گیرنده ACE-2 دارد و به راحتی بیان و تخلیص می شود و دارای پایداری ساختاری مورد نظر است. این پپتید سمیت کمی دارد و با موفقیت می تواند جلوی ایجاد عفونت را بگیرد.

کلیدواژه‌ها: 1- سندرم حاد تنفسی 2، 2- کووید 19، 3-پروتئین اسپایک، 4- مبدل آنژیوتانسین 2 ،5-پپتید مهار کننده.

1.مقدمه

در سال 2019 ویروس جدیدی نام SARS-CoV-2 در ووهان چین برای اولین بار شناسایی شد که ایجادکننده بیماری COVID-19 است. این ویروس به سرعت در سراسر دنیا گسترش یافت و موجب یک پاندمی عظیم شد که تا الان یعنی مارس 2022 طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)موجب ابتلای بیش از 460 ملیون و مرگ بیش از 6 ملیون نفر در سرتاسر جهان شده است.این پاندمی موجب مشکلات اقتصادی ، اجتماعی،روحی و روانی زیادی شده و پایان دادن به آن به یک هدف مهم برای بشریت مبدل شده است.

2.تئوری و پیشینه تحقیق

از میان پروتئین های مختلف موجود در این ویروس، پروتئین اسپایک نقش مهمی در ورود ویروس به سلول و ایجاد بیماری دارد. این پروتئین در سطح ویروس قرار دارد و به دو زیر واحد عملکردی، S1 و S2 تق سیم می شود، که به ترتیب در ات صال به سلول میزبان و ادغام غ شا نقش مهمی را ایفا می‌کنند. زیرواحد S1 دارای دامین مت صل شونده به گیرنده (RBD) ا ست که با ات صال به گیرنده مبدل آنژیوتانسین 2 (ACE2) ، راه را برای ورود ویروس به سلول هموار می‌کند.بنابراین اختلال در این میانکنش امری کلیدی در پیشگیری و درمان بیماری است. راهکارهای مختلفی برای ممانعت از این میانکنش پیشنهاد شده است.

3. مواد و روش‌ها

در این پژوهش با هدف اختلال در میانکنش بین RBD و ACE2، با بررسی بیوانفورماتیکی محل این میانکنش ،پپتیدی با استفاده از نرم افزارهای GROMACS، OSPREY و MM/PBSA طراحی شد که P-99B نام گرفت. توالی ژنی پپتید طراحی شده به همراه تگ مناسب جهت بیان در *E.coli* بهینه و در وکتور PUC57 سفارش داده شد. سپس توسط دو آنزیم برش‌دهندهٔ Nde1 و Xho1 به وکتور pET26b(+) ساب کلون و در نهایت جهت بیان به باکتری *E.coli* BL21 (DE3) منتقل شد. شرایط بهینه بیان در باکتری،1 میلی‌مولار IPTG ،$37^{o}C$ دما و 4 ساعت زمان انکوبا سیون بود. سپس سوموپپتید تخلیص، دنبالهٔ سومو تو سط آنزیم

سـومو‌پروتئاز حذف و در نهایت پپتید خالص گردید.بررسـی سـاختار ثانویه پپتید مورد نظر با اسـتفاده از تکنیک دورنگ نمایی دورانی(CD) انجام شد. مطالعات سنجش عدم سمیت و فعالیت پپتید به‌ترتیب توسط آزمون MTT و VNT انجام گرفت. نتایج نشان داد که این پپتید در بررسـی های بیوانفورماتیکی دارای انرژی پیوندی بالایی در اتصـال به RBD ویروس اسـت و تمایل اتصـال ا سپایک به آن بی‌شتر از گیرنده ACE2 ا ست.این پپتید به صحولت بیان و تخلیص می شود و سمیت کمی برای سلول ها دارد. همچنین به طور موثری جلوی ورود ویروس به سـلول و ایجاد آلودگی را در دوز های پایین می‌گیرد. داده های جذب CD نشـان داده است که این پپتید دارای ساختار موتیف مشابه مورد نظر در گیرنده ACE2 است.

4.نتایج و بحث

درانتها می‌توان نتیجه گرفت که این پپتید با موفقیت می‌تواند جلوی ایجاد عفونت توسـط ویروس SARS-CoV-2 را بگیرد و آن را مهار کند.با توجه به ماهیت مهارکنندگی دامین RBD ، می‌توان انتظار داشت که از این پپتید به توان به شکل های مختلفی جهت پیشگیری و درمان این بیماری در آینده نزدیک استفاده کرد.