

کلون سازی، تعیین ترادف و بیان ژن Core ویروس هپاتیت C جدا شده از یک بیمار ایرانی مبتلا به هپاتیت مزمن

نسرین راستگو^۱، علی کرمی^{۲*}، فرزانه صباحی^۳

- ۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دکتری تخصصی بیوتکنولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۳- دکتری تخصصی ویروس شناسی، دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: ویروس هپاتیت C یکی از مهمترین عوامل ایجادکننده هپاتیت حاد و مزمن، سیروز و سرطان کبد در سطح جهان محسوب می شود. به دلیل روند رو به رشد ابتلا به HCV در سطح دنیا تحقیقات گسترده ای در نقاط مختلف جهان برای افزایش کیفیت روشهای تشخیصی و تعیین ژنوتیپ ویروس در حال انجام است. **روشها:** در این تحقیق ناحیه ژنی مربوط به پروتئین نوکلئوکپسید ویروس (ژن core) که یک ناحیه بسیار حفاظت شده در طول ژنوم ویروس است، از سرم یک بیمار ایرانی با روش RT-PCR جدا شده و پس از کلون سازی در وکتور pUC ۱۸ با پرایمرهای یونیورسال تعیین ترادف شد. به منظور تولید پروتئین نوترکیب Core ژن تعیین ترادف شده در وکتور بیانی PET ۲۸ A کلون شد و پلاسمید نوترکیب حاصل به باکتری (۳ DE) BL ۲۱ منتقل گردید.

نتایج و بحث: نتیجه تعیین ترادف نشان داد که ژن Core جدا شده از یک بیمار ایرانی ۹۶ درصد شباهت با سویه ۱a و ۹۵ درصد شباهت با سویه ۱b ویروس هپاتیت C دارد. این نتیجه با نتایج سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه مطابقت دارد. وجود باند ۲۳/۵ کیلودالتون در ژل SDS-PAGE و تست وسترن بلات با آنتی بادیهای مونوکلونال بیان پروتئین Core را اثبات نمود. با تولید انبوه این پروتئین، می توان از آن برای استفاده در کیت های تشخیصی بهره جست.

کلید واژگان: هپاتیت C، ژن Core، تعیین ترادف، بیان پروتئین Core

۱- مقدمه

سیروز کبدی می رسد. حدود ۵ درصد موارد نیز، خطر ابتلا به سرطان کبد برای فرد آلوده وجود دارد [۲،۱]. ویروس هپاتیت C یک ویروس RNA دار تک رشته ای مثبت، متعلق به خانواده فلاوی ویروسهاست^۱. ژنوم این ویروس بسیار متنوع بوده که بر

ویروس هپاتیت C که تقریباً ۱ درصد جمعیت جهان را آلوده کرده، مهمترین عامل به وجود آورنده هپاتیت غیر A و B پس از تزریق خون، محسوب می شود. در بیش از ۷۵ درصد موارد عفونت با HCV، بیماری پیشرفت کرده و به مرحله مزمن و

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، بخش بیوتکنولوژی و بیولوژی مولکولی، تلفن: ۸۸۰۵۷۰۲۳، صندوق پستی ۵۸۱-۱۹۹۴۵، دورنگار ۸۸۰۳۹۸۸۳

E-mail: Alika95@nregeb.ac.ir

1. Flaviviruses

۲- مواد و روشها

۲-۱- استخراج RNA

نمونه سرم از یک بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن که با تستهای سرم شناسی و کیتهای تجاری ELISA و RIBA وجود آنتیبادیهای ضد HCV در آنها مثبت و تأیید شده بود، تهیه شد.

استخراج RNA ژنومی از سرم فرد بیمار anti-HCV مثبت با استفاده از کیت استخراج RNA به نام تجاری RNXTM-plus (شرکت سیناژن) انجام شد. روش انجام کار به این ترتیب بود که ۵۰۰ μl نمونه سرم به ۴۵۰ μl محلول استخراج سرد اضافه شد و بعد از ورتکس کردن به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس ۱۰۰ μl کلروفرم-ایزواکلیل الکل (۱:۲) به مخلوط اضافه شده و پس از هم زدن در ۱۲۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. به فاز آبی یک حجم ایزوپروپانل اضافه شده و با واژگون کردن لوله آزمایش هم زده شد و ۲۰ دقیقه در ۲۰°C- قرار داده شد و پس از مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. پس از شستشوی رسوب با اتانل ۷۵ درصد و خشک کردن آن در آب مقطر تزریقی تیمار شده با DEPC حل شد.

۲-۲- ساخت cDNA

ساخت cDNA مربوط به ژن core با پرایمرهای ویژه (bext^۱ و ext^۲) انجام شد. این پرایمرها از روی نقشه ژنتیکی ژنوم سویه های ۱b و ۴ ویروس هپاتیت C طراحی شده بود. ترادف این پرایمرها مکمل ناحیه فرودست ژن core و ویروس هپاتیت C بود. به منظور تکثیر cDNA حاصل دو سری پرایمر حاوی جایگاه برش آنزیمی برای آنزیمهای محدودگر *EcoRI* و *BamHI* طراحی شد. پرایمر Forward که دارای جایگاه برش مخصوص آنزیم *EcoRI* در انتهای ۵ درجه خود بود، مکمل ناحیه فرادست ژن core (ناحیه ۵'UTR) که ناحیه حفظ شده در ژنوم است، بود. پرایمرهای معکوس که دارای جایگاه برش آنزیمی برای آنزیم *BamHI* بود، مکمل ناحیه فرودست ژن core و بر اساس نقشه ژنتیکی سویه های ۱b و ۴ طراحی شدند (به ترتیب پرایمرهای R_۱ و R_۲). تکثیر cDNA با پرایمرهای F و R_۱ و نیز F و R_۲ انجام گرفت.

۲-۳- کلون سازی ژن Core در پلاسمید pUC18

محصول PCR قطعات cDNA پس از خالص سازی با روش فنل

اساس این تنوع به شش ژنوتایپ اصلی طبقه بندی می شود. در بین این ژنوتایپها موقعیت نوکلئوتیدی روی ژنوم ۳۱ تا ۳۴ درصد تفاوت نشان می دهند. هر گروه ویروسی به چند زیر گروه تقسیم می شود که ترادف نوکلئوتیدی در آنها ۲۰ تا ۳۰ درصد تفاوت دارند [۳]. RNA ژنومی حدود ۹۵۰۰ bp طول دارد و از یک چهارچوب خواندنی بزرگ تشکیل شده است که یک پروتئین با طول ۳۰۱۰ تا ۳۰۳۳ اسید آمینه را کد می کند [۴، ۵]. ترادف کدکننده ژنوم به دو ناحیه غیرکدشونده ۵' و ۳' به نام ناحیه UTR ختم می شود [۶]. ناحیه ژنومی کدکننده پروتئین core و ویروس HCV در انتهای ۵' ژنوم پس از ناحیه UTR قرار دارد. پروتئین core از طریق یک سیگنال پپتید موجود در غشای شبکه آندوپلاسمی به کمک پروتئازهای سلولی از پلی پروتئین جدا می شود [۷]. این پروتئین یک مولکول هیدروفیل با بار مثبت است که حدود ۲۰ درصد آن را ریشه های لیزین و آرژینین تشکیل می دهند که از طریق این اسید آمینه های با بار مثبت به ژنوم، که دارای بار منفی است، متصل می شوند [۸]. طول این ژن ۵۷۳ باز است که با نوکلئوتید ۳۴۲ که اولین باز کدن شروع ATG است آغاز شده و تا نوکلئوتید ۹۱۴، که آخرین باز باقیمانده آرژینین است، ادامه دارد. مطالعات نشان می دهند که ناحیه کدکننده پروتئین core در ژنوم ویروس بسیار حفاظت شده است و درصد جهش در این ناحیه بسیار کم است بنابراین در مطالعات تعیین ژنوتیپ حایز اهمیت است [۹]. از طرفی پروتئین core در ایجاد پاسخ ایمنی هم بسیار مؤثر ظاهر شده است. در یک بررسی وجود ۴ اپی توپ آنتی ژنی در پروتئین core شناسایی شده که قادر به ایجاد پاسخ ایمنی همورال و القای تولید آنتی بادی ضد این پروتئین ویروسی می باشد [۱۰]. همچنین اپی توپ های آنتی ژنی القاکنده لئوسیت های T سیتوتوکسیک ضد ویروسی هم در انتهای کربوکسیل پروتئین core در محل اسید آمینه های ۱۲۱ تا ۱۴۰ شناسایی شده است [۱۱]. از طرفی چندین بررسی نشان داده است که در تستهای سرم شناسی برای تشخیص آنتی بادیهای ضد HCV آنتی ژن core بسیار حساستر از آنتی ژنهای موجود دیگر از جمله C-۱۰۰ (پپتید مشتق از پروتئین NS_۳-NS_۴) عمل می کند [۱۲، ۱۳]. و نیز به دلیل درصد بالای حفظ شدگی در این پروتئین می توان سیستمهای تشخیصی بر پایه پروتئین core طراحی کرد که از حساسیت و ویژگی بسیار بالاتری برخوردار باشند [۱۴]. در این تحقیق ژن core از سرم یک بیمار ایرانی با هپاتیت مزمن جدا سازی و ردیف نوکلئوتیدی آن تعیین شده است و با ترادف ژنی موجود در بانک ژنی مقایسه شد. ادامه کلون کردن و بیان ژن Core به منظور استفاده در سیستمهای تشخیصی نیز انجام گرفت.

دمای ۲۸°C قرار گرفت و به وسیله عمل سانتیفوژ و سونیکاسیون، محلول رویی ورسوب حاصل برای تولید پروتیین Core با آنالیز وسترن بلات جمع آوری گردید. به طور خلاصه نمونه های پروتئینی به چاهک های ژل پلی آکریل آمید ۱۲/۵ درصد وارد شده و SDS-PAGE انجام گرفت. سپس بر روی غشای PVDF الکتروترانسفر شد. پس از بلوکه کردن غشا به وسیله non-fat dry milk با آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی Core (Biogenesis, UK) و آنتی بادی ضد His (Roche, Germany) انکوبه گردید و مشاهده باندهای پروتئینی با استفاده از آنتی بادی کونژوگه شده با HRP (DAKO, Denmark) انجام پذیرفت.

۳- نتایج

۳-۱- جداسازی ژن core از سرم فرد بیمار anti-HCV مثبت با پرایمرهای ویژه ژنوتیپهای ۱b و ۴ ویروس

RNA ژنومی از سرم بیمار anti-HCV مثبت استخراج شد و جذب آن در طول موج ۲۶۰ اندازه گیری شد. سپس با پرایمرهای ext ۴ و bext ۱ cDNA سنتز شد و به روش PCR با پرایمرهای F_۱ و R_۱ و نیز F_۲ و R_۲ تکثیر شد. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که فقط واکنش PCR ای که از پرایمرهای تایپ 1b برای تکثیر استفاده شده بود، جواب مثبت داده و برای پرایمرهای تایپ ۴ نتیجه منفی بود (شکل ۱). همانطور که در شکل مشخص است وجود باند تقریباً ۶۸۰ bp در نمونه هایی که از پرایمرهای bext ۱ برای سنتز cDNA آنها استفاده شده و بعد با پرایمرهای یونیورسال و 1b تکثیر شد، نشان دهنده تکثیر ژن Core با این پرایمرهاست. هیچ باندهای در لاینهای PCR مربوط به پرایمر ext ۴ بر روی ژل دیده نمی شود.

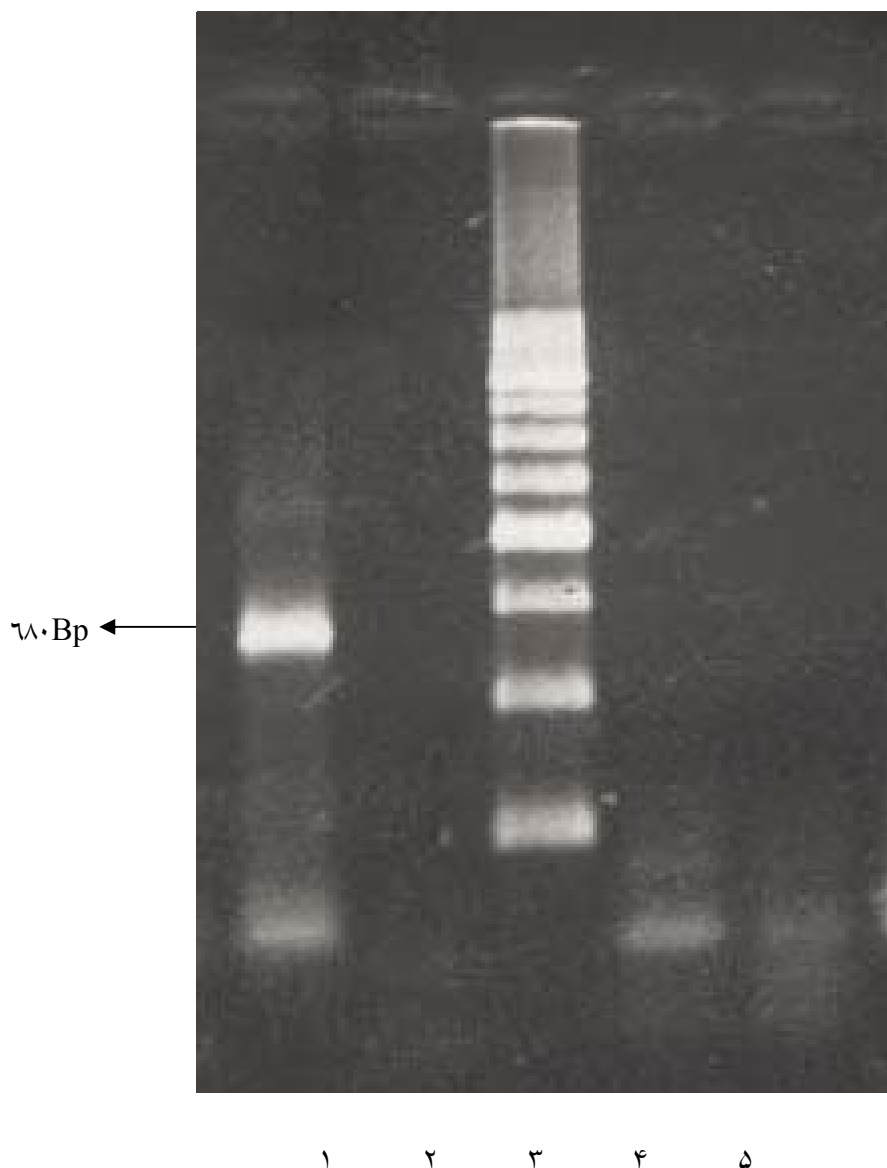
۳-۲- کلون سازی ژن core در وکتور pUC۱۸ تعیین ترادف ژن

همانطور که قبلاً اشاره شد محصول PCR ژن Core و نیز وکتور pUC۱۸ با آنزیمهای *EcoRI* و *BamHI* هضم شده و واکنش الحاق و ترانسفورم کردن انجام شد. از چندین کلونی سفید و نیز یک کلونی آبی به عنوان کنترل منفی استخراج پلاسمید صورت

کلروفرم، با آنزیمهای *EcoRI* و *BamHI* بریده شد. به این ترتیب که به ازای هر میکرولیتر محصول PCR تخلیص شده یک واحد از هر یک از آنزیمهای فوق اضافه شده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. محصول هضم حاصل با روش فنل-کلروفرم تخلیص شد. پلاسمید pUC۱۸ نیز با دو آنزیم فوق برش داده شد و محصول هضم از روی ژل آگاروز ۱ درصد تخلیص گشت. سپس به نسبت مولی ۱:۳ محصول برش و DNA پلاسمیدی توسط آنزیم *T4 DNA ligase* به هم متصل شدند. واکنش اتصال به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶°C انجام گرفت. محصول الحاق به باکتری DH5α منتقل شد و در پلیت LB آگار حاوی ۷μl از IPTG (۲۰٪w/v) و ۴۰μl از X-Gal (۲۰٪w/v) و آنتی بیوتیک Ampicilin کشت داده شد. از آنجا که سایت کلونینگ وکتور pUC۱۸ در وسط ژن LacZ قرار گرفته است، کلونهای نو ترکیب به دلیل عدم فعالیت این ژن کلونیهای سفید رنگ و کلونیهای طبیعی ترانسفورم نشده یا کلون نشده کلونیهای آبی رنگ بر روی این محیط افتراقی ایجاد می کنند. چندین کلون نو ترکیب که در این محیط به رنگ سفید ظاهر شده بودند انتخاب شده و صحت کلونینگ در آنها با روش PCR با پرایمرهای اختصاصی 1b و 5'UTR و هضم آنزیمی با آنزیمهای محدودگر *EcoRI* و *BamHI* تایید شد. برای تأیید توالی صحیح، یکی از پلاسمیدهای نو ترکیب حاصل با پرایمرهای M13/pUC reverse sequencing primer و M13/pUC sequencing primer تعیین ترادف شد (شرکت Primm ایتالیا) و با ترادفهای موجود در بانک ژنی مقایسه گردید.

بیان پروتئین نو ترکیب Core در باکتری

ژن HCV Core در سایتهای *HindIII* و *EcoRI* وکتور بیان pET۲۸A ساب کلون شد. پس از تأیید حضور پلاسمیدهای نو ترکیب با PCR و آنالیز هضم آنزیمی پلاسمید pET۲۸A-Core به سویه BL۲۱(DE۳) باکتری کشت داده شد. رقت ۱:۱۰۰ محیط کشت در منابع کشت ۲XTY (۱۰g/L yeast extract, ۱۶g/L tripton, ۵g/L NaCl) کانامایسین (۵۰ uL/m) و گلوکز ۱ درصد قرار داده شد و در انکوباتور ۳۷°C برای ۲ ساعت قرار گرفت و سپس در دور ۴۰۰۰g برای ۵ دقیقه سانتیفوژ شد. رسوب با محیط ۲XTY B-D-thiogalactopyranoside (IPTG) و رساندن غلظت نهایی به ۱mM آماده شد. در مرحله بعدی، باکتری به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار در

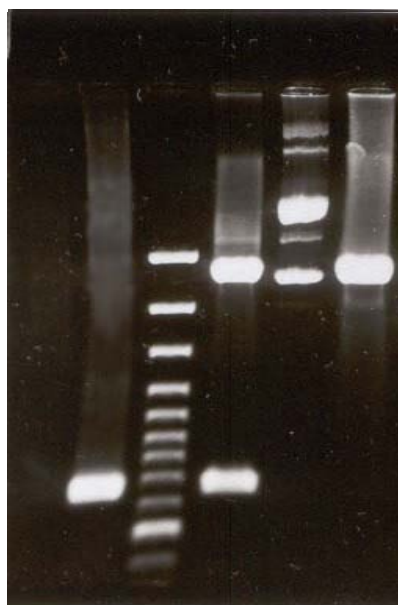


شکل ۱ جدا سازی ژن core از سرم بیمار ایرانی

چاهک ۱: cDNA ساخته شده با پرایمر ۱bext و تکثیر شده با پرایمرهای ۵'UTR, ۱b چاهک ۲: cDNA ساخته شده با پرایمر ۱bext و تکثیر شده با پرایمرهای ۵'UTR, ۴ چاهک ۳: نشانگر وزن مولکولی ۲۵۰ جفت بازی، چاهک ۴: cDNA ساخته شده با پرایمر ۴ext و تکثیر شده با پرایمرهای ۵'UTR, ۱b چاهک ۵: cDNA ساخته شده با پرایمر ۴ext و تکثیر شده با پرایمرهای ۵'UTR, ۴

(شکل ۲). یکی از کلونهای نو ترکیب با پرایمرهای مخصوص وکتور pUC۱۸ از دو نظر تعیین ترادف شد و نتایج کروماتوگرام به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه تعیین ترادف نشان داد که حدود ۹۶ درصد همولوژی بین این ترادف با ژن core سویه ۱a و ۹۵ درصد شباهت با ژن core سویه ۱b وجود دارد (شکل ۳ - الف و ب)

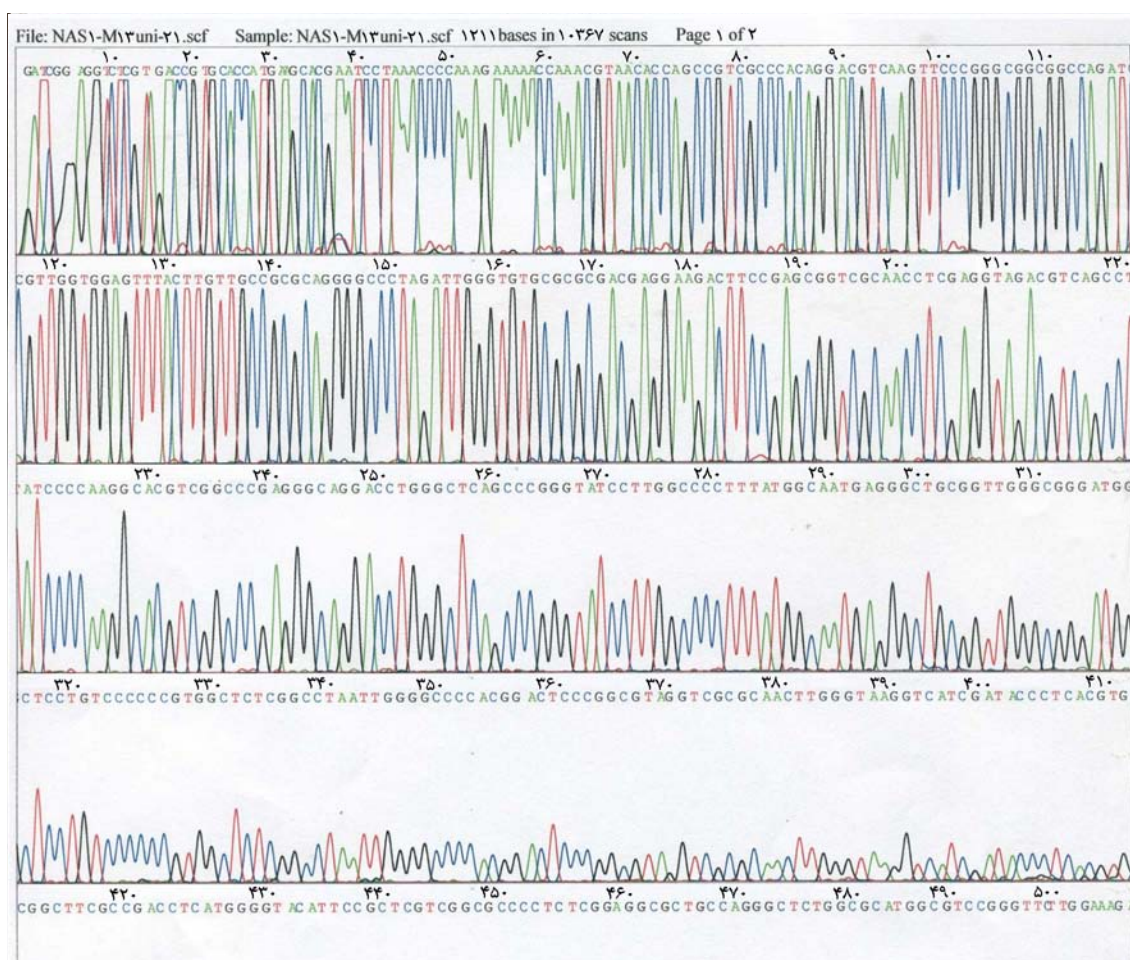
گرفت و روی ژل آگاروز یک درصد برده شد (شکل ۲). کلونهایی که نسبت به کنترل منفی دارای وزن مولکولی بیشتری بودند به عنوان کلونهای نو ترکیب انتخاب شده و با روش PCR و هضم آنزیمی صحت کلونینگ در آنها تأیید شد. وجود باند ۷۸۰bp در محصول PCR و نیز هضم آنزیمی با آنزیمهای *BamHI* و *EcoRI* نشان دهنده موفقیت کلونینگ بوده است.



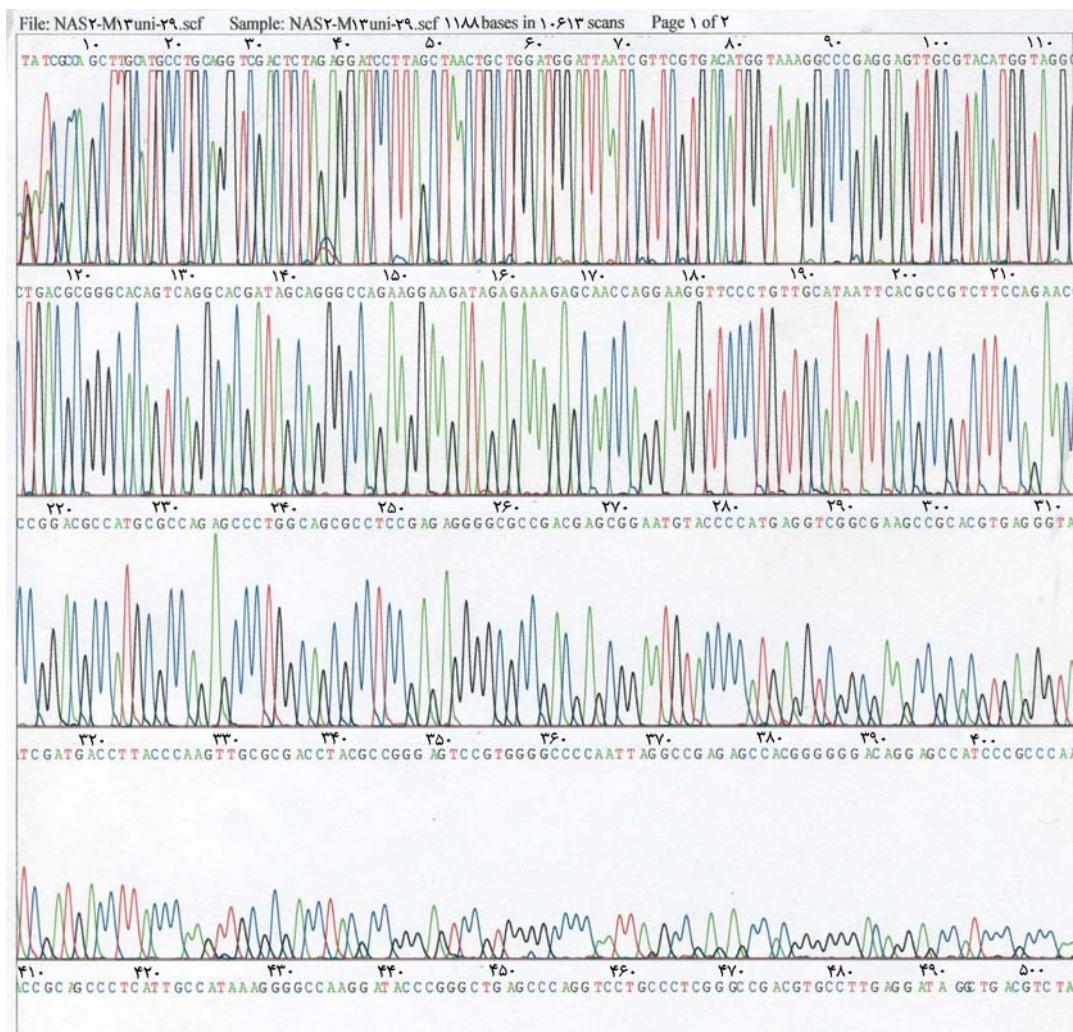
۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶

شکل ۲ تأیید صحت کلونینگ با روش PCR و هضم آنزیمی

چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: محصول ژن Core، چاهک ۳: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۴: محصول هضم آنزیمی ۱۸ rpUC با آنزیمهای *EcoRI* و *BamHI*، چاهک ۵: محصول هضم آنزیمی ۱۸ pUC با آنزیمهای *EcoRI*، *BamHI*، چاهک ۶: پلاسمید ۱۸ rpUC هضم نشده



شکل ۳ - الف نتیجه تعیین توالی پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن Core با پرایمر sequencing primer M13/pUC



شکل ۳- ب نتیجه تعیین ترادف پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن Core با پرایمر M13/pUC reverse sequencing primer

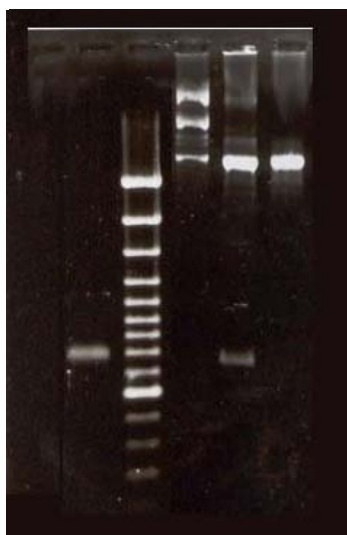
۳-۳- کلون کردن ژن core در وکتور pET28a

و بیان در E.Coli

ژن Core تعیین ترادف شده در محل سایتهای آنزیمی *EcoRI* و *BamHI* در وکتور pET28a کلون شد و نتیجه به وسیله PCR و هضم آنزیمی تأیید گردید (شکل ۴). پس از تأیید پلاسمید نو ترکیب rpET28a، ترانسفورماسیون در سویه BL21 (DE3) باکتری *E. Coli* انجام گرفت. در این باکتری و با استفاده از pET28a، ژن کلون شده به صورت پروتئین فیوز شده با قطعه پپتیدی حاوی 6-His بیان می گردد. در نتیجه پروتئین Core نو ترکیب دارای His-tag در ناحیه انتهایی N بود. نتیجه SDS-PAGE وجود یک پروتئین ۲۳/۵ KD را نشان داد (شکل ۵) و آنالیز وسترن بلات با آنتی بادیهای مونوکلونال (ضد His و اختصاصی Core) بیان پروتئین Core را تعیین نمود (شکل ۶).

۴- بحث

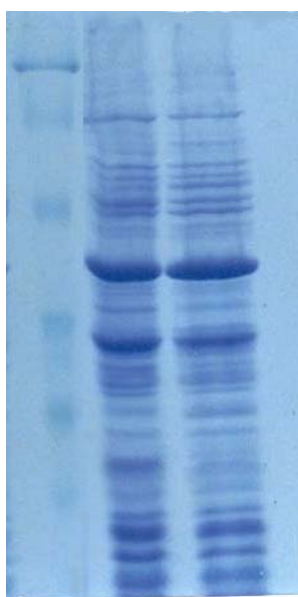
همانطور که ذکر شد، ژنوم ویروس هپاتیت C بسیار متنوع است که بر اساس این تنوع به ۶ ژنوتایپ و حدود ۷۰ زیرگروه طبقه بندی می شود. مطالعات ژنوتیپی ناحیه ای و منطقه ای برای تعیین زیرگروه های ویروسی رایج در یک منطقه جغرافیایی، بسیار حایز اهمیت است؛ زیرا شدت بیماری و الگوی درمان با توجه به نوع ژنوتایپ متغیر است. بنابراین با تعیین نوع ژنوتایپ رایج در یک منطقه می توان روش درمانی مناسب را انتخاب کرد [۱۵]. ژنوتایپ رایج در آسیای میانه کویت، عراق و عربستان سعودی ژنوتایپ ۴ است [۱۶] در حالی که در ترکیه و جنوب شرقی اروپا بیشتر ژنوتایپ ۱b شایع است [۱۷]. با توجه به این اطلاعات پرایمرهایی که طراحی شد از روی ترادف ژنی این دو نوع سویه ویروس که در میان همسایگان ایران شایعتر بود، ساخته شد. در این مطالعه نتایج PCR و تعیین ترادف ژن core



۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶

شکل ۴ تأیید کلونینگ ژن Core در pET۲۸a با روش PCR و هضم آنزیمی

چاهک ۱: کنترل منفی، نتیجه PCR وکتور PET۲۸a با پرایمرهای اختصاصی ژن Core، چاهک ۲: نتیجه PCR وکتور rPET۲۸a با پرایمرهای اختصاصی ژن Core، چاهک ۳: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۴: محصول هضم آنزیمی rPET۲۸a با آنزیمهای *EcoRI* و *BamHI*، چاهک ۵: محصول هضم آنزیمی PET۲۸a با آنزیمهای *EcoRI*, *BamHI*



۱ ۲ ۳

شکل ۵ آنالیز SDS-PAGE پروتئین Core نو ترکیب

چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی (از بالا به پایین) (۱۱۸-۸۵-۴۶-۳۳-۲۶-۱۹/۵ KD)، چاهک ۲: نمونه پروتئین مربوط به rPET۲۸a پس از القا با IPTG، چاهک ۳: نمونه پروتئین مربوط به PET۲۸a پس از القا با IPTG (کنترل منفی)



۱ ۲ ۳

شکل ۶ آنالیز وسترن بلات ژن Core نو ترکیب

چاهک ۱: نمونه پروتئین از rPET_{28a}، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۳: نشانگر وزن مولکولی پروتئین

از طرف دیگر در تستهای سرولوژیکی برای تشخیص آنتی بادیهای ضد HCV آنتی ژن core بسیار حساستر از آنتی ژنهای موجود دیگر مثل C-۱۰۰ عمل می کنند. بررسیها نشان می دهند که آنتی ژن core از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار بوده و به دلیل این که آنتی بادی ضد این زیرگروه خیلی زودتر از سایر آنتی بادیها یعنی حدود ۴ هفته پس از ورود ویروس به بدن در خون ظاهر می شود. بنابراین وجود عفونت HCV خیلی سریعتر تشخیص داده می شود [۲۲، ۲۱]. بنابراین در طراحی کیتهای تشخیصی آنتی ژن core کاندیدی مناسب محسوب می شود. در نتیجه می توان با بیان این پروتئین به صورت نو ترکیب در سلول باکتری و استخراج آن با روشهای مرسوم این آنتی ژن را تخلیص کرده و در مقیاس بالا تولید کرد و برای اهداف تشخیصی و نیز پیشگیری از عفونت با HCV از طریق واکسیناسیون به کار برد [۲۳].

بیشترین شباهت را با سویه های ۱a و ۱b نشان داد. تحقیقی در ایران نیز در سال ۲۰۰۰ انجام شده و با تستهای سرولوژیکی و نیز PCR نشان داد که ژنوتایپهای رایج در ایران ۱a و ۱b هستند [۱۸]. در این تحقیق ژن core برای مطالعه انتخاب شد. علت این امر این بود که پروتئین core در بین سویه های مختلف HCV بسیار حفظ شده، به طوری که در مطالعات ژنوتایپینگ حایز اهمیت است. از طرفی پروتئین core در ایجاد پاسخ ایمنی بسیار مؤثر ظاهر می شود در یک بررسی وجود ۴ اپی توپ آنتی ژن در زیرگروه core گزارش شده، در یک تحقیق دیگر یک اپی توپ به وجود آورنده لگوسیت های سیتوتوکسیک در پروتئین core شناسایی شده است [۲۰، ۱۹]. این بررسیها نشان می دهد که زیرگروه core قادر است پاسخ ایمنی هموژال و سلولی را تحریک کند و از طرفی به دلیل نداشتن جایگاه گلیکولیزاسیون، ساخت پروتئین سستیک core با خواص آنتی ژنی مشابه با پروتئین طبیعی میسر است.

۵- منابع

- [1] Kiyosawa K, Sodeyama E, Tanaka Y, Gibo K, Koshizama Y, Nakano S, et al. Interrelationship of blood transfusion non A non B hepatitis and

hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. Hepatology. 1999, 12: 671-675.

- [2] Saito IT, Miyamura A, Ohbayashi H, Harada T, Katayama S, Kikuchi Y, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990, 87: 6547-6549
- [3] Kay R, mengji LU, Bellers S, Fumiko C, Yoshida M. Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection. Virus Genes. 2000, 21(3): 179-188
- [4] Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991, 88:2451-55
- [5] Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice C. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein. J Virol. 1993, 67:1385-1395
- [6] Han JH, Shyamala V, Richman KH, Braver MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp P. Characterization of the terminal region of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5 untranslated region and polyA tails at the 3 end. Proc Natl Acad Sci. 1991, 88:1711-1715
- [7] Selby MJ, Choo QL, Berger K, Kuo G, Glazer E, Eckart M, Lee C. Expression identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. J Gen Virol. 1993. 74:1103-1113
- [8] Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. Hepatology, 14:381-388.
- [9] Yasui K, Wakita T, Tsukijama K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kahara M, Kajita T, Moradpour D, Wands R. The native form and maturation process of hepatitis C Virus core protein. J Virol. 72(7):6048-6055. (1998)
- [10] Ferroni P, Mascolo G, zaninetti M, Colzani F, Pirisi M, Barbone F, Gasparini V. Identification of four epitopes in hepatitis C virus core protein. J Clinical Microbiol. 1993, 31(2): 1586-1591.
- [11] Chen Z, Berkower I, Ching WM, Wang RY, Alter HJ, Shin JW. Identification of a murine CD4 T-lymphocyte response site in hepatitis C virus core protein. Mol Immunol. 1996, 33(78): 703-709.
- [12] Alberti A, Benvegna L. Management of hepatitis. J Hepatology, 2003, 38:s104-s118
- [13] Muerhoff AS, Jiang L, Shach Do. Detection of HCV Core antigen in human and plasma with an automated chemiluminescent immunoassay. Transfusion, 2002, 42:349-356
- [14] Stuyrer L. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. J Gen Virol. 1993, 74: 1093-102.
- [15] Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon alpha therapy: Relationship to genotype of hepatitis C virus. Hepatology, 1992, 16:293-299.
- [16] Simmonds P. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and series of subtypes by phylogenic analysis of the NS5 region. J Gen Virol. 1993, 74: 2391-2399.
- [17] Lau JY. Signification of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. Lancet. 1993, 341:1501-1504.
- [18] Zali MR, Mayumi M, Raoufi M, Noroozi A. Hepatitis C virus genotypes in the Islamic Republic of Iran: A preliminary study. Eastern Mediterranean Health Journal. 2000, 6:372-377.
- [19] Kamei A, Tamaki S, Taniyama H, Takamura S, Nishimura Y, Kagawa Y, et al. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. Virology. 2000, 273: 120-126.
- [20] Nishimura Y, Kamei A, Furuta S, Tamaki S, Kim G, Adaeli Y, Kuribayashi Y, Matsuura Y, Yasutomi Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus structural proteins under the elongation factor 1-a promoter

- elicits HCV-specific cytotoxic T-lymphocytes. Vaccine. 2000, 18:675-680.
- [21] Tobias G, Hubert M, Muller, Jin YE, Eberhard P, Lorenz T. Characterization of antigenic determinants in the core antigen of the hepatitis C virus. Virology. 1994, 205: 462-469.
- [22] Fabrizio F, Giovanna L, Flippo A, Mangano S, Barbisoni F, Bisegna S, et al. Novel assay using total hepatitis C virus (HCV) core antigen quantification for diagnosis of HCV infection in dialysis patients. J Clin Microbiol. 2005, 43: 414-420.
- [23] Masahiko T, Hidetsugu S., Makiko H, Kazuhiro A, Hiromasa I. Benefit of hepatitis C virus core antigen assay in prediction of therapeutic response to interferon and Ribavirin combination therapy. J. Clin. Microbiol. 2005, 43: 186-91.