دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

تولید سازه ژنی نوترکیب حاوی قطعه کد کننده هپسیدین انسانی

ندا کیهان ور
دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی ،دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

علیجان تبرائی
استادیار ، ویروس شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

یعقوب یزدانی
استادیار ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی ، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول : یعقوب یزدانی
تلفن:۰۹۱۲۵۷۵۷۲۹۲
پست الکترونیک:yazdani@goums.ac.ir
آدرس: دانشکده فناوری های نوین،دانشگاه علوم پزشکی گلستان

دریافت مقاله:۹۱/۱۱/۱۵
ویرایش نهایی:۹۱/۱۲/۱۰
پذیرش :۹۲/۱/۱۸

چکیده

مقدمه: *هپسیدین یک پپتید ضد میکروبی غنی از سیستئین است که شکل پیش ساز آن از کبد ترشح می شود. این پپتید علیه دامنه وسیعی از باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها عمل می کند. هپسیدین همچنین به عنوان اصلی ترین تنظیم گر هومئوستاز آهن بدن شناخته شده است. امروزه تلاش های گسترده ای برای تولیدهپسیدین صورت گرفته است. یکی از سیستم های بیانی یوکاریوتی مورد استفاده برای تولید هپسیدین ، سیستم بیانی باکلوویروس می باشد. تولید سازه ژنی نوترکیب یکی از اصلی ترین مراحل در مسیر تولید هپسیدین در این سیستم بیانی است.*

روش بررسی: *ابتدا RNA تام از سلول های رده HepG2 به عنوان سلول تولید کننده هپسیدین استخراج شده و پس از سنتز cDNA کل، قطعه مربوط به هپسیدین انسانی توسط پرایمر های اختصاصی هپسیدین به روش PCR تکثیر شد. در مرحله بعد این قطعه درون ناقل pTZ57R/T کلون شد. در پایان قطعه مربوطه به روش برش آنزیمی توسط آنزیم های BamHI و ECoRI به درون محل ورود ژن در ناقل pFast BacHT B منتقل شد.*

یافته ها: *قطعه کد کننده هپسیدین انسانی به طور صحیح درون ناقل pTZ57R/T کلون شده و مراحل ساب کلونینگ درون ناقل pFast Bac HT B با موفقیت انجام شد. حضور باند ۲۷۴ جفت بازی حاصل از تکثیر PCR و برش آنزیمی نشان دهنده صحت مراحل انجام کار بود.*

نتیجه گیری: *بر اساس جستجوهای انجام شده این مطالعه نخستین مورد از تولید سازه ژنی نوترکیب واجد قطعه کد کننده هپسیدین کامل انسانی در کشور است. سازه های ژنی نوترکیب حاصل از این مطالعه می تواند به منظور تولید فرم کامل هپسیدین انسانی در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرد.*

واژه های کلیدی : *سازه ژنی، هپسیدین ، آهن*

آدرس مقاله:
کیهان ور ن، تبرائی ع، یزدانی ی " تولید سازه ژنی نوترکیب حاوی قطعه کد کننده هپسیدین انسانی مجله علوم آزمایشگاهی،تابستان۱۳۹۲، دوره هفتم(شماره۲): ۶-۱

مقدمه

هپسیدین یک پپتید ضد میکروبی غنی از سیستئین با پیوند های دی سولفیدی است (۱). گزارش های قبلی گویای این است که این پپتید در میان گونه ها ی مختلف، از ماهی گرفته تا پستانداران مثل انسان، حفاظت شده باقی مانده است (۲). هپسیدین اغلب در سلول های کبدی یافت شده و کمتر در معده، روده،قلب و تیموس بیان می شود (۳). مطاله های حاکی از این است که این پپتید حاوی پیوند دی سولفیدی غیر معمول است و در نتیجه این پپتید یک کلاس جدیدی از پپتید های ضد میکروبی تلقی می شود (۴). این پپتید علیه دامنه وسیعی از باکتری ها ، مانند اشرشیا کولی، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و گروه ب استرپتوکوکوس و نیز علیه ویروس ها و قارچ هایی نظیر کاندیدا آلبیکانس، آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نیجر عمل می کند (۲). مطاله های مختلف نشان داده است که هپسیدین مانع جذب آهن از روده کوچک شده و باعث مهار آزاد شدن آهن ذخیره ای از ماکروفاژ و سایر سلول های رتیکوواندوتلیال می شود (۵). فروپورتین یک کانال انتقال دهنده آهن سلولی است که به عنوان رسپتور هپسیدین ایفای نقش می کند (۶،۷). بنابر این می توان از هپسیدین به عنوان اصلی ترین تنظیم کننده آهن در بدن یاد کرد.روش های مختلفی جهت تولید هپسیدین وجود دارد. به عنوان مثال، هپسیدین را می توان از پلاسما یا ادرار جدا کرد. ولی میزان هپسیدین تخلیص شده حاصل از این راه بسیار کم است (۲،۴). راه دوم سنتز هپسیدین است. مراحل تولید هپسیدین سنتتیک عملکردی بسیار دشوار بوده و نیازمند فرایند فولدینگ دوباره می باشد (۸). همچنین هپسیدین می تواند در سیستم های بیانی از جمله باکتریایی نیز تولید شود. مزیت این سیستم های بیانی هزینه کم و محصول زیاد است ولی تغییرات پس ترجمه ای در مقایسه با بیان در سلول های پستانداران کارآمد نمی باشد (۹).سیستم بیانی قارچی نیز نوع دیگری از سیستم های بیانی است که علی رغم مزایای مختلف (بیان بالا، هزینه کم، عدم وجود اندوتوکسین و فولدینگ کارآمد پروتئین ها)، به دلیل افزودن واحد های قندی مانوز که منجر به حذف سریع پروتئین تولید شده از گردش خون می شود، برای بیان پروتئین یوکاریوتی گزینه بسیار مناسبی نمی باشد. مطاله های گوناگونی در زمینه کلونینگ هپسیدین گونه های مختلف در انواع سیستم های بیانی ازجمله سیستم بیانی باکتریایی، سیستم بیانی قارچی و ... صورت گرفته است (۱۵،۱۰).سیستم بیانی باکولوویروس روشی دیگر در تولید پروتئین های نوترکیب یوکاریوتی می باشد. تغییرات پس ترجمه ای در این سیستم بیانی تا حدود بسیار زیادی مشابه با سلول های پستانداران است (۱۶). مزیت دیگر این سیستم نبود آلودگی با اجزای باکتریایی از قبیل لیپوپلی ساکارید می باشد ، در نتیجه به کارگیری این پروتئین پاسخ ایمنی را برانگیخته نخواهد کرد (۱۷).

روش بررسی

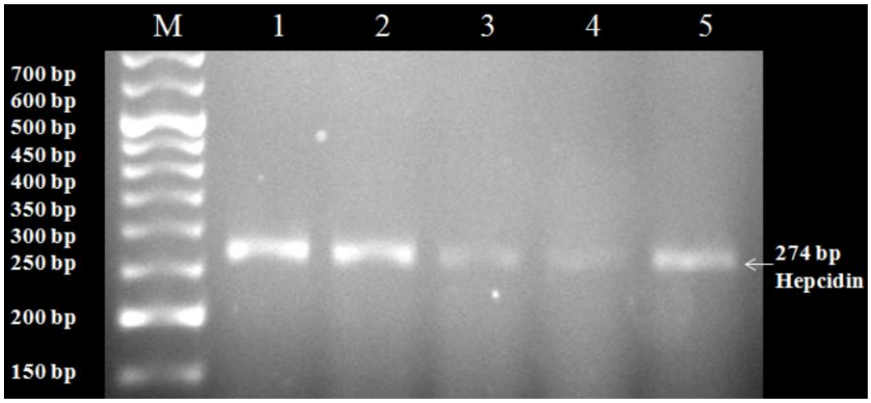
کلونینگ cDNA هپسیدین درون *ناقل* **pTZ57R/T**در این مرحله، سلول های HepG2 به عنوان یک منبع سلولی تولید کننده هپسیدین،کشت داده شدند. پس از استخراج RNA، سنتز cDNA توتال و تکثیر قطعه مربوط به پری پروپپتید هپسیدین انسانی توسط کیت OneStep RT-PCR (کیاژن، آلمان) انجام شد . توالی نوکلئوتیدی پرایمر های مورد استفاده در ذیل آورده شده است. توالی های برش آنزیمی BamHI و ECoRI جهت ساب کلونینگ درون *ناقل* بیانی، در دو انتهای پرایمر های اختصاصی وارد شد. قطعه تکثیر شده جهت مشاهده و جداسازی روی آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز شد و توسط کیت " QIAquick Gel Extraction" (کیاژن ،آلمان) استخراج شد. قطعه استخراج شده توسط کیت TA Cloning (فرمنتاز، آلمان) درون *ناقل* pTZ57R/T کلون شد. *ناقل* نوترکیب تولید شده درون باکتری مستعد XL1Blue منتقل شد شده و روی محیط آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و سوبسترای گال (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و القا کننده IPTG (۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) کشت داده شد. در این مرحله از روش کلسیم کلراید

Forward Hepcidin	5` GGATCCGACGGCACGATGGCACTGAGC 3
Reverse Hepcidin	5` GAATTCGGTTCTACGTCTTGCAGCACATCC 3`

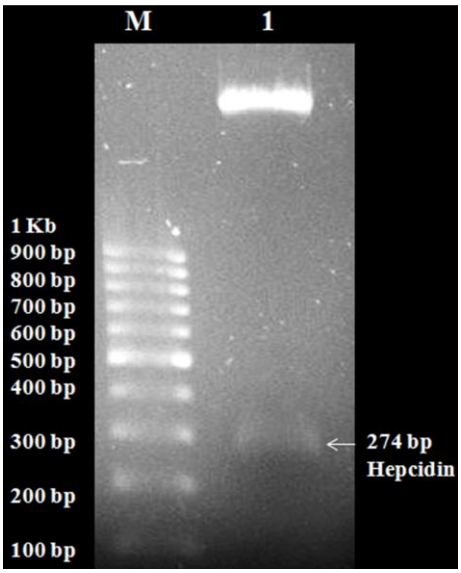
جهت تهیه باکتری های باصلاحیت استفاده شد و این باکتری ها توسط روش شوک حرارتی ترانسفورم شدند. پلیت های حاوی باکتری نوترکیب به مدت ۱ شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس کلنی های دارای *ناقل* صحیح انتخاب شده و جهت استخراج پلازمید و بررسی صحت حضور قطعه مورد نظر در محیط مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب کشت داده شدند. پس از آن پلازمید باکتر های نوترکیب کشت داده شده ،به روش قلیایی استخراج شد و به دو روش PCR با پرایمر های اختصاصی هپسیدین و روش برش آنزیمی توسط آنزیم های Fast digest BamHI (فرمنتاز، آلمان) و Fast digest ECoRI (فرمنتاز، آلمان) بررسی شدند. نحوه کار به این صورت بود که ۱ میکروگرم پلازمید pTZ57-Hepc، ۱ میکرولیتر آنزیم BamHI، ۱ میکرولیتر آنزیم آلکالین فسفاتازFast AP (فرمنتاز)، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X را درون لوله واکنش ریخته و توسط آب دیونیزه عاری از RNase و DNase به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. لوله جهت غیر فعال سازی آنزیم آلکالالین فسفاتاز ۲۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. سپس ۱ میکرولیتر آنزیم Fast digest ECoRI (فرمنتاز، آلمان)، به لوله واکنش اضافه شد و دوباره در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد (مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده). محصول برش آنزیمی و محصول نهایی PCR روی ژل۵ /۱درصد الکتروفورز شد. علاوه بر این جهت اطمینان نهایی از صحت توالی، *ناقل* نوترکیب pTZ57-Hepc برای توالی یابی ارسال شد. پس از اطمینان از صحت انجام کلونینگ، قطعه مورد نظر جهت ساب کلونینگ درون *ناقل* pFastBac HT B مورد استفاده قرار گرفت.

ساب کلونینگ ژن هپسیدین درون *ناقل* pFast Bac1 : *ناقل* نوترکیب pTZ57-Hepc توسط آنزیم های Fast digest BamHI و Fast digest ECoRI برش خورده و محصول برش آنزیمی روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد. باند ۲۷۴ جفت بازی مربوط به توالی هپسیدین انسانی توسط کیت استخراج ژل "QIAquick Gel Extraction" (کیاژن، آلمان) تخلیص شد. همزمان، *ناقل* pFastBac HT B نیز توسط روش Double Digestion خطی شد. مراحل این کار مطابق روش قبل انجام شد، با این تفاوت که در همان مرحله اول هر دو آنزیم BamHI و ECoRI همزمان به لوله واکنش اضافه شد. برای اطمینان از خطی شدن روی ژل ۰.۸٪ الکتروفورز انجام شد. پلازمید خطی توسط کیت استخراج ژل"QIAquick Gel Extraction" (کیاژن، آلمان) استخراج شد. لیگاسیون قطعه حاصل از استخراج ژل که حاوی انتهای چسبنده مربوط به برش توسط دو آنزیم بالا است به دو انتهای چسبنده حاصل از برش *ناقل* pFast Bac HT B خطی انجام شد. در این مرحله نسبت ۱:۳ از *ناقل* خطی pFastBac HT B و قطعه هپسیدین استفاده شد. لیگاسیون در ۱۶ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انجام شد و *ناقل* نوترکیب pFastBac HT B-Hepc حاوی هپسیدین با روش شوک حرارتی به درون باکتری با صلاحیت XL1Blue انتقال یافت . باکتری های حاوی پلازمید نوترکیب توانایی رشد در محیط حاوی آمپی سیلین را داشته و تشکیل کلنی می دهند. سپس پلازمید کلنی های نوترکیب مرحله قبل به روش لیز قلیایی استخراج شده و صحت انجام ساب کلونینگ با استفاده از روش PCR بررسی شد و محصول PCR روی ژل ۱/۵درصد الکتروفورز گردید. همچنین برش آنزیمی *ناقل* نوترکیب pFast Bac HT B-Hepc مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که این *ناقل* نوترکیب توسط همان دو آنزیم Fast digest EcoRI وFast digest BamHI برش داده شد و نتیجه روی ژل آگارز ۱/۵درصد مشاهده گردید.

شکل ۱- بررسی صحت درج سکانس هپسیدین توسط پرایمر های اختصاصی هپسیدین به روش PCR. باند ۲۷٤ جفت بازی نشان دهنده حضور قطعه کد کننده هپسیدین انسانی است.(ستون های اتال نمونه =M شاخص وزن ملکولی)



شکل شماره ۲-بررسی صحت درج سکانس هپسیدین توسط آنزیم های ECoRI و BamHI به روش برش آنزیمی. باند ۲۷٤ جفت بازی نشان دهنده هپسیدین(ستون های اتال نمونه =M شاخص وزن ملکولی) است.



یافته ها

قطعه ژنی کدد کننده پری پرو هپسیدین که با در نظر گرفتن سایت های برش آنزیمی در حدود ۲۷۴ جفت بازی بود توسط پرایمر های اختصاصی بروش PCR تکثیر یافت(نتایج نشان داده نشده است). پس از کلونینگ و تولید *ناقل* نوترکیب pTZ57-Hepc، باکتری های صلاحیت دار XL1blue ترانسفورم شده توسط این *ناقل* نوترکیب روی محیط آگار حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. کلنی های سفید حاصل از باکتری های ترانسفورم شده و مقاوم به آمپی سیلین احتمالا ناقل نوترکیب را به عنوان یک ژن خارجی پذیرفته اند(نتایج نشان داده نشده است). پلازمید استخراج شده از کلنی های انتخابی جهت تائید حضور ژن هپسیدین با پرایمر های اختصاصی ژن هپسیدین بروشPCR مورد بررسی قرار گرفتند. حضور باند ۲۷۴ جفت بازی بیانگر حضور قطعه پری پرو هپسیدین و نیز صحت کلونینگ درون *ناقل* pTZ57R/T است (نتایج نشان داده نشده است). پس از برش آنزیمی و استخراج سکانس هپسیدین از ژل، ساب کلونینگ قطعه پری پرو هپسیدین درون *ناقل* خطی شده pFastBac HT B صورت گرفت. سپس باکتری های باصلاحیت XL1blue منتقل شده با *ناقل* نوترکیب pFastBac HT B-Hep، روی پلیت آگار حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. پلازمید حاصل از کلنی های رشد یافته صحت درج سکانس هپسیدین استخراج شده با روش های PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی هپسیدین و الگوی برش آنزیمی با آنزیم های Fast digest ECoRI و Fast digest BamHI بررسی شد. باند های ۲۷۴ جفت بازی نشان دهنده صحت حضور قطعه هپسیدین کلون

شده درون *ناقل* نوترکیب pFastBac HT B-Hep است(شکل۱). این داده با روش برش آنزیمی نیز تائید شد(شکل۲). ستون M در این شکل نیز نشان دهنده مارکر ملکولی می باشد.

بحث

در سال ۲۰۰۰ آقای Krause و همکارانش برای اولین بار هپسیدین را ازپلاسمای انسان تخلیص کردند و آنرا پپتید ضد میکروبی بیان شده از کبد نامیدند (۴). سیستم های بیانی مختلفی جهت تولید پروتئین های نوترکیب وجود دارند ولی هرکدام در کنار مزایای موجود، دارای معایبی نیز هستند که بسته به انتظار و نوع پروتئین هدف می توان از آنها استفاده کرد. در طی مطالعات قبلی صورت گرفته بر روی هپسیدین موشی تولید شده در سیستم بیانی باکولوویروس مشخص شد که این پپتید از فولدینگ و عملکرد قابل قبولی برخوردار است. مطالعات نشان می داد که هپسیدین نه تنها قادر به کاهش سطح بیان فروپورتین در شرایط آزمایشگاهی و شرایط زیستی (In vivo) می باشد، بلکه قادر به کاهش سطح سرمی آهن نیز است (۱۹). بر این اساس به منظور بهره گیری از هپسیدین به عنوان یک دارو بر آن شدیم که فرم انسانی آن را نیز تولید نماییم. از آنجا که تولید و ساخت سازه های ژنی مناسب و کارآمد نخستین گام در تولید هپسیدین نوترکیب انسانی می باشد، سازه های ژنی مورد نظر تولید گردید. مطالعات مختلفی در زمینه کلونینگ هپسیدین گونه های مختلف در انواع سیستم های بیانی صورت گرفته است. به عنوان مثال در سال ۲۰۰۵ هپسیدین-۲۵ انسانی در سیستم بیانی باکتریایی (*E.Coli*) تولید شده و دارای خاصیت ضد میکروبی بود(۱۲). همچنین در همان سال هپسیدین-۲۰ انسانی در سیستم بیانی باکتریایی (*E.Coli*) تولید شد. اما پپتید تولید شده فاقد عملکرد بود(۱۰). علاوه بر این در سال ۲۰۰۸ ، هپسیدین انسانی در دو فرم هپسیدین-۲۰ و هپسیدین-۲۵ در سیستم بیانی قارچی (Pichia Pastoris) تولید شد و نتایج نشانگر دارا بودن خاصیت باکتریواستاتیک و همچنین توانایی تنظیم هومئوستاز آهن سلولی پپتید های تولید شده بود(۱۳). علاوه بر فرم انسانی هپسیدین ، مطالعات مختلف دیگری بر روی تولید هپسیدین سایر گونه ها در سیستم های بیانی مختلف صورت گرفته است(۱۴-۱۵،۱۱).با استناد به مقالات موجود در مورد کلونینگ هپسیدین، این مطالعه اولین مطالعه در مورد کلونینگ هپسیدین انسانی در سیستم بیانی باشد. ما از این سیستم برای کلون سازی بخش پری پرو پپتید هپسیدین انسانی و ساخت سازه های ژنی نوترکیب حاوی قطعه کد کننده هپسیدین انسانی استفاده کردیم. بر خلاف سیستم های بیانی باکتریایی ، سیستم بیانی باکلوویروس پپتید ها و پروتئین هایی را بیان می کند که از نظر تغییرات پس ترجمه ای شبیه پروتئین های سلولهای پستانداران هستند و از آنجایی که تغییرات پس ترجمه ای عامل مهمی برای فعالیت بیولوژیکی و مطالعات عملکرد پروتئین هستند، امید است تا بتوان در مطالعات آتی پروتئین نوترکیب هپسیدین را در این سیستم بیانی تولید کرد.

نتیجه گیری

تولید سازه ژنی نوترکیب یکی از اصلی ترین مراحل در مسیر تولید هپسیدین در سیستم بیانی باکلوویروس است. بر اساس جستجوهای انجام شده این مطالعه نخستین مورد از تولید سازه ژنی نوترکیب واجد قطعه کد کننده هپسیدین کامل انسانی در کشور است. سازه های ژنی نوترکیب حاصل از این مطالعه می تواند به منظور تولید فرم کامل هپسیدین انسانی در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله از محل حمایت مالی صورت گرفته توسط دانشگاه علوم پزشکی گلستان صورت پذیرفته است. همچنین از زحمات همکاران عزیز سرکار خانم میشارکلیشادی و آقایان مصطفی میر و ایوب خسروی که در انجام کار ، کمک شایانی نمودند تشکر و قدردانی می نماییم.

References

1. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. *The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis*. J Biol Chem. 2002; 277(40): 37597-603.

2. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem. 2001; 276(11): 7806-10.

3. Pigeon C, Iiyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload*. J Biol Chem. 2001; 276(11): 7811-9.

4. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett. 2000; 480(2-3): 147-50.

5. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. *Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(7): 4596-601.

6. Carstens BB. *The analysis of the interaction between hepcidin and ferroportin.* Masters thesis: Queensland. 2009.

7. De Domenico I, Nemeth E, Nelson JM, Phillips JD, Ajioka RS, Kay MS, et al. *The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved*. Cell Metab. 2008; 8(2): 146-56.

8. Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. *Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs*. Blood. 2005; 106(6): 2196-9.

9. Terpe K. *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 72(2): 211-22.

10. Gerardi G, Biasiotto G, Santambrogio P, Zanella I, Ingrassia R, Corrado M, et al. *Recombinant human hepcidin expressed in Escherichia coli isolates as an iron containing protein*. Blood Cells Mol Dis. 2005; 35(2): 177-81.

11. Srinivasulu B, Syvitski R, Seo JK, Mattatall NR, Knickle LC, Douglas SE. *Expression, purification and structural characterization of recombinant hepcidin, an antimicrobial peptide identified in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus*. Protein Expr Purif. 2008; 61(1): 36-44.

12. Zhang H, Yuan Q, Zhu Y, Ma R. *Expression and preparation of recombinant hepcidin in Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 2005; 41(2): 409-16.

13. Koliaraki V, Marinou M, Samiotaki M, Panayotou G, Pantopoulos K, Mamalaki A. *Iron regulatory and bactericidal properties of human recombinant hepcidin expressed in Pichia pastoris*. Biochimie. 2008; 90(5): 726-35.

15. Greenshields AL, Knickle LC, Syvitski R, Douglas SE. *Strategies for recombinant expression of small, highly disulphide-bonded, cationic antimicrobial peptides*. Protein Pept Lett. 2008; 15(9): 985-94.

14.Lee SJ, Park IS, Han YH, Kim YO, Reeves PR. *Soluble expression of recombinant olive flounder hepcidin I using a novel secretion enhancer* .Mol Cells. 2008; 26(2): 140-5.

16. Patterson RM, Selkirk JK, Merrick BA. *Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology*. Environ Health Perspect. 1995; 103(7-8): 756-9.

17. Hervas-Stubbs S, Rueda P, Lopez L, Leclerc C. *Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN*. J Immunol. 2007; 178(4): 2361-9.

18. Malyszko J. *Hemojuvelin: the hepcidin story continues*. Kidney Blood Press Res. 2009; 32(2): 71-6.

19. Yazdani Y, Sadeghi H, Alimohammadian M, Andalib A, Moazen F, Rezaei A. *Expression of an Innate Immune Element (Mouse Hepcidin-1) in Baculovirus Expression System and the Comparison of Its Function with Synthetic Human Hepcidin-25*. Iran J Pharm Res. 2011; 10(3): 559-568.