

## **Gereç ve Yöntem**

Tanısal ELISA kitlerinde kullanılmak üzere hepatit B virusu yüzey antijenlerinin rekombinant olarak elde edilmesini hedeflediğimiz bu projede, Escherichia coli ekspresyon konağı olarak kullanılacaktır.

### ***HBV ile enfekte hücre hatlarının üretilmesi***

Projemizde HBV yüzey antijeninin pre-S1/preS2/S bölgelerini kodlayan HBVgp2 geni, HBV ile enfekte durumda bulunan ve genomlarına entegre halde HBV genom kopyaları taşıyan PLC/PRF/5 hücre hattı (ATCC CRL-8024, HBV alttip adw2 genom entegre hücre hattı) ve Hep3B hücre hattından (ATCC HB-8064, HBV genom entegre hücre hattı) elde edilecektir (1-3).

Hücre hattı stokları %10 fetal sığır serumu içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılarak açılacaktır. Kültür şişelerinin taban yüzeyi yapışan hücreler tarafından yaklaşık %70 kaplandığında RNA izolasyonu gerçekleştirilecektir.

### ***Hücre kültürlerinden total RNA izolasyonu***

Hepatoma hücre hattı kültürlerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilecektir. Bu amaçla tek tabaka halindeki hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak yerine guanidyum içeren parçalama tamponu konulacaktır. Elde edilen lizat asit fenol kloroform ile ekstrakte edilecektir. Sıvı faz alınarak sırası ile %99 ve %70 etanol ile yıkanacaktır. Elde edilen pellet kurutulduktan sonra RNaz içermeyen su ile çözülecektir. Saflaştırılmış RNA örnekleri kullanılabilecek kadar -80 °C sıcaklıkta saklanacaktır (4).

### ***HBVgp2 transkriptlerinin klonlama vektörüne aktarılması***

HBV enfekte hepatoma hücre hatlarından elde edilen total RNA'nın ters transkripsiyonu oligo-dT24 primer ve MuMLV ters transkriptaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilecektir. İkincil iplikcik sentezi ve HBVgp2 çoğaltılması polimeraz zincirleme tepkimesi (PZT) ile gerçekleştirilecektir. Çoğaltma için kullanılacak primerlerin 5' uçlarına EcoRI ve HindIII gibi hedef gen üzerinde kesim yapmadığı bilinen bir enzim çiftinin kesim motifleri eklenecektir. Yapılacak çoğaltmalarda 3' - 5' eksonükleaz aktivitesi ile "proof-reading" yapabilen enzim ya da enzim karışımları kullanılacaktır (5).

Çoğaltma ürünü, silika matriksli kolon sistemine dayanan bir PZT temizleme kiti kullanılarak saflaştırılacaktır. PZT ile başarılı bir çoğaltma yapıp yapılmadığını ve ürünün saflık durumunun kontrolü için %2 yoğunluğunda TBE tampon ile hazırlanmış agaroz jel ile elektroforez yapılacaktır. Etidyum bromür ile boyamanın ardından jeller UV transillüminatör ile incelenecektir. Yaklaşık 1200

baz çifti uzunluğunda bir ürün elde edilmesi hedeflenecektir (5).

Saflaştırılmış ürün EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesilecektir. pGEM-3Zf(+) klonlama vektörü de aynı enzimler ile kesilerek yapışkan uçlu hale getirilecektir. PZT ürünü ve plazmid vektör saflaştırılarak kesim enzimleri uzaklaştırılacaktır (6; 7). Saflaştırılmış ürünler jelde yürütülerek kontrol edilecektir. Spektrometrik olarak kantite edilen saflaştırma ürünleri ligasyona alınacaktır. T4 DNA ligaz ile gerçekleştirilecek klonlama için uygun oranlarda plazmid ve PZT ürünü karıştırılacaktır (5).

Ligasyon ürünlerinin Escherichia coli K12 JM109 hücrelerine aktarılması için polietilen glikol - DMSO karışımı ve ısı şoku kullanılacaktır (8). Transformantların seçimi 100 µg/ml ampisilin içeren SOC agarlarda yapılacaktır. pGEM-3Zf(+) plazmidi JM109 hücrelerinde kullanıldığında "insert" almış plazmidlerin seçimini kolaylaştıran mavi - beyaz koloni seçimine olanak sağladığından SOB agar yüzeyine ekim yapılmadan önce 5-bromo-4-kloro-3-indolil- beta-D-galaktopiranozid (X-gal) ve izopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozid (IPTG) çözeltileri sürülecektir. Kültürler 35 °C'de bir gece inkübasyonun ardından değerlendirilecektir. Beyaz renkli koloniler M13-20 ve M13-26 primerlerinin kullanıldığı PZT ile "insert" durumları yönünden kontrol edilecektir. Yaklaşık 1450 baz çiftlik ürün elde edilen koloniler sekans analizine alınacaktır (5).

### ***DNA dizi analizi ile klonlanan HBVgp2'nin kontrol edilmesi***

pGEM-3Zf(+) plazmidleri üzerine klonlanmış HBVgp2 segmentlerinin kontrolü DNA dizi analiz yöntemi ile yapılacaktır. Bu amaçla, 1203 baz çiftlik HBVgp2'nin uzunluğu boyunca bir biri ile çakışan bölgeleri bulunan 450 - 500 baz çiftlik çoğaltma ürünlerinin elde edileceği PZT'leri tasarlarak gerçekleştirilecektir. PZT ürünleri saflaştırılarak DNA sekanslama tepkimesine hazırlanacaktır (7).

Sekanslama işlemi için Beckman Coulter CEQ 8000 ile uyumlu floresan işaretli dideoksiterminatör sekanslama kitleri kullanılacaktır. Elde edilen döngü - sekanslama ürünleri sodyum asetat - etanol yöntemi ile çöktürülerek kapiller jel elektroforezine hazırlanacaktır. Elde edilen kromatogramların redaksiyonu ve birleştirilmesinin ardından ekspresyonda hataya yol açabilecek bir mutasyona sahip olup olmadıkları kontrol edilecektir.

### ***HBVgp2 genotiplerinin oluşturulması***

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre genomlarına entegre durumdaki HBVgp2 transkriptleri temel alınarak yönlendirilmiş mutagenез teknikleri kullanılarak hepatit B virusu yüzey antijeni genotiplerini kodlayan standart diziler oluşturulacaktır (9-12).

Elde edilmesi hedeflenen genotipler için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/view.cgi?>

db=2 adresinden ulaşılabilen A - H genotiplerindeki referans HBV genomlarından ve diğeri protein veritabanlarından yararlanılacaktır (13-15).

Genotipler	Referans genom dizilerinin genbankası "accession" numaraları	İncelenen genbankası S antijeni peptid kayıt numaraları
A	X02763, X51970, AF090842	BAF44867, BAF44868, BAF44869, BAF44877, BAF44879, BAF44884, BAF44900, BAF44910, BAF44882, BAF44896, ABI49966, ABI49967, ABI49969
B	D00329, AF100309, AB033554	BAF44870, BAF44871, BAF44886, BAF44905, BAF44911, BAF44885, BAF44890, BAF44891, BAF44897, BAF44902, AAU05982, ABI49972
C	X04615, AY123041, AB014381	AAA62814, AAT45898, CAG37970, BAF44872, BAF44873, BAF44874, BAF44875, BAF44876, BAF44878, BAF44880, BAF44881, BAF44883, BAF44887, BAF44888, BAF44889, BAF44892
D	X65259, M32138, X85254	BAC77642, BAC77643, BAC77644, BAC77645, BAC77646, BAC77647, ABI49968, ABI49970, ABI49971, ABI49974, ABI49975, ABI49976, ABI49977, ABI49978, ABI49979, ABI49980, ABI49981, ABI49982, ABI49983, ABI49984, ABI49985, ABI49986, ABI49987, ABI49988, ABI49989, ABI49990
E	X75657, AB032431	ABI49961, ABI49962, ABI49963, ABI49964, ABI49965
F	AB036910, X69798, AF223965	AAU05983, AAU05984, AAU05985, AAU05987, AAU05988, AAU05989, AAU05991, AAU05992, AAU05993, AAU05994, AAU05995, AAU05996, AAU05997, AAU05998, AAU05999, AAU06000
G	AF160501, AB064310, AF405706	
H	AY090454, AY090457, AY090460	

NCBI bünyesinde yer alan protein veritabanında HBV Pre-S1/Pre-S2/S peptidi için 2800'den fazla kayıt bulunmaktadır. Bu kayıtların da incelenmesine devam edilmektedir. Böylece farklı genotipteki HBV ile enfekte bireylerde tarafından oluşturulmuş anti-HBsAg antikorları ile birleşme özelliğine sahip rekombinant HBVgp2 dizileri üretilecektir (16-19; 14; 20-22)

pGEM-3Zf(+) plazmid vektör üzerine klonlanmış olan HBVgp2 dizine yönlendirilmiş mutageniz

uygulanacaktır. Bu amaç için kullanılacak plazmid konstraktlar dam metilasyon yapabilen E. coli K12 JM109 suşundan izole edilecektir. Kısaca, HBVgp2 dizisi üzerinde yapılmak istenilen amino asit değişikliğini sağlayacak 1, 2 ya da 3 nükleotidlik mutasyonu içeren ve tüm plazmidi çoğaltacak şekilde tasarlanmış primerler ile 15 - 20 tur PZT yapılacaktır. Bu tepkimede, 5' - 3' ekzonükleaz aktivitesi bulunmayan Pfu ya da Phusion gibi enzimler kullanılacak, böylece mutajenik primerlerin yıkılması önlenecektir. PZT sonrasında orijinal plazmidi ortamdan uzaklaştırmak tepkime karışımı için DpnI enzimi ile 2 - 3 saat inkübe edilecektir. Bu sayede dam metile edilmiş olan orijinal plazmid DNA'sı yıkılarak yalnızca PZT ürününün ortamda kalması sağlanacaktır. Bu ürünün elektroporasyon ya da daha önce açıklanan PEG-DMSO yöntemleri kullanılarak E. coli hücrelerine aktarılması sağlanacaktır. Ampisilinli SOB plaklarında seçilen transformantların kontrol edilmesi aşamasına geçilecektir (23-26).

Açıklanan yöntem kullanılarak hücre hatlarından elde edilen HBVgp2 dizileri adım adım istenilen genotipler elde edilecek şekilde değiştirilecektir. Ayrıca, hedef amino asit değişiklikleri yapılırken E. coli kodon tercihleri gözetilerek ekspresyon aşamasında ortaya çıkması muhtemel sorunların önüne geçilmeye çalışılacaktır (27).

Elde edilen konstraktlar tekrar sekanslanarak genotipler doğrulanacaktır.

### ***Genotiplerin ekspresyon vektörlerine klonlanması***

Yönlendirilmiş mutagenез teknikleri kullanılarak oluşturulmuş ve doğrulanmış farklı HBVgp2 genotiplerine sahip konstraktlar kalıp DNA olarak kullanılacaktır. Bu plazmidlerden PZT yöntemi kullanılarak çoğaltılacak HBVgp2 segmentleri ekspresyon vektörüne klonlanacaktır. Bu amaçla kullanılacak PZT primerlerinin 5' uçlarında uygun birer tip 2 restriksiyon endonükleaz kesim motifi bulunacaktır (5). PZT sonrası saflaştırma yapılacaktır (28; 29). Saflaştırılmış PZT ürünü ve plazmid vektör kesime konulacak ve tekrar saflaştırılacaktır. Kesim sonrası yapılan saflaştırmanın ardından DNA kantitasyonu yapılarak ligasyona uygun miktar ve oranda vektör ve insert konulması sağlanacaktır (5). T4 DNA ligaz kullanılarak yapılacak ligasyon ardından PEG-DMSO çözeltisi ile kompetan hale getirilmiş E. coli K12 JM109 ya da E. coli K12 DH5α hücrelerine transformasyon gerçekleştirilecektir (8; 30). Antibiyotikli plaklara yapılan ekimin ardından seçilen transformant kolonilerin insert alıp almadıkları PZT yöntemi ile kontrol edilecektir. Insert alan koloniler ile ekspresyon denemesine geçilecektir. Kullanılacak ekspresyon konağı hücrenin seçiminde ekspresyon vektörü plazmidin indüklenebilir promotorunun tipi etkili olacaktır. Klonlanan genin önünde lac ya da tac promotoru içeren vektörler için JM109 ve DH5α hücreleri ile devam edilecektir. Ancak, T7 promotor sistemi içeren vektörler için T7 DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi taşıyan (DE3

bakteriyofaj genom kopyası içeren) ekspresyon konakları tercih edilecektir. Ayrıca, ekspresyonun optimizasyonunda proteaz defektif olan E. coli B suşları kullanılacaktır. Bunun için ligasyon ürünleri ile transforme edilmiş ve insert taşıyan plazmide sahip oldukları gösterilen kolonilerden mini prep plazmid izolasyonu yapılacaktır. Ekspresyon konağı hedef hücreler bu plazmidler ile transforme edilerek ekspresyon çalışmalarına geçilecektir (31).

### ***Pilot ekspresyon çalışmaları ve HBVgp2 ekspresyonunun saptanması***

HBVgp2 ekspresyonunun optimizasyonunda denenecek vektörler T7-lac hibrid promotor, triptofan-lac hibrid promotor, lacUV5 promotoru, cspA soğuk şok proteini promotoru ile arabinoz operonu promotoru olacaktır. Kullanılacak ticari sistemler pET28a ve çalışma grubumuz tarafından yapılmış olan varyantları, pCold (Takara-Bio, Japonya), pBAD/His Kit (Invitrogen, ABD), pET-SUMO (Invitrogen) olarak sayılabilir.

Kültürler indüklenmeden önce her sistem için önerilen bulanıklığa kadar üretilcektir. Uygun konsantrasyonda indükleyicinin (IPTG, arabinoz) yapılmasının ardından 6 ve 18 saatlik süre ile indüksiyon gerçekleştirilecektir. Pilot ekspresyon çalışmaları için mikrokuyucuklu plakalar ve küçük hacimli erlen-mayerler kullanılacaktır. İndüksiyon sonunda kültürler santrifüj ile pellet edilecektir. Bakteri pellet alikotları Laemmli tamponu ile süspanse edilecek, 95 °C'de 5 dakika inkübe edilerek yeterli parçalanma gerçekleştirilecektir. DNA açığa çıkmasından kaynaklanan viskozite sorunlarına karşı sonikasyon uygulanacaktır. Elde edilen lizatlar %12 - 15 yoğunluğunda hazırlanmış SDS-PAGE jellerine yüklenecektir. 10 x 10 cm boyutlarında ve 1 mm kalınlığında hazırlanmış mini jeller 20 mA sabit akım ile yürütülecektir. Yeterli açılmanın sağlanmasının ardından jeller önce fikse edilecek, ardından Coomassie mavisini ile boyanacaktır. Tam uzunluk (Pre-S1/Pre-S2/S) HBVgp2 için yaklaşık 43.7 kDa, M için 31.2 kDa ve S için 25.5 kDa ( + ekspresyon vektörüne ait "tag"ler) moleküler ağırlığa uygun yerde rekombinant ürüne ait protein bantları gözlenmesi beklenecektir (32).

Uygun moleküler ağırlığa sahip protein bantlarının HBVgp2'ye ait olup olmadığı western blot yöntemi kullanılarak doğrulacaktır. Bu amaçla HBVgp2 eksprese ettiği düşünülen kültür pelletleri SDS-PAGE ile yürütülecektir. Elektroforez sonrası proteinlerin PVDF membrana transferi sağlanacaktır. Transferin başarı ile gerçekleşip gerçekleşmediği PVDF membranın Ponceau S boyaması ile test edilecektir. Membran dekolore edildikten sonra bloklanacaktır. Bloklamanın ardından poliklonal primer HBVgp2 antikorları ile inkübe edilecektir. Yıkama ve tekrar bloklamanın ardından HRP işaretleli sekonder antikor ile inkübasyon yapılacaktır. Luminol eklenmesinin ardından uzun pozlama ile görüntüleme gerçekleştirilecektir (32).

## ***Ekspresyon koşullarının optimizasyonu ve ölçeklendirme***

Uygun molekül ağırlıkta anti-HBsAg reaktif rekombinant protein üreten bakteri kültürleri için ekspresyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilecektir. Besiyerine katılacak karbon kaynakları, indüksiyon öncesi ve sırasındaki inkübasyon sıcaklığı, indükleyici konsantrasyonu, süre gibi parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilecektir. Ekspresyon ölçeği büyütülerek çok miktarda protein elde edilecektir (31).

## ***Rekombinant proteinlerin saflaştırılması***

Rekombinant proteinlerin saf olarak elde edilmesi için ilk basamak olarak indüklenmiş kültürlerden lizat hazırlama ve mümkün olan en yüksek miktarda çözünmüş protein eldesi optimize edilecektir. Bu amaçla lizis tamponu bileşiminde yer alan tuz miktarları ayarlanarak kromatografik yöntemleri olumsuz etkilemeyen deterjanlar denenecektir. Dondurma - çözme ve sonikasyon gibi fiziksel yöntemlerin çözünmüş protein eldesine ve deterjan kullanımını önlemeye katkısı araştırılacaktır. Böylece, en düşük maliyetli ve en etkin lizat hazırlama yöntemi oluşturulacaktır.

Rekombinant proteinlerin saflaştırılması için afinite tabanlı teknikler öncelikle tercih edilecektir. Bu amaçla immobilize metal afinite kromatografisi kullanılacaktır. Nikel (ya da çinko, bakır,...) yüklenmiş ve şartlandırılmış kolondan süzölmüş hücre lizatı geçirilecektir (33-35). Düşük miktarda imidazol içeren tampon ile yapılacak yıkamanın ardından imidazol konsantrasyon gradiyenti ya da sabit konsantrasyonda imidazol ile elüsyon gerçekleştirilecektir. Toplanan fraksiyonlardan en yüksek protein içerenleri birleştirilerek jel filtrasyon kolonuna enjekte edilecektir. Kesim noktası 5 kDa dolaylarında olan bir grup seperasyon jeli ile tampon değiştirme işlemi uygulanacak, imidazol uzaklaştırılacaktır.

İmmobilize metal afinite kromatografisinin uygun olmadığı ya da yetersiz kaldığı durumda ise iyon değiştirme, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografi yöntemleri kullanılacaktır.

Kromatografik saflaştırmanın ardından elde edilen proteinler SDS-PAGE ve western blot ile analiz edilecektir (32).

Elde edilen rekombinant proteinlerin HBVgp2'ye ait olmayan ve ekspresyon vektöründen kaynaklanan ekstra bölgeleri ("tag"ler) kullanılan vektöre göre trombin, aktive faktör X ya da enterokinaz kullanılarak kesilecektir. Saflaştırma işlemi benzamidin sefaroze kolon ve diğer kromatografik teknikler kullanılarak gerçekleştirilecektir.

## ***B planı***

Bakteriyel ekspresyon sistemleri kullanılarak rekombinant protein üretiminde başarısızlık sıklıkla

karşılaşılabilen bir durumdur. Bunun da en sık nedenleri olarak eksprese edilmek istenen proteinin bakteri hücresi üzerindeki toksik etkileri ve ekspresyon konağı olarak seçilen hücrenin kodon tercihi gösterilmektedir (36; 27; 37).

Diğer bir sorun ise, ifadelendirilecek genin güçlü promotorların arkasına yerleştirilmesi sonucunda hızla üretilen proteinlerin bakteri hücresi içinde çözünürlüklerini kaybederek inklüzyon cisimleri oluşturmalarıdır. Inklüzyon cisimciklerinden proteinlerin çözünür hale getirilerek ekstrakte edilmesi ve fonksiyonel konformasyona getirilmesi bazen mümkün olamamaktadır (38).

Rekombinant HBsAg üretiminde karşılaşılabilecek muhtemel sorunlar için alternatif çözüm yolları da planlanmıştır. Kodon tercihindan kaynaklanabilecek ekspresyon sorunları için E. coli nadir kodonlarına yönelik tRNA havuzunun genişletilmesi için tRNA genleri klonlanmış plazmid kullanılacaktır (27; 39). Toksik etkinin giderilmesine yönelik olarak eksprese edilecek proteinlerin, N-terminal bir tag ile kimerik olarak sentezlettirilmesi denenecektir. Çalışma grubumuzun halen kullanmakta olduğu glutathion-S-transferaz ya da "small ubiquitin related modifier" (SUMO) tag kullanılacaktır (Invitrogen, ABD).

Bakteri hücresinde çözünür halde ve anti-HBsAg antikorları ile immünoreaktif özellikte rekombinant HBVgp2 ekspresyonu mümkün olmazsa maya ekspresyon sistemleri denenecektir. Bu amaçla Saccharomyces cerevisiae pYES sistemi ile Pichia pastoris pPIC-Z sistemi denenecektir (40-43).

### **Kaynaklar:**

1. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature 1979 Dec;282(5739):615-616. [cited 2011 Aug 19 ]
2. Twist EM, Clark HF, Aden DP, Knowles BB, Plotkin SA. Integration pattern of hepatitis B virus DNA sequences in human hepatoma cell lines. J Virol 1981 Jan;37(1):239-243.
3. Darlington GJ, Kelly JH, Buffone GJ. Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. In Vitro Cell. Dev. Biol 1987 May;23(5):349-354.[cited 2011 Aug 19 ]
4. Kaabache T, Barraud B, Feldmann G, Bernuau D, Lardeux B. Direct solution hybridization of guanidine thiocyanate-solubilized cells for quantitation of mRNAs in hepatocytes. Anal. Biochem 1995 Dec;232(2):225-230.[cited 2011 Aug 31 ]
5. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning. CSHL Press; 2001.
6. Boom R, Sol C, Beld M, Weel J, Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P. Improved Silica-

Guanidiniumthiocyanate DNA Isolation Procedure Based on Selective Binding of Bovine Alpha-Casein to Silica Particles. *J. Clin. Microbiol.* 1999 Mar;37(3):615-619.[cited 2011 Aug 10 ]

7. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. [Internet]. 1997;[cited 2011 Aug 10] Available from: <http://pubget.com/paper/9067025>
8. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Apr;86(7):2172-2175.
9. Shamay M, Agami R, Shaul Y. HBV integrants of hepatocellular carcinoma cell lines contain an active enhancer. *Oncogene* 2001 Oct;20(47):6811-6819.[cited 2011 Aug 31 ]
10. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980 Jul;209(4455):497-499.[cited 2011 Aug 19 ]
11. Hsu IC, Tokiwa T, Bennett W, Metcalf RA, Welsh JA, Sun T, Harris CC. p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis* 1993 May;14(5):987-992.[cited 2011 Aug 31 ]
12. Saito H, Morizane T, Watanabe T, Kagawa T, Miyaguchi S, Kumagai N, Tsuchimoto K, Tsuchiya M. Proto-oncogene expression in three human hepatoma cell lines, HCC-M, HCC-T and PLC/PRF/5. *Keio J Med* 1991 Sep;40(3):139-145.[cited 2011 Aug 31 ]
13. Pujol FH, Navas M-C, Hainaut P, Chemin I. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 2009 Dec;286(1):80-88.[cited 2011 Aug 16 ]
14. Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *Journal of General Virology* 2000 May;81(5):1165 -1174.[cited 2011 Aug 16 ]
15. Ohnuma H, Machida A, Okamoto H, Tsuda F, Sakamoto M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Allelic subtypic determinants of hepatitis B surface antigen (i and t) that are distinct from d/y or w/r. *J Virol* 1993 Feb;67(2):927-932.
16. Geretti AM, Patel M, Sarfo FS, Chadwick D, Verheyen J, Fraune M, Garcia A, Phillips RO. Detection of Highly Prevalent Hepatitis B Virus Coinfection among HIV-Seropositive Persons in Ghana. *J. Clin. Microbiol.* 2010 Sep;48(9):3223-3230.[cited 2011 Aug 17 ]
17. Deguchi M, Kagita M, Asari S, Iwatani Y, Tsuchida T, Inuma K, Sanborn M. [Evaluation of seven immunological assay reagents for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) in the sensitivity and the detection of HBsAg mutants]. *Kansenshōgaku Zasshi* 2005 Feb;79(2):138-142.[cited 2011 Aug 17 ]
18. Ali A, Pearce S, Coleman P. Factors affecting immunodetection of hepatitis B surface antigen recombinant mutants. *Journal of Medical Virology* 2007 Jan;79(S1):S47-S51.[cited 2011 Aug 17 ]
19. Dufour DR. Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Assays--Are They Good Enough for Their



Current Uses? Clin Chem 2006 Aug;52(8):1457-1459.[cited 2011 Aug 17 ]

20. Wolters G, Nelissen P, Kuijpers L. Improved ELISA for the detection of HBsAg. Journal of Virological Methods 1985 Apr;10(4):299-305.[cited 2011 Aug 18 ]
21. Ly TD, Servant-Delmas A, Bagot S, Gonzalo S, Férey M-P, Ebel A, Dussaix E, Laperche S, Roque-Afonso A-M. Sensitivities of Four New Commercial Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Assays in Detection of HBsAg Mutant Forms. J Clin Microbiol 2006 Jul;44(7):2321-2326.
22. Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, Kumarasamy T, Thyagarajan SP. Transmission of “a” determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. Jpn. J. Infect. Dis 2008 Jan;61(1):73-76.[cited 2011 Aug 17 ]
23. Tian J, Liu Q, Dong S, Qiao X, Ni J. A new method for multi-site-directed mutagenesis. Analytical Biochemistry 2010 Nov;406(1):83-85.[cited 2011 Aug 31 ]
24. Edelheit O, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. BMC Biotechnol 2009;9:61.[cited 2011 Aug 31 ]
25. Li J, Li C, Xiao W, Yuan D, Wan G, Ma L. Site-directed mutagenesis by combination of homologous recombination and DpnI digestion of the plasmid template in Escherichia coli. Analytical Biochemistry 2008 Feb;373(2):389-391.[cited 2011 Aug 31 ]
26. Shenoy AR, Visweswariah SS. Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. Analytical Biochemistry 2003 Aug;319(2):335-336.[cited 2011 Aug 31 ]
27. Rosano G, Ceccarelli E. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted Escherichia coli strain. Microbial Cell Factories 2009;8(1):41.[cited 2011 Jan 11 ]
28. Paithankar KR, Prasad KS. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. Nucleic Acids Res 1991 Mar;19(6):1346.[cited 2011 Aug 31 ]
29. Lis JT. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. Meth. Enzymol 1980;65(1):347-353.[cited 2011 Aug 31 ]
30. Chung CT, Miller RH. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. Nucleic Acids Res 1988 Apr;16(8):3580.[cited 2010 Mar 14 ]
31. Vaillancourt PE. E. coli Gene Expression Protocols. Softcover reprint of hardcover 1st ed. 2003 ed. Humana Press; 2011.
32. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons; 1993.
33. Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS, Samuelson JC. Engineering Escherichia coli BL21(DE3) derivative strains to minimize E. coli protein contamination after purification by

immobilized metal affinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol* 2011 Jul;77(13):4634-4646.[cited 2011 Aug 31 ]

34. Zhao C, Hellman LM, Zhan X, Bowman WS, Whiteheart SW, Fried MG. Hexahistidine-tag-specific optical probes for analyses of proteins and their interactions. *Anal. Biochem* 2010 Apr;399(2):237-245.[cited 2011 Aug 31 ]
35. Abe R, Kudou M, Tanaka Y, Arakawa T, Tsumoto K. Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2009 Apr;381(3):306-310.[cited 2011 Aug 31 ]
36. Jacinto-Loeza E, Vivanco-Domínguez S, Guarneros G, Hernández-Sánchez J. Minigene-like inhibition of protein synthesis mediated by hungry codons near the start codon. *Nucleic Acids Research* 2008;36(13):4233 -4241.[cited 2011 Jan 11 ]
37. Vernet E, Kotzsch A, Voldborg B, Sundström M. Screening of genetic parameters for soluble protein expression in *Escherichia coli* [Internet]. *Protein Expression and Purification* [date unknown];In Press, Corrected Proof[cited 2011 Jan 22] Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WPJ-51M0NBJ-1/2/3f0773f7284f67c2afc31bbda615f4c2>
38. Otto CM, Niagro F, Su X, Rawlings CA. Expression of recombinant feline tumor necrosis factor is toxic to *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 1995 Nov;2(6):740-746.[cited 2011 Aug 31 ]
39. Ciampi MS. Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* 2006 Sep;152(9):2515-2528.[cited 2011 Jan 17 ]
40. Calik P, Orman MA, Celik E, Halloran SM, Calik G, Ozdamar TH. Expression system for synthesis and purification of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris* and structural analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry. *Biotechnol. Prog* 2008 Feb;24(1):221-226.[cited 2011 Aug 31 ]
41. Celik E, Calik P, Halloran SM, Oliver SG. Production of recombinant human erythropoietin from *Pichia pastoris* and its structural analysis. *J. Appl. Microbiol* 2007 Dec;103(6):2084-2094.[cited 2011 Aug 31 ]
42. Hadiji-Abbes N, Borchani-Chabchoub I, Triki H, Ellouz R, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Expression of HBsAg and preS2-S protein in different yeast based system: a comparative analysis. *Protein Expr. Purif* 2009 Aug;66(2):131-137.[cited 2011 Aug 31 ]
43. Kim E-J, Park Y-K, Lim H-K, Park Y-C, Seo J-H. Expression of hepatitis B surface antigen S domain in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using GAL1 promoter. *J. Biotechnol* 2009 May;141(3-4):155-159.[cited 2011 Aug 31 ]