Original Article

Design, Cloning, and Expression assay of the *NP* Gene in a Bicistronic Vector Harboring the Mouse *IL-18* Gene: Potential Implications for Type A Influenza Vaccine Investigations

Mojtaba Taheri[1], Mohammad Shenagari[2*], Iraj Nikokar[1], Mahmoud Khosravi[1], Mehran Nemattalab[2]

1- M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Para-Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Langroud, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
3- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Para-Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Langroud, Iran
4- Instructor, Department of Biotechnology, Faculty of Para-Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Langroud, Iran
5- M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 4199613769, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran*
Email: Shenagari@gums.ac.ir, Shenagari@gmail.com

Received: 16/May/2016, Accepted: 12/Dec/2016

Abstract

Objective: Vaccination is the most effective tool to prevent influenza virus morbidity and mortality. Despite surface antigen mutability, the influenza virus inner proteins are remarkably conserved among various strains. The high similarity of NP protein sequences among various strains of influenza type A from one side, and the potency of IL-18 molecular adjuvant in shifting immune response toward Th1 from the other side, has persuaded us to evaluate the possibility to clone and express the influenza type A NP gene in a bicistronic vector that harbored the mice *IL-18* gene. We sought to assess their immunogenic activities in a susceptible mouse model.

Methods: Initially, we extracted genomic RNA from the influenza virus PR8. After cDNA synthesis, the target gene encoding NP was amplified by PCR after which the NP gene was cloned in the pJET1.2/blunt TA vector. The accuracy of cloned gene was confirmed by PCR, enzymatic digestion and sequencing. The pJET1.2-NP plasmid and pIRES-Igk/mIL18/Fc plasmids were simultaneously digested by *BstXI/NotI* enzymes. We inserted the digested NP fragment into the pIRES-Igk/mIL18/Fc plasmid using T4 ligase. Transformation into DH5α and colony selection was done. Gene cloning was confirmed by PCR, enzymatic double-digestion and sequencing. Eventually, by transfection of the constructed mIL-18-pIRES2-NP plasmid into BHK-21 and RAW264.7 cell lines, we assessed the expressions of *NP* and *IL-18* by indirect immunofluorescence and ELISA, respectively.

Results: Electrophoresis of the PCR product, enzymatic digestion, and sequencing showed that the influenza *NP* gene successfully cloned into pIRES-Igk/mIL18/Fc to generate the mIL-18-pIRES2-NP plasmid. Indirect immunofluorescence and ELISA indicated the successful expressions of *NP* and mIL-18 from the produced plasmid in eukaryotic cell lines.

Conclusion: The results of the present study confirm expressions of *NP* and *IL-18* genes from mIL-18-pIRES2-NP. This is a proper candidate for *influenza A* gene vaccine in future investigations.

Keywords: Influenza, Cloning, *NP* gene, Mouse *IL-18*, Bicistronic vector

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.2, Pages: 45-58

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مقاله اصیل

طراحی، همسانه‌سازی و بررسی بیان ژن NP در ناقل دوسیسترونی واجد ژن اینترلوکین ۱۸ موشی با هدف استفاده در مطالعات واکسن آنفلوانزا

مجتبی طاهری[۱]، محمد شناگری[۲*]، ایرج نیکوکار[۳]، محمود خسروی[۴]، مهران نعمت طلب[۵]

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، لنگرود، ایران
۲- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پیراپزشکی، لنگرود، ایران
۴- مربی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، رشت، کدپستی: ۴۱۹۹۶۱۳۷۶۹، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی
Email: Shenagari@gums.ac.ir, Shenagari@gmail.com

دریافت مقاله: ۹۵/۰۷/۲۷ پذیرش مقاله: ۹۵/۰۹/۰۷

چکیده

هدف: در حال حاضر واکسیناسیون مهم ترین استراتژی در کاهش آمار مبتلایان و مرگ و میر سالیانه ناشی از آنفلوانزا فصلی تلقی می‌شود. بر خلاف آنتی‌ژن‌های سطحی مورد استفاده در ترکیب واکسن‌های موجود، پروتئین‌های داخلی ساختاری و غیر ساختاری ویروس آنفلوانزا به خوبی حفاظت شده هستند. با توجه به سطح حفاظت شدگی نسبتا بالای نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا و قابلیت ادجوانتی اینترلوکین ۱۸ در تحریک پاسخ‌های ایمنی و میل به Th1، این مطالعه در صدد ساخت یک پلاسمید دو سیسترونی با قابلیت بیان ژن‌های *NP* و اینترلوکین ۱۸ موشی بود تا در صورت نیل به این هدف به‌عنوان یک کاندید واکسن قابلیت ایمنی‌زایی آن در مطالعات بعدی ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها: در مرحله اول RNA ژنومی ویروس آنفلوانزا تیپ A سویه H_1N_1/ PR8 استخراج شد و پس از تولید cDNA، توالی ژن کد کنندهٔ NP با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن و با روش PCR تکثیر شد. در مرحلهٔ بعد ژن NP در ناقل همسانه‌سازی pJET1.2/blunt همسانه‌سازی شد. پس از تأیید درستی همسانه‌سازی ژن در ناقل pJET1.2/blunt از طریق تعیین توالی، هضم آنزیمی و PCR، قطعه مزبور توسط هضم آنزیمی دو گانه خارج شد. پلاسمید pIRES-Igk/mIL18/Fc با استفاده از آنزیم‌های *BstXI/NotI* هضم دوگانه شد و قطعه مربوط به eGFP خارج شد. سپس فرآیند الحاق ژن NP در ناقل دو سیسترونی pIRES-Igk/mIL18/Fc هضم شده با استفاده از آنزیم T4 لیگاز صورت پذیرفت. محصول لیگاسیون به سویه استاندارد DH5α ترانسفورم شد و انتخاب کلونی‌های مثبت با استفاده از کلونی PCR صورت پذیرفت. به‌منظور بررسی درستی همسانه‌سازی از آزمون PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد. در نهایت بیان ژن *NP* و اینترلوکین ۱۸ از سازه ژنی mIL-18-pIRES2-NP در رده سلولی BHK-21 و RAW264.7 ترانسفکت شده با پلاسمید به وسیلهٔ رنگ آمیزی ایمنوفلورسنت غیر مستقیم و الایزا ارزیابی شد.

نتایج: نتایج PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به صورت دو جهته نشان داد که ژن *NP* ویروس آنفلوانزا در ناقل pIRES-Igk/mIL18/Fc به‌صورت موفق و در راستای درست کلون شده است. ترانسفکشن و بررسی قابلیت بیان سازه ژنی mIL-18-pIRES2-NP با استفاده از رنگ آمیزی ایمنوفلوئورسانس و الایزا بیان موفق‌آمیز ژن‌های *NP* و اینترلوکین ۱۸ از mIL-18-pIRES2-NP در سلول یوکاریوتی را اثبات کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بیان موفقیت‌آمیز ژن *NP* و اینترلوکین ۱۸ از سازه mIL-18-pIRES2-NP را نشان داد. با توجه به آثار ادجوانتی سایتوکاین اینترلوکین ۱۸، پلاسمید ساخته شده می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب واکسن ژنی برای پیشگیری از عفونت ناشی از ویروس آنفلوانزا در مطالعات ارزیابی ایمنولوژیک آتی مطرح شود.

کلیدواژگان: همسانه‌سازی، آنفلوانزا، واکسن ژنی، ژن *NP*، اینترلوکین ۱۸

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، صفحات: ۴۵-۵۸

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

ویروس آنفلوانزا (Influenza virus) بـه‌خـاطر تغییـرات ژنتیکی و آنتی‌ژنیک، به‌عنوان عامل بالقوه خطرناک برای ایجاد اپیدمی (Epidemic) و پاندمی (Pandemic) شناخته می‌شود. ویروس آنفلوانزا سالیانه به‌طور تقریبی ۲۰ درصد از جمعیـت جهان را درگیر می‌کنـد و بـیش از ۵۰۰ هـزار نفـر بـه علـت عوارض ناشی از این عفونت جان خود را از دست می‌دهنـد [۱]. علاوه بر این اپیدمی‌ها؛ همه‌گیری‌هـای جهـانی آنفلـوانزا می‌تواند در صورت ایجـاد یـک ویـروس آنفلـوانزای واجـد زیرگونه‌های جدید همـاگلوتینین (Hemagglutinin) ظهـور کند و با سرعت بسیار زیاد در میان افراد سرایت پیـدا کنـد. ده همه‌گیری بزرگ جهانی طی ۳۰۰ سال اخیر اتفاق افتاده اسـت که سه مورد از این پاندمی‌ها در قرن بیسـتم منجـر بـه مـرگ حداقل چهل میلیون نفر شده‌اسـت [۲]. نخسـتین همـه‌گیـری جهانی قرن ۲۱ در سال ۲۰۰۹ با آغـاز عفونـت از مکزیـک و گسترش آن در عرض چند ماه به اکثریت کشـورهای دنیـا بـا میزان مرگ و میر حدود ۲۸٤۰۰ نفر از مبتلایان باعث شـد تـا سازمان بهداشت جهانی سطح دوم بالاترین هشدار را در مورد این بیماری اعلام کند [۳].

واکسن غیر فعال سـه ظرفیتـه (Trivalent Inactivated influenza Vaccine: TIV) و واکسـن زنـده ضـعیف شـده (Live, Attenuated Influenza Vaccine: LAIV) هر سـاله برای پیشگیری از سویه‌های غالب آنفلوانزای قابل پـیش‌بینـی طراحی و ساخته می‌شوند [٤]. واکسن‌های مورد استفاده دارای مجوز از چندین منظر دارای نقص هسـتند؛ از جملـه صـرف هزینه و وقت بسیار برای تولیـد تخـم مـرغ عـاری از عامـل بیماری‌زا و همچنین امکان ایجاد علایم مربوط به حساسیت در بعضی از افراد، احتیاج به بازبینی سالیانه ترکیب واکسن، چرخه تولید نسبتاً طولانی حدود ۹ ماه از زمان پیش‌بینی سویه شـایع سال تا تولید و عرضه، تأثیر جزیی بر سویه واجـد HA تغییـر یافته و همچنین محدودیت در میزان دوز تولیدی و عدم ایجاد پاسخ ایمنی سلولی در صـورت اسـتفاده از TIV [٥، ٦]. یـک استراتژی جایگزین برای واکسن آنفلوانزا کـه مـی‌توانـد اکثـر معایب فوق را برطرف سازد پلاسمید بیان کننده آنتی‌ژن‌هـای محافظت شدهٔ ویروس آنفلوانزا است. واکسن‌های ژنی دارای مزایای بسیاری نظیر تحریک هر دو بـازوی سیسـتم ایمنـی و پایداری در شرایط دمایی بوده و تولید راحت و ارزان آن‌ها در مقیاس وسیع امکان‌پذیر است [٦، ۷]. شاید بتوان مهم‌ترین ایراد این نوع واکسن‌ها را کارآیی پایین آن‌ها در ایجاد پاسخ ایمنی در انسان‌ها و پریمات‌های غیر انسانی دانست [۸]. با وجود آن که پاسخ‌های آنتی‌بادی، به شدت اختصاصی و مستعد به گریز ویروس به‌وسیله تغییرات آنتی ژنی کوچک و بـزرگ هسـتند، پاسخ‌هـای ایمنـی سـلولی واجـد خصیصـهٔ واکـنش متقـاطع (cross-reactive) هستند. بی‌قاعـدگی گیرنـده سـلول‌هـای TCD4 و TCD8 می‌تواند به آن‌ها اجازه شناسایی اپی‌توپ‌هـا را حتی پس از جهش نقطه‌ای بدهد [۹] از سوی دیگر؛ حضور قبلی سلول‌های TCD4 با واکنش متقاطع می‌توانـد در تولیـد سریع آنتی‌بادی‌های خنثی کنندهٔ اختصاصی تایپ نیز مؤثر باشد [۱۰]. بر خلاف پروتئین‌های سـطحی، پـروتئین‌هـای داخلـی ساختاری و غیر ساختاری ویروس آنفلوانزا به‌خوبی حفاظت شده هستند. این پروتئین‌ها سبب تحریک و القای شکل‌گیـری سلول‌های T سیتوتوکسیک (Cytotoxic T Lymphocytes: CTL) می‌شوند که قادر به تخریب سلول‌های آلوده به ویروس هستند [۱۱]. نوکلئوپروتئین یک زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی اسـت کـه توسط قطعهٔ شماره ۵ ژنوم ویـروس آنفلـوانزا کـد مـی‌شـود. هم‌ردیفی توالی ژن‌های نوکلئوپروتئین سه گونـه و همچنـین تحلیل فیلوژنیک سویه‌های ویروس جدا شده از میزبـان‌هـای مختلف آشکار می‌سازد که ژن نوکلئوپروتئین نسـبتاً در طـول فرآیند تکامل حفاظت شده است و حداکثر تفاوت آمینواسیدی آن‌ها ۱۱درصد است [۱۲].

اینترلوکین ۱۸ (Interleukin 18: IL-18) یـک سـایتوکاین پیش التهابی و یک عامل القا کننده اینترفـرون گامـا محسـوب می‌شود که تولید اینترفرون گاما را در سلول‌های کشندهٔ طبیعی و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک القا می‌کند و همچنین خاصیت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

سلول کشی وابسته به Fas و پرفورین (Perforin) را در این سلول‌ها بالا می‌برد [۱۳]. این سایتوکاین نقش اساسی در فعالیت کمکی لنفوسیت‌های T کمک کننده (T helper 1) دارد [۱٤]. خصوصیت بارز این سایتوکاین در تحریک سلول‌های کشندهٔ طبیعی و سلول‌های T سیتوتوکسیک و به‌دنبال آن افزایش فعالیت کشندگی این سلول‌ها موجب شده که استفاده از این سایتوکاین در تحقیقات تولید واکسن و ایمنی درمانی تومورها بسیار مورد توجه قرار گیرد [۱۵]. مطالعات جدید نشان داده است که عرضه همزمان آنتی‌ژن و ادجوانت توسط سلول‌های APC (Antigen-Presenting Cell) تحریک بهتر لنفوسیت‌ها را به‌دنبال خواهد داشت [۸، ۱٦، ۱۷]. از آن‌جا که DNA واکسن‌ها به‌عنوان یک پیشنهاد جدی و ماندگار برای پیشگیری از بیماری‌های مسری کلاسیک و نوظهور در آینده مطرح هستند و با توجه به خطرات بالقوه ویروس آنفلوانزا، همچنین قابلیت ادجوانتی IL-18 در تحریک پاسخ‌هابه Th1، این مطالعه به منظور ساخت یک پلاسمید دو سیسترونی با قابلیت بیان ژن‌های NP و IL-18 موشی انجام شد تا در مطالعات بعدی به‌عنوان یک کاندید واکسن قابلیت ایمنی‌زایی این سازه ژنی در مدل موشی ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر دارای تأییدیه از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گیلان است

بررسی بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرها

به‌منظور کلونینگ ژن NP از ویروس Influenza A/PR8/34 (H1N1)، نخست دو جفت آغازگر برای تکثیر ژن طراحی شد. برای این منظور ابتدا توالی ژن از بانک ژنی NCBI دریافت شد و سایت‌های برش آنزیم‌های محدود کننده موجود در توالی با استفاده از نرم‌افزار Nebcutter بررسی شد. سپس طراحی آغازگرها با کمک نرم‌افزارهای Oligo7، NCBI Blast و Oligo analyzer انجام شد. در طراحی آغازگرها، قابلیت در تکثیر مؤثر قطعه کامل ژنی همچنین الحاق جایگاه برش برای آنزیم‌های BstxI و NotI مد نظر قرار گرفت. به‌منظور بیان بهتر ژن NP توالی کوزاک (Kozak sequence) در طراحی آغازگرها لحاظ شد. پس از تأیید کارآیی آغازگرها در سطح In silico سنتز آغازگرها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) با خلوص HPLC انجام شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده TAGTCACCACAACCATGGCGTCCCAAGGCACCAA (BstxI) (آغازگر جلویی) و TAGTGTGCGGCCGCTTAATTGTCGTACTCCTCTG (NotI) (آغازگر برگشتی) بود.

استخراج RNA ویروسی و سنتز cDNA

برای این منظور رده سلولی MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells) از بانک سلولی و ویروس Influenza A/PR8/34 (H_1N_1) از بخش آنفلوانزا انستیتو پاستور ایران تهیه شد. بعد از بهینه‌سازی شرایط کشت، کشت و استحصال ویروس از رده سلولی یادشده انجام شد. پس از برداشت ویروس آنفلوانزا و انجام آزمون هماگلوتیناسیون، استخراج RNA ویروسی با استفاده از کیت QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN، آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. واکنش RT-PCR با استفاده از کیت سنتز cDNA (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) (ABI، آمریکا) نیز طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. در پایان از محصول به‌دست آمده به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد.

واکنش PCR برای تکثیر ژن NP

تکثیر ژن NP از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ۱۰ پیکومول آغازگر جلویی و برگشتی، ۲/۵ میلی‌مولار $MgSo_4$، ۱ میلی‌مولار

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

dNTP، ۳۰۰ نانوگرم cDNA انجام شد. برای جلوگیری از جهش احتمالی از آنزیم Pfu (Fermentas، کانادا) استفاده شد. چرخه دمایی واکنش PCR ۵ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ ثانیه در ٦۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ چرخه بود و در نهایت ۱۰ دقیقه در ٦۸ درجه سانتی‌گراد برای سنتز نهایی در نظر گرفته شد.

همسانه‌سازی ژن NP در ناقل pJET1.2/blunt

محصول PCR بر روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین (Low Melting Agarose) با غلظت ۰/۸ درصد در مجاورت نشانگر DNA ۱ کیلوباز الکتروفورز شد. برش قطعه مربوط به ژن NP از روی ژل انجام و سپس با کیت استخراج DNA از ژل (QIAquick gel extraction kit) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص شد و در ناقل pJET1.2/blunt با استفاده از کیت CloneJET PCR Cloning طبق دستورالعمل شرکت سازنده کلون شد. غلظت مواد مورد استفاده برای واکنش لیگاسیون شامل ۱۱۳ نانوگرم محصول PCR، ۱۰ میکرولیتر بافر، ۵۰ نانوگرم ناقل pJET1.2/blunt، ۱ میکرولیتر آنزیم T4 ligase با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. میکروتیوب حاوی واکنش به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به‌منظور غیر فعال‌سازی آنزیم ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اتمام انکوباسیون، محصول فرآیند لیگاسیون به سویه استاندارد DH5α مستعد شده با کلسیم کلراید ترانسفورم شد و سلول‌های ترانسفورم شده روی پلیت واجد ۱۰۰ میکروگرم/ میکرولیتر آمپی‌سیلین کشت داده شد.

بررسی درستی همسانه‌سازی ژن NP در ناقل pJET1.2/blunt

به‌منظور تأیید همسانه‌سازی یک واکنش هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های محدود کننده BstXI و NotI انجام شد. پس از تأیید نتایج توسط این آزمون به‌منظور بررسی درستی توالی کلون شده، توالی‌یابی دو جهته پلاسمید با استفاده از ست آغازگر اختصاصی موجود در کیت که واجد جایگاه اتصال در بدنه ناقل بود توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین توالی

3'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-5'

(آغازگر جلویی) و

3'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-5'

(آغازگر برگشتی) بود.

ساب کلون ژن NP از ناقل pJET1.2- NP به سازه ژنی واجد ژن IL-18 (Igk/mIL-18/Fc-pIRES)

در این مطالعه به‌منظور همسانه‌سازی ژن NP در پلاسمید واجد IL-18 (pIRES-Igk/mIL18/Fc) می‌بایست ژن eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) واقع در جایگاه بعد از توالی IRES (Internal Ribosome Entry Site)، با استفاده از دو آنزیم BstXI و NotI از ناقل خارج و سپس ژن NP هضم شده و خارج شده از pJET1.2-NP در این ناحیه وارد می‌شد. برای این منظور نخست هضم آنزیمی pIRES-Igk/mIL18/Fc و pJET1.2-NP انجام شد. میکروتیوب‌های حاوی واکنش‌های فوق به‌مدت یک و نیم ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس به‌منظور غیر فعال‌سازی آنزیم NotI به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از آن به هر میکروتیوب ۰/۵ میکرولیترآنزیم BstXI افزوده و یک ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به‌منظور غیر فعال نمودن این آنزیم، مجدداً به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محصول هضم آنزیمی دو واکنش فوق روی دو ژل آگارز ۰/۸ درصد تهیه شده از آگارز با دمای ذوب پایین الکتروفورز

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

شد و پس از تکمیل، باندهـای اختصاصـی مربـوط بـه NP و pIRES–Igk/mIL18/Fc از ژل بریده شد و با کیت اسـتخراج از ژل (QIAquick gel extraction kit) طبـق دسـتورالعمل سـازنده اسـتخراج شـد. بـه‌منظـور الحـاق ژن NP در ناقـل pIRES–Igk/mIL18/Fc واکنش لیگاسیون با استفاده از آنـزیم T4 لیگاز (Takara، ژاپن) طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت انجام شد. میکروتیوب حاوی واکنش به‌مدت ١٤ ساعت در ١٦ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام انکوباسیون محصول واکنش لیگاسیون با روش شوک حرارتی به بـاکتری اشریشـیا کلی سویه DH5α ترانسفورم شد و باکتری‌ها به‌صورت چمنی روی پلیت آگار واجد ۵۰ میکروگرم بر میلـی‌لیتـر کانامایسـن کشت داده شدند و به‌مدت ٢٤ ساعت در ٣٧ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

ارزیابی درستی همسانه‌سازی NP در در ناقـل pIRES–Igk/mIL18/Fc

پس از ٢٤ ساعت کلونی‌های ایجاد شده از نظر حضور ژن NP بررسی شد. برای این منظور Colony PCR با اسـتفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن NP روی کلونی‌های ایجاد شـده، انجـام شـد. کلـونی‌هـای مثبـت در محـیط LB مـایع واجـد آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح شد و به‌مدت ١٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد و سرعت ١٢٠ دور در دقیقه انکوبه شـد. سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسـمید (QIAprep Spin Miniprep Kit) پلاسمیدهای مربوطـه اسـتخراج شـد. بـرای تأیید همسانه‌سازی نخست آزمون هضم آنزیمـی دوگانـه بـا آنزیم‌های BstXI و NotI روی پلاسمیدهای اسـتخراج شـده انجام شد. همچنین از آزمون PCR با بهره‌گیری از آغازگرهای اختصاصی ژن NP طبق واکنش استاندارد، برای تأیید حضـور قطعه مربوطه استفاده شد. در نهایت از تعیین توالی دو جهته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای درستی توالی و جهـت الحاق ژن همسانه‌سازی شده استفاده گردید. توالی آغازگرهای طراحی شده برای تعیین توالی ژن NP شامل

5'-GCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTT-3' (آغازگر جلویی ١)،

5'-AGGCAGGACTTGTGAGCAACCGA-3' (آغازگر برگشتی ١)،

5'-AATGATGGATCAAGTGAGAGAGA-3' (آغازگر جلویی ٢) و

5'-AATCAGCCATACCACATTTGTAGAGG-3' (آغازگر برگشتی ٢) بود.

ترانسفکشن سازه ژنی mIL–18–pIRES2–NP

ارزیابی بیـان ژن‌هـای NP و mIL–18 از پلاسـمید mIL-18-pIRES2-NP در سلول یوکاریوتی با بهره‌گیری از رده‌های سلولی BHK21 و RAW264.7 (تهیه شـده از بانـک سـلولی انستیتو پاستور ایران) انجام شد. برای این منظور ٢٤ ساعت قبل از ترانسفکشن 10^5 سلول به هر چاهک پلیت ١٠ سانتی‌متـری منتقل شـد و در محـیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Biosera، انگلستان) حـاوی ١٥ درصـد FBS (Fetal Bovine Serum) (Biosera، انگلستان)، دمـای ٣٧ درجه سانتی‌گـراد، ۵ درصـد CO_2 و ٩٦ درصـد رطوبـت کشت شد به‌طوری که در روز ترانسفکشن تراکم سلول‌ها ٩۵–١٠٠ درصد بود. ٢٠ میکروگرم از سـازه ژنـی pIRES2–NP–mIL–18 در ١٠٠ میکرولیتـر آب دیـونیزه رقیـق شـد. ٣۵٠ میکرولیتر آب دیونیزه استریل همراه بـا ۵٠ میکرولیتـر کلسـیم کلراید ٢/۵ مولار درون یک میکروتیوب مخلـوط شـد سـپس سازه ژنی به این میکروتیوب افزوده شد. ۵٠٠ میکرولیتـر بـافر 2X HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid] درون یک فالکون ریخته شد. کمپلکس کلسیم کلراید/DNA به‌دست آمده از مرحله قبل به آرامی به فـالکون حاوی بافر HEPES افزوده شد و محلول همگن شـد؛ سـپس سریعاً محلول ۵ ثانیه ورتکس (Vortex) و ٢٠ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. کمپلکس حاصل روی سلول‌های هر چاهک توزیع شد. پس از ١۵ ساعت محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شد و سلول‌ها بـا PBS (Phosphate Buffered Saline) شسـته شدند. ٢ میلی‌لیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) ١٠ درصد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

به هر چاهک افزوده شد سپس پلیت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از اتمام دوره انکوباسیون سلول‌ها مجدداً با PBS شسته شدند و به آن‌ها محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS افزوده شد. یک ساعت در انکوباتور و شرایط استاندارد رشد انکوبه شدند و بعد از آن محیط کشت کامل با محیط کشت کامل جدید جایگزین شد. مجدداً ۲٤ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شد.

ارزیابی بیان و فعالیت زیستی IL-18 از سازه ژنی mIL-18-pIRES2-NP

به منظور بررسی بیان IL-18 از پلاسمید ساخته شده و فعالیت زیستی آن، از رده مونوسیت ماکروفاژی موشی (RAW264.7) استفاده شد. محیط کشت رویی سلول‌های ترانسفکت شده برای ارزیابی بیان IL-18 و IFN-γ جمع‌آوری شد و در نهایت با استفاده از کیت الایزای IL-18 موشی (Bender MedSystems، اتریش) و کیت الایزای (U-cytech bioscience، هلند) IFN-γ میزان بیان سایتوکاین‌های IL-18 و IFN-γ ارزیابی شد.

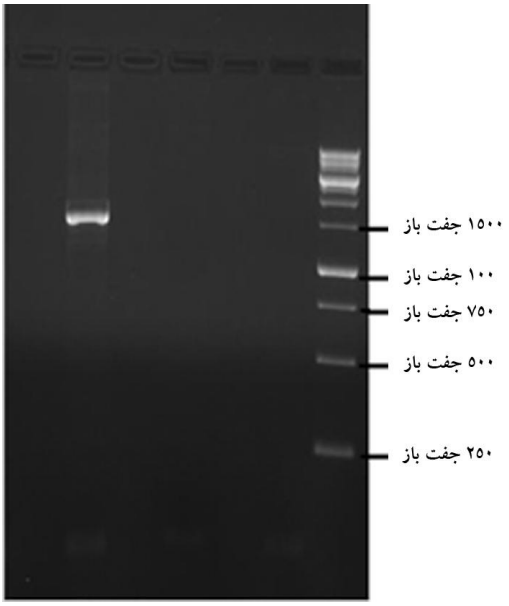
رنگ‌آمیزی ایمونوفلئورسنت سلول‌های BHK-21 به‌منظور ارزیابی بیان ژن NP

سلول‌های ترانسفکت شده نخست با PBS شسته شد و سپس ۱ میلی‌لیتر فرمالدیید ٤ درصد به هر چاهک افزوده و پلیت به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از آن مجدداً سلول‌ها با PBS شسته شدند. ۱ میلی‌لیتر Triton -X100، ۰/۲۵ درصد به هر چاهک افزوده و پلیت به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سلول‌ها با PBS شسته شدند. ۱ میلی‌لیتر محلول ۱/۳۰ آنتی‌بادی مونوکلونال ضد NP (AbCAM، ایالات متحده آمریکا) در PBS حاوی ۱ درصد BSA آماده و به هر چاهک اضافه شد. اسلاید تهیه شده به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس اسلاید با PBS شستشه شد. ۱ میلی‌لیتر محلول ۱/۵۰ آنتی‌بادی پلی کلونال ضد IgG موشی کونژوگه با FITC (Fluorescein isothiocyanate) (AbCAM، ایالات متحده آمریکا) در PBS حاوی ۱ درصد BSA تهیه و به هر چاهک اضافه شد. اسلاید به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد و بعد از آن ۳ مرتبه با PBS و یک مرتبه با آب شستشه شد. در انتها بیان ژن NP در سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

نتایج

الکتروفورز محصول PCR ژن NP

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن NP انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد در مجاورت نشانگر ۱ کیلوبازی الکتروفورز شد. نتیجه الکتروفورز محصول PCR در شکل ۱ آمده است. همان‌طور که مشخص است، باند ۱۵۰۰ جفت بازی حاصل از PCR ژن NP تأیید کننده تکثیر اختصاصی ژن NP بود.



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن NP

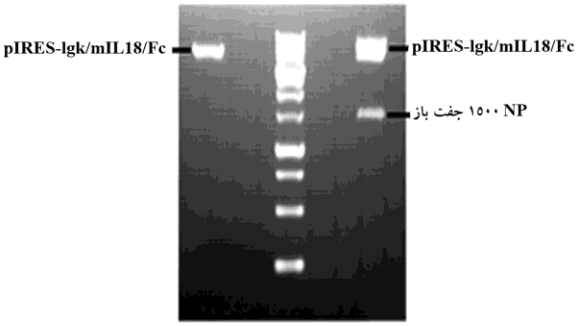
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

نتایج آزمون‌های ارزیابی درستی همسانه‌سازی NP در در ناقل pJET1.2/blunt

پس از الحاق (Ligation) ژن NP به پلاسمید pJET1.2/blunt، درستی نوترکیبی با انجام هضم آنزیمی، PCR و توالی‌یابی بررسی شد. برای این منظور پلاسمید استخراج شده از کلونی با استفاده از دو آنزیم NotI و BstXI هضم شد، همان‌طور که انتظار می‌رفت قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی مربوط به ژن NP از ناقل خارج شد. نتایج PCR نیز تأیید کننده حضور ژن NP در سازه ژنی pJET1.2/blunt_NP بود. همچنین نتایج تعیین توالی توسط نرم‌افزار Chromas بازیابی شد و با توالی NP، blastn و با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit و AlleleID هم ردیفی چندگانه انجام شد. نتایج نشان دهنده تشابه صد در صدی توالی ژن همسانه‌سازی شده با توالی ژن NP ویروس آنفلوانزا Influenza A/PR8/34 (H_1N_1) بود.

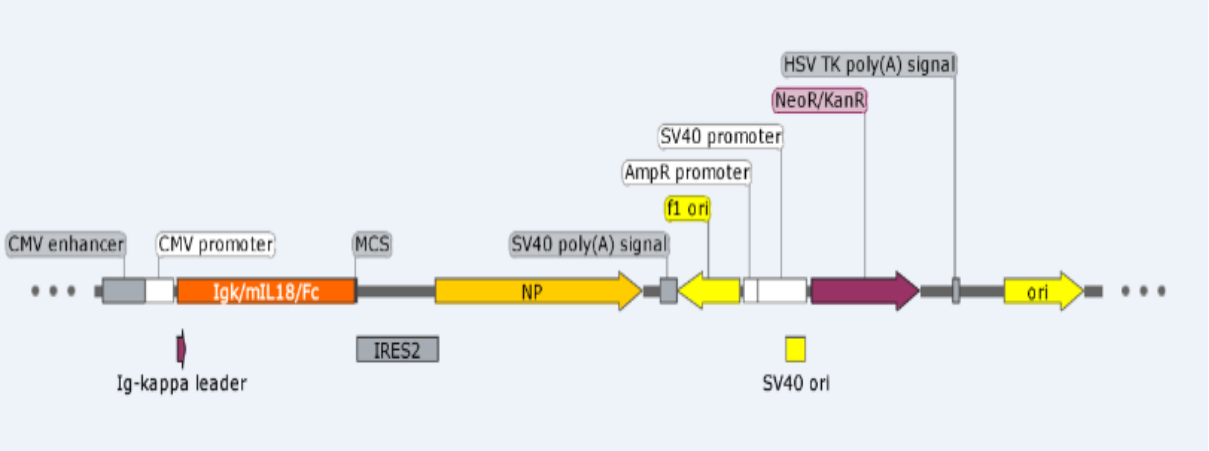
نتایج آزمون‌های ارزیابی درستی ساب کلونینگ ژن NP در ناقل pIRES–Igk/mIL18/Fc

از آزمون PCR برای اثبات حضور ژن NP در کلون‌های ایجاد شده استفاده شد که نتایج الکتروفورز تأیید کننده همسانه‌سازی این ژن در ناقل pIRES–Igk/mIL18/Fc و تولید محصول ۱۵۰۰ جفت بازی بود. نتایج هضم دوگانه با آنزیم‌های NotI و BstXI و الکتروفورز محصول واکنش هضم نیز مطابق با پیش‌بینی و خروج قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی مربوط به NP از ناقل بود.



شکل ۲ نتیجه الکتروفورز محصول هضم آنزیمی دوگانه‌سازه mIL–18–pIRES2–NP

همچنین نتیجه تعیین توالی قطعه کلون شده در ناقل با استفاده از آغازگرهای طراحی شده نشان دهندهٔ تشابه کامل توالی این قطعه با توالی ژن NP ویروس آنفلوانزا Influenza A/PR8/34 (H_1N_1) بود. شکل ۳ نقشه ژنتیکی پلاسمید ساخته شده mIL–18–pIRES2– NP را نشان می‌دهد.

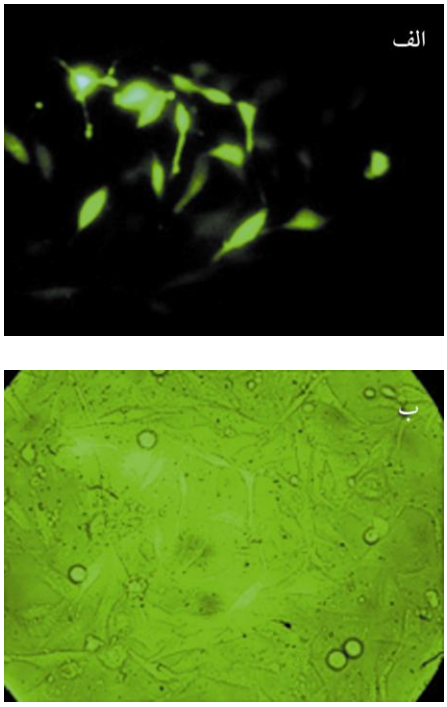


شکل ۳ نقشه ژنتیکی پلاسمید ساخته شده mIL–18–pIRES2–NP

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

نتایج بیان و فعالیت زیستی IL-18 موشی کلون شده

بررسی بیان و فعالیت زیستی پروتئین الحاقی IL-18-Fcy2a در محیط کشت رویی سلول‌های RAW 264.7 ترانسفکت شده نشان دهنده بیان mIL-18 در حد ۱۸۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر و IFN-γ در حد تقریباً ۱۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود.



شکل ٤ نتیجه رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت غیر مستقیم سلول‌های BHK21 ترانسفکت شده با سازه ژنی mIL-18-pIRES2-NP؛ الف) تصویر سلول‌ها با نور مرئی، ب) تصویر همان سلول‌ها با تابش فلوئورسنس

نتیجه ترانسفکشن و ارزیابی قابلیت بیان ژن NP در سلول با روش رنگ‌آمیزی ایمونوفلئورسنت غیر مستقیم

به‌منظور بررسی قابلیت بیان ژن NP سلول‌های ترانسفکت شده تحت رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت غیر مستقیم قرار گرفتند که نتیجه مشاهده سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسنت همان‌طور که در شکل ٤ می‌بینید اثبات کنندهٔ قابلیت بیان ژن NP از سازه ژنی mIL-18-pIRES2-NP در سلول‌های یوکاریوتی است.

بحث

آنفلوانزا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در جهان مدرن است که هر ساله به‌دلیل فقدان داروهای وسیع الطیف و واکسن‌های با مدت اثر طولانی آسیب گسترده‌ای به سلامت عمومی جامعه وارد می‌سازد. علاوه بر این؛ به علت پتانسیل زئونوز و تغییرپذیری گسترده آنتی‌ژنیک، این عامل بیماری‌زا تهدید مداوم برای ایجاد یک پاندمی جدید جهانی را نیز به ارمغان می‌آورد. بنابراین تحقیقات گسترده‌ای روی ارایه راه‌حل‌های جدید به‌منظور مبارزه با آنفلوانزا و کنترل آن متمرکز شده است. یکی از راه‌حل‌های احتمالی که می‌تواند به فایق آمدن بر مشکلات داروها و واکسن‌های موجود به جامعهٔ بشری کمک کند واکسن‌های ژنی است. DNA واکسن‌های موجود علیه ویروس آنفلوانزا را می‌توان دو دسته اصلی تقسیم نمود: ۱) واکسن‌های با هدف کاربرد در دامپزشکی (اغلب علیه H_5N_1 برای کاربرد در پرندگان و همچنین علیه دیگر سویه‌های آنفلوانزا به‌منظور استفاده برای اسب، خوک و...)، ۲) واکسن‌های به‌منظور مقابله با آنفلوانزای پاندمیک و فصلی انسانی (از جمله H_5N_1 عامل احتمالی پاندمی آتی). اغلب اثربخشی این واکسن‌ها در موش یا موش خرما آزمایش شده‌است، هر چند در مورد برخی ارزیابی‌های بالینی قبلاً به چاپ رسیده است [۷]. پس از مطالعات متعدد روی واکسن‌های ژنی کد کنندهٔ پروتئین‌های سطحی ویروس (NA و HA)، کارآیی کم این واکسن‌ها در ایجاد ایمنی با واکنش متقاطع مشاهده شد. اغلب این کارآیی کم، نتیجه تغییرات ژنتیکی و سپس آنتی‌ژنیکی در نوروآمینیداز و هماگلوتینین بود. بنابراین محققان برای ساخت واکسن‌های ژنی به پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری درونی ویروس که از لحاظ آنتی‌ژنیک پایدار هستند، روی آوردند. با توجه به مطالب اشاره

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

شده در مطالعه حاضر سعی شد تا به‌منظور دستیابی به استراتژی پیش‌گیرانه برای عفونت آنفلوانزا، DNA واکسنی طراحی شود که بازوی سلولی سیستم ایمنی را تحریک و ایمنی با واکنش متقاطع قابل قبولی را ایجاد کند. بنابراین برای نیل به این منظور ساختار ژنتیکی و آنتی‌ژنیک ویروس آنفلوانزا با هدف انتخاب آنتی‌ژن نسبتاً حفاظت شده در گونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف این ویروس بررسی و مطالعه شد. مطالعات نشان داد که بر خلاف پروتئین‌های سطحی، پروتئین‌های داخلی ساختاری و غیر ساختاری ویروس آنفلوانزا به خوبی حفاظت شده هستند. این پروتئین‌ها سبب تحریک و القای شکل‌گیری سلول‌های T سیتوتوکسیک می‌شوند که قادر به تخریب سلول‌های آلوده به ویروس است [۱۱]. در بین این پروتئین‌ها نوکلئوپروتئین (NP) به‌طور ویژه‌ای نظر طراحان واکسن را به خود جلب کرده است. در مطالعه‌ای که توسط پورتلا (Portela) و همکاران در سال ۲۰۰۲ و در مطالعهٔ دیگر که توسط شری (Sherry) و همکاران در سال ۲۰۱٤ انجام شد، مشخص شد که NP یک پروتئین بسیار حفاظت شده در سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا است که از لحاظ فیلوژنی دچار تغییرات کمتری نسبت به پروتئین‌های سطحی شده و از طرفی نقش‌های متعددی در فرآیند تکثیر ویروس و انتقال آن به هسته داشته و با پروتئین‌های مختلف سلولی و ویروسی، برهمکنش دارد. بنابراین می‌تواند یک ساختار آنتی‌ژنی مناسب برای ایجاد ایمنی با واکنش متقاطع باشد [۱۲، ۱۹]. در مطالعات اولیه که توسط کودیهالی (Kodihalli) و همکاران در سال ۲۰۰۰، پرتمر (Pertmer) و همکاران در سال ۱۹۹٦، روی (Roy) و همکاران در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت نشان داده شد که DNA پلاسمید کد کنندهٔ ژن نوکلئوپروتئین سیستم ایمنی را به اندازه کافی برای ایجاد حفاظت علیه ویروس‌های آنفلوانزای هترولوگ و همولوگ تحریک نمی‌کند [۲۰-۲۲]. اما در مطالعات دیگری که توسط اولمر (Ulmer) و همکاران در سال ۱۹۹٤، اپستین (Epstein) و همکاران در سال ۲۰۰۵، ساها (Saha) و همکاران در سال ۲۰۰٦ و لوو (Luo) و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد نشان داده شد که DNA واکسن کد کننده نوکلئوپروتئین نه تنها می‌تواند سبب تحریک سیستم ایمنی شود، بلکه باعث ایجاد محافظت در برابر سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا می‌شود [۲۳-۲٦]. در مطالعه‌ای که توسط اوپرچال (Operschall) و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد مشخص شد تلقیح همزمان DNA کد کنندهٔ اینترلوکین ۱۲ و DNA کد کننده هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا A سبب تحریک بیشتر سیستم ایمنی، نسبت به حالت تلقیح جداگانه این DNA واکسن‌ها شده است. در مطالعه‌ای که توسط بابیوک (Babiuk) و همکاران در سال ۲۰۰٤ ارایه شد بیان داشتند که از سایتوکاین‌های مختلف یا کاست‌های بیانی آن‌ها می‌توان به‌عنوان ادجوانت زیستی در DNA واکسن آنفلوانزا استفاده کرد [۲۷]. مطالعه‌ای که توسط مارشال (Marshall) و همکاران در سال ۲۰۰٦ انجام شد نشان داد که پلاسمید کد کنندهٔ IL-18 و پلاسمید PSA (Prostate_specific antigen) نقش مهمی در توسعه پاسخ ایمنی سلول‌های T، $CD8^+$ و $CD4^+$ به هنگام تلقیح همزمان IL-18 و پلاسمید PSA دارند [۲۸]. همچنین در مطالعه‌ای که توسط هیودا (Hyoda) و همکارانش در سال ۱۹۹۹ انجام شد مشخص شد که IL-18 سبب القای سلول‌های NK می‌شود [۲۹]. لیم (Lim) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای نشان دادند که ترکیبی از توالی‌های DNA کد کنندهٔ chIL15 و chIL18 هنگام تزریق داخل عضلانی به جوجه می‌تواند سبب بروز پاسخ التهابی شود. به‌طوری که گروه تلقیح شده با مخلوطی از پلاسمیدهای کد کننده هماگلوتینین و chIL15 بهترین نتیجه را در آزمون مهار هماگلوتینین جوجه از خود نشان دادند [۳۰]. این گروه تحقیقاتی در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که اگر جوجه‌ها را با ترکیبی از پلاسمیدهای کد کننده chIL15 و chIL18 به همراه پلاسمیدهای کد کننده N1NA یا NP تلقیح نمایند، هر دو پلاسمید کد کنندهٔ اینترلوکین سبب ارتقا پاسخ ایمنی علیه N1NA و NP می‌شوند. با این وجود بیشترین پتانسیل ایمنی‌زایی از ترکیب IL-15 و N1NA حاصل شد [۳۱]. در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مطالعات صورت گرفته توسط هنکه (Henke) و همکاران در سال ۲۰۰٤ و ژو (Xu) و همکاران در سال ۲۰۰۷ از پلاسمید PIRES به‌طور موفقیت‌آمیزی برای ساخت یک DNA واکسن دو سیسترونی بیان کنندهٔ آنتی‌ژن‌های بیماری‌زاهای Bromchitivirus و Salmonella استفاده شد [۳۲، ۳۳]. در مطالعه‌ای که توسط هنکه و همکاران در سال ۲۰۰٦ انجام شد، مشخص شد که پلاسمید بایسیستیرونیک PIRES/NA/IL2 و PIRES/HA/IL2 که باعث بیان همزمان توالی اختصاصی ویروس به همراه سایتوکاین IL-2 می‌شود سبب ارتقای پاسخ ایمنی کراس رآکتیو موش‌های BALB/C در برابر ویروس آنفلوانزا A در مقایسه با واکسن‌های تولید شده با پلاسمیدهای کد کننده HA و NA به همراه GM – CSF یا IL–12 می‌شود. از مشکلات اصلی استفاده از واکسن‌های ژنی درانسان لزوم تهیه مقادیر بسیار زیاد از DNA است تا قادر به ایجاد ایمنی حفاظتی در انسان شود که برای رفع این مشکل راه‌کارهای زیادی نظیراستفاده از ادجوانت‌های مختلف یا سایتوکین‌ها پیشنهاد شده‌است. از آن‌جایی که مطالعات متعددی در زمینه اهمیت و کاربرد واکسن‌های ژنی صورت گرفته بود که واکسن‌های ژنی را به‌عنوان یک پیشنهاد جدی و ماندگار برای پیش‌گیری از بیماری‌های کلاسیک و نوظهور در آینده مطرح می‌ساخت، همچنین با توجه به قابلیت ادجوانتی IL-18 در تحریک پاسخ‌های ایمنی و میل به Th1، این مطالعه در صدد ساخت یک پلاسمید دو سیسترونی واجد ژن‌های NP و 18– IL موشی بود تا در مطالعات بعدی قابلیت ایمنی‌زایی این پلاسمید در مدل موشی ارزیابی شود. ناقل مورد استفاده در این تحقیق یک پلاسمید دو سیسترونی ساخت شرکت Clonetech (ژاپن) با عنوان pIRES2–eGFP بود. با توجه به ادعای شرکت سازنده، ناقل مورد استفاده در این مطالعه مبنی بر بیان مساوی دو ژن کلون شده در جایگاه MCS (Multiple Cloning Site) و جایگاه پس از IRES موقعیت‌های انتخاب شده برای همسانه‌سازی این دو ژن به‌ترتیب موقعیت MCS برای ژن IL–18 و موقعیت پس از IRES برای ژن NP بودند. استفاده از دو نوع پلاسمید می‌توانست تکرارپذیری آزمایش‌ها را کاهش دهد که برای همین منظور از ناقل دو سیسترونی برای اطمینان از همسان بودن مولی ژن‌ها (Equimolar) در فرمولاسیون واکسن ژنی همچنین عرضه همزمان آنتی‌ژن و ادجوانت استفاده شد تا در آینده ایمن‌سازی یکنواخت گروه‌های تجربی با این ساختار میسر شود. در مجموع نتایج تعیین توالی، ترانسفکشن و تأیید بیان با استفاده از روش رنگ‌آمیزی فلورسنت غیر مستقیم نشان داد که ژن NP ویروس آنفلوانزا و IL-18 موشی به‌صورت موفق در رده سلول‌های یوکاریوتی BHK21 و RAW264 .7 بیان می‌شوند و استفاده از این سازه به‌عنوان کاندید واکسن برای ویروس آنفلوانزا امکان‌پذیر است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله از تمامی همکاران مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی گیلان بابت کمک‌های علمی و اجرایی در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل آورند. این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان است.

منابع

[1] Yavarian J, Shafiei Jandaghi NZ, Rezeai F, Mokhtari Azad T. Adamantane and Neuraminidase resistant influenza A/H3N2 isolated in Iran from 2005 to 2013. Tehran Univ Med J 2014;72(1):40-5.

[2] Kukol A, Hughes DJ. Large-scale analysis of influenza A virus nucleoprotein sequence conservation reveals potential drug-target sites. Virology 2014; 454-455: 40-7.

[3] Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Shay DK, Cheng PY, Bandaranayake D, Breiman RF, Brooks WA, Buchy P, Feikin DR, Fowler KB, Gordon A, Hien NT, Horby P, Huang QS, Katz MA, Krishnan A, Lal R, Montgomery JM, Mølbak K, Pebody R, Presanis AM, Razuri H, Steens A, Tinoco YO, Wallinga J, Yu H, Vong S, Bresee J, Widdowson MA. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. Lancet Infect Dis 2012; 12(9): 687-95.

[4] Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 2005; 54: 1-40.

[5] Boyce TG, Poland GA. Promises and challenges of live-attenuated intranasal influenza vaccines across the age spectrum: a review. Biomedicine & Pharmacotherapy 2000; 54(4): 210-8.

[6] Rousta F, Fotouhi F, Ghaemi A, Heidarchi B, Mazaheri V, Fazeli M, Torabi A, Ghaffari M. Effects of aqueous Echinacea purpurea extract on immunogenicity of DNA vaccine encoding M2 gene of Influenza virus. J Gorgan Uni Med Sci 2012; 14(4): 82-8.

[7] Stachyra A, Góra-Sochacka A, Sirko A. DNA vaccines against influenza. Acta Biochim Pol 2014; 61(3): 515-22.

[8] Henke A, Rohland N, Zell R, Wutzler P. Co-expression of interleukin-2 by a bicistronic plasmid increases the efficacy of DNA immunization to prevent influenza virus infections. Intervirology 2006; 49(4): 249-52.

[9] Scholtissek C. Source for influenza pandemics. Eur J Epidemiol 1994; 10(4): 455-8.

[10] Berkhoff EG, Boon AC, Nieuwkoop NJ, Fouchier RA, Sintnicolaas K, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. A mutation in the HLA-B*2705-restricted NP383-391 epitope affects the human influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. J Virol 2004; 78(10): 5216-22.

[11] Altstein AD, Gitelman AK, Smirnov YA, Piskareva LM, Zakharova LG, Pashvykina GV, Shmarov MM, Zhirnov OP, Varich NP, Ilyinskii PO, Shneider AM. Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. Arch Virol 2006; 151(5): 921-31.

[12] Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. J Gen Virol 2002; 83(Pt 4): 723-34.

[13] Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. J Immunol 1996; 156(11): 4274-9.

[14] Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Fukuda S, Kurimoto M. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

for interferon-gamma production. Eur J Immunol 1996; 26(7): 1647-51.

[15] Barouch DH, Santra S, Tenner-Racz K, Racz P, Kuroda MJ, Schmitz JE, Jackson SS, Lifton MA, Freed DC, Perry HC, Davies ME, Shiver JW, Letvin NL. Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. J Immunol 2002; 168(2): 562-8.

[16] Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of Helicobacter pylori oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. Gastroenterology 2002; 123(2): 414-24.

[17] O'Donovan LH, McMonagle EL, Taylor S, Argyle DJ, Nicolson L. Bioactivity and secretion of interleukin-18 (IL-18) generated by equine and feline IL-18 expression constructs. Vet Immunol Immunopathol 2004; 102(4): 421-8.

[18] Pouriayevali MH, Memarnejadian AR, Sadat SM, Zavvar M, Siadat SD, Hartoonian C, Aghasadeghi MR. Designing and construction of bicistronic plasmid pIRES-Igk/mIL18/Fc: potential implications for vaccine investigations. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology. 2011; 14(2): 13-23.

[19] Sherry L, Smith M, Davidson S, Jackson D. The N terminus of the influenza B virus nucleoprotein is essential for virus viability, nuclear localization, and optimal transcription and replication of the viral genome. J Virol 2014; 88(21): 12326-38.

[20] Kodihalli S, Kobasa DL, Webster RG. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. Vaccine 2000; 18(23): 2592-9.

[21] Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. J Virol 1996; 70(9): 6119-25.

[22] Roy S, Kobinger GP, Lin J, Figueredo J, Calcedo R, Kobasa D, Wilson JM. Partial protection against H5N1 influenza in mice with a single dose of a chimpanzee adenovirus vector expressing nucleoprotein. Vaccine 2007; 25(39-40): 6845-51.

[23] Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science 1993; 259(5102): 1745-9.

[24] Epstein SL, Kong WP, Misplon JA, Lo CY, Tumpey TM, Xu L, Nabel GJ. Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. Vaccine 2005; 23(46-47): 5404-10.

[25] Saha S, Yoshida S, Ohba K, Matsui K, Matsuda T, Takeshita F, Umeda K, Tamura Y, Okuda K, Klinman D, Xin KQ, Okuda K. A fused gene of nucleoprotein (NP) and herpes simplex virus genes (VP22) induces highly protective immunity against different subtypes of influenza virus. Virology 2006; 354(1): 48-57.

[26] Luo M, Tao P, Li J, Zhou S, Guo D, Pan Z. Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice. J Virol Methods 2008; 154(1-2): 121-7.

[27] van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk SL, Babiuk LA. Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. Immunol Rev 2004; 199: 113-25.

[28] Marshall DJ, Rudnick KA, McCarthy SG, Mateo LR, Harris MC, McCauley C, Snyder LA. Interleukin-18 enhances Th1 immunity and tumor protection of a DNA vaccine. Vaccine 2006; 24(3): 244-53.

[29] Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, Hiroishi K, Takeda K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kayagaki N, Kurimoto M, Okamura H, Hada T, Yagita H, Akira S, Nakanishi K, Higashino K. IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. J Immunol 1999; 162(3): 1662-8.

[30] Lim KL, Jazayeri SD, Yeap SK, Alitheen NB, Bejo MH, Ideris A, Omar AR. Co-administration of avian influenza virus H5 plasmid DNA with chicken IL-15 and IL-18 enhanced chickens immune responses. BMC Vet Res 2012; 8: 132.

[31] Lim KL, Jazayeri SD, Yeap SK, Mohamed Alitheen NB, Bejo MH, Ideris A, Omar AR. Antibody and T cell responses induced in chickens immunized with avian influenza virus N1 and NP DNA vaccine with chicken IL-15 and IL-18. Res Vet Sci 2013; 95(3): 1224-34.

[32] Henke A, Chiang CS, Zell R, Stelzner A. Co-expression of interleukin-2 to increase the efficacy of DNA vaccine-mediated protection in coxsackievirus B3-infected mice. Antiviral Res 2004; 64(2): 131-6.

[33] Xu C, Li ZS, Du YQ, Gong YF, Yang H, Sun B, Jin J. Construction of recombinant attenuated Salmonella typhimurium DNA vaccine expressing H pylori ureB and IL-2. World J Gastroenterol 2007; 13(6): 939-44.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]