

Construction of Recombinant Bacmid DNA Encoding Influenza Virus A (H1N1) Hemagglutinin Gene

Samaneh Hossainzadeh¹, Fatemeh Fotouhi^{2*}, Behrokh Farahmand³, Mavyam Saleh⁴, Atena Yousefi¹, Behnaz Heydarchi⁵, Masoumeh Tavasoti Kheiri²

1- M.Sc., Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Ph.D., Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- M.Sc., Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

5- Ph.D. Candidate, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1316943551, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

Received: 24/Dec/2011, Accepted: 11/Mar/2012

Abstract

Objective: Influenza virus A (H1N1) is an important subtype of the influenza respiratory viruses, which has important worldwide implications. Hemagglutinin (HA), an important viral antigen, is responsible for binding to human cell receptors leading to an onset of the disease process. Considering the critical role of viral attachment, this study focuses on the extraction and cloning of HA and its large subunit HA1 genes to generate recombinant baculovirus shuttle vectors (bacmid) in order to produce recombinant proteins in insect cells.

Methods: Human influenza virus A/New Caledonia 99/20/(H1N1) was propagated in MDCK cell culture. Total viral RNA was extracted using easy-red solution. The full-length HA genome and HA1 fragment were amplified by RT-PCR using specific primers, cloned into a pGEM®-TEasy vector, and then subcloned into a pFastBac HT plasmid. Finally, recombinant bacmids that contained the genes of interest were produced in *E. coli* DH10Bac™ cells.

Results: Expected PCR products of HA genes were evaluated through gel electrophoresis and restriction enzyme analysis. Recombinant pGEM®-TEasy vectors and pFastBac HT donor plasmids were confirmed by PCR, digestion, and sequencing. Construction of recombinant bacmid DNA was verified by using blue-white colony screening, overnight electrophoresis, and PCR analysis that used either pUC/M13 or gene-specific primers.

Conclusion: In this study, we have successfully constructed recombinant Bacmid DNA that encoded the full-length HA genome and its HA1 subunit. We intend to transfect sf9 insect cells with these constructs to generate recombinant baculovirus and produce large amounts of desired proteins for future studies.

Keywords: Recombinant DNA, Baculovirus, Hemagglutinin, Subunit Vaccine

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 14, No 4, Winter 2012, Pages: 39-49

ساخت بکمیدهای نو ترکیب واجد ژن همگلوتینین ویروس آنفلوانزای انسانی

سمانه حسین زاده^۱، فاطمه فتوحی^{۲*}، بهرخ فرهمند^۳، مریم صالح^۴، آتنا یوسفی^۱، بهناز حیدرچی^۵، معصومه توسی خیری^۲

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استادیار، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- دکتری تخصصی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۵- دانشجوی دکتری تخصصی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا

Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۰/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۰۴

چکیده

هدف: ویروس آنفلوانزای A (H1N1) از مهم ترین زیرگونه های ویروس آنفلوانزا است که منجر به پیامدهای متعددی در جهان شده است. همگلوتینین یکی از مهم ترین آنتی ژن های این ویروس می باشد که باعث ایجاد پاسخ ایمنی می شود. اتصال این پروتئین به گیرنده های سلول میزبان منجر به شروع فرایند بیماری زایی می شود. با توجه به نقش حیاتی مرحله اتصال ویروسی، این پژوهش درصدد استخراج و جای سازی ژن همگلوتینین و زیرواحد بزرگ آن (HA1) با هدف تولید شاتل ناقل نو ترکیب باکیولو ویروس (بکمید) برای تولید پروتئین نو ترکیب در سلول های حشره است.

مواد و روش ها: ویروس آنفلوانزای انسانی A/New Caledonia 99/20/(H1N1) در کشت سلولی MDCK تکثیر شده و RNA کامل ویروسی توسط محلول Easy-red تخلیص شد. سپس طول کامل ژن همگلوتینین و ژن HA1 توسط روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی تکثیر و ابتدا در ناقل pGEM-TEasy و سپس در پلاسمید pFastBac HT جای سازی شد. در نهایت بکمید نو ترکیب واجد ژن های فوق در سلول های میزبان DH10Bac تولید شد.

نتایج: محصولات PCR ژن همگلوتینین با الکتروفورز روی ژل آگارز و هضم با آنزیم های محدودالتر ارزیابی شد. ناقل نو ترکیب pGEM-TEasy و پلاسمید دهنده نو ترکیب pFastBac HT توسط روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین ترادف تأیید شد. تولید DNA نو ترکیب بکمیدی نیز توسط افتراق کلونی های آبی-سفید، الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۷ درصد، PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای pUC/M13 مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه گیری: در این پژوهش، بکمید نو ترکیب واجد ژن همگلوتینین و زیرواحد بزرگ آن با موفقیت ساخته شد. در ادامه سلول های حشرات به منظور تولید باکیولو ویروس نو ترکیب با سازه های فوق ترانسفکت شده و پروتئین های نو ترکیب برای مطالعات آتی تولید خواهد شد.

کلیدواژگان: DNA نو ترکیب، باکیولو ویروس، همگلوتینین، واکسن زیرواحدی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۴۹-۳۹

مقدمه

آنفلوانزا از بیماری‌های شایع دستگاه تنفسی است که سابقه ظهور آن به سال ۱۶۵۰ بر می‌گردد. این بیماری به‌طور معمول در فصول سرد سال شایع است و در برخی موارد منجر به همه‌گیری جهانی (پاندمی) می‌شود [۱]. طی قرن گذشته پاندمی‌هایی از آنفلوانزا به وقوع پیوست که مهم‌ترین آن‌ها در سال‌های ۱۹۱۸ تا ۱۹۱۹ روی داده است و مرگ حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلیون نفر در دنیا را به‌همراه داشت [۲]. جدیدترین پاندمی مشاهده شده در سال ۲۰۰۹ بود که بر خلاف موارد قبلی، گسترش و شیوع آن بسیار سریع اتفاق افتاد [۳]. عامل اصلی مولد بیماری آنفلوانزا، ویروس نوع A است که به دلیل دامنه میزبانی وسیع از جمله انسان، پرندگان و انواع گونه‌های پستانداران شامل خوک، اسب، سگ و غیره، مهم‌ترین عضو خانواده اورتومیکسوویریده (Orthomyxoviridae) به‌شمار می‌آید [۴].

از گذشته تاکنون به‌منظور آمادگی برای مواجهه با همه‌گیری‌ها و بالا بردن قدرت ایمنی افراد، واکسن‌های اختصاصی گوناگونی با روش‌های اثربخشی مختلف علیه ویروس‌های آنفلوانزا شایع تولید شده است که کارایی آن‌ها، براساس تطابق بالای بین سویه درحال چرخش در جمعیت و سویه تخلیص شده موجود در واکسن تعیین می‌شود [۵]. واکسن‌های رایج برای ویروس آنفلوانزا عبارتند از واکسن‌های غیرفعال شده و واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته. واکسن‌های حاوی ویروس کامل یا ویروس زنده تخفیف حدت یافته در افراد با نقص سیستم ایمنی و افراد سالمند ایجاد عوارض شدیدی می‌نمایند. حتی تزریق این نوع واکسن‌ها ممکن است باعث ابتلای آنان شود. همچنین تولید چنین واکسن‌هایی علاوه بر خطرپذیری تزریق، نیازمند صرف وقت و هزینه زیادی است که در شیوع ناگهانی همه‌گیری‌های جهانی قابل استفاده نیست [۶]. بنابراین مناسب‌ترین راه‌کار برای تولید واکسن کارآمد در مقیاس زیاد در زمان کم و قابل استفاده در افراد مستعد، به‌کارگیری زیرواحدهای ویروسی مانند

پروتئین‌های موجود در غشای خارجی در قالب واکسن‌های زیرواحدی است [۷].

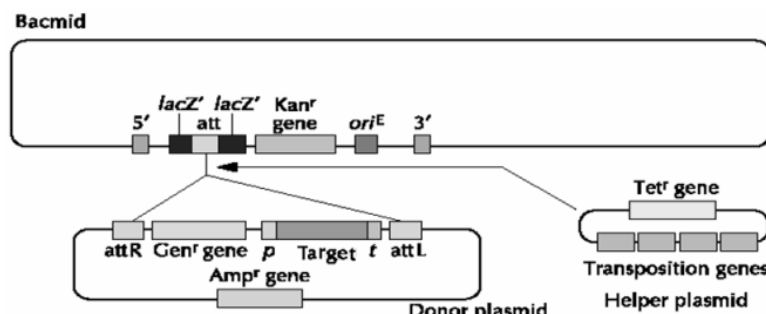
ویروس آنفلوانزای نوع A، ویروس پوشش‌دار و دارای ژنوم RNA تک رشته با قطبیت منفی است که در هشت قطعه ژنی توزیع شده‌است و ده پروتئین ساختمانی و غیرساختمانی را برای ویروس کد می‌کند. از مهم‌ترین پروتئین‌های سطحی ویروس می‌توان به دو گلیکوپروتئین هم‌آگلوتینین (Hemagglutinin: HA) و نورآمینیداز (Neuraminidase: NA) اشاره نمود که به‌صورت زوایدی روی پوشش لیپیدی ظاهر می‌شود [۸].

مطالعات نشان داده است که گلیکوپروتئین HA به‌عنوان فراوان‌ترین پروتئین سطحی ویروس، به‌صورت یک پیش‌ساز پروپیتی تولید شده و دارای دو زیرواحد بزرگ (HA1) و کوچک (HA2) است. بخش HA2 در غشای لیپیدی لنگر انداخته و با پیوند غیرکووالانسی به بخش HA1 متصل می‌شود [۹]. زیرواحد بزرگ HA با شناسایی الیگوساکاریدهای سطحی متصل به اسید سیالیک انتهایی گیرنده‌های سطحی سلول‌های میزبان، باعث ورود ویروس به سلول می‌شود؛ بنابراین هدف مناسبی برای تحقیقات واکسن به‌شمار می‌رود. به‌گونه‌ای که نشان داده شده است تزریق عضلانی HA خالص شده به موش موجب القای تولید آنتی‌بادی ضد فعالیت هم‌آگلوتیناسیون (Hemagglutination) شده و در نهایت منجر به از بین رفتن توانایی ویروس در ایجاد عفونت می‌شود [۱۰]. علاوه بر آن؛ با توجه به این که HA1 واجد جایگاه‌های آنتی‌ژنیک مهمی است، بیان آن به تنهایی برای القای پاسخ ایمنی کافی است و واکسن حاصل شده از آن می‌تواند برای ایمنی مخاطی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین می‌توان با روش‌های مهندسی پروتئین، تغییراتی در ساختار هم‌آگلوتینین به وجود آورد که منجر به بهینه‌سازی پاسخ‌های ایمنی گردد.

برای دستیابی به مقدار انبوه این گلیکوپروتئین با ساختار فضایی صحیح برای تولید واکسن‌های زیرواحدی به سیستمی کارآمد نیاز است تا علاوه بر مشابهت با سلول‌های یوکاریوتیک در تولید و پیرایش پروتئین‌ها، قابلیت تولید

باکیولوویروس (Baculovirus Expression System) (شکل ۱) استفاده شد [۱۱].

حجم بالای پروتئین را در مدت زمان اندک داشته باشد. در این مطالعه برای دستیابی به این هدف از سیستم بیانی



شکل ۱ اجزای ناقل بیانی سیستم باکیولوویروس Bac-to-Bac [۱۲]

MDCK (Madin Darby Canine Kidney cell line) که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد پنی سیلین G (Penicillin G) و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین (Streptomycin) به ازای هر میلی لیتر محیط کشت رشد یافته بودند، تلقیح شد. پس از بروز آثار تخریب سلولی، مایع رویی کشت سلولی برداشت شده و پس از تعیین عیار ویروس با روش هماگلوتیناسیون، به عنوان منبع ژنوم ویروسی استفاده شد.

استخراج RNA و تهیه cDNA

ژنوم ویروس با استفاده از محلول (iNTRON, Easy-RED (South Korea مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد و رشته DNA مکمل با استفاده از کیت سنتز cDNA دارای آنزیم پلیمرز معکوس M-MuLV (Fermentas, EU) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، تحت شرایط دمایی مناسب ساخته شد. برای این کار از آغازگر واحد (Uni12) با غلظت ۱۰ میکرومول، دزاکسی نوکلئوتری فسفات ها، بافر مخصوص واکنش آنزیمی و محافظت کننده RNA استفاده شد. لازم به ذکر است در کلیه مراحل از میکروتیوب ها و سر سمپلرهای عاری از DNase و RNase استفاده شد.

اساس روش تولید پروتئین های نو ترکیب در سیستم بیانی باکیولوویروس، جای سازی ژن هدف تحت کنترل پروموتور پلی هیدرین (Polyhydrin Promoter) است. این پروتئین به میزان زیاد در مراحل پایانی تکثیر ویروس در میزبان طبیعی خودش بیان می شود و با ایجاد یک پوشش پروتئینی ویروس ها را در برابر شرایط نامساعد محیطی محافظت می نماید. وجود این پروتئین برای تکثیر و همانند سازی ویروس در کشت سلول ضرورت ندارد [۱۳، ۱۴].

در پژوهش حاضر طول کامل ژنوم HA و زیر واحد بزرگ آن با استفاده از آغازگرهای (Primers) اختصاصی جداسازی شد و به منظور تولید پروتئین نو ترکیب در سلول های حشره، در شاتل ناقل بکمید جای سازی شد تا در مراحل بعدی پس از ساخت باکیولوویروس نو ترکیب، پروتئین های هدف در سلول های حشرات تولید شود.

مواد و روش ها

مطالعه به روش تجربی (Experimental) انجام شد.

کشت ویروس

ویروس آنفلوآنزای انسانی سویه فصلی A/New Caledonia/20/99(H1N1) در کشت تک لایه سلول های

(5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside: X gal)

کشت داده شد و به وسیله پیت پاستور در سرتاسر پلیت پخش شد. به علت ورود ژن هدف به ناحیه کد کننده اپران lacZ در ناقل نو ترکیب و عدم تجزیه X gal، پس از گذشت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه، با روش غربالگری کلونی‌های آبی-سفید، از کلونی‌های سفید تک موجود در پلیت، کشت جدا تهیه و پلاسمید آن‌ها استخراج شد. پلاسمیدهای نو ترکیب با تکثیر ژن هدف به روش PCR و هضم آنزیمی تأیید و در نهایت برای تعیین ترادف فرستاده شد.

تکثیر و جداسازی ژن HA1

پس از اطمینان از درستی تکثیر طول کامل ژنوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن HA1 در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ژن زیر واحد بزرگ HA نیز تکثیر شد تا در مرحله بعدی همراه با ژنوم HA به صورت جداگانه و به طور همزمان به پلاسمید دهنده pFastBac HTb انتقال یابد. برای تکثیر ژن فوق از آغازگر برگشت با ترادف زیر استفاده شد. در این آغازگر علاوه بر محل اثر آنزیم Hind III، کدون خاتمه (TTA) نیز تعبیه شد.

R-HA1: 5'GGAAAGCTTTACTTTGGACACTC3'

جاسازی ژن‌های هدف در پلاسمید pFastBac

قدم بعدی جاسازی ژن‌های هدف در پلاسمید دهنده pFastBac HTb، در پایین دست دنباله هیستیدینی بود. بدین منظور ناقل نو ترکیب T-Easy حاوی ژنوم کامل HA و پلاسمید دهنده pFastBac HTb و ژن زیر واحد بزرگ HA در نمونه حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، به کمک آنزیم‌های محدودالتر XhoI و Hind III هضم شد تا دو انتهای ژن‌های هدف و پلاسمید مکمل یکدیگر شوند. ژن‌های هدف از ژل آگارز استخراج و برای اتصال به پلاسمید دهنده خطی شده، مطابق با روش قبلی عمل شد و

تکثیر ژن HA در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

برای تکثیر اختصاصی قطعه cDNA حاوی ژنوم کامل گلیکوپروتئین HA، از آغازگرهای اختصاصی ژن هدف و آنزیم (Fermentas, EU) High fidelity DNA Polymerase استفاده شد و نتیجه حاصل از آن توسط الکتروفورز در آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. ترادف آغازگرهای اختصاصی که برای جداسازی طول کامل ژن HA طراحی شد، در زیر آمده است. محل اثر آنزیم‌های محدودالتر Xho I و Hind III به ترتیب در آغازگرهای رفت و برگشت در نظر گرفته شد که به صورت ایتالیک نشان داده شده است.

F: 5'GCCTCGAGATGAAAGCAAACTAC3'

R: 5'GGAAGCTTTCAGATGCATATTCTACA3'

جای‌سازی ژن HA در ناقل کلونینگ و تعیین ترادف

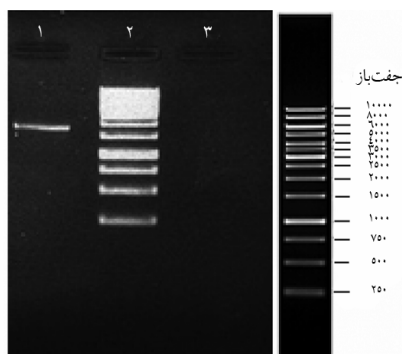
در مرحله بعدی قطعه تکثیر یافته در ناقل T-Easy (Promega, USA) کلون شد. بدین منظور ابتدا ژنوم کامل HA با استفاده از کیت استخراج (Qiagen, USA) از ژل الکتروفورز استخراج شد و مطابق توصیه شرکت سازنده با ناقل خطی شده و آنزیم T4 DNA Ligase و بافر مخصوص واکنش اتصال، مخلوط و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

با مستعد کردن باکتری Top10f با استفاده از کلرید کلسیم سرد، مخلوط واکنش اتصال در باکتری میزبان ترانسفورم شد. پس از کشت یک ساعته باکتری در محیط LB فاقد آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۷ درجه و بیان ژن مقاومت در برابر آمپی‌سیلین (Ampicillin)، باکتری‌های ترانسفورم شده روی پلیت LB آگار (Luria Bertani Agar, HIMEDIA, India) حاوی ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر تتراسایکلین (Tetracycline)، ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر آمپی‌سیلین، ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside: IPTG) و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر ۵-برومو ۴-کلرو ۳-ایندولیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید

هماگلوتینین ویروس آنفلوآنزای انسانی

پلاسمید کمکی و pFastBac وجود دارد. در ادامه از کلونی‌های سفید که احتمالاً حاوی بکمید نو ترکیب هستند، در پلیت واجد آنتی‌بیوتیک‌های فوق کشت ایزوله تهیه شده و برای کشت باکتری در محیط مایع و جداسازی بکمید از آن استفاده می‌شود. با در نظر گرفتن اندازه مولکولی بکمید که بیش از ۱۳۰ هزار جفت‌باز می‌باشد، استخراج آن از باکتری DH10Bac مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Invitrogen, USA) و به روش دستی انجام می‌گیرد.

برای تأیید انتقال صحیح ژن HA و HA1 به درون بکمید، روش PCR به کار گرفته شد. برای این کار از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های هدف و آغازگرهای M13 که ناحیه مکمل آن در دو سوی محل ترانسپوزون (Transposon) در ناحیه Lac α در بکمید تعبیه شده، استفاده شد. در نهایت برای اطمینان از سالم بودن و عدم شکست بکمیدهای نو ترکیب، نتیجه استخراج روی ژل آگارز ۰/۷ درصد با ولتاژ ۲۵ و به مدت ۱۸ ساعت الکتروفورز شد.



شکل ۱ نتیجه حاصل از تکثیر ژنوم کامل HA به روش RT-PCR؛ باند ۱۷۰۰ جفت‌بازی محصول تکثیر cDNA به کمک آغازگرهای اختصاصی (ردیف ۱)، نشانگر وزن مولکولی DNA ۱ کیلوبازی (ردیف ۲)، کنترل منفی PCR (ردیف ۳)

نتایج

ویروس آنفلوآنزای انسانی سویه فصلی A/New Caledonia/20/99(H1N1) پس از تکثیر در کشت تک لایه

نمونه‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محصول واکنش‌های اتصال به باکتری میزبان Top10f⁺ انتقال یافته و در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمپی‌سیلین کشت داده شد.

تولید pFastBac HTb های نو ترکیب حاوی ژن‌های هدف با روش PCR و هضم آنزیمی تأیید شد و در نهایت برای تعیین توالی ارسال شد تا از جهت‌گیری صحیح ژن در پلاسمید اطمینان حاصل شود. لازم به ذکر است که به دلیل وجود دنباله هیستیدینی، تعیین ترادف در این مرحله بسیار ضروری است.

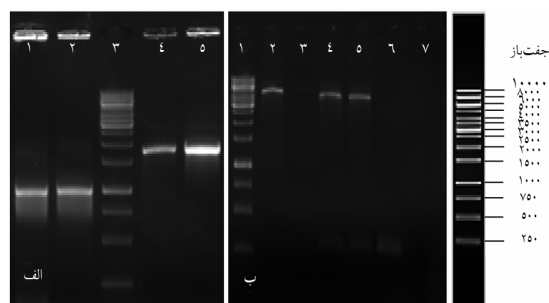
ساخت بکمید (Bacmid) نو ترکیب

مرحله نهایی کلونینگ در سیستم بیانی باکیولوویروس، انتقال ژن‌های هدف از پلاسمید دهنده pFastBac HTb به شاتل ناقل ویروسی یا بکمید است که درون باکتری *E. Coli* DH10Bac قرار دارد. این باکتری در پلیت آگارز حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و تتراسایکلین به ترتیب با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کشت داده می‌شود. این میزبان همچنین واجد یک پلاسمید کمکی است که آنزیم‌های لازم برای انتقال ژن بین ناقل دهنده و بکمید را امکان پذیر می‌سازد.

باکتری DH10Bac با روش گفته شده قبل مستعد دریافت پلاسمید شده و سپس ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمیدهای pFastBac HTb نو ترکیب به باکتری ترانسفورم می‌شود. برای شروع بیان ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، ۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور شیکردار (Shaker Incubator) ۳۷ درجه الزامی است. آنگاه باکتری‌ها در محیط واجد آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، تتراسایکلین و ۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر جنتامایسین (Gentamicin) و نیز القا کننده IPTG و Xgal گسترش می‌یابند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده می‌شوند. لازم به ذکر است که ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، تتراسایکلین و جنتامایسین به ترتیب در بکمید،

جاسازی ژن HA و HA1 در ناقل pfastBac مطابق آنچه در بخش روش‌ها گفته شد، انجام شد و ناقل‌های نوترکیب با PCR و هضم آنزیمی و در نهایت تعیین تترادف، تأیید شد (نتایج آورده نشده است).

در مرحله نهایی پلاسمیدهای نوترکیب pfastBac HTb-HA1 و pfastBac HTb-HA به درون باکتری میزبان مستعد شده DH10Bac که حاوی بکمید است، ترانسفورم شد. بکمید نوترکیب پس از استخراج، توسط روش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی یا آغازگرهای M13 تأیید شد و نتایج حاصل در شکل ۳ نشان داده شده است.



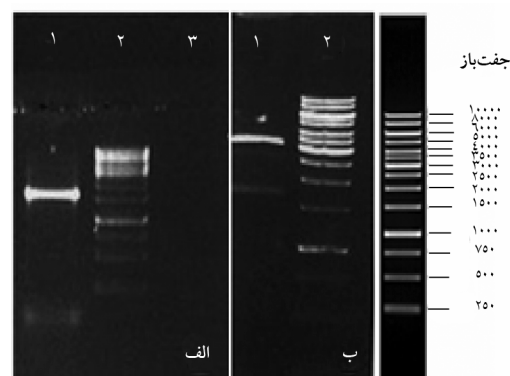
شکل ۳ الف) PCR با آغازگرهای اختصاصی از بکمید نوترکیب؛ باند ۱۰۰۰ جفت‌بازی ژن HA1 (ردیف ۱ و ۲)، ۱ کیلوبازی (ردیف ۳)، باند ۱۷۰۰ جفت‌بازی ژنوم کامل HA (ردیف ۴ و ۵)، ب) PCR با آغازگرهای M13، ۱ کیلوبازی (ردیف ۱)، باند ۴۱۳۰ جفت‌بازی واجد ژنوم کامل HA (ردیف ۲)، باند ۳۴۳۰ جفت‌بازی واجد ژن HA1 (ردیف ۴ و ۵)، بکمید غیرنوترکیب (ردیف ۶)، کنترل منفی PCR (ردیف ۷)

بحث

تا به امروز مؤثرترین راه برای مقابله با بیماری آنفلوآنزا، واکسیناسیون عمومی با استفاده از واکسن سه گانه‌ای است که در تخم مرغ تهیه می‌شود. این واکسن‌ها بیش از ۵۰ سال است که با موفقیت به‌کار رفته‌اند ولی با وجود اثربخشی بالا و نداشتن عوارض جانبی، چرخه تولید طولانی داشته و در مقابل همه‌گیری‌ها از جمله همه‌گیری ۲۰۰۹ قادر به پاسخ‌گویی نبودند. در سالیان اخیر واکسن‌های جایگزین مورد مطالعه قرار

سلول‌های MDCK به عنوان منبع ژنوم ویروسی استفاده شد. پس از استخراج RNA ژنومی ویروس و سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ژنوم کد کننده HA با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جدا شد. نتیجه حاصل از تکثیر cDNA سنتز شده به روش PCR و مشاهده باند ۱۷۰۰ جفت‌بازی با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۱ آمده است.

در مرحله بعدی قطعه مورد نظر پس از تخلیص از ژل آگارز در ناقل T-Easy کلون و با روش‌های مختلف تأیید شد. نتایج حاصل از تأیید تولید ناقل T-Easy نوترکیب دارای ژنوم کامل HA در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج PCR با آغازگرهای اختصاصی و مشاهده باند ۱۷۰۰ جفت‌بازی (الف) و نیز هضم آنزیمی ناقل نوترکیب و مشاهده دو باند ۳۰۰۰ و ۱۷۰۰ جفت‌بازی بر اثر هضم آنزیمی ناقل تخلیص شده با دو آنزیم *HindIII* و *XhoI* (ب)، نشانگر صحت تولید ناقل T-Easy نوترکیب است.



شکل ۲ نتایج حاصل از PCR با آغازگر اختصاصی (الف) محصول PCR (ردیف ۱)، نشانگر وزن مولکولی DNA ۱ کیلوبازی (ردیف ۲)، کنترل منفی PCR (ردیف ۳)؛ و هضم آنزیمی ناقل نوترکیب (ب) ناقل نوترکیب پس از هضم آنزیمی (ردیف ۱)، نشانگر وزن مولکولی DNA ۱ کیلوبازی (ردیف ۲)

پس از تأیید اولیه، نمونه‌های نوترکیب برای تعیین تترادف ارسال شد. نتایج حاصل به‌طور کامل درستی تکثیر ژن HA را معلوم کرد. در ادامه ناقل نوترکیب فوق به عنوان الگو استفاده شد و با به‌کارگیری آغازگر اختصاصی، ژن HA1 نیز تکثیر شد.

(Transmembrane) است که نقش مهمی در تثبیت مولکول در ساختار لیپیدی دو لایه دارد. از این خاصیت می‌توان در طراحی واکسن‌های لیپوزومی و وایروزومی (Virosomal Vaccine) استفاده نمود. همچنین این بخش از مولکول نسبت به سر کروی واجد ترادف‌های حفاظت شده است به‌طوری که معلوم شده ناحیه ساقه HA حاوی سه زنجیره الیگو ساکاریدی است که جایگاه گلیکوزیلاسیون در این سه مکان در تمامی گونه‌های HA از H1 تا H16 ویروس آنفلوآنزای نوع A ثابت است. وجود این ساختارهای یکسان احتمالاً در ایجاد پاسخ‌های ایمنی متقاطع در بین سویه‌های مختلف این ویروس مؤثر است.

مطالعات نشان داده است که به‌طور متوسط ۶ جایگاه با پتانسیل گلیکوزیلاسیون از نوع N در HA1 و یک جایگاه در HA2 وجود دارد که نقش مهمی در ایجاد تاخوردگی صحیح مولکول و پیدایش اپی‌توپ‌های فضایی مناسب برای بروز خاصیت آنتی‌ژنیکی در این پروتئین را به عهده دارند [۲۰]. بنابراین تولید این گلیکوپروتئین در سلول‌های حشرات که علاوه بر کارایی و بازدهی خوب، تغییرات پس از ترجمه‌ای از جمله اضافه کردن شاخه‌های قندی به پروتئین در حال ساخت را با بیشترین شباهت به سلول‌های پستانداران امکان‌پذیر می‌سازد، هدف نهایی این پروژه است.

در این پژوهش با توجه به عدم وجود روش بومی شده تولید واکسن در کشور و نیز با در نظر گرفتن اپی‌توپ‌های خنثی‌سازی متقابل میان ویروس‌های آنفلوآنزای فصلی با ویروس آنفلوآنزای مولد آخرین همه‌گیری یعنی novel A/H1N1 ویروس آنفلوآنزای A/New Caledonia/20/99(H1N1) برای بررسی فن‌آوری بهینه تولید واکسن استفاده شد. بنابراین طول کامل مولکول HA و همچنین زیر واحد بزرگ آن در بکمید جاسازی شد تا در مرحله بعدی پروتئین‌های نو ترکیب مربوط در سلول‌های حشرات تولید و ایمنی‌زایی و کارایی آن‌ها بررسی شود.

اولین قدم در ساخت این گونه واکسن‌ها، استخراج ژنوم کامل ویروس و جداسازی قطعه ژن هدف توسط آغازگرهای

گرفته‌اند که می‌بایست حداقل به همان اندازه واکسن تخم مرغی قابل اعتماد، بی‌خطر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده و در زمان کوتاه بتوان مقادیر مورد نیاز از آن‌ها را تهیه نمود [۱۵]. یکی از مهم‌ترین آن‌ها واکسن‌های زیرواحدی نو ترکیب است که پروتئین‌های ویروسی را رمزدهی می‌کنند و با استفاده از تکنولوژی نو ترکیبی DNA تهیه می‌شوند [۱۶]. از جمله مزایای این واکسن‌ها نسبت به واکسن‌های تخم مرغی، دارا بودن پروتئین آنتی‌ژنیکی است که در بافر نمکی تهیه می‌شود و نیازی به مواد محافظت کننده، آنتی‌بیوتیک و ادجوانت (Adjuvant) ندارد. به علت عدم استفاده از ویروس زنده در مسیر تهیه این واکسن‌ها، نیازی به تسهیلات زیستی خاص یا مواد شیمیایی نظیر فرمالدئید نبوده و شاید به همین علت است که این واکسن‌ها در کارآزمایی‌های بالینی عوارض جانبی کمتری را سبب می‌شوند. همچنین در مواجهه با خطر پاندمی سویه‌های خطرناک نظیر H5، می‌توان با تولید HA نو ترکیب، تا زمان ساخته شدن واکسن اختصاصی سویه، عوارض بالینی را کاهش داد [۱۸].

گلیکوپروتئین HA، مهم‌ترین پروتئین سطحی ویروس است که به‌صورت زوایدی روی پوشش دیده می‌شود و با توجه به این که بیشترین میزان آنتی‌بادی‌های خنثی کننده علیه آن ساخته می‌شود، هدف مناسبی برای تحقیقات واکسن به‌شمار می‌رود. تا به امروز HA انواع مختلف ویروس آنفلوآنزا در سیستم‌های متعدد پروکاریوتی و یوکاریوتی به‌صورت واکسن‌های زیر واحدی تولید و ایمنی‌زایی آن‌ها بررسی شده است [۱۸، ۱۹].

گلیکوپروتئین فوق ابتدا به‌صورت یک پیش‌ساز پروپیتیدی تولید شده و پس از تکامل مولکول، زیر واحد بزرگ‌تر یا HA1 با پیوند غیرکووالانسی به بخش HA2 متصل می‌شود. زیر واحد بزرگ یا همان سر کروی، واجد اکثر مکان‌های آنتی‌ژنیک و جایگاه اتصال به گیرنده سلولی است. از طرف دیگر زیر واحد HA2 که بخش اصلی ساقه مولکول را تشکیل می‌دهد، ضمن دارا بودن خاصیت آنتی‌ژنیک، واجد توالی عرض‌گشایی

اختصاصی است. با در نظر گرفتن این نکته که آنفلوآنزای نوع A دارای ژنوم RNA است، پس از استخراج آن ابتدا باید DNA مکمل ساخته شده و سپس ژنوم کامل HA توسط آغازگرهای اختصاصی جداسازی و تکثیر شود. شایان ذکر است که این مرحله یکی از مراحل کلیدی کار به‌شمار می‌رود زیرا اولین مرحله در جداسازی ژن هدف بوده و انتخاب صحیح آنزیم مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، زمان‌بندی و برنامه دمایی مناسب و طراحی صحیح آغازگرهای اختصاصی بسیار با اهمیت است. با توجه به اهمیت بالای این مرحله، در این پژوهش از آنزیم High fidelity DNA Polymerase برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. این آنزیم دارای قابلیت‌هایی است که آن را از سایر پلیمرزهای موجود متمایز می‌نماید که از آن جمله می‌توان به بالاترین میزان صحت واکنش پلیمرز در مقایسه با سایر پلیمرزهای مقاوم به حرارت و در نتیجه دارا بودن کمترین میزان واکنش‌های ناموفق، توانایی پردازش بالا و کاهش دادن زمان واکنش، دارا بودن بالاترین بازده در مقایسه با سایر پلیمرزها به دلیل بیشترین میزان محصول تولید شده با حداقل میزان آنزیم مورد استفاده و دارا بودن عنوان دقیق ترین پلیمرز مقاوم به حرارت اشاره نمود. همچنین این آنزیم باعث اضافه شدن نوکلئوتید واجد باز آلی آدنین به انتهای فرآورده تکثیر شده می‌شود، بنابراین برای جداسازی در ناقل های T مناسب است [۲۱].

بدین ترتیب پس از اطمینان از صحت جداسازی و تکثیر ژن هدف، با استفاده از سیستم بیانی باکیولوویروس (Bac-to-Bac)، پس از سه مرحله فرایند کلونینگ، ژنوم کامل HA و نیز زیرواحد بزرگ آن در شاتل ناقل بکمید جای‌سازی گردید تا در ادامه پروتئین‌های ذکر شده در سلول‌های حشره تولید گردد. بکمید، پلاسمید بزرگی است که از ژنوم باکیولوویروس مشتق شده است و پس از ورود به سلول حشره می‌تواند ویروس‌هایی را تولید کند که ژن هدف را تحت کنترل پروموتور پلی‌هیدرین بیان نمایند. علت استفاده از این سیستم بیانی، بهینه بودن آن نسبت به سایر روش‌های تولید باکیولوویروس

می‌باشد. تا قبل از سال ۱۹۹۳ جهت تولید پروتئین‌های ویروسی در سلول‌های حشرات از سیستم‌های بیانی استفاده می‌شد که نیازمند خالص‌سازی و تکثیر ویروس نو ترکیب بوده و جهت به دست آوردن تیترا بالای ویروس بدون در نظر گرفتن پیچیدگی‌ها و مشکلات فراوان، مدت زمانی معادل ۳ تا ۶ ماه صرف می‌گردید. اما پس از معرفی روش جدید انتقال (ترانسپوزیشن) از طریق جایگاه اختصاصی در باکتری اشریشیا کلی توسط لوکو (Luckow) [۲۲]، تولید مؤثر باکیولوویروس نو ترکیب تحقق یافت و پروتئین‌های متعددی با استفاده از این روش در سلول‌های حشرات تولید گردیده است [۲۳، ۲۴].

تولید پروتئین نو ترکیب در سلول‌های حشرات واجد چند ویژگی مهم است که آن را از سایر میزبان‌های یوکاریوتی متمایز می‌سازد. در این سیستم، باکیولوویروس‌های نو ترکیب در سلول‌های حشرات تکثیر یافته و پیپتدهای تولید شده پس از تغییرات پس ترجمه‌ای مشابه با سلول‌های پستانداران، در محل‌های هدف سلولی جای‌گیری می‌کند. در نتیجه پروتئین‌های نو ترکیب، ساختار و عملکرد مشابه پروتئین‌های طبیعی خواهد داشت که به‌خصوص در مورد پروتئین‌هایی مانند HA که اشکال فضایی در عملکرد آن‌ها نقش حیاتی دارد، بسیار مهم است. مطالعات نشان داده است که در مقایسه با سایر سیستم‌های یوکاریوتیک، کارایی تولید پروتئین در این سیستم بسیار بیشتر است، به‌طوری که بعضی از محققین نیمی از پروتئین تولید شده در سلول را مربوط به پروتئین نو ترکیب می‌دانند [۲۵]. همچنین این ویروس‌ها گستره میزبانی محدودی دارند که مختص گونه‌های خاصی از بندپایان است و به‌طور کلی برای پستانداران و گیاهان غیربیماری‌زا هستند، به‌طوری که مقدار زیادی از آن در طبیعت روی سبزیجات که بخشی از غذای روزانه است، یافت می‌شوند [۱۸].

بدین ترتیب، انتظار می‌رود پروتئین‌های مورد نظر که از طریق این سیستم بیانی در سلول‌های حشرات تولید خواهد شد، دارای پیرایش و تغییرات پس ترجمه‌ای مشابه با سلول یوکاریوتیک باشد. پس از گذر از مراحل تعیین درستی

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی و مساعدت معاونت پژوهشی و براساس طرح مصوب انستیتو پاستور ایران با شماره ۴۱۱ انجام شده است. نویسندگان از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی آنفلوآنزا کمال تشکر را دارند.

پروتئین‌های فوق با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و تخلیص آن‌ها، واکسن پروتئینی به‌عنوان مدل اولیه به حیوان آزمایشگاهی مناسب تزریق شده و ایمنی‌زایی و آثار حفاظت بخشی اختصاصی و متقاطع هر یک در برابر سویه‌های رایج آنفلوآنزا بررسی و مقایسه خواهد شد.

منابع

- [1] Potter CW. A history of influenza. *J Appl Microbiol* 2001; 91(4): 572-9.
- [2] Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(1): 15-22.
- [3] Franco-Paredes C, Hernandez-Ramos I, Del Rio C, Alexander KT, Tapia-Conyer R, Santos-Preciado JJ. H1N1 influenza pandemics: comparing the events of 2009 in Mexico with those of 1976 and 1918-1919. *Arch Med Res* 2009; 40(8): 669-72.
- [4] Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP, Timbury MC. A Virus obtained from influenza patients. *Rev Med Virol* 1995; 5(4): 187-91.
- [5] Steel J, Lowen AC, Wang TT, Yondola M, Gao Q, Haye K, García-Sastre A, Palese P. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio*. 2010; 1(1): pii: e00018-10.
- [6] Hu YC, Yao K, Wu TY. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7(3): 363-71.
- [7] Treanor JJ, Schiff GM, Couch RB, Cate TR, Brady RC, Hay CM, Wolff M, She D, Cox MM. Dose-related safety and immunogenicity of a trivalent baculovirus-expressed influenza-virus hemagglutinin vaccine in elderly adults. *J Infect Dis* 2006; 193(9): 1223-8.
- [8] Hidayatullah TA. Cloning and expression of antigenic sites of hemagglutinin of Influenza A virus. *Int J Integ Biol* 2009; 6(3): 137-42.
- [9] Thoennes S, Li ZN, Lee BJ, Langley WA, Skehel JJ, Russell RJ, Steinhauer DA. Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion. *Virology* 2008; 370(2): 403-14.
- [10] Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 1994; 371(6492): 37-43.
- [11] Haines FJ, Possee RD, King LA. Baculovirus Expression Vectors. In: Mahy BWJ, Regenmortel MHV (Eds). *Encyclopedia of Virology*. 3th ed, London: Elsevier, 2006; p: 451-4.
- [12] Soleimanjahi H, Fotouhi F. Baculoviruses and insect cells as powerful tools for gene expression. Tehran: Jahad Daneshgahi, 2009; p: 62. (Persian)
- [13] Acharya A, Gopinathan KP. Transcriptional Analysis and Preliminary Characterization of ORF Bm42 from *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus. *Virology* 2002; 299(2): 371-8.

- 213-24.
- [14] Airenne KJ, Peltomaa E, Hytönen VP, Laitinen OH, Ylä-Herttuala S. Improved generation of recombinant baculovirus genomes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(17): e101.
- [15] Ellebedy AH, Webby RJ. Influenza vaccines. *Vaccine* 2009; 27 Suppl 4: D65-8.
- [16] Weeks-Levy CL, Clements DE, Ogata SA. Influenza recombinant subunit vaccine. US Patent App. 20,070/042,002; 2006. <http://www.google.com/patents/US20070042001>
- [17] Prabakaran M, Madhan S, Prabhu N, Qiang J, Kwang J. Gastrointestinal delivery of baculovirus displaying influenza virus hemagglutinin protects mice against heterologous H5N1 infection. *J Virol* 2010; 84(7): 3201-9.
- [18] Cox MM, Karl Anderson D. Production of a novel influenza vaccine using insect cells: protection against drifted strains. *Influenza Other Respi Viruses* 2007; 1(1): 35-40.
- [19] Davis AR, Nayak DP, Ueda M, Hiti AL, Dowbenko D, Kleid DG. Expression of antigenic determinants of the hemagglutinin gene of a human influenza virus in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(9): 5376-80.
- [20] Wang CC, Chen JR, Tseng YC, Hsu CH, Hung YF, Chen SW, Chen CM, Khoo KH, Cheng TJ, Cheng YS, Jan JT, Wu CY, Ma C, Wong CH. Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(43): 18137-42.
- [21] Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 1991; 108(1): 1-6.
- [22] Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* 1993; 67(8): 4566-79.
- [23] Rajendra W, Hackett KJ, Buckley E, Hammock BD. Functional expression of lepidopteran-selective neurotoxin in baculovirus: potential for effective pest management. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760(2): 158-63.
- [24] Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat Biotechnol* 2004; 22(12): 1583-7.
- [25] Matsuura Y, Possee RD, Overton HA, Bishop DH. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J Gen Virol* 1987; 68(Pt 5): 1233-50.