

ساخت ناقل یوکاریوتی دو سیستمی بیان کننده ژن‌های M1 و نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا

محمد شناگری^۱، فرزانه صباحی^{۲*}، معصومه توسی خیری^{۳*}، کامبیز فرقان پرست^۴، عباس جمالی^۵، حمیدرضا هاشمی^۶،
شادی خدامرادی^۷

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استادیار، واحد آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
- ۵- پژوهشگر فرادکتری، واحد آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۶- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
- ۷- دانشجوی کارشناسی ارشد، واحد آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۹۰/۰۳/۲۱

دریافت مقاله: ۸۹/۱۲/۲۴

چکیده

هدف: در این پژوهش در راستای راه‌اندازی یک واکسن جامع براساس واکسن ژنی، دو ژن محافظت شده در سویه‌ها و زیرگونه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا (M1 و نوکلئوپروتئین) در ناقل دو سیستمی یوکاریوتی بیان شد.

مواد و روش‌ها: پلاسمیدهای M1-pIRES2-EGFP و pIRES2-NP به ترتیب با کلون کردن محصولات PCR ژن‌های M1 و نوکلئوپروتئین برگرفته از ویروس آنفلوانزا H1N1 سویه A/Peurto Rico/8/34 در داخل ناقل بیانی pIRES2-EGFP ساخته شد. به منظور ساخت پلاسمید دو سیستمی M1-pIRES2-NP، ژن M1 از پلاسمید M1-pIRES2-EGFP استخراج و در پلاسمید pIRES2-NP ساب کلون شد. در نهایت بررسی بیان این دو پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی با ترانسفکشن کلون ساخته شده به داخل سلول BHK-21 با استفاده از ایمونوفلوروسنس غیرمستقیم انجام شد.

نتایج: موفقیت در کلونینگ صحیح ژن‌های مذکور با هضم آنزیمی و تعیین توالی قطعات کلون شده به اثبات رسید. بیان صحیح این دو ژن در سلول‌های یوکاریوتی با ترانسفکشن این کلون در رده سلولی BHK-21 و بررسی با روش ایمونوفلوروسنس به اثبات رسید.

نتیجه‌گیری: بیان همزمان دو ژن M1 و نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا در یک سازه ژنی با واسطه توالی IRES ممکن است.

کلیدواژگان: ویروس آنفلوانزا، ناقل دو سیستمی، ژن M1، ژن نوکلئوپروتئین، بیان همزمان

Email: sabahi_f@modares.ac.ir

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، کدپستی: ۱۴۱۱۷۳۱۱۶

Email: mtkheiri@pasteur.ac.ir

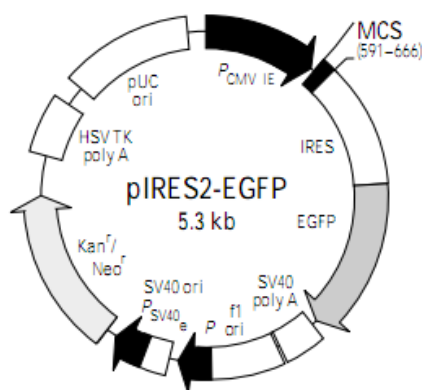
*نشانی مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور ایران، واحد آنفلوانزا، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

۱- مقدمه

بیماری آنفلوآنزا (Influenza) سالیانه ۱۰ درصد یا به عبارت دیگر ۵۰۰ میلیون نفر از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می دهد [۱]. واکسیناسیون مهم ترین راه کار در کاهش آمار مبتلایان و مرگ و میر سالیانه ناشی از آنفلوآنزای فصلی است که می تواند در کاهش آثار این جهان گیری (پاندمی) نقش بسیار مهمی را ایفا کند. واکسن های موجود شامل واکسن غیرفعال سه ظرفیته و واکسن زنده ضعیف شده، هر ساله برای پیشگیری از سویه های غالب آنفلوآنزای قابل پیش بینی طراحی و ساخته می شود. هر دو نوع واکسن واجد سوش های پیش بینی شده از آنفلوآنزای نوع A (H3N2)، A (H1N1) و B است [۲] با این وجود واکسن های مورد استفاده دارای مجوز از چندین منظر دارای نقص است که مهم ترین آن احتیاج به بازبینی ترکیب سالیانه برای تولید، نیاز به تجدید واکسیناسیون در هر سال، تأثیر جزئی بر سوش های واجد HA تغییر یافته و عدم ایجاد پاسخ ایمنی سلولی در صورت استفاده از واکسن غیرفعال است. واکسن های فوق از دهه ۱۹۴۰ تاکنون مورد استفاده قرار می گیرد و این در حالیست که جهان گیری های ایجاد شده در سال های ۱۹۵۷ و ۱۹۶۸ موجب مرگ و میر قابل توجهی در سراسر دنیا شد [۳]. همه گیری ها (اپیدمی) و جهان گیری های مکرر آنفلوآنزا می تواند به دلیل موجود نبودن یک واکسن مؤثر پوشش دهنده برای زیرگونه ها و سوش های متنوع ویروسی باشد. ایمنی هتروساب تایپیک (Heterosubtypic) در نتیجه اعمال یک واکسن تطبیقی هتروساب تایپیک علیه آنتی ژن های حفاظت شده آنفلوآنزای A می تواند میزان خسارت ها و مرگ و میرها را بسیار کاهش دهد. با وجود این که قابلیت آنتی بادی ها در پیشگیری از عفونت کاملاً مشخص است، اما اهمیت سیستم ایمنی سلولی در مصونیت در مقابل ویروس را نمی توان نادیده گرفت. مطالعات متعدد صورت گرفته از نقش ایمنی سلولی در جلوگیری از ایجاد عفونت و همچنین کاهش عوارض ناشی از عفونت و پاک سازی ویروس از دستگاه تنفسی حکایت دارد [۴، ۵]. با توجه به مطالب ذکر شده طراحی

یک واکسن دایمی و کارا به یکی از مهم ترین چالش های پیش روی پژوهشگران علوم نوین پزشکی تبدیل شده است. مطالعاتی که طی دو سال اخیر انجام شده توانایی این دو ژن در پیشگیری از ابتلا به عفونت آنفلوآنزا در مدل های موشی و موش خرما را به اثبات رسانده است. نوکلئوپروتئین (Nucleoprotein: NP) و ویروس آنفلوآنزا یک پروتئین حفاظت شده به شمار می رود. NP با اتصال به ssRNA (Single-stranded RNA) آن را از تخریب به وسیله آنزیم های نوکلئاز حفاظت می کند. از این رو با توجه به وجود توالی های تحریک کننده پاسخ CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) در NP که بین تمامی زیرنوع های آنفلوآنزای A مشترک است، ایده طراحی یک واکسن دایمی براساس NP در ذهن پژوهشگران شکل گرفت [۶]. تولید ناقل بیانی NP آنفلوآنزا و کاربرد آن به عنوان واکسن ژنی به بیش از دو دهه پیش برمی گردد [۷]. مطالعات اولیه نشان داد که NP توانایی ایجاد پاسخ نسبی ایمنی حفاظتی بر ضد سویه های مختلف ویروس نوع A آنفلوآنزا را دارد [۸]. از این رو تلاش برای افزایش کارایی ایمنی ایجاد شونده توسط NP به خصوص پس از گزارش ایجاد عفونت کشنده توسط ویروس آنفلوآنزای A/H5N1 افزایش چشمگیری یافت [۹، ۱۰]. ژن M یا ماتریکس آنفلوآنزای A دو پروتئین M1 و M2 (پروتئین کانال یونی) را کد می کند که هر دو دارای توالی های حفاظت شده است. پروتئین داخلی M1 یکی از مهم ترین اجزا ویروس است که در سرهم بندی و جوانه زنی ویروس نقش مهمی را ایفا می کند. در سال ۲۰۰۱ طی یک تحقیق مشخص شد که واکسن ژنی بیان کننده ژن M1 و M2 قادر است ایمنی محافظتی را در برابر ۸۰ درصد جمعیت مورد مطالعه ایجاد کند [۱۱]. با توجه به مطالب ذکر شده به نظر می رسد قرار دادن دو ژن M1 و NP در یک ناقل دو سیسترونی (Bicistronic) می تواند به لحاظ طراحی یک راه کار واکسن جامع برای ویروس آنفلوآنزا بسیار اهمیت داشته باشد. در سال ۲۰۰۹ یک گروه از محققان چینی با قرار دادن دو تا از ژن های متغیر [هماگلوتینین (Hemagglutinin) و نورآمینیداز

استفاده از نرم‌افزارهای Bio Edit, Oligo6, NCBI Blast و Oligo analyzer3 انجام شد. در طراحی آغازگرها، طول کامل ژن‌ها مد نظر بوده است به نحوی که محصولات PCR مورد نظر واجد کدون آغاز و کدون اختتام باشد. به‌منظور بررسی جایگاه‌های برش روی ژن‌ها و جلوگیری از ایجاد جایگاه‌های برش ناخواسته از نرم‌افزار Stand alone با عنوان Nebcutter استفاده شد و در نهایت جایگاه‌های برش *NheI* و *EcoRI* در طراحی آغازگرهای ژن M1 و جایگاه‌های برش *BstXI* و *XbaI* در طراحی آغازگرهای ژن NP در نظر گرفته شد. با توجه به ادعای شرکت سازنده ناقل مورد استفاده در این مطالعه مبنی بر بیان مساوی از دو ژن کلون شده در جایگاه MCS (Multiple Cloning Site) و جایگاه پس از IRES موقعیت‌های انتخاب شده برای کلونینگ این دو ژن به‌ترتیب موقعیت MCS برای ژن M1 و موقعیت پس از IRES برای ژن NP بود. همچنین توالی کزاک (Kozak Sequence) به‌منظور بیان بهتر ژن NP در طراحی آغازگر لحاظ شد. سنتز آغازگرها در شرکت TIB MolBiol با خلوص در سطح HPLC (High Performance Liquid Chromatography) انجام شد. توالی آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ مشخص شده است.



شکل ۱ ناقل pIRES2-EGFP

و ویروس آنفلوانزا در ناقل دوسیسترونی موفق به تولید همزمان این پروتئین‌ها شدند که در مرحله بعد کارایی این سازه در به راه انداختن ایمنی بر علیه این ویروس بررسی شد؛ اما با توجه به این‌که ژن‌های مورد استفاده در مطالعه آنان ژن‌های بسیار متغیر ویروس بود، در نتیجه ایمنی هتروساب تایپیک ایجاد نشد. راه‌کار مورد استفاده در طراحی ناقل‌های دوسیسترونی به‌کار بردن توالی‌های مختلف (Internal IRES Ribosome Entry Site) است که امکان بیان همزمان دو پروتئین از یک mRNA را ممکن می‌سازد به نحوی که رایبوزوم‌ها هم از AUG مربوط به ناحیه Cap و هم از AUG مربوط به ناحیه IRES ترجمه mRNA را آغاز می‌کنند و به این ترتیب دو ژن از یک mRNA ترجمه می‌شود [۱۲].

در این پژوهش در راستای راه‌اندازی یک واکسن جامع براساس واکسن ژنی، دو ژن محافظت شده در سویه‌ها و زیرگونه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا (M1 و NP) در ناقل دوسیسترونی یوکاریوتی بیان شد تا با توجه به ساختار محافظت شده، قادر به ایجاد ایمنی بر علیه گونه‌های درون زیرگونه‌ای و زیرگونه‌های دیگر باشد. قرار دادن ژن‌های NP و M1 ویروس آنفلوانزا درون ناقل دوسیسترونی باعث تولید همزمان این پروتئین‌ها در سلول‌های یوکاریوتی خواهد شد که هم به لحاظ اقتصادی و هم ایمنی‌زایی احتمالی بیشتر و هم فرمول‌بندی راحت‌تر و تکرارپذیرتر اهمیت پیدا می‌کند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- طراحی آغازگرها (Primers)

به‌منظور کلونینگ ژن‌های M1 و NP از ویروس H1N1 Influenza A/PR8/34 در ناقل pIRES2-EGFP (شکل ۱) نخست ۲ جفت آغازگر برای تکثیر این ژن‌ها طراحی شد. طراحی آغازگرها پس از دریافت توالی‌های مربوط از NCBI (National Center for Biotechnology Information) با

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن های M1 و NP

ژن M1 (۷۸۰ جفت باز)	
5' GAC GGC TAG CAT GAG TCT TCT AAC CGA GG 3'	M1 جلویی (NheI) (Forward)
5' TAA AGA ATT CGA GGA TCA CTT GAA CCG TTG C 3'	M1 برگشتی (EcoRI) (Reverse)
ژن NP (۱۵۰۰ جفت باز)	
5' CTA ACC ACA ACC ATG GCG TCC CAA GGC ACC AA 3'	NP جلویی (BstXI)
5' CGG CTC TAG ATT AAT TAT CGT ATT CCT CTG C 3'	NP برگشتی (XbaI)

نوکلئاز در یک میکروتیوب فاقد آنزیم های RNase و DNase وارد شد و به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و سپس به سرعت روی یخ قرار داده شد تا ساختارهای دوم باز گردند و آنزیم رونوشت بردار معکوس بتواند ساخت cDNA را به نحو مؤثری انجام دهد. سپس ۴ میکرولیتر بافر ۵X، ۱ میکرولیتر مهار کننده ریبونوکلئاز معادل ۲۰ واحد و ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار به میکروتیوب دارای RNA و آغازگر افزوده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس ۲۰۰ واحد از آنزیم نسخه بردار معکوس به نام M-Mulv (ساخت شرکت Fermentas کانادا) وارد واکنش شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در پایان واکنش محصول به دست آمده به سرعت روی یخ قرار داده شد. سپس این محصول به عنوان الگو در دو مرحله واکنش PCR برای ژن M1 استفاده شد.

۲-۳- PCR ژن M1

واکنش PCR برای ژن M1 با استفاده از آنزیم High Fidelity Taq (ساخت شرکت Fermentas کانادا) انجام شد. این آنزیم ترکیبی از دو آنزیم Taq و Pfu است که در آن خاصیت پروسسیویته (Processivity) بالایی به واکنش می دهد و آنزیم Pfu با توجه به خاصیت تصحیح اشتباه (Proofreading) درصد خطای Taq را کاهش می دهد. غلظت مواد مورد استفاده در واکنش PCR از جمله آغازگرها مطابق واکنش استاندارد PCR

۲-۲- استخراج RNA ویروسی و انجام واکنش

نسخه برداری معکوس برای ژن M1

پس از تهیه رده سلولی MDCK (Madin Darby Canine Kidney) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، کشت و بهینه سازی شرایط کشت سلول ها انجام شد. سلول های اخذ شده در مرحله نخست به فلاسک های ۲۵ سانتی متر مربعی منتقل و تا مرحله ای که حاوی رده سلولی MDCK به صورت تک لایه باشد در انکوباتور نگهداری شد. محیط کشت مورد استفاده محیط DMEM (غنی شده با سرم گاوی ۱۰ درصد) ساخت شرکت Gibco و فلاسک های مورد استفاده ساخت شرکت Greiner بود. ویروس (H1N1) Influenza A/PR8/34 تهیه و تیتراژ با استفاده از روش TCID₅₀ (Tissue Culture Infective Dose 50) تعیین شد. در مرحله بعد مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ویروس با MOI (Multiplicity Of Infection) برابر ۰/۰۰۱ به هر فلاسک ۲۵ سی سی انتقال داده شد؛ حجم نهایی محیط مورد استفاده ۶ میلی لیتر بود. پس از برداشت ویروس آنفلوانزا و انجام آزمون هماگلوتیناسیون، استخراج RNA ویروسی با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت Qiagen آلمان) انجام شد. واکنش RT-PCR برای ژن M1 با استفاده از آغازگر جلویی اختصاصی طراحی شده برای این ژن به انجام رسید. در مرحله سنتز cDNA ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج شده به عنوان الگو استفاده شد. میزان آغازگر جلویی استفاده شده ۱۰۰ پیکومول در واکنش ۲۰ میکرولیتری (با غلظت نهایی ۵ میکرومولار) بود. به طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر RNA استخراج شده، یک میکرولیتر از آغازگر اختصاصی، ۱ میکرولیتر آب مقطر فاقد

۲-۵- کلونینگ ژن NP در ناقل دو سیستمی pIRES2-EGFP به‌جای ژن EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)

ناقل مورد استفاده در این مطالعه (ساخت شرکت Clontech) با نام تجاری pIRES2-EGFP بود. این ناقل در حالت طبیعی واجد ژن EGFP بعد از ناحیه IRES تحت کنترل پروموتور CMV (Cytomegalovirus) است. همچنین ناحیه MCS واجد چندین جایگاه برش آنزیم‌های محدودالثر است. در این پژوهش برای ساخت ناقل واجد ژن NP محصول PCR در جایگاه پس از IRES به‌جای ژن EGFP کلون شد. پس از بارگذاری محصول PCR روی ژل آگارز ذوب شونده در دمای پایین قطعه مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل (ساخت شرکت Qiagen) از ژل استخراج شده و سپس با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *BstXI* (ساخت شرکت Roche) در کنار پلاسمید pIRES2-EGFP هضم آنزیمی شده و در نهایت توسط کیت خالص‌سازی PCR خالص‌سازی شد. حاصل هضم ناقل pIRES2-EGFP با این دو آنزیم خارج شدن ژن EGFP با طول حدود ۷۳۰ نوکلئوتید بود. عمل الحاق (Ligation) با استفاده از کیت‌های T4 لیگاز (ساخت شرکت Takara) انجام شد. ترانسفورماسیون (Transformation) در سویه Top 10 انجام شد و نتایج کلونینگ پس از انتخاب کلونی با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید و بارگذاری کردن محصول در روی ژل به‌منظور مشخص کردن کلون‌های واجد ژن NP انجام شد. تأیید درستی قطعات کلون شده با استفاده از هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *XbaI* و *BstXI* انجام شد.

۲-۶- کلونینگ ژن M1 در کلون pIRES2-NP

در این پژوهش ژن M1 در ناحیه MCS کلون شد. ژن M1 پس از PCR و استخراج از ژل با استفاده از آنزیم‌های *EcoRI* و *NheI* ساخت شرکت Roche در کنار پلاسمید

تنظیم شد. حجم واکنش PCR ۵۰ میکرولیتر واجد بافر با غلظت ۱X، ۰/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۲ میکرومولار آغازگر، ۲ واحد آنزیم High Fidelity Taq و ۱۰ میکرولیتر cDNA بود. برنامه چرخه دمایی مورد استفاده در PCR ژن M1 شامل ۲ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه PCR به‌صورت ۴۵ ثانیه ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه ۵۶ درجه برای اتصال آغازگرها، ۱ دقیقه دمای ۶۸ درجه برای بسط رشته و در انتهای چرخه‌ها، یک دمای ۶۸ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه برای بسط نهایی در نظر گرفته شد. محصول این مرحله روی ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد الکتروفورز و زیر نور ماورای بنفش بررسی شد.

۲-۴- PCR ژن NP

PCR ژن NP با استفاده از پلاسمید pCAG-NP که واجد ژن NP و ویروس آنفلوانزا سویه PR8 بود، به‌عنوان الگو در واکنش PCR به انجام رسید. این پلاسمید به‌صورت دوستانه از دکتر کنجی اوها (Kenji Ohba) (گروه ویروس‌شناسی مولکولی، دانشگاه پزشکی دندانپزشکی توکیو، توکیو) از ژاپن دریافت شده بود. واکنش PCR برای ژن NP نیز با استفاده از آنزیم High Fidelity Taq (ساخت شرکت Fermentas کانادا) انجام شد. غلظت مواد مورد استفاده همانند PCR ژن M1 براساس PCR استاندارد تعیین شده بود. حجم واکنش PCR ۵۰ میکرولیتر واجد بافر با غلظت ۱X، ۰/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۲ میکرومولار آغازگر، ۲ واحد آنزیم High Fidelity Taq و ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید pCAG-NP بود. برنامه چرخه دمایی مورد استفاده در PCR ژن NP شامل ۳ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه PCR به‌صورت ۱ دقیقه ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه ۵۶ درجه برای اتصال آغازگرها، ۲ دقیقه دمای ۶۸ درجه برای بسط رشته و در انتهای چرخه‌ها، یک دمای ۶۸ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه برای بسط نهایی در نظر گرفته شد. محصول این مرحله روی ژل آگارز با غلظت ۱ درصد الکتروفورز و زیر نور ماورای بنفش بررسی شد.

پلاسمیدهای مورد نظر در شرکت SeqLab آلمان و به وسیله دستگاه ABI PRISM® Genetic Analyzer انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین توالی ناقل های واجد ژن های M1 و NP در جدول ۲ آمده است. دلیل استفاده از آغازگرهای متفاوت (که برای نواحی اطراف ژن روی پلاسمید طراحی شده بود) از آغازگرهای تکثیر ژن در فرآیند تعیین توالی، عدم کارایی مناسب دستگاه های تعیین توالی در چندین نوکلئوتید اولیه است که در صورت استفاده از آغازگرهای تکثیر ژن بر درستی توالی آن ها نمی توان اطمینان کرد.

piRES2-NP هضم آنزیمی شده و عمل الحاق با استفاده از کیت های T4 لیگاز (ساخت شرکت Takara) انجام شد. ترانسفورماسیون در سویه Top 10 باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) انجام شد و نتایج کلونینگ پس از انتخاب کلونی با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید Miniprep (ساخت شرکت Fermentas) و بارگذاری کردن محصول روی ژل آگارز مشخص شد.

۲-۷- تأیید کلونینگ ژن های M1 و NP با تعیین توالی

تأیید نهایی درستی قطعات کلون شده با تعیین توالی

جدول ۲ توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین توالی کلون های واجد ژن های M1 و NP

ژن M1	
جلویی	5' CAA ATG GGC GGT AGG CGT G 3'
برگشتی	5' GCA CAC CGG CCT TAT TCC AAG 3'
ژن NP	
جلویی ۱	5' GCT TTA CAT GTG TTT AGT CGA GGT T 3'
برگشتی ۱	5' AGG CAG GAC TTG TGA GCA ACC GA 3'
جلویی ۲	5' AAT GAT GGA TCA AGT GAG AGA GA 3'
برگشتی ۲	5' AAT CAG CCA TAC CAC ATT TGT AGA GG 3'

۲-۹- ترانسفکشن (Transfection) پلاسمید واجد

ژن های M1 و NP به داخل رده سلولی BHK-21

تعداد ۵۰۰۰۰ سلول BHK-21 که در مرحله لگاریتمی قرار داشتند در حجم ۵۰۰ میکرولیتر محیط کامل به یک حفره از پلیت ۲۴ خانه ای منتقل شد. بعد از کشت شبانه ۳ ساعت قبل از ترانسفکشن با محیط تازه بدون آنتی بیوتیک تعویض محیط شدند؛ در این زمان تراکم سلول ها ۶۰ تا ۸۰ درصد بوده است. مقدار ۰/۸ میکروگرم از پلاسمید نوترکیب با محیط ناقص بدون سرم جنین گاوی به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. مقدار ۴ میکرولیتر لیوفکتامین ۲۰۰۰ سی دی (Lipofectamin 2000 CD) به مخلوط

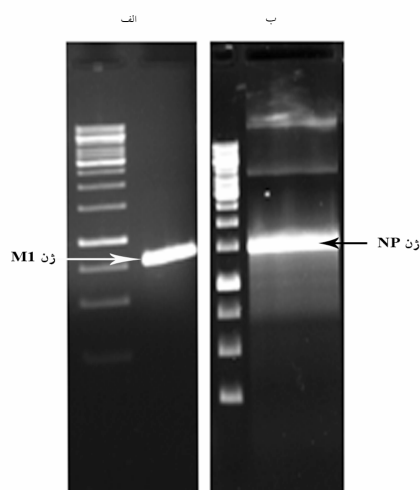
۲-۸- تأیید نهایی سازه ژنی با هضم آنزیمی

تأیید درستی قطعات کلون شده با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم Fast Digest BamHI (شرکت Fermentas) انجام شد. با توجه به این که یک جایگاه برش در داخل هر دو ژن M1 (در نوکلئوتید شماره ۲۲۷) و NP (در نوکلئوتید شماره ۵۱۰) برای آنزیم BamHI وجود دارد، همچنین یک جایگاه برش در ناحیه MCS (در نوکلئوتید شماره ۶۵۹) پلاسمید piRES2-EGFP برای این آنزیم وجود دارد، هضم آنزیمی با این آنزیم در صورت حضور هر دو ژن در داخل پلاسمید نهایی در نهایت منجر به خروج دو قطعه حدوداً ۵۳۰ و ۱۱۰۰ جفت بازی از یک کلون می شود.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج PCR ژن‌های M1 و NP

با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، PCR انجام شد. محصولات حاصل از تکثیر ژن‌های M1 و NP که به ترتیب قطعات حدوداً ۷۸۰ و ۱۵۰۰ جفت‌بازی بودند، روی ژل آگارز ۱/۵ و ۱ درصد در کنار نشانگر ژنی ۱ کیلوباز (Fermentas) بارگذاری شد. نتایج PCR در شکل ۲ قابل مشاهده است.



شکل ۲ نتایج حاصل از PCR ژن‌های الف (M1) ب (NP)

۳-۲- ساخت کلون pIRES2-NP

پس از الحاق ناقل pIRES2 و ژن NP و ترانسفورم محصول الحاق به باکتری‌های مستعد، بررسی کلون‌های رشد یافته به منظور انتخاب کلون مورد نظر انجام شد. همان گونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، پلاسمیدهای به دست آمده پس از عمل الحاق واجد ژن NP است که با هضم آنزیمی دوگانه به وسیله آنزیم‌های *XbaI* و *BstXI* از داخل آن خارج شد. همان گونه که در عکس ژل مشاهده می‌شود، کلون‌های واجد ژن NP در اثر هضم، تولید یک قطعه ۱۵۰۰ جفت‌بازی را کرده‌اند که در کنار نشانگر ۱ کیلو جفت‌بازی (Fermentas)

قبل از اضافه نموده و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. تمام مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت اضافه شد. پلیت به مدت ۶ ساعت در انکوباتور کشت سلول قرار داده شد و سپس با محیط کامل واجد سرم تعویض محیط شد. بعد از گذشت حدود ۴۸ ساعت بیان ژن‌های M1 و NP توسط روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم ارزیابی شد.

۲-۱۰- رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس سلول‌های

ترانسفکت شده با پلاسمید

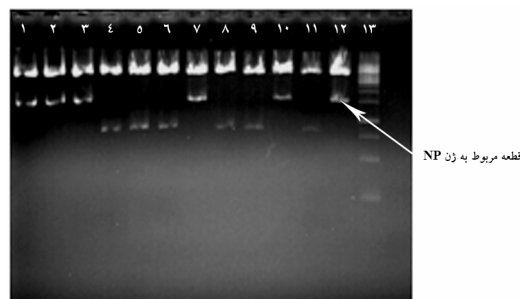
ابتدا محیط رویی خارج و سلول‌ها دو بار با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو شدند. فرم‌آلدهید ۴ درصد در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به روی هر کدام از خانه‌ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سلول‌ها با PBS شستشو شدند. تریتون X۱۰۰ (Triton X100) ۰/۲۵ درصد به منظور نفوذپذیر کردن سلول‌ها، در حجم ۱۰۰ میکرولیتر روی هر کدام از خانه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سلول‌ها ۳ مرتبه با PBS شستشو شدند. محلول ۱/۳۰ آنتی‌بادی مونوکلونال (Monoclonal) ضد M1 و NP (ساخت شرکت AbCAM) در PBS حاوی ۱ درصد BSA (Bovine Serum Albumin) تهیه و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه و اسلاید به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. اسلاید ۳ مرتبه با PBS شستشو شد. محلول ۱/۵۰ آنتی‌بادی پلی‌کلونال (Polyclonal) ضد IgG موشی کونژوگه با FITC (Fluorescein Isothiocyanate) (ساخت شرکت AbCAM) در PBS حاوی ۱ درصد BSA تهیه و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه و اسلاید به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. اسلاید ۳ مرتبه با PBS و یک مرتبه با آب شستشو شد. بیان ژن‌های M1 و NP درون سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسانس معکوس مشاهده و از هر خانه عکس برداری انجام شد.

سیسترونی M1-pIRES2-NP شد. تأیید نهایی درستی قطعه کلون شده با تعیین توالی ژن M1 پلاسمید مورد نظر انجام شد که نشان دهنده درستی این پلاسمیدها بود. همچنین با توجه به این که یک جایگاه برش در داخل هر دو ژن M1 و NP و یک جایگاه برش در ناحیه MCS برای آنزیم *BamHI* وجود دارد، هضم آنزیمی با این آنزیم در صورت حضور هر دو ژن در داخل پلاسمید نهایی در نهایت منجر به خروج دو قطعه حدوداً ۵۰۰ و ۱۱۰۰ جفت‌بازی می‌شود که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود.

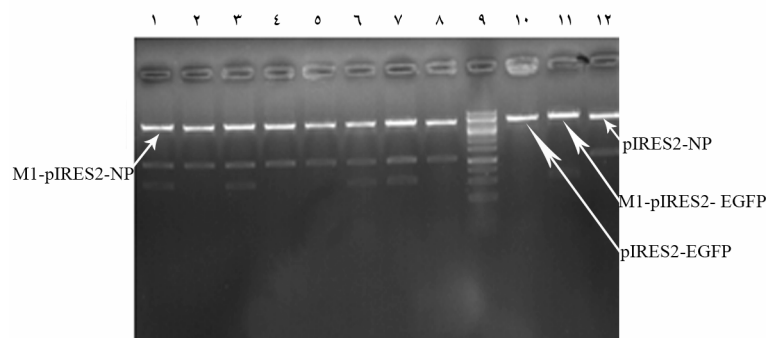
بارگذاری شده است. لیکن کلون‌های دیگر در اثر هضم، قطعه ۷۳۰ جفت‌بازی مربوط به EGFP را تولید کرده‌اند.

۳-۳- ساخت ناقل دو سیسترونی M1-pIRES2-NP

قطعه M1 خارج شده از پلاسمید M1-pIRES2-EGFP به وسیله هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *EcoRI* و *NheI* خالص‌سازی و در کنار پلاسمید pIRES2-NP هضم شده با همان آنزیم‌ها وارد واکنش الحاق و منجر به ساخت پلاسمید دو



شکل ۳ نتایج حاصل از کلونینگ ژن NP و تأیید با هضم آنزیمی دوگانه (ستون‌های ۱، ۲، ۳، ۷، ۱۰ و ۱۲ مربوط به کلون‌هایی است که قطعه ۱۵۰۰ جفت‌بازی مربوط به ژن NP از آنها خارج شده است. ستون‌های ۴، ۵، ۶، ۸، ۹ و ۱۱ مربوط به کلون‌هایی است که ژن ۷۳۰ جفت‌بازی EGFP از آنها خارج شده است. ستون ۱۳ مربوط به نشانگر DNA است.)

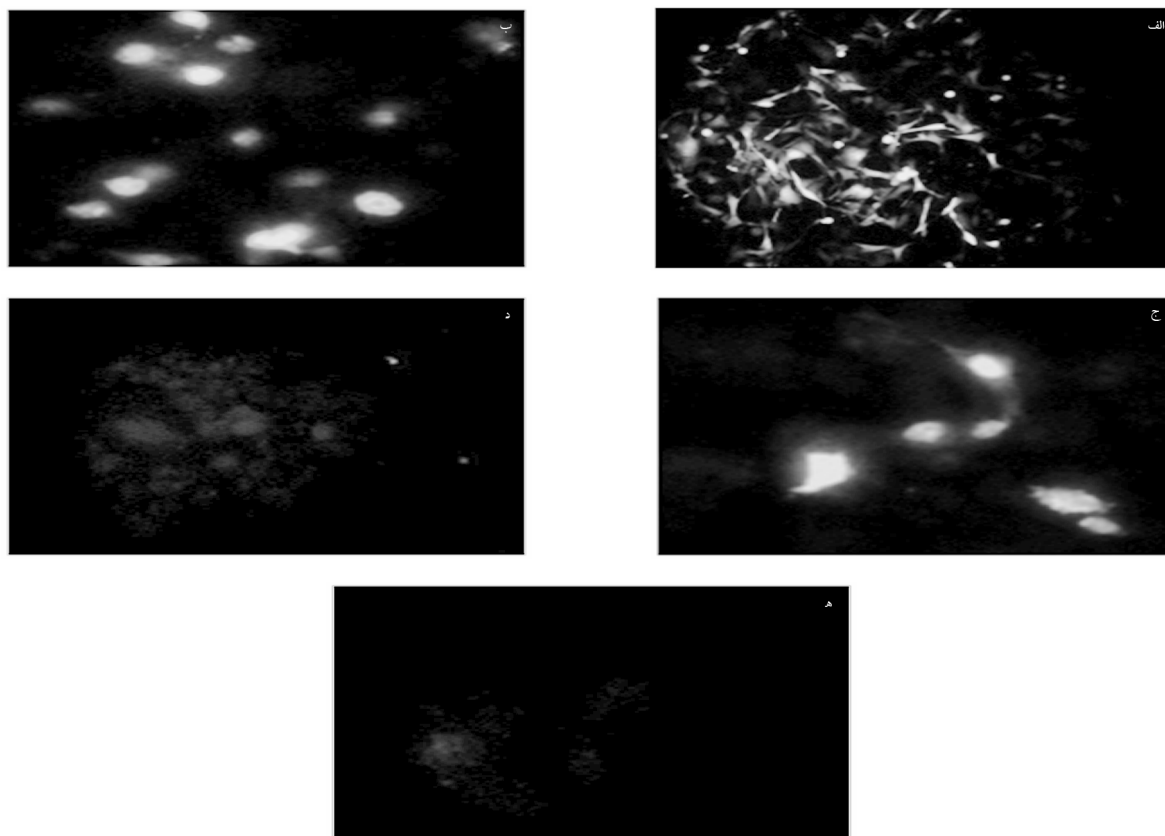


شکل ۴ ساخت ناقل دو سیسترونی و تأیید با هضم آنزیمی (خروج همزمان قطعات ۵۰۰ و ۱۰۰۰ جفت‌بازی از کلون‌های واجد هر دو ژن M1 و NP) (ستون‌های ۱، ۳، ۶، ۷ مربوط به کلون‌های M1-pIRES2-NP است که در اثر هضم آنزیمی با *BamHI* دو قطعه ۵۰۰ و ۱۱۰۰ جفت‌بازی تولید کرده‌اند. ستون‌های ۲، ۴، ۵، ۸ و ۱۲ مربوط به کلون‌هایی است که فاقد ژن M1 بوده و فقط قطعه ۱۱۰۰ جفت‌بازی تولید کرده‌اند. ستون ۹ مربوط به نشانگر DNA است و ستون‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲ به‌عنوان پلاسمیدهای کنترل به‌ترتیب مربوط به کلون‌های pIRES2-EGFP، M1-pIRES2-EGFP و M1-pIRES2-NP است.)

۳-۶- تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی ژن‌های کلون شده

برای تأیید درستی ژن‌های کلون شده دو نمونه از هر کدام از کلون‌های انتخاب شده حاوی ژن‌های M1 و NP برای انجام توالی‌یابی ژنی ارسال شد. توالی‌های خوانده شده توسط نرم‌افزار

Chromas بازیابی شده و سپس با ژن‌های ویروس‌های مرجع آنفلوآنزا سویه PR8 با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit هم‌ردیفی چندگانه (Multiple Alignment) انجام پذیرفت که نشان داد ژن‌های کلون شده در این پلاسمید ۱۰۰ درصد با ژن‌های M1 و A Influenza/NP H1N1 PR/8/34 همپوشانی دارد.



شکل ۵ بررسی بیان پروتئین‌های M1 و NP درون سلول‌های BHK-21 پس از تثبیت سلول‌ها با فرم‌آلدهید، سلول‌ها با استفاده از تریتون X100 نفوذپذیر شدند. در مرحله بعد این سلول‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد M1 و ضد NP در جاهک‌های جداگانه مجاور و به دنبال آن با آنتی‌بادی ثانویه حاوی کوئزوگه FITC مجاور شدند. پس از شستشوی نهایی از این سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسانت معکوس عکس‌برداری شد. **الف)** بیان پروتئین EGFP درون سلول‌های BHK-21 (بزرگنمایی ۱۰۰×)، **ب)** سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید M1-pIRES2-NP که با آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن M1 مجاور شده‌اند (بزرگنمایی ۴۰۰×)، **ج)** سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید M1-pIRES2-NP که با آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن NP مجاور شده‌اند (بزرگنمایی ۴۰۰×)، **د)** سلول‌های بدون ترانسفکت که با آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن M1 مجاور شده‌اند (بزرگنمایی ۴۰۰×)، **ه)** سلول‌های بدون ترانسفکت که با آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن NP مجاور شده‌اند. (بزرگنمایی ۴۰۰×)

۳-۵- تأیید بیان ژن‌های M1 و NP با ایمونوفلورسانس

به‌منظور بررسی بیان همزمان ژن‌های M1 و NP در سلول یوکاریوتی، پلاسمید M1-pIRES2-NP به داخل سلول

یوکاریوتی BHK-21 ترانسفکت شد. پس از گذشت دو روز، بیان پروتئین‌های M1 و NP با روش ایمونوفلورسانس بررسی شد. علاوه بر پلاسمید حاوی ژن‌های M1 و NP، از پلاسمید

آنفلوانزا که می تواند بر علیه همه سویه های یک نوع مشخص ایمنی ایجاد کند بیش از پیش آشکار شد [۱۵].

تاکنون مطالعات گسترده ای روی استفاده از واکسن های ژنی به عنوان یک استراتژی جایگزین واکسن بر ضد عفونت آنفلوانزا صورت گرفته است و اکثریت آن ها بر قابلیت بالای این راه کار به عنوان یک واکسن دائمی علیه این ویروس اتفاق نظر دارند. در سال ۲۰۰۹ دانشمندان چینی طی یک مطالعه، کارایی ژن های مختلف ویروس H5N1 در قالب یک DNA واکسن در ایجاد ایمنی را بررسی کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که واکسیناسیون همزمان با ژن های M1 و NP باعث محافظت ۹۵ درصد موش ها در مقابل چالش با ویروس همولوگوس (H5N1) و ۸۰ درصد موش ها در مقابل چالش با ویروس هتروولوگوس H1N1 (PR8) می شود. در شرایطی که واکسیناسیون موش ها تنها با ژن NP باعث بقای ۶۰-۸۰ درصد و واکسیناسیون با M1 باعث محافظت ۲۵ درصد موش ها می شود که نشان دهنده هم افزایی دو ژن در ایجاد ایمنی مؤثرتر است [۱۶]. با توجه به مطالب ذکر شده هدف از این مطالعه ساخت یک ناقل دو سیستمی بر مبنای ژن های محافظت شده ویروس آنفلوانزا بود تا هم بیان دو ژن از یک سازه با آثار هم افزایی ایمنی مؤثرتری را ایجاد کند و هم ایمنی علیه زیرگونه های مختلف ویروس را تضمین نماید. پروتئین ماتریکس محافظت شده ترین پروتئین ویروس آنفلوانزا است و همچنین کوچک ترین (۲۵۲ آمینو اسید) و فراوان ترین پروتئین ساختمانی ویروس است [۱۷]. پروتئین NP نیز جزء محافظت شده ترین پروتئین های ویروس آنفلوانزا است که مطالعات قبلی بر نقش مؤثر این ژن ها در ایجاد مقاومت علیه عفونت ویروس آنفلوانزا حکایت دارند [۱۸]. ناقل مورد استفاده در این مطالعه ساخت شرکت Clonetech با نام تجاری pIRES2-EGFP بود که با توجه به ادعای شرکت سازنده ناقل مورد استفاده در این مطالعه مبنی بر بیان مساوی از دو ژن کلون شده در جایگاه MCS و جایگاه پس از IRES موقعیت های انتخاب شده برای کلونینگ این دو ژن به ترتیب موقعیت MCS برای ژن M1 و

pIRES2-EGFP که بیان کننده پروتئین EGFP بود نیز به منظور بررسی کارایی ترانسفکشن استفاده شد. همان گونه که در شکل ۵ مشاهده می شود وجود رنگ سبز در سلول های ترانسفکت شده با پلاسמיד بیان کننده EGFP نشان دهنده کارایی مناسب فرایند ترانسفکشن است. پس از مشاهده بیان پروتئین EGFP، سایر نمونه ها که با M1-pIRES2-NP در شرایط یکسان ترانسفکت شده بودند، از نظر بیان پروتئین های M1 و NP ارزیابی شدند. قسمت الف در شکل ۵ بیان EGFP و قسمت ب و ج به ترتیب بیان پروتئین های M1 و NP را در رده سلولی BHK-21 نشان می دهد.

۴- بحث

به دلیل همه گیری های هر ساله ویروس آنفلوانزا در جهان و خطر بروز یک جهان گیری توسط این ویروس، دستیابی به یک واکسن کارا از دیر باز مورد توجه محققان بوده است [۱۳]. استفاده از واکسن غیرفعال آنفلوانزا با وجود مزیت هایی نظیر بی خطر بودن مصرف آن، به دلیل ایجاد پاسخ ضعیف در جمعیت های در معرض خطر مانند نوزادان و سالمندان و نیز نیاز به تغییرات هر ساله در آن، محققان را بر آن داشته است که به دنبال واکسن کارآمدتری که نیاز به تغییر نداشته باشد و بتواند ایمنی متقاطع قابل قبولی را ایجاد کند، باشند. برای مثال در سال ۱۹۹۶ در ایالات متحده تحقیقات نشان داد هنگامی که سویه واکسن ۷۷ درصد سویه در گردش همان سال را تشکیل می داد درصد حفاظت از مرگ واکسن در سالمندان مبتلا شده به پنومونی حاد (Acute Pneumonia) حاصل از آنفلوانزا ۶۱ درصد بود در حالی که در سال بعد این میزان به دلیل این که تنها ۲۳ درصد شباهت بین سویه واکسن و در گردش وجود داشت به ۳۵ درصد تنزل یافت [۱۴]. این مثال به تنهایی می تواند اهمیت دستیابی به یک واکسن دائمی بر ضد آنفلوانزا را آشکار کند. علاوه بر این؛ با گسترش عفونت H5N1 که همراه با نگرانی های گسترده ای در زمینه بروز یک جهان گیری است و عدم موفقیت در دستیابی به یک واکسن کارا بر ضد آن اهمیت نواحی حفاظت شده ویروس

همچنین از آزمون‌های تأییدی هضم آنزیمی برای اثبات درستی کلونینگ استفاده شد. نتایج تعیین توالی نیز صحت قطعات کلون شده را به اثبات رساند. هر چند انجام آزمون‌های بیشتر نظیر وسترن بلات (Western Blot) بهتر بود ولی به لحاظ اقتصادی تهیه آنتی‌بادی‌های وسترن بلات مقدور نبود. به دلیل شیوع بالای ویروس آنفلوانزا در سطح جوامع انسانی و لزوم دستیابی به یک واکسن دایمی و جامع به نظر می‌رسد سازه ژنی تولید شده در این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب برای جایگزینی واکسن‌های کنونی باشد که البته نیاز به مطالعات بیشتر ایمنی‌زایی در مدل‌های حیوانی و انسان دارد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود فرض می‌دانند از همکاران محترم واحد آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران بابت کمک‌های بی‌دریغشان در انجام این تحقیق، تقدیر و تشکر نمایند. این تحقیق مستخرج از رساله دکتری رشته ویروس‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد.

موقعیت پس از IRES برای ژن NP بود. توالی کزاک (Kozak Sequence) به‌منظور بیان بهتر ژن NP در طراحی آغازگر جلویی مربوط لحاظ شد. قرار دادن ژن‌های NP و M1 و ویروس آنفلوانزا درون ناقل دو سیسترونی باعث تولید همزمان این پروتئین‌ها در سلول‌های یوکاریوتی شد که هم به لحاظ اقتصادی و هم ایمنی‌زایی احتمالی بیشتر و هم فرمول‌بندی راحت‌تر و تکرارپذیرتر اهمیت پیدا می‌کند. تعیین توالی ژن‌های کلون شده نشان داد ژن‌های کلون شده در این پلاسמיד ۱۰۰ درصد با ژن‌های M1 و A Influenza/NP H1N1 PR/8/34 همپوشانی دارد. همچنین انجام آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نشان دهنده بیان همزمان دو پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی BHK-21 بود. بسیاری از مطالعات اخیر در مورد استفاده از DNA واکسن‌ها، به اثبات بیان ژن‌ها در سلول‌های یوکاریوتی براساس آزمایش ایمونوفلورسانس بسنده کرده‌اند که چون هدف از این مطالعه نیز استفاده از این سازه ژنی در قالب DNA واکسن بوده است و نه تولید پروتئین در محیط آزمایشگاهی (In vitro)، ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی علیه پروتئین‌های NP و M1 به‌عنوان یک آزمون حساس مدنظر قرار گرفت.

۶- منابع

- [1] Lamb RA, Krug RM. Orthomyoviridae: The viruses and their replication. In: Virology. Field BN, Knipe DN, (eds.). Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, 1996; p. 1353-95.
- [2] 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 Morb Mortal Wkly Rep 2005; 54 (RR08):1-40.
- [3] Ghendon Y. Introduction to pandemic influenza through history. Eur J Epidemiol 1994; 10(4): 451-3.
- [4] Kreijtz JH, Bodewes R, van Amerongen G, Kuiken T, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice. Vaccine 2007; 25(4): 612-20.
- [5] Brown DM, Dilzer AM, Meents DL, Swain SL. CD4 T cell-mediated protection from lethal influenza: perforin and antibody-mediated mechanisms give a one-two punch. J Immunol 2006; 177(5): 2888-98.
- [6] Kaiser J. A one-size-fits-all flu vaccine? Science 2006; 312(5772): 380-2.
- [7] Townsend AR, McMichael AJ, Carter NP,

- Huddleston JA, Brownlee GG. Cytotoxic T cell recognition of the influenza nucleoprotein and hemagglutinin expressed in transfected mouse L cells. *Cell* 1984; 39(1): 13-25.
- [8] Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MA. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine* 1994; 12(16): 1541-4.
- [9] Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Donatelli I, Guo YJ, Webster RG. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol* 1991; 65(7): 3704-14.
- [10] 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.
- [11] Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamajima K, Yang J, Ishii N, Nakazawa M, Okuda K, Ohnari K, Nakajima K, Xin KQ. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine* 2001; 19: 3681-91.
- [12] Zhang W, Li W, Li Y, Li H, Wang B, Wang F, Zhu Y, Jiang Z, Zhong L, Li M. Immune effects against influenza A virus and a novel DNA vaccine with co-expression of haemagglutinin- and neuraminidase-encoding genes. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt 7): 845-54.
- [13] Nguyen-Van-Tam JS, Hampson AW. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. *Vaccine* 2003; 21(16): 1762-8.
- [14] Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 2007; 25(39-40): 6852-62.
- [15] 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.
- [16] Chen Q, Kuang H, Wang H, Fang F, Yang Z, Zhang Z, Zhang X, Chen Z. Comparing the ability of a series of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against H5N1 influenza virus. *Virus Genes* 2009, 38(1): 30-8.
- [17] Ruigrok RW, Barge A, Durrer P, Brunner J, Ma K, Whittaker GR. Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology* 2000; 267(2): 289-98.
- [18] Jamali A, Sabahi F, Bamdad T, Hashemi H, Mahboudi F, Kheiri MT. Evaluation of intradermal and intramuscular administration of an influenza DNA vaccine encoding nucleoprotein gene. *Modares J Med Sci* 2010; 13(1): 17-23. (Persian)