مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱٤، شماره ۲: از ۵۱-٦۲
تابستان ۱۳۹۰

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

محمد شناگری[۱]، فرزانه صباحی[۲*]، معصومه توسطی‌خیری[۳]، کامبیز فرقان‌پرست[٤]، عباس جمالی[۵]، حمیدرضا هاشمی[٦]، 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 میکروب‌شناسی، 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

دریافت مقاله: ۸۹/۱۲/۲۴ پذیرش مقاله:۹۰/۰۳/۲۱

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 دوسیسترونی یوکاریوتی بیان شد.

مواد و روش‌ها: پلاسمیدهای M1-pIRES2-EGFP و pIRES2-NP به‌ترتیب 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. به‌منظور ساخت پلاسمید دو سیسترونی 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 ایمونوفلوئورسنس 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 ایمونو فلورسنس 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 سیسترونی، ژن M1 ، ژن نوکلئوپروتئین، بیان همزمان

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی،گروه ویروس‌شناسی پزشکی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦ Email: sabahi_f@modares.ac.ir
****نشانی مکاتبه:** تهران، انستیتو پاستور ایران، واحد آنفلوانزا، کدپستی: ۱۳۱٦۹٤۳۵۵۱ Email: mtkheiri@pasteur.ac.ir

۱- مقدمه

بیماری آنفلوانزا (Influenza) سالیانه ۱۰ درصد یا به‌عبارت دیگر ۵۰۰ میلیون نفر از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱]. واکسیناسیون مهم‌ترین راه‌کار در کاهش آمار مبتلایان و مرگ و میر سالیانه ناشی از آنفلوانزای فصلی است که می‌تواند در کاهش آثار این جهان‌گیری (پاندمی) نقش بسیار مهمی را ایفا کند. واکسن‌های موجود شامل واکسن غیرفعال سه ظرفیته و واکسن زنده ضعیف شده، هر ساله برای پیشگیری از سویه‌های غالب آنفلوانزای قابل پیش‌بینی طراحی و ساخته می‌شود. هر دو نوع واکسن واجد سوش‌های پیش‌بینی شده از آنفلوانزای نوع A (H3N2)، A (H1N1)، و B است [۲] با این وجود واکسن‌های مورد استفاده دارای مجوز از چندین منظر دارای نقص است که مهم‌ترین آن احتیاج به بازبینی ترکیب سالیانه برای تولید، نیاز به تجدید واکسیناسیون در هر سال، تأثیر جزئی بر سوش‌های واجد HA تغییر یافته و عدم ایجاد پاسخ ایمنی سلولی در صورت استفاده از واکسن غیرفعال است. واکسن‌های فوق از دهه ۱۹٤۰ تاکنون مورد استفاده قرار می‌گیرد و این در حالیست که جهان‌گیری‌های ایجاد شده در سال‌های ۱۹۵۷ و ۱۹٦۸ موجب مرگ و میر قابل‌توجهی در سراسر دنیا شد [۳]. همه‌گیری‌ها (اپیدمی) و جهان‌گیری‌های مکرر آنفلوانزا می‌تواند به دلیل موجود نبودن یک واکسن مؤثر پوشش‌دهنده برای زیرگونه‌ها و سوش‌های متنوع ویروسی باشد. ایمنی هتروساب تایپیک (Heterosubtypic) در نتیجه اعمال یک واکسن تطبیقی هتروساب تایپیک علیه آنتی‌ژن‌های حفاظت شده آنفلوانزای A می‌تواند میزان خسارت‌ها و مرگ و میرها را بسیار کاهش دهد. با وجود این‌که قابلیت آنتی‌بادی‌ها در پیش‌گیری از عفونت کاملاً مشخص است، اما اهمیت سیستم ایمنی سلولی در مصونیت در مقابل ویروس را نمی‌توان نادیده گرفت. مطالعات متعدد صورت گرفته از نقش ایمنی سلولی در جلوگیری از ایجاد عفونت و همچنین کاهش عوارض ناشی از عفونت و پاک‌سازی ویروس از دستگاه تنفسی حکایت دارد [٤، ۵]. با توجه به مطالب ذکر شده طراحی یک واکسن دایمی و کارا به یکی از مهم‌ترین چالش‌های 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 آنفلوانزا در مدل‌های موشی و موش خرما را به اثبات رسانده است. نوکلئوپروتئین (Necleoprotein: NP) ویروس آنفلوانزا یک پروتئین حفاظت شده به‌شمار می‌رود. NP با اتصال به ssRNA (Single-stranded RNA) آن را از تخریب به‌وسیله آنزیم‌های نوکلئاز حفاظت می‌کند. از این رو با توجه به وجود توالی‌های تحریک کننده پاسخ CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) در NP که بین تمامی زیرنوع‌های آنفلوانزای A مشترک است، ایده طراحی یک واکسن دایمی براساس NP در ذهن پژوهشگران شکل گرفت [٦]. تولید ناقل بیانی NP آنفلوانزا و کاربرد آن به‌عنوان واکسن ژنی به بیش از دو دهه پیش برمی‌گردد [۷]. مطالعات اولیه نشان داد که NP توانایی ایجاد پاسخ نسبی ایمنی حفاظتی بر ضد سویه‌های مختلف ویروس نوع A آنفلوانزا را دارد [۸]. از این رو تلاش برای افزایش کارایی ایمنی ایجاد شونده توسط NP به‌خصوص پس از گزارش ایجاد عفونت کشنده توسط ویروس آنفلوانزای A/H5N1 افزایش چشمگیری یافت [۹، ۱۰]. ژن M یا ماتریکس آنفلوانزای A دو پروتئین M1 و M2 (پروتئین کانال یونی) را کد می‌کند که هر دو دارای توالی‌های حفاظت شده است. پروتئین داخلی M1 یکی از مهم‌ترین اجزا ویروس است که در سرهم‌بندی و جوانه‌زنی ویروس نقش مهمی را ایفا می‌کند. 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 به‌نظر می‌رسد قرار دادن دو ژن M1 و NP در یک ناقل دوسیسترونی (Bicistronic) می‌تواند به لحاظ طراحی یک راه‌کار واکسن جامع برای ویروس آنفلوانزا بسیار اهمیت داشته باشد. در سال ۲۰۰۹ یک گروه از محققان چینی با قرار دادن دو تا از ژن‌های متغیر [هماگلوتینین (Hemagglutinin) و نورآمینیداز

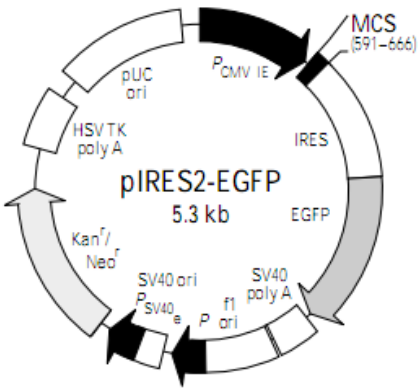
(Neuraminidase)] ویروس آنفلوانزا در ناقل دوسیسترونی موفق به تولید همزمان این پروتئین‌ها شدند که در مرحله بعد کارایی این سازه در به راه انداختن ایمنی بر علیه این ویروس بررسی شد؛ اما با توجه به این‌که ژن‌های مورد استفاده در مطالعه آنان ژن‌های بسیار متغیر ویروس بود، در نتیجه ایمنی هتروساب تایپیک ایجاد نشد. راه‌کار مورد استفاده در طراحی ناقل‌های دوسیسترونی به‌کار بردن توالی‌های مختلف IRES (Internal 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 Influenza A/PR8/34 (H1N1) 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 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 *Eco*RI و *Nhe*I در طراحی آغازگرهای ژن M1 و جایگاه‌های برش *Bst*XI و *Xba*I 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

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن‌های M1 و NP

ژن M1 (۷۸۰ جفت‌باز)	
M1 جلویی (*Nhe*I) (Forward)	5' GAC GGC TAG CAT GAG TCT TCT AAC CGA GG 3'
M1 برگشتی (*Eco*RI) (Reverse)	5' TAA AGA ATT CGA GGA TCA CTT GAA CCG TTG C 3'
ژن NP (۱۵۰۰ جفت‌باز)	
NP جلویی (*Bst*XI)	5' CTA ACC ACA ACC ATG GCG TCC CAA GGC ACC AA 3'
NP برگشتی (*Xba*I)	5' CGG CTC TAG ATT AAT TAT CGT ATT CCT CTG C 3'

۲-۲- استخراج RNA ویروسی و انجام واکنش نسخه‌برداری معکوس برای ژن M1

پس از تهیه رده سلولی MDCK (Madin Darby Canine Kidney) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، کشت و بهینه‌سازی شرایط کشت سلول‌ها انجام شد. سلول‌های اخذ شده در مرحله نخست به فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی منتقل و تا مرحله‌ای که حاوی رده سلولی MDCK به‌صورت تک لایه باشد در انکوباتور نگهداری شد. محیط کشت مورد استفاده محیط DMEM (غنی شده با سرم گاوی ۱۰ درصد) ساخت شرکت Gibco و فلاسک‌های مورد استفاده ساخت شرکت Greiner بود. ویروس Influenza A/PR8/34 (H1N1) تهیه و تیتر 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 سی‌سی انتقال داده شد؛ حجم نهایی محیط مورد استفاده ٦ میلی‌لیتر 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 به‌عنوان الگو استفاده شد. میزان آغازگر جلویی استفاده شده ۱۰۰ پیکومول در واکنش ۲۰ میکرولیتری (با غلظت نهایی ۵ میکرومولار) بود. به‌طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر RNA استخراج شده، یک میکرولیتر از آغازگر اختصاصی، ۱ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز در یک میکروتیوپ فاقد آنزیم‌های RNAse و DNase وارد شد و به‌مدت ۵ دقیقه و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و سپس به سرعت روی یخ قرار داده شد تا ساختارهای دوم باز گردند و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس بتواند ساخت cDNA را به نحو مؤثری انجام دهد. سپس ٤ میکرولیتر بافر ٥X، ۱ میکرولیتر مهار کننده ریبونوکلئاز معادل ۲۰ واحد و ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار به میکروتیوب دارای RNA و آغازگر افزوده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس ۲۰۰ واحد از آنزیم نسخه‌بردار معکوس به نام M-Mulv (ساخت شرکت Fermentas کانادا) وارد واکنش شد و به‌مدت ٦۰ دقیقه در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در پایان واکنش محصول به‌دست آمده به سرعت روی یخ قرار داده شد. سپس این محصول به‌عنوان 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 *Taq* خاصیت پروسسیویته (Proccessivity) بالایی به واکنش می‌دهد و آنزیم *Pfu* با توجه به خاصیت تصحیح اشتباه (Proofreading) درصد خطای *Taq* را کاهش می‌دهد. غلظت مواد مورد استفاده در واکنش PCR از جمله آغازگرها مطابق واکنش استاندارد PCR

تنظیم شد. حجم واکنش PCR ۵۰ میکرولیتر واجد بافر با غلظت 1X، ۰/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۲ میکرومولار آغازگر، ۲ واحد آنزیم *Taq* High Fidelity و ۱۰ میکرولیتر cDNA بود. برنامه چرخه دمایی مورد استفاده در PCR ژن M1 شامل ۲ دقیقه دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه PCR به‌صورت ٤۵ ثانیه ۹٤ درجه، ۳۰ ثانیه ٥٦ درجه برای اتصال آغازگرها، ۱ دقیقه دمای ٦۸ درجه برای بسط رشته و در انتهای چرخه‌ها، یک دمای ٦۸ 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.

۲-٤- PCR ژن NP

PCR ژن NP با استفاده از پلاسمید pCAG-NP که واجد ژن NP ویروس آنفلوانزا سویه PR8 بود، به‌عنوان الگو در واکنش PCR به انجام رسید. این پلاسمید به‌صورت دوستانه از دکتر کنجی اوهبا (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 *Taq* High Fidelity (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 1X، ۰/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۲ میکرومولار آغازگر، ۲ واحد آنزیم *Taq* High Fidelity و ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید pCAG-NP بود. برنامه چرخه دمایی مورد استفاده در PCR ژن NP شامل ۳ دقیقه دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه PCR به‌صورت ۱ دقیقه ۹٤ درجه، ۳۰ ثانیه ٥٦ درجه برای اتصال آغازگرها، ۲ دقیقه دمای ٦۸ درجه برای بسط رشته و در انتهای چرخه‌ها، یک دمای ٦۸ 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.

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

ناقل مورد استفاده در این مطالعه (ساخت شرکت Clonetech) 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 محدودالاثر 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 *Xba*I و *Bst*XI (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 *Bst*XI و *Xba*I انجام شد.

۲-٦- 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 *Nhe*I و *Eco*RI ساخت شرکت Roche در کنار پلاسمید

pIRES2-NP هضم آنزیمی شده و عمل الحاق با استفاده از کیت‌های 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 ژن‌های M1 و NP با تعیین توالی

تأیید نهایی درستی قطعات کلون شده با تعیین توالی پلاسمیدهای مورد نظر در شرکت SeqLab آلمان و به‌وسیله دستگاه ABI PRISM® Genetic Analyzer انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین توالی ناقل‌های واجد ژن‌های 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 دستگاه‌های تعیین توالی در چندین نوکلئوتید اولیه است که در صورت استفاده از آغازگرهای تکثیر ژن بر درستی توالی آن‌ها نمی‌توان اطمینان کرد.

جدول ۲ توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین توالی کلون‌های واجد ژن‌های 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'

۲-۸- تأیید نهایی سازه ژنی با هضم آنزیمی

تأیید درستی قطعات کلون شده با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم Fast Digest *Bam*HI (شرکت Fermentas) انجام شد. با توجه به این‌که یک جایگاه برش در داخل هر دو ژن M1 (در نوکلئوتید شماره ۲۲۷) و NP (در نوکلئوتید شماره ۵۱۰) برای آنزیم *Bam*HI وجود دارد، همچنین یک جایگاه برش در ناحیه MCS (در نوکلئوتید شماره ٦٥٩ 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 حدودا ۵۳۰ و ۱۱۰۰ جفت‌بازی از یک کلون می‌شود.

۲-۹- ترانسفکشن (Transfection) پلاسمید واجد ژن‌های 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 ٢٤ خانه‌ای منتقل شد. بعد از کشت شبانه ۳ ساعت قبل از ترانسفکشن با محیط تازه بدون آنتی‌بیوتیک تعویض محیط شدند؛ در این زمان تراکم سلول‌ها ٦٠ تا ٨٠ 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 ٤ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ سی‌دی (Lipofectamin 2000 CD) به مخلوط

قبلی اضافه نموده و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. تمام مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت اضافه شد. پلیت به‌مدت ٦ ساعت در انکوباتور کشت سلول قرار داده شد و سپس با محیط کامل واجد سرم تعویض محیط شد. بعد از گذشت حدود ٤٨ ساعت بیان ژن‌های M1 و NP توسط روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم ارزیابی شد.

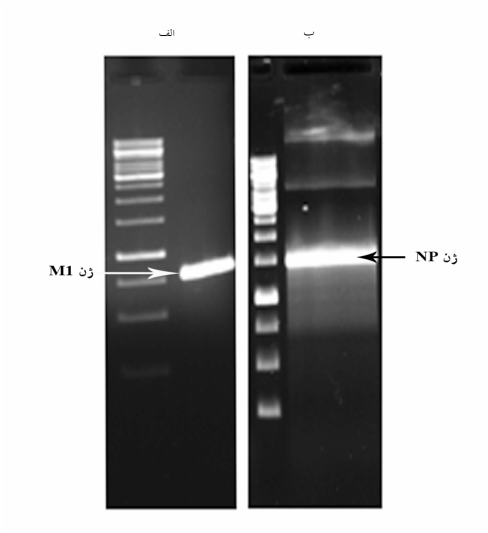
۲-۱۰- رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید

ابتدا محیط رویی خارج و سلول‌ها دو بار با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو شدند. فرم‌آلدهید ٤ درصد در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به روی هر کدام از خانه‌ها اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سلول‌ها با PBS شستشو شدند. تریتون X۱۰۰ (Triton X100) ۰/۲۵ درصد به‌منظور نفوذپذیر کردن سلول‌ها، در حجم ۱۰۰ میکرولیتر روی هر کدام از خانه‌ها اضافه و به‌مدت 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 به‌مدت 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 به‌مدت 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 عکس‌برداری انجام شد.

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 به‌ترتیب قطعات حدودا 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

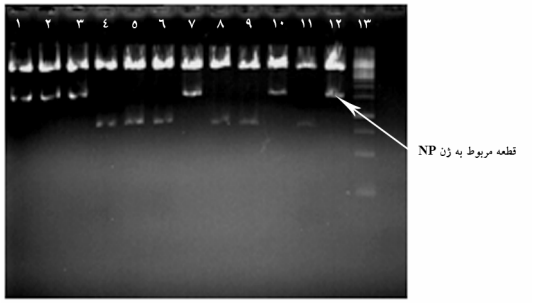
۳-۲- ساخت کلون pIRES2-NP

پس از الحاق ناقل pIRES2 و ژن NP و ترانسفورم محصول الحاق به باکتری‌های مستعد، بررسی کلون‌های رشد یافته به‌منظور انتخاب کلون مورد نظر انجام شد. همان گونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، پلاسمیدهای به‌دست آمده پس از عمل الحاق واجد ژن NP است که با هضم آنزیمی دوگانه به‌وسیله آنزیم‌های *Bst*XI و *Xba*I از داخل آن خارج شد. همان‌گونه 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)

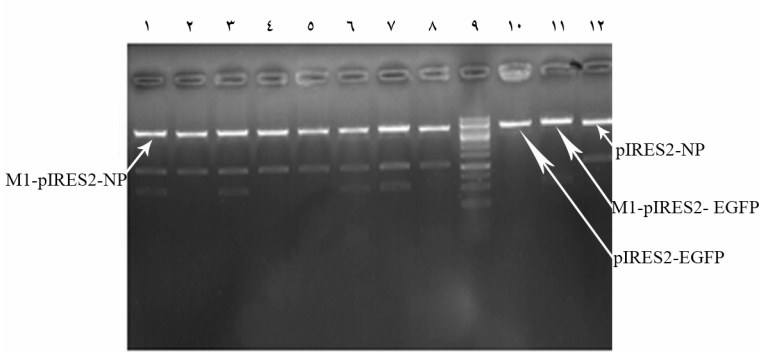
بارگذاری شده است. لیکن کلون‌های دیگر در اثر هضم، قطعه ۷۳۰ جفت‌بازی مربوط به EGFP را تولید کرده‌اند.

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

قطعه M1 خارج شده از پلاسمید M1-pIRES2-EGFP به‌وسیله هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *Eco*RI و *Nhe*I خالص‌سازی و در کنار پلاسمید pIRES2-NP هضم شده با همان آنزیم‌ها وارد واکنش الحاق و منجر به ساخت پلاسمید دو 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 این‌که یک جایگاه برش در داخل هر دو ژن M1 و NP و یک جایگاه برش در ناحیه MCS برای آنزیم *Bam*HI 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 ٤ ملاحظه می‌شود.



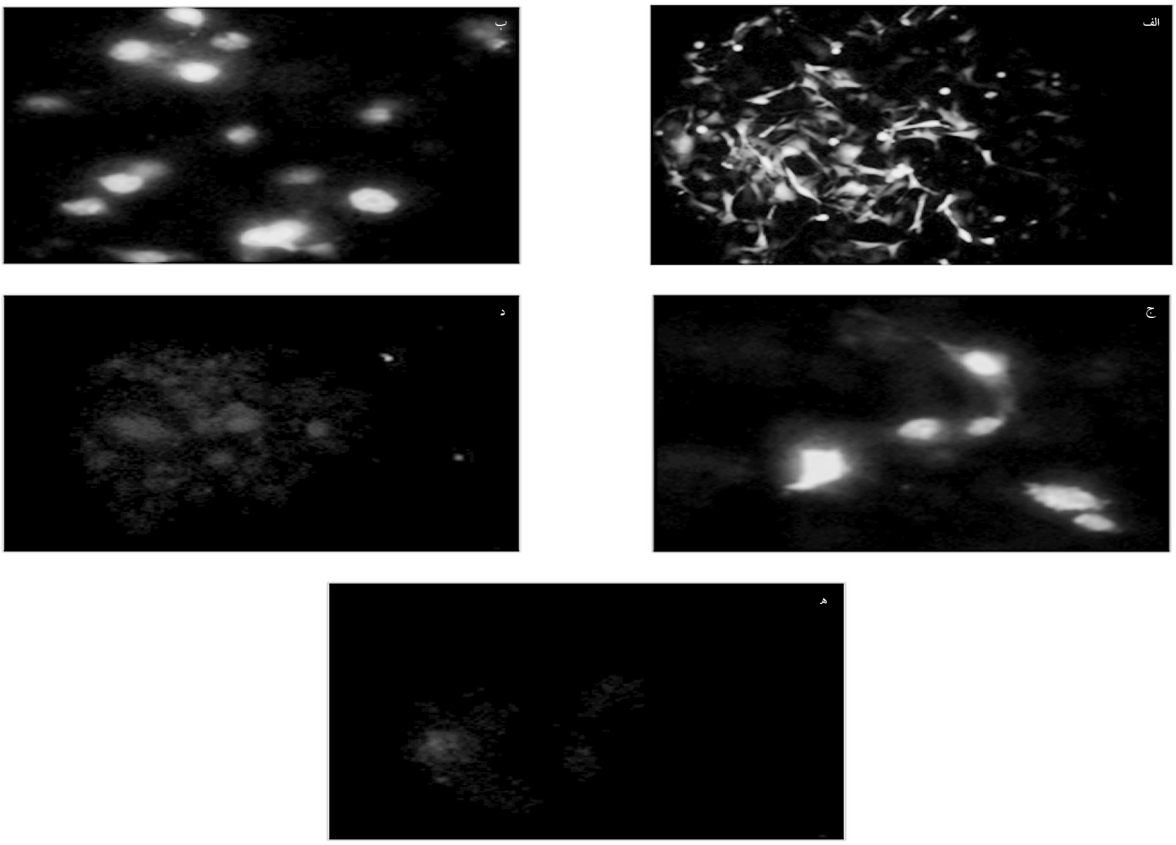
شکل ۳ نتایج حاصل از کلونینگ ژن NP و تأیید با هضم آنزیمی دوگانه (ستون‌های ۱، ۲، ۳، ۷، ۱۰ و ۱۲ مربوط به کلون‌هایی است که قطعه ۱۵۰۰ جفت‌بازی مربوط به ژن NP از آن‌ها خارج شده است. ستون‌های ٤، ٥، ٦، ۸، ۹ و ۱۱ مربوط به کلون‌هایی است که ژن ۷۳۰ جفت‌بازی EGFP از آن‌ها خارج شده است. ستون ۱۳ مربوط به نشانگر DNA است.)



شکل ٤ 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، ٦ و ۷ مربوط به کلون‌های M1-pIRES2-NP است که در اثر هضم آنزیمی با *Bam*HI دو قطعه ۵۰۰ و ۱۱۰۰ جفت‌بازی تولید کرده‌اند. ستون‌های ۲، ٤، ٥ و ۸ 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 pIRES2-NP است.)

۳-٤- 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 آنفلوانزا 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 X۱۰۰ نفوذپذیر شدند. در مرحله بعد این سلول‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد M1 و ضد NP در چاهک‌های جداگانه مجاور و به دنبال آن با آنتی‌بادی ثانویه حاوی کونژوگه 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 ×٤۰۰)، **ج)** سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید M1-pIRES2-NP که با آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن NP مجاور شده‌اند (بزرگنمایی ×٤۰۰)، **د)** سلول‌های بدون ترانسفکت که با آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن M1 مجاور شده‌اند (بزرگنمایی ×٤۰۰)، **ه)** سلول‌های بدون ترانسفکت که با آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن NP مجاور شده‌اند. (بزرگنمایی ×٤۰۰)

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

pIRES2-EGFP کـه بیـان کننـده پـروتئین EGFP بـود نیـز به‌منظور بررسی کارایی ترانسفکشن استفاده شد. همان‌گونه کـه در شکل ۵ مشاهده می‌شود وجـود رنـگ سـبز در سـلول‌هـای ترانسفکت شده با پلاسـمید بیـان کننـده EGFP نـشان دهنـده کارایی مناسب فرایند ترانسفکشن است. پـس از مـشاهده بیـان پروتئین EGFP، سایر نمونه‌هـا کـه بـا M1-pIRES2-NP در شرایط یکسان ترانسفکت شده بودند، از نظر بیان پروتئین‌هـای M1 و NP ارزیابی شدند. قسمت الف در شکل ۵ بیان EGFP و قسمت ب و ج به‌ترتیب بیان پروتئین‌هـای M1 و NP را در رده سلولی BHK-21 نشان می‌دهد.

٤- بحث

به دلیل همه‌گیری‌های هر ساله ویروس آنفلوانزا در جهـان و خطر بروز یک جهان‌گیری توسط این ویـروس، دسـتیابی بـه یک واکسن کارا از دیر باز مورد توجه محققان بوده است [۱۳]. استفاده از واکسن غیرفعال آنفلـوانزا بـا وجـود مزیـت‌هـایی نظیـر بـی‌خطـر بـودن مـصرف آن، بـه دلیـل ایجـاد پاسـخ ضـعیف در جمعیت‌های در معرض خطر مانند نوزادان و سالمندان و نیز نیاز به تغییرات هر ساله در آن، محققان را بر آن داشته است که بـه دنبـال واکسن کارآمدتری که نیاز به تغییر نداشـته باشـد و بتوانـد ایمنـی متقاطع قابل قبولی را ایجاد کند، باشند. برای مثال در سال ۱۹۹٦ در ایالات متحـده تحقیقـات نـشان داد هنگـامی کـه سـویه واکـسن ۷۷ درصد سویه در گردش همان سـال را تـشکیل مـی‌داد درصـد حفاظت از مرگ واکسن در سالمندان مبتلا شده به پنومـونی حـاد (Acute Pneumonia) حاصـل از آنفلـوانزا ٦۱ درصـد بـود در حالی‌که در سال بعد این میزان بـه دلیـل ایـن‌کـه تنهـا ۲۳ درصـد شباهت بین سویه واکسن و در گردش وجود داشت به ۳۵ درصـد تنزل یافت [١٤]. این مثال به تنهایی می‌تواند اهمیـت دسـتیابی بـه یک واکسن دایمی بر ضد آنفلوانزا را آشکار کند. علاوه بر این؛ بـا گسترش عفونت H5N1 که همراه با نگرانـی‌هـای گـسترده‌ای در زمینه بروز یک جهان‌گیری است و عدم موفقیـت در دسـتیابی بـه یک واکسن کارا بر ضد آن اهمیت نواحی حفاظت شـده ویـروس آنفلوانزا که می‌تواند بر علیه همه سـویه‌هـای یـک نـوع مـشخص ایمنی ایجاد کند بیش از پیش آشکار شد [۱۵].

تاکنون مطالعات گـسترده‌ای روی اسـتفاده از واکـسن‌هـای ژنی به‌عنوان یک استراتژی جایگزین واکسن بـر ضـد عفونـت آنفلوانزا صورت گرفته است و اکثریت آن‌ها بـر قابلیـت بـالای این راه‌کار به‌عنوان یک واکسن دایمی علیه این ویـروس اتفـاق نظر دارند. در سال ۲۰۰۹ دانشمندان چینـی طـی یـک مطالعـه، کارایی ژن‌های مختلف ویروس H5N1 در قالـب یـک DNA واکسن در ایجاد ایمنی را بررسی کردند. نتـایج حاصـل از ایـن مطالعه نشان داد که واکسیناسیون همزمان با ژن‌های M1 و NP باعث محافظت ۹۵ درصد موش‌ها در مقابل چالش با ویـروس همولوگوس (H5N1) و ۸۰ درصد موش‌هـا در مقابـل چـالش با ویروس هترولوگوس H1N1 (PR8) می‌شـود. در شـرایطی که واکسیناسیون موش‌هـا تنهـا بـاژن NP باعـث بقـای ٦۰-۸۰ درصـد و واکـسیناسیون بـا M1 باعـث محافظـت ۲۵ درصـد موش‌ها می‌شود که نـشان دهنـده هـم‌افزایـی دو ژن در ایجـاد ایمنی مؤثرتر است [١٦]. با توجه به مطالب ذکر شده هـدف از این مطالعه ساخت یک ناقل دو سیسترونی بـر مبنـای ژن‌هـای محاظت شده ویروس آنفلوانزا بود تـا هـم بیـان دو ژن از یـک سازه با آثار هم‌افزایی ایمنی مؤثرتری را ایجاد کند و هم ایمنـی علیه زیرگونه‌های مختلف ویروس را تـضمین نمایـد. پـروتئین ماتریکس محافظت شده‌ترین پروتئین ویروس آنفلوانزا است و همچنین کوچک‌ترین (۲۵۲ آمینواسید) و فراوان‌تـرین پـروتئین ساختمانی ویروس است [۱۷]. پروتئین NP نیز جزء محافظـت شده‌ترین پروتئین‌های ویروس آنفلوانزا است که مطالعات قبلی بر نقش مؤثر این ژن‌ها در ایجاد مقاومت علیه عفونت ویـروس آنفلوانزا حکایت دارند [۱۸]. ناقل مورد استفاده در این مطالعـه ساخت شرکت Clonetech با نـام تجـاری pIRES2-EGFP بود که با توجه به ادعای شرکت سازنده ناقل مـورد اسـتفاده در این مطالعه مبنی بر بیان مساوی از دو ژن کلون شده در جایگاه MCS و جایگاه پس از IRES موقعیت‌های انتخاب شده برای کلونینگ این دو ژن به‌ترتیب موقعیـت MCS بـرای ژن M1 و

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 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 پلاسمید 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 یوکایوتی 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 M1 و NP به‌عنوان یک آزمون حساس مدنظر قرار گرفت. 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 به‌نظر 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.

٦- 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)