Original Article

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

Samaneh Hossainzadeh[1], Fatemeh Fotouhi[2*], Behrokh Farahmand[3], Mavyam Saleh[4], Atena Yousefi[1], Behnaz Heydarchi[5], Masoumeh Tavasoti Kheiri[2]

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

مقاله اصیل

ساخت بکمیدهای نوترکیب واجد ژن هماگلوتینین ویروس آنفلوانزای انسانی

سمانه حسین‌زاده[1]، فاطمه فتوحی[2*]، بهرخ فرهمند[3]، مریم صالح[4]، آتنا یوسفی[1]، بهناز حیدرچی[5]، معصومه توسطی‌خیری[2]

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

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۰۴ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۲/۲۱

چکیده

هدف: ویروس آنفلوانزای A (H1N1) از مهم‌ترین زیرگونه‌های ویروس آنفولانزاست که منجر به پیامدهای متعددی در جهان شده است. هماگلوتینین یکی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های این ویروس می‌باشد که باعث ایجاد پاسخ ایمنی می‌شود. اتصال این پروتئین به گیرنده‌های سلول میزبان منجر به شروع فرایند بیماری‌زایی می‌شود.
با توجه به نقش حیاتی مرحله اتصال ویروسی، این پژوهش درصدد استخراج و جای‌سازی ژن هماگلوتینین و زیرواحد بزرگ آن (HA1) با هدف تولید شاتل ناقل نوترکیب باکیولوویروس (بکمید) برای تولید پروتئین نوترکیب در سلول‌های حشره است.

مواد و روش‌ها: 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 هماگلوتینین و ژن HA1 توسط روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی تکثیر و ابتدا در ناقل pGEM-TEasy و سپس در پلاسمید pFastBac HT جای‌سازی شد. در نهایت بکمید نوترکیب واجد ژن‌های فوق در سلول‌های میزبان DH10Bac تولید شد.

نتایج: محصولات PCR ژن هماگلوتینین با الکتروفورز روی ژل آگارز و هضم با آنزیم‌های محدودالاثر ارزیابی شد. ناقل نوترکیب pGEM-Teasy و پلاسمید دهنده نوترکیب pFastBac HT توسط روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین ترادف تأیید شد. تولید DNA نوترکیب بکمیدی نیز توسط افتراق کلونی‌های آبی–سفید، الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۷ درصد، PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای pUC/M13 مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش، بکمید نوترکیب واجد ژن هماگلوتینین و زیرواحد بزرگ آن با موفقیت ساخته شد. در ادامه سلول‌های حشرات به‌منظور تولید باکیولوویروس نوترکیب با سازه‌های فوق ترانسفکت شده و پروتئین‌های نوترکیب برای مطالعات آتی تولید خواهد شد.

کلیدواژگان: DNA نوترکیب، باکیولوویروس، هماگلوتینین، واکسن زیرواحدی

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

مقدمه

آنفولانزا از بیماری‌های شایع دستگاه تنفسی است که سابقه ظهور آن به سال ۱٦٥٠ 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 [٤].

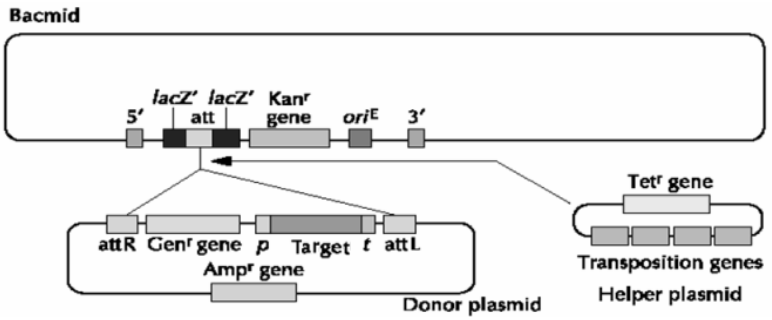
از گذشته تاکنون به‌منظور آمادگی برای مواجهه با همه‌گیری‌ها و بالا بردن قدرت ایمنی افراد، واکسن‌های اختصاصی گوناگونی با روش‌های اثربخشی مختلف علیه ویروس‌های آنفلوانزای شایع تولید شده است که کارایی آن‌ها، براساس تطابق بالای بین سویه درحال چرخش در جمعیت و سویه تخلیص شده موجود در واکسن تعیین می‌شود [٥]. واکسن‌های رایج برای ویروس آنفلوآنزا 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 همه‌گیری های جهانی قابل استفاده نیست [٦]. 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 آنفولانزای 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 هماگلوتینین (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 پروپپتیدی 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 هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) شده و در نهایت منجر به از بین رفتن توانایی ویروس در ایجاد عفونت می‌شود [۱۰]. علاوه بر آن؛ با توجه به این‌که 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 هماگلوتینین 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

حجم بالای پروتئین را در مدت زمان اندک داشته باشد. در این مطالعه برای دستیابی به این هدف از سیستم بیانی باکیولوویروس (Baculovirus Expression System) (شکل ۱) استفاده شد [۱۱].



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

اساس روش تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم بیانی باکیولوویروس، جای‌سازی ژن هدف تحت کنترل پروموتر پلی‌هیدرین (Polyhydrin Promoter) است. این پروتئین به میزان زیاد در مراحل پایانی تکثیر ویروس در میزبان طبیعی خودش بیان می‌شود و با ایجاد یک پوشش پروتئینی ویروس‌ها را در برابر شرایط نامساعد محیطی محافظت می‌نماید. وجود این پروتئین برای تکثیر و همانندسازی ویروس در کشت سلول ضرورت ندارد [۱۳، ۱٤].

در پژوهش حاضر طول کامل ژنوم HA و زیرواحد بزرگ آن با استفاده از آغازگرهای (Primers) اختصاصی جداسازی شد و به‌منظور تولید پروتئین نوترکیب در سلول‌های حشره، در شاتل ناقل بکمید جای‌سازی شد تا در مراحل بعدی پس از ساخت باکیولوویروس نوترکیب، پروتئین‌های هدف در سلول‌های حشرات تولید شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه به روش تجربی (Experimental) انجام شد.

کشت ویروس

ویروس آنفلوانزای انسانی سویهٔ فصلی A/New Caledonia/20/99(H1N1) در کشت تک لایه سلول‌های 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 پنی‌سیلین G (Penicillin G) و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین (Streptomycin) به ازای هر میلی‌لیتر 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، به‌عنوان 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 پلیمراز 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 فسفات‌ها، بافر مخصوص واکنش آنزیمی و محافظت کننده RNA استفاده شد. لازم به ذکر است در کلیه مراحل از میکروتیوب‌ها و سر سمپلرهای عاری از DNase و RNase استفاده شد.

تکثیر ژن HA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

برای تکثیر اختصاصی قطعه cDNA حاوی ژنوم کامل گلیکوپروتئین HA، از آغازگرهای اختصاصی ژن هدف و آنزیم High fidelity DNA Polymerase (Fermentas, EU) 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 محدودالاثر *Xho* I و *Hind* III به‌ترتیب در آغازگرهای رفت و برگشت در نظر گرفته شد که به‌صورت ایتالیک نشان داده شده است.

F: 5'GC*CTCGAG*ATGAAAGCAAAACTAC3'

R: 5'GG*AAGCTTT*CAGATGCATATTCTACA3'

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 به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ٤ 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 میلی‌لیتر تتراسایکلین (Tetracycline)، ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، ٤۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر القا کننده ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside: IPTG) و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۵-برومو ٤-کلرو ۳-ایندولیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside: X gal) کشت داده شد و به‌وسیله پیپت پاستور در سرتاسر پلیت پخش شد.

به علت ورود ژن هدف به ناحیه کد کننده اپران lacz در ناقل نوترکیب 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 نوترکیب 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 پلیمراز، ژن زیر واحد بزرگ HA نیز تکثیر شد تا در مرحله بعدی همراه با ژنوم HA به‌صورت جداگانه و به‌طور 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'GG*AAGCTT*TTACTTTGGACACTC3'

جاسازی ژن‌های هدف در پلاسمید pFastBac

قدم بعدی جاسازی ژن‌های هدف در پلاسمید دهنده pFastBac HTb، در پایین‌دست دنبالهٔ هیستیدینی بود. بدین‌منظور ناقل نوترکیب T- Easy حاوی ژنوم کامل HA و پلاسمید دهنده pFastBac HTb و ژن زیر واحد بزرگ HA در نمونه حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، به کمک آنزیم‌های محدودالاثر *Xho*I 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

نمونه‌ها به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ٤ 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.

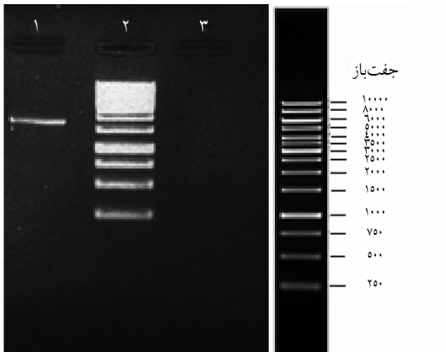
تولید pFastBac HTb های نوترکیب حاوی ژن‌های هدف با روش PCR و هضم آنزیمی تأیید شد و در نهایت برای تعیین توالی ارسال شد تا از جهت‌گیری صحیح ژن در پلاسمید اطمینان حاصل شود. لازم به ذکر است که به دلیل وجود دنبالهٔ هیستیدینی، تعیین ترادف در این مرحله بسیار ضروری است.

ساخت بکمید (Bacmid) نوترکیب

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 به‌ترتیب 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 نوترکیب به باکتری ترانسفورم می‌شود. برای شروع بیان ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، ٤ 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 به‌مدت ٤۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده می‌شوند. لازم به ذکر است که ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، تتراسایکلین و جنتامایسین به‌ترتیب در بکمید، پلاسمید کمکی و pFastBac وجود دارد. در ادامه از کلونی‌های سفید که احتمالاً حاوی بکمید نوترکیب 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 درنظر 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 به‌کار گرفته شد. برای این کار از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های هدف و آغازگرهای M13 که ناحیه مکمل آن در دو سوی محل ترانسپوزون (Transposon) در ناحیهٔ Laczα در بکمید تعبیه شده، استفاده شد. در نهایت برای اطمینان از سالم بودن و عدم شکست بکمیدهای نوترکیب، نتیجه استخراج روی ژل آگارز ۰/۷ درصد با ولتاژ ۲۵ و به‌مدت ۱۸ ساعت الکتروفورز شد.



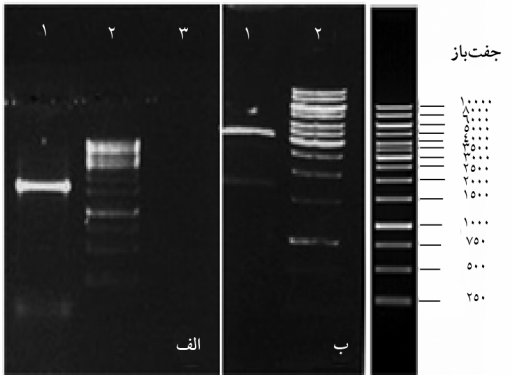
شکل ۱ نتیجه حاصل از تکثیر ژنوم کامل HA به روش RT-PCR؛ باند ۱۷۰۰ جفت‌بازی محصول تکثیر cDNA به کمک آغازگرهای اختصاصی (ردیف۱)، نشانگر وزن مولکولی DNA ۱ کیلوبازی (ردیف ۲)، کنترل منفی PCR (ردیف۳)

نتایج

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

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 پلیمراز 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 *Xho*I و *Hind*III (ب)، نشانگر صحت تولید ناقل T-Easy نوترکیب است.

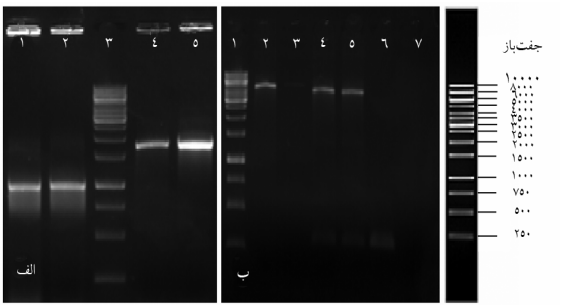


شکل ۲ نتایج حاصل از PCR با آغازگر اختصاصی (الف) محصول PCR (ردیف ۱)، نشانگر وزن مولکولی DNA ۱ کیلوبازی (ردیف ۲)، کنترل منفی PCR (ردیف ۳)؛ و هضم آنزیمی ناقل نوترکیب (ب) ناقل نوترکیب پس از هضم آنزیمی (ردیف ۱)، نشانگر وزن مولکولی DNA ۱ کیلوبازی (ردیف ۲)

پس از تأیید اولیه، نمونه‌های نوترکیب برای تعیین ترادف 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.

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 ترادف، 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؛ باند۱۰۰۰ جفت‌بازی ژنHA1 (ردیف ۱ و ۲)، Ladder ۱ کیلوبازی (ردیف ۳)، باند ۱۷۰۰ جفت‌بازی ژنوم کامل HA (ردیف ٤ و ٥)، ب) PCR با آغازگرهای M13، Ladder ۱ کیلوبازی (ردیف ۱)، باند ٤۱۳۰ جفت‌بازی واجد ژنوم کامل HA (ردیف ۲)، باند ۳٤۳۰ جفت‌بازی واجد ژن HA1 (ردیف ٤ و ٥)، بکمید غیرنوترکیب (ردیف ٦)، کنترل منفی PCR (ردیف ۷)

بحث

تا به امروز مؤثرترین راه برای مقابله با بیماری آنفولانزا، 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

گرفته‌اند که می‌بایست حداقل بـه همـان انـدازه واکـسن تخـم مرغی قابل اعتماد، بی‌خطر و از نظر اقتصادی مقرون بـه صـرفه بوده و در زمان کوتاه بتوان مقادیر مـورد نیـاز از آن‌هـا را تهیـه نمود [۱۵]. یکی از مهم‌ترین آن‌هـا واکـسن‌هـای زیـرواحـدی نوترکیب است که پروتئین‌های ویروسی را رمزدهی می‌کننـد و با استفاده از تکنولوژی نـوترکیبی DNA تهیـه مـی‌شـوند [۱٦، ۱۷]. از جمله مزایای این واکسن‌ها نسبت به واکسن‌هـای تخـم مرغی، دارا بودن پروتئین آنتی‌ژنیکی اسـت کـه در بـافر نمکـی تهیه می‌شود و نیازی به مواد محافظـت کننـده، آنتـی‌بیوتیـک و ادجوانت (Adjuvant) ندارد. به علت عدم استفاده از ویـروس زنده در مسیر تهیه این واکسن‌ها، نیازی بـه تـسهیلات زیـستی خاص یا مواد شیمیایی نظیر فرمالدئید نبوده و شـاید بـه همـین علت است که این واکسن‌ها در کارآزمایی‌های بـالینی عـوارض جانبی کمتری را سبب می‌شوند. همچنین در مواجهـه بـا خطـر پاندمی سویه‌های خطرناک نظیر H5، مـی‌تـوان بـا تولیـد HA نوترکیب، تـا زمـان سـاخته شـدن واکـسن اختـصاصی سـویه، عوارض بالینی را کاهش داد [۱۸].

گلیکوپروتئین HA، مهم‌تـرین پـروتئین سـطحی ویـروس است که به‌صورت زوایدی روی پوشـش دیـده مـی‌شـود و بـا توجه به این که بیشترین میزان آنتی‌بادی‌های خنثی کننـده علیـه آن ساخته می‌شود، هدف مناسبی برای تحقیقات واکسن به‌شمار می‌رود. تا به امروز HA انـواع مختلـف ویـروس آنفـولانزا در سیـستم‌هـای متعـدد پروکـاریوتی و یوکـاریوتی بـه‌صـورت واکسن‌های زیر واحدی تولید و ایمنی‌زایی آن‌ها بررسـی شـده است [۱۸، ۱۹].

گلیکوپروتئین فوق ابتدا به‌صورت یک پیش‌ساز پروپپتیـدی تولید شده و پس از تکامل مولکول، زیر واحد بزرگ‌تر یا HA1 با پیوند غیرکووالانسی به بخش HA2 متـصل مـی‌شـود. زیـر واحد بزرگ یا همان سر کروی، واجد اکثر مکان‌های آنتی‌ژنیک و جایگاه اتصال به گیرنده سلولی اسـت. از طـرف دیگـر زیـر واحد HA2 که بخش اصلی ساقه مولکول را تشکیل مـی‌دهـد، ضمن دارا بودن خاصیت آنتی‌ژنیک، واجد توالی عرض غشایی (Transmembrane) است که نقش مهمی در تثبیت مولکول در ساختار لیپیدی دو لایه دارد. از این خاصیت می‌تـوان در طراحـی واکسن‌هـای لیپـوزومی و وایروزومـی (Virosomal Vaccine) استفاده نمود. همچنین ایـن بخـش از مولکـول نـسبت بـه سـر کروی واجد ترادف‌های حفاظت شده است به‌طوری که معلـوم شده ناحیه ساقه HA حاوی سه زنجیره الیگو ساکاریدی اسـت که جایگاه گلیکوزیلاسیون در این سه مکان در تمامی گونه‌های HA از H1 تا H16 ویروس آنفلـوآنزای نـوع A ثابـت اسـت. وجود این ساختارهای یکسان احتمالاً در ایجاد پاسخ‌های ایمنی متقاطع در بین سویه‌های مختلف این ویروس مؤثر است.

مطالعات نشان داده است که به‌طـور متوسـط ٦ جایگـاه بـا پتانسیل گلیکوزیلاسیون از نوع N در HA1 و یـک جایگـاه در HA2 وجود دارد که نقش مهمی در ایجاد تـاخوردگی صـحیح مولکول و پیدایش اپی‌توپ‌هـای فـضایی مناسـب بـرای بـروز خاصیت آنتی‌ژنیکی در این پـروتئین را بـه عهـده دارنـد [۲۰]. بنابراین تولید این گلیکـوپروتئین در سـلول‌هـای حـشرات کـه علاوه بر کارایی و بازدهی خوب، تغییرات پس از ترجمـه‌ای از جمله اضافه کردن شاخه‌های قندی به پروتئین در حال سـاخت را با بیشترین شباهت بـه سـلول‌هـای پـستانداران امکـان‌پـذیر می‌سازد، هدف نهایی این پروژه است.

در این پژوهش با توجه بـه عـدم وجـود روش بـومی شـده تولید واکسن در کـشور و نیـز بـا در نظرگـرفتن اپـی‌تـوپ‌هـای خنثی‌سازی متقابل میان ویروس‌های آنفلوانزای فصلی با ویـروس آنفلوانزای مولد آخرین همـه‌گیـری یعنـی novel A/H1N1، از ویروس آنفلوانزای A/New Caledonia/20/99(H1N1) برای بررسی فن‌آوری بهینه تولید واکسن استفاده شد. بنـابراین طـول کامل مولکول HA و همچنین زیر واحـد بـزرگ آن در بکمیـد جاسازی شد تا در مرحلهٔ بعدی پروتئین‌های نوترکیـب مربـوط در سلول‌های حـشرات تولیـد و ایمنـی‌زایـی و کـارآیی آن‌هـا بررسی شود.

اولین قدم در ساخت این گونه واکسن‌هـا، اسـتخراج ژنـوم کامل ویروس و جداسازی قطعه ژن هدف توسـط آغازگرهـای

اختصاصی است. با در نظرگرفتن این نکته که آنفلوانزای 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 پلیمراز، 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 پلیمراز استفاده شد. این آنزیم دارای قابلیت‌هایی است که آن را از سایر پلیمرازهای موجود متمایز می‌نماید که از آن جمله می‌توان به بالاترین میزان صحت واکنش پلیمرازی در مقایسه با سایر پلیمرازهای مقاوم به حرارت و درنتیجه دارا بودن کمترین میزان واکنش‌های ناموفق، توانایی پردازش بالا و کاهش دادن زمان واکنش، دارا بودن بالاترین بازده در مقایسه با سایر پلیمرازها به دلیل بیشترین میزان محصول تولید شده با حداقل میزان آنزیم مورد استفاده و دارا بودن عنوان دقیق ترین پلیمراز مقاوم به حرارت اشاره نمود. همچنین این آنزیم باعث اضافه شدن نوکلئوتید واجد باز آلی آدنین به انتهای فرآورده تکثیر شده می‌شود، بنابراین برای جاسازی 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 پروموتر 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 نوترکیب بوده و جهت به دست آوردن تیتر بالای ویروس بدون در نظرگرفتن پیچیدگی‌ها و مشکلات فراوان، مدت زمانی معادل ۳ تا ٦ 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 نوترکیب تحقق یافت و پروتئین‌های متعددی با استفاده از این روش در سلول‌های حشرات تولید گردیده است [۲۳، ۲٤].

تولید پروتئین نوترکیب در سلول‌های حشرات واجد چند ویژگی مهم است که آن را از سایر میزبان‌های یوکاریوتی متمایز می‌سازد. در این سیستم، باکیولوویروس‌های نوترکیب در سلول‌های حشرات تکثیر یافته و پپتیدهای تولید شده پس از تغییرات پس ترجمه‌ای مشابه با سلول‌های پستانداران، در محل‌های هدف سلولی جای‌گیری می‌کند. در نتیجه پروتئین‌های نوترکیب، 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 نوترکیب می‌دانند [۲۵]. همچنین این ویروس‌ها گسترهٔ 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].

بدین‌ترتیب، 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

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 آنفولانزا بررسی و مقایسه خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی و مساعدت معاونت پژوهشی و براساس طرح مصوب انستیتو پاستور ایران با شماره ٤١١ انجام شده است. نویسندگان از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی آنفولانزا کمال تشکر را دارند.

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 JI. 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):

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.