

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

Mojtaba Taheri<sup>1</sup>, Mohammad Shenagari<sup>2\*</sup>, Iraj Nikokar<sup>1</sup>, Mahmoud Khosravi<sup>1</sup>, Mehran Nemattalab<sup>2</sup>

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

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

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

### Abstract

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

**Methods:** Initially, we extracted genomic RNA from the influenza virus PR8. After cDNA synthesis, the target gene encoding NP was amplified by PCR after which the NP gene was cloned in the pJET1.2/blunt TA vector. The accuracy of cloned gene was confirmed by PCR, enzymatic digestion and sequencing. The pJET1.2-NP plasmid and pIRES-Igk/mIL18/Fc plasmids were simultaneously digested by *BstXI/NotI* enzymes. We inserted the digested NP fragment into the pIRES-Igk/mIL18/Fc plasmid using T4 ligase. Transformation into DH5 $\alpha$  and colony selection was done. Gene cloning was confirmed by PCR, enzymatic double-digestion and sequencing. Eventually, by transfection of the constructed mIL-18-pIRES2-NP plasmid into BHK-21 and RAW264.7 cell lines, we assessed the expressions of *NP* and *IL-18* by indirect immunofluorescence and ELISA, respectively.

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

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

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

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

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

مجتبی طاهری<sup>۱</sup>، محمد شناگری<sup>۲\*</sup>، ایرج نیکوکار<sup>۳</sup>، محمود خسروی<sup>۴</sup>، مهران نعمت طلب<sup>۵</sup>

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

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

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۹/۰۷

دریافت مقاله: ۹۵/۰۷/۲۷

### چکیده

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

**مواد و روش‌ها:** در مرحله اول RNA ژنومی ویروس آنفلوانزا تیپ A سویه PR8 H1N1/ استخراج شد و پس از تولید cDNA، توالی ژن کد کننده NP با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن و با روش PCR تکثیر شد. در مرحله بعد ژن NP در ناقل همسانه‌سازی pJET1.2/blunt همسانه‌سازی شد. پس از تأیید درستی همسانه‌سازی ژن در ناقل pJET1.2/blunt از طریق تعیین توالی، هضم مزبور توسط هضم آنزیمی دو گانه خارج شد. پلاسمید pIRES-Igk/mIL18/Fc با استفاده از آنزیم‌های BstXI/NotI هضم دو گانه شد و قطعه مربوط به eGFP خارج شد. سپس فرآیند Igk/mIL18/Fc در ناقل دو سیسترونی pIRES-Igk/mIL18/Fc هضم شده با استفاده از آنزیم T4 لیگاز صورت پذیرفت. الحاق ژن NP در ناقل دو سیسترونی pIRES-Igk/mIL18/Fc ترانسفورم شد و انتخاب کلونی‌های مثبت با استفاده از کلونی PCR صورت پذیرفت. به منظور بررسی درستی همسانه‌سازی از آزمون PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد. در نهایت بیان ژن NP و اینترلوکین ۱۸ از سازه ژنی mIL-18-pIRES2-NP در رده سلولی BHK-21 و RAW264.7 ترانسفکت شده با پلاسمید به وسیله رنگ آمیزی ایمنوفلوروستنتر غیر مستقیم و الیزا ارزیابی شد.

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

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

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

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

## مقدمه

استراتژی جایگزین برای واکسن آنفلوانزا که می‌تواند اکثر معایب فوق را برطرف سازد پلاسمید بیان کننده آنتی ژن‌های محافظت شده ویروس آنفلوانزا است. واکسن‌های ژنی دارای مزایای بسیاری نظیر تحریک هر دو بازوی سیستم ایمنی و پایداری در شرایط دمایی بوده و تولید راحت و ارزان آن‌ها در مقیاس وسیع امکان‌پذیر است [۶، ۷]. شاید بتوان مهمن‌ترین ایجاد این نوع واکسن‌ها را کارآیی پایین آن‌ها در ایجاد پاسخ ایمنی در انسان‌ها و پریمات‌های غیر انسانی دانست [۸] با وجود آن که پاسخ‌های آنتی‌بادی، به شدت اختصاصی و مستعد به گریز ویروس به وسیله تغییرات آنتی ژنی کوچک و بزرگ هستند، پاسخ‌های ایمنی سلولی واجد خصیصه واکنش متقاطع (cross-reactive) هستند. بی‌قاعدگی گیرنده سلول‌های TCD4 و TCD8 می‌تواند به آن‌ها اجزا شناسایی اپی‌توب‌ها را حتی پس از جهش نقطه‌ای بدهد [۹] از سوی دیگر؛ حضور قبلی سلول‌های TCD4 با واکنش متقاطع می‌تواند در تولید سریع آنتی‌بادی‌های خشنی کننده اختصاصی تایپ نیز مؤثر باشد [۱۰]. برخلاف پروتئین‌های سطحی، پروتئین‌های داخلی ساختاری و غیر ساختاری ویروس آنفلوانزا به خوبی حفاظت شده هستند. این پروتئین‌ها سبب تحریک و القای شکل‌گیری سلول‌های Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) می‌شوند که قادر به تخریب سلول‌های آلدوده به ویروس هستند [۱۱]. نوکلئوپروتئین یک زنجیره پلی‌پیتیدی است که توسط قطعه شماره ۵ ژنوم ویروس آنفلوانزا کد می‌شود. هم‌رديفی توالی ژن‌های نوکلئوپروتئین سه گونه و همچنین تحلیل فیلوجنیک سویه‌های ویروس جدای شده از میزان‌های مختلف آشکار می‌سازد که ژن نوکلئوپروتئین نسبتاً در طول فرآیند تکامل حفاظت شده است و حداقل تفاوت آمینواسیدی آن‌ها ۱۱ درصد است [۱۲].

ایترلوکین ۱۸ (Interleukin 18: IL-18) یک سایتوکاین پیش التهابی و یک عامل القا کننده ایترفرون گاما محسوب می‌شود که تولید ایترفرون گاما را در سلول‌های کشنده طبیعی و لنفوцит‌های T سیتوکاین القا می‌کند و همچنین خاصیت

ویروس آنفلوانزا (Influenza virus) به خاطر تغییرات ژنتیکی و آنتی ژنیک، به عنوان عامل بالقوه خط‌طرنگ برای ایجاد اپیدمی (Epidemic) و پاندمی (Pandemic) شناخته می‌شود. ویروس آنفلوانزا سالیانه به طور تقریبی ۲۰ درصد از جمعیت جهان را درگیر می‌کند و بیش از ۵۰۰ هزار نفر به علت عوارض ناشی از این عفونت جان خود را از دست می‌دهند [۱]. علاوه بر این اپیدمی‌ها؛ همه گیری‌های جهانی آنفلوانزا می‌تواند در صورت ایجاد یک ویروس آنفلوانزای واجد زیرگونه‌های جدید هماگلوتینین (Hemagglutinin) ظهرور کند و با سرعت بسیار زیاد در میان افراد سرایت پیدا کند. ده همه گیری بزرگ جهانی طی ۳۰۰ سال اخیر اتفاق افتاده است که سه مورد از این پاندمی‌ها در قرن بیست منجر به مرگ حداقل چهل میلیون نفر شده‌است [۲]. نخستین همه گیری جهانی قرن ۲۱ در سال ۲۰۰۹ با آغاز عفونت از مکزیک و گسترش آن در عرض چند ماه به اکثریت کشورهای دنیا با میزان مرگ و میر حدود ۲۸۴۰۰ نفر از مبتلایان باعث شد تا سازمان بهداشت جهانی سطح دوم بالاترین هشدار را در مورد این بیماری اعلام کند [۳].

واکسن غیر فعال سه ظرفیه (Trivalent Inactivated influenza Vaccine: TIV) و واکسن زنده ضعیف شده (Live, Attenuated Influenza Vaccine: LAIV) برای پیشگیری از سویه‌های غالب آنفلوانزای قابل پیش‌بینی طراحی و ساخته می‌شوند [۴]. واکسن‌های مورد استفاده دارای مجوز از چندین منظر دارای نقص هستند؛ از جمله صرف هزینه و وقت بسیار برای تولید تخم مرغ عاری از عامل بیماری‌زا و همچنین امکان ایجاد عالیم مربوط به حساسیت در بعضی از افراد، احتیاج به بازبینی سالیانه ترکیب واکسن، چرخه تولید نسبتاً طولانی حدود ۹ ماه از زمان پیش‌بینی سویه شایع سال تا تولید و عرضه، تأثیر جزئی بر سویه واجد HA تغییر یافته و همچنین محدودیت در میزان دوز تولیدی و عدم ایجاد پاسخ ایمنی سلولی در صورت استفاده از TIV [۵، ۶]. یک

Oligo analyzer و Oligo analyzer انجام شد. در طراحی آغازگرها، قابلیت در تکثیر مؤثر قطعه کامل ژنی همچنین الحاق جایگاه برش برای آنزیم‌های BstXI و NotI مد نظر قرار گرفت. بهمنظور بیان بهتر ژن NP توالی کوزاک (Kozak sequence) در طراحی آغازگرها لحاظ شد. پس از تأیید کارآیی آغازگرها در سطح In silico ستر آغازگرها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) با خلوص HPLC انجام شد. توالی آغازگرها مورد استفاده TAGTCACCACAACCATGGCGTCCCAAGGCACCAA (آغازگر جلویی) و TAGTGCGGCCGCTTAATTGTCGTACTCCTCTG (آغازگر برگشتی) بود.

### استخراج RNA ویروسی و ستر

برای این منظور رده سلولی MDCK (Canine Kidney Epithelial Cells) از بانک سلولی و ویروس (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) A/PR8/34 از بخش آنفلوآنزا انسیتو پاستور ایران تهیه شد. بعد از بینه‌سازی شرایط کشت، کشت و استحصال ویروس از رده سلولی یادشده انجام شد. پس از برداشت ویروس آنفلوآنزا و انجام آزمون هماگلوتیناسیون، استخراج RNA ویروسی با استفاده از کیت QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. واکنش RT-PCR با Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (High-Transcription Kit, ABI) (آمریکا) نیز طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. در پایان از محصول بدست آمده به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد.

### واکنش PCR برای تکثیر ژن NP

تکثیر ژن NP از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ۱۰ پیکومول آغازگر جلویی و برگشتی، ۲/۵ میلی مولار MgSo<sub>4</sub> ۱ میلی مولار

سلول کشی وابسته به Fas و پروفورین (Perforin) را در این سلول‌ها بالا می‌برد [۱۳]. این سایتوکاین نقش اساسی در فعالیت کمکی لنفوцитی‌های T کمک کننده (T helper 1) دارد [۱۴]. خصوصیت بارز این سایتوکاین در تحریک سلول‌های کشنده طبیعی و سلول‌های T سیتو توکسیک و به‌دبال آن افزایش فعالیت کشنده‌گی این سلول‌ها موجب شده که استفاده از این سایتوکاین در تحقیقات تولید واکسن و اینمنی درمانی تومورها بسیار مورد توجه قرار گیرد [۱۵]. مطالعات جدید نشان داده است که عرضه همزمان آنتی ژن و ادجوانات توسط سلول‌های APC (Antigen-Presenting Cell) تحریک بهتر لنفوцитی‌ها را به‌دبال خواهد داشت [۱۶، ۱۷]. از آن‌جا که DNA واکسن‌ها به عنوان یک پیشنهاد جدی و ماندگار برای پیشگیری از بیماری‌های مسری کلاسیک و نوظهور در آینده مطرح هستند و با توجه به خطرات بالقوه ویروس آنفلوآنزا، همچنین قابلیت ادجوانی IL-18 در تحریک پاسخ‌های Th1، این مطالعه به منظور ساخت یک پلاسمید دو سیسترونی با قابلیت بیان ژن‌های NP و IL-18 موشی انجام شد تا در مطالعات بعدی به عنوان یک کاندید واکسن قابلیت اینمنی زایی این سازه ژنی در مدل موشی ارزیابی شود.

### مواد و روش‌ها

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

### بررسی بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرها

به‌منظور کلونینگ ژن NP از ویروس Influenza (H1N1) A/PR8/34، نخست دو جفت آغازگر برای تکثیر ژن طراحی شد. برای این منظور ابتدا توالی ژن از بانک ژنی NCBI دریافت شد و سایت‌های برش آنزیم‌های محدود کننده موجود در توالی با استفاده از نرم‌افزار Nebcutter بررسی شد. سپس طراحی آغازگرها با کمک نرم‌افزارهای NCBI Blast و Oligo7.

دو گانه با آنزیم‌های محدود کننده BstXI و NotI انجام شد. پس از تأیید نتایج توسط این آزمون به منظور بررسی درستی توالی کلون شده، توالی یابی دو جهته پلاسمید با استفاده از ست آغازگر اختصاصی موجود در کیت که واحد جایگاه اتصال در بدن ناقل بود توسط شرکت Pioneer (کره جنوبی) انجام شد.

توالی آغازگرها مورد استفاده برای تعیین توالی 3'-CGACTCACTATA GGGGA GA GCGGC-5'

(آغازگر جلویی) و

3'-AAGAACATCGATTTCATGGCAG-5'  
(آغازگر برگشتی) بود.

### ساب کلون ژن NP از ناقل pJET1.2-NP به سازه ژنی واحد ژن IL-18 (pIRES)

در این مطالعه به منظور همسانه‌سازی ژن NP در پلاسمید واحد pIRES-Igk/mIL18/Fc (Site Internal Ribosome Entry Site)، با استفاده از دو آنزیم BstXI و NotI از ناقل خارج و سپس ژن NP هضم شده و خارج شده از pJET1.2-NP در این ناحیه وارد می‌شد. برای این منظور نخست هضم آنزیمی eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) جایگاه بعد از توالی IRES (Internal Ribosome Entry Site)، با استفاده از دو آنزیم BstXI و NotI از ناقل خارج و سپس ژن NP هضم شده و خارج شده از pJET1.2-NP و pIRES-Igk/mIL18/Fc انجام شد. میکروتیوب‌های حاوی واکنش‌های فوق به مدت یک و نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس به منظور غیر فعال‌سازی آنزیمی NotI به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از آن به هر میکروتیوب ۰/۵ میکرولیتر آنزیم BstXI افزوده و یک ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به منظور غیر فعال نمودن این آنزیم، مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محصول هضم آنزیمی دو واکنش فوق روی دو ژل آگارز ۰/۸ درصد تهیه شده از آگارز با دمای ذوب پایین الکتروفورز به منظور تأیید همسانه‌سازی یک واکنش هضم آنزیمی

۳۰۰ نانوگرم cDNA انجام شد. برای جلوگیری از جهش احتمالی از آنزیم Pfu (Fermentas، کانادا) استفاده شد. چرخه دمایی واکنش PCR ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ ثانیه در ۶۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ چرخه بود و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۶۸ درجه سانتی‌گراد برای سنتز نهایی در نظر گرفته شد.

### همسانه‌سازی ژن NP در ناقل pJET1.2/blunt

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

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

به منظور تأیید همسانه‌سازی یک واکنش هضم آنزیمی

5'-GCTTACATGTGTTAGTCGA GGTT-3'  
 آغازگر جلویی<sup>(۱)</sup>

5'-AGGCA GGA CTTGTGA GCAACCGA-3'  
 آغازگر برگشتی<sup>(۱)</sup>

5'-AATGATGGATCAA GTGA GAGAGA-3'  
 آغازگر جلویی<sup>(۲)</sup> و

5'-AATCAGCCATACCA CATTGTAGAGG-3'  
 آغازگر برگشتی<sup>(۲)</sup> بود.

### mIL-18-pIRES2-NP

ارزیابی بیان ژن‌های NP و mIL-18 از پلاسمید mIL-18-pIRES2-NP در سلول یوکاریوتی با بهره‌گیری از رده‌های سلولی BHK21 و RAW264.7 (تپیه شده از بانک سلولی انسنتیو پاستور ایران) انجام شد. برای این منظور ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن ۱۰<sup>۰</sup> سلول به هر چاهک پلیت ۱۰ سانتی‌متری متغیر شد و در محیط Dulbecco's Modified DMEM (Biosera، انگلستان) حاوی ۱۵ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) Biosera (انگلستان)، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۶ درصد رطوبت کشت شد به طوری که در روز ترانسفکشن تراکم سلول‌ها ۹۵-۱۰۰ درصد بود. ۲۰ میکروگرم از سازه ژنی NP-pIRES2-NP-18 در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه رقیق شد. ۳۵۰ mIL-18 در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل همراه با ۵۰ میکرولیتر کلسیم کلراید ۲/۵ مولار درون یک میکروتیوب مخلوط شد سپس سازه ژنی به این میکروتیوب افزوده شد. ۵۰۰ میکرولیتر بافر 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-] HEPES 2X [sulfonic acid] درون یک فالکون ریخته شد. کمپلکس کلسیم کلراید/DNA به دست آمده از مرحله قبل به آرامی به فالکون حاوی بافر HEPES افزوده شد و محلول همگن شد؛ سپس سریعاً محلول ۵ ثانیه ورتكس (Vortex) و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. کمپلکس حاصل روی سلول‌های هر چاهک توزیع شد. پس از ۱۵ ساعت محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شد و سلول‌ها با PBS (Phosphate Buffered Saline) شسته شدند. ۲ میلی‌لیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) ۱۰ درصد

شد و پس از تکمیل، باندهای اختصاصی مربوط به NP و pIRES-Igk/mIL18/Fc از ژل بریده شد و با کیت استخراج از ژل (QIAquick gel extraction kit) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. به منظور الحاق ژن NP در ناقل pIRES-Igk/mIL18/Fc واکنش لیگاسیون با استفاده از آنزیم T4 لیگاز (Takara، ژاپن) طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت انجام شد. میکروتیوب حاوی واکنش به مدت ۱۴ ساعت در ۱۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام انکوباسیون محصول واکنش لیگاسیون با روش شوک حرارتی به باکتری اشريشیا کلی سویه DH5α ترانسفورم شد و باکتری‌ها به صورت چمنی روی پلیت آگار واحد ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

### ارزیابی درستی همسانه‌سازی NP در در ناقل

#### pIRES-Igk/mIL18/Fc

پس از ۲۴ ساعت کلونی‌های ایجاد شده از نظر حضور ژن NP بررسی شد. برای این منظور PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن NP روی کلونی‌های ایجاد شده، انجام شد. کلونی‌های مثبت در محیط LB مایع واحد آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح شد و به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه انکوبه شد. QIAprep Spin (Miniprep Kit) پلاسمیدهای مربوطه استخراج شد. برای تأیید همسانه‌سازی نخست آزمون هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های BstXI و NotI روی پلاسمیدهای استخراج شده انجام شد. همچنین از آزمون PCR با بهره‌گیری از آغازگرهای اختصاصی ژن NP طبق واکنش استاندارد، برای تأیید حضور قطعه مربوطه استفاده شد. در نهایت از تعیین توالی دو جهته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای درستی توالی و جهت الحاق ژن همسانه‌سازی شده استفاده گردید. توالی آغازگرهای طراحی شده برای تعیین توالی ژن NP شامل پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

PBS شسته شد. ۱ میلی لیتر محلول ۱/۵۰ آنتی‌بادی پلی کلونال ضد IgG موشی کونتروگه با FITC (AbCAM) (isothiocyanate) در PBS حاوی ۱ درصد BSA تهیه و به هر چاهک اضافه شد. اسالید به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد و بعد از آن ۳ مرتبه با PBS و یک مرتبه با آب شسته شد. در انتهای برسی شد.

به هر چاهک افزوده شد سپس پلیت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از اتمام دوره انکوباسیون سلول‌ها مجدداً با PBS شسته شدند و به آن‌ها محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS افزوده شد. یک ساعت در انکوباتور و شرایط استاندارد رشد انکوبه شدند و بعد از آن محیط کشت کامل با محیط کشت کامل جدید جایگزین شد. مجدداً ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شد.

## ارزیابی بیان و فعالیت زیستی IL-18 از سازه

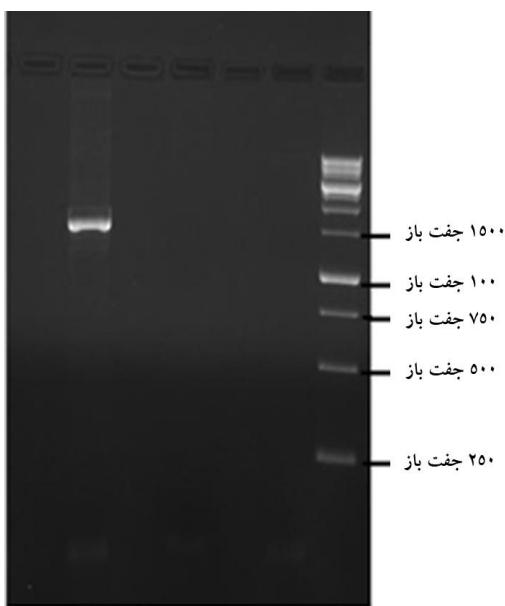
### mIL-18-pIRES2-NP

به منظور بررسی بیان IL-18 از پلاسمید ساخته شده و فعالیت زیستی آن، از رده مونوسیت ماکروفازی موشی RAW264.7 استفاده شد. محیط کشت رویی سلول‌های ترانسفکت شده برای ارزیابی بیان IL-18 و IFN- $\gamma$  جمع آوری شد و در نهایت با استفاده از کیت الایزای IL-18 موشی (Bender MedSystems) و کیت الایزای IFN- $\gamma$  (cytech bioscience میزان بیان سایتوکاین‌های IL-18 و IFN- $\gamma$  ارزیابی شد.

## رنگ آمیزی ایمونوفلئورسنت سلول‌های BHK-21

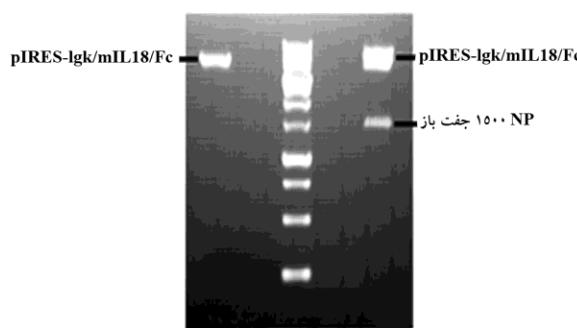
### به منظور ارزیابی بیان ژن NP

سلول‌های ترانسفکت شده نخست با PBS شسته شد و سپس ۱ میلی لیتر فرمالدیید ۴ درصد به هر چاهک افزوده و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از آن مجدداً سلول‌ها با PBS شسته شدند. ۱ میلی لیتر ۱۰۰-X100 Triton درصد به هر چاهک افزوده و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سلول‌ها با PBS شسته شدند. ۱ میلی لیتر محلول ۱/۳۰ آنتی‌بادی مونوکلونال ضد NP (AbCAM) در PBS حاوی ۱ درصد BSA آمده و به هر چاهک اضافه شد. اسالید تهیه شده به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس اسالید با



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن NP

همسانه‌سازی این ژن در ناقل pIRES-Igk/mIL18/Fc و تولید محصول ۱۵۰۰ جفت بازی بود. نتایج هضم دوگانه با آنزیم‌های NotI و BstXI و الکتروفورز محصول واکنش هضم نیز مطابق با پیش‌بینی و خروج قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی مربوط به NP از ناقل بود.



شکل ۲ نتیجه الکتروفورز محصول هضم آنزیمی دوگانه pIRES2-NP-mIL-18-pIRES2-NP

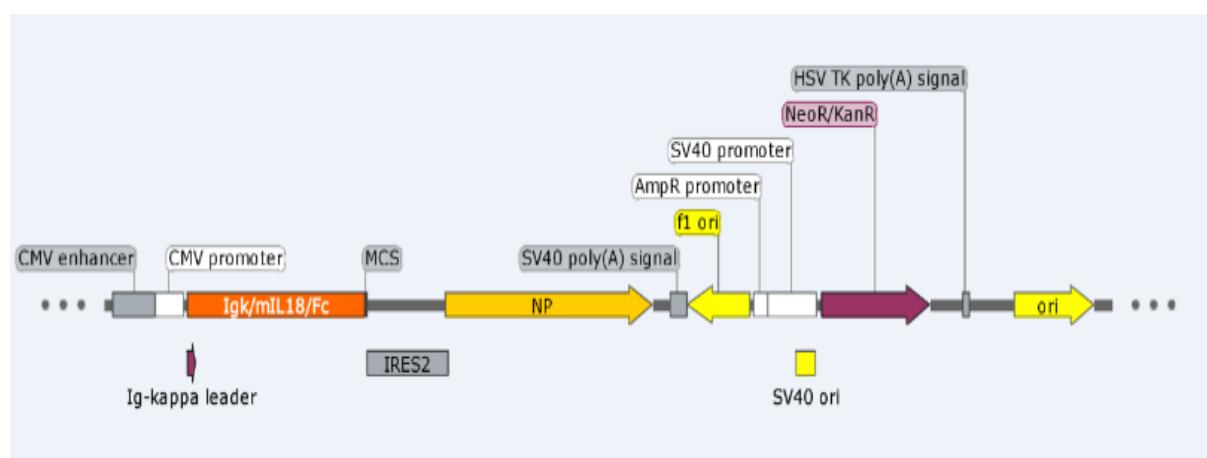
همجنین نتیجه تعیین توالی قطعه کلون شده در ناقل با استفاده از آغازگرهای طراحی شده نشان دهنده تشابه کامل توالی این قطعه با توالی ژن NP ویروس آنفلوآنزا Influenza A/PR8/34 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) بود. شکل ۳ نقشه ژنتیکی پلاسمید ساخته شده mIL-18-pIRES2-NP را نشان می‌دهد.

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

پس از الحاق (Ligation) ژن NP به پلاسمید pJET1.2/blunt، درستی نوترکیبی با انجام هضم آنزیمی، PCR و توالی یابی بررسی شد. برای این منظور پلاسمید استخراج شده از کلونی با استفاده از دو آنزیم NotI و BstXI هضم شد، همان‌طور که انتظار می‌رفت قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی مربوط به ژن NP از ناقل خارج شد. نتایج PCR نیز تأیید کننده حضور ژن NP در سازه ژنی pJET1.2/blunt\_NP بود. همچنین نتایج تعیین توالی توسط نرم‌افزار Chromas بازیابی شد و با توالی AlleleID و BioEdit و با استفاده از نرم‌افزارهای blastn و npblastn نتایج نشان دهنده تشابه حد در حدی توالی ژن همسانه‌سازی شده با توالی ژن NP ویروس آنفلوآنزا (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) Influenza A/PR8/34 بود.

## نتایج آزمون‌های ارزیابی درستی ساب کلونینگ ژن NP در ناقل

از آزمون PCR برای اثبات حضور ژن NP در کلون‌های ایجاد شده استفاده شد که نتایج الکتروفورز تأیید کننده



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

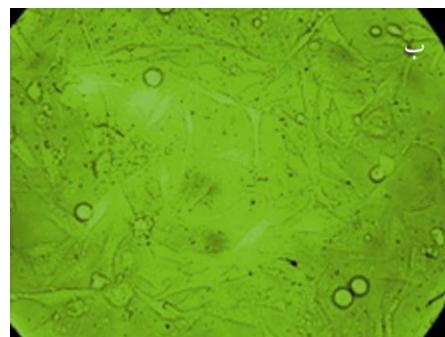
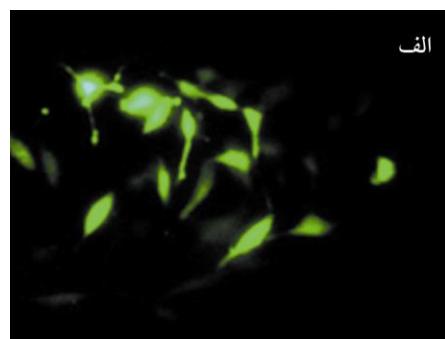
همان طور که در شکل ۴ می‌بینید اثبات کننده قابلیت بیان ژن NP از سازه ژنی mIL-18-pIRES2-NP در سلول‌های یوکاریوتی است.

## بحث

آنفلوانزا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در جهان مدرن است که هر ساله به دلیل فقدان داروهای وسیع الطیف و واکسن‌های با مدت اثر طولانی آسیب گسترده‌ای به سلامت عمومی جامعه وارد می‌سازد. علاوه بر این، به علت پتانسیل زئونوز و تغییرپذیری گسترده آنتی‌ژنیک، این عامل بیماری‌زا تهدید مداوم برای ایجاد یک پاندمی جدید جهانی را نیز به ارمغان می‌آورد. بنابراین تحقیقات گسترده‌ای روی ارایه راه حل‌های جدید به منظور مبارزه با آنفلوانزا و کنترل آن متوجه شده است. یکی از راه حل‌های احتمالی که می‌تواند به فایق آمدن بر مشکلات داروها و واکسن‌های موجود به جامعه بشری کمک کند واکسن‌های ژنی است. واکسن‌های موجود علیه ویروس آنفلوانزا را می‌توان دو دسته اصلی تقسیم نمود: ۱) واکسن‌های با هدف کاربرد در دامپزشکی (اغلب علیه H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> برای کاربرد در پرنده‌گان و همچنین علیه دیگر سویه‌های آنفلوانزا به منظور استفاده برای اسب، خوک و...)، ۲) واکسن‌های به منظور مقابله با آنفلوانزای پاندمیک و فصلی انسانی (از جمله H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> عامل احتمالی پاندمی آتی). اغلب اثربخشی این واکسن‌ها در موش یا موش خرما آزمایش شده است، هر چند در مورد برخی ارزیابی‌های بالینی قبلاً به چاپ رسیده است [۷]. پس از مطالعات متعدد روی واکسن‌های ژنی کد کننده پروتئین‌های سطحی ویروس (NA و HA)، کارآیی کم این واکسن‌ها در ایجاد ایمنی با واکنش متقاطع مشاهده شد. اغلب این کارآیی کم، نتیجه تغییرات ژنیکی و سپس آنتی‌ژنیکی در نورومامینیداز و هماگلوبولینین بود. بنابراین محققان برای ساخت واکسن‌های ژنی به پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری درونی ویروس که از لحاظ آنتی‌ژنیک پایدار هستند، روی آوردند. با توجه به مطالب اشاره

## نتایج بیان و فعالیت زیستی IL-18 موشی کلون شده

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



شکل ۴ نتیجه رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت غیر مستقیم سلول‌های BHK21 ترانسفکت شده با سازه ژنی mIL-18-pIRES2-NP؛ (الف) تصویر سلول‌ها با نور مرئی، (ب) تصویر همان سلول‌ها با تابش فلئورسنس

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

به منظور بررسی قابلیت بیان ژن NP سلول‌های ترانسفکت شده تحت رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت غیر مستقیم قرار گرفتند که نتیجه مشاهده سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسنت

سال ۲۰۰۸ انجام شد نشان داده شد که DNA واکسن کد کننده نوکلئوپروتئین نه تنها می‌تواند سبب تحریک سیستم ایمنی شود، بلکه باعث ایجاد محافظت در برابر سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا می‌شود [۲۳-۲۶]. در مطالعه‌ای که توسط اوپرچال (Operchall) و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد مشخص شد تلقیح همزمان DNA کد کننده ایترلوکین ۱۲ و DNA کد کننده هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا A سبب تحریک بیشتر سیستم ایمنی، نسبت به حالت تلقیح جداگانه این DNA واکسن‌ها شده است. در مطالعه‌ای که توسط باییوک (Babiuk) و همکاران در سال ۲۰۰۴ ارایه شد بیان داشتند که از سایتوکاین‌های مختلف یا کاسته‌های بیانی آن‌ها می‌توان به عنوان ادجوانات زیستی در DNA واکسن آنفلوانزا استفاده کرد [۲۷]. مطالعه‌ای که توسط مارشال (Marshall) و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد نشان داد که پلاسمید کد کننده IL-18 و پلاسمید PSA (Prostate-specific antigen) نقش مهمی در توسعه پاسخ ایمنی سلول‌های T، CD8<sup>+</sup> و CD4<sup>+</sup> به هنگام تلقیح همزمان IL-18 و پلاسمید PSA دارند [۲۸]. همچنین در مطالعه‌ای که توسط هیودا (Hyoda) و همکارانش در سال ۱۹۹۹ انجام شد مشخص شد که IL-18 سبب القای سلول‌های NK می‌شود [۲۹]. لیم (Lim) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای نشان دادند که ترکیبی از توالی‌های DNA کد کننده chIL18 و chIL15 هنگام تزریق داخل عضلانی به جوجه می‌تواند سبب بروز پاسخ التهابی شود. به طوری که گروه تلقیح شده با مخلوطی از پلاسمید‌های کد کننده هماگلوتینین و chIL15 بهترین نتیجه را در آزمون مهار هماگلوتینین جوجه از خود نشان دادند [۳۰]. این گروه تحقیقاتی در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که اگر جوجه‌ها را با ترکیبی از پلاسمید‌های کد کننده chIL15 و chIL18 به همراه پلاسمید‌های کد کننده NINA یا NP تلقیح نمایند، هر دو پلاسمید کد کننده ایترلوکین سبب ارتقا پاسخ ایمنی علیه NINA و NP می‌شوند. با این وجود بیشترین پتانسیل ایمنی زالی از ترکیب IL-15 و N1NA حاصل شد [۳۱]. در

شده در مطالعه حاضر سعی شد تا به منظور دستیابی به استراتژی پیش‌گیرانه برای عفونت آنفلوانزا، DNA واکسنی طراحی شود که بازوی سلولی سیستم ایمنی را تحریک و ایمنی با واکنش مقاطعه قابل قبولی را ایجاد کند. بنابراین برای نیل به این منظور ساختار ژنتیکی و آنتی‌ژنیک ویروس آنفلوانزا با هدف انتخاب آنتی‌ژن نسبتاً حفاظت شده در گونه‌ها و زیر‌گونه‌های مختلف این ویروس بررسی و مطالعه شد. مطالعات نشان داد که بر خلاف پروتئین‌های سطحی، پروتئین‌های داخلی ساختاری و غیر ساختاری ویروس آنفلوانزا به خوبی حفاظت شده هستند. این پروتئین‌ها سبب تحریک و القای شکل‌گیری سلول‌های T سیتوتوکسیک می‌شوند که قادر به تخرب سلول‌های آلدوده به ویروس است [۱۱]. درین این پروتئین‌ها نوکلئوپروتئین (NP) به طور ویژه‌ای نظر طراحان واکسن را به خود جلب کرده است. در مطالعه‌ای که توسط پورتلا (Portela) و همکاران در سال ۲۰۰۲ و در مطالعه دیگر که توسط شری (Sherry) و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، مشخص شد که NP یک پروتئین بسیار حفاظت شده در سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا است که از لحاظ فیلوزنی دچار تغییرات کمتری نسبت به پروتئین‌های سطحی شده و از طرفی نقش‌های متعددی در فرآیند تکثیر ویروس و انتقال آن به هسته داشته و با پروتئین‌های مختلف سلولی و ویروسی، برهمکنش دارد. بنابراین می‌تواند یک ساختار آنتی‌ژنی مناسب برای ایجاد ایمنی با واکنش مقاطعه باشد [۱۲، ۱۹]. در مطالعات اولیه که توسط کودیهالی (Kodihalli) و همکاران در سال ۲۰۰۰، پرتمر (Pertmer) و همکاران در سال ۱۹۹۶، روی (Roy) و همکاران در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت نشان داده شد که DNA پلاسمید کد کننده ژن نوکلئوپروتئین سیستم ایمنی را به اندازه کافی برای ایجاد حفاظت علیه ویروس‌های آنفلوانزای هترولوگ و همولوگ تحریک نمی‌کند [۲۰-۲۲]. اما در مطالعات دیگری که توسط اولمر (Ulmer) و همکاران در سال ۱۹۹۴، اپستین (Epstein) و همکاران در سال ۲۰۰۵، سaha (Saha) و همکاران در سال ۲۰۰۶ و لوو (Luo) و همکاران در

(ژاپن) با عنوان pIRES2-eGFP بود. با توجه به ادعای شرکت سازنده، ناقل مورد استفاده در این مطالعه مبنی بر بیان Multiple Cloning Site (MCS) و جایگاه پس از IRES موقعیت‌های انتخاب شده برای همسانه‌سازی این دو ژن به ترتیب موقعیت MCS برای ژن IL-18 و موقعیت پس از IRES برای ژن NP بودند. استفاده از دو نوع پلاسمید می‌توانست تکرار پذیری آزمایش‌ها را کاهش دهد که برای همین منظور از ناقل دو سیسترونی برای اطمینان از همسان بودن مولی ژن‌ها (Equimolar) در فرمولاسیون واکسن ژنی همچنین عرضه همزمان آنتی ژن و ادجوانت استفاده شد تا در آینده ایمن‌سازی یکنواخت گروه‌های تجربی با این ساختار میسر شود. در مجموع نتایج تعیین توالی، ترانسفکشن و تأیید بیان با استفاده از روش رنگ‌آمیزی فلورسنت غیر مستقیم نشان داد که ژن NP ویروس آنفلوانزا و IL-18 موشی به صورت موفق در رده سلول‌های یوکاریوتی BHK21 و RAW264.7 بیان می‌شوند و استفاده از این سازه به عنوان کاندید واکسن برای ویروس آنفلوانزا امکان‌پذیر است.

## تشکر و قدردانی

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

مطالعات صورت گرفته توسط هنکه (Henke) و همکاران در سال ۲۰۰۴ و ژو (Xu) و همکاران در سال ۲۰۰۷ از پلاسمید PIREs به طور موفقیت‌آمیزی برای ساخت یک DNA واکسن دو سیسترونی بیان کننده آنتی ژن‌های بیماری‌زاها استفاده شد [۳۲، ۳۳]. در مطالعه‌ای که توسط هنکه و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد، مشخص شد که پلاسمید بایسیسترونیک PIREs/NA/IL2 که باعث بیان همزمان توالی اختصاصی PIREs/HA/IL2 ویروس به همراه سایتوکاین IL-2 می‌شود سبب ارتقای پاسخ ایمنی کراس راکتیو موش‌های BALB/C در برابر ویروس آنفلوانزا A در مقایسه با واکسن‌های تولید شده با پلاسمید‌های کد کننده HA و NA به همراه GM-CSF یا IL-12 می‌شود. از مشکلات اصلی استفاده از واکسن‌های ژنی در انسان لزوم تهیه مقادیر بسیار زیاد از DNA است تا قادر به ایجاد ایمنی حفاظتی در انسان شود که برای رفع این مشکل راهکارهای زیادی نظری استفاده از ادجوانت‌های مختلف یا سایتوکین‌ها پیشنهاد شده است. از آنجایی که مطالعات متعددی در زمینه اهمیت و کاربرد واکسن‌های ژنی صورت گرفته بود که واکسن‌های ژنی را به عنوان یک پیشنهاد جدی و ماندگار برای پیش‌گیری از بیماری‌های کلاسیک و نوظهور در آینده مطرح می‌ساخت، همچنین با توجه به قابلیت ادجوانی IL-18 در تحریک پاسخ‌های ایمنی و میل به Th1، این مطالعه در صدد ساخت یک پلاسمید دو سیسترونی واجد ژن‌های NP و IL-18 موشی بود تا در مطالعات بعدی قابلیت ایمنی‌زایی این پلاسمید در مدل موشی ارزیابی شود. ناقل مورد استفاده در این تحقیق یک پلاسمید دو سیسترونی ساخت شرکت Clonetech

## منابع

- [1] Yavarian J, Shafiei Jandaghi NZ, Rezeai F, Mokhtari Azad T, Adamantane and Neuraminidase resistant influenza A/H3N2 isolated in Iran from 2005 to 2013. Tehran Univ Med J 2014;72(1):40-5.
- [2] Kukol A, Hughes DJ. Large-scale analysis of influenza A virus nucleoprotein sequence conservation reveals potential drug-target sites. Virology 2014; 454-455: 40-7.
- [3] Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI,

- Shay DK, Cheng PY, Bandaranayake D, Breiman RF, Brooks WA, Buchy P, Feikin DR, Fowler KB, Gordon A, Hien NT, Horby P, Huang QS, Katz MA, Krishnan A, Lal R, Montgomery JM, Mølbak K, Pebody R, Presanis AM, Razuri H, Steens A, Tinoco YO, Wallinga J, Yu H, Vong S, Bresee J, Widdowson MA. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 2012; 12(9): 687-95.
- [4] Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2005; 54: 1-40.
- [5] Boyce TG, Poland GA. Promises and challenges of live-attenuated intranasal influenza vaccines across the age spectrum: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2000; 54(4): 210-8.
- [6] Rousta F, Fotouhi F, Ghaemi A, Heidarchi B, Mazaheri V, Fazeli M, Torabi A, Ghaffari M. Effects of aqueous Echinacea purpurea extract on immunogenicity of DNA vaccine encoding M2 gene of Influenza virus. *J Gorgan Uni Med Sci* 2012; 14(4): 82-8.
- [7] Stachyra A, Góra-Sochacka A, Sirk A. DNA vaccines against influenza. *Acta Biochim Pol* 2014; 61(3): 515-22.
- [8] Henke A, Rohland N, Zell R, Wutzler P. Co-expression of interleukin-2 by a bicistronic plasmid increases the efficacy of DNA immunization to prevent influenza virus infections. *Intervirology* 2006; 49(4): 249-52.
- [9] Scholtissek C. Source for influenza pandemics. *Eur J Epidemiol* 1994; 10(4): 455-8.
- [10] Berkhoff EG, Boon AC, Nieuwkoop NJ, Fouchier RA, Sint Nicolaas K, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. A mutation in the HLA-B\*2705-restricted NP383-391 epitope affects the human influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *J Virol* 2004; 78(10): 5216-22.
- [11] Altstein AD, Gitelman AK, Smirnov YA, Piskareva LM, Zakharova LG, Pashvykina GV, Shmarov MM, Zhirnov OP, Varich NP, Ilyinskii PO, Shneider AM. Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. *Arch Virol* 2006; 151(5): 921-31.
- [12] Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 2002; 83(Pt 4): 723-34.
- [13] Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996; 156(11): 4274-9.
- [14] Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Fukuda S, Kurimoto M. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12

- for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 1996; 26(7): 1647-51.
- [15] Barouch DH, Santra S, Tenner-Racz K, Racz P, Kuroda MJ, Schmitz JE, Jackson SS, Lifton MA, Freed DC, Perry HC, Davies ME, Shiver JW, Letvin NL. Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. *J Immunol* 2002; 168(2): 562-8.
- [16] Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of Helicobacter pylori oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* 2002; 123(2): 414-24.
- [17] O'Donovan LH, McMonagle EL, Taylor S, Argyle DJ, Nicolson L. Bioactivity and secretion of interleukin-18 (IL-18) generated by equine and feline IL-18 expression constructs. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102(4): 421-8.
- [18] Pouriayevali MH, Memarnejadian AR, Sadat SM, Zavvar M, Siadat SD, Hartoonian C, Aghasadeghi MR. Designing and construction of bicistronic plasmid pIRES-Igk/mIL18/Fc: potential implications for vaccine investigations. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology*. 2011; 14(2): 13-23.
- [19] Sherry L, Smith M, Davidson S, Jackson D. The N terminus of the influenza B virus nucleoprotein is essential for virus viability, nuclear localization, and optimal transcription and replication of the viral genome. *J Virol* 2014; 88(21): 12326-38.
- [20] Kodihalli S, Kobasa DL, Webster RG. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine* 2000; 18(23): 2592-9.
- [21] Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol* 1996; 70(9): 6119-25.
- [22] Roy S, Kobinger GP, Lin J, Figueiredo J, Calcedo R, Kobasa D, Wilson JM. Partial protection against H5N1 influenza in mice with a single dose of a chimpanzee adenovirus vector expressing nucleoprotein. *Vaccine* 2007; 25(39-40): 6845-51.
- [23] Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259(5102): 1745-9.
- [24] Epstein SL, Kong WP, Misplon JA, Lo CY, Tumpey TM, Xu L, Nabel GJ. Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 2005; 23(46-47): 5404-10.
- [25] Saha S, Yoshida S, Ohba K, Matsui K, Matsuda T, Takeshita F, Umeda K, Tamura Y, Okuda K, Klinman D, Xin KQ, Okuda K. A fused gene of nucleoprotein (NP) and herpes simplex virus genes (VP22) induces highly protective immunity against different subtypes of influenza virus. *Virology* 2006; 354(1): 48-57.
- [26] Luo M, Tao P, Li J, Zhou S, Guo D, Pan Z. Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits

- strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice. *J Virol Methods* 2008; 154(1-2): 121-7.
- [27] van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk SL, Babiuk LA. Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. *Immunol Rev* 2004; 199: 113-25.
- [28] Marshall DJ, Rudnick KA, McCarthy SG, Mateo LR, Harris MC, McCauley C, Snyder LA. Interleukin-18 enhances Th1 immunity and tumor protection of a DNA vaccine. *Vaccine* 2006; 24(3): 244-53.
- [29] Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, Hiroishi K, Takeda K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kayagaki N, Kurimoto M, Okamura H, Hada T, Yagita H, Akira S, Nakanishi K, Higashino K. IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J Immunol* 1999; 162(3): 1662-8.
- [30] Lim KL, Jazayeri SD, Yeap SK, Alitheen NB, Bejo MH, Ideris A, Omar AR. Co-administration of avian influenza virus H5 plasmid DNA with chicken IL-15 and IL-18 enhanced chickens immune responses. *BMC Vet Res* 2012; 8: 132.
- [31] Lim KL, Jazayeri SD, Yeap SK, Mohamed Alitheen NB, Bejo MH, Ideris A, Omar AR. Antibody and T cell responses induced in chickens immunized with avian influenza virus N1 and NP DNA vaccine with chicken IL-15 and IL-18. *Res Vet Sci* 2013; 95(3): 1224-34.
- [32] Henke A, Chiang CS, Zell R, Stelzner A. Co-expression of interleukin-2 to increase the efficacy of DNA vaccine-mediated protection in coxsackievirus B3-infected mice. *Antiviral Res* 2004; 64(2): 131-6.
- [33] Xu C, Li ZS, Du YQ, Gong YF, Yang H, Sun B, Jin J. Construction of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* DNA vaccine expressing *H pylori* ureB and IL-2. *World J Gastroenterol* 2007; 13(6): 939-44.