Prokaryotic expression of chimeric trimer protein (3M2e-HA2-NP) derived from conserved domains of influenza virus A/H1N1 as a promising universal subunit vaccine

Hatami Sh.,MSc [1, 2], Fotouhi F.,Ph.D [1], Hashemi M.,MSc [2], Saleh M.,MSc [1], Nazeri E.,MSc [1,2], Shokohi H.,MSc[1], Farahmand B.,PhD [3]

1. Department of Influenza and other respiratory virus, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran.
2.Department of New Science, Tehran Medical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Influenza and other respiratory virus, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran,Tel:021-66496582, b_farahmand@pasteur.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: Influenza A virus is an important respiratory pathogen which can cause high rates of morbidity and mortality during seasonal epidemics and pandemics. Current vaccines are not capable of producing effective immunity against different influenza virus subtypes. Designing universal vaccines by using conversed domains of influenza virus antigens can overcome this limitation. The ectodomain of influenza M2 protein (M2e), the hemagglutinin stalk domain (HA2), and nucleoprotein (NP) are the most conserved sequences among subtypes of influenza A viruse. The aim of this study was to attach part of the NP gene into the binary structure of 3M2e-HA2 and assessment of expression of a chimer trimer protein in prokaryotic system. This recombinant protein is considered as a promising antigenic candidate for a universal vaccine production.

Materials and Methods: First, part of the NP gene segment of human influenza A/H1N1(PR/8/34)was amplified by PCR using designed specific primers. This amplified gene was cloned into pGEM-TEasy cloning vector. Then, the confirmed segment of NP gene was subcloned into PET28a/3M2e-HA2 recombinant expression vector, downstream of the HA2 segment. After confirmation of cloning, the chimer protein was expressed in *E.coli* BL21(DE3).

Results: The results of colony PCR, restriction enzyme digestion and sequencing indicated that the NP gene segment was correctly cloned into PET28a/3M2e-HA2. Chimer protein expression was analyzed by SDS-PAGE and confirmed by western blotting.

Conclusion: Design and production of recombinant protein (3M2e-HA2-NP) could be an important step towards development of a universal influenza vaccine.

Keywords: Influenza vaccine, Chimer protein, 3M2e, HA2, NP

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / آذر و دی ۱۳۹۶/۱۲۰-۱۱۱

بیان پروکاریوتی پروتئین کایمر سه تاییM2e-HA2-NP3 حاصل از نواحی حفاظت شده پروتئینهای ویروس آنفلوانزای A/H1N1 در راستای دست یابی به واکسن زیر واحدی فراگیر

شکوفه حاتمی[۱و۲] فاطمه فتوحی[۱] مهرداد هاشمی[۲] مریم صالح[۱] الهه ناظری[۱و۲] حدیث شکوهی[۱] بهرخ فرهمند[۳]

۱. بخش آنفلوانزا و سایر ویروسهای تنفسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲. گروه علوم نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳.استادیاربخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی انستیتو پاستور ایران، تلفن ثابت:۶۴۱۱۲۱۸۳-۰۲۱، b_farahmand@pasteur.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ویروس آنفلوانزا A یک پاتوژن تنفسی مهم است که باعث بیماری و مرگ و میر گسترده در طول اپیدمی‌های فصلی و پاندمی ها می‌شود. واکسن‌های رایج آنفلوانزا توانایی ایجاد ایمنی مؤثر در برابر سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا را ندارند. طراحی واکسن‌های فراگیر با استفاده از آنتی‌ژن‌های حفاظت شده‌ی ویروس آنفلوانزا در جهت رفع این محدودیت می‌باشد. ناحیه بیرونی پروتئین M2 آنفلوانزا (M2e)، ساقه هماگلوتینین (HA2) و نوکلئوپروتئین (NP) بخشهای بسیار حفاظت شده در میان زیرگونه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا A هستند. هدف این مطالعه، افزودن بخشی از ژن NP به سازه‌ی دوتایی 3M2e-HA2 و بیان کایمر سه تایی در سیستم پروکاریوتی بود. این پروتئین نوترکیب کاندید آنتی‌ژنی نوید بخشی برای تولید واکسن فراگیر محسوب می‌شود.

روش بررسی: ابتدا بخشی از ژن NP ویروس آنفلوانزای انسانی سویه A/H1N1(PR/8/34) با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده تکثیر شد. ژن تکثیر شده در وکتور کلونینگ pGEM-TEasy کلون شد. سپس ژن NP تایید شده در وکتور بیانی نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 در پایین دست قطعه‌ی HA2 کلون شد. پس از تایید کلونینگ، پروتئین کایمر در باکتری *E.coli* سویه BL21(DE3) بیان شد.

یافته‌ها: نتایج Colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین ترادف نشان دادند که قطعه انتخابی ژن NP در وکتور نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 به درستی جایسازی شده است. بیان پروتئین کایمرتوسط SDS-PAGE بررسی و با آزمایش وسترن بلات تایید شد. **استنتاج:** طراحی و تولید پروتئین نوترکیب 3M2e-HA2-NP می‌تواند گام مهمی درجهت تولید واکسن فراگیر به منظور مقابله با زیرگونه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا باشد.

واژه های کلیدی: واکسن آنفلوانزا، پروتئین کایمر، 3M2e، HA2، NP

وصول مقاله:۹۵/۱۱/۱۸ اصلاحیه نهایی:۹۶/۳/۲۷ پذیرش:۹۶/۵/۲۱

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]

مقدمه

آنفلوانزا یک عفونت حاد تنفسی و به شدت مسری است. ویروس آنفلوانزا در حدود ۱۰ تا ۲۰٪ از جمعیت جهان را در طول اپیدمی‌های فصلی عفونی می‌کند که در ۳ تا ۵ میلیون از موارد بیماری شدید ایجاد کرده و ۲۵۰ تا ۵۰۰ هزار مرگ را باعث می‌شود(۲و۱). ویروس آنفلوانزا از خانواده ارتومیکسوویریده دارای RNA تک رشته‌ای قطعه قطعه با قطبیت منفی می‌باشد. تاکنون ۳ گونه A، B و C از ویروس آنفلوانزا شناسایی شده است(۳). آنزیم RNA پلیمراز وابسته به RNA ویروس مستعد خطا است و وجود ژنوم قطعه قطعه به ویروس‌های آنفلوانزا به ویژه گونه A این امکان را می‌دهند که به طور فراوان جهش یابند و نوترتیب(بازآرایی) شوند که به ترتیب منجر به دریفت آنتی‌ژنیک و شیفت آنتی‌ژنیک می‌شوند. به این ترتیب ویروس‌های آنفلوانزا، توانایی فرار از حذف به وسیله‌ی سیستم ایمنی را پیدا می‌کنند(۴). واکسن، بهترین راه پیشگیری از آنفلوانزا است. واکسن‌های موجود از طریق القای آنتی‌بادی در برابر دو گلیکوپروتئین بزرگ سطحی ویروس، هماگلوتینین (HA) و نورامینیداز (NA) ایجاد ایمنی می‌کنند(۵). این واکسن‌ها با کشت ویروس آنفلوانزا در تخم مرغ جنین دار و غیرفعال کردن ویروس تهیه می‌شوند.کارایی این واکسن ها در بهترین شرایط کمتر از ۷۵٪ می‌باشد. واکسن‌های آنفلوانزای موجود توانایی ایجاد حفاظت در برابر زیرگونه‌های دیگر ویروس آنفلوانزا را ندارند، به همین دلیل لازم است که هر ساله واکسن تازه ی مربوط به زیرگونه‌های جدید ویروس تولید شود. از این رو نیاز به واکسنی کارامدتر و فراگیر وجود دارد که به تغییر هر ساله نیاز نداشته باشد(۷و۶).

واکسن‌های زیرواحدی، واکسن‌های نسل دوم هستند. برای تولید این واکسن‌ها ترکیبات مختلف ساختار ویروس را جدا کرده و بخشهایی را که حاوی آنتی‌ژنهای مفیدی با توانایی تحریک آنتی‌بادی محافظت کننده هستند تهیه می‌کنند. با این شیوه می‌توان با عمل تخلیص، پروتئین‌های غیراختصاصی را حذف و امکان واکنش‌های نامطلوب واکسن را کاهش داد. همچنین در سالهای اخیر محققان تلاش می‌کنند که با تولید واکسن‌های زیرواحدی نوترکیب با استفاده از پپتیدهای حفاظت شده ویروس نیاز به تجدید هرساله برطرف شود(۸). پروتئین M2 یک پروتئین ترا غشایی نوع III است که ۹۷ اسیدآمینه دارد(۹). انتهای آمینی خارج سلولی این پروتئین (M2e) در میان زیرگونه‌های آنفلوانزای A انسانی به شدت حفاظت شده است. آنتی‌ژن M2e یک پپتید ۲۳ اسیدآمینه‌ای است که در بیماریزایی ویروس نقش ندارد. بنابراین واکسن‌های آنفلوانزا بر پایه M2e، ایمنی‌زایی پایینی دارند. آنتی‌بادی‌ها علیه M2e در سرم انسان به سختی قابل ردیابی هستند(۱۱و۱۰). بر همین اساس در مطالعات پیشین استراتژی‌های مختلفی برای افزایش ایمنی‌زایی آنتی‌ژن M2e، با هدف تولید واکسن مؤثر برای ویروس آنفلوانزا، به کار گرفته شده است. از جمله این استراتژی‌ها افزایش دانسیته پپتید از طریق افزایش تعداد نسخه‌ها یا پیوستن مولکول‌های حامل مانند گلوتاتیون ترانسفراز،آنتی ژن هسته ویروس هپاتیت B (HBcAg)، هموسیانین صدف کوهی و کمپلکس پروتئین غشای خارجی نایسریا منتژیتیدیس و یا همراهی با ادجوانت‌ها مانند فلاژلین و توکسین ویبریوکلرا می‌باشد(۴). هماگلوتینین (HA) فراوان‌ترین پروتئین در سطح پوشش ویروسی و مهم ترین پروتئین در عفونت زایی ویروس است(۱۲). هماگلوتینین از دو زیرواحد HA1 و HA2 تشکیل شده است. این دو زیر واحد توسط پیوند دی‌سولفیدی به هم مرتبط هستند(۱۳). زیرواحد HA2 ناحیه حفاظت شده ساقه هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا به شمار می‌آید که سبب ایجاد واکنش حفاظتی متقاطع در بین زیرگونه‌های مختلف ویروس می‌گردد. براین اساس HA2 کاندید آنتی‌ژنی مناسبی برای تولید واکسن فراگیرخواهد بود(۱۴-۱۲). نوکلئوپروتئین(NP)، پروتئین داخلی ویروس آنفلوانزا است که RNA ژنومی ویروس را می‌پوشاند. این

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]

پروتئین از آنتی‌ژن‌های اختصاصی برای تعیین گونه ویروس آنفلوانزا می‌باشد و منجر به تسهیل رونویسی و همانندسازی ژنوم ویروس می‌شود که به واسطه در معرض قرار دادن بازها برای دسترسی آنزیم پلیمراز ویروسی است. همچنین این پروتئین توانایی میانکنش با طیف وسیعی از ماکرومولکولهای ویروسی و سلولی را دارد. نوکلئوپروتئین از حفاظت شدگی بالایی در بین زیرگونه‌های ویروس آنفلوانزا برخوردار است و تحقیقات پیشین نشان داده است که استفاده از واکسن‌های حاوی ژن NP می‌تواند منجر به القای ایمنی حفاظتی متقاطع گردد. انتخاب اپی‌توپ مناسب NP می‌تواند تولید پروتئین کایمر مناسب را تسهیل نماید. اپی‌توپ‌هایی در نوکلئوپروتئین وجود دارد که از بین رفتن سلول‌های آلوده و کاهش جمعیت ویروسی را در پی دارد. القای پاسخ لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک CTL یکی از اهداف مطالعات در زمینه تولید واکسن فراگیر آنفلوانزا به شمار می‌رود(۱۷-۱۵).

سازه‌ی دوتایی M2e-HA2 پیش از این در آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران در وکتور pET28a کلون شده است(۱۸). هدف ما در این مطالعه، افزودن بخشی از ژن NP به سازه‌ی دوتایی 3M2e-HA2 و بیان پروتئین کایمر سه تایی در سیستم پروکاریوتی بود. این پروتئین نوترکیب آنتی‌ژن نوید بخشی برای تولید واکسن فراگیر آنفلوانزا محسوب می‌شود.

روش بررسی

در این پژوهش از ژن NP سویه A/H1N1(PR/8/34)و سازه‌ی دوتایی 3M2e-HA2 که پیش از این در آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران در وکتور pET28a کلون شده بود، استفاده شد(۱۸). در آغاز با مطالعه مقالات پیشین و بهره‌گیری از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک توالی ۱۵۰ تا ۴۵۰ (۳۰۰ bp) از ژن NP انتخاب شد. قطعه‌ی انتخابی با استفاده از روش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی حاوی سایت برش آنزیمی مناسب تکثیر یافت. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد. توالی پرایمرها به ترتیب زیر بود.

پرایمر Forward به طول ۲۲ نوکلئوتید و Tm=۵۸°C دارای سایت برش آنزیمی HindIII:

F: 5'-GAAGCTTGATTATGAGGGACGG- 3'

پرایمر Reverse به طول ۲۱ نوکلئوتید و Tm=۵۵/۳ دارای سایت برش آنزیمی XhoI:

R: 5'-GCTCGAGCCTCTGATAAGTTG- 3'

در توالی پرایمر F سایت برش آنزیم HindIII جهت اتصال به انتهای 3M2e-HA2 طراحی گردید. و نیز در توالی پرایمر R سایت برش آنزیم XhoI به گونه‌ای طراحی شد تا هنگام بیان پروتئین از کدون اختتام بعد از توالی His-Tag واقع در توالی وکتور بیانی pET28a استفاده شود. مقادیر مواد در مخلوط PCR:

۰/۵µl dNTP(۱۰mM), ۰/۷۵µl MgCl2(۵۰mM),
۲/۵µl PCR buffer(10X), ۱µl Template(۱۰۰ ng),
۱µl Forward primer(۴۷/۷µM),
۱µl Reverse primer(۵۵/۲µM)

در نظر گرفته شد. واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (با حجم ۲۵ میکرولیتر) مطابق برنامه دمایی جدول ۱ انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردید. سپس با استفاده از دستگاه آشکارساز در طول موج ۲۶۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. برای تشخیص اندازه مولکولی محصول PCR از نشانگر ۱۰۰ bp DNA شرکت Fermentas استفاده شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]

جدول ۱. برنامه PCR تنظیم شده در دستگاه ترموسایکلر

فاز PCR	دما (C°)	زمان	سیکل
دناتوره شدن اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
دناتوره شدن	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال	۵۴	۴۵ ثانیه	
طویل شدن	۷۲	۲دقیقه	
طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

کلونینگ ژن NP در ناقل pGEM-TEasy

ابتدا قطعه ژن NP تکثیر شده(محصول PCR) با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (شرکت کیاژن) تخلیص و پس از سنجش غلظت به روش جذب نوری به وسیله‌ی دستگاه نانودراپ به کمک آنزیم T4DNA Ligase در ناقل pGEM-TEasy کلون گردید. مخلوط واکنش شامل محصول PCR خالص شده به حجم µl ۰/۵، پلاسمید خطی PGEM-TEasy به حجم µl ۰/۵، بافر µl ۲، آب مقطر µl ۶ و آنزیم T4DNA Ligase به حجمµl ۰/۵(کیت لیگاسیون شرکت Promega برابر با دستور سازنده) به مدت ۲۴ ساعت در دمای C° ۴ قرار داده شد. محصول واکنش اتصال در باکتری *E.coli* مستعد سویه Top10F' به روش شوک حرارتی ترانسفورم شد و باکتری ترانسفورم شده در محیط LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمپی‌سیلین و IPTG/X-Gal کشت داده شد. سپس با استفاده از روش غربالگری کلنی‌های آبی–سفید، کلنی‌های سفید که به احتمال زیاد واجد پلاسمید هدف بودند انتخاب شدند. از کلنی‌های سفید به محیط‌کشت LB Broth تلقیح و به مدت ۱۸ ساعت در دمای C° ۳۷ انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ با دور rpm ۱۸۰ با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (شرکت کیاژن) از رسوب باکتری، پلاسمید استخراج و تخلیص گردید. برای تایید کلونینگ از روش‌های Colony PCR با پرایمرهای اختصاصی و هضم آنزیمی با آنزیم‌های XhoI و HindIII استفاده شد.

کلونینگ NP در وکتور بیانی نوترکیب pET28a-3M2e-HA2

ابتدا ژن NP از وکتور pGEM-NP جدا شد. برای این هدف از هضم آنزیمی کامل توسط آنزیم‌های XhoI و HindIII استفاده شد. سپس تخلیص ژن مزبور با استفاده از کیت استخراج از ژل (شرکت کیاژن) پس از الکتروفورز محصول واکنش هضم آنزیمی انجام گرفت. همچنین بطور همزمان وکتور نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 آماده شد. بدین منظور استخراج وکتور نوترکیب نیز با کیت (شرکت کیاژن) انجام و غلظت آن به روش جذب نوری اندازه‌گیری شد. سپس به کمک واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های XhoI و HindIII وکتور نوترکیب خطی شد. در این مرحله الحاق ژن NP به وکتور بیانی نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 خطی شده با آنزیم T4DNA Ligase انجام شد و مخلوط واکنش اتصال به مدت ۲۴ ساعت در دمای C° ۴ قرار گرفت. پس از آن سازه جدید به داخل باکتری مستعد شده *E.coli* سویه Top10F' ترانسفورم شده و در محیط LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و کانامایسین کشت داده شد. به منظور تایید نهایی کلونهای حاصل از سه روش Colony PCR با پرایمرهای اختصاصی، هضم آنزیمی با آنزیم‌های

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]

XhoI و HindIII و تعیین توالی وکتور نوترکیب pET28a-3M2e-HA2-NP استفاده گردید.

القای بیان پروتئین کایمر 3M2e-HA2-NP

برای بیان پروتئین کایمر 3M2e-HA2-NP وکتور نوترکیب pET28a-3M2e-HA2-NP به باکتری‌های مستعد شده‌ی *E.coli* سویه BL21(DE3) ترانسفورم و در محیط کشت LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. از کلنی‌های حاصل یک کلنی به ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت LB Broth واجد آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح و در انکوباتور شیکردار در دمای $37\ ^{\circ}C$ قرار داده شد. پس از حصول جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر(به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر)، القاگر ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG) با غلظت ۱ میلی‌مولار به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. سپس در فواصل زمانی ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از القا با برداشت یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری جذب نوری آن در طول موج مذکور مشخص شد و در دمای $4\ ^{\circ}C$ و دور ۹۰۰۰ در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ و رسوب‌گیری شد.

بررسی بیان پروتئین کایمر 3M2e-HA2-NP

بررسی بیان پروتئین کایمر با روش SDS-PAGE انجام شد. بدین ترتیب که رسوب‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در ساعت‌های مختلف ابتدا با مقادیر معین آب مقطر و بافر نمونه (sample buffer) (ترکیب بافر نمونه: ابتدا ۳/۳۸ گرم تریس در ۳۰ میلی لیتر آب مقطرحل شده و pH را روی ۶/۸ تنظیم و ۵ گرم SDS می افزاییم و سپس ۵۰ میلی لیتر گلیسرول و در انتها ۰/۰۳ گرم برموفنول بلو افزوده و حجم نهایی را به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم) مخلوط و ۵ دقیقه جوشانده شد. الکتروفورز لیزات باکتریایی حاصل بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد به مدت ۳ ساعت با ولتاژ۹۰ ولت انجام شد. (ترکیب بافر الکتروفورز شامل ۳ گرم پودر تریس و۱۴/۴گرم پودر گلایسین در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر است که ۱ گرم پودر SDS به آن اضافه نموده و در انتها pH آن را روی ۸/۸ تنظیم و حجم نهایی به ۱ لیتر رسانده می‌شود.) باندهای پروتئینی با رنگ‌آمیزی محلول کوماسی‌بلو R-250 نمایان شدند. وزن مولکولی پروتئین‌ها با نشانگر پروتئین شرکت Fermentas تخمین زده شد.

تایید بیان پروتئین با روش وسترن بلات

پروتئین‌های الکتروفورز شده با استفاده از ژل الکتروترانسفر در شرایط نیمه خشک از ژل پلی‌اکریل‌آمید به غشای نیتروسلولزی منتقل شدند. سپس غشا نیتروسلولز به مدت ۲۰ دقیقه در محلول مسدودکننده (Blocker) (۰/۵گرم BSA در ۲۰ میلی‌لیتر PBS(1X)) در یخچال $4\ ^{\circ}C$ قرار گرفت. پس از ۳ مرتبه شستشو با بافر (بافر شستشو شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS(1X) که ۵۰ میکرولیتر TWEEN20 به آن اضافه شده است.)، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه با آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه برچسب هیستیدینی نشاندار با آنزیم پراکسیداز (شرکت کیاژن) انکوبه شد. باندهای پروتئینی موردنظر با استفاده از سوبسترای دی آمینو بنزیدین (DAB) با غلظت mg/ml ۰/۶ (شرکت Sigma) آشکار گردید.

یافته ها

پس از بررسی‌های انجام شده توسط نرم‌افزارهای Expasy ، UniProt و Imtech توالی ۳۰۰bp (۴۵۰ bp–۱۵۰) از ژن NP آنفلوانزای انسانی سویه H1N1(PR/8/34) جهت کلونینگ در وکتور نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 انتخاب شد. جداسازی و تکثیر قطعه‌ی انتخابی از ژن NP با استفاده از پرایمرهای ذکر شده انجام گرفت. نتیجه الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد در مجاورت نشانگر DNA ۱۰۰ bp شرکت Fermentas در شکل ۱ نشان داده شده است. در ستون شماره ۲ و ۳ باند ۳۰۰bp نمایان می‌باشد.

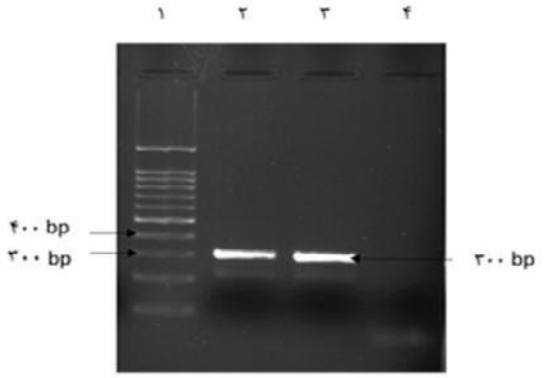
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]

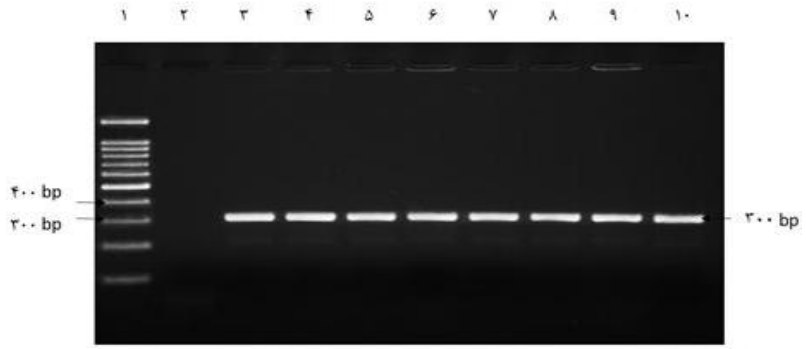
محصول PCR پس از تخلیص در وکتور pGEM-TEasy کلون شد. وکتور نوترکیب pGEM-NP حاصل، به باکتری *E.coli* سویه 'Top10F ترانسفورم شد. پس از تایید محصول کلونینگ، کلون مورد تایید و منتخب برش داده، تخلیص و در پلاسمید نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 کلون شد. پلاسمیدهای نوترکیب pET28a-3M2e-HA2-NP پس از انتقال به باکتری *E.coli* سویه 'Top10F با روش‌های Colony PCR و هضم آنزیمی بررسی و تایید شدند. به این ترتیب در روش Colony PCR قطعه NP (۳۰۰ bp) تکثیر و در هضم آنزیمی با آنزیم‌های XhoI و HindIII جداسازی شد(شکل ۲ و۳).

در پایان پلاسمیدهای نوترکیب به کمک تعیین ترادف تایید شدند. نتایج الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل‌آمید برای نمونه‌های پیش از القا و پس از القا (۴ ساعت) حاکی از افزایش تدریجی یک باند پروتئینی می‌باشد. این پروتئین در ناحیه‌ای حدود ۵۱ کیلودالتون مشاهده گردید که با وزن مولکولی پیش‌بینی شده مطابقت دارد.(شکل۴) بدین ترتیب بیان پروتئین کایمر تایید گردید.

به منظور تایید نهایی پروتئین نوترکیب از آزمایش وسترن بلات استفاده شد. در آزمایش وسترن بلات با استفاده از Anti-His تولید پروتئین کایمر 3M2e-HA2-NP در باکتری *E.coli* سویه BL21(DE3) تایید شد(شکل ۵). در اثر واکنش Ag-Ab و واکنش آنزیم با سوبسترای رنگزا یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۵۱ کیلودالتونی دیده شد.



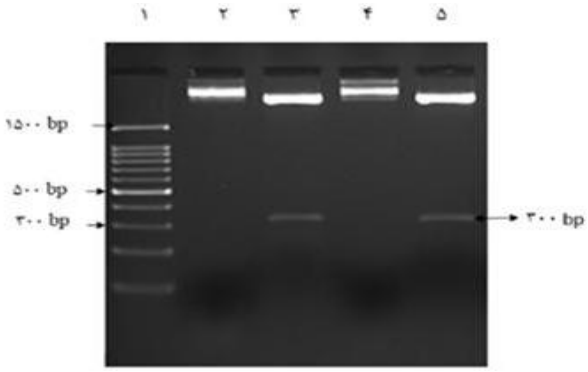
شکل ۱: نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن NP بر روی ژل آگارز ۲ درصد :ردیف۱: نشانگر DNA 100 bp (Fermentas)ردیف ۳و۲: محصول PCR بخشی از قطعه NP ردیف ۴: کنترل منفی



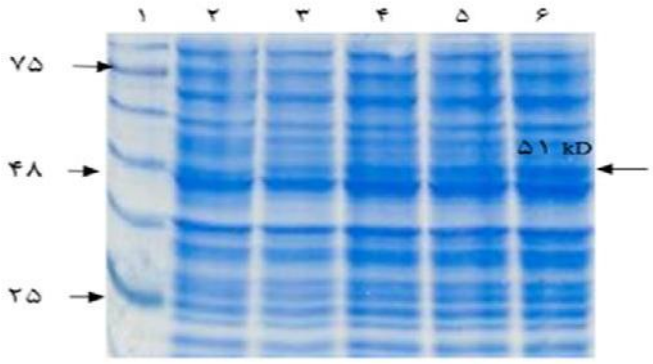
شکل۲: نتیجه الکتروفورز محصول کلنی PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد ردیف۱: نشانگر DNA 100 bp (Fermentas) ردیف۲: کنترل منفی ردیف۳ تا۱۰: محصولات کلنی PCR به ترتیب برای کلنی‌های شماره ۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸ در ردیف‌های ۳ تا ۱۰ قطعات تکثیر شده بخشی از ژن NP را نشان می‌دهند

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

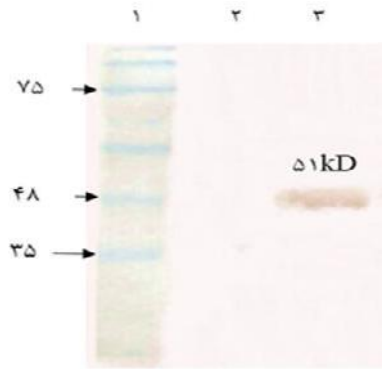
[DOI: 10.22102/22.5.111]



شکل ۳: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET-3M2e-HA2-NP با دو آنزیم HindIII و XhoI و جداسازی قطعه ۳۰۰ جفت بازی NP در کنار نشانگر ۱۰۰bp
ردیف۱: نشانگرDNA 100 bp (Fermentas) ردیف۲ و۴: پلاسمید هضم نشده از کلونی‌های شماره ۵ و ۸ ردیف ۵ و ۳: پلاسمید هضم شده از کلونی‌های شماره ۵ و ۸



شکل ۴: الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) و رنگ آمیزی با کوماسی بلو برای بررسی بیان کایمر 3M2e-HA2-NP مربوط به کلنی شماره ۵ در سلول‌های BL21 قبل و بعد از القا با IPTG (غلظت ۱mM) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی ژل آکریل‌آمید ۱۲ درصد ردیف ۱: نشانگر پروتئینی شرکت فرمنتاز(Fermentas)
ردیف ۲: نمونه‌ی قبل از القا ردیف های ۳ تا۶: نمونه های ۱، ۲، ۳، ۴ ساعت بعد از القا



شکل ۵: نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین کایمر۵۱ کیلودالتونی با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد برچسب هیستیدین
ردیف ۱: نشانگر پروتئینی شرکت فرمنتاز ردیف ۲ : شاهد منفی (نمونه قبل از القا) ردیف ۳: نمونه سازه3M2e-HA2-NP حاصل از کلونی های شماره ۵ در ساعت چهارم، ظهور باند پروتئین کایمر با استفاده از Anti-His نشاندار شده با آنزیم پراکسیداز و سوبسترای دی آمینو بنزدین

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]

بحث

ویروس آنفلوانزا دارای توانایی بالقوه در وقوع اپیدمی و پاندمی‌های گسترده می‌باشد. ویژگی دریفت و شیفت آنتی‌ژنیک در ویروس آنفلوانزا موجب ظهور سویه‌های جدیدی می‌شود که مردم هیچگونه ایمنی نسبت به سویه نوظهور ندارند و به همین سبب با سرعت زیاد در میان مردم پخش می‌شود(۱۹-۱۴). نخستین پاندمی قرن ۲۱ که در سال ۲۰۰۹ اتفاق افتاد به علت شیوع سویه جدید A/H1N1 بود(۲۰). بازآرایی ژنتیکی در بین ۳ سویه آنفلوانزای H1N1 خوکی، H3N2 انسانی و H5N1 پرندگان سویه مزبور را به وجود آورده بود. آمار بالای مرگ و میر در پاندمی سال ۲۰۰۹ لزوم تحقیقات گسترده در خصوص واکسن فراگیرآنفلوانزا را برجسته‌تر کرد(۲۱). واکسن‌هایی که امروزه تولید می‌شوند دارای محدودیت‌هایی از جمله عوارض جانبی، چرخه تولید طولانی مدت، اثربخشی پایین و عدم ایجاد ایمنی متقاطع می‌باشند. در حالی که با کمک مهندسی ژنتیک امکان تولید انواع واکسن فراگیر آنفلوانزا فراهم شده است. یکی از روش‌های نوین استفاده از واکسن‌های زیرواحدی نوترکیب است. در این نوع واکسن با استفاده از نواحی آنتی‌ژنیک از ژن‌های حفاظت شده ویروس می‌توان به واکسنی دست پیدا کرد که قادر به ایجاد ایمنی متقاطع در برابر سویه‌های نوظهور باشد(۲۲). نتایج مطالعات در مورد توالی ۲۳ اسیدآمینه‌ای دمین خارج غشایی پروتئین ماتریکس (M2e) نشان داده است که ۱۷ اسیدآمینه آن بیش از ۹۷٪ حفاظت شده است. بنابراین M2e یک کاندید مناسب برای تولید واکسن فراگیر به شمار می‌آید(۲۳). هماگلوتینین (HA) آنتی‌ژن اصلی ویروس و یک ایمونوژن قوی است که می‌تواند سیستم ایمنی هومورال را تحریک کند. زیرواحد پروتئینی HA2 در مقایسه با زیرواحد HA1 از حفاظت شدگی بیشتری برخوردار است. به همین دلیل قادر به ایجاد واکنش حفاظتی متقاطع در بین سویه‌های مختلف می‌باشد(۱۲). Junwei Li و همکاران در سال ۲۰۱۴، سازه سه‌تایی CTB-3M2e-HA2 را با هدف تهیه واکسن زیرواحدی طراحی کردند. در این سازه برای افزایش ایمنوژنیسیتی واکسن از دو پپتید ایمنوژن HA2 و 3M2e به همراه ادجوانت کلراتوکسین B (CBT) استفاده شد. نتایج ارائه شده از چالش ایمنی‌زایی با پروتئین نوترکیب مذکور حاکی از پاسخ ایمنی هومورال بسیار قوی در موش‌های واکسینه بود(۲۴). NP آنتی‌ژن داخلی ویروس آنفلوانزا است. آنالیز توالی ژنومی NP نشانگر حفاظت شدگی بیش از ۹۰٪ در میان انواع ویروس‌های آنفلوانزا می‌باشد. به طوری که پروتئین‌های سطحی ویروس باعث ایجاد پاسخ ایمنی هومورال در میزبان می‌شوند. این در حالی است که پروتئین‌های داخلی ویروس ایمنی سلولی را تحریک می‌کنند. لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (CTL) ایجاد شده در برابر پروتئین NP، بیشتر از نوع $CD8^+$ بوده و میزان کمتری از $CD4^+$ گزارش شده است. همچنین علاوه بر $CTL\ CD8^+$، آنتی‌بادی‌های NP در پاکسازی ویروسی با واسطه ADCC شرکت می‌کنند(۲۵-۱۷). در سال ۲۰۱۳، xioa Gao و همکاران از یک اپی‌توپ انتخابی NP در سازه سه‌تایی 3M2e-HBc-NP بهره گرفتند تا به همراه پاسخ ایمنی هومورال تحریک پاسخ ایمنی سلولی هم ایجاد شود. بررسی ایمنی‌زایی سازه مذکور بواسطه وجود دو پپتید ایمنوژن به همراه ادجوانت پوشش ویروس هپاتیت B افزایش چشمگیر پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را نشان داده است(۴). در این پژوهش برای افزایش ایمنی‌زایی M2e از افزایش دانسیته استفاده شد. یعنی سه نسخه ژن M2e به طور متوالی در وکتور جایسازی شد. همچنین به منظور تنوع اپی‌توپیک و در نتیجه افزایش

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]

ایمنی‌زایی پپتید HA2 در کنار 3M2e استفاده شد. و در نهایت با هدف تحریک پاسخ ایمنی سلولی در کنار پاسخ ایمنی هومورال اپی‌توپ NP نیز به سازه دوتایی 3M2e-HA2 اضافه گردید. قطعه‌ی انتخابی ژن NP به گونه‌ای در وکتور نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 جایسازی شد که یک توالی هیستیدینی (برچسب هیستیدینی) در انتهای آمینی و توالی هیستیدینی دیگری در انتهای کربوکسیل پروتئین نوترکیب قرارگیرد. همچنین توالی هیستیدینی انتهای کربوکسیل به طور دقیق در انتهای قطعه NP و پیش از کدون اختتام وکتور واقع شده است، بنابراین هیچ اسیدآمینه‌ای از توالی وکتور به انتهای پروتئین نوترکیب اضافه نخواهد شد. علاوه بر اینکه پروتئین‌های نوترکیب واجد دنباله‌های هیستیدینی به سهولت توسط ستون‌های Ni-NTA تخلیص می‌گردند. در ادامه این مطالعه اقدام به بیان این پروتئین نوترکیب در میزبان BL21(DE3) گردید. از ویژگی‌های مطلوب این میزبان کنترل آسان و راندمان بالا در تولید پروتئین‌های نوترکیب است. این سیستم فاقد آنزیم‌های اندونوکلئاز می‌باشد. در این حالت پلاسمیدی که وارد باکتری شده، تجزیه نمی‌گردد. مهمترین مزیت این میزبان لیزوزیم مهارکننده‌ی T7RNAPol می‌باشد که اجازه بیان پروتئین از پروموتر T7 را بدون حضور IPTG نمی‌دهد. بر این اساس حضور IPTG بیان پروتئین موردنظر را کنترل می‌نماید(۲۷-۲۶).

نتیجه گیری

در این پژوهش نشان داده شد که سازه نوترکیب 3M2e-HA2-NP با قابلیت بیان در سیستم پروکاریوتی به خوبی سنتز شده و همچنین وزن مولکولی مشاهده شده با مقدار پیش بینی شده با استفاده از نرم افزارهای بیو انفورماتیکی مطابقت دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان‌نامه خانم شکوفه حاتمی دانشجوی رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران می‌باشد که با حمایت مالی طرح پژوهشی مصوب انستیتو پاستور ایران به شماره‌ی ۷۵۹ اجرایی شده است. بدین وسیله از مساعدت و همکاری کلیه‌ی کارکنان بخش تحقیقات آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران تقدیر می‌گردد.

References

1. Palese P. Influenza: old and new threats. Nat Med 2004;10:S82-S7.
2. Tumpey TM, García-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE, Basler CF. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2004;101:3166-71.
3. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. Fields Virology 2007;2:1647-89.
4. Gao X, Wang W, Li Y, Zhang S, Duan Y, Xing L, et al. Enhanced Influenza VLP vaccines comprising matrix-2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge. Antiviral Res 2013;98:4-11.
5. Steinhauer DA, Skehel JJ. Genetics of influenza viruses. Annu Rev Genet 2002;36:305-32.
6. Du L, Zhou Y, Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. Microb Infect 2010;12:280-6.
7. Mischler R, Metcalfe IC. Inflexal® V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. Vaccine 2002;20:B17-B23.
8. Andersson C. Production and delivery of recombinant subunit vaccines. 2000.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]

9. Ebrahimi SM, Tebianian M. Heterologous expression, purification and characterization of the influenza A virus M2e gene fused to Mycobacterium tuberculosis HSP70359–610 in prokaryotic system as a fusion protein. Mol Biol Rep 2010;37(6):2877-883.
10. Schotsaert M, De Filette M, Fiers W, Saelens X. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. Expert *Rev* Vaccines 2009;8:499-508.
11. Zhao G, Lin Y, Du L, Guan J, Sun S, Sui H, et al. An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses. Virol J 2010; 18;7:9.
12. Bommakanti G, Citron MP, Hepler RW, Callahan C, Heidecker GJ, Najar TA, et al. Design of an HA2-based Escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. Proc Natl Acad Sci U.S.A 2010;107:13701-6.
13. Worch R. Structural biology of the influenza virus fusion peptide. Acta Biochim Pol 2014;61:421-6.
14. Staneková Z, Varečková E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. Virol J 2010; 30;7:351.
15. Hutchinson EC, von Kirchbach JC, Gog JR, Digard P. Genome packaging in influenza A virus. J Gen Virol 2010;91:313-28.
16. Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, Ozawa M, et al. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. J Virol 2009;83:4153-62.
17. Ulmer JB, Fu T-M, Deck RR, Friedman A, Guan L, DeWitt C, et al. Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. J Virol 1998;72:5648-53.
18. Jalili N, Taheri N, Tavakoli R, Fotoohi F, Akbari A, Farahmand B. Expression and Purification of a Recombinant Chimeric Protein (3M2e-HA2) Composed of Influenza Virus Hemaglutinin and Matrix Protein Conserved Domain for Universal Subunit Vaccine Development. J Mazandaran Uni MedSci 2016;26:12-22. [In Persian]
19. Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. Cell Host Microbe 2010;7:440-51.
20. Peiris J, Tu Ww, Yen Hl. A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century. Eur J Immunol 2009;39:2946-54.
21. Scalera NM, Mossad SB. The First Pandemic of the 21st Century: Review of the 2009 Pandemic Variant Influenza A (H1N1) Virus. Postgrad Med J 2009;121:43-7.
22. Kesik-Brodacka M, Plucienniczak G. A universal flu vaccine. Acta Biochim Pol 2014;61:523-30.
23. Ebrahimi SM, Tebianian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. Virus Gen 2011;42:1-8.
24. Li J, Arévalo MT, Chen Y, Posadas O, Smith JA, Zeng M. Intranasal immunization with influenza antigens conjugated with cholera toxin subunit B stimulates broad spectrum immunity against influenza viruses. Hum Vaccin Immunother 2014;10:1211-20.
25. Kreijtz J, de Mutsert G, Van Baalen C, Fouchier R, Osterhaus A, Rimmelzwaan G. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus. J Virol 2008;82:5161-6.
26. Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in E. coli. Curr Protoc Protein Sci 2010:5.24. 1-5.
27. Novagen. pSM. 11th ed, 2006.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-23]

[DOI: 10.22102/22.5.111]