

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.D¹, Hashemi M.,MSc², Saleh M.,MSc¹, Nazeri E.,MSc^{1,2}, Shokohi H.,MSc¹, Farahmand B.,PhD³

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 virus. 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

بیان پروکاریوتی پروتئین کایمر سه تایی 3M2e-HA2-NP حاصل از نواحی حفاظت شده پروتئینهای ویروس آنفلوانزا A/H1N1 در راستای دست یابی به واکسن زیر واحدی فراگیر

شکوفه حاتمی^{۱*} فاطمه فتوحی^۱ مهرداد هاشمی^۲ مریم صالح^۱ الهه ناظری^۱ حدیث شکوهی^۱ بهرح فرهمند^۳

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

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

۳. استادیار بخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی انتیتو پاستور ایران، تلفن ثابت: ۰۲۱-۶۴۱۱۲۱۸۳؛ 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 ایامی های فصلی و پاندمی ها می شود. واکسن های رایج آنفلوانزا توانایی ایجاد اینمی مؤثر در برابر سویه های مختلف ویروس آنفلوانزا را ندارند. طراحی واکسن های فراگیر با استفاده از آنتی زن های حفاظت شده ویروس آنفلوانزا در جهت رفع این محدودیت می باشد. ناحیه بیرونی پروتئین M2 آنفلوانزا (M2e)، ساقه هما گلوتینین (HA2) و نوکلئوپروتئین (NP) بخش های سیار حفاظت شده در میان زیر گونه های مختلف ویروس آنفلوانزا A هستند. هدف این مطالعه، افزودن بخشی از زن NP به سازه دوتایی 3M2e-HA2 و بیان کایمر سه تایی در سیستم پروکاریوتی بود. این پروتئین نوترکیب کاندید آنتی زنی نوید بخشی برای تولید واکسن فراگیر محسوب می شود.

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

یافته ها: نتایج Colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین ترادف نشان دادند که قطعه انتخابی زن NP در وکتور نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 به درستی جایسازی شده است. بیان پروتئین کایمر توسط SDS-PAGE بررسی و با آزمایش وسترن بلاز تایید شد. **استنتاج:** طراحی و تولید پروتئین نوترکیب 3M2e-HA2-NP می تواند گام مهمی در جهت تولید واکسن فراگیر به منظور مقابله با زیر گونه های مختلف ویروس آنفلوانزا باشد.

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

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

مقدمه

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 زیروحادی نوترکیب با استفاده از پیتیدهای 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 آنفلوانزا A انسانی به شدت حفاظت شده است. آنتیژن M2e یک پیتید ۲۳ اسید‌آمینه‌ای است که در بیماری‌زایی ویروس نقش ندارد. بنابراین واکسن‌های آنفلوانزا بر پایه M2e، اینمی‌زایی پایینی دارند. آنتی‌بادی‌ها علیه M2e در سرم انسان به سختی قابل ردیابی هستند(۱۰) و (۱۱). بر همین اساس در مطالعات پیشین استراتژی‌های مختلفی برای افزایش اینمی‌زایی آنتیژن M2e، با هدف تولید واکسن مؤثر برای ویروس آنفلوانزا، به کار گرفته شده است. از جمله این استراتژی‌ها افزایش دانسیته پیتید از طریق افزایش تعداد نسخه‌ها یا پیوستن مولکول‌های حامل مانند گلوتاتیون ترانسفراز، آنتیژن HA با هسته ویروس هپاتیت B (HBcAg)، هموسیانین صدف کوهی و کمپلکس پروتئین غشای خارجی نایسیریا منژتییدیس و یا همراهی با ادجوانات‌ها 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 زیروحادی HA1 و HA2 تشکیل شده است. این دو زیر واحد توسط پیوند HA2 دی‌سولفیدی به هم مرتبط هستند(۱۳). زیروحادی HA2 ناحیه حفاظت شده ساقه هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا به شمار می‌آید که سبب ایجاد واکنش حفاظتی متقطع در بین زیرگونه‌های مختلف ویروس می‌گردد. براین اساس HA2 کاندید آنتیژنی مناسبی برای تولید واکسن فراگیرخواهد بود(۱۴-۱۵). نوکلئوپروتئین (NP)، پروتئین داخلی ویروس آنفلوانزا است که RNA ژنومی ویروس را می‌پوشاند. این

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(۱۶). ویروس آنفلوانزا از خانواده ارتومیکسویریده دارای RNA تک رشته‌ای قطعه قطعه با قطبیت منفی می‌باشد. تاکنون ۳ گونه A، B و C از RNA ویروس آنفلوانزا شناسایی شده است(۱۷). آنزیم 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 نوتریپ(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 اینمی را پیدا می‌کنند(۱۸). 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 اینمی می‌کنند(۱۹). این واکسن‌ها با کشت ویروس آنفلوانزا در تخم مرغ جنین دار و غیرفعال کردن ویروس تهیه می‌شوند. کارایی این واکسن‌ها در بهترین شرایط کمتر از ۷۵٪ می‌باشد. واکسن‌های آنفلوانزا موجود توانایی ایجاد حفاظت در برابر زیرگونه‌های دیگر ویروس آنفلوانزا را ندارند، به همین دلیل لازم است که هر ساله واکسن تازه‌ی مربوط به زیرگونه‌های جدید ویروس تولید شود. از این رو نیاز به واکسنی کارامدتر و فرآگیر وجود دارد که به تغییر هر ساله نیاز نداشته باشد(۲۰-۲۱).

واکسن‌های زیروحادی، 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

ژن NP انتخاب شد. قطعه‌ی انتخابی با استفاده از روش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی حاوی سایت برش آنزیمی مناسب تکثیر یافت. پرایمرهای با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد. توالی پرایمرهای به ترتیب زیر بود.

پرایمر Forward به طول ۲۲ نوکلئوتید و $Tm=58^{\circ}\text{C}$ دارای سایت برش آنزیمی HindIII:

F: 5'-GAAGCTTGATTATGAGGGACGG- 3'

پرایمر Reverse به طول ۲۱ نوکلئوتید و $Tm=55/3$ 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:

۰.۵ μM dNTP(۱۰ mM), ۰.۷۵ μM MgCl₂(۵ mM), ۰.۵ μM PCR buffer(10X), ۱ μM Template(۱۰۰ ng), ۱ μM Forward primer(۴۷/۷ μM), ۱ μM Reverse primer(۵۵/۲ μM)

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.

پروتئین از آنتیژن‌های اختصاصی برای تعیین گونه ویروس آنفلوآنزا 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 سلوالی را دارد. نوکلئوپروتئین از حفاظت شدگی بالایی در بین زیرگونه‌های ویروس آنفلوآنزا برخوردار است و تحقیقات پیشین نشان داده است که استفاده از واکسن‌های حاوی ژن NP می‌تواند منجر به القای اینمی حفاظتی متقطع گردد. انتخاب اپی‌توب مناسب NP می‌تواند تولید پروتئین کایمر مناسب را تسهیل نماید. اپی‌توب‌هایی در نوکلئوپروتئین وجود دارد که از بین رفتن سلوالهای آلوده و کاهش جمعیت ویروسی را در پی دارد. القای پاسخ لنفوسيت‌های T سیتوتوکسیک CTL یکی از اهداف مطالعات در زمینه تولید واکسن فراگیر آنفلوآنزا به شمار می‌رود(۱۵-۱۷).

سازه‌ی دوتایی M2e-HA2 پیش از این در آزمایشگاه تحقیقات آنفلوآنزای انسیتو 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 پروکاربیوتی بود. این پروتئین نوترکیب آنتی ژن نوید بخشی برای تولید واکسن فراگیر آنفلوآنزا محسوب می‌شود.

روش بررسی

در این پژوهش از ژن NP سویه A/H1N1(PR/8/34) و سازه‌ی دوتایی 3M2e-HA2 پیش از این در آزمایشگاه تحقیقات آنفلوآنزای انسیتو 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

جدول ۱. برنامه PCR تنظیم شده در دستگاه ترموسایکلر

سیکل	زمان	دما (C°)	فاز
۱	۵ دقیقه	۹۴	دنا توره شدن اولیه
	۳۰ ثانیه	۹۴	دنا توره شدن
۳۵	۴۵ ثانیه	۵۶	اتصال
	۲ دقیقه	۷۲	طوبیل شدن
۱	۱۰ دقیقه	۷۲	طوبیل شدن نهایی

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 غاظت 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 الحق 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 ۴°C 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 آمپیسیلین و Colony PCR با پرایمرهای اختصاصی، هضم آنزیمی با آنزیم‌های

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 نانودرآپ به کمک آنزیم T4DNA Ligase در ناقل pGEM-TEasy کلون گردید. مخلوط واکنش شامل محصول PCR خالص شده به حجم ۱ μl، پلاسمید خطی pGEM-TEasy به حجم ۱ μl، بافر ۱ μl، آب مقطر ۱ μl و آنزیم T4DNA Ligase به حجم ۱ μl (کیت لیگاسیون شرکت Promega برابر با دستور سازنده) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C قرار داده شد.

محصول واکنش اتصال در باکتری E.coli Top10F' به روش شوک حرارتی ترانسفورم شد و باکتری ترانسفورم شده در محیط LB Agar حاوی IPTG/X-Gal کشت داده شد. سپس با استفاده از روش غربالگری کلندی‌های آبی-سفید، کلندی‌های سفید که به احتمال زیاد واجد پلاسمید هدف بودند انتخاب شدند. از کلندی‌های سفید به محیط کشت LB Broth تلقیح و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C 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

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 رنگ آمیزی محلول کوماسی بلو R-250 نمایان شدند. وزن مولکولی پروتئین‌ها با نشانگر پروتئین شرکت Fermentas تخمین زده شد.

تایید بیان پروتئین با روش وسترن بلاست

پروتئین‌های الکتروفورز شده با استفاده از ژل الکتروترانسفر در شرایط نیمه خشک از ژل پلی‌اکریل‌آمید به غشاء نیتروسلولزی منتقل شدند. سپس غشا نیتروسلولز به مدت ۲۰ دقیقه در محلول مسدود‌کننده (Blocker) (۰/۵ گرم PBS(1X) در ۴°C فرار BSA در ۲۰ میلی‌لیتر) گرفت. پس از ۳ مرتبه شستشو با بافر (بافر شستشو شامل TWEEN20 ۰/۵ میکرومیتر PBS(1X) که ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS(1X) به آن اضافه شده است)، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه با آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه برچسب هیستیدینی نشاندار با آنزیم پراکسیداز (شرکت کیازن) انکوبه شد. باندهای پروتئینی موردنظر با استفاده از سویسترای دی آمینو بنزیدین (DAB) با غلظت ۰/۶ mg/ml (شرکت Sigma) آشکار گردید.

یافته‌ها

پس از بررسی‌های انجام شده توسط نرم‌افزارهای Expasy، UniProt و Imtech توالی ۳۰۰ bp (۱۵۰-۴۵۰ bp) 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 PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد در الکتروفورز محصول DNA ۱۰۰ bp شرکت Fermentas در مجاورت نشانگر DNA شرکت ۳۰۰ bp شکل ۱ نشان داده شده است. در ستون شماره ۲ و ۳ باند ۳۰۰ bp نمایان می‌باشد.

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

القای بیان پروتئین کایمر ۳M2e-HA2-NP

برای بیان پروتئین کایمر ۳M2e-HA2-NP وکتور نوترکیب pET28a-3M2e-HA2-NP به باکتری‌های مستعد شده‌ی BL21(DE3) سویه E.coli ترانسفورم و در محیط کشت LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. از کلنی‌های حاصل یک کلنی به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth واجد آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷°C قرار داده شد. پس از حصول جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر)، 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 ۴°C دور ۹۰۰ دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوز و رسوب گیری شد.

بررسی بیان پروتئین کایمر ۳M2e-HA2-NP

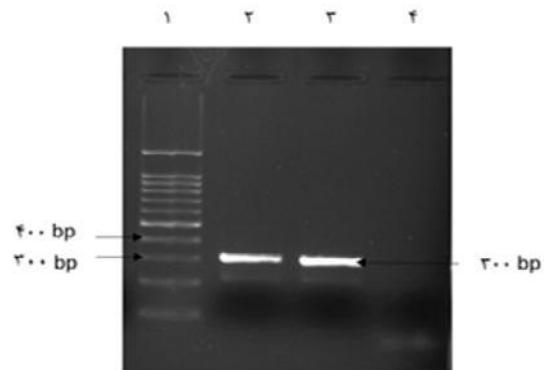
بررسی بیان پروتئین کایمر با روش SDS-PAGE انجام شد. بدین ترتیب که رسوب‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در ساعت‌های مختلف ابتدا با مقدار معین آب مقطر و بافر نمونه (sample buffer) (ترکیب بافر نمونه: ابتدا ۳/۳۸ گرم تریس در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و pH را روی ۶/۸ تنظیم و ۵ گرم SDS می‌افزاییم و سپس ۵۰ میلی‌لیتر گلیسرول و در انتهای ۰/۰۳ گرم برموفنول بلو افزوده و حجم نهایی را به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم) مخلوط و ۵ دقیقه جوشانده شد. الکتروفورز لیزات باکتریایی حاصل بر روی ژل اکریل‌آمید ۱۲ درصد به مدت ۳ ساعت با ولتاژ ۹۰ ولت انجام شد. (ترکیب بافر الکتروفورز شامل ۳ گرم پودر تریس و ۱۴/۴ گرم پودر گلایسین در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب

نمونه‌های پیش از القا و پس از القا (۴ ساعت) حاکی از افزایش تدریجی یک باند پروتئینی می‌باشد. این پروتئین در ناحیه‌ای حدود ۵۱ کیلو Dalton مشاهده گردید که با وزن مولکولی پیش‌بینی شده مطابقت دارد. (شکل ۴) بدین ترتیب بیان پروتئین کایمر تایید گردید.

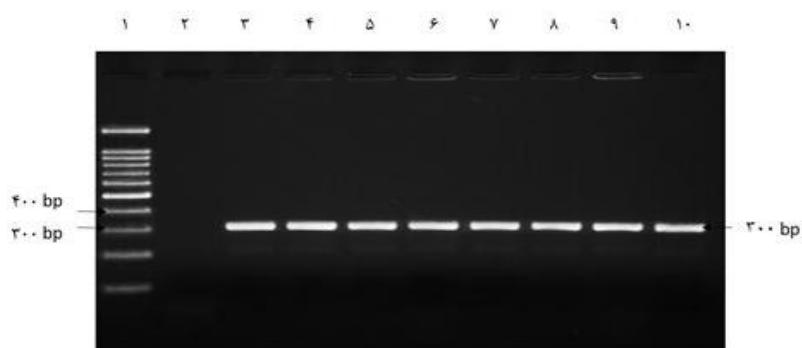
به منظور تایید نهایی پروتئین نوترکیب از آزمایش وسترن بلاط استفاده شد. در آزمایش وسترن بلاط با استفاده از 3M2e-HA2-NP تولید پروتئین کایمر Anti-His باکتری *E.coli* سویه BL21(DE3) تایید شد (شکل ۵). در اثر واکنش Ag-Ab و واکنش آنزیم با سوبسترانی رنگزا یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۵۱ کیلو Daltonی دیده شد.

محصول PCR پس از تخلیص در وکتور pGEM-TEasy کلون شد. وکتور نوترکیب Top10F' سویه *E.coli* حاصل، به باکتری Colony PCR با روشهای Top10F' سویه *E.coli* هضم آنزیمی بررسی و تایید شدند. به این ترتیب در روش قطعه Colony PCR (۳۰۰ bp) تکثیر و در هضم آنزیمی با آنزیمهای XbaI و HindIII جداسازی شد (شکل ۲ و ۳).

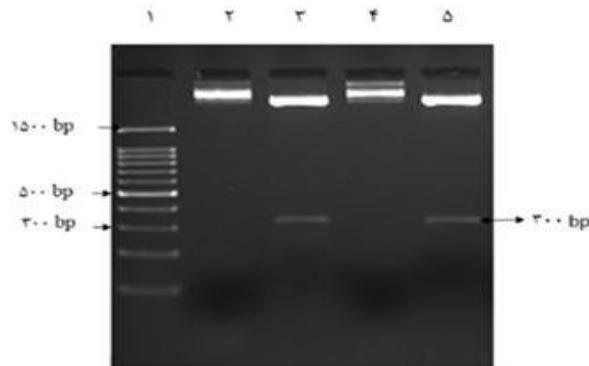
در پایان پلاسمیدهای نوترکیب به کمک تعیین ترافق تایید شدند. نتایج الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل‌آمید برای



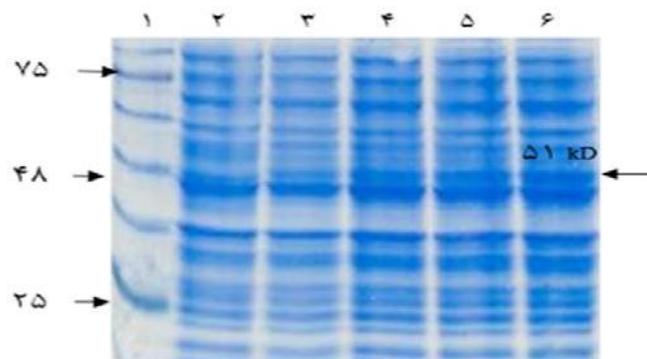
شکل ۱: نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن NP بر روی ژل آگارز ۲ درصد: ردیف ۱: نشانگر (Fermentas) 100 bp DNA (Ridif ۳)؛ ردیف ۲: محصول PCR بخشی از قطعه NP ردیف ۴: کنترل منفی



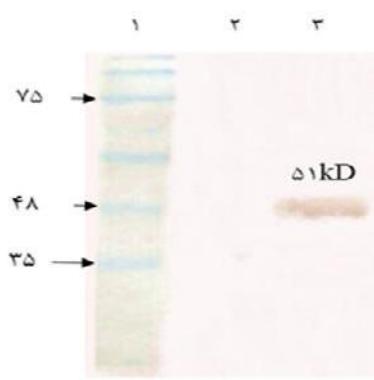
شکل ۲: نتیجه الکتروفورز محصول کلني PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد: ردیف ۱: نشانگر (Fermentas) 100 bp DNA (Ridif ۳)؛ ردیف ۲: کنترل منفی (Ridif ۱۰)؛ ردیف ۳ تا ۱۰: قطعات تکثیر شده بخشی از ژن NP را نشان می‌دهند



شکل ۳: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET-3M2e-HA2-NP با دو آنزیم XbaI و HindIII و جداسازی قطعه ۳۰۰ جفت بازی NP در کار نشانگر ۱۰۰ bp DNA (Fermentas) ۱۰۰ bp DNA ردیف ۱: نشانگر ۱۰۰ bp DNA ردیف ۲ و ۴: پلاسمید هضم نشده از کلونی های شماره ۵ و ۸ ردیف ۵ و ۳: پلاسمید هضم شده از کلونی های شماره ۵ و ۸



شکل ۴: الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) و رنگ آمیزی با کوماسی بلو برای بررسی بیان کایمرون ۳M2e-HA2-NP مربوط به کلنی شماره ۵ در سلول های BL21 قبیل و بعد از القا با IPTG (غله ۱mM) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد ردیف ۱: نشانگر پروتئینی شرکت فرمنتاز (Fermentas) ردیف ۲: نمونه قبیل از القا ردیف های ۳ تا ۶: نمونه های ۱، ۲، ۳، ۴ ساعت بعد از القا



شکل ۵: نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین کایمرون ۵۱ کیلو Daltonی با استفاده از آنتی بادی مونو کلونال ضد برقسب هیستیدین ردیف ۱: نشانگر پروتئینی شرکت فرمنتاز ردیف ۲: شاهد منفی (نمونه قبیل از القا) ردیف ۳: نمونه سازه ۳M2e-HA2-NP حاصل از کلونی های شماره ۵ در ساعت چهارم، ظهر باند پروتئین کایمرون با استفاده از Anti-His ایزوتیپ پراکسیداز و سوبستراٹ دی آمینو بنزدین

بحث

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 زیروحدی طراحی کردند. در این سازه برای افزایش ایمنی‌زیستی واکسن از دو پپتید ایمنی‌ژایی با ۳M2e و HA2 به همراه ادجوانت کلراتوکسین B (CBT) استفاده شد. نتایج ارائه شده از چالش ایمنی‌ژایی با پروتئین نوترکیب مذکور حاکی از پاسخ ایمنی همورال بسیار قوی در موش‌های واکسینه بود(۲۴). NP آنتی‌ژن داخلی ویروس آنفلوآنزا است. آنالیز توالی ژنومی NP نشانگر حفاظت شدگی بیش از ۹۰٪ در میان انواع ویروس‌های آنفلوآنزا می‌باشد. به طوری که پروتئین‌های سطحی ویروس باعث ایجاد پاسخ ایمنی همورال در میزان می‌شوند. این در حالی است که پروتئین‌های داخلی ویروس ایمنی سلولی را تحريك می‌کنند. لنفوسيت‌های T سیتوکسیک (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). در سال ۲۰۱۳، Gao xiao و همکاران از یک اپی‌توب انتخابی NP در سازه سه‌تایی 3M2e-HBc-NP بهره گرفتند تا به همراه پاسخ ایمنی همورال تحريك پاسخ ایمنی سلولی هم ایجاد شود. بررسی ایمنی‌ژایی سازه مذکور بواسطه وجود دو پپتید ایمنی‌ژایی به همراه ادجوانت پوشش ویروس هپاتیت B افزایش چشمگیر پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی را نشان داده است(۴). در این پژوهش برای افزایش ایمنی‌ژایی M2e از افزایش داسیته استفاده شد. یعنی سه نسخه ژن M2e به طور متواالی در وکتور جایسازی شد. همچنین به منظور تنوع اپی‌توبیک و در نتیجه افزایش

ویروس آنفلوآنزا دارای توانایی بالقوه در وقوع اپیدمی و پاندمی‌های گسترده می‌باشد. ویژگی دریفت و شیفت آنتی‌ژنیک در ویروس آنفلوآنزا 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(۱۶-۱۹). نخستین پاندمی قرن ۲۱ که در سال ۲۰۰۹ اتفاق افتاد به علت شیوع سویه جدید A/H1N1 بود(۲۰). بازآرایی ژنیکی در بین ۳ سویه آنفلوآنزای H5N1، H3N2 انسانی و H1N1 خوکی، پرندگان سویه مزبور را به وجود آورده بود. آمار بالای مرگ و میر در پاندمی سال ۲۰۰۹ لزوم تحقیقات گسترده در خصوص واکسن فراگیر آنفلوآنزا 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 ژنیک امکان تولید انواع واکسن فراگیر آنفلوآنزا فراهم شده است. یکی از روش‌های نوین استفاده از واکسن‌های زیروحدی نوترکیب است. در این نوع واکسن با استفاده از نواحی آنتی‌ژنیک از ژن‌های حفاظت شده ویروس می‌توان به واکسینی 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 ایمنی‌ژایی قوی است که می‌تواند سیستم ایمنی همورال را تحريك کند. زیروحد پروتئینی HA2 در مقایسه با زیروحد HA1 از حفاظت شدگی بیشتری

میزبان لیزوژیم مهارکننده‌ی T7RNAPol می‌باشد که اجازه بیان پروتئین از پرموتر T7 را بدون حضور IPTG نمی‌دهد. بر این اساس حضور IPTG بیان پروتئین مورد نظر را کنترل می‌نماید (۲۶-۲۷).

نتیجه گیری

در این پژوهش نشان داده شد که سازه نوترکیب 3M2e-HA2-NP با قابلیت بیان در سیستم پروکاریوتی به خوبی سنتر شده و همچنین وزن مولکولی مشاهده شده با مقدار پیش‌بینی 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 انسیتو پاستور ایران به شماره‌ی ۷۵۹ اجرای شده است. بدین وسیله از مساعدت و همکاری کلیه‌ی کارکنان بخش تحقیقات آنفلوانزای انسیتو پاستور ایران تقدیر می‌گردد.

ایمنی زایی پپتید HA2 در کنار 3M2e استفاده شد. و در نهایت با هدف تحریک پاسخ ایمنی سلوالی در کنار پاسخ ایمنی همورال اپی‌توپ NP نیز به سازه دوتایی 3M2e-HA2 اضافه گردید. قطعه‌ی انتخابی θن 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 قرار گیرد. همچنین توالی هیستیدینی انتهای کربوکسیل به طور دقیق در انتهای قطعه NP و پیش از کدون اختتام وکتور واقع شده است، بنابراین هیچ اسید آمینه‌ای از توالی وکتور به انتهای پروتئین‌های نوترکیب اضافه نخواهد شد. علاوه بر اینکه پروتئین‌های نوترکیب واجد دنباله‌های هیستیدینی به سهولت توسط ستون‌های Ni-NTA تخلیص می‌گردد. 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 قادر آنژیم‌های اندونوکلئاز می‌باشد. در این حالت پلاسمیدی که وارد باکتری شده، تجزیه نمی‌گردد. مهمترین مزیت این

References

- Palese P. Influenza: old and new threats. *Nat Med* 2004;10:S82-S7.
- 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.
- Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology* 2007;2:1647-89.
- 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.
- Steinhauer DA, Skehel JJ. Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet* 2002;36:305-32.
- Du L, Zhou Y, Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. *Microb Infect* 2010;12:280-6.
- Mischler R, Metcalfe IC. Inflexal® V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. *Vaccine* 2002;20:B17-B23.
- Andersson C. Production and delivery of recombinant subunit vaccines. 2000.

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, Vareková 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 Hemagglutinin 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 HI. 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.