Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۸۸/هفته اول مرداد ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۱۰

تولید پروکاریوتی پروتئین M۲ ویروس آنفلوانزا در اتصال با پروتئین شوک حرارتی لیشمانیا ماژور به منظور دستیابی به یک واکسن کارآمد

سیاوش چلبیانی[۱]، دکتر فاطمه فتوحی[۲]، دکتر امیر قائمی[۳]، مریم صالح[۴]، دکتر بهرخ فرهمند[۲]، سید محمد علی علوی اصفهانی[۱]، منصوره طباطبائیان[۵]، علی ترابی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ویروس‌های آنفلوانزا عامل عمده‌ی بیماری و مرگ و میر ناشی از بیماری‌های تنفسی در جهان به شمار می‌روند و واکسیناسیون، بهترین راه پیشگیری می‌باشد. به علت تغییرات آنتی ژنیک ویروس آنفلوانزا، بازآرایی هر ساله‌ی واکسن اجتناب ناپذیر است. یکی از روش‌های مقابله با این مشکل، طراحی واکسن با استفاده از آنتی ژن‌های حفاظت شده‌ی ویروس آنفلوانزا است. پروتئین M۲ که در پوشش ویروس، کانال یونی را تشکیل می‌دهد و با تغییرات pH باعث ورود ویروس و ایجاد عفونت در سلول‌های میزبان می‌شود، در بین همه‌ی ویروس‌های آنفلوانزای A حفاظت شده است و هدف مناسبی برای تولید واکسن با ایمنی وسیع‌الطیف می‌باشد. در این مطالعه، به منظور تولید یک واکسن کارآمد، بخشی از ژن HSP۷۰ (Heat shock proteins۷۰) لیشمانیا ماژور به ژن M۲ ویروس آنفولانزای A/H۵N۱ متصل شد و پروتئین نوترکیب کایمر در سیستم پروکاریوتی بیان گردید.

روش‌ها: برای ساخت سازه‌ی بیانی، ابتدا ژن کد کننده‌ی HSP در پلاسمید pET۲۸a در بین محل اثر آنزیم‌های BamHI و HindIII جای‌سازی گردید. سپس ژن M۲ به روش PCR (Polymerase chain reaction) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، تکثیر یافت و در محل اثر سایت آنزیمی BamHI در وکتور خطی و دفسفریله شده‌ی pET۲۸a و بالادست ژن HSP۷۰ کلون گردید. پس از تعیین ترادف و تأیید صحت کلونینگ، بیان پروتئین نوترکیب در سلول‌های BL۲۱ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج کلنی PCR و هضم آنزیمی صحت سازه‌های نوترکیب را تأیید کردند. نتایج تعیین توالی نشان داد که ژن M۲در وکتور pET۲۸a و در بالادست ژن HSP۷۰ به طور صحیح و در قاب خواندنی دنباله‌ی هیستیدینی کلون شده است. تولید پروتئین‌های نوترکیب به روش وسترن بلات (Western blot) تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های شوک حرارتی توانایی تحریک و ایجاد هر دو نوع ایمنی ذاتی و اکتسابی را دارند و اتصال آن به آنتی ژن هدف باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی می‌شود. پروتئین کایمر تهیه شده در این مطالعه، پس از تخلیص می‌تواند به عنوان یک کاندیدای واکسن زیر واحدی مناسب برای پیشگیری از عفونت آنفلوانزا در نظر گرفته شود. برای بررسی اثرات ادجوانتی HSP۷۰ لیشمانیا ماژور بر روی پروتئین M۲، ارزیابی ایمونوژنیسیتی آن در مدل‌های حیوانی در مطالعات آتی انجام خواهد شد.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا، پروتئین کایمر، M۲، HSP۷۰، واکسن زیر واحدی

ارجاع: چلبیانی سیاوش، فتوحی فاطمه، قائمی امیر، صالح مریم، فرهمند بهرخ، علوی اصفهانی سید محمد علی، طباطبائیان منصوره، ترابی علی. **تولید پروکاریوتی پروتئین M۲ ویروس آنفلوانزا در اتصال با پروتئین شوک حرارتی لیشمانیا ماژور به منظور دستیابی به یک واکسن کارآمد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۸): ؟؟

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه ویروس‌شناسی پزشکی و ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۴- کارشناس ارشد، گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۵- کارشناس آزمایشگاه، گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فاطمه فتوحی
Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

Proof Version
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزای نوع A موجب بروز بیماری تنفسی در پرندگان و پستانداران می‌شوند و همچنین می‌توانند باعث مرگ و میر مبتلایان در تمام سنین شوند. بیماری آنفلوانزا سالیانه حدود ۱۰ درصد یا به عبارت دیگر ۵۰۰ میلیون نفر از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد که باعث مرگ ۲۵۰ تا ۵۰۰ هزار نفر از مبتلایان می‌گردد (۱). بیشترین شیوع این بیماری در طی ماه‌های سرد سال اتفاق می‌افتد و به عنوان آنفلوانزای فصلی شناخته می‌شود. ویروس آنفلوانزا متعلق به خانواده‌ی ارتومیکسو ویریده می‌باشد. ویروس‌های این خانواده دارای پوشش هستند و واجد ژنوم RNA (Ribonucleic acid) تک رشته‌ای قطعه قطعه با پولاریته‌ی منفی می‌باشند. ژنوم این ویروس شامل ۸ قطعه می‌باشد که این قطعات با ترتیب اندازه، شماره‌گذاری می‌شوند و هر کدام یک یا دو پروتئین را رمزدهی می‌کنند.

آنتی بادی‌های خنثی کننده علیه دو گلیکوپروتئین سطحی هماگلوتینین و نورومینیداز تولید می‌شوند و همه‌گیری‌های ویروس آنفلوانزا مرتبط با تغییرات در ساختمان آنتی ژنیک آن‌ها می‌باشد (۳-۲). توسعه و تولید واکسنی که بتواند ایمنی وسیع‌الطیف علیه ویروس آنفلوانزای A ایجاد کند، از دیرباز مورد توجه محققان بوده است. واکسن‌های آنفلوانزایی که امروزه تولید و مصرف می‌شوند، حاوی ویروس کشته شده می‌باشند که برای جلوگیری از بیماری آنفلوانزا در جمعیت‌های انسانی، اسب و خوک مورد استفاده قرار می‌گیرند. ایمنی القا شده توسط این واکسن به واسطه‌ی القای آنتی بادی علیه دو گلیکوپروتئین سطحی ویروس در بدن میزبان صورت می‌گیرد.

واکسن‌های آنفلوانزا اغلب به صورت واکسن‌های دوتایی یا سه‌تایی ساخته می‌شوند که شامل انواع ویروس‌های در حال گردش در جامعه می‌باشند. نامتناسب بودن سویه‌ی واکسن و ویروس در حال گردش، عامل اصلی برای عدم موفقیت واکسن می‌باشد. به دلیل تغییرات آنتی ژنتیک ویروس‌های آنفلوانزای A، نیاز به بازآرایی هر ساله‌ی واکسن‌های آنفلوانزای انسانی می‌باشد. آنالیز سویه‌های در حال گردش و انتخاب سویه‌ی مناسب واکسن آنفلوانزای انسانی، توسط کمیته‌ی علمی بر اساس گزارش‌های کسب شده از شبکه‌ی آزمایشگاه‌های سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) صورت می‌گیرد. با وقوع پاندمی آنفلوانزای خوکی A/H۱N۱ در سال ۲۰۰۹ معلوم گردید که این روش برای پیشگیری از خطر بروز پاندمی چندان موفقیت‌آمیز نمی‌باشد (۵-۴).

بهترین راه حل برای مقابله با این مشکل، ساخت واکسن با استفاده از آنتی ژن‌های حفاظت شده‌ی ویروس می‌باشد. برای تهیه‌ی این واکسن‌ها نیازی به پیش‌بینی سویه‌ی در حال گردش نیست و استفاده از آن‌ها در هنگام وقوع پاندمی تا زمانی که واکسن متناسب با سویه ساخته شود، بیماری را محدود می‌کند (۶).

پروتئین M۲ که در سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا بسیار حفاظت شده است، یک پروتئین تراغشایی غیر گلیکوزیله‌ی نوع ۳ می‌باشد که می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن جامع آنفلوانزا باشد. این پروتئین که به میزان فراوانی در غشای پلاسمایی سلول‌های آلوده به ویروس بیان می‌شود، اما فقط مقدار کمی از آن (به طور متوسط

Proof Version

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

۲۰-۶ مولکول) به ذرات ویروسی ملحق می‌شود، یک کانال یونی را شکل می‌دهد که نقش مهمی در پوشش‌برداری ویروس در مراحل اولیه‌ی عفونت‌زایی آن ایفا می‌کند.

پروتئین دست نخورده‌ی M۲ به صورت یک هموترامر می‌باشد که شامل یک جفت دایمر متصل به هم است که از طریق پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند. هر مونومر آن از ۳ بخش تشکیل شده است: بخش خارج سلولی که شامل ۲۴ اسید آمینه‌ی انتهای آمینی است و M۲e نامیده می‌شود. بخش تراغشایی با ۱۹ اسید آمینه که برای فعالیت کانال یونی ضروری می‌باشد و بخش C ترمینال که ۵۴ اسید آمینه را شامل می‌شود و نقش مهمی در همانندسازی و چیدمان ویروس آنفلوانزا به عهده دارد. داروهای ضد ویروسی آمانتادین و ریمانتادین بر علیه این پروتئین وارد عمل می‌شوند. با وجود این که پاسخ‌های ایمنی اختصاصی ضد M۲ در عفونت طبیعی کم است، مطالعات متعددی نشان داده است که آنتی بادی اختصاصی که ناحیه‌ی خارج سلولی پروتئین را شناسایی می‌کند، به طور نسبی موش‌ها را در برابر چالش مرگ‌بار ویروسی محافظت می‌نماید. این پدیده، شاید به واسطه‌ی خاصیت سلول‌کشی وابسته به آنتی بادی صورت می‌گیرد (۹-۷).

یکی از نگرانی‌ها درباره‌ی واکسن‌های آنفلوانزای A بر پایه‌ی پروتئین M۲، میزان ایمنی‌زایی محدود آن‌ها می‌باشد. چندین استراتژی برای افزایش پتانسیل ایمنی‌زایی واکسن‌هایی که بر پایه‌ی پپتیدهای کوچک و ضعیف از نظر ایمنی‌زایی طراحی شده‌اند، وجود دارد. در سال‌های اخیر، پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP یا Heat shock proteins) به عنوان ادجوانت برای عرضه به همراه پپتیدهای آنتی ژنی پیشنهاد شده است. پروتئین‌های شوک حرارتی یکی از اعضای خانواده‌ی چاپرون‌های مولکولی است و ساختار ژنی آن در طی تکامل بسیار حفاظت شده است. این پروتئین‌ها که در همه‌ی ارگانیسم‌های زنده از باکتری تا انسان یافت می‌شوند و اغلب بر اساس وزن مولکولی نام‌گذاری می‌شوند، یک سیستم اولیه‌ی دفاع سلولی هستند و سلول‌ها را در برابر استرس‌های مختلف محیطی مثل گرما و غیره محافظت می‌کنند و از طریق اتصال محکم به سکانس‌های پپتیدی تازه سنتز شده (پروتئین ناقص)، مانع از تجمع و غیر عملکردی شدن آن‌ها می‌شود (۱۱-۱۰).

پروتئین HSP۷۰ از دو ناحیه‌ی اصلی شامل ناحیه‌ی آمینی (دارای فعالیت ATPase) و ناحیه‌ی کربوکسیل (ناحیه‌ی اتصال به پپتید) تشکیل می‌شود (۱۲).

در این مطالعه، بخشی از ژن HSP۷۰ لیشمانیا ماژور (کد کننده‌ی اسید امینه‌های ۲۲۱ تا ۶۰۴) به ژن M۲ ویروس آنفلوانزای A/H۱N۱ متصل شد و پروتئین نوترکیب HSP۷۰ و کایمر M۲-HSP۷۰ در سیستم پروکاریوتی بیان گردید. پروتئین کایمر تولید شده، می‌تواند پس از تخلیص به عنوان یک کاندید واکسن در نظر گرفته شود و در مطالعات آینده در مدل‌های حیوانی مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش‌ها

در این مطالعه از ژن M۲ سویه (H۱N۱) A/NewCaledonia/۲۰/۹۹ که از قبل در آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران در وکتور pcDNA کلون شده بود، استفاده شد (۱۳). ژن M۲ توسط PCR (Polymerase chain reaction) با

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر یافت تا سایت آنزیمی مناسب در دو انتهای ژن هدف ایجاد و کدون خاتمه از انتهای این ژن حذف گردد. بدین منظور، پرایمرهایی که شامل ابتدا و انتهای ژن M۲ به همراه ترادف اختصاصی ناحیه‌ی برش آنزیم BamHI بودند، طراحی گردید.

Forward :۵' TCGGATCCATGAGTCTTCTAAC ۳'

Reverse :۵' GGATCCCTTCAACTCTATGCTGAC ۳'

با استفاده از پرایمرهای سنتز گفته و مواد مورد نیاز، تکثیر ژن M۲ به روش PCR صورت گرفت. غلظت پرایمرها و مواد مورد نیاز PCR شامل ۲ pM از هر یک از پرایمرها، DNA ۵۰ ng الگو، ۱/۵ mM $MgCl_2$، dNTP mix ۲/۵ mM (Deoxyribonucleotide triphosphates) و یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز بود. حجم نهایی واکنش با آب دیونیزه به ۲۵ µl رسانده شد. برنامه‌ی دمایی مورد نیاز شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۵ °C، ۳۵ چرخه (۱ دقیقه در دمای ۹۵ °C، ۱ دقیقه در دمای ۵۵ °C و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ °C) و در نهایت، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C بود. محصول PCR بر روی ژل ۲ درصد آگارز در بافر تریس- اسید بوریک- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) با ولتاژ ۸۰ و به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه الکتروفورز شد.

جهت بررسی نتیجه‌ی الکتروفورز، ژل آگارز با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و با استفاده از دستگاه آشکارساز (شرکت Viber Lourmat) در طول موج ۲۶۰ nm مشاهده گردید. همچنین برای تشخیص اندازه‌ی مولکولی محصول PCR از نشانگر bp DNA ۱۰۰ شرکت Fermentas (SM۱۱۵۳) استفاده شد.

کلونینگ در ناقل pGEM-T Easy

برای این منظور، پلی نوکلئوتیدهای تکثیر شده با استفاده از کیت (شرکت کیاژن) از ژل آگارز استخراج و سپس در ناقل pGEM-T Easy (شرکت Promega) مطابق روش گفته شده کلون گردید و در باکتری E.coli سویه‌ی 'Top۱۰f ترانسفورم شد. با استفاده از روش غربالگری کلنی‌های آبی- سفید در محیط کشت حاوی IPTG/Xgal (Sopropyl β-D-۱-thiogalactopyranoside)، کلنی‌های سفید که احتمال می‌رود واجد پلاسمید مورد نظر بودند، انتخاب گردیدند. جهت تأیید کلونینگ، از سه روش کلنی PCR با پرایمرهای اختصاصی، هضم آنزیمی با BamHI و تعیین توالی پلاسمید نوترکیب استفاده شد.

آماده‌سازی پلاسمید pET۲۸a

یک کلنی تک از باکتری واجد پلاسمید pET۲۸a در ۷ ml محیط مایع LB (Luria-Bertani) تلقیح شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ C° در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. پلاسمید pET۲۸a با استفاده از کیت (شرکت ایناکرون) استخراج شد و پس از تعیین غلظت، در حضور آنزیم‌های محدودالاثر BamHI و HindIII هضم آنزیمی صورت گرفت و به صورت خطی شده مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت پلاسمید نوترکیب pET۲۸a-M۲-HSP۷۰

برای ساخت سازه‌ی بیانی واجد M۲ و HSP۷۰، ابتدا ژن کد کننده‌ی HSP در پلاسمید pET۲۸a جای‌سازی گردید. بدین منظور، از سازه‌ی pGEM-HSP۷۰ برای دستیابی به ژن HSP۷۰ استفاده گردید (۱۲). این سازه با آنزیم‌های BamHI و HindIII هضم گردید و قطعه‌ی

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

۱۱۵۲جفت بازی کد کننده‌ی L.major HSP۷۰ (۱۸۱۲-۶۶۱ nt) پس از استخراج از ژل در حضور آنزیم لیگاز به پلاسمید خطی شده‌ی pET۲۸a متصل و به داخل باکتری مستعد سویه‌ی 'Top۱۰f ترانسفورم شد و در محیط کشت واجد کانامایسین کشت داده شد. کلنی‌های به دست آمده در محیط مایع کشت داده شدند و پلاسمیدهای جدا شده از نظر وجود یا عدم وجود ژن با هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند.

در مرحله‌ی بعدی پلاسمید نوترکیب pET۲۸a-HSP جهت جای‌سازی ژن M۲ در بالادست ژن HSP، با استفاده از آنزیم BamHI خطی شد. پلاسمید pGEM-M۲ نیز با همان آنزیم هضم و ژن M۲ تخلیص شده در حضور آنزیم لیگاز به پلاسمید خطی شده‌ی pET۲۸a-HSP متصل گردید. از آن جایی که در این مرحله فقط از یک آنزیم برای جای‌سازی ژن هدف استفاده شد، به منظور کاهش اتصال غیر اختصاصی، پلاسمید pET۲۸a-HSP قبل از مجاور شدن با ژن هدف دفسفریله شد. برای دفسفریله کردن پلاسمید از آنزیم‌های SAP (Shrimp alkaline phosphatase) و همچنین CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد تا با برداشتن فسفات '۵ انتهایی DNA از باز اتصالی پلاسمید خطی شده جلوگیری گردد. جهت تأیید کلونینگ، از روش کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و هضم آنزیمی در حضور آنزیم‌های BamHI و HindIII استفاده شد. در نهایت پلاسمید نوترکیب pET۲۸a-M۲-HSP۷۰ با تعیین توالی نوکلئوتیدی تأیید گردید.

بیان پروتئین‌های نوترکیب

پلاسمیدهای نوترکیب pET۲۸a-HSP۷۰ و pET۲۸a-M۲-HSP۷۰ به داخل باکتری مستعد شده‌ی E.coli سویه‌ی BL۲۱ ترانسفورم شد. باکتری‌ها در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ gμ/ml کانامایسین کشت داده شد و در دمای ۳۷ C^{o} گرماگذاری شد تا زمانی که میزان جذب نمونه در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۵ برسد. سپس برای القای بیان ژن، ایزوپروپیل تیو گالاکتوزید (IPTG) با غلظت‌های مختلف ۱ mM، ۰/۵ و ۰/۲ اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۳۷ ^{o}C در انکوباتور قرار گرفتند. رسوب سلول‌های باکتریایی در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ ساعت پس از القا، جمع‌آوری و دانسیته‌ی آن‌ها با اسپکتروفوتومتر معلوم گردید.

بررسی بیان پروتئین‌های نوترکیب با روش SDS-PAGE

جهت بررسی بیان پروتئین، نمونه‌ها بر روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. ابتدا رسوب باکتری‌های جمع‌آوری شده در ساعات مختلف با بافر نمونه (Sample buffer) مخلوط و ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. پروتئین‌های پروتئینی با رنگ‌آمیزی با محلول کوماسی بلو R-۲۵۰، آشکار گردید. برای برآورد اندازه‌ی پروتئین از نشانگر پروتئینی شرکت فرمنتاز استفاده شد.

تأیید پروتئین بیان شده با روش وسترن بلات (Western blot)

پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل پلی آکریل آمید، با استفاده از دستگاه الکتروترانسفر به روی غشای نیتروسلولز منتقل شد. بیان پروتئین‌های M۲-HSP۷۰ و HSP۷۰ در باکتری Bl۲۱ با استفاده از

Proof Version

www.SID.ir

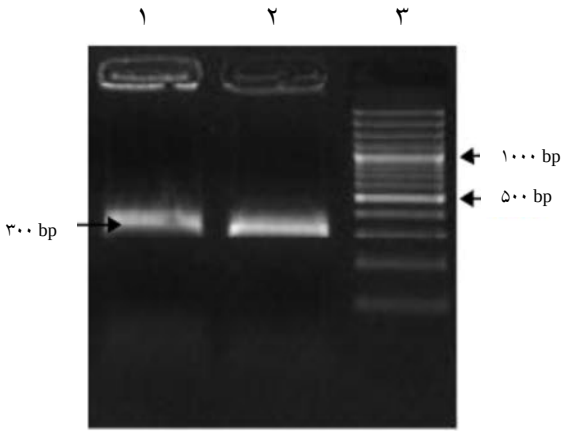
Archive of SID

آنتی بادی مونوکلونال علیه دنباله‌ی هیستیدینی صورت گرفت. این آنتی بادی که با آنزیم پراکسیداز نشاندار شده بود، با رقت ۱/۳۰۰۰ در PBS تهیه شد و باندهای پروتئینی با استفاده از سوبسترای دی آمینو بنزیدین (DAB یا ۳,۳'–Diaminobenzidine) آشکار شد.

یافته‌ها

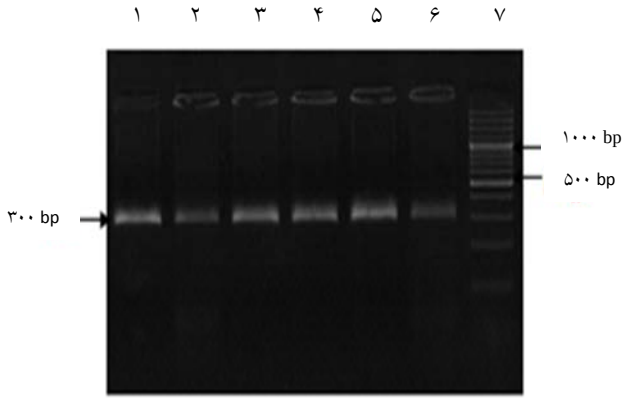
در این مطالعه، از طول کامل ژن M۲ ویروس آنفلوانزا سویه‌ی H۱N۱ که شامل ۳۰۰ جفت باز می‌باشد و ژن HSP۷۰ لیشمانیا ماژور که ۱۱۵۲ جفت باز دارد، جهت ساخت پلاسمید نوترکیب استفاده شد.

به منظور تولید پلاسمید نوترکیب pET۲۸a–M۲–HSP، در ابتدا ژن M۲ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR تکثیر داده شد. نتیجه‌ی الکتروفورز قطعه‌ی ۳۰۰ جفت بازی ژن M۲ که بر روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شد، در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱. نتیجه‌ی الکتروفورز تکثیر ژن M۲، ستون ۱ و ۲: قطعه‌ی M۲ ۳۰۰ جفت بازی، ستون ۳: نشانگر ۱۰۰ bp DNA

ژن M۲ پس از جداسازی از ژل آگارز در پلاسمید pGEMTeasy جای‌سازی شد و پس از انتقال محصول آن به باکتری E.coli سویه‌ی 'Top۱۰f، برای انتخاب کلنی مورد نظر، از روش کلنی PCR استفاده شد که نتایج آن در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲. نتایج کلنی Polymerase chain reaction (PCR) جهت تأیید جای‌سازی ژن M۲ در pGEMT vector ستون ۱-۶: محصولات PCR کلنی‌های سفید غربال شده (قطعه‌ی M۲)، ستون ۷: نشانگر ۱۰۰ bp DNA

پس از مشاهده‌ی قطعه‌ی تکثیر یافته‌ی مورد نظر، کلنی مربوط در محیط مایع کشت داده شد، پلاسمید آن استخراج گردید و با آنزیم BamHI هضم گردید که منجر به جدا سازی یک قطعه‌ی ۳۰۰ جفت بازی از پلاسمید گردید.

به منظور کلونینگ ژن HSP در پلاسمید بیانی، پلاسمید pGEM II-HSP۷۰ واجد ژن لیشمانیا ماژور با آنزیم‌های BamHI و HindIII هضم گردید و قطعه‌ی ۱۱۵۲جفت بازی کد کننده‌ی HSP۷۰ از آن جدا گردید که نتیجه‌ی الکتروفورز آن در شکل ۳ آمده است.

ژن کد کننده‌ی HSP پس از استخراج از ژل در پلاسمید pET۲۸a جای‌سازی گردید و به داخل باکتری مستعد سویه‌ی 'Top۱۰f ترانسفورم و در محیط کشت واجد کانامایسین کشت داده شد. حضور ژن HSP در پلاسمیدهای جدا شده با هضم آنزیمی

Proof Version

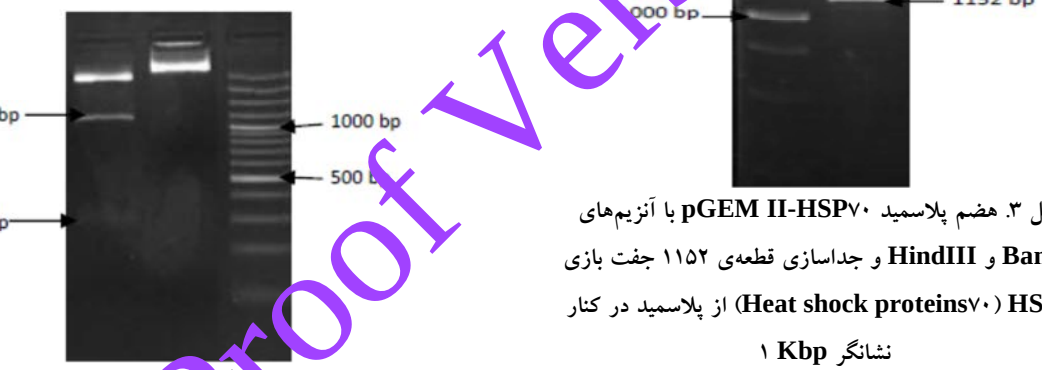
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

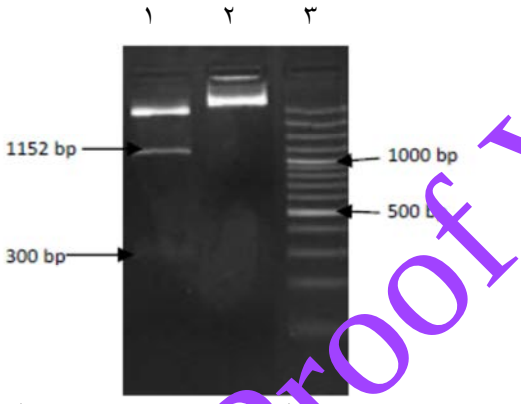
مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۴ تعدادی از این پلاسمیدها را که با هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفتند، نشان می‌دهد.

برای ساختن پلاسمید کایمر، ژن M۲ از هضم پلاسمید pGEM-M۲ با آنزیم BamHI تهیه شد. همچنین پلاسمید نوترکیب pGEM II-HSP۷۰ نیز با آنزیم پیش‌گفته برش خورد و پس از دفسفوریله شدن در حضور آنزیم لیگاز، با ژن هدف مجاور گشت تا در بالا دست ژن HSP۷۰ ساب کلون گردد. ساختار پلاسمیدی جدید به داخل باکتری E.coli سویه‌ی Top۱۰f' ترانسفورم شد و بعد از تأیید وجود ژن توسط کلنی PCR، پلاسمید نوترکیب از کلنی‌های مثبت استخراج و درستی جای‌سازی ژن‌ها توسط آنالیزهای هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های BamHI و HindIII تأیید گردید (شکل ۵).

همان‌طور که در تصویر دیده می‌شود، آنالیز آنزیمی این پلاسمیدها دو باند مورد انتظار را نشان دادند (۳۰۰ و ۱۱۵۲ جفت باز). در نهایت تعیین توالی پلاسمید نوترکیب معلوم گردانید که ژن HSP۷۰ به صورت صحیح در دنباله‌ی ژن M۲ و در یک قاب خواندنی با دنباله‌ی هیستیدینی در پلاسمید pET۲۸a جای‌سازی شده است.

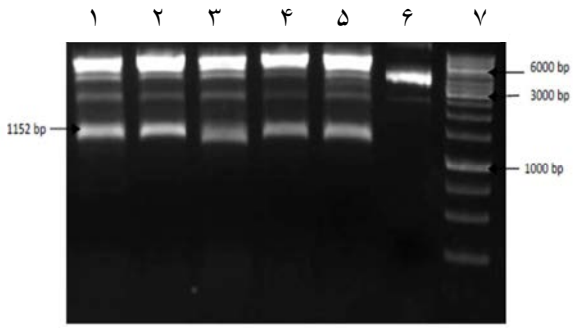


شکل ۳. هضم پلاسمید pGEM II-HSP۷۰ با آنزیم‌های BamHI و HindIII و جداسازی قطعه‌ی ۱۱۵۲ جفت بازی HSP۷۰ (Heat shock proteins۷۰) از پلاسمید در کنار نشانگر ۱ Kbp



شکل ۵. نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب با دو آنزیم BamHI و HindIII. ستون ۱: محصول هضم آنزیمی (قطعات ۳۰۰ bp و ۱۱۵۲ bp)، ستون ۲: سازه‌ی هضم نشده، ستون ۷: نشانگر ۱۰۰ bp

برای بررسی بیان پروتئین، پلاسمیدهای نوترکیب واجد ژن هدف (pET۲۸a–HSP۷۰ و HSP۷۰–M۲–pET۲۸a) در باکتری E.coli سویه‌ی BL۲۱ ترانسفورم گردید. برای القای بیان پروتئین از غلظت‌های مختلف IPTG استفاده شد و در ساعات مختلف نمونه برداشت شد و بر روی ژل ۱۲ درصد آکریل آمید در



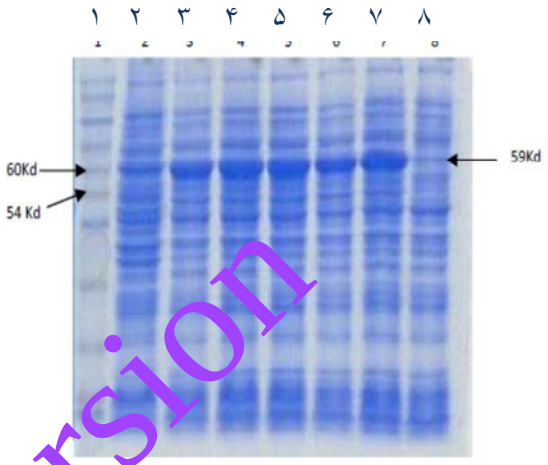
شکل ۴. هضم پلاسمیدهای pET۲۸a نوترکیب با آنزیم‌های BamHI و HindIII، قطعه‌ی ۱۱۵۲ جفت بازی HSP۷۰ (Heat shock proteins۷۰) در کنار نشانگر ۱ Kbp دیده می‌شود.

Proof Version

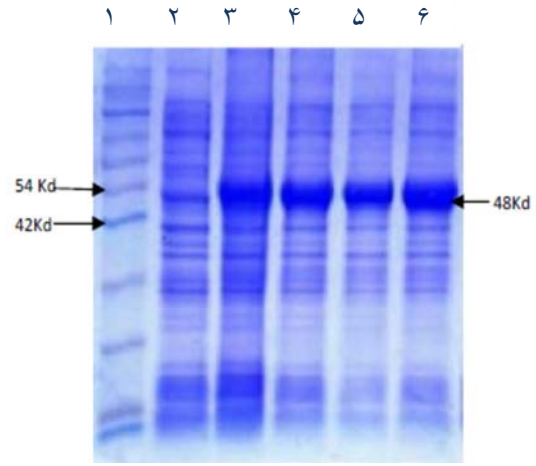
www.SID.ir

Archive of SID

حضور سدیم دودسیل سولفات الکتروفورز شد. نتیجه‌ی الکتروفورز عمودی در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که بالاترین میزان تولید پروتئین دو ساعت پس از القا با ۰/۵ mM IPTG حاصل می‌گردد.



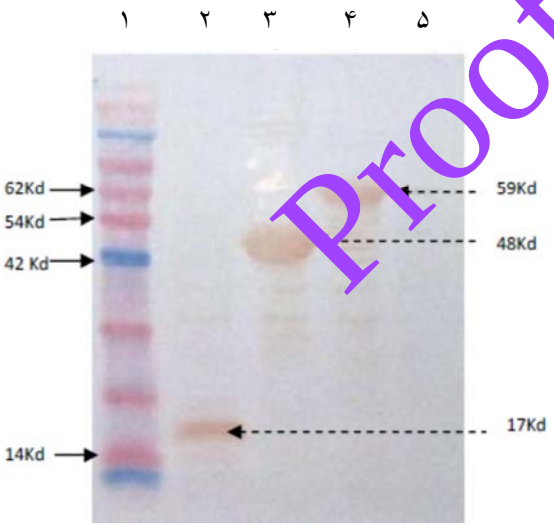
شکل ۶. نتیجه‌ی بررسی بیان پروتئین HSP۷۰-M۲ در سلول‌های BL۲۱ قبل و بعد از القا با IPTG (غلظت ۰/۵ mM) روی ژل آکریل آمید. ستون ۱: نشانگر پروتئینی، ستون ۷-۲: نمونه ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت بعد از القا، ستون ۸: نمونه‌ی قبل از القا



شکل ۷. نتیجه‌ی بررسی بیان پروتئین HSP۷۰ در سلول‌های BL۲۱ قبل و بعد از القا با IPTG (غلظت ۰/۵ mM) روی ژل آکریل آمید. ستون ۱: نشانگر پروتئینی، ستون ۲: نمونه‌ی قبل از القا، ستون ۶-۳: نمونه ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از القا

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های نوترکیب HSP و M۲-HSP با استفاده از نرم‌افزار Expasy (http://expasy.org) انجام گردید. با توجه به محل جای‌سازی ژن در پلاسمید pET۲۸a و افزوده شدن دنباله‌ی هیستیدینی در هر دو طرف پروتئین‌های نوترکیب، اندازه‌ی مولکولی مورد انتظار (۵۹ kDa برای پروتئین کایمر و ۴۸ kDa برای HSP) در روی ژل آگارز مشاهده گردید.

نمونه‌های پروتئینی که با الکتروفورز روی ژل ۱۲ درصد پلی اکریل آمید از همدیگر تفکیک شده بودند، به غشای نیتروسلولز منتقل شدند و با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ویژه‌ی دنباله‌ی هیستیدینی آزمایش وسترن بلاتینگ انجام شد (شکل ۸). پروتئین نوترکیب M۲ که در مطالعات قبل توسط علوی و همکاران در این آزمایشگاه ساخته و تأیید شده بود نیز در شکل دیده می‌شود (۱۴).



شکل ۸. نتیجه‌ی وسترن بلاتینگ پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین. ستون ۱: نشانگر پروتئینی، ستون ۲: پروتئین M۲، ستون ۳: پروتئین HSP، ستون ۴: پروتئین کایمر M۲-HSP و ستون ۵: شاهد منفی

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در مطالعه‌ی حاضر پروتئین کایمر واجد پروتئین M۲ و پروتئین HSP۷۰ (۶۰۴-۲۲۱) در سیستم پروکاریوتی بیان گردید. پروتئین M۲ که در بین تحت تیپ‌های مختلف ویروس بسیار حفاظت شده است، در عفونت طبیعی پاسخ‌های ایمنی ضعیفی ایجاد می‌کند (۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی بر علیه این پروتئین ویروسی، می‌تواند به حفاظت نسبی میزبان در برابر انواع ویروس‌های آنفلوانزا منجر شود. Slepushkin و همکاران نشان دادند که پروتئین M۲ بیان شده در سلول‌های حشرات، می‌تواند موش‌ها را در برابر چالش با تحت تیپ‌های مختلف ویروس محافظت نماید (۱۶).

همچنین Okuda و همکاران با تجویز طول کامل ژن M۲ و M۱ در قالب واکسن DNA توانستند ایمنی بادی‌های اختصاصی و همچنین پاسخ‌های سلولی را در موش‌های واکسینه شده نشان دهند (۱۷). به منظور بهینه‌سازی پاسخ‌های ایمنی اختصاصی، پروتئین M۲ و یا ناحیه‌ی خارج سلولی آن (M۲e) در کنار ترکیبات مختلفی به عنوان ادجوانت مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله اتصال چند سکانس پیوسته‌ی M۲e به پروتئین نوترکیب Onchocerca volvulus (OV-) ۱ Asp، ۱۸۲۶ CPG-ODN و یا STF۲ باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال اختصاصی ضد M۲e در مدل موشی گردید (۱۸).

یکی از ادجوانت‌های مناسب که باعث افزایش ایمنی‌زایی پروتئین هدف می‌شود، پروتئین شوک حرارتی (HSP) می‌باشد. پروتئین شوک حرارتی با عملکرد چاپرونی خود به پپتیدهای آنتی ژنی متصل می‌شود و آن‌ها را برای عرضه به لنفوسیت‌ها در اختیار MHCI (Major histocompatibility complex) قرار می‌دهد و در تحریک و تولید هر دو ایمنی ذاتی و اکتسابی نقش دارد. این پروتئین بخش مهمی از دستگاه سلولی برای فولدینگ صحیح پروتئین‌ها می‌باشد و قادر به تحریک تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی عامل نکروز دهنده‌ی تومور (Tumor necrosis factor)، اینترلوکین‌های (Interleukin) ۱، ۶ و ۱۲ و رهاسازی کموکاین‌های NO و C-C توسط مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک می‌باشد.

اثرات پروتئین شوک حرارتی به عنوان ادجوانت در واکسن‌های زیر واحدی پروتئینی و ژنی در پژوهش های مختلف مورد تأیید قرار گرفته است. مطالعات نشان داده است که تجویز همزمان پلاسمیدهای کد کننده‌ی HSP و پلاسمیدهای کد کننده‌ی آنتی ژن و یا تجویز پلاسمیدهای کایمر که شامل ژن HSP و ژن هدف می‌باشد، می‌تواند باعث تقویت ایمنی سلولی بشود (۱۹).

در مطالعه‌ای پیرامون تولید واکسن ژنی بر ضد ویروس هانتان، J۲ و همکاران نشان دادند که واکسن کایمر شامل ژن های کد کننده‌ی قطعه‌ی S ویروس و ژن HSP می تواند به طور مؤثری باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال گردد (۲۰).

پروتئین شوک حرارتی در بهینه‌سازی واکسن‌های آنفلوانزا نیز به کار گرفته شده است. ابراهیمی و همکاران، پپتید M۲e ویروس آنفلوانزا H۹N۲ را به ناحیه‌ی کربوکسیل پروتئین شوک حرارتی (HSP۷۰۳۵۹-۶۱۰) باکتری مایکوباکتریم توبرکلوزیس متصل کردند و آن را در وکتور بیانی pPICZαA

www.SID.ir
www.mui.ac.ir
Proof Version

Archive of SID

کلـون و پـروتئین مربـوط را در سـلول‌هـای مخمـر Pichia Pastoris KMV۱H بیـان کردنـد (۲۱). آن‌هـا همچنین این پروتئین را در سیسـتم پروکـاریوت نیـز بیان کردند و برای این کار از وکتور PQE۶۰ اسـتفاده نمودند (۲۲).

در این پژوهش پروتئین کایمر واجد پروتئین M۲ و پروتئین HSPV۷۰(۶۰۴-۲۲۱) لیشمانیا ماژور در سیسـتم پروکاریوتی بیان گردیـد. رأفتـی و همکـاران قطعـات متفاوت پروتئین Lm.HSPV۷۰ را مـورد بررسـی قـرار دادند و نشان دادنـد کـه ناحیـه‌ی کـد کننـده‌ی اسـید آمینه‌هـای ۲۲۱ تـا ۶۰۴ ایـن پروتئین در مقایسـه بـا قطعات C و N ترمینال آن باعث القای بهتر پاسخ‌های ایمنی هومورال می‌شود که در مورد لیشمانیا مطلـوب نبود (۱۲)؛ در حالی که در مورد آنفلوانزا پاسخ‌های آنتی بادی ویژه‌ی M۲ از اهمیـت خاصـی برخـوردار اسـت. از ایـن رو در ایـن مطالعـه، ایـن ناحیـه از Lm.HSPV۷۰ به انتهای کربوکسیل پروتئین M۲ متصل شد. در این حالت، در پروتئین کایمر نوترکیب، مشابه حالت طبیعی انتهای آمین پـروتئین M۲ آزاد اسـت و می‌تواند به صورت یک ایمونوژن قـوی و بـه عنـوان واکسن زیر واحدی عمل کند (۲۳).

واکسن‌های زیر واحدی، حاوی یک یا چند آنتـی ژن خالص و فاقد بیمـاری‌زایـی هسـتند و بـه عنـوان واکسن‌های بی‌خطر، مؤثر و پایدار از نظر آنتی ژنیـک به شمار می‌آیند که باعث به وجود آمدن پاسخ ایمنـی سـلولی و همـورال مـؤثر، مناسـب و طـولانی مـدت می‌شوند؛ در عین حـال کـه فراینـد تولیـد آن‌هـا نیـز مقرون به صرفه می‌باشد.

ناقل بیانی مناسب که به منظـور بیـان پـروتئین در سلول‌های پروکـاریوت بـه کـار مـی‌رود، بایـد دارای ویژگی‌های خاصی باشد تا بتواند امکانات مـورد نیـاز جهت رونویسی، ترجمه و بیـان ژن هـدف را فـراهم کند. یکی از مرسوم‌تـرین وکتورهـای مـورد اسـتفاده، پلاسمیدهای گروه pET می‌باشـند. ایـن پلاسـمیدها دارای منشـأ همانندسـازی مناسـب در سیسـتم پروکاریوت هستند و باکتری پذیرنـده‌ی آن‌هـا، قـادر است که مقادیر زیـادی پلاسـمید نوترکیـب را تولیـد نمایـد. همچنـین بـه واسـطه‌ی دارا بـودن پرومـوتر باکتریوفاژ T۷، قادر است ژن هـدفی را کـه در پـایین دست این پروموتر قرار گرفته است، با کـارایی بسـیار بالا بیان نماید.

در این سیستم، بیان پروتئین با افزودن IPTG القـا می‌شود. در پژوهش حاضر از وکتور pET۲۸a جهـت تولید واکسن‌های زیر واحدی اسـتفاده شـد. در ابتـدا ژن کد کننده‌ی اسید آمینه‌هـای ۲۲۱ تـا ۶۰۴ HSPV۷۰ لیشـمانیا مـاژور در پلاسـمید pET۲۸a جـای‌سـازی گردیـد. در مرحلـه‌ی بعـدی، ژن M۲ در بـالا دسـت ژن HSP و در یـک قـاب خوانـدنی بـا دنبالـه‌ی هیسـتیدینی جـای‌سـازی گردیـد. در تمـام مراحـل کلونینـگ، پلاسـمیدهای نوترکیـب بـا تعیـین تـوالی نوکلئوتیدی تأیید گردیدند. برای بیـان پـروتئین‌هـای نوترکیب HSP و کایمر M۲-HSP از بـاکتری E.coli سـویه‌ی BL۲۱ اسـتفاده شـد. سـویه‌هـای باکتریـایی BL۲۱ دارای ژن کد کننده‌ی لیـزوزیم T۷ مـی‌باشـند. این لیزوزیم مهار کننده‌ی RNA پلیمراز T۷ می‌باشـد و کمک می‌کند تا هیچ بیانی از پروموتور T۷ صـورت نگیرد تا زمانی که IPTG اضافه شود. بنابراین پـس از انتقال پلاسمید، این باکتری‌ها مـی‌تواننـد رونویسـی و بیان ژن هـدف را کـه در پـایین دسـت پرومـوتر T۷ جای‌سازی شده است، افزایش دهند (۲۴).

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

در نهایت، با توجه به توانایی جهش‌زایی و فراوانی نوترتیبی ژنتیکی در ویروس‌های آنفلوانزا، طراحی واکسنی که فرمولاسیون ثابتی داشته باشد و ایمنی متقاطع قابل قبولی در برابر تحت تیپ‌های مختلف ویروس ایجاد کند و بتوان جهت پیشگیری از اپیدمی‌های آنفلوانزا و حتی پاندمی‌های احتمالی از آن بهره جست، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه، ما به طور موفقیت‌آمیزی پروتئین کایمر M۲–HSP۷۰ را در سیستم بیانی پروکاریوتی بیان کردیم. آنالیزهای SDS-PAGE و وسترن بلات بیان پروتئین نوترکیب را تأیید کردند. اما برای حضور آن به عنوان یک کاندیدای واکسن جامع بر علیه ویروس آنفلوانزای A و بررسی اثرات ادجوانتی HSP۷۰ لیشمانیا ماژور بر روی پروتئین M۲، ارزیابی ایمونوژنیسیتی آن در مدل‌های حیوانی ضروری می‌باشد و در مطالعات آتی انجام خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی و مساعدت معاونت پژوهشی و بر اساس طرح مصوب انستیتو پاستور ایران به شماره‌ی ۶۱۱ انجام پذیرفته است. نویسندگان از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی آنفولانزا کمال تشکر را دارند.

References

1. Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. Am J Med 2008; 121(4): 258-64.
2. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. Nat Rev Genet 2007; 8(3): 196-205.
3. Zimmer G. RNA replicons - a new approach for influenza virus immunoprophylaxis. Viruses 2010; 2(2): 413-34.
4. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. Scand J Immunol 2004; 59(1): 1-15.
5. Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. Vaccine 2003; 21(16): 1776-9.
6. Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78(7): 4170-4.
7. Wu F, Huang JH, Yuan XY, Huang WS, Chen YH. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. Vaccine 2007; 25(52): 8868-73.
8. Zebedee SL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. J Virol 1988; 62(8): 2762-72.
9. Treanor JJ, Tierney EL, Zebedee SL, Lamb RA, Murphy BR. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. J Virol 1990; 64(3): 1375-7.
10. Torok Z, Tsvetkova NM, Balogh G, Horvath I, Nagy E, Penzes Z, et al. Heat shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(6): 3131-6.
11. Tamura Y, Saito K, Sato N. Heat shock protein inhibitor for molecular targeting therapy. Nihon Rinsho 2012; 70(Suppl 8): 135-9. (In Japanese).
12. Rafati S, Gholami E, Hassani N, Ghaemimanesh F, Taslimi Y, Taheri T, et al. Leishmania major heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. Vaccine 2007; 25(21): 4159-69.
13. Esghaei M, Monavari SH, Tavassoti-Kheiri M, Shamsi-Shahrabadi M, Heydarchi B, Farahmand B, et al. Expression of the influenza M2 protein in three different eukaryotic cell lines. J Virol Methods 2012; 179(1): 161-5.
14. Alavi-Esfahani MA, Fotouhi-Chahooki F, Saleh M, Tavakoli R, Farahmand B, Ghaemi A, et al. Over expression of influenza virus M2 protein in prokaryotic system. Iran J Virol 2012; 6(4):

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

13-9
15. Fu TM, Freed DC, Horton MS, Fan J, Citron MP, Joyce JG, et al. Characterizations of four monoclonal antibodies against M2 protein ectodomain of influenza A virus. Virology 2009; 385(1): 218-26.
16. Slepushkin VA, Katz JM, Black RA, Gamble WC, Rota PA, Cox NJ. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. Vaccine 1995; 13(15): 1399-402.
17. Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamajima K, et al. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. Vaccine 2001; 19(27): 3681-91.
18. Zhao G, Du L, Xiao W, Sun S, Lin Y, Chen M, et al. Induction of protection against divergent H5N1 influenza viruses using a recombinant fusion protein linking influenza M2e to Onchocerca volvulus activation associated protein-1 (ASP-1) adjuvant. Vaccine 2010; 28(44): 7233-40.
19. Chen W, Lin Y, Liao C, Hsieh S. Modulatory effects of the human heat shock protein 70 on DNA vaccination. J Biomed Sci 2000; 7(5): 412-9.
20. Li J, Li KN, Gao J, Cui JH, Liu YF, Yang SJ. Heat shock protein 70 fused to or complexed with hantavirus nucleocapsid protein significantly enhances specific humoral and cellular immune responses in C57BL/6 mice. Vaccine 2008; 26(25): 3175-87.
21. Ebrahimi SM, Tebianian M, Toghyani H, Memarnejadian A, Attaran HR. Cloning, expression and purification of the influenza A (H9N2) virus M2e antigen and truncated Mycobacterium tuberculosis HSP70 as a fusion protein in Pichia pastoris. Protein Expr Purif 2010; 70(1): 7-12.
22. Ebrahimi SM, Tebianian M. Heterologous expression, purification and characterization of the influenza A virus M2e gene fused to Mycobacterium tuberculosis HSP70(359-610) in prokaryotic system as a fusion protein. Mol Biol Rep 2010; 37(6): 2877-83.
23. Shaw A. Conserved proteins as potential universal vaccines. In: Rappuoli R, Giudice GD, editors. Influenza vaccines for the future. New York, NY: Springer; 2011. p. 313-25.
24. Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in E. coli. Curr Protoc Protein Sci 2010; Chapter 5: Unit 5.24.1-29.

Proof Version

www.SID.ir