TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرداد ۱۳۹۳، دوره ۷۲، شماره ۵، صفحه‌های ۲۹۴ تا ۳۰۰ مقاله اصیل

طراحی، ساخت و بیان وکتور نوترکیب ژن نوکلئوپروتیین ویروس هاری

خدیجه فنائی[۱]، مهدی آجورلو[۲و۳]
سید حمیدرضا مژگانی[۴]
شیوا ایرانی[۱]، علیرضا غلامی[۲و۵*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۲- آزمایشگاه پژوهش و ساخت واکسن هاری انسانی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۳- گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران.
۴- گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۵- بخش تحقیقات و مرکز رفرانس هاری WHO، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیقات و مرکز رفرانس هاری WHO
تلفن: ۶۶۴۰۳۴۹۶-۰۲۱
E-mail: agholami@pasteur.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۰۱ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۸ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۴/۲۵

زمینه و هدف: هاری (Rabies) یک آنسفالیت حاد است که سالانه سبب مرگ بیش از ۶۰،۰۰۰ انسان در جهان می‌شود. تنها راه نجات بیماران استفاده‌ی به‌موقع از واکسن‌های کارآمد است. هدف از این مطالعه معرفی یک سیستم بیانی یوکاریوتی جدید به‌منظور بیان ژن نوکلئوپروتیین (N) ویروس هاری می‌باشد. این سیستم جهت ارزیابی و ساخت واکسن ضد هاری به‌کار می‌رود.

روش بررسی: توالی کامل ژن N سویه PV ویروس هاری به‌روش Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) تکثیر و در وکتور pCDNA3.1(+) کلون شد. پس از هضم آنزیمی ژن از وکتور خارج و تعیین توالی شد. لکن به‌دلیل وجود موتانت در توالی آن، ژن مذکور به‌صورت وکتور نوترکیب pGH/N خریداری شد. pGH/N تکثیر و پس از هضم آنزیمی آن، ژن N مجدد در وکتور بیانی pCDNA3.1(+) کلون و کلونینگ تایید شد. وکتور نوترکیب pCDNA3.1 (+)/N به سلول‌های BSR کشت داده شده منتقل و بیان پروتیین N با روش آنتی‌بادی فلورسنت (FAT) بررسی و تایید شد.

یافته‌ها: تعیین توالی ژن تکثیر شده با RT-PCR وجود جهش در ژن را مشخص نمود. هضم آنزیمی و خارج شدن ژن N از وکتور pGH/N خریداری شده و وکتور نوترکیب pCDNA3.1 (+)/N کلونینگ ژن N و نتایج الکتروفورز تکثیر ژن نوکلئوپروتیین را تایید کرد. کلونینگ مجدد ژن N در وکتور بیانی pCDNA3.1(+) با روش هضم آنزیمی و کنترل سریع (Quick check) نیز تایید و بیان پروتیین N در سلول‌های BSR با استفاده از پادتن اختصاصی و میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد پروتیین N ویروس هاری سویه PV، در سیستم بیانی یوکاریوتی pCDNA3.1(+) طراحی شده کلون شده و می‌تواند بیان شود.

کلمات کلیدی: ویروس هاری، نوکلئوپروتیین، وکتور نوترکیب، بیان ژن.

مقدمه

بیماری هاری (Rabies) توسط گونه‌های متعدد از جنس لیساویروس، خانواده‌ی رابدوویریده و رده‌ی مونونگاوایرال ایجاد می‌شود.[۱] هاری یک بیماری ویروسی مشترک بین انسان و دام است که گوشت‌خواران اهلی و وحشی نقش مهمی در انتقال آن بازی می‌کنند.[۲] هاری موجب آنسفالیت حاد سیستم عصبی مرکزی و مرگ محتوم فرد آلوده‌شده می‌شود.[۳] شیوع بیماری هاری در حیوانات و انسان، به‌ویژه در مناطق فقیر کشورهای در حال توسعه، کماکان به‌عنوان یک تهدید جهانی برای بهداشت عمومی است. به‌طور تخمینی، سالانه بالغ بر ۶۰ هزار نفر به‌دلیل ابتلای به هاری در دنیا فوت می‌کنند.[۴و۵] حدود ۶۰٪ مرگ‌ومیرها در آسیا اتفاق می‌افتد.[۶و۷]

Archive of SID
www.SID.ir

هرچند که تا به امروز آنسفالیت ناشی از هاری غیر قابل درمان است، آگاهی نسبت به بیماری و استفاده از واکسن بهترین راه مقابله با این بیماری می‌باشد.[۸] اگر چه واکسن‌های موثر قابل دسترسی وجود دارد، برای مقابله با هاری هزینه بالایی در طی تولید و مدیریت واکسن باید پرداخت شود. افزایش شیوع و کشف سویه‌های جدید ویروس‌های خانواده هاری، نیاز به واکسن‌های ایمن، موثر و در حد امکان ارزان‌تر را می‌طلبد. یکی از رویکردهای مورد توجه جهت دستیابی به کیفیت و کمیت بیان شده از طریق ساخت انواع نوترکیب واکسن هاری است.[۹و۱۰]

در حال حاضر واکسن‌های ضد هاری دامی فقط به‌صورت غیرفعال یا واکسن زنده تخفیف حدت یافته استفاده می‌شوند که فرایند غیرفعال کردن آن توجه به ملاحظاتی را موجب می‌شود.[۹و۵] ویروس هاری محتوی یک ژنوم تک رشته RNA خطی منفی (-ssRNA) است. RNA ژنومی ویروس، پنج ژن N، P، M، G و L را کد می‌کند.[۴و۱۱] گلیکوپروتیین G ویروس هاری به‌عنوان آنتی‌ژن اصلی قادر است تولید آنتی‌بادی خنثی‌کننده ویروس را موجب شود.

واکسن‌های نوترکیب در مقابل هاری بر اساس آنتی‌ژن G پایه‌گذاری شده است، اما ایمنی در مقابل هاری فقط وابسته به سطوح آنتی‌بادی القاشده توسط پروتیین G نمی‌باشد. علاوه بر این، تنوع ژنتیکی گلیکوپروتیین G بر اساس موقعیت‌های جغرافیایی مختلف و گونه‌های ویروس هاری بالقوه ممکن است در پوشش ایمنی کامل بروز اشکال نماید. ثبات بالای آنتی‌ژنی N این پروتیین را به‌عنوان یک کاندید دیگر برای توسعه واکسن هاری معرفی کرده است.[۵و۹]

ژن N محتوی ۱۳۵۳ نوکلئوتید و پروتیین N ۴۵۰ اسیدآمینه دارد.[۷و۱۲] پروتیین N جزو داخلی پروتیینی مهم از کمپلکس ریبونوکلئوپروتیین (RNP) ویروس است. این پروتیین در یک ساختار بسیار پایدار و به‌شدت کپسیده در داخل ژنوم به‌صورت سازمان‌یافته و کارآمد قرار دارد.[۵و۱۳] همچنین ژن N از نظر ساختاری و نیز از نظر آنتی‌ژنتیسیته بیشتر از سایر ژن‌ها حفاظت شده است. حفاظت در سطح توالی نوکلئوتیدی آن (۹۱/۲٪) و در سطح توالی آمینواسید حاصله (۹۶٪) می‌باشد.[۱۴-۱۷]

هدف از این مطالعه طراحی و ساخت یک سازه بیان‌کننده ژن N از سویه PV (سویه فیکس‌شده و واکسینال) ویروس هاری و تایید بیان آن در مدل یوکاریوتی سلول‌های BSR است که کلونی از سلول‌های Baby Hamster Kidney (BHK) می‌باشد.

روش بررسی

الف) ویروس، پلاسمیدها و سلول: سویه PV ویروس هاری (اهدایی از بخش واکسن‌های ویروسی انستیتو پاستور واقع در شهر کرج و کشور ایران) و با تزریق ویروس در مغز موش شیرخوار تکثیر شدند. پس از حدود هشت روز بافت مغز از موش‌های بیمار جدا و جهت ساخت یک سوسپانسیون هموژنیزه شد

به‌کمک سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی به‌صورت رسوب در آمده و محلول رویی محتوی ویروس در فریزر ۷۰- ºC تا زمان مورد نیاز ذخیره گردید. باکتری ایشرشیاکلی سویه TOP10 (اهدایی از بخش واکسن‌های ویروسی انستیتو پاستور، کرج)، پلاسمید pCDNA3.1(+) (اهدایی از بانک سلولی دانشگاه تربیت مدرس، تهران) و پلاسمید pGH/N (GENE-RAY, Hong Kong, China) تهیه شده و بر اساس تکنیک‌های استاندارد تکثیر شدند.

سلول‌های BSR کلونی از سلول‌های BHK (اهدایی از بخش واکسن‌های ویروسی انستیتو پاستور، کرج) تهیه و در محیط کشت DMEM (Gibco-Invitrogen) با FBS ۵٪ در شرایط استریل کشت داده شدند.

ب) کلونینگ ژن N سویه PV ویروس هاری: کل RNA از نمونه‌های بافت مغز موش عفونی‌شده با سویه PV ویروس هاری، با استفاده از کیت RNX-PLUS (Cinna Gen Inc., Tehran, Iran) و بر اساس دستورکار شرکت سازنده استخراج گردید. همه نمونه‌های RNA در ۷۰- ºC تا زمان استفاده برای Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ذخیره شد. سنتز cDNA با پرایمرهای Random Hexamer (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania) انجام شد. ORF ژن N سویه PV ویروس هاری از RNA ویروس با پرایمرهای (F: 5′- AAAAAACTAGCTAGCGTAACACCTCTA CAATGGATGC- 3′، R: 5′- AAAAAACGGGATCCTTCTTA TGAGTCACTCGAATATG- 3′) به‌وسیله PCR تکثیر شد.

تمام طول cDNA نوکلئوپروتیین سویه PV ویروس هاری در پلاسمید pCDNA3.1(+) کلون شد و در پی آن pCDNA3.1 (+)/N

Archive of SID

www.SID.ir

نامیده شد. تایید کلونینگ با روش هضم آنزیمی و کنترل سریع انجام شد. کشت مجدد کلونی تک از باکتری‌های حاوی وکتور نوترکیب pCDNA3.1(+)/N انجام شد. توالی‌های نوکلئوتیدی cDNA داخل شده توسط شرکت مشخص شد. این توالی با توالی ژن N سویه PV (Gene bank no: JX276550.1) مقایسه شده و وجود موتانت‌هایی در آن مشخص شد. نظر به اهمیت صحت پروتیین بیان شده در مراحل بعدی این مطالعه، ژن N سویه PV به‌صورت وکتور pGH/N خریداری شد. کلونینگ با روش‌های استاندارد انجام شد و هضم آنزیمی با آنزیم‌های NheI و BamHI روی وکتور نوترکیب pGH/N صورت گرفت. پس از الکتروفورز محصول هضم آنزیمی مرحله قبل، ژن N از روی ژل بازیافت شده و در وکتور pCDNA3.1(+) مجددا کلون شد. به‌دنبال آن کلونینگ با روش هضم آنزیمی و کنترل سریع تایید شد.

ج) انتقال ژن به سلول: دو روز قبل از عمل انتقال ژن سلول‌های BSR کشت داده شده تریپسینه شدند (0.25% trypsin-EDTA, Invitrogen). سلول‌های تریپسینه شده به پلیت‌های شش‌خانه مخصوص کشت سلولی (Greiner) منتقل گردیدند و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ ºC انکوبه شدند. هنگامی که ۹۰-۷۵٪ از مقطع چاهک‌ها پر شدند به تعدادی از آنها وکتور نوترکیب pCDNA3.1 (+)/N با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen) طبق دستورکار شرکت سازنده ترانسفکت شد.

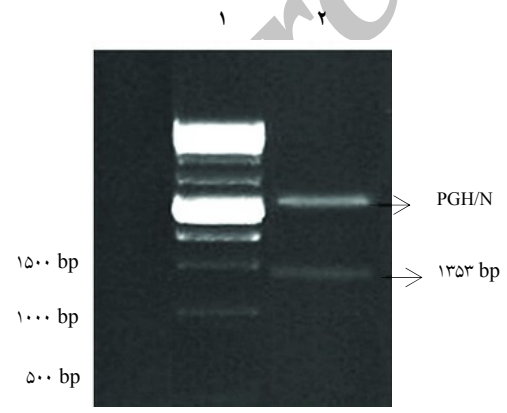
ه) آنالیز بیان ژن نوکلئوپروتیین ویروس هاری سویه PV در سلول‌های BSR با روش آنتی‌بادی فلورسنت (FAT): سلول‌های BSR حاوی وکتور نوترکیب pCDNA3.1 (+)/N در شرایط استریل کشت داده شده و ۴۸ ساعت در ۳۷ ºC انکوبه شد. به‌عنوان کنترل منفی، به تعدادی از چاهک‌ها وکتور اضافه نگردید. سپس کلیه نمونه‌ها یک تا دو ساعت با استون سرد فیکس شدند. پس از خشک شدن استون، نمونه‌ها با آنتی‌بادی ضد ریبونوکلئوکپسید کونژوگه با FITC (BioRad cat no:357-2112) یک ساعت در ۳۷ ºC انکوبه شدند. نمونه‌ها پس از شستشو با آب تامپون با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده گردید.

یافته‌ها

تکثیر ژن N ویروس هاری سویه PV با روش RT-PCR: نتایج الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد ژن N ویروس هاری سویه PV به‌روش RT-PCR تکثیر شده به‌نحوی که باند مربوطه (bp ۱۳۵۳) در حوالی طول مورد نظر مربوط به این ژن مشاهده شده بود. تایید کلونینگ ژن نوکلئوپروتیین ویروس هاری سویه PV با روش کنترل سریع: نتایج الکتروفورز بر روی ژل آگارز، کلونینگ ژن نوکلئوپروتیین در وکتور pCDNA3.1(+) و تشکیل وکتور نوترکیب pCDNA3.1(+)/N را نشان داد. در روش کنترل سریع قرار گرفتن نمونه‌ها در باند بالاتر نسبت به وکتور خطی شده حاکی از کلونینگ ژن N در وکتور pCDNA3.1(+) بود. تایید بعدی کلونینگ با هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pCDNA3.1 (+)/N نیز روی ژل الکتروفورز مشخص شد. مشاهده باند bp ۱۳۵۳ حاکی از خارج شدن ژن N از وکتور نوترکیب pCDNA3.1 (+)/N می‌باشد.

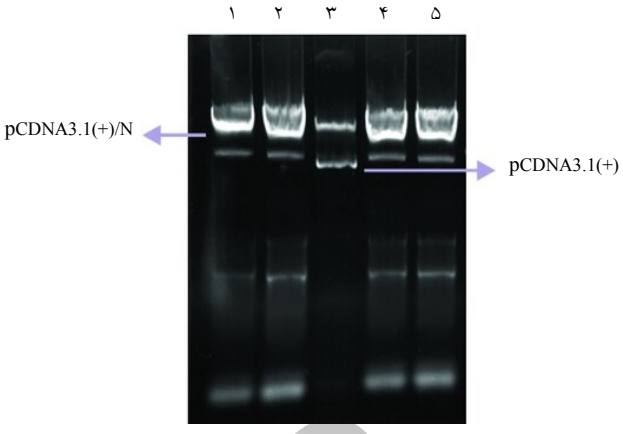
نتایج تعیین توالی وجود موتانت را در ژن تکثیر شده مشخص نمود، از این‌رو ژن به‌صورت وکتور نوترکیب pGH/N جهت سنتز به شرکت Generay ارسال گردید. هضم آنزیمی روی وکتور نوترکیب pGH/N، خارج شدن ژن N را از وکتور pGH/N، روی ژل آگارز نشان داد (شکل ۱).

نتایج الکتروفورزی روی ژل آگارز کلونینگ مجدد ژن N در وکتور pCDNA3.1(+) و حاصل شدن وکتور نوترکیب pCDNA3.1 (+)/N را با دو روش هضم آنزیمی و کنترل سریع نشان داد (شکل ۲).



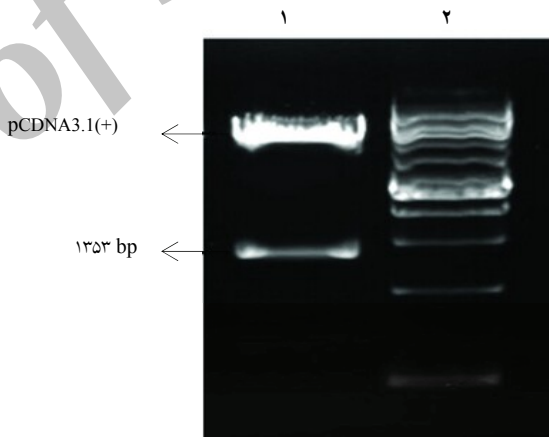
شکل ۱: هضم آنزیمی با آنزیم‌های NheI و BamHI جهت خارج‌کردن ژن N از وکتور PGH/N. ۱- ژن N خارج‌شده از وکتور PGH/N. ۲- مارکر از پایین به بال به‌ترتیب، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ باز می‌باشد.

www.SID.ir



شکل ۲: تایید کلونینگ ژن N در وکتور pCDNA3.1 (+) با روش کنترل سریع

نمونه‌های ۱ و ۲ و ۴ و ۵ کلونی تک کشت داده شده pCDNA3.1 (+)/N می‌باشد.
نمونه ۳ محصول وکتور خطی‌شده قبل از کلونینگ است.

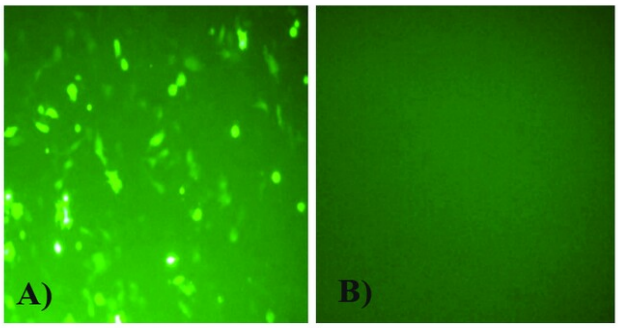


شکل ۳: تایید کلونینگ ژن N در وکتور pCDNA3.1 (+) با روش هضم آنزیمی

۱- ژن N خارج‌شده به‌همراه وکتور خطی‌شده pCDNA3.1 (+)
۲- مارکر از پایین به بالا به‌ترتیب، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ باز می‌باشد.

بر اساس محل قرارگیری نمونه‌ها روی ژل در مقایسه با وکتور، ژن N در وکتور pCDNA3.1(+) کلون شده است (شکل ۳).

تایید بیان پروتیین ژن نوکلئوپروتیین ویروس هاری سویه PV در سلول‌های BSR با روش FAT : مشاهدات با میکروسکوپ فلورسنت با استفاده از آنتی‌بادی ضد ریبونوکلئوکپسید کونژوگه با FITC نشان داد که پروتیین نوکلئوپروتیین ویروس هاری سویه PV در سلول‌های BSR



شکل ۴: تایید بیان پروتیین N در سلول‌های BSR با آنتی‌بادی ضد ریبونوکلئوکپسید کونژوگه با FITC (تست FAT)

A: سلول‌های BSR حاوی وکتور نوترکیب pCDNA3.1(+)/N
B: نمونه کنترل منفی سلول‌های BSR

بیان شده است. در نمونه‌های کنترل منفی در سلول‌های BSR هیچ‌گونه بیان پروتیین و اتصال با آنتی‌بادی نشاندار مشاهده نشد (شکل ۴).

بحث

از مزایای نوکلئوپروتیین ویروس هاری (N) داشتن خواص سوپرآنتی‌ژنی است که به‌تنهایی قابلیت فعال‌کردن سلول‌های لنفوسیت B جهت تکثیر آنها و تولید آنتی‌بادی‌های (IgM) را دارد. در نتیجه هم پاسخ‌های قوی ایمنی سلولی و هم پاسخ‌های ایمنی هومورال قوی، اختصاصی و طولانی‌مدت را علیه ویروس هاری القا می‌کند. همان‌گونه که در واکسن‌های ویروسی نوترکیب N یا پروتیین خالص‌شده N، القای ایمنی حفاظتی علیه عفونت کشنده هاری، در موش‌ها و سگ‌ها تایید شده است.[۱۲و۱۵و۱۸]

در یک مطالعه در سال ۱۹۹۱ توسط FU و همکاران، پروتیین N را به‌روش کروماتوگرافی گرایشی خالص و آنالیز بعدی پروتیین با الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن‌بلات انجام شد.[۱۳] در مطالعه بعدی توسط Goto و همکاران در سال ۱۹۹۵ تمام پروتیین‌های باکتری ایکلای بیان‌کننده ژن N با الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن‌بلات آنالیز شد.[۱۸]

در این پژوهش نیازی به خالص‌سازی پروتیین N نبود و تایید بیان پروتیین N در داخل سلول با روش Fluorescent Antibody Test

Archive of SID

www.SID.ir

(FAT) انجام شد. این روش استاندارد طلایی و ارزان، برای تشخیص آلودگی سلول به آنتی‌ژن‌های ویروس هاری توسط WHO و World Organization for Animal Health (OIE) توصیه شده و به‌طور گسترده برای تشخیص واکسن هاری (Rabies) استفاده می‌شود که در ۹۹-۹۵٪ موارد، نتیجه قابل اعتماد در عرض چند ساعت به‌دست می‌آید.

این روش ممکن است به‌صورت مستقیم روی اسمیر و نیز برای تایید حضور آنتی‌ژن Rabies در محیط کشت یا در بافت مغز موش، که به‌منظور تشخیص تلقیح شده، استفاده شود و در انسان سریعترین، حساسترین و اختصاصی‌ترین روش تشخیصی می‌باشد.[۱۹] پلاسمید استفاده شده در این پژوهش pcDNA3.1 بوده که حاوی پروموتر قوی CMV و توالی‌های پلی A و Origin مربوط به ColE1 می‌باشد و به‌علت داشتن Open reading frame (ORF) آمپی‌سیلین، امکان گزینش باکتری‌های حاوی پلاسمید مربوطه را فراهم می‌سازد. همچنین این وکتور دارای مبدا همانندسازی پروکاریوتی و یوکاریوتی است. بدین‌ترتیب وکتور حاوی ژن هدف در سیستم پروکاریوت تکثیر نموده، برای بیان پروتیین در داخل سیستم یوکاریوت از آن استفاده شد.

در پژوهش Liu، N نوترکیب خالص‌شده از سلول‌های حشرات قادر به باند شدن به RNA ویروس در In vitro است و حدود ۶۰٪ به‌شکل نوکلئوکپسید و همراه با mRNA حشرات می‌باشد.[۱۶] به‌دلیل امکان عدم پردازش صحیح پروتیین بیان‌شده در سیستم‌های بیانی حشرات و باکتری‌ها، تایید بیان پروتیین N در این پژوهش در سلول‌های BSR صورت گرفت. همچنین، اکثر واکسن‌های ویروسی کلاسیک تولیدشده در سلول‌های پستانداران تولید می‌شود. با توجه به این موضوع، از سلول ذکر شده جهت بیان N استفاده و توسط آنتی‌بادی اختصاصی پلی‌کلونال بیان آن ارزیابی شد. یکی از معایب سیستم‌های سلول جانوری سرعت رشد و حداکثر تراکم سلولی بسیار کمتر از سایر سلول‌ها است.

بنابراین، بازده تولید پروتیین نوترکیب با محدودیت مواجه می‌شود. به‌منظور افزایش بازدهی در این موارد، از حامل‌های بیانی و ژن‌های کلون شده تحت کنترل یک پروموتر قویتر استفاده می‌شود (REF). از طرف دیگر، تولید پروتیین نوترکیب با این روش بسیار گران است، زیرا تایید عدم همراه شدن احتمالی ویروس‌های جانوری با محصول خالص‌سازی شده، به آزمایش‌های کنترل کیفیت گسترده نیاز دارد.[۲۰] بیان پروتیین حاصل در سیستم جانوری و تایید با پادتن اختصاصی موید این است که N با درستی پردازش می‌شود. با توجه به اینکه تکثیر کاست ژنی مربوطه در سیستم‌های پروکاریوت انجام می‌شود، معایب بیان‌شده برای تولید در سیستم‌های جانوری فرا روی این روش نخواهد بود.

Iseni و همکاران به این نتیجه رسیدند که پروتیین P پروتیین N را در حالت محلول نگه می‌دارد و در غیاب P، پروتیین N به‌تنهایی به‌شکل پلیمریزه و بدون RNA بیان می‌شود و به‌شکل حلقوی و رسوب وجود دارد. این نتیجه مورد توافق عموم است.[۲۱] در سیستم‌های بیانی مینی‌ژنومی به‌طور معمول بیان ژن‌های N و P با هم در نظر گرفته می‌شود، زیرا پروتیین P از طریق واکنش با پروتیین N، مناطق اختصاصی RNA ژنومی را جهت کپسیده شدن توسط پروتیین N، به‌آن عرضه می‌کند. در واقع پروتیین P به‌عنوان یک چاپرون و تعیین‌کننده کانفورماسیون پروتیین N محلول، مانع از تجمع پروتیین N(N-N) و باند شدن غیراختصاصی به RNA سلولی می‌شود.

پروتیین P به پروتیین N برهنه باند می‌شود و از فسفریلاسیون فوری Nهای سنتز شده جدید پیشگیری می‌کند.[۱۶] از این‌رو تایید بیشتر کارآیی استفاده از این سیستم به‌صورت واکسن نوترکیب منوط به بررسی بیان همزمان پروتیین N و P و همچنین ارزیابی و تعیین آنتی‌ژنتیسیته ژن N با تزریق pCDNA3.1/N به حیوان آزمایشگاهی خواهد بود. تکثیر سویه‌های ضعیف‌شده خیلی سریع است و به‌شدت پاسخ‌های ایمنی ذاتی و تطبیقی را القا می‌کنند.[۴] بنابراین، تحقیقات مربوطه به‌طور عمده باید روی تضعیف کامل ویروس متمرکز گردد، به‌طوری که این واکسن‌ها حتی برای اشخاصی که دچار نقص شدید در سیستم ایمنی هستند، به‌طور کامل ایمن باشد.

در ادامه پژوهش حاضر اقدامات زیر پیشنهاد می‌شود:

۱- تزریق pCDNA3.1/N به موش جهت تعیین آنتی‌ژنتیسیته ژن N در مرحله بعد. ۲- طراحی یک سازه جهت بررسی بیان همزمان پروتیین N و P با هم و ارزیابی سازه در سلول‌های حشرات.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی‌از پایان‌نامه تحت عنوان "طراحی، ساخت و بیان وکتور نوترکیب ژن نوکلئوپروتیین ویروس هاری" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۹۲-۱۳۹۱ می‌باشد که با حمایت مجتمع تولیدات انستیتو پاستور ایران، در آزمایشگاه پژوهش و ساخت واکسن هاری انسانی انجام شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Finke S, Conzelmann KK. Replication strategies of rabies virus. *Virus Res* 2005;111(2):120-31.
2. Gongal G, Mudhusudana SM, Sudarshan MK, Mahendra BJ, Hemachudha T, Wilde H. What is the risk of rabies transmission from patients to health care staff? *J Asian Biomed* 2012;6(6):937-9.
3. Cai K, Feng JN, Wang Q, Li T, Shi J, Hou XJ, et al. Fine mapping and interaction analysis of a linear rabies virus neutralizing epitope. *Microbes Infect* 2010;12(12-13):948-55.
4. Dietzschold B, Li J, Faber M, Schnell M. Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol* 2008;3(5):481-90.
5. Perea Arango I, Loza Rubio E, Rojas Anaya E, Olivera Flores T, Gonzalez de la Vara L, Gómez Lim MA. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune responses in mice. *Plant Cell Rep* 2008;27(4):677-85.
6. Hatami H. History of Rabies in Traditional Medicine's Resources and Iranian Research Studies: On the CccasiOn of the World Rabies Day (September 28, 2012). *Int J Prev Med* 2012;3(9):593-5.
7. He CQ, Meng SL, Yan HY, Ding NZ, He HB, Yan JX, et al. Isolation and identification of a novel rabies virus lineage in China with natural recombinant nucleoprotein gene. *PLoS One* 2012;7(12): e49992.
8. Rupprecht CE, Smith JS, Fekadu M, Childs JE. The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention? *Emerg Infect Dis* 1995;1(4):107-14.
9. Yin X, Li Z, Li J, Yi Y, Zhang Y, Li X, et al. Rabies virus nucleoprotein expressed in silkworm pupae at high-levels and evaluation of immune responses in mice. *J Biotechnol* 2013;163(3):333-8.
10. Aylan O, El-Sayed AFM, Farahtaj F, Janani AR, Lugach O, Tarkhan-Mouravi O, et al. Report of the First Meeting of the Middle East and Eastern Europe Rabies Expert Bureau, Istanbul, Turkey (June 8-9, 2010). *Adv Prev Med* 2011;2011:812515.
11. Meslin FX, Kaplan MM., Koprowski H, editors. Laboratory Techniques in Rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996.
12. Jiang Y, Luo Y, Michel F, Hogan RJ, He Y, Fu ZF. Characterization of conformation-specific monoclonal antibodies against rabies virus nucleoprotein. *Arch Virol* 2010;155(8):1187-92.
13. Fu ZF, Dietzschold B, Schumacher CL, Wunner WH, Ertl HC, Koprowski H. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(5):2001-5.
14. He Y, Gao D, Zhang M. Expression of the nucleoprotein gene of rabies virus for use as a diagnostic reagent. *J Virol Methods* 2006; 138(1-2):147-51.
15. Goto H, Minamoto N, Ito H, Ito N, Sugiyama M, Kinjo T, et al. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 1):119-27.
16. Koser ML, McGettigan JP, Tan GS, Smith ME, Koprowski H, Dietzschold B, et al. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(25):9405-10.
17. Liu P. Rabies virus N, P and RNA interactions in vivo and mapping the functional domains of n in N-P and N-N interactions. University of Georgia Theses and Dissertations, 2004.
18. Goto H, Minamoto N, Ito H, Luo TR, Sugiyama M, Kinjo T, et al. Expression of the nucleoprotein of rabies virus in Escherichia coli and mapping of antigenic sites. *Arch Virol* 1995;140(6):1061-74.
19. Fooks A, Horton D. Rabies. In: Oie Biological Standards Commission. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals- birds and bees). 6th ed. World Organization for Animal Health; 2008. P. 304-322.
20. Brown TA. Gene Cloning and DNA Analysis. 6th ed. Manchester: Wiley- Blackwell; 2010.
21. Iseni F, Barge A, Baudin F, Blondel D, Ruigrok RW. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 12):2909-19.

Archive of SID

www.SID.ir

TUMJ Tehran University Medical Journal, August 2014; Vol. 72, No. 5: 294-300 Original Article

Design, construction and expression of recombinant vector containing the rabies virus nucleoprotein gene

Khadijeh Fanayi M.Sc.[1]
Mehdi Ajorloo M.Sc.[2,3]
Sayed Hamid Reza Mozhgani M.Sc.[4]
Shiva Irani Ph.D.[1]
Alireza Gholami Ph.D.[2,5*]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Human Rabies Vaccine Laboratory, Pasteurs Production and Research Complex, Institute of Iran, Tehran, Iran.
3- Department of Virology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4- Department of Virology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5- WHO CC For Reference and Research on Rabies, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

* Corresponding author: WHO Collaborating Center for Reference and Research on Rabies, Iran Pasteur Institute, 12 Farvardin St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-66403496
E-mail: agholami@pasteur.ac.ir

Abstract

Received: 22 May. 2014 Accepted: 29 Jun. 2014 Available online: 16 Jul. 2014

Background: Rabies is an acute encephalitis that causes more than 60,000 deaths worldwide. The only way to save individuals bitten by a rabies-infected animal is the timely use of effective vaccines. Treatment with new generation vaccines is expensive. Therefore, there is a global movement towards the production of less expensive vaccines which retain and improve upon the quality and effectiveness of the vaccine. Production and evaluation of non-classical vaccines is one of the approaches taken in this regard. In this study, we describe a new eukaryotic expression system to express the nucleoprotein N gene of rabies virus which, if suitable, may be evaluated for anti-rabies vaccine production.

Methods: The complete sequence of the N gene of rabies virus PV subtype was amplified by real-time polymerase chain reaction and cloned into the pCDNA3.1(+) vector. The cloned gene was excised from the vector by restriction enzyme digestion and sequenced. Due to mutations detected in the N gene, the gene coding sequence was purchased as a recombinant pGH/N vector. Vector pGH/N was amplified and following enzymatic digestion, the excised N gene was once again cloned into vector pCDNA3.1(+). Successful cloning was confirmed using restriction digests and quick check. The recombinant vector pCDNA3.1(+)/N was transformed into cultured BSR cells and protein N expression was analyzed using fluorescent antibody test (FAT).

Results: Electrophoresis confirmed amplification of the nucleoprotein N gene and subsequent restriction enzyme digestion showed that the N gene had been successfully cloned into the recombinant pCDNA3.1(+)/N vector. However, DNA sequencing revealed the presence of mutations within the N gene. Restriction digest of the commercial pGH/N vector showed that the N gene had been excised from the vector. Successful cloning of the N gene into the pCDNA3.1(+) expression vector was confirmed using restriction digests and quick check. Protein expression in BSR cells was assayed by immunostaining with anti-ribonucleocapsid FITC-conjugated antibody and visually confirmed by fluorescence microscopy.

Conclusion: This study showed that the protein N of rabies virus subtype PV can be expressed in a eukaryotic expression system using the pCDNA3.1(+) expression vector.

Keywords: FAT, rabies virus, ribonucleoproteins, sequence, vaccines.

Archive of SID
www.SID.ir