مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره پانزدهم، تابستان ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

کلونینگ و بیان پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا H1N1 در باکتری Ecoli سویه BL21(DE3)

فاطمه جعفری نژاد[۱]، گلناز اسعدی تهرانی[۲]، محمد امین بخش[۱]، بهرام کاظمی[۳،۴]، وحید رضا یاسائی[۵]،فاطمه یاریان[۳،۴]، آمنه کوچکی[۳،۴]
زینب سلیمانی فر[۳،۴]، مژگان بنده پور[۳،۴]*

۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران
۲ گروه میکروبیولوژی و زیست جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۳ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴ بخش بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵ مرکز تحقیقات ژنومیک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: ویروس انفلوانزا A یکی از عوامل اصلی مرگ ومیر سالیانه می باشد و از سال ۱۹۶۰ میلادی بر علیه آن واکسن موثر در دسترس بوده است. تغییرات مداوم آنتی ژنیک ویروس چالش بزرگی در مسیر تولید سالیانه واکسن می باشد. در حال حاضر محققین روی آنتی ژنهای ثابت ویروس مطالعه می کنند. پروتئین M۲ یک کانال یونی درون پوشش ویروس انفلوانزای A تشکیل می دهد که در عفونت زایی آن موثر است. این پروتئین حفاظت شده است و هدف مناسبی برای تولید واکسن انفلوانزا میباشد.

مواد و روش ها: با توجه به محدودیت کشت ویروس انفلوانزا در آزمایشگاه توالی ژن M۲ از ویروس سویه H۱N۱ ایران انتخاب و سنتز شد. ژن M۲ در وکتور pET۲۲b ساب کلون گردید. پروتئین نوترکیب در باکتری E.coli سویه BL۲۱DE۳ بیان و از آنتی بادی اختصاصی در روش SDS-PAGE و وسترن بلات برای تایید آن استفاده شد.

یافته ها: غلظت پروتئین حاصل ۳۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بدست آمد و با آنتی بادی اختصاصی تایید گردید.

نتیجه گیری: پروتئین M۲ ویروس آنفلوانزا در باکتری Ecoliسویه (DE۳) BL۲۱ قابل بیان است.

کلمات کلیدی: کلونینگ، ویروس آنفلوانزا، بیان ژن

مقدمه

بیماری های تنفسی در جهان بیش از نیمی از موارد بیماری های حاد را تشکیل می دهد در این میان ارتو میکسوویریده (ویروس انفلوانزا) عامل مهمی در ایجاد بیماری و مرگ ناشی از بیماری های تنفسی به شمار میاید. درچند سال اخیر۴ پاندمی انفلوانزا A به وسیله ویروس های جدید از میزبان های پرندگان یا خوک به جمعیت انسانی منتقل شده است. کانون اپیدمی انفلوانزای خوکی ۲۰۰۹ H۱N۱ آمریکای شمالی گزارش شده است(۸) قطعه ۷ ژنوم ویروس انفلوانزا دو پروتئین M۱ و M۲ را کد می کند. پروتئین M۱ غشاء لیپیدی ویریون را از داخل پوشانده و باعث استحکام آن می شود. پروتئین M۲ یک پروتئین داخل غشایی با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون بوده و به عنوان کانال یونی عمل می کند. کانال یونی M۲ با هدایت پروتون ها به داخل اندوزوم باعث ایجاد شرایط اسیدی می شود که این pH منجر به جدا شدن پروتئین M۱ از ریبونوکلئوپروتئین شده و این مجموعه به داخل هسته انتقال می یابد(۷) . این پروتئین با تحریک ایمنی هومورال توانایی ایجاد ایمنی در برابر سویه های مختلف انفلوانزا را دارد(۵). پروتئین ماتریکس ۲ (M۲) یک پروتئین بین غشایی با ۹۷ اسید آمینه به شکل هموتترامر با پیوند های دی سولفید است که در غشاء پلاسمایی سلول های آلوده به ویروس با چگالی بالا که شبیه مولکول HA است بیان می شود. چگالی این پروتئین هنگام آزاد شدن ویروس های جدید کاهش میابد. به طور متوسط ویروس انفلوانزا شامل ۱۰ تترامر M۲، حدود ۴۰۰ تری مر HA و ۱۰۰ تترامر NA در هر ویریون میباشد(۶،۳). اخیرا" توجه دانشمندان و فارماکولوژیستها به این پروتئین جهت طراحی واکسن معطوف

آدرس نویسنده مسئول : مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
Email :Bandehpour@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲

Archive of SID
www.SID.ir

شده است. این پروتئین هدف اختصاصی داروهای ضد انفلوانزا، آمانتادین و ریمانتادین است. هدف این تحقیق کلون و بیان این پروتئین شاخص ویروس از سویه بومی ایران بوده است.

مواد و روش ها

تایید وکتور حاوی ژن M۲:

بعلت محدودیت کشت ویروس انفلوانزا در آزمایشگاه، توالی ژن M۲ از ویروس سویه H۱N۱ ایران از بانک ژن انتخاب گردید(HQ۶۰۶۴۷۴). این توالی از نظر کدونهای مصرفی باکتری تغییر داده شد و دو محل اثر آنزیمهای SacI و SalI در دو انتهای تعبیه گردید. در نهایت این توالی برای سنتز به شرکت ندای فن سفارش داده شد.

پلاسمید pGE حاوی ژن M۲در باکتری E.coli سویه Top۱۰ با روش هاناهان ترانسفرم و تکثیرشد. بعد از تخلیص پلاسمید(کیت بایونیر، کره) قطعه مورد نظر با استفاده از پرایمر های عمومی M۱۳ (توالی دو طرف محل کلون ژن هدف در پلاسمید) تکثیر گردید.

M۱۳ F ۵'GTAAAACGACGGCCAGTG۳'

M۱۳ R ۵'GGAAACAGCTATGACCATG۳'

جدول شماره ۱: موادمصرفی و غلظتهای آنها در واکنش PCR

مواد مورد استفاده درواکنش	مقدار مصرفی در واکنش	غلظت مصرفی در واکنش
Plasmid(DNA) (1ng/ µl)	1 µl	1 ng
dNTP (10mM)	5 µl	m M 0.2
MgCl2(50mM)	1.5 µl	m 10 M
Primers 20pmol	2 µl	pmol 1.5
Buffer PCR10x	3 µl	1 X
Taq DNA polymerase(5 unit/ µl)	µl 0.25	u 1.25
D.W.	Up to 30 µl	

واکنش PCR برای تکثیر ژن M۲ به وسیله پرایمر های عمومی M۱۳ به صورت زیر انجام گرفت:

جدول شماره ۲:مراحل واکنش PCR برای تکثیر ژن M۲

Initial Denaturation	94 ℃	5 Min
Denaturation	94 ℃	30 S
Annealing	54 ℃	40 S
Extension	72 ℃	1 Min
Final extension	72℃	5 Min

ساب کلونینگ ژن M۲ در وکتور بیان :

وکتور نهایی برای بیان این پروتئین pET۲۲b در نظر گرفته شده است که بعد از هضم باآنزیمهای SacI (فرمنتاس، لیتوانی) و SalI (فرمنتاس، لیتوانی) از ژل آگارز (بایونیر، کره) تخلیص گردید.

قطعه M۲ و وکتور بعد از آماده سازی با یک واحد آنزیم T۴ DNA ligase (فرمنتاس- لیتوانی) در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد به هم متصل شدند. جهت تایید این مرحله از PCR قطعه با پرایمرهای عمومی pET۲۲b و هضم آنزیمی استفاده شد(۱) . پرایمر های طراحی شده برای تکثیر ژن کلون شده در پلاسمید pET۲۲b با دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی گراد به ترتیبی که در جداول ۱ و ۲ ذکر گردید از قرار زیر است:

pET۲۲bF ۵'TAATACGACTCACTATAG۳'

pET۲۲bR ۵'GCTAGTTATTGCTCAGC۳'

محصولات PCR بر روی آگاروز ۱/۵ ٪ الکتروفورز و با رنگ سایبرگرین مشاهده گردیدند.

بیان ژن M۲ و تایید آن

کشت شبانه با یک کلونی باکتری حاوی پلاسمید نوترکیبM۲/ pET۲۲b در ۲ml محیط کشت LB.broth (هایمدیا، هند) انجام گرفت و روز بعد باmL ۴۰ محیط حاوی µg/mL ۱۰۰ آمپی سیلین(سیگما، آلمان) در یک ارلن استریل کشت مجدد داده شد. در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید.

پس از گذشت ۲ ساعت و رسیدنOD..ء به ۰/۶ ، mL ۱ به عنوان نمونه صفر در نظر جمع آوری شد، سپس با ۴۰ میکرولیتر IPTG (۱mM) (سیگما، آلمان) القاء گردید. نمونه های ۳ و۵ ساعت نیز جمع آوری شد.

تایید بیان ژن با روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ

لیزات باکتری‌های القا شده در زمان های متفاوت به همراه لیزات سلول بدون پلاسمید، بر روی ژل ٪ ۱۲SDS-PAGE مقایسه گردید. پروتئین مورد نظر با kDa ۲۸پس از انتقال از ژل SDS-PAGE به کاغذ نیتروسلولز با تکنیک وسترن بلاتینگ تایید گردید(۱)

ازآنتی بادی (Abcam,UK) mouse Anti M۲ Antibody به

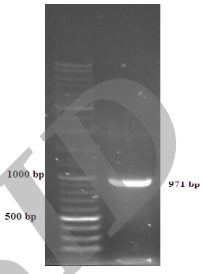
Archive of SID

www.SID.ir

عنوان آنتی بادی اول و از آنتی بادی Anti mouse کونژوگه با آلکالن فسفاتاز بعنوان آنتی بادی دوم استفاده شد. جهت رویت باند از کروموژن و سوبسترای NBT/BCIP بهره گرفته شد(۲).

یافته ها

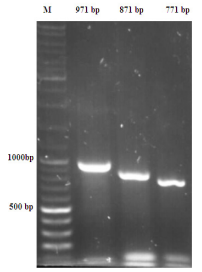
تایید کلون اولیه ژن M۲ : واکنش PCR به وسیله پرایمر عمومی M۱۳ انجام شد و قطعه مورد نظر تکثیر گردید. محصول PCR ، روی ژل ۱/۵٪ الکتروفورز گردید که باند bp۹۷۱ در شکل ۱ مشاهده می شود.



شکل شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR (۹۷۱bp)ژن M۲ کنار مارکر ۱۰۰ جفت باز DNA

تهیه قطعه M۲جهت کلون در وکتور بیان

محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر SacI, SalI برش داده شده و هر مرحله روی ژل آگارز ۱/۵٪ در کنار مارکر bp ۱۰۰ الکتروفورز گردیده است. با توجه به نتایج حاصله قطعه ۷۷۱ جفت بازی از پلاسمید اولیه و سنتتیک pGE خارج گردید(شکل شماره۲).

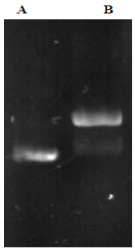


شکل شماره ۲: قطعه برش خورده توسط آنزیم‌های محدود الاثر SacI و SalI و محصول اولیه در کنار مارکر ۱۰۰bp

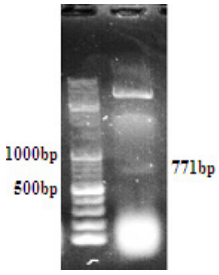
نتایج ساب کلونینگ قطعه M۲ در وکتور pET۲۲b

وکتور مذکور با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر SacI و SalI انکوبه گردید و سپس بر روی ژل آگارز ۰/۸ ٪ الکتروفورز شد(شکل شماره۳).

هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب سنتز شده توسط آنزیم‌های SalI و SacI انجام شدکه حاصل آن بصورت خروج ژن M۲ از پلاسمید نوترکیب کنار مارکر روی ژل ۱/۵ ٪ در شکل شماره ۴ مشاهده میشود.



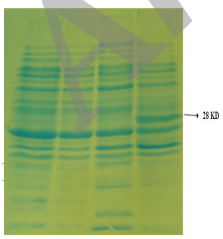
شکل شماره ۳: وکتور pET۲۲b خطی شده، B: وکتور pET۲۲b کنترل



شکل شماره۴: ۷۷۱bp ژن M۲ خارج شده از وکتور کنار مارکرbp۱۰۰

نتایج حاصل از بیان پروتئین پس از القای سلول با IPTG ۱mM

لیزات باکتری‌های القا شده در زمان های متفاوت به همراه لیزات سلول بدون پلاسمید، بر روی ژل ٪ ۱۲SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. باند پروتئین M۲ در مقایسه با موارد کنترل در شکل شماره ۵ مشاهده می شود



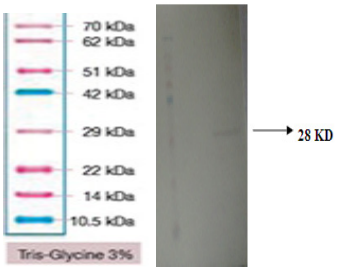
A

شکل شماره۵: ژل SDS-PAGE ٪۱۲ حاصل از الکتروفورزپروتئین M۲ ستون A: سلول BL۲۱ بدون پلاسمید نو ترکیب،ستون B: نمونه ساعت صفر،ستون C: ۳ ساعت پس از القا ،ستون D: ۵ ساعت پس از القا

پس از انتقال باند از ژل SDS-PAGE به کاغذ نیتروسلولز به منظور تایید باند M۲ از تکنیک وسترن بلاتینگ استفاده

Archive of SID
www.SID.ir

شد. پس از مراحل آشکار سازی با آنتی بادی ثانویه کونژوگه با آلکالن فسفاتاز باند پروتئین بیان شده در شکل شماره ۶ مشاهده گردید.



شکل شماره۶: نتیجه وسترن بلات و باند ۲۸ KD پروتئین M۲

بحث:

HA وNA گلیکوپروتئین هایی هستند که درون پوشش ویروس قرار دارند و ساختار آنتی ژنی آنها به راحتی تغییر میکند. بر خلاف ایندو، پروتئین غشایی M۲ درهمه ویروس های انفلوانزای انسانی همولوژی بالایی را نشان می دهد(۱۰). بعضی از جهش های M۲ ویروس انفلوانزا ضعیف است(۸) . پروتئین های تشکیل دهنده کانال یون M۲ در ویریون ورود یونها را از اندوزوم به درون ذره ویروس مقدور می سازد و تغییر ترکیب ساختار HA را تقویت می کند(۱۴). اخیرا" توجه دانشمندان و فارماکولوژیستها به این پروتئین معطوف شده است. چرا که در بین همه ویروس های انفلوانزای A حفاظت شده بوده و همچنین ایمونوژن میباشد، بنابراین یکی از اهداف مناسب برای تولید واکسن انفلوانزا با ایمنی وسیع الطیف می باشد(۱۲) . در این تحقیق با استفاده از سویه(DE۳) E.Coli BL۲۱ مهندسی شده با کلون کردن ژن کد کننده پروتئین M۲ در وکتور pET۲۲b در شرایط تنظیم شده ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد. در خصوص انتخاب ژن M۲ به عنوان یک ایمونوژن بر علیه ویروس انفلوانزا تحقیقات بسیاری انجام شده است که از جمله آنها می توان به DNA vaccine در تحقیق .A Ihataو همکارانش در سال ۲۰۰۱(۹)، و یا بصورت VLP بهمراه پروتئین core ویروس هپاتیت B(۱۱،۱۳)اشاره نمود. در سال ۱۹۹۹ توسط Frace AM, Klimov AI دمین خارج سلولی M۲ ویروس را مطرح نمودکه در مدل های حیوانی منجر به ایمنی در مقابل ویروس گردید(۶). متداول ترین میزبان بیانی از سویه های E.coli، (DE۳)BL۲۱ می باشد. این سویه از E.coli دارای مزایای زیادی برای تولید پروتئین نوترکیب می باشد. BL۲۱ از سویه ی E.coli B مشتق شده است. یکی از روشهای کنترل پایه بیان، استفاده از وکتورهایی می باشد که حاوی lac T۷ پروموتور هستند. وکتور مورد استفاده در این تحقیق pET۲۲b است. وقتی این نوع از وکتورها در میزبانهای لیزوژن DE۳ استفاده می شوند، lac رپرسور در کروموزوم میزبان فعالیت نموده و رونویسی از ژن هدف را با مهار تولیدT۷ RNA پلیمراز مهار می کند(۴) . بدین ترتیب در ادامه این تحقیق پروتئین بدست آمده در سیستم بیان پروکاریوتی، مورد ارزیابی ایمونولوژیکی قرار خواهد گرفت.

نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از سویهE.Coli BL۲۱ (DE۳) مهندسی شده با کلون کردن ژن کد کننده پروتئین M۲ در وکتور pET۲۲b می توان آن را در مقادیر زیاد بیان نمود. مقدار بدست آمده در شرایط تنظیم شده در این تحقیق ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر میباشد.

سپاسگزاری:

این تحقیق در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفته است. تامین بودجه آن مشترک بین این مرکز و مرکز ژنومیک دانشگاه بوده است. بدین وسیله از مسئولین محترم این مراکز تشکر و قدردانی میشود.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع:

(1) Bandehpour M, Khodabandeh M, Mosaffa N, Sharifnia Z, Ghazanfari T, Kazemi B. An efficient procedure for purification of recombinant human β heat shock protein 90.DARU, 2010; 18(1):64-68.

(2) Bandehpour M, Seyed N, ShadnooshM, PakzadP, Kazemi B. Using recombinant Chlamydia Major Outer Membrane Protein (MOMP) in ELISA diagnostickit. Iranian J of Biotech,2006; 4(4): 239- 244.

(3) Betakova T. M2 Protein–A Proton Channel of Influenza A Virus. Curr Pharma Design, 2007; 13)31(:3231-3235.

(4) Dower W J, Miller J F, Ragsdale CW. High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res, 1988; 6(13): 6127- 45.
(5) Filettea M, Joua WM, Birkett b B, Lyons b K, Schultz b B, Tonkyro b A, Resch b S, Fiersa W. Universal influenza A vaccine Optimization of M2-based constructs. Virol J, 2005;337 : 149 – 161.
(6) Frace AM, Klimov AI, Rowe T. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus. Vaccine, 1999;17 (18): 2237-44.

(7) Jason R, James J. Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. Nature, 2008; 451: 591–595.
(8) Mishra N, Emerging influenza A/H1N1: Challenges and development. The Health, 2011; 2: 16-22.
(9) Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene.Vaccine, 2001; 19: 36-39.

(10) Sakaguchi A, Hirayama E, Hiraki A. Nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein is temperature-dependently inhibited by dissociation of viral matrix protein. Virol, 2003; 306: 244-253.

(11) Song J.M, Wang BZ, Park K.M, Van Rooijen N, Quan FS. Influenza Virus-Like Particles Containing M2 Induce Broadly Cross Protective Immunity. PLoS ONE, 2011; 6: 14538-14544.

(12) Staneková Z, Varečková E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. Virol J, 2010; 7: 351-357.

(13) Song J.M, Wang B.Z, Park K.M, Van Rooijen N, Quan F.S. Influenza Virus-Like Particles Containing M2 Induce Broadly Cross Protective Immunity, PLoS ONE. 2011; 6: 14538-42

(14) Wenbin L, Cady SD, Hu F, Hong M. Structure and Function of the Influenza A M2 Proton Channel. Biochem, 2009; 48: 7356–7364.

Archive of SID

www.SID.ir