

Isolation, cloning, and sequencing of influenza A (H1N1) hemagglutinin for production of hemagglutinin gene bank

Farahmand B(PhD)¹, Khodabandeh M(PhD)², Mahboudi F(PhD)³, Fotouhi F(PhD)⁴, Barkhordari F(BSc)⁵, Saleh M(MSc)⁶, Kheiri T M(PhD)^{7*}

1- Influenza Unit of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2- Department of Industry and Environment, Research Center of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3- Biotechnology Research Center of Pasture Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Influenza Unit of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

5- Biotechnology Research Center of Pasture Institute of Iran, Tehran, Iran

6- Influenza Unit of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

7- Influenza Unit of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received 30 March 2010 Accepted 19 May 2010

Abstract

Background: Influenza is a contagious respiratory infectious disease out breaking in cold seasons of the year. The outbreak of the new influenza A (H1N1) virus in 2009 involved large populations of the world with considerable mortality. Hemagglutinin (HA) molecule, the main surface glycoprotein of the influenza virus, is one of the key factors for serological diagnostic kits and vaccine development. Thus establishment of HA gene bank of the circulating influenza viruses is essential in gaining quick access to large amounts of protein.

Materials and Methods: The first step in providing such a bank is detection and isolation of HA full genome and its subunits by using specific primers and cloning them in proper vectors. For this purpose, using standard virus genome (A/New Caledonia/20/99(H1N1)) cultured on MDCK cell, HA coding gene was proliferated by RT-PCR using specific primers.

Results: Isolation and cloning of the HA gene was verified by RT-PCR, enzyme digestion and determining nucleotide synonymy. Through the use of specific cloning primers, different HA gene constructs were propagated for expression of the gene in insect cells and *E.coli* bacteria.

Conclusion: The results indicated the complete compatibility of the extracted HA gene with the influenza (A/New Caledonia/20/99(H1N1)) hemagglutinin. It makes it possible to use the gene as a source of cloning in a variety of eukaryotic and prokaryotic expression systems.

Keywords: Gene bank, Hemagglutinin, Influenza

*Corresponding author:

Address: Influenza Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Email: mtkheiri@yahoo.com

جداسازی، کلونینگ و تعیین توالی ژن هم‌آگلوتینین آنفلوآنزای A(H1N1) به منظور تهیه بانک ژن هم‌آگلوتینین

بهرخ فرهنگند¹، مهوش خدابنده³، فریدون مهبودی²، فاطمه فتوحی⁴، فرزانه برخوردار⁵، مریم صالح⁶، معصومه توسی خیری⁷*

- 1- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، واحد آنفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- 2- استادیار، دکتری بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ژنتیک و زیست فن آوری، تهران، ایران
- 3- دانشیار، دکتری بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- 4- استادیار، دکتری ویروس شناسی، واحد آنفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- 5- کارشناس میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- 6- کارشناس ارشد میکروب شناسی، واحد آنفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- 7- استادیار، دکتری ویروس شناسی، واحد آنفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت 89/1/10، تاریخ پذیرش 89/2/29

چکیده

زمینه هدف: آنفلوآنزا بیماری مسری عفونت دستگاه تنفسی است که در فصل های سرد سال شیوع پیدا می کند. شیوع ویروس جدید آنفلوآنزا A(H1N1) در سال 2009 که جمعیت کثیری از مردم جهان را درگیر کرد، مرگ و میر قابل توجهی در پی داشت. مولکول هم‌آگلوتینین که اصلی ترین گلیکوپروتئین سطحی ویروس آنفلوآنزا است، یکی از ارکان مهم در تهیه کیت‌های تشخیصی و واکسن‌های موثر بر علیه این بیماری است. لذا تهیه بانک ژن سویه‌های شایع به منظور دسترسی سریع به مقدار انبوه این مولکول بسیار ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع پژوهشی - کاربردی می باشد. اولین قدم برای تهیه چنین بانکی، جداسازی ژن کامل هم‌آگلوتینین و زیر واحدهای آن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و کلونینگ آنها در ناقله‌های مناسب است. در این راستا ابتدا با استفاده از ژنوم ویروس استاندارد (A/NewCaledonia/20/99(H1N1)) کشت داده شده در سلول MDCK، ژن کد کننده هم‌آگلوتینین به روش RT-PCR تکثیر و در ناقل مناسب کلون گردید.

یافته‌ها: جداسازی و کلونینگ ژن هم‌آگلوتینین با روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی تایید گردید. با استفاده از پرایمرهای ویژه کلونینگ، سازه‌های مختلف واجد ژن هم‌آگلوتینین مورد نظر به منظور بیان ژن در سلول حشره و باکتری اشریشیا کلی، تهیه گردید.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده نشان دهنده تطابق کامل قطعات ژنی استخراج شده با هم‌آگلوتینین ویروس آنفلوآنزای A/New Caledonia 20/99(H1N1) است که استفاده از این منبع ژنی، اهداف خاص از قبیل کلون کردن در وکتورهای بیانی مختلف یوکاریوتی و پروکاریوتی را امکان پذیر می‌سازد.

واژگان کلیدی: آنفلوآنزا، بانک ژن، هم‌آگلوتینین

مقدمه

ضروری بوده و اولین قدم در این راستا جدا سازی، کلونینگ و تعیین و تایید توالی این ژن می‌باشد.

در این مطالعه، با طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژنوم کامل هم‌گلوتینین سویه استاندارد (A/NewCaledonia/20/99(H1N1))، اقدام به جدا سازی و کلونینگ ژن هم‌گلوتینین در ناقل pGEM-T Easy شد و بعد از تایید توالی آن، به عنوان الگو برای ساخت سازه‌های ژنی دیگر از قبیل ناقل pET، (برای بیان در اشریشیا کلی) و باکیلو ویروس استفاده شد تا علاوه بر تهیه بانک ژن، برای مطالعات بعدی به ویژه در رابطه با گلیکوزیلاسیون و اثر آن بر ساختار و عملکرد مولکول، مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه پژوهشی - کاربردی از سویه‌ها و مواد زیر استفاده گردید.

ویروس آنفلوآنزای انسانی (A/New Caledonia /20/99(H1N1)) در کشت تک لایه سلول‌های MDCK (Madine Darby Canine Kidney) (تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) رشد یافته در محیط DMEM حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین G (100 unit/ml) و استرپتومایسین (100 µg/ml) تلقیح گردید (7، 8). پس از بروز آثار تخریب سلولی که معمولاً 48 ساعت پس از تلقیح قابل مشاهده است، مایع رویی کشت سلولی برداشت شد و با روش هم‌گلوتیناسیون، عیار ویروس تعیین گردید.

به منظور کلونینگ، باکتری اشریشیا کلی Top10F⁺ (تهیه شده از شرکت Novagen) با استفاده از محیط کشت جامد و مایع (LB (Louria Bertoni))، کشت داده شد و به عنوان میزبان برای تراریختی (transformation) و تکثیر ناقلین و سازه‌های کلونینگ استفاده گردید.

جهت طراحی پرایمرها، با استفاده از توالی 1698 نوکلئوتیدی هم‌گلوتینین ویروس آنفلوآنزای A/New

آنفلوآنزای، بیماری عفونی دستگاه تنفسی است که فرم فصلی آن همه ساله با وقوع سرما شایع می‌گردد. مرکز کنترل بیماری‌های آمریکا (CDC) در سال 2004 گزارش کرده است که سالیانه 5 تا 20 درصد مردم آمریکا با نوع فصلی این بیماری درگیر می‌شوند که برای گروه‌های پرخطر شامل افراد بالای 65 سال، کودکان و افراد با بیماری‌های خاص و زمینه‌ای، مشکلات فراوانی را در پی دارد (1). عامل مولد این بیماری ویروس آنفلوآنزای خانواده ارتومیکسو ویریده است که دارای 8 قطعه ژنومی از جنس RNA(-) می‌باشد که حداقل 11 پروتئین آن را رمزگذاری می‌کنند (2). اصلی‌ترین پروتئین‌های ویروس آنفلوآنزای هم‌گلوتینین و نورامینیداز هستند که در ورود و انتشار ویروس نقش دارند و هدف اصلی برای سیستم ایمنی می‌باشند. هم‌گلوتینین با وزن مولکولی حدود 75-70 کیلو دالتون، گلیکوپروتئین غالب غشایی است که اصلی‌ترین گزینه برای تولید واکسن‌ها به ویژه از نوع زیر واحدی است. فرم کامل آن یعنی HA0 دارای ساختار تریمری است که هر مونمر آن از هشت ناحیه تشکیل یافته است. فرم فعال مولکول از دو زیر واحد بزرگ (HA1) و کوچک (HA2) تشکیل شده است. هر دو زیر واحد گلیکوزیله هستند ولی زیر واحد بزرگ یا آنتی ژنیک، که بخش خارج غشایی مولکول است، دارای بیشترین واحدهای قندی می‌باشد (3). تا سال 2010 بیش از 6000 ژن هم‌گلوتینین و زیر واحدهایش در بانک ژن بین المللی به ثبت رسیده است (4). این پروتئین توسط قطعه چهارم ژنوم ویروس آنفلوآنزای رمزگذاری می‌شود (5) و تغییر در توالی این ژن منجر به پیدایش سویه‌های جدیدی از ویروس می‌شود که ممکن است منجر به ایجاد اپیدمی یا پاندمی‌های خطرناکی نظیر پاندمی 1918 و یا سویه‌های دارای پتانسیل پاندمی H5N1 و سویه 2009 شود (6). لذا به منظور تولید سریع واکسن و کیت‌های تشخیصی لازم برای ارزیابی سرولوژیکی ویروس شایع، دسترسی فوری به منابع هم‌گلوتینین به فرم بانک ژنی، بسیار

تکثیر قطعه کامل ژن و زیر واحد بزرگ 960 نوکلئوتیدی طراحی گردید (جدول 1).

caledonia/20/99(H1N1) ثبت شده در بانک ژن بین المللی با کد دستیابی (AJ344014) و نرم افزار DNASIS MAX 2.0 (شرکت هیتاچی) پرایمرهای اختصاصی برای

جدول 1. پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه

Plasmids	Sequence (5-3)	
F HA-XhoI Amplification	5'-CTCGAGACCTACTTTGGACACTC-3'	HA
R HA-XhoI Amplification	5'-CTCGAGCCAGATGCATATTCTAC-3'	HA
F HA1-HindIII Amplification	5'-GCAAGCTTATGGACACAATATGTATA-3'	HA1
R HA1-XhoI Amplification (Uni 12)	5'-CACTCGAGACCTACTTTGGACACT-3'	HA1
	5'-AGCAAAAGCAGG-3'	(2& 9)

بلافاصله روی یخ منتقل شد و به آن مخلوطی از dNTP، بافر اختصاصی و Ribolock (مهارکننده RNase) طبق دستورالعمل کیت افزوده شد. سپس به مدت 5 دقیقه در دمای 25 درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در انتها آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (RT) اضافه شد و ابتدا به مدت 10 دقیقه در 25 درجه سانتی گراد و سپس یک ساعت در 42 درجه سانتی گراد قرار داده شد.

در ادامه برای انجام واکنش PCR از cDNA ساخته شده و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در جدول 1 و سه آنزیم پلیمرز smartTaq، pfu و Taq high fidelity (شرکت فرمنتاز) مطابق روش های معمول (Sambrook & Russell 2001) استفاده گردید (10). کلیه واکنش های PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندرف مدل 22331 اجرا گردید. در تمام موارد ابتدا آزمایش در گرادیان دمایی انجام شد و نتایج PCR با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز 1 درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. بهترین شرایط برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. بهترین ترکیب واکنش و شرایط PCR که در تمامی موارد تکثیر HA و HA1 با آنزیم های Taq قابل اجرا بوده صورت زیر می باشد:

ترکیب: 5 میکرولیتر بافر PCR(10X)، 1 میکرولیتر dNTP(10mM)، 1 میکرولیتر پرایمر رفتی (10pmol)، 1 میکرولیتر پرایمر برگشتی (10pmol)، پلیمرز

به منظور استخراج RNA نیز ویروس های حاصل از کشت سلولی MDCK که واجد عیار معادل 512 واحد هماگلویتینین بود مورد استفاده قرار گرفت. استخراج RNA با استفاده از محلول RNXTM-Plus (شرکت سیناژن) صورت گرفت. به این ترتیب که 250 میکرو لیتر از سوسپانسیون ویروسی با 750 میکرو لیتر از RNXTM-Plus مخلوط و به مدت 5 دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. سپس با افزودن 200 میکرو لیتر کلروفرم، در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه و با دور 12000 x g سانتریفوژ گردید. معادل حجم RNA جمع آوری شده از لایه بالایی، ایزوپروپیل الکل افزوده و بعد از 15 دقیقه انکوباسیون روی یخ در دمای 4 درجه سانتی گراد و با دور 12000 x g به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب بعد از سه بار شستشو با اتانل 75 درجه، در آب تیمار شده با DEPC (Diethyl pyrocarbonate) حل گردید.

مراحل RT-PCR به شرح زیر صورت گرفت:

برای ساخت cDNA، از کیت سنتز cDNA دارای آنزیم پلیمرز معکوس M-MuLV (شرکت فرمنتاز) و پرایمر یونیور سال (Uni12) ذکر شده در جدول 1، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (2، 9) و به ترتیب زیر استفاده شد:

در ابتدا پرایمر و RNA استخراج شده مخلوط و در دمای 70 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه در ترموسایکلر قرار داده شد و بعد از خروج از دستگاه،

بررسی قرار گرفتند. ناقل‌های نو ترکیب تایید شده، جهت تعیین توالی به شرکت UK Gene service ارسال گردیدند.

ساخت و آنالیز سازه های بیانی اختصاصی

یوکاریوتی و پروکاریوتی

با استفاده از سازه pGEM-TEasyHA تایید شده به عنوان الگو، پرایمرهای اختصاصی طراحی شده و با استفاده از آنزیم پلیمرز Taq high-fidelity در شرایط PCR بهینه شده، سازه‌های بیانی pETHA1، pETHA (همراه و یا بدون سیگنال پپتید)، pFastBac-HA و pFastBac-HA1 ساخته شدند و به کمک روش‌های PCR و آنالیز آنزیمی تایید گردیدند (11، 12).

بررسی سازه‌ها با آنزیم‌های محدودگر:

به منظور بررسی سازه‌ها با آنزیم‌های محدودگر از نقشه آنزیمی توالی‌های ژنی که با استفاده از نرم افزار DNASIS MAX به دست آمده است، آنزیم‌های مورد نظر انتخاب (PstI برای HA کامل و NcoI برای HA1) و واکنش‌های هضم آنزیمی طبق دستورالعمل شرایط استفاده از آنزیم‌ها، اجرا گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایشات جدا سازی و تکثیر ژن کامل هم‌گلوتینین و ویروس آنفلوآنزای انسانی نوع (A/NewCaledonia/20/99(H1N1)) و کلونینگ و تایید آن در شکل 1a و 1b نشان داده شده است. در روش RT-PCR بهینه شده با آنزیم پلیمرز Taq high fidelity، هیچ گونه باند غیر اختصاصی مشاهده نشد (شکل 1b ردیف 2). با مشاهده قطعات ژنی 580 و 1100 نوکلئوتیدی حاصل از هضم آنزیمی محصول RT-PCR ژن HA با آنزیم PstI (شکل 1b، ردیف 3) و قطعات 3000 و 1680 نوکلئوتیدی حاصل از هضم سازه pGEM-T-HA با آنزیم‌های HindIII/XhoI (شکل 1b، ردیف 5)، جدا سازی و کلونینگ ژن در ناقل T مورد تایید واقع شد.

0/5 واحد، 1 میکرو لیتر cDNA(50ng/ml) و آب مقطر استریل تا حجم نهایی 25 میکرو لیتر افزوده شد.

شرایط: 5 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی گراد، 30 ثانیه در 94 درجه سانتی گراد، 45 ثانیه در 54 درجه سانتی گراد، 2 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد که مراحل 2 تا 4 برای 30 بار تکرار شد و در پایان به مدت 10 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد قرار داده شد.

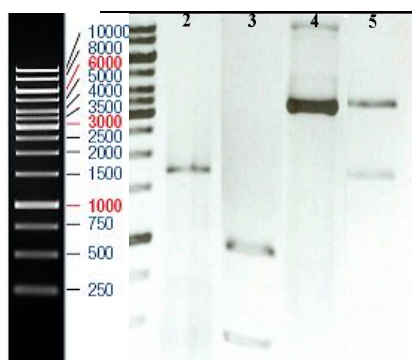
کلونینگ در ناقل pGEM-T Easy

برای این منظور پلی نوکلئوتیدهای تکثیر شده با استفاده از کیت استخراج از ژل (شرکت کیاژن) استخراج و سپس در ناقل pGEM-T Easy (شرکت پرومگا) طبق دستورالعمل مربوطه کلون گردیدند (11).

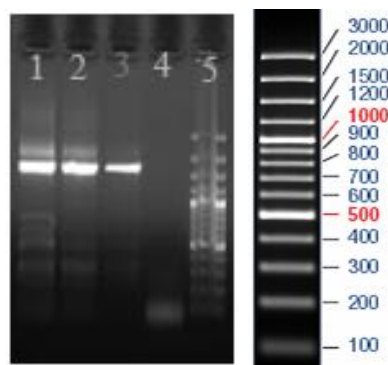
مستعد سازی و نواریختی 'Top10F':

برای این منظور یک کلنی از کشت شبانه باکتری اشیرشیا کلی 'Top10F' در 5 میلی لیتر محیط LB مایع تلقیح و در 37 درجه سانتی گراد با دور 180 در دقیقه تا رسیدن تراکم سلولی به حدود $OD_{600}=0.6$ کشت داده شد و به منظور جدا سازی سلول‌های باکتری در 4 درجه سانتی گراد به مدت 3 دقیقه با دور 9000 در دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب طی سه مرحله با محلول سرد $CaCl_2(0.1mM)$ تیمار گردید. در مرحله آخر سلول‌های مستعد شده ضمن مجاورت با غلظت مناسب سازه (حدود 1 ng) و به مدت 30 دقیقه انکوباسیون بر روی یخ و شوک حرارتی (90 ثانیه در 42 درجه سانتی گراد) ترا ریخت گردیده و بر روی محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و تتراسایکلین، القا کننده IPTG و معرف رنگی Xgal کشت داده شدند.

به منظور آنالیز کلونها، با استفاده از روش غربالگری کلنی‌های آبی - سفید، کلنی‌های واجد پلاسمید مورد نظر انتخاب گردید و پلاسمیدهای آنها پس از استخراج از نظر وجود یا عدم وجود ژن مورد نظر مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور در ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با روش PCR و سپس با هضم آنزیمی به وسیله آنزیم‌های XhoI و HindIII مورد



(b)



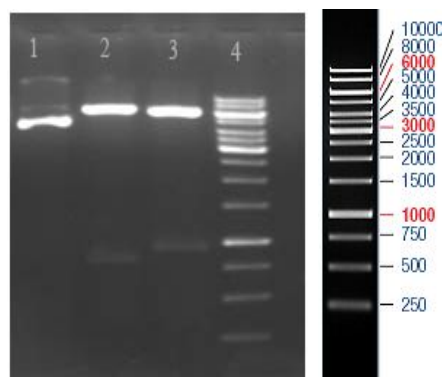
(a)

شکل 1. نتایج الکتروفورز مراحل تکثیر ژن HA، و ارزیابی هضم آنزیمی ژن HA بر روی ژل آگارز 1 درصد (a) نتایج PCR با گرادیان دمایی ژن HA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و cDNA به عنوان الگو (ردیف 1 دمای 52 °C، ردیف 2 دمای 53 °C، ردیف 3 دمای 54 °C، ردیف 4 کنترل منفی و ردیف 5 مارکر DNA (100bp) (b) آنالیز آنزیمی ژن HA با استفاده از آنزیم PstI و هضم آنزیمی سازه ژنی pGEMT-HA (ردیف 1 مارکر DNA (1Kb)، ردیف 2 ژن HA، ردیف 3 هضم آنزیمی ژن HA با آنزیم محدودگر PstI، ردیف 4 pGEMT-HA هضم نشده و ردیف 5 هضم آنزیمی pGEMT-HA با آنزیمهای HindIII/XhoI)

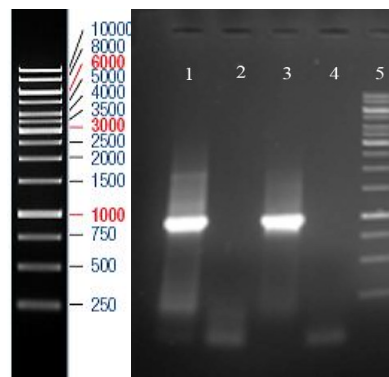
می‌باشد که قطعه برش یافته حدود 800bp است و ردیف 3 مربوط به اثر آنزیمهای XhoI و HindIII است که قطعه 960 نوکلئوتیدی تولید می‌کند.

در پایان توالی‌های تعیین ترادف شده با توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن از طریق برنامه BLASTN مقایسه شد و نتایج تطابق صددرصد را نشان داد.

همچنین نتایج تکثیر ژن زیر واحد بزرگ هم‌گلویتینین (HA1) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در شکل 2a، آنالیز آنزیمی ژن این زیر واحد با آنزیم محدودگر NcoI در شکل 2b، ردیف 2 و کلونینگ و تایید آنزیمی آن با آنزیمهای HindIII/XhoI در شکل 2b، ردیف 3 نشان داده شده است. شکل 2b ردیف 2 مربوط به اثر آنزیم NcoI است که دارای یک جایگاه برش در وکتور و یک جایگاه برش در درون ژن



(b)



(a)

شکل 2. نتایج الکتروفورز مراحل تکثیر ژن HA1 و آنالیز آنزیمی کلونینگ ژن HA1 در وکتور pET بر روی ژل آگارز 1 درصد (a) نتایج PCR ژن HA1 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و سازه مرجع THA به عنوان الگو (ردیف 1 PCR با آنزیم Taq معمولی، ردیف 2 کنترل منفی، ردیف 3 PCR با آنزیم Taq high fidelity، ردیف 4 کنترل منفی و ردیف 5 مارکر DNA (1Kb) (b) آنالیز آنزیمی سازه pETHA1 (ردیف 1 سازه هضم نشده، ردیف 2 هضم سازه با آنزیم NcoI، ردیف 3 هضم سازه با آنزیمهای HindIII/XhoI و ردیف 4 مارکر DNA (1Kb))

بحث

تکثیر قطعات کوتاه ژنی هم‌گلوپتینین مناسب است (نتایج نشان داده نشده است). این آنزیم بر خلاف آنزیم‌های Taq ، دنباله آدنوزین که لازمه کلونینگ در ناقل T (که واجد تیمیدین است) می‌باشد، در محصول ایجاد نمی‌کند. در حالی که آنزیم Taq high fidelity ، آنزیمی است که علاوه بر این که قادر است رشته‌های واجد نوکلئوتید آدنین (A) انتهایی را ایجاد کند، توانایی تصحیح رشته در حال سنتز را نیز دارا می‌باشد و تکثیر ژنوم را با کمترین اشتباه، ممکن می‌سازد. در مورد آنالیز آنزیمی ژن‌های مورد نظر با آنزیم‌های محدودگر نیز نتایج حاصله با آنچه که به وسیله نرم افزارهای پیش‌بینی شده به دست آمده بود مطابقت دارد.

در سال 1994 مهندسی و ساخت وکتورهای کلونینگ خانواده T (با تعداد کپی بالا، ژن β - گالکتوزیداز و MCS اختصاصی) منجر به سهولت کلونینگ ژن‌های تکثیر یافته با پلیمرزهایی از قبیل Taq و Taq high fidelity شد (22). در این مطالعه با توجه به ارزش چنین سیستمی مبادرت به کلونینگ در-pGEM-TEasy شد. نتایج به دست آمده از تعیین ترادف و آنالیز آنزیمی قطعه کلون شده در وکتور pGEM-TEasy نشان دهنده تطابق کامل قطعات ژنی استخراج و کلون شده با هم‌گلوپتینین ویروس آنفلوآنزای (H1N1) 20/99 A/New Caledonia است. این تایید، استفاده از این منبع ژنی را برای اهداف خاص از قبیل کلون کردن در وکتورهای بیانی ویژه مانند ناقل باکیلوویروس و E.coli را مقدور می‌سازد. محصول بیان شده در سلول حشره با استفاده از باکیلو ویروس برای تهیه واکسن و دارو، بی‌خطر بوده و بسیار مورد توجه است زیرا باکیلو ویروس‌ها در سطح گیاهان خوراکی وجود دارند و برای مصارف انسانی مضر نمی‌باشند. همچنین وکتورهای پروکاریوتی نظیر انواع pET برای بیان در سلول‌های پروکاریوتی مانند اشیریشیا کلی (*E. coli*) و تولید صنعتی هم‌گلوپتینین به منظور تولید انبوه با امکانات ارزان قیمت جهت تهیه کیت‌های تشخیصی، از اهمیت بالایی برخوردار است (23).

در حال حاضر در کشور ما هیچ گونه فن آوری بومی شده‌ای برای تولید واکسن آنفلوآنزا و کیت‌های تشخیصی به منظور پیش‌گیری و ارزیابی سرمی افراد واکسینه شده و در معرض ویروس وجود ندارد. تهیه بانک ژن‌های ویروس به ویژه هم‌گلوپتینین در این راستا حائز اهمیت می‌باشد. زیرا هم‌گلوپتینین مهم‌ترین پروتئین درگیر در ایجاد ایمنی بر علیه ویروس آنفلوآنزا است که ساختمان آن به خوبی شناسایی شده است (13) به نحوی که نه تنها کاندید مناسبی برای تولید واکسن می‌باشد بلکه یکی از بهترین مدل‌های مولکولی انتخاب شده برای مطالعات وسیع در زمینه‌های بیوشیمی، بیوفیزیک و بیولوژی مولکولی است (14، 15). لذا تحقیق و اقدام به تولید فرم نو ترکیب آن امری ضروری می‌باشد. از سال 1980 میلادی تولید فرم نو ترکیب شاخص‌های آنتی ژنیک هم‌گلوپتینین ویروس آنفلوآنزا در E.Coli آغاز گردید و سپس با گسترش فن آوری تولید پروتئین‌های نو ترکیب، در سایر میزبان‌های یوکاریوتی (مخمر، سلول حشرات، گیاهان و سلول‌های پستانداران) نیز بیان شده است که هر کدام با توجه به مزایا و معایبی که دارند برای اهداف خاصی به کار برده می‌شوند (16-21). در جهت رسیدن به تولید هم‌گلوپتینین نو ترکیب، تخلیص RNA ، سنتز cDNA ، تکثیر ژن به روش RT-PCR و کلون کردن آن در یک وکتور کلونینگ مناسب گام‌های اولیه در تهیه واکسن نو ترکیب بر علیه هر سویه جدید ویروسی شناخته شده می‌باشد.

در این تحقیق نتایج به دست آمده نشان داده است که چنانچه بلافاصله بعد از استخراج RNA ، سنتز cDNA انجام شود، بهترین نتیجه حاصل می‌گردد زیرا ذخیره سازی RNA حتی در دمای 70- درجه سانتی‌گراد باعث تخریب آن گشته و کاهش شدید میزان cDNA را به دنبال دارد. همچنین در این مطالعه برای تکثیر ژن به وسیله PCR از آنزیم‌های پلیمرز مختلف استفاده گردید و نشان داده شد که آنزیم *pfu* (fermentase) مورد استفاده، فقط برای

- Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>.
5. Sveda MM, Lai CJ. Functional expression in primate cells of cloned DNA coding for the hemagglutinin surface glycoprotein of influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(9):5488-92.
 6. Haque A, Hober D, Kasper LH. Confronting potential influenza A (H5N1) pandemic with better vaccines. 2007.
 7. Shahidi M, Kheiri MT, Amini-Bavil-Olyae S, Hosseini M, Moattari A, Tabatabaeian M, et al. Molecular and phylogenetic analysis of human influenza virus among Iranian patients in Shiraz, Iran. *Journal of medical virology*. 2007;79(6):803-10.
 8. Soltani Z, Hosseini M, Shahidi M, Hedayati M, Kheiri MT. Molecular Analysis of Human Influenza Virus in Tehran, Iran. *Intervirology*. 2009;52(2):63-7.
 9. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of virology*. 2001;146(12):2275-89.
 10. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001.
 11. promega.com, The Association; Promega Technical Manual (pGEM-T and pGEM-TEasy vector systems) 5/2007[homepage on the Internet]. Available from: <http://www.promega.com>
 12. Bac-to-Bac Baculovirus Expression system Manual protocol.
 An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. version D. 2004 10359. Available from: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Invitrogen_bactobacexpression.
 13. Wiley DC, Wilson IA. Structural identification of the antibody binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*. 1981; 289:373-8.
 14. Ramalho-Santos J, de Lima MC. The influenza virus hemagglutinin: a model protein in the study of membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1376:147-54.
 15. Braakman I, Hoover-Litty H, Wagner KR, Helenius A. Folding of influenza hemagglutinin

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت تهیه بانک ژن هم‌گلوتینین و نتایج به دست آمده، چنین نتیجه گیری می‌شود که با به کارگیری دستاوردهای این تحقیق، در صورت تامین بودجه مناسب به راحتی می‌توان چنین سازه‌هایی را تهیه نمود تا در صورت بروز اپیدمی یا پاندمی آنفلوآنزا، با سرعت بیشتری به واکسن موثر و کیت‌های تشخیصی سری می‌دسترسی داشت. همچنین با تعمیم کار برای سایر پروتئین‌های ویروس آنفلوآنزا نظیر M2 و NP (که در حال حاضر در واحد آنفلوآنزای انستیتو پاستور ایران تهیه شده‌اند) و سایر ژن‌ها، بانک ژنی ویروس آنفلوآنزا دایر گردد تا در اختیار سایر پژوهش‌گران و تولیدکنندگان قرار گیرد.

تشکر و قدر دانی

از سرکار خانم منصوره طباطبائیان که مسئولیت کشت ویروس در سلول را عهده‌دار بوده‌اند و جناب آقای علی ترابی جهت همکاری در تهیه برخی مواد و امکانات تقدیر و تشکر می‌گردد. این پروژه با استفاده از امکانات مالی طرح پژوهشی 411 انیستینوپاستور ایران و با همکاری علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری اجرا شده است.

منابع

1. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *Jama*. 2004;292(11):1333-40.
2. Chan CH, Lin KL, Chan Y, Wang YL, Chi YT, Tu HL, et al. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 2006;136:38-43.
3. Collins JK, Knight CA. Removal of carbohydrate from influenza A virus and its hemagglutinin and the effect on biological activities. *Journal of Virology*. 1978;27(1):164-171.
4. ncbi.nlm.nih.gov [homepage on the Internet]. Association of genomes Online Resources.

- in the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*. 1991;114(3):401.
16. Song L, Nakaar V, Kavita U, Price A, Huleatt J, Tang J, et al. Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: a solution to global pandemic and seasonal needs. *PlosOne*. 2008; 3(5):e2275
17. Hartman JR, Nayak DP, Fareed GC. Human influenza virus hemagglutinin is expressed in monkey cells using simian virus 40 vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(2):233-7.
18. Hidayatullah TA. Cloning and expression of antigenic sites of hemagglutinin of Influenza A virus. *International Journal of Integrative Biology*. 2009;6(3):137-42.
19. Jabbar MA, Sivasubramanian N, Nayak DP. Influenza viral (A/WSN/33) hemagglutinin is expressed and glycosylated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(7):2019-23.
20. Nitar N, Qigai H, Sudarat D, Qingyun D, Ivanus M, Yukol L, et al. Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microbiology*. 2006; 6(16):1-7.
21. Mueller M, Renzullo S, Brooks R, Ruggli N, Hofman MA. Antigenic characterization of recombinant hemagglutinin proteins derived from different avian influenza virus subtypes. *PLoSOne*. 2010;5(2):e9097.
22. fermentas.com [homepage on the Internet]. Association of genomes Online Resources; Available from: <http://www.fermentas.com/>.
23. Alvarez MM, López-Pacheco F, Aguilar-Yañez JM, Portillo-Lara R, Mendoza-Ochoa GI, García-Echauri S, et al. Specific Recognition of Influenza A/H1N1/2009 Antibodies in Human Serum: A Simple Virus-Free ELISA Method. *PLoSOne* 2010;5(4):e10176