مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 8 (شماره پیاپی 67)، دی 1391، 25-16

ساخت باکیلوویروس نوترکیب کد کننده توأم پروتئین‌های هماگلوتینین، نورآمینیداز و ماتریکس ویروس آنفلوانزای H_1N_1 خوکی و بیان آن در سلول‌های حشرات

فریدا بهزادیان[1]، زهرا گودرزی[2]، اسماعیل صابر فر[3*]

1- استاد یار، پژوهشکده علوم و فن آوری زیستی، گروه مهندسی ژنتیک، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران
2- کارشناس ارشد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... ، تهران، ایران
3- دانشیار، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... ، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 90/11/12 تاریخ پذیرش: 91/3/3

چکیده

زمینه و هدف: تغییرات ژنتیکی ویروس آنفلونزا، هر ساله باعث ایجاد اپیدمی‌های جدید در سراسر دنیا می‌شود. ساخت یک واکسن جدید به منظور پیش‌گیری از ویروس آنفلونزا در چند سال اخیر هدف اصلی پژوهشگران بوده است. هدف ما از این پژوهش،ساختن باکیلوویروس نوترکیبی است که بتواند دو گلیکوپروتئین سطحی آنتی ژنیک هماگلوتینین و نورآمینیداز، به همراه پروتئین ماتریکس ویروس آنفلوانزاینوع A را به طور مستقل بیان نماید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا کاست سه گانه‌ای که بیان هم‌زمان و مستقل سه ژن هماگلوتینی، نورآمینداز و پروتئین ماتریکس را تأمین نماید، طراحی و سنتز شد. این کاست سپس در پلاسمید دهنده pFastBac1 کلون شد تا به پلاسمید دهنده pFastBacI HNM1 دست بیابیم. کلون مذکور در میزبان E.Coli DH10Bac با انجام ترانسپوزیشن همسان، بکمید نوترکیب را ساخت. این سازه پس از تائید با PCR، برای تکوین باکیلوویروس نوترکیب در سلول‌های حشرات SF9 تراریخت شد.

یافته‌ها: نتایج هضم آنزیمی، کلونینگ صحیح پلاسمید دهنده pFastBacI HNM1 را تایید نمود. طول صحیح نواحی تکثیر یافته هدف بر روی بکمید نوترکیب،دلیل بر صحت نوترکیبی همسان بین پلاسمید دهنده pFastBacI HNM1 و بکمید موجود در E.Coli DH10Bac بود. آثار ضایعات سلولی SF9 به دنبال تراریختی با بکمید نوترکیب، نشان دهنده تکوین موفق باکیلوویروس نوترکیب بود.آنالیز پروتئین‌های این سلول‌ها نشان داد هر سه پروتئین هدف به طور مؤثر و هم‌زمان بیان یافته‌اند.

نتیجه‌گیری: باکیلوویروس نوترکیب ساخته شده در این طرح ویژگی‌های درست جهت قابلیت استفاده در تولید ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا ویژه استرین خوکی را دارد.

واژگان کلیدی: باکیلو ویروس، ساب تایپ H1N1، ویروس آنفلونزای تیپA، ذرات شبیه ویروس

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی
Email: saberfar@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ویروس آنفلوانزای A، یکی از اعضاء خانواده ارتومیکوویروس‌ها می‌باشد که توانایی آلوده ساختن طیف وسیعی از حیوانات و هم‌چنین انسان را دارد. ژنوم این ویروس از 8 قطعه جداگانه با پلاریته منفی تشکیل شده است که بر پایه خواص آنتی‌ژنیک دو گلیکوپروتئین سطحی، موسوم به هماگلوتینین (Hemagglutinin-HA) و نورآمینیداز (Neuraminidase-NA) به لحاظ سرولوژیکی تشخیص داده می‌شود(1). تا کنون تمامی تحت تیپ‌های متنوع از ویروس آنفلوانزای A که حاوی تلفیق‌های مختلف از انواع هماگلوتینین و نورآمینیداز بوده‌اند، از پرندگان جدا شده است(2). مسئله وقوع نوترتیپی ژنتیکی یا همان تغییرات شیفت و جهش‌های رایج در قطعات ژنومی این ویروس یا همان تغییرات دریفت، می‌تواند منجر به ایجاد نوع نوظهوری از ویروس آنفلوانزا گردد که سد گونه‌ای را در هم شکسته و موجب انتقال بیماری از پرنده به انسان و حتی پس از آن، انتقال انسان به انسان گردد. این پدیده ، ظهور پاندمی‌های آنفلوانزا را که به سرعت در جمعیت‌های انسانی پخش می‌شود، به دنبال خواهد داشت(1، 2). بدون شک واکسیناسیون، ابزاری مقرون به صرفه و کارامد در کنترل بیماری و محدود نمودن پیامدهای گسترده ویروس‌های آنفلوانزای نوع A می‌باشد. اولین پاسخ ایمنی در بدن به دنبال عفونت آنفلونزا از طریق تولید آنتی‌بادی علیه هماگلوتینین و نورآمینیداز صورت می‌گیرد. ویروس آنفلوانزا در مراحل ابتدایی چرخه عفونت، با عاملیت هماگلوتینین به سلول‌های میزبان متصل و در آنها نفوذ می‌کند، در حالی که نورآمینیداز در آزادسازی ویریون‌های تکثیر شده در سلول، از خلال غشاهای سلول میزبان نقش ایفا می‌کند(3). به همین سبب اغلب واکسن‌های مطرح در حوزه تحقیقات و تولید صنعتی، در صدد تولید و معرفی محصولاتی می‌باشند که سیستم ایمنی هومورال را به شکل کارآمدی برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه این دو پروتئین تحریک نماید. تغییرات مولکولی گلیکو پروتئین‌های هماگلوتینین و نورآمینیداز باعث شده که سویه‌های ویروسی در گردش هر ساله دستخوش تغییر شده و در نتیجه واکسن‌های رایج نتوانند موثر واقع شوند. به همین علت کارخانه‌های تولید واکسن هر ساله می‌بایستی از سویه‌های در گردش همان سال که توسط سازمان بهداشت جهانی تأمین و به عنوان بذر استاندارد معرفی می‌شود، استفاده نموده و واکسن‌های جدید و موثر بسازند، فرآیندی که بین 6 تا 9 ماه به طول می‌انجامد. این تولیدکنندگان محصولات خود را غالباً بر پایه تخم مرغ یا کشت سلول تولید می‌نمایند که هر یک محدودیت‌ها و نقاط ضعف خود را دارد(4، 5).

مطالعات متعددی درسال‌های اخیر بر روی معرفی و توسعه ذرات شبه ویروسی که حاوی اجزاء پوششی و ایمونوژن ویروس می‌باشد به عنوان جایگزین واکسن‌های آنفلوانزا صورت گرفته است که همگی آنها تأثیرات کارامد خود را در تحریک سیستم ایمنی و بازدارندگی در مقابل عفونت در حیوانات آزمایشگاهی نشان داده‌اند. در این مطالعات بیان توأم تعداد مختلفی از ژن‌های ویروس برای ساخت ذرات شبه ویروسی به کار رفته است. ضمن این که برای تکوین این ذرات نیز از سیستم‌های بیانی مختلفی نیز سود جسته‌اند(11-6). به عنوان مثال در یک مطالعه از چهار ژن هماگلوتینین و نورآمینیداز و ماتریکس (M2 و M1) برای ساخت این ذرات استفاده گردید(12). در حالی که در مطالعات دیگر از سه ژن هماگلوتینین، نورآمینیداز و ماتریکس نوع یک و یا حتی دو ژن M1 و HA در تکوین این ذرات استفاده شده است(13، 14). در مجموع تمامی محصولات حاصله به خوبی حفاظت کننده و ایمونوژن بوده‌اند.

در این مطالعه با هدف نهایی تولید ذرات شبه ویروسی سویه H1N1 خوکی، ابتدا کاست ژنی مرکبی از سه ژن هماگلوتینین، نورآمینیداز و ماتریکس نوع یک طراحی گردید به طوری که هر یک از ژن‌ها بیان مستقل خود را داشته باشند. پس از ساخت باکیلوویروس نوترکیب

www.SID.ir
Archive of SID

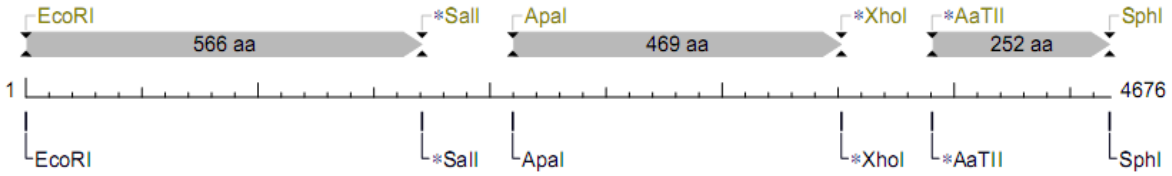
مربوطه در سلول‌های حشرات، بیان موفق و همزمان هر یک از پروتئین‌های هدف در این رده سلولی نشان داده شد.

مواد و روش ها

طراحی کاست مرکب و کلونینگ آن

در این مطالعه تجربی، ترادف‌های اختصاصی سه ژن نورآمینیداز، هماگلوتینین و ماتریکس نوع یک (M1) از ترادف گزارش شده به بانک ژنی از ایزوله خوکی H1N1 (A/California/04/2009) گرفته و در مهندسی کاست مرکب از آنها استفاده گردید. چنانچه در شکل 1 ملاحظه می‌شود در کاست ترکیبی طراحی شده ابتدا قاب خواندنی HA با طول 1698 جفت باز قرار داده شد که پس از کلون کردن این مجموعه تحت کنترل بیانی پروموتر پلی هیدرین موجود در اسکلت پلاسمید pFastBacI قرار می‌گیرد و با رمز اختتام در پایان قاب خواندنی خود، بیانش پایان می‌پذیرد. پس از آن، ترادف علامت پلی آدنیلاسیون SV40 به منظور ارتقا بیان پیش‌بینی شده است که به دنبال آن توالی فاصله‌انداز به طول 15 جفت باز قرار داده شد. پس از این مجموعه، بسته بیانی NA قرار دارد که توالی عناصر آن از ´5 به ´3 شامل ترادف پروموتر پلی هیدرین، قاب خواندنی NA با طول 1407 جفت باز و علامت پلی آدنیلاسیون SV40 می‌باشد. پس از این مجموعه، توالی فاصله انداز با طول 15 جفت باز و بعد از آن بسته بیانی M1 قرار داده شد. ترتیب ترادف این بسته شامل ترادف پروموتری پلی هیدرین و قاب خواندنی M1 با طول 756 جفت باز می‌باشد. این ژن آخر، پس از کلون شدن در pFastBacI در بالا دست علامت پلی آدنیلاسیون SV40 متعلق به پلاسمید قرار گرفته و از آن استفاده می‌نماید. سازماندهی به گونه‌ای است که هر ژن در کاست خود رونویسی و بیان می‌گردد.

کاست ترکیبی مشروح در بالا برای سفارش سنتز به کمپانی ژن اسکریپت ایالات متحده فرستاده شد و به صورت یکپارچه تحت سنتز قرار گرفت. شکل شماتیک 1 نشان دهنده موقعیت کاست‌ها در یک مجموعه ترکیبی بوده و محل‌های برش آنزیمی که برای کلونینگ یا برای استفاده از هر یک از بخش‌ها در پروژه‌های آینده، پیش بینی شده است را نشان می‌دهد.



شکل 1. نمای شماتیک از کاست مرکب HNM1 که با نرم افزار روی خط "نبکاتر" رسم گردیده است. قاب‌های خواندنی مستقل و محل‌های برش آنزیمی مهم بر روی شکل نشان داده شده است.

در ابتدا و انتهای این مجموعه به ترتیب محل‌های برش EcoRI و SphI قرار داده شده است. با استفاده از برش دوگانه این دو آنزیم پلاسمید دهنده pFastBacI خطی شده و قطعه مورد نظر موسوم به HNM1 که در مجموع 4676 جفت باز طول دارد، پس از آماده سازی با واکنش T4 لایگیشن در آن کلون و تأیید گردید. این کلون pFastBacI HNM1 نامیده شد.

تولید باکیلوویروس نوترکیب

جهت ساخت بکمید نوترکیب، سلول‌های میزبان E.coliDH10Bac را ابتدا صلاحیت‌دار کرده و سپس توسط پلاسمید نوترکیب pFastBacI HNM1 فرآیند تراریخت شد. نوترکیبی همسان از طریق محل‌های خاص (Tn7) بین پلاسمید دهنده pFastBacI HNM1 و ژنوم باکیلوویروس AcMNPV موسوم به بکمید، انجام گرفت و

www.SID.ir
Archive of SID

بدین ترتیب بکمیدهای نوترکیب حاوی کاست ترکیبی HNM1 تشکیل گردید. بکمیدهای مذکور به علت تخریب ژن LacZ دارای فنوتیپ سفید بودند و توسط روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی M13، مورد تأیید قرار گرفتند. برنامه دمایی این واکنش مطابق جدول 1 انجام گرفت. آنزیم مصرف شده در این واکنش به سبب طول نسبتا بلند نواحی هدف Dream Taq(محصول فرمنتاز) بود.

جدول 1. دستورالعمل حرارتی واکنش PCR براساس پرایمر های pUC/M13

	1 سیکل	35 سیکل			1 سیکل
	واسرشتگی اولیه	واسرشتگی	اتصال آغازگر	طویل شدن	طویل شدن انتهایی
دما	95	95	58	68	68
زمان	2 دقیقه	20 ثانیه	30 ثانیه	5 دقیقه	7دقیقه

کشت سلولی و آلوده سازی با باکیلوویروس

سلول های حشرات Spodoptera Frugiperda (SF9) ، از بانک سلولی پاستور تهیه و در محیط گریس حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین با سرم جنین گوساله 10 درصد (محصول کمپانی گیبکو) در 27 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.

فرآیند ترانس فکشن این سلول‌ها، با استفاده از حاملین لیپیدی کاتیونیک با نام تجاری سلفکتین (محصول کمپانی اینویتروژن) مطابق دستور سازنده انجام پذیرفت. به طور خلاصه این فرآیند در ظروف کشت سلول 6 خانه‌ای حاوی $1/5-2/5\times10^6$ سلول‌های جوان در فاز لگاریتمی، تکثیر و با استفاده از تلفیق 1 میکروگرم از DNA بکمیدی و 8 میکروگرم محلول سلفتکین انجام گرفت. سلول‌ها هر روز، در مقایسه با کنترل غیر آلوده، مورد بازبینی قرار گرفته و 3 روز پس از تراریختی، ویروس‌ها جمع‌آوری گردید. جهت افزایش تیتر ویروس به دست آمده از نسل اول، دو پاساژ متوالی دیگر نیز بر روی سلول‌های SF9 انجام گرفت. بدین وسیله ذخیره ویروس نوترکیب با تیتر مناسب به دست آمد و جهت ذخیره سازی در 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در پایان به منظور جمع‌آوری پروتئین، فلاسک‌های بزرگ‌تر (25 و 75 میلی‌متری) حاوی سلول‌های Sf9 با تراکم $2-2/5\times10^6$ با ویروس‌های نوترکیب با عیار عفونت‌زایی بالا در حدود 3 آلوده گردید. 72 ساعت پس از آلوده سازی هنگامی که آثار ضایعات آسیب شناختی سلولی ظاهر شد و قبل از رخ دادن لیز و ریختگی سلول‌ها، مایع رویی فلاسک، خارج و پروتئین تام سلول‌ها با مقادیر مناسبی از بافرنمونه جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از حرارت دادن، بر روی ژل کوچک SDS-PAGE با گرادیانت 12/5 درصد جداسازی شد. ژل‌ها به صورت قرینه در دو سوی مارکر پروتئینی، نمونه‌گذاری گردید. بخشی برای رنگ آمیزی کوماسی و قسمت دوم برای وسترن بلات در نظر گرفته شد. سپس فرآیند چند مرحله‌ای روبه رو سازی با آنتی بادی‌های اختصاصی و ثانویه بر روی آن انجام گرفت. برای ظهور باند اختصاصی HA از پلی کلونال آنتی بادی بر علیه پروتئین H1 خوکی جدایه کالیفرنیا (محصول کمپانی پروسای) استفاده شد. برای ظهور باند اختصاصی NA از پلی کلونال آنتی بادی بر علیه پروتئین N1 (محصول کمپانی ابکم) و برای ظهور باند اختصاصی M1 از مونوکلونال آنتی بادی علیه ماتریکس پروتئین آنفلوانزا (محصول کمپانی سروتک) استفاده شد. آنتی بادی ثانویه برای ظهور باندهای HA و NA سرم ضد خرگوش تهیه شده در بز که نشاندار با پراکسیداز است (محصول کمپانی رازی فراطب) و برای M1، سرم ضد موش تهیه شده در بز که نشاندار با پراکسیداز است (محصول کمپانی سیگما)، استفاده گردید. کاغذهای نیتروسلولز هر یک جداگانه با آنتی‌بادی‌های اولیه به غلظت 1 /200 در تمام طول شب و آنتی‌بادی‌های ثانویه برابر غلظت ارائه داده شده در بروشورهای مربوطه، به مدت یک ساعت در معرض قرار گرفتند. برای انجام این آزمایش از روش‌های استاندارد و رایج استفاده شد(15، 16).

Archive of SID

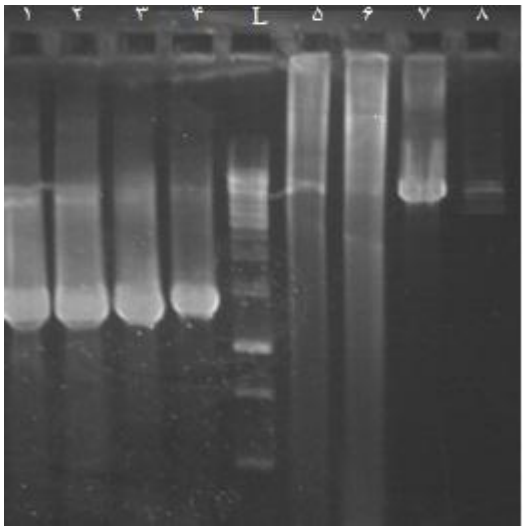
www.SID.ir

یافته ها

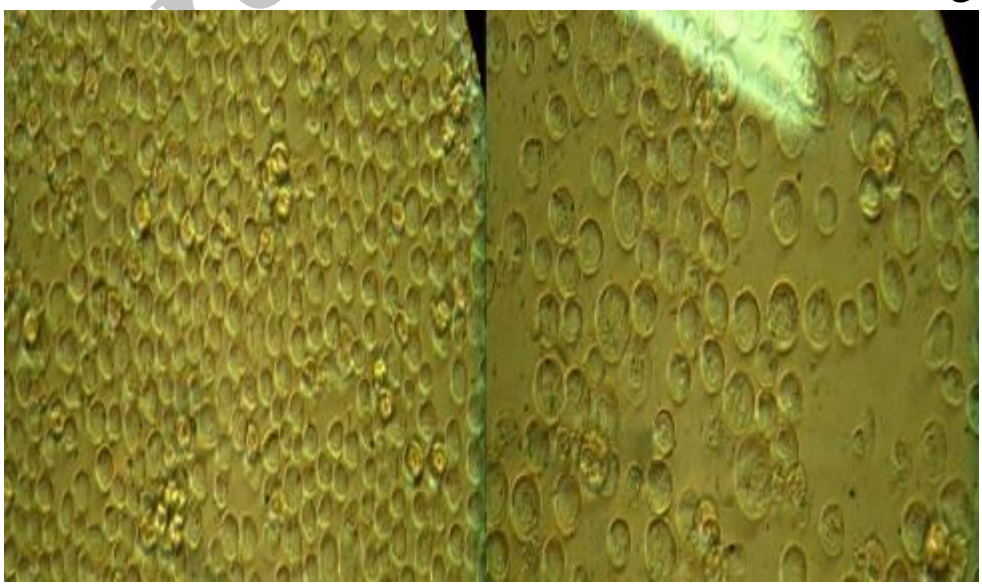
ترادف و کروماتوگرام کاست ترکیبی سنتز شده، با ترادف سفارش داده شده کنترل شد و هم تراز سازی آنها، کیفیت مطلوب و بدون خطای سنتز قطعه نسبتاً طولانی 4676 جفت بازی HNM1 را خاطر نشان ساخت. کلون‌های انتخابی، حاصل واکنش لایگیشن HNM1 و pFastBac1 که هر دو با آنزیم‌های EcoRI / Sph1 هضم و آماده شده بود ، صحت کلونینگ و تکوین HNM1 pFastBac1 را تأیید نمود.

انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی M13 بر روی بکمیدهای حاصل از استخراج کلنی‌های سفید، وقوع نوترکیبی موفق، بین قطعه HNM1 از پلاسمید نوترکیب دهنده با بکمید موجود در میزبان E.coli DH10 Bac را نشان داد (شکل 2).

به دنبال تراریختی سلول‌های SF9 با بکمید نوترکیب مذکور، ویروس‌های باکیلوی نوترکیب تکوین یافتند. شکل 3 آثار ضایعات آسیب شناختی سلولی در اثر فعالیت تکثیری بکمید نوترکیب را نشان می‌دهد. این تغییرات شامل توقف رشد، افزایش قطر سلول و اندازه هسته سلول، گرانوله شدن ظاهر سلول و بالاخره جدا شدن سلول‌ها از سطح فلاسک در فاز نهایی می‌باشد.



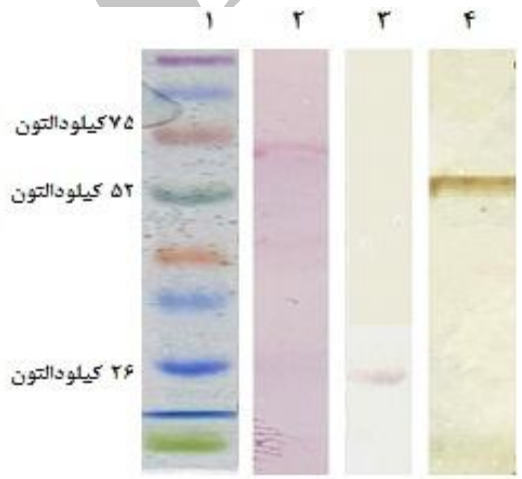
شکل 2. ژل الکتروفورز 1 درصد محصول PCR بر روی چهار نمونه از بکمیدهای نوترکیب به دست آمده از کلنی های سفید با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی PUC/M13 و پرایمر جلودار اختصاصی ناحیهM1 که یکی از نواحی سه گانه در قطعه HNM1، می‌باشد. ردیف‌های 1 ، 2 ،3 و 4 محصول PCR با استفاده از پرایمرهای معکوس M13 و جلودار M1 می‌باشد که قطعه مورد انتظار(1400 جفت باز) تشکیل شده است. ردیف‌های5، 6، 7 و 8 محصول PCR است که با استفاده از جفت پرایمرهای M13 به ترتیب بر روی همان نمونه‌ها صورت گرفته و باند مورد انتظار(7300 جفت باز) را ایجاد نموده است. ردیف L ، مارکر 1 کیلوبازی (محصول کمپانی فرمنتاز)



www.SID.ir
Archive of SID

شکل 3. نمای میکروسکوپی لایه سلولی SF9 ;سمت چپ، سلول‌های کنترل غیر آلوده و سمت راست سلول‌های آلوده با باکیلو ویروس نوترکیب که دچار ضایعات آسیب شناختی سلولی تیپیک گردیده اند.

پروتئین‌های برداشت شده از نمونه سلول‌های آلوده با باکیلوویروس کد کننده HNM1 و سلول‌های غیر آلوده کنترل در کنار مارکر پروتئینی بر روی SDS-PAGE جداسازی شد و ابراز پروتئین‌های HA، NA، M1 به صورت ایمونولوژیکی به روش وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج به دست آمده حاکی از کارکرد درست هر یک از کاست‌های بیانی در مجموعه طراحی شده در یک کاست سه گانه می‌باشد(شکل 4).



شکل4. بیان پروتئین‌های M1 , HA و NA بر اساس تست وسترن بلات، ستون 1؛ مارکر پروتئینی (محصول کمپانی فرمنتاز)، ستون‌های 2، 3 و 4 به ترتیب مربوط به پروتئین‌های HA، M1 و NA با وزن‌های مولکولی تقریبی به ترتیب 27، 55 و 70 کیلو دالتون می‌باشد.

بحث

در سال‌های اخیر یکی از استرین‌های نوظهور ویروس آنفلوانزای A، استرین خوکی H1N1 بوده است. این استرین ابتدا از مکزیک و سپس از ایالات متحده گزارش گردید و به سرعت در 74 کشور دیگر پخش شد به طوری که سه ماه بعد سازمان بهداشت جهانی، وضعیت انتشار بیماری را پاندمی فاز شش اعلام نمود(16). اصولاً مسئله وقوع پاندمی‌های آنفلوانزا و انتشار سریع آن در جمعیت‌های انسانی دغدغه همیشگی طراحان و تولید کنندگان واکسن آنفلوانزا بوده است. یکی از روش‌های نوین در تولید واکسن آنفلوانزا، سود جستن از تکنولوژی زیستی و مهندسی ژنتیک جهت تولید ذرات شبه ویروسی است(3). برای بسیاری از ویروس‌ها ساختارهای ذرات شبه ویروسی نوترکیب، به عنوان یافتن واکسنی امید بخش مطرح گردیده است. این ذرات به دلیل ایمنی زایی فوق العاده زیاد، راه اندازی آنتی بادی‌های خنثی کننده به سبب این که فرم فضایی اپی توپها همانند ویروس وحشی می‌باشد و مزایایی که در تولید آن از نظر ضوابط ایمنی دارد، در این زمینه بسیار مورد توجه بوده‌اند(19-17).

سر هم شدن پروتئین‌های آنفلوانزا و تشکیل ذرات شبه ویروسی این ویروس قبلا در سیستم سلولی پستانداران، مخمر و سلول‌های حشرات نشان داده شده است(20، 21). استفاده از سلول‌های حشرات به عنوان میزبان و سیستم باکیلوویروس به عنوان ناقل ژن‌های هدف از جمله سیستم‌هایی هستند که مزایای بیشتری نسبت به سیستم‌های قبلی دارند. به عنوان مثال در این سیستم پپتیدها در مسیرهای مشابه با سلول‌های پستانداران دچار تغییرات پس از ترجمه می‌شوند و در محل‌های هدف سلولی جای می‌گیرند در نتیجه پروتئین نوترکیب، ساختار و عملکرد مشابه پروتئین طبیعی خواهد داشت که این امر به خصوص در مورد HA و NA که اشکال فضایی در عملکرد آنها نقش حیاتی دارد، بسیار مهم می‌باشد(2).

با توجه به این مزایا برای تولید ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا که هدف نهایی این مطالعه است، سیستم مذکور انتخاب گردید ولی اولین گام طراحی کاست مربوطه و تولید بکمید نوترکیب آن است. پروتئین‌های پوششی ویروس آنفلوانزا(M ، NA و HA) آنتی‌ژن‌های اصلی در معرض با سیستم ایمنی میزبان می‌باشند. این سه پروتئین به

www.SID.ir
Archive of SID

هنگام جوانه زدن ذرات ویروسی (یا شبه ویروسی) در غشاء پلاسمایی با یکدیگر میانکنش داده و سپس با کسب غشاء لیپیدی دو لایه از سلول میزبان رها می‌گردند. به همین سبب در اغلب مطالعات انجام گرفته بر روی طراحی و ارائه ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا این سه ژن اساسی، لحاظ گردیده‌اند(25-22). در کاست مرکبی که ما در این پروژه طراحی نمودیم و کارکرد مورد انتظار را از خود نشان داد، اگر چه هر سه ژن HA، NA و M در یک جهت قرار دارند لیکن هر یک تحت کنترل نسخه برداری مستقل با پروموتر پلی هیدرین خود می‌باشند. به این ترتیب رقابت احتمالی بین ژن‌ها در بهره‌برداری از پروموتر منتفی است. از سویی به سبب استفاده از سیگنال پلی A پس از قاب خواندنی هر پروتئین که خاتمه نسخه‌برداری از روی قاب را اجرایی می‌نماید، مسئله تداخل عمل پروموترهای متوالی منتفی است.

نسخه‌برداری مطلوب از روی ژن‌های هدف، سبب بیان مکفی از هر سه پروتئین می‌شود. اگر چه به هنگام شکل‌گیری ذرات ویروسی از هر پروتئین به میزان لازم در واکنش گردآوری استفاده خواهد شد.

پوشکو و همکاران در سال 2005 برای تولید کاست ترکیبی، ابتدا سه ژن را جداگانه تکثیر و جداگانه در پلاسمید دهنده pFastBac کلون نمودند و سپس طی چند مرحله پیچیده کلونینگ، سه کاست را به یکدیگر پیوند دادند(24).

امروزه با ارزان‌تر شدن و در دسترس قرار گرفتن خدمات سنتز ژن این امکان فراهم گردیده که ژن‌ها و عناصر بیانی و تنظیم گر ژنتیکی، با طراحی مورد نظر محقق و با صرفه جویی در زمان اجرای پروژه سفارش سنتز داده شوند. به همین جهت در این پروژه پس از طراحی دقیق کاست مرکب و آنالیز نرم افزاری، سفارش سنتز آن داده شد و به صورت یکپارچه در پلاسمید دهنده کلون گردید. این پلاسمید علی رغم طول بلند قطعه پذیرفته شده در خود، توانست با کارآیی خوبی در میزبان E.coli DH10 Bac ، ترانسپوزیشن Tn7 (Tn7 transposition) را انجام دهد و بکمیدهای نوترکیب را بسازد.

برای انجام تراریختی در سلول‌های یوکاریوتی روش‌های مختلفی از جمله استفاده از رسوب کلسیم فسفات، دکستران، الکتروپوریشن (electroporation)، لیپیدهای کاتیونی وجود دارد(15). مطالعات انجام گرفته نشان داده است که سلفکتین که خود نوعی لیپید کاتیونی است، برای ترانسفکت کردن سلول‌های حشرات نسبت به سایر روش‌ها برتری داشته و آسان‌تر نیز می‌باشد. لذا در این مطالعه برای دخول بکمید نوترکیب به سلول‌های میزبان از آن استفاده نمودیم. در این تحقیق بروز ضایعات آشکار و تیپیک آسیب شناختی سلولی در میزبان SF9 نشان دهنده کارآیی بسیار مطلوب فرایند تراریختی و افزایش عیار ویروس‌های عفونت‌زا در این رده سلولی می‌باشد. بررسی پروتئین‌های استخراج شده از سلول‌های آلوده به باکیلوویروس نوترکیب حاوی کاست HNM1، در مقایسه با سلول‌های کنترل بدون آلودگی، بیان کارا و مستقل هر یک از ژن‌های سه گانه را مورد تأیید قرار داد. رده‌های مختلف سلول‌های حشرات بدین منظور به کار می‌رود معهذا رده‌های سلولی SF9 و Sf21 بیشتر توصیه می‌شود. هر چند که پس از تولید باکیلوویروس نوترکیب می‌توان از رده‌های دیگر مانند های فایو (Highfive) یا MimicSF9 نیز استفاده کرد(26). در ادامه این مطالعه باید در مقیاس بالا اقدام به تولید پروتئین‌های هدف نموده و پس از عملیات تخلیص با میکروسکوپ الکترونی در جستجوی ذرات 120-100 نانومتری تکوین یافته باشیم. هم‌چنین به جاست که کارآیی این ذرات در تحریک سیستم ایمنی حیوان سنجیده و با سایر مطالعات مقایسه شود.

نتیجه گیری

بیان کارا و مستقل هر یک از ژن‌های سه گانه پروتئین‌های استخراج شده از سلول‌های آلوده به باکیلوویروس نوترکیب حاوی کاست HNM1، در مقایسه

www.SID.ir
Archive of SID

با سلول‌های کنترل بدون آلودگی که خود پیش شرط شکل‌گیری ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا می‌باشد، نشان می‌دهد که باکیلوویروس نوترکیب ساخته شده در این طرح مؤلفه‌های درست جهت قابلیت استفاده در تولید ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا ویژه استرین خوکی را دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای هادی لشینی وکلیه همکاران محترم آزمایشگاه ویروس شناسی کاربردی پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تشکر و قدر دانی می‌نماییم. این مطالعه نتیجه طرح تحقیقاتی با کد تصویب 608- 88 بوده و با حمایت و تامین مالی معاونت پژوهشی پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله انجام گرفته است.

منابع

1. Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ. Textbook of influenza: Blackwell Science Ltd; 1998.
2. Fields BN, Knipe DM. Fields virology. 5 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2007.
3. Ellebedy A, Webby R. Influenza vaccines. Vaccine. 2009;27:D65-D8.
4. Kang SM, Song JM, Quan FS, Compans RW. Influenza vaccines based on virus-like particles. Virus research. 2009;143(2):140-6.
5. Bardiya N, Bae JH. Influenza vaccines: recent advances in production technologies. Applied microbiology and biotechnology. 2005; 67(3):299-305.
6. Buonaguro L, Tornesello M, Tagliamonte M, Gallo R, Wang L, Kamin-Lewis R, et al. Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses. Journal of virology. 2006; 80(18): 9134-43.
7. Sun Y, Carrion R, Ye L, Wen Z, Ro YT, Brasky K, et al. Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. Virology. 2009;383(1):12-21.
8. Bai B, Hu Q, Hu H, Zhou P, Shi Z, Meng J, et al. Virus-like particles of SARS-like coronavirus formed by membrane proteins from different origins demonstrate stimulating activity in human dendritic cells. PloS one. 2008; 3(7):e2685.
9. O'Neal CM, Clements JD, Estes MK, Conner ME. Rotavirus 2/6 viruslike particles administered intranasally with cholera toxin, Escherichia coli heat-labile toxin (LT), and LT-R192G induce protection from rotavirus challenge. Journal of virology. 1998; 72(4): 3390-3.
10. Wang BZ, Liu W, Kang SM, Alam M, Huang C, Ye L, et al. Incorporation of high levels of chimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins into virus-like particles. Journal of virology. 2007; 81(20): 10869-78.
11. Latham T, Galarza JM. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. Journal of virology. 2001; 75(13): 6154-65.
12. Quan FS, Steinhauer D, Huang C, Ross TM, Compans RW, Kang SM. A bivalent influenza VLP vaccine confers complete inhibition of virus replication in lungs. Vaccine. 2008; 26(26): 3352-61.
13. Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrilov V, et al. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. Vaccine. 2007;25(19):3871-8.
14. Ausubel FM. Short protocols in molecular biology. 3th ed. New York ; Chichester: Wiley; 1997
15. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning : a laboratory manual. 3th ed.N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
16. Real-Time R. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N Engl j Med. 2009;2009(360):2605-15.
17. Kitts PA, Possee R. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. Biotechniques. 1993;14(5):810-7.
18. Anderson D, Harris R, Polayes D, Ciccarone V, Donahue R, Gerard G, et al. Rapid generation of recombinant baculovirus and

www.SID.ir
Archive of SID

20. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. Reviews in medical virology. 2006; 16(3):139-49.
21. Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. Journal of virology. 2000; 74(18):8709-19.
22. Mahmood K, Bright RA, Mytle N, Carter DM, Crevar CJ, Achenbach JE, et al. H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses. Vaccine. 2008; 26(42): 5393-9.
23. Galarza JM, Latham T, Cupo A. Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. Viral immunology. 2005;18(1):244-51.
24. Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. Vaccine. 2005;23(50):5751-9.
25. Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrilov V, Massare M, Pushko P, Mytle N, Rowe T, Smith G, Ross TM. Influenza virus like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. Vaccine 2007;25(19):3871-8.
26. Soleimanjahi H, Fotouhi F. Baculoviruses and insect cells as powerful tools gene expression.1st ed. Publication of Tehran University Jihad; 1388.[Persian]
19. Matsuura Y, Possee RD, Overton HA, Bishop D. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. The Journal of general virology. 1987;68:1233-50.
expression of foreign genes using the Bac-to-Bac baculovirus expression system. Focus. 1995; 17(2):53-8.

Archive of SID

www.SID.ir