Archive of SID

DOI: 10.22122/jims.v38i572.12948 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۵۷۲/هفته‌ی چهارم خرداد ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۵ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۳/۲۸

کلون، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا H1N1 انسانی در رده‌ی یوکاریوتیک سلول حشره با استفاده از وکتور باکولوویروس

نیلوفر راشدی[۱]، مرتضی تقی‌زاده[۲]، پریسا محمدی‌نژاد[۳]، مهدی مهدوی[۴]، رضا جلالی‌راد[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ویروس آنفلوانزا H1N1 به عنوان عامل بیماری‌زا و تهدید کننده‌ی حیات انسان مطرح می‌شود. واکسیناسیون، از راه‌های مؤثر برای پیش‌گیری و مهار بیماری آنفلوانزا است. تولید پروتئین نوترکیب هماگلوتینین در سیستم بیانی باکولوویروس، در بستر سلول یوکاریوت حشره (Sf9) به عنوان یک راهکار مؤثر پیشنهاد شده است.

روش‌ها: توالی ژن هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا H1N1 از National Center for Biotechnology Information (NCBI) استنتاج و پس از طراحی پرایمر اختصاصی، توالی با استفاده از هضم آنزیمی در پلاسمید pFastBacHTA کلون گردید و برای تولید یک بکمید نوترکیب به سلول DH10Bac انتقال داده شد. پس از استخراج پلاسمید مربوط و تأیید صحت کار، به داخل سلول حشره ترانسفکت گردید و بعد از بیان پروتئین توسط سلول Sf9، با روش Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) و Western blot، حضور پروتئین نوترکیب تأیید شد.

یافته‌ها: ژن هماگلوتینین با طول ۶۵۴ جفت‌باز در پلاسمید pFastBacHTA به کمک دو آنزیم BamHI و Xhol ساب کلون گردید. سلول حشره بعد از دریافت بکمید نوترکیب، پروتئینی به وزن تقریبی ۶۰ کیلودالتون را بیان نمود. پس از استخراج پروتئین، با روش‌های SDS-PAGE و Western blot تأیید انجام گرفت و با روش Lowry، غلظت پروتئین اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌گیری: سیستم بیانی باکولوویروس برای تولید پروتئین‌هایی با ساختار پیچیده مفید است. به طور کلی، از این طرح می‌توان به این نتیجه رسید که این پروتئین در سلول حشره به میزان بالایی بیان می‌شود و به دلیل تشابه سیستم آن با سیستم انسانی، می‌تواند در آینده به عنوان جایگزین مناسب برای تخم‌مرغ‌های جنین‌دار در زمینه‌ی واکسیناسیون مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا نوع A؛ زیرگروه H1N1؛ هماگلوتینین، سلول Sf9، باکولوویروس

ارجاع: راشدی نیلوفر، تقی‌زاده مرتضی، محمدی‌نژاد پریسا، مهدوی مهدی، جلالی‌راد رضا. **کلون، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا H1N1 انسانی در رده‌ی یوکاریوتیک سلول حشره با استفاده از وکتور باکولوویروس.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۵۷۲): ۲۶۶-۲۶۰.

مقدمه

ویروس آنفلوانزا A، عضو مهمی از خانواده‌ی اورتومیکسوویروس‌ها بود که قادر به ایجاد عفونت در طیف وسیعی از میزبان‌ها می‌باشد (۱). این ویروس، دارای ژنوم RNA منفی و قطعه‌قطعه است که بر اساس آنتی‌ژن‌های سطحی هماگلوتینین (H1-H16) و نورآمینیداز (N1-N9) به زیرگونه‌های مختلفی تقسیم می‌شود (۳-۲). در ۱۰ آگوست ۲۰۱۰، سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization یا WHO)، همه‌گیری آنفلوانزای H1N1 را اعلام و بیان کرد که فعالیت

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استادیار مدعو، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران و استادیار، بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۴- استادیار مدعو، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران و استادیار، مرکز تحقیقات واکسن‌های نوترکیب، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵- استادیار مدعو، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران و استادیار، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی، انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مرتضی تقی‌زاده؛ استادیار مدعو، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

Email: taghizadeh.morteza@gmail.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Archive of SID

آنفلوانزای جهانی به الگوی فصلی معمولی برگشته است (۴). بیشتر سویه‌های ایجاد شده به درمان‌های ضد ویروسی پاسخ خوبی نمی‌دهند (۵). این ویروس، به علت انتشار جهانی و توانایی انطباق با میزبان‌های پستاندار، منجر به تغییرات ژنتیکی برای انتقال کارآمد از انسان به انسان شده است (۷-۶). واکسیناسیون، یک راه مؤثر برای پیش‌گیری و کنترل بیماری آنفلوانزا است (۸). در حال حاضر، دو نوع واکسن Split و زنده‌ی ضعیف شده رایج است که در تخم‌مرغ جنین‌دار تولید می‌شوند، اما به علت ایجاد آلرژی موضعی و سیستمی، چندان مطلوب نیستند و همچنین، استفاده از واکسن‌های تولیدی در رده‌ی سلولی پستاندارن به علت خاصیت سرطان‌زایی، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. اغلب واکسن‌های توصیه شده توسط سازمان بهداشت جهانی، واکسن‌های غیر فعال (کشته شده) و یا زنده‌ی ضعیف شده هستند. در حال حاضر، ۹ مورد واکسن زنده‌ی ضعیف شده در حال استفاده هستند (۹). ۱۳ نوع واکسن غیر فعال نیز ساخته شده‌اند که اغلب از مشتقات بیماری‌زا نظیر پلی‌ساکاریدهای ساختاری هستند. تنها دو مورد از واکسن‌های موجود، نوترکیب می‌باشد. اولین واکسن نوترکیب، واکسن هپاتیت B به عنوان آنتی‌ژن خالص سطح ویروس (Hepatitis B surface antigen یا HBS Ag) از کشت مخمر (Saccharomyces cerevisiae) تولید شد. یکی از مزیت‌های واکسن‌های نوترکیب، عدم وجود ماده‌ی بیماری‌زا در آن‌ها می‌باشد. بنابراین، احتمال بیماری‌زایی ندارند (۹).

برای غلبه بر چالش‌های پیش‌گفته، بیوتکنولوژیست‌ها مسیرهای جدیدی را برای تولید واکسن‌های ایمن‌تر و مؤثرتر معرفی کرده‌اند (۱۱-۱۰). یکی از این مسیرهای پیشنهادی، استفاده از ذرات نوترکیب (Virus-like particles یا VLPs) به جای استفاده از واکسن‌های وابسته به تخم‌مرغ جنین‌دار است. در این مدل واکسن، نیاز به ویروس زنده نیست و عوارض آلرژی ندارد و همچنین، سرعت و کیفیت بالاتری ارایه می‌دهد (۱۳-۱۲). سیستم بیانی حشره (The Baculovirus expression vector system یا BEVS)، به عنوان ابزاری برای تولید سریع پروتئین‌های نوترکیب پیچیده کاربرد دارد. این بستر، به تازگی برای تولید واکسن نیز به کار می‌رود. باکولوویروس‌ها، عوامل بیماری‌زایی حشرات هستند. آن‌ها به دلیل محدوده‌ی میزبان باریک (۱۴) و عدم توانایی تکثیر در مهره‌داران، از جمله انسان، ایمن می‌باشند. یکی از بهترین رده‌های سلولی پذیرنده‌ی باکولوویروس، رده‌ی سلولی حشره Sf9 است. اولین واکسن انسانی تولید شده در سلول‌های حشرات، Cervarix بود که در سال ۲۰۰۷ توسط آژانس داروهای اروپایی (European Medicines Agency یا EMA) و سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA یا Food and Drug Administration) در سال ۲۰۰۹ مجوز گرفت (۹).

واکسن دوم، PROVENGE® است که برای مصارف انسانی از FDA مجوز دریافت کرد. این واکسن، یک محصول درمانی اتولوگ سرطان پروستات می‌باشد که در آن، (Prostate-specific antigen یا PSA) در سلول‌های Sf تولید می‌شود (۹).

امروزه، آنفلوانزا انتخاب جدیدی برای تولید واکسن با استفاده از سیستم Bac-to-Bac و سلول حشره در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه، یک باکولوویروس مونوسیسترونیک تولید شد که حاوی ژن هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا A (H1N1) انسانی بود.

روش‌ها

این مطالعه با دریافت کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1398.046 در مصوبه‌ی اخلاق در پژوهش انجام پذیرفت. بدین منظور، سلول حشره Sf9 (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) و باکتری DH10BAC (انستیتو پاستور ایران) تهیه گردید.

به منظور استخراج از کیت کیاژن (AVL)، RNase (Roche)، کیت سنتز DNA complementary (cDNA) (Roche) و همسانه‌سازی ژن مورد از آنزیم‌های Xhol I (Jena Bioscience) و BamHI (Fermentas, JenaBioscience)، آنزیم Pfu پلی‌مراز (Roche)، Taq پلی‌مراز و T4 لیگاز (Fermentas) و در نهایت برای استخراج پلاسمید، کیت بیوفکت استفاده گردید.

ازدیاد ویروس آنفلوانزای سویه‌ی H1N1 در تخم‌مرغ SPF: ویروس آنفلوانزای سویه‌ی H1N1 روی تخم‌مرغ ۱۰ روزه‌ی Specific-Pathogen-Free (SPF) جهت انجام کشت تلقیح شد و پس از جداسازی تخم‌مرغ‌های مرده و زنده در نور، روزانه مایع کوریوآلانتوییک جمع‌آوری و پس از افزودن آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین در یخچال ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. این ویروس‌ها جمع‌آوری و پس از عیارسنجی به روش Egg infective dose 50 (EID50) برای تولید cDNA استفاده شد.

استخراج RNA ویروس: طبق دستورالعمل کیت کیاژن و در نهایت با اضافه‌کردن محلول‌ها و استفاده از کالوم فیلتردار، RNA ویروسی استخراج شد.

انجام Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) برای تولید cDNA: با استفاده از پرایمرهای عمومی U12 و U13، تولید cDNA انجام گردید. این پرایمر، دارای چندین عدد T در انتهای خود است. انتهای ژن‌های ویروس آنفلوانزا ۱۲ عدد نوکلئوتید اوراسیل می‌باشد. از این رو، این پرایمر می‌تواند به آن جا متصل شود و تمام ژن‌ها همانندسازی شوند. پرایمر ریورس U12 و پرایمر فوروارد U13 می‌باشد. با استفاده از تکنیک مورد نظر، خلوص قطعات به دست آمده زیاد خواهد شد؛ بدین معنا که cDNA به

www.SID.ir

Archive of SID

دست آمده، به طور کامل از رشته‌ی سنس مثبت مورد نظر خواهد بود و از حضور سایر رشته‌های تولید شده جلوگیری می‌شود.

تکثیر ژن هماگلوتینین با استفاده از PCR: برای ازدیاد ژن و تأیید مولکولی، پرایمرهای فوروارد (حاوی جایگاه BamHI برای کلونینگ) و پرایمر ریورس (دارای جایگاه XhoI و کدون خاتمه) طراحی شدند. تراداف پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. پرایمرهای اختصاصی جهت انجام واکنش (PCR) Polymerase chain reaction

نوع آغازگر	توالی	موقعیت ژنوم
HA Forward	5'-AAGCTCAGCAAATCCTACA-3'	۵۴۷-۵۲۹
HA Reverse	5'-TCCCTCACTTTGGGTCTT-3'	۷۱۶-۶۹۹

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده انجام گردید. واکنش توسط آنزیم Pfu پلی‌مراز و یون منیزیم (۲/۵ میلی‌مولار) و در دمای ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۳۰ چرخه تکرار گردید.

تولید بکمید نوترکیب: ابتدا قطعه‌ی تکثیر یافته از روی ژل آگارز تخلیص و پس از هضم توسط آنزیم‌های BamHI و Xhol I در وکتور بیانی pFastBACHTA وارد و داخل باکتری TOP10 کلون گردید. پس از تأیید، وکتور دهنده استخراج و به منظور ایجاد بکمید نوترکیب داخل سویه‌ی DH10Bac از باکتری Escherichia coli کلون گردید. بین عامل MiniTn7 پلاسمید دهنده و عامل Mini att-Tn7 بکمید، عمل جابه‌جایی (Transposition) صورت گرفت و کاست بیانی واجد ژن مورد نظر در درون بکمید قرار گرفت.

تغییر شکل (Transformation): برای انتقال وکتور حاوی ژن نوترکیب به داخل سلول باکتری، ابتدا باکتری مستعد DH10 به روش کلسیم کلرید تهیه و انتقال وکتور طبق شیوه‌نامه‌ی اجرا، انجام شد. پس از ازدیاد باکتری (تکثیر پلاسمید)، با استفاده از کیت بیوفکت، کلنی‌های سفید روی محیط Luria-Bertani agar (LB agar) برای استخراج پلاسمید جداسازی شد و پس از تخلیص، کیفیت و کمیت پلاسمید استخراجی با دستگاه نانودراپ و ژل آگارز ۱ درصد سنجیده شد.

کشت رده‌ی سلولی Sf9 و آلوده‌سازی (Transfection): برای آلوده‌سازی، رده‌ی سلولی Sf9 (رده‌ی سلولی تخمدان حشره Spodoptera frugiperda) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد و در محیط اختصاصی گریس (Gibco) کشت داده شد. سپس، با استفاده از روش الکتروپوریشن (Electroporation) پلاسمید وارد سلول‌های حشره Sf9 می‌شود. سلول‌های آلوده شده، در دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶ روز انکوبه شدند تا ویروس در سلول حشره تکثیر و سپس، مورد آلودگی قرار گرفتند. قابل ذکر است که روش الکتروپوریشن نسبت به روش‌های دیگر انتقال (۱۵)، از نظر اقتصادی و زمان به صرفه‌تر و راحت‌تر می‌باشد.

تخلیص پروتئین بیان شده در سلول حشره: پس از ۱۰-۵ بار کشت سلول حشره و اطمینان از ازدیاد پروتئین مربوط و همچنین، بررسی اثرات سایتوپاتیک در زیر میکروسکوپ، با استفاده از کیت تخلیص پروتئین، پروتئین مورد نظر استخراج شده و غلظت آن با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. محتویات فلاسک حاوی سلول آلوده به ویروس سانتریفیوژ شد و به رسوب باقی‌مانده، ۴ میلی‌لیتر از بافر لیز افزوده شد. سپس، محلول به دست آمده در میکروتیوپ برای انجام سونیکاسیون انتقال داده شد و عمل سونیکاسیون توسط دستگاه مربوط بر اساس شیوه‌نامه (۱۰ مرتبه با فواصل ۸ و ۱۰ ثانیه، ۸۰ امپلیتود) انجام گرفت. در مطالعات قبلی، تخلیص پروتئین مستقیم انجام شده است (۱۵).

اما در مطالعه‌ی حاضر، با انجام سونیکاسیون و استفاده از سرنگ با گیج ۲۱ تجزیه‌ی سلول قبل از تخلیص پروتئین تسهیل شد. پس از اتمام کار دستگاه، ژل Ni-NTA آماده در ستون ریخته شد. استفاده از این روش بسیار سریع، آسان و دقیق‌تر از روش‌های تخلیص دستی با ساخت بافر می‌باشد. پروتئین تغلیظ شده با روش فراپالایش (Ultrafiltration) بعد از تعیین غلظت با روش اسپکتروفوتومتری در ۲۸۰ نانومتر و بررسی کمی و کیفی با SDS-PAGE در ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند تا با روش Western blot مورد ارزیابی قرار گیرد. هدف از انجام آزمایش Western blot، تأیید بیان و ارزیابی آنتی‌ژنیسیته و خصوصیات ایمونولوژیک پیلین نوترکیب می‌باشد. پروتئین نوترکیب از ژل SDS-PAGE با سیستم انتقال نیمه خشک به کاغذ پلی‌وینیلیدین دی‌فلورید توسط دستگاه ماژور در شرایط نیمه‌خشک منتقل شد. برای کنترل انتقال پروتئین از رنگ پانسو استفاده و غشا به صورت نوارهای نازک حاوی پروتئین‌های منتقل‌شده بریده شد. مسدودسازی غشا با محلول آلبومین سرم گاوی به مدت ۱ ساعت انجام شد.

در مرحله‌ی بعد، غشا با آنتی‌بادی بر علیه 6 His taq با رقت استاندارد به مدت ۲ ساعت مجاور شدند. شستشو با بافر Tris نمکی محتوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ انجام شد. سپس، غشا با آنتی‌بادی ثانویه Anti mouse IgG و Anti Human IgG کونژوگه با پراکسید برای مدت ۲ ساعت مجاور شد. غشا پس از شستشو در مجاورت محلول سوبسترای کمیلومینسانت تحت شرایط استاندارد قرار گرفت و بلافاصله باندهای فلورسنت روی غشای رادیوگرافی ثبت و ظاهر گردید.

اندازه‌گیری پروتئین به روش Lowry: روش Lowry، یکی از روش‌های سنجش پروتئین است که در واقع اساس آن، روش Biuret

www.SID.ir

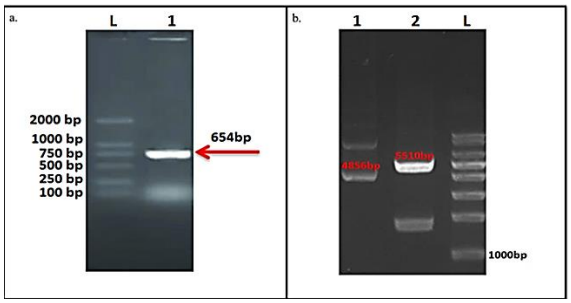
Archive of SID

است. از معرف فولین برای شناسایی پروتئین استفاده می‌شود. در این روش، ۶ عدد لوله‌ی آزمایش برداشته شد. لوله‌ی اول به عنوان بلانک و در لوله‌های دیگر Bovine serum albumin (BSA) به ترتیب به مقادیر ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید.

در مرحله‌ی بعد، همه‌ی لوله‌ها با اضافه شدن deionized distilled water (DDW) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس، در لوله‌ی جدیدی، مقدار ۵۰ میکرولیتر آب‌مقطر و ۵۰ میکرولیتر نمونه‌ی مورد نظر اضافه گردید. در انتها، به همه‌ی لوله‌ها (۷ لوله) ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر اضافه و سپس مخلوط گردید. پس از ۱۰ دقیقه استراحت، بر روی همه‌ی لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محلول فولین افزوده و مخلوط شدند. در این مرحله، به مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک انکوباسیون انجام شد و سپس، با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۷۵۰ نانومتر، مقادیر لوله‌ها مورد خوانش قرار گرفت.

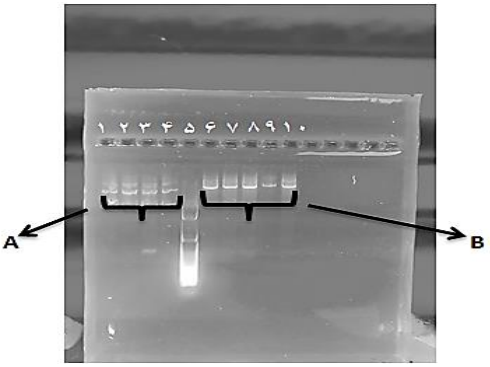
یافته‌ها

کلونینگ ژن هماگلوتینین در پلاسمید دهنده‌ی pFASTBAC HT A: پرایمرهای اختصاصی برای ژن هماگلوتینین طراحی شده و توسط آنزیم‌های XhoI و BamHI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. پس از آن، با آزمون PCR بر روی ژل آگارز تأیید شد (شکل ۱-a). قطعه‌ی ژن (۶۵۴ جفت باز) توسط هضم آنزیمی با همان آنزیم‌ها وارد پلاسمید pFASTBAC HT A شد (شکل ۱-b).



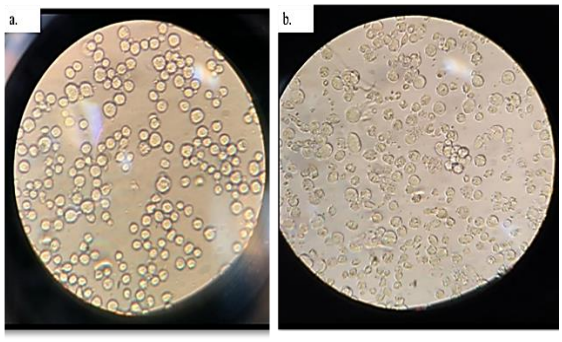
شکل ۱. a) باند ژن هماگلوتینین در ردیف ۱ به وزن حدود ۶۵۴ جفت‌باز، b) ردیف ۱ باند حاصل از پلاسمید و ردیف ۲ باند ۵۵۱۰ جفت‌باز پلاسمید حاوی ژن هماگلوتینین پس از هضم آنزیمی با XhoI و BamHI

تأیید بکمید نوترکیب و تعیین غلظت پلاسمید نوترکیب: پس از جداسازی کلنی‌های سفیدرنگ از محیط LB agar بکمید نوترکیب با استفاده از کیت استخراج و توسط آزمون PCR تأیید شد. وکتور شاتل بکمید دارای M13/pUC در فورووارد و سایت mini-att Tn7 در درون LacZ در ریورس است (شکل ۲). غلظت پلاسمید استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر برابر ۱۹/۶۸ نانوگرم/میکرولیتر بود.



شکل ۲. Polymerase chain reaction (PCR) انجام شده با پرایمر اختصاصی. نشانگر وزن مولکولی در ردیف ۵ و ردیف‌های ۴-۱ (A)کلون خالی (فاقد ژن مورد نظر) با اندازه‌ی ۴۸۵۶ جفت‌باز و ردیف‌های ۱۰-۶ (B) ژن HA کلون شده در وکتور با اندازه‌ی ۵۵۱۰ جفت‌باز می‌باشد.

تأیید آلوده‌سازی و بررسی اثرات سایتوپاتیک: بکمید نوترکیب جداسازی شده، با روش الکتروپوریشن وارد سلول حشره شد و پس از مدت زمان مقرر انکوباسیون، از نظر اثرات سایتوپاتیک به طریقه‌ی میکروسکوپی، مورد بررسی قرار گرفت. حضور و تراکم کم سلولی، دیواره‌ی تخریب شده، معلق شدن سلول در محیط کشت و سلول‌های بزرگ شده، نشان دهنده‌ی تکثیر ویروس در سلول است (شکل ۳).



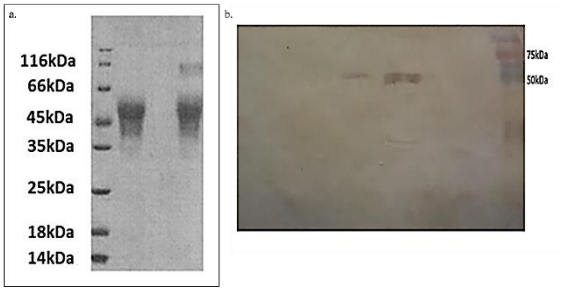
شکل ۳. نتایج سلول‌های حشره در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰. شکل a، سلول Sf9 قبل از آلوده‌سازی (سلول‌های سالم). شکل b، سلول Sf9 آلوده شده با بکمید (سلول‌های آلوده شده با ویروس)

تعیین حضور پروتئین نوترکیب: سلول‌های آلوده با سانتریفیوژ جداسازی و پس از آن، برای تجزیه‌ی کامل سلولی سونیکاسیون گردیدند. پس از استخراج، الکتروفورز پروتئین با تکنیک SDS-PAGE روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد انجام شد (شکل ۴-a). اندازه‌ی باند پروتئینی حدود ۶۲ کیلودالتون بود. ژل حاصل از مرحله‌ی SDS-PAGE برای انجام آزمون Western blot بر روی غشای

www.SID.ir

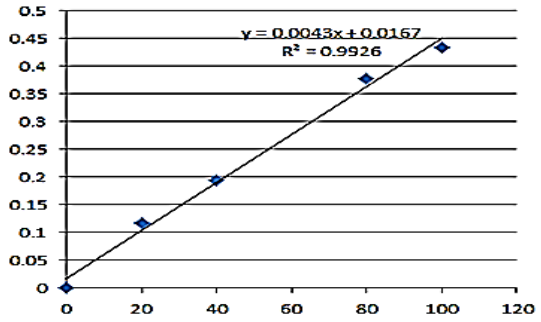
Archive of SID

نیتروسلولز برده شد و مورد شناسایی قرار گرفت (شکل ۴-b).



شکل ۴. a) نمای باند پروتئین در آزمون Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)، b) بررسی و مشاهده‌ی پروتئین‌های تولید شده در سلول‌های Sf9 در روش Western blot. ردیف سمت راست نشانگر وزن مولکولی و به ترتیب باندهای حاصل از شاهد مثبت و نمونه‌ی اصلی سلول آلوده

تعیین غلظت پروتئین نوترکیب با روش Lowry: با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب نوری نمونه خوانده شد و در برنامه‌ی Excel با استفاده از فرمول زیر غلظت محاسبه گردید. مقدار پروتئین حاصل، معادل ۱۰/۶ میکروگرم بر ۱۰۰ میکرولیتر بود که معادل ۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود. از طرفی چون رقت ۱/۲ بود، بنابراین عدد حاصل در ۲ ضرب می‌گردد و مقدار پروتئین مربوط معادل ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر می‌شود (شکل ۵).



$$y = 0.0043\,x + 0.0167$$

$$x = \frac{0.06 - 0.0167}{0.0043}$$

$$x = 10.06$$

شکل ۵. نمودار و معادله‌ی به دست آمده برای غلظت پروتئین

بحث

در چند دهه‌ی گذشته، تلاش‌های ارزشمندی صورت گرفته است تا روند تولید تسریع یابد. در این واکسن‌ها، تنها بخشی از ژن ویروس که قادر به تحریک مؤثر سیستم ایمنی بدن است، کلون و بیان می شود. همچنین، گزارش شده است که تولید پروتئین نوترکیب در سیستم پروکاریوتی، ایمنی خوبی در حیوانات آزمایشگاهی ایجاد می‌کند، اما به دلیل عمل گلیکوزیلاسیون و عدم وجود برخی تغییرات ترجمه، قادر به تولید آنتی‌بادی‌های محافظتی بلند مدت در انسان نیستند. یکی از موفق‌ترین راه‌های تولید هماگلوتینین در سیستم باکولوویروسی، سلول حشرات است که به بازار عرضه شده است. در این روش، مقادیر زیادی از هماگلوتینین در مدت زمان کوتاهی ترشح می‌شود و سطح بالاتری از هماگلوتینین نسبت به زمان تولید ویروس در تخمک ایجاد می‌کند؛ در نتیجه، واکسن ارزان و مؤثرتری ایجاد می‌کند. شیوه‌نامه‌ی جدید واکسن بسیار انعطاف پذیرتر از واکسن های فعلی است. بنابراین، تولید مشترک واکسن‌های جهانی با واکسن‌های فصلی، گام مؤثری در پیش‌گیری و کنترل آنفلوانزا در اپیدمی های سالانه است. سال‌های آینده، زمان مهیج برای تولید واکسن آنفلوانزا است (۱۶).

سیستم بیانی باکولوویروسی، به طور موفقیت‌آمیزی برای سنتز کپسیدهای ویروس‌های متعددی تا به حال استفاده شده است. Hu و همکاران، با استفاده از سیستم Baculovirus/insect cell دو ژن HA ویروس آنفلوانزای سویه‌ی H5N2 را بیان نمود (۱۷).

در تحقیق دیگری، Powers و همکاران، VLP ویروس واکسینال آنفلوانزای H1N1 را با سیستم باکولوویروس ساختند (۱۸). این نوع سیستم، حامل باکولوویروسی بود که روز به روز در حال پیشرفت است. در طی ۲۰ سال گذشته، سیستم باکلوویروسی یکی از پرکاربردترین سیستم‌های تولید پروتئین نوترکیب بوده است (۲۰-۱۹).

پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در سیستم بیانی باکولوویروسی حشره، بین ۵۰-۱ درصد کل پروتئین‌های موجود در سلول را تشکیل می‌دهند (۲۰). قابل ذکر است که مطالعات انجام شده در زمینه‌ی این سیستم، بیانگر آن است که در آن، فرایندهای پس از ترجمه به خوبی انجام می‌شود؛ به طوری که پروتئین نوترکیب حاصل گلیکوزیله، فسفریله، پلیمریزه و استیله می‌شود و همچنین، فولدینگ مناسب پروتئین در آن‌ها تشکیل می‌شود (۲۰). در ضمن، شرایط سیتوپلاسمی سلول‌های حشرات به شکلی است که موقعیت لازم برای تشکیل باندهای دی‌سولفیدی را فراهم می‌کند. بنابراین، پروتئین تولید شده ساختار اصلی خود را حفظ می‌کند و می‌تواند مشابه پروتئین طبیعی عمل نماید (۲۱-۲۰). در این تحقیق، برای تولید پروتئین نوترکیب هماگلوتینین در سلول‌های حشرات از روشی که Luckow و Summers (۲۱) ابداع کرده بودند، استفاده شد.

Kitts و Possee، بیان و تخلیص پروتئین هماگلوتینین را نیز در سلول حشره بررسی کردند (۲۲)، اما در مطالعه‌ی حاضر، از سویه‌ی ایرانی آنفلوانزا استفاده گردید و سیستم بیانی در این مطالعه Bac-to-Bac بود که در نهایت، مقدار پروتئین بیشتر با پایداری و خلوص بیشتر تخلیص گردید که می‌تواند با بررسی‌های بیشتر به

http://jims.mui.ac.ir
www.SID.ir

Archive of SID

عنوان جایگزین مناسبی برای ساخت واکسن آنفلوانزا در ایران باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، واکسن‌های تجاری که در تخم‌مرغ جنین‌دار می‌باشند، حساسیت و آلرژی ایجاد می‌کنند. بنابراین، در افراد با سن بالا که سیستم ایمنی ضعیف‌تری دارند، تاثیری ندارد، اما بیان این پروتئین به دلیل این که در سلول حشره می‌باشد، این مشکل را نخواهد داشت. بنابراین، در سنین بالاتر مؤثرتر خواهد بود. از طرفی، چون سلول یوکاریوتی می‌باشد، به دلیل تشابه با سلول انسانی، می‌تواند مؤثر واقع شود. قابل ذکر است که بیماری آنفلوانزا یک بیماری مشترک بین انسان و پرندگان است. از این رو، وقتی این بیماری شیوع پیدا می‌کند، تخم‌مرغ‌های جنین‌دار کمتر می‌شوند و ساخت واکسن زمان‌بر خواهد بود، اما با بیان در سلول حشره، این مشکل حل خواهد شد و از لحاظ اقتصادی، مقرون به صرفه‌تر و مستلزم صرف زمان کمتر خواهد بود. این مطالعه، نشان داد پروتئین هماگلوتینین قادر به بیان بالا در سلول حشره می‌باشد. پس می‌تواند در آینده جایگزین مناسبی برای تخم‌مرغ‌های جنین‌دار برای تولید واکسن باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر با کد ۱۸۲۶۳۸ در پژوهشیار تأیید شده است. با سپاس فراوان از مؤسسه‌ی تحقیق واکسن و سرم‌سازی رازی که با پژوهشگران در این مطالعه همکاری نمودند.

References

1. Munster VJ, Fouchier RA. Avian influenza virus: of virus and bird ecology. Vaccine 2009; 27(45): 6340-4.
2. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol 2000; 74(1-2): 3-13.
3. Knipe D, Howley P, Cohen J, Griffin D, Lamb R, Martin M, et al. Fields virology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2013.
4. Roos R. WHO says H1N1 pandemic is over. Minneapolis, MN: Center for Infectious Disease Research and Policy Office of the Vice President for Research, University of Minnesota; 2010.
5. Hussain M, Galvin HD, Haw TY, Nutsford AN, Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. Infect Drug Resist 2017; 10: 121-34.
6. Ligon BL. Avian influenza virus H5N1: A review of its history and information regarding its potential to cause the next pandemic. Semin Pediatr Infect Dis 2005; 16(4): 326-35.
7. Hitchman RB, Possee RD, King LA. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. Recent Pat Biotechnol 2009; 3(1): 46-54.
8. Steel J. New strategies for the development of H5N1 subtype influenza vaccines: progress and challenges. BioDrugs 2011; 25(5): 285-98.
9. Cox MM. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. Vaccine 2012; 30(10): 1759-66.
10. Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. Nat Biotechnol 2004; 22(12): 1583-7.
11. 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.
12. Kang SM, Pushko P, Bright RA, Smith G, Compans RW. Influenza virus-like particles as pandemic vaccines. Curr Top Microbiol Immunol 2009; 333: 269-89.
13. Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. Curr Opin Biotechnol 2007; 18(6): 537-45.
14. Tinsley TW, Harrap KA. Viruses of Invertebrates. In: Fraenkel-Conrat H, editor. Newly Characterized Protist and Invertebrate Viruses. Boston, MA: Springer US; 1978. p. 1-101.
15. Wang K, Holtz KM, Anderson K, Chubet R, Mahmoud W, Cox MMJ. Expression and purification of an influenza hemagglutinin-one step closer to a recombinant protein-based influenza vaccine. Vaccine 2006; 24(12): 2176-85.
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. PLoS One 2008; 3(5): e2257.
17. Hu YC, Luo YL, Ji WT, Chulu JL, Chang PC, Shieh H, et al. Dual expression of the HA protein of H5N2 avian influenza virus in a baculovirus system. J Virol Methods 2006; 135(1): 43-8.
18. Powers DC, Kilbourne ED, Johansson BE. Neuraminidase-specific antibody responses to inactivated influenza virus vaccine in young and elderly adults. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3(5): 511-6.
19. Ahmad B, Li Z, Hanif Q, Hu Q, Wei X, Zhang L, et al. A Hybrid Peptide DEFB-TP5 Expressed in Methylotrophic Yeast Neutralizes LPS with Potent Anti-inflammatory Activities. Front Pharmacol 2020; 11: 461.
20. Soleimanjahi H, Fotouhi F. Baculoviruses and insect cells as powerful tools for gene expression. Tehran, Iran: Jahad Daneshgahi; 2009. [In Persian].
21. Luckow VA, Summers MD. Trends in the Development of Baculovirus Expression Vectors. Bio/Technology 1988; 6(1): 47-55.
22. Kitts PA, Possee RD. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. Biotechniques 1993; 14(5): 810-7.

www.SID.ir

Archive of SID

DOI: 10.22122/jims.v38i572.12948 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Vol. 38, No. 572, 4th Week, June 2020

Received: 12.03.2020 Accepted: 04.06.2020 Published: 26.06.2020

Cloning, Expression, and Purification of the Recombinant Hemagglutinin of Human Influenza Virus H1N1 in the Eukaryotic Insect Cells Using Baculovirus Vector

Niloufar Rashedi[1], Morteza Taghizadeh[2], Parisa Mohamadynejad[3], Mehdi Mahdavi[4], Reza Jalalirad[5]

Original Article

Abstract

Background: The H1N1 influenza virus is a highly pathogenic virus that threatens human life. Vaccination is an effective way of preventing and controlling influenza. Production of recombinant hemagglutinin in the baculovirus expression system, in the insect eukaryotic cell substrate (Sf9), has been suggested as an effective strategy.

Methods: The H1N1 influenza virus hemagglutinin gene sequence was prepared from National Center for Biotechnology Information (NCBI). After designing a specific primer, the sequence was provided using restriction digestion, cloned into pFastBacHTA plasmid, and transferred to the DH10Bac cell to produce a recombinant bacmid. After extracting the relevant plasmid, it was transfused into the insect cell; and after the expression of the protein by Sf9 cell, the presence of recombinant protein was confirmed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot methods.

Findings: The hemagglutinin gene (654 bp) was cloned in pFastBacHTA plasmid using the two enzymes of BamHI and Xhol. Sf9 cell expressed a protein weighing approximately 60 kDa after receiving the recombinant bacmid protein. The extracted protein was identified and confirmed using SDS-PAGE and Western blot methods; and protein concentration was measured by Lowry method.

Conclusion: The baculovirus system is useful for the production of proteins with complex structures. Generally, it can be concluded that this protein is highly expressed in insect cells. Due to the similarity of this system with the human system, it can be a suitable alternative for embryonic eggs in the future, and can be used in vaccination.

Keywords: Influenza A virus; H1N1 subtype; Hemagglutinins; Sf9 cells; Baculovirus

Citation: Rashedi N, Taghizadeh M, Mohamadynejad P, Mahdavi M, Jalalirad R. **Cloning, Expression, and Purification of the Recombinant Hemagglutinin of Human Influenza Virus H1N1 in the Eukaryotic Insect Cells Using Baculovirus Vector.** J Isfahan Med Sch 2020; 38(572): 260-6.

1- PhD Student, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2- Invited Assistant Professor, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran AND Assistant Professor, Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
4- Invited Assistant Professor, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran AND Assistant Professor, Recombinant Vaccine Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Invited Assistant Professor, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran AND Assistant Professor, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran
Corresponding Author: Morteza Taghizadeh, Invited Assistant Professor, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran; Email: taghizadeh.morteza@gmail.com

www.SID.ir