Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

Expression and Purification of a Recombinant Chimeric Protein (3M2e-HA2) Composed of Influenza Virus Hemaglutinin and Matrix Protein Conserved Domain for Universal Subunit Vaccine Development

Neda Jalili[1],
Najmeh Taheri[2],
Rezvan Tavakoli[3],
Fatemeh Fotoohi[4],
Atieh Akbari[1],
Behrokh Farahmand[5]

[1] MSc in Genetic, Department of Influenza and other respiratory virus, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran
[2] MSc in Molecular Cell Biology, Department of Influenza and other respiratory virus, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran
[3] MSc in Microbiology, Department of Influenza and other respiratory virus, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran
[4] Associate Professor, Department of Influenza and other respiratory virus, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Influenza and other respiratory virus, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran

(Received August 12, 2015 ; Accepted February 21, 2016)

Abstract

Background and purpose: Influenza virus is one of the most important respiratory infectious agents. Viral antigenic variations are major problems for vaccine production process. At present, many researches have focused on conserved domains of influenza virus antigenic peptides for subunit vaccine development. Hemagglutinin small subunit (HA2) and the 23 amino acid extracellular N-terminal domain of proton selective ion channel (M2e) are highly conserved in all human influenza A strains and very attractive for broad-spectrum universal influenza vaccine production.

Materials and methods: In this study, the synthetic 3M2e gene was cloned upstream of HA2 gene following digestion by BamH1. Chimeric construct pET28a-3M2e-HA2 was transformed into *E.coli* (BL21) and the cells were grown overnight in LB broth media containing 50 mg/ml kanamycin after induction of isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of chimer protein 3M2e-HA2 was approved by sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis using monoclonal specific antibody. Then, the recombinant protein was purified using Ni-TED columns.

Results: The result of colony PCR, restriction enzyme digestion and sequencing revealed that the 3M2e gene was properly cloned into pET28a- HA2 and was in frame to histidin tag.

Conclusion: Identification of antibodies against conserved epitopes of (HA2) and (M2e) is an important step toward development of influenza vaccine, hence, chimer protein (3M2e-HA2) prepared in this study could be an appropriate subunit vaccine candidate for preventing influenza virus infection.

Keywords: Influenza, M2e, Hemagglutinin, chimer, subunit vaccine

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(137): 12-22 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۳۷ خرداد سال ۱۳۹۵ (۲۲-۱۲)

بیان و خالص سازی پروتئین کایمر نوترکیب (3M2e-HA2) واجد نواحی حفاظت شده هماگلوتینین و پروتئین ماتریکس ویروس آنفلوانزا در راستای تولید واکسن زیرواحدی جهانی

ندا جلیلی[۱] نجمه طاهری[۲] رضوان توکلی[۳] فاطمه فتوحی[۴] عطیه اکبری[۱] بهرخ فرهمند[۵]

چکیده

سابقه و هدف: ویروس آنفلوانزا یکی از مهم‌ترین عوامل عفونی در سراسر جهان است که تغییرات آنتی‌ژنیک آن چالش بزرگی در مسیر تولید واکسن می‌باشد. در حال حاضر اکثر پژوهش‌ها بر روی توسعه واکسن‌های زیرواحدی حاصل از پپتیدهای آنتی‌ژنیک حفاظت شده ویروس متمرکز شده است. زیر واحد کوچک مولکول هماگلوتینین (HA2) و بخش آمینی خارج سلولی پروتئین کانال یونی (M2e) با ۲۳ اسید آمینه، در همه ویروس‌های آنفلوانزای A انسانی بسیار حفاظت شده هستند و هدف مناسبی برای تولید واکسن آنفلوانزای وسیع الطیف می‌باشند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، قطعه ژنی 3M2e سنتتیک، بالا دست ژن HA2 در سازه pET28a-HA2 پس از هضم آنزیمی با آنزیم BamH1، کلون شد. سازه واجد کایمر 3M2e-HA2 به باکتری *E.coli* سویه BL21 منتقل شد و سلول‌ها در محیط مایع LB حاوی کانامایسین (۵۰mg/ml) بعد از القا با ایزوپروپیل بتا دی تیو گالاکتوزید (IPTG) به صورت کشت شبانه رشد داده شد. بررسی و تایید بیان سازه 3M2e-HA2 به وسیله الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید SDS- PAGE و وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی انجام شد و سپس پروتئین نوترکیب توسط ستون Ni-TED تخلیص گردید.

یافته‌ها: نتایج کلونی PCR و هضم آنزیمی و تعیین توالی نشان داد که ژن 3M2e در وکتور pET28a-HA2 به طور صحیح و در قاب خواندنی دنبال هیستیدینی کلون شده است.

استنتاج: شناسایی آنتی‌بادی علیه اپی توپ‌های حفاظت شده HA2 و M2e، گامی مهم به سوی ساخت واکسن جهانی ویروس آنفلوانزا است، بنابراین سازه (3M2e-HA2) تهیه شده در این مطالعه می‌تواند کاندید واکسن زیر واحدی مناسبی برای پیشگیری از این عفونت باشد.

واژه های کلیدی: ویروس آنفلوانزا، کایمر 3M2e-HA2، واکسن زیر واحدی

مقدمه

آنفلوانزا یک بیماری تنفسی جدی است که معمولاً انسان را در فصول سرد درگیر می‌سازد و سالیانه هزینه هنگفتی را به جوامع تحمیل می‌کند. ویروس آنفلوانزا عامل میلیون‌ها مرگ در سراسر جهان می‌باشد. در کشور ما هم

مولف مسئول: بهرخ فرهمند– تهران: انستیتو پاستور ایران، بخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی E-mail: b_farahmand@pasteur.ac.ir

۱. کارشناس ارشد ژنتیک، گروه آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲. کارشناس ارشد سلولی مولکولی، گروه آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴. استاد، گروه آنفلوانزا و سایر ویروسهای تنفسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۵. استادیار، گروه آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۵/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۴/۶/۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱۲/۳

www.SID.ir

Archive of SID

در سال‌های گذشته و هم‌چنین اپیدمی سال ۱۳۹۴، مواردی از مرگ را در افراد با بیماری‌های زمینه‌ای به دنبال داشته است. عامل مولد این بیماری ویروسی کروی و پوشش‌دار از خانواده ارتومیکسوویریده می‌باشد که به سه تیپ A، B و C تقسیم می‌شوند. ویروس آنفلوانزا نوع A دارای ۸ قطعه ژن می‌باشد که پروتئین‌های سطحی هماگلوتینین (HA) و نورامینیداز (NA)، پروتئین‌های ماتریکس (M1,M2)، نوکلئوپروتئین (NP)، کمپلکس پلیمرازی (PB1,PB2,PA) و دو پروتئین غیرساختاری (NS1,NS2) را کد می‌کنند. RNA پلیمراز ویروسی مستعد خطا، و ژنوم قطعه‌ای، ویروس آنفلوانزا را قادر می‌سازد تا متحمل تغییرات آنتی ژنی از نوع antigenic drift و antigenic shift شود که موجب تغییرات آنتی‌ژنی در گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس شده و باعث می شود ویروس بتواند از سیستم ایمنی میزبان بگریزد. این ویروس‌ها به علت تغییرات مکرر آنتی ژنی که در HA و NA رخ می‌دهد، در برابر آنتی بادی‌های تولید شده علیه ویروس‌های قبل مقاوم می‌شوند. تغییر ماهیت ویروس آنفلوانزا باعث شده مراکز تحقیقات مختلف به تعریف پروژه‌هایی در زمینه پیشگیری، تشخیص و درمان آن بپردازند، ولی هنوز واکسنی با ایمنی بلند مدت علیه ویروس‌های آنفلوانزا تهیه نگردیده است(۱). آنتی ژن HA هدف اصلی برای تهیه واکسن علیه این بیماری محسوب می‌گردد که توسط آنتی‌بادی‌ها قابل شناسایی و تشخیص می باشد. این گلیکوپروتئین سطحی، به دو زیر واحد HA1 و HA2 شکسته می‌شود که این دو به وسیله‌ی پیوند دی سولفیدی به همدیگر متصل هستند و شکسته شدن برای عفونت‌زایی ذره‌ی ویروسی و گسترش عفونت در ارگانیسم میزبان ضروری است(۳،۲). زیر واحد HA1 که در انتهای آمینی مولکول HA قرار دارد، دارای یک سر کروی است که شامل جایگاه‌های گیرنده‌ای است که به عنوان سایت‌های آنتی‌ژنی ویروس شناخته شده‌اند. آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده از اتصال ویروس به سلول میزبان جلوگیری می‌کنند، ولی ویروس‌ها با جهش در این سایت‌های آنتی‌ژنی از خنثی‌سازی به وسیله آنتی‌بادی‌های موجود در میزبان جلوگیری می‌کنند که منجر به شیوع آنفلوانزای فصلی می‌شود. با وجود تغییرات آنتی‌ژنی مستمر در مولکول هماگلوتینین، اپی توپ‌هایی از آن در نژادهای مختلف ویروسی مشترک هستند که تعداد این اپی‌توپ‌ها در زیر واحد HA2 نسبت به HA1 بیش‌تر بوده و در نتیجه این قسمت می‌تواند عامل القای ایمنی ذاتی علیه زیرگونه‌های گوناگون ویروس باشد(۷-۴).

HA2 بخش انتهای کربوکسیل از HA است که به شکل یک ساختار ساقه مانند می‌باشد. بخش انتهای آمینی HA2 موسوم به پپتید الحاقی، نقش قابل توجهی در فعالیت‌های ادغام ویروس آنفلوانزا در سلول میزبان دارد که این توالی آمینواسیدی در واقع جزئی از ناحیه حفاظت شده ارتباط دهنده‌ی دو زیر واحد HA1 و HA2 از مولکول HA محسوب می‌گردد که توسط گروه‌های مطالعاتی مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است(۱۰،۴-۸). محققین دریافتند که موش‌های واکسینه شده با این بخش‌های آنتی‌ژنی، بیماری خفیف‌تر و مرگ و میر کم‌تری بر اثر چالش با ویروس نشان داده‌اند(۱۱،۱۰). پروتین M2 ویروس آنفلوانزا، یک هموتترامر است که به عنوان کانال یونی در داخل غشا ویروس قرار گرفته است. هنگامی که ویروس به سلول میزبان وارد می شود، این کانال در آزاد شدن ژنوم ویروس به داخل سیتوپلاسم سلول میزبان نقش مهمی دارد(۱۲). در این میان به توالی ۲۳ آمینواسیدی انتهای آمینی مولکول M2e توجه بسیاری شده است. این ناحیه در تمامی سویه‌های آنفلوانزا A به میزان زیادی ثابت بوده و دچار موتاسیون‌های شیفت و دریفت نمی‌گردد؛ بنابراین یک کاندید مناسب برای تهیه واکسن‌های کار آمد علیه ویروس آنفلوانزا A می‌باشد(۱۳). این آنتی ژن به تنهایی قدرت ایمنی‌زایی بسیار کمی دارد. در بسیاری از تحقیقات، DNA واکسن‌ها و واکسن‌های کونژوگه با استفاده از پروتئین M2، مورد بررسی قرار گرفته است. در این

www.SID.ir

Archive of SID

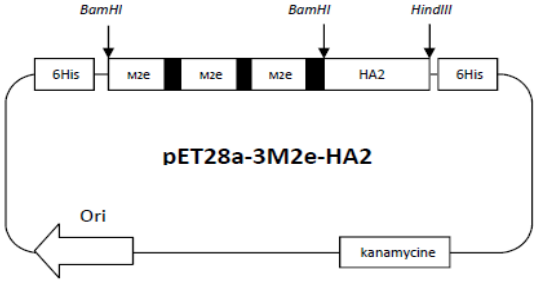
مطالعات مشخص شده است که پروتئین M2 به تنهایی قادر به ایجاد آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده نیست(۱۴). یکی از روش‌های نوین تولید واکسن آنفلوانزا، استفاده از واکسن‌های نوترکیب الحاق شده با پروتئین‌هایی که ایمنی‌زایی زیادی دارند و یا استفاده از تعداد کپی‌های متفاوت اپی‌توپ M2e می‌باشد. بنابراین در این پژوهش به منظور دست‌یابی به یک آنتی‌ژن مناسب، سازه 3M2e طراحی شده در پژوهش‌های قبلی (بخش آنفلوانزا انستیتو پاستور) به زیر واحد HA2 متصل گردید و پروتئین کایمر تولید شده پس از تائید، تخلیص گردید.

مواد و روش ها

در این پژوهش، از ژن زیر واحد کوچک هماگلوتینین (HA2) ویروس آنفلوانزای A/H1N1 که قبلاً در آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران در وکتور pET28a کلون شده بود و ژن سنتتیک 3M2e طراحی شده و کلون شده در وکتور pUC 57 در این آزمایشگاه استفاده شد و بررسی‌های انفورماتیکی انجام شده با نرم افزار Expasy prort param، بر روی خواص فیزیکوشیمیایی این مولکول کایمر که برای انجام مراحل ارزیابی کمی و کیفی و تخلیص آن مورد نیاز بود، مراحل کلونینگ و بیان آن طبق توضیحات زیر اجرا شد.

جای سازی ژن 3M2e در وکتور نوترکیب pET28a-HA2

بدین منظور جهت جداسازی ژن 3M2e از وکتور pUC 57 و خطی شدن وکتور نوترکیب pET28a- HA2، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم BamHI که در دو سر قطعه 3M2e تعبیه شده است، صورت گرفت. به منظور ساخت سازه کایمریک (تصویر شماره ۱)، عمل الحاق ژن 3M2e و وکتور نوترکیب pET28a-HA2 خطی شده، با استفاده از آنزیم لیگاز صورت گرفت. بدین منظور وکتور خطی شده و ژن 3M2e به نسبت‌های مولی متفاوت در کنار آنزیم لیگاز به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس به منظور تکثیر، محصول الحاق در باکتری *E. coli* سویه Top10 F´ ترانسفورم گردید. باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و کاناماپسین (با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به صورت شبانه کشت داده شدند. جهت تایید کلونینگ، پس از انجام کلنی PCR، ابتدا یک کلنی از کشت کلنی‌های مثبت برداشته و در محیط LB مایع، تکثیر و پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت Miniprep (ساخت شرکت BIONEER) استخراج گردید. سپس برای هضم آنزیمی، پلاسمید نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 تخلیص شده با آنزیم‌های BamHI و HindIII برش داده شد تا قطعه‌های مورد نظر (HA2 و 3M2e) از آن خارج گردد و جهت تایید نهایی پلاسمید نوترکیب pET28a-3M2e-HA2، با استفاده از پرایمرهای T7 پروموتور و T7 ترمیناتور وکتور pET تعیین توالی شد.



تصویر شماره ۱: تصویرشماتیک سازه کایمریک pET28a-3M2e-HA2، لینکر آمینواسیدی GGKGG بین توالی‌های 3M2e قرار داده شده است

بیان سازه 3M2e-HA2

جهت بیان سازه 3M2e-HA2، پلاسمید نوترکیب pET28a-3M2e-HA2 به داخل باکتری‌های مستعد شده *E. coli* سویه BL21 ترانسفورم شد و سپس در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کاناماپسین تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرار داده شد تا زمانی که جذب نوری آن در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ برسد. سپس تولید پروتئین، با استفاده ازایزوپروپیل تیو گالاکتوزید (IPTG) باغلظت یک میلی‌مولار به سوسپانسیون باکتری القا گردید و در زمان‌های ۱، ۲، ۳

www.SID.ir

Archive of SID

و ۴ ساعت پس از القا، میزان رشد باکتری‌ها از طریق اندازه‌گیری میزان جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر ارزیابی و رسوب باکتریایی با ۳ دقیقه سانتریفیوژ در ۹۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جدا گردید.

بررسی بیان سازه 3M2e-HA2 با روش SDS-PAGE

در این قسمت از مطالعه، جهت بررسی بیان سازه، از الکتروفورز SDS-PAGE به روش Lameli et al استفاده گردید(۱۵). برای این منظور رسوب باکتری‌ها که در ساعت‌های مختلف تهیه شده بود، با بافر نمونه (sample buffer) مخلوط گردید تا لیز شوند. بدین صورت که غلظت نمونه‌ها بر حسب نانوگرم به میکرولیتر از طریق نرمالیزاسیون محاسبه گردید. بافر نمونه به صورت x۵ تهیه شد، (به این ترتیب که ۳ گرم پودر تریس در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده پس از آن که pH آن به ۶/۸ رسید، ۵ گرم SDS به محلول فوق اضافه شد). سپس ۵۰ میلی‌لیتر گلیسرول به صورت قطره قطره و هم‌چنین ۰/۰۳ گرم بر موفنول بلو نیز در چند مرحله به محلول افزوده و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. جهت باز شدن پیوندهای دی‌سولفیدی به ازا هر میلی لیتر بافر، ۲۰ میکرولیتر ۲- مرکاپتو اتانول افزوده شد. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی بر روی ژل ۱۲ درصد پلی آکریل آمید طبق پروتکل استاندارد، الکتروفورز شد و باندهای پروتئینی با رنگ آمیزی با محلول کوماسی بلو، آشکار گردید.

تائید پروتئین بیان شده با روش وسترن بلات

پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل ۱۲ درصد پلی‌آکریل آمید، با استفاده از دستگاه الکتروترنسفر به روی غشا نیتروسلولز منتقل شد. بیان سازه 3M2e-HA2 در باکتری بیانی BL21 با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال موشی علیه پروتئین M2 با کد abcam.co (ab5416) به عنوان آنتی بادی اولیه با نسبت ۱ به ۵۰۰ در PBS و آنتی‌بادی نشاندار شده با پراکسیداز علیه آنتی‌بادی موش با کد Sigma.co (A 8924) به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه با نسبت ۱ به ۵۰۰۰ در PBS از سوبسترای دی آمینو بنزیدین (DAB) جهت رنگ‌آمیزی باندهای پروتئینی، مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین از آنتی‌بادی ضد هیستیدین نشاندار نیز برای آشکارسازی پروتئین کایمر واجد دنباله هیستیدینی استفاده شد.

استخراج و تخلیص پروتئین نوترکیب

برای تولید پروتئین کایمر 3M2e-HA2، از کشت شبانه باکتری *E. coli* سویه(DE3) BL21 برای تلقیح ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط تازه LB استفاده گردید و با IPTG ۱ میلی‌مولار القا و به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس سلول‌ها با سانتریفیوژ در دور ۹۰۰۰ جمع‌آوری شدند و روی رسوب حاصل، ۱۰ میلی‌لیتر بافر لیزکننده ریخته شد و پیپتاژ گردید. بافر فوق واجد ۵۰ میلی‌مولار سدیم فسفات و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم است و به اختصار LEW (lysis equilibration wash) نامیده می‌شود. سوسپانسیون حاصل ۳ بار در تانک نیتروژن مایع فریز و در آب ۳۷ درجه ذوب گردید و بعد ۹ بار و هر بار به مدت ۲۰ ثانیه با توان ۸۰ وات سونیکه شد. بعد از هر ۲۰ ثانیه، سوسپانسیون به مدت ۱ دقیقه در آب یخ نگه داشته شد و بعد با دور ۱۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی از رسوب جدا شد. سپس روی رسوب حاصل ۴ میلی‌لیتر بافر LEW حاوی اوره ۸ مولار اضافه گردید و همانند مراحل بالا، سونیکاسیون انجام شد و در نهایت مایع رویی حاصل از مرحله نهایی سانتریفیوژ که حاوی پروتئین نوترکیب 3M2e-HA2 بود، جهت تخلیص با ستون نیکل جمع‌آوری شد. تخلیص پروتئین نوترکیب 3M2e-HA2 با استفاده از ستون protino® Ni-TED 2000 packed (MACHERY-NAGEL) انجام گرفت. بدین‌صورت که نمونه‌های آماده شده حاصل از استخراج به ستون اضافه شدند. سپس در ادامه ستون با ۱۲ میلی‌لیتر بافر شستشودهنده شسته شد و در نهایت با ۲ میلی‌لیتر

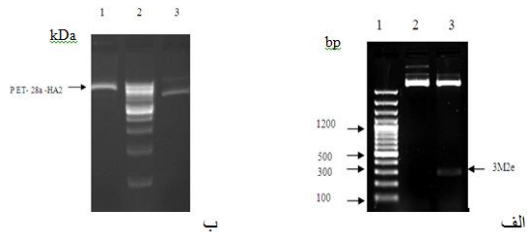
www.SID.ir

Archive of SID

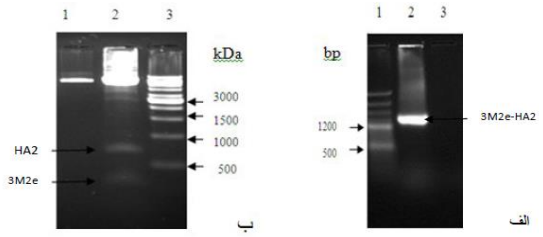
Eluting buffer (LEW+Im) که حاوی ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول بود، شسته شد تا پروتئین مورد نظر خارج شود. در پایان، خروجی‌های ستون در مراحل مختلف، به کمک ژل SDS-PAGE ۱۲درصد بررسی گردید. سرانجام برای حذف ایمیدازول، محلول پروتئینی در برابر بافر فسفات نمکی (p۸/۵) دیالیز شد.

یافته‌ها

نتایج آنالیز انفورماتیکی خواص فیزیکوشیمیایی کایمر 3M2e-HA2 در Expasy protparam نشان داد که این کایمر با ۳۶۱ اسید آمینه دارای pH اسیدی و وزن مولکولی حدود۳۹۶۰۴/۶ دالتون و همچنین pH ایزوالکتریک ۵/۸۲ است و پیش‌بینی شد که پروتئین مورد نظر پس از بیان محلول می‌باشد. با توجه به نتایج مربوط به نیمه عمر پروتئین مورد نظر در مدل انسانی، این کایمر می‌تواند برای واکسن انسانی کاندید مناسبی باشد. هم‌چنین بررسی‌ها روی شاخص ناپایداری نشان داد که می‌توان این کایمر را به عنوان پروتئین پایدار در نظر گرفت. سازه‌های pUC 57-3M2e و HA2-pET28a پس از ازدیاد و تخلیص با هدف کلون کردن ژن 3M2e در پا یین دست قطعه HA2 توسط آنزیم BamHI برش داده شدند. قطعات مورد انتظار، برحسب اندازه در ژل‌های آگازر ۲-۱ درصد الکتروفورز گردیدند. مطابق (تصویر شماره ۲ الف)، ژن سنتز شده 3M2e (۲۷۰bp) از سازه pUC 57/3M2e جدا شد و سازه pET28a-HA2 خطی گردید (تصویر شماره ۲ ب). سپس جهت اطمینان از کلون شدن قطعه 3M2e در پلاسمید نوترکیب pET28a-HA2 از هضم آنزیمی و PCR استفاده شد. نتایج به دست آمده از کلونی PCR پلاسمیدهای حاوی سازه (تصویر شماره ۳ الف) و هضم آنزیمی با آنزیم‌های (Hind III و BamHI) که منجر به جداسازی یک قطعه ۲۷۰ جفت‌بازی 3M2e و یک قطعه ۷۰۰ جفت‌بازی HA2 از پلاسمید شد (تصویر شماره ۳ ب)، نشان داد که این ژن در ناقل پلاسمیدی کلون شده است. هم‌چنین تعیین توالی سازه 3M2e-HA2 تائید کرد که دو ژن 3M2e و HA2 به یکدیگر متصل شده و در فریم مناسب در ناحیه MCS وکتور pET28a کلون گردیده اند. نتایج حاصل از بررسی بیان کایمر ساخته شده روی ژل پلی‌آکریل آمید، بیان یک پروتئین در محدوده وزنی ۳۵ تا ۴۸ کیلو دالتونی را نشان می‌دهد که با وزن مولکولی حدود ۴۰ کیلو دالتون پیش‌بینی شده کایمر، هم‌خوانی دارد (تصویر شماره ۴). نتایج حاصل از بررسی تایید بیان کایمر توسط آنالیز وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد هیستیدین (تصویر شماره ۵ الف) و نتایج حاصل از بررسی با آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد پروتئین M2 در (تصویر شماره ۵ ب) نشان داده شده است که هر دو نتایج، تایید کننده بیان کایمر است و هم‌چنین نتیجه بررسی الکتروفورزی تخلیص پروتئین کایمر 3M2e-HA2، حاکی از غلظت قابل توجه این پروتئین پالایش شده از سایر پروتئین‌های باکتری می‌باشد (تصویر شماره ۶).



تصویر شماره ۲: (الف) الکتروفورز حاصل از هضم آنزیمی وکتور pUC-3M2e. ستون ۱: مارکر DNA 100bp(Fermentas). ستون ۲: نمونه هضم نشده. ستون ۳: نمونه هضم شده با آنزیم BamHI. (ب): الکتروفورز حاصل از خطی شدن وکتور نوترکیب pET-28a/HA2. ستون ۱: وکتور نوترکیب خطی شده با آنزیم BamHI. ستون ۲: مارکر 1Kb DNA (vivantis). ستون ۳: نمونه هضم نشده

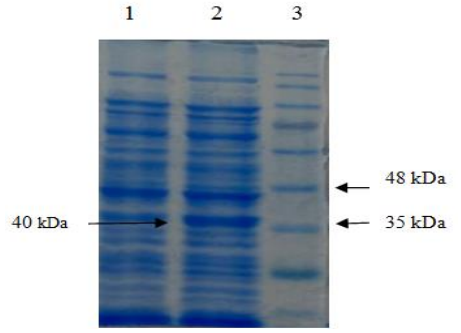


تصویر شماره ۳: (الف) نتیجه کلنی PCR که از روی کلنی های ماتریکس گذاشته شده است. ستون۱:مارکر DNA 100 bp(Fermentas).

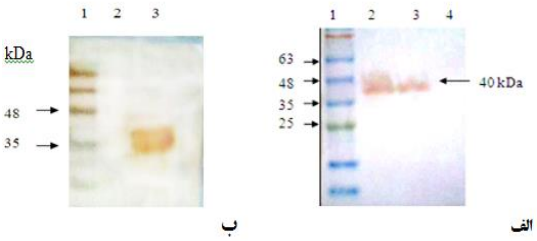
www.SID.ir

Archive of SID

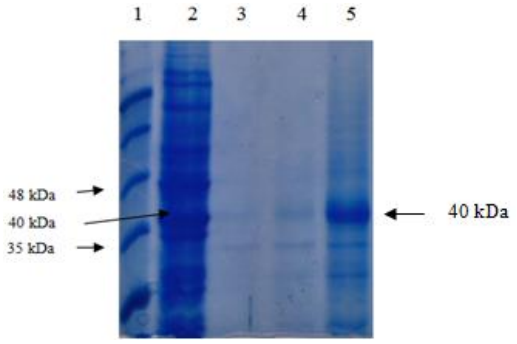
ستون ۲ : نمونه PCR. ستون ۳: کنترل منفی. (ب): نتیجه ی هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب با دو آنزیم BamHI و HindIII. ستون ۱: نمونه هضم نشده. ستون ۲: نمونه هضم شده. ستون ۳: مارکر DNA (vivantis) 1kb.



تصویر شماره ۴: نمایی از الکتروفورز عمودی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، غلظت ۱ میلی مولار IPTG در ساعت سوم. ستون ۱: نمونه قبل از القا (ساعت صفر). ستون ۲: نمونه ساعت سوم بعد از القا. ستون ۳: ماکر پروتئین (vivantis)



تصویر شماره ۵: (الف) نمایی از آزمایش وسترن بلاتینگ بیان سازه 3M2e-HA2 با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین. ستون ۱: مارکر پروتئین 1kb (Fermentase). ستون ۲ و ۳: رسوب پروتئینی ۳ ساعت بعد از القا. ستون ۴: نمونه قبل از القا (شاهد منفی). (ب) نمایی از آزمایش وسترن بلاتینگ بیان سازه 3M2e-HA2 با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد پروتئین M2. ستون ۱: مارکر پروتئین 1kb(Fermentas). ستون ۲: نمونه قبل از القا (شاهد منفی). ستون ۳: رسوب پروتئینی ۳ ساعت بعد از القا.



تصویر شماره ۶: نتایج تخلیص پروتئین کایمر (3M2e-HA2) بر روی ژل پلی آکریل آمید رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو. ستون ۱: مارکر مولکولی پروتئین (vivantis). ستون ۲: لیزات باکتری واجد پروتئین نوترکیب. ستون ۳ و ۴: نمونه های حاصل از شستشوی ستون با بافر (LEW+Urea). ستون ۵: پروتئین (3M2e-HA2) تخلیص شده با بافر (LEW+Urea+Im).

بحث

جهت جلوگیری از وقوع پاندمی، واکسن آنفلوانزا یکی از بهترین راه‌های ایمن کردن جمعیت انسانی در مقابل این ویروس می‌باشد. واکسن‌های آنفلوانزایی که امروزه تولید و مصرف می‌شوند، عمدتاً از طریق تلقیح ویروس آنفلوانزا به تخم مرغ جنین دار تهیه می‌شوند. کارایی این واکسن‌ها در بهترین شرایط، کم‌تر از ۷۵ درصد می‌باشد و با توجه به تغییرات مکرر آنتی‌ژنیک ویروس، هر ساله می‌بایست تجدید شوند تا بیش‌ترین شباهت را با سویه‌های در گردش داشته باشند. در سال‌های اخیر توجه محققین به تولید واکسن‌های زیرواحدی نوترکیب با استفاده از ژن‌های حفاظت شده ویروس معطوف شده است تا بتوانند واکسنی تولیدکنند که فرمولاسیون ثابتی داشته و نیاز به تجدید هر ساله نداشته باشد واکسن‌های زیر واحدی از نظر محتوی، واجد یک یا چند آنتی‌ژن پروتئینی خالص و افزودنی‌های مجاز می‌باشند و فاقد بیماری‌زایی بوده و به عنوان واکسن‌های بی‌خطر، مؤثر و پایدار از نظر آنتی‌ژنیک به شمار می‌آیند که باعث به وجود آمدن پاسخ ایمنی سلولی و هومورال مؤثر، مناسب و طولانی مدت می‌شوند، در عین حال فرآیند تولید آن‌ها از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است(۱۶). با توجه به آزمایش‌ها و مطالعات انجام شده، ناحیه خارج سلولی پروتئین ماتریکس (M2e) آنفلوانزا یک کاندید مناسب برای تهیه واکسن علیه ویروس آنفلوانزا می‌باشد، اما از آن‌جاکه سایز کوچکی دارد و موجب ایمنی‌زایی مختصری می‌شود، برای بهبود ایمنی‌زایی آن، روش‌های گوناگونی به کار گرفته شده تا موفق به تولید بهترین و موثرترین واکسن علیه این ویروس گردند. از جمله این که در پژوهش‌های اخیر، پروتئین M2e آنفلوانزا با

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین‌هایی نظیر TLR5 فلاژلین سالمونلا، و ادجوانت‌هایی نظیر CTA1-DD،CPG-ODN و HSP مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ترکیب و ایمنی‌زایی آن ارزیابی شده است. در ایران، ابراهیمی و همکاران در سال ۲۰۱۰، پپتید M2e ویروس آنفلوانزا H9N2 را به HSP70 باکتری مایکوباکتریم توبرکلوزیس متصل کرده و آن را در وکتور بیانی pPICZαA کلون و پروتئین مربوطه را در سلول‌های مخمر Pichia Pastoris KM71H بیان کردند. در تمامی این مطالعات، سطح بالایی از تحریک سیستم ایمنی توسط پروتئین M2e فیوز شده به سایر پروتئین‌ها گزارش شده است(۲۲-۱۷). هم‌چنین با توجه به اهمیت HA2 در تحریک سیستم ایمنی علیه ویروس آنفلوانزا، می‌توان از این پپتید به عنوان حامل جهت تقویت ایمنی‌زایی 3M2e استفاده کرد که خود دارای توالی نوکلئوتیدی است که در تمامی سویه‌های آنفلوانزا A به میزان زیادی ثابت است. با وجود تغییرات آنتی‌ژنی پی در پی در HA، اپی‌توپ‌هایی از آن در نژادهای مختلف ویروس مشترک هستند که تعداد این اپی‌توپ‌ها در HA2 نسبت به HA1 بیش‌تر است و در نتیجه این قسمت می‌تواند القاگر ایمنی ذاتی علیه تحت تیپ‌های گوناگون ویروس باشد(۲۳). آنتی‌بادی هایی که زیر واحد HA2 را هدف قرار می‌دهند، می‌توانند حفاظت گسترده را علیه عفونت فصلی و پاندمیک، تحت تیپ‌های خاص و یا تحت تیپ‌های مختلف ویروس آنفلوانزای نوع A ایجاد نمایند. این کار از طریق ممانعت از فعالیت ادغام HA2 انجام می‌پذیرد و کاندید امیدبخشی برای آماده‌سازی واکسن بر مبنای HA2 می‌باشد(۲۵،۲۴).

صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۵، افزایش ایمنی‌زایی HA2 را در کنار پروتئین شوک حرارتی لیشمانیا ماژور مطالعه نمودند. در همان سال، مقدس‌زاده و همکاران یک کپی از توالی M2e ویروس آنفلوانزا را به فرم کایمر متصل به HA2 در باکتری *E.coli* بیان کردند. هم‌چنین شکوهی و همکاران در سال ۲۰۱۵، ایمنی‌زایی توالی سه تایی M2e ویروس آنفلوانزا را در کنار ادجوانت‌های مختلف در موش Balb/c ارزیابی نمودند(۲۸-۲۶). در این پژوهش، کایمر 3M2e-HA2 به منظور دست‌یابی به یک کاندیدای واکسن نوترکیب وسیع‌الطیف علیه ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A تهیه شد. با توجه به عدم نیاز هر دو پروتئین M2e و HA2 به تغییرات پس از ترجمه (گلیکولیزاسیون، استیلاسیون و....) و سادگی بیان و خالص‌سازی آنتی‌ژن پروتئینی، از سیستم بیانی پروکاریوتی برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده شد. بدین‌منظور قطعه 3M2e در وکتور pET28a در بالا دست HA2 کلون شد.

در قسمت طراحی سازه این گونه عمل شد که دنباله هیستیدینی در دو سر پروتئین قرار گیرد تا بتوانیم از روش تخلیص با استفاده از ستون تجاری شده Ni-TED به‌طور سریع پروتئین را جداسازی کنیم. در این تکنیک کروماتوگرافی، یون‌های نیکل به یک بستر رزینی متصل می‌گردند و برای اتصال پروتئین‌ها با برچسب هیستیدینی به کار می‌روند که این رزین دارای چهار جایگاه کوئوردیناسیون است که به طور محکم به یون نیکل متصل می‌گردد. باردار شدن رزین با نیکل باعث می‌شود دو تا از شش جایگاه کوئوردیناسیون یون آزاد بماند که این سایت‌ها می‌توانند با حلقه های ایمیدازول در زنجیره‌های جانبی زیر واحدهای متوالی هیستیدینی در زنجیره پلی‌پپتیدی میانکنش محکمی دهند. حداقل شش باقی مانده هیستیدین مورد نیاز است تا میل ترکیبی لازم برای این اتصال فراهم گردد و پروتئین برچسب دار به طور محکم به ستون متصل شود و در نهایت پروتئین‌های مورد نظر با استفاده از ایمیدازول که با پل هیستیدینی برای چسبیدن به نیکل ستون رقابت می‌کند، جدا شوند. در این پژوهش از تکرار سه تایی M2e برای تهیه کایمر استفاده شد، زیرا در مطالعات فراوانی نشان داده شده است که به کارگیری کپی‌های متعدد M2e، موجب ایمنی‌زایی بهتر می‌شود، ولی این افزایش به صورت خطی نمی‌باشد، یعنی لزوماً کپی‌های زیاد از توالی M2e، موجب حفاظت بخشی بیش‌تر نمی‌شود؛ چنان‌چه

www.SID.ir

Archive of SID

در آزمایشات انجام شده نیز نشان داده شده است که میزان حفاظت بخشی با تعداد ۱ کپی، صفر درصد، برای کپی‌های ۶،۹ و۱۲ تایی میزان افزایش ۱۲/۵ درصد و برای کپی‌های سه تایی، ۳۷/۵ درصد می‌باشد(۲۷).

در کارهای بعدی و حذف توکسیک‌های احتمالی ایمنی‌زایی، این پروتئین تخلیص شده در مطالعات حیوانی مورد بررسی واقع خواهد شد تا گامی به سوی تولید واکسن زیر واحدی حفاظت بخش در برابر طیف وسیعی از ویروس‌های آنفلوانزا باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک می باشد و با پشتیبانی طرح مصوب انستیتو پاستور ایران به شماره ۷۵۹ اجرا شده است.

References

1. Staneková Z, Varečková E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. Virology J 2010; 7: 351.
2. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virusentry The influenza hemagglutinin. Annu Rev Biochem 2000; 69: 531-569.
3. Ward AC. Virulence of influenza A virus for mouse lung. Virus Genes. 1997; 14(3): 187-194.
4. Gerhard W, Mozdzanowska K, Zharikova D. Prospects for universal influenza virus vaccine. Emerg Infect Dis 2006; 12(4):
5. Gocník M, Fislová T, Sládková T, Mucha V, Kostolanský F, Varecková E. Antibodies specific to the HA2 glycopolypeptide of influenza A virus hemagglutinin with fusion-inhibition activity contribute to theprotection of mice against lethal infection. J Gen Virol 2007; 88(pt 3): 951-952: 569-574.
6. Gocník M, Fislová T, Mucha V, Sládková T, Russ G, Kostolanský FVarecková E. Antibodies induced by the HA2 glycopolypeptide ofinfluenza virus hemagglutinin improve recovery from influenza A virus infection. J Gen Virol 2008; 89(pt 4): 958-967.
7. Graves PN, Schulman JL, Young JF, Palese P. Preparation of influenza virus subviral particles lacking the HA1 subunit of hemagglutinin unmaskingof cross-reactive HA2 determinants. Virology 1983; 126(1): 106-116.
8. Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. Virology 1991; 182(2): 475-485.
9. Okuno Y, Isegawa Y, Sasao F, Ueda S. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2strains. J Virol 1993; 67(5): 2552-2558.
10. Worch, R. Structural biology of the influenza virus fusion peptide. Acta Biochim Pol 2014; 61(3): 421-426.
11. Okuno Y, Matsumoto K, Isegawa Y, Ueda S. Protection against the mouse adapted A/FM/1/47 strain of influenza A virus in mice by a monoclonal antibody with cross-neutralizing activity among H1 and H2 strains. J Virol 1994; 68(1): 517-520.
12. Schnell JR, Chou JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of

www.SID.ir

Archive of SID

influenza A virus. Nature 2008; 451(7178): 591-595.

13. Feng J, Zhang M, Mozdzanowska K, Zharikova D, Hoff H, Wunner W et al. Influenza A virus infection engenders a poor antibody respones against the ectodomain of matrix protein 2. Virol J 2006; 3: 102.
14. Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. Nat Med 1999; 5(10): 1157-1163.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(5259): 680-685.
16. Huleatt JW, Nakaar V, Desai P, Huang Y, Hewitt D, Jacobs A et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. Vaccine 2008; 26(2): 201-214.
17. Ebrahimi SM, Tebianian M, Aghaiypour Kh, Nili, Ali Mirjalili H. Prokaryotic expression and characterization of avian influenza A virus M2 gene as a candidate for universal recombinant vaccine against influenza A subtypes; specially H5N1 and H9N2. Mol Biol Rep 2010; 37(6): 2909-2914.
18. Hovden Arnt-Ove. The effect of influenza virus vaccine formulation. Thesis for the degree Philosophiae Doctor (PhD) at the University of Bergen. ISBN: 82-308-0075-8. 2008.
19. Wu F, Yuan XY, Li J, Chen YH. The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine. Vaccine 2003; 32: 4320-4324.
20. Eliasson DG, El Bakkourib K, Schon K, Ramne A, Festjens E, Löwenadler B, et al. CTA1-M2e-DD: A novel mucosal adjuvant targeted influenza. Vaccine 2008; 26(9): 1243-1252.
21. Ebrahimi SM, Tebianian M, Toghyani H, Memarnejadian A, Attaran HR. Cloning, expression and purification of the influenza A (H9N2) virus M2e antigen and truncated Mycobacterium tuberculosis HSP70 as a fusion protein in Pichia pastoris. Protein Expr Purif 2010; 70(1): 7-12.
22. Dai J, Pei D, Wang B, Kuang Y, Ren L, Cao K. A novel DNA vaccine expressing the Ag85A-HA2 fusion protein provides protection against influenza A virus and Staphylococcus aureus. Virology J 2013; 10: 40.
23. Lambert LC, Fauci AS. Influenza Vaccines for the Future. N Engl J M 2010; 363(21): 2036-2044.
24. GocnK M, Fislova T, Mucha V, Sla.dkova T, Russ G, Kostolansky F, et al. Antibodies induced by the HA2 glycopolypeptide of influenza virus haemagglutinin improve recovery from influenza A virus infection. J Gen Virol 2008; 89(pt 4): 958-967.
25. Sadeghi Neshat S, Farahmand B, Kianmehr Z, Zamani S, Saleh M, Fotouhi F. Immunogenesity Enhancement of Influenza Virus Stalk Domain Using Leishmania Major Heat Shock Protein, One Step Closer to Universal Vaccine. Journal of Isfahan Medical School 2015; 33(349): 1-12.
26. Moghadaszadeh, Golchin M, Tavakkoli H, Ghanbarpour R. Cloning, expression and purification of M2e-HA2 from Influenza A virus in Escherichia coli. Online Journal of Veterinary Research 2015; 19(2): 124-129.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Zhang X, Liu M, Liu C, Du J, Shi W, Sun E, et al. Vaccination with Different M2e Epitope Densities Confers Partial Protection against H5N1 Influenza A Virus Challenge in Chickens. Intervirology 2011; 54(5): 290-299.
28. Shokouhi H, Zolfaghari M, Farahmand B, Tabatabaeean M, Taheri N and Fotouhi F. Immunological assessment of three tandemrepeat of influenza virus M2 extracellular domain with adjuvant in Balb/c mice. Arak Medical University Journal 2015; In Press.
29. Deng L, Cho KJ, Fiers W and Saelens X. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines. Vaccines 2015; 3(1): 105-136.

www.SID.ir