DOI: 10.22092/vj.2024.105606.2098 No 144 Automn 2024

Veterinary Research & Biological Products

Original Article

Expression of Recombinant Neuraminidase Protein of H1N1 Vaccine Strain Influenza Virus in Baculovirus Expression System

• **Moghaddam Pour, Masoud***

Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

• **Taghizadeh, Morteza**

Department of Research and Production of human viral vaccine , Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization(AREEO), Karaj, Iran.

• **Masoudi, Shahin**

Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

• **Tebianian, Majid**

Department of Research and Production of antiserum , Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2023-10-24 **Accepted: 2024-02-10**
Revised: 2024-02-06 **Published: 2024-10-02**

*Email: m.moghaddam@rvsri.ac.ir

Abstract

Two structural antigens, haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), have been identified as promising candidates for the development of a genetically engineered vaccine against influenza. The production of recombinant vaccines is a relatively straightforward process, yet the effectiveness of these vaccines in inducing an immune response to a specific antigen remains a topic of ongoing research and improvement. On the other hand, a potent and efficacious vaccine against influenza should elicit both humoral and cellular immune responses. In the present study, the NA gene, which is more stable than the HA gene, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into a eukaryotic expression vector pFastBac HTA. The purity of the expressed NA protein was analyzed on SDS-PAGE electrophoresis. Western blot was conducted to assess the expression of NA using a commercially available anti-NA polyclonal antibody. Immunofluorescence assay was used to qualitatively assess the antigenicity and biological activity profiles of the recombinant protein, NA, on infected Sf9 cell surface using immunized rabbit antiserum. Finally, according to the confirmed clone of the neuraminidase gene, it can be said that an essential step has been taken towards the production of a recombinant human influenza vaccine.

Key words: *Influenza; Reverse Genetics; Neuraminidase; Recombinant Vaccine; Baculovirus*

DOI: 10.22092/vj.2024.105606.2098
شماره ۱۴۴ پاییز ۱۴۰۳
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مقاله کامل

بیان پروتئین نورآمینیداز نوترکیب ویروس آنفلوانزا سویه واکسنی H۱N۱ در سیستم بیانی باکولوویروس

• **مسعود مقدم‌پور***
بخش تحقیق و تولید واکسن های ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
• **مرتضی تقی‌زاده طرنابی**
بخش تحقیق و تولید واکسن های ویروسی انسانی(سرخک،سرخجه،اوریون) ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
• **شهین مسعودی**
بخش تحقیق و تولید واکسن های ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
• **مجید تبیانیان**
بخش تحقیق و تولید سرم ضد مار و عقرب، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۰۲-۰۸-۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: ۲۱-۱۱-۱۴۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۷-۱۱-۱۴۰۲ تاریخ انتشار: ۱۱-۰۷-۱۴۰۳
*Email: m.moghaddam@rvsri.ac.ir

چکیده

دو آنتی‌ژن ساختاری هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA)، برای توسعه یک واکسن بر پایه مهندسی ژنتیک در برابر ویروس آنفلوانزا مورد نظر محققین و تولیدکنندگان واکسن مذکور می‌باشند. واکسن‌های نوترکیب با استفاده از روش ساده و موثر تولید می‌شوند و بایستی توسط یک آنتی‌ژن خاص موجب القای پاسخ ایمنی شوند به نحوی که دارای اثربخشی بیشتری نسبت به واکسن‌های دارای ویروس کامل باشند. در مطالعه حاضر، ژن نورآمینیداز سویه واکسنی H۱N۱ که نسبت به ژن هماگلوتینین با ثبات تر بوده و دارای موتاسیون‌های کمتری می‌باشد توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد و سپس در حامل بیانی یوکاریوتی pFastBac HTA قرار گرفت. بیان پروتئین نورآمینیداز بوسیله آزمایش SDS-PAGE و وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی پلی کلونال تجاری علیه نورآمینیداز مورد بررسی قرار گرفت. علاوه براین، از روش ایمونوفلورسانس کیفی به منظور ارزیابی آنتی‌ژن و فعالیت بیولوژیکی پروتئین نوترکیب نورآمینیداز در سطح سلول حشره (Sf۹) آلوده شده به باکولوویروس حامل ژن نورآمینیداز با استفاده از آنتی‌سرم خرگوش واکسینه استفاده گردید. در نهایت با توجه به کلون تاییدشده ژن نورآمینیداز می‌توان ادعا نمود که برای ساخت واکسن نوترکیب آنفلوانزای انسانی قدم مهم و اساسی برداشته شده است.

کلمات کلیدی: آنفلوانزا؛ ریورس ژنتیک؛ نورآمینیداز؛ واکسن ریکامبیننت؛ باکولوویروس

مقدمه

بیماری آنفلوانزا، یک بیماری عفونی بوده که بوسیله ویروسی از خانواده ارتومیکسوویریده ایجاد می‌شود. این ویروس دارای اسید نوکلئیک RNA با سنس منفی بوده و پرندگان و پستانداران را مبتلا می‌کند.(۱،۲) ویروس آنفلوانزا از ژنوم تك زنجيره‌اي اسيدريبونوكلئيک تشكيل شده است كه در ويروس آنفلوانزاي A و B به صورت ۸ قطعه مجزا بوده كه ده عدد پروتئين را كد مي‌كنند. قطعه شماره ۱ متعلق به PB۲، شماره ۲ متعلق به PB۱، شماره ۳ متعلق به PA، شماره ۴ متعلق به HA، شماره ۵ متعلق به NP، شماره ۶ متعلق به NA، شماره ۷ متعلق به M۱ و M۲ و شماره ۸ متعلق به NS۱ و NS۲ ژن نورآمينيداز (NA) يك پروتئين اينتگرال غشايي بوده و دومين گليكوپروتئين اختصاصي تحت تيپ‌هاي ويروس‌هاي آنفلوانزاي A,B مي‌باشد. (۳) اين پروتئين يك هموتترامر با وزن مولكولي ۲۲۰ كيلودالتون بوده و داراي يك سر گنبدي شكل مي‌باشد كه از لحاظ آنزيمي فعال بوده و با ناحيه ساقه خود به غشاء ويروس متصل مي‌شود. قطعه ششم ويروس آنفلوانزا اين پروتئين را با ۳۵۳ اسيد آمينه كد مي‌كند. پلي‌پپتيد NA تنها داراي يك ناحيه آبگريز(هيدروفوبي) بوده كه قادر است از ليپيد دو لايه بگذرد. اين ناحيه نزديك انتهاي آميني اين پلي‌پپتيد واقع شده و به عنوان يك ناحيه لنگرگاهي و سيگنالي عملكرده و در تثبيت NA از طريق انتهاي آميني خود در سيتوپلاسم حضور يافته و به عنوان يك پروتوتايپ از پروتئين‌هاي اينتگرال كلاس دو مي‌باشد. (۳) پروتئين NA بخاطر دو عملكرد خود حائز اهميت بسياري مي‌باشد از جمله عملكرد بيولوژيكي در حذف اسيد سياليك از گليكوپروتئين سلول و هم از اين جهت كه به عنوان شاخص آنتي‌ژني مي‌باشد NA. همچنين می‌تواند از طریق اپیتلیوم مژکدار در راه‌های هوایی انسان نفوذ کرده و ویروس با از بین بردن گیرنده‌های موسینی، گیرنده‌های مژه و گلیکوکالیکس فعالیت خود را گسترش دهد. در رده‌بندی ویروس‌های آنفلوانزا، این ویروس‌ها جز RNA دار محسوب می‌شوند که سویه‌های انسانی ۳ جنس از خانواده اورتومیکسوویریده را به خود اختصاص می‌دهند که عبارتند از آنفلوانزا A، آنفلوانزا B، آنفلوانزا. C (۴) بیماری آنفلونزا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان، دام و طیور می‌باشد. علی‌رغم خسارت‌های صدها میلیارد دلاری بر صنعت طیور جهان، در همه‌گیری‌های اسپانیا (۱۹۱۹و۱۹۱۸)، آسیا (۱۹۵۷) و هنگ کنگ (۱۹۶۸) به ترتیب تلفات ۵۰ میلیون، یک میلیون و ۲۰ میلیون انسان را در جهان باعث شده است.(۵) هرکدام از این همه‌گیری‌های بوسیله تظاهر گونه جدیدی از این ویروس در انسان‌ها ظاهر شده بود. اغلب این گونه‌های جدید وقتی نمایان می‌شوند که یک ویروس آنفلوانزا از گونه‌های حیوانی دیگر به انسان منتقل می‌شود، یا وقتی یک گونه انسانی ژن‌های جدیدی را از یک ویروس عامل عفونت در پرندگان یا خوک دریافت می‌کند. اخیرا بروز سویه جدید H۵N۱ و ایجاد سویه‌های نوترکیب جدید از تیپ A آنفلوانزا باعث وحشت جامعه بین‌المللی شده است. (۶) تا به حال گزارش انتقال این ویروس از پرنده به انسان ثابت شده است ولی در مورد انتقال انسان به انسان گزارشات موثقی در دست نیست در عین حال انتقال انسان به انسان این ویروس قابل پیش‌فرض بوده که بیان می‌شود در نتیجه آن فاجعه جهانی در نوع انسان بر اثر مرگ ومیر زیاد رخ خواهد داد. معمول‌ترین واکسن انسانی، واکسن آنفلوانزا سه گانه است یعنی دارای سه سویه ویروس آنفلوانزا می‌باشد که حاوی مواد غیرفعال و تخلیص شده از سه گونه ویروسی است. به عنوان نمونه این واکسن شامل موادی از دو گونه ویروسی آنفلوانزای نوع A و یک گونه آنفلوانزای نوع B می‌باشد. این واکسن هیچ گونه خطر انتقال ویروس نداشته و فعالیت ضعیفی دارد. واکسن ساخته شده در هر سال ممکن است برای سال بعد بی‌اثر باشند، چون ویروس آنفلوانزا در هر سال تغییرات جزئی پیدا می‌کند و گونه‌های جدید به سرعت جایگزین گونه‌های قبلی می‌شوند. (۷) داروهای ضد ویروسی را به همراه مهارکننده‌های نورآمینیداز می‌توان برای معالجه بیماری آنفلوانزا بکار برد که البته برای برخی گونه‌های ویروس آنفلوانزا بطور جزئی مؤثر و یا حتی بی‌اثر هستند. (۸) ویروس آنفلوانزا بوسیله نور خورشید، ضدعفونی کننده‌ها و درجنت‌ها غیرفعال می‌شوند. (۹) با توجه به اینکه واکسن رایج براي بيماري آنفلوانزا فصلي واكسن غيرفعال يا كشته است و ويروس غيرفعال شده قادر به تكثير در بدن فرد نيست لذا اين نوع واكسن در تحريك سيستم ايمني ضعيف بوده و بعضا" احتياج به بوستر دارد. لذا استفاده از واكسن تخفيف حدت يافته كه داراي ويروس زنده ضعيف شده است و يا واكسن ساب يونيت همواره براى مقابله با ويروس مذكور مورد توجه بوده است. بعد از اپیدمی سال ۱۹۹۸ ساخت واکسن بر علیه ویروس آنفلوانزای فوق حاد با استفاده از سیستم Revers Genetic به عنوان یک گزینه مفید وسودمند مورد استفاده و توجه قرار گرفت. در این سیستم هر کدام از ژن‌های هدف‌گذاری شده ویروس در یک حامل ژنتیکی (وکتور) داخل می‌گردد. نهايتا" با استفاده از يك باكتري و يا ويروس غير بيماري‌زا براي انسان پروتئين مذكور توليد شده و بعنوان آنتي‌ژني كه مي‌تواند سيستم ايمني را بر عليه ويروس مذكور تحريك كند بعنوان واكسن مصرف خواهد شد. بطور مثال در سال‌های اخیر از ویروس آبله بدین منظور استفاده‌های مکرری شده است. در سال ۲۰۰۵ سازمان بهداشت جهانی موضوع نقش NA در ایمنی متقابل (cross – protection immunity) را مطرح نمود. در دسامبر ۲۰۰۷ جلسه FDA/NIH/WHO در مورد اهمیت بررسی نقش ایمنی بر علیه NA ویروس آنفلوانزا و موضوعات تحقیقاتی آن تاکید نمودند. مدل‌های حیوانی مشخص کردند که ایمنی بر علیه NA می‌تواند محافظت نسبی برعلیه ویروس H۵N۱ داشته باشد. (۳) بعلاوه موثر بودن آنتی‌بادی هترولوگ علیه N۱ انسانی بر علیه ویروس H۵N۱ این ایده را که جمعیت انسانی میزانی از مقاومت بر علیه ویروس پرندگان را با مواجه با ویروس فصلی و یا با استفاده از واکسن آنفلوانزای فصلی بدست آورده است را ایجاد نمود. بر همین اساس سازمان بهداشت جهانی در جلسه سال ۲۰۰۸ موضوعات تحقیقاتی مختلفی را در مورد چگونگی و نوع آزمایشات ایمنی بر علیه NA را تاکید نمود. درحال حاضر تحقیقات کلینیکی زیادی در مورد اینکه آنتی‌سرم علیه NA به چه میزان می‌تواند از شدت بیماری شخص بیمار جلوگیری کند در دست انجام می‌باشد. در یک تحقیق پری کلینیکی که از نوترکیب NA تولید شده در سلول حشره استفاده می‌کند میزان نقش ایمنی بر علیه NA در حال بررسی است. (۱۰) گفته شده است نوترکیب NA نتوانسته است علیه ویروس همولوگ و هترولوگ (H۱N۱ & H۳N۲) خاصیت ممانعت کنندگی داشته باشد و همچنین باعث کاهش عیار ویروس در سیستم تنفسی بشود. ایمنی بر علیه NA نمی‌تواند محافظت کامل بر علیه ویروس

آنفلوانزا داشته باشد ولی می‌تواند در یک عفونت واقعی تکثیر ویروس را محدود کرده و از شدت بیماری جلوگیری نماید.(۱۱)در یک تحقیقات کلینیکی اثبات شده است که نوترکیب NA ایمنوژن بوده و برای انسان توکسیک نیست. (۱۳،۱۲) در آزمایشی در مدل حیوانی انتقال سرم حیوان ایمن به غیرایمن توانسته است ایمنی در مقابل چالش در برابر ویروس حاد داشته باشد. نتایج مشابه و غیر مشابهی در تحقیقات روی آنتی‌بادی NA و ویروس‌های مختلف در حیوانات آزمایشگاهی را گفته‌اند و بعلت اینکه روش‌ها یکسان نبوده نمی‌توان نتایج آنها را ناقض یکدیگر دانست. در ضمن تحقیقات بیشتری در زمینه شکل پروتئینی آنتی‌ژن NA و فرم‌های مختلف ایمنوژنیسیتی این ملکول در حال انجام می‌باشد و تنوع ویروس‌های بکار رفته در آزمایش چالش در نظر محققین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طراحي پرايمر ژن NA

در ابتداي ژن NA جایگاه آنزیم HindIII و در انتهاي آن جایگاه KpnI قرار گیرد. لذا در اول پرایمرها قطعات موسوم به گوشواره که سایت‌های آنزیمی می‌باشد قرار داده شد. طراحي پرايمرها براساس توالي استخراج شده از بانک ژن و با استفاده از نرم‌افزار صورت پذیرفت.

NA (Forward primer cotaining KpnI restriction site): ttatatttaGg-taCCAAATCAAAAGATAATAACC

NA (Revers primer containing HindIII restriction site): tattaatttta-agcTTCAACGAACTACTTGTCAATGGTG

استخراج ژنوم RNA ویروس

برای استخراج ژنوم از کیت تجاری کیاژن استفاده شد.

گرادیانت PCR

ازدیاد ژن بوسیله PCR انجام شد. استفاده از PCR یکی از روش‌هاي مهم تشخیصی و کلونینگ در شرایط آزمایشگاه است که در طی مراحل آنزیمی در PCR یک قطعه DNA به طور اختصاصی تکثیر می‌شود. به منظور ساخت cDNA از دو پرایمر اولیگونوکلئوتیدی اختصاصی باترادف‌هایی که مکمل دو دو طرف DNA هستند استفاده شد. بوسیله دستگاهی که توانایی پذیرش شیب حرارتی را داشت، ازدیاد ژن NA انجام شده و به مقدار کافی قطعه cDNA مورد نظر ساخته شد. برای تایید قطعه ساخته شده، محصول زیاد شده برای بررسی ردیف‌های نوکلئوتیدها و نقشه ژنی (سکونسینگ) به آزمایشگاه تخصصی خارجی فرستاده شد.

روش تخلیص محصول PCR

از کیت High Pour PCR Product Purification شرکت Kit Roche استفاده شد.

پلاسمید pFASTBac HTA

لازم به توضیح است که در حامل ژنتیکی جایگاه‌های آنزیمی آن، سایت‌های کاربردی، جایگاه‌های کلونیگ، ATG و سایت‌های برش وجود دارد.

پرایمرهای اختصاصی حامل ژنتیکی pFASTBac HTA

Forward primer: 5’ TAT TCC GGA TTA TTC ATA CCG TC 3’

Revers primer: 5’ GTA TGG CTG ATT ATG ATC CTC 3’

پرایمرهای اختصاصی شناسایی حامل ژنتیکی pFASTBac HTA در باکتری DH۱۰

پرایمرهای M۱۳puc/ به رشته نوکلئوتیدی ذیل با توجه به اندازه ژن وارد شده در ژل الکتروفورز می‌تواند به شناسایی وجود یا عدم وجود ژن مورد نظر کمک کند.

Forward primer: 5’ CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3’

Revers primer: 5’ AGCGGATA ACAATTTCACACAGG 3’

باکولوویروس‌ها

از میان ویروس‌هاي چند وجهی جانوري می‌توان به باکولوویروس‌ها و میزبان اختصاصی آن‌ها یعنی حشرات اشاره کرد که امروزه نقش مهمی را در تحقیق‌هاي مولکولی کسب کرده‌اند. (۱۴) از سال ۱۹۸۳ که فن‌آوري Baculovirus Expression Vector System (BEVS) به دنیا معرفی شده است؛ این سیستم یکی از جذاب‌ترین و قوي‌ترین سیستم‌هاي یوکاریوتیک براي پروتئین نوترکیب شناخته شده است. باکولوویروس‌ها خانواده‌اي از ویروس‌هاي میله‌اي بزرگ هستند که به دو جنس ویروس‌هاي NPV (Nucleopolyhedroviruses) و چند وجهی هسته اي GV) Granuloviruses) تقسیم می‌شوند. ژنوم باکولوویروس بین ۸۰ kbp الی ۱۸۰ متغیر است. (۱۵) ژنوم dsDNA می‌باشد که californica multiple nuclear polyhedrosis virus بیشترین کاربرد را به عنوان ویروس نوترکیب در مطالعات به خود اختصاص داده است.(۱۶)

روش تولید باکولوویروس نوترکیب

بعد از تولید حامل ژنتیکی یا پلاسمید انتقالی حامل ژن بیگانه آن را به همراه DNA ژنومی ویروس وارد سلول‌های حشره می‌نمایند تا ویروس نوترکیب حاصل شود. این کار بواسطه‌ی نوترکیبی همولوگوس بین ژنوم ویروس و حامل ژنتیکی انتقالی که واجد زنجیره‌ی طویلی از ژنوم ویروسی در جوار محل کلون‌سازی خود می‌باشد صورت می‌گیرد. بطور کلی ۰/۱ تا ۱ درصد از ویروس‌های تولید شده نوترکیب هستند که بوسیله شکل پلاک تولید شده تشخیص داده می‌شوند. (۱۷) پس از کسب اطمینان از وجود بکمید، سلول‌های Sf۹ با ابن بکمید نوترکیب ترانسفکت شدند.

سیستم بیانی باکولوویروسی

برای تولید باکولوویروس نوترکیب از سیستم Bac-to-Bac که محصول شرکت Invitrogen می‌باشد استفاده شد. اساس این روش انتقال Transpose یک کاست بیانی به درون یک شاتل حامل ژنتیکی گرفته شده از باکولوویروس بوده که می‌تواند در باکتری DH۱۰ تکثیر پیدا کند. اولین جزء اصلی این سیستم یک حامل ژنتیکی دهنده به نام پلاسمید pFastBacHTA می‌باشد که واجد یک کاست بیانی بوده و ژن مورد نظر در داخل آن کلون شده و تحت کنترل پروموتور پلی‌هیدرین قرار گرفته است . (۱۸)

ترانسفرم کردن باکتري Ecoli

براي انجام اين عمل در مرحله نخست بايد پيکر باکتري مستعد پذيرش شود و پس از آن قطعه به داخل آن ترانسفورم شود. بسياري از باکتری‌ها در مرحله بين رشد لگاريتمی با فاز ثابت به طور خود بخود مستعد دريافت قطعه ژن DNA می‌گردند. اما باکتری‌هاي با روش‌هاي مصنوعی به سلول مستعد تبديل می‌گردند. بر اين اساس روش‌هاي متعددي وجود دارد. در اين تحقيق بافرهاي نمکی مورد استفاده قرارگرفت.

ترانسفکشن در سلول Sf۹

سلول‌های Sf۹ کشت منولایر داده شد. بهترین دما برای تکثیر سلول‌های مذکور ۲۶ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود. بعد از آلوده کردن، سلول‌ها در درجه حرارت در ۰/۵ ±۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محیط کشت اختصاصی Grace's از شرکت Gibco بوده (۱۷) و برای ترنسفکت نمودن از ماده لیپوفکتامین استفاده شد.

ژل پلی اکریل آمید SDS-PAGE

برای ارزیابی پروتئین از این روش استفاده شد. رنگ‌آميزي پروتئين با ماده کوماسي بلو ۰/۱ ميکروگرم انجام شد.

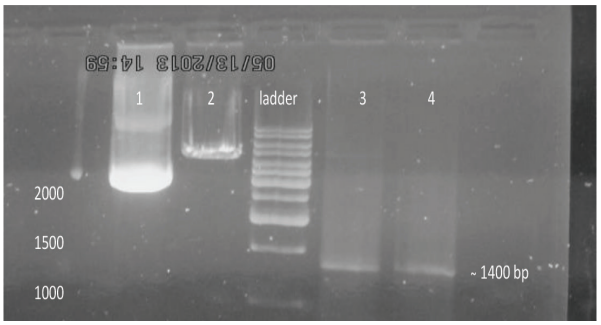
شناسائي و تائيد پروتئين‌هاي نوترکيب با روش وسترن بلات

پس از انجام الکتروفورز SDS-PAGE بر روي نمونه‌ها، ابتدا کليه پروتئين‌هاي الکتروفورز شده موجود در ژل به غشاء نيتروسلولزي منتقل شده و سپس با استفاده از آنتي‌بادي ضد Histag يا Anti penta His و نيز آنتي‌بادي کنژوگه با آنزيم HRP، باندهاي پروتئيني داراي بر چسب هيستيدني مورد شناسائي قرار گرفتند. از goat-anti-mouse IgG/HRP استفاده شد..

نتایج

گرادیانت PCR یا PCR با شیب حرارتی

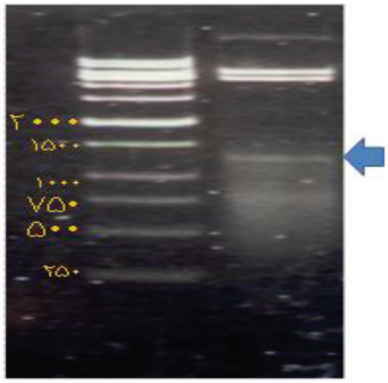
باند پروتئين نورآمينيداز (NA) مقداری پايين ترازباند ۱۵۰۰ bp لدر قرار داشت . اين باند حدودا در مجاور ۱۴۰۰ bp رويت شد.(شکل ۱)



شکل ۱- ردیف ۱ و ۲ کنترل منفی، ردیف لدر، ردیف ۳ و ۴ باند ژن NA به وزن حدود ۱۴۰۰ bp

هضم آنزیمی کلون NA

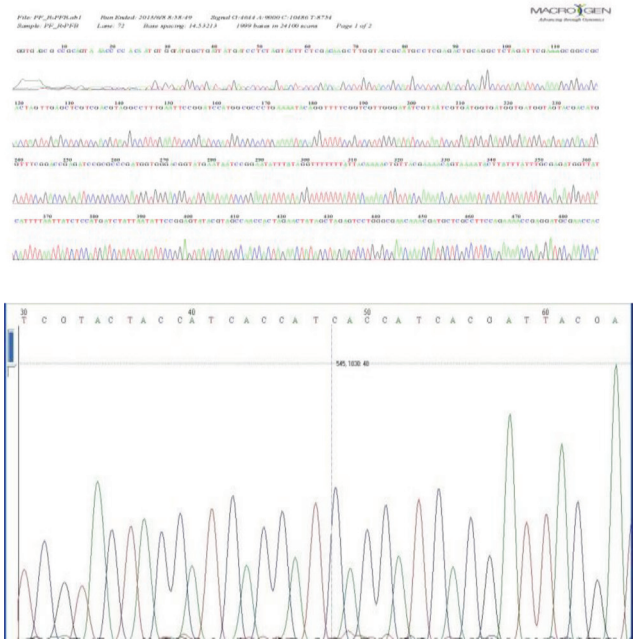
بعد از خالص‌سازی پلاسمید با دو آنزیم محدودگر KpnI و HindIII برش داده شده و سپس در ژل الکتروفورز باند حدود ۱۴۰۰ bp رویت شد.(شکل۲)



شکل ۲- باند ۱۴۰۰bp پس از برش قطعه حاوی NA با دو آنزیم KpnI و HindIII

سکونسینگ ژن NA

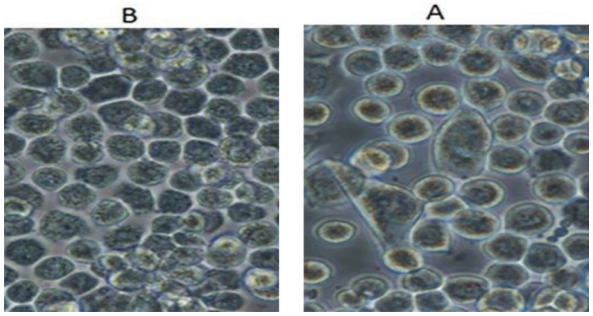
پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه NA برای تعیین توالی دو سر قطعه NA توسط پرایمرفوروارد و پرایمر ریورس طراحی شده بوسیله شرکت کره‌ایMWG انجام شد (شکل ۳). به کمک نرم‌افزار CLC Sequence Viewer قسمت مکمل دو توالی مشخص و توالی کامل قطعه دخولی بدست آمد. توالی بدست آمده با توالی ژن NA سوش ۲۰۰۷/۵۹/A/Bersben H۱N۱ مقایسه شد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای که در ترجمه تغییر ایجاد شده باشد مشاهده نشد.



شکل ۳- گراف سکانس ژنNA تخلیص شده پس از PCR

تولید باکولوویروس نوترکیب

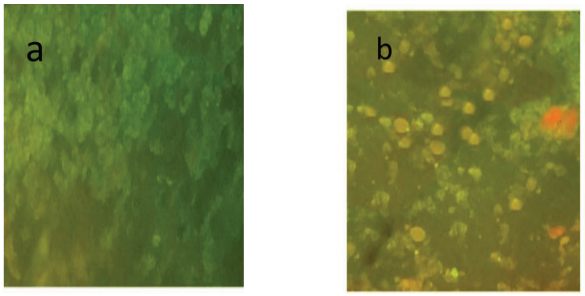
پس از کشت سلول‌های Sf۹ حشره به منظور تولید باکولوویروس نوترکیب؛ بکمید حاصل در داخل سلول‌های حشرات ترانسفکت شد پس از ترانسفکشن سلول‌های حشره با بکمید نوترکیب؛ با میکروسکوپ نوری سلول‌ها رویت شده و علائم CPE در سلول‌ها ظاهر شدند. در ۲۴ ساعت اول پس از ترانسفکشن، رشد سلول‌ها در مقایسه با شاهد تقریبا" متوقف می‌شد. اندازه آن‌ها و همچنین اندازه هسته آنها افزایش می‌یابد و ظاهر گرانولار شده و از سطح فلاسک کشت سلول جدا شد. (شکل۴).



شکل۴- A سلول S۹ قبل از ترانسفرم شدن ، B سلول های ترانسفکت شده با بکمید

ایمنوفلورسنس غیر مستقیم (IF)

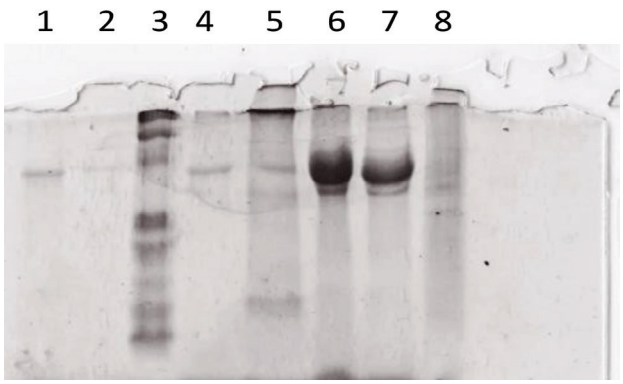
فعالیت بیولوژیکی پروفایل‌های از پروتئین نوترکیب نورآمینیداز در سطح سلول حشره (Sf۹) آلوده شده به باکولوویروس حامل ژن نورآمینیداز با استفاده از آنتی‌سرم واکسینه خرگوش بررسی گردید. سطح سلول‌های آلوده که دارای پروتئین نورآمینیداز بیان شده بودند، رنگ سبز درخشان در میکروسکوپ اینورت نشان دادند ولی در سلول‌های غیر آلوده درخشندگی رویت نشد.(شکل۵).



شکل۵-بررسی ایمنوفلورسانس غیرمستقیم: a سلول‌هایی غیرآلوده، b سلول‌های آلوده به ویروس و با بکمید

SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ پروتئین نوترکیب

در ژل SDS-PAGE نمونه‌های مختلف از جمله نمونه سلول‌های آلوده به باکولوویروس، مایع رویی سلول‌های آلوده(سوپرنیتنت)، سلول‌های غیر آلوده و ویروس آنفلوانزای H۱N۱ روی ژل منتقل شد. نمونه سلول‌های آلوده در درجه حرات‌های مختلف از ۵ دقیقه تا ۱۸ دقیقه جوشانده شده و سپس به ژل منتقل گردید. زمان‌های حرارت‌دهی به مدت ۷ و ۹ دقیقه بهترین نتایج را نشان دادند. (شکل۶) پس از انجام SDS-PAGE و انتقال آن به کاغذ نیتروسلولز بوسیله وسترن بلاتینگ بیان پروتئین مورد نظر با رویت باندپروتئینی بین باند لدر ۳۷ – ۵۰ کیلو دالتون برابر با ۴۶ کیلو دالتون تایید شد. بیان پروتئین نورآمینیداز با هدف بررسی بیان پروتئین مذکور با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه نورآمینیداز تجاری بررسی شد. (شکل۷).



شکل۶- ستون ۱ سلول‌های آلوده به ویروس، ستون ۲ باکیولو ویروس، ستون ۳ لدر، ستون ۴ مایع رویی کشت سلول‌های آلوده، ستون ۵ ویروس آنفلوانزا سویه H۱N۱ (کنترل مثبت)، ستون ۶ و ۷ و ۸ سلول Sf۹ غیر آلوده (کنترل منفی)

شکل۷- پروتئین‌های تولید شده در سلول های Sf۹ در وسترن بلاتینگ، ستون لدر L، ستون ۲ نمونه سلول‌های آلوده، ستون ۳ نمونه مایع رویی کشت آلوده، ستون ۱، ۴، ۵و ۶ نمونه‌های کنترل منفی

بحث

به منظور تکثیر ژن مورد نظر از واکنش PCR استفاده شد. در این تحقیق بجای DNA پلیمراز Taq از محصول شرکت Amplicon یعنی Master Mix استفاده شد. گفته شده است موفقیت PCR تاحد زیادی به طراحی پرایمر و ویژگی اتصال پرایمر به توالی هدف آن وابسته است. در طراحی سایت برش آنزیم محدودکننده گذاشته شده و هضم آنزیمی به روش Double digest بر روی محصول PCR و همچنین حامل ژنتیکی Pfastbac HTA انجام گردید. از PCR دو مرحله‌ای که دارای دو دمای متفاوت اتصال دردومرحله می‌باشد استفاده شد. بعلت اینکه در آمپلی فای ژن NA در PCR باندی مشاهده نشد لذا گوشوارهای آن بوسیله آنزیم‌های برش محدودکننده بریده شد و سپس محصول PCR تخلیص شده و بعد با

پرایمرهای اولیه ازدیاد قطعه ژن انجام شد تا نواحی برش آنزیمی در آن ایجاد گردید. در این تحقیق بوسیله شیب دمایی بین ۵۰ الی ۶۵ سانتی‌گراد استفاده شد که برای پرایمرهای بیانی و تکثیر ژن نورآمینیداز دمای بین ۵۴/۵ الی ۵۶/۵ سانتی‌گراد باند دیده شد. سکونسینگ برای تایید قطعه نورآمینیداز انجام شد. در Alignment توالی نوکلئوتیدی قطعه کلون شده با توالی نوکلئوتیدی ژن نورآمینیداز که از بانک ژن دریافت گردیده بود ۱۰۰٪ همولوژی مشاهده شد. همچنین با توالی یابی آمینواسید حاصل از ژن NA و مقایسه آن با توالی آمینواسید این ژن‌ها در بانک ژن نشان داده شد که صددرصد همولوژی وجوددارد.

در نظر بیولوژیست‌های مولکولی، رده‌های سلولی حشرات تقریبا به عنوان یک جزء اصلی در گستره پهناور تحقیقات مولکولی محسوب می‌شوند. بعنوان یک فاکتور کلیدی برای این سیستم می‌توان به توانایی سلول‌های حشرات در تولید پروتئین‌های یوکاریوتی که نیاز تغیرات پس از ترجمه(Post translational modifications) هستند؛ در مقیاس وسیع و در زمان نسبتا کوتاه اشاره کرد. همانطور که گفته شده است انواع گوناگونی از ویروس‌ها حشرات را آلوده می‌سازند که مشهورترین آنها متعلق به خانواده باکولوویریده است. (۱۰) سال ۱۹۸۳ که فن‌آوری Baculovirus Expression Vector System (BEVS) به دنیا معرفی شده است. رایج‌ترین رده‌های سلولی راسته لپیدوپترا مورد استفاده برای BEVS رده‌های سلولی Sf۹ و Sf۲۱ جدا شده از بافت تخمدان شفیره Spodoptera frugiperda fall army worm و رده سلولی High Five TM جدا شده از بافت جنینی نوعی کرم حلقوی آفت کلم بنام Trichoplusia ni هستند. ضمنا رده ی سلولی Sf۹ یک ساب کلون مشتق شده از Sf۲۱ است.(۱۵،۱۶)

پلاسمید دارای نورآمینیداز پس از ترانسفورم نمودن باکتری TOP۱۰ و سپس باکتری DH۱۰، برای تایید انتقال پلاسمید، باکتری در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، کانامایسین و تتراسیکلین کشت داده شد و سپس بوسیله پرایمرهای اختصاصی این مرحله، قطعه مذکور پس از PCR در ژل الکتروفورز باند bp ۱۸۳۰ را نشان داد. ایجاد کلنی‌های آبی رنگ در محیط جامد (۱۲)و در مرحله بعد در محیط LB-agar دارای X-gal-IPTG کلنی‌های شفاف تایید دریافت DNA نوترکیب در باکتری DH۱۰ بود. در این تحقیق برای تولید پروتئین نوترکیب NA در سلول‌های حشرات از روشی که در سال ۱۹۹۳ توسط لاکوف و همکارانش ابداع کرده بودند استفاده شد. (۱۸ ، ۱۹) البته از سیستم بیانی باکولوویروسی بطور موفقیت‌آمیزی برای سنتز کپسید و یا ژن‌های ویروس‌های متعددی استفاده شده است از جمله Baumart در سال ۱۹۹۸با همکاران(۲۰) از سیستم Bac-To-Bac استفاده کرده و ذرات شبیه ویروس HCV(VLP) را در سلول حشره تولید کردند. در سال ۲۰۰۶ آقای Hu YuC (۲۱) بوسیله‌ی سیستم Baculovirus/insect cell دو ژن HA ویروس آنفلوانزای سویه H۵N۲ را بیان نمودند. در تحقیق دیگری در سال ۲۰۱۰ Peter Pushko و همکاران(۴) VLP ویروس واکسنی آنفلوانزای H۱N۱ را با سیستم باکولوویروس ساختند. این نوع سیستم حامل باکولوویروسی روزبه روز در حال پیشرفت است. در طی بیست سال گذشته سیستم باکولوویروسی یکی از پرکارترین سیستم‌های تولید پروتئین نوترکیب بوده است(۲۳).

موضوعات مهمی در استفاده از سیستم بیانی باکولوویروس وجود دارد که با رعایت این نکات محصول نهایی کیفیت مورد انتظار را خواهد داشت که در این مقاله به بعضی از آنها اشاره می‌شود. در ابتدا هدف بدست آوردن عیار بالایی از باکولوویروس بود. در مرحله بعد برای جلوگیری از موتاسیون‌های ناخواسته، استفاده از MOI بسیار پایین ویروس در تکثیر مد نظر بود. لذا در این تحقیق از MOI کمتر از یک استفاده شد. موضوع مهم دیگر احتمال جهش ویروس در پاساژهای متوالی است که برای ممانعت از آن، ویروس‌های مورد نظر از پاساژ سوم جمع‌آوری شد. برای استحصال پروتئین نوترکیب با کیفیت و کمیت بالا، سلول‌های Sf۹ در پاساژ آخر با MOI ۱۰ آلوده شدند. پس از مشاهده بزرگ شدن و گرانوله شدن سلول‌ها که نشانه رشد ویروس در سلول است، سلول‌ها جمع‌آوری و لیز شدند و با روش سونیکه کردن پروتئین از سلول جداگردید. مشاهده تولید پروتئین نورآمینیداز با کیفیت و کمیت بالا در الکتروفورز ژل آکریل آمید نشان داد که بکار گرفتن MOI ۱۰ و جمع‌آوری سلول‌ها ۷۲ ساعت پس از آلوده کردن سلول‌ها، باعث تولید پروتئین نوترکیب به مقدار زیاد هم در سوپرنیتنت و هم در سلول‌ها شده بود. بطوری که بدون تخلیص پروتئین باند پروتئینی در ژل براحتی رویت شد. وجود پروتئین نوترکیب در مایع رویی محصول نهایی نمی‌تواند ترشحی بودن پروتئین را اثبات کند زیرا احتمالا پروتئین در مایع رویی محصول نهایی بخاطر CPE و تخریب سلول‌های Sf۹ بوده باشد. نهایتا در وسترن بلات باند پروتئین به وزن حدود ۴۱ کیلو دالتون که بوسیله باکولوویروس نوترکیب حاوی ژن NA تولید شده بود در مقایسه با سلول‌های غیرآلوده که بعنوان کنترل منفی بکار گرفته شده بود مشاهده شده و بعنوان پروتئین نوترکیب نورآمینیداز تایید شد.

نتیجه‌گیری کلی

اولا با توجه به نتایج آزمایش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم، شکل ساختمانی پروتئین نورآمینیداز در سیستم باکولوویروسی صحیح انجام شده و پروتئین بدست آمده با نمونه واقعی تفاوتی ندارد. دوما با توجه به تولید پروتئین قابل رویت بدون استفاده از عملیات تخلیص با این روش و در مقایسه با کشت ویروس آنفلوانزای فصلی سویه H۱N۱ در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار به نظر می‌رسد برای تولید پروتئین‌های ایمنوژن ویروس آنفلوانزا برای تولید واکسن‌های فصلی، استفاده از روش‌های نوترکیب به احتمال قوی اقتصادی‌تر از سایر روش‌ها باشد. بکارگیری فرمانتور در فاز تولید ویروس باکولوویروس در تولید انبوه می‌توان در ارتقاء کمیت پروتئین در زمان کمتر موثر باشد و به اقتصادی‌تر شدن این روش کمک شایانی نماید.

منابع مورد استفاده

1. Noda T, K. Y. (2006). "Classification and virion structure of influenza virus. Nippon Rinsho. 64((10): 1766-1769

2. Howley P. , Knipe D. M., Enquist D. L., Cohen J. I., Freed E.O., Damania B. A., Whelan S. P. J.; (2021). Fields Virology. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication , Florian Krammer , Peter Palese , Chapter 14: 1774-1776

3. Pavlovic, J., et al. (2000). DNA vaccination against La Crosse virus. Intervirology 43(4-6): 312-321

4. Maeda, Y., et al. (2003). Classification and genome structure of influenza virus, Nippon Rinsho 61(11): 1886-1891

5. Cox, N. J., et al. (2003). Influenza pandemic planning. Vaccine

21(16): 1801-1803
6. Ford SM, Grabenstein JD. Pandemics, avian influenza A (H5N1), and a strategy for pharmacists.Pharmacotherapy. 2006;26(3):312-22
7. Zangwill KM, Belshe RB. Safety and efficacy of trivalent inactivated influenza vaccine in young children: a summary for the new era of routine vaccination. The Pediatric infectious disease journal. 2004;23(3):189-97
8. Laohpongspaisan, C., et al. (2009). Why amantadine loses its function in influenza m2 mutants: MD simulations: Journal of chemical information and modeling 49(4): 847-852
9. Paterson, R. G., et al. (2003). Influenza B virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface: Virology 306(1): 7-17
10. Kim Y. H., Hong K. J., Kim H., Hwan J. , Influenza vaccines: Past, present, and future , Rev Med Virol. 2022; 32(1): e2243
11. Ze C., Kurata T., Tamura S. Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins. Jpn J Infect Dis. 2000;53(6):219–228
12. Kilbourne ED, et al. Purified influenza A virus N2 neuraminidase vaccine is immunogenic and non-toxic in humans. Vaccine. 1995; 13(18):1799-803
13. Giurgea L. T., et al. Influenza Neuraminidase: A Neglected Protein and Its Potential for a Better Influenza Vaccine, Vaccines (Basel). 2020 Jul 23;8(3):409
14. Pushko P, et al. Recombinant H1N1 virus-like particle vaccine elicits protective immunity in ferrets against the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. Vaccine.2010; 28(30):4771-6.
15. Miller L.K. The baculoviruses : 1997 - books.google.com
16. Zhao W., Liao G.Y., Jiang Y.J., Jiang S.D... Expression and self-assembly of HCV structural proteins into viruslike particles and their immunogenicity. Chinese medical journal. 2004; 117(8):1217-22.
17. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect andmammalian cells. Nature biotechnology. 2005;23(5):567-75
18. Hitchman RB, Possee RD, King LA. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. Recent patents on biotechnology.2009; 3(1):46-54.
19. Invitrogen. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System, Instruction Manual 2010.
20. Kitts PAaP, R. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency.BioTechniques. 1993;14:5810
21. Baumgart M., Verena Moos, Diana Schuhbauer, Brigitte Müller,Differential expression of major histocompatibility complex class II genes on murine macrophages associated with T cell cytokine profile and protective/suppressive effects (1998) , Proceedings of the National Academy of Sciences , 95 (12) 6936-6940
22. 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. Journal of virological methods. 2006;135(1):43-8
23. Pushko P., et al. (2010). Recombinant H1N1 virus-like particle vaccine elicits protective immunity in ferrets against the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. Vaccine 28(30): 4771-4776.