

Construction of a recombinant bacmid DNA in order to express Neuraminidase gene of influenza virus H1N1

Najafi S(M.Sc)¹, Behzadian F(Ph.D)^{*2}, Fotouhi Chahooki F(Ph.D)³, Fallah Mehrabadi J(Ph.D)⁴

1- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

2- Department of Genetics Engineering, Research Center for Science and Biotechnology, Lavizan, Tehran, Iran

3- Research Center for Influenza, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Minoodasht, Iran

Received: 13 Sep 2011, Accepted: 13 Dec 2011

Abstract

Background: In recent years Influenza viruses have caused widely spread moderate to severe infection in all around the world and there is no Influenza vaccine which can protect people only with one dose injection till now. Therefore , producing a universal vaccine based on virus like particle (VLP) could be ideal. In this study one of the molecular structures was considered for VLP based Influenza vaccine.

Materials and Methods: In this experimental study, the human influenza virus (A /New Caledonia 20/1999/ (H1N1)) was propagated in MDCK cell culture. Viral RNA was extracted using RNX-plus solution. Complementary DNA synthesis was carried out using uni-12 primer and random hexamer as specific and general primers, respectively. Neuraminidase open reading frame (1413-bp) was amplified by PCR and cloned into pBlue-script SK. Neuraminidase coding frame sub cloned into pFastBac11 plasmid through SalI/XhoI sites. After verification of cloned Neuraminidase by restriction analysis, it was subjected to automated sequencing bi-directionally. The recombinant pFastBac Neuraminidase vector was transformed to E.coli DH10Bac cells which harbor bacmid DNA and helper plasmid to create Neuraminidase recombinant bacmid.

Results: Neuraminidase recombinant bacmid was created by homologous recombination between pFastBacNA and bacmid and was verified by PCR using Neuraminidase specific and M13 universal primers.

Conclusion: Recombinant baculovirus expressing Neuraminidase gene can be also used with other individual recombinant baculoviruses expressing HA and M1 genes in production of influenza VLPs or proteins resulting from this structure could be purified in specific insects for vaccine research studies.

Keywords: Genetic vector, Influenza vaccine, Neuraminidase, Recombinant baculovirus, Virus like particles

*Corresponding author:

Address: Department of Genetics Engineering, Research Center for Science and Biotechnology, Lavizan, Tehran, Iran

Email: fbehzadian@yahoo.com

جداسازی و کلونینگ ژن نورآمینیداز ویروس آنفلوانزا A (H1N1) سویه New Caledonia) در وکتور بکمید به منظور ساخت باکیولوویروس نوترکیب

سارا نجفی¹، فریدا بهزادیان^{2*}، فاطمه فتوحی چاهوکی³، جلیل فلاح مهرآبادی⁴

1- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

2- استادیار، دکتری تخصصی ویروس‌شناسی، دانشگاه مالک اشتر، گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، تهران، ایران

3- استادیار، دکتری تخصصی ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات آنفلوانزا، تهران، ایران

4- استادیار، دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مینودشت، مینودشت، ایران

تاریخ دریافت: 90/6/23 تاریخ پذیرش: 90/9/23

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر ویروس آنفلوانزا باعث عفونت‌های متوسط تا شدید با میزان پراکندگی وسیع در سرتاسر دنیا شده است. بر این اساس، واکسن آنفلوانزایی که تنها یک دوز آن محافظت ایجاد نماید هنوز در دسترس نیست. بنابراین، تهیه یک واکسن عمومی و فراگیر بر اساس ذرات شبه ویروسی غیرتکثیری ایده‌آل می‌باشد. در تحقیق حاضر یکی از سازه‌های مولکولی برای ساخت این ذرات مد نظر قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، رده سلولی MDCK برای تکثیر ویروس آنفلوانزای انسانی تیپ A/New Caledonia H1N1 استفاده شد. سپس کل RNA سلول، استخراج شده و با استفاده از پرایمر random hexamer به عنوان پرایمر عمومی cDNA ساخته شد. قطعه NA(1413 bp) با روش PCR تکثیر داده شد و در وکتور pBluescript SK کلون شد. سپس قطعه نورآمینیداز در پلاسمید pFastBac11 از طریق محل‌های برش آنزیمی SalI و XhoI ساب‌کلون گردیده و صحت آن با توالی‌یابی دو طرفه مورد تایید قرار گرفت. وکتور pFastBac1NA به میزبان E.coli DH10Bac که حاوی بکمید و پلاسمید کمکی بود منتقل شد تا بکمید نوترکیب نورآمینیداز ساخته شود. **یافته‌ها:** بکمید نوترکیب نورآمینیداز با روش نوترکیبی هومولوگ بین pFastBac1NA و بکمید به وجود آمد. این محصول با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی نورآمینیداز و عمومی M13 تایید گردید.

نتیجه‌گیری: از بکمید نوترکیب ساخته شده در این مطالعه به همراه بکمیدهای نوترکیب، حاوی ژن‌های ساختمانی ویروس، می‌توان برای ساخت ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا استفاده نمود و یا پروتئین حاصل از بیان این سازه را در سلول‌های حشرات خالص نموده و در تحقیقات واکسن‌شناسی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا، نورآمینیداز، بکمید نوترکیب، ذرات شبه ویروسی

* نویسنده مسئول: تهران، لویزان، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، گروه مهندسی ژنتیک

Email: fbehzadian@yahoo.com

مقدمه

ویروس آنفلوانزا، متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده، دارای ژنوم قطعه قطعه تک رشته‌ای از جنس RNA می‌باشد (1). آنفلوانزا بیماری است که دارای اهمیت جهانی بوده و نه تنها در جمعیت‌های انسانی بلکه در حیوانات قادر به گسترش می‌باشد. این بیماری به صورت فصلی در مناطق سرد سیر هنگام زمستان و در نواحی گرمسیر در فصول بارانی رخ می‌دهد. پاندمی‌های آنفلوانزا محدود به فصول نمی‌باشد و در هر زمان از سال می‌تواند رخ دهد. مهم‌ترین اقدام بهداشتی جهت پیش‌گیری از آنفلوانزا، استفاده از واکسن‌های غیرفعال شده آنفلوانزا می‌باشد که از ویروس‌های آنفلوانزای A و B که احتمالاً در آن سال شایع خواهد بود تهیه می‌شوند. در بسیاری از تحقیقات، تولید واکسن‌های زیر واحدی یا غیرفعال دارای پروانه ساخت برای انسان با تأکید بر ساخت واکسن مؤثر با کمترین عوارض جانبی مورد توجه قرار گرفته است. از سه دهه پیش نشان داده شده است که آنتی بادی علیه هماگلوتینین و نور آمینیداز می‌تواند علیه آنفلوانزا حافظت ایجاد نماید و این ایمنی با واکسن غیرفعال آنفلوانزای انسانی ایجاد می‌شود (2). (3). علی‌رغم تهیه واکسن‌های متعدد علیه آنفلوانزا، بیشتر تحقیقات به سوی تهیه ذره‌های شبه ویروسی یا (Virus Like particle-VLP) می‌باشد به طوری که این ذره‌های نو ترکیب در میزبان‌های بیانی مختلف تولید شده‌اند. یکی از بهترین سیستم‌های مطرح در تولید VLP، استفاده از سیستم بیانی باکیولوویروس در سلول‌های حشرات می‌باشد. در سیستم باکیولوویروسی، این پروتئین‌ها به صورت طبیعی خود با تمام تغییرات پس از ترجمه‌ای بیان شده و به طور خود به خودی گرد هم آمده و همانند ذرات تو خالی ویروس آنفلوانزا در می‌آید (4). در تحقیق حاضر بکمید نو ترکیبی ساخته شد تا بتوان از آن در تهیه VLP این ویروس استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی سلول‌های MDCK (Madin- Darby Canine Kidney)

(Epithelial Cell) در محیط DMEM با 5 درصد سرم جنین گوساله کشت داده شد. ویروس H1N1 سویه New Caledonia به سلول‌های MDCK تلقیح و عیار آن با تست هماگلوتینین تعیین گردید (5). عیار ویروسی استفاده شده در این تحقیق برابر 512 بود. استخراج RNA تام (Total RNA) از 250 تا 300 میکرولیتر مایع رویی سلول‌های MDCK آلوده، با استفاده از کیت RTTM RNX (سیناژن، ایران) انجام شد. برای انجام PCR، ابتدا 50 میکرولیتر از RNA استخراج شده با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس و پرایمرهای Random Hexamer تبدیل به cDNA شد (6). برای بررسی صحت استخراج RNA و سنتز cDNA، با یک جفت پرایمر که ناحیه کوتاهی از ژن HA را تکثیر می‌دهد، PCR انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به صورت زیر بود:

HA-Reverse-1013: TTCCTTAGTCCTGTAACCAT
HA-Forward-797: TAATAGCGCCATGGTATG

سپس PCR برای تکثیر ژن هدف با پرایمرهای اختصاصی NA که به صورت توالی‌های زیر می‌باشد انجام شد. برای طراحی پرایمر از نرم افزار Generunner و از توالی ثبت شده با شماره دسترسی CY033624 استفاده شد (7).

NA1 Forward:
CGGTCGACTTTAAAATGAACCCAAATC 3'
NA1 Reverse:
5'ATCTCGAGCTACTTGTCAATGGTGAAC 3'

پرایمرهای طراحی شده دارای سایت برش آنزیم‌های SalI و XhoI به ترتیب در پرایمرهای پیشرو و معکوس بودند.

واکنش PCR در حجم 25 میکرولیتر و در میکروتیوب‌های استریل 0/5 میلی‌لیتری انجام گرفت. برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR در جدول 1 آمده است.

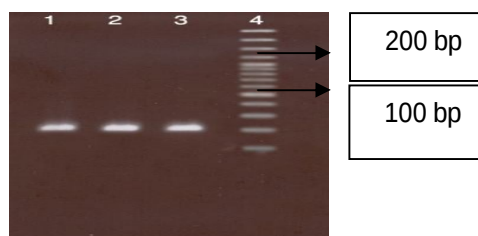
جدول 1. برنامه مورد استفاده برای تکثیر ژن NA در واکنش PCR

نوع عملیات	درجه حرارت	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	93° c	3	1
واسرشت	93° c	1	35
اتصال	50° c	1	35
طولیل سازی	72° c	2	35
طولیل سازی نهایی	72° c	10	1

گردید. با انجام نوترکیبی هم ساخت در این میزبان، قطعه NA از وکتور نوترکیب pFastBac1/NA به بکمید وارد شده و بکمید نوترکیب ساخته شد. برای شناسایی کلنی‌های DH10Bac دارای بکمید نوترکیب، پس از انجام ترانسفورماسیون، از روش غربال‌گری کلنی‌های آبی و سفید استفاده شد. هم‌چنین برای تأیید بکمید نوترکیب و برای نشان دادن نوترکیبی، از PCR استفاده گردید. بکمید واجد توالی‌های مکمل پرایمرهای یونیورسال M13 در دو سوی محل ترانسپوزون در داخل LacZ می‌باشد و از این ویژگی می‌توان برای تأیید ترانسپوزیشن با روش PCR کمک گرفت. برای PCR از پرایمرهای مستقیم و واژگون M13 استفاده شد. اندازه محصول PCR با توجه به نقشه pFastBac11 محاسبه شد(8).

یافته‌ها

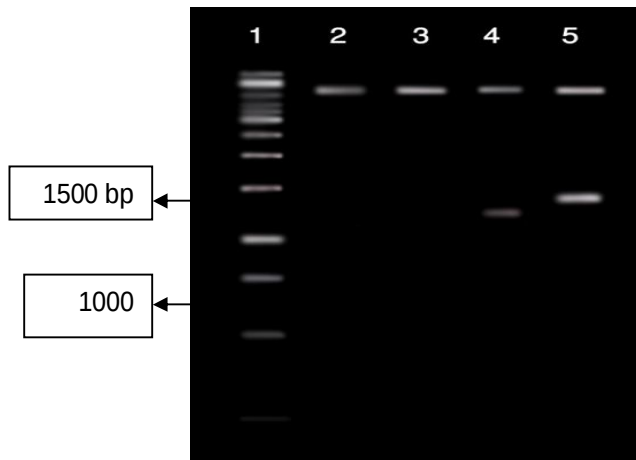
جهت پایش عمل استخراج RNA و نسخه‌برداری معکوس، از cDNA سنتز شده به عنوان الگو برای تکثیر یک ناحیه 200 bp از ژن HA استفاده شد. شکل 1 نتیجه الکتروفورز محصول PCR مذکور می‌باشد.



شکل 1. ژل الکتروفورز محصول PCR ناحیه‌ای ژن HA که برای پایش صحت عمل استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. نمونه‌های چاهک 1 تا 3 مربوط به سه واکنش مجزای سنتز cDNA می‌باشد. چاهک 4 : DNA plus 100bp ladder

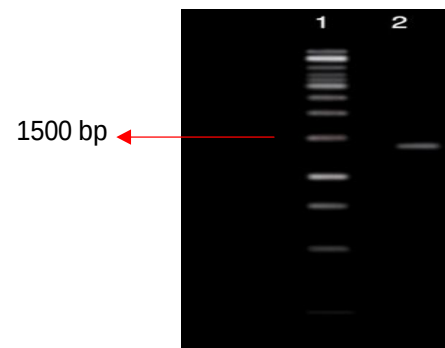
برای تکثیر ژن هدف یعنی قاب خواندنی NA با اندازه 1420 bp، PCR با استفاده از آنزیم High fidelity PCR Enzyme mix (فرمنتاز - لیتوانی) و پرایمرهای اختصاصی انجام شد (شکل 2).

خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت استخراج DNA (فرمنتاز - لیتوانی) انجام شد. برای انجام کلونینگ، ابتدا وکتور pBluescript SK⁻ با آنزیم محدودگر EcoRV به صورت صاف برش خورده و سپس با استفاده از آنزیم T4 لیگاز (فرمنتاز - لیتوانی) مطابق دستور با محصول PCR وارد واکنش لیگاسیون گردید. محصول لیگاسیون در سلول‌های مستعد شده اش‌ریشاکلی سوئیۀ TOP10F وارد شده و در محیط کشت LB agar حاوی آمبی‌سیلین، X-gal و IPTG برای غربال‌گری کلنی‌های سفید-آبی کشت داده شد. به منظور انتخاب کلون حاوی وکتور نوترکیب و تأیید صحت کلونینگ، پلاسمیدهای چند نمونه از کلنی‌های سفید استخراج و با هضم آنزیم‌های SalI و XhoI مورد آنالیز قرار گرفت. یکی از وکتورهای نوترکیب انتخاب شده و برای تعیین توالی ژن کلون شده به شرکت MWG آلمان ارسال شد. تعیین ترادف دو طرفه و با استفاده از همان پرایمرهایی که ژن NA تکثیر داده شده بود، صورت گرفت. اولین قدم در تولید باکیولوویروس نوترکیب، کلون کردن ژن هدف در پلاسمید دهنده pFastBac11 می‌باشد. برای برش pFastBac1 و وکتور نوترکیب pBluescript/NA از دو آنزیم SalI و XhoI استفاده شد. محصول برش با استفاده از کیت تخلیص DNA (فرمنتاز - لیتوانی) خالص شده و با واکنش T4 لیگاسیون، قطعه NA در وکتور pFastBac1 کلون گردید. از کلنی‌هایی که رشد کرده بودند استخراج پلاسمید صورت گرفت و با برش آنزیمی، ساب کلونینگ قطعه NA به داخل وکتور و تکوین سازه pFastBac1/NA تأیید شد. این سازه به داخل باکتری میزبان اش‌ریشاکلی سوئیۀ DH10Bac وارد



شکل 3. تأیید هضم آنزیمی کلون نوترکیب pFastBac11/NA. ردیف 1، Ladder 1kb، ردیف 2 برش با آنزیم HindIII که وکتور به اضافه ژن NA به صورت خطی در آمده و وزنی برابر 6195 bp را نشان می‌دهد. ردیف 3 برش با آنزیم XhoI انجام شده و کلون pFastBac11NA را خطی کرده و وزنی معادل ردیف 1 را نشان می‌دهد. ردیف 2 و 4 نشان دهنده برش توسط آنزیم BamHI و حاصل شدن قطعه 1200 bp و 4995 bp را نشان می‌دهد. ردیف شماره 5 هضم دو تایی با آنزیم‌های XhoI / SalI و بیرون آمدن ژن NA را نشان می‌دهد.

برای بررسی بکمید نوترکیب از روش PCR استفاده گردید. بکمید در دو طرف محل ترانسپوزون واجد توالی‌های مکمل پرایمرهای یونیورسال M13 می‌باشد. با استفاده از این ویژگی، وجود ژن NA در موقعیت صحیح آن مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به نقشه pFastBac1 اندازه قطعات مورد انتظار محاسبه گردید. در صورتی که از پرایمرهای رفت و برگشت M13 استفاده شود انتظار می‌رفت قطعه‌ای با طول 3/85 کیلو باز به وجود آید و در صورتی که بکمید دست نخورده باشد قطعه‌ای به طول 300 نوکلئوتید را تولید می‌کند. در شکل 4 تأیید بکمید نوترکیب نشان داده شده است. همچنین pFastBac1-NA نوترکیب توالی‌یابی شد تا از صحت کلونینگ اطمینان کامل حاصل شود.

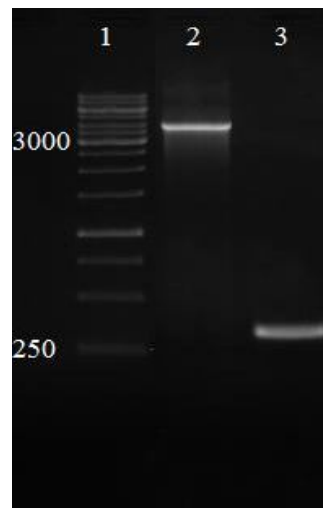


شکل 2. نتیجه ژل الکتروفورز تکثیر قطعه NA چاهک 1 : 1Kb Ladder ، چاهک 2: قطعه NA با اندازه 1413 bp

ناقل نوترکیب حاصل از مرحله قبلی، تحت هضم دو آنزیم SalI و XhoI قرار گرفته و قطعه کلون شده از آن خارج گردید. این واکنش با انجام ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب ناقل نوترکیب pBluescript/NA واجد قطعه NA شناسایی گردید. به منظور تولید گلیکوپروتئین نوترکیب NA از سیستم باکیولوویروسی Bac-to-Bac استفاده شد. این سیستم واجد یک پلاسمید دهنده به نام pFastBac1 و یک شاتل وکتور باکیولوویروسی به نام بکمید می‌باشد که در داخل میزبان DH10Bac قرار داده شده است. علاوه بر استفاده از pFastBac11 از سایت‌های SalI و XhoI برای دخول ژن استفاده گردید. در صورتی که از آنزیم‌های XhoI و SalI برای هضم پلاسمید نوترکیب استفاده شود، قطعه 1/4 کیلو بازی ژن NA به دست می‌آید. با توجه به این که محل اثر آنزیم BamHI در وکتور وجود دارد و یک محل اثر برای این آنزیم در ژن NA وجود دارد در نتیجه قطعه 1200 و 4995 نوکلئوتیدی از پلاسمید نوترکیب خارج شده و این نشان می‌دهد که جایگیری ژن هدف در وکتور فوق همان طور که قابل انتظار بود در جهت صحیح انجام گرفته است و برای آنزیم HindIII هیچ جایگاه برشی وجود ندارد. (شکل 3) تا این مرحله، وکتور نوترکیب pFastBac1/NA ساخته شد.

کارایی مناسب پروموتور پلی هیدرین در تولید پروتئین نوترکیب است. در سال 1992 نیز گزارشی مبنی بر تولید نورامینیداز نوترکیب در سیستم بیانی باکیولوویروس ارائه گردیده است (11). تا این زمان برای تولید باکیولوویروس نوترکیب از روش معمول کلونینگ استفاده می شد بنابراین شانس تولید ویروس نوترکیب بسیار کم بود، به طوری که میزان نوترکیبی کمتر از یک درصد بوده است. در کار انجام گرفته در پروژه حاضر از سیستم Bac-to-Bac استفاده شده تا میزان نوترکیبی هم ساخت برای تهیه بکمید نوترکیب بیشتر شود. نتیجه ای که در پژوهش حاضر به دست آمد آن بود که از هر پنج بکمید استخراج شده دو مورد دارای ژن مورد نظر بودند و این نشان داد میزان نوترکیبی همساخت با استفاده از این سیستم بسیار مناسب بوده و کارایی مطلوبی دارد. در سال 1995 جانسون و همکاران پروتئین نورامینیداز را در سیستم بیانی باکیولوویروس تولید نموده و میزان آنتی ژنیسته آن را معادل آنتی ژن طبیعی تخلیص شده از ویروس آنفلوانزا دانسته اند. برای این کار از آزمایش الایزا و polyclonal antisera in functional assays (NI) استفاده نموده اند و مدعی شدند آنتی ژن نوترکیب را می توان بدون ادجوانت استفاده نمود (12). با توجه به نتایجی که در پژوهش حاضر به دست آمده است در نظر است این کار تا تولید یک VLP مناسب انجام شود. لذا در حال حاضر نمی توان میزان ایمونوژنیسته کاست ساخته شده را پیش بینی نمود.

در سال 1996 درو و همکاران پروتئین نورامینیداز را به صورت ترشحاتی در سلول حشرات و با کمک سیستم بیانی باکیولوویروس تولید نمودند. در این گزارش میزان تولید پروتئین نوترکیب 6 تا 8 میکروگرم بر میلی لیتر محیط کشت عنوان شده است (13). نتیجه ای که در کار ما نیز به دست آمد نشان داد پروتئین نوترکیب تا 20 درصد کل پروتئین سلولی تولید می شود. لذا این نتیجه با کارهای مشابه خارج از کشور و با توجه به مقالات آنها قابل مقایسه بوده و برای مراحل تولید آزمایشگاهی مطلوب است. در سال 1999 جانسون آنتی ژن های NA و HA از ایزوله A/Nanchang/933/95 را در سیستم بیانی باکیولوویروس



شکل 4. تایید بکمید نوترکیب با PCR
ردیف 1: مارکر، ردیف 2: توالی NA به اندازه 1420 نوکلئوتید
که 2430 نوکلئوتید به آن اضافه شده، ردیف 3: کنترل منفی،
بکمید خالی که 300 نوکلئوتید می باشد.

بحث

اولین گزارشات در مورد استفاده از سیستم باکیولوویروس به منظور تولید پروتئین نوترکیب نورامینیداز به سال 1987 بر می گردد. در این سال وان ویکه و همکاران ژن نورامینیداز ویروس آنفلوانزای انسانی را در این سیستم بیانی تولید نموده و در آزمایش روی موش نشان دادند این پروتئین خاصیت ایمنی زایی دارد (9). در این پژوهش، با توجه به طراحی وکتورهای بیانی جدید، از وکتوری استفاده شده که میزان نوترکیبی هم ساخت در آن شانس بیشتری داشته باشد. نکته قابل توجه در مقایسه کار ما با کارهای اولیه در این است که در تمام تحقیقات مربوط به استفاده از سیستم بیانی باکیولوویروس از همان سال های 1987 تاکنون، از پروموتور پلی هیدرین استفاده شده است و این نشان می دهد تا چه اندازه این پروموتور می تواند برای تولید ویروس نوترکیب کارایی داشته باشد. هارلی و همکاران در سال 1990 ژن نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا را در اشریشیا کلی و باکیولوویروس کلون نموده و در گزارش خود عنوان نمودند میزان بیان پروتئین نوترکیب در باکیولوویروس بیش از اشریشیا کلی بوده است (10). این مطلب باز هم موید

این تحقیق تهیه بکمیدی بود که حاوی ژن NA باشد تا بتوان در ادامه بکمیدهای مربوط به ژنهای HA و M1 نیز تهیه نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه همکارانی که ما را در انجام این پژوهش یاری نموده‌اند تقدیر و تشکر می‌نمایم. همچنین از موسسه انیستیتو پاستور ایران به جهت همکاری در این طرح تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

1. Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 5th ed: Lippincott Williams and wilkins Pub; 2006.
2. Norkin LC. Virology: molecular biology and pathogenesis: ASM Press; 2010.
3. Carter JB, Saunders VA. Virology: principles and applications: Wiley; 2007.
4. Guillén G, Aguilar J, Dueñas S, Hermida L, Guzmán M, Penton E, et al. Virus-Like Particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. *Procedia in Vaccinology*. 2010; 2(2): 128-33.
5. Helgason CD, Miller CL. Basic cell culture protocols: Humana Pr Inc; 2005.
6. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. New York. 2001.
7. Yuryev A. PCR primer design: Humana Pr Inc; 2009.
8. Primrose SB, Twyman RM. Principles of gene manipulation and genomics: Wiley-Blackwell; 2006.
9. Van Wyke Coelingh KL, Murphy BR, Collins PL, Lebacqz-Verheyden AM, Battey JF. Expression of biologically active and antigenically authentic parainfluenza type 3 virus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein by a recombinant baculovirus. *Virology*. 1987; 160(2): 465-72.
10. Harley V, Mather K, Power B, McKimm-Breschkin J, Hudson P. Characterisation of an avian influenza virus nucleoprotein expressed

تولید نموده و ایمنی‌زایی آنها را روی موش بررسی نمود. وی تولید واکسن با استفاده از این سیستم بیانی را توصیه نموده و آن را مقرون به صرفه معرفی کرد (14). در تحقیق حاضر از سویه A/New Caledonia H1N1 استفاده شده که در سال‌های اخیر شیوع بیشتری داشته است. گزارشات دیگری نیز در مورد تولید NA نو ترکیب در سیستم بیانی باکیولوویروس وجود دارد که در آنها نیز از این سیستم به عنوان روشی مناسب برای تولید بالای آنتی‌ژن نو ترکیب نام برده شده است (15، 16). گالارزا و همکاران در سال 2005 از سیستم بیانی باکیولوویروس استفاده نموده و آنتی ژن‌های NA، HA، M1 و M2 را به صورت VLP در سلول Sf9 تولید نمودند. در ادامه آنها از IL-12 به عنوان ادجوانت استفاده کرده و واکسن مورد نظر را به صورت استنشاقی روی موش آزمایش نمودند. میزان تیتراژ آنتی‌بادی قابل توجه بوده است (17). کوکس و همکاران در سال 2008 گزارشی ارائه نمودند که در آن سعی کرده‌اند میزان تولید باکیولوویروس نو ترکیب را افزایش دهند. در این مورد عواملی مانند زمان کشت، دما، شرایط نگهداری ویروس و فرایند تخلیص دخالت دارند (18). در تحقیق حاضر این شرایط بهینه مد نظر قرار گرفت تا بیشترین تولید ویروس حاصل شود. کشت در محیط حاوی 10 درصد FBS، استفاده از کشت سلول در حالت سوسپانسیون به جای کشت stationary و آلوده سازی سلول میزبان در ابتدای مرحله رشد لگاریتمی از جمله این شرایط بودند. تهیه VLP حاوی آنتی‌ژن‌های NA، HA و M2 در سال‌های 2009 و 2010 نیز گزارش شده است (19، 20). تمامی این مقالات نشان داده‌اند این سیستم برای تهیه واکسن آنفلوانزا مناسب می‌باشد و بر همین اساس در تحقیق حاضر از این سیستم استفاده شده است.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر این مسئله مورد توجه قرار گرفته است که می‌توان از سیستم بیانی باکیولوویروس برای تهیه واکسن مناسب علیه آنفلوانزا استفاده نمود. هدف از انجام

- inE. coli and in insect cells. Archives of virology. 1990; 113(3): 267-77.
11. Mather KA, White JF, Hudson PJ, McKimm-Breschkin JL. Expression of influenza neuraminidase in baculovirus-infected cells. Virus research. 1992; 26(2): 127-39.
 12. Johansson BE, Price PM, Kilbourne ED. Immunogenicity of influenza A virus N2 neuraminidase produced in insect larvae by baculovirus recombinants. Vaccine. 1995; 13(9): 841-5.
 13. Deroo T, Min Jou W, Fiers W. Recombinant neuraminidase vaccine protects against lethal influenza. Vaccine. 1996; 14(6):561-9.
 14. Johansson BE. Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine. Vaccine. 1999; 17(15-16):2073-80.
 15. Kilbourne ED, Pokorny BA, Johansson B, Brett I, Milev Y, Matthews JT. Protection of mice with recombinant influenza virus neuraminidase. Journal of Infectious Diseases. 2004; 189(3): 459-61.
 16. Borg J, Nevsten P, Wallenberg R, Stenstrom M, Cardell S, Falkenberg C, et al. Amino-terminal anchored surface display in insect cells and budded baculovirus using the amino-terminal end of neuraminidase. Journal of biotechnology. 2004; 114(1): 21-30.
 17. 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.
 18. Cox M. Progress on baculovirus-derived influenza vaccines. Current opinion in molecular therapeutics. 2008; 10(1): 56-61.
 19. Wen Z, Ye L, Gao Y, Pan L, Dong K, Bu Z, et al. Immunization by influenza virus-like particles protects aged mice against lethal influenza virus challenge. Antiviral research. 2009; 84(3): 215-24.
 20. Pan YS, Wei HJ, Chang CC, Lin CH, Wei TS, Wu SC, et al. Construction and Characterization of Insect Cell-Derived Influenza VLP: Cell Binding, Fusion, and EGFP Incorporation. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010; 2010:1-11.