

Construction of a new recombinant baculovirus encoding HA, NA, and M1 proteins of swine influenza (H1N1) virus and its expression in insect cells

Behzadian F(Ph.D)¹, Goodarzi Z(M.Sc)², Saberfar E(Ph.D)²

1- Research Center for Sciences and Biotechnology, MalekeAshtar University, Tehran, Iran

2- Applied Virology Research Center, BaqyatallahUniversity of Medical Sciences , Tehran, Iran

Received:31 Jan 2012, Accepted: 23 May 2012

Abstract

Background: Genetic variability of influenza viruses causes new epidemics worldwide annually. Development of a new vaccine for prophylaxis of influenza virus has been a major objective in recent years. The aim of this study was to construct a recombinant baculovirus capable of expressing the two surficial antigenic glycoproteins, hemagglutinin and neuraminidase, as well as matrix proteins of swine influenza (H1N1) simultaneously and independently.

Materials and Methods: In this experimental study, first, a triplet cassette providing simultaneous and independent expression of target proteins was designed and subjected to synthesis. It was then cloned into pFastBac1 donor plasmid. Competent *E. Coli* DH10Bac cells were transformed by donor clone and the recombinant bacmids were produced following homologous transposition. This construction was verified by PCR and then transfected into Sf9 insect cells to package new recombinant baculoviruses.

Results: Restriction map of pFastBacI HNM1 donor plasmid confirmed the fidelity of the clone. The results of PCR done on the recombinant bacmid as template indicated that a proper homologous recombination has occurred between pFastBacI HNM1 donor plasmid and the bacmid in *E. Coli* DH10Bac host cells. Protein analysis of the infected Sf9 cells showed that all target proteins were efficiently expressed at the same time.

Conclusion: The recombinant baculovirus constructed in this study possesses proper characteristics to produce swine influenza virus-like particles in Sf9 cells.

Keywords: Baculovirus, H1N1 subtype, Influenza A virus, Virus-like particle

*Corresponding author:

Address: Applied Virology Research Center, Baqyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: saberfar@yahoo.com

ساخت باکیلوویروس نوترکیب کد کننده توأم پروتئین های همگلوتینین، نورآمینیداز و ماتریکس ویروس آنفلوانزای H₁N₁ خوکی و بیان آن در سلول های حشرات

فریدا بهزادیان¹، زهرا گودرزی²، اسماعیل صابر فر^{3*}

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

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

چکیده

زمینه و هدف: تغییرات ژنتیکی ویروس آنفلونزا، هر ساله باعث ایجاد اپیدمی های جدید در سراسر دنیا می شود. ساخت یک واکسن جدید به منظور پیش گیری از ویروس آنفلونزا در چند سال اخیر هدف اصلی پژوهشگران بوده است. هدف ما از این پژوهش، ساختن باکیلوویروس نوترکیبی است که بتواند دو گلیکوپروتئین سطحی آنتی ژنیک همگلوتینین و نورآمینیداز، به همراه پروتئین ماتریکس ویروس آنفلوانزای نوع A را به طور مستقل بیان نماید.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا کاست سه گانه ای که بیان همزمان و مستقل سه ژن همگلوتینین، نورآمینیداز و پروتئین ماتریکس را تأمین نماید، طراحی و سنتز شد. این کاست سپس در پلاسمید دهنده pFastBac1 کلون شد تا به پلاسمید دهنده pFastBac1 HNMI دست یابیم. کلون مذکور در میزبان E.Coli DH10Bac با انجام ترانسپوزیشن همسان، بکمید نوترکیب را ساخت. این سازه پس از تأیید با PCR، برای تکوین باکیلوویروس نوترکیب در سلول های حشرات SF9 تراریخت شد.

یافته ها: نتایج هضم آنزیمی، کلونینگ صحیح پلاسمید دهنده pFastBac1 HNMI را تأیید نمود. طول صحیح نواحی تکثیر یافته هدف بر روی بکمید نوترکیب، دلیل بر صحت نوترکیبی همسان بین پلاسمید دهنده pFastBac1 HNMI و بکمید موجود در E.Coli DH10Bac بود. آثار ضایعات سلولی SF9 به دنبال تراریختی با بکمید نوترکیب، نشان دهنده تکوین موفق باکیلوویروس نوترکیب بود. آنالیز پروتئین های این سلول ها نشان داد هر سه پروتئین هدف به طور مؤثر و همزمان بیان یافته اند.

نتیجه گیری: باکیلوویروس نوترکیب ساخته شده در این طرح ویژگی های درست جهت قابلیت استفاده در تولید ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا ویژه استرین خوکی را دارد.

واژگان کلیدی: باکیلو ویروس، ساب تایپ H1N1، ویروس آنفلوانزای تیپ A، ذرات شبیه ویروس

*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی

مقدمه

سویه های ویروسی در گردش هر ساله دستخوش تغییر شده و در نتیجه واکسن های رایج نتوانند موثر واقع شوند. به همین علت کارخانه های تولید واکسن هر ساله می بایستی از سویه های در گردش همان سال که توسط سازمان بهداشت جهانی تأمین و به عنوان بذر استاندارد معرفی می شود، استفاده نموده و واکسن های جدید و موثر بسازند، فرآیندی که بین 6 تا 9 ماه به طول می انجامد. این تولیدکنندگان محصولات خود را غالباً بر پایه تخم مرغ یا کشت سلول تولید می نمایند که هر یک محدودیت ها و نقاط ضعف خود را دارد (4، 5).

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

در این مطالعه با هدف نهایی تولید ذرات شبه ویروسی سویه H1N1 خوکی، ابتدا کاست ژنی مرکبی از سه ژن همگلویتینین، نورآمینیداز و ماتریکس نوع یک طراحی گردید به طوری که هر یک از ژن ها بیان مستقل خود را داشته باشند. پس از ساخت باکیلوویروس نوترکیب مربوطه در سلول های حشرات، بیان موفق و هم زمان هر یک از پروتئین های هدف در این رده سلولی نشان داده شد.

ویروس آنفلوانزای A، یکی از اعضاء خانواده ارتومیکوویروس ها می باشد که توانایی آلوده ساختن طیف وسیعی از حیوانات و هم چنین انسان را دارد. ژنوم این ویروس از 8 قطعه جداگانه با پلاریته منفی تشکیل شده است که بر پایه خواص آنتی ژنیک دو گلیکوپروتئین سطحی، موسوم به همگلویتینین (Hemagglutinin-HA) و نورآمینیداز (Neuraminidase-NA) به لحاظ سرولوژیکی تشخیص داده می شود (1). تا کنون تمامی تحت تیپ های متنوع از ویروس آنفلوانزای A که حاوی تلفیق های مختلف از انواع همگلویتینین و نورآمینیداز بوده اند، از پرندگان جدا شده است (2). مسئله وقوع نوتریبی ژنتیکی یا همان تغییرات شیفت و جهش های رایج در قطعات ژنومی این ویروس یا همان تغییرات دریافت، می تواند منجر به ایجاد نوع نوظهوری از ویروس آنفلوانزا گردد که سد گونه ای را در هم شکسته و موجب انتقال بیماری از پرند به انسان و حتی پس از آن، انتقال انسان به انسان گردد. این پدیده، ظهور پاندمی های آنفلوانزا را که به سرعت در جمعیت های انسانی پخش می شود، به دنبال خواهد داشت (1، 2). بدون شک واکسیناسیون، ابزاری مقرون به صرفه و کارآمد در کنترل بیماری و محدود نمودن پیامدهای گسترده ویروس های آنفلوانزای نوع A می باشد. اولین پاسخ ایمنی در بدن به دنبال عفونت آنفلوانزا از طریق تولید آنتی بادی علیه همگلویتینین و نورآمینیداز صورت می گیرد. ویروس آنفلوانزا در مراحل ابتدایی چرخه عفونت، با عاملیت همگلویتینین به سلول های میزبان متصل و در آنها نفوذ می کند، در حالی که نورآمینیداز در آزادسازی ویرونی های تکثیر شده در سلول، از خلال غشاهای سلول میزبان نقش ایفا می کند (3). به همین سبب اغلب واکسن های مطرح در حوزه تحقیقات و تولید صنعتی، در صدد تولید و معرفی محصولاتی می باشند که سیستم ایمنی همورال را به شکل کارآمدی برای تولید آنتی بادی اختصاصی علیه این دو پروتئین تحریک نماید. تغییرات مولکولی گلیکو پروتئین های همگلویتینین و نورآمینیداز باعث شده که

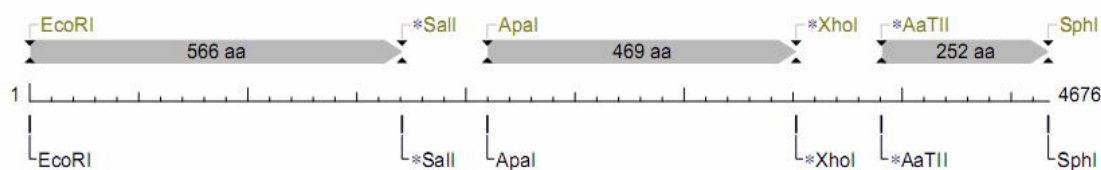
مواد و روش ها

طراحی کاست مرکب و کلونینگ آن

در این مطالعه تجربی، ترادف های اختصاصی سه ژن نور آمینیداز، همگلو تینین و ماتریکس نوع یک (M1) از ترادف گزارش شده به بانک ژنی از ایزوله خوکی H1N1 (A/California/04/2009) گرفته و در مهندسی کاست مرکب از آنها استفاده گردید. چنانچه در شکل 1 ملاحظه می شود در کاست ترکیبی طراحی شده ابتدا قاب خواندنی HA با طول 1698 جفت باز قرار داده شد که پس از کلون کردن این مجموعه تحت کنترل بیانی پروموتور پلی هیدرین موجود در اسکلت پلاسمید pFastBacI قرار می گیرد و با رمز اختتام در پایان قاب خواندنی خود، بیانش پایان می پذیرد. پس از آن، ترادف علامت پلی آدنیلایسیون SV40 به منظور ارتقا بیان پیش بینی شده است که به دنبال آن توالی فاصله انداز به طول 15 جفت باز قرار داده شد. پس از این مجموعه، بسته بیانی NA قرار دارد که توالی عناصر آن از 5 به 3 شامل ترادف پروموتور پلی هیدرین، قاب خواندنی NA با طول 1407 جفت باز و علامت پلی

آدنیلایسیون SV40 می باشد. پس از این مجموعه، توالی فاصله انداز با طول 15 جفت باز و بعد از آن بسته بیانی M1 قرار داده شد. ترتیب ترادف این بسته شامل ترادف پروموتور پلی هیدرین و قاب خواندنی M1 با طول 756 جفت باز می باشد. این ژن آخر، پس از کلون شدن در pFastBacI در بالا دست علامت پلی آدنیلایسیون SV40 متعلق به پلاسمید قرار گرفته و از آن استفاده می نماید. سازماندهی به گونه ای است که هر ژن در کاست خود رونویسی و بیان می گردد.

کاست ترکیبی مشروح در بالا برای سفارش سنتز به کمپانی ژن اسکرپیت ایالات متحده فرستاده شد و به صورت یکپارچه تحت سنتز قرار گرفت. شکل شماتیک 1 نشان دهنده موقعیت کاست ها در یک مجموعه ترکیبی بوده و محل های برش آنزیمی که برای کلونینگ یا برای استفاده از هر یک از بخش ها در پروژه های آینده، پیش بینی شده است را نشان می دهد.



شکل 1. نمای شماتیک از کاست مرکب HNMI1 که با نرم افزار روی خط "نیکاتر" رسم گردیده است. قاب های خواندنی مستقل و محل های برش آنزیمی مهم بر روی شکل نشان داده شده است.

جهت ساخت بکمید نو ترکیب، سلول های میزبان E.coliDH10Bac را ابتدا صلاحیت دار کرده و سپس توسط پلاسمید نو ترکیب HNMI1 pFastBacI فرآیند تراریخت شد. نو ترکیبی همسان از طریق محل های خاص (Tn7) بین پلاسمید دهنده HNMI1 pFastBacI و ژنوم باکیلوویروس AcMNPV موسوم به بکمید، انجام گرفت و بدین ترتیب بکمید های نو ترکیب حاوی کاست ترکیبی HNMI1 تشکیل گردید. بکمید های مذکور به علت تخریب ژن LacZ دارای فنوتیپ سفید بودند و توسط روش PCR

در ابتدا و انتهای این مجموعه به ترتیب محل های برش EcoRI و SphI قرار داده شده است. با استفاده از برش دو گانه این دو آنزیم پلاسمید دهنده pFastBacI خطی شده و قطعه مورد نظر موسوم به HNMI1 که در مجموع 4676 جفت باز طول دارد، پس از آماده سازی با واکنش T4 لایگیشن در آن کلون و تأیید گردید. این کلون HNMI1 pFastBacI نامیده شد.

تولید باکیلوویروس نو ترکیب

72 ساعت پس از آلوده سازی هنگامی که آثار ضایعات آسیب شناختی سلولی ظاهر شد و قبل از رخ دادن لیز و ریختگی سلولها، مایع رویی فلاسک، خارج و پروتئین تام سلولها با مقادیر مناسبی از بافر نمونه جمع آوری گردید. نمونهها پس از حرارت دادن، بر روی ژل کوچک SDS-PAGE با گرادیانت 12/5 درصد جداسازی شد. ژلها به صورت قرینه در دو سوی مارکر پروتئینی، نمونه گذاری گردید. بخشی برای رنگ آمیزی کوماسی و قسمت دوم برای وسترن بلات در نظر گرفته شد. سپس فرآیند چند مرحله ای روبه رو سازی با آنتی بادی های اختصاصی و ثانویه بر روی آن انجام گرفت. برای ظهور باند اختصاصی HA از پلی کلونال آنتی بادی بر علیه پروتئین HI خوکی جدایه کالیفرنیا (محصول کمپانی پروسای) استفاده شد. برای ظهور باند اختصاصی NA از پلی کلونال آنتی بادی بر علیه پروتئین NI (محصول کمپانی ابکم) و برای ظهور باند اختصاصی MI از مونوکلونال آنتی بادی علیه ماتریکس پروتئین آنفلوانزا (محصول کمپانی سروتک) استفاده شد. آنتی بادی ثانویه برای ظهور باندهای HA و NA سرم ضد خرگوش تهیه شده در بز که نشاندار با پراکسیداز است (محصول کمپانی رازی فراطب) و برای MI، سرم ضد موش تهیه شده در بز که نشاندار با پراکسیداز است (محصول کمپانی سیگما)، استفاده گردید. کاغذهای نیتروسولوز هر یک جداگانه با آنتی بادی های اولیه به غلظت 1/200 در تمام طول شب و آنتی بادی های ثانویه برابر غلظت ارائه داده شده در بروشورهای مربوطه، به مدت یک ساعت در معرض قرار گرفتند. برای انجام این آزمایش از روش های استاندارد و رایج استفاده شد (15، 16).

یافته ها

ترادف و کروماتوگرام کاست ترکیبی سنتز شده، با ترادف سفارش داده شده کنترل شد و هم تراز سازی آنها، کیفیت مطلوب و بدون خطای سنتز قطعه نسبتاً طولانی 4676 جفت بازی HNMI را خاطر نشان ساخت. کلون های انتخابی، حاصل واکنش لایگیشن HNMI و pFastBac1

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی M13، مورد تأیید قرار گرفتند. برنامه دمایی این واکنش مطابق جدول 1 انجام گرفت. آنزیم مصرف شده در این واکنش به سبب طول نسبتاً بلند نواحی هدف Dream Taq (محصول فرمنتاز) بود.

جدول 1. دستورالعمل حرارتی واکنش PCR براساس پرایمرهای pUC/M13

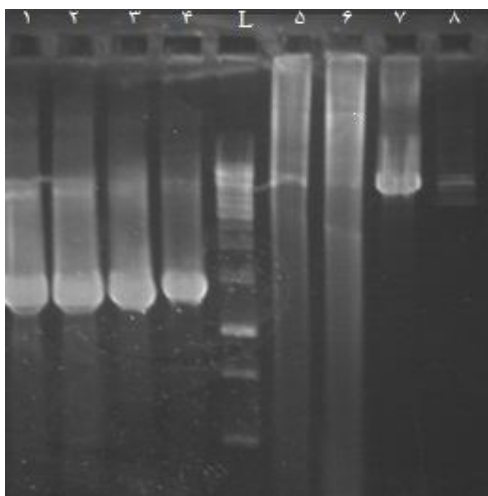
1 سیکل	35 سیکل	1 سیکل
واشرشگی اولیه	واشرشگی	اتصال
95	95	58
2 دقیقه	20 ثانیه	30 ثانیه
7 دقیقه	5 دقیقه	68
دما	زمان	انتهایی

کشت سلولی و آلوده سازی با کیلوویروس

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

فرآیند ترانس فکشن این سلولها، با استفاده از حاملین لیپیدی کاتیونیک با نام تجاری سلفکتین (محصول کمپانی اینویترورژن) مطابق دستور سازنده انجام پذیرفت. به طور خلاصه این فرآیند در ظروف کشت سلول 6 خانه ای حاوی $10^6 \times 2/5 - 1/5$ سلول های جوان در فاز لگاریتمی، تکثیر و با استفاده از تلفیق 1 میکروگرم از DNA بکمیدی و 8 میکروگرم محلول سلفکتین انجام گرفت. سلولها هر روز، در مقایسه با کنترل غیر آلوده، مورد بازبینی قرار گرفته و 3 روز پس از تراریختی، ویروسها جمع آوری گردید. جهت افزایش تیترو ویروس به دست آمده از نسل اول، دو پاساژ متوالی دیگر نیز بر روی سلول های SF9 انجام گرفت. بدین وسیله ذخیره ویروس نو ترکیب با تیترو مناسب به دست آمد و جهت ذخیره سازی در 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در پایان به منظور جمع آوری پروتئین، فلاسک های بزرگ تر (25 و 75 میلی متری) حاوی سلول های SF9 با تراکم $10^6 \times 2 - 2/5$ با ویروس های نو ترکیب با عیار عفونت زایی بالا در حدود 3 آلوده گردید.



شکل 2. ژل الکتروفورز 1 درصد محصول PCR بر روی چهار نمونه از بکمیدهای نوترکیب به دست آمده از کلنی های سفید با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی PUC/M13 و پرایمر جلودار اختصاصی ناحیه M1 که یکی از نواحی سه گانه در قطعه HNMI، می باشد. ردیف های 1، 2، 3 و 4 محصول PCR با استفاده از پرایمرهای معکوس M13 و جلودار M1 می باشد که قطعه مورد انتظار (1400 جفت باز) تشکیل شده است. ردیف های 5، 6، 7 و 8 محصول PCR است که با استفاده از جفت پرایمرهای M13 به ترتیب بر روی همان نمونه ها صورت گرفته و باند مورد انتظار (7300 جفت باز) را ایجاد نموده است. ردیف L، مارکر 1 کیلوبازی (محصول کمپانی فرمنتاز)

که هر دو با آنزیم های EcoRI / Sph1 هضم و آماده شده بود، صحت کلونینگ و تکوین pFastBac1 HNMI را تأیید نمود.

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

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



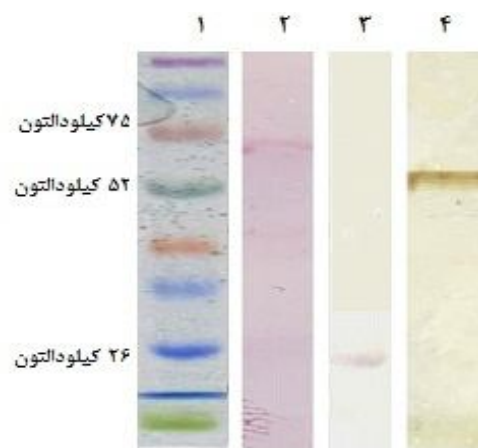
شکل 3. نمای میکروسکوپی لایه سلولی SF9؛ سمت چپ، سلول های کنترل غیر آلوده و سمت راست سلول های آلوده با باکیلو ویروس نوترکیب که دچار ضایعات آسیب شناختی سلولی تیپیک گردیده اند.

نوین در تولید واکسن آنفلوانزا، سود جستن از تکنولوژی زیستی و مهندسی ژنتیک جهت تولید ذرات شبه ویروسی است (3). برای بسیاری از ویروس‌ها ساختارهای ذرات شبه ویروسی نوترکیب، به عنوان یافتن واکسنی امید بخش مطرح گردیده است. این ذرات به دلیل ایمنی زایی فوق العاده زیاد، راه اندازی آنتی بادی‌های خنثی کننده به سبب این که فرم فضایی اپی توپها همانند ویروس وحشی می‌باشد و مزایایی که در تولید آن از نظر ضوابط ایمنی دارد، در این زمینه بسیار مورد توجه بوده‌اند (17-19).

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

با توجه به این مزایا برای تولید ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا که هدف نهایی این مطالعه است، سیستم مذکور انتخاب گردید ولی اولین گام طراحی کاست مربوطه و تولید بکمید نوترکیب آن است. پروتئین‌های پوششی ویروس آنفلوانزا (M، NA و HA) آنتی‌ژن‌های اصلی در معرض با سیستم ایمنی میزبان می‌باشند. این سه پروتئین به هنگام جوانه زدن ذرات ویروسی (یا شبه ویروسی) در غشاء پلاسمایی با یکدیگر میانکنش داده و سپس با کسب غشاء لیپیدی دو لایه از سلول میزبان رها می‌گردند. به همین سبب در اغلب مطالعات انجام گرفته بر روی طراحی و ارائه ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا این سه ژن اساسی، لحاظ گردیده‌اند (22-25). در کاست مرکبی که ما در این پروژه

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



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

بحث

در سال‌های اخیر یکی از استرین‌های نوظهور ویروس آنفلوانزای A، استرین خوکی H1N1 بوده است. این استرین ابتدا از مکزیک و سپس از ایالات متحده گزارش گردید و به سرعت در 74 کشور دیگر پخش شد به طوری که سه ماه بعد سازمان بهداشت جهانی، وضعیت انتشار بیماری را پاندمی فاز شش اعلام نمود (16). اصولاً مسئله وقوع پاندمی‌های آنفلوانزا و انتشار سریع آن در جمعیت‌های انسانی دغدغه همیشگی طراحان و تولید کنندگان واکسن آنفلوانزا بوده است. یکی از روش‌های

طراحی نمودیم و کارکرد مورد انتظار را از خود نشان داد، اگر چه هر سه ژن HA، NA و M در یک جهت قرار دارند لیکن هر یک تحت کنترل نسخه برداری مستقل با پروموتور پلی هیدرین خود می باشند. به این ترتیب رقابت احتمالی بین ژن ها در بهره برداری از پروموتور منتفی است. از سویی به سبب استفاده از سیگنال پلی A پس از قاب خواندنی هر پروتئین که خاتمه نسخه برداری از روی قاب را اجرایی می نماید، مسئله تداخل عمل پروموتورهای متوالی منتفی است.

نسخه برداری مطلوب از روی ژن های هدف، سبب بیان مکفی از هر سه پروتئین می شود. اگر چه به هنگام شکل گیری ذرات ویروسی از هر پروتئین به میزان لازم در واکنش گردآوری استفاده خواهد شد.

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

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

برای انجام تراریختی در سلول های یوکاریوتی روش های مختلفی از جمله استفاده از رسوب کلسیم فسفات، دکستران، الکتروپوریشن (electroporation)، لیپیدهای کاتیونی وجود دارد (15). مطالعات انجام گرفته نشان داده است که سلفکتین که خود نوعی لیپید کاتیونی

است، برای ترانسفکت کردن سلول های حشرات نسبت به سایر روش ها برتری داشته و آسان تر نیز می باشد. لذا در این مطالعه برای دخول بکمید نوترکیب به سلول های میزبان از آن استفاده نمودیم. در این تحقیق بروز ضایعات آشکار و تیپیک آسیب شناختی سلولی در میزبان SF9 نشان دهنده کارآیی بسیار مطلوب فرایند تراریختی و افزایش عیار ویروس های عفونت زا در این رده سلولی می باشد. بررسی پروتئین های استخراج شده از سلول های آلوده به باکیلوویروس نوترکیب حاوی کاست HNMI1، در مقایسه با سلول های کنترل بدون آلودگی، بیان کارا و مستقل هر یک از ژن های سه گانه را مورد تأیید قرار داد. رده های مختلف سلول های حشرات بدین منظور به کار می رود معهذاً رده های سلولی SF9 و Sf21 بیشتر توصیه می شود. هر چند که پس از تولید باکیلوویروس نوترکیب می توان از رده های دیگر مانند های فایو (Highfive) یا MimicSF9 نیز استفاده کرد (26). در ادامه این مطالعه باید در مقیاس بالا اقدام به تولید پروتئین های هدف نموده و پس از عملیات تخلیص با میکروسکوپ الکترونی در جستجوی ذرات 100-120 نانومتری تکوین یافته باشیم. هم چنین به جاست که کارآیی این ذرات در تحریک سیستم ایمنی حیوان سنجیده و با سایر مطالعات مقایسه شود.

نتیجه گیری

بیان کارا و مستقل هر یک از ژن های سه گانه پروتئین های استخراج شده از سلول های آلوده به باکیلوویروس نوترکیب حاوی کاست HNMI1، در مقایسه با سلول های کنترل بدون آلودگی که خود پیش شرط شکل گیری ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا می باشد، نشان می دهد که باکیلوویروس نوترکیب ساخته شده در این طرح مؤلفه های درست جهت قابلیت استفاده در تولید ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا ویژه استرین خوکی را دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای هادی لیشینی و کلیه همکاران محترم آزمایشگاه ویروس شناسی کاربردی پژوهشگاه

virus envelope glycoproteins into virus-like particles. *Journal of virology*. 2007; 81(20): 10869-78.

11. Latham T, Galarza JM. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *Journal of virology*. 2001; 75(13): 6154-65.

12. Quan FS, Steinhauer D, Huang C, Ross TM, Compans RW, Kang SM. A bivalent influenza VLP vaccine confers complete inhibition of virus replication in lungs. *Vaccine*. 2008; 26(26): 3352-61.

13. Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrillo V, et al. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine*. 2007;25(19):3871-8.

14. Ausubel FM. Short protocols in molecular biology. 3th ed. New York ; Chichester: Wiley; 1997

15. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning : a laboratory manual. 3th ed.N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

16. Real-Time R. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl j Med*. 2009;2009(360):2605-15.

17. Kitts PA, Possee R. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques*. 1993;14(5):810-7.

18. Anderson D, Harris R, Polayes D, Ciccarone V, Donahue R, Gerard G, et al. Rapid generation of recombinant baculovirus and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac baculovirus expression system. *Focus*. 1995; 17(2):53-8.

19. Matsuura Y, Possee RD, Overton HA, Bishop D. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *The Journal of general virology*. 1987;68:1233-50.

20. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Reviews in medical virology*. 2006; 16(3):139-49.

21. Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane

دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تشکر و قدر دانی می‌نمایم.

این مطالعه نتیجه طرح تحقیقاتی با کد تصویب 608-88

بوده و با حمایت و تامین مالی معاونت پژوهشی پژوهشگاه

دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله انجام گرفته است.

منابع

1. Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ. Textbook of influenza: Blackwell Science Ltd; 1998.

2. Fields BN, Knipe DM. Fields virology. 5 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2007.

3. Ellebedy A, Webby R. Influenza vaccines. *Vaccine*. 2009;27:D65-D8.

4. Kang SM, Song JM, Quan FS, Compans RW. Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus research*. 2009;143(2):140-6.

5. Bardiya N, Bae JH. Influenza vaccines: recent advances in production technologies. *Applied microbiology and biotechnology*. 2005; 67(3):299-305.

6. Buonaguro L, Tornesello M, Tagliamonte M, Gallo R, Wang L, Kamin-Lewis R, et al. Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses. *Journal of virology*. 2006; 80(18): 9134-43.

7. Sun Y, Carrion R, Ye L, Wen Z, Ro YT, Brasky K, et al. Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. *Virology*. 2009;383(1):12-21.

8. Bai B, Hu Q, Hu H, Zhou P, Shi Z, Meng J, et al. Virus-like particles of SARS-like coronavirus formed by membrane proteins from different origins demonstrate stimulating activity in human dendritic cells. *PloS one*. 2008; 3(7):e2685.

9. O'Neal CM, Clements JD, Estes MK, Conner ME. Rotavirus 2/6 viruslike particles administered intranasally with cholera toxin, Escherichia coli heat-labile toxin (LT), and LT-R192G induce protection from rotavirus challenge. *Journal of virology*. 1998; 72(4): 3390-3.

10. Wang BZ, Liu W, Kang SM, Alam M, Huang C, Ye L, et al. Incorporation of high levels of chimeric human immunodeficiency

- association of M1 protein. Journal of virology. 2000; 74(18):8709-19.
22. Mahmood K, Bright RA, Mytle N, Carter DM, Crevar CJ, Achenbach JE, et al. H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses. Vaccine. 2008; 26(42): 5393-9.
23. Galarza JM, Latham T, Cupo A. Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. Viral immunology. 2005;18(1):244-51.
24. Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. Vaccine. 2005;23(50):5751-9.
25. Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrilov V, Massare M, Pushko P, Mytle N, Rowe T, Smith G, Ross TM. Influenza virus like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. Vaccine 2007;25(19):3871-8.
26. Soleimanjahi H, Fotouhi F. Baculoviruses and insect cells as powerful tools gene expression. 1st ed. Publication of Tehran University Jihad; 1388.[Persian]