Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(95): 80-89

Cloning of fusion protein gene of Newcastle disease virus into a baculovirus derived bacmid shuttle vector, in order to express it in insect cell line

Hashemzadeh MS[1], Shafaati MR[*2], Dorostkar R[1]

1- Applied Virology Research Center, Baghiatallah Medical Sciences Institute, Baghiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damaghan, Iran.

Received: 30 Sep 2014, Accepted: 17 Dec 2014

Abstract

Background: Newcastle disease virus (NDV) is one of the major pathogens in poultry and vaccination is intended to control the disease, as an effective solution, yet. Fusion protein (F) on surface of NDV, has a fundamental role in virus pathogenicity and can induce protective immunity, alone. With this background, here our aim was to construct a baculovirus derived recombinant bacmid shuttle vector (encoding F-protein) in order to express it in insect cell line.

Materials and Methods: In this experimental study, at first complete F gene from avirulent strain La Sota of NDV was amplified by RT-PCR to produce F cDNA. The amplicon was cloned into T/A cloning vector and afterwards into pFastBac Dual donor plasmid. After the verification of cloning process by two methods, PCR and enzymatic digestion analysis, the accuracy of F gene sequence was confirmed by sequencing. Finally, F-containing recombinant bacmid was subsequently generated in DH10Bac cell and the construct production was confirmed by a special PCR panel, using F specific primers and M_{13} universal primers.

Results: Analysis of confirmatory tests showed that the recombinant bacmid, expressing of F-protein gene in correct sequence and framework, has been constructed successfully.

Conclusion: The product of this F-containing recombinant bacmid, in addition to its independent application in the induction of protective immunity, can be used with the other individual recombinant baculoviruses, expressing HN and NP genes to produce NDV-VLPs in insect cell line.

Keywords: Baculovirus, Fusion protein, Newcastle disease virus (NDV)

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
Email: Shafaati.mohammadreza@gmail.com

مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۸، شماره ۲ (شماره پیاپی۹۵)، اردیبهشت ۱۳۹۴، ۸۹-۸۰

همسانه سازی ژن فیوژن پروتئین ویروس بیماری نیوکاسل در شاتل وکتور بکمیدی مشتق از باکیولوویروس به منظور بیان در لاین سلولی حشره

محمد صادق هاشم زاده[۱]، محمد رضا شفاعتی[۲*]، روح الله درستکار[۳]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
۳- استادیار ویروس شناسی، پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۸تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: ویروس بیماری نیوکاسل (New Castle disease Virus) از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در طیور است و واکسیناسیون هم‌چنان به عنوان راهکاری مؤثر برای کنترل این بیماری مطرح است. فیوژن پروتئین (F) قرار گرفته روی سطح ویروس بیماری نیوکاسل، در بیماری‌زایی این ویروس نقش اساسی دارد و می‌تواند به تنهایی باعث القاء ایمنی محافظتی گردد. با این پیش زمینه، هدف ما، تولید یک سازه نوترکیب (کد کننده پروتئین F) از شاتل وکتور بکمیدی مشتق از باکیولوویروس به منظور بیان آن در لاین سلولی حشره بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا ژن کامل F از سویه غیر بیماری‌زای لاسوتا ویروس بیماری نیوکاسل، به منظور تولید رشته DNA مکمل (cDNA)، با تکنیک RT-PCR فراوان سازی گردید. محصول تکثیر، در وکتور کلونینگ T/A و سپس در پلاسمید دهنده pFastBac Dual همسانه سازی گردید. بعد از تأیید فرآیند کلونینگ با دو روش PCR و آنالیز هضم آنزیمی، صحت توالی با روش تعیین توالی تأیید شد. در نهایت بکمید نوترکیب واجد ژن F متعاقباً در سویه باکتریایی $DH_{10}Bac$ تولید و سازه فوق با یک پنل اختصاصی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن F و پرایمرهای عمومی M_{13} مورد تأیید قرار گرفت.

یافته‌ها: تحلیل تست‌های تأییدی نشان داد که سازه نوترکیب بکمیدی- بیان کننده ژن پروتئین F با توالی و چارچوب صحیح- با موفقیت ساخته شده است.

نتیجه‌گیری: محصول این سازه نوترکیب واجد ژن F علاوه بر کاربرد مستقل در القاء ایمنی محافظتی می‌تواند به همراه محصول دیگر باکیولوویروس‌های نوترکیب- بیان کننده ژن‌های HN و NP برای تولید ذره شبه ویروسی (virus-Like particle,VLP) ویروس فوق در لاین سلولی حشره- مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: باکیولوویروس، فیوژن پروتئین، ویروس بیماری نیوکاسل

***نویسنده مسئول:** تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، خیابان شیخ بهایی جنوبی، بیمارستان بقیه الله (عج)
Email: Shafaati.mohammadreza@gmail.com

مقدمه

ویروس بیماری نیوکاسل از نظر اقتصادی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در طیور است. واکسیناسیون به عنوان راهکاری مؤثر برای کنترل این بیماری در نظر گرفته می‌شود؛ با این حال این ویروس به عنوان یک تهدید فزاینده برای صنعت طیور محسوب می‌شود(۱). ویروس بیماری نیوکاسل از جنس روبولاویروس و از خانواده پارامیکسو ویریدا است. این ویروس دارای نوکلئوکپسید مارپیچ و ژنوم RNA تک رشته‌ای با قطبیت منفی است. اندازه ژنوم ویروس ۱۵ کیلو باز و دارای ۶ پروتئین ساختمانی و غیر ساختمانی است (NP ,P ,M ,F ,L ,HN) (۲، ۳). محصول ژنی F و HN از جنس گلیکوپروتئین و از فاکتورهای مهم عفونت‌زایی و بیماری‌زایی ویروس می‌باشد(۴، ۵). پروتئین F در پوشش ویروس به صورت پیش ساز F_0 ساخته می‌شود و سپس از طریق آنزیم فورین در دستگاه گلژی در محل شکاف شکسته می‌شود و دو پلی‌پپتید F_1 و F_2 که به وسیله باند دی‌سولفیدی بهم متصل هستند را ایجاد می‌کند. این شکستگی برای فعالیت و عفونت‌زایی لازم است(۶). ژن F (کد کننده پروتئین فیوژن ویروس بیماری نیوکاسل) ۱۶۶۲ جفت باز دارد و یک پروتئین ۵۵۳ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند(۵). ویروس بیماری نیوکاسل سویه‌های زیادی دارد که از نظر شدت و حدت بیماری‌زایی باهم متفاوت هستند. بر اساس شدت بیماری ایجاد شده در طیور، سویه‌های جدا شده از این ویروس در سه گروه ولوژنیک، مزوژنیک و لنتوژنیک قرار داده شده‌اند. تفاوت این سه گروه در تعداد اسید آمینه‌های بازی در محل شکاف است(۷). پاتوتایپ‌های ولوژنیک می‌توانند ۱۰۰ درصد کشنده باشند(۷). با توجه به این که پروتئین فیوژن ویروس بیماری نیوکاسل می‌تواند به طور مؤثر موجب تحریک سیستم ایمنی شود(۸)، بیان آن به تنهایی برای القاء پاسخ ایمنی کافی است و واکسن حاصله از آن را می‌توان برای ایمن سازی به کاربرد(۸). هم‌چنین می‌توان با روش‌های مهندسی ژنتیک تغییراتی در ساختار پروتئین فیوژن ایجاد کرد که منجر به بهینه سازی پاسخ ایمنی گردد(۸).

برای دستیابی به مقدار انبوه این گلیکوپروتئین با ساختار فضایی صحیح جهت تولید واکسن‌های، زیر واحد، به سیستمی کارآمد نیاز است تا علاوه بر مشابهت با سلول‌های یوکاریوتیک در تولید و پردازش پروتئین‌ها، قابلیت تولید حجم بالای پروتئین را در مدت زمان اندک داشته باشد. در این مطالعه، برای دستیابی به این هدف از سیستم بیانی باکیولوویروس استفاده شد(۹).

اساس روش تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم بیانی باکیولوویروس، جاسازی و قراردهی ژن هدف تحت کنترل پروموتر p_{10} است. در مراحل پایانی تکثیر ویروس، این پروتئین به میزان زیاد در میزبان طبیعی خودش بیان می‌شود و با ایجاد یک پوشش پروتئینی ویروس را در برابر شرایط نامساعد محیطی محافظت می‌نماید. وجود این پروتئین برای تکثیر و همانند سازی ویروس در شرایط کشت سلول ضرورتی ندارد(۱۰، ۱۱).

در پژوهش حاضر، طول کامل ژن F با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جداسازی شد و به منظور تولید پروتئین F نوترکیب در سلول حشره (SF_9، SF_{21} و یا High Five)، در شاتل وکتور بکمیدی مشتق شده از باکیولوویروس جای گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که به روش تجربی (آزمایشگاهی) انجام شد، سویه غیر بیماریزای لاسوتا ویروس بیماری نیوکاسل از انستیتو رازی ایران تهیه گردید.

استخراج RNA ویروس و تهیه c-DNA

ژنوم ویروس با استفاده از کیت استخراج RNA با خلوص بالا (شرکت روش آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و رشته DNA مکمل با استفاده از کیت سنتز DNA مکمل حاوی آنزیم ریورس ترنس کریپتاز و به کمک تکنیک Thermo Script RT-PCR (شرکت فن آوری‌های زندگی آمریکا) مطابق با دستور العمل شرکت سازنده و تحت شرایط دمایی مناسب ساخته شد. برای این منظور از آغازگرهای اختصاصی (با غلظت ۱۰

میکرو مولار)، dNTP (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) و بافرهای مخصوص واکنش آنزیمی و یک محافظت کننده RNA (مهارکننده RNase) استفاده شد. لازم به ذکر است که در کلیه مراحل فوق از میکروتیوپ‌ها و سرسمپلرهای عاری از RNAase و DNase (شرکت اکستراژن آمریکا) استفاده شد.

تکثیر ژن F در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

برای تکثیر اختصاصی قطعه c-DNA تهیه شده حاوی ژنوم کامل فیوژن پروتئین، از آغازگرهای اختصاصی ژن هدف و آنزیم DNA پلیمراز Taq پلاتینوم (شرکت فن آوری‌های زندگی آمریکا) که دارای خاصیت اصلاح خطاست، استفاده شد و محصول تولید شده از طریق الکتروفورز با ژل آگاروز ۱ درصد بررسی گردید. ترادف آغازگرهای اختصاصی که برای جداسازی کامل طول ژنوم F طراحی شد، در جدول ۱ آمده است. محل اثر آنزیم‌های محدود الاثر *NcoI* و *KpnI* به ترتیب در آغازگرهای رفت و برگشت در نظر گرفته شده است.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن F ویروس بیماری نیوکاسل

نام آغازگر	توالی
NC-R	5□ GGT ACC TCA TGT TCTTGTAGTG 3□
NC-F	5□ CCA TGG ATG GGC TCC AAA CCT 3□

همسانه سازی ژن F در ناقل کلونینگ و تعیین ترادف

در مرحله بعدی قطعه تکثیر یافته در ناقل T/A (رویال بانک کانادا، آمریکا) همسانه سازی شد. بدین منظور ابتدا قطعه کامل F با استفاده از کیت استخراج از ژل با دمای ذوب پایین (شرکت ویوانتیس، کره) استخراج گشت و مطابق توصیه شرکت سازنده، با وکتور خطی شد؛ آنزیم T_4DNA Ligase و بافر مخصوص واکنش الحاق، مخلوط شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

پس از مستعد کردن سویه باکتریایی *E. coli* α_5 DH با استفاده از $CaCl_2$ سرد، محصول واکنش الحاق با روش شوک سرمایی - گرمایی به باکتری میزبان منتقل گردید و باکتری ترانسفورم شده (تراریخت) حاصل شد. پس از کشت ۱ ساعته در محیط LB فاقد آنتی بیوتیک و بیان ژن مقاومت در برابر آمپی سیلین (شرکت پارس دارو)، باکتری ترانسفورم شده روی محیط کشت LB آگار (شرکت لیوفیلکم ایتالیا) حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG) القا کننده و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ۵- برومو ۴- کلرو ۳- ایندولیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید (X-Gal، شکرت ترموساینتیفیک، اتحادیه اروپا)، کشت داده شد. به علت ورود ژن هدف به ناحیه کد کننده اپران *lacZ* در وکتور فوق و عدم تجزیه X-Gal در نتیجه تخریب این اپران، پس از گذشت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه، کشت جداگانه ای با روش غربال گری آبی- سفید از کلنی های سفید تک موجود در پلیت به عمل آمد و پلاسمید آنها استخراج شد، سپس حضور قطعه وارد شده در پلاسمیدهای نوترکیب با دو روش PCR و آنالیز هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. این وکتور نوترکیب هم‌چنین توسط یک شرکت ایرانی (آریا تک ژن آزما) به شرکت ام دابلیوجی آلمان ارسال گردید و توالی آن تعیین شد. سپس توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار کروماس نسخه پرو ۱/۵ (استرالیا) بررسی و در بانک جهانی ژن بلاست گردید (نتایج مربوط به تعیین توالی و آنالیز بلاست آورده نشده است).

زیر همسانه سازی ژن هدف در وکتور دهنده pFastBac Dual

قدم بعدی جاسازی ژن هدف در پلاسمید pFastBac Dual در جلوی پروموتور p_{10} بود. برای این منظور وکتور T/A کلونینگ نوترکیب حاوی ژن F و پلاسمید دهنده pFastBac Dual به کمک آنزیم‌های محدود الاثر *NcoI* و *KpnI* هضم شدند تا ضمن خروج ژن هدف از وکتور کلونینگ نوترکیب، دو انتهای ژن هدف و پلاسمید دهنده خطی شده مکمل هم شوند.

ژن هدف به کمک ژل آگاروز تحت دمای ذوب پایین استخراج شد و واکنش الحاق با پلاسمید دهنده خطی

شده طبق روش قبلی صورت گرفت و نمونه‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محصول واکنش الحاق به باکتری *E. coli* DH $_{5}\alpha$ انتقال یافت و در محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کشت داده شد. تولید وکتورهای pFastBac Dual نوترکیب حاوی ژن هدف با PCR و هضم آنزیمی تأیید شد.

تولید سازه نوترکیب از شاتل وکتور بکمیدی مشتق از باکیولوویروس

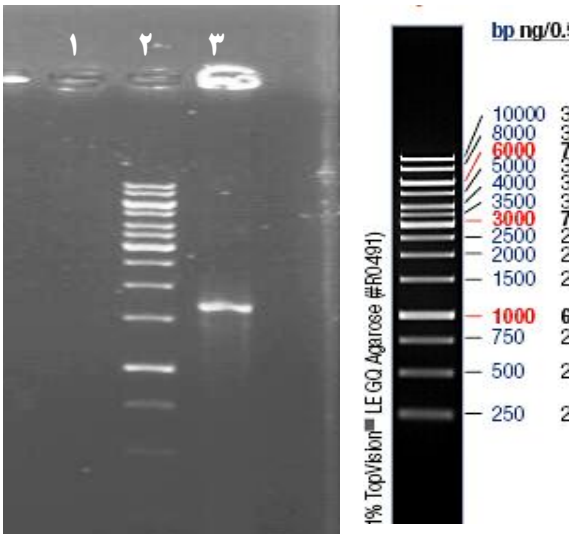
مرحله اصلی و نهایی برای راه‌اندازی سیستم بیانی باکیولوویروس، انتقال ژن هدف از پلاسمید دهنده pFastBac Dual نوترکیب حاوی کاست بیانی به شاتل وکتور بکمید (مشتق از باکیولوویروس) است (که این وکتور در باکتری *E. coli* DH ۱۰Bac قرار دارد) و تحت عنوان سیستم Bac-to-Bac شناخته می‌شود؛ این کار با مکانیسم ویژه‌ای به انجام رسید. باکتری *E. coli* ۱۰Bac DH هم‌چنین حاوی یک پلاسمید کمکی (دارای مارکر آنتی بیوتیکی تتراسایکلین) برای انجام واکنش انتقال بین وکتور دهنده (با مارکر آنتی بیوتیکی جنتامایسین) و بکمید (با مارکر آنتی بیوتیکی کانامایسین) است. این میزبان بر طبق روشی که قبلاً گفته شد، مستعد دریافت پلاسمید کشت و سپس ۱۰۰ نانوگرم پلاسمید pFastBac Dual نوترکیب، طی فرآیند ترانسفرماسیون به باکتری منتقل شد. برای انجام فرآیند جابجایی ژن بین دو وکتور دهنده و بکمید و نیز شروع بیان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سلول‌های ترانسفرم شده به مدت ۶ ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه، گرماگذاری شدند و سپس بر روی پلیت LB آگار واجد آنتی بیوتیک‌های کاناماسین، تتراسایکلین و جنتاماسین به ترتیب با غلظت‌های ۵۰، ۱۰ و ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر به همراه IPTG (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و X-Gal (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. لازم به ذکر است که ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، تتراساکلین و جنتامایسین به ترتیب در بکمید، پلاسمید کمکی و پلاسمید دهنده pFastBac Dual وجود دارند.

در ادامه کلنی‌های سفید احتمالاً حاوی بکمید نوترکیب بوده که در پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک‌های فوق ایزوله شدند و سپس به منظور استخراج بکمید در محیط مایع واجد آنتی‌بیوتیک‌های فوق، کشت داده شدند. با در نظر گرفتن وزن مولکولی بکمید که بیش از ۱۳۵ کیلو باز می‌باشد، استخراج این پلاسمید بسیار بزرگ با روش دستی و طبق دستورالعمل توصیه شده شرکت سازنده (شرکت فن آوری‌های زندگی آمریکا) به انجام رسید. برای تأیید انتقال و جهت‌گیری صحیح ژن در بکمید، از یک پنل ویژه PCR با آغازگرهای عمومی M_{13} (که ناحیه مکمل آنها در دو سوی محل ترانسپوزون در ناحیه *lacZ* بکمید تعبیه شده)، به همراه آغازگرهای اختصاصی خود ژن استفاده شد. در نهایت محصولات به دست آمده با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد تحلیل قرار گرفتند.

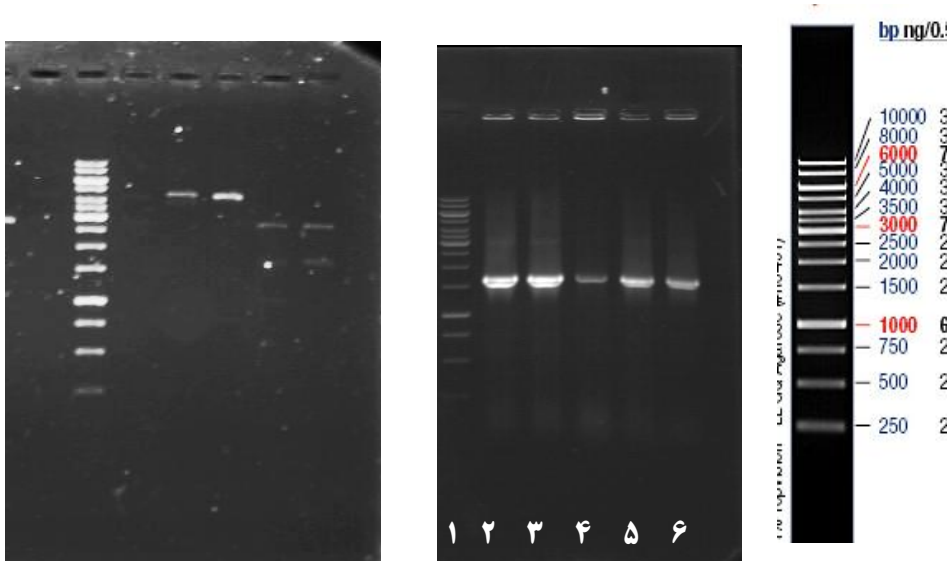
یافته ها

پس از استخراج RNA، سنتز c-DNA و تکثیر آن به وسیله از آغازگرهای اختصاصی ژن کد کننده F از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. نتیجه حاصل از تکثیر c-DNA سنتز شده به روش PCR و باند ۱۶۶۲ جفت بازی مشاهده شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد، در تصویر ۱ آمده است.

در مرحله بعد، قطعه تکثیر شده- پس از تخلیص از روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین- در وکتور کلونینگ T/A همسانه سازی گردید و صحت فرآیند انجام گرفته با دو روش PCR و هضم آنزیمی تأیید شد (تصاویر ۲). نتایج حاصل از PCR ژن مورد نظر با پرایمرهای اختصاصی و باند ۱۶۶۲ جفت بازی مشاهده شده در تصویر ۲ الف آمده است و نیز نتایج هضم آنزیمی وکتور نوترکیب و وجود دو باند ۲۷۰۰ و ۱۶۶۲ جفت بازی حاصل از واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم *NcoI* و *KpnI* در تصویر ۲ ب قابل مشاهده است. نتایج فوق، صحت تولید سازه نوترکیب را در وکتور کلونینگ T/A نشان می‌دهند.



تصویر ۱. نتیجه حاصل از تکثیر ژن کدکننده فیوژن پروتئین ویروس بیماری نیوکاسل به روش RT-PCR و مشاهده باند ۱۶۶۲ جفت بازی مربوط به محصول تکثیر c-DNA به کمک آغازگرهای اختصاصی. ستون ۱: کنترل منفی واکنش زنجیره ای پلیمراز. ستون ۲: اندازه نمای یک کیلو بازیDNA (فرمنتاز). ستون ۳: محصول ۱۶۶۲ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن F

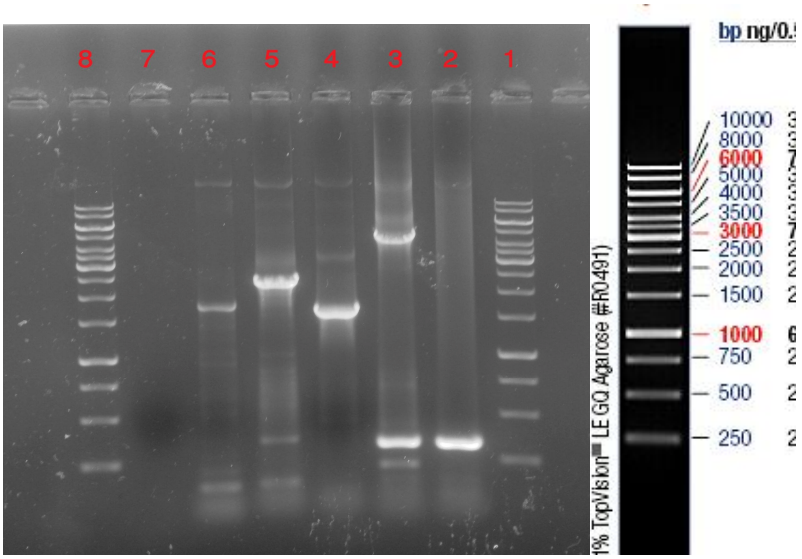


تصاویر ۲. الف: نتایج حاصل از PCR ژن مورد نظر با پرایمرهای اختصاصی بر روی ۵ کلنی سفید انتخاب شده حاوی وکتور کلونینگ T/A نوترکیب احتمالی. ستون ۱: اندازه نمای یک کیلو بازی DNA (فرمنتاز). ستون‌های ۶-۲: نشان دهنده وجود قطعه ۱۶۶۲ جفت بازی حاصل از PCR ژن F با آغازگرهای اختصاصی می‌باشند. ب: نتایج حاصل از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *KpnI* و *NcoI*. ستون ۱: اندازه نمای یک کیلو بازیDNA (فرمنتاز). ستون‌های ۴-۲: تک برش وکتور نوترکیب با هر کدام از آنزیم‌های فوق. ستون‌های ۵ و ۶ جفت برش وکتور نوترکیب با هر دو آنزیم فوق.

پس از تعیین ترادف وکتور نوترکیب، نتایج حاصل از آنالیز بلاست توالی مورد نظر نشان داد که این توالی متعلق به ژن فیوژن پروتئین ویروس بیماری نیوکاسل است و ۹۸ درصد با توالی فوق شباهت دارد. بنابراین با توجه به عدم وجود شباهت ۱۰۰ درصد، این توالی به عنوان جدایه IRI۱۳۹۲K نام گذاری شد و در بانک جهانی ژن با شماره دسترسی KJ۱۷۶۹۹۶ به عنوان توالی بومی ایران ثبت گردید.

در ادامه زیرهمسانه سازی قطعه F در وکتور دهنده pFastBac Dual مطابق آنچه در بخش روش‌ها گفته شد، انجام پذیرفت و سازه نوترکیب حاصل، مشابه مرحله قبل با دو روش PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت و نتایج مشابهی به دست آمد (در اینجا از تکرار نتایج مشابه صرف نظر کردیم).

نهایتاً پلاسمید نوترکیب pFastBac Dual حاوی ژن F به درون میزبان مستعد *E. coli* DH ۱۰Bac حاوی بکمید منتقل شد و پس از تولید سازه نوترکیب از شاتل وکتور بکمیدی مشتق شده از باکیولوویروس حاوی ژن F (با مکانیسم جابجایی) و استخراج بکمید، برای تأیید انتقال و جهت‌گیری صحیح ژن در بکمید، از یک پنل ویژه PCR با آغازگرهای عمومی M_{13} به همراه آغازگرهای اختصاصی خود ژن استفاده گردید. درنهایت محصولات به دست آمده، با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد تحلیل قرار گرفتند (تصویر ۳).



تصویر ۳. نتایج به دست آمده از پنل انجام شده PCR برای تأیید بکمید نوترکیب حاوی ژن F. ستون‌های ۱ و ۸: اندازه نمای یک کیلو بازی DNA (فرمنتاز). ستون ۲: محصول PCR حاصل از پرایمرهای عمومی M_{13} بر روی بکمید غیرنوترکیب تخلیص شده از یک کلنی آبی به عنوان کنترل منفی (حدود ۳۰۰ جفت باز). ستون ۳: محصول PCR حاصل از پرایمرهای عمومی M_{13} بر روی بکمید نوترکیب تخلیص شده از یک کلنی سفید (حدود ۴۲۰۰ جفت باز). ستون ۴: محصول PCR حاصل از پرایمر پیشرو اختصاصی ژن F و ریورس عمومی M_{13} بر روی بکمید نوترکیب تخلیص شده از همان کلنی سفید (حدود ۱۵۰۰ جفت باز که نشان‌دهنده جهت گیری صحیح ژن در بکمید است). ستون ۵: محصول PCR حاصل از پرایمر پیشرو عمومی M_{13} و ریورس اختصاصی ژن F بر روی بکمید نوترکیب تخلیص شده از همان کلنی سفید (حدود ۲۵۰۰ جفت باز که تأیید دیگری بر جهت گیری صحیح ژن در بکمید است). ستون ۶: محصول PCR حاصل از پرایمرهای اختصاصی ژن F بر روی بکمید نوترکیب تخلیص شده از همان کلنی سفید (۱۶۶۲ جفت باز).

لازم به ذکر است که با توجه به اندازه بسیار بزرگ بکمید، امکان انجام واکنش هضم آنزیمی بر روی آن وجود نداشت و صرفا انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی هم نمی‌توانست موجب تأیید فرآیند جابجایی ژن هدف به داخل بکمید گردد، چرا که به دلیل حضور وکتور نوترکیب pFastBac Dual حتی در صورت عدم انجام این واکنش نوترکیبی، باز هم نتیجه فراوان سازی ژن مورد نظر مثبت بوده و ما ناگزیر به انجام این پنل ویژه استاندارد شدیم.

بحث

تا به امروز یکی از مؤثرترین راه‌های مقابله با بیماری‌های ویروسی، واکسیناسیون بوده است. بیشتر واکسن‌های نوترکیب براساس گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس بر علیه بیماری‌های ویروسی تولید شده‌اند(۱۲، ۱۳). فیوژن پروتئین یکی از گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس بیماری‌زا نیوکاسل می‌باشد که توانایی تحریک سیستم ایمنی را دارد. با توجه به اهمیتی که این پروتئین در بیماری‌زایی

ویروس دارد، کاندید مناسبی برای تحریک سیستم ایمنی است(۸). تولید این گلیکوپروتئین در سلول حشره علاوه بر بازدهی خوب و کارایی بالا، تغییرات پس از ترجمه از جمله اضافه کردن شاخه‌های قندی به پروتئین در حال ساخت را با بیشترین شباهت به سلول پستانداران امکان پذیر می‌سازد.

این مطالعه با توجه به عدم وجود روش بومی تولید واکسن در کشور، می‌تواند به عنوان زمینه‌ای برای بررسی فن‌آوری بهینه تولید واکسن در نظر گرفته شود. بنابراین طول کامل ژن پروتئین F در داخل بکمید جاسازی شد تا در ادامه این تحقیق پروتئین نوترکیب مربوطه در سلول حشره تولید شود و ایمنی‌زایی و کارایی آن بررسی گردد. اولین قدم در تولید این پروتئین نوترکیب، استخراج ژنوم کامل ویروس و جداسازی قطعه ژن هدف از طریق آغازگرهای اختصاصی است. با در نظر گرفتن این نکته که ژنوم ویرس نیوکاسل از نوع RNA است، پس از استخراج آن می‌بایست cDNA مکمل آن ساخته شده و سپس ژن کامل F به وسیله آغازگرهای اختصاصی تکثیر شود. شایان ذکر است که این مرحله یکی از مراحل کلیدی کار به شمار می‌رود، زیرا اولین مرحله جداسازی ژن هدف بوده و انتخاب صحیح آنزیم مورد استفاده، زمان بندی، برنامه دمایی مناسب و طراحی آغازگر اختصاصی بسیار حائز اهمیت است. با توجه به اهمیت بالای این مرحله، در این پژوهش از آنزیم DNA پلیمراز با دقت بالا برای واکنش فراوان سازی استفاده شد. دلیل انتخاب این آنزیم، توانایی پردازش بالا، کاهش زمان واکنش و دارا بودن بازدهی بالا در مقایسه با سایر پلیمرازها به دلیل بیشترین میزان محصول تولیدی و حداقل آنزیم مورد استفاده است؛ این آنزیم یکی از دقیق‌ترین پلیمرازهای مقاوم به حرارت می‌باشد. هم‌چنین این آنزیم باعث ایجاد اورهنگ A در انتهای فرآورده تکثیری می‌شود، بنابراین برای جاسازی در ناقل T/A مناسب است. بدین ترتیب پس از اطمینان از صحت جداسازی و تکثیر ژن هدف با استفاده از سیستم Bac to Bac، پس از سه مرحله کلونینگ، قطعه کامل ژن F در شاتل وکتور بکمیدی جاسازی گردید تا در ادامه پروتئین ذکر شده در سلول حشره تولید گردد. بکمید پلاسمیدی بزرگ است و از ژنوم باکیولوویروس مشتق شده است و پس از ورود به سلول حشره می‌تواند ویروس‌هایی را تولید کند که ژن هدف را تحت کنترل پروموتر p_{10} بیان می‌نمایند. اولین گزارشات در مورد استفاده از سیستم باکیولوویروس به منظور تولید پروتئین به سال ۱۹۸۷ بر می‌گردد که در این سال ژن نورآمینیداز ویروس آنفولانزا در این سیستم بیان گردید و خاصیت ایمنی‌زایی آن روی موش نشان داده شد(۱۴). علت استفاده از سیستم بیانی باکیولوویروس، بهینه بودن آن نسبت به سایر روش‌هاست. تا قبل از سال ۱۹۹۳، از سیستم‌های بیانی برای تولید پروتئین‌های ویروسی در سلول حشرات استفاده می‌شد که نیازمند خالص سازی و تکثیر ویروس نوترکیب بودند و برای رسیدن به تیتر بالای ویروس- بدون در نظر گرفتن پیچیدگی‌ها و مشکلات فراوان- نیاز به یک دوره زمانی ۳ تا ۶ ماهه بود. اما پس از معرفی روش جدید انتقال (ترانسپوزیشن) از طریق جایگاه اختصاصی در باکتری اشرشیاکلی توسط لوکو(۱۵)، تولید مؤثر باکیولوویروس نوترکیب تحقق یافت و پروتئین‌های متعددی با استفاده از این روش در سلول حشرات تولید شد(۱۶، ۱۷). تولید پروتئین نوترکیب در سلول حشرات دارای چند ویژگی مهم است که آن را از سایر میزبان‌های یوکاریوتی متمایز می‌سازد. در این سیستم، باکیولوویروس نوترکیب در سلول حشره تکثیر می‌یابد و پپتیدهای تولید شده، بعد از پردازش و اعمال تغییرات پس از ترجمه‌ای مشابه با دیگر سلول‌های یوکاریوتی، در محل‌های هدف سلول جای‌گیری می‌کنند. در نتیجه، پروتئین‌های نوترکیب دارای ساختار و عملکردی مشابه با پروتئین‌های طبیعی هستند، به خصوص پروتئین‌هایی مانند F که شکل فضایی آنها از لحاظ عملکرد دارای اهمیت است. مطالعات نشان داده است که در مقایسه با سایر سیستم‌های یوکاریوتی، کارایی تولید پروتین در این سیستم بیشتر است، به طوری که بعضی از محققان نیمی از پروتئین‌های تولید شده در سلول حشره را به پروتئین نوترکیب مرتبط می‌دانند. هم‌چنین این ویروس‌ها گستره میزبانی محدودی دارند که مختص به گونه خاصی از بند

پایان است و برای پستانداران و گیاهان غیر بیماری‌زا هستند(۱۸). در مطالعه حاضر این مسئله مورد توجه قرار گرفته است که می‌توان از سیستم بیانی باکیولوویروس برای تهیه واکسن مناسب علیه ویروس بیماری نیوکاسل استفاده نمود و محصول این پژوهش می‌تواند بدین منظور مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری

در این مطالعه ژن فیوژن پروتئین ویروس بیماری نیوکاسل تحت عنوان IRI۱۳۹۲K و با شماره دسترسی KJ۱۷۶۹۹۶ برای اولین بار به عنوان جدایه بومی ایران در بانک جهانی ژن ثبت گردید. هم‌چنین یک سازه نوترکیب از شاتل وکتور بکمیدی مشتق از باکیولوویروس- کد کننده فیوژن (F) پروتئین فوق- به منظور بیان در لاین سلولی حشره، با موفقیت ساخته شد. محصول بیانی این سازه نوترکیب باکیولوویروسی، علاوه بر کاربرد در زمینه تحقیقات واکسن، می‌تواند به تنهایی و یا به همراه دیگر سازه‌های نوترکیب باکیولوویروسی کد کننده ژن‌های HN و NP، برای تولید ذرات شبه ویروسی (VLPs) ویروس بیماری نیوکاسل مورد استفاده قرار بگیرد(۲۲-۱۹).

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از ریاست محترم مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی و همکاران گرامی در بخش بیولوژی مولکولی پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تهران و هم‌چنین سرکار خانم دکتر بهزادیان به خاطر مساعدت‌هایشان تشکر و قدردانی نماییم.

منابع

1. Alexander D. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties. 2000;19(2):443-55.
2. Chambers P, Millar NS, Bingham RW, Emmerson PT. Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin-neuraminidase and the large protein. Journal of general virology. 1986; 67(3):475-86.
3. Wilde A, McQuain C, Morrison T. Identification of the sequence content of four polycistronic transcripts synthesized in Newcastle disease virus infected cells. Virus research. 1986; 5(1):77-95.
4. Loke C, Omar AR, Raha A, Yusoff K. Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. Veterinary immunology and immunopathology. 2005; 106(3):259-67.
5. Meulemans G, Gonze M, Carlier M, Petit P, Burny A, Long L. Protective effects of HN and F glycoprotein-specific monoclonal antibodies on experimental newcastle disease. Avian Pathology. 1986;15(4):761-8.
6. Edbauer C, Weinberg R, Taylor J, Rey-Senelonge A, Bouquet J-F, Desmettre P, et al. Protection of chickens with a recombinant fowlpox virus expressing the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene. Virology. 1990; 179(2):901-4.
7. Peeters BP, de Leeuw OS, Koch G, Gielkens AL. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. Journal of Virology. 1999; 73(6): 5001-9.
8. Farjollah S, Bassami M, Marashi S, Mousavi S. Cloning Of Fusion (F) Gene Of Newcastle Disease Virus In E. coli. Pajouhesh And Sazandegi. 2007;75: 96-110.
9. Mather KA, White JF, Hudson PJ, McKimm-Breschkin JL. Expression of influenza neuraminidase in baculovirus-infected cells. Virus research. 1992; 26(2):127-39.
10. Deroo T, Jou WM, Fiers W. Recombinant neuraminidase vaccine protects against lethal influenza. Vaccine. 1996; 14(6):561-9.
11. 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):2073-80.

12. Prabakaran M, Madhan S, Prabhu N, Qiang J, Kwang J. Gastrointestinal delivery of baculovirus displaying influenza virus hemagglutinin protects mice against heterologous H5N1 infection. Journal of virology. 2010;84(7):3201-9.
13. Ellebedy A, Webby R. Influenza vaccines. Vaccine. 2009;27: D65-D8.
14. Najafi S, Behzadian F, Fotuhi F, Fallah Mehrabadi J. Construction of a recombinant bacmid DNA in order to express Neuraminidase gene of influenza virus H1N1. Arak Medical University Journal. 2012;15(5):58-65.[Persian]
15. Luckow VA, Lee S, Barry G, Olins P. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli. Journal of Virology. 1993;67(8):4566-79.
16. Rajendra W, Hackett KJ, Buckley E, Hammock BD. Functional expression of lepidopteran-selective neurotoxin in baculovirus: potential for effective pest management. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2006;1760(2):158-63.
17. Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. Nature biotechnology. 2004; 22(12):1583-7.
18. 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.
19. Li B, Wu H-Y, Qian X-P, Li Y, Chen W-F. Expression, purification and serological analysis of hepatocellular carcinoma associated antigen HCA587 in insect cells. WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY. 2003; 9(4):678-82.
20. Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. Journal of virology. 2007; 81(13):7111-23.
21. Wang B-Z, Quan F-S, Kang S-M, Bozja J, Skountzou I, Compans RW. Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses. Journal of virology. 2008; 82(23): 11813-23.
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.