

Immunological Assessment of Three Tandem Repeat of Influenza Virus M2 Extracellular Domain with Adjuvant in Balb/c Mice Model

Hadiseh Shokouhi¹, Mohammad Reza Zolfaghari², Behrokh Farahmand³, Mansooreh Tabatabaieian⁴, Najmeh Taheri⁵, Fatemeh Fotouhi^{6*}

1- MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

3- Assistant Professor, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

4- Laboratory Expert, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

5- MSc in Cellular and Molecular Biology, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

6- Associate Professor, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 12 Jul 2015, Accepted: 4 Nov 2015

Abstract

Background: Influenza A viruses are globally important respiratory pathogens which cause a high degree of morbidity and mortality during annual epidemics. M2 protein which expressed on the viral surface facilitates virus entry to the host cells. The extracellular domain of M2 protein (M2e) consists of N-terminal 24 residue which shows remarkable conservation among all subtypes of influenza A viruses. In this study, we evaluated the immunogenicity of three tandem repeats of M2e along with different adjuvants in BALB/C mice model.

Materials and Methods: Recombinant protein (3M2e) was expressed in *Escherichia coli* and purified. Six weeks old BALB/c mice were immunized interdermally with three doses of 3M2e alone or supplemented with Alum/CpG motif as adjuvant. Control group was injected with PBS. Two weeks after the last immunization, specific anti-M2 was measured using ELISA method and finally mice were challenged with one lethal dose (LD90) of PR8 virus.

Results: The results showed that 3M2e can induce specific antibody alone. However, 3M2e protein supplemented with Alum-CpG induced higher level of specific antibodies, so that, there was a significant difference with 3M2e group ($p < 0.05$). Anti-M2 antibodies mostly consisted of IgG2a subclass which considered as activity index of TH1 Cells. Moreover, this group showed enhanced protection against wild-type virus (survival rate=60%).

Conclusion: Applying Alum-CpG as a complex adjuvant may play a crucial role in integrating innate and acquisitive immunity. We increased density of M2e in combination with complex adjuvant and showed that this vaccine induced power immune responses and semi-protected mice against lethal challenge.

Keywords: Influenza Virus, 3M2e protein, Alum adjuvant, CPG adjuvant

*Corresponding Author:

Address: Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, 12 Farvardin street, Tehran, Iran.

Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

ارزیابی ایمنی زایی توالی تکرار سه تایی ناحیه خارج سلولی پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا همراه با ادجوانت در مدل موش بالب سی

حدیثه شکوهی^۱، محمدرضا ذوالفقاری^۲، بهرخ فرهمند^۳، منصوره طباطبائی^۴، نجمه طاهری^۵، فاطمه فتوحی^{۶*}

- ۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
- ۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
- ۳- استادیار، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
- ۴- کارشناس آزمایشگاه، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
- ۵- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
- ۶- دانشیار، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: ویروس‌های آنفلوانزا یکی از مهم‌ترین عوامل بروز عفونت‌های تنفسی می‌باشند که باعث بیماری و مرگ و میر بسیار در طی اپیدمی‌های سالیانه می‌گردند. پروتئین M2 در سطح ذره ویروس آنفلوانزا، ورود ویروس به سلول‌های میزبان را تسهیل می‌کند. بخش خارج سلولی این پروتئین که واجد ۲۴ اسید آمینه است، در اکثر نژادهای آنفلوانزای نوع A انسانی حفاظت شده می‌باشد. در این مطالعه، ایمنی‌زایی توالی سه تایی M2e به همراه ادجوانت‌های مختلف در مدل موشی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها: پروتئین نوترکیب (3M2e) پس از بیان در اشرشیاکلی تخلیص شد. موش‌های بالب سی شش هفته‌ای با پروتئین تخلیص شده به تنهایی و یا همراه با ادجوانت Alum-CpG در سه دوزیه صورت زیرجلدی واکسینه شدند. موش‌های شاهد، بافر فسفات دریافت کردند. دو هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی، آنتی‌بادی اختصاصی M2 در سرم موش‌ها به وسیله تست الایزا بررسی گردید و در نهایت حیوانات با یک دوز کشنده LD90 ویروس PR8 چالش شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تزریق 3M2e به تنهایی می‌تواند باعث تولید آنتی‌بادی اختصاصی شود. ولی همراهی آلوم و CPG میزان بیشتری آنتی‌بادی اختصاصی را در موش‌ها القا کرد، به طوری که اختلاف معنی‌داری با گروه 3M2e داشت ($p < 0.05$). آنتی‌بادی‌های فوق بیشتر شامل زیرنوع IgG2a بودند که معمولاً به عنوان شاخصی از فعالیت سلول‌های Th1 در نظر گرفته می‌شود. همچنین این گروه از موش‌ها در چالش با ویروس وحشی بهتر محافظت شده بودند (میزان بقای ۶۰ درصد).

نتیجه‌گیری: به کارگیری کمپلکس ادجوانت Alum-CpG نقش مهمی در برانگیختن ایمنی ذاتی واکتسابی دارد. در این پژوهش نشان دادیم که با افزایش دانسیته M2e و استفاده از کمپلکس ادجوانت می‌توان پاسخ‌های ایمنی کارآمدی را القا کرد و موش‌ها را در مقابل چالش کشنده با ویروس تا حدی محافظت نمود.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا، پروتئین 3M2e، ادجوانت آلوم، ادجوانت CpG

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان دوازده فروردین، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا

Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

مقدمه

بیماری‌های تنفسی شامل بیش از نیمی از بیماری‌های حاد هستند که سالیانه در جهان رخ می‌دهند. در این میان ویروس آنفلوانزا به عنوان یک پاتوژن جهانی و مهم، عامل عمده‌ای در ایجاد بیماری و مرگ و میر ناشی از بیماری‌های تنفسی به شمار می‌رود. ویروس آنفلوانزا جزو خانواده ارتومیکسویریده و دارای اسیدریبونوکلئیک قطعه قطعه است. اصطلاح میکسو ویروس به علت وابستگی این ویروس‌ها به مخاط به کار برده می‌شود که با توجه به پروتئین‌های M1، M2 و NP که اختصاصی تپ هستند به سه گروه آنفلوانزای A، B و C تقسیم می‌شوند. دو گلیکوپروتئین ویروسی، هماگلوتینین و نورآمینیداز بر روی پوشش لیپیدی ویروس قرار گرفته‌اند، به طوری که تغییرات آنتی ژنی ویروس‌های آنفلوانزا و ایمنی میزبان به وجود آن‌ها بستگی دارد. ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A و B به علت تغییرات مکرر آنتی ژنی که در دو گلیکوپروتئین سطحی آن‌ها رخ می‌دهد همواره مورد توجه بوده‌اند. این تغییرات باعث جلوگیری از عملکرد آنتی بادی‌های تولید شده علیه سروتیپ‌های والدی بر روی سروتیپ جدید می‌شود (۱).

همین امر باعث شکست در زمینه‌ی ساخت واکسن علیه این ویروس شده است. این ویژگی مشکل بزرگ‌تری به وجود آورده و آن هم ایجاد سویه‌های جدید از این ویروس است که منجر به ایجاد پاندمی در میان جوامع انسانی می‌شود. پاندمی زمانی به وجود می‌آید که ویروسی با زیر گونه‌ی جدید هماگلوتینین و نورآمینیداز و یا با زیر گونه جدید هماگلوتینین به تنهایی به وجود بیاید و بتواند در انسان تولید عفونت و بیماری کند و به راحتی در جوامع انسانی از فردی به فرد دیگر انتقال پیدا کند. به همین علت ویروس‌های آنفلوانزا در برابر اقدامات پیش‌گیری کننده مقاومت نشان می‌دهند (۲). به دلیل تغییرات آنتی ژنی مستمر سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا تاکنون هیچ پژوهشی منتج به تولید واکسنی که برای سال‌های متمادی کارایی داشته باشد، نشده است. بنابراین محققان به دنبال واکسنی

هستند که فرمولاسیون ثابتی داشته باشد تا بتوان جهت پیش‌گیری از اپیدمی‌های آنفلوانزا و حتی پاندمی‌های احتمالی از آن بهره جست. واکسن‌های ویروسی آنفلوانزا که به صورت تجاری برای انسان به صورت هر ساله و بر اساس سویه در گردش تولید می‌شود، واکسن‌های ویروس کامل غیر فعال شده هستند و با وجود این که بروز بیماری و شدت علائم بالینی را کاهش می‌دهند، نمی‌توانند حفاظت کاملی در مقابل عفونت ویروسی ایجاد کنند.

امروزه استفاده از واکسن‌های زیرواحدی که فاقد بیماری‌زایی بوده و به عنوان واکسن‌های بی خطر، موثر و پایدار به شمار می‌آیند مورد توجه محققان قرار گرفته است. برای تولید این واکسن‌ها ترجیحاً از پروتئین‌های حفاظت شده ویروس آنفلوانزا استفاده می‌شود که باعث به وجود آمدن پاسخ ایمنی متقاطع شود و بتواند میزبان را در برابر انواع مختلف ویروس محافظت نماید.

در این زمینه نواحی حفاظت شده‌ی پروتئین M2 از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. پروتئین M2 یک پروتئین هموترامرغشایی بوده و به عنوان کانال یونی عمل می‌کند و بخش خارج سلولی آن در بین تمام سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزای نوع A حفاظت شده است. این پپتید یک کاندید مناسب برای تهیه واکسن می‌باشد، اما از آن‌جا که اندازه کوچکی دارد و موجب ایمنی‌زایی مختصری می‌شود، روش‌های گوناگونی به کار گرفته شده تا منجر به تولید واکسن موثر و کارآمدی گردد. از جمله می‌توان با افزایش تعداد توالی‌های M2e و استفاده از ادجوانت‌های مختلف ایمونوژن قوی‌تری تولید نمود. یکی از ادجوانت‌های مورد استفاده در این مطالعه آلومینیوم هیدروکساید است. نمک‌های آلوم، بیشتر به شکل فسفات آلومینیوم یا هیدروکسید آلومینیوم به طور گسترده‌ای به عنوان ادجوانت‌های انسانی استفاده شده‌اند. این ادجوانت قادر است با ایجاد دپو و به دام انداختن آنتی ژن در محل تزریق با آزاد سازی و ارائه آرام و مستمر آن به سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن ایمنی زایی را افزایش دهد. سایر

خریداری شده و قبل از شروع کار به مدت یک هفته در حیوان خانه نگهداری شدند.

تعیین دوز کشنده ویروس PR8 در موش بالب سی

به منظور ارزیابی کارایی واکسن در چالش با ویروس وحشی لازم بود مشخص شود که چه مقداری از ویروس برای حیوان کشنده است. از این رو، ۲۰ سر موش ۸ هفته‌ای در ۴ گروه ۵ تایی تقسیم شدند و به هر کدام ۲۰ میکرولیتر کتامین و ۵ میکرولیتر ایلانین به صورت صفاقی تزریق گردید تا موش‌ها نیمه هوشیار شوند. سپس به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر ویروس (۵۰ میکرولیتر در هر حفره بینی) با رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-4} تلقیح شد. موش‌های هر گروه به مدت ۲ هفته در قفس‌های جداگانه و زیر هود آزمایشگاهی سطح ۲ ایمنی نگهداری شده و روزانه از نظر بروز آثار بیماری و یا مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند.

تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب

در این پژوهش پلاسمید بیانی (pET-28a/3M2e) واجد تکرار سه تایی ترادف M2e، که قبلاً در آزمایشگاه تحقیقاتی آنفلوآنزای انسیتو پاستور ایران ساخته و تعیین توالی شده بود، استفاده گردید.

برای بیان سازه‌ی نوترکیب فوق از سلول‌های اشریشیا کلی سویه BL21(DE3) استفاده شد. بیان پروتئین نوترکیب در این سویه در مقایسه با سویه‌های مشابه نظیر pLysS BL21(DE3) دارای سطح بالاتری است و به علاوه میزان ممانعت کنندگی بیان آن کمتر است. بدین منظور پلاسمید نوترکیب به داخل سلول‌های اشریشیا کلی سویه BL21(DE3) ترانسفورم شد، سپس در محیط کشت مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه و ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از گذشت ۲ تا ۳ ساعت و زمانی که میزان جذب نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ تا ۰/۷ رسید، ۱/۵ میلی لیتر از محیط برداشته شد و به عنوان نمونه صفر در نظر گرفته شد. رسوب‌گیری نمونه با انجام سانتریفوژ آن به مدت ۳ دقیقه و ۹۰۰۰ دور در

مکانیسم‌های احتمالی عمل نمک‌های آلومینیوم شامل فعال سازی کمپلمان، اتوزینوفیل و یا ماکروفاژ است (۳).

الیگونوکلوئیدهای CpG دومین ادجوانت مورد استفاده در این مطالعه است. این الیگونوکلوئیدها مشابه موتیف DNA باکتریایی بوده و شامل یک زنجیره دراز از دئوکسی نوکلئوتیدهای DNA همراه با دی نوکلئوتیدهای CpG مرکزی است. CpG تعدیل کننده سیستم ایمنی بوده و توانایی تحریک آنتی بادی‌ها را دارد (۴، ۵).

در این مطالعه در راستای راه اندازی یک واکسن واحد علیه ویروس آنفلوآنزا، پس از تولید پروتئین 3M2e در سیستم پروکاریوت و تخلیص آن، اثر ادجوانتی آلوم و CpG بر ایمنونژنیسیته 3M2e و میزان مرگ و میر حاصل از چالش با ویروس کشنده در گروه‌های دریافت کننده واکسن در قیاس با گروه کنترل در مدل موشی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به روش تجربی انجام شد. در این تحقیق از ویروس آنفلوآنزای A/PR/8/34 سازگار شده با موش استفاده گردید. نظر به این که این ویروس باعث مرگ و میر در موش می‌شود و در انسان هیچ‌گونه عوارض بیماری‌زایی ندارد، در تحقیقات آزمایشگاهی ویروس آنفلوآنزا خصوصاً در طراحی واکسن علیه این ویروس، از سویه PR8 جهت چالش استفاده می‌گردد. تکثیر ویروس در رده سلولی MDCK صورت گرفت. سلول‌های MDCK در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco BRL)، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین (Aldrich، سیگما) کشت داده شدند.

مدل آزمایشگاهی

برای این پژوهش از موش‌های بالب سی ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای استفاده گردید که از انسیتو پاستور ایران

کارایی، در هر مرحله خروجی ستون مسدود شده و ستون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از شست و شوی ستون، پروتئین مورد نظر با استفاده از بافر الوشن از ستون کنده و در مقادیر کم جمع آوری شد. تمامی نمونه‌های جمع آوری شده از طریق SDS PAGE بررسی گردید.

در آخر جهت حذف نمک‌های اضافی و آماده سازی پروتئین مورد نظر برای تزریق، از ستون‌های کروماتوگرافی G با قدرت عبور مواد ریزتر از پروتئین مورد نظر استفاده شد. در این حالت پروتئین در طی عبور از ستون فرصت تغییر ساختار نخواهد داشت. در این پژوهش از ستون G-25 (BioRad) با قدرت عبور ذرات ۱۰۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون برای نمک زدایی و اوره زدایی پروتئین نو ترکیب استفاده کردیم.

واکسیناسیون حیوانات

بیست و پنج سر موش بальب سی ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور کرج خریداری شده و بعد از یک هفته نگهداری در بخش حیوان خانه به ۵ گروه ۵ تایی اصلی و شاهد تقسیم شدند. واکسیناسیون به صورت تحت جلدی در سه دوز ۱۵ میکرو گرمی و در فواصل دو هفته‌ای انجام شد. گروه اول پروتئین 3M2e، گروه دوم پروتئین 3M2e همراه با ادجوانت آلوم (انستیتو پاستور ایران، واحد تولیدی کرج)، گروه سوم پروتئین 3M2e همراه با ادجوانت آلوم و CpG (Eurofins MWG) و گروه چهارم پروتئین 3M2e همراه با CpG دریافت کردند. یک گروه از موش‌ها نیز به عنوان شاهد، PBS دریافت کرد. دو هفته بعد از آخرین تزریق از سینوس ارییتال موش‌ها خون‌گیری شد و سرم آن‌ها جهت بررسی با الایزا جدا گردید.

بررسی ایمنی زایی واکسن

دو هفته پس از تزریق سوم از هر یک از حیوانات دریافت کننده واکسن خون‌گیری شد و سرم آن‌ها جدا شد. خون‌گیری از سینوس ارییتال موش‌ها و با بییت پاستور انجام شد. میزان IgG اختصاصی M2 در سرم گروه‌های مختلف با تست الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت (۶). بدین منظور از

دقیقه صورت گرفت. سپس به جهت القای بیان، IPTG با غلظت یک میلی مولار به محیط اضافه شد و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. رسوب سلولی در ساعت‌های مختلف پس از القا (ساعات اول تا چهارم) جمع آوری شد و نتایج بیان از طریق الکتروفورز پروتئین در ژل ۱۵ درصد پلی آکریل آمید (SDS PAGE) بررسی گردید.

استخراج پروتئین نو ترکیب

پس از تایید بیان و با توجه به نتایج حاصله، کلونی‌های انتخاب شده در ارلن‌های یک لیتری حاوی ۲۵۰ سی سی محیط کشت تلقیح شدند و پس از حصول جذب نوری مناسب و افزودن القاگر IPTG با غلظت یک میلی مولار، پروتئین مورد نظر به روش زیر از رسوب باکتری جدا گردید:

رسوب جمع آوری شده در بافر لیز کننده واجد اوره تعلیق شده و به مدت یک ساعت روی هم‌زن مغناطیسی داخل یخچال قرار داده شد. برای تخریب دیواره سلول‌ها از ۱۲ مرتبه سونیکاسیون و در هر نوبت ۲۰ پالس با قدرت ۸۵ استفاده شد. سوسپانسیون سونیکه شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۱۰۰۰۰G سانتریفیوژ شد. رسوب باقیمانده مجدداً در بافر لیز کننده تعلیق شده و مراحل تکرار گردید تا نهایتاً رسوبی باقی نماند. در تمام مراحل فوق نمونه‌برداری صورت گرفت و میزان پروتئین استخراج شده با الکتروفورز بررسی گردید.

تخلیص پروتئین نو ترکیب

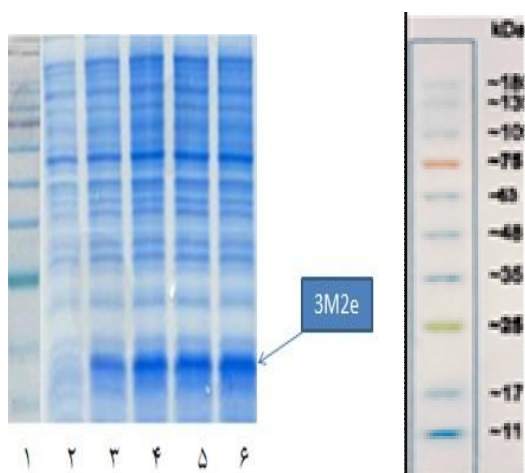
تخلیص پروتئین 3M2e نو ترکیب با استفاده از ستون‌های Ni-TED 1000 packed (MN، آلمان) و با اعمال تغییراتی در دستورالعمل مربوطه صورت گرفت.

سوسپانسیون حاصل از استخراج که حاوی تمامی پروتئین‌های باکتری و پروتئین نو ترکیب مورد نظر ما است بر روی ستون برده شد. به دلیل باقی ماندن بخشی از پروتئین نو ترکیب در نمونه جمع آوری شده از زیر ستون و به جهت بهره‌گیری کامل از حداکثر ظرفیت، محلول جمع آوری شده چند بار روی ستون برده شد. هم‌چنین جهت افزایش

یافته‌ها

نتایج بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب در باکتری BL21

پلاسمید نو ترکیب pET-28a/3M2e به سلول مستعد BL21 ترانسفورم شد و پس از نمونه برداری در ساعت‌های مختلف، نمونه‌های پروتئینی در ژل آکریل آمید- بیس آکریل آمید الکتروفورز گردید. براساس نتایج حاصله که در شکل ۱ آورده شده است، پروتئین 3M2e قبل از القا بیان نداشته و به تدریج در ساعت‌های بعد از القا، میزان بیان افزایش یافته است. به این ترتیب پروتئین 3M2e سه ساعت پس از القا به بیشترین میزان رسیده و جمع‌آوری شد.



شکل ۱. الکتروفورز نمونه حاصل از بیان پروتئین 3M2e در باکتری اشرشیاکلی سویه BL21(DE3) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پس از القا با IPTG ۱ میلی‌مولار. ستون ۱: مارکر پروتئین؛ ستون ۲: نمونه باکتری قبل از القا؛ ستون ۳ تا ۶: نمونه باکتری در ساعات اول تا چهارم پس از القا.

پس از تأیید بیان، پروتئین نو ترکیب در مقیاس زیاد تولید و از رسوب باکتری جدا گردید. جهت تعیین تعداد سونیکاسیون مناسب و بهینه سازی استخراج پروتئین به کار رفته در این پژوهش، استخراج‌های متعدد با تعداد پالس و قدرت‌های سونیکاسیون متفاوت انجام شد که نتایج حاصله در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود (ستون ۱)، بیش از ۹۰ درصد پروتئین مورد نظر پس از یک مرحله لیز باکتری و انجام سونیکاسیون

پپتید M2e که واجد ۲۳ اسید آمینه خارج سلولی پروتئین M2 می‌باشد استفاده گردید. محلول یک میکروگرم در میلی‌لیتر پپتید فوق در بافر فسفات در هر یک از چاهک‌های پلیت الیزا (۱۰۰ میکرولیتر) ریخته شد و به مدت یک شب در یخچال نگهداری گردید. به منظور پوشاندن فضاهای خالی از بافر فسفات حاوی آلبومین سرم گاو ۳ درصد استفاده شد. سرم گروه‌های مختلف مورد مطالعه با رقت ۱ به ۱۰۰۰ و آنتی‌بادی موشی نشان‌دار با آنزیم پراکسیداز (A8924، سیگما) با رقت ۱ به ۵۰۰۰ به عنوان آنتی‌بادی ثانویه مورد استفاده قرار گرفت. در تمام مراحل از بافر فسفات واجد توئین ۲۰ برای شست و شو استفاده شد. در مرحله نهایی، سوبسترای TMB اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در ادامه، زیر نوع IgG (IgG1 و IgG2a) نیز بر طبق مراحل گفته شده در فوق و به روش الیزا ارزیابی شد و پس از شست و شوی رقت‌های سرمی، از آنتی‌بادی ویژه زیر نوع IgG موش (M5532, M5657، سیگما) که در خرگوش تهیه شده بود استفاده گردید. آنتی‌بادی نشان‌دار که در مرحله آخر اضافه گردید بر علیه IgG خرگوش در بز تهیه شده بود (A5420، سیگما).

چالش حیوانات واکسینه

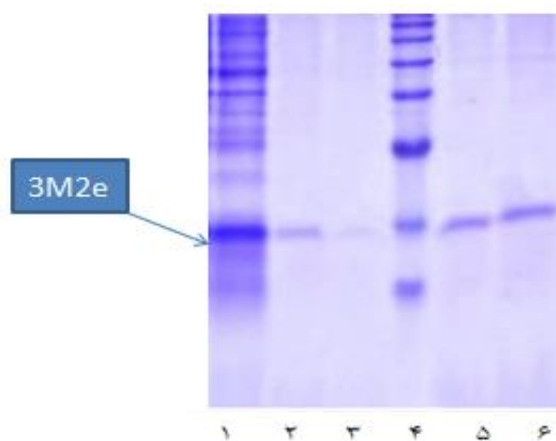
گروه‌های مختلف مورد آزمایش دو هفته پس از آخرین ایمن سازی با یک دوز کشته و ویروس چالش شده و به مدت دو هفته در حیوان خانه و در زیر هود آزمایشگاهی سطح ۲ ایمنی نگه داری شدند و میزان مرگ و میر در گروه‌های مورد مطالعه ثبت گردید.

تحلیل آماری

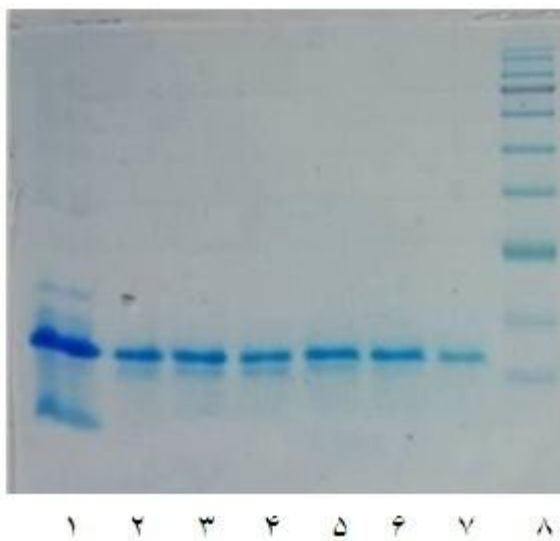
تجزیه و تحلیل‌های آماری آزمایش‌های مختلف ایمنی با استفاده از نرم افزار اکسل و آزمون آنوای یک طرفه با استفاده از نرم افزار Graph pad. Prism نسخه ۶ انجام شد.

پروتئین مورد نظر مدت زمان بیشتری با بافر الوشن در تماس باشد و در نهایت تخلیص پروتئین 3M2e با غلظت بیشتر انجام گردید که نتایج آن نشان داده نشده است.

در نهایت جهت حذف نمک‌های اضافی و آماده سازی پروتئین مورد نظر برای تزریق، از ستون کروماتوگرافی G استفاده شد. نتیجه الکتروفورز مراحل تخلیص پروتئین در شکل‌های ۳ و ۴ دیده می‌شود.

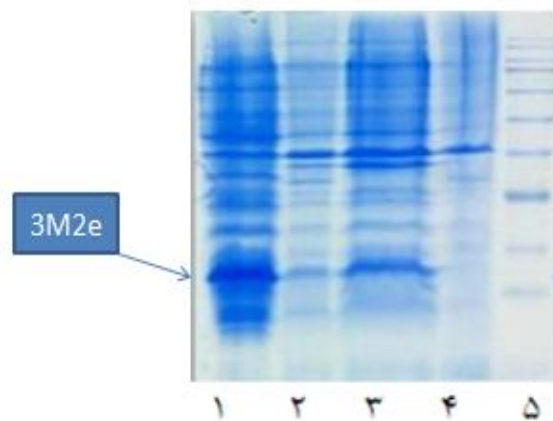


شکل ۳. الکتروفورز نمونه حاصل از تخلیص پروتئین 3M2e. ستون ۱: نمونه‌ی رد شده از ستون؛ ستون‌های ۲ و ۳: نمونه‌های حاصل از شست و شوی ستون؛ ستون ۴: مارکر پروتئینی؛ ستون‌های ۵ و ۶: نمونه‌های الوشن



شکل ۴. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از ستون G25، ستون ۱: نمونه‌ی پروتئین 3M2e تخلیص شده قبل از اوره زدایی؛ ستون‌های ۲ تا ۷: نمونه‌های خروجی از ستون؛ ستون ۸: مارکر پروتئینی

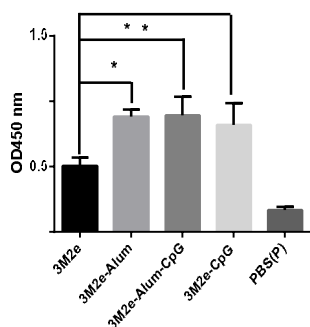
از لاشه سلولی جدا شده و نیازی به تکرار مراحل لیز و سونیکاسیون نبوده است.



شکل ۲. نتایج الکتروفورز مراحل استخراج پروتئین 3M2e از باکتری اشرشیاکلی سویه BL21(DE3). ستون ۱ و ۲ به ترتیب: سوسپانسیون و رسوب حاصل بعد از یک بار سونیکاسیون؛ ستون ۳ و ۴ به ترتیب: سوسپانسیون و رسوب حاصل بعد از دو بار سونیکاسیون؛ ستون ۵: مارکر پروتئینی

با توجه به این که پروتئین نو ترکیب بیان شده واجد دنباله هیستیدینی بود، با استفاده از ستون Ni-TED تخلیص گردید. در ابتدا سه میلی‌لیتر سوسپانسیون حاصل از استخراج بر روی ستون برده شد و خروجی ستون جمع‌آوری و الکتروفورز گردید. همان‌طور که در شکل ۳ ستون ۱ دیده می‌شود، پروتئین 3M2e به میزان زیادی در مایع رد شده از ستون باقی ماند. برای برطرف کردن این مشکل، مایع جمع‌آوری شده از ستون چندین مرتبه‌ی دیگر بر روی ستون برده شد. در مرحله‌ی بعد، شست و شوی ستون انجام شد (شکل ۳، ستون‌های ۲ و ۳). شواهد نشان می‌دهد که پروتئین مورد نظر در این مراحل از ستون جدا نشده است. در آخر پروتئین نو ترکیب با استفاده از بافر الوشن از ستون جدا گردید که ستون ۵ و ۶ شکل ۳ نتایج این مرحله را نشان می‌دهند. به منظور افزایش غلظت پروتئین 3M2e، در کارهای بعدی در مرحله‌ی الوشن، خروجی ستون مسدود شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا

نتایج اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد M2 به روش الایزا در موش‌های مورد مطالعه



نمودار ۱. نتایج مربوط به اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های ویژه M2 به روش الایزا. در این روش رقت ۱:۱۰۰۰ : ۱ سرم موش‌های مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه شده است. * ($p < 0.05$) و ** ($p < 0.01$)

نتایج چالش موش‌های واکسینه شده با ویروس‌های آنفلوانزا

نتایج تعیین دوز کشنده ویروس PR8 نشان داد که در رقت 10^{-3} ویروس، ۱۰۰ درصد از حیوانات مردند و در رقت 10^{-4} تمام حیوانات زنده ماندند. از این رو، رقت 10^{-3} ویروس به عنوان دوزی که می‌تواند بیش از ۹۰ درصد حیوانات را بکشد (LD90) در نظر گرفته شد.

تمامی گروه‌های مورد آزمایش دو هفته پس از آخرین ایمن سازی با یک LD90 از ویروس آنفلوانزای H1N1 PR8 چالش شدند و طی این مدت موش‌های هر گروه درون قفس‌های مجزا و در زیر هود آزمایشگاهی سطح ۲ ایمنی موجود در حیوان خانه انستیتو پاستور نگهداری شدند. میزان مرگ و میر هر گروه تا ۱۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله در نمودار ۲ آمده است. همان‌طور که در این نمودار ملاحظه می‌شود در مورد گروه‌های دریافت کننده 3M2e همراه با ادجوانت آلوم و CPG شاهد بقای ۶۰ درصد موش‌های چالش شده با ویروس بودیم. این در حالی است که در گروه‌های دریافت کننده 3M2e و گروه کنترل همه حیوانات تلف شدند.

دو هفته پس از آخرین دوز واکسن، از تمام حیوانات خون‌گیری به عمل آمد و میزان آنتی‌بادی‌های ویژه M2 در گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شد (نمودار ۱). پس از انجام آزمایش الایزا و رسم منحنی استاندارد و محاسبه و تحلیل مقادیر به دست آمده با آزمون آماری آنوای یک طرفه معلوم شد که تولید آنتی‌بادی IgG در همه گروه‌های واکسن نسبت به گروه کنترل PBS نتایج معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p < 0.05$).

نتایج به دست آمده نشان داد که تزریق پروتئین 3M2e به تنهایی نیز باعث القای پاسخ ایمنی همورال می‌گردد. گروه دریافت کننده پروتئین 3M2e به همراه ادجوانت آلوم و هم‌چنین گروهی که پروتئین 3M2e را به همراه آلوم و CpG دریافت کردند، ایمنی‌زایی بیشتری را نسبت به گروه دریافت کننده پروتئین بدون ادجوانت نشان دادند که این تفاوت‌ها معنی‌دار بوده است ($p < 0.01$). این تفاوت در گروهی که واکسن 3M2e را به همراه CpG دریافت کرده بودند $p < 0.05$ معنی‌دار بوده است.

هم‌چنین نتایج الایزا نشان داد که گروه کنترل (PBS) فاقد آنتی‌بادی اختصاصی ضد پروتئین M2 است. نتایج اندازه‌گیری زیر نوع آنتی‌بادی‌ها (IgG1 و IgG2a) نیز در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاکی از تولید هر دو زیر نوع آنتی‌بادی در گروه‌های واکسن می‌باشد. زیر نوع IgG2a که غالباً به عنوان شاخصی از عملکرد سیستم ایمنی سلول در نظر گرفته می‌شود در سرم موش‌های گروه 3M2e همراه با آلوم و CPG به میزان قابل توجهی افزایش یافت.

جدول ۱. نسبت زیر نوع‌های IgG2a به IgG1 در گروه‌های موشی علیه پروتئین M2

IgG2a/ IgG1	IgG2a	IgG1	
۰/۲۳	۰/۳۹	۱/۷۱	3M2e
۰/۶۵	۰/۹۷	۱/۵۰	3M2e-Alum
۰/۸۲	۱/۲۱	۱/۴۹	3M2e-Alum-CPG
۰/۷۴	۱/۱۲	۱/۵۱	3M2e-CPG

بحث

ویروس آنفلوانزای نوع A بر اساس دو گلیکوپروتئین سطحی ویروس (هماگلوتینین و نورآمینیداز) به زیر نوع‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شود. این گلیکوپروتئین‌ها بهترین آنتی‌ژن برای تولید ایمنی محافظتی در میزبان هستند. هماگلوتینین آنتی‌ژن اصلی ویروس است و میزان جهش در آن بسیار زیاد است. یکی از دلایل این جهش‌های سریع عملکرد نیمه دقیق آنزیم رپلیکاز ویروسی و همین‌طور عدم توانایی آنزیم در تصحیح اشتباهاتش (ویژگی آگزونوکلئازی) می‌باشد. تجمع این جهش‌های نقطه‌ای در پروتئین‌های هماگلوتینین و نورآمینیداز که دریافت نامیده می‌شود باعث عدم تاثیر آنتی‌بادی‌های اختصاصی در گردش شده و ویروس می‌تواند در بخش قابل توجهی از جمعیتی که از تماس قبلی ایمن شده بودند، ظاهر شود و به صورت آنفلوانزای فصلی بروز کند.

علاوه بر شیوع فصلی، در صورت جا به جایی قطعات ژنوم ویروس‌های انسانی و پرندگان و ظهور ویروس حاوی گلیکوپروتئین‌های سطحی جدید، ممکن است ویروس جدید باعث بروز پاندمی شده و با سرعت زیاد در میان جوامع انسانی منتشر شود. در طی سه قرن اخیر، ۱۰ پاندمی بزرگ اتفاق افتاده که سه تا از این پاندمی‌ها در قرن بیستم در سال‌های ۱۹۱۸، ۱۹۵۷ و ۱۹۶۸ بوده است. نخستین پاندمی قرن بیست و یکم در سال ۲۰۰۹ با آغاز عفونت در مکزیک و انتشار آن در طی چند ماه به اکثر کشورهای دنیا با میزان مرگ و میر حدود ۱ درصد از مبتلایان به وقوع پیوست (۷).

بنابراین شاخصه‌ی ویروس آنفلوانزا، تنوع در گلیکو پروتئین‌های سطحی آن است که در نتیجه ویروس می‌تواند از پاسخ ایمنی میزبان فرار کند. اگر چه افزایش سرعت تولید و کارایی واکسن‌های منطبق بر علیه سویه در گردش حائز اهمیت است، اما جلوگیری از بیماری آنفلوانزا به دلیل قدرت ویروس در پنهان کردن خود و ظهور به صورت یک عامل جدید دشوار است که این مسئله نیاز به تولید واکسن علیه سویه‌ی جدید را دو چندان می‌کند. با ظهور روش‌های مدرن و افزایش درک و شناسایی ایمونولوژی آنفلوانزا، تحقیقات و پژوهش‌ها در جهت توسعه‌ی واکسن جامع آنفلوانزا که نیاز به تغییرات هر ساله نداشته باشد ادامه دارد. به طور قطع این پژوهش‌ها می‌بایست بر پایه‌ی آنتی‌ژن‌های حفاظت شده ویروس باشد.

چند کاندید مناسب در این زمینه وجود دارد که از آن جمله می‌توان به ناحیه ثابت یا حفاظت شده ساقه پروتئین هماگلوتینین و هم‌چنین پروتئین M2 اشاره کرد. اثر بخشی موفق چندین واکسن بر اساس پروتئین M2 علیه سویه‌های همولوگ و هترولوگ ویروس آنفلوانزا ثابت شده است (۸).

این پروتئین به میزان فراوانی در غشاء پلاسمایی سلول‌های آلوده به ویروس بیان شده و به مقدار زیاد در ویرون تحت بیان است، ولی فقط مقدار کمی از آن (به طور متوسط ۶ تا ۲۰ مولکول) به ذرات ویروسی ملحق می‌شود. پروتئین دست نخورده M2 به صورت یک هموترامر شامل یک جفت دایمر متصل به هم از طریق پیوند دی‌سولفیدی یا به صورت یک تترامر پیوسته با پیوند دی‌سولفیدی شکل می‌گیرد. ناحیه خارج سلولی این پروتئین که M2e نام دارد شامل ۲۴ اسید آمینه است (۹). طبق مطالعات انجام شده، اسید آمینه‌های ۲ تا ۹ بخش N ترمینال این پپتید (SLLTEVET) در بین همه‌ی تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا حفاظت شده است (۹). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه اپی‌توپ فوق، همانند سازی ویروس آنفلوانزای A را در سلول‌های MDCK مهار می‌کنند و هم‌چنین باعث مهار همانند سازی ویروس در ریه حیوان

شده و آن‌ها را در برابر دوز کشنده عفونت محافظت می‌نمایند (۹).

به دلیل این که واکسن‌های نوین زیر واحدی تنها شامل قطعه آنتی ژنی ضد عامل بیماری‌زا می‌باشند، فاقد محرک‌های کمکی لازم به منظور تحریک مناسب سیستم ایمنی هستند. یکی از نگرانی‌های موجود در مورد واکسن‌های آنفلوانزا بر اساس پروتئین M2e، قدرت ایمنی‌زایی پایین آن است. به منظور افزایش ایمنی‌زایی این پروتئین، محققان چندین نسخه از M2e نسخه را با برخی پروتئین‌های ایمنی‌زا ادغام و یا از ادجوانت‌های مختلف استفاده کرده‌اند. از جمله این که M2e با پروتئین تترامر GCN4 که یک پروتئین فعال کننده رونویسی یوکاریوتی است، ادغام شد و در نتیجه توانایی پاسخ‌های آنتی‌بادی ویژه M2e افزایش یافت و موش‌های واکنش‌دهنده با آن به طور کامل علیه ویروس آنفلوانزا حفاظت شدند (۱۰). در همین راستا توالی M2e با هسته ویروس هپاتیت B (M2e-HBC) نیز ادغام شد که توانست موش‌ها را بر علیه ویروس آنفلوانزا حفاظت کند (۱۱). ادغام M2e با بخش آمینی HSP70 مایکوباکتریوم تویر کلوزیس نیز باعث افزایش ایمنی‌زایی در مدل حیوانی شد (۱۲). قرار دادن چند کپی متوالی از M2e و ادغام آن با TLR5 سالمونلا تیفی موریوم به عنوان ادجوانت در مدل موشی مورد آزمایش، باعث افزایش پاسخ آنتی‌بادی ویژه M2e شده و حیوان را در برابر ویروس محافظت کرد (۱۳).

در مطالعه حاضر در راستای راه‌اندازی یک واکسن واحد علیه ویروس آنفلوانزا، طراحی واکسن پروتئینی بر مبنای استفاده از توالی چند گانه پپتید M2e صورت گرفت. با همراه کردن دو ادجوانت مختلف (آلوم و CPG) با پروتئین 3M2e، ایمنی‌زایی این پروتئین را با سنجش میزان آنتی‌بادی‌های ویژه M2e بررسی کردیم. دو هفته پس از آخرین تزریق، ایمنی همورال با تست الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله بیان‌گر آن بود که گرچه تزریق پروتئین 3M2e به تنهایی نیز باعث القای پاسخ ایمنی همورال گردیده است، اما همراهی ادجوانت‌ها

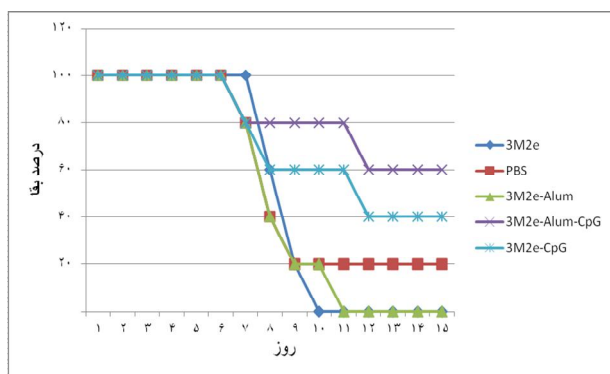
باعث افزایش معنی‌دار میزان آنتی‌بادی‌های اختصاصی شده است. در سال ۲۰۰۹، وو و همکاران پپتید M2e را با واکسن رایج آنفلوانزا ترکیب کردند. نتایج نشان داد که میزان آنتی‌بادی تولید شده برابر با آنتی‌بادی تولید شده در واکسن‌های رایج می‌باشد، اما افزودن ادجوانت الموم به این ترکیب جدید باعث افزایش آنتی‌بادی تولیدی شده و ایمنی وسیع‌الطیف علیه ویروس آنفلوانزا به وجود می‌آورد (۱۴).

هدف از واکنش‌های ایمنی‌زایی حفاظتی است که در برخی از واکسن‌ها همراهی یک ادجوانت مناسب باعث افزایش ایمنی می‌شود. ادجوانت‌ها در بسیاری از واکسن‌ها استفاده می‌شوند، ولی مکانیسم عمل آن‌ها به طور کامل شناخته نشده است. مواردی از قبیل افزایش ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌های ضعیف، افزایش سرعت و مدت پاسخ ایمنی، افزایش میل ترکیبی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن و اختصاصی‌تر کردن این اتصال، تغییر زیر کلاس آنتی‌بادی، تحریک ایمنی سلولی، افزایش تحریک ایمنی مخاطی، افزایش واکنش‌های ایمنی در افراد خردسال و مسن، کاهش دوز آنتی‌ژن در واکسن و کاهش قیمت متعاقب آن و بالاخره غلبه بر رقابت آنتی‌ژن‌ها در واکسن‌های ترکیبی، محققان را مجاب به استفاده از ادجوانت‌های مناسب کرده است. ادجوانت‌ها از طریق مکانیسم‌هایی مانند تشکیل دپو در محل تزریق، تحریک سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، به کارگیری سلول‌های ایمنی، افزایش جذب و ارائه آنتی‌ژن به سیستم ایمنی و انتقال آن به گره‌های لنفاوی اثر خود را اعمال می‌کنند (۳).

یکی از ادجوانت‌های مورد استفاده در این مطالعه آلومینیوم هیدروکساید است. همان‌طور که پیشتر گفته شد مکانیسم دقیق عمل این ادجوانت هنوز به طور کامل شناخته نشده است. گفته می‌شود این ادجوانت با تحریک Th2 القاء پاسخ ایمنی همورال را افزایش می‌دهد (۱۵). در گروه دیگری از موش‌ها الیگونوکلئوتیدهای CpG به عنوان ادجوانت استفاده گردید. این الیگونوکلئوتیدها تعدیل‌کننده سیستم ایمنی بوده و توانایی القای تولید آنتی‌بادی‌ها را

بالایی از آنتی‌بادی‌های ضد M2 به ویژه ایزوتیپ IgG2a می‌شود که احتمالاً حاصل فعالیت هر دو گروه سلول‌های Th1 و Th2 می‌باشد. تولید این آنتی‌بادی‌ها معمولاً با تولید اینترفرون گاما همراه است. نتایج این پژوهش با سایر پژوهش‌ها قابل مقایسه است. برای مثال، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ انجام شد پپتید M2e و ویروس آنفلوانزا را به ادجوانت CpG-ODN الحاق کردند و نشان دادند که ترکیب M2e-CpG-ODN، پاسخ ایمنی Th1 و تیتر IgG2a و اینترفرون گاما را افزایش می‌دهد (۱۶).

هم‌چنین مقایسه نتایج چالش موش‌ها با ویروس H1N1 نشان داد که گروه 3M2e-Alum-CpG، نسبت به سایر گروه‌های واکسن دارای بقای بهتری بوده است (نمودار ۲). احتمالاً همراهی CPG، علاوه بر تحریک اختصاصی سیستم ایمنی، توانسته است ایمنی ذاتی را نیز تحریک کرده و در حفاظت بخشی نقش داشته باشد.



نمودار ۲. میزان بقا در موش‌های واکسینه شده بعد از چالش با H1N1

نتیجه‌گیری

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به کارگیری پروتئین 3M2e همراه با ادجوانت‌های آلوم و CPG، باعث القای پاسخ سیستم ایمنی همورال و سلولی بر علیه آنتی ژن 3M2e می‌شود که می‌تواند اثر حفاظت بخشی پروتئین M2e را به عنوان یک واکسن واحد علیه ویروس‌های آنفلوانزا بهبود بخشد.

دارند. این ادجوانت در تغییر مسیر ایمنی به سمت پاسخ‌های تیپ ۱ موثر است (۴، ۵).

در این پژوهش، ایمنی‌زایی پروتئین 3M2e در گروه‌های مورد مطالعه که آن را همراه با آلوم و یا CpG و یا ترکیب هر دو ادجوانت دریافت کرده بودند نسبت به گروه دریافت‌کننده پروتئین بدون ادجوانت تفاوت معنی‌داری نشان داد، گرچه این گروه‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند.

مطالعات مختلف نشان داده است که القای ایمنی همورال به تنهایی قادر به ایجاد حفاظت کامل در مقابل ویروس آنفلوانزای A نیست، اما می‌تواند باعث حفاظت نسبی گردد. برای رسیدن به یک واکسن جامع، مد نظر قرار دادن هر دو بازوی سیستم ایمنی همورال و سلولی ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه با اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های زیر نوع IgG (IgG1 و IgG2a) به طور غیر مستقیم میزان تحریک ایمنی سلولی ارزیابی و در چهار گروه واکسن با یکدیگر مقایسه گردید. عموماً تولید آنتی‌بادی IgG2a و IgG1 به ترتیب به عنوان شاخصی از فعالیت سلول‌های Th1 و Th2 در نظر گرفته می‌شوند. بر این اساس، همان‌طور که انتظار می‌رفت، در گروهی که پروتئین 3M2e را به تنهایی دریافت کرده بودند گرایش پاسخ‌ها به سمت Th2 بود. در گروهی که پروتئین 3M2e را همراه CpG دریافت کردند، با وجود کاهش نسبی آنتی‌بادی اختصاصی (IgG کل)، میزان آنتی‌بادی IgG2a افزایش چشم‌گیری داشت که می‌تواند بیان‌گر راه‌اندازی پاسخ‌های Th1 باشد. اما در گروهی که پروتئین 3M2e را همراه با آلوم و CPG دریافت کردند، ضمن حفظ میزان کلی IgG، نسبت IgG2a به IgG1 به یک نزدیک‌تر است. با توجه به این که آلوم به تنهایی القاکننده Th2 است، همراهی CpG در واکسن حاوی پروتئین و آلوم می‌تواند باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی شده و به دلیل دپوی ایجاد شده به وسیله آلوم، به میزان بیشتری قادر خواهد بود Th2 را تحریک کرده و هم‌چنین پاسخ ایمنی سلولی را القا نماید (۱۵). بدین معنی که همراهی CPG منجر به القای تولید میزان بسیار

8. Tompkins SM, Zhao Z-S, Lo C-Y, Misplon JA, Liu T, Ye Z, et al. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerging infectious diseases*. 2007; 13(3):426-7.
9. Ebrahimi SM, Tebianian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. *Virus Genes*. 2011; 42(1):1-8.
10. Du L, Zhou Y, Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. *Microbes and infection*. 2010; 12(4):280-6.
11. De Filette M, Martens W, Smet A, Schotsaert M, Birkett A, Londoño-Arcila P, et al. Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies. *Vaccine*. 2008; 26(51):6503-7.
12. Ebrahimi SM, Tebianian M, Toghiani H, Memarnejadian A, Attaran HR. Cloning, expression and purification of the influenza A (H9N2) virus M2e antigen and truncated *Mycobacterium tuberculosis* HSP70 as a fusion protein in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*. 2010; 70(1):7-12.
13. Jia P-p, Hu Y-h, Chi H, Sun B-g, Yu W-g, Sun L. Comparative study of four flagellins of *Vibrio anguillarum*: Vaccine potential and adjuvanticity. *Fish & shellfish immunology*. 2013; 34(2):514-20.
14. Wu F, Yuan X-Y, Huang W-S, Chen Y-H. Heterosubtypic protection conferred by combined vaccination with M2e peptide and split influenza vaccine. *Vaccine*. 2009; 27(43): 6095-101.
15. Millan CLB, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist C-A, Davis HL. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95(26):15553-8.
16. Wu F, Yuan X-Y, Li J, Chen Y-H. The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine. *Vaccine*. 2009; 27(32):4320-4.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی و مساعدت بخش آنفلوآنزای انستیتو پاستور ایران انجام پذیرفته است. بدین وسیله نویسندگان از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی آنفلوآنزا کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Arias CF, Escalera-Zamudio M, de los Dolores Soto-Del M, Cobián-Güemes AG, Isa P, López S. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Archives of medical research*. 2009; 40(8):643-54.
2. Peiris J, Tu Ww, Yen Hl. A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century. *European journal of immunology*. 2009; 39(11):2946-54.
3. Foumani M, Asadpour L, Azizi Saraji A, Sharifat Salmani A, Aghasadeghi M. Adjuvants and Their Mechanisms of Action. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2012; 12(3):276-91.[Persian]
4. Qin W, Jiang J, Chen Q, Yang N, Wang Y, Wei X, et al. CpG ODN enhances immunization effects of hepatitis B vaccine in aged mice. *Cell Mol Immunol*. 2004; 1(2):148-52.
5. Lin L, Gerth AJ, Peng SL. CpG DNA redirects class-switching towards "Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *European journal of immunology*. 2004; 34(5): 1483-7.
6. Rousta F, Fotouhi F, Ghaemi A, Heidarchi B, Fazeli M, Ghaffari M. Effects of aqueous *Echinacea purpurea* extract on immunogenicity of DNA vaccine encoding M2 gene of Influenza virus. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*. 2012; 14(4):82-8.
7. Baras B, Stittelaar KJ, Simon JH, Thoolen R, Mossman SP, Pistor F, et al. Cross-protection against lethal H5N1 challenge in ferrets with an adjuvanted pandemic influenza vaccine. *PLoS One*. 2008; 3(1):e1401-2.