مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۶/هفته دوم بهمن ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲

بیان پروتئین M2 ویروس آنفلوانزای انسانی H1N1 در باکتری اشریشیا کلی

سید محمد علی علوی اصفهانی[۱]، دکتر فاطمه فتوحی[۲]، دکتر امیر قائمی[۳]، مریم صالح[۴]، سیاوش چلبیانی[۱]، دکتر بهرخ فرهمند[۲]، دکتر معصومه توسطی خیری[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پروتئین M2 که یک پروتئین هوموترامر متصل به غشا با پیوند دی‌سولفیدی می‌باشد، در میان همه‌ی ویروس‌های آنفلوانزای A به طور کامل حفاظت شده است. به همین دلیل هدف مناسبی برای توسعه‌ی واکسن آنفلوانزا با محافظت وسیع‌الطیف می‌باشد. در این مطالعه پروتئین M2 ویروس آنفلوانزای A در سیستم پروکاریوتی بیان شد.

روش‌ها: ژن پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا [A/NewCaledonia/20/99 (H1N1)] پس از تکثیر به روش PCR (Polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و هضم آنزیمی، در وکتور بیانی پروکاریوتی pQE30 جای‌سازی گردید. پلاسمید نوترکیب pQE30-M2 به سلول مستعد شده E.coli سویه‌ی M15 منتقل شد و سلول‌ها در محیط LB مایع واجد آمپی‌سیلین و کانامایسین بعد از القا با IPTG (Isopropyl thiogalactoside) به صورت کشت شبانه رشد کردند. بیان پروتئین M2 به وسیله‌ی الکتروفورز روی ژل آکریل آمید و سپس Western blot تأیید شد.

یافته‌ها: نتایج کلونی PCR و هضم آنزیمی و تعیین توالی نشان داد که ژن M2 در وکتور pQE30 به طور صحیح و در قاب خواندنی دنباله‌ی هیستیدینی کلون شد و تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد پروتئین M2 به روش Western blot تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: آزمایشات نشان داد که واکسن‌های بر پایه‌ی M2 باعث القای ایمنی وسیع‌الطیف می‌شوند و می‌توانند حیوانات را در برابر چالش کشنده تحت تیپ‌های چند گانه‌ی ویروس، محافظت نماید. بنابراین پروتئین M2 پس از تخلیص می‌تواند به عنوان یک کاندید واکسن در نظر گرفته شود و در مطالعات آینده همراه با ادجوانت‌های مختلف در مدل‌های حیوانی مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: پروتئین M2، واکسن، بیان پروتئین، ویروس آنفلوانزا، اشریشیا کلی

ارجاع: علوی اصفهانی سید محمد علی، فتوحی فاطمه، قائمی امیر، صالح مریم، چلبیانی سیاوش، فرهمند بهرخ، توسطی خیری معصومه. **بیان پروتئین پروکاریوتی M2 ویروس آنفلوانزای انسانی H1N1 در باکتری اشریشیا کلی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۶): ۲۱۰۲-۲۰۹۱

مقدمه

ویروس آنفلوانزا یکی از پاتوژن‌های مهم دستگاه تنفسی است (۱). این ویروس هر ساله ۵-۳ میلیون نفر را در سراسر جهان مبتلا می‌کند که در موارد شدید، منجر به مرگ ۲۵۰ تا ۳۵۰ هزار نفر می‌شود (۲). نوزادان، افراد مسن و افراد با نقص سیستم ایمنی

۱- کارشناس ارشد، گروه میکرب‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستورایران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه ویروس‌شناسی پزشکی و ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۴- کارشناس ارشد، گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستورایران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فاطمه فتوحی
Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

نسبت به عفونت آنفلوانزا بیشتر در معرض خطر قرار دارند (۳).

تا به امروز سه گونه‌ی ایمونولوژیکی از ویروس آنفلوانزا شامل انواع A، B و C شناخته شده است. ژنوم ویروس آنفلوانزا از RNAی تک رشته‌ای تشکیل شده است که در ویروس‌های آنفلوانزای A و B به صورت ۸ قطعه مجزا می‌باشند، در حالی که ویروس‌های آنفلوانزای C واجد هفت قطعه‌ی RNA هستند (۴). قطعات RNA ویروس، چندین پروتئین ساختاری از جمله هماگلوتینین (Hemagglutinin یا HA)، نورامینیداز (NA یا Neuraminidase)، پروتئین ماتریکس (Matrix یا M)، نوکلئوپروتئین (NP یا Nucleoprotein) و همچنین پروتئین‌های غیر ساختاری را رمزگذاری می‌کنند. گلیکوپروتئین‌های هماگلوتینین و نورآمینیداز، مهم‌ترین پروتئین‌های سطحی ویروس هستند که به صورت زوایدی بر روی پوشش ویروسی دیده می‌شوند و بیشترین میزان آنتی‌بادی‌های خنثی کننده بر ضد آن‌ها ساخته می‌شود.

با توجه به این که داروهای ضد ویروس آنفلوآنزا کارایی چندانی در مبارزه با این بیماری ندارند، واکسیناسیون بهترین راه برای کنترل بیماری آنفلوانزا است. واکسن‌های تجاری موجود که به صورت ویروس کامل غیر فعال شده (Whole inactivated virus) در تخم مرغ تهیه می‌شود، به طور عمده بر ضد گلیکوپروتئین‌های فوق، ایمنی ایجاد می‌کنند. با توجه به موتاسیون‌های پی در پی در پروتئین‌های سطحی ویروس، استفاده از این نوع واکسن‌ها در مقابل اپیدمی ویروس آنفلوانزا با محدودیت روبرو شده است و نیاز به توسعه‌ی واکسن واحد بر ضد آنفلوانزا با استفاده از پروتئین‌های حفاظت شده‌ی ویروس به وضوح احساس می‌شود. تولید واکسن آنفلوانزا بر پایه‌ی تخم مرغ با محدودیت‌هایی روبرو است و تکنولوژی‌های واکسن نوترکیب بر اساس پروتئین‌های مهم ویروسی، به عنوان یک راهکار مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است (۵). قطعه‌ی هفتم ژنوم ویروس آنفلوانزا علاوه بر پروتئین ماتریکس (M1)، پروتئین کانال یونی (M2) را نیز رمزدهی می‌کند که در بین تمامی تحت تیپ‌های این ویروس حفاظت شده است. پروتئین M2، یک پروتئین هوموترامر است که به عنوان کانال یونی متصل به غشای ویروس آنفلوانزا عمل می‌کند. هر مونومر این پروتئین از ۹۷ اسید آمینه تشکیل شده است که شامل یک قسمت سیتوپلاسمی ۵۴ اسید آمینه‌ای، یک قسمت عرض غشایی ۱۹ اسید آمینه‌ای و یک قسمت خارج سلولی ۲۴ اسید آمینه‌ای (M2e) می‌باشد (۶-۵). این پروتئین که در مرحله‌ی پوشش برداری ویروس در داخل اندوزوم‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند، به عنوان هدف اختصاصی برای داروهای ضد آنفلوانزای ریمانتادین و آمانتادین محسوب می‌شود. پروتئین هوموترامر M2 شامل یک جفت دایمر متصل به هم و یا یک ترامر پیوسته است که با پیوند دی‌سولفیدی شکل می‌گیرد و با انتقال پروتون باعث تنظیم pH می‌گردد (۸-۷).

برای تولید واکسن آنفلوانزا بر اساس پروتئین M2 مطالعات مختلف و روش‌های گوناگونی استفاده شده است. برای مثال ابراهیمی و همکاران در زمینه‌ی بیان پروتئین M2 در سلول باکتری با هدف تولید واکسن نوترکیب جهانی، تحقیقاتی انجام دادند. آن‌ها موفق شدند پس از کلون کردن ژن M2 در وکتور بیانی pAED4 و انتقال آن به باکتری E.coli سویه‌ی

BL21 (DE3)، بیان پروتئین M2 را در سلول باکتری گزارش کنند (۹).

همچنین مطالعاتی در زمینه‌ی استفاده از سکانس M2e برای تولید واکسن آنفلوانزا صورت گرفته است (۱۱-۱۰). طی یک مطالعه، پروتئین نوترکیب Volvulus onchocerca (Ov-ASP-1) به عنوان ادجوانت، با سکانس پیوسته‌ی M2e از ویروس آنفلوانزای H1N1 ادغام شد. نتایج نشان داد که واکسن نوترکیب فوق، قادر بود پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال اختصاصی ضد M2e را در مدل موشی به شدت القا کند (۱۲).

با وجودی که M2e قسمت بسیار حفاظت‌شده‌ی پروتئین است (۵)، اما به علت کوتاه بودن توالی ۲۳ اسید آمینه‌ای آن، در این مطالعه از طول کامل ژن M2 برای جای‌سازی در پلاسمید pQE30 و تولید پروتئین در باکتری E.coli سویه‌ی M15 استفاده شد. پروتئین M2 تولیدشده می‌تواند پس از تخلیص به عنوان یک کاندید واکسن در نظر گرفته شود و در مطالعات آینده در مدل‌های حیوانی مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش‌ها

این پژوهش از نوع مطالعات علوم پایه‌ی تجربی (Experimental) بود و در آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران در سال ۱۳۹۰ انجام شد. پرایمرها، MgCl2، PCR Buffer10 X، dNTP Mix، آنزیم Taq polymerase، آنزیم‌های Hind III و BamHI، 6 X Loading Buffer و اتیدیوم بروماید از شرکت سیناژن (ایران) تهیه شد. آکریل آمید و آگارز از شرکت سیگمای آمریکا و LB Broth و LB Agar از شرکت‌های مدیای هند، خریداری شد. همچنین کاغذ نیتروسلولز از شرکت سارتریوس آلمان و مارکر پروتئین و DNA از شرکت فرمنتاز خریداری گردید. در این مطالعه جهت تخلیص پلاسمید، از کیت استخراج پلاسمید شرکت اینترون استفاده شد.

تکثیر و جداسازی ژن M2 با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR یا Polymerase chain reaction)

در این مطالعه از ژن کامل M2 سویه‌ی H1N1 (A/NewCaledonia/20/99) که پیش از این در آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران در وکتور pcDNA کلون شده بود، استفاده شد. ژن M2 توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر یافت تا سایت‌های آنزیمی مناسب در دو انتهای ژن هدف ایجاد شود و در وکتور بیانی pQE30 با دنباله‌ی هیستیدینی کلون گردد. بدین منظور پرایمرهایی که شامل ابتدا و انتهای ژن M2 به همراه ترادف اختصاصی ناحیه‌ی برش آنزیم‌های HindIII و BamHI بودند، طراحی و ساخته شدند.

Forward-BamH I:
5' TCGGATCCATGAGTCTTCTAAC 3'
Reverse–HindIII:
5' GC AAGCTTCTTCAACTCTATGC 3'

با استفاده از پرایمرهای فوق و مواد مورد نیاز PCR تکثیر ژن M2 صورت گرفت. غلظت پرایمرها و مواد مورد نیاز PCR شامل: ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها، ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲/۵ میلی‌مولار dNTP mix، بافر PCR به صورت 1 X و یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز بود. این مخلوط با آب مقطر، به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه‌ی دمایی مورد نیاز شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه (۱ دقیقه

در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. محصول PCR بر روی ژل ۲ درصد آگارز در بافر تریس- اسید بوریک- EDTA با ولتاژ ۸۰ و به مدت ۳۰ تا ۴۰ دقیقه الکتروفورز شد. جهت بررسی نتیجه‌ی الکتروفورز، ژل آگارز با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه Gel documentation (شرکت Viber lourmat) در طول موج ۲۶۰ نانومتر مشاهده شد.

همچنین برای تشخیص اندازه‌ی مولکولی محصول PCR از مارکر DNA شرکت فرمنتاز (SM1153) استفاده شد.

آماده‌سازی پلاسمید pQE30

یک کلونی تک از باکتری واجد پلاسمید pQE30 در ۵ میلی‌لیتر محیط مایع LB تلقیح شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور مجهز به Shaker قرار داده شد. سپس جهت تخلیص پلاسمید، از کیت استخراج پلاسمید شرکت اینترون استفاده شد.

جای‌سازی ژن هدف در پلاسمید pQE30

کلون کردن ژن M2 در پلاسمید pQE30 به این ترتیب انجام شد: جهت برش دو سر ژن M2 و همچنین خطی شدن پلاسمید pQE30، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های Hind III و BamH I صورت گرفت.

محصول PCR و پلاسمید خطی‌شده پس از تخلیص با نسبت‌های مختلف مولی با یکدیگر مجاور شدند و با افزودن آنزیم لیگاز به مدت یک شب در دمای ۸-۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند تا به یکدیگر متصل گردند. سپس در سلول‌های مستعد E.coli سویه‌ی Top10 F′ ترانسفورم گردید.

جهت تأیید کلونینگ، از سه روش کلونی PCR، هضم آنزیمی و بررسی توالی پلاسمید نوترکیب استفاده شد. برای انجام روش کلونی PCR، مشابه روشی که پیشتر به آن اشاره گردید، عمل شد؛ با این تفاوت که در میکروتیوپ حاوی مخلوط مواد مورد نیاز PCR به جای اضافه کردن نمونه‌ی DNA، بخش کوچکی از یک کلونی توسط لوپ جدا شد و در مخلوط وارد گردید.

برای هضم آنزیمی، پلاسمید نوترکیب pQE30-M2 با آنزیم‌های HindIII و BamHI برش داده شد تا قطعه‌ی مورد نظر از آن خارج گردد و جهت تأیید نهایی، پلاسمید نوترکیب pQE30-M2 تعیین توالی گردید.

القای بیان پروتئین M2

جهت القای بیان پروتئین M2 پلاسمید نوترکیب pQE30-M2 به داخل باکتری‌های مستعد E.coli، سویه‌ی M15 ترانسفورم شد. سپس در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور مجهز به Shaker قرار داده شد تا زمانی که جذب نوری آن در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ برسد. سپس برای القای تولید پروتئین، ایزوپروپیل تیو گالاکتوزید (IPTG یا Isopropyl thiogalactoside) با غلظت‌های مختلف ۱، ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌مولار به سوسپانسیون باکتری اضافه شد و در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از القا، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری برداشت شد و دانسیته‌ی آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر معلوم

گردید. رسوب باکتریایی با ۳ دقیقه سانتریفوژ در ۹۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد جدا شد.

بررسی بیان پروتئین M2 با روش SDS-PAGE

جهت بررسی بیان پروتئین، رسوب باکتری‌ها که در ساعت‌های مختلف تهیه شده بود، با بافر نمونه (Sample buffer) مخلوط گردید تا لیز شوند. غلظت نمونه‌ها بر حسب نانوگرم به میکرولیتر محاسبه گردید (به طور مثال اگر غلظت بافر نمونه ۰/۱ نانوگرم در میکرولیتر بود، ۱۰ میکرولیتر از بافر نمونه X ۵ به آن اضافه گردید). برای تهیه‌ی بافر نمونه X ۵، ۳ گرم پودر تریس در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و پس از آن که pH آن به ۶/۸ رسید، ۵ گرم SDS (Sodium dodecyl sulfate) به محلول فوق اضافه شد. ۵۰ میلی‌لیتر گلیسرول به صورت قطره قطره و همچنین ۰/۰۳ گرم برموفنول بلو نیز در چند مرحله به محلول افزوده و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جهت باز شدن پیوندهای دی‌سولفیدی به ازای هر میلی‌لیتر بافر، ۲۰ میکرولیتر بتامرکاپتو اتانول افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند تا لیز شوند. لیزات باکتری‌ها بر روی ژل ۱۵ درصد پلی آکریل آمید طبق پروتکل استاندارد، الکتروفورز شد و باندهای پروتئینی با رنگ‌آمیزی با محلول کوماسی بلو R-250، آشکار گردید.

تأیید پروتئین بیان‌شده با روش Western blot

پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل ۱۵ درصد پلی‌آکریل آمید، با استفاده از دستگاه الکتروترنسفر به روی غشا نیتروسلولز منتقل شد. بیان پروتئین M2 در باکتری بیانی M15 با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد پروتئین M2 با کد ab5416 (Abcam.co) به عنوان آنتی‌بادی اولیه با نسبت ۱/۱۰۰۰ در PBS (Phosphate buffered saline) و آنتی‌بادی نشان‌دار شده با پروکسیداز ضد آنتی‌بادی موش با کد A 8924 (Sigma.co) به عنوان آنتی‌بادی ثانویه با نسبت ۱/۵۰۰۰ در PBS و استفاده از سوبسترای دی آمینو بنزیدین (DAB یا Diaminobenzidine) جهت رنگ‌آمیزی باندهای پروتئینی، بررسی گردید.

یافته‌ها

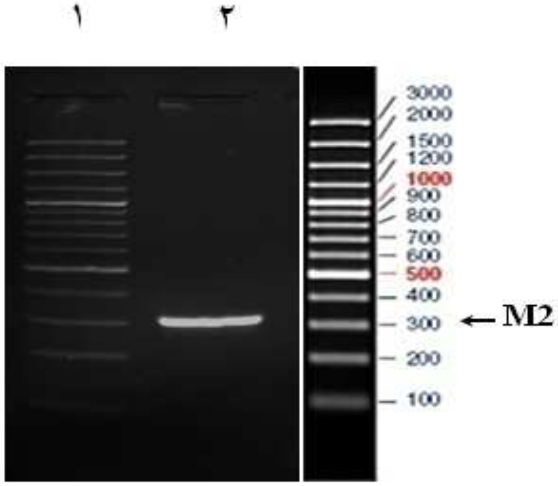
در این مطالعه، از ژن کامل M2 آنفلوانزای سویه‌ی H1NI (A/NewCaledonia/20/99) جهت کلون کردن در پلاسمید pQE30 استفاده شد.

طبق بررسی‌های انجام شده توسط نرم‌افزار Expasy معلوم گردید که پروتئین M2 با توجه به افزودن توالی هیستیدینی، واجد ۱۱۲ اسید آمینه شد و دارای وزن مولکولی حدود ۱۲/۸۱ بود. همچنین pH ایزوالکتریک این پروتئین ۶/۲۸ بود. داشتن این اطلاعات، برای انجام مراحل ارزیابی کمی و کیفی پروتئین و تخلیص آن، مورد نیاز بود. توالی پروتئین M2 به همراه دنباله‌ی ۶ هیستیدینی، در زیر ارائه شده است.

M R G S H HHHHH G S M S L L T E V E
T P I R N E W G C R C N D S S D P L V V A
A S I I G I V H L I L W I I D R L F S K S I Y
R I F K H G L K R G P S T E G V P E S M R
E E Y R E E Q Q N A V D A D D G H F V S I
E L K K L N Stop

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR، به همراه مارکر شرکت فرمنتاز بر روی ژل آگارز ۲ درصد در شکل ۱ نشان داده شده است. در ستون شماره‌ی ۲ شکل ۱ باند ۳۰۰ جفت بازی ژن M2 مشخص می‌باشد.

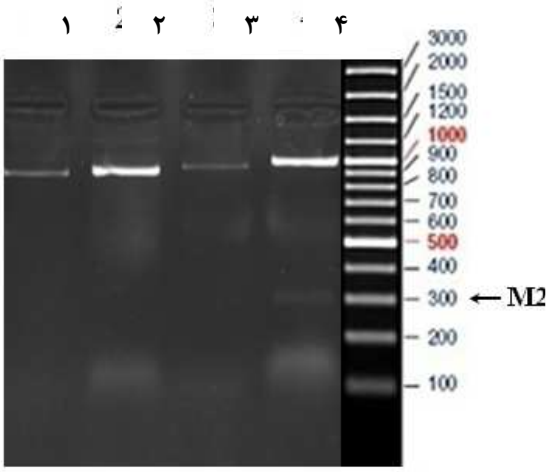
به منظور تولید پلاسمید نوترکیب pQE30–M2، ژن M2 در پلاسمید pQE30 جای‌سازی شد و جهت



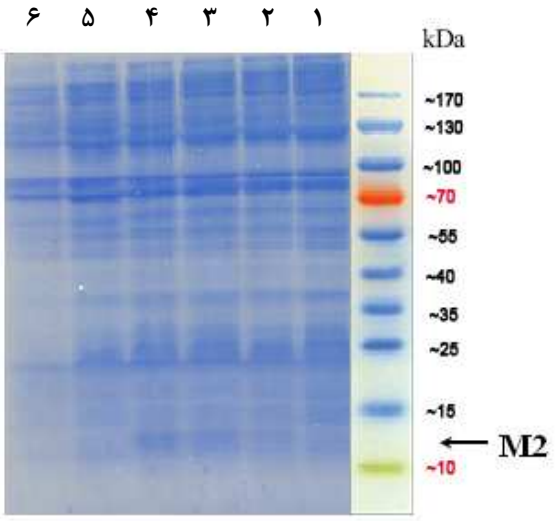
شکل ۱. ژل الکتروفورز، نتیجه‌ی تکثیر ژن M2
ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA
ستون ۲: قطعه‌ی ۳۰۰ جفت بازی ژن M2

تأیید این فرایند، بعد از الحاق ژن M2 در پلاسمید و انتقال محصول آن به باکتری E.coli سویه‌ی Top10 F′، برای انتخاب کلونی مورد نظر، از روش کلونی PCR استفاده شد. پس از مشاهده‌ی قطعه‌ی تکثیریافته‌ی مورد نظر، کلونی مربوط در محیط مایع کشت داده شد و پلاسمید آن استخراج گردید و سپس با آنزیم‌های Hind III و BamH I هضم گردید. نتیجه‌ی هضم ۳ کلونی از کلونی‌های فوق که منجر به جداسازی یک قطعه‌ی ۳۰۰ جفت بازی از پلاسمید شد، در شکل ۲ نشان داده شده است.

به منظور بررسی بیان پروتئین M2، سازه‌ی تأییدشده به باکتری E.coli سویه‌ی بیانی M15 انتقال داده شد و به منظور بررسی بیان پروتئین M2، نمونه‌های قبل و بعد (۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت) از القا با IPTG، به همراه مارکر پروتئین شرکت فرمنتاز (SM0671) بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد در حضور سدیم دو دسیل سولفات الکتروفورز شد که نتیجه‌ی آن در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۲. الکتروفورز حاصل از هضم آنزیمی سازه‌ی pQE30 -M2
ستون ۱: شاهد منفی
ستون‌های ۲ و ۳: نمونه‌های فاقد ژن M2
ستون ۴: نمونه‌ی واجد ژن M2

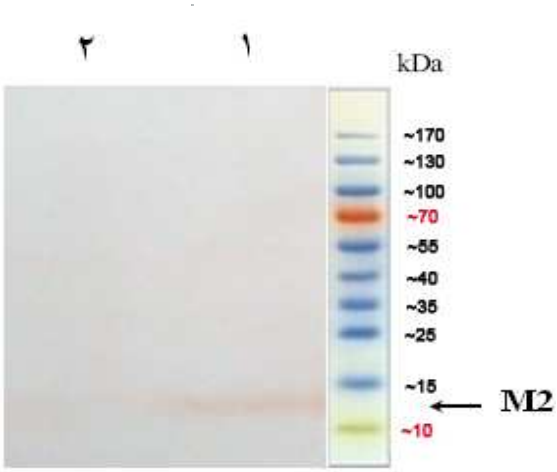


شکل ۳. نتیجه‌ی بررسی بیان پروتئین M2 قبل و بعد از القا توسط IPTG (Isopropyl thiogalactoside)
(غلظت ۰/۵ میلی‌مولار) روی ژل آکریل آمید.
ستون‌های ۴-۱: نمونه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از القا
ستون ۵: نمونه‌ی قبل از القا (پلاسمید فاقد M2)
ستون ۶: نمونه‌ی فاقد پلاسمید

رسوب باکتری القاشده و باکتری القانشده، الکتروفورز شد و سپس به کاغذ نیتروسلولز منتقل گردید و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال مطابق

روش گفته شده، تأیید شد (شکل ۴). همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در نمونه‌ی پروتئینی حاصل از رسوب باکتری در ناحیه‌ی حدود ۱۳ کیلودالتون یک باند پروتئینی مشاهده شد، در حالی که در نمونه‌ی شاهد چنین باندی نبود.

در این مطالعه برای بیان پروتئین M2 در باکتری سویه‌ی M15، از غلظت‌های مختلف IPTG جهت القای تولید پروتئین استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که بالاترین میزان تولید پروتئین در غلظت نیم میلی‌مولار IPTG، حاصل گردید. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود بالاترین میزان تولید پروتئین ۴ ساعت پس از القا حاصل شد. البته بیان پروتئین پس از گذشت یک شب هم مورد مطالعه قرار گرفت که نتیجه‌ی الکتروفورز آن کاهش بیان پروتئین را نشان داد.



شکل ۴. نتیجه‌ی Western blot پروتئین M2
ستون ۱: رسوب پروتئینی ۴ ساعت بعد از القا با IPTG
ستون ۲: نمونه‌ی شاهد منفی (پلاسمید فاقد M2)

بحث

ویروس‌های آنفلوانزا، عامل اصلی ایجاد بیماری‌های تنفسی و مرگ و میر ناشی از آن به حساب می‌آیند. موارد عفونت گاهی به طور اپیدمی در سراسر جهان انتشار می‌یابد. واکسن‌ها مؤثرترین راه پیشگیری از عفونت ویروس آنفلوانزا هستند، اما با توجه به ویژگی تغییرات آنتی‌ژنی دریفت و شیفت در ویروس‌های آنفلوانزا، امر پیشگیری با روش واکسیناسیون همواره با مشکل روبرو بوده است (۵). هر ساله سازمان جهانی بهداشت اطلاعات مربوط به شیوع آنفلوانزا در سراسر جهان را گردآوری می‌کند و با استفاده از آن، سویه‌ی ویروسی جهت ساخت واکسن در سال آینده را معرفی می‌کند. واکسن‌های ویروس غیر فعال‌شده و واکسن‌های ویروس زنده‌ی ضعیف‌شده از واکسن‌های مرسوم آنفلوانزا به شمار می‌آیند. در سال ۱۹۴۰ برای اولین بار، فرمولاسیون واکسن ویریون کامل غیر فعال‌شده مورد آزمایش قرار گرفت و تا امروز نیز مصرف می‌شود. واکسن غیر فعال‌شده‌ی ویروس نمی‌تواند آنتی‌بادی IgA موضعی ایجاد کند و یا پاسخ‌های ایمنی سلولی را تحریک کند. همچنین به علت این که نژادهای منتخب برای واکسن، در تخم مرغ جنین‌دار کشت داده می‌شوند و ویروس نیز از مایع آلانتوییک برداشت می‌شود، وجود آنتی‌ژن‌های پروتئینی تخم مرغ عوارضی را برای افراد با سابقه‌ی آلرژی به پروتئین موجود در تخم مرغ، به همراه دارد. در مقابل، واکسن‌های ویروسی زنده‌ی ضعیف‌شده توانایی تولید آنتی‌بادی خنثی‌کننده و ایجاد پاسخ ایمنی سلولی را دارد. اما این واکسن نیز دارای محدودیت‌هایی می‌باشد، از جمله این که برای ایجاد پاسخ‌های ایمنی مطلوب، دو نوبت تجویز واکسن لازم است. همچنین این واکسن به دلیل پتانسیل خطر ناشی از حضور یک ویروس زنده، در کودکان زیر ۲ سال و بالغین بالای ۵۰ سال تجویز نمی‌شود. به علاوه، تولید این واکسن‌ها نیازمند طی

مراحل دشواری می‌باشد و از نظر طول مدت تولید نیز، همانند واکسن‌های غیر فعال وقت‌گیر است (۴-۲).

نگرانی ناشی از بروز پاندمی حاصل از بازآرایی ژن‌های ویروس انسانی و ویروس فوق حاد پرندگان و همچنین بروز پاندمی غیر قابل انتظار ۲۰۰۹، محققین را بر آن داشت تا با استفاده از پروتئین‌های حفاظت‌شده‌ی ویروس به مقابله برخیزند. انتظار می‌رود ایمنی ایجادشده به واسطه‌ی واکسیناسیون با پروتئین‌های فوق به عنوان اولین سد دفاعی عمل می‌کند و با راه‌اندازی ایمنی وسیع‌الطیف تا آماده شدن واکسن ویژه‌ی سویه، جامعه را در برابر بیماری حاد آنفلوانزا محافظت نماید. از میان پروتئین‌های ویروس، پروتئین M2 در بین گونه‌های مختلف ویروس بسیار حفاظت شده است و در مطالعات مختلف پیرامون تولید واکسن واحد، به گستردگی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۴-۱۳، ۵). این پروتئین در عفونت طبیعی پاسخ‌های ایمنی ضعیفی ایجاد می‌کند که محافظت‌بخش نیست (۸)، ولی در عین حال مطالعات نشان داده است که آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی ناحیه‌ی N ترمینال این پروتئین می‌تواند حیوانات را در برابر چالش کشنده با ویروس آنفلوانزا حفاظت نماید (۶). پس راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی بر ضد این پروتئین ویروسی می‌تواند به حفاظت میزبان در برابر ویروس‌های آنفلوانزای موجود و نیز ویروس‌های نوپدید منجر شود.

مطالعات اخیر نشان داده است که پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا می‌تواند با تحریک پاسخ‌های ایمنی مناسب، حیوانات مورد مطالعه را در مقابل تیپ‌های مختلف آنفلوانزا محافظت نماید. این نتایج امیدهایی را در زمینه‌ی توسعه‌ی بیشتر این نوع واکسن در آینده‌ی نزدیک برای مقابله با آنفلوانزای فصلی و پاندمیک، ایجاد کرده است (۱۶-۱۳).

این پروتئین به شکل نوترکیب در سیستم‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی مختلف تهیه گردیده و ایمنی‌زایی آن‌ها در مدل‌های حیوانی تأیید شده است. اسقایی و همکاران ژن M2 ویروس H1N1 را در پلاسمید pcDNA کلون کردند و بیان پروتئین را در سلول‌های مختلف یوکاریوتی ارزیابی کردند (۱۷).

همچنین در سال ۲۰۰۹ یک واکسن ویروس آنفلوانزای خوکی (SIV)، برای مطالعه‌ی کارایی واکسن پروتئین M2 تنها یا در ترکیب با یک واکسن H1N1، برای محافظت در مقابل ویروس‌های H1N1 و H1N2، در مدل خوکی استفاده شد. در این مطالعه مشخص شد که پروتئین M2 تولیدشده در سلول‌های حشره می‌تواند از بیماری آنفلوانزای خوکی در حیوانات واکسینه‌شده (موش، موش خرما و میمون رزوس) ممانعت به عمل آورد (۱۶).

با توجه به عدم نیاز پروتئین M2 به تغییرات گسترده پس از ترجمه، می‌توان از سیستم پروکاریوت برای تولید آن بهره برد. بیان پروتئین نوترکیب در این سیستم ساده، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و بسیار کارآمد می‌باشد (۱۹-۱۸). به همین دلیل در این پژوهش از باکتری E.coli به عنوان میزبان، برای تولید پروتئین M2 استفاده شد.

تاکنون این پروتئین در سیستم‌های پروکاریوتی متعددی بیان شده است. Wang و همکاران موفق به تولید پروتئین M2 سویه‌ی H3N2 ویروس آنفلوانزای نوع A در سلول پروکاریوتی شدند. آن‌ها پس از کلون کردن ژن M2 در وکتور بیانی pET28a (+) و انتقال وکتور نوترکیب به باکتری E.coli سویه‌ی

BL21 (DE3)، پروتئین حاصله را جهت ارزیابی ایمنی‌زایی در مدل حیوانی رت به کار بردند (۲۰).

در مطالعه‌ی حاضر از وکتور بیانی pQE30 جهت تولید پروتئین نوترکیب M2 در سلول‌های باکتری E.coli استفاده شد. علت به کارگیری این وکتور بیانی این بود که علاوه بر برخورداری از اندازه‌ی کوچک (۳/۴ کیلو دالتون)، دست‌کاری آن نیز آسان بود. ساختار این پلاسمید شامل رپلیکون و ژن کدکننده‌ی آمپی‌سیلین از PBR322، پروموتور قوی فاژ T5 و دنباله‌ی هیستیدینی می‌باشد. در این وکتور ژن هدف بلافاصله بعد از ناحیه‌ی کدکننده‌ی هیستیدین‌ها جای‌سازی می‌گردد. بنابراین در مقایسه با سایر وکتورهای مشابه، تعداد اسیدهای آمینه‌ای که به پروتئین به دست آمده اضافه می‌شود بسیار اندک است. باکتری E.coli سویه‌ی M15 به عنوان سلول میزبان برای بیان پروتئین خارجی، به طور اختصاصی با وکتور PQE30 منطبق شده است. پروتئین بیان‌شده در میزبان فوق به طور معمول دارای پایداری خوبی است و به آسانی توسط پروتئازهای باکتریایی تجزیه نمی‌شود و به سهولت با روش کروماتوگرافی رزین Ni-NTA تخلیص می‌گردد (۲۱).

در زمینه‌ی تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از پلاسمید pQE30 مطالعات مختلفی صورت گرفته است. Xu و همکاران توانستند با استفاده از وکتور بیانی pQE30، بیان بالایی از پپتید هیبرید 2 magainin Cecropin A را با یک Ubiqitin در باکتری E.coli سویه‌ی M15 به دست آورند. بیان این پپتید به عنوان اولین مورد بیان پپتید آنتی‌باکتریایی هیبرید ادغام شده با Ubiqitin در E.coli گزارش گردید (۲۲).

خیراندیش و همکاران با کلون کردن ژن آنزیم Pteridine reductase 1 در پلاسمید pQE30، و بیان این پروتئین در E.coli سویه‌ی M15 به عنوان میزبان، موفق شدند بعد از فرایند تخلیص پروتئین، از آن برای ادامه‌ی تحقیقات خود استفاده کنند (۲۳). همچنین بوالحسنی و همکاران نیز برای بیان پروتئین‌های نوترکیب HPV16 E7 و GP96 ویروس پاپیلومای انسانی، از این وکتور استفاده کردند. آن‌ها پروتئین‌های به دست آمده را در مطالعه‌ای در زمینه‌ی تعیین و جستجو برای مارکرهای سرولوژیک در بیماران مبتلا به سرطان دهانه‌ی رحم مرتبط با پاپیلوما ویروس به کار بردند (۲۴).

با استفاده از نرم‌افزار Quantity one میزان تولید پروتئین در این مطالعه در حدود ۷/۵ درصد از کل پروتئین باکتریایی، تخمین زده شد. در گام‌های بعدی مطالعه پروتئین‌های کایمر واجد ژن M2 و یا ناحیه‌ی خارج سلولی آن همراه با پروتئین‌های واسطه‌ی ایمنی نظیر HSP70 تولید خواهند شد و با استفاده از ادجوانت‌های مورد تأیید، در مدل حیوانی مورد بررسی قرار خواهند گرفت. امید است با استفاده از سازه‌های مختلف پروتئین M2 بتوان راه رسیدن به واکسن واحد، آنفلوانزا را هموارتر نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی می‌باشد و با پشتیبانی مالی طرح پژوهشی مصوب انستیتو پاستور ایران به شماره‌ی ۶۱۱ اجرا گردیده است.

References

1. Sui Z, Chen Q, Wu R, Zhang H, Zheng M, Wang H, et al. Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of M2-based vaccine with chitosan as an adjuvant. Arch Virol 2010; 155(4): 535-44.
2. Lang PO, Samaras D, Samaras N, Govind S, Aspinall R. Influenza vaccination in the face of immune exhaustion: is herd immunity effective for protecting the elderly? Influenza Res Treat 2011; 2011: 419216.
3. Drummond JE, Shaw EE, Antonello JM, Green T, Page GJ, Motley CO, et al. Design and optimization of a multiplex anti-influenza peptide immunoassay. J Immunol Methods 2008; 334(1-2): 11-20.
4. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelbergs medical microbiology. 24th ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2007. p. 638-51.
5. Du L, Zhou Y, Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. Microbes Infect 2010; 12(4): 280-6.
6. Fu TM, Freed DC, Horton MS, Fan J, Citron MP, Joyce JG, et al. Characterizations of four monoclonal antibodies against M2 protein ectodomain of influenza A virus. Virology 2009; 385(1): 218-26.
7. Betakova T. M2 protein-a proton channel of influenza A virus. Curr Pharm Des 2007; 13(31): 3231-5.
8. Fu TM, Grimm KM, Citron MP, Freed DC, Fan J, Keller PM, et al. Comparative immunogenicity evaluations of influenza A virus M2 peptide as recombinant virus like particle or conjugate vaccines in mice and monkeys. Vaccine 2009; 27(9): 1440-7.
9. Ebrahimi SM, Tebianian M, Aghaiypour K, Nili H, Mirjalili A. Prokaryotic expression and characterization of avian influenza A virus M2 gene as a candidate for universal recombinant vaccine against influenza A subtypes; specially H5N1 and H9N2. Mol Biol Rep 2010; 37(6): 2909-14.
10. Ellebedy AH, Webby RJ. Influenza vaccines. Vaccine 2009; 27(Suppl 4): D65-D68.
11. Huleatt JW, Nakaar V, Desai P, Huang Y, Hewitt D, Jacobs A, et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. Vaccine 2008; 26(2): 201-14.
12. Zhao G, Du L, Xiao W, Sun S, Lin Y, Chen M, et al. Induction of protection against divergent H5N1 influenza viruses using a recombinant fusion protein linking influenza M2e to Onchocerca volvulus activation associated protein-1 (ASP-1) adjuvant. Vaccine 2010; 28(44): 7233-40.
13. Tompkins SM, Zhao ZS, Lo CY, Misplon JA, Liu T, Ye Z, et al. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. Emerg Infect Dis 2007; 13(3): 426-35.
14. Ameiss K, Ashraf S, Kong W, Pekosz A, Wu WH, Milich D, et al. Delivery of woodchuck hepatitis virus-like particle presented influenza M2e by recombinant attenuated Salmonella displaying a delayed lysis phenotype. Vaccine 2010; 28(41): 6704-13.
15. de Filette M, Martens W, Smet A, Schotsaert M, Birkett A, Londono-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.
16. Kitikoon P, Vincent AL, Janke BH, Erickson B, Strait EL, Yu S, et al. Swine influenza matrix 2 (M2) protein contributes to protection against infection with different H1 swine influenza virus (SIV) isolates. Vaccine 2009; 28(2): 523-31.
17. Esghaei M, Monavari SH, Tavassoti-Kheiri M, Shamsi-Shahrabadi M, Heydarchi B, Farahmand B, et al. Expression of the influenza M2 protein in three different eukaryotic cell lines. J Virol Methods 2012; 179(1): 161-5.
18. Hannig G, Makrides SC. Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli. Trends Biotechnol 1998, 16(2): 54-60
19. Holsinger LJ, Shaughnessy MA, Micko A, Pinto LH, Lamb RA. Analysis of the posttranslational modifications of the influenza virus M2 protein. J Virol 1995; 69(2): 1219-25.
20. Wang X, Chen P, Shen Y, Qiu Y, Deng X, Shi Z, et al. Characterization of M2 gene of H3N2 subtype swine influenza virus. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2010; 26(1): 16-21. [In Chinese].
21. Liu Z, Liu Sh, Li Y, Fang X. Heterologous expression and purification of Cry1Ac22 toxin from Bacillus thuringiensis W015-1. Bioscience Methods 2013; 1(2): 9-14.
22. Xu X, Jin F, Yu X, Ren S, Hu J, Zhang W. High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) with an ubiquitin fusion partner in Escherichia coli. Protein Expr Purif 2007; 55(1): 175-82.
23. Kheirandish F, Bandehpour M, Haghighi A,

Taghikhani M, Nahavandian B, Rafati S. Antibody detection against HPV16 E7 & GP96 fragments as biomarkers in cervical cancer patients. Indian J Med Res 2009; 130(5): 533-41.

Mahboudi F, Mohebali M, Mosaffa N, et al. Molecular cloning and expression of Iranian leishmania major pteridine reductase 1. Iran J Parasitol 2008; 3(2): 1-9.

24. Bolhassani A, Zahedifard F, Taslimi Y,

Journal of Isfahan Medical School
Received: 26.10.2012
Vol. 30, No. 216, 2nd Week, February 2013
Accepted: 22.12.2012

Expression of M2 Protein of Human Influenza Virus in Escherichia Coli

Mohammad Ali Alavi Esfahani MSc[1], Fatemeh Fotouhi PhD[2], Amir Ghaemi PhD[3], Maryam Saleh MSc[4], Siavash Chalabiani MSc[1], Behrokh Farahmand PhD[2], Masoumeh Tavasoti Kheiri PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Influenza A virus is an orthomyxovirus capable of infecting humans. The virus genome consists of eight negative single-strand RNA segments that encode structural and nonstructural viral proteins. M2, a disulfide-linked homotetramer and a membrane-bound protein, is conserved among all influenza A viruses. Therefore, it is an appropriate target for the development of influenza vaccine with broad-spectrum protection. In this study, M2 protein of influenza virus A was expressed in a prokaryotic system.

Methods: M2 gene of influenza virus A (New Caledonia/20/99, H1N1) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. It was then digested with appropriate enzymes and cloned into the prokaryotic expression vector pQE30. The *Escherichia coli* (M15) competent cells were transformed with recombinant plasmid (pQE30-M2) and grown in LB broth media overnight after being induced by isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The media were supplemented with 50 mg/ml ampicillin and 50 mg/ml kanamycin. Expression of the M2 protein was approved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis.

Findings: The results of colony PCR, restriction enzyme digestion, and sequencing revealed that M2 gene was cloned in pQE30 properly in frame to histidine tag. Protein expression was confirmed in western blotting using specific monoclonal anti-M2 antibody.

Conclusion: Experiments in animal models have shown M2-based vaccines to induce broad spectrum immunity against various influenza A viruses. Thus, the M2 protein prepared in this study will be a suitable vaccine candidate to be evaluated in further studies on animal models.

Keywords: M2 protein, Vaccine, Protein expression, Influenza virus, Escherichia coli

Citation: Alavi Esfahani MA, Fotouhi F, Ghaemi A, Saleh M, Chalabiani S, Farahmand B, et al. **Expression of M2 Protein of Human Influenza Virus in Escherichia Coli.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(216): 2091-102

1- Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
2- Assistant Professor, Department of Virology, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Medical Virology and Immunology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
4- Department of Virology, Influenza Research Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Fatemeh Fotouhi PhD, Email: fotouhi@pasteur.ac.ir