DOI: 10.22122/jims.v39i617.13912 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۱۷/هفته‌ی اول خرداد ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۳ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۳/۷

بیان نوترکیب پروتئین هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا A (H1N1) خوکی سویه‌ی ایرانی در رده‌ی سلولی حشره با استفاده از سیستم باکولوویروس

سارا زحمتی[۱]، مهدی مهدوی[۲]، مرتضی تقی‌زاده طرنابی[۳]، ستاره حقیقت[۴]، رضا جلالی‌راد[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ویروس آنفلوانزا، عامل بیماری آنفلوانزا است که به علت ایجاد اپیدمی‌های سالانه در بین طیف وسیعی از میزبان حیوانی و انسانی مورد توجه بوده است. هدف از انجام این مطالعه، بیان مؤثر و قوی پروتئین نوترکیب هماگلوتینین سویه‌ی ایرانی ویروس آنفلوانزا A(H1N1) خوکی در رده‌ی سلولی حشره‌ی Sf9 به کمک سیستم بیانی باکولوویروس بود.

روش‌ها: ژن هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا H1N1 خوکی با پرایمر اختصاصی حاوی توالی آنزیم‌های برشی تکثیر و کلون گردید و سپس به منظور تولید یک بکمید نوترکیب با استفاده از سیستم Bac-to-Bac به سلول DH10Bac انتقال داده شد. بیان و فعالیت پروتئین نوترکیب در سلول با استفاده از تکنیک‌های مولکولی مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: تولید ژن هماگلوتینین به طول ۱۷۰۱ جفت‌باز تأیید و سلول حشره بعد از دریافت بکمید نوترکیب، پروتئینی به وزن تقریبی ۶۶ کیلودالتون را بیان نمود. اندازه‌ی سلول‌های آلوده شده و هسته آن‌ها افزایش یافت و با ایجاد ظاهر گرانولار، از سطح فلاسک کشت سلول جدا شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از عفونت، سلول‌های آلوده، با جذب گلبول‌های قرمز جوجه، به شکل تجمعات سلولی ظاهر شدند. عدم تشکیل کلامپ سلولی، نشان از صحت آزمون و مهار فعالیت هماددسورپشن بود. مقدار پروتئین حاصل معادل ۱۰/۷۶ میکروگرم بر ۱۰۰ میکرولیتر معادل ۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر گزارش شد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج سیستم بیانی باکولوویروس، قادر به بیان پروتئین نوترکیب در سلول حشره بود و بنابراین، راه حل مناسبی برای جایگزین کردن آن به عنوان نسل جدید واکسن به جای واکسن‌های مبتنی بر تخم مرغ و یا کشت سلول می‌باشد.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا H1N1؛ هماگلوتینین؛ حشره؛ باکولوویروس؛ واکسن

ارجاع: زحمتی سارا، مهدوی مهدی، تقی‌زاده طرنابی مرتضی، حقیقت ستاره، جلالی‌راد رضا. **بیان نوترکیب پروتئین هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا A (H1N1) خوکی سویه‌ی ایرانی در رده‌ی سلولی حشره با استفاده از سیستم باکولوویروس.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۱۷): ۱۸۸-۱۸۱.

مقدمه

بیماری عفونی آنفلوانزا، یک بیماری بسیار مسری و شایع دستگاه تنفسی و دارای اهمیت جهانی است. عامل این بیماری، ویروس آنفلوانزا A می‌باشد (۱) که به علت طیف وسیع میزبانی (حیوان، انسان و به خصوص پرندگان و ...) و همچنین، سرعت انتشار بالا، از اهمیت ویژه‌ای در کل دنیا برخوردار است (۲). در سه قرن اخیر، بالغ بر ده پاندمی رخ داده است که سه مورد آن تنها در قرن بیستم میلادی و در سال‌های ۱۹۱۸ (H1N1)، ۱۹۵۷ (H2N2) و ۱۹۶۸ (H3N3) بوده است (۳-۲). در آپریل ۲۰۰۹، یک گونه‌ی جدید آنفلوانزا پدیدار شد که ترکیبی از ژن‌های ویروسی آنفلوانزای پرندگان، خوک و انسان را با خود داشت؛ این گونه که در ابتدا، لقب آنفلوانزای خوکی را گرفت با نام آنفلوانزای

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات واکسن‌های نوترکیب، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- استادیار، بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- استادیار، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی، انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مهدی مهدوی؛ استادیار، مرکز تحقیقات واکسن‌های نوترکیب، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Email: mahdavivac@gmail.com

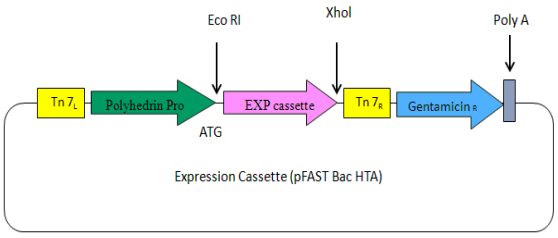
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

H1N1/A، برای اولین بار در مکزیک، ایالات متحده‌ی آمریکا و چند کشور دیگر پدیدار شد که سازمان بهداشت جهانی، وقوع یک پاندمی را در ۱۱ ژوئن ۲۰۰۹ به طور رسمی اعلام کرد (۴). آنتی‌ژن‌های اصلی سطح ویروس، دو گلیکوپروتئین هماگلوتینین و نورآمینیداز بودند که در اتصال، نفوذ و انتشار ویروس دخالت دارند (۳). از آن جایی که تغییرات آنتی‌ژنیکی این ویروس منجر به ظهور انواع مختلف آنفلوانزا شده است، از گذشته تا به امروز همواره برای مواجهه با همه‌گیری‌های این ویروس و بالا بردن سطح ایمنی جامعه، واکسن‌های اختصاصی مختلفی با عملکرد متفاوت تولید شده است که کارایی و اثرگذاری بهینه‌ی آن‌ها، منوط به تطابق بالای سویه‌ی تخلیص شده‌ی واکسن و سویه‌ی شایع در جمعیت انسانی بوده است (۵). از واکسن‌های متداول به نوع غیر فعال شده و واکسن زنده‌ی تخفیف حدت یافته می‌توان اشاره کرد. واکسن‌هایی که مبتنی بر ویروس کامل بودند و اغلب در افراد با نقص سیستم ایمنی و یا افراد سالخورده ایجاد عوارض جانبی شدید نموده‌اند و گاهی تزریق این واکسن‌ها، منجر به بروز یک آنفلوانزای شدید شده‌اند. از دیگر معایب این واکسن‌ها، صرف وقت و هزینه‌ی بالای تولید و همچنین، خطر تزریق و یا آلرژی بوده است که در پاندمی‌ها، قابل استفاده و تهیه نمی‌باشند (۵، ۱). دو نوع واکسن تحت لیسانس که از ویروس کشته شده و Split تهیه شده‌اند، دارای خاصیت آنتی‌ژنی بوده، اما عفونت‌زا نبوده است و با ایجاد ایمنی کوتاه مدت برای افراد، به ویژه افراد مسن، بسیار مؤثر هستند (۷-۶، ۱).

به این ترتیب، پژوهشگران تولید پروتئین نوترکیب را به عنوان یک راه حل سریع برای تولید واکسن سالانه معرفی کرده‌اند که عوارض و اشکالات استفاده از تخم‌مرغ و رده‌های نامیرای کشت سلولی را ندارند. این واکسن، علاوه بر سرعت بالای تولید، بسیار ایمن و مؤثر است و قادر به تحریک سیستم ایمنی هومورال و القای تولید آنتی‌بادی بر علیه هماگلوتینین می‌باشد و باعث عدم ایجاد عفونت می‌گردد (۸). در این مسیر، از سیستم Bac-to-Bac به عنوان وکتور بیانی استفاده می‌شود و این سیستم به تولید پروتئین بیشتری می‌انجامد. بنابراین، محتوای آنتی‌ژنی بالاتر است و این عاملی برای تحریک بیشتر و سریع‌تر سیستم ایمنی است و گزارش‌ها حاکی از این است که سیستم ایمنی هومورال و سلولی در برابر این گلیکوپروتئین تحریک می‌شود و ایمنی مؤثر ایجاد می‌کند (۹، ۱). پروتئین حاصل از این سیستم، ساختار بسیار مشابهی با پروتئین اصلی و همچنین، مشابهت بالا در مراحل پس از ترجمه و گلیکوزیلاسیون مناسب بر روی پروتئین، با سلول‌های یوکاریوتیک داشته است.

روش‌ها

اساس کار در این پژوهش تجربی، انتقال یک کاست بیانی به درون یک شاتل وکتور گرفته شده از باکولوویروس بود که می‌تواند در باکتری DH10Bac تکثیر پیدا کند. اولین جزء اصلی این سیستم، یک وکتور دهنده به نام پلاسمید pFastBacHTA است که دارای یک کاست بیانی است و ژن هماگلوتینین، در داخل آن تحت کنترل پروموتور پلی هیدرین کلون می‌شود. در دو طرف کاست بیانی پلاسمید، بازوهای چپ و راست Tn7 قرار دارد و همچنین، دارای ژن مقاومت در برابر جنتامایسین و یک سیگنال پلی A می‌باشد که مجموعه‌ی یک miniTn7 را تشکیل می‌دهد (شکل ۱). سویه‌ی خاصی از باکتری Escherichia coli به نام DH10Bac به عنوان میزبان پلاسمید نوترکیب استفاده شد. این باکتری، دارای یک شاتل وکتور باکولوویروسی به نام بکمید و یک پلاسمید کمکی می‌باشد. این بکمید با نام تجاری bMON14272 و واجد یک نشانگر مقاومت به کانامایسین؛ یک ریپلیکون mini-F و قطعه‌ای از DNA است که پپتید lacZα را کد می‌کند و در درون آن، یک محل، جهت اتصال ترانسپوزون باکتری (mini att-Tn7) وجود دارد. این بکمید در DH10Bac به صورت یک پلاسمید بزرگ تکثیر می‌شود و علاوه بر ایجاد مقاومت در برابر کانامایسین، می‌تواند فقدان lacZα روی کروموزوم باکتری را جبران کند و کلنی‌هایی را به وجود آورد که در حضور سوبسترای رنگی X-gal یا Blue-gal و القا کننده‌ی Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) به رنگ آبی دیده شود (۱۰).



شکل ۱. اجزای وکتور بیانی سیستم باکولوویروس Bac-to-Bac

کشت ویروس، استخراج RNA و تهیه‌ی Complementary DNA (cDNA): ابتدا ویروس آنفلوانزا خوکی سویه‌ی ایرانی (A/Iran/14068/2009 (H1N1) GenBank: HM581923.1) از بانک ویروس مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج تهیه و در تخم‌مرغ ده روزه Specific pathogen free (SPF) کشت شد و با استفاده از کیت استخراج RNA (Roche)، ژنوم ویروس جدا و پس از طراحی پرایمر اختصاصی Oligo v760، با استفاده از کیت اختصاصی

سنتز cDNA (Roche) دارای آنزیم پلیمراز معکوس M-MuLV، مطابق بروشور و با کمک آنزیم High fidelity DNA polymerase، cDNA ساخته شد. با روش الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد، نتیجه ارزیابی گردید. برای ازدیاد ژن و تأیید مولکولی، پرایمر فوروارد (حاوی جایگاه Eco RI برای کلونینگ) و پرایمر ریورس (دارای جایگاه Xhol و کدون خاتمه) طراحی گردید. ترادف پرایمرهای طراحی شده در زیر آمده است.

F:
5´GAATTCAAGGCCATCTTGGTGGTCCTGCTGTACACC 3´
R:
5´CTCGAGTTAGATGCAGATGCGGCACTGCAGGGAGCC 3´

ژنوم کامل هماگلوتینین، با استفاده از کیت استخراج، از ژل الکتروفورز استخراج گردید و بعد با آنزیم T4 DNA لیگاز (Fermentas)، بافر مخصوص و وکتور خطی شده، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۸-۴ درجه‌ی سانتی‌گراد مجاور گردید. در مرحله‌ی بعد، سلول‌های Top10 با روش کلسیم کلراید، مستعد گردید و مخلوط واکنش اتصال در مرحله‌ی قبل، در سلول باکتری، وارد شد. باکتری در محیط Luria Bertani agar (LB agar) فاقد آنتی‌بیوتیک کشت شد و پلیت، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی روتاتور قرار داده شد. پس از گذشت این مدت، از محتویات محیط کشت بر روی محیط کشت LB agar (HIMEDIA, India) حاوی تتراسیکلین (۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، آمپی‌سیلین (۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و القا کننده‌ی ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (۴۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و X gal (۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر 5-bromo-4-chloro-indoly1-β-D-galactopranoside) در کل سطح پلیت به صورت متشر، کشت داده شد. ورود ژن هماگلوتینین در ناحیه‌ی کد کننده‌ی lacZα در وکتور نوترکیب و عدم تجزیه‌ی X gal، باعث ظهور کلونی‌های سفید شد و برای استخراج پلاسمید از این کلونی‌ها استفاده گردید. آزمایش Polymerase chain reaction (PCR) با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و پلاسمید حاوی ژن پیش‌گفته و DNA ladder (Biofact 1kb plus cat.No.SM354-500) جهت تأیید، انجام گرفت و در پایان برای تعیین ترادف ارسال گردید.

جانمایی ژن هماگلوتینین در پلاسمید pFast Bac HTA جانمایی ژن هدف در پلاسمید دهنده‌ی pFast Bac HTA در پایین دست هیستیدینی صورت گرفت. ژن هماگلوتینین در نمونه‌ی حاصل از PCR و پلاسمید دهنده توسط آنزیم‌های محدود الاثر Xhol (Jena Bioscience) و Eco RI (Fermentas, Jena Bioscience) هضم شد تا دو انتهای ترادف‌ها با یکدیگر مکمل گردند. پس از انجام واکنش زنجیره‌ی پلیمراز، ژن‌ها از ژل آگارز، استخراج و پس از انتقال به باکتری میزبان Top10، در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. حضور پلاسمید pFastBac HTA حاوی ژن، با روش PCR تأیید گردید.

تولید بکمید نوترکیب: سلول DH10Bac مستعد شده، با ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید دهنده‌ی pFastBacHTA (حاصل از مرحله‌ی قبل) که حاوی یک پلاسمید کمکی است، آلوده‌سازی گردید. در مرحله‌ی انتهایی کلونینگ، بین عامل miniTn7 پلاسمید دهنده و عامل mini att-Tn7 بکمید، عمل جابه‌جایی (Transposition) صورت گرفت و کاست بیانی واجد ژن هماگلوتینین در درون بکمید قرار گرفت. مانند مرحله‌ی قبل، کلونی‌های سفید حاصل، در پلیت دارای این آنتی‌بیوتیک‌ها کشت و برای جداسازی بکمید (BioFact)، مورد استفاده قرار گرفتند. برای تأیید انتقال صحیح ژن هدف داخل بکمید، از روش PCR –با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن و پرایمرهای M13 (Signagen) که ناحیه‌ی مکمل آن در دو طرف محل ترانسپوزون در ناحیه‌ی lacZα در بکمید نوترکیب قرار دارد– استفاده شد.

pUC/M13 Forward:
5´-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG- 3´
pUC/M13 Reverse:
5´-AGCGGATAACAATTTCACACAGG- 3´

رده‌ی سلولی حشره (Sf9) و آلوده‌سازی (Transfection): رده‌ی سلولی Sf9 (رده‌ی سلولی تخمدان حشره‌ی Spodoptera Frugiperda) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری و در محیط اختصاصی گریس (Gibco, UK) کشت داده شد. با روش الکتروپوراسیون (۱۱)، پلاسمید وارد سلول‌های Sf9 شد و به منظور تکثیر ویروس در سلول‌های عفونی شده، ۶ روز انکوباسیون در دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد اعمال و به طور روزانه، سلول‌ها از نظر بروز اثرات سایتوپاتیک، بررسی شدند.

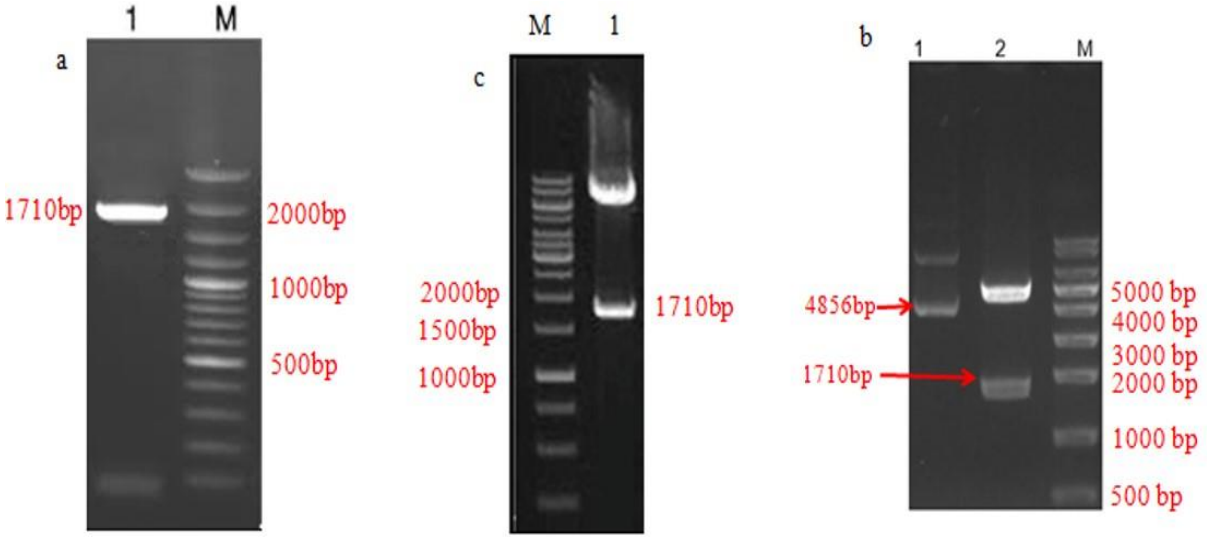
سنجش جذب سطحی و ممانعت از جذب سطحی: از آن جایی که سلول‌های بیان کننده‌ی هماگلوتینین سطحی، قادر به جذب اریتروسیت هستند، از آزمایش جذب سطحی (Hemadsorption) جهت بررسی و ارزیابی آن استفاده شد. محلول رویی فلاسک‌های کشت سلولی محتوی سلول Sf9 آلوده به باکولوویروس نوترکیب سه مرتبه با Phosphate buffered saline (PBS) استریل با pH معادل ۷/۱ شسته شدند. سلول‌های آلوده و غیر آلوده با گلبول قرمز جوجه ۰/۵ درصد در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه و پس از گذشت این زمان، ۶ مرتبه با PBS سرد، شسته و توسط میکروسکوپ معکوس (Olympus, Japan) مشاهده شدند. برای بررسی ممانعت از جذب سطحی، ابتدا باکولوویروس نوترکیب، با آنتی‌بادی Anti H1 پلی‌کلونال (Harbin, China) مجاور گردید (۹۰ دقیقه، ۳۷ درجه)؛ سپس مخلوط حاصل، برای تزریق به سلول Sf9 استفاده شد و میزان ممانعت از جذب سطحی با استفاده از خون جوجه بعد از ۲ روز با میکروسکوپ بررسی گردید.

سنجش هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون: ۵۰ میکرولیتر از محلول لیزات سلول آلوده با مقدار مساوی از PBS به صورت سریالی رقت‌سازی و با همان مقدار از Red blood cells (RBCs) جوجه در پلیت ۹۶ خانه مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، انکوبه و سپس میزان آگلوتیناسیون گلبول قرمز جوجه گزارش گردید. بالاترین رقتی که در آن آگلوتیناسیون قابل مشاهده باشد، تیتر مورد نظر است. در بررسی تست ممانعت از هماگلوتیناسیون، میزان ۵۰ میکرولیتر از پروتئین نوترکیب (8 HAU) با دو برابر آنتی‌سرم H1 به طور سریالی رقت‌سازی و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از افزودن خون جوجه ۰/۵ درصد و انکوباسیون مجدد، آخرین رقت فاقد آگلوتیناسیون قابل مشاهده، به عنوان تیتر محاسبه گردید.

تخلیص پروتئین بیان شده در سلول حشره: پس از چند سری کشت سلول حشره، با استفاده از کیت تخلیص پروتئین، پروتئین مورد نظر استخراج و غلظت آن با دستگاه نانودراپ (Epoch, BioTek U.S) اندازه‌گیری شد. محتویات فلاسک حاوی سلول آلوده به ویروس، سانتریفیوژ و به رسوب باقی مانده، ۴ میلی‌لیتر از بافر لیز اضافه گردید. سپس، محلول حاصل، تحت عمل سونیکاسیون، توسط دستگاه مربوط بر اساس شیوه‌نامه (۱۰ مرتبه با فواصل ۸ و ۱۰ ثانیه، ۸۰ آمپلی‌تود) قرار گرفت. برای تخلیص پروتئین از سلول‌های Sf9، از ژل Ni-NTA در ستون کروماتوگرافی استفاده و پروتئین حاصل، با دور g × ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، با PBS سرد، ۳ مرتبه شستشو و پلت انتهایی در بافر لیز شامل ۳۰۰ میلی‌مول کلرید سدیم، ۲۰ میلی‌مولار Tris HCl (pH = ۸)، Triton X-100 ۱ درصد و Protease inhibitor cocktail × ۱ به شکل سوسپانسیون تهیه و پس از انکوباسیون (۳۰ دقیقه روی یخ)، با دور g × ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پلت باقی مانده از سلول‌های آلوده، روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد جداسازی و سپس، روی غشای نیتروسلولزی برای انجام آزمون Western blot با آنتی‌بادی His tag (آنتی‌بادی اولیه) و آنتی‌بادی کونژوگه با HRP (آنتی‌بادی ثانویه) جهت بررسی و تأیید پروتئین، منتقل شد. برای سنجش میزان پروتئین، روش لوری با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر، انتخاب گردید.

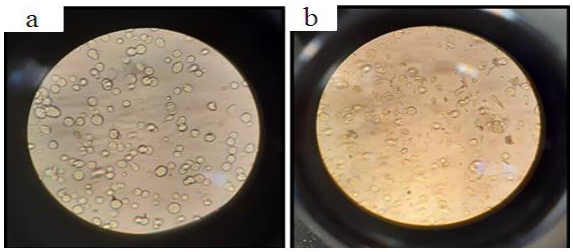
یافته‌ها

کلونینگ قطعه هماگلوتینین به پلاسمید pFastBacHTA: قطعه ژن هماگلوتینین با پرایمرهای اختصاصی و با استفاده از ناقل پلاسمیدی اصلی تکثیر و قطعه‌ی مورد نظر (۱۷۰۱ جفت باز) روی ژل آگارز تأیید شد (شکل ۲a). قطعه‌ی تکثیر شده با آنزیم‌های EcoRI و XhoI هضم شد و در pFastBac HTA کلون گردید. صحت کلونینگ توسط آزمون PCR تأیید و سپس با هضم آنزیمی با همان آنزیم‌های مورد استفاده در کلونینگ، مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲b). در ادامه، پس از انتقال پلاسمید pFastBac HTA به داخل باکتری DH10Bac، کلونی‌های سفید با PCR تأیید شد (شکل ۲c). پس از استخراج وکتور توسط کیت تجاری، غلظت محصول استخراج شده در اسپکتوفتومتر برابر ۱۸/۹۸ نانوگرم/میکرولیتر بود.



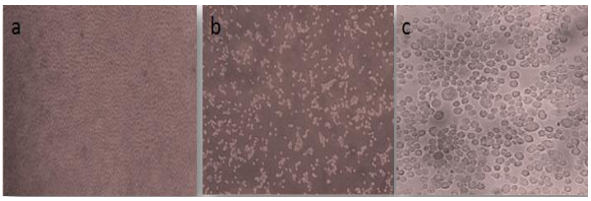
شکل ۲. نتایج تکثیر و شبیه‌سازی Polymerase chain reaction (PCR). a. ۱: ژن HA در cDNA H1N1، ۱۷۱۰ جفت باز، M: لدر (Biofact 1kb plus cat.No.SM354-500)؛ b. ۱: وکتور شاهد (۴۸۵۶ جفت باز)، ۲: هضم pFast Bac HTA نوترکیب با XhoI و EcoRI 4856bp به همراه ۱۷۱۰ جفت‌باز (ژن HA)؛ c. ۱: تأیید PCR ناقل شبیه‌سازی شده با ژن HA، M لدر (Biofact 1kb plus cat.No.SM354-500)

تأیید آلوده‌سازی (Transfection): علایم سایتوپاتیک در سلول‌های حشره‌ی آلوده به بکمید نوترکیب، به وضوح قابل مشاهده است (شکل ۳). در ۲۴ ساعت اول پس از آلوده‌سازی، رشد سلول‌ها در مقایسه با شاهد به طور تقریبی متوقف شد. اندازه‌ی کلی و همچنین، اندازه‌ی هسته‌ی آن‌ها افزایش و ظاهر گرانولار پیدا کرد و سلول‌ها از سطح فلاسک کشت سلول جدا شدند.



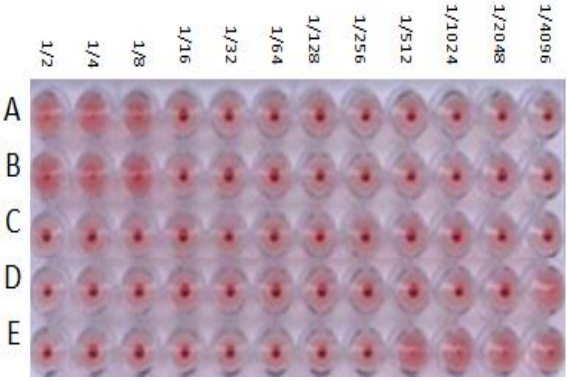
شکل ۳. a: Sf9 قبل از ترانسفکت شدن؛ b: سلول Sf9 ترانسفکت شده با بکمید

ارزیابی فعالیت‌های بیولوژیکی پروتئین نوترکیب هماگلوتینین بیان شده در سطح سلول: از آن جایی که سلول‌های بیان کننده‌ی هماگلوتینین سطحی، قادر به جذب اریتروسیت می‌باشند، از روش جذب سطحی جهت بررسی و ارزیابی آن استفاده شد (۱۲). سلول‌های غیر آلوده در مجاورت با RBCs جوجه، سالم ماندند و هیچ گونه تغییری مشاهده نشد (شکل ۴a)، اما پس از گذشت ۴۸ ساعت بعد از عفونت، سلول‌های آلوده گلبول‌های قرمز جوجه را جذب نمودند و به شکل تجمعات سلولی ظاهر شدند (شکل ۴b). این نتایج نشان داد که پروتئین ریکامبینت هماگلوتینین بیان شده در سلول، از نظر بیولوژیک فعال بوده و قابلیت جذب سطحی را داشته است. برای تأیید این نتایج، سلول‌های آلوده با پروتئین نوترکیب با آنتی‌سرم اختصاصی Anti H1 مجاور شد و عدم تشکیل تجمع سلولی نشان از صحت آزمون و مهار فعالیت جذب سطحی بود (شکل ۴c).



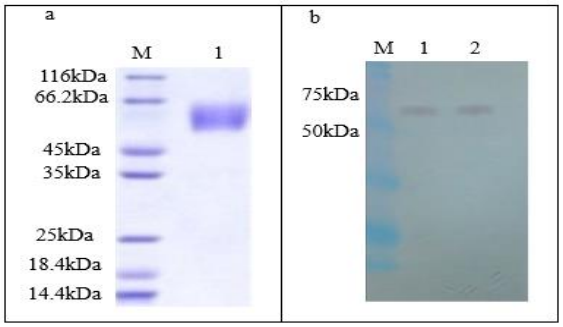
شکل ۴. سنجش فعالیت همادسورپشن و مهار همادسورپشن. a: سلول‌های غیر آلوده در Phosphate buffered saline (PBS)؛ b: سلول‌های آلوده با باکولوویروس ریکامبینت و جذب سطحی اریتروسیت جوجه؛ c: ممانعت از هماگلوتیناسیون و مهار جذب سطحی گلبول‌های قرمز جوجه پس از گذشت ۴۸ ساعت بعد از عفونت. سلول‌های آلوده و غیر آلوده به مدت ۱ ساعت با گلبول قرمز جوجه ۰/۵ درصد انکوبه شدند، پس از سه مرتبه شستشو با PBS، گلبول‌های قرمز آزاد حذف و با میکروسکوپ اینورتر نتایج ارزیابی شد.

برای تجزیه و تحلیل بیشتر فعالیت بیولوژیکی هماگلوتینین آنفلوانزا، در سلول‌های Sf9 آلوده و غیر آلوده از روش هماگلوتیناسیون استفاده شد. برای این کار، سلول‌ها با خون جوجه ۰/۵ درصد انکوبه شدند. در ردیف سلول‌های آلوده (شکل ۵ ردیف‌های A و B) در چاهک با رقت ۱/۱۶، آگلوتیناسیون مشاهده گردید، اما هیچ آگلوتیناسیونی در نمونه‌ی غیر آلوده (شکل ۵ ردیف‌های C و D) مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که آنتی‌بادی اختصاصی به طور انتخابی به سایت‌های آنتی‌ژنیک مولکول هماگلوتینین باند می‌شود و منجر به غیر عفونی‌سازی ویروس آنفلوانزا می‌گردد. برای ارزیابی خاصیت آنتی‌ژنیسیتی ویروس H1N1 خوکی، آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون انجام شد. سلول‌های آلوده با مقادیر استاندارد از آنتی‌سرم H1 و گلبول قرمز جوجه، به طور مؤثر قادر به ممانعت از عمل هماگلوتیناسیون آنتی‌ژن هماگلوتینین نوترکیب سطح سلولی بوده و تیتر بالای ۱/۵۱۲ را ایجاد نموده است (شکل ۵ ردیف E).



شکل ۵. هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون. ردیف‌های A و B: فعالیت هماگلوتیناسیون سلول‌های آلوده در مجاورت گلبول قرمز جوجه (۰/۵ درصد) که به طور سریالی رقیق شده است و تیتر ۱/۱۶ را نشان می‌دهد. ردیف‌های C و D: شاهد منفی (سلول غیر آلوده به علاوه‌ی گلبول قرمز جوجه (۰/۵ درصد). ردیف E: سنجش آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (سلول‌های آلوده در حضور آنتی‌سرم H1 و گلبول قرمز جوجه (۰/۵ درصد) که تیتر ۱/۵۱۲ را نشان می‌دهد (آزمایش HA و نمونه‌ی شاهد به صورت دوپلیکیت گذاشته شده است).

روش‌های Western blot و SDS PAGE پس از خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون Ni–NTA به ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد برای انجام آزمایش Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)، منتقل شد و باند با وزن مولکولی تقریبی ۶۶ کیلودالتون روی ژل نمایان شد (شکل ۶a) و سپس، به غشای نیتروسلولز برای انجام Western blot انتقال داده شد (شکل ۶b).

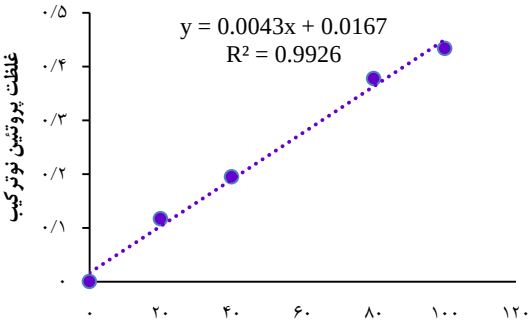


شکل ۶. روش‌های Western blot و Sodium dodecyl sulphate– polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE).
a: SDS PAGE ردیف M لدر و ردیف 1 پروتئین نوترکیب (۶۴ کیلودالتون)؛ b: Western blot ردیف M لدر، ردیف 1 شاهد مثبت، ردیف ۲ پروتئین نوترکیب

تعیین غلظت پروتئین نوترکیب با روش لوری: پس از تخلیص پروتئین و خوانش جذب نوری توسط اسپکتروفوتومتر، نتیجه‌ی حاصل در برنامه‌ی Excel با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (شکل ۷).

$$y=0.0043x+0.0167;\ x=\frac{0.063-0.0167}{0.0043};\ x=10.76$$

مقدار پروتئین حاصل معادل ۱۰/۷۶ میکروگرم/۱۰۰ میکرولیتر و معادل ۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود. از طرفی، چون رقت ۱/۲ بود، بنابراین عدد حاصل در ۲ ضرب شد و مقدار پروتئین مربوط معادل ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر محاسبه شد.



شکل ۷. غلظت پروتئین هماگلوتینین به دست آمده پس از تخلیص

بحث

واکسیناسیون یک راه مؤثر برای مبارزه با بیماری عفونی آنفلوانزا می‌باشد. بیش از ۵۰ سال است که از واکسن‌های مبتنی بر تخم‌مرغ با کارایی مناسب و عوارض جانبی محدود، استفاده می‌شود. با این وجود، این واکسن‌ها در پاندمی سال ۲۰۰۹ جوابگو نبود و به همین دلیل، دانشمندان به دنبال کشف واکسن‌های جایگزین، مطالعات جدیدی را آغاز نمودند تا به واکسنی با کارایی و اطمینان مناسب و در عین حال با صرفه‌ی اقتصادی و زمان کمتر تولید، دست یابند. در این مطالعه، با توجه به عدم وجود فن‌آوری بومی تولید واکسن در ایران، برای اولین بار از ویروس آنفلوانزا آخرین پاندمی –A/Iran/14068/2009 (H1N1)– جهت بررسی یک فرایند بهینه‌ی تولید واکسن استفاده گردید. زیر واحد بزرگ آنتی‌ژن هماگلوتینین، در بکمید نوترکیب کلون و بیان و تولید پروتئین در رده‌ی سلولی Sf9 و میزان و کارایی پروتئین، بررسی شد. از مزایای این سیستم می‌توان به مواردی از جمله به امکان مدیریت تولید، ایمن بودن نسبی، ایمنی‌زایی مناسب، میزان محصول بالا اشاره نمود (۱۳). رده‌ی سلولی Sf9 از نظر ایمنی بسیار مناسب است؛ چرا که مانع ایجاد تغییرات در ژنوم مورد نظر می‌شود، فولدینگ پروتئین به شکل مناسب و صحیح اتفاق می‌افتد و بنابراین پروتئین بیان شده در این سلول، کارایی مورد نظر برای تحریک سیستم ایمنی میزبان یوکاریوتیک را دارا خواهد بود. میزان بالای بیان، در این سیستم به اندازه‌ای محققین را شگفت‌زده نمود که بیش از نیمی از پروتئین بیان شده را پروتئین نوترکیب می‌دانند (۱۴). سیستم بیانی باکولوویروس به دلیل این که قادر به رشد در سلول‌های پستانداران نیست، قادر به تکثیر در میزبان دریافت کننده‌ی واکسن نمی‌باشد (۱۵). همچنین، اصلاحات مناسب پروتئین پس از ترجمه در این سیستم، که ثابت شده است ساختار و فعالیت بیولوژیکی پروتئین‌های بیان شده را حفظ می‌کند، به عنوان یک مزیت برجسته قلمداد می‌شود(۱۶).

از آن جایی که تولید ذرات شبه ویروسی آنفلوانزا هدف اصلی این مطالعه است، بنابراین اولین گام، تولید بکمید نوترکیب آن می‌باشد. در این مطالعه، پروتئین HA H1N1 Swine تحت کنترل رونویسی پروموتر پلی‌هیدرین در سلول‌های Sf9 با استفاده از سیستم بیان باکولوویروس Bac-to-Bac با هدف استفاده از آن به عنوان پایه‌ای برای تولید واکسن زیر واحد علیه H1N1 swine با موفقیت بیان شد. پروموتر پلی‌هیدرین مشتق شده از Autographa californica nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)، برای بیان پروتئین خارجی با استفاده از سیستم بیانی باکولوویروس استفاده گردید. با این حال، بیان موفق پروتئین علاوه بر یک پروموتر قوی، به رده‌ی سلولی مناسب و ویژگی‌های ژن خارجی نیز بستگی دارد (۱۷). چندین راهبرد برای بهبود تولید پروتئین‌های عملکردی در سلول‌های حشرات وجود دارد. به عنوان مثال، اصلاحات وکتورهای بیانی، با افزودن عناصر DNA دخیل در فرایند بیان پروتئین، می‌تواند باعث افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب گردد. پروموتر پلی‌هیدرین، به دلیل داشتن عناصر یوکاریوتیک، دارای فعالیت بالا در رده‌ی سلول‌های حشرات و مهره‌داران می‌باشد. بنابراین، به عنوان یک پروموتر قوی در زمینه‌ی تولید وکتورهای بیانی مبتنی بر باکولوویروس شناخته شده است. ظهور تغییرات سایتوپاتیک سلولی در میزبان حشره، حاکی از روند مطلوب پدیده‌ی ترانسفکشن و افزایش عیار ویروس عفونت‌زا بوده است. پس از بررسی پروتئین‌های استخراج شده در این مطالعه، حضور باند پروتئینی با اندازه‌ی ۶۶ کیلودالتون، نشان از بیان مؤثر و قوی پروتئین نوترکیب، در رده‌ی

سلولی میزبان یوکاریوت تحت کنترل پروموتر پلی‌هیدرین می‌باشد.

پروتئین هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا دارای فعالیت‌های بیولوژیک است که در این جا، با استفاده از آزمون‌های هماگلوتینین و همادسورپشن مشخص شد که پروتئین نوترکیب هماگلوتینین بیان شده در سلول‌های Sf9 آلوده به باکولوویروس نوترکیب، دارای فعالیت‌های بیولوژیک و خصوصیات مشابهی با هماگلوتینین ویروس‌های آنفلوانزا بوده است (۱۷). رده‌های سلولی متفاوتی از سلول‌های حشرات با این هدف استفاده می‌شوند، اما دو رده‌ی سلولی Sf9 و Sf21 بیشتر توصیه می‌گردند. هر چند در مطالعاتی دیده شده است که رده‌ی Five (Highfive) به عنوان میزبان باکولوویروس نوترکیب، حساسیت بسیار بالاتری نسبت به Sf9 و Sf21 دارد، اما به دلیل تولید پروتئاز بیشتر، منجر به تخریب پروتئین می‌شود. به همین دلیل، ظرفیت تولید بالای ذرات در رده‌ی سلولی Sf9 (۱۰۰ برابر) بیشتر از رده‌ی Five بوده است (۱۸). برای عملیاتی شدن این طرح، باید تخلیص پروتئین در مقیاس انبوه صورت بگیرد. ذرات تکوین شده با اندازه‌ی ۱۲۰–۱۰۰ نانومتر دارای ارزش است و پیشنهاد می‌گردد بررسی تحریک سیستم ایمنی حیوان توسط این ذرات، سنجیده و با سایر مطالعات مقایسه گردد. علاوه بر این، استفاده از کاست‌های ترکیبی از سایر آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلوانزا و استفاده از ادجوانت‌های مختلف و در نهایت، بررسی سطح ایمنی‌زایی حاصل از آن‌ها در حیوان آزمایشگاهی قابل اجرا می‌باشد. در این طرح، ویروس آنفلوانزای H1N1 خوکی سویه‌ی ایرانی از بانک ویروس مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی استفاده گردیده است. بیان بالا و قوی ژن هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا H1N1 خوکی سویه‌ی ایرانی و استخراج پروتئین از سلول‌های آلوده به بکمید نوترکیب، نشان داد که بکمید نوترکیب ساخته شده، یک ابزار مفید در راستای تولید ذرات شبه ویروس آنفلونزا ویژه‌ی استرین خوکی بوده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری رشته‌ی زیست‌شناسی سلولی مولکولی گرایش میکروبیولوژی (کد 22530507961010) بود که با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1397.101 در دانشگاه علوم پزشکی آزاد واحد تهران تصویب و با حمایت مالی دانشگاه و امکانات مؤسسه‌ی سرم‌سازی رازی انجام شد که از این دو مؤسسه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Harding AT, Heaton NS. Efforts to improve the seasonal influenza vaccine. Vaccines (Basel) 2018; 6(2): 19.
2. Morin CW, Stoner-Duncan B, Winker K, Scotch M, Hess JJ, Meschke JS, et al. Avian influenza virus ecology and evolution through a climatic lens. Environ Int 2018; 119: 241-9.
3. Saunders-Hastings PR, Krewski D. Reviewing the history of pandemic influenza: Understanding patterns of emergence and transmission. Pathogens 2016; 5(4): 66.
4. Cook PW, Stark T, Jones J, Kondor R, Zanders N, Benfer J, et al. Detection and characterization of swine origin influenza A(H1N1) pandemic 2009 viruses in humans following zoonotic transmission. J Virol 2020; 95(2): [Epub ahead of print].
5. Lewnard JA, Cobey S. Immune history and influenza vaccine effectiveness. Vaccines (Basel) 2018; 6(2).
6. Nunez IA, Carlock MA, Allen JD, Owino SO, Moehling KK, Nowalk P, et al. Impact of age and pre-existing influenza immune responses in humans receiving split inactivated influenza vaccine on the induction of the breadth of antibodies to influenza A strains. PLoS One 2017; 12(11): e0185666.
7. Zhao L, Young K, Gemmill I. Summary of the NACI Seasonal Influenza Vaccine Statement for 2019-2020. Can Commun Dis Rep 2019; 45(6): 149-55.
8. Dutta A, Huang CT, Lin CY, Chen TC, Lin YC, Chang CS, et al. Sterilizing immunity to influenza virus infection requires local antigen-specific T cell response in the lungs. Sci Rep 2016; 6: 32973.
9. Rockman S, Laurie KL, Parkes S, Wheatley A, Barr IG. New Technologies for influenza vaccines. Microorganisms 2020; 8(11): 1745.
10. Shafaati M, Akhavan E, Yazdani S, Shafaati M. Construction of a recombinant bacmid DNA containing influenza A virus hemagglutinin gene using a site-specific transposition mechanism. Vac Res 2015; 2(3-4): 63-8.
11. Alex A, Piano V, Polley S, Stuiver M, Voss S, Ciossani G, et al. Electroporated recombinant proteins as tools for in vivo functional complementation, imaging and chemical biology. Elife 2019; 8: e48287.
12. Killian ML. Hemagglutination Assay for influenza virus. In: Spackman E, editor. Animal influenza virus. Totowa, NJ: Humana Press; 2020. p. 3-10
13. Lai CC, Cheng YC, Chen PW, Lin TH, Tzeng TT, Lu CC, et al. Process development for pandemic influenza VLP vaccine production using a baculovirus expression system. J Biol Eng 2019; 13: 78.
14. Possee RD, Chambers AC, Graves LP, Aksular M, King LA. Recent developments in the use of baculovirus expression vectors. Curr Issues Mol Biol 2020; 34: 215-30.
15. Chambers AC, Aksular M, Graves LP, Irons SL, Possee RD, King LA. Overview of the baculovirus expression system. Curr Protoc Protein Sci 2018; 91: 5.
16. Irons SL, Chambers AC, Lissina O, King LA, Possee RD. Protein production using the baculovirus expression system. Curr Protoc Protein Sci 2018; 91: 5.
17. Ono C, Okamoto T, Abe T, Matsuura Y. Baculovirus as a tool for gene delivery and gene therapy. Viruses 2018; 10(9): 510.
18. Martinez-Solis M, Herrero S, Targovnik AM. Engineering of the baculovirus expression system for optimized protein production. Appl Microbiol Biotechnol 2019; 103(1): 113-23.

DOI: *10.22122/jims.v39i617.13912* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 617, 1st Week, June 2021**

Received: 16.02.2020 Accepted: 02.04.2021 Published: 05.06.2021

Recombinant Expression of Hemagglutinin Protein of Iranian Swine influenza A (H1N1) in the Insect Cells Using Baculovirus System

Sara Zahmati[1], Mehdi Mahdavi[2], Morteza Taghizadeh-Tarnabi[3], Setareh Haghighat[4], Reza Jalalirad [5]

Original Article

Abstract

Background: Influenza virus, which is a decisive agent of influenza, attracted interest because of the event of the annual epidemic among a wide range of animal and human hosts. This study aimed to express the hemagglutinin protein of Iranian swine Influenza A (H1N1) through a baculovirus system in SF9 cells to produce a new recombinant vaccine.

Methods: Hemagglutinin gene of Swine H1N1 virus was amplified with specific primers containing restriction enzymes site, and then cloned. Afterward, the vector was transformed to DH10Bac using Bac-to-Bac system in order to produce a recombinant bacmid. Hemagglutinin expression and its biological activity were assessed using molecular and immunization tests.

Findings: The target rHA in length, 1710 bp, was produced and expressed in transfected SF9 cells with a size of ~66 kDa. The infected cells expanded in size and their nucleus, and desiccated from the surface of the cell culture as a granular. They could absorb chick red blood cells (RBCs), and appear as cell aggregates forty-eight post-infection. The fact that infected cells were unable to form cell clamp showed the test's accuracy and inhibition of hemodesorption activity. The amount of protein obtained was 10.76 µg/100 µl, equal to 0.1 mg/ml.

Conclusion: The baculovirus expression system could express the recombinant protein in the insect cell. Therefore, it may be a well-suited alternative to produce a new generation of the vaccine instead of egg-based and cell-culture-based generation vaccines.

Keywords: Influenza A virus, H1N1 subtype; Hemagglutinin; Insecta; Baculoviridae; Vaccines

Citation: Zahmati S, Mahdavi M, Taghizadeh-Tarnabi M, Haghighat S, Jalalirad R. **Recombinant Expression of Hemagglutinin Protein of Iranian Swine influenza A (H1N1) in the Insect Cells Using Baculovirus System.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(617): 181-8.

1- PhD Student, Department of Microbiology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Vaccine Research Center, School of Medicine, Tehran University of Medicine Sciences, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

4- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran

Corresponding Author: Mehdi Mahdavi, Assistant Professor, Vaccine Research Center, School of Medicine, Tehran University of Medicine Sciences, Tehran, Iran; Email: mahdavivac@gmail.com