

کلونینگ و بیان پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا H1N1 در باکتری E.coli سویه BL21(DE3)

فاطمه جعفری نژاد^۱، گلناز اسعدی تهرانی^۲، محمد امین بخش^۱، بهرام کاظمی^{۳،۴}، وحید رضا یاسائی^۵، فاطمه یاریان^{۳،۴}، آمنه کوچکی^{۳،۴}

زینب سلیمانی فر^{۳،۴}، مژگان بنده پور^{۳،۴*}

۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران
۲ گروه میکروبیولوژی و زیست جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۳ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴ بخش بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵ مرکز تحقیقات ژنومیک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: ویروس آنفلوانزا A یکی از عوامل اصلی مرگ و میر سالیانه می باشد و از سال ۱۹۶۰ میلادی بر علیه آن واکسن موثر در دسترس بوده است. تغییرات مداوم آنتی ژنیک ویروس چالش بزرگی در مسیر تولید سالیانه واکسن می باشد. در حال حاضر محققین روی آنتی ژنهای ثابت ویروس مطالعه می کنند. پروتئین M2 یک کانال یونی درون پوشش ویروس آنفلوانزای A تشکیل می دهد که در عفونت زایی آن موثر است. این پروتئین حفاظت شده است و هدف مناسبی برای تولید واکسن آنفلوانزا میباشد.

مواد و روش ها: با توجه به محدودیت کشت ویروس آنفلوانزا در آزمایشگاه توالی ژن M2 از ویروس سویه H1N1 ایران انتخاب و سنتز شد. ژن M2 در وکتور pET22b ساب کلون گردید. پروتئین نوترکیب در باکتری E.coli سویه BL21(DE3) بیان و از آنتی بادی اختصاصی در روش SDS-PAGE و وسترن بلات برای تایید آن استفاده شد.

یافته ها: غلظت پروتئین حاصل ۳۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بدست آمد و با آنتی بادی اختصاصی تایید گردید.

نتیجه گیری: پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا در باکتری E.coli سویه BL21 (DE3) قابل بیان است.

کلمات کلیدی: کلونینگ، ویروس آنفلوانزا، بیان ژن

مقدمه

یونی عمل می کند. کانال یونی M2 با هدایت پروتون ها به داخل اندوزوم باعث ایجاد شرایط اسیدی می شود که این pH منجر به جدا شدن پروتئین M1 از ریبونوکلوپروتئین شده و این مجموعه به داخل هسته انتقال می یابد (۷). این پروتئین با تحریک ایمنی هومورال توانایی ایجاد ایمنی در برابر سویه های مختلف آنفلوانزا را دارد (۵). پروتئین ماتریکس ۲ (M2) یک پروتئین بین غشایی با ۹۷ اسید آمینه به شکل هموترامر با پیوند های دی سولفید است که در غشاء پلاسمایی سلول های آلوده به ویروس با چگالی بالا که شبیه مولکول HA است بیان می شود. چگالی این پروتئین هنگام آزاد شدن ویروس های جدید کاهش میابد. به طور متوسط ویروس آنفلوانزا شامل ۱۰ تترامر M2، حدود ۴۰۰ تری مر HA و ۱۰۰ تترامر NA در هر ویرون میباشد (۶،۳). اخیراً توجه دانشمندان و فارماکولوژیستها به این پروتئین جهت طراحی واکسن معطوف

بیماری های تنفسی در جهان بیش از نیمی از موارد بیماری های حاد را تشکیل می دهد در این میان ارتو میکسوویریده (ویروس آنفلوانزا) عامل مهمی در ایجاد بیماری و مرگ ناشی از بیماری های تنفسی به شمار میاید. در چند سال اخیر ۴ پاندمی آنفلوانزا A به وسیله ویروس های جدید از میزبان های پرندگان یا خوک به جمعیت انسانی منتقل شده است. کانون اپیدمی آنفلوانزای خوکی ۲۰۰۹ H1N1 آمریکای شمالی گزارش شده است (۸) قطعه ۷ ژنوم ویروس آنفلوانزا دو پروتئین M1 و M2 را کد می کند. پروتئین M1 غشاء لیپیدی ویرون را از داخل پوشانده و باعث استحکام آن می شود. پروتئین M2 یک پروتئین داخل غشایی با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون بوده و به عنوان کانال

آدرس نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه

علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Email: Bandehpour@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۰۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲

شده است. این پروتئین هدف اختصاصی داروهای ضد انفلوانزا، آمانتادین و ریمانتادین است. هدف این تحقیق کلون و بیان این پروتئین شاخص ویروس از سویه بومی ایران بوده است.

مواد و روش ها

تایید وکتور حاوی ژن M2:

بعلت محدودیت کشت ویروس انفلوانزا در آزمایشگاه، توالی ژن M2 از ویروس سویه H1N1 ایران از بانک ژن انتخاب گردید (HQ606474). این توالی از نظر کدونهای مصرفی باکتری تغییر داده شد و دو محل اثر آنزیمهای SacI و SalI در دو انتهای تعبیه گردید. در نهایت این توالی برای سنتز به شرکت ندای فن سفارش داده شد.

پلاسمید pGE حاوی ژن M2 در باکتری E.coli سویه Top10 با روش هاناها ترانسفرم و تکثیر شد. بعد از تخلیص پلاسمید (کیت بایونیر، کره) قطعه مورد نظر با استفاده از پرایمر های عمومی M13 (توالی دو طرف محل کلون ژن هدف در پلاسمید) تکثیر گردید.

M13 F 5'GTAAAACGACGGCCAGTGT3'

M13 R 5'GGAAACAGCTATGACCATGT3'

جدول شماره ۱: مواد مصرفی و غلظتهای آنها در واکنش PCR

غلظت مصرفی در واکنش	مقدار مصرفی در واکنش	مواد مورد استفاده درواکنش
1 ng	1 µl	Plasmid(DNA) (1ng/ µl)
0.2 mM	5 µl	dNTP (10mM)
10 mM	1.5 µl	MgCl2(50mM)
1.5 pmol	2 µl	Primers 20pmol
1 X	3 µl	Buffer PCR10x
1.25 u	0.25 µl	Taq DNA polymerase(5 unit/ µl)
	Up to 30 µl	D.W.

واکنش PCR برای تکثیر ژن M2 به وسیله پرایمر های عمومی M13 به صورت زیر انجام گرفت:

جدول شماره ۲: مراحل واکنش PCR برای تکثیر ژن M2

Initial Denaturation	94 °C	5 Min
Denaturation	94 °C	30 S
Annealing	54 °C	40 S
Extension	72 °C	1 Min
Final extension	72 °C	5 Min

ساب کلونینگ ژن M2 در وکتور بیان :

وکتور نهایی برای بیان این پروتئین pET22b در نظر گرفته شده است که بعد از هضم با آنزیمهای SacI (فرمنتاس، لیتوانی) و SalI (فرمنتاس، لیتوانی) از ژل آگارز (بایونیر، کره) تخلیص گردید.

قطعه M2 و وکتور بعد از آماده سازی با یک واحد آنزیم T4 DNA ligase (فرمنتاس- لیتوانی) در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد به هم متصل شدند. جهت تایید این مرحله از PCR قطعه با پرایمرهای عمومی pET22b و هضم آنزیمی استفاده شد (۱). پرایمر های طراحی شده برای تکثیر ژن کلون شده در پلاسمید pET22b با دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی گراد به ترتیبی که در جداول ۱ و ۲ ذکر گردید از قرار زیر است:

pET22bF 5'TAATACGACTCACTATAG3'

pET22bR 5'GCTAGTTATTGCTCAGC3'

محصولات PCR بر روی آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز و با رنگ سایبرگرین مشاهده گردیدند.

بیان ژن M2 و تایید آن

کشت شبانه با یک کلونی باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب M2/ pET22b در ۲ml محیط کشت LB.broth (هایمدیا، هند) انجام گرفت و روز بعد با ۴۰ mL محیط حاوی ۱۰۰ µg/mL آمپی سیلین (سیگما، آلمان) در یک ارلن استریل کشت مجدد داده شد. در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید.

پس از گذشت ۲ ساعت و رسیدن OD_{۶۰۰} به ۰/۶، ۱ mL به عنوان نمونه صفر در نظر جمع آوری شد، سپس با ۴۰ میکرولیتر IPTG (۱mM) (سیگما، آلمان) القاء گردید. نمونه های ۳ و ۵ ساعت نیز جمع آوری شد.

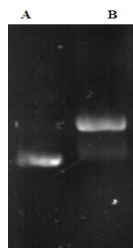
تایید بیان ژن با روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ

لیزات باکتری های القا شده در زمان های متفاوت به همراه لیزات سلول بدون پلاسمید، بر روی ژل ۱۲ SDS-PAGE مقایسه گردید. پروتئین مورد نظر با ۲۸ kDa پس از انتقال از ژل SDS-PAGE به کاغذ نیتروسلولز با تکنیک وسترن بلاتینگ تایید گردید (۱)

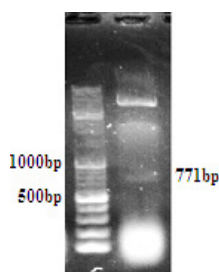
ازآنتی بادی mouse Anti M2 Antibody (Abcam,UK) به

شکل شماره ۳).

هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب سنتز شده توسط آنزیم های SalI و SacI انجام شد که حاصل آن بصورت خروج ژن M2 از پلاسمید نو ترکیب کنار مارکر روی ژل ۱/۵٪ در شکل شماره ۴ مشاهده میشود.



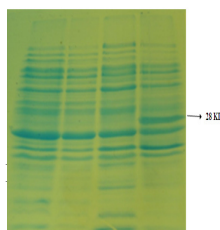
شکل شماره ۳: وکتور pET22b خطی شده، B: وکتور pET22b کنترل



شکل شماره ۴: ۷۷۱bp ژن M2 خارج شده از وکتور کنار مارکر ۱۰۰bp

نتایج حاصل از بیان پروتئین پس از القای سلول با IPTG ۱mM

لیزات باکتری های القا شده در زمان های متفاوت به همراه لیزات سلول بدون پلاسمید، بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. باند پروتئین M2 در مقایسه با موارد کنترل در شکل شماره ۵ مشاهده می شود



A

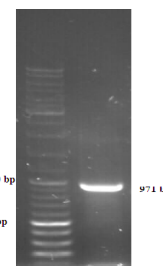
شکل شماره ۵: ژل SDS-PAGE ۱۲٪ حاصل از الکتروفورز پروتئین M2 ستون A: سلول BL21 بدون پلاسمید نو ترکیب، ستون B: نمونه ساعت صفر، ستون C: ۳ ساعت پس از القا، ستون D: ۵ ساعت پس از القا

پس از انتقال باند از ژل SDS-PAGE به کاغذ نیتروسلولز به منظور تایید باند M2 از تکنیک وسترن بلاتینگ استفاده

عنوان آنتی بادی اول و از آنتی بادی Anti mouse کونژوگه با آلکالن فسفاتاز بعنوان آنتی بادی دوم استفاده شد. جهت رویت باند از کروموزن و سوبسترای NBT/BCIP بهره گرفته شد (۲).

یافته ها

تایید کلون اولیه ژن M2: واکنش PCR به وسیله پرایمر عمومی M13 انجام شد و قطعه مورد نظر تکثیر گردید. محصول PCR، روی ژل ۱/۵٪ الکتروفورز گردید که باند ۹۷۱bp در شکل ۱ مشاهده می شود.

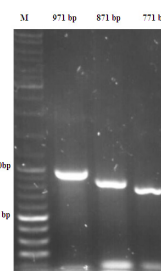


شکل شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR (۹۷۱bp) ژن M2 کنار مارکر ۱۰۰

جفت باز DNA

تهیه قطعه M2 جهت کلون در وکتور بیان

محصول PCR با استفاده از آنزیم های محدود الاثر SalI, SacI برش داده شده و هر مرحله روی ژل آگارز ۱/۵٪ در کنار مارکر ۱۰۰ bp الکتروفورز گردیده است. با توجه به نتایج حاصله قطعه ۷۷۱ جفت بازی از پلاسمید اولیه و سنتتیک pGE خارج گردید (شکل شماره ۲).

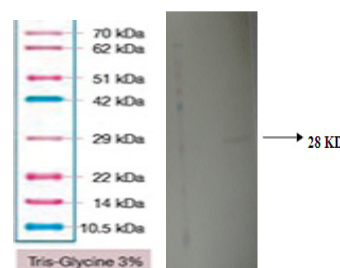


شکل شماره ۲: قطعه برش خورده توسط آنزیم های محدود الاثر SacI و SalI و محصول اولیه در کنار مارکر ۱۰۰bp

نتایج ساب کلونینگ قطعه M2 در وکتور pET22b

وکتور مذکور با استفاده از آنزیم های محدود الاثر SalI و SacI انکوبه گردید و سپس بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شد

شد. پس از مراحل آشکار سازی با آنتی بادی ثانویه کونژوگه با آلکالین فسفاتاز باند پروتئین بیان شده در شکل شماره ۶ مشاهده گردید.



شکل شماره ۶: نتیجه وسترن بلات و باند ۲۸ KD پروتئین M۲

بحث:

HA و NA گلیکوپروتئین هایی هستند که درون پوشش ویروس قرار دارند و ساختار آنتی ژنی آنها به راحتی تغییر میکند. بر خلاف ایندو، پروتئین غشایی M۲ در همه ویروس های انفلوانزای انسانی همولوژی بالایی را نشان می دهد (۱۰). بعضی از جهش های M۲ ویروس انفلوانزا ضعیف است (۸). پروتئین های تشکیل دهنده کانال یون M۲ در ویروس ورود یونها را از اندوزوم به درون ذره ویروس مقدور می سازد و تغییر ترکیب ساختار HA را تقویت می کند (۱۴). اخیراً توجه دانشمندان و فارماکولوژیستها به این پروتئین معطوف شده است. چرا که در بین همه ویروس های انفلوانزای A حفاظت شده بوده و همچنین ایمونوژن میباشد، بنابراین یکی از اهداف مناسب برای تولید واکسن انفلوانزا با ایمنی وسیع الطیف می باشد (۱۲). در این تحقیق با استفاده از سویه E.Coli BL۲۱ (DE۳) مهندسی شده با کلون کردن ژن کد کننده پروتئین M۲ در وکتور pET۲۲b در شرایط تنظیم شده ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد. در خصوص انتخاب ژن M۲ به عنوان یک ایمونوژن بر علیه ویروس انفلوانزا تحقیقات بسیاری انجام شده است که از جمله آنها می توان به DNA vaccine در تحقیق A. Ihata و همکارانش در سال ۲۰۰۱ (۹)، و یا بصورت VLP به همراه پروتئین core ویروس هپاتیت B (۱۱، ۱۳) اشاره نمود. در سال ۱۹۹۹ توسط Frace AM, Klimov AI دمین خارج سلولی M۲ ویروس را مطرح نمود که در مدل های حیوانی منجر به ایمنی در مقابل ویروس گردید (۶). متداول ترین میزبان بیانی از سویه

های E.coli، BL۲۱ (DE۳) می باشد. این سویه از E.coli دارای مزایای زیادی برای تولید پروتئین نوترکیب می باشد. BL۲۱ از سویه ی E.coli B مشتق شده است. یکی از روشهای کنترل پایه بیان، استفاده از وکتورهایی می باشد که حاوی lac TV پروموتور هستند. وکتور مورد استفاده در این تحقیق pET۲۲b است. وقتی این نوع از وکتورها در میزبانهای لیزوژن DE۳ استفاده می شوند، lac رپرسور در کروموزوم میزبان فعالیت نموده و رونویسی از ژن هدف را با مهار تولید RNA TV پلیمراز مهار می کند (۴). بدین ترتیب در ادامه این تحقیق پروتئین بدست آمده در سیستم بیان پروکاریوتی، مورد ارزیابی ایمونولوژیکی قرار خواهد گرفت.

نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از سویه E.Coli BL۲۱ (DE۳) مهندسی شده با کلون کردن ژن کد کننده پروتئین M۲ در وکتور pET۲۲b می توان آن را در مقادیر زیاد بیان نمود. مقدار بدست آمده در شرایط تنظیم شده در این تحقیق ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر میباشد.

سپاسگزاری:

این تحقیق در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفته است. تامین بودجه آن مشترک بین این مرکز و مرکز ژنومیک دانشگاه بوده است. بدین وسیله از مسئولین محترم این مراکز تشکر و قدردانی میشود.

منابع:

- (1) Bandehpour M, Khodabandeh M, Mosaffa N, Sharifnia Z, Ghazanfari T, Kazemi B. An efficient procedure for purification of recombinant human β heat shock protein 90. *DARU*, 2010; 18(1):64-68.
- (2) Bandehpour M, Seyed N, Shadnoosh M, Pakzad P, Kazemi B. Using recombinant Chlamydia Major Outer Membrane Protein (MOMP) in ELISA diagnostic kit. *Iranian J of Biotech*, 2006; 4(4): 239- 244.
- (3) Betakova T. M2 Protein—A Proton Channel of Influenza A Virus. *Curr Pharma Design*, 2007; 13)31(:3231-3235.
- (4) Dower W J, Miller J F, Ragsdale CW. High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 1988; 6(13): 6127- 45.
- (5) Filettea M, Joua WM, Birkett b B, Lyons b K, Schultz b B, Tonkyro b A, Resch b S, Fiersa W. Universal influenza A vaccine Optimization of M2-based constructs. *Viol J*, 2005; 337 : 149 – 161.
- (6) Frace AM, Klimov AI, Rowe T. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus. *Vaccine*, 1999; 17 (18): 2237-44.
- (7) Jason R, James J. Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. *Nature*, 2008; 451: 591–595.
- (8) Mishra N, Emerging influenza A/H1N1: Challenges and development. *The Health*, 2011; 2: 16-22.
- (9) Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine*, 2001; 19: 36-39.
- (10) Sakaguchi A, Hirayama E, Hiraki A. Nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein is temperature-dependently inhibited by dissociation of viral matrix protein. *Viol*, 2003; 306: 244-253.
- (11) Song J.M, Wang BZ, Park K.M, Van Rooijen N, Quan FS. Influenza Virus-Like Particles Containing M2 Induce Broadly Cross Protective Immunity. *PLoS ONE*, 2011; 6: 14538-14544.
- (12) Staneková Z, Varečková E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Viol J*, 2010; 7: 351-357.
- (13) Song J.M, Wang B.Z, Park K.M, Van Rooijen N, Quan F.S. Influenza Virus-Like Particles Containing M2 Induce Broadly Cross Protective Immunity, *PLoS ONE*. 2011; 6: 14538-42
- (14) Wenbin L, Cady SD, Hu F, Hong M. Structure and Function of the Influenza A M2 Proton Channel. *Biochem*, 2009; 48: 7356–7364.