مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره نهم، زمستان ۱۳۹۱

Research Article
مقاله تحقیقی

کلون کردن قطعه اتصالی M2e *آنفلوانزا* - ctxB *ویبریو کلرا* در پلاسمید pET28a

نیما میرزائی[۱*]، فرهاد رضائی[۲]

۱-دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، باشگاه پژوهشگران جوان، تهران، ایران
۲-دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه ویروس شناسی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: از آنجا که دومین خارجی پروتئین ماتریکس *آنفلوانزا*، ایمونوژن ضعیفی است انتخاب مناسبی جهت تولید واکسن نمی باشد. زیرواحد B انتروتوکسین وبا بخش غیر سمی و موجب اتصال هولوتوکسین به GM1 موجود در سطح سلول های اپیتلیال روده می شود. CTB به شدت ایمونوژن می باشد. از این رو اتصال این دو ژن، کاربرد زیادی در تهیه واکسن نوترکیب *آنفلوانزا* خواهد داشت.

مواد و روش ها: از طریق PCR و با استفاده از پرایمر های اختصاصی حاوی جایگاه برش آنزیم محدود کننده، ژن *ctxB* تکثیر شد. سویه استاندارد *آنفلوانزا* نوع A (A/PUERTO RICO/8/34) تهیه و ژن *M2e* از طریق RT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی حاوی جایگاه برش تکثیر گردید. جهت اتصال دو ژن *ctxB* و *M2e* واکنش PCR دوم به وسیله پرایمر R ژن *ctxB* و پرایمر F ژن *M2e* انجام گرفت. محصول PCR با استفاده از آنزیم های *BamH1* و *EcoR1* هضم و در وکتور pET28a کلون گردید. تائید کلونینگ با استفاده تعیین توالی صورت گرفت. پس از تائید، وکتور نوترکیب pET28a/M2e-ctxB در باکتری *E.coli* سویه Top10 ترانسفورم گردید. تائید نهایی فیوژن، کلونینگ و ترانسفورمیشن از طریق PCR کلنی، هضم آنزیمی و تعیین توالی صورت گرفت.

یافته ها: آنالیز توالی نشان داد، ژن *M2e* در فریم مناسب به ژن *ctxB* متصل شده بود. علاوه بر این، ژن حاصل در محل برش آنزیم های *BamH1* و *EcoR1* در وکتور pET28a کلون گردیده بود.

نتیجه گیری: از آنجا که توالی ژن *M2e آنفلوانزا* دچار تغییرات آنتی ژنیک سالیانه نمی شود کاندید مناسبی جهت تولید واکسن *آنفلوانزا* می باشد. با توجه به این که M2e ایمونوژن بسیار ضعیفی می باشد فیوژن آن با ایمونوژن های قوی مانند CTB می تواند روشی نوین در تهیه واکسن نوترکیب *آنفلوانزا* باشد.

کلمات کلیدی: پروتئین ماتریکس ۲، *آنفلوانزا*، واکسن نوترکیب، زیر واحد B توکسین وبا، فیوژن

مقدمه

ویروس های *آنفلوانزا* متعلق به خانواده ارتومیکسو ویریده هستند. اصطلاح میکسو (Myxo) به معنای مخاط یا موکوس بوده و اشاره به تمایل این ویروس ها به مخاط دارد. خانواده ارتومیکسو ویریده شامل پنج جنس است: *آنفلوانزای* A ، *آنفلوانزای* B ،*آنفلوانزای* C، *آنفلوانزای* D یا Togothoviruses (ویروس های با منشا کنه‌ای) و ISA virus (Infection Salmon Anemia Virus).

آدرس نویسنده مسئول:دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، باشگاه پژوهشگران جوان، تهران، ایران
Email:nm_mirzaei@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/ ۲۴

تغییرات آنتی ژنیک به طور مداوم در تیپ A و در مقیاس کمتر در تیپ B روی می دهد. تیپ C از لحاظ آنتی ژنی پایدار است (۱۶). ویروس *آنفلوانزای* A ویروس RNA دار، جزء خانواده ارتومیکسو ویریده و عامل بیماری *آنفلوانزا* در سرتاسر جهان می باشد. (۲۲،۱۲). در حال حاضر *آنفلوانزا* به عنوان یک تهدید آشکار و بالقوه برای سلامت بهداشت جهانی محسوب می شود. آمار و اطلاعات بدست آمده از کشورهای صنعتی نشان می دهند که بیماری *آنفلوانزا* یک مشکل اقتصادی مهم به شمار می رود. زیان های اقتصادی ناشی از شیوع *آنفلوانزا* سالانه میلیاردها دلار می باشد (۲۳،۱۲ ،۲). ویروس های *آنفلوانزای* A توانایی ایجاد

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.3.7]

اپیدمی و یا پاندمی های بالقوه از طریق موتاسیون در شاخص های آنتی ژنی موجود در گلیکوپروتئین های سطحی (Antigenic drift) و یا نوترکیبی و تعویض قطعات ژنی (Antigenic shift) بین سویه های ویروس های مختلف *آنفلوانزای* A را دارا هستند (۱۵، ۴) این موتاسیون ها به ویروس های *آنفلوانزا* اجازه می دهند که از پاسخ های ایمنی میزبان فرار کنند و از این رو ما را ناچار به تولید سالانه واکسن از ویروس های جدید می کنند که مستلزم صرف هزینه های گزاف می باشد (۲۲،۱۷). مطالعات زیادی سطح و نوع ایمنی ایجاد شده از راه ایمنی زایی مخاطی توسط واکسن های زنده ضعیف شده و یا واکسن های غیر فعال را مورد بررسی قرار داده اند (۱۸، ۲۱). واکسن های زنده ضعیف شده و واکسن های غیر فعال سطح قابل قبولی از ایمنی را ایجاد می کنند با این وجود این نوع واکسن ها به عنوان وسیله‌ای مناسب به منظور مقابله با ویروس های نوظهور *آنفلوانزا* محسوب نمی شوند (۱۰). در سال های اخیر، به منظور مقابله با پاندمی های احتمالی ناشی از *آنفلوانزا* تحقیقات گسترده ای در زمینه تولید و بهبود ایمنی زایی واکسن ها در سرتاسر دنیا در حال انجام می باشد (۱). بسیاری از این واکسن ها براساس پروتئین های HA و NA ویروس تهیه می شوند. یکی از مهم ترین چالش ها در زمینه تولید واکسن های نوترکیب زیرواحدی *آنفلوانزا* ناپایداری ژنتیک پروتئین های HA و NA می باشد. به همین دلیل سویه های بیماری زای جدید که هر ساله در اثر چرخش درجمعیت به‌وجود می آیند به‌وسیله‌واکسن‌های ساخته شده بر اساس پروتئین های سطحی سویه های سال گذشته کنترل نمی شوند. بنابراین به صورت سالانه تغییر فورمولاسیون این واکسن ها ضروری است. در نتیجه هر ساله واکسن های جدید با فرمول جدید وارد بازار می گردد، که ممکن است بسیاری از آن ها تاثیری در پیشگیری از بیماری *آنفلوانزا* نداشته باشند. از این رو یک واکسن موثر *آنفلوانزا* باید حاوی آنتی ژن هایی باشد که در تمامی سویه های *آنفلوانزا* مشترک است. واکسن های تهیه شده بر اساس چنین آنتی ژن هایی نیاز به پیش بینی سویه های در حال چرخش در طول یک فصل را ندارد و در نتیجه از تولید شتاب زده واکسن در هنگام شیوع بیماری *آنفلوانزا* جلوگیری می شود (۷). یکی از بهترین آنتی ژن های حفظ شده *آنفلوانزا* A ، ناحیه خارجی (ectodomain) پروتئین ماتریکس ۲ یا M2e است. توالی نوکلئوتیدی این ناحیه در تمامی سویه های *آنفلوانزا* A به میزان زیادی ثابت است و دچار موتاسیون های Drift و Shift نمی گردد. بنابراین یک کاندید مناسب برای تهیه واکسن های کارآمد بر علیه ویروس *آنفلوانزا* A می باشد (۱۳). این آنتی ژن به تنهایی قدرت ایمنی زایی بسیار کمی دارد. در بسیاری از تحقیقات، DNA واکسن ها و واکسن های کونژوگه با استفاده از پروتئین M2، مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعات مشخص شد که پروتئین M2 به تنهایی قادر به ایجاد آنتی بادی های نوترالیزه کننده نیست (۲). یکی از روش های نوین تولید واکسن *آنفلوانزا* استفاده از واکسن های نوترکیب فیوز شده با پروتئین هایی است که ایمنی زایی زیادی دارند. یکی از پروتئین هایی که می توان برای این منظور استفاده کرد زیر واحد B انتروتوکسین ویبرو کلرا (CtxB) می باشد. سم وبا (cholera toxin) از دو زیر واحد A و B تشکیل شده است. زیر واحد A قسمت سمی و فعال توکسین وبا است در حالی که زیر واحد B در اتصال به گیرنده موجود در سطح سلول ها نقش دارد. گیرنده سم وبا گانگلیوزید GM1 موجود در سطح سلول های بافت مخاطی می باشد. پس از اتصال به گیرنده، زیر واحد A وارد سلول و از طریق تولید cAMP موجب ترشح آب و الکترولیت ها و در نتیجه اسهال می گردد (۱۶). هدف از انجام این تحقیق اجرای اولین مرحله در بررسی ایمنی زائی پروتئین متصل شده M2e به زیرواحد B توکسین وبا می باشد. برای این منظور زیر واحد B انتروتوکسین وبا از طریق فرآیند PCR و هضم آنزیمی جهت ایجاد وکتور نوترکیب pET28a/m2e-ctxB متصل گردید.

مواد و روش ها

تکثیر زیرواحد B انتروتوکسین وبا

از باکتری ویبریو کلرا توکسین زا سویه 569B جهت تکثیر ژن توکسین وبا استفاده گردید. از طریق تست های بیوشیمیایی مختلف جنس باکتری تائید شد. سپس DNA کروموزومی باکتری با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Fermentas, Lithuania) مطابق با پروتکل کیت استخراج گردید. سکانس کد کننده ژن *ctxB* به وسیله PCR تکثیر گردید. برای این منظور بر اساس توالی ژنومی *Vibrio cholera* سویه 569 B موجود در بانک ژن (NCBI, Accession Number: U25679) پرایمر های *ctxB*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.3.7]

F: 5′- ATTAAGCTTCCATGATTAAATTAAAATTTGG
-3′ و ATCGAATTCTTATGCCATACTAATTGCG -3′
ctxB R: 5′- طراحی و جایگاه برش برای آنزیم های *HindIII* (در پرایمر ctxB F) و *EcoRI* (در پرایمر *ctxB* R) به آن ها افزوده و توسط شرکت Metabion آلمان سنتز گردید. علاوه بر این در پرایمر Reverse قبل از جایگاه برش کدون پایان (TAA) رونویسی در نظر گرفته شد. واکنش PCR در یک تیوب حاوی ۵ میکرولیتر بافر 10X همراه با 2mM MgCl2، ۲میکرولیتر dNTPs mix، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای اختصاصی (۱۰ پیکومول)، ۱ واحد Taq DNA polymerase (Fermenats, Lithuania)، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۳۶ میکرولیتر nuclease free water با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و با شرایط زیرانجام گرفت. ۹۵ درجه سانتی گراد (۲ دقیقه) و به دنبال آن ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۵۶ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی گراد (۶۰ ثانیه)، سپس محصول PCR به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی گردید.

تکثیر دومین خارجی M2

ابتدا ویروس *آنفلوانزا* نوع A سویه استاندارد (A/PUERTO RICO/8/34) تکثیر و ژنوم آن استخراج گردید. قطعه *M2e* از طریق واکنش RT-PCR با استفاده از کیتSuper ScriptIII one step RT-PCR system (Invitrogen, USA) تکثیر گردید. بر اساس توالی ژن *M2e* ویروس *آنفلوانزا* نوع A سویه استاندارد (A/PUERTO RICO/8/34) موجود در بانک ژن (NCBI, Accession Number: V01099.1) پرایمر های *M2e* F و *M2e* R جهت تکثیر دومین خارجی ژن M2 طراحی گردید. توالی پرایمر های طراحی شده *M2e* F و *M2e* R به ترتیب
5′- AACGGATCCATGAGCCTGCTGACCGAA -3′
و5′-ATTAAGCTT*CCGCCGCCGTCGCCG*TAAACG
-3′ GTATGATTAACGCCG بود. در این پرایمرها جایگاه برش برای آنزیم های *BamHI* (در پرایمر *M2e* F) و *HindIII* (در پرایمر *M2e* R) در نظر گرفته و توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شد. به منظور جداسازی فضائی دو زیر واحد تشکیل دهنده فیوژن پروتئین (*M2e* و *CtxB*) لینکر سرین گلیسین نیز با توالی *CCGCCGCCGTCGCCG* به پرایمر Reverse افزوده گردید. بدین ترتیب در مراحل بعد از کلونینگ، پس از بیان ژن *m2e-ctxB* ، هریک از زیرواحدها به طور مستقل شکل فضائی خود را در پروتئین حاصل حفظ و تداخلی در پروتئین حاصل نخواهند داشت. واکنش PCR و RT-PCR در یک تیوب حاوی ۲۵ میکرولیتر 2X Reaction Mix (شامل dNTP 0.4 mM for each mix و ۲,۴MgSO4 mM)، ۱ واحد RT/ Taq DNA polymerase، DNA الگو با غلظت ۱ میکروگرم، پرایمرهای Forward و Reverse (با غلظت 10 mM) هرکدام یک میکرولیتر با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر طبق دستورالعمل کیت و با شرایط زیرانجام گرفت. RT-PCR شامل یک سیکل ۴۵ درجه سانتی گراد (۴۵ دقیقه) و ۹۴ درجه سانتی گراد (۲ دقیقه) و PCR شامل: ۴۰ سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد (۱۵ ثانیه) ، ۶۳ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۶۸ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه) و تکثیر نهایی ۶۸ درجه سانتی گراد (۵ دقیقه). سپس محصول PCR به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی گردید.

اتصال *M2e* و *ctxB*

قطعات تکثیر شده M2e و *ctxB* با استفاده از کیت Qiaquick (Qiagne, USA) gel extraction kit مطابق با پروتکل شرکت سازنده از ژل آگارز استخراج شدند. هریک از قطعات به صورت جداگانه به وسیله آنزیم *HindIII* هضم و تخلیص شدند. لیگاسیون محصولات هضم شده با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase (Fermenats, Lithuania) و در شرایط زیر صورت گرفت. ۱۰۰ نانوگرم از هر یک از قطعات هضم شده، ۳ میکرولیتر بافر لیگاز (10X)، ۱ واحد آنزیم لیگاز و تا حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر water nuclease free افزوده و به صورت شبانه در دمای محیط (۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه گردید.

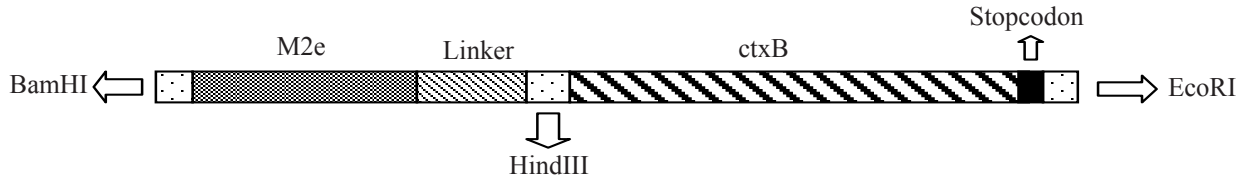
سپس به منظور تکثیر قطعه فیوز شده واکنش PCR به طور مستقیم بر روی محصول لیگاسیون و با استفاده از پرایمر های F *M2e* و R *ctxB* و با شرایط ذکر شده قبلی انجام گرفت. T_M نیز ۶۲ درجه سانتی گراد درنظر گرفته شد (شکل ۱).

کلونینگ و ساخت وکتور pET28a/*ctxB-M2e*

محصول PCR که حاوی هر دو ژن *M2e* و *ctxB* به صورت فیوز شده بود از ژل خالص سازی و با آنزیم های *EcoRI* و *BamHI* هضم گردید. همزمان وکتور بیانی pET28a (Novagen, Germany) نیز به وسیله این دو آنزیم هضم گردید. سپس جهت

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.3.7]

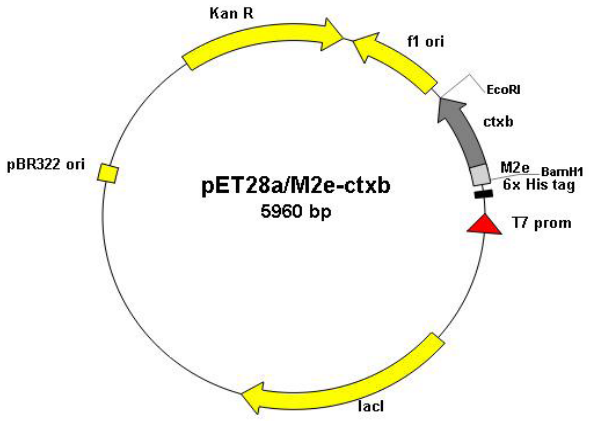


شکل ۱- قطعه M2e-*ctxb*.

ایجاد وکتور نوترکیب، عمل لیگاسیون محصول PCR و وکتور هضم شده با استفاده از آنزیم لیگاز صورت گرفت (شکل۲). برای این منظور۱۰۰ نانوگرم وکتور هضم شده، محصول خالص شده PCR به نسبت مولی ۱:۳ در برابر وکتور، ۳ میکرولیتر بافر لیگاز (10X)، ۱ واحد آنزیم لیگاز و تا حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر water nuclease free افزوده و به صورت شبانه در دمای محیط (۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه گردید. به منظور تکثیر، وکتور نوترکیب در باکتری *E.coli* سویه Top10 (Invitrogen, USA) ترانسفورم گردید. باکتری های ترانسفورم شده در محیط کشت LB آگار حاوی کانامایسین به صورت شبانه کشت داده شدند. کلنی های حاوی پلازمید نوترکیب با انجام PCR کلنی و با استفاده از پرایمرهای F قطعه *M2e* و R قطعه *ctxB* شناسایی گردیدند. جهت آنالیز توالی ابتدا یک کلنی از کشت شبانه کلنی های مثبت برداشته و در محیط LB براس تکثیر و پلازمید نوترکیب با استفاده از کیتQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA) استخراج گردید. تائید نهایی کلونینگ و ساخت وکتور نوترکیب pET28a/*ctxB-M2e* با استفاده از آنالیز توالی پلازمید های استخراج شده صورت گرفت.

یافته ها

انجام واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری ویبرو کلرا و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی موجب تکثیر قطعه *ctxB* به اندازه ۳۴۵ جفت باز گردید. این قطعه تکثیر شده علاوه بر زیر واحد B انتروتوکسین وبا حاوی جایگاه برش برای آنزیم های *HindIII* ، *EcoRI* و کدون پایان رونویسی نیز بود. واکنش PCR مربوط به *M2e* نیز موجب تکثیر قطعه ای به اندازه ۱۰۴ جفت باز گردید. این قطعه حاوی M2e ، جایگاه برش برای آنزیم های *HindIII* و *BamHI* و لینکر سرین گلیسین بود. نتایج حاصل از آنالیز توالی نشان داد که دو قطعه *M2e* و *ctxB* در فریم مناسب به یکدیگر متصل شده بودند. قطعه فیوز شده حاصل اندازه ای درحدود ۵۰۰ (۵۲۰-۵۰۰ جفت باز) جفت باز داشت.



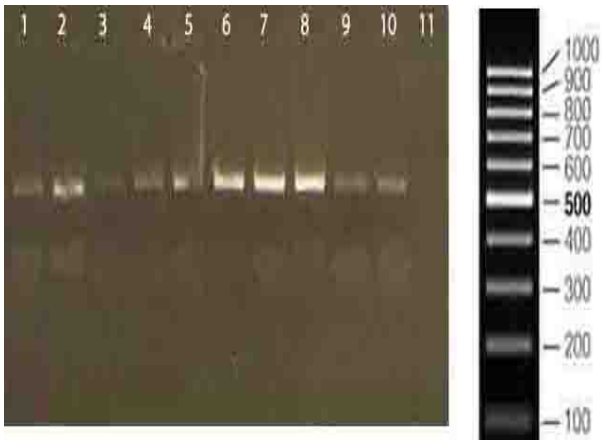
شکل ۲- وکتور نوترکیب pET28a/*ctxB-M2e*

این قطعه در ناحیه Multiple cloning site بین جایگاه برش آنزیم های (۱۹۸) *BamHI* و (۱۹۲) *EcoRI* وکتور بیانی pET28a کلون گردید. این ناحیه پائین دست پروموتور T7 و 6x Histidine Tag قرار گرفته است. پلازمید نوترکیب حاصل سپس در باکتری *E.coli* سویه Top10 ترانسفورم گردید. فقط باکتری های حاوی وکتور یا پلازمید نوترکیب به روری محیط دارای آنتی بیوتیک کانامایسین رشد کردند. کلنی های حاوی پلازمید نوترکیب به وسیله انجام واکنش PCR کلنی شناسایی شدند. قطعه تکثیر شده همانطور که انتظار می رفت تقریبا ۵۰۰ جفت باز بود (شکل ۳). جهت تائید جهت وارد شدن قطعه فیوز شده در وکتور پس از استخراج پلازمید از کلنی های مثبت با استفاده از آنزیم های *BamHI* و *EcoRI* هضم آنزیمی صورت گرفت. آنالیز آنزیمی، دو باند به اندازه های تقریبی ۵۰۰ جفت باز (قطعه فیوز شده) و ۵۳۰۰ جفت باز (وکتور) را نشان داد (شکل ۴). آنالیز توالی پلازمید نوترکیب نشان داد که دو ژن *M2e* و *ctxB* به یکدیگر متصل شده و در فریم مناسب در ناحیه MCS وکتور pET28a کلون گردیده بود. علاوه بر این توالی *M2e* هومولوژی ۱۰۰ درصد با پروتئین ماتریکس ۲ سویه استاندارد *آنفلوانزا* A و توالی ctxB هومولوژی ۱۰۰ درصد با زیر واحد B انتروتوکسین

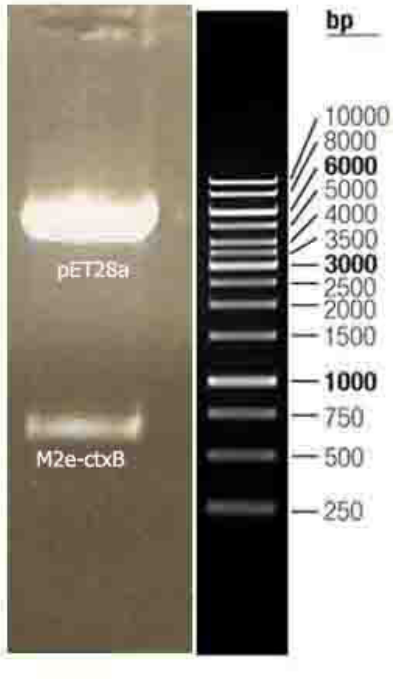
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.3.7]

وبا داشتند. وزن مولکولی پروتئین حاصل از قطعه فیوز شده M2e-ctxB نیز در حدود ۲۰ کیلو دالتون می باشد.



شکل ۳- نتیجه الکتروفورز واکنش colony PCR. ردیف های ۱۰-۱: قطعه تکثیر شده به اندازه تقریبی ۵۰۰ جفت باز با استفاده از پرایمر های F *M2e* و R *ctxB* . در تمامی کلنی های جدا شده اندازه قطعه تکثیر شده در حدود ۵۰۰ جفت باز بود که نشان می دهد تمامی کلنی های حاوی قطعه کلون شده *M2e-ctxB* می باشند. ردیف ۱۱: کنترل منفی واکنش PCR.



شکل۴- آنالیز آنزیمی وکتور نوترکیب pET28a حاوی قطعه *M2e-ctxB* به وسیله آنزیم های *BamHI* و *EcoRI*. در نتیجه هضم آنزیمی دو قطعه به اندازه های تقریبی ۵۵۰۰ جفت باز (pET28a) و ۵۰۰ جفت باز (قطعه کلون شده M2e-ctxB) به دست آمد.

بحث

با توجه به شیوع بالای بیماری *آنفلوانزا* مطالعات زیادی در زمینه پیشگیری و درمان آن در حال انجام است. واکسیناسیون موثرترین و ارزشمندترین روش پیشگیری از بیماری های عفونی می باشد (۱۴، ۵). بسیاری از این واکسن ها براساس پروتئین های HA و NA ویروس تهیه می شوند. یکی از مهم ترین چالش ها در زمینه تولید واکسن های نوترکیب زیرواحدی *آنفلوانزا* ناپایداری ژنتیک پروتئین های HA و NA می باشد. دومین خارجی پروتئین ماتریکس ۲ *آنفلوانزا* به دلیل ثابت بودن توالی یکی از مهم ترین آنتی ژن ها جهت تولید واکسن های جدید بر علیه *آنفلوانزا* می باشد (۸). مطالعات زیادی بر روی پتانسیل ایمنی زایی واکسن های تهیه شده از *M2e* صورت گرفته است. نتایج حاصل نشان داد که *M2e* ایمنی زایی ضعیفی دارد ولی ایمنی زایی آن در صورت استفاده از یک ادجوان یا ترکیب با یک آنتی ژن دیگر افزایش می یابد. به کارگیری ادجوان ها اگر چه ممکن است موجب افزایش پاسخ ایمنی شود ولی بسیاری از آن ها ممکن است موجب بیماری های خود ایمنی و آرتریت در انسان شوند (۱۹). در پژوهش های اخیر پروتئین M2 *آنفلوانزا* با پروتئین هایی نظیر پروتئین core ویروس هپاتیت B، پروتئین غشاء خارجی *Neiseria meningitidis*، پروتئین فلاژلین سالمونلا، HSP70 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PapMV-CP ترکیب و ایمونوزایی پروتئین M2 در این حالت ها ارزیابی گردید. در تمامی مطالعات فوق سطح بالایی از تحریک سیستم ایمنی توسط پروتئین M2 گزارش شده است. در حقیقت پروتئین ترکیب شده نقش موثری در افزایش پاسخ ایمنی بدن داشته است (۱۳، ۹، ۲۰، ۶، ۷). یکی از آنتی ژن هایی که می توان برای ایجاد واکسن های نوترکیب (واکسن های فیوژن) *آنفلوانزا* به همراه M2e استفاده کرد زیر واحد B انتروتوکسین وبا می باشد. زیر واحد B به شدت موجب تحریک سیستم ایمنی به ویژه سیستم ایمنی مخاطی می شود و هیچ گونه سمیتی برای سلول های انسان ندارد. این پروتئین از نظر بیولوژیکی غیر فعال است. محققان در پژوهش های متعددی نشان داده اند که واکسن های استنشاقی و خوراکی که بر علیه پاتوژن های سیستم تنفسی انسان ساخته می شوند در صورتی که با یک ادجوان تحریک کننده سیستم ایمنی مخاطی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.3.7]

همراه نباشند پاسخ ایمنی ضعیفی ایجاد می کنند. استفاده از زیر واحد B سم وبا جهت تهیه واکسن های *آنفلوانزا* می تواند سیستم ایمنی مخاطی را بر علیه این ویروس تحریک و پاسخ ایمنی مناسب تری ایجاد کند (۱۱). در این تحقیق اولین مرحله در بررسی توانایی ایمنی زائی واکسن نوترکیب *آنفلوانزا* بر پایه فیوژن پروتئین *M2e-CtxB* انجام شد. برای این منظوردومین خارجی M2 به صورت موفقیت آمیزی به ژن زیرواحد B انتروتوکسین وبا که به شدت ایمونوژن می باشد متصل و در وکتور pET28a به منظور بیان در سیستم پروکاریوتی کلون و توالی نوکلئوتیدی آن ارزیابی گردید. سیستم های مختلفی جهت بیان پروتئین های نوترکیب وجود دارد. از جمله این سیستم ها می توان از سیستم های بیان پروکاریوتی و سیستم های بیان یوکاریوتی نام برد. بسته به نوع پروتئین هدف یکی از این سیستم ها را جهت تولید پروتئین نوترکیب می توان به کار گرفت. از مهم ترین سیستم های بیانی پروکاریوتی سیستم بیان پروتئین در باکتری *E.coli* می باشد. مهمترین ویژگی بیان پروتئین در *E.coli* میزان بالای تولید پروتئین و مقرون به صرفه بودن آن می باشد. علاوه بر این، این سیستم همانند سایر سیستم های بیان پروکاریوتی فاقد فرآیند های پس از ترجمه مانند گلیکولیزاسیون، استیلاسیون و کربوکسیلاسیون می باشد. بنابراین برای بیان پروتئنی هایی که جهت فعالیت خود نیازمند تغییرات پس از ترجمه هستند از این سیستم نمی توان استفاده کرد (۳). با توجه به این که هیچ یک پروتئین های *M2e* و *CtxB* نیاز به تغییرات پس از ترجمه ندارند، جهت تولید پروتئین *M2e-CtxB* استفاده از سیستم بیانی *E.coli* مناسب می باشد. وکتورهای بیانی مختلفی جهت بیان ژن در باکتری *E.coli* گسترش یافته است. از این جمله می توان از وکتورهای pET نام برد. در این وکتورها جهت بیان ژن مورد نظر از پروموتور باکتریوفاژ T7 استفاده می شود. پروموتورT7 بسیار قوی بوده و توسط RNA پلیمرازهای *E.coli* شناسایی نمی شوند. بنابراین با استفاده از وکتورهای pET به طور اختصاصی و به میزان زیاد ژن مورد نظر بیان می گردد. پروموتور T7 در بالادست ناحیه MCS قرار گرفته است. وجود برچسب 6x His بعد از پروموتور موجب افزوده شدن این برچسب به انتهای آمین پروتئین هدف می گردد. پروتئین های نوترکیب حاوی برچسب His به راحتی توسط ستون ها یا رزین های Ni-NTA خالص می شوند. پس از بیان ژن و خالص سازی پروتئین حاصل، برچسب هیستیدین را می توان با استفاده از پروتئاز ترومبین از انتهای آمین پروتئین هدف حذف کرد. MCS در وکتورهای pET به ویژه وکتور pET28a جایگاه برش برای بیشتر آنزیم های برش دهنده معمول را دارند. با استفاده از آنزیم های برش دهنده *BamHI* و *EcoRI* قطعه فیوز شده *M2e-CtxB* در چهارچوب مناسب جهت بیان در باکتری *E.coli* (سویه BL21) در ناحیه MCS وکتور کلون گردید. پس از بیان در باکتری *E.coli* سویه BL21، پروتئین حاصل به همراه برچسب His tag اندازه ای در حدود ۱۸ تا ۲۰ کیلو دالتون خواهد داشت.

نتیجه گیری

در این تحقیق به صورت موفقیت آمیزی دو قطعه *M2e* و *ctxB* به یکدیگر متصل و به شکل یک ORF مستقل ازدیاد گردیدند. هرچند که پروتئین ماتریکس ۲ *آنفلوانزا* در سلول میزبان دچار تغییرات پس از ترجمه نمی گردد ولی به منظور مقایسه میزان تولید پروتئین نوترکیب *M2e-CtxB* و همچنین مقایسه میزان ایمنی زایی، کلونینگ ژن فیوز شده در سیستم های بیانی یوکاریوتی نظیر باکولوویروس و یا سیستم های بیانی مخمر پیشنهاد می گردد. علاوه بر این جهت استفاده از این قطعه اتصالی در یک واکسن موثر بر علیه *آنفلوانزا* نوع A ارزیابی توانایی ایمنی زائی پروتئین حاصل در مدل حیوانی ضروری می باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.3.7]

منابع

(1) Bram P. New Vaccine Approaches for Seasonal and Pandemic Influenza. Vaccine, 2008; 26: 6232-6236.

(2) Bright R, Shay D, Shu B, Cox J, Klimov A. Amantadine Resistance among Influenza A Viruses Isolated Early During The 2005-2006 Influenza Season in The United States. JAMA, 2006; 22 (8):.891-894

(3) Brown TA. Production of Protein from Cloned Genes, Gene Cloning and DNA Analysis an Introduction, 4th Edition, London, Blackwell Science, 2001, pp.271-292.

(4) Burke A, Cunha MD. Influenza: Historical Aspects of Epidemics and Pandemics. Infect Dis Clin North Am, 2004; 18 (1): 141–155.

(5) Cuadros C, Lopez F, Dominguez A, Mc Clelland, Lustgarten J. Flagellin Fusion Proteins as Adjuants or Vaccines Induce Specific Immune Responses. Infect Immun, 2004; 72 (5): 2810-2816.

(6) De Filette D, Martens W, Smet A, Schotsaert M, Brikett A, Arcila P, Fiers W, Saelens X. Universal influenza A M2e-HBc Vaccine Protects Against Disease Even in The Presence of Pre-existing Anti-HBc Antibodies. Vaccine, 2008; 26 (51): 6503-6507.

(7) Denis J, Ramirez E, Zhao Y, Hamelin M, Koukavica I, Baz M, Abed Y, Savard C, Pare C, Macias C, Boivin G, Leclerc D. Development of a Universal Influenza A Vaccine Based on The M2e Peptide Fused to The Papaya Mosaic Virus (PapMV) Vaccine Platform. Vaccine, 2008; 26 (27): 3395-3403.

(8) Ebrahimi M, Aghaiypour Kh, Nili H. Sequence Analysis of *M2* Gene of Avian Influenza Virus Strain (A/Chicken/Iran/101/98 (H9N2)) as An Oil Vaccine Seed. Iran J Biotehnol, 2008; 6 (4): 235-238.

(9) Ebrahimi M, Tebianian M, Toghiyani H, Memarnejafian A, Attaran R. 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 Expr Purif, 2010; 70 (1): 7-12.

(10) Galarza J, Latham T. Virus-like Particle (VLP) Vaccine Conferred Complete Protection Against a Lethal Influenza Virus Challenge. Viral Immunol, 2005; 18 (1): 244-51.

(11) Harakoni T, Sugawa H, Komesu A, Tadano M, Arakawa T. Heteropentameric Cholera Toxin B Subunit Chimeric Molecules Genetically Fused to A Vaccine Antigen Iinduced Systematic and Mucosal Immune Responses: A Potential New Strategy to Target Recombinant Vaccine Antigens to Mucosal Immune Systems. Infect Immun, 2005; 73 (9): 5654-5665.

(12) Hehme N, Colegate T, Palache B, Hessel L. Influenza Vaccine Supply: Building Long-term Sustainability. Vaccine, 2008; 4 (4): D23-6.

(13) Huleatt JW, Nakaar V, Desai P, Huang Y, Hewitt D, Jacobs A, Tang J, McDonald W, Song L, Evans RK, Umlauf S, Tussey L, Powell TJ. 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): 201-214.

(14) Jefferson T, Rivetti A, Harnden A, Di pietrantonj C, Demicheli V. Vaccines for Preventing Influenza in Healthy Children. Cochrane Database Syst Rev, 2008; 16 (2): 1-247.

(15) Kuiken T, Fouchier R, Rimmelzwaan G, Osterhaus A. Emerging Viral Infections in A Rapidly Changing World. Curr Opin Biotechnol, 2003; 14 (6): 641–646.

(16) Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, Orthomyxoviruses, Medical Microbiology, 5th edition, Philadelphia, Elsevier Mosby Publishing, 2005, pp.609-619.

(17) Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, Genetic Reassortment of Human Influenza Viruses in Nature, Textbook of Influenza, 1st Edition, Oxoford, Blackwell Science, 1998, pp.120-125.

(18) Ninomiya A, Ogasawara K, Kajino K, Takada A, Kida H. Intranasal Administration of A Synthetic Peptide Vaccine Encapsulated in Liposome Together with An Anti-CD40 Antibody Induces Protective Immunity Against Influenza A Virus in Mice. Vaccine, 2002; 20 (25): 3123–3129.

(19) Schotsaert M, Filette M, Fiers W, Saelens X. Universal M2 Ectodomain Based Influenza A Vaccines: Preclinical and Clinical Developments. Expert Rev Vaccines, 2009; 8 (4): 499-508.

(20) Turely B, Rupp R, Johnson C, Taylor N, Wolfson J, Tussey L, Kavita U, Stanberry L, Shaw A. Safety and Immunogenicity of A Recombinant M2e–flagellin Influenza Vaccine (STF2.4xM2e) in Healthy Adults. Vaccine, 2011; 29 (32): 5145-5152.

(21) Wharton SA, Weis W, Skehel JJ. Structure, Function, and Antigenicity of the Hemagglutinin of Influenza Virus, The Influenza Viruses, 1st Edition, New York., Plenum Press, 1975, pp.153–169.

(22) World Health Organization, WHO, 2006, pp.1-24, http://www.whqlibdoc.who.int/hq/2006/who_ivb_06.13_eng.pdf.

(23) World Health Organization, WHO, 2005, pp.1-9, http://www.who.int/immunization/documents/Influenza_refs_final.pdf.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.3.7]