Journal of Microbial World
Volume 15, No. 1, June 2022

Original Article

Cloning and expression of Hemagglutinin gene of H9N2 influenza virus in Sf9 cells

Mohadeseh Moheb Shahedin[1], Majid Moghbeli[2], Mohammad Kargar[3], Mojtaba Jafarinia[1]

[1]Department of biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran. [2]Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. [3]Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Influenza virus is one of the most important causes of death due to respiratory diseases in poultry, which causes a lot of damage to the poultry industry worldwide every year. Hemagglutinin (HA) protein is one of the main factors in the pathogenesis of this virus. The aim of this research is cloning and expression of this gene in Sf9 cell using baculovirus.

Materials & Methods: After isolating of the H9N2 influenza virus genome, the HA gene was amplified by specific primers by RT-PCR and PCR methods and transferred to Bakmid using pFastBac Dual vector. The recombinant HA gene was transferred to the DH10Bac host cell. By transfecting Sf9 cells with recombinant bacmid, the expression of recombinant protein was examined by SDS-PAGE, western blotting and Bradford methods.

Results: The protein obtained from recombinant Bakmid was evaluated using SDS PAGE and its purity was confirmed. The concentration of recombinant protein in the supernatant of Sf9 cells infected with recombinant virus was estimated to be 138µg / ml and confirmed by western blotting.

Conclusion: In the present study, the HA gene was successfully cloned on the PfastBacDual vector. With animal experiments, this protein could be used as a recombinant vaccine candida against influenza H9N2 virus.

Key word: Influenza virus, Baculovirus, PfastBacDual vector, Recombinant vaccine.

Received: 2 November 2021 Revised: 11 March 2022 Accepted: 26 April 2022

Correspondence to: Majid Moghbeli
Tel: +98 09122218612
E-mail: moghbeli552@gmail.com

Journal of Microbial World 2022, 15(1): 32-40
DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره چهارم (پیاپی ۵۰) بهار ۱۴۰۱
صفحات ۴۰-۳۲

Original Article

کلون کردن و بیان ژن هماگلوتینین ویروس آنفولانزا H9N2 در سلول Sf9

محدثه محب شاهدین[۱]، مجید مقبلی[۲]، محمد کارگر[۳]، مجتبی جعفرینیا[۱]

[۱]گروه زیست شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران. [۲]گروه میکروبیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
[۳]گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: ویروس آنفولانزا یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر طیور بر اثر بیماری‌های تنفسی است که سالیانه خسارات زیادی را به صنعت پرورش طیور در سراسردنیا وارد می‌کند.پروتین هماگلوتینین (HA) از عوامل اصلی در بیماری‌زایی این ویروس است لذا هدف از پژوهش حاضر کلون کردن و بیان این ژن در سلول Sf9 با استفاده از باکولوویروس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بعد از جداسازی ژنوم ویروس آنفولانزا H9N2، ژن HA توسط پرایمرهای اختصاصی با روش‌های RT-PCR و PCR تکثیر و با کمک وکتور pFastBac Dual به بکمید منتقل گردید. بکمید نوترکیب واجد ژن HA به سلول میزبان DH10Bac انتقال داده شد. با ترانسفکت کردن سلول Sf9 با بکمید نوترکیب، چگونگی بیان و میزان بیان پروتین نوترکیب با روش‌های SDS-PAGE، western blotting و بردفورد بررسی شد.

یافته‌ها: پروتین حاصل از بکمید نوترکیب با استفاده از SDS PAGE بررسی و خلوص آن تائید شد. غلظت پروتین نوترکیب در محلول رویی سلول‌های Sf9 آلوده به ویروس نوترکیب 138 µg/ml تخمین و توسط western blotting تائید شد.

نتیجه‌گیری: در تحقیق حاضر ژن HA بر روی وکتور PfastBacDual با موفقیت کلون شد و بعد از انتقال بر روی بکمید و ترانسفکت به سلول Sf9 بیان مناسبی از ژن در محلول رویی سلول‌های Sf9 بدست آمد. با انجام آزمایش‌های حیوانی، این پروتین می‌تواند به عنوان واکسن نوترکیب بر علیه آنفولانزا H9N2 مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ویروس آنفولانزا، باکولوویروس، وکتور PfastBacDual، واکسن نوترکیب.

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۱ ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۲/۶

مقدمه

ویروس آنفولانزا یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر بر اثر بیماری‌های تنفسی است (۱). این ویروس به زیرخانواده آنفولانزا و خانواده ارتومیکسوویریده تعلق دارد (۲). آنفولانزای تیپ A از نظر آنتی‌ژنیک بسیار تغییرپذیر بوده و سرمنشاءآنفولانزا در طیور است (۱). ژنوم ویروس آنفولانزا شامل RNA تک رشته‌ای قطعه قطعه است که به عنوان mRNA عمل می‌کند و می‌تواند منجر به تغییرات آنتی‌ژنیک وسیعی شود (۲). این امر می‌تواند موجب انتقال بیماری از پرنده به انسان و حتی پس از آن، انتقال انسان به انسان گردد (۵). ویروس‌های تیپ A، دارای یک غشاء لیپیدی دو لایه، با سه نوع پروتین سطحی هستند، که شامل گلیکوپروتین هماگلوتینین (HA)، نورامینیداز (NA) و ماتریکس (M) می‌شود (۶). گلیکوپروتین هماگلوتینین (HA) فراوان‌ترین

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۲۲۱۸۶۱۲ پست الکترونیک: moghbeli552@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

پروتین داخلی و اولین ژن تعیین کننده بیماریزایی ویروس آنفولانزا است و دارای دو زیرواحد HA1 و HA2 می‌باشد که HA1 خاصیت آنتی‌ژنی داشته و همچنین مسئول اتصال به گیرنده سطح سلول بوده و در انتشار ویروس و تحریک تولید پاسخ ایمنی در سلول نقش اساسی دارد (۷). واکسیناسیون بهترین راه برای کنترل بیماری آنفولانزا می‌باشد اما با بروز تغییرات آنتی‌ژنی این واکسن‌ها کارایی خود را از دست می‌دهند (۱). معمولا واکسن‌های ویروس غیرفعال‌شده، پاسخ‌های ایمنی موضعی خوبی از آنتی‌بادی IgA با ایمنی وابسته به سلول را تولید نمی‌کنند (۱). واکسن‌های زنده می‌توانند محافظت خوبی را در مقایسه با واکسن‌های کشته، ایجاد کنند. این واکسن‌ها علاوه بر ایمنی هومورال، ایمنی سلولی را نیز تحریک می‌کنند اما تاکنون بدلیل امکان جهش مجدد و انتقال سریع بیماری و نیز ماهیت تغییر پذیری ویروس و بروز شیفت‌ها ودریفت‌های متعدد آنتی‌ژنی، اجازه مصرف در طیور داده نشده است. یکی از روش‌های نوین تولید واکسن آنفولانزا استفاده از واکسن‌های نوترکیب فیوژ شده با پروتئین‌هایی است که ایمنی‌زایی زیادی دارند (۲). در صورتیکه بتوان از ژن HA بطور خالص به‌عنوان واکسن استفاده کرد، ایمنی‌زایی این واکسن‌ها افزایش می‌یابد (۸). هدف از انجام این پژوهش، کلون سازی و بیان ژن هماگلوتینین (HA) با استفاده از باکولو ویروس در سلول‌های Sf9 با هدف استفاده از پروتین نوترکیب تولید شده به عنوان واکسن علیه بیماری انفولانزای طیور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) استخراج RNA: ویروس آنفولانزا، سویه H9N2 بصورت غیر فعال از موسسه واکسن و سرم سازی رازی (ایران) تهیه شد. استخراج RNA توسط کیت استخراج RNA شرکت اینترون (کره جنوبی) و با استفاده از پروتکل استاندارد موجود در کیت انجام شد.

ب) سنتز cDNA: پرایمرهای اختصاصی ژن HA ویروس آنفولانزا H9N2 با استفاده از سکانس‌های موجود در بانک ژن NCBI و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک طراحی گردید در ابتدا و انتهای ژن HA به ترتیب جایگاه‌های *Bam*HI و *Xba*I طراحی شد (جدول۱).

سنتز cDNA با استفاده از کیت ThermoScript^{TM} RT-PCR System (Invitrogen^{TM}, USA) و پرایمر ریورس انجام شد. برنامه دمایی شامل ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سلسیوس برای فعالیت آنزیم ترانسکریپتاز معکوس، ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس برای تکمیل دوره سنتز، ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس و در انتها ۱۵ دقیقه در ٤ درجه سلسیوس بود.

جدول۱: پرایمرهای مورد استفاده برای جداسازی و تکثیر ژن HA.

Name	Primer
HA	F: GGATCCATGGAAACAATATCACTAATAACTATAC R:AAGCTTTTATATACAAATGTTGCATCTGCAAGATC

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن HA با استفاده از مستر میکس Exprime (۲X) و پرایمرهای اختصاصی انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس به صورت جداگانه و cDNA به میزان ۱ میکرولیتر (تقریباً ۱۰۰ ng/µl) و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه دمایی به صورت ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه برای یک چرخه، ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ٤۵ ثانیه برای ۳۲ چرخه و در انتها ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای یک چرخه اجرا شد (۲۰).

محصول واکنش در داخل TA کلونینگ وکتور pTZ57R توسط روش استاندارد موجود در کیت کلون و توسط روش شوک حرارتی به سلول پذیرنده *E. coli* انتقال و ذخیره شد (۱۸).

ج) آماده سازی ژن HA و وکتور pFast DualTM : بر روی تی وکتور حامل ژن و PfastBacDual با استفاده از دو آنزیم *Nco*I و *Kpn*I و بافر y-tango 2X (ThermoFisher Scientific) واکنش هضم آنزیمی به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. بعد از الکتروفورز واکنش‌های هضم

آنزیمی بر روی الکتروفورز ، ژل حاوی باندهای ژن HA و وکتور PfastBacDual با اسکالپل جدا و با استفاده از کیت جداسازی DNA از ژل (پویا ژن آزما، ایران)، نمونه‌ها استخراج و خالص شد (۱۲).

مخلوط واکنش لایگیشن بین ژن HA و وکتور pFast DualTM شامل ۲/۵ میکرولیتر وکتور، ۵ میکرولیتر از ژن HA، ۱ میکرولیتر آنزیم T4 DNA ligase (Geneon, China)، ۱ میکرولیتر بافر لایگشن ۱۰X و ۱ میکرولیتر پلی اتیلن گلیکول در حجم کلی ۱۰ میکرولیتر بود. مخلوط واکنش به مدت ۱۲۰ دقیقه در ۲۲ درجه سلسیوس قرار گرفت. از باکتری *E.coli DH5α* به عنوان میزبان وکتور نوترکیب استفاده گردید. ۵ میکرولیتر از محصول لایگیشن در داخل ناقل باکتریایی *DH5α* مستعد به روش استاندارد شوک حرارتی، ترانسفورم شد(۱۰). کلونی‌های نوترکیب بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG کشت داده شد. صحت کلونینگ با روش کلونی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و هضم آنزیمی مورد تائید قرار گرفت (۱۴).

د) ساخت بکمید نوترکیب: پلاسمید نوترکیب pfastHA با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (پویا ژن آزما،ایران) و طبق پروتکل استاندارد موجود در کیت استخراج و با استفاده از روش استاندارد شوک حرارتی به سلول مستعد *E.coli* DH10Bac منتقل شد و بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، تتراسایکلین و جنتامایسین (با غلظت‌های به ترتیب ۵۰µg/ml، ۱۰، ۷) کشت داده شد. از آنجائیکه اندازهٔ DNA بکمید بزرگ است (حدود ۱۳۵ کیلوباز)، هضم آنزیمی آن بسیار مشکل می‌باشد. لذا از واکنش PCR به منظور تائید بکمید نوترکیب استفاده گردید. بکمید واجد توالی های آغازگر M13 در دو سوی محل ترانسپوزون در ناحیهٔ Lacza می‌باشد لذا از پرایمرهای اختصاصی M13 برای انجام PCR استفاده گردید(جدول۲).

جدول۲: پرایمرهای اختصاصی M13.

Name	Primer
M13	F: CCCAGTCAC GAC GTT GTA AAA CG R: AGCGGA TAA CAA TTT CAC ACA GG

مخلوط واکنش شامل ۵/۲ میکرولیتر Buffer(10X)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP Mix (10mM each)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۱ میکرولیتر آنزیم DreamTaq DNA Polymerase، ۵ میکرلیتر از پلاسمید نوترکیب و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. برنامه دمایی شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه برای واسرشتی اولیه یک سیکل، ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال پرایمرها به ژن هدف و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه ۳۵ سیکل و در انتها ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه برای یک سیکل تنظیم شد (۱۰).

ه) بیان پروتین نوترکیب در سلول Sf9: به منظور بیان پروتین نوترکیب از سلول Sf9 استفاده شد. پس از تهیه سلول‌های حشرات Sf9 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران ، 10^6 × ۸۰۰ سلول جوان در فاز لگاریتمی در پلیت کشت ۶ خانه ای حاوی محیط کشت گریس دارای مکمل (Grace, s insect medium (1X) Supplemented) و حاوی ۱۰٪ FBS، و ۱٪ آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس پاساژ داده شد. ۸ میکرولیتر سلفکتین و ۱ میکروگرم DNA بکمید نوترکیب (Bac-infHA) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرارداده شد. مخلوط ترانسفکشن قطره قطره به سلول‌های Sf9 اضافه و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۵ ساعت نگهداری شدند. پس از حذف مخلوط ترانسفکشن، به سلول‌ها ۲ میلی‌لیتر محیط کشت کامل حاوی ۱۰٪ FBS اضافه و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از ظهور اثرات سایتوپاتیک (cytopathic effect CPE) در روز سوم پس از آلوده کردن، محلول رویی جدا و برای حذف باقی مانده سلول‌ها، محلول در g2000 به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفوژ شد. با توجه به وجود سیگنال پپتید در ابتدای ژن و انتظار ترشح پروتین نوترکیب به داخل محیط کشت، و یا تولید VLP، محلول رویی برای وجود پروتین به روش استاندارد SDS-PAGE بررسی گردید (۱۲).

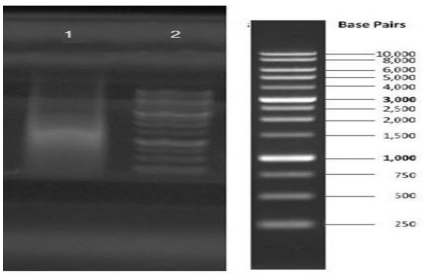
و) بررسی پروتین با وسترن بلاتینگ:

نمونه‌های پروتین نوترکیب از روی ژل SDS-PAGE به وسیله

روش استاندارد semi dri، بر روی غشاء نیتروسلولزی انتقال یافت. فرایند هم یوغی با اضافه نمودن ml15 بافر PBS دارای 5/7 µl آنتی‌بادی موشی کونژوگه با آلکالین فسفاتاز (AP) انجام و به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه به آرامی هم زده شد. غشاء به ml15 بافر PBS دارای 45 µl NBT و 35 µl X-Phosphate انتقال و در محل تاریک قرار داده شد. به منظور بررسی میزان پروتین نوترکیب تولید شده از روش استاندارد بردفورد استفاده گردید(۱۳).

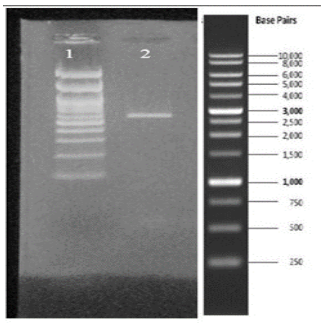
یافته‌ها

در بررسی Cdna با پرایمر ریورس اختصاصی ژن HA بر روی ژل آگاروز حالت اسمیر دیده شد که البته با توجه این که فقط از پرایمر ریورس استفاده شده بود، انتظار چنین نتیجه‌ای می‌رفت (شکل ۱).



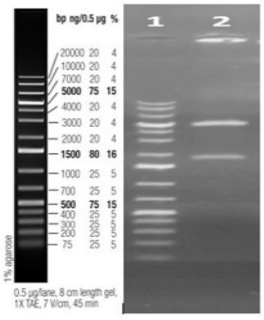
شکل ۱: الکتروفورز نمونه سنتز .cDNA. چاهک ۱: cDNA سنتز شده با استفاده از پرایمر ژن HA بر روی ژنوم ویروس آنفولانزا، چاهک ۲: kb ladder 1.

با توجه به شکل ۲، محصول PCR ژن HA یک باند به اندازه kb ۱/۷ بود که نشان دهنده صحت انجام واکنش PCR می‌باشد.



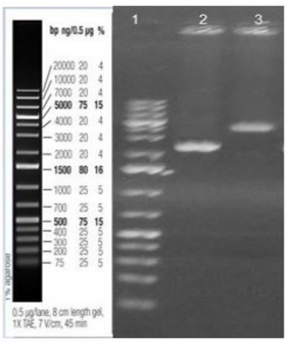
شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز. چاهک ۱: 1kb ladder چاهک ۲: محصول PCR ژن HA.

انجام کلنی PCR و هضم آنزیمی با آنزیم‌های NcoI و KpnI بر روی وکتور pFastBacTM Dual نوترکیب که تحت پروموتر پلی هیدرین می‌باشد نشان دهنده صحت وجود ژن HAدر وکتور pFastBacTM Dual می‌باشد. همانطور که در شکل ۳ مشخص است، پس از انجام هضم آنزیمی دو باند ایجاد شد، باند 7/1 kb و 5 kb که به ترتیب مربوط به ژن HA و وکتور pFastBacTM Dual می‌باشد.



شکل ۳: الکتروفورز نمونه وکتور pFastHA هضم شده با آنزیم‌های NcoI و KpnI. چاهک ۱: 1kb plus ladder ، چاهک ۲: وکتور هضم شده با دو آنزیم.

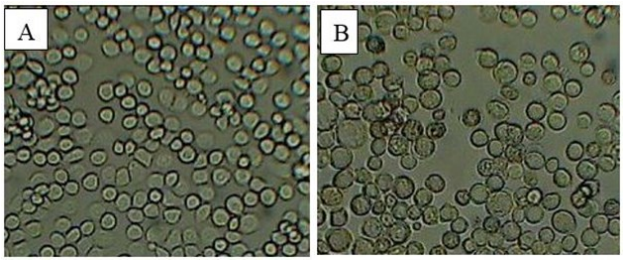
با بررسی وجود ژن بر روی بکمید نوترکیب با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های HA و M13 دو باند kb ۷/۱ و حدود kb ۳ بدست آمد و نشان داد که بکمید نوترکیب دارای ژن HA می‌باشد (شکل ٤).



شکل ٤: الکتروفورز محصول PCR بکمید نوترکیب و کنترل منفی. چاهک: 1kb ladder ، چاهک ۲: محصول PCR بکمید نوترکیب با پرایمرهای عمومی M13 ، چاهک ۳: محصول PCR بکمید کنترل منفی با پرایمرهای عمومی M13.

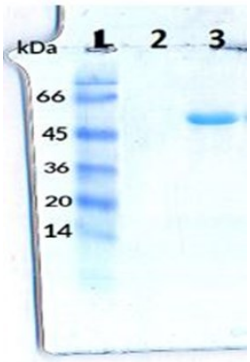
بررسی سلول‌های Sf9 نوترکیب در مقایسه با سلول‌های Sf9 طبیعی، نشان داد که در سلول‌های Sf9 آلوده شده با ویروس

نوترکیب، تقسیم سلولی متوقف شده و تشکیل CPE داده‌اند که نشان دهنده وجود وکتور نوترکیب در این سلول‌ها می‌باشد (شکل۵).



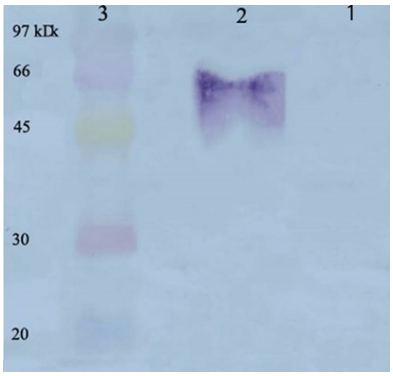
شکل۵: تصویر میکروسکپی از سلول‌های Sf9 آلوده نشده (A) و آلوده شده (B). در سلول‌های Sf9 آلوده شده با ویروس نوترکیب تقسیم سلولی متوقف و سلول‌ها بزرگتر شده‌اند.

بررسی پروتین نوترکیب HA در محلول رویی سلول‌های نوترکیب Sf9 به روش SDS-PAGE وجود پروتین با اندازه تقریبی ۶۰ KD را نشان داد که مربوط به پروتین هدف در محلول رویی سلول‌های نوترکیب Sf9 می‌باشد (شکل۶).



شکل۶: بررسی پروتئین‌های نوترکیب بر روی SDS-PAGE. چاهک ۱: لدر پروتئینی، چاهک ۲: محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده با بکمید بدون ژن، چاهک ۳: محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده با بکمید حامل ژن HA.

همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود در محلول رویی فقط یک باند با رنگ آمیزی کوماسی برلیانت بلو به اندازه ۶۰ کیلودالتون مشخص است که نشان دهنده خلوص پروتین می‌باشد. میزان پروتین نوترکیب در محلول رویی با روش بردفورد توسط وکتور حامل ژن HA، ۱۳۸ µg/ml بود. اتصال آنتی سرم HA به پروتین نوترکیب یک باند ۶۰ kD در وسترن بلات ایجاد نمود (شکل۷) در حالی که در نمونه محلول روئی سلول‌های ترانسفکت شده با بکمید بدون ژن هیچگونه باندی ظاهر نشده است. این مسئله نشان دهنده صحت ترانسفکت و بیان صحیح پروتین HA در سلول‌های Sf9 می‌باشد.



شکل۷: چاهک ۱: محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده با بکمید بدون ژن، چاهک ۲: محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده با بکمید نوترکیب، چاهک ۳: مارکر پروتئین.

بحث

بیماری آنفولانزای طیور یکی از بیماری‌های مهم تنفسی و واگیر دار طیور است که دارای قدرت انتشار سریع می‌باشد. ویروس‌های آنفولانزای طیور در خانواده ارتومیکسوویریده و جنس آنفولانزا قرار داشته و دارای ژنوم هشت قطعه‌ای با پولاریته منفی هستند (۱۳). بروز اپیدمی‌های آنفولانزای پرندگان حاصل از تحت تیپ H9N2 در طی سال‌های گذشته در طیور صنعتی و بومی برخی کشورها احتمال وجود آلودگی و گردش ویروس آنفولانزای پرندگان از تحت تیپ‌های مختلف در پرندگان اهلی و وحشی را بالا برده است. این بیماری هرچند سال یکبار پدیدار شده و به سرعت گسترش می‌یابد که موجب همه‌گیری وسیع و زیان‌های بزرگ به صنعت پروش طیور می‌شود. همچنین این افزایش احتمال بیماری شامل کشورهایی که برای اولین بار ویروس در آن‌ها یافت شده نیز می‌شود؛ به دلیل محدوده جغرافیایی گسترده، احتمال می‌رود ویروس H9N2 آسیب‌های اقتصادی بیشتری به پرورش طیور در سراسر جهان وارد کند. علاوه براین، در چهار سال گذشته نسبت به دو دهه قبل تعداد بسیار زیادی از عفونت‌های H9N2 در انسان‌ها

دیده شده‌است. این واقعیت‌ها حاکی از تهدید فزاینده ویروس H9N2 برای سلامت انسان و حیوان است (٤).

با توجه به شیوع بالای بیماری آنفولانزا مطالعات زیادی در زمینه پیشگیری و درمان آن در حال انجام است. واکسیناسیون موثرترین و ارزشمندترین روش پیشگیری از بیماری‌های عفونی می‌باشد. بسیاری از این واکسن‌ها براساس پروتئین‌های NA و HA ویروس تهیه می‌شوند. یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در زمینه تولید واکسن‌های نوترکیب زیرواحدی آنفولانزا، ناپایداری ژنتیکیِ پروتئین‌های HA و NA می‌باشد (۱۵). هماگلوتینین فراوان‌ترین پروتین داخلی در پوشش ویروس است که هدف اصلی برای ایجاد ایمنی می‌باشد (۱۳). HA به عنوان یک پروتین اولیه (HA0) ساخته می‌شود که توسط پروتئازهای سلولی به زیر واحدهای HA1 و HA2 شکسته می‌شود (۵). منطقه HA2 به طور قابل توجهی بیشتر از HA1 محافظت می‌شود و در سال‌های اخیر، تلاش‌های متعددی برای تولید جهانی واکسن آنفولانزا برپایه HA2 و بخش‌های متقابل HA1 انجام شده است (٦و۱۵و۱٦). به تازگی واکسن‌های برپایه mRNA که برای کنترل بیماری‌های عفونی ایجاد شده‌است پیشرفت کرده‌اند و چنین مطالعاتی نشان داده که این واکسن‌ها پتانسیل ایجاد ایمنی هومورال و همچنین میانجی‌های ایمنی سلولی را دارند (٦و۱۸).

در ساخت واکسن‌های طیور مقدار آنتی‌ژن واکسن و نوع ادجوان به کار رفته، اهمیت بیشتری در ایمنی‌زایی واکسن دارد (۱۹). بنابراین در پژوهش حاضر با استفاده از کلونیگ ژن HA در باکولوویروس هم میزان بیان پروتین بالاتر برده و هم خطر واکسن‌های زنده ضعیف شده را ندارد. همچنین با استفاده از کلونیگ ژن HA در باکولوویروس نیازی به مواد محافظت کننده، آنتی‌بیوتیک و ادجوانت نیست و عوارض جانبی کمتری را سبب می‌شوند. در سال ۲۰۱۲ Subathra و همکاران ژن هماگلوتینین آنفولانزا H5N1 را در وکتور pRSETA کلون کردند و سپس به سلول *اشریشیا کلی* انتقال دادند. Subathra و همکاران با استفاده از SDS PAGE پروتین خالص هماگلوتینین ٦۵ KD حاصل از بیان وکتور نوترکیب را مورد تائید قرار دادند (۲۰). همچنین در سال ۲۰۱۷ Bidram و همکاران ژن HA آنفولانزا H3N2 را با استفاده از وکتور pET-28a و pHT43 به سلول *اشریشیا کلی* BL21 انتقال دادند. میزان بیان پروتین نوترکیب در این پژوهش ۸۵ µg/ml بود (۲۱).

در پژوهش حاضر از ویروس غیر فعال شده آنفولانزا به عنوان منبع ژن استفاده شد و ژن HA بعد از تکثیر بر روی وکتور pFastBacDual کلون شد. وکتور نوترکیب حامل ژن HA بر روی بکمید کلون گردید و بکمید نوترکیب به سلول Sf9 ترانسفکت شد. این پژوهش برای اولین بار به کلونینگ HA ویروس آنفولانزا H9N2 در سیستم بیانی باکولوویروس پرداخته است. چرا که این سیستم واجد بسیاری از فعالیت‌های حیاتی یاخته‌های یوکاریوتیک نظیر پردازش و انتقال پروتئین می‌باشد و در واقع پروتئین تولید شده ماهیت خود را حفظ می‌کند. بطوریکه تشکیل باندهای دی‌سولفیدی، الیگومریزاسیون، گلیکوزیلاسیون، فسفریلاسیون و فولدینگ صحیح روی آن‌ها صورت می‌گیرد و پروتئین حاصله هم از نظر ساختاری و هم از نظر کار کردی مشابه پروتئین طبیعی می‌باشد. میزان بیان، در محلول رویی حامل سلول‌های ترانسفکت شده Sf9، µg/ml ۱۳۸ بدست آمد که این میزان نسبت به گزارش‌های قبلی بیشتر می‌باشد. با توجه به اثبات وجود پروتین نوترکیب HA بوسیله وسترن بلاتینگ و میزان بیان بالای آن، این پروتین می‌تواند به عنوان گزینه‌ای برای واکسن علیه بیماری آنفولانزای طیور مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

برای بهبود واکسن آنفولانزا یکی از مهم‌ترین خواسته‌ها رسیدن به یک پاسخ ایمنی گسترده‌تر و پایدارتر در برابر ویروس‌ها است. فناوری‌های واکسن نوترکیب به عنوان روش‌های جدید، تولید واکسن‌های فصلی و فراگیر را آسان می‌کند. طبق نتایج این پژوهش ژن HA به درستی جداسازی و به سلول حشره منتقل شد. همچنین نتایج وسترن بلات نشان دهنده بیان موفق این پروتین در سلول حشره بود. با تولید پروتین هماگلوتینین نوترکیب می‌توان امید داشت تا در آینده نزدیک بتوان

واکسن‌های زیر واحدی بر علیه آنفولوانزا تولید نمود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت و شرکت پویاژن آزما به دلیل همکاری و مساعدت، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض و منافع

وجود ندارد.

References

1. Bahari P, Pourbakhsh SA, Shoushtari H, Bahmaninejad MA. Molecular characterization of H9N2 avian influenza viruses isolated from vaccinated broiler chickens in northeast Iran. Tropical animal health and production. 2015 Aug;47(6):1195-201.
2. Barjesteh N, O'Dowd K, Vahedi SM. Antiviral responses against chicken respiratory infections: focus on avian influenza virus and infectious bronchitis virus. Cytokine. 2020 Mar 1;127:154961..
3. Jawetz, M. (2016). Medical Microbiology 27 edition, Lange
4. Carroll, K. C., et al. (2015). Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 27 E, McGraw-Hill Education.
5. Nicholson, K. G., et al. (1998). Textbook of influenza, Blackwell Science Ltd.
6. Bommakanti G, Citron MP, Hepler RW, Callahan C, Heidecker GJ, Najar TA, Lu X, Joyce JG, Shiver JW, Casimiro DR, ter Meulen J. Design of an HA2-based Escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010 Aug 3;107(31):13701-6.
7. Adel A, Arafa A, Hussein HA, El-Sanousi AA. Molecular and antigenic traits on hemagglutinin gene of avian influenza H9N2 viruses: Evidence of a new escape mutant in Egypt adapted in quails. Research in veterinary science. 2017 Jun 1;112:132-40.

8. Gaikwad SS, Lee HJ, Kim JY, Choi KS. Expression and serological application of recombinant epitope-repeat protein carrying an immunodominant epitope of Newcastle disease virus nucleoprotein. Clinical and experimental vaccine research. 2019 Jan;8(1):27.
9. Swayne, D. and D. Halvorson (2008). Influenza in Diseases of Poultry, (eds. Saif, YM, Fadly, AM, Glissom, JR, McDougald, LR, Nolan, LK & Swayne, DE) 153–184, Blackwell.
10. Sambrook J, Russell DW. Preparation and transformation of competent E. coli using calcium chloride. Cold Spring Harbor Protocols. 2006 Jun 1;2006(1):pdb-rot3932.
11. Gaikwad SS, Lee HJ, Kim JY, Choi KS. Expression and serological application of recombinant epitope-repeat protein carrying an immunodominant epitope of Newcastle disease virus nucleoprotein. Clinical and experimental vaccine research. 2019 Jan;8(1):27
12. Schägger H. Tricine–sds-page. Nature protocols. 2006 Jun;1(1):16.
13. Ellebedy, A. and R. Webby (2009). "Influenza vaccines." vaccine 27: D65-D68
14. Kuchipudi SV, Nissly RH. Novel flu viruses in bats and cattle:“Pushing the Envelope” of Influenza Infection. Veterinary sciences. 2018 Sep;5(3):71.
15. Skehel, J. J. and D. C. Wiley (2000). "Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin." Annual review of biochemistry 69(1): 531-569.
16. Steel, J., et al. (2010). "Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain." MBio 1(1): e00018-00010.
17. Vemula, S. V., et al. (2013). "Broadly protective adenovirus-based multivalent vaccines against highly pathogenic avian influenza viruses for pandemic preparedness." PloS one 8(4).
18. Hajam, I. A., et al. (2020). "Intranasally administered protein coated chitosan nanoparticles encapsulating influenza H9N2 HA2 and M2e mRNA molecules elicit protective immunity against avian influenza viruses in chickens." Veterinary research 51(1): 1-17.
19. Roche X, Fredrick K, Kamata A, Okuthe S, Kone P, Wiersma L, Von Dobschuetz S, Soumare B, Makonnen Y, Morzaria S, Lubroth J. 2016–2018 Spread of H5N8 highly pathogenic avian influenza (HPAI) in sub-Saharan Africa.
20. Subathra M, Santhakumar P, Pardhasaradhi P, Narasu ML, Chakravarty C, Lal SK. Cloning, expression and purification of haemagglutinin and neuraminidase gene of highly pathogenic avian influenza H5N1 in *Escherichia coli*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. 2012 Apr 1;6(2):222-8.
21. Bidram M, Behzadian F, Fotouhi F, Fazeli M. Cloning and prokaryotic expression of the globular head domain of hemagglutinin antigen (HA1) of influenza A (H3N2) virus in *Escherichia coli* and Bacillus subtilis. Archives of Medical Laboratory Sciences. 2017;3.