Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
Winter 2011; 13(53): 59-67

# Isolation, cloning, and sequencing of influenza A (H1N1) hemagglutinin for production of hemagglutinin gene bank

Farahmand B(PhD)[1], Khodabandeh M(PhD)[2], Mahboudi F(PhD)[3], Fotouhi F(PhD)[4], Barkhordari F(BSc)[3], Saleh M(MSc)[5] , Tavasoti kheiri M(PhD)[5*]

1- Influenza Unit of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2- Department of Industry and Environment, Research Center of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
3- Biotechnology Research Center of Pasture Institute of Iran, Tehran, Iran
4- Influenza Unit of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
5- Influenza Unit of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received 30 March 2010 Accepted 19 May 2010

**Abstract**

***Background:*** Influenza is a contagious respiratory infectious disease out breaking in cold seasons of the year. The outbreak of the new influenza A (H1N1) virus in 2009 involved large populations of the world with considerable mortality. Hemagglutinin (HA) molecule, the main surface glycoprotein of the influenza virus, is one of the key factors for serological diagnostic kits and vaccine development. Thus establishment of HA gene bank of the circulating influenza viruses is essential in gaining quick access to large amounts of protein.

***Materials and Methods:*** The first step in providing such a bank is detection and isolation of HA full genome and its subunits by using specific primers and cloning them in proper vectors. For this purpose, using standard virus genome (A/New Caledonia/20/99(H1N1)) cultured on MDCK cell, HA coding gene was proliferated by RT-PCR using specific primers.

***Results:*** Isolation and cloning of the HA gene was verified by RT-PCR, enzyme digestion and determining nucleotide synonymy. Through the use of specific cloning primers, different HA gene constructs were propagated for expression of the gene in insect cells and *E.coli* bacteria.

***Conclusion:*** The results indicated the complete compatibility of the extracted HA gene with the influenza (A/New Caledonia/20/99(H1N1)) hemagglutinin. It makes it possible to use the gene as a source of cloning in a variety of eukaryotic and prokaryotic expression systems.

***Keywords:*** Gene bank, Hemagglutinin, Influenza

*Corresponding author:
Address: Influenza Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email:mtkheiri@yahoo.com

سال 13، شماره 4 (شماره پیاپی 53)، زمستان 1389، 67-59

# جداسازی، کلونینگ وتعیین توالی ژن هماگلوتینین آنفلوآنزای A(H1N1) به منظور تهیه بانک ژن هماگلوتینین

**بهرخ فرهمند[1]، مهوش خدابنده[3]، فریدون مهبودی[2]، دکتر فاطمه فتوحی[4]، فرزانه برخورداری[5]، مریم صالح[6]، معصومه توسطی خیری[7] ***

1- دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی ،واحد آنفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران،تهران،ایران
2- استادیار،دکترای بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ژنتیک و زیست فن آوری ، تهران ، ایران
3- دانشیار ، دکترای بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران،تهران،ایران
4- استادیار،دکترای ویروس شناسی، واحد آنفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران،تهران،ایران
5- کارشناس میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران،تهران،ایران
6- کارشناس ارشدمیکروب شناسی، واحد آنفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران،تهران،ایران
7- استادیار، دکتری ویروس شناسی، واحد آنفلوآنزا، انستیتو پاستور ایران،تهران،ایران

تاریخ دریافت 89/1/10 ، تاریخ پذیرش 89/2/29

**چکیده**

**زمینه هدف:** آنفلوآنزا بیماری مسری عفونت دستگاه تنفسی است که در فصل های سرد سال شیوع پیدا می کند. شیوع ویروس جدید آنفلوآنزا A(H1N1) در سال 2009 که جمعیت کثیری از مردم جهان را درگیر کرد، مرگ و میر قابل توجهی در پی‌داشت. مولکول هماگلوتینین که اصلی‌ترین گلیکوپروتئین سطحی ویروس آنفلوآنزا است، یکی از ارکان مهم در تهیه کیت‌های تشخیصی و واکسن‌های موثر بر علیه این بیماری است. لذا تهیه بانک ژن سویه‌های شایع به منظور دسترسی سریع به مقدار انبوه این مولکول بسیار ضروری می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع پژوهشی- کاربردی می باشد. اولین قدم برای تهیه چنین بانکی، جداسازی ژن کامل هماگلوتینین و زیر واحدهای آن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی وکلونینگ آنها در ناقلهای مناسب است. در این راستا ابتدا با استفاده از ژنوم ویروس استاندارد ((A/NewCaledonia/20/99(H1N1)) کشت داده شده در سلول MDCK ، ژن کد کننده هماگلوتینین به روش RT-PCR تکثیر و در ناقل مناسب کلون گردید.

**یافته‌ها:** جداسازی و کلونینگ ژن هماگلوتینین با روش PCR ، هضم آنزیمی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی تایید گردید. با استفاده از پرایمرهای ویژه کلونینگ، سازه‌های مختلف واجد ژن هماگلوتینین مورد نظر به منظور بیان ژن در سلول حشره و باکتری اشریشیا کلی، تهیه گردید.

**نتیجه گیری:** نتایج به دست آمده نشان دهنده تطابق کامل قطعات ژنی استخراج شده با هماگلوتینین ویروس آنفلوآنزای A/New Caledonia 20/99(H1N1) است که استفاده ازاین منبع ژنی، اهداف خاص از قبیل کلون کردن در وکتورهای بیانی مختلف یوکاریوتی و پروکاریوتی را امکان پذیر می‌سازد.

**واژگان کلیدی:** آنفلوآنزا، بانک ژن، هماگلوتینین

* **نویسنده مسئول:** تهران، انستیتوپاستور ایران، واحد آنفلوآنزا

Email:mtkheiri@yahoo.com

**مقدمه**

آنفلوآنزا، بیماری عفونی دستگاه تنفسی است که فرم فصلی آن همه ساله با وقوع سرما شایع می‌گردد. مرکز کنترل بیماری‌های آمریکا (CDC) درسال 2004 گزارش کرده است که سالیانه 5 تا 20 درصد مردم آمریکا با نوع فصلی این بیماری درگیر می‌شوند که برای گروه‌های پرخطرشامل افراد بالای 65 سال، کودکان و افراد با بیماری‌های خاص و زمینه‌ای، مشکلات فراوانی را در پی‌دارد(1). عامل مولد این بیماری ویروس آنفلوآنزا از خانواده ارتومیکسو ویریده است که دارای 8 قطعه ژنومی از جنس (-)RNA می‌باشد که حداقل 11پروتئین آن را رمزگذاری می‌کنند(2). اصلی‌ترین پروتئین‌های ویروس آنفلوآنزا هماگلوتینین و نورامینیداز هستند که در ورود و انتشار ویروس نقش دارند و هدف اصلی برای سیستم ایمنی می‌باشند. هماگلوتینین با وزن مولکولی حدود 75-70 کیلو دالتون، گلیکوپروتئین غالب غشایی است که اصلی‌ترین گزینه برای تولید واکسن‌ها به ویژه از نوع زیر واحدی است. فرم کامل آن یعنی HA0 دارای ساختار تریمری است که هر منومر آن از هشت ناحیه تشکیل یافته است. فرم فعال مولکول از دو زیر واحد بزرگ (HA1) و کوچک (HA2) تشکیل شده است. هر دو زیر واحد گلیکوزیله هستند ولی زیر واحد بزرگ یا آنتی ژنیک، که بخش خارج غشایی مولکول است، دارای بیشترین واحدهای قندی می‌باشد(3). تا سال 2010 بیش از 6000 ژن هماگلوتینین و زیرواحدهایش در بانک ژن بین المللی به ثبت رسیده است(4). این پروتئین توسط قطعه چهارم ژنوم ویروس آنفلوآنزا رمزگذاری می‌شود(5) و تغییر در توالی این ژن منجر به پیدایش سویه‌های جدیدی از ویروس می‌شود که ممکن است منجر به ایجاد اپیدمی یا پاندمی‌های خطرناکی نظیر پاندمی 1918 و یا سویه‌های دارای پتانسیل پاندمی H5N1 وسویه 2009 شود(6). لذا به منظور تولید سریع واکسن وکیت‌های تشخیصی لازم برای ارزیابی سرولوژیکی ویروس شایع، دسترسی فوری به منابع هماگلوتینین به فرم بانک ژنی، بسیار ضروری بوده و اولین قدم در این راستا جداسازی، کلونینگ وتعیین وتایید توالی این ژن می‌باشد.

در این مطالعه، با طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژنوم کامل هماگلوتینین سویه استاندارد (A/NewCaledonia/20/99(H1N1))، اقدام به جداسازی و کلونینگ ژن هماگلوتینین در ناقل pGEM-T Easy شد و بعد از تایید توالی آن، به عنوان الگو برای ساخت سازه‌های ژنی دیگر از قبیل ناقلpET ، (برای بیان دراشیرشیا کلی) و باکیلوویروس استفاده شد تا علاوه بر تهیه بانک ژن، برای مطالعات بعدی به ویژه در رابطه با گلیکوزیلاسیون و اثر آن بر ساختار وعملکرد مولکول، مورد استفاده قرار گیرد.

## مواد و روش ها

در این مطالعه پژوهشی- کاربردی از سویه‌ها و مواد زیر استفاده گردید.

ویروس آنفلوآنزای انسانی (A/New Caledonia /20/99(H1N1)) در کشت تک لایه سلول‌های(MDCK(Madine Darby Canine Kidney ( تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) رشد یافته در محیط DMEM حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین G (100 unit/ml) و استرپتومایسین (100µg/ml) تلقیح گردید(7، 8). پس ازبروز آثار تخریب سلولی که معمولاً48 ساعت پس از تلقیح قابل مشاهده است، مایع رویی کشت سلولی برداشت شد و با روش هماگلوتیناسیون، عیار ویروس تعیین گردید.

به منظور کلونیگ، باکتری اشیرشیا کلی ' Top10F (تهیه شده از شرکت Novagen ) با استفاده از محیط کشت جامد ومایع (Louria Bertoni) LB، کشت داده شد و به عنوان میزبان برای تراریختی (transformation) و تکثیر ناقلین و سازه های کلونینگ استفاده گردید.

جهت طراحی پرایمرها، با استفاده از توالی 1698 نوکلئوتیدی هماگلوتینین ویروس آنفلوآنزا A/New

caledonia/20/99(H1N1) ثبت شده در بانک ژن بین المللی با کد دستیابی (AJ344014) و نرم افزار DNASIS MAX 2.0 (شرکت هیتاچی) پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه کامل ژن و زیر واحد بزرگ 960 نوکلئوتیدی طراحی گردید(جدول 1).

**جدول 1. پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه**

| Plasmids | Sequence (5-3) | |
|---|---|---|
| F HA-*XhoI* Amplification | 5'-CTCGAGACCTACTTTGGACACTC-3' | HA |
| R HA-*Xho*I Amplification | 5'- CTCGAGCCAGATGCATATTCTAC -3' | HA |
| F HA1-HindIII Ampilification | 5'-GCAAGCTTATGGACACAATATGTATA-3' | HA1 |
| R HA1-XhoI Ampilification | 5'-CACTCGAGACCTACTTTGGACACT-3' | HA1 |
| (Uni 12) | 5'- AGCAAAAGCAGG-3' | (2& 9 ) |

به منظور استخراج RNA نیز ویروس‌های حاصل از کشت سلولی MDCK که واجد عیار معادل 512 واحد هماگلوتینین بود مورد استفاده قرار گرفت. استخراج RNA با استفاده از محلول RNX$^{TM}$-Plus (شرکت سیناژن) صورت گرفت. به این ترتیب که 250 میکرو لیتر از سوسپانسیون ویروسی با 750 میکرو لیتر از RNX$^{TM}$-Plus مخلوط و به مدت 5 دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. سپس با افزودن 200 میکرولیتر کلروفرم، در دمای4 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه و با دور 12000 x g سانتریفوژ گردید. معادل حجم RNA جمع‌آوری شده از لایه بالایی، ایزوپروپیل الکل افزوده و بعد از 15 دقیقه انکوباسیون روی یخ در دمای4 درجه سانتی‌گراد و با دور 12000 x g به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب بعد از سه بار شستشو با اتانل 75 درجه، در آب تیمار شده با ( DEPC( Diethyl pyrocarbonate حل گردید.

مراحل RT- PCR به شرح زیر صورت گرفت:

برای ساخت cDNA، ازکیت سنتز cDNA دارای آنزیم پلیمرازمعکوس M-MuLV (شرکت فرمنتاز) و پرایمر یونیور سال (Uni12) ذکر شده در جدول 1، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده(2، 9) و به ترتیب زیر استفاده شد:

در ابتدا پرایمر و RNA استخراج شده مخلوط و در دمای 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه درترموسایکلر قرار داده شد و بعد از خروج از دستگاه، بلافاصله روی یخ منتقل شد و به آن مخلوطی از dNTP، بافر اختصاصی و Ribolock (مهارکننده RNase) طبق دستورالعمل کیت افزوده شد. سپس به مدت 5 دقیقه دردمای 25 درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در انتها آنزیم ترانس کریپتاز معکوس(RT) اضافه شد و ابتدا به مدت 10 دقیقه در 25 درجه سانتی‌گراد و سپس یک ساعت در 42 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

در ادامه برای انجام واکنش PCR از cDNA ساخته شده و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در جدول 1 و سه آنزیم پلیمراز smartTaq ، p*fu* و Taq high fidelity (شرکت فرمنتاز ) مطابق روش‌های معمول (Sambrook & Russell 2001) استفاده گردید(10). کلیه واکنش‌های PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندرف مدل 22331 اجرا گردید. در تمام موارد ابتدا آزمایش در گرادیان دمایی انجام شد و نتایج PCR با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز 1 درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. بهترین شرایط برای مراحل بعدی مورد استفاده قرارگرفت. بهترین ترکیب واکنش و شرایط PCR که در تمامی موارد تکثیر HA و HA1 با آنزیم‌های Taq قابل اجرا بودبه صورت زیر می باشد:

ترکیب: 5 میکرولیتر بافر PCR(10X) ، 1 میکرولیتر dNTP(10mM)، 1 میکرولیتر پرایمر رفتی (10pmol)، 1میکرولیتر پرایمر برگشتی(10pmol)، پلیمراز

0/5 واحد،1 میکرولیتر cDNA(50ng/ml) و آب مقطر استریل تا حجم نهایی 25 میکرولیتر افزوده شد.

شرایط: 5 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، 30 ثانیه در 94 درجه سانتی‌گراد، 45 ثانیه در 54 درجه سانتی‌گراد، 2 دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد که مراحل 2 تا 4 برای 30 بار تکرار شد و در پایان به مدت 10 دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

### کلونینگ در ناقل pGEM-T Easy

برای این منظور پلی نوکلئوتیدهای تکثیر شده با استفاده از کیت استخراج از ژل (شرکت کیاژن) استخراج و سپس در ناقل pGEM-T Easy ( شرکت پرومگا) طبق دستورالعمل مربوطه کلون گردیدند(11).

### مستعدسازی و تراریختی 'Top10F:

برای این منظوریک کلنی از کشت شبانه باکتری اشیرشیاکلی 'Top10F در 5 میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح و در 37 درجه سانتی‌گراد با دور 180 در دقیقه تا رسیدن تراکم سلولی به حدود $OD_{600}$=0.6 کشت داده شد و به منظور جداسازی سلول‌های باکتری در 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 دقیقه با دور 9000 در دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب طی سه مرحله با محلول سرد ($CaCl_2$(0.1mM تیمار گردید. در مرحله آخر سلول‌های مستعد شده ضمن مجاورت با غلظت مناسب سازه (حدودا 1 ng) و به مدت 30 دقیقه انکوباسیون بر روی یخ و شوک حرارتی (90 ثانیه در 42 درجه سانتی‌گراد) ترا ریخت گردیده و بر روی محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و تتراسایکلین، القا کننده IPTG و معرف رنگی Xgal کشت داده شدند.

به منظور آنالیز کلونها، با استفاده از روش غربال‌گری کلنی‌های آبی – سفید، کلنی‌های واجد پلاسمید مورد نظر انتخاب گردید و پلاسمیدهای آنها پس از استخراج از نظر وجود یا عدم وجود ژن مورد نظر مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور در ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با روش PCR و سپس با هضم آنزیمی به وسیله آنزیم‌های XhoI و HindIII مورد بررسی قرار گرفتند. ناقل‌های نوترکیب تایید شده، جهت تعیین توالی به شرکت Gene service .UK ارسال گردیدند.

### ساخت وآنالیز سازه های بیانی اختصاصی یوکاریوتی وپروکاریوتی

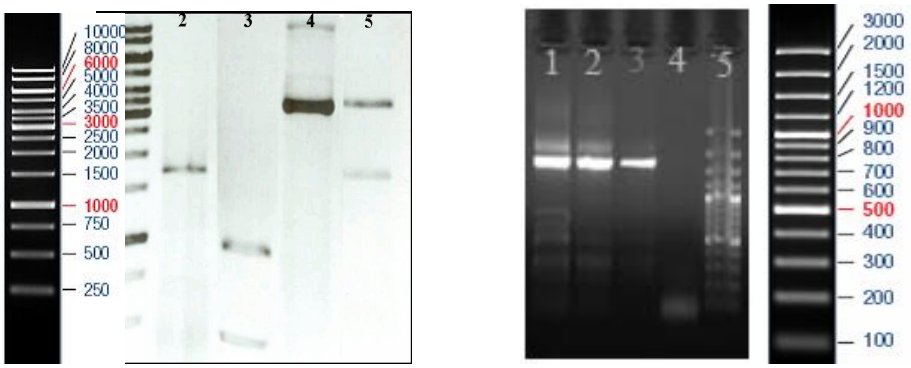
با استفاده از سازه pGEM-TEasy*HA* تایید شده به عنوان الگو، پرایمرهای اختصاصی طراحی شده و با استفاده از آنزیم پلیمراز Taq high-fidelity در شرایط PCR بهینه شده، سازه‌های بیانی pET*HA* ، pET*HA1* (همراه و یا بدون سیگنال پپتید)، pFastBac-*HA* و pFastBac-*HA1* ساخته شدند و به کمک روش‌های PCR و آنالیز آنزیمی تایید گردیدند(11، 12).

### بررسی سازه‌ها با آنزیم‌های محدودگر:

به منظور بررسی سازه‌ها با آنزیم‌های محدودگر از نقشه آنزیمی توالی‌های ژنی که با استفاده از نرم افزارDNASIS MAX به دست آمده است، آنزیم‌های مورد نظر انتخاب(pstI برای HA کامل و NcoI برای HA1) و واکنش‌های هضم آنزیمی طبق دستورالعمل شرایط استفاده از آنزیم‌ها، اجرا گردید.

### یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایشات جداسازی و تکثیر ژن کامل هماگلوتینین ویروس آنفلوآنزای انسانی نوع (A/NewCaledonia/20/99(H1N1)) و کلونینگ و تایید آن در شکل a 1 و b 1 نشان داده شده است. در روش RT-PCR بهینه شده با آنزیم پلیمراز Taq high fidelity، هیچ گونه باند غیراختصاصی مشاهده نشد (شکل b 1 ردیف 2). با مشاهده قطعات ژنی 580 و 1100نوکلئوتیدی حاصل از هضم آنزیمی محصول RT-PCR ژن HA با آنزیم PstI (شکل b 1، ردیف 3) و قطعات3000 و 1680 نوکلئوتیدی حاصل از هضم سازه pGEM-T-*HA* با آنزیم‌هایHindIII/XhoI (شکل b 1، ردیف 5)، جداسازی وکلونینگ ژن درناقل T مورد تایید واقع شد.

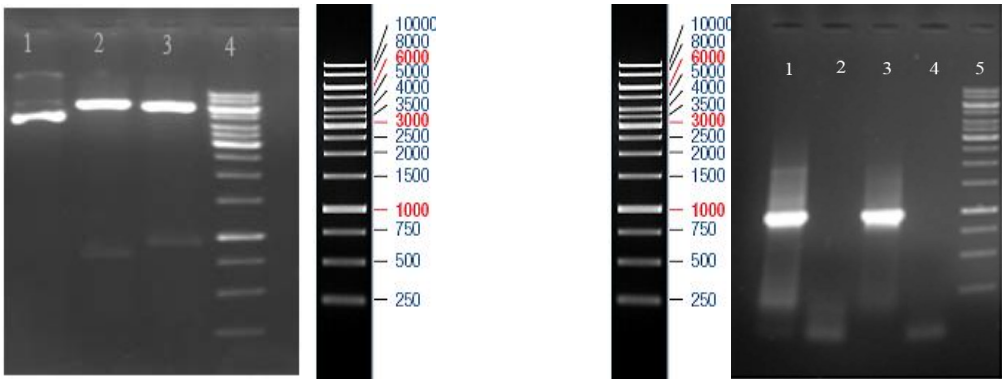



(b) ( a)

**شکل1. نتایج الکتروفورز مراحل تکثیر ژنHA ، و ارزیابی هضم آنزیمی ژن HA بر روی ژل آگارز 1 درصد**
**a ) نتایج PCR باگرادیان دمایی ژنHA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و cDNA به عنوان الگو(ردیف 1 دمای 52 °C ، ردیف 2 دمای 53°C ، ردیف 3 دمای 54°C، ردیف 4 کنترل منفی و ردیف 5 مارکر DNA(100bp)**
**b ) آنالیز آنزیمی ژن HA با استفاده از آنزیم PstI و هضم آنزیمی سازه ژنی pGEMT-*HA* ( ردیف 1 مارکر DNA(1Kb) ، ردیف 2 ژن HA ، ردیف 3 هضم آنزیمی ژن HA با آنزیم محدودگر PstI ، ردیف 4 pGEMT-*HA* هضم نشده و ردیف 5 هضم آنزیمیpGEMT-*HA* با آنزیمهای HindIII/XhoI )**

همچنین نتایج تکثیر ژن زیر واحد بزرگ هماگلوتینین (HA1) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در شکل 2a، آنالیز آنزیمی ژن این زیر واحد با آنزیم محدودگر NCoI در شکل 2 b، ردیف 2 و کلونینگ و تایید آنزیمی آن با آنزیم‌های HindIII/XhoI در شکل 2 b، ردیف 3 نشان داده شده است. شکل 2b ردیف 2 مربوط به اثر آنزیم NcoI است که دارای یک جایگاه برش در وکتور و یک جایگاه برش در درون ژن می‌باشد که قطعه برش یافته حدود 800bp است و ردیف 3 مربوط به اثر آنزیم‌های XhoI و HindIII است که قطعه 960 نوکلئوتیدی تولید می‌کند.

در پایان توالی‌های تعیین ترادف شده با توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن از طریق برنامه BLASTN مقایسه شد و نتایج تطابق صددرصد را نشان داد.




( b ) ( a)

**شکل2. نتایج الکتروفورز مراحل تکثیر ژن HA1 وآنالیز آنزیمی کلونینگ ژن HA1 در وکتور pET بر روی ژل آگارز 1 درصد**
**a ) نتایج PCR ژن HA1 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و سازه مرجع T*HA* به عنوان الگو(ردیف 1 PCR با آنزیم Taqمعمولی، ردیف 2 کنترل منفی ،ردیف 3 PCR با آنزیم Taq high fidelity،ردیف 4 کنترل منفی و ردیف 5 مارکر DNA (1Kb)**
**b ) آنالیز آنزیمی سازه pET*HA1* (ردیف 1 سازه هضم نشده ، ردیف 2 هضم سازه با آنزیم NCoI، ردیف 3 هضم سازه با آنزیمهای HindIII/XhoI و ردیف 4 مارکرDNA (1Kb)**

## بحث

در حال حاضر در کشور ما هیچ گونه فن‌آوری بومی‌شده‌ای برای تولید واکسن آنفلوآنزا و کیت‌های تشخیصی به منظور پیش‌گیری و ارزیابی سرمی افراد واکسینه شده و در معرض ویروس وجود ندارد. تهیه بانک ژن‌های ویروس به ویژه هماگلوتینین در این راستا حائز اهمیت می‌باشد. زیرا هماگلوتینین مهم‌ترین پروتئین درگیر در ایجاد ایمنی بر علیه ویروس آنفلوآنزا است که ساختمان آن به خوبی شناسایی شده است(13) به نحوی که نه تنها کاندید مناسبی برای تولید واکسن می‌باشد بلکه یکی از بهترین مدل‌های مولکولی انتخاب شده برای مطالعات وسیع در زمینه‌های بیوشیمی، بیوفیزیک و بیولوژی مولکولی است(14، 15). لذا تحقیق و اقدام به تولید فرم نوترکیب آن امری ضروری می‌باشد. از سال 1980 میلادی تولید فرم نوترکیب شاخص‌های آنتی ژنیک هماگلوتینین ویروس آنفلوآنزا در E.Coli آغاز گردید و سپس با گسترش فن آوری تولید پروتئین‌های نوترکیب، در سایر میزبان‌های یوکاریوتی (مخمر، سلول حشرات، گیاهان و سلول‌های پستانداران) نیز بیان شده است که هر کدام با توجه به مزایا و معایبی که دارند برای اهداف خاصی به کار برده می‌شوند(21-16). در جهت رسیدن به تولید هماگلوتینین نوترکیب، تخلیص RNA ، سنتز cDNA ، تکثیر ژن به روش RT-PCR و کلون کردن آن در یک وکتورکلونینگ مناسب گام‌های اولیه در تهیه واکسن نوترکیب بر علیه هر سویه جدید ویروسی شناخته شده می‌باشد.

در این تحقیق نتایج به دست آمده نشان داده است که چنانچه بلافاصله بعد از استخراج RNA ، سنتز cDNA انجام شود، بهترین نتیجه حاصل می‌گردد زیرا ذخیره سازی RNA حتی در دمای70- درجه سانتی‌گراد باعث تخریب آن گشته و کاهش شدید میزان cDNA را به دنبال دارد. همچنین در این مطالعه برای تکثیرژن به وسیله PCR از آنزیم‌های پلیمراز مختلف استفاده گردید و نشان داده شد که آنزیم (fermentase) *pfu* مورد استفاده، فقط برای تکثیر قطعات کوتاه ژنی هماگلوتینین مناسب است (نتایج نشان داده نشده است). این آنزیم بر خلاف آنزیم‌های Taq ، دنباله آدنوزین که لازمه کلونینگ در ناقل T(که واجد تیمیدین است) می‌باشد، در محصول ایجاد نمی‌کند. در حالی که آنزیم Taq high fidelity ، آنزیمی است که علاوه بر این که قادر است رشته‌های واجد نوکلئوتید آدنین(A) انتهایی را ایجاد کند، توانایی تصحیح رشته در حال سنتز را نیز دارا می‌باشد و تکثیر ژنوم را با کمترین اشتباه، ممکن می‌سازد. در مورد آنالیز آنزیمی ژن‌های مورد نظر با آنزیم‌های محدودگر نیز نتایج حاصله با آنچه که به وسیله نرم افزارهای پیش‌بینی شده به دست آمده بود مطابقت دارد.

در سال 1994 مهندسی و ساخت وکتورهای کلونینگ خانواده T (با تعداد کپی بالا، ژن β – گالکتوزیداز و MCS اختصاصی) منجر به سهولت کلونینگ ژن‌های تکثیر یافته با پلیمرازهایی از قبیل Taq و Taq high fidelity شد(22). در این مطالعه با توجه به ارزش چنین سیستمی مبادرت به کلونینگ در-pGEM TEasyشد. نتایج به دست آمده از تعیین ترادف وآنالیز آنزیمی قطعه کلون شده در وکتور pGEM-TEasy، نشان دهنده تطابق کامل قطعات ژنی استخراج و کلون شده با هماگلوتینین ویروس آنفلوآنزای (H1N1)20/99 A/New Caledonia است. این تایید، استفاده ازاین منبع ژنی را برای اهداف خاص از قبیل کلون کردن در وکتورهای بیانی ویژه مانند ناقل باکیلوویروس و E.coli را مقدور می‌سازد. محصول بیان شده در سلول حشره با استفاده از باکیلو ویروس برای تهیه واکسن و دارو، بی‌خطر بوده و بسیار مورد توجه است زیرا باکیلو ویروس‌ها در سطح گیاهان خوراکی وجود دارند و برای مصارف انسانی مضر نمی‌باشند. همچنین وکتورهای پروکاریوتی نظیر انواع pET برای بیان در سلول‌های پروکاریوتی مانند اشیریشیا کلی *(E.coli)* و تولید صنعتی هماگلوتینین به منظور تولید انبوه با امکانات ارزان قیمت جهت تهیه کیت‌های تشخیصی، از اهمیت بالایی برخوردار است(23).

## نتیجه گیری

با توجه به اهمیت تهیه بانک ژن هماگلوتینین و نتایج به دست آمده، چنین نتیجه گیری می‌شود که با به کارگیری دستاوردهای این تحقیق، در صورت تامین بودجه مناسب به راحتی می‌توان چنین سازه‌هایی را تهیه نمود تا در صورت بروز اپیدمی یا پاندمی آنفلوآنزا، با سرعت بیشتری به واکسن موثر وکیت‌های تشخیص سرمی دسترسی داشت. همچنین با تعمیم کار برای سایر پروتئین‌های ویروس آنفلوآنزا نظیر M2 و NP (که در حال حاضر در واحد آنفلوآنزای انستیتو پاستور ایران تهیه شده‌اند) و سایر ژن‌ها، بانک ژنی ویروس آنفلوآنزا دایر گردد تا در اختیار سایر پژوهش‌گران و تولید کنندگان قرار گیرد.

## تشکر و قدر دانی

از سرکار خانم منصوره طباطبائیان که مسئولیت کشت ویروس در سلول را عهده‌دار بوده‌اند و جناب آقای علی ترابی جهت همکاری در تهیه برخی مواد و امکانات تقدیر و تشکر می‌گردد. این پروژه با استفاده از امکانات مالی طرح پژوهشی411 انیستینوپاستور ایران و با همکاری علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری اجرا شده است.

## منابع

1. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. Jama. 2004;292(11):1333-40.
2. Chan CH, Lin KL, Chan Y, Wang YL, Chi YT, Tu HL, et al. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by revers-transcription polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods. 2006;136:38-43.
3. Collins JK, Knight CA. Removal of carbohydrate from influenza A virus and its hemagglutinin and the effect on biological activities. Journal of Virology. 1978;27(1):164-171.
4. ncbi.nlm.nih.gov [homepage on the Internet]. Association of genomes Online Resources. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/.
5. Sveda MM, Lai CJ. Functional expression in primate cells of cloned DNA coding for the hemagglutinin surface glycoprotein of influenza virus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1981;78(9):5488-92.
6. Haque A, Hober D, Kasper LH. Confronting potential influenza A (H5N1) pandemic with better vaccines. 2007.
7. Shahidi M, Kheiri MT, Amini-Bavil-Olyaee S, Hosseini M, Moattari A, Tabatabaeian M, et al. Molecular and phylogenetic analysis of human influenza virus among Iranian patients in Shiraz, Iran. Journal of medical virology. 2007;79(6):803-10.
8. Soltani Z, Hosseini M, Shahidi M, Hedayati M, Kheiri MT. Molecular Analysis of Human Influenza Virus in Tehran, Iran. Intervirology. 2009;52(2):63-7.
9. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Archives of virology. 2001;146(12):2275-89.
10. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 2001.
11. promega.com, The Association; Promega Technical Manual (pGEM-T and pGEM-TEasy vector systems) 5/2007[homepage on the Internet]. Available from: http://www.promega.com
12. Bac-to-Bac Baculovirus Expression system Manual protocol.
An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. version D. 2004 10359. Available from: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Invitrogen_bactobacexpression.
13. Wiley DC, Wilson IA. Structural identification of the antibody binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation. Nature. 1981; 289:373-8.
14. Ramalho-Santos J, de Lima MC. The influenza virus hemagglutinin: a model protein in the study of membrane fusion. Biochim Biophys Acta. 1998;1376:147-54.
15. Braakman I, Hoover-Litty H, Wagner KR, Helenius A. Folding of influenza hemagglutinin

in the endoplasmic reticulum. The Journal of cell biology. 1991;114(3):401.
16. Song L, Nakaar V, Kavita U, Price A, Huleatt J, Tang J, et al. Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: a solution to global pandemic and seasonal needs. PlosOne. 2008: 3(5):e2275
17. Hartman JR, Nayak DP, Fareed GC. Human influenza virus hemagglutinin is expressed in monkey cells using simian virus 40 vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1982;79(2):233-7.
18. Hidayatullah TA. Cloning and expression of antigenic sites of hemagglutinin of Influenza A virus. International Journal of Integrative Biology. 2009;6(3):137-42.
19. Jabbar MA, Sivasubramanian N, Nayak DP. Influenza viral (A/WSN/33) hemagglutinin is expressed and glycosylated in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1985;82(7):2019-23.
20. Nitar N, Qigai H, Sudarat D, Qingyun D, Ivanus M, Yukol L, et al. Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture. BMC Microbiology. 2006; 6(16):1-7.
21. Mueller M, Renzullo S, Brooks R, Ruggli N, Hofman MA. Antigenic characterization of recombianant hemagglutinin proteins derived from different avian influenza virus subtypes. PLoSOne. 2010;5(2):e9097.
22. fermentas.com [homepage on the Internet]. Association of genomes Online Resources; Available from: http://www.fermentas.com/.
23. Alvarez MM, López-Pacheco F, Aguilar-Yañez JM, Portillo-Lara R, Mendoza-Ochoa GI, García-Echauri S, et al. Specific Recognition of Influenza A/H1N1/2009 Antibodies in Human Serum: A Simple Virus-Free ELISA Method. PLoSOne2010;5(4):e10176