

جداسازی و کلونینگ ژن فیوژن (F) از ویروس سرخک سوش واکسینال (AIK-C)

ملیحه اسماعیلزاده خراسانی^۱، مجتبی سعادت^{۲*}، خسرو آقایی پور^۳

۱- کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران

۲- دانشیار، دانشگاه امام حسین (ع) و دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست تهران

۳- استادیار بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج

*تهران، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۵۷۳۹

Saadati_m@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۸۹/۴/۳۱، پذیرش مقاله: ۸۹/۸/۲۴)

چکیده - ویروس سرخک عضو خانواده پارامیکسو ویروس‌ها و از جنس موربیلی ویروس‌ها است که دارای ژنوم RNA با قطبیت منفی است.

در این تحقیق، ابتدا از محیط حاوی ویروس‌های سرخک سوش واکسینال AIK-C که روی سلول‌های MRC-5 رشد کرده، RNA استخراج شد، از RNA استخراج شده فوراً برای ساخت cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده از واکنش نسخه‌برداری معکوس استفاده شد. از cDNA تک‌رشته‌ای به‌عنوان رشته الگو برای تکثیر ژن F با پرایمرهای اختصاصی در واکنش PCR استفاده شد. محصول PCR با طول 1662 bp درون وکتورهای بیانی pET-28a(+) و pET-22b(+) کلون شد. برای تأیید کلونینگ، پلاسمیدهای نوترکیب به‌درون سلول‌های مستعد *E. coli* DH5a ترانسفورم شد. کلونی‌های به‌دست آمده، با استفاده از PCR مستقیم، غربالگری شدند. سپس پلاسمیدهای نوترکیب به‌روش لیز قلیایی استخراج شد.

هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب، با استفاده از آنزیم‌های با اثر محدود *HindIII* و *NdeI* انجام شد و قطعه DNA به‌طول 1662 bp جداسازی شد. توالی پلاسمید نوترکیب pET-28aF با شرکت MWG آلمان تعیین شد. مقایسه این توالی با توالی ژن F ویروس سرخک از بانک ژن (سوش واکسینال ادمونستون (AIK-C) با (Accession number: AF266286) حاکی از همولوژی بالا بین این دو ژن است.

نتایج این تحقیق نشان داد ژن F بسیار حفاظت شده و پایدار است. بنابراین مطالعه ژن F برای تهیه واکسن نوترکیب، اهمیت دارد.

کلیدواژه‌گان: ویروس سرخک، ژن F، وکتورهای بیانی pET-28a(+) و pET-22b(+). کلونینگ.

۱- مقدمه

ویروس سرخک عضو خانواده پارامیکسو ویروس‌ها و از جنس موربیلی ویروس‌ها است و پوشش غشایی آن دارای دو گلیکو پروتئین H و F می‌باشد. پروتئین H در جذب ویروس به گیرنده سلولی و پروتئین F ویروس سرخک، در فرایند فیوژن و ورود ویروس به سلول نقش دارد و عامل کلیدی در ایجاد عفونت و بیماری‌زایی این ویروس است. این پروتئین‌ها علاوه بر نقش بیولوژیک، مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های ویروس سرخک هستند [۱، ۲].

سرخک عموماً یک بیماری مربوط به دوران کودکی است که از طریق دستگاه تنفسی گسترده می‌شود. بیماری دارای یک دوره کمون ۱۰ تا ۱۴ روزه است و سپس تب، سرفه، زکام و التهاب چشم به مدت ۲ تا ۳ روز طول می‌کشد و به دنبال آن راش‌های ماکولوپاپولار ظاهر می‌شود [۳].

ارگان‌های لنفاوی و بافت‌هایی مثل تیموس، طحال، لنفونیدها، آپاندیس و لوزه‌ها، جایگاه اصلی تکثیر ویروس هستند [۴].

این ویروس از طرق مختلف آزمایشگاهی، از جمله جداسازی ویروس، تشخیص مستقیم ویروس، ردیابی RNA ویروسی یا آنتی‌ژن‌های ویروسی در ترشحات، مهار هماگلوتیناسیون (HI)، ثبوت کمپلمان (CF)، و خنثی‌سازی ویروس، شناسایی می‌شود [۱].

واکسن این ویروس در حال حاضر، به صورت سرخک زنده تخفیف حدت یافته است. مشکل اصلی با این واکسن‌های تضعیف شده، توانایی ضعیف پاسخ‌های ایمنی در حضور آنتی بادی مادری می‌باشد [۵]. از این رو برای حل این مشکل، تلاش‌های زیادی برای تهیه واکسن‌های نو ترکیب، با استفاده از آنتی‌ژن‌های H و F

انجام شده است. پروتئین F ویروس سرخک به علت نقش مهم ایمونولوژیک و عملکردی، در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها**۲-۱- باکتری‌ها و ویروس**

محیط حاوی ویروس سرخک سوش AIK-C که در تهیه واکسن استفاده شد، از بخش واکسن‌های ویروسی مؤسسه سرم‌سازی رازی تهیه شد. از باکتری *E. coli*، سوش DH5 α ، برای کلونینگ استفاده شد.

۲-۲- استخراج RNA

استخراج RNA از محیط حاوی ویروس سرخک سوش واکسینال AIK-C که روی سلول‌های دیپلوئید انسانی MRC-5 رشد کرده بودند، انجام شد. استخراج RNA با کیت (High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) انجام شد. این روش بر اساس لیز ویروس به وسیله گوانیدین هیدروکلراید، که یک ماده دناتور کننده قوی است، انجام شد [۶]. RNA استخراج شده، فوراً برای واکنش نسخه‌برداری معکوس و تولید cDNA تک- رشته‌ای استفاده شد.

۲-۳- سنتز cDNA

سنتز cDNA ژن F، با استفاده از آنزیم AMV Reverse Transcriptase با غلظت 25 unit/ μ l (Roche) انجام شد. به این ترتیب که ابتدا RNA استخراج شده در مرحله قبل، برای جلوگیری از ساختار ثانویه، به مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نسخه‌برداری معکوس (RT) در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد

به مدت ۱ دقیقه انجام شد. مرحله نهایی افزایش طول زنجیره DNA (Final extention) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز و با اتیدیوم برمایند رنگ آمیزی شد.

۳- کلونینگ محصول PCR

پس از آنکه تخلیص محصول PCR به طور مستقیم با استفاده از کیت Product High Pure PCR Purification Kit (Roche) و انجام پلاسمیدهای pET-22b(+) و pET-28a(+) بروش لیز قلیایی در حجم زیاد استخراج شد، هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای نامبرده و محصول PCR (ژن F) با دو آنزیم با اثر محدود *NdeI* و *HindIII* به طور هم‌زمان انجام شد. به این ترتیب که هضم آنزیمی روی ۳ میکروگرم از هر وکتور، به طور جداگانه، با ۲۰ واحد آنزیم *NdeI* با غلظت 10 unit/μl و ۱۰ واحد آنزیم *HindIII* با غلظت ۱۰ unit/μl، ساخت شرکت فرمتاز و در حجم نهایی ۳۰ ماکرولیتر، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت یک شب، انجام شد. به همین ترتیب، هضم آنزیمی روی ۳ میکروگرم از محصول PCR (ژن F) انجام گردید [۹]. این فرایند باعث ایجاد انتهای چسبنده در هر دو انتهای پلاسمیدها می‌شود که لازمه انجام کلونینگ است [۱۰]. پس از هضم آنزیمی به طور کامل، وکتورهای مورد نظر با آلکالین فسفاتاز ساخت شرکت Roche دفسفریله شدند.

۱۰۰ نانوگرم از هر وکتور آماده‌سازی شده، به طور جداگانه، همراه ۰/۲ پیکومول از محصول PCR آماده‌سازی شده، ۰/۵ ماکرولیتر آنزیم T4DNALigase و

به مدت ۶۰ دقیقه با ۲ ماکرولیتر Random primer، ۰/۸ ماکرولیتر آنزیم AMV Reverse Transcriptase، ۱ ماکرولیتر RNase inhibitor، ۲ ماکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار و ۲ ماکرولیتر بافر ۱۰x آنزیم AMV انجام شد. سپس آنزیم AMV در دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۵ دقیقه، انکوبه و غیرفعال شد [۷].

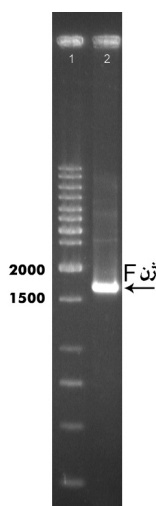
۲-۴- PCR

پرایمرهای M-FRS و M-FFS2، با استفاده از نرم‌افزار OLIGO طراحی شد. پرایمرها طوری طراحی شدند تا ناحیه ORF ژن F، به طور کامل جداسازی و در وکتورهای بیانی کلون شود. برای ایجاد سایت برشی، با طراحی مناسب پرایمر، جایگاه آنزیم برشی *NdeI* در ابتدای ژن و جایگاه آنزیم برشی *HindIII* در انتهای ژن قرار گرفت. PCR با استفاده از ۵ ماکرولیتر cDNA تک‌رشته‌ای ساخته شده در مرحله‌ی قبل، ۲ ماکرولیتر dNTP (2.5 mM)، 0.1 میکرومولار از هر کدام از پرایمرهای M-FRS و M-FFS2 و ۱ ماکرولیتر از آنزیم Pfu DNA polymerase با غلظت 2.5 unit/μl ساخت شرکت فرمتاز، در حجم نهایی ۲۵ ماکرولیتر، انجام شد [۸].

برنامه PCR مورد استفاده در تکثیر cDNA ژن F، شامل مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، برای جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی و در ادامه، ۲۰ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و اتصال پرایمر (annealing) در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و افزایش طول زنجیره DNA (extention) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد

۳- نتایج

پس از استخراج RNA از سوش واکسینال AIK-C، ویروس سرخک روی سلول‌های MRC-5 رشد کرده و در محیط، آزاد شد. سپس اقدام به انجام RT-PCR دو مرحله‌ای شد، پس از انجام ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برمیاید و مقایسه با مارکر ۱ kb (Fermentase)، یک باند در منطقه‌ی بین دو باند ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ bp مارکر، مشاهده شد (شکل ۱، باند موجود در ستون ۲). این باند از لحاظ اندازه، مشابه با DNA مورد نظر ما (ژن F) و حدود ۱۶۶۲ bp است.



شکل ۱ محصول RT-PCR با استفاده از پرایمرهای M-FFS2، M-FR. ستون ۱: مارکر 1kb. ستون ۲: محصول PCR (ژن F)

پس از هضم آنزیمی، روی ژن F و پلاسمیدهای pET-22b(+) و pET-28a(+). با استفاده از هر دو آنزیم محدودگر *NdeI* و *HindIII* به‌طور هم‌زمان، ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برمیاید انجام شد. باندهای مشاهده شده، نشان‌دهنده این بود که هضم آنزیمی به‌طور کامل انجام شده است (شکل ۲ ستون‌های ۲، ۳ و ۴).

۲ ماکرولیتر بافر لایگیشن (10X)، در حجم نهایی ۲۰ ماکرولیتر، در فرایند لایگیشن استفاده شد [۱۱]. پلاسمیدهای نوترکیب pET-22bF و pET-28aF به‌وسیله شوک حرارتی درون سلول‌های مستعد *E. coli* DH5 α ترانسفورم شدند برای تأیید و بررسی کلونینگ روی کلونی‌های به‌دست آمده PCR مستقیم انجام شد. کلونی‌های با PCR مثبت، در محیط LB-broth دارای آنتی بیوتیک مناسب، کشت داده شدند و پلاسمید به‌روش لیز قلیایی استخراج شد [۱۲].

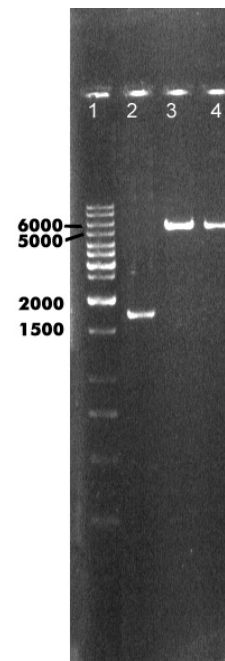
با انجام ژل الکتروفورز، براساس وزن مولکولی، پلاسمیدهای نوترکیب از پلاسمیدهای فاقد ژن F، جدا شدند. هم‌چنین هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای نوترکیب pET-22bF و pET-28aF به‌وسیله دو آنزیم *NdeI* و *HindIII* انجام شد که پس از انجام الکتروفورز روی ژل آگارز، قطعه DNA به‌طول ۱۶۶۲ bp جدا شد. آنالیز پلاسمیدهای نوترکیب، کلون شدن ژن F را درون پلاسمیدهای مورد نظر تأیید کرد.

۲-۶- تعیین توالی

پس از کلون شدن ژن F درون پلاسمیدهای pET-22b(+) و pET-28a(+). منطقه‌ی مورد نظر (منطقه واقع بین دو جایگاه *HindIII* و *NdeI*) در pET-28aF تعیین شد.

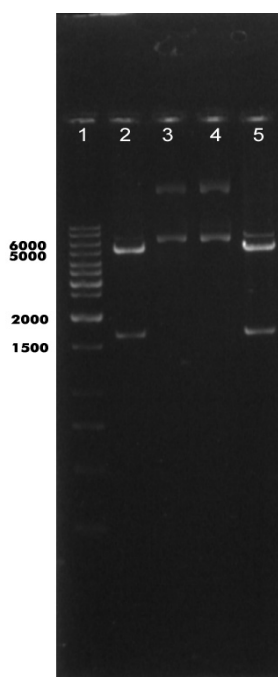
برای تعیین توالی، از دو پرایمر T7-promoter و T7-terminator استفاده شد. سپس توالی به‌دست آمده با توالی موجود در بانک ژن (سوش واکسینال ادمونستون (AIK-C) با (Accession number : AF266286) با نرم‌افزار DNAMAN، مقایسه شد.

پلاسمیدهای نو ترکیب به دلیل کلون شدن ژن F درون آن‌هاست. وجود دو باند در هر ستون، به خاطر این است که پلاسمید می‌تواند به سه حالت سوپرکویل، حلقوی و خطی وجود داشته باشد که بر اساس سرعت، پلاسمید سوپرکویل سریعتر از حالت‌های دیگر، سپس شکل خطی و بعد حلقوی حرکت می‌کند. هم‌چنین برای آنالیز پلاسمید نو ترکیب، PCR مستقیم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی M-FFS₂ و M-FRS و آنزیم Taq DNA Polymerase روی چند کلونی از هر پلیت (پلیت مربوط به کلونی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب pET-22bF و پلیت مربوط به کلونی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب pET-28 aF) انجام شد. پس از انجام ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید و مقایسه با مارکر ۱ kb (Fermentase)، یک باند در منطقه بین دو باند ۱۵۰۰ bp و ۲۰۰۰ bp مارکر مشاهده شد (شکل ۴)، این باندها، از لحاظ اندازه، مشابه با DNA مورد انتظار ما (ژن F) و حدود ۱۶۶۲bp است. هم‌چنین پلاسمیدهای نو ترکیب pET-22bF و pET-28aF با استفاده از آنزیم‌های محدودگر *HindIII* و *NdeI* هضم آنزیمی شدند. سپس با انجام ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید، با مارکر ۱ kb مقایسه شدند. در هر ستون دو باند مشاهده شد (شکل ۵ ستون ۲ و ۵) که یکی از باندها مربوط به پلاسمید (باند بین ۵۰۰۰ bp و ۶۰۰۰ bp مارکر) و دیگری مربوط به ژن F (باند بین ۱۵۰۰ bp و ۲۰۰۰ bp) است و ستون ۳ و ۴ مربوط به پلاسمیدهای نو ترکیب، قبل از هضم آنزیمی است. این نشان می‌دهد که ژن F به درستی درون وکتورها کلون شده که پس از هضم آنزیمی، وکتورهای نو ترکیب به وسیله دو آنزیم نامبرده، از این وکتورها جدا شده است.

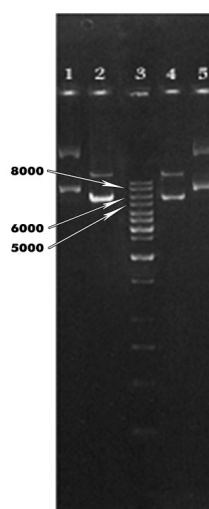


شکل ۲ نتایج حاصل از هضم آنزیمی ژن F و پلاسمیدهای pET-22b(+) و pET-28a(+) به وسیله هر دو آنزیم *NdeI* و *HindIII* به طور هم‌زمان. ستون ۱: مارکر 1kb ستون ۲: ژن F برش داده شده با هر دو آنزیم *HindIII* و *NdeI* به طور هم‌زمان، ستون ۳: پلاسمید pET-22b (+) برش داده شده با هر دو آنزیم *HindIII* و *NdeI* به طور هم‌زمان. ستون ۴: پلاسمید pET-28a (+) برش داده شده با هر دو آنزیم *HindIII* و *NdeI* به طور هم‌زمان.

برای بررسی و تأیید کلونینگ، از برخی کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون وکتورهای نو ترکیب (pET-22bF, pET-28aF) به سلول‌های مستعد *E. coli* DH5 α استفاده شد. پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های به دست آمده، ژل الکتروفورز انجام شد. بعد از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم برماید و مقایسه با مارکر ۱ kb، مشاهده شد که پلاسمیدهای نو ترکیب (شکل ۳ ستون‌های ۱ و ۳) بالاتر از پلاسمیدهای فاقد ژن (شکل ۳ ستون‌های ۲ و ۴) قرار گرفته‌اند که این نشان‌دهنده سنگین‌تر شدن



شکل ۵ آنالیز پلاسمید نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی. ستون ۱: مارک 1kb، ستون ۲: pET-28aF بعد از هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *HindIII*، ستون ۳: pET-28aF قبل از هضم آنزیمی، ستون ۴: pET-22bF بعد از هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *HindII*

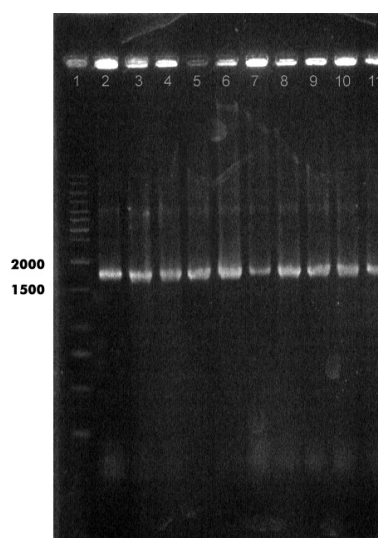


شکل ۳ آنالیز پلاسمیدهای نوترکیب و مقایسه با پلاسمیدهای pET-22b(+) و pET-28a(+) از لحاظ وزن مولکولی. ستون ۱: پلاسمید نوترکیب pET-22bF، ستون ۲: پلاسمید pET-22b(+) (کنترل منفی)، ستون ۳: مارک 1kb، ستون ۴: پلاسمید pET-28a(+) (کنترل منفی)، ستون ۵: پلاسمید نوترکیب pET-28aF.

۶- بحث

در این طرح، ابتدا RNA از محیط حاوی ویروس سرخک سوش واکسینال AIK-C که روی سلول‌های دیپلوئید انسانی MRC-5 رشد کرده بودند، استخراج شد. بعد از انجام RT-PCR دو مرحله‌ای و انجام ژل الکتروفورز، ژن F با موفقیت جداسازی شد.

بهترین زمان برای استخراج RNA از سلول، در مراحل عفونت سلول‌ها است که میزان CPE ایجاد شده در کشت سلولی ۲۰-۱۰ درصد باشد. در این مراحل تکثیر ویروسی، mRNAهای ویروسی ساخته می‌شوند و سپس به سمت تولید ژنوم تغییر پیدا می‌کنند.



شکل ۴ آنالیز پلاسمید نوترکیب با استفاده از PCR مستقیم. ستون ۱: مارکر 1 k، ستون‌های (۲-۵): مربوط به محصولات PCR مستقیم کلونی‌های حاوی pET-22 bF، ستون‌های (۶-۱۱): مربوط به محصولات PCR مستقیم کلونی‌های حاوی pET-28aF.

به وجود حلقه‌ای نسبتاً پایدار ۹ نوکلئوتیدی در پرایمر M-FFS2 اشاره کرد. برای حل این مشکل، از روش شروع داغ در PCR استفاده شد. ساده‌ترین روش برای جلوگیری از اتصالات اولیه غیراختصاصی و بهتر کردن شرایط اتصال صحیح پرایمر، استفاده از روش شروع داغ (Hot-Start) است.

در حین ساخت DNA، آنزیم DNA پلی‌مراز، نوکلئوتید صحیح را برای افزودن به پرایمر انتخاب می‌کند تا طول زنجیره‌ی DNA را بر اساس قانون جفت شدن واتسون-کریک افزایش دهد.

پس از ایجاد محصول PCR (ژن F)، مراحل لازم برای انجام فرآیند کلونینگ آغاز شد که این مراحل شامل آماده‌سازی وکتورها و ژن هدف است. به این منظور، وکتورهای pET-28a(+) و pET-22b(+) با آنزیم‌های *HindIII* و *NdeI* محدود به‌طور هم‌زمان برش داده شدند (هضم آنزیمی).

بعد از هضم آنزیمی به‌طور کامل، برای جلوگیری از Self-Ligation در وکتورهای خطی شده، فرایند دفسفریلاسیون انجام شد. برای آماده‌سازی ژن F، تخلیص مستقیم محصول PCR برای حذف dNTP و پرایمرها و ناخالصی‌ها از نمونه محصول PCR انجام شد و پس از آن هضم آنزیمی ژن F با همان شرایط بافری و همان دو آنزیم *HindIII* و *NdeI* انجام شد. این عمل باعث ایجاد انتهای چسبنده می‌شود که لازمه کلونینگ این ژن درون وکتورهای ذکر شده است [۹].

پس از آماده‌سازی وکتورها و ژن F، این ژن در هر دو وکتورهای بیانی pET-22b(+) و pET-28a(+) کلون شد. به‌علت این که سیستم pET یک ابزار بیان پروتئین بسیار قوی است، می‌توانیم بیان پروتئین را با پروموتور T7/T7lac، میزبان‌های pLysS یا pLysE و اضافه کردن

برای ساخت cdNA از روی RNA استخراج شده، از Random hexamer به‌عنوان پرایمر استفاده شد که روشی متداول برای جداسازی قطعات ژنومیک و ویروسی است.

برای ساخت cdNA می‌توان از هر دو آنزیم نسخه‌برداری معکوس AMV و M-MuLV، استفاده کرد. آنزیم AMV، هم برای الگوهای RNA و هم برای الگوهای DNA فعالیت پلیمرازی ۳'→۵' وابسته به پرایمر دارد. آنزیم M-MuLV کاملاً شبیه آنزیم AMV است و فقط از RNA به‌عنوان الگو استفاده می‌کند. در این طرح به علت در دسترس بودن آنزیم AMV از این آنزیم استفاده شد که نتیجه خوبی هم حاصل شد [۷].

برای انجام PCR روی cdNA تک‌رشته‌ای، از پرایمرهای M-FRS و M-FFS2 استفاده شد. این پرایمرها طوری طراحی شدند که بتوان ناحیه ORF ژن F را جدا برای کلونینگ در وکتورهای بیانی استفاده کرد. در این پرایمرها، برای ایجاد انتهای چسبنده، سایت‌های برشی برای آنزیم‌های محدودگر *NdeI* و *HindIII* قرار داده شد. سایت *NdeI* یا *NcoI* در تعداد زیادی از وکتورهای pET، برای کلونینگ به درون کدون شروع AUG که در انتهای ۵' توالی کدکننده ژن هدف وجود دارد، موجود است. ژن‌های هدف که سایت *NdeI* و یا سایت‌هایی که Overhang سازگار در ابتدای ORF‌شان را دارند، به‌درون سایت *NdeI* وکتور کلون می‌شوند [۱۹]. از این رو، پرایمرها طوری طراحی شدند که باعث ایجاد سایت برشی *NdeI* در ژن F شوند که این سایت در پرایمر M-FFS2 قرار داده شد؛ برای ایجاد سایت برشی *HindIII* پرایمر M-FRS طوری طراحی شد که حاوی این سایت باشد. طراحی پرایمرهای مناسب در چنین شرایطی، با مشکلاتی همراه است. برای مثال می‌توان

عمل در غیاب منبع T7 RNA polymerase انجام می‌شود. از این رو برای کلونینگ از میزبان‌های کلونینگ که $recA^-$ و $endA^-$ هستند، استفاده شد [۹، ۱۳]. این میزبان‌ها توانایی انتقال (ترانسفورماسیون) بالا دارند و قادر به نگهداری پلاسمید و تولید مقادیر بالای پلاسمید هستند، زیرا محصول ژن $endA$ آنزیم آندونوکلاز I است و این آنزیم DNA دو رشته‌ای را به‌عنوان سوبسترا می‌شناسد و باعث هضم آن می‌شود؛ بنابراین در این میزبان‌ها که $endA^-$ هستند، این آنزیم تولید نمی‌شود و باعث پایداری DNA می‌شود. بنابراین برای استخراج پلاسمید، از این میزبان‌ها استفاده می‌شود. از جمله این میزبان‌های کلونینگ می‌توان به سوش‌های *E. coli* K12 از NovaBlue، JM109 و DH5 α اشاره کرد که ما در این طرح از DH5 α استفاده کردیم [۱۳].

بعد از تأیید کلونینگ، توالی پلاسمید نو ترکیب pET-28aF توسط شرکت MWG آلمان تعیین شد. سپس نتایج به‌دست آمده توسط نرم‌افزار DNAMAN با توالی F ویروس سرخک که از بانک ژن (سوش واکسینال ادمونستون (AIK-C) با (Accession number: AF266286) استخراج شده بود، مقایسه شد.

در نتایج به‌دست آمده حاصل از مقایسه مناطق مختلف ژن، در تمامی موارد همولوژی بالایی مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده این است که عادت دادن سوش واکسینال AIK-C از سلول فیروبلاست جنین جوجه، به سلول MRC-5، هیچ‌گونه تغییری در سطح توالی اسید نوکلئیک و اسید آمینه در مورد ژن F ایجاد نکرده است.

در یک مطالعه، ژنوم کامل F از RNA ویروس سرخک سوش Halle که روی سلول‌های میمون رشد کرده بود، جداسازی شد. سپس ژنوم کامل F درون پلاسمید pCD-1 کلون شد و پلاسمیدهای نو ترکیب به

گلوکز به محیط بر اساس خصوصیتی از پروتئین هدف، کنترل کنیم. بنابراین کلونینگ از این وکتورهای بیانی استفاده شد تا در صورت نیاز به بیان این ژن در تحقیقات بعدی، نیازی به انجام ساب کلونینگ نباشد [۹، ۱۳].

وکتورهای pET-28a(+) و pET-22b(+), هر دو دارای پروموتور قوی T7lac هستند که برای کنترل بیان پایه مناسب‌ترند. (پروموتور قوی T7 از فاژ T7 گرفته شده است که کارایی بالایی در نسخه‌برداری دارد). این پلاسمیدها حاوی یک توالی اوپراتور lac در پایین دست پروموتور T7 و توالی کدکننده برای رپرسور lac (LacI) هستند.

LacI، برای مهار نسخه‌برداری ژن T7 RNA Polymerase با پلی‌مراز میزبان، روی پروموتور LacUV5 در کروموزوم میزبان اثر دارد. همچنین در پروموتور T7lac وکتور، برای جلوگیری از نسخه‌برداری ژن هدف به وسیله T7 RNA Polymerase مؤثر است و به این ترتیب در به حداقل رساندن بیان پایه دخالت می‌کند [۹].

البته پلاسمیدهای بیانی دیگری مثل pQE و pGEX هم وجود دارند که به ترتیب حاوی پروموتور T5 و پروموتور Tac (ترکیبی از پروموتورهای trp و lac) هستند که در مقایسه با وکتور pET پروموتور ضعیف‌تری دارند. وکتورهای pET به علت داشتن پروموتور قوی، که دارند برای بیان ژن، مناسب‌ترند و از سویه‌های باکتری زیادی می‌توان برای بیان آن‌ها استفاده کرد به همین دلیل باعث گسترده‌تر شدن زمینه تحقیق و بررسی می‌شوند و به دلیل مزیت‌های ذکر شده، در این طرح این وکتورها انتخاب شده‌اند [۹].

ساختار قوی سیستم pET، توانایی کلون کردن ژن‌های هدف را در شرایط نسخه‌برداری بسیار اندک، دارد. این

است. پلاسمید pJW4303 جزء پلاسمیدهای بیانی در تهیه واکسن‌های نوترکیب است. بعد از انجام کلونینگ، پلاسمیدهای نوترکیب به موش تلقیح شدند. پس از بررسی‌های ایمنولوژیکی، نتایج امیدوارکننده‌ای در رابطه با توسعه واکسن‌های نوترکیب ویروس سرخک به دست آمده است [۱۷].

۷- مراجع

- [1] Knipe D, Howley P, Fields - Virology. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins. 2006; ISBN 0-7817-1832-5.
- [2] Flint SJ, Racaniello VR. Principles of virology. 2000; ISBN 1-55581-172-2.
- [3] Jawetz., Melnick. and Adelberg's. Medical Microbiology. 25th ed. 2010.
- [4] Bellini WJ, Rota JS. Virology of measles virus. J. Gen. Virol. 1994; 170: 15-23.
- [5] Mary P, Paul A. DNA vaccination of infants in the presence of maternal antibody. Virology, 2003; 307: 67-75.
- [6] High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche 2004.
- [7] Protocol for first – strand cDNA synthesis Kit for RT – PCR (AMV) +, Roche 2004.
- [8] Protocol for PCR with Pfu DNA Polymerase, fermentase. 2004.
- [9] pET System manual, 10th ed., Novagen 2002.

سلول‌های *E. coli* MC1061 ترانسفورم شدند، پس از غربالگری کلونی‌ها و تأیید کلونینگ، توالی پلاسمید نوترکیب تعیین توالی شد. DNA حاوی 2384 نوکلئوتید بود که در مقایسه این توالی با توالی ژن F حاصل از ویروس سرخک سوش Edmonston مشاهده شد که توالی ژن فیوژن (F) بسیار حفاظت شده است. همچنین در مقایسه این توالی با توالی ژن F دیگر پارامیکوویروس-ها، همولوژی زیادی بین آن‌ها مشاهده شده و نشان دهنده این است که ژن F بسیار حفاظت شده و پایدار است که باعث اهمیت بررسی این ژن در تهیه واکسن نوترکیب شده است [۱۴].

در مطالعاتی دیگر، ناحیه کدکننده پروتئین فیوژن از ویروس سرخک سوش ادمونستون در وکتور کلونینگ pBR322 و در باکتری *E. coli* سوش HB101 کلون شد. بعد از تعیین توالی، مشخص شد که این پروتئین حاوی ۵۵۰ اسید آمینه است و ۸۱/۶۴ درصد از اسید آمینه‌ها هیدروفوبیک یا بدون بار هستند [۱۵].

ناحیه حفاظت‌شده‌ای در انتهای آمینی F1 است که در فرآیند فیوژن دخالت دارد و از ویژگی‌های بیش‌تر پارامیکسو ویروس‌ها است.

در مقایسه‌ی توالی ژن پروتئین F با سایر پارامیکسو ویروسها (Sendai, RSV, SV5) همولوژی زیادی در انتهای حفاظت‌شده‌ی F1 و ۹ سیستمین مشاهده شده است [۱۵].

مطالعات اخیر نشان داده است که گلیکو پروتئین نوترکیب F به همراه گلیکو پروتئین H به علت اهمیت بالای ایمنولوژیکی، به عنوان کاندیدای واکسن نوترکیب مطرح هستند [۱۶]. در مطالعاتی، کلونینگ ژن هم‌اگلوتینین (H) و ژن فیوژن (F) سوش ادمونستون ویروس سرخک در وکتور بیانی pJW4303 انجام شده

- [15] Richardson C, Hull D. The nucleotide sequence of the mRNA encoding the Fusion of Measles virus (Edmonston strain). *Virology*, 1986; 155: 508- 523.
- [16] SangKon O, Pendleton D. Protective immunity provided by HLA-A2 epitopes for fusion and hemagglutinin proteins of measles virus. *J. Virol.* 2006; 04. 040.
- [17] Yang KF, Mustafa F. Early studies on DNA-based immunizations for measles virus. 1997; 888- 892.
- [10] Brown TA. *Gene cloning*. 3th ed., 1998.
- [11] *Molecular Biology Catalog and Product. Application guide*, Fermentase 2004-2005.
- [12] Rusel D, Sambrook J. *Molecular cloning A laboratory Manual*. 3th ed., 2001.
- [13] pET System Tutorial (Protein Expression), Novagen. 2002.
- [14] Buckland R, Gerand C. Fusion glycoprotein of measles virus: Nucleotid sequence of the gene and comprision with other p aramixoviruses. *J. gen. virol.* 1987; 68: 1695-1703.