

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

ملیحه اسماعیلزاده خراسانی^۱، مجتبی سعادتی^{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 پیش 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 تکرشهایی با استفاده از واکنش نسخه‌برداری معکوس استفاده شد. از PCR استفاده تکرشهای به عنوان رشتہ الگو برای تکثیر ژن F با پرایمرهای اختصاصی در واکنش شد. محصول PCR با طول 1662 bp درون وکتورهای بیانی (+) و (+) pET-22b(+) و pET-28a(+) شد. محصول PCR با طول 1662 bp درون سلول‌های مستعد E. coli DH5α کلون شد. برای تأیید کلونینگ، پلاسمیدهای نوترکیب به درون سلول‌های مستعد ترانسفورم شد. کلونی‌های به دست آمده، با استفاده از PCR مستقیم، غربالگری شدند. سپس پلاسمیدهای نوترکیب به روش لیز قلیایی استخراج شد.

هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب، با استفاده از آنزیمهای با اثر محدود NdeI و HindIII انجام شد و قطعه DNA به طول 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 (سوسن واکسینال ادمونستون (AIK-C) با Accession number: AF266286) با همologی 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.

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

انجام شده است. پروتئين F ویروس سرخک به علت نقش مهم ایمونولوژنيک و عملکردي، در اين تحقيق مورد بررسى قرار گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۱- باكتري‌ها و ویروس

محيط حاوي ویروس سرخک سوش AIK-C که در تهيه واکسن استفاده شد، از بخش واکسن‌های ویروسی مؤسسه سرم‌سازی رازی تهيه شد. از باكتري *E. coli* سوش DH5α، برای کلوبینیگ استفاده شد.

۲- استخراج RNA

استخراج RNA از محيط حاوي ویروس سرخک سوش واکسينال AIK-C که روی سلول‌های ديبلوئيد انساني MRC-5 رشد کرده بودند، انجام شد. استخراج RNA با Kit (High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) انجام شد. اين روش بر اساس ليز ویروس به وسیله گوانیدین هيدروكلرايد، که يك ماده دنا توره کننده قوي است، انجام شد [۶]. RNA استخراج شده، فوراً برای واکشن نسخه‌برداری معکوس و تولید cDNA تک-رشته‌اي استفاده شد.

۳- ستز cDNA

ستز cDNA ژن F، با استفاده از آنزيم AMV Reverse Transcriptase با غلظت 25 unit/ μ l (Roche) انجام شد. به اين ترتيب که ابتدا RNA استخراج شده در مرحله قبل، برای جلوگيری از ساختار ثانویه، به مدت ۳ دقيقه در دماي ۶۵ درجه سانتي گراد قرار داده شد. سپس نسخه‌برداری معکوس (RT) در دماي ۴۲ درجه سانتي گراد

۱- مقدمه

ویروس سرخک عضو خانواده پارامیکسو ویروس‌ها و از جنس موربیلی ویروس‌ها است و پوشش غشای 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 يك بیماری مربوط به دوران کودکی است که از طریق دستگاه تنفسی گسترده می‌شود. بیماری دارای يك 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 ماکولوپاپلار ظاهر می‌شود [۳].

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

این ویروس از طرق مختلف آزمایشگاهی، از جمله جداسازی ویروس، تشخيص مستقیم ویروس، ردیابی RNA ویروسی یا آنتی‌ژن‌های ویروسی در ترشحات، مهار هماگلوبیناسیون (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 نوترکیب، با استفاده از آنتی‌ژن‌های H و F

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

۳- کلونینگ محصول PCR

پس از آن که تخلیص محصول PCR به طور مستقیم با استفاده از کیت Product High Pure PCR و انجام پلاسمیدهای Purification Kit (Roche) و pET-28a(+) و pET-22b(+) 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 ۱۰ unit/ μ l و ۱۰ واحد آنزیم *HindIII* با غلظت ۱۰ unit/ μ l، ساخت شرکت فرمتاز و در حجم نهایی ۳۰ ماکرولیتر، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، 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

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

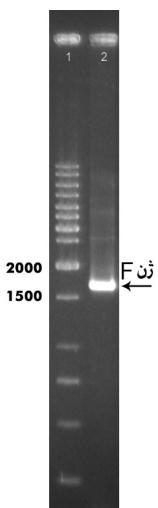
۴-۲ PCR

پرایمرهای M-FRS و M-FFS2، با استفاده از نرمافزار OLIGO طراحی شد. پرایمربا 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 cDNA قرار گرفت. PCR با استفاده از ۵ ماکرولیتر PCR تکریشهای ساخته شده در مرحله‌ی قبل، ۲ ماکرولیتر dNTP (۰.۱، ۰.۲۵ mM)، ۰.۱ میکرومولار از هر کدام از پرایمرهای M-FRS و M-FFS2 و ۱ ماکرولیتر از آنزیم *Pfu* DNA polymerase با غلظت ۲.۵ μ l 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 سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، برای جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی و در ادامه، ۲۰ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و اتصال پرایمر (annealing) در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و افزایش طول زنجیره (extention) DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد

۳- نتایج

پس از استخراج RNA از سوش واکسینال AIK-C ویروس سرخک روی سلول‌های MRC-5 رشد کرد و در محیط آزاد شد. سپس اقدام به انجام RT-PCR دو مرحله‌ای شد، پس از انجام ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید و مقایسه با مارکر ۱ kb bp (Fermentase)، یک باند در منطقه‌ی بین دو باند ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ 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 و M-FR. ستون ۱: مارکر ۱kb. 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* به طور هم زمان، ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید انجام شد. باندهای مشاهده شده، نشان‌دهنده این بود که هضم آنزیمی به طور 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-28aF و pET-22bF به وسیله شوک حرارتی درون سلول‌های مستعد *E. coli* DH5 α ترانسفورم شدند برای تأیید و بررسی کلونینگ روی کلونی‌های به دست آمده PCR مستقیم انجام شد. کلونی‌های با PCR مثبت، در محیط LB-broth دارای آنتی بیوتیک مناسب، کشت داده شدند و پلاسمید به روش لیز قلیایی استخراج شد [۱۲].

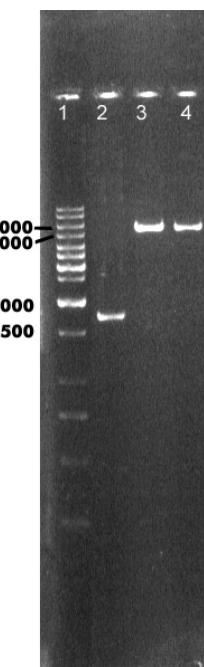
با انجام ژل الکتروفورز، براساس وزن مولکولی، پلاسمیدهای نوترکیب از پلاسمیدهای فاقد ژن F، جدا شدند. هم‌چنین هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای نوترکیب pET-28aF و pET-22bF به وسیله دو آنزیم *NdeI* و *HindIII* انجام شد که پس از انجام الکتروفورز روی ژل آگارز، قطعه DNA به طول ۱۶۶۲ bp جدا شد. آنالیز پلاسمیدهای نوترکیب،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

۶-۲- تعیین توالی

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

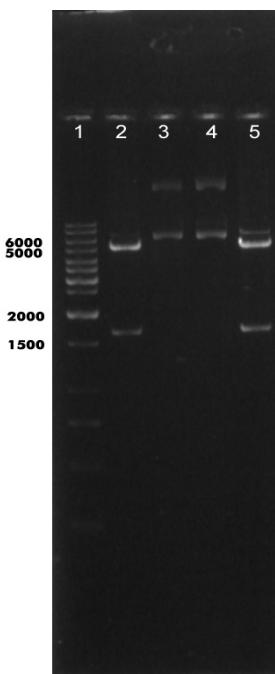
برای تعیین توالی، از دو پرایمر T7-promoter و T7-terminator استفاده شد. سپس توالی به دست آمده با توالی موجود در بانک ژن (سوش واکسینال ادمونستون Accession number : AF266286) (AIK-C) با نرم‌افزار DNAMAN مقایسه شد.

پلاسمیدهای نوترکیب به دلیل کلون شدن ژن F درون آن هاست. وجود دو باند در هر ستون، به خاطر این است که پلاسمید می تواند به سه حالت سوپرکویل، حلقوی و خطی وجود داشته باشد که بر اساس سرعت، پلاسمید سوپرکویل سریعتر از حالت های دیگر، سپس شکل خطی و بعد حلقوی حرکت می کند. همچنین برای آنالیز پلاسمید نوترکیب، PCR مستقیم با استفاده از پرایمرهای Taq DNA اختصاصی M-FFS² و M-FRS² و آنزیم M-FRS² Polymerase روی چند کلونی از هر پلیت (پلیت مربوط به کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیب pET-22bF و pET-28 aF) انجام شد. پس از انجام ژل الکتروفوروز و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید و مقایسه با مارکر 1 kb (Fermentase)، یک باند در منطقه بین دو باند 1500 و 2000 bp مشاهده شد (شکل ۴، باندهای موجود در ستون های ۲ تا ۵ و ۶ تا ۱۱). این باندها، از لحاظ اندازه، مشابه با DNA مورد انتظار ما (ژن F) و حدود ۱۶۶۲ bp است. همچنین پلاسمیدهای نوترکیب pET-28aF و pET-22bF با استفاده از آنزیم های محدودگر NdeI و HindIII هضم آنزیمی شدند. سپس با انجام ژل الکتروفوروز و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید، با مارکر 1 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 5000 و 6000 bp) و ۶۰۰۰ مارکر) و دیگری مربوط به ژن F (باند بین 1500 و 2000 bp) است و ستون ۳ و ۴ مربوط به پلاسمیدهای نوترکیب، قبل از هضم آنزیمی است. این نشان می دهد که ژن F به درستی درون وکتورها کلون شده که پس از هضم آنزیمی، وکتورهای نوترکیب به وسیله دو آنزیم نامبرده، از این وکتورها جدا شده است.

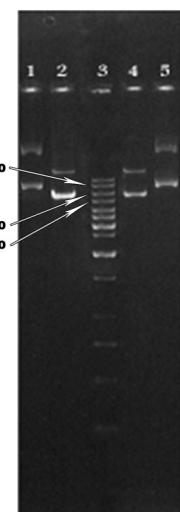


شکل ۴ نتایج حاصل از هضم آنزیمی ژن F و پلاسمیدهای pET-22b(+) و pET-28a(+) به وسیله هر دو آنزیم NdeI و HindIII به طور همزمان. ستون ۱: مارکر 1kb ستون ۲: ژن F برش داده شده با هر دو آنزیم NdeI و HindIII به طور همزمان، ستون ۳: پلاسمید (+) pET-22b برش داده شده با هر دو آنزیم NdeI و HindIII به طور همزمان . ستون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

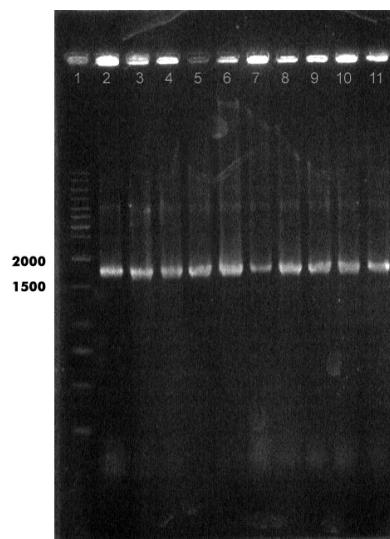
برای بررسی و تأیید کلونینگ، از برخی کلونی های حاصل از ترانسفورماسیون وکتورهای نوترکیب (pET-22bF, pET-28aF) به سلول های مستعد استفاده شد. پس از استخراج پلاسمید از کلونی های به دست آمده، ژل الکتروفوروز انجام شد. بعد از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم برماید و مقایسه با مارکر 1 kb مشاهده شد که پلاسمیدهای نوترکیب (شکل ۳ ستون های ۱ و ۳) بالاتر از پلاسمیدهای فاقد ژن (شکل ۳ ستون های ۲ و ۴) قرار گرفته اند که این نشان دهنده سنجیگین تر شدن



شکل ۵ آنالیز پلاسمید نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی.
ستون ۱: مارک ۱kb، pET-28aF، ستون ۲: pET-22bF قبل از هضم آنزیمی
با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *HindIII*، ستون ۳: pET-22bF (کنترل منفی)، ستون ۴: مارک ۱kb، ستون ۵: pET-28aF (کنترل منفی)، ستون ۶: pET-22bF بعد از هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *HindII* و *NdeI*



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



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

در این طرح، ابتدا RNA از محیط حاوی ویروس سرخک سوش واکسینال AIK-C که روی سلول‌های دیپلوبتید 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 ۱۰-۲۰ درصد باشد. در این مراحل تکثیر ویروسی، mRNAهای ویروسی ساخته می‌شوند و سپس به‌سمت تولید ژنوم تغییر پیدا می‌کنند.

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 (Hot-Start) صحیح پرایمر، استفاده از روش شروع داغ (Hot-Start) است.

در حین ساخت cDNA، آنزیم DNA پلی مراز، 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 این‌منظور، وکتورهای pET-22b(+) و pET-28a(+) با آنزیم‌های NdeI و HindIII 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 NdeI و HindIII 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 این‌که سیستم pET یک ابزار بیان پروتئین بسیار قوی است، می‌توانیم بیان پروتئین را با پرومومتر T7/T7lac، میزبان‌های pLysS یا pLysE و اضافه کردن

برای ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده، از Random hexamer به عنوان پرایمر استفاده شد که روشی متداول برای جداسازی قطعات ژنومیک ویروسی است.

برای ساخت cDNA می‌توان از هر دو آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV و AMV، استفاده کرد. آنزیم AMV، هم برای الگوهای RNA و هم برای الگوهای DNA فعالیت پلی‌مرازی $3' \rightarrow 5'$ وابسته به پرایمر دارد. آنزیم M-MuLV کاملاً "شیوه آنزیم AMV" است و فقط از RNA به عنوان 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-FFS2 و M-FRS استفاده شد. این F 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 یا Overhang سایت‌هایی که سازگار در ابتدای ORF شان را دارند، به درون سایت NdeI وکتور کلون می‌شوند [۱۹]. از این‌رو، 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 Pرایمر M-FRS طوری طراحی شد که حاوی HindIII این سایت باشد. طراحی پرایمرهای مناسب در چنین شرایطی، با مشکلاتی همراه است. برای مثال می‌توان

عمل در غياب منبع RNA polymerase T7 انجام می شود. از اين روش برای کلونینگ از ميزبان های کلونینگ که recA⁻ و endA⁻ هستند، استفاده شد [۹، ۱۳]. اين ميزبانها توانايي انتقال (transformation) بالا دارند و قادر به نگهداري پلاسميد و توليد مقادير بالاي پلاسميد هستند، زيرا محصول ژن endA آنزيم آندونوكلثاز I است و اين آنزيم DNA دو رشته اي را به عنوان سوبسترا مي شناسد و باعث هضم آنمی شود؛ بنابراین در اين ميزبانها که endA⁻ هستند، اين آنزيم توليد نمي شود و باعث پايداري DNA مي شود. بنابراین برای استخراج پلاسميد، از اين ميزبانها استفاده مي شود. از جمله اين ميزبانهاي کلونینگ مي توان به سوش های E. coli K12 از NovaBlue JM109 و DH5 α اشاره کرد که ما در اين طرح از DH5 α استفاده کردیم [۱۳].

بعد از تأييد کلونینگ، توالی پلاسمید نوترکيب pET-28aF MWG شرکت آلمان تعیین شد. سپس نتایج به دست آمده توسط نرم افزار DNAMAN با توالی F ویروس سرخک که از بانک ژن (سوش واکسینال ادمونستون Accession number:AF266286 (AIK-C) با شده بود، مقایسه شد.

در نتایج به دست آمده حاصل از مقایسه مناطق مختلف ژن، در تمامی موارد همولوژي بالاي مشاهده شد. اين نتایج نشان دهنده اين است که عادت دادن سوش واکسینال AIK-C از سلول فيبروبلاست جنين جوجه، به سلول MRC-5، هيج گونه تغييري در سطح توالی اسيد نوكليئيك و اسييد آمينه در مورد ژن F ايجاد نکرده است.

در يك مطالعه، ژنوم کامل F از RNA ویروس سرخک سوش Halle که روی سلول های ميمون رشد کرده بود، جداسازی شد. سپس ژنوم کامل F درون pCD-1 کلون شد و پلاسميد های نوترکيب به

گلوکز به محیط بر اساس خصوصیاتی از پروتئین هدف، کنترل کنیم. بنابراین کلونینگ از اين وكتورهای بيانی استفاده شد تا در صورت نیاز به بيان اين ژن در تحقیقات بعدی، نیازی به انجام ساب کلونینگ نباشد [۹، ۱۳]. وكتورهای (+) pET-22b(+) و (+) pET-28a(+)، هر دو دارای پرومودر قوي T7lac هستند که برای کنترل بيان پایه مناسب ترند. (پرومودر قوي T7 از فاز ۷ گرفته شده است که کارابی بالاي در نسخه برداری دارد). اين پلاسميدها حاوي يك توالی اوپراتور lac در پايان دست (LacI) lac پرومودر T7 و توالی کدکننده برای رپرسور LacI هستند.

LacI برای مهار نسخه برداری ژن T7 RNA Polymerase با پلی مراز ميزبان، روی پرومودر LacUV5 در کروموزوم ميزبان اثر دارد. همچنان در پرومودر T7lac وكتور، برای جلوگیری از نسخه برداری ژن هدف به وسیله T7 RNA Polymerase مؤثر است و به اين ترتيب در به حداقل رساندن بيان پایه دخالت می کند [۹].

البته پلاسميد های بيانی دیگری مثل pGEX و pQE هم وجود دارند که به ترتیب حاوي پرومودر T5 و پرومودر (ترکیبی از پرومودرهای la و trp) هستند که در مقایسه با وكتور pET پرومودر ضعیفتری دارند. وكتورهای pET به علت داشتن پرومودر قوي، که دارند برای بيان ژن، مناسب ترند و از سویه های باکتری زيادی می توان برای بيان آنها استفاده کرد به همین دليل باعث گسترش تر شدن زمینه تحقيق و بررسی می شوند و به دليل مزیت های ذکر شده، در اين طرح اين وكتورها انتخاب شده اند [۹].

ساختار قوي سیستم pET، توانایی کلون کردن ژن های هدف را در شرایط نسخه برداری 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 ایمونولوژیکی، 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 نوکلئید بود که در مقایسه این توالی با توالی Ζن F حاصل از ویروس سرخک سوش Edmonston مشاهده شد که توالی Ζن فیوژن (F) بسیار حفاظت شده است. همچنین در مقایسه این توالی با Ζن F دیگر پارامیکوویروس-ها، همولوژی زیادی بین آنها مشاهده شده و نشان دهنده این است که Ζن F بسیار حفاظت شده و پایدار است که باعث اهمیت بررسی این Ζن 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* HB101 سوش Ζن 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 Ζن پروتئین F با سایر پارامیکسو ویروس‌ها (Sendai, RSV, SV5, ...) همولوژی زیادی در انتهای حفاظت شده F1 و ۹ سیستئین مشاهده شده است [۱۵].

مطالعات اخیر نشان داده است که گلیکوپروتئین نوترکیب F به همراه گلیکوپروتئین H به علت اهمیت بالای ایمونولوژیک، به عنوان کاندیدای واکسن نوترکیب مطرح هستند [۱۶]. در مطالعاتی، کلونینگ Ζن هماگلوبینین (H) و Ζن 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 paramixoviruses. *J. gen. virol.* 1987; 68: 1695-1703.