Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.39; No.2; 2015

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 18:27 +0430 on Tuesday August 20th 2019

Evaluation of Modification in M2 gene of Influenza H1N1 virus in expression in BL21 E-coli

Fatemeh Jafarinejad[1], Mojgan Bandehpour[2]*, Shiva Sadat Gheflat[3], Bahram Kazemi[4,5]

1. Department of Biology, Azad University of Ahar, Ahar, Iran
2. Department of Biochemistry, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Cellular & Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Cellular & Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Biotechnology Department, School of Advanced Biotechnologies, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2015/10/20 Accept: 2016/2/3)

Abstract

Background: *This research was carried out for a by considering gene sequence and each amino acid codon in host, which express protein in order of probable vaccine production against influenza A, a major cause of mortality in a year. M2 protein is conserved and it can be a proper candidate vaccine for influenza infection.*

Materials and Methods: *Present research was an experimental study. The sequence of M2 protein of Iran influenza virus H1N1 strain was modified and synthesized. It was subcloned into pET22b vector recombinant protein and expressed in BL21 E-coli and confirmed with specific antibody by western blot technique.*

Results: *The modified M2 gene was expressed in E-coli. The concentration of it was 300µg/ml and it was confirmed by western blotting with specific antibody.*

Conclusion: *Influenza M2 protein with modification in sequence could be expressed in BL21 E-coli host.*

Keywords: *Cloning, Influenza virus, Protein expression, M2 protein, genetic modification, pET22b*

* *Corresponding author:Mojgan Bandehpour*
m. bandehpour@sbmu. ac. ir

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دور۳۹، شماره۲، ۱۳۹٤، صفحات ٦۹ تا ۷۳

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 18:27 +0430 on Tuesday August 20th 2019

بررسی تغییر ژن پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا H1N1 در بیان آن در باکتری Ecoli سویه BL21

فاطمه جعفری‌نژاد[۱]، مژگان بنده پور[۲,*]، شیوا سادات غفلت[۳]، بهرام کاظمی[۴و۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران
۲- دانشیار، بخش بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵- بخش بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۷/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴

چکیده

مقدمه: با توجه به اهمیت توالی ژن و کدون‌های مربوط به هر اسیدآمینه در میزبان بیان کننده پروتئین، همچنین برای تولید احتمالی واکسن علیه آنفلوانزا *A*، یکی از عوامل اصلی مرگ ومیر سالانه در جهان، این تحقیق انجام گرفته است. پروتئین *M2* حفاظت شده است و بعد از تغییر در توالی آن به نظر می‌رسد هدف مناسبی برای تولید واکسن آنفلوانزا در نظر گرفته شود.

روش بررسی: تحقیق به روش تجربی انجام شد. توالی ژن *M2* از ویروس سویه *H1N1* ایران انتخاب و بعد از اعمال تغییر برای بیان بهتر در باکتری *ilocE* سنتز شد. سپس در وکتور *pET22b* ساب کلون شد. پروتئین نوترکیب در باکتری *E. iloc* سویه *BL21DE3* بیان و از آنتی بادی اختصاصی در روش وسترن بلات برای تأیید آن استفاده شد.

یافته‌ها: *Ecoli* با تغییر اعمال شده قادر به بیان پروتئین *M2* باغلظت ۳۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بود و با آنتی بادی اختصاصی نیز ماهیت آن تأیید شد.

نتیجه‌گیری: پروتئین *M2* ویروس آنفلوانزا با تغییرهایی در توالی آن در باکتری *Ecoli* سویه *BL21* قابل بیان است.

واژگان کلیدی: کلونینگ، ویروس آنفلوانزا، بیان پروتئین، پروتئین *M2*، تغییر ژنتیکی، *pET22b*

مقدمه

امروزه تولید پروتئین‌های نوترکیب در علم بیولوژی، پزشکی و داروسازی یکی از ابعاد مهم را به خود اختصاص داده است. استفاده از سیستم‌های مختلف یوکاریوتیک و پروکاریوتیک به این منظور مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند. یکی از سیستم‌های پروکاریوت در بیان پروتئین نوترکیب، استفاده از باکتری اشریشیا کولای با موتاسیون‌های متفاوت است. بین پدیده‌هایی چون درصد GC در DNA ژنومی، کدون‌های شناسایی شونده در هر میزبان و سطح بیان ژن ارتباط قوی وجود دارد. محققی به نام Knight و همکاران روی الگوی استفاده کدون در تعداد زیادی از گونه‌ها (۳۱۱ پروکاریوت، ۲۸ آرکی و ۲۵۷ یوکاریوت) تحقیق کردند و مدل قابل پیش‌بینی از بیان پروتئین نوترکیب را به‌دست آوردند (۱، ۲). انتخاب صحیح کدون‌ها براساس میزبان هدف از نظر نوع tRNAهای موجود نیز اهمیت دارد. در تحقیقی که از سوی Alexander Dana و Tamir Tuller انجام شد داده‌هایی براساس پروفایل ریبوزوم برای چهار ارگانیسم آنالیز شد که زمان مکس هر کدون در ترجمه و اثر ترافیک ریبوزوم‌ها را شامل می‌شود. بنابراین یک ارتباط معنادار بین غلظت tRNA و زمان مکس کدون‌ها هم در پروکاریوت‌ها و هم در یوکاریوت‌ها در شرایط طبیعی وجود دارد (۳، ۴، ۵). با این توضیح‌هادر این مقاله برای بیان بالای پروتئین نوترکیب M2 ویروس آنفلوانزا تغییرهایی برای کدون‌های قابل شناسایی در باکتری Ecoli داده شد. چرا که بیماری‌های تنفسی در جهان بیش از نیمی از موارد بیماری‌های حاد را تشکیل می‌دهند. در این میان ارتو میکزوویریده (ویروس آنفلوانزا) عامل مهمی در ایجاد بیماری و مرگ ناشی از بیماری‌های تنفسی به شمار می‌آید(۶). این پروتئین به‌عنوان هدفی برای تهیه واکسن‌های مؤثر است که توانایی القای ایمنی در برابر سویه‌های مختلف آنفلوانزا را دارد. پروتئین ماتریکس ۲ (M2) یک پروتئین بین غشایی با ۹۷ اسیدآمینه به شکل هموتترامر با پیوندهای دی سولفید است که در غشای پلاسمایی سلول‌های آلوده به ویروس با چگالی بالا که شبیه مولکول HA است بیان

نویسنده مسئول: دکتر مژگان بنده‌پور
m. bandehpour@sbmu. ac. ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 18:27 +0430 on Tuesday August 20th 2019

می‌شود.(۷) و چگالی این پروتئین هنگام آزاد شدن ویروس‌های جدید کاهش می‌یابد. به‌طور متوسط هر ویروس آنفلوانزا شامل ۱۰ تترامر M2، حدود ۴۰۰تری مر HA و ۱۰۰ تترامر NA است.(۸، ۹) بدین ترتیب با آگاهی از اهمیت پروتئین M2 در طراحی واکسن علیه آنفلوانزا در این تحقیق به تولید آن اقدام کردیم.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه به‌صورت تجربی انجام شد. به دلیل محدودیت کشت ویروس آنفلوانزا در آزمایشگاه، توالی ژن M2 از ویروس سویه H1N1 ایران (۲۰۱۰/۱۴/A/Shiraz از بانک ژن انتخاب و بعد از اعمال تغییر با توجه به کدن‌های قابل شناسایی در باکتری Ecoli برای سنتز به شرکت ندای فن سفارش داده شد.

پلاسمید pGH حاوی ژن M2 در باکتری E. coli سویه Top10 ترانسفرم و تکثیرشد. بعد از تخلیص پلاسمید قطعه مورد نظر با استفاده از پرایمر عمومی M13 تکثیر شد.

M13 F 5’GTAAAACGACGGCCAGTG3’

M13 R 5’GGAAACAGCTATGACCATG3’

جدول ۱: موادمصرفی و غلظت‌های آن‌ها در واکنش PCR

مواد مورد استفاده درواکنش	مقدار مصرفی در واکنش	غلظت مصرفی در واکنش
Plasmid (1ng/ µl)	µl 1	ng 1
dNTP (10mM)	5 µl	Mm 0. 2
MgCl2 (50mM)	1.5 µl	Mm 10
Primers 20pmol	2 µl	Pmol 1. 5
Buffer PCR10x	µl 3	X 1
Taq (5unit/ µl)	µl 0.25	u 1.25
D. W.	Up to 30 µl	

واکنش PCR برای تکثیر ژن M2 به وسیله پرایمرهای عمومی M13 به صورت زیر انجام شد:

جدول ۲: مراحل واکنش PCR برای تکثیر ژن M2

Initial Denaturation	C °94	Min 5
Denaturation	C °94	Sec 30
Annealing	C °54	Sec 40
Extension	C °72	Min 1
Final extension	C 72°	Min 5

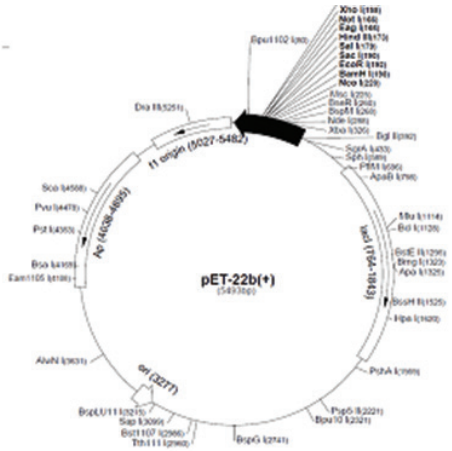
ساب کلونینگ ژن M2 در وکتور بیان:

وکتور نهایی برای بیان این پروتئین pET22b در نظر گرفته شد که بعد از هضم باآنزیم‌های SacI (فرمنتاس، لیتوانی) و SalI (فرمنتاس، لیتوانی) تخلیص شد. قطعه M2 و وکتور بعد از آماده‌سازی با آنزیم T4 DNA ligase (فرمنتاس-لیتوانی) به هم متصل شدند. برای تأیید این مرحله از روش PCRn با پرایمرهای عمومی pET22b در دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی‌گراد و هضم آنزیمی استفاده شد.(۱۰)

pET22bF 5’TAATACGACTCACTATAG3’

pET22bR 5’GCTAGTTATTGCTCAGC3’

محصولات PCR روی آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با رنگ سایبرگرین مشاهده شدند. نقشه پلاسمید pET22b که به‌عنوان وکتور استفاده شده است در شکل روبه‌رو آمده است.



شکل ۱: نقشه پلاسمید pET22b

بیان ژن M2 و تأیید آن:

کشت شبانه از کلونی باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب M2/ pET22b انجام شد و روز بعد با ۴۰ mL، محیط LB. broth (هایمدیا، هند) حاوی ۱۰۰ µg/mL آمپی سیلین (سیگما، آلمان) در یک ارلن استریل کشت دوباره داده شد. در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت دو ساعت انکوبه شد. پس از گذشت دو ساعت و رسیدن به OD_{600}=۰/۶-۰/۹، ۱ mL از آن به‌عنوان نمونه صفر برداشته شد، سپس با ۴۰ میکرولیتر از IPTG (1mM) (سیگما، آلمان) القا شد. نمونه‌ها ۳ تا ۵ ساعت و شبانه جمع‌آوری شد.

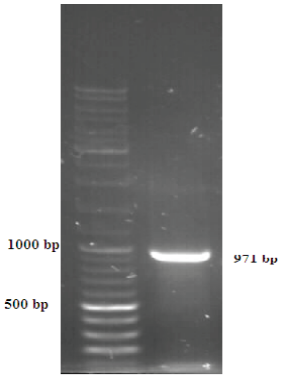
لیزات باکتری‌های القا شده در زمان‌های متفاوت به همراه کنترل سلول روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بررسی شد. پس از انتقال باند از ژل به کاغذ نیتروسلولز برای تأیید آن از تکنیک وسترن بلاتینگ استفاده شد،(۷)

ازآنتی بادی اول mouse Anti M2 Antibody (Abcam,UK) و از آنتی بادی Anti mouse کونژوگه با آلکالن فسفاتاز به‌عنوان آنتی بادی دوم استفاده شد. باندها با استفاده از کروموژن و سوبسترای NBT/BCIP مشاهده شدند.

یافته‌ها:

در مراحل مختلف کلونینگ ژن M2 تأیید آن به ترتیب زیر انجام شد.

تأیید کلون اولیه ژن M2: واکنش PCR به وسیله پرایمر عمومی M13 انجام و قطعه مورد نظر تکثیر شد. محصول PCR، روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز شدکه باند bp ۹۷۱ در شکل زیر مشاهده می‌شود.

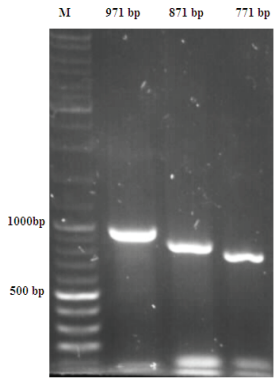


شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR (971bp) ژن M2 کنار مارکر ۱۰۰ جفت باز DNA

تهیه قطعه M2 برای کلون در وکتور بیان

محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های کم اثر SacI, SacI برش داده شد و هر مرحله روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار مارکر ۱۰۰ bp الکتروفورزشد. با توجه به نتایج حاصله قطعه M2 با ۷۷۱ جفت باز از پلاسمید pGE خارج شد(شکل ۲).

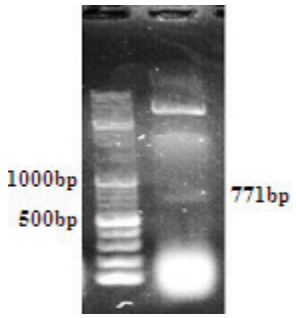
Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 18:27 +0430 on Tuesday August 20th 2019



شکل ۲: قطعه برش خورده با آنزیم‌های کم اثر SacI و SalI و محصول اولیه در کنار مارکر ۱۰۰ bp

تأیید ساب کلونینگ قطعه M2 در وکتور pET22b:

هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب حاصل با آنزیم‌های SalI و SacI انجام شد که نتیجه به‌صورت خروج ژن M2 از پلاسمید نوترکیب کنار مارکر روی ژل ۱/۵ درصد در شکل زیر مشاهده می‌شود.

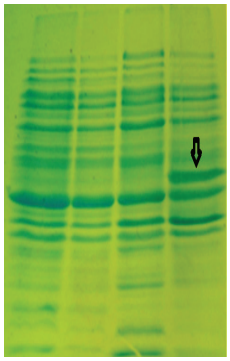


شکل ۳: ۷۷۱ bp ژن M2 بعد از هضم آنزیمی کنار مارکر ۱۰۰ bp

بیان پروتئین M2

لیزات باکتری‌های القا شده در زمان‌های متفاوت به همراه لیزات سلول بدون پلاسمید، روی ژل 12SDS-PAGE درصد بررسی شدند. باند ۲۸ پروتئین M2 در مقایسه با موارد کنترل در شکل زیر مشاهده می‌شود.

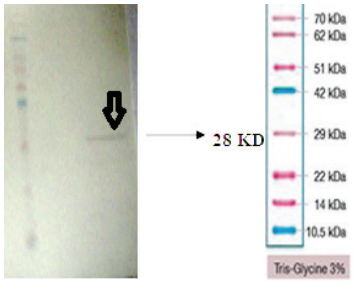
D C B A



شکل ۴: ژل 12% SDS-PAGE حاصل از الکتروفورزپروتئین M2

ستون A: سلول BL21 بدون پلاسمید نو ترکیب، ستون B: نمونه ساعت صفر، ستون C: ۳ ساعت پس از القا، ستون D: ۵ ساعت پس از القا

برای تأیید باند M2 از تکنیک وسترن بلاتینگ استفاده شد. پس از مراحل آشکارسازی با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با آلکالن فسفاتاز باند پروتئین بیان شده در شکل پایین مشاهده شد.



شکل ۵: باند ۲۸ KD حاصل از تأیید پروتئین با آنتی بادی اختصاصی

بحث:

برای بیان پروتئین نوترکیب به طور معمول از سلول‌های باکتریایی مشخصی استفاده می‌شود که علاوه بر بیان بالا هیچ‌گونه تغییری در ساختار آن ایجاد نکنند. متداول‌ترین میزبان بیانی از سویه‌های E. coli، BL21 است. این سویه از B E. coli دارای مزایای زیادی برای تولید پروتئین نوترکیب است. بین پدیده‌هایی چون درصد GC در DNA ژنومی، کدون‌های شناسایی شونده در هر میزبان و سطح بیان ژن ارتباط قوی وجود دارد. محققی به نام Knight و همکاران روی الگوی استفاده کدون در تعداد زیادی از گونه‌ها (۳۱۱ پروکاریوت، ۲۸ آرکی و ۲۵۷ یوکاریوت) تحقیق کردند و مدل قابل پیش‌بینی از بیان پروتئین نوترکیب را به‌دست آوردند.(۱، ۲، ۳) انتخاب صحیح کدون‌ها براساس میزبان هدف از نظر نوع tRNAهای موجود نیز اهمیت دارد. در تحقیقی که از سوی Alexander Dana و Tamir Tuller انجام شد داده‌هایی براساس پروفایل ریبوزوم برای چهار ارگانیسم آنالیز شد که زمان تأخیر هر کدون در نرجمه و اثر ترافیک ریبوزوم‌ها را شامل می‌شود. بنابراین یک ارتباط معنادار بین غلظت tRNA و زمان تأخیر کدون‌ها هم در پروکاریوت‌ها و هم در یوکاریوت‌ها در شرایط طبیعی وجوددارد. (۵، ۴) بنابراین در این تحقیق با تغییر توالی ژن کدکننده پروتئین M2 و کلون آن در پلاسمید pET22b با پروموتور lac T7 کدون‌های ژن M2 را براساس codon usage باکتری Ecoli تنظیم کرده و میزان بیان پروتئین به ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر رسیدکه در مقایسه با پروژه دیگر نویسنده که این تغییرها در آن اعمال نشده بود این میزان به سه برابر افزایش یافته است.(۱۱)

پروتئین نوترکیب حاصل در این سیستم طراحی شده به راحتی با سیستم کروماتوگرافی تمایلی قابل خالص‌سازی است که قبل از آن با آنتی بادی اختصاصی M2 تأیید شد. چنان‌که در تحقیق‌های مشابه این سیستم، بیان یالا و خلوص قابل توجهی از سوی نویسنده به اثبات رسیده است. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ به چاپ رسیده این سیستم برای بیان پروتئین NS1 همین سویه از ویروس از وکتور pQE30 در سلول BL21 (DE3) استفاده شده است. میزان بیان پروتئین در مقایسه با سیستم مورد استفاده در این مقاله کارایی کمتری داشت و میزان بیان پروتئین نسبت به حجم کشت باکتری مورد مطالعه کم‌تر به‌دست آمد.(۱۱)

به تازگی توجه دانشمندان و فارماکولوژیست‌ها نیز روی پروتئین M2 معطوف شده است، چرا که در بین همه ویروس‌های آنفلوانزای A حفاظت شده بوده و همچنین ایمونوژن است، بنابراین یکی از اهداف مناسب برای تولید واکسن آنفلوانزا با ایمنی وسیع الطیف است.(۱۲) در این تحقیق به‌دنبال پروتئینی مناسب به این منظور از ژن ویروس گزارش شده از اپیدمی آنفلوانزا در ایران استفاده شد که بعد از کلون آن در وکتور مناسب و دستیابی به پروتئین خالص در مرحله بعد با طراحی کمپلکسی مناسب ایمونوژنیسیتی آن در موش بررسی شود.

قدردانی و تشکر:

این تحقیق در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است. تأمین بودجه آن مشترک بین این مرکز و مرکز ژنومیک دانشگاه بوده است. به این وسیله از مسئولان محترم این مراکز تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از راهنمایی آقای مهندس ولایی در تدوین این مقاله تشکر می‌شود.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 18:27 +0430 on Tuesday August 20th 2019

منابع:

1.Tuller T and Zur H, Multiple roles of the coding sequence 5' end in gene expression regulation, 2015; Nuc Aci Res 43: 13-28.

2.Angov E, Codon usage: Nature's road map to expression and folding of proteins, 2011; Biotech J 6: 650-659.

3.Xia X, Amajor controversy in codon-anticodon adaptation resolved by a new codon usage index, 2015; Genetics 199: 573-579.

4.Sabi R and Tuller T, Modelling the efficiency of codon-tRNA interaction based on codon usage bias, 2014; DNA Res 21: 511-525.

5.Dana A and Tuller T, The effect of tRNA levels on decoding times of mRNA codons, 2014; Nuc Aci Res 42: 9171-9181.

6.Filettea M, Joua WM, Birkett b B, Lyons b K, Schultz b B, Tonkyro b A, 7.Resch b S, Fiersa W. Universal influenza A vaccine Optimization of M2-based constructs. 2005; Virol J 337: 149 – 161.

8.Mishra N, Emerging influenza A/H1N1: Challenges and development. The Health 2011; 2: 16-22.

9.Staneková Z, Varečková E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. Virol J 2010; 7: 351-357.

10.Wenbin L, Cady SD, Hu F, Hong M. Structure and Function of the Influenza A M2 Proton Channel. Biochem 2009; 48: 7356–7364.

11.Bandehpour M, Khodabandeh M, Mosaffa N, Sharifnia Z, Ghazanfari T, Kazemi B. An efficient procedure for purification of recombinant human β heat shock protein 90. DARU 2010; 18 (1): 64-68.

12. Sadeghi M, Bandehpour M, Yarian F, Yassaee V , Torbati E, Kazemi B. Cloning and Expression of Influenza H1N1 NS1 Protein in Escherichia Coli BL21, Iran J Biotech 2014 ; 12 (1): e12625

13. Betakova T. M2 Protein–A Proton Channel of Influenza A Virus. Curr Pharma Design 2007; 13)31 (: 3231-3235.