بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

رساله دکتری

رشته ژنتیک مولکولی

بیان گلیکوپروتئین غشایی (HA) ویروس آنفلوآنزا در *E. coli* نوترکیب

نگارش

بهرخ فرهمند

استادان راهنما

دکتر مهوش خدابنده

دکتر معصومه توسطی خیری

استادان مشاور

دکتر فریدون مهبودی

دکتر فاطمه فتوحی

خرداد ۱۳۹۰

"حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است"

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک
و زیست فناوری

مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه
علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تهران

رساله جهت دریافت دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی با عنوان

بیان گلیکوپروتئین غشایی (HA) ویروس آنفولانزا در E.coli نوترکیب

توسط: بهرخ فرهمند

تصویب وارزشیابی توسط کمیته داوران بادرجه **عالی**

استاد راهنما: سرکار خانم دکتر مهوش خدابنده

استاد راهنما: سرکار خانم دکتر معصومه توسطی خیری

استاد مشاور: جناب آقای دکتر فریدون مهبودی

استاد مشاور: سرکار خانم دکتر فاطمه فتوحی چاهوکی

داور خارجی: جناب آقای دکتر محمود شمسی شهرآبادی

داور خارجی: جناب آقای دکتر بهرام کاظمی

داور داخلی: جناب آقای دکتر مهدی شمس آراء

داور داخلی: جناب آقای دکتر علی اصغر کارخانه ای

نماینده تحصیلات تکمیلی پژوهشگاه: جناب آقای دکتر حسین شهبانی ظهیری

خرداد ماه ۱۳۹۰

تقدیم به

مادر، همسر و فرزند دلبندم فاطمه عزیز

تشکر و قدردانی از:

پرودگارمنان،

اساتید بزرگوارم،

سرکار خانم دکتر خدابنده، سرکار خانم دکتر خیری، جناب آقای دکتر مهبودی و سرکار خانم دکتر فتوحی که در انجام این پایان نامه از راهنماییهای ارزشمند شان بهره مند بوده ام.

کلیه مسئولین محترم پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک که در راه اندازی و پیشبرد این دوره زحمات بسیار متحمل شده اند.

مدیریت و اعضا محترم هیئت علمی گروه صنعت و محیط زیست، کلیه اساتید و کارکنان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک

مسئولین و کارکنان واحد آموزش پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک،

آقایان دکتر شهبانی ظهیری، دکتر آل یاسین و حسین دوستدار

سرکارخانم دکتر صابونی و خانمها صدفی و زنجانی

کلیه مسئولین محترم انستیتو پاستور ایران

همکاران محترم واحد آنفلوآنزا انستیتو پاستور ایران، خانمها طباطبائیان، صالح، دکتر مظاهری، کاظمی، یعقوبی، راغبی و آقایان دکتر جمالی و ترابی

همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتوپاستور ایران، خانم برخورداری و آقایان دکتر خلج و دکتر وزیری

چکیده

ویروس آنفلوآنزا که عامل مولد یکی از بیماریهای حاد تنفسی می باشد در غشا خود واجد گلیکوپروتئین مهمی به نام هماگلوتینین است. این مولکول ضمن اینکه اصلی ترین آنتی ژن برای القا پاسخ ایمنی بر علیه ویروس است، همواره به عنوان مدل ایده آلی برای مطالعه فرآیندهای بیولوژیکی مهم از جمله گلیکوزیلاسیون مورد استفاده قرار گرفته است. گلیکوزیلاسیون (به ویژه از نوع N) متداولترین تغییر ضمن یا پس از ترجمه ای پروتئینها در سلولهای یوکاریوتی است بطوریکه تقریبا ۷۰٪ داروها و واکسنهای پروتئینی از نوع N– گلیکوپروتئینها هستند. معمولا برای تولید فرم نوترکیب این پروتئینها از سیستمهای بیانی یوکاریوتی مختلف نظیرمخمرها، سلولهای پستانداران نظیر CHO و سلولهای حشرات مانند Sf9 استفاده می گردد که هر کدام دارای مزایا و معایب خاص خود می باشند. این سلولها با توجه به امکانات آنزیمی سیستم گلیکوزیلاسیون خود ساختارهای گلیکانی مختلفی را به مولکولهای پروتئینی می افزایند که بر عملکرد این مولکولها به ویژه آنتی ژنیسیته تاثیرگذار می باشند. بنابر این تولید گلیکوپروتئینها به فرم گلیکوزیله در باکتری اشریشیاکلی نوترکیب، که قابلیت مهندسی مسیر گلیکوزیلاسیون در آن وجود داشته باشد، از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به اینکه، اهمیت گلیکوپروتئین هماگلوتینین ویروس آنفلوآنزا (به ویژه زیر واحد بزرگ آن HA_1) به عنوان آنتی ژن کلیدی برای تولید واکسن آنفلوآنزا به اثبات رسیده است، لذا در این تحقیق زیر واحد بزرگ وآنتی ژنیک مولکول هماگلوتینین(HA_1) دراین اشریشیاکلی نوترکیب بیان گردید. برای این منظور ابتدا قطعه ژنی کد کننده زیر واحد بزرگ پروتئین هماگلوتینین به کمک روش Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction از ویروس استاندارد با تیتر مناسب جداسازی وتکثیر گردید و پس از تعیین ترادف در وکتور بیانی pET22b با پپتید هدایتگر PelB کلون شد. پس ازتایید بیان پروتئین به وسیله SDS-PAGE و Western Blotting در لیزات سلولی و فضای پری پلاسمی، واکنش پذیری آن با آنتی سرم استاندارد ویروسی سنجیده و با آنتی ژن ویروسی استاندارد، مقایسه گردید. سپس با استفاده از سازه حامل سیستم گلیکوزیلاسیون باکتری کامپیلوباکتر ژژونی، باکتری اشریشیاکلی نوترکیب تهیه و پروتئین HA_1 ویروس آنفلوآنزا در آن بیان گردید. پروتئین بیان شده در هر دو باکتری از نظر گلیکوزیلاسیون مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از روش لکتین بلاتینگ و مهار آن، گلیکوزیلاسیون HA_1 درباکتری نوترکیب تایید شد.

کلید واژه ها: ویروس آنفلوآنزا، اشریشیاکلی نوترکیب، هماگلوتینین، N–گلیکوزیلاسیون

فهرست مطالب

	عنوان	صفحه
فصل اول	**مقدمه**	
۱-۱	ویروسهای آنفلوآنزا	۱
۱-۱-۱	ساختمان و ترکیب ویروس آنفلوآنزا	۱
۱-۱-۲	سازمان ژنومی و پروتئینهای ویروس آنفلوآنزا	۲
۱-۲	گلیکوزیلاسیون	۵
۱-۲-۱	N- گلیکوزیلاسیون	۷
۱-۲-۲	N- گلیکوزیلاسیون در پروکاریوتها	۸
۱-۲-۳	مکانیزم N-گلیکوزیلاسیون پروکاریوتی در *C. jejuni*	۱۱
۱-۲-٤	مقایسه N- گلیکوزیلاسیون پروکاریوتها با یوکاریوتها	۱۳
۱-۲-۵	نوترکیبی اشریشیا کلی با ماشین N-گلیکوزیلاسیون *C. jejuni*	۱٤
۱-۳	هماگلوتینین	۱۷
۱-۳-۱	ساختار هماگلوتینین طبیعی	۱۸
۱-۳-۲	ساختمان سه بعدی هماگلوتینین	۱۹
۱-۳-۳	بخش کربوهیدراتی (گلیکانی) هماگلوتینین	۲۱
۱-٤	اثر گلیکانها بر هماگلوتینین	۲۲
۱-٤-۱	اثرگلیکانها بر فعالیت آنتی ژن - آنتی بادی هماگلوتینین	۲۲
۱-٤-۲	اثر گلیکانها بر تاخوردگی مولکول هماگلوتینین	۲۲
۱-٤-۳	اثر گلیکانها بر فیوژن غشایی	۲٤
۱-٤-٤	اثرگلیکانها در اتصال به گیرنده سلولی	۲٤
۱-۵	زیر واحد بزرگ یا آنتی ژنیک هماگلوتینین(HA_1)	۲٤
۱-۵-۱	نقشهای الیگوساکاریدهای واقع در HA_1	۲٦
۱-٦	هماگلوتینین نوترکیب	۲٦
۱-۷	سلولهای یوکاریوتی که برای تولید هماگلوتینین بکار برده شده اند	۲۷
۱-۸	مشکلات تولید (گلیکو) پروتئین های نوترکیب در سلولهای یوکاریوتی	۲۹
۱-۹	اهداف تحقیق	۳۱
فصل دوم	**بررسی منابع**	
	بررسی منابع	۳۲

فصل سوم **مواد و روشها**

۳-۱	ویروس مورد استفاده در این مطالعه	۳۵
۳-۲	کشت سلول و تکثیر ویروس	۳۵
۳-۳	تلقیح ویروس به سلولهای MDCK	۳۷
۳-٤	تعیین عیار ویروس به روش هماگلوتیناسیون(HA)	۳۸
۳-٥	جداسازی و تکثیر ژن هماگلوتینین	٤۱
۳-٥-۱	پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده دراین مطالعه	٤۱
۳-٥-۲	استخراج RNA	٤۱
۳-٥-۳	RT-PCR ژن HA_1 ویروس آنفلوآنزا A/H1N1	٤۲
۳-٥-۳-۱	سنتز cDNA	٤۲
۳-٥-۳-۲	تکثیر cDNA ژن HA_1	٤۳
۳-٦	بررسی محصولات PCR به وسیله الکتروفورز با ژل آگارز	٤٤
۳-۷	کلون سازی ژن HA_1 در ناقل pGEM-TEasy	٤٥
۳-۷-۱	مراحل کلون سازی	٤٦
۳-۷-۱-۱	اتصال ژن HA_1 به پلاسمید pGEM-TEasy	٤٦
۳-۷-۱-۲	انتقال سازه pGEM-T- HA_1	٤۷
۳-۷-۲	تایید کلون سازی	٤۸
۳-۷-۲-۱	تایید کلون سازی ژن به روش PCR	٤۸
۳-۷-۲-۲	تایید از طریق برش با آنزیمهای محدودگر اختصاصی	٤۹
۳-۷-۳	کلون سازی در ناقل بیانی pET22b و تاییدآن	٤۹
۳-۷-۳-۱	برش آنزیمی سازه pGEM-T-HA_1	٥۱
۳-۷-۳-۲	برش آنزیمی وکتور pET22b(+) به منظور خطی کردن	٥۱
۳-۷-۳-۳	ساخت سازه pET- HA_1 از طریق واکنش اتصال	٥۲
۳-۷-۳-٤	تایید کلون سازی pET-HA_1 به روش PCR	٥۲
۳-۷-۳-٥	تایید سازه pET-HA_1 به روش PCR	٥۳
۳-۷-۳-٦	آنالیز آنزیمی سازه pET-HA_1	٥۳
۳-۷-۳-۷	تایید توالی ژن HA_1 سازه pET-HA_1 از طریق تعیین ترادف	٥۳
۳-۸	بیان pET- HA_1 در *E. coli*	٥٤
۳-۸-۱	ترا نسفورماسیون سویه بیانی با سازه pET- HA_1	٥٤
۳-۸-۲	القا بیان	٥٤
۳-۸-۳	بررسی بیان با SDS-PAGE	٥٤

۳-۸-٤	تایید بیان به روش ایمونوبلاینگ	٥٥
۳-۸-٥	بررسی بیان در کلنی های مختلف	٥٥
۳-۸-٦	بررسی اثر غلظتهای مختلف القا کننده IPTG بر روند بیان	٥٦
۳-۹	بررسی بیان پری پلاسمی	٥٦
۳-۹-۱	استخراج عصاره پری پلاسمی	٥٦
۳-۹-۲	خالص سازی پروتئین HA_1 پری پلاسمی از ژل پلی آکریل آمید به روش الکتروالوشن	٥٧
۳-۹-۲-۱	رنگ آمیزی معکوس	٥٨
۳-۹-۲-۲	الکتروالوشن	٥٩
۳-۱۰	تست RID یا نفوذ شعاعی در ژل آگارز	٥٩
۳-۱۰-۱	نفوذ شعاعی دو بعدی DRID	٦٢
۳-۱۰-۲	نفوذ شعاعی یک بعدیSRID	٦٢
۳-۱۱	بیان هماگلوتینین (HA_1) در اشریشیا کلی نوترکیب	٦٣
۳-۱۱-۱	خصوصیات سازه pACYC*pgl*	٦٣
۳-۱۱-۲	ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* سویه 'Top10F با پلاسمید pACYC*pgl*	٦٤
۳-۱۱-۳	استخراج سازه pACYC*pgl*	٦٤
۳-۱۱-٤	بررسی سازه با PCR ژن آنزیم pglB	٦٥
۳-۱۱-٥	ترانسفورماسیون BL21(DE3) با دو سازه pACYC*pgl* و pET22-HA_1	٦٦
۳-۱۱-٦	بیان pET-HA_1 در اشریشیاکلی نوترکیب	٦٦
۳-۱۲	بررسی گلیکوزیلاسیون HA_1	٦٧
۳-۱۲-۱	لکتین بلاتینگ	٦٧
۳-۱۲-۲	مهار لکتین بلاتینگ	٦٨
۳-۱۳	مهار هماگلوتیناسیونHI	٦٨
۳-۱٤	نرم افزارها	٧٣
فصل چهارم	**نتایج**	
٤-۱	تعیین تیتر ویروس به روش هماگلوتیناسیون(HA)	٧٤
٤-۲	ساخت سازه بیان کننده زیر واحد بزرگ هماگلوتینین ویروس آنفلوآنزای انسانی (rHA_1)	٧٥
٤-۲-۱	جداسازی و تکثیر ژن زیر واحد بزرگ هماگلوتینین (HA_1)	٧٥
٤-۲-۲	کلون سازی cDNA توالی کد کننده (HA_1) دروکتورکلونینگ pGEM-TEasy	٧٧
٤-۲-۲-۱	تایید کلون سازی با استفاده ازPCR	٧٨
٤-۲-۲-۲	آنالیز سازه با برش آنزیمی	٧٩
٤-۲-۳	کلون سازی ژن HA_1 در وکتور بیانی pET22b	٨٠

٤-٢-٣-١	تایید کلون سازی با استفاده از PCR	٨١
٤-٢-٣-٢	آنالیز از طریق برش آنزیمی پلاسمید تایید شده با PCR	٨٢
٤-٢-٣-٣	تعیین ترادف ژن HA_1 در سازه pET-HA_1	٨٣
٤-٣	بیان HA_1 نوترکیب در *E. coli*	٨٤
٤-٣-١	تایید بیان باند پروتئینی مشاهده شده با وسترن بلاتینگ	٨٥
٤-٣-٢	بهینه سازی غلظت مناسب القا کننده	٨٦
٤-٣-٣	بیان rHA_1 در فضای پری پلاسمی	٨٧
٤-٣-٤	تغلیظ عصاره پری پلاسمی	٨٨
٤-٣-٥	بررسی واکنش ایمنی rHA_1 عصاره پری پلاسمی با آنتی سرم استاندارد ضد ویروسی و مقایسه آن با آنتی ژن استاندارد به روش ایمنودیفیوژن شعاعی	٨٩
٤-٣-٦	خالص سازی rHA_1 از عصاره پری پلاسمی تغلیظ شده به روش الکتروالوشن	٩١
٤-٤	بیان rHA_1 در *E. coli* نوترکیب شده با سیستم گلیکوزیلاسیون *C. jejuni*	٩٢
٤-٤-١	تکثیر و خالص سازی سازه حامل ژنهای سیستم گلیکوزیلاسیون *C. jejuni*	٩٢
٤-٤-٢	ترانسفورماسیون سلول *E. coli* با سازه pACYC*pgl* و pET-8-*HA*$_1$	٩٣
٤-٤-٣	بررسی و تایید بیان HA_1 در *E. coli* نوترکیب	٩٤
٤-٤-٤	بررسی وضعیت بیانی کلونی های مختلف انتخابی	٩٥
٤-٤-٥	بررسی اثر غلظت های مختلف القا کننده بر بیان پروتئین rHA_1 در *E. coli* نوترکیب	٩٦
٤-٤-٦	بیان پری پلاسمی HA_1 در *E. coli* نوترکیب	٩٧
٤-٤-٧	آنالیز گلیکوزیلاسیون پروتئینهای HA_1 پری پلاسمی	٩٨
٤-٤-٧-١	وسترن بلاتینگ	٩٨
٤-٤-٧-٢	لکتین بلاتینگ و مهار لکتین بلاتینگ	١٠٠
٤-٤-٨	خالص سازی HA_1 از عصاره پری پلاسمی	١٠١
٤-٤-٩	مقایسه واکنش ایمنی فرم گلیکوزیله و غیرگلیکوزیله HA_1 نوترکیب با آنتی سرم استاندارد ویروسی در آزمون مهار هماگلوتیناسیون (HI)	١٠١
فصل پنجم	**بحث و نتیجه گیری**	
٥-١	بحث	١٠٤
٥-٢	نتیجه گیری	١١٥
	پیشنهادها	١١٦
	منابع و مآخذ	١١٧
	ضمائم	
	چکیده انگلیسی	

فهرست جدول ها

۱-۱	مقایسه ماشین N- گلیکوزیلاسیون یوکاریوتی (*yeast*) و پروکاریوتی (*C. jejuni*)	۱۳
۱-۳	تعداد RBC های موجود در خون با درصد های مختلف	٤۱
۳-۲	مشخصات مواد استفاده شده در PCR	٤۳
۳-۳	مشخصات برنامه چرخه دمایی استفاده شده در PCR	٤۳
٤-۳	مشخصات واکنش برش آنزیمی سازه pGEM-T-HA_1	٥۱
٥-۳	مشخصات واکنش برش آنزیمی وکتور pET22b	٥۱

فهرست شکل ها

۱-۱	نمایی شماتیک از ویروس آنفلوآنزا و اجزای آن	۲
۱-۲	همطرازی نواحی غیرکد کننده قطعات ژنی ویروس آنفلوآنزای A	۳
۱-۳	بیوسنتز انواع گلیکوزیلاسیون در سلولهای یوکاریوتی	٦
۱-٤	محل اتصال قندها به توالی حفاظت شده N -گلیکوزیلاسیون سلولهای یوکاریوتی	٦
۱-٥	مسیر N- گلیکوزیلاسیون یوکاریوتی در ساکارومایسس سرویزیه	۷
۱-٦	ترکیب زیرواحدی کمپلکس الیگوساکاریل ترانسفراز مخمر ساکارومایسس سرویزیه	۸
۱-۷	بیوسنتزگلیکوپروتئینهای با اتصال N و O –گلیکانهادر سلولهای باکتریایی	۹
۱-۸	ترتیب قرار گرفتن اجزا درمجموعه ژنی *pgl* باکتری *C. jejuni*	۱۰
۱-۹	ساختار هپتاساکارید گلیکوپروتئینها در باکتری کامپیلو باکتر ژژنی	۱۱
۱-۱۰	مراحل بیوسنتز N- گلیکان و انتقال آن بر روی آسپا رژین موجود در توالی N – گلیکوزیلاسیون	۱۲
۱-۱۱	مقایسه الیگوساکاریل ترانسفرازهای یوکاریوتی و پروکاریوتی	۱۳
۱-۱۲	توپولوژی غشایی pglB فیوژن شده به پروتئین phoA در باکتری نوترکیب *E.coli*	۱٥
۱-۱۳	مقایسه توالی و متیف (D/EXNYS/T) در HA_1 سه سویه آنفلوآنزای نوع A/H1N1	۱٦
۱-۱٤	نقش هماگلوتینین در مراحل تکثیرو رهایش ویروس در سلول میزبان	۱۷
۱-۱٥	ساختار سه واحدی هماگلوتینین و نقش آن در فیوژن غشایی	۱۸
۱-۱٦	بخشهای مختلف مونومر هماگلوتینین	۱۸
۱-۱۷	هموتریمر هماگلوتینین	۱۹
۱-۱۸	شمایی از بخش های مختلف مونومر هماگلوتینین	۲۰
۱-۱۹	گلیکانها و تعامل آنها با چپرونها در راستای تاخوردگی مولکول هماگلوتینین	۲۳
۱-۲۰	نمایی شماتیک از حضور گلیکانها درناحیه سر مولکول هماگلوتینین واطراف جایگاه اتصال به گیرنده سلولی	۲٤

۱-۲۱	ساختمان مونومر همآگلوتینین و محل وقوع مکانهای اتصال آنتی ژن - آنتی بادی در زیر واحد HA_1	۲۵
۱-۲۲	تکامل و آرایش N- گلیکانها در دستگاه گلژی در بین ارگانیزمها و سلولهای مختلف	۲۸
۳-۱	نمایی شماتیک از مراحل تست همآگلوتیناسیون	۳۸
۳-۲	نقشه و توالی نوکلئوتیدی اطراف محل کلون قطعه ژن در وکتور کلونینگ pGEM-Teasy	٤٦
۳-۳	ساختار و توالی نوکلئوتیدی نواحی مهم وکتور بیانی pET22b	۵۰
۳-٤	الگوهای ممکن برای واکنش آنتی ژن و آنتی بادی در تست های DRID	٦۰
۳-۵	نقشه ژنتیکی pACYC184 و محل اتصال مجموعه ژنی *pgl* باکتری *C. jejuni*	٦۳
۳-٦	نمایی شماتیک از آزمون مهار همآگلوتیناسیون	٦۹
٤-۱	تعیین عیار ویروس کشت داده شده بر روی لایه سلولی MDCK	۷٤
٤-۲	الکتروفورز محصول تکثیر شده cDNA ژن HA_1 در آگارز ۱٪	۷٦
٤-۳	الکتروفورز جهت مقایسه الگوی برش نخورده محصول مینی پرپ چند نمونه کلنی سفید و آبی	۷۷
٤-٤	الکتروفورز محصول واکنش PCR بر روی دو نمونه از کلنی های سفید و یک نمونه کلنی آبی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن HA_1	۷۸
٤-۵	الکتروفورز برش آنزیمی سازه pG-T5- HA_1 در آگارز ۱٪	۷۹
٤-٦	الکتروفورز پلاسمیدهای(pET22b -HA_1) برش نخورده حاصل از(Quick (mini prep check چند نمونه ازکلنی ها در کنار pET22b	۸۰
٤-۷	الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی بر روی دو نمونه از پلاسمیدهای نسبتا تخلیص شده pET-8-HA_1 و pET- 9-HA_1	۸۱
٤-۸	الکتروفورز حاصل ازآنالیز آنزیمی پلاسمید(pET-8-HA_1)	۸۲
٤-۹	بخشی از توالی ژن HA_1 که درآن محل توالی نوکلئویدی متیف مورد نظر (۲۹۱-۲۷۸) وجود دارد	۸۳
٤-۱۰	SDS-PAGE رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو حاصل از بیان pET-8-HA_1	۸٤
٤-۱۱	نتایج وسترن بلاتینگ پروتئین HA_1 حاصل از بیان پلاسمید pET-8-HA_1	۸۵
٤-۱۲	نمودار مقایسه پیمایش تراکم روند بیان پروتئین نوترکیب rHA_1 در غلظتهای مختلف القا کننده IPTG در ساعات مختلف	۸٦
٤-۱۳	SDS-PAGE رنگ آمیزی شده با کوماسی برای نمونه های جمع آوری شده بعد ازالقا بیان HA_1 نوترکیب با دو غلظت مختلف از IPTG	۸۷
٤-۱٤	SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ نمونه پری پلاسمی با آنتی بادی مونوکلونال ویژه همآگلوتینین ویروس مورد نظر	۸۸
٤-۱۵	وسترن بلاتینگ نمونه های rHA_1 عصاره پری پلاسمی قبل و بعد از تغلیظ درکنار نمونه rHA_1	۸۹

لیزات سلولی
٤-١٦ نتایج حاصل از بررسی واکنش ایمنی rHA_1 پری پلاسمی با آنتی سرم استاندارد ویروسی و مقایسه آن با آنتی ژن استاندارد ٩٠
٤-١٧ SDS-PAGE عصاره پری پلاسمی باکتری *E. coli* بیان کننده rHA_1 تغلیظ شده قبل و بعد از خالص سازی به همراه وسترن بلاتینگ نمونه خالص سازی شده ٩١
٤-١٨ نتایج الکتروفورز آگارز ٠/٧ درصد محصول مینی پرپ (pACYC(pgl و تایید آن از طریق PCR برای ژن *pgl*B ٩٢
٤ - ١٩ نتایج الکتروفورز آگارز یک درصد محصول مینی پرپ باکتریهای BL21 ترانسفورم شده با سازه های (pACYC(pgl و $pET\text{-}8\text{-}HA_1$ بطور جداگانه و همزمان ٩٣
٤-٢٠ SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ پروتئین نوترکیب rHA_1 بیانی در *E. coli* نوترکیب ٩٤
٤-٢١ نمودار نتایج پیمایش تراکم بیان پروتئین rHA_1 در ساعات مختلف بعد از القا برای ٦ نمونه ٩٥
٤-٢٢ مقایسه نمودار پیمایش تراکم در ساعات مختلف و برای نمونه های القا شده با غلظت های مختلف IPTG ٩٦
٤-٢٣ SDS-PAGE رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو استخراج عصاره پری پلاسمی سلول باکتری نوترکیب بیان کننده HA_1 ٩٧
٤-٢٤ آنالیز پروتئینهای پری پلاسمی باکتری *E. coli* BL21 (DE3) بیان کننده HA_1 در حضور یا عدم حضور لوکوس ژنی گلیکوزیله کننده باکتری *C. jejuni* ٩٩
٤-٢٥ آنالیز گلیکوزیلاسیون HA_1 پری پلاسمی در حضور و عدم حضور لوکوس ژنی pgl باکتری *C. jejuni* ١٠٠
٤-٢٦ نتایج SDS-PAGE و لکتین بلاتینگ پروتئین HA_1 نوترکیب بیانی گلیکوزیله خالص سازی شده از عصاره پری پلاسمی ١٠١
٤-٢٧ نتیجه تعیین تیترآنتی بادی استاندارد با استفاده از ویروس باتیتر ٤ واحد HA به روش مهار هماگلوتیناسیون ١٠٢
٤-٢٨ مهار هماگلوتیناسیون ویروس آنفلوآنزا با آنتی سرم استاندارد و آنتی سرم استانداردی که از قبل با زیر واحدهای بزرگ هماگلوتینین نوترکیب گلیکوزیله ($g\text{-}rHA_1$) و غیر گلیکوزیله ($nong\text{-}rHA_1$) مجاور شده اند ١٠٢

فهرست فرمول ها

٣-١ محاسبه نسبت محصول PCR برای واکنش اتصال به وکتور ٤٧

فصل اول

مقدمه

۱-۱- ویروسهای آنفلوآنزا

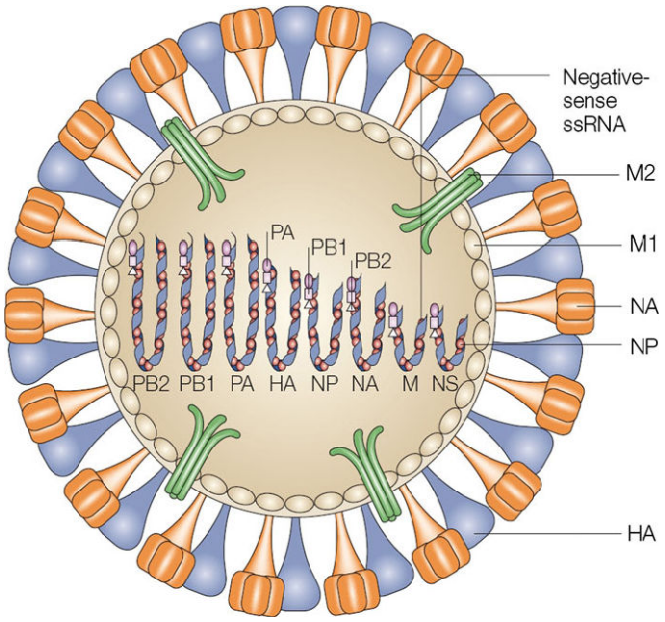
ویروس های آنفلوآنزا از اعضای خانواده ارتو میکسوویریده[1] هستند. ارتومیکسوویریده مشتق ازکلمه یونانی ارتوس[2] به معنی استاندارد، صحیح و معتبر و میکسا[3] به معنی موکوس می باشد. اصطلاح میکسو ویروس به علت وابستگی این ویروسها به مخاط به کار برده می شود (Wright . et al., 2007). این ویروسها بر اساس اختلاف آنتی ژنیک میان پروتئینهای NP[4] (نوکلئوپروتئین) و M [5] (پروتئین ماتریکس) به سه گروه آنفلوآنزای A ، B و C تقسیم می شوند (Wright . et al., 2007, Fauquet, 2005).

۱-۱-۱- ساختمان و ترکیب ویروس آنفلوآنزا

ذرات ویروس آنفلوآنزا معمولا کروی، غشا دار و پلئومورفیک[6] بوده و حدود ۱۲۰-۸۰ نانومتر قطر دارند. از لحاظ ترکیب، این ویروس دارای یک درصد اسید ریبونوکلئیک[7] RNA (قطعه قطعه و با قطبیت منفی)، ۷۰ درصد پروتئین، ۲۰ درصد چربی و ۸-۵ درصد کربوهیدرات می باشد. غشا لیپیدی ویروسهای آنفلوآنزا نیز از غشا پلاسمایی سلول میزبان مشتق می شود (Nayak et al., 2009). روی سطح غشا ویروس آنفلوآنزا در حدود ۵۰۰ خوشه وجود دارد که به صورت برجستگی هایی به طول ۱٤-۱۰ نانومتر، سطح ویروس را می پوشانند (شکل۱-۱). این خوشه ها دو نوع هستند (خوشه های میله ای شکل هماگلوتینین[8](HA) و خوشه های قارچی شکل نورامینیداز [9](NA)) که از لحاظ آنتی ژنی اهمیت زیادی دارند به طوری که تغییرات آنتی ژنی ویروسهای آنفلوآنزا به وجود آنها بستگی دارد.
نسبت هماگلوتینین به نورامینیداز متنوع بوده و معمولا ٤ به ۱ یا ۵ به ۱ است و هماگلوتینین حدود ۲۵ درصد کل پروتئینهای ویروس را تشکیل می دهد(Skehel and wiley, 2002).

---

[1] Orthomyxoviridae
[2] Orthos
[3] Myxa
[4] Nucleoprotein
[5] Matrix Protein
[6] poleomorphic
[7] Ribonucleic Acid
[8] Hemagglutinin
[9] Nuraminidase

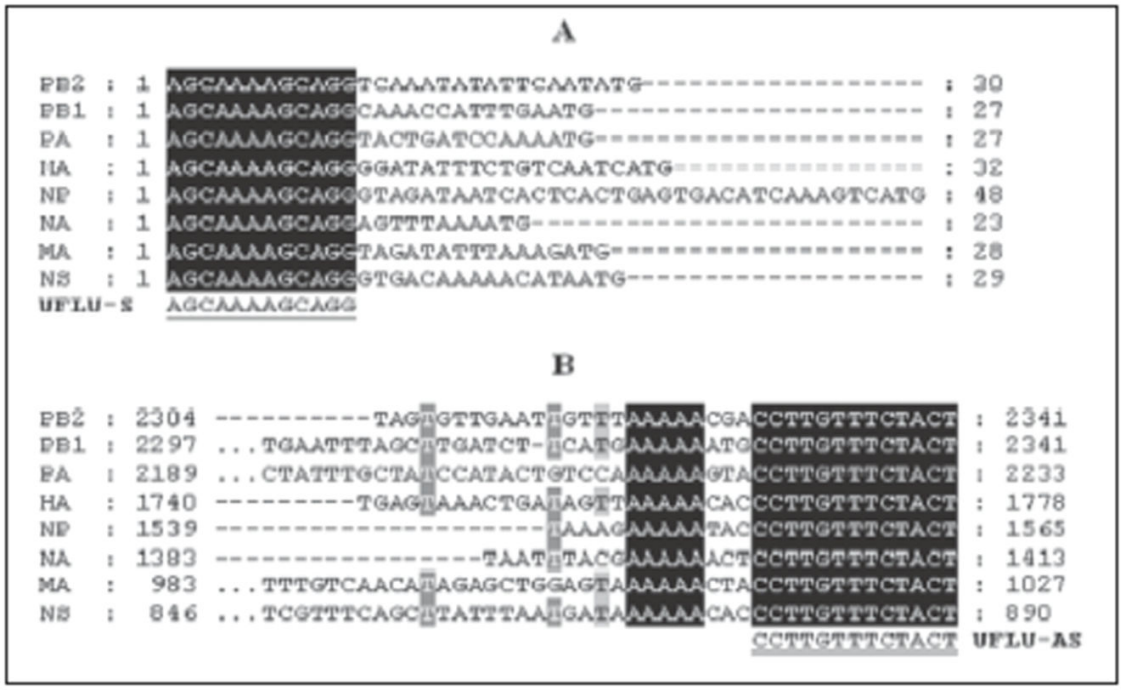


شکل۱-۱: نمایی شماتیک از ویروس آنفلوآنزا و اجزای آن (Ebrahimi and Tebianian, 2010)

۱-۱-۲- سازمان ژنومی و پروتئینهای ویروس آنفلوآنزا

ژنوم ویروس آنفلوآنزا (نوع A وB) از ۸ قطعه تشکیل یافته است(شکل۱-۱). این قطعات ژنی واجد نواحی غیر کد کننده در دو انتها می باشند. ناحیه غیر کد کننده انتهای '۵ به طول ۵۸-۲۰ نوکلئوتید بوده در حالیکه ناحیه ´۳ کوتاهتر و واجد ۴۵-۱۹ نوکلئوتید می باشد. نواحی غیر کد کننده قطعات ژنی شامل بخش های بسیار حفاظت شده ای به طول ۱۲ نوکلئوتید در انتهای '۵ و۱۳ نوکلئوتید در انتهای '۳ می باشند که در طراحی پرایمرهای عمومی[10] برای سنتز cDNA و جداسازی ژنهای ویروسی مورد استفاده قرار می گیرند (شکل۱-۲) (Hoffmann et al., 2001, Sguazza et al., 2009).

[10] Universal



شکل۱-۲: همطرازی نواحی غیرکد کننده قطعات ژنی ویروس آنفلوآنزای A.. **A**: ۱۲نوکلئوتید حفاظت شده انتهای '۵.
B: ۱۳ نوکلئوتید حفاظت شده در انتهای ´۳ (Sguazza et al., 2009).

هشت قطعه ژنوم آنفلوآنزا بر اساس اندازه نامگذاری شده و مجموعا ۱۰ پروتئین ویروس را رمزگذاری می کنند. قطعات ۱ تا ۳ به ترتیب پروتئینهای PB_2، PA و PB_1 را که آنزیمهای پلیمراز ویروسی هستند سنتز می کنند. قطعه چهارم مسئول سنتز گلیکوپروتئین غشایی هماگلوتینین (HA) می باشد. دیگر گلیکوپروتئین ویروسی که نورامینیداز (NA) نامیده می شود، در آزادسازی ویروسهای پروژنی نقش دارد و توسط قطعه ششم ساخته می شود. قطعه پنجم نوکلئوپروتئین ویروسی (NP) را کد دهی می کند. پروتئین حاصله وپلیمرازها با مولکولهای RNA تشکیل RNP می دهند. پروتئینهای ماتریکس (M1 و M2) توسط قطعه هفتم ساخته می شوند. دو پروتئین غیر ساختاری (NS1 و NS2)که به میزان زیاد در سلولهای آلوده به ویروس بیان می شوند ولی در ویریونها یافت نمی شوند، توسط قطعه هشتم رمزگذاری می شوند(Flint et al., 2004, Fields and Knipe, 2001).

هماگلوتینین که بخش عمده پروتئینهای غشا ویروسی را تشکیل می دهد بسیار مورد توجه محققین علوم بیولوژی قرار دارد. هماگلوتینین باعث القا ایمنی برعلیه ویروس می گردد و نخستین هدف برای آنتی بادی های خنثی کننده است. بنابر این اصلی ترین ترکیب ویروسی در ارتباط با طراحی وتوسعه واکسنها و بهترین هدف برای سنجشهای سرولوژیک به شمار می رود (Hidayatullah, 2009). این مولکول ویروس آنفلوانزا تاکنون به عنوان مدل مناسبی برای مطالعات فیزیکوشیمیایی در فرآیندهای بیولوژیکی مهم نظیر فیوژن غشایی، تاخوردگی مولکولهای پروتئینی در مسیر ترشحی،... و به ویژه مطالعات **گلیکوزیلاسیون** مولکولهای پروتئینی مورد استفاده قرار گرفته است (Imai et al., 2006, Schulze, 1997, Ramalho-Santos et al., 1998, Scheiffele et al., 1997, Shriver et al., 2009, Braakman et al., 1991, Klenk et al., 2002, Tatu et al., 1995).

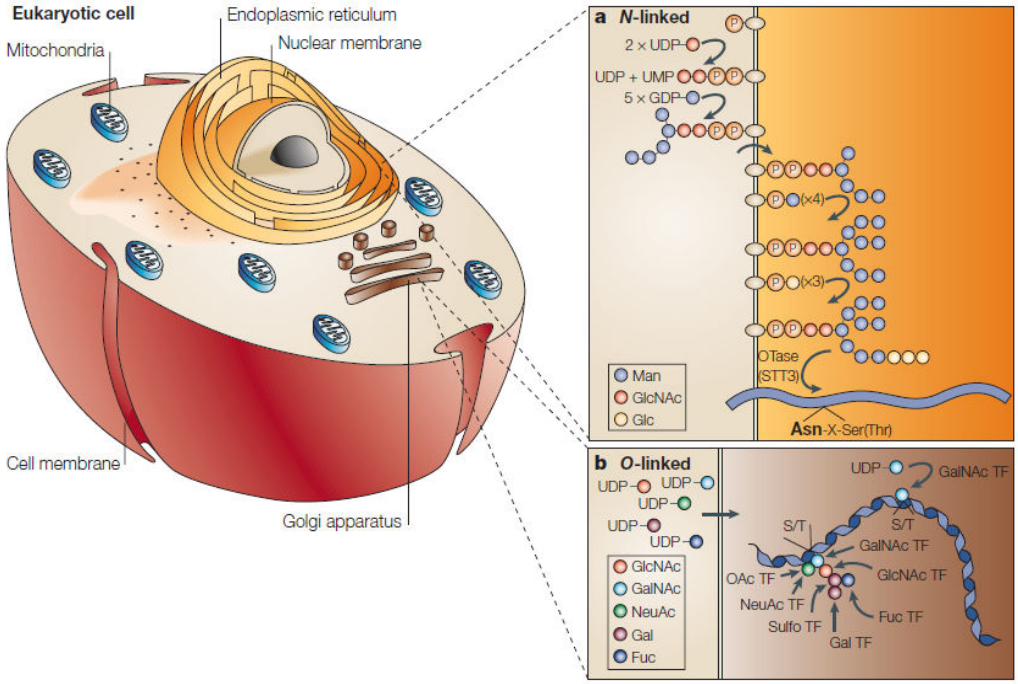
۱-۲- گلیکوزیلاسیون

فرآیندگلیکوزیلاسیون از مهمترین تغییرات ضمن و یا بعد از ترجمه ای [11]پروتئینهاست که نتیجه آن ورود بخش کربوهیدراتی (یا الیگوساکاریدی) به ساختار مولکول پروتئین است. این زنجیره های الیگوساکاریدی از طریق پیوند کووالانسی به اسکلت پلی پپتیدی خود متصل شده و ضمن ایجاد تغییراتی در ساختار مولکول برخواص فیزیکوشیمیایی، فعالیت آنزیمی، آنتی ژنیسیته، پایداری مولکول وغیره تاثیر می گذارند. تقریبا" تمام پروتئین های سرم انسان به استثنای آلبومین، بسیاری از پروتئین های غشایی، تعدادی از ترکیبات گروه های خونی و برخی از هورمون ها جزء گلیکو پروتئین ها هستند. گلیکو پروتئین ها در انسان، باکتری، و سایر موجودات زنده شناسایی شده اند و تاکنون مطالعات و تحقیقات زیادی روی آن ها انجام گرفته است (Langdon et al., 2009). در یوکاریوتها ساختارهای گلیکانی عمدتا از دو طریق زیر به مولکول پروتئین متصل می گردند (Szymanski and Wren, 2005, Weerapana and Imperiali, 2006) (شکل ۱-۳) .

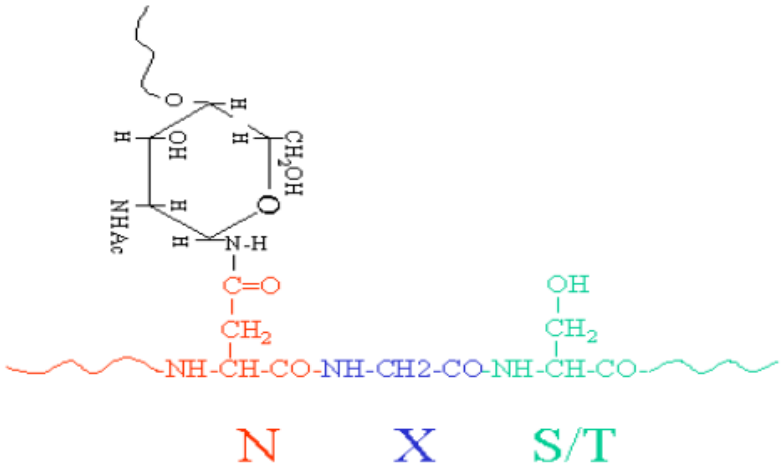
۱) N- گلیکوزیلاسیون: فرآیندی است که از این طریق ساختارهای قندی با اتصال به اسید آمینه آسپارژین (N) در توالی حفاظت شده N X S/T (X می تواند هر اسید آمینه ای به غیر از پرولین باشد) به مولکول پروتئینی اضافه می گردند (شکل ۱-٤).

۲) O- گلیکوزیلاسیون: فرآیندی است که از این طریق ساختارهای قندی با اتصال به اسید آمینه های سرین یا ترئونین به مولکول پروتئین افزوده می شوند. برای O-گلیکوزیلاسیون توالی حفاظت شده خاصی وجود ندارد و عموما جایگاه گلیکوزیلاسیون به وسیله ساختار ثانویه مولکول تعیین می شود.

[11] Co- or post-translational modification



شکل۱-۳: بیوسنتز انواع گلیکوزیلاسیون در سلولهای یوکاریوتی(Szymanski and Wren, 2005)



شکل۱-٤: محل اتصال قندها به توالی حفاظت شده N - گلیکوزیلاسیون سلولهای یوکاریوتی(پیوند N-گلیکوزیدی)