تخلیص پروتیین نوترکیب هماگلوتینین (HA1) ویروس آنفلوانزا سویه A(H1N1) و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آن

فاطمه خسروی نوده[1و2]
فریدا بهزادیان[1]، وحیده مظاهری[2]
حدیثه شکوهی[2]، مریم صالح[2]
بهرخ فرهمند[2*]

۱- پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
۲- بخش آنفلوانزا و سایر ویروس‌های تنفسی، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش آنفلوانزا و سایر ویروس‌های تنفسی.
تلفن: ۶۴۱۱۲۱۸۳ -۰۲۱
E-mail: b_farahmand@pasteur.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۰ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۸/۳۰

زمینه و هدف: سال‌های اخیر ویروس آنفلوانزا نوع A (H1N1) باعث عفونت‌های متوسط تا شدید با میزان پراکندگی وسیع در سرتاسر دنیا شده است. بنابراین تشخیص افتراقی، سریع و ارزان قیمت بر پایه شناسایی آنتی‌ژن‌ها دارای اهمیت است. همچنین تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های آنفلوانزا برای موفقیت در تحقیقات پایه و پشرفته ضروری است. هماگلوتینین مهمترین گلیکوپروتیین سطحی ویروس آنفلوانزا است که به دو زیرواحد هماگلوتینین ۱ و هماگلوتینین ۲ شکسته می‌شود. از آن‌جایی که بیشتر مناطق آنتی‌ژنی در ناحیه هماگلوتینین ۱ قرار دارند، بهره‌گیری از این دومین به‌عنوان آنتی‌ژن، جهت تولید آنتی‌بادی در این پژوهش مورد مطالعه قرارگرفت.

روش بررسی: پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ در پژوهشی تجربی با همکاری بخش آنفلوانزا انستیتو پاستور ایران در نیمه دوم سال ۱۳۹۳ بیان و تخلیص شد. در ادامه آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی علیه آن در تابستان ۱۳۹٤ تولید شد. پروتیین هماگلوتینین ۱ آنفلوانزا (A/PR/8/34) در وکتور pET28aHA1 در میزبان پروکاریتی ایشرشیاکلی BL21 در مقیاس زیاد بیان شد. با تغییر پارامترهایی مانند غلظت IPTG، زمان القاء و دمای بیان، بهینه‌سازی بیان صورت گرفت. سپس پروتیین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل تخلیص شد.

یافته‌ها: تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه این پروتیین نوترکیب پس از تزریق آنتی‌ژن به‌همراه ادجوانت فروند بر اساس پروتکلی مشخص، در خرگوش انجام گرفت. همچنین کارایی سرم حاوی این آنتی‌بادی با استفاده از روش ELISA ارزیابی شد. تعیین میزان آنتی‌بادی در سرم خون‌های جمع‌آوری شده از خرگوش با استفاده از الایزا مبتنی بر سرم، افزایش آنتی‌بادی اختصاصی را طی دوره ایمیونیزاسیون نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به داده‌ها مشاهده می‌شود این آنتی‌بادی پلی‌کلونال ظرفیت تولید در خرگوش را داراست و می‌تواند در آینده در تست‌های تشخیص آنفلوانزا به مثابه سایر تست‌های ایمنی مانند وسترن بلات، ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بادی، ویروس آنفلوانزا انسانی، هماگلوتینین، پروتیین HA1، پلی‌کلونال.

مقدمه

بیماری آنفلوانزا دارای اهمیت جهانی بوده و نه تنها در جمعیت‌های انسانی بلکه در حیوانات قادر به گسترش می‌باشد.[1] طی سه قرن اخیر ۱۰ پاندمی بزرگ آنفلوانزا اتفاق افتاده که سه مورد از این پاندمی‌ها در قرن بیستم و در سال‌های 1918 (H1N1)، 1957 (H2N2) و 1968 (H3N2) بوده است.[2] ویروس آنفلوانزا، متعلق به خانواده اورتومیکسو ویریده، می‌باشد[1] که دارای هشت قطعه ژنومی است که حداقل ۱۱ پروتیین آن را RNA جنس (-) رمزگذاری می‌کنند. ویروس‌های آنفلوانزا بر اساس تفاوت‌های آنتی‌ژنی میان

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-08]

پروتیین‌های ماتریکس (M) و نوکلئوپروتیین (NP) به سه نوع A، B و C طبقه‌بندی می‌گردند.[۳] از مهمترین پروتیین‌های سطحی ویروس می‌توان به دو گلیکوپروتیین هماگلوتینین (Hemagglutinin, HA) و نورآمینیداز (Neuraminidase, NA) اشاره نمود که به‌صورت زوایدی روی پوشش لیپیدی نمایان می‌شود.[۱] اولین پاسخ ایمنی ویروس‌های آنفلوانزای نوع A در بدن به‌دنبال عفونت آنفلونزا از طریق تولید آنتی‌بادی علیه هماگلوتینین و نورامینیداز صورت می‌گیرد.[٤] هماگلوتینین توسط قطعه شماره ٤ اسید ریبونوکلئیک رمزدهی می‌شود[۲] و با وزن مولکولی حدود ۷۰ تا ۷۵ کیلودالتون، گلیکوپروتیین غالب غشایی[۳] و یک آنتی‌ژن کلیدی شناخته شده در پاسخ‌های میزبان به این ویروس، هم در عفونت طبیعی و هم در واکسیناسیون می‌باشد.[۵] این آنتی‌ژن ابتدا به یک پروتیین اولیه (HA0) ترجمه شده و سپس به دو زیر واحد هماگلوتینین ۱ و هماگلوتینین ۲ تقسیم می‌شود که در ادامه طی گردهمایی تشکیل ساختاری سه قسمتی می‌دهد. در ساختار فضایی خاصی که هماگلوتینین بالغ تشکیل می دهد تنها زیر واحد هماگلوتینین ۱ (ناحیه سر کروی) در معرض قرار می‌گیرد یعنی جایی که بیشترین شاخص‌های آنتی‌ژنی یافت می‌شود. این ناحیه شامل جایگاه‌های اتصال به گیرنده سلول هدف است.[۵]

گلیکوپروتیین هماگلوتینین به‌عنوان فراوانترین پروتیین سطحی ویروس آنفلوانزا است که زیر واحد بزرگ آن (هماگلوتینین ۱) با شناسایی الیگوساکاریدهای متصل به اسید سیالیک انتهایی گیرنده‌های سطحی سلول‌های میزبان، باعث ورود ویروس به سلول می‌شود، بنابراین هدف مناسبی برای تحقیقات واکسن به‌شمار می‌رود.[٦] شواهد تجربی در مورد ویروس‌های آنفولانزا نشان می‌دهد که گلیکوزیلاسیون هماگلوتینین ممکن است برای شکل‌گیری مناسب و شناسایی گیرنده میزبان مهم باشد، اما در ایمنی‌زایی آن اهمیت چندانی ندارد، بنابراین در صورتی که در سیستم پروکاریوتی بیان شود، همان خواص آنتی‌ژنی خود را حفظ می‌نماید. بیان قطعات هماگلوتینین در سیستم پروکاریوتی به‌طور بالقوه می‌تواند راهبرد بسیار موثری برای تولید مقادیر زیادی از واکسن آنفولانزا در مدت زمانی کوتاه باشد.[۵] افزون‌بر آن، با توجه به این که هماگلوتینین ۱ واجد جایگاه‌های آنتی‌ژنیک مهمی است، بیان آن به تنهایی برای القای پاسخ ایمنی کافی است و واکسن حاصل شده از آن می‌تواند برای ایمنی مخاطی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین می‌توان با روش‌های مهندسی پروتیین، تغییراتی در ساختار هماگلوتینین به‌وجود آورد که منجر به بهینه‌سازی پاسخ‌های ایمنی گردد.[٦]

همچنین نشان داده شده است تزریق عضلانی هماگلوتینین خالص شده به موش موجب القای تولید آنتی‌بادی ضد فعالیت هماگلوتیناسیون شده و در نهایت منجر به از بین رفتن توانایی ویروس در ایجاد عفونت می‌شود.[٦] در واقع آنتی‌بادی‌ها ابزارهای مناسبی می‌باشند که توسط بسیاری از پژوهشگران در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند و منجر به پیشبرد بسیاری در علم پزشکی شده‌اند.[۷] آنتی‌بادی پلی‌کلونال با ایمیونیزه کردن یک حیوان مناسب که به‌طور معمول پستاندار می‌باشد تولید می‌گردد. آنتی‌ژن مورد نظر به‌همراه ادجوانت مناسب به حیوان تزریق می‌شود. آنتی‌بادی‌هایی از کلاس IgG علیه آنتی‌ژن در بدن حیوان توسط لنفوسیت‌های B اختصاصی، تولید می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها از سرم حیوان تخلیص می‌گردند. آنتی‌بادی‌های تولید شده با این روش از لنفوسیت‌های B اختصاصی علیه اپی‌توپ‌های متفاوت مشتق می‌شوند. بنابراین پلی‌کلونال نامیده می‌شوند.[۸] امروزه پژوهشگران در تلاشند با تفکیک اجزای ویروس و حذف پروتیین‌های غیراختصاصی، با تخلیص قسمت‌های آنتی‌ژنیک مشترک بین سویه‌های مختلف ویروس، به‌سمت تولید واکسن‌های دایمی و امن‌تری گام بردارند که تمام سویه‌ها را تحت پوشش قرار دهد.[۹]

مطالعه حاضر با هدف تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه هماگلوتینین ۱ ویروس آنفلوانزا انجام شد.

روش بررسی

سازه بیانی واجد ژن بخش کروی پروتیین هماگلوتینین (هماگلوتینین ۱) ویروس آنفلوانزا کلون شده در وکتور pET28a، مورد استفاده در این پژوهش، در پژوهش پیشین در دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهیه شد.[۱۰] ادامه این مطالعه تجربی در بخش آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران اجرا گردید. بیان پروتیین نوترکیب مذکور در میزبان بیانی BL21 و تخلیص آن در شش ماهه دوم سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. برای تهیه رسوب سلولی، محیط کشت مایع حاوی باکتری‌ها پس از گذشت ١٦ ساعت پس از القا به‌وسیله ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG)، درون فالکن با دور 10000 rpm در دمای ٤ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-08]

سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله ابتدا برای جداسازی پروتیین‌های محلول به‌وسیله بافرلیز حاوی (۵۰mM) NaH2PO4، NaCl (۳۰۰mM) و pH=۷ سوسپانسیون شد و به مدت یک ساعت درون یخچال بر روی استیرر قرار گرفت. سپس محلول رسوب و بافرلیز در ۱۰ مرحله و هر مرحله به‌مدت ۱۵ ثانیه با قدرت میانی دستگاه سونیکه شد. حد فاصل هر بار سونیکه، ۱۵ ثانیه استراحت در یخ انجام گرفت. محلول سونیکه شده در دمای ٤ °C با دور 10000rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی از رسوب جدا گردید. سپس برای خارج کردن پروتیین‌هایی که به‌صورت اینکلوژن بادی هستند از بافرلیز دارای اوره هشت مولار استفاده شد.

در این مرحله پس از حل نمودن رسوب در بافر ذکر شده به‌مدت یک ساعت درون یخچال بر روی استیرر قرار گرفت. سپس در دمای ٤ °C با دور 10000rpmبه‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی از رسوب جدا گردید.[11] برای احراز وجود پروتیین در محلول‌های رویی جدا شده، از الکتروفورز پروتیین در ژل حاوی سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) ۱۲٪ استفاده شد. با توجه به اینکه وزن تقریبی پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ نزدیک به ٤۰ کیلودالتون است و باند محرزی در آن ناحیه از ژل مشاهده شد اما به جهت تایید پروتیین مدنظر که دارای دم پلی‌هیستیدینی است با استفاده از آنتی‌بادی کنژوگه با HRP علیه دم پلی‌هیستیدینی پروتیین، وسترن بلات انجام شد. با توجه به وجود دنباله پلی‌هیستیدینی در پروتیین هماگلوتینین ۱ نوترکیب، از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل Protino® Ni-TED columns (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG, Düren, Germany) جهت تخلیص استفاده شد. مراحل تخلیص بر اساس پروتکل ارایه شده توسط شرکت مذکور انجام گرفت.[11]

اما با توجه به وجود باندهای ناخالص در مرحله خروج (Elution) و همچنین خروج ممتد پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ در دو مرحله شستشو و خروج که به‌وسیله SDS-PAGE مشاهده شد، اثر تغییر pH بافرها در بهبود وضعیت مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر pH اولیه که برابر ۸ بود pH بافرها در ۷/۵ و ۷ نیز ارزیابی شد. همچنین جهت خروج یک‌باره پروتیین متصل شده به ذرات نیکل ستون کروماتوگرافی در راستای کاهش رقت پروتیین خروجی از ستون، غلظت ایمیدازول بین بازه ۲۵۰ تا ٤۰۰ mmol تغییر یافت. پس از تخلیص پروتیین به‌وسیله ستون کروماتوگرافی نیکل‌دار، به منظور تزریق پروتیین به حیوان، حذف اوره و ایمیدازول به‌وسیله کیسه دیالیز علیه بافر حاوی NaH2PO4 (۱۵/۵ mM) و Na2HPO4 (۲mM) در pH=۷ انجام گرفت.[12]

مرحله حیوانی این پژوهش تجربی در آزمایشگاه حیوانات انستیتو پاستور ایران در شش ماهه اول سال ۱۳۹٤ انجام شد. بدین منظور از دو سر خرگوش نر سفید نیوزلندی ۸-٦ هفته‌ای استفاده شد. در ابتدا پیش از تزریق اول، خونگیری به‌وسیله سرنگ از ورید گوش خرگوش، به‌عنوان خون صفر یا شاهد انجام شد.

در تزریق اول ۵۰۰ µl از پروتیین نوترکیب به‌غلظت ٤۰۰ تا ٦۰۰ µg/ml به ازای هر سر خرگوش به همراه حجم برابری از ادجوانت فروند کامل صورت گرفت. تزریق اول در سه ناحیه به‌صورت زیر جلدی و دو ناحیه به صورت تزریق عضلانی در عضله هر دو پا صورت گرفت. پس از گذشت سه هفته از تزریق اول، خونگیری انجام شد و سرم با سانتریفوژ در دور ٤۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه از خون جدا گردید.

نوبت بعدی تزریق به‌عنوان یادآور یک‌ماه پس از تزریق اول به‌میزان ۲۵۰ µl از پروتیین به غلظت ٤۰۰ تا ٦۰۰ µg/ml به‌ازای هر سر خرگوش به‌همراه حجم برابری از ادجوانت فروند ناقص در سه نقطه به‌صورت زیر جلدی صورت گرفت. نوبت‌های سوم، چهارم و پنجم تزریق، به‌فاصله دو هفته پس از تزریق قبل انجام گرفت. در هر بار تزریق یادآور، خونگیری یک هفته پس از آن انجام گرفت و سرم‌ها برای بررسی‌های بعدی جدا شد.[13]

به‌منظور بررسی میزان آنتی‌بادی در سرم‌های جدا شده، میزان ۱ µg از پروتیین تخلیص شده به ازای هر چاهک، به مدت ۱٦ ساعت انکوبه شد و پس از مسدود شدن ظرفیت‌های خالی چاهک‌ها با استفاده از محلول BSA 3% در بافر PBS، سرم با رقت‌های ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ در چاهک‌ها قرار داده شد.

پس از شستشو، آنتی‌بادی ثانویه ضد سرم خرگوشی (Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate) با رقت مناسب به‌عنوان آنتی‌سرم کنژوگه با آنزیم HRP، به چاهک‌ها افزوده گردید. در انتها سوبسترای تترامتیل بنزیدین (TMB) برای مشاهده نتایج به چاهک‌ها اضافه شد.

پس از توقف فعالیت آنزیم به‌وسیله محلول ۲ نرمال از H2SO4 نتایج توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ٤۵۰ nm خوانده شد.[14]

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-08]

یافته‌ها

نتایج به‌دست آمده توسط SDS-PAGE در مرحله استخراج نشان داد پروتیین مورد نظر توسط بافر لیز حاوی اوره، از رسوب سلولی جدا گشته و در محلول رویی رسوب باکتری پس از سانتریفیوژ قرار گرفته است (شکل ۱) نتایج وسترن بلات نیز بیان پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ مورد نظر را تایید نموده است (شکل ۲).

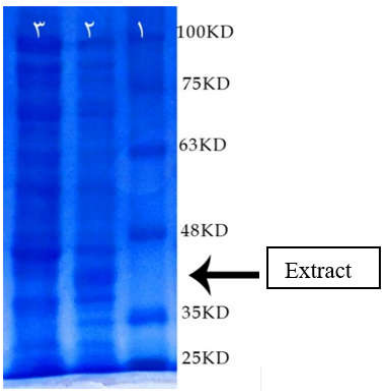
تخلیص به‌وسیله ستون کروماتوگرافی نیکل در pH=7 بهترین نتیجه را از لحاظ خلوص پروتیین و حذف خروج پروتیین نوترکیب در مرحله شستشو داشت. همچنین پروتیین نوترکیب متصل شده به ستون کروماتوگرافی، توسط بافر شستشو ۲ (Elotion) حاوی اوره ۸ مولار با غلظت ٤۰۰ mmol ایمیدازول به‌صورت یک‌باره و با غلظت مناسب شسته شد و از انتهای ستون جمع شد (شکل ۳) نتایج تست الایزا با رقت ۱:۱۰۰ از پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ با غلظت ۰/۱ mg/ml و تهیه رقت ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ از سرم خرگوش ایمونیز شده با پروتیین نوترکیب تخلیص شده هماگلوتینین ۱ در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج آن روند افزایشی تولید آنتی‌بادی علیه پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ تزریق شده به خرگوش‌ها را نشان داد. طبق جدول زیر، هر دو رقت ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ سرم، نتایج معناداری داشت و می‌توان از هر دو رقت در این تست تشخیصی استفاده کرد.

بحث

آنتی‌بادی علیه هماگلوتینین ۱ در تشخیص عفونت آنفلوانزا توسط سویه H1N1 به روش الایزا و یا سایر روش‌های سرولوژیک قابل استفاده است.[۱۰]

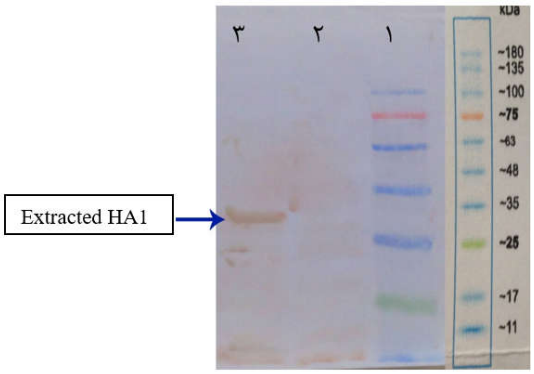
در این مطالعه تلاش شد با بهینه‌سازی بیان به نتایج مطلوب‌تری در تخلیص پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ ویروس آنفلوانزا در میزبان پروکاریوتی BL21 دست یابیم. مدت زمان و یا دمای بیان دو مورد از پارامترهای کلیدی جهت بهینه‌سازی هستند. امید بود بتوان با تغییر پارامترهای مذکور بیان پروتیین از حالت اینکلوژن‌بادی به‌صورت محلول تغییر یابد. زیرا در این صورت از درستی شکل فضایی پروتیین اطمینان حاصل می‌شود و دیگر نیاز به بازیابی شکل پروتیین نیست. همچنین در مرحله استخراج، پروتیین بدون نیاز به اوره از رسوب جدا گردد و در نتیجه مرحله حذف اوره از مسیر پژوهش خارج گردد.

در مرحله تخلیص پروتیین در پژوهش حاضر به منظور جلوگیری از خروج پروتیین از ستون کروماتوگرافی در زمان شستشوی ستون، تغییر pH صورت گرفت و مشاهده شد با نزدیک شدن pH به ۷، خروج پروتیین در این مرحله، از ستون کاهش می‌یابد. در نتیجه از کاهش میزان پروتیین متصل شده به ستون جلوگیری می‌شود.



شکل ۱: نتیجه SDS-PAGE پروتیین هماگلوتینین ۱ (HA1) پس از تخلیص

۱: مارکر وزن ملکولی تهیه شده از شرکت سیناکلون، ۲: محلول رویی پس از استخراج HA1 به‌وسیله بافر لیز به همراه اوره هشت مولار، ۳: محلول رویی پس از استخراج HA1 به‌وسیله بافر لیز



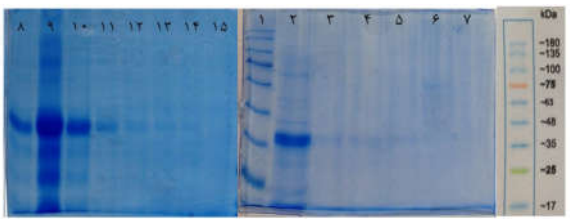
شکل ۲: نتیجه وسترن بلات پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱

۱: مارکر وزن مولکولی تهیه شده از شرکت سیناکلون، ۲: (کنترل منفی) باکتری فاقد پلاسمید بیانی، ۳: نمونه حاوی پروتیین نوترکیب

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-08]

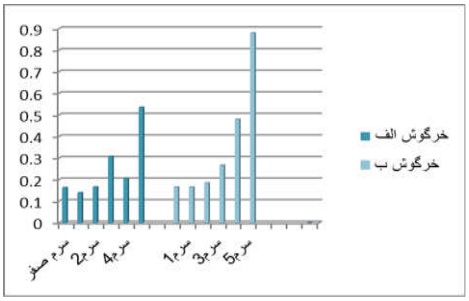
جدول ۱: نتایج تست الایزا با رقت (µg/ml ۱) از پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ به‌عنوان آنتی‌ژن و۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ از سرم خرگوش ایمونیزه شده با پروتیین نوترکیب تخلیص شده هماگلوتینین ۱ حاوی آنتی‌بادی

			پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ به‌عنوان آنتی‌ژن (µg/ml ۱)				
خرگوش	رقت سرم	سرم صفر	سرم ۱	سرم ۲	سرم ۳	سرم ٤	سرم ٥
الف	۱:۵۰	۰/۲۲۹	۰/۱۸۲	۰/۲۱۲	۰/۳۸۹	۰/۳۱۲	۰/۷۲۷
	۱:۱۰۰	۰/۱٦۳	۰/۱۳۹	۰/۱٦٦	۰/۳۰۸	۰/۲۰۵	۰/۵۳۵
ب	۱:۵۰	۰/۱٤۸	۰/۱۸٤	۰/۱۹۰	۰/۳۱۳	۰/۵۸۱	۱/۰۲۰
	۱:۱۰۰	۰/۱٦۵	۰/۱٦۵	۰/۱۸۵	۰/۲٦۷	۰/٤۸۰	۰/۸۸۰

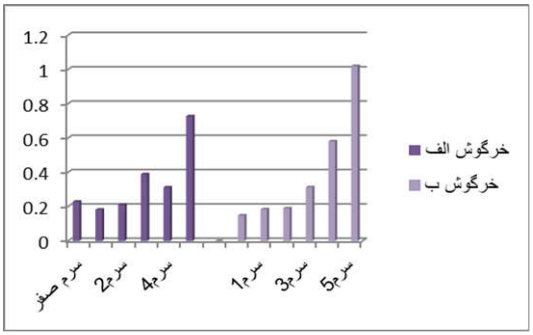


شکل ۳: نتیجه تخلیص به‌وسیله ستون کروماتوگرافی نیکل

۱: مارکر وزن مولکولی تهیه شده از شرکت سیناکلون، ۲ تا ۷: فرکشن‌های خارج شده از ستون به‌ترتیب خروج در مرحله شستشو، ۸ تا ۱۵: فرکشن‌های خارج شده از ستون به‌ترتیب خروج در مرحله خروج (Elution)



نمودار ۲: نتایج الایزا با رقت پروتیین آنتی‌ژن ۱:۱۰۰ و رقت سرم ۱:۱۰۰



نمودار ۱: نتایج الایزا با رقت پروتیین آنتی‌ژن ۱:۱۰۰ و رقت سرم ۱:۵۰

همچنین با توجه به اینکه خروج پروتیین از ستون در مرحله خروج پروتیین، به‌صورت ممتد و در ازای چند میلی‌لیتر بافر صورت می‌گرفت، شاهد رقیق شدن پروتیین بودیم که با تغییر میزان ایمیدازول، پروتیین در غلظت ٤۰۰ mmol ایمیدازول به یک‌باره از ستون خارج شد. در نتیجه به غلظت بالایی از پروتیین دست یافتیم. غلظت بالای پروتیین از آن جهت دارای اهمیت است که در مرحله تزریق به حیوان، غلظت محلول پروتیین باید بین ٤۰۰ تا ٦۰۰ µg/ml باشد که در صورت رقیق‌تر بودن محلول پروتیینی باید تغلیظ صورت گیرد.

برای تولید آنتی‌بادی از میزبان‌های حیوانی متفاوتی مانند بز، گوسفند و خرگوش استفاده می‌شود. خرگوش به‌دلیل اندازه مناسب، سهولت در دست ورزی و خونگیری و همچنین تولید میزان مناسب آنتی‌سرم با تیتر و دقت اتصال بالا در مدت زمان کوتاه، یکی از گونه‌های پرکاربرد پستانداران در تولید آنتی‌بادی است.[۱۵] در نتیجه در پژوهش حاضر از خرگوش به‌عنوان میزبان حیوانی استفاده شد. پس از طی مرحله حیوانی از دو تست الایزا جهت بررسی سرم استفاده شد. همانطور که در نمودارهای حاصل از نتایج الایزا مشاهده می‌شود،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-08]

روند افزایشی تولید آنتی‌بادی در بدن خرگوش‌ها، پس از تزریق‌های متوالی صورت گرفته است (نمودار ۱ و ۲).

بر اساس نتایج الایزا می‌توان گفت آنتی‌بادی علیه پروتیین نوترکیب هماگلوتینین ۱ در هر دو خرگوش تولید شده و پس از تزریقات متوالی یادآور، افزایش سطح آنتی‌بادی در هر دو خرگوش مشاهده شده است و با تزریق متوالی یادآور، سطح آنتی‌بادی نیز افزایش یافته است. در مورد خرگوش الف، ناخوشی جسمی طی هفته‌های هشتم تا دهم رخ داد که می‌توان اثر آن را در نمودارها مشاهده کرد. شاید بتوان دلیل آن را کاهش قدرت سیستم ایمنی خرگوش الف در اثر ضعف جسمی معنا کرد. همانطور که در نمودارهای بالا آورده شده است، دو رقت ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ نتیجه به‌نسبت مشابهی را نشان می‌دهد. می‌توان نتیجه گرفت هر دو رقت برای انجام این تست قابل قبولند و می‌توان برای کاهش حجم مصرفی سرم از رقت ۱:۱۰۰ استفاده کرد.

شرکت‌های زیادی از جمله My Bio Source، Sino Biological، eENZYME، Biorbyt، Abcam و غیره در دنیا اقدام به تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال و منوکلونال علیه پروتیین هماگلوتینین سویه‌های مختلف آنفلوانزا برای اهداف پژوهشی و به‌عنوان یک محصول تجاری نموده‌اند.[۱۳] قیمت‌های ارایه شده توسط این شرکت‌ها به‌طور میانگین به ازای هر µg ۱۰۰ از این محصولات بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ دلار می‌باشد. یکی از دلایل گران قیمت بودن محصول، طولانی‌بودن روند تولید و همچنین فاز حیوانی آن است. به‌طوری‌که مرحله حیوانی این نوع پروژه‌ها حداقل دو ماه به‌طول می‌انجامد. پروتیین تخلیص شده و قابل تزریـق به حیوان نیز با قیمت حدود ۳۰۰ دلار به‌ازای هر µg ۱۰۰ توسط این شرکت‌ها عرضه می‌گردد.[۱۶و۱۷]

قابل ذکر است آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه سر کروی آنفلوانزا در ایران برای اولین بار تولید می‌گردد و امید است با تولید و تخلیص این آنتی‌بادی بتوان گام ارزشمندی در جهت خودکفایی ملی و استفاده از آن در عرصه‌های آزمایشگاهی مختلف از جمله کیت‌های تشخیصی و سرولوژیک و همچنین در گام‌های بعدی، ارزیابی تولید واکسن‌های زیرواحدی برداشت.

در نهایت پیشنهاد می‌شود با تزریق تعداد یادآور بیشتر به خرگوش‌ها، میزان تغییرات تولید آنتی‌بادی در فواصل طولانی‌تر در مواجهه با آنتی‌ژن نیز بررسی گردد. هرچند در این مطالعه با توجه به محدودیت‌های آزمایشگاهی، فقط از دو راس خرگوش استفاده شده است، اما با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان دریافت کرد تولید آنتی‌بادی در میزبان خرگوش امکان‌پذیر است.

همچنین می‌توان از حیوانات آزمایشگاهی دیگری مانند بز و گوسفند که دارای حجم بیشتر خون هستند به جای خرگوش، جهت تولید بیشتر این آنتی‌بادی استفاده نمود.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آنتی‌ژن هماگلوتینین ۱ آنفلوانزا H1N1 در میزبان خرگوشی با موفقیت صورت گرفته است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "تخلیص بخش کروی پروتیین نوترکیب هماگلوتینین آنفلوانزا و تولید آنتی‌بادی علیه آن جهت استفاده در مصارف سرولوژیک" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹٤ می‌باشد که با حمایت دانشگاه صنعتی مالک اشتر و و در بخش آنفلوانزا و سایر ویروس‌های تنفسی انستیتو پاستور ایران با استفاده از امکانات مالی طرح پژوهشی مصوب این مرکز به شماره ۷۵۹ انجام گرفت.

References

1. Najafi S, Behzadian F, Fotuhi F, Fallah Mehrabadi J. Construction of a recombinant bacmid DNA in order to express Neuraminidase gene of influenza virus H1N1. *Arak Med Univ J* 2012;15(5):58-65.
2. Mousavi SF, Fotouhi F, Yousefi A, Frarahmand B, Heydarchi B, Tavakoli R, et al. Isolation and sequence analysis of hemagglutinin gene of Influenza A H1N1 virus from Iranian clinical samples during 2009 pandemic flu. *Iran South Med J* 2014;17(2):182-90.
3. Farahmand B, Khodabandeh M, Mahboudi F, Fotouhi F, Barkhordari F, Saleh M, et al. Isolation, cloning, and sequencing of influenza A (H1N1) hemagglutinin for production of hemagglutinin gene bank. *Arak Med Univ J* 2011;13(4):59-67.
4. Behzadian F, Goodarzi Z, Saberfar E. Construction of a new recombinant baculovirus encoding HA, NA, and M1 proteins of swine influenza (H1N1) virus and its expression in insect cells. *Arak Med Univ J* 2013;15(8):16-25.
5. Aliakbari M, Behzadian F, Deldar AA, Mahyad B, Bidram M, Bahreinian M. Secretory expression of hemagglutinin globular domain (HA1) of the influenza A (H5N1) virus in Bacillus subtilis. *Iran J Med Microbiol* 2015; 9(3):48-53.
6. Hossainzadeh S, Fotouhi F, Farahmand B, Saleh M, Yousefi A, Heydarchi B, et al. Construction of recombinant bacmid DNA

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-08]

encoding influenza virus A (H1N1) hemagglutinin gene. *Modares J Med Sci (Pathobiology)* 2012;14(4):38-42.
7. Alizadeh H, Madani R, Babaie M, Kavid N, Golchinfar F, Emami T. Preparation and purification of polyclonal antibodies against mycobacterium avium paratuberculosis antigens in rabbit. *J Fasa Univ Med Sci* 2012; 2(3):168-73.
8. Maneian M, Zarkesh Esfahani SH, Akbari M, Khanahmad H, Masjedi M. Production of polyclonal antibody against recombinant growth hormone and designing an ELISA kit and comparing some of its diagnostics indices with a commercial kit. *J Isfahan Med Sch* 2013;31(247):1173-84.
9. Sadeghi Neshat S, Farahmand B, Kianmehr Z, Zamani S, Saleh M, Fotouhi F. Immunogenicity enhancement of influenza virus stalk domain using Leishmania major heat shock protein, one step closer to universal vaccine. *J Isfahan Med Sch* 2015;33(349):1475-86.
10. Bahreinian M, Behzadian F, Fotouhi F. Prokaryotic expression of H1N1 influenza A virus haemagglutinin protein globular domain (HA1). *Arch Med Lab Sci* 2016;2(3):94-101.
11. Reed R. Practical Skills in Biomolecular Sciences. 3rd ed. Essex, UK: Pearson Education Limited; 2007. P. 379.
12. Animal Care and Use Program. Guidelines for the production of antibodies in laboratory animals [Internet]. Berkeley: University of California; 2014 Jan 6 [cited 2017 Oct 15]. Available from: https://acuc.berkeley.edu/guidelines/antibodies.pdf.
13. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol* 2013;133(9):e12.
14. Farahmand B, Rasaee MJ, Maleknia N, Malekane M. Enzyme Linked Immunosorbent Assay of progesterone in serum using penicillinase as lable. *Iranian Biomed Journal*. 1998;12(2):115-122.
15. Biorby (Europe's largest bioscience hubs). Rabbit Polyclonal to H1N1 HA1. 2017 [cited 2017 Oct 15]. Available from: http://www.biorbyt.com/influenza-a-virus-hemagglutinin-antibody-orb10763.
16. MyBioSource (Best biological reagents worldwide). HA1 (H1N1)(A/PR/8/34) Recombinant Protein [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 15]. Available from: https://www.mybiosource.com/prods/Recombinant-Protein/HA1-H1N1-A-PR-8-34/HA1/datasheet.php?products_id=434017.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-08]

TUMJ Tehran University Medical Journal, November 2017; Vol. 75, No. 8: 585-592 Original Article

Purification of Influenza virus A (H1N1) recombinant Hemagglutinin (HA1) and polyclonal antibody production

Fateme Khosravi Node M.Sc.[1,2]
Farida Behzadian Ph.D.[1]
Vahideh Mazaheri M.D.[2]
Hadiseh Shokouhi M.Sc.[2]
Maryam Saleh M.Sc.[2]
Behrokh Farahmand Ph.D.[2*]

1- Research Center of Bioscience and Biotechnology, Malek- Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
2- Department of Influenza Research and Other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Department of Influenza Research and Other Respiratory Virus, Pasteur Institute of Iran, 12 Farvardin St., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 64112183
E-mail: b_farahmand@pasteur.ac.ir

Abstract

Received: 10 May 2017 Revised: 13 Nov. 2017 Accepted: 20 Nov. 2017 Available online: 21 Nov. 2017

Background: Each year, Human influenza A (H1N1) virus causes moderate to severe infections with a high prevalence throughout the world. Accordingly, the rapid, sensitive and cost-effective laboratory diagnosis based on viral antigen detection is important. Moreover, the generation of specific antibodies directed against Influenza antigens is essential to the success of both basic and applied research programs. Hemagglutinin (HA) is the major surface envelope glycoprotein of influenza virus, which is subsequently cleaved into two subunits, HA1 and HA2. Since most antigenic sites are in the HA1 domain of HA, HA1 domain of influenza virus was studied as antigen to produce polyclonal antibody.

Methods: In this experimental study we expressed and purified the recombinant HA1 protein in the second half of 2015 at department of influenza and other respiratory viruses, Pasteur Institute of Iran and then prepared the polyclonal rabbit antibody against it. The vector of pET28aHA1 expressing HA1-His tagged protein of H1N1 influenza A/PR/8/34 virus was used for large scale production of HA1 into *E. Coli* (BL21). By changing expression conditions such as IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) concentration, time and temperature of incubation, the expression conditions for HA1 were optimized. The total cell protein harvested and purified by nickel affinity chromatography. All above mentioned experiments monitored by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Results: The efficiency of HA1 recombinant protein was high, equal to 400-600 mg/ml of cell lysate. The polyclonal antibody was prepared by immunizing the rabbits using recombinant HA1 with Freund's adjuvant according to standard protocols. Efficiency of the antiserum evaluated by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Determination of antibody level in the collected antiserum using serum-based ELISA showed that the specific antibody has risen well through the immunization schedule.

Conclusion: Our data shows that this polyclonal antibody has potential to be produced in rabbit. It will also be used in the future in influenza diagnosis as well as in other immunological applications such as western blot analyses, immunocytochemistry, and immunohistochemistry.

Keywords: antibody, human influenza virus, hemagglutinin, HA1 protein, polyclonal.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-08]