تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه ناحیه حفاظت‌شده هماگلوتینین ویروس آنفلوآنزا (A/H1N1/2009) سویه تهران: *گزارش کوتاه*

سمیه زمانی[1]
فاطمه فتوحی چاهوکی[2]
زهرا نورمحمدی[1]، سعیده صادقی نشاط[2]
وحیده مظاهری[2]، علی ترابی[2]
بهرخ فرهمند[2*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۲- گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوآنزا، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان جمهوری، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوآنزا تلفن: ۶۶۴۱۱۲۱۸۳-۰۲۱
E-mail: b_farahmand@pasteur.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹٤/۰۳/۱۹ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۵/۰۶ آنلاین: ۱۳۹٤/۰۶/۱۶

زمینه و هدف: ویروس آنفلوآنزا یکی از عوامل مرگ‌ومیر بالا در جهان است. پژوهشگران به استفاده از آنتی‌ژن‌های حفاظت‌شده این ویروس (مانند زیرواحد کوچک مولکول گلیکوپروتیین هماگلوتینین) به‌منظور ساخت واکسن و پژوهش‌های سرولوژیک توجه خاص دارند. این پژوهش با هدف تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه HA2 با کارایی لازم اجرا شد.

روش بررسی: این پژوهش از نوع علوم پایه (در زمینه تولید فرآورده) بود و از مهر ۱۳۹۲ تا خرداد ۱۳۹۳ در بخش آنفلوآنزا انستیتو پاستور تهران انجام شد. پروتیین نوترکیب HA2 به‌همراه ادجوانت فروند از طریق عضلانی به خرگوش تزریق شد و کارایی سرم خرگوش به‌وسیله تست‌های نفوذ شعاعی (Radial immunodiffusion, RID) و وسترن‌بلاتینگ بررسی شد.

یافته‌ها: در تست RID خط و هاله رسوبی مشاهده شد. همچنین نتایج وسترن‌بلاتینگ برای آنتی‌سرم HA2 مثبت بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که آنتی‌بادی علیه پروتیین HA2 تولید و پاسخ ایمنی هومورال به‌خوبی القا گردیده است.

کلمات کلیدی: ویروس آنفلوآنزا، پروتیین HA2، آنتی‌بادی، پلی‌کلونال، هماگلوتینین، ایمونودیفیوژن، وسترن بلاتینگ.

مقدمه

ویروس آنفلوآنزا عامل بیماری حاد تنفسی است. این ویروس که اولین‌بار در سال ۱۹۳۳ از انسان جدا شد، مسئول پاندمی‌های اسپورادیک و اپیدمی‌های فصلی می‌باشد. سالانه یک میلیارد نفر در جهان به این بیماری مبتلا می‌شوند که از این تعداد ۵-۳ میلیون نفر دچار بیماری شدید و ۳۰۰ تا ۵۰۰ هزار نفر هم به مرگ می‌انجامد.[1] این ویروس جز خانواده اورتومیکسوویریده و دارای سه نوع A، B و C می‌باشد که نوع A رنج وسیعی از پستانداران و پرندگان را آلوده می‌کند، بیشترین زیرگونه‌هایی که در اپیدمی‌های فصلی انسان‌ها را آلوده می‌کنند H1N1، H2N2، H3N2 هستند. ویروس آنفلوآنزا از نظر ساختاری دارای پوشش لیپیدی و هشت قطعه RNA تک‌رشته با قطبیت منفی و پروتیین‌های مختلف است. هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) مهمترین گلیکوپروتیین‌هایی هستند که در سطح پوشش این ویروس قرار دارند.[2]

هماگلوتینین یک مولکول تریمر است، هر زیرواحد آن به‌صورت یک پیش‌پروتیین ساخته می‌شود که توسط پروتئازها به HA1 و HA2 شکسته شده ولی به‌وسیله پیوندهای دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل هستند. HA2 در انتهای کربوکسیل HA می‌باشد و در ادغام غشا ویروس با سلول هدف در هنگام ورود ویروس به سلول نقش دارد.[2] HA2 قسمت حفاظت‌شده HA است. این پپتید دارای سه منطقه آنتی‌ژنیک است، این مناطق شامل ناحیه پپتید پیونددهنده (Fusion peptide) (اسید آمینه‌های ۱-۳۸ از سمت N ترمینال)، ناحیه اکتودمین HA2 (اسید آمینه‌های ۲۳-۱۸۵ سمت N ترمینال) و قسمت ایمونوژنیک

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

داخلی (اسید آمینه‌های ۱۲۵–۱۷۵) هستند. این سه منطقه منجر به القای پاسخ ایمنی و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال می‌شوند.[۳] از آنجایی‌که HA2 در طیف وسیعی از ویروس‌های آنفلوآنزا نوع A حفاظت شده است، بنابراین می‌توان از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد HA2 برای تولید واکسن و راه‌اندازی سیستم‌های تشخیصی و پژوهشی و مطالعات سرولوژیک سرم انسان در پاندمی‌ها استفاده کرد.[۳و۴] شرکت‌های تولیدی مانند eENZYME و Biorbyt در دنیا اقدام به تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد HA2 برای اهداف پژوهشی به‌عنوان یک محصول تجاری نموده‌اند.[۵و۶]

با توجه به اهمیت بیماری آنفلوآنزا و ویروس آن، در ایران نیز پژوهش‌های گوناگونی بر روی این ویروس انجام می‌شود که این امر لزوم استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه ویروس و پروتیین‌های آن‌را ضرورت می‌بخشد.[۷و۸] در حال حاضر این آنتی‌بادی‌ها از شرکت‌های خارجی خریداری می‌شود که بسیار هزینه‌بر است. با توجه به اهمیت پژوهش در ویروس آنفلوآنزا، هدف این مطالعه بومی‌سازی ساخت آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد HA2 در کشور بود.

روش بررسی

این مطالعه که از نوع علوم پایه و در زمینه تولید فرآورده بود در مدت زمان مهر ۱۳۹۲ تا خرداد ۱۳۹۳ در بخش آنفلوآنزا انستیتو پاستور تهران انجام گردید. پپتید HA2 تخلیص شده مورد استفاده در این مطالعه حاصل از بیان قطعه ژنی جداسازی‌شده از توالی کامل HA ویروس آنفلوآنزا (A/Tehran/18/2010/H1N1) است که در پژوهش‌های پیشین بخش آنفلوآنزا انستیتو پاستور، تکثیر و تخلیص شده و از آن برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال استفاده گردید.[۹] برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال از دو خرگوش نر سفید نیوزلندی ۸–۴ هفته‌ای استفاده شد. در تزریق اول ml ۱ پروتیین نوترکیب HA2 (غلظت µg/ml ۴۰۰) با ml ۱ ادجوانت کامل فروند (Complete Freund's Adjuvant, CFA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) مخلوط و به‌صورت عضلانی و زیرجلدی تزریق شد. تزریق دوم ۳۰ روز پس از تزریق اول با نصف میزان ادجوانت فروند ناقص (Incomplete Freund's adjuvant, IFA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) و آنتی‌ژن صورت گرفت. تزریق‌های یادآور هر ۱۴ روز یک‌بار تا چند ماه ادامه یافت. خون‌گیری از رگ سیاهرگ حاشیه‌ای گوش در فواصل زمانی مشخص صورت گرفت و جداسازی سرم انجام شد.[۱۰]

به‌منظور بررسی تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال در خرگوش از روش‌های مختلفی مانند نفوذ شعاعی (Radial Immunodiffusion, RID) در ژل (به دو صورت تک‌بعدی (Single RID, SRID) و دوبعدی (Double RID, DRID) استفاده شد.

برای DRID، ژل آگارز (CinnaGen, Iran) با درصد مناسب تهیه و هفت چاهک در آن با قطر ۵/۳ mm و فاصله ۴/۵ mm از یکدیگر ایجاد گردید. به چاهک‌ها آنتی‌ژن و رقت‌های مختلفی از سرم و کنترل اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۲۵ °C، رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو ۰/۵٪ و رنگ‌زدایی با محلول رنگ‌بر انجام شد و در نهایت ژل برای مشاهده خط رسوبی بررسی گردید. اما در SRID پس از تهیه محلول آگارز زمانی که دمای آن به کمتر از ۵۶ °C رسید، سرم به آن اضافه گردید. بقیه مراحل مانند DRID انجام شد.[۱۱]

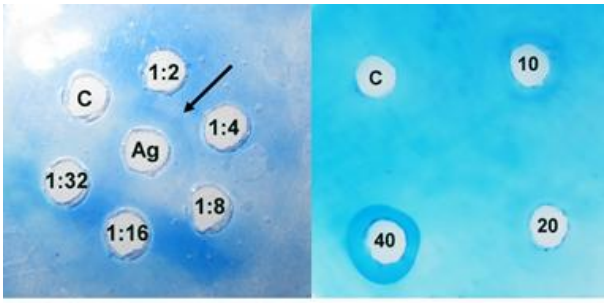
برای بررسی کارایی آنتی‌سرم پلی‌کلونال تولید شده از تکنیک وسترن‌بلاتینگ استفاده شد، ابتدا SDS-PAGE نمونه‌ها (HA2 و پروتیین نوترکیب 3M2e-HA2) در ژل ۱۵٪ انجام و سپس باندهای پروتیینی به‌وسیله Semidry electro-transfer (Applex, 016932) با ولتاژ ۱۰ میلی‌آمپر به غشا نیتروسلولز انتقال پیدا کرد. پس از بلاک کردن با BSA ۱/۵٪، رقت ۱:۱۰ سرم اضافه و با گذشت زمان مناسب آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه (Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) با رقت مناسب اضافه گردید. در آخر سوبسترا دی‌آمینوبنزیدین (DAB) برای آشکار شدن باندها بر روی غشا ریخته شد.

یافته‌ها

نتایج RID نشان‌دهنده برهمکنش بین آنتی‌بادی ضد HA2 و پروتیین HA2 بود، این تست دارای اختصاصیت و ویژگی بالایی است. در DRID و SRID خط و هاله رسوبی بین آنتی‌ژن و آنتی‌سرم تشکیل گردید (شکل ۱).

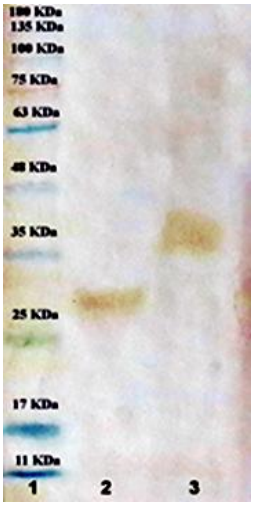
برای بررسی واکنش متقاطع آنتی‌سرم HA2 با پروتیین‌هایی که دارای جایگاه‌های آنتی‌ژنی مشابه HA2 هستند، تست وسترن‌بلاتینگ

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]



۱ ۲

شکل ۱: تست RID برای آنتی‌سرم HA2 (ژل آگارز ۱/۵٪)
۱) DRID: خط رسوبی تا رقت ۱:۸ مشاهده شد (Ag: پروتیین HA2، C: کنترل منفی) ۲) SRID: غلظت‌های مختلف HA2 (µg) در هر چاهک (C: کنترل منفی)



شکل ۲: نتیجه وسترن بلاتینگ با آنتی‌سرم HA2 ۱- مارکر پروتیینی (CinnaGen, Iran)، ۲- پروتیین HA2، ۳- پروتیین 3M2e-HA2

انجام شد. نتایج مثبت بود و آنتی‌سرم حاصل قابلیت واکنش‌پذیری با پروتیین‌های HA2 و 3M2e-HA2 را داشت (شکل ۲).

بحث

در مطالعه کنونی واکنش آنتی‌سرم پلی‌کلونال به‌دست‌آمده با پروتیین HA2 از طریق روش‌های گوناگون سرولوژیکی بررسی شد. در RID جایی‌که دو ماده با غلظت مناسب با یکدیگر برخورد نمایند، خط یا هاله رسوبی متشکل از کمپلکس‌های آنتی‌ژن- آنتی‌بادی تشکیل می‌شود که به‌علت بزرگی قادر به عبور از منافذ ژل نیستند. نفوذ ترکیبات در ژل به غلظت و اندازه مولکولی آنها بستگی دارد، بنابراین، توجه به درصد ژل آگارز ضروری است.[۱۱و۱۲] در مطالعه کنونی شکل هاله‌های رسوبی به‌صورت دوحلقه‌ای مشاهده شد که بر اساس پژوهش Vodeiko و همکاران این وضعیت به‌دلیل همخوانی آنتی‌سرم با آنتی‌ژن مربوطه است.[۱۳] نتیجه وسترن‌بلاتینگ آنتی‌سرم به‌دست‌آمده در مطالعه کنونی در مقایسه با نتایج گزارش‌شده آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد HA2 تولیدشده توسط شرکت‌های مختلف مانند eENZYME LLC (Gaithersburg, USA)، مناسب است.[۵] با توجه به ارزیابی‌های انجام شده آنتی‌سرم پلی‌کلونال حاصل دارای کارایی لازم در شناسایی پروتیین HA2 و جایگاه‌های آنتی‌ژنیک می‌باشد و برای کارهای پژوهشی آنفلوآنزا مناسب است.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی‌از پایان‌نامه تحت عنوان "تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه پروتیین‌های نوترکیب M2 و HA2 بیان شده در سیستم پروکاریوتی در راستای راه‌اندازی روش‌های سرولوژیک برای تشخیص آنفلوآنزا" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۲ و با شماره ۱۲۶۲۹۵ است که با حمایت بخش آنفلوآنزا انستیتو پاستور ایران انجام شد. مراتب سپاس از خانم حدیثه شکوهی طرقی و همکاران آزمایشگاه تحقیقاتی آنفلوآنزا اعلام می‌گردد.

References

1. Lambert LC, Fauci AS. Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med* 2010;363(21):2036-44.
2. Das K, Aramini JM, Ma LC, Krug RM, Arnold E. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17(5):530-8.
3. Staneková Z, Mucha V, Sládková T, Blaškovičová H, Kostolanský F, Varečková E. Epitope specificity of anti-HA2 antibodies in-

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

duced in humans during influenza infection. *Influenza Other Respir Viruses* 2012;6(6):389-95.
4. 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
5. Anti-HA2 (A/Vietnam/1203/2004) (H5N1). [Internet] 2015 Aug [cited 2015 Aug 22]. Available from: http://www.eenzyme.com/inforpage/ia-010-0100.pdf
6. H1N1 HA2 antibody. [Internet] 2015 Aug [cited 2015 Aug 22]. Available from: http://www.biorbyt.com/influenza-a-virus-hemagglutinin-antibody-6
7. Ebrahimi SM, Tebianian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. *Virus Genes* 2011;42(1):1-8.
8. Esghaei M, Monavari SH, Tavassoti-Kheiri M, Shamsi-Shahrabadi M, Heydarchi B, Farahmand B, et al. Expression of the influenza M2 protein in three different eukaryotic cell lines. *J Virol Methods* 2012;179(1):161-5.
9. Yousefi A, Fotouhi F, Hosseinzadeh S, Kheiri MT, Farahmand B, Montazeri S, et al. Expression of antigenic determinants of the haemagglutinin large subunit of novel influenza virus in insect cells. *Folia Biol (Praha)* 2012;58(4):151-6.
10. Farahmand B, Rasaee MJ, Maleknia N, Malekaneh M. Enzyme-linked immunosorbent assay of progesterone in serum using penicillinase as label. *Iranian Biomed J* 1998;12(2):115-22.
11. Waggett BE, Gannon S, McGorum BC. Use of the Ouchterlony double immunodiffusion method to observe antigen/antibody interactions in serum taken from Equine Grass Sickness cases and Co-grazers of Equine Grass Sickness. [Internet] 2010 [cited 22 Aug 2015]. Available from: http://www.grasssickness.org.uk/wp-content/uploads/2013/10/Ouchterlony-double-immunodiffusion.pdf
12. Estakhr J, Javdan N. Antigenicity determination of purified alpha-toxin of clostridium septicum. *Pharmacologyonline* 2011;2:835-41.
13. Vodeiko GM, Weir JP. Determination of H5N1 vaccine potency using reference antisera from heterologous strains of influenza. *Influenza Other Respir Viruses* 2012;6(3):176-87.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

TUMJ Tehran University Medical Journal, October 2015; Vol. 73, No. 7: 535-539 Brief Report

Production of polyclonal antibody against Tehran strain influenza virus (A/H1N1/2009) hemagglutinin conserved domain (HA2): *brief report*

Somayeh Zamani M.Sc.[1]
Fatemeh Fotouhi Chahouki Ph.D.[2]
Zahra Nourmohammadi Ph.D.[1]
Saeideh Sadeghi Neshat M.Sc.[2]
Vahideh Mazaheri M.Sc.[2]
Ali Torabi B.Sc.[2]
Behrokh Farahmand Ph.D.[2*]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Virology, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, 12 Farvardin St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-64112183
E-mail: b_farahmand@pasteur.ac.ir

Abstract

Received: 09 Jun. 2015 Accepted: 28 Jul. 2015 Available online: 07 Sep. 2015

Background: The influenza virus is one of the most important factors for higher morbidity and mortality in the world. Recently, researchers have been focused on influenza conserved antigenic proteins such as hemagglutinin stalk domain (HA2) for vaccine production and serological studies. The HA2 plays a major role in the fusion of the virus with host cells membrane. The immunity system enables to produce antibody against HA2. The aim of this study is polyclonal antibody production against influenza HA2.

Methods: This study was done in the Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran for one year from September 2013 to October 2014. In the present study, recombinant HA2 protein was produced in prokaryotic system and purified using Nickel affinity chromatography. The purified HA2 was mixed with Freund's adjuvant (complete and incomplete) and injected into two New Zealand white rabbits by intramuscularly and subcutaneously routes. Immunization was continued for several months with two weeks interval. Before each immunization, blood was drawn by venous puncture from the rabbit ear. Function of rabbit's sera was evaluated using radial immunodiffusion (RID) in both forms, Single RID (SRID) and Double RID (DRID). Finally, antiserum activity against HA2 was evaluated using western blotting as serological assay.

Results: Sedimentary line and zone was observed in RID assays (SRID and DRID) represent interaction between HA2 protein and anti- HA2 antibody. As well as, western blotting results was positive for HA2 protein. Therefore, these results showed that polyclonal antibody produced against HA2 protein can identify HA2 protein antigenic sites.

Conclusion: These findings show that humoral immune responses have properly been stimulated in rabbits and these antibodies can identify HA2 protein and may be suitable for other serological methods.

Keywords: antibody, HA2 protein, hemagglutinins, immunodiffusion, influenza virus, polyclonal, western blotting.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]