

Genomic evaluation of 5'-UTR sequence of fusion gene in vaccine strain of measles virus (AIK-C) following passage in MRC-5 cell line

A Emami*

K Aghaeipour**

S S Safavieh***

R Yaghoobi**

* MSc of microbiology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

** Assistant professor of molecular biology, Razi Serum and Vaccine Research Institute, Karaj, Iran

*** MSc of microbiology, Razi Serum and Vaccine Research Institute, Karaj, Iran

****Assistant professor of virology, Shiraz Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*Abstract

Background: Multiple point mutations and deletions have been detected in the 5'-UTR non-coding region of F gene of measles virus vaccine strains that may affect the function of fusion protein and viral penetration.

Objective: To study the possible alterations in 5'-UTR non-coding sequence of F gene following a change in measles virus cell culture from chicken fibroblast to MRC-5 cell line.

Methods: Concerning the importance of F gene in immunogenicity and the cellular tropism of this protein, the present study was performed at the Biotechnology Department of Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran. After cloning of 5'-UTR non-coding sequence of F gene and amplification using a two-step RT-PCR method, the recombinant plasmid was sequenced. Comparing this F gene 5'-UTR sequence with standard vaccine strains by DNAMAN program, the possible changes which might have been occurred in F gene non-coding sequence, was determined.

Findings: Comparing the F gene 5'-UTR sequence of AIK-C vaccine strain with two sequences of Parks and Mori vaccine strains was indicative of two nucleotide variations in bases 156 and 288 after shifting the measles virus vaccine strain cell lines from chicken fibroblast to MRC-5.

Conclusion: Regarding the changes in two nucleotides of F gene 5'-UTR non-coding sequence after cell culture shift from fibroblast to MRC-5 cell line for multiplication of measles virus vaccine strain, these alterations may affect the selection of AUG initiation codon, promote the translational level of fusion protein, and therefore leading to possible reduction in immunogenicity of this newly propagated virus vaccine strain.

Keywords: Measles, Vaccination

Corresponding Address: Shiraz Transplant Research Center, Namazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Email: rayaviro@yahoo.com

Tel: +98 711 6476331

Received: 2008/03/15

Accepted: 2009/03/10

بررسی ژنومیکس تغییرات توالی 5'-UTR ژن F ویروس سرخک سوش واکسن AIK-C تکثیر شده در سلول‌های MRC-5

امیر امامی* دکتر خسرو آقایی پور** صدیقه السادات صفویه*** دکتر رامین یعقوبی****

*کارشناس ارشد میکروپ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
**استادیار بیولوژی مولکولی مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی کرج
***کارشناس ارشد میکروپ شناسی مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی کرج
****استادیار ویروس شناسی مرکز تحقیقات پیوند اعضاء دانشگاه علوم پزشکی شیراز

Email: rayaviro@yahoo.com

آدرس مکاتبه: شیراز، بیمارستان نمازی، مرکز تحقیقات پیوند اعضاء، تلفن ۶۴۷۴۳۳۱-۰۷۱۱

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۲۰

چکیده

زمینه: در انتهای 5'-UTR ژن F سویه واکسن سرخک یک توالی غیر معمول طولانی غیرکد کننده قرار دارد که با توجه به موتاسیون‌ها و حذف‌های منطقه‌ای، تغییرات در این ناحیه می‌تواند بر عملکرد پروتئین F تولید شده مؤثر باشد.

هدف: مطالعه به منظور تعیین ژنومیکس تغییرات توالی 5'-UTR ژن F ویروس سرخک سوش واکسن AIK-C تکثیر شده در سلول‌های MRC-5 انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش بنیادی در سال ۱۳۸۵ در بخش بیوتکنولوژی مؤسسه سرم و واکسن‌سازی رازی انجام شد. پس از کلون‌سازی و تکثیر با روش RT-PCR و سپس ترادف‌یابی توالی ناحیه 5'-UTR ژن کد کننده پروتئین F، تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در توالی سویه واکسن مورد مطالعه با توالی سویه‌های واکسن استاندارد موری و پارکز موجود در بانک اطلاعات ژن با استفاده از برنامه DNAMAN مقایسه شد.

یافته‌ها: از مقایسه نتایج حاصل از تعیین توالی ناحیه 5'-UTR ژن کد کننده پروتئین F سویه واکسن مورد مطالعه با دو توالی مرجع مشخص شد که ناحیه غیر کد کننده پروتئین فیوژن سویه واکسنی سرخک AIK-C با تغییر کشت سلولی از فیبروبلاست جوجه به MRC-5، در نوکلئوتید شماره ۱۵۶ و در نوکلئوتید ۲۸۸ دچار تغییر شده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت مشاهده تغییر در ناحیه در انتخاب کدون AUG ابتدایی ژن کد کننده پروتئین فیوژن و نقش آن در میزان بیان این پروتئین، این احتمال وجود دارد که تغییر در نوع کشت سلول ویروس سرخک بتواند در شرایط ایمنی‌زایی واکسن فوق مؤثر باشد.

کلیدواژه‌ها: سرخک، واکسیناسیون

مقدمه

کشورهای در حال توسعه وجود دارد. عوارض این بیماری عبارتند از: پنومونی، التهاب گوش میانی، گاستروانتریت، اسکلروز پان آنسفالیت تحت حاد (SSPE) و در نهایت مرگ.^(۱،۲) این ویروس ژنوم RNA تک رشته‌ای با قطبیت منفی دارد. RNA خطی ۱۶ کیلو بازی این ویروس حاوی ۶ سیسترون غیر همپوشان 5'-N-P-M-F-H-L-3' است که کدکننده ۸ پلی پپتید شناخته شده هستند.^(۳،۴) بررسی‌ها نشان داده‌اند که ۱۱ درصد از توالی ژنومی این ویروس به صورت نواحی غیر کد کننده در فواصل ژن‌های این

بیماری سرخک، قبل از دسترسی به واکسن آن، بیماری خطرناکی محسوب می‌شد که سبب مرگ و میر کودکان بسیاری در سراسر دنیا بود. انسان تنها میزبان طبیعی این ویروس است. علائم بیماری شامل تب، سرفه، التهاب ملتحمه، راش‌های ماکولوپاپولار منتشر، آبریزش بینی و به طور کلی مشکلات تنفسی و عصبی هستند.^(۱) علی‌رغم این که واکسن سرخک از حدود ۴۰ سال پیش در دسترس عموم قرار گرفته است، اما هنوز گزارش‌های متعددی از ابتلا و مرگ و میر ناشی از این بیماری در

*مواد و روش‌ها:

این مطالعه بنیادی در سال ۱۳۸۵ در بخش بیوتکنولوژی مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی- حصارک کرج انجام شد. ناحیه 5'-UTR پروتئین F ویروس سرخک سوش AIK-C، به دست آمده از کشت سلولی MRC-5، به وسیله روش RT-PCR دو مرحله‌ای تکثیر شد.

کشت‌های رده سلولی MRC-5 از بخش سرخک مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی- حصارک - کرج تهیه شد. پس از آماده شدن کشت سلولی، برای تلقیح از سوش ویروسی (Edmonston, AIK-C) که به عنوان سوش واکسن سرخک در مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی ایران استفاده می‌شود، به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر با تیتراژ 1×10^3 استفاده شد. (۸۵و۸۶) پس از گذشت مدت تقریبی ۱۰ روز و تشکیل ۱۰ تا ۲۰ درصد اثر سیتوپاتیک (CPE^2) محیط کشت درون فلاسک خالی و سلول‌های موجود با استفاده از محلول تریپسین ۲ درصد از سطح جداره فلاسک جدا شد. با استفاده از محلول سالین بافر فسفات (PBS) سلول‌ها از سطح فلاسک شسته و با استفاده از سانتریفیوژ رسوب داده شدند. رسوب سلولی با استفاده از محلول PBS، ۳ بار شستشو داده شده و در هر مرحله سانتریفیوژ شد. سپس از استخراج RNA رسوب نهایی با استفاده از روش RNXTM-Plus (سیناژن-ایران) انجام شد. (۱۰۳)

غلظت RNA حاصل با دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین شد و ۵ نانوگرم از آن با استفاده از هگزامتر (Roch) و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (MuMLV (Roch) برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. (۸۹و۱۳۳) با توجه به ارزیابی اسپکتوفتومتری، حدود ۱۰۰۰ نانوگرم RNA از سلول‌ها استخراج شد. برای تداوم کار و تهیه cDNA تنها به ۵ نانوگرم mRNA نیاز بود.

با استفاده از پرایمر اختصاصی، قطعه مورد نظر به صورت کاملاً اختصاصی از میان توالی‌های بسیار زیاد تکثیر شد. (۱۴) پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق به

ویروس قرار گرفته است. (۶و۵) دو توالی تنظیمی با فعالیت سیس (Cis-acting) در ژنوم ویروس سرخک شناسایی شده‌اند که این دو منطقه عبارتند از: مناطق ویرایش ژن P و منطقه UTR ژن F. منطقه ویرایش ژن P اجازه ورود یک گوانین به این منطقه را طی نسخه برداری در برخی از mRNA ها می‌دهد. نتیجه این امر تغییر چارچوب خواندن این ژن و تولید پروتئین V است. (۵) منطقه UTR موجود در ابتدای mRNA ژن F نیز نقش بسیار مهمی در کارآیی ترجمه و انتخاب کدون آغازین این پروتئین دارد. (۶-۸) حذف یا تغییر این دسته از عناصر کنترل کننده ترجمه در ویروس- های نو ترکیب در شرایط محیط کشت سلولی باعث حذف یک سری از عملکردهای ژنومی شده است. (۹و۷) این دسته از توالی‌ها با عملکرد تنظیمی سیس می‌توانند در تهیه سوش- های تضعیف شده واکسنی نقش مهمی داشته باشند. (۸)

با وجود شروع این دسته از مطالعه‌ها در تعیین نقش پروتئین‌های مختلف ویروس سرخک در تضعیف آن، عملکرد و نقش نواحی تنظیمی فعالیت سیس کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است. (۹و۸) بررسی حذف نواحی غیرکد کننده ژن پروتئین F در یکی از سوش‌های نو ترکیب ویروس سرخک باعث کاهش قدرت همانندسازی ویروس در بافت‌های تیموس و کبد انسانی پیوند زده شده در موش‌های SCID شده است. (۱۰و۸و۳) این امر نشان‌دهنده قدرت تغییر در عملکرد توالی تنظیمی سیس در تضعیف ویروس است. نواحی غیر کدکننده موجود در ژن تولیدکننده گلیکوپروتئین F از مناطق حفاظت شده در سوش‌های واکسن ویروس سرخک هستند که برای تحریک سیستم ایمنی بدن و ایجاد ایمنی لازم در افراد واکسینه شده اهمیت دارد. (۱۱و۱۲) به منظور اطمینان از سلامت سوش واکسن در حال تولید در مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی و تکمیل آزمون‌های کنترلی سوبیه واکسن که به طور معمول باید در هر کشوری انجام شود، این تحقیق به منظور مطالعه به منظور تعیین ژنومیکس تغییرات توالی 5'-UTR ژن F ویروس سرخک سوش واکسن AIK-C تکثیر شده در سلول‌های MRC-5 انجام شد.

محیط قرار گرفت به راحتی به یکدیگر متصل شدند و ناقلی به شکل حلقوی که دو شکاف داشت تشکیل شد. این قطعه با استفاده از آنزیم لیگاز T₄ به وکتور متصل شد.^(۵)

بعد از عمل کلونینگ، پلاسمیدهای نوترکیب شده به درون سلول‌های سازگار شده E.coli سوش DH5α منتقل شدند. عمل انتقال به روش کلسیم-کلرید انجام شد. برای این منظور سلول‌های تیمار شده با CaCl₂ پس از قرار گرفتن بر روی یخ، به نمونه‌های فوق اضافه شدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه از زمان سرمایش بر روی یخ، لوله حاوی نمونه به سرعت وارد حمام آب گرم با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد شد. سپس لوله از حمام آب گرم خارج و دوباره بر روی یخ قرار داده شد. پس از انجام شوک سرمایشی، مقداری محیط LB مایع به درون لوله اضافه شد و سپس لوله حاوی باکتری نوترکیب شده برای بهبودی از شوک ایجاد شده و بیان نشان‌گر مقاومت آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین موجود در پلاسمید، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شد.^(۲۰) سپس سلول‌ها به محیط آگار LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و شاخص‌های رنگی IPTG - Xgal منتقل و مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این زمان کلنی‌های سفید رنگ انتخاب شدند. برای اطمینان از وجود قطعه مورد نظر در باکتری نوترکیب، مجدداً به طور مستقیم بر روی آن به کمک پرایمر اختصاصی PCR انجام شد. پس از تأیید نهایی کلنی‌ها با PCR، کلنی‌های انتخاب شده به محیط مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین منتقل و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان باکتری‌های رشد کرده با استفاده از سانتریفیوژ رسوب و برای تخلیص پلاسمید مورد استفاده قرار گرفتند.^(۲۱)

از آنجا که پلاسمید بر روی ژل الکتروفورز چندین باند ایجاد می‌کند، برای اطمینان از خالص بودن پلاسمیدهای استخراج شده آنها را با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده

صورت دو توالی پیش‌رو و معکوس به شرکت MWG Oligo Synthesis سفارش داده شد که مشخصات زیر را داشت.

Forward Primer: 5'- AGG GCC AAG GAA CAT ACA CA -3'

Reverse Primer: 5'- GCA CTT CCT ATT CCT ACC AC -3'

طول قطعه تکثیر شده ۷۰۴ جفت باز بود. این پرایمر ناحیه ۵۷۴ جفت بازی، 5'-UTR از فیوژن پروتئین سرخک سوش واکسینال AIK-C را در خود تکثیر می‌کند. قطعه مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و آنزیم TaqPol با استفاده از روش واکنش زنجیره پلیمر (PCR)، در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد و طی ۳۰ چرخه در دستگاه ترموسایکلر تکثیر شد.^(۱۴-۱۶) پس از اتمام مرحله تکثیر، مقداری از محصول نهایی جهت بررسی صحت عملکرد اولیه در کنار نشان‌گر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Roch) بر روی ژل آگاروز ۲ درصد، به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز شد.

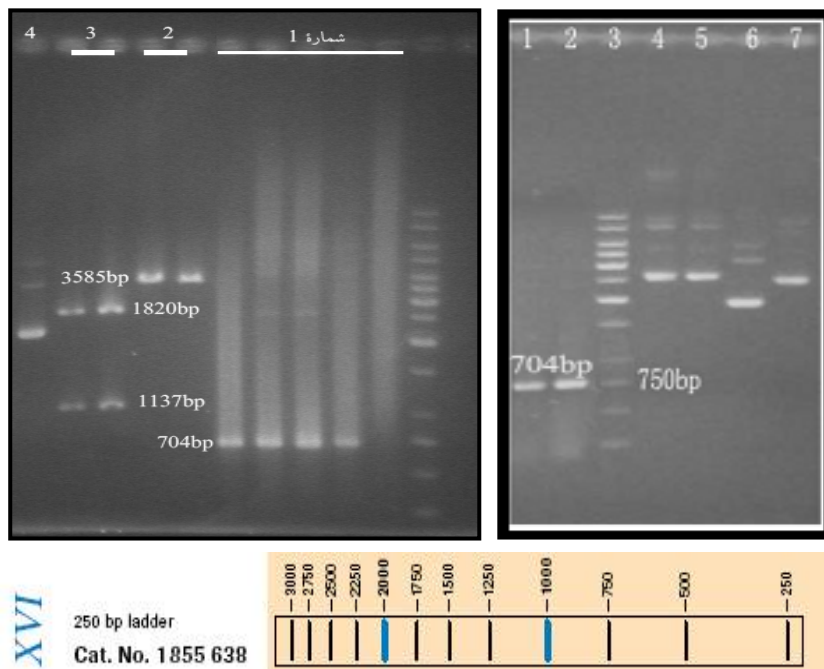
پس از تأیید اولیه قطعه مورد نظر و تأیید طول قطعه، حجم بیشتری از نمونه تکثیر شد. برای این که بتوان قطعه مورد نظر را به صورت خالص و عاری از ترکیب‌های دیگر و قطعه‌های ناقص تهیه کرد، نمونه تکثیر یافته بر روی ژل الکتروفورز منتقل و سپس باند تشکیل شده در منطقه مورد نظر از روی ژل بریده و با استفاده از کیت تخلیص محصولات PCR (Roche) تخلیص شد.^(۱۷-۱۹) پس از اجرای این مراحل، نمونه خالص فاقد هر گونه پرایمر اضافی و نمک‌های به کار رفته در واکنش زنجیره‌ای برای اجرای مرحله کلونینگ استفاده شد.^(۱۴ و ۱۶)

از آنجا که قطعه حاصل برای سیستم T/A سازگار شده بود در این تحقیق از کیت Ins T/A CloneTM PCR Product Cloning (Fermentas)، به عنوان یک سیستم یک مرحله‌ای مناسب جهت کلونینگ قطعه تکثیر شده استفاده شد.^(۵) ناقلی که در این کیت مورد استفاده قرار گرفت pTZ57R/T بود. زمانی که قطعه تکثیر یافته از PCR که دارای انتهای 3'-da است در

نمونه‌های ارسال شده به درستی انجام نمی‌شود، نمونه‌ها از هر دو جهت توسط پرایمرهای پیش‌رو و معکوس ترادف یابی شدند. پس از بررسی نتایج، این دو توالی به صورت یک توالی موتاژ شد و با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید. در بانک ژن دو توالی برای سویه AIK-C موجود است که یکی توسط موری و همکاران با شماره دسترسی S58435 در سال ۱۹۹۳ و دیگری توسط پارکز و همکاران با شماره دسترسی AF266286 در سال ۲۰۰۱ گزارش شده است.

به شکل ساختار خطی تبدیل کرده تا پس از انجام عمل الکتروفورباند صحیح مشخص شود. از این رو، در این مرحله مقداری از پلاسمیدهای استخراج شده با آنزیم‌های EcoRI و RsaI هضم آنزیمی شدند و با توجه به نقشه آنزیمی مورد انتظار نمونه‌ها بررسی و تأیید شدند (شکل شماره ۱).

سپس نمونه‌های تأیید شده جهت تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به MWG فرستاده شدند. از آنجا که به طور معمول تعیین توالی قسمت‌های انتهایی



شکل ۱- نتیجه هضم آنزیم‌های برش دهنده

نمونه شماره ۱ و ۲ از شکل a و ۱ از b : PCR بر روی کلون‌ها (باندهای مورد نظر در ناحیه پایین‌تر از ناحیه ۷۵۰ bp از مارکر مورد استفاده قرار گرفته است).

شماره ۳ از شکل a : 250 bp ladder

شماره‌های ۴ و ۵ از شکل a: پلاسمید استخراج شده با روش MAX preparation

شماره ۶ از شکل a : پلاسمید شاهد

شماره ۷ از شکل a : پلاسمید استخراج شده با کیت استخراج پلاسمید

نمونه شماره ۲ از شکل b : هضم آنزیمی با EcoRI (این آنزیم تنها یک محل برش (ناحیه ۶۱۵) بر روی این پلاسمید دارد که با توجه به پیش بینی انجام شده، این ناحیه کاملاً قابل تشخیص هستند)

نمونه شماره ۳ از شکل b : هضم آنزیمی با RsaI (این آنزیم ۲ سایت برش (ناحیه ۶۲۸ و ناحیه ۲۴۴۸) بر روی این پلاسمید دارد که با توجه به پیش بینی انجام شده، این دو ناحیه قابل تشخیص هستند)

نمونه شماره ۴ از شکل b : پلاسمید شاهد

*** یافته‌ها:**

میزان RNA با کمک اسپکتوفتومتر به دست آمد. توالی به دست آمده در این تحقیق در مقایسه با توالی‌های مرجع مورد مطالعه در دو ناحیه تغییر داشت. تغییر اول در نوکلئوتید ۱۵۶ بود که در مقایسه با توالی پارکز این نوکلئوتید از A به C تغییر کرده بود. تغییر دیگر حذف یک نوکلئوتید در ناحیه ۲۸۸ در مقایسه با توالی موری بود، به طوری که باز G تنها در ترادف سویه‌های AIK-C و پارکز وجود داشت (شکل شماره ۲).

مقایسه‌ای، این نواحی در بانک ژن در موقعیت‌های ۱۵۶ و ۲۸۸ مشخص است. در موقعیت ۱۵۶ نوکلئوتید C شبیه توالی موری بوده و با توالی پارکز که A بوده متفاوت است. در موقعیت ۲۸۸ G موجود شبیه پارکز بوده و نسبت به موری یک تک نوکلئوتیدی اضافه شده است که به صورت خطوط ممتد (---) نشان داده شده‌اند و نشان‌دهنده همولوژی بین توالی است. نواحی که به صورت نقطه‌های ممتد مشخص شده است نشان‌دهنده عدم نقاط تعیین توالی شده است که به منظور جلوگیری از عدم وجود نقاط تعیین توالی نشده، تعیین توالی با استفاده از هر دو پرایمر و در دو جهت صورت گرفته است. همانطور که در شکل هم مشاهده می‌شود تنها در یک نوکلئوتید و آن هم در ناحیه ۱۵۶ باز A به C تغییر پیدا کرده است.

*** بحث و نتیجه گیری:**

مطالعه حاضر نشان داد که پس از تغییر در رده کشت سلولی ویروس سرخک از رده فیروبلاست جوجه به رده MRC-5 نوکلئوتیدهای ناحیه غیرکدکننده ژن F و باز تغییر داشت که یکی در ناحیه ۱۵۶ بود که نوکلئوتید A به C مشابه با سویه موری تغییر یافت و دیگری اضافه شدن یک نوکلئوتید G در ناحیه ۲۸۸ بود که همانند سویه پارکز این تغییر انجام شده است. این امر می‌تواند باعث تغییر در ساختار و عملکرد مولکولی ناحیه کدکننده فیوژن پروتئین ویروس سرخک شود. (۲۳و۲۱)

بررسی‌های انجام شده بر روی رده‌های سلولی دیگر از قبیل رده سلولی Vero نشان داده است که تغییر در رده‌های سلولی می‌تواند باعث تغییر در ساختار مولکولی و توالی ویروس سرخک شود. (۲۳-۲۴) از آنجا که این واکسن ابتدا بر روی رده‌های فیروبلاست جوجه تهیه می‌شده و در حال حاضر رده سلولی تهیه آن به MRC-5 تغییر پیدا کرده، هرگونه تغییری محتمل است. همچنین ناحیه غیر کدکننده پروتئین فیوژن در انتخاب کدون اولیه AUG و تولید پروتئین فیوژن کاربردی و همچنین تأثیر آن در میزان بیان این پروتئین اهمیت دارد. (۲۵و۲۴) پروتئین فیوژن و پروتئین هم‌اگلوتینین از نواحی مهم در ایمنی‌زایی و تروپیسیم سلولی این واکسن هستند و نواحی غیرکدکننده آنها به ویژه ناحیه غیر کدکننده پروتئین

AIK-C_Mori	TAGGGCCAAAGGAACATACACACCCAAACAGAACCCGAGACCCGGCCACCGGCGCGCCG	60
AIK-C_Parks	TAGGGCCAAAGGAACATACACACCCAAACAGAACCCGAGACCCGGCCACCGGCGCGCCG	60
AIK-C_MRC	TAGGGCCAAAGGAACATACACACCCAAACAGAACCCGAGACCCGGCCACCGGCGCGCCG	60
Consensus	TAGGGCCAAAGGAACATACACACCCAAACAGAACCCGAGACCCGGCCACCGGCGCGCCG	
AIK-C_Mori	CCAAACCCCGGACAAACAGAGGGAGCCCAACCAATCCGCGGGCTCCCGGGTGC	120
AIK-C_Parks	CCAAACCCCGGACAAACAGAGGGAGCCCAACCAATCCGCGGGCTCCCGGGTGC	120
AIK-C_MRC	CCAAACCCCGGACAAACAGAGGGAGCCCAACCAATCCGCGGGCTCCCGGGTGC	120
Consensus	CCAAACCCCGGACAAACAGAGGGAGCCCAACCAATCCGCGGGCTCCCGGGTGC	
AIK-C_Mori	AGGCAGGGACACCAACCCCGGAAACAGCCAGCAGCC	180
AIK-C_Parks	AGGCAGGGACACCAACCCCGGAAACAGCCAGCAGCC	180
AIK-C_MRC	AGGCAGGGACACCAACCCCGGAAACAGCCAGCAGCC	180
Consensus	AGGCAGGGACACCAACCCCGGAAACAGCCAGCAGCC	
AIK-C_Mori	GGGGCCCCCAAAAAGGGCCCCGAGGGGGGACAGCCAGCAGCCGCGGAGAGCCACCC	240
AIK-C_Parks	GGGGCCCCCAAAAAGGGCCCCGAGGGGGGACAGCCAGCAGCCGCGGAGAGCCACCC	240
AIK-C_MRC	GGGGCCCCCAAAAAGGGCCCCGAGGGGGGACAGCCAGCAGCCGCGGAGAGCCACCC	240
Consensus	GGGGCCCCCAAAAAGGGCCCCGAGGGGGGACAGCCAGCAGCCGCGGAGAGCCACCC	
AIK-C_Mori	CAGCCACACAGCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCC	299
AIK-C_Parks	CAGCCACACAGCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCC	300
AIK-C_MRC	CAGCCACACAGCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCC	300
Consensus	CAGCCACACAGCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCC	
AIK-C_Mori	CCAGACTCGGGCATCACCCCGGAAAGGAAAGGCGCACACCCCGGACCCAGCCCGGGA	359
AIK-C_Parks	CCAGACTCGGGCATCACCCCGGAAAGGAAAGGCGCACACCCCGGACCCAGCCCGGGA	360
AIK-C_MRC	CCAGACTCGGGCATCACCCCGGAAAGGAAAGGCGCACACCCCGGACCCAGCCCGGGA	360
Consensus	CCAGACTCGGGCATCACCCCGGAAAGGAAAGGCGCACACCCCGGACCCAGCCCGGGA	
AIK-C_Mori	TCCGGCGGGGAGCCACCCCAACCCGAAACAGCAGCCAGAGCGGATCCCGAAGGACCCCGG	419
AIK-C_Parks	TCCGGCGGGGAGCCACCCCAACCCGAAACAGCAGCCAGAGCGGATCCCGAAGGACCCCGG	420
AIK-C_MRC	TCCGGCGGGGAGCCACCCCAACCCGAAACAGCAGCCAGAGCGGATCCCGAAGGACCCCGG	420
Consensus	TCCGGCGGGGAGCCACCCCAACCCGAAACAGCAGCCAGAGCGGATCCCGAAGGACCCCGG	
AIK-C_Mori	AACCGCAAGGACATCAGTATCCACAGCCTCTCCAGTCCCGCGGTCTCTCTCTCTCTCT	479
AIK-C_Parks	AACCGCAAGGACATCAGTATCCACAGCCTCTCCAGTCCCGCGGTCTCTCTCTCTCTCTCT	480
AIK-C_MRC	AACCGCAAGGACATCAGTATCCACAGCCTCTCCAGTCCCGCGGTCTCTCTCTCTCTCTCT	480
Consensus	AACCGCAAGGACATCAGTATCCACAGCCTCTCCAGTCCCGCGGTCTCTCTCTCTCTCTCT	
AIK-C_Mori	CGAAGGGACCAAAAATCAATCCACCCACCCGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	539
AIK-C_Parks	CGAAGGGACCAAAAATCAATCCACCCACCCGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	540
AIK-C_MRC	CGAAGGGACCAAAAATCAATCCACCCACCCGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	540
Consensus	CGAAGGGACCAAAAATCAATCCACCCACCCGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	
AIK-C_Mori	CAGACACCGGGATCCAGAAATCAGACTCATCCAAATGTCATCATG	586
AIK-C_Parks	CAGACACCGGGATCCAGAAATCAGACTCATCCAAATGTCATCATG	587
AIK-C_MRC	CAGACACCGGGATCCAGAAATCAGACTCATCCAAATGTCATCATG	587
Consensus	CAGACACCGGGATCCAGAAATCAGACTCATCCAAATGTCATCATG	

شکل ۲- مقایسه توالی ژن F تعیین توالی شده با ترادف‌های این ژن در بانک ژن

هر دو توالی موجود برای سویه AIK-C ویروس سرخک در بانک ژن که توسط موری و همکاران (S58435) و پارکز و همکاران (AF266286) گزارش شده در این مقایسه استفاده شده است. ردیف اول شامل توالی موجود از این ناحیه در بانک ژن گزارش شده توسط موری و ردیف دوم توالی مربوط به پارکز است. ردیف سوم توالی حاصل از این تحقیق است. در این شکل

سری تغییرات در پلی پپتیدهای ویروسی که از طریق پاساژهای مکرر در رده‌های سلولی هتروژن صورت می‌گیرد، ایجاد شوند.^(۲۶-۲۱)

بررسی نواحی غیر کدکننده ژن F نشان‌دهنده تأثیر این ناحیه در تضعیف فعالیت ویروس سرخک بود. از آنجا طول ناحیه بین دو ژن M و F در ویروس سرخک به طور غیر معمولی طولانی و حدود ۵۷۴ جفت باز است، به نظر می‌رسد این ناحیه غیر کدکننده برای رشد ویروس‌های نوترکیب در سلول‌های Vero ضروری باشد. این امر در حالی است که مشخص شده این ناحیه باعث تعادل در ترجمه پروتئین می‌شود و در تعیین کدون غالب AUG آغازین از بین چندین کدون AUG اولیه، نقش به‌سزایی دارد. در مقایسه سویه‌های ادمونستون ۵ تغییر بازی در ناحیه 5'-UTR ژن F شناسایی شده است. ۳ مورد از این تغییرات در تمام سوش‌های واکسنی معمول هستند و به نظر می‌رسد این تغییرات در این توالی ممکن است برای رشد ویروس سرخک در انواع سلول‌های نیمه سازگار مؤثر باشد.^(۲۴) این موضوع که تغییر در F mRNA 5'-UTR نقشی در تضعیف این سوش دارد یا نه، هنوز به درستی مشخص نشده است. اما مطالعه‌ها نشان می‌دهند ویروس‌های نوترکیبی که فاقد این توالی هستند از نسخه برداری کم‌تری در کشت‌های سلولی برخوردارند.^(۲۴ و ۲۱) از طرف دیگر در مطالعه‌های انجام شده در بخش زیست‌شناسی مولکولی و ایمنی‌شناسی دانشگاه زوریخ آلمان مشخص شد که حذف در ناحیه 5'-UTR باعث کاهش شدید میزان تولید ویروس و حدت بیماری‌زایی آن و تغییرهای جزئی در میزان رشد این ویروس می‌شود.^(۱۸ و ۱۹ و ۲۶-۲۳) کاهش در بیان پروتئین F می‌تواند نشان‌دهنده فعالیت 5'-UTR به عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت در ترجمه آن باشد.^(۱۳ و ۱۸ و ۱۹ و ۲۳ و ۲۵) با این حال افزایش میزان بیان ژن F می‌تواند باعث افزایش تولید ویروس در مراحل اولیه عفونت و اتصال نا به هنگام یا زودرس ویروس کامل نشده شود. عدم تجمع سلول‌ها در محیط کشت سلولی ویروس‌های واکسن سوش

فیوژن از تأثیر به‌سزایی به صورت سیس در بیان و عملکرد این پروتئین برخوردار است. از این رو، هر تغییری در این ناحیه می‌تواند باعث کاهش ایمنی‌زایی و در نتیجه کاهش تأثیر واکسن در جامعه شود.^(۲۶-۲۳) در صورتی که تغییر در دیگر نواحی ژنوم ویروس مثل ناحیه کدکننده فیوژن پروتئین و پروتئین هم‌گلوپتینین که در تروپیسیم سلولی مؤثر هستند نیز به اثبات برسد، می‌توان این رده سلولی را به عنوان سلول نامناسب جهت تهیه این واکسن معرفی نمود. امروزه یکی از مسیرهای مطمئن و راحت جهت تهیه واکسن نوترکیب، استفاده از کلون‌سازی و بیان ژن‌هاست. در این راستا به جای استفاده از تمام ویروس یا باکتری برای ایجاد ایمنی، ژن‌های شاخص آنتی‌ژنی کلون و بیان می‌شوند.^(۲۲ و ۲۳ و ۲۷) پژوهش‌های قبلی بر روی تحزیه و تحلیل توالی واکسن‌های انسانی IV₃ و RSV نوع A و B نشان داده‌اند که این ویروس‌ها فاقد سیستم تصحیح‌کنندگی در حین همانندسازی هستند و در نتیجه احتمال تغییرهای نوکلئوتیدی در نواحی سیس آنها وجود دارد.^(۲۴-۲۳) همچنین مشخص شده که این ویژگی در بین سوش‌های واکسن ویروس‌های دارای ژنوم RNA با قطبیت منفی بسیار معمول است. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که نواحی غیر کدکننده سوش در تنظیم‌های رونویسی ویروس نقش مهمی دارد و تغییرهایی که در این دسته از توالی ایجاد می‌شود به راحتی توسط ویروس قابل تحمل نیست.^(۲۴) بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که انجام تنظیم‌های دقیق در توالی‌های سیس، باعث کنترل بیان و همانندسازی ژن تحت شرایط لازم برای رشد انتخابی ویروس سوش واکسنی در سلول‌های نیمه سازگار می‌شود.^(۲۱) با این حال، تاکنون دلیلی دال بر میزان تأثیر توالی‌های تنظیمی موجود در نواحی غیر کدکننده بر نحوه عملکرد نواحی کدکننده مشخص نشده است، اما می‌توان برخی از این موتاسیون‌ها را به عنوان روشی برای تولید و نسخه‌برداری ویروس‌های واکسنی تحت شرایط خاص پیشنهاد نمود. به علاوه جای‌گزینی نوکلئوتیدی در توالی غیر کدکننده سیس می‌تواند در پاسخ به یک

5. Takeda M, Kato A, Kobune F, et al. Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins. *J Virol* 1998 Nov; 72(11): 8690-6
6. Skiadopoulos MH, Surman S, Tatem JM, et al. Identification of mutations contributing to the temperature-sensitive, cold-adapted, and attenuation phenotypes of live-attenuated cold-passage 45 (cp45) human para influenza virus 3 candidate vaccine. *J Virol* 1999 Feb; 73(2): 1374-81
7. Patterson J B, Thomas D, Lewicki H, et al. V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology* 2000 Feb 1; 267(1): 80-9
8. Horikami SM, Moyer SA. Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 191:35-50
9. Valsamakis A, Schneider H, Auwaerter PG, et al. Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J Virol* 1998 Oct; 72(10): 7754-61
10. Mrkic B, Odermatt B, Klein MA, et al. Lymphatic dissemination and comparative pathology of recombinant measles viruses in genetically modified mice. *J Virol* 2000 Feb; 74(3): 1364-72
11. Cattaneo R, Kaelin K, Bacsko K, et al. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 1989 Mar 10; 56(5): 759-64
12. Tidjani O, Grunitsky B, Guerin N, et al. Serological effects of Edmonston-Zagreb, Schwarz, and AIK-C measles vaccine strains given at ages 4-5 or 8-10 months. *Lancet* 1989 Dec 9; 2 (8676): 1357-60
13. Collins PL, Whitehead SS, Bukreyev A, et al. Rational design of live-attenuated

ادمونستون که در ناحیه غیر کدکننده آن‌ها تغییر ایجاد شده بود نشان داد که این دسته از توالی‌ها، عناصر تنظیمی مهمی برای ویروس‌های RNA دار با قطبیت منفی هستند و تغییر در آنها برای ویروس‌ها قابل تحمل نیست. بر این اساس در هنگام تولید واکسن ضعیف شده باید به این نکته توجه کرد که تغییری در نواحی غیر کدکننده صورت نگرفته باشد.^(۱۸، ۱۹، ۲۱ و ۲۴) با توجه به نتایج فوق می‌توان نتیجه گرفت که تغییر کشت سلولی توانسته است باعث بروز تغییرهایی در ناحیه غیر کدکننده پروتئین فیوژن ویروس سرخک سوش AIK-C شود. با توجه به اهمیت ایجاد این تغییر در انتخاب کدون AUG ابتدایی ژن کدکننده پروتئین فیوژن، بررسی دقیق‌تر نقش تغییرهای رخ داده در میزان بیان پروتئین F و امکان تغییر در شرایط ایمنی‌زایی ویروس واکسن لازم است.

*سپاس‌گزاری:

از تمام کارکنان بخش بیوتکنولوژی، سرخک، معاونت پژوهشی و ریاست محترم مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی-حصارک تشکر می‌نماید.

*مراجع:

1. Gershon AA. Measles virus. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 2002. 1519-26 [Vol. 2]
2. Cutts FT, Markowitz LE. Successes and failures in measles control. *J Infect Dis* 1994 Nov; 170 Suppl 1: S32-S41
3. Griffin DE, Bellini WJ. Measles virus in fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2002. 1267-312
4. Schneider H, Spielhofer P, Kaelin K, et al. Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia- T7 vector. *J Virol Methods* 1997 Feb; 64(1): 57-64

recombinant vaccine virus for human respiratory syncytial virus by reverse genetics. *Adv Virus Res* 1999; 54: 423-51

14. Escoffier C, Manie S, Vincent S, et al. Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J Virol* 1999 Feb; 73(2): 1695-8

15. Stokes A, Tierney E L, Sarris CM, et al. The complete nucleotide sequence of two cold-adapted, temperature-sensitive attenuated mutant vaccine viruses (cp12 and cp45) derived from the JS strain of human parainfluenza virus type 3 (PIV3). *Virus Res* 1993 Oct; 30(1): 43-52

16. Sasaki K. Studies on the modification of the live AIK measles vaccine. I. Adaptation of the further attenuated AIK measles virus (the strain of AIK-L33) to chick embryo cells. *Kitasato Arch Exp Med* 1974 Jun; 47(1-2): 1-12

17. Parks CL, Lerch RA, Walpita P, et al. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* 2001 Jan; 75(2): 910-20

18. Griffin HG, Griffin AM. DNA sequencing: recent innovations and future trends. *Appl Biochem Biotechnol* 1993 Jan-Feb; 38(1-2):147-59

19. Tober C, Seufert M, Schneider H, et al. Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol* 1998 Oct; 72(10): 8124-32

20. Griffin DE, Bellini WJ. Measles virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2004. 1267-312

21. Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, et al. Rescue of measles virus from cloned DNA. *EMBOJ* 1995 Dec 1; 14(23):5773-84

22. Whitehead SS, Juhasz K, Firestone CY, et al. Recombinant respiratory syncytial virus (RSV) bearing a set of mutations from cold-passaged RSV is attenuated in chimpanzees. *J Virol* 1998 May; 72(5): 4467-71

23. Sidhu MS, Chan J, Kaelin K, et al. Rescue of synthetic measles virus minireplicons: measles genomic termini direct efficient expression and propagation of a reporter gene. *Virology* 1995 Apr 20; 208(2): 800-7

24. Bousse T, Takimoto T, Murti KG, Portner A. Elevated expression of the human parainfluenza virus type 1 F gene downregulates HN expression. *Virology* 1997 May 26; 232(1): 44-52

25. Nakayama T, Komase K, Uzuka R, et al. Leucine at position 278 of the AIK-C measles virus vaccine strain fusion protein is responsible for reduced syncytium formation. *J Gen Virol* 2001 Sep; 82 (pt 9): 2143-50

26. Nagai Y, Kato A. Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. *Microbiol Immunol* 1999; 43(7): 613-24

27. Makino S. Development and characteristics of live AIK-C measles virus vaccine: a brief report. *Rev Infect Dis* 1983 May- Jun; 5(3): 504-5