Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره اول، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۲: ۱۰۰-۹۱

کلونینگ و بیان ژن VP3 ویروس بیماری بورس عفونی در *اشرشیا کولی* و تخلیص پروتئین VP3 نوترکیب

مسعود رضا صیفی‌آباد شاپوری[1*]، مسعود قربانپور[1]، علی محبت[2]، محمد رشنو[2]، غلامرضا دهنوی زاده کازرونی[3]

۱- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانش آموخته دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۰ شهریور ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: ۳۰ خرداد ۱۳۹۴

چکیده: *بیماری بورس عفونی یا گامبورو، یکی از بیماری‌های ویروسی بسیار واگیر طیور است که در صنعت طیور در سراسر جهان باعث زیان‌های اقتصادی می‌شود. از آنجایی که پس از عفونت با ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV) اولین آنتی‌بادی‌ها بر ضدپروتئین ساختمانی VP3 تولید می‌شوند، این پروتئین آنتی ژن مناسبی برای استفاده در الیزا می‌باشد. باتوجه به دشوار بودن تهیه VP3طبیعی از IBDV یا سلول‌های آلوده به ویروس، VP3 نوترکیب بیان شده در اشرشیا کولی می‌تواند آنتی‌ژن مطلوبی برای این منظور محسوب شود. مطالعه حاضر با هدف کلونینگ ژن VP3 سویه ویروس واکسن D78 در پلاسمید pMal-C2X (یک پلاسمید بیانی پروکاریوتی) و بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب انجام گردید. بنابر این ژن VP3 با آزمایش RT-PCR تکثیر داده شده و پس از هضم با آنزیم‌های محدودگر مناسب در پلاسمید pMal-C2X کلون گردید. پس از تعیین توالی و اطمینان از کلونینگ موفق این ژن، بیان پروتئین نوترکیب با آزمایش SDS-PAGE تایید گردید. در ادامه پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی حاوی رزین آمیلوز خالص شد. بررسی واکنش پروتئین VP3 نوترکیب در آزمایش ایمونوبلاتینگ نشان داد که پروتئین تولید شده از نظر آنتی ژنی فعال می‌باشد. با توجه به راندمان بالای تولید در این سیستم، پروتئین بیان شده کاندیدای مناسبی برای طراحی آزمایش الیزا و سنجش تیتر آنتی بادی علیه ویروس بیماری بورس عفونی می‌باشد.*

کلمات کلیدی: *ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV)، پروتئین VP3، کلونینگ، پلاسمید pMal-C2X*

*نویسنده مسئول: مسعود رضا صیفی‌آباد شاپوری

آدرس: ایران، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی. تلفن: ۱۹-۳۳۳۰۰۱۰ داخلی ۴۱۲۶ همراه: ۰۹۱۶۱۱۳۳۲۴۷

پست الکترونیکی: masoudrs@scu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیماری بورس عفونی (Infectious Bursal Disease) یا گامبورو یکی از بیماری‌های بسیار واگیر طیور است که در صنعت طیور در سراسر جهان باعث زیان‌های اقتصادی می‌شود (۴، ۱۴ و ۲۳). عامل ایجاد کنندهٔ این بیماری، ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV) است (۹). عفونت با این ویروس در جوجه‌های با سن کمتر از ۳ هفته، می‌تواند موجب یک فرم تحت بالینی بیماری گردد که متعاقبا به علت از دست رفتن عملکرد بورس فابریسیوس به سرکوب شدید سیستم ایمنی می‌انجامد (۱۷). در جوجه‌های بزرگتر از ۳ هفته، بسته به حدت ویروس، عفونت ممکن است به یک بیماری حاد و با تلفات بالا منجر گردد (۸ و ۱۸). کنترل عفونت IBDV در حال حاضر بوسیله واکسیناسیون حاصل می‌شود (۱۴) و سرولوژی برای تعیین روز مطلوب واکسیناسیون بسیار ضروری است (۵). ویروس IBDV از جنس آوی بیرناویروس و از خانواده بیرناویریده است. ژنوم شامل دو قطعه RNA دو رشته‌ای، به نام قطعات A و B است (۱۵). قطعه B تنها آنزیم RNA پلیمراز ویروس (VP1) را کد می‌کند اما قطعه A پلی پپتیدی با طول ۱۰۸کیلو دالتون را کد می‌کند که به طور خودبخود و با فعالیت پروتئازی VP4 شکسته شده و پروتئین‌های VP2، VP3 و VP4 از یکدیگر جدا می‌گردند. VP2 پروتئین ساختاری اصلی ویروس است که حاوی نواحی آنتی ژنی مسئول ایجاد آنتی‌بادی خنثی‌کننده است (۸). VP3 با وزن مولکولی ۳۲ کیلو دالتون پروتئین اسکلتی ویریون را تشکیل می‌دهد و پس از عفونت با ویروس و یا واکسیناسیون با واکسن غیر فعال IBDV، اولین آنتی-بادی‌ها بر ضد VP3 ظاهر می‌شوند. از سوی دیگر این پروتئین بر خلاف VP2 نقش بسیارمهمی در تولید آنتی بادی‌های خنثی‌کننده ندارد و توالی آن به خوبی در جدایه‌های IBDV حفاظت شده است (۶). بنابراین VP3می‌تواند بعنوان آنتی ژنی مناسب برای تشخیص آنتی‌بادی‌های القا شده توسط ویروس بکار رود.

در حال حاضر برای تشخیص آنتی‌بادی ضد IBDV کیت‌های تجاری ELISA در دسترس است. منبع معمول آنتی‌ژن برای این کیت‌ها غالبا ویریون کامل است (۱۲، ۲۰، ۲۱ و ۲۲) که با استفاده از گرادیان کلرید سزیم و اولتراسانتریفیوژ خالص‌سازی می‌شود. با توجه به هزینه بالا برای خالص‌سازی ویروس کامل IBDV، تاکنون مطالعات متعددی به منظور جایگزین کردن ویروس کامل با پروتئین‌های نوترکیب IBDV صورت گرفته است (۲، ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۹ و ۲۴).

هدف از مطالعه حاضر کلونینگ و بیان ژن VP3 ویروس بیماری بورس عفونی در *اشرشیا کولی*، با استفاده از پلاسمید pMal-C2X، برای تولید پروتئین VP3 نوترکیب قابل استفاده در الیزا می‌باشد.

مواد و روش کار

استخراج RNA و RT-PCR برای تکثیر ناحیه ژنی کُدکننده VP3

به عنوان ویروس مرجع، از سویه ویروس واکسن D78 بیماری بورس‌عفونی (شرکت اینتروت، هلند) استفاده شد. RNA این ویروس با استفاده از محلول تجاری Tripure (شرکت روش، آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (VP3F: GCGAGAATTCCGTTTCCCTCACAATCCAC و VP3R: GCGAGTCGACTCACATCTCCATCGCAGTCA) براساس توالی ژنوم این ویروس (با شماره دسترسی AF499929در بانک ژن)، ناحیه‌ای از ژن کدکننده VP3 بطول ۷۵۰ نوکلئوتید که فاقد ۴۰ اسید آمینه انتهایی ناحیه کربوکسیل می‌باشد (۲۴) با آزمایش RT-

Archive of SID

www.SID.ir

PCR تکثیر گردید. به این منظور در ابتدا ۱۰/۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده با ۱ میکرولیتر (۲۵ پیکومول) از هریک ازپرایمرهای طراحی شده (به دلیل دو رشته‌ای بودن ژنوم ویروس) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C قرارداده شد. سپس میکروتیوب حاوی این مواد بلافاصله و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. در مرحله بعد به این مخلوط ۴ میکرولیتر بافر 5X واکنش رونوشت برداری معکوس، ۲ میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتیدهای چهارگانه (dNTP mix) با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر (۲۰ واحد) مهارکننده RNase (**شرکت** فرمنتاس- لیتوانی) و ۱ میکرولیتر (۲۰۰ واحد) آنزیم نسخه بردار معکوس M-MuLV RevertAid™ (**شرکت** فرمنتاس- لیتوانی) اضافه شد. واکنش نسخه برادری معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲°C انجام و با ۱۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای ۷۰°C پایان داده شد. پس از انجام واکنش نسخه برادری معکوس، DNA مکمل (cDNA) ساخته شده در این مرحله با آزمایش PCR و با استفاده از پرایمرهای فوق تکثیر داده شد. در آزمایش PCR ۵ میکرولیتر از cDNA با ۲۵ پیکومول از هریک از پرایمرهای فوق، ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس PCR 2X (شرکت سیناژن، ایران) که غلظت کلرید منیزیوم آن ۳ میلی مولار می‌باشد در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط و طی برنامه دمایی ۹۵ درجه بمدت ۳دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی ۱ دقیقه در ۹۵ درجه، ۱دقیقه در ۶۰ درجه و ۱ دقیقه در۷۲ درجه و یک مرحله ۷۲ درجه نهایی بمدت ۷ دقیقه تکثیر داده شد.

کلونینگ و بیان قطعه ژن VP3

پس از انجام PCR و دستیابی به قطعه DNA مورد نظر، محصول PCR و پلاسمید pMAL-C2X (شرکت نیوانگلندز بیولب، آمریکا) توسط آنزیم‌های محدودگر *EcoRI* و *SalI* که محل برش آنها در پرایمرها درنظر گرفته شده بود هضم و پس از خالص‌سازی با کیت استخراج DNA از ژل (شرکت ویوانتیس، مالزی) خالص شدند. واکنش لیگاسیون بین پلاسمید و محصول PCR با استفاده از آنزیم لیگاز T4 (شرکت فرمنتاس، لیتوانی) و طبق دستوالعمل آنزیم انجام شد. سپس سویه TG1باکتری *اشرشیا کولی* با محصول لیگاسیون و با روش استفاده از کلرید کلسیم و شوک حرارتی ترانسفورمه شد (۳). غربالگری کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون، رشد یافته بر روی محیط آگار LB دارای ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین، با روش PCR انجام شد. سه کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب انتخاب و از نظر بیان پروتئین MBP-VP3 و توالی نوکلئوتیدی ژن VP3 موردبررسی قرارگرفتند. جهت بررسی بیان پروتئین نوترکیب، کلونی‌های منتخب هریک در ۳ میلی لیتر محیط LB مایع دارای ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین بطور شبانه کشت داده شدند. سپس کشت‌های شبانه به نسبت ۱/۱۰۰ در محیط LB مایع دارای ۱۰۰µg/ml آمپی-سیلین تا رسیدن به کدورت ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رشد داده شدند. در این مرحله به منظور القاء بیان پروتئین، IPTG (ایزوپروپیل بتا دی-گالاکتوپیرانوزید) با غلظت نهایی ۱ mM اضافه شد و کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه تا ۲ ساعت ادامه یافت. نمونه‌های تهیه شده پیش و پس از افزودن IPTG، با الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید و رنگ-آمیزی ژل با رنگ آبی کوماسی، از نظر بیان پروتئین نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفتند. پلاسمیدهای نوترکیب از سه کلونی بیان‌کننده پروتئین با کیت استخراج پلاسمید (شرکت فلدان، کانادا) استخراج و به

Archive of SID

www.SID.ir

منظور تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M13 F و malE به شرکت تکاپو زیست ارسال شد.

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب MBP-VP3

یکی از کلون‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب که پروتئینی با وزن ملکولی قابل انتظار برای پروتئین MBP-VP3 را تولید می‌نمود برای کشت و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب انتخاب شد. کشت شبانه این باکتری به نسبت ۱/۱۰۰ در ۵۰۰ میلی لیتر محیط LB مایع دارای ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین مخلوط و تا رسیدن به کدورت ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رشد داده شد. سپس برای القاء بیان پروتئین، همانند قبل IPTG با غلظت نهایی ۱ mM اضافه شد. دو ساعت بعد از افزودن IPTG، سوسپانسیون باکتریایی در دور g ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و به رسوب باکتریایی بافر ستون خالص‌سازی (حاوی ۲۰mM Tris، ۲۰۰mM NaCl و ۱ mM EDTA با pH ۷/۴) به نسبت ۵ میلی لیتر بافر ستون برای رسوب ۸۰ میلی لیترسوسپانسیون باکتریایی افزوده شد. سوسپانسیون باکتری در بافر ستون پس از ۵ مرتبه انجماد در فریزر ۷۰- درجه و ذوب در آب سرد با قدرت g ۱۸۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به عنوان فاز پروتئین‌های محلول به لوله دیگری منتقل شد تا از ستون حاوی رزین آمیلوز عبور داده شود.

برای تهیه ستون رزین آمیلوز، ۳ میلی لیتر رزین آمیلوز (شرکت نیوانگلندز بیولب، آمریکا) در یک سرنگ پلاستیکی ۱۰ میلی لیتری که انتهای خروجی آن توسط الیاف پشم شیشه مسدود شده بود، ریخته شد. بعد از رسوب رزین در سرنگ، ستون تهیه شده چندین مرتبه با بافر ستون شستشو داده شد. سپس فاز پروتئین‌های محلول باکتری که روش تهیه آن در بالا ذکر گردید با نسبت ۱ به ۵ با بافر ستون رقیق شده و به آرامی از ستون رزین آمیلوز عبور داده شد. در ادامه، ستون با ۱۲ برابر حجم رزین با بافر ستون شستشو گردید. در آخرین مرحله بافر ستون حاوی ۱۰ میلی-مولار مالتوز به ستون اضافه گردید و اقدام به جمع-آوری ۱۵ نمونه ۱/۵ میلی لیتری از خروجی ستون درون میکروتیوب‌های استریل گردید. در آخر حضور پروتئین نوترکیب در نمونه‌های جمع‌آوری شده، با SDS-PAGE بررسی گردید.

ایمونوبلاتینگ

جهت بررسی واکنش پروتئین نوترکیب بیان شده با سرم‌های مثبت و منفی (از نظر آنتی بادی ضد IBDV) از آزمایش ایمنوبلاتینگ استفاده شد. در این آزمایش پس از الکتروفورز نمونه‌ای از پروتئین نوترکیب خالص شده و نیز پروتئین خالص شده MBP در ژل پلی اکریلامید (SDS-PAGE)، پروتئین‌ها از ژل به غشای نیتروسلولز انتقال داده شدند. سپس غشاء نیتروسلولز برای بلاک شدن به مدت ۳ ساعت در محلول PBS حاوی ۵٪ درصد شیر خشک بر روی روتاتور قرار گرفت. پس از پایان مرحله بلاک کردن، محلول بلاک‌کننده تخلیه گردید و غشاء نیتروسلولز سه مرتبه، هر مرتبه ۵ دقیقه، با PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBST) شستشو گردید. پس از شستشو، سرم‌های مثبت و منفی مرغی که قبلاً از نظر وجود آنتی‌بادی ضد IBDV با یک کیت الیزای تجاری (شرکت آیدکس، آمریکا) آزمایش شده بودند به نسبت ۱/۵۰۰ در PBST حاوی ۲ درصد شیر خشک رقیق شده و روی غشاء اضافه گردیدند. انکوباسیون غشا در این محلول به مدت ۱ ساعت و بر روی روتاتور انجام شد. بعد از اتمام این

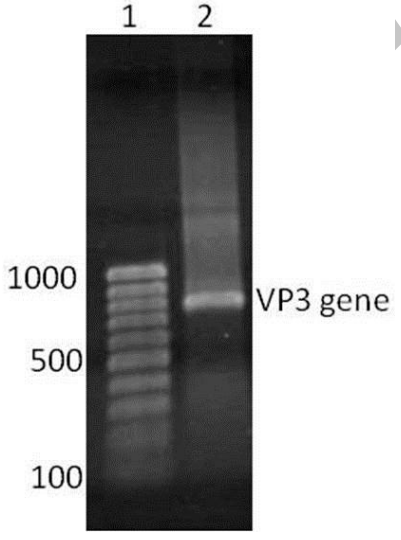
Archive of SID

www.SID.ir

مرحله، شستشو همانند مرحله اول انجام شد و سپس غشاء به مدت ۱ ساعت در رقت ۱/۴۰۰۰ کونژوگه پراکسیداز Anti-Chicken IgG (شرکت سیگما، آمریکا) در PBST حاوی ۲ درصد شیر خشک، روی روتاتور قرار داده شد. پس از انجام شستشو شامل ۲ مرحله شستشو با PBST و یک مرحله شستشوی نهایی با PBS معمولی، غشاء به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ظهور حاوی کلرونفتول و آب اکسیژنه (۱۰) قرار داده شد. با ظاهرشدن باند پروتئینی، محلول ظهور تخلیه و به منظور توقف واکنش، غشا نیتروسلولز با آب معمولی شسته شد

نتایج

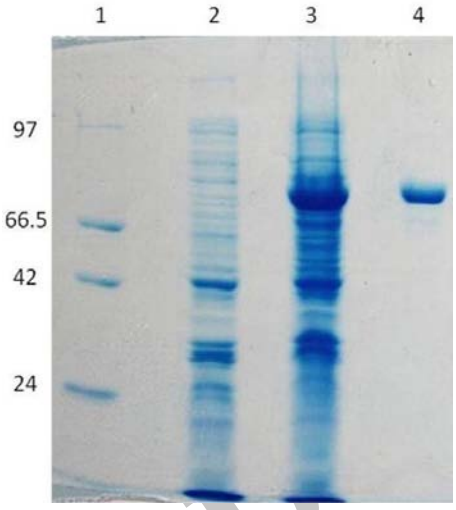
پس از انجام واکنش RT-PCR روی RNA استخراج شده از سویه ویروس واکسن، محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۵٪ در کنار یک مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاس، لیتوانی) به عنوان استاندارد الکتروفورز شد. نتایج الکتروفورز نشان داد که آزمایش PCR با موفقیت منجر به ساخت قطعه DNA مورد انتظار (با طول bp ۷۷۳ با احتساب توالی‌های غیر اختصاصی قرارداده شده در 5' پرایمرها) شده است (شکل ۱). با انجام مراحل هضم و اتصال محصول PCR و پلاسمید pMAL-C2X و سپس انتقال محصول اتصال به سویه‌ی TG1 باکتری *اشرشیا کولی*، ظهور کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط جامد LB آمپی‌سیلین‌دار نشان‌دهنده ورود موفق پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در باکتری‌ها بود. پس از اطمینان از صحت وجود ژن‌ها با غربالگری با PCR، بیان پروتئین‌ها در آن کلون‌ها در SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۲ مشخص شده است، باکتری مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG، حاوی پروتئینی جدید در محدوده میان پروتئین‌های استاندارد ۶۶/۵ و ۹۷ کیلودالتون می‌باشد که با وزن مولکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی (۷۰ کیلودالتون با احتساب وزن ۲۷/۵ کیلودالتون برای ناحیه کلون شده VP3 و ۴۲/۵ کیلودالتون برای پروتئین MBP کُدشده توسط پلاسمید) تقریبا همخوانی دارد. شکل ۲ همچنین نشان می‌دهد که با استفاده از ستون رزین آمیلوز پروتئین نوترکیب بیان شده با راندمان و خلوص نسبتا بالایی خالص شده است. تعیین توالی ژن VP3 در پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M13 F و malE انجام گردید. براساس نتایج تعیین توالی و آنالیز بلاست مشخص شد که توالی قطعه‌ی تکثیر شده مربوط به ژن سازنده‌ی VP3 بوده و این ژن به شکل صحیح در پلاسمید وارد شده است. در شکل ۳، نتیجه آزمایش ایمونوبلاتینگ نشانگر واکنش مثبت پروتئین نوترکیب خالص شده با سرم مثبت و عدم واکنش آن با سرم منفی می‌باشد.



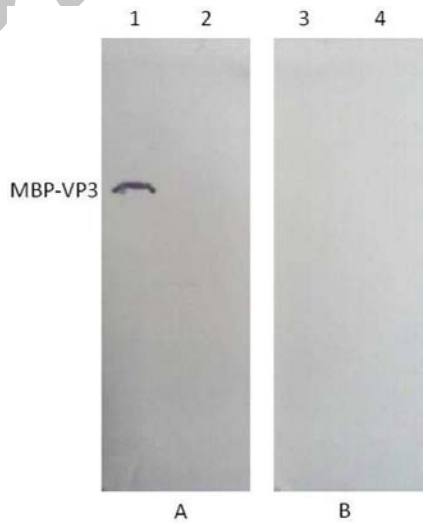
شکل ۱- الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز. چاهک شماره ۱ مارکر ۱۰۰ زوج بازی و چاهک شماره ۲ محصول RT-PCR را نشان می‌دهند. طول قطعات ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ زوج بازی مارکر در کنار آن‌ها نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- آزمایش الکتروفورز در ژل پلی اکریلامید (SDS-PAGE): چاهک‌های شماره ۱ الی ۴ بترتیب نشان دهنده استاندارد وزن ملکولی، پروتئین‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب قبل از افزودن IPTG، پروتئین‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از افزودن IPTG و پروتئین نوترکیب خالص شده با ستون رزین آمیلوز می‌باشند. وزن‌های ملکولی پروتئین‌های استاندارد برحسب کیلودالتون در سمت چپ ژل نشان داده شده‌اند.



شکل۳: آزمایش ایمونوبلاتینگ. در بخش‌های A و B ستون‌های ۱ و ۳ حاوی پروتئین نوترکیب MBP-VP3 و ستون‌های ۲ و ۴ حاوی پروتئینMBP می‌باشند. غشا نیتروسلولز در بخش A با سرم کنترل مثبت و در بخش B با سرم کنترل منفی مجاور شده است.

بحث

تاکنون مطالعات مختلفی در خصوص استفاده از فناوری DNA نوترکیب برای تولید آنتی ژن‌های IBDV که قابل استفاده در آزمایش الیزا باشند صورت گرفته است، زیرا استفاده از ویروس کامل درالیزا مستلزم انجام مراحل خالص‌سازی ویروس با دستگاه اولتراسانتریفیوژ و بطورکلی روشی هزینه بر است. علاوه براین عدم مراقبت درنگهداری و استفاده از پلیت‌های الیزای پوشش داده شده با ویروس کامل ممکن است خطرشیوع عفونت را در پی داشته باشد. از سوی دیگر پروتئین‌های نوترکیب فاقد خطر بیولوژیک بوده و می‌توانند با خلوص و راندمان بالا تولید شوند. بر این اساس پروتئین‌های نوترکیب VP2 و IBDV VP3 درسیستم‌های مختلف بیانی تولید و بعنوان آنتی ژن الیزا مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. برای تولید پروتئین VP2 یا پیش ساز VP2 (VPX) از سیستم بیانی باکلوویروس در سلول حشره (۱۱ و ۱۳) و مخمر (۷) استفاده شده است. همچنین پروتئین VP3 نوترکیب را در *اشرشیا کولی* (۲، ۱۹ و ۲۴) و سلول حشره (۱۳) بیان کرده‌اند.

Jackwood و همکاران (۱۹۹۶) با بیان یک بخش ۹۴۴ زوج بازی ازناحیه کدکننده ژن VP2 تحت تیپ آنتی ژنی Del-A ویروس IBDV در سیستم باکلوویروس و استفاده از پروتئین بیان شده در الیزا دریافتند که این بخش پروتئین تا حد زیادی بطور اختصاصی آنتی بادی‌های ضد این تحت تیپ را ردیابی می‌کند (۱۱).

Martinez-Torrecuadrad و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از باکلوویروس، پروتئین‌های نوترکیب VPX و VP3 را در سلول‌های حشره بیان کرده وسپس آزمایش‌های الیزای طراحی شده با این پروتئین‌ها را با کیت الیزای تجاری (براساس ویروس کامل) و آزمایش خنثی‌سازی مقایسه نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد الیزای طراحی شده با VPX درمقایسه با VP3 همخوانی بیشتری با الیزای تجاری وآزمایش خنثی‌سازی داشت (۱۳).

Archive of SID

www.SID.ir

Dey و همکاران (۲۰۰۹) با بیان ژن کدکننده VP2 در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* موفق به تولید ذرات شبه ویروسی (Virus like particles; VLP) تشکیل شده از پروتئین VP2 شدند. سپس با استفاده از VLPهای تولید شده آزمایش الیزا برای IBDV را طراحی نمودند. آزمایش طراحی شده در مقایسه با آزمایش خنثی‌سازی ویروس دارای حساسیت ۹۹ و ویژگی ۹۴ درصد بود (۷).

در سال ۲۰۰۸، Wang و همکاران (۲۴) پروتئین VP3 را در سویه BL21(DE3) *اشرشیا کولی* بیان نموده و با استفاده از دنباله ۶ هیستیدینی اضافه شده به پروتئین آن را با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل خالص نمودند. سپس آزمایش الیزای طراحی شده با این پروتئین با الیزای تجاری، الیزای طراحی شده با ذارت شبه ویروسی VP2 و آزمایش خنثی‌سازی مقایسه گردید. نتایج گویای این واقعیت بود که آزمایش الیزا برمبنای VP3 بیان شده در *اشرشیا کولی*، نسبت به الیزای VP2 و الیزای تجاری، در مقایسه با آزمایش خنثی‌سازی (بعنوان آزمایش استاندارد) از عملکرد بهتری برخوردار بود. محققین اختلاف مشاهده شده میان نتایج خود و نتایج Martinez-Torrecuadrad و همکاران (۱۳) را که در آن الیزای VPX را بهتر از VP3 یافته بودند، ناشی از روند خالص‌سازی غیرموثر VP3 بیان شده در سلول حشره عنوان نمودند.

پس از مطالعه Wang و همکاران (۲۴)، Alfonso و همکاران (۲) و Singh و همکاران (۱۹) نیز با بیان VP3 دارای دنباله هیستیدنی در *اشرشیا کولی* و سپس طراحی آزمایش الیزا، قابلیت بالای این پروتئین را برای ردیابی آنتی بادی‌های ضد IBDV تایید نمودند. قابلیت بالای VP3 برای استفاده در الیزا می‌تواند به این دلیل باشد که این پروتئین علیرغم درگیر نبودن در روند محافظت و تولید آنتی بادی‌های خنثی‌کننده، از خاصیت ایمنی زایی بالای برخورداراست. براساس شواهد موجود اولین آنتی بادی‌هایی که در پاسخ به عفونت با IBDV یا واکسیناسیون تولید می‌شوند با این پروتئین واکنش می‌دهند (۶) و این نشانگر ایمنی‌زایی بالای VP3 است. از سوی دیگر بدلیل عدم ارتباط این پروتئین با محافظت و نیز حضور آن درداخل ویروس، ژن کُدکننده VP3 از ثبات ژنتیکی بالایی برخوردار است و در نتیجه احتمال تغییرات اسید آمینه ایی ناشی از جهش که در VP2 بروز می‌کنند در VP3 بسیار کمتر است.

با توجه به شیوع بالای بیماری گامبورو در ایران و متداول شدن آزمایش الیزا برای بررسی سطح ایمنی گله‌های طیور و تعیین سن مناسب واکسیناسیون، در این تحقیق با هدف نهایی ساخت کیت الیزای گامبورو، تلاش گردید تا آنتی ژن مورد نیاز از طریق کلونینگ و بیان ژن VP3 با استفاده از پلاسمید بیانی پروکاریوتی pMAl-C2X تولید گردد. علت انتخاب این پلاسمید این است که اولا این پلاسمید از پروموتر (پروموتر lac) کارآمدی برای بیان ژن برخوردار است. ثانیا پروتئین‌های تولید شده در این سیستم بصورت متصل به MBP تولید می‌شوند. دنباله MBP اگرچه پروتئینی نسبتا بزرگ است اما براساس مطالعات قبلی (۱) تداخلی در انجام آزمایش الیزا با استفاده از سرم‌های مرغ ایجاد نمی‌کند. مزیت دیگر که در انتخاب این پلاسمید تاثیرگذار است اقتصادی بودن هزینه خالص‌سازی پروتیئن با استفاده از رزین آمیلوز است. رزین آمیلوز که برای خالص‌سازی پروتئین‌های دارای دنباله MBP بکار می‌رود در مقایسه با ستون کروماتوگرافی افینیتی نیکل ارزان قیمت تر است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که حتی در صورت عدم دسترسی به رزین آمیلورز می‌توان با شیوه‌ای بسیار کم هزینه و با استفاده آرد برنج

Archive of SID

www.SID.ir

که منبعی از آمیلوز می‌باشد این نوع پروتئین‌ها را تا حدی خالص نمود (۱۶).

بطور کلی نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که باکتری *اشرشیا کولی* سویه TG1، ترانسفورمه شده با پلاسمید pMAL-C2X حاوی ژن VP3 بخوبی این پروتئین را بیان می‌کند. پروتئین بیانی (MBP-VP3) تولید شده نیز محلول و با استفاده از ستون رزین آمیلور کاملا قابل تخلیص است. از سوی دیگر آزمایش ایمونوبلاتینگ نشان داد که این پروتئین از نظر خصوصیات آنتی ژنی فعال است و توسط یک سرم دارای آنتی بادی ضد IBDV شناسایی می‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که سیستم بیانی مورد استفاده در این تحقیق از کارآمدی لازم برای تولید VP3 نوترکیب مورد نیاز برای طراحی الیزا برخوردار می‌باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله حاضراز معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه اجرای این تحقیق را فراهم نمود تشکر می گردد.

منابع

۱. جایدری، ا. (۱۳۹۰). کلونینگ و بیان ژن NP ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در *اشریشیا کلی*، رساله دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران.

2. Alfonso, A., Noda, J. (2010). Factibilidad del uso de la proteína recombinante VP3 de Gumboro en un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA. *Revista Electrónica de Veterinaria* **11**: 1-8.

3. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1992). *Short protocols in molecular biology*, 2nd ed., Greene Publishing Associates and John Willey & Sons, United States.

4. Balamurugan, V., Kataria, J.M. (2006). Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral diseases of chicken current status. *Veterinary Research Communication* **30**: 541-66.

5. De Wit, J.J., Van de Sande, H.W., Counotte, G.H., Wellenberg, G.J. (2007). Analyses of the results of different test systems in the 2005 global proficiency testing schemes for infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus antibody detection in chicken serum. *Avian Pathology* **36**: 177-83.

6. Deng, X., Gao, Y., Gao, H., Qi, X., Cheng, Y., Wang, X. (2007). Antigenic structure analysis of VP3 of infectious bursal disease virus. *Virus Research* **129**: 35-42.

7. Dey, S., Upadhyay, C., Mohan, C.M., Kataria, J.M., Vakharia, V.N. (2009). Formation of sub-viral particles of the capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus and its application for serological diagnosis. *Journal of Virological Methods* **157**: 84-9.

8. Fahey, K.J., Erny, K., Crooks, J. (1989). A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus. *Virology* **70**: 1473-81.

9. Giambrone, J.J., Ewert, D.L., Eidson, C.S. (1977). Effect of infectious bursal disease virus on the immunological responsiveness of the chicken. *Poultry Science* **56**: 1591-4.

10. Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, United States of America, PP: 139-239.

11. Jackwood, D.J., Henderson, K.S., - Jackwood, R.J. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay-based detection of antibodies to antigenic subtypes of infectious bursal disease viruses of chickens. *Clinical Diagnosis and Laboratory Immunology* **3**: 456-63.

12. Marquardt, W.W., Johnson, R.B., Odenwald, W.F., Schlotthober, B.A. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Diseases* **24**: 375-85.

13. Martınez-Torrecuadrada, J.L., Lazaro, B., Rodriguez, J.F., Casal, J.I. (2000). Antigenic properties and diagnostic

Archive of SID

www.SID.ir

potential of baculovirus-expressed infectious bursal disease virus proteins VPX and VP3. *Clinical Diagnosis and Laboratory Immunology* **7**: 645-51.

14. Muller, H., Islam, M.R., Raue, R. (2003). Research on infectious bursal disease- the past, the present and the future. *Veterinary Microbiology* **97**: 153-65.
15. Mundt, E., Muller, H. (1995). Complete nucleotide sequences of 5 and 3-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. *Virology* **209**: 10-8.
16. Neissi, A., Seyfi Abad Shapouri, M.R., Ghorbanpoor Najafabadi, M., Jaydary, A. (2013). Using rice flour for purification of maltose binding fusion proteins expressed in *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology* **6**: 233-6.
17. Okoye, J.O., Uzoukwu, M. (1981). An outbreak of infectious bursal disease among chickens between 16 and 20 weeks old. *Avian Diseases* **25**: 1034-8.
18. Sharma, J.M., Kim, I.J., Rautenschlein, S., Yeh, H.Y. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental Comparative Immunology* **24**: 223-35.
19. Singh, N. K., Sohini, D.C., Madhan, M., Kataria, J.M., Vikram, N.V. (2010). Evaluation of four enzyme linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to infectious bursal disease in chickens. *Journal of Virological Methods* **165**: 277-82.
20. Snyder, D.B., Marquardt, W.W., Mallinson, E.T., Savage, P.K., Allen, D.C. (1984). Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis, infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. *Avian Diseases* **28**: 12-24.
21. Snyder, D.B., Marquardt,W.W., Mallinson, E.T., Russek-Cohen, E., Savage, P.K., Allen, D.C. (1986). Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. IV. Association of infectious bursal disease serology with broiler flock performance. *Avian Diseases* **30**: 139-48.
22. Thayer, S.G., Villegas, P., Fletcher, O.J. (-1987). Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays and conventional methods for avian serology. *Avian Diseases* **31**: 120-4.
23. Van der Berg, T.P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology*. **29**: 175-94.
24. Wang, M.Y., Hu, H.L., Suen, S.Y., Chiu, F.Y., Shien, J.H., Lai, S.Y.(2008). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting infectious bursal disease virus (IBDV) infection based on the VP3 structural protein. *Veterinary Microbiology* **131**: 229-36.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 1, 2016

Cloning and Expression of VP3 Gene of Infectious Bursal Disease Virus in *E. coli* and Purification of the Recombinant Protein

Seyfi Abad Shapouri, M.R.[1*], Mohebat, A.[2], Ghorbanpour, M.[1], Rashno, M.[2]

1. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. PhD Student, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received Date: 1 September 2014 *Accepted Date: 20 June 2015*

Abstract: *Infectious bursal disease or Gumboro, is a highly contagious viral disease of poultry which causes economic losses in the poultry industry, worldwide. Following infection, the first antibodies are produced against the structural VP3 protein of the Infectious bursal disease virus (IBDV); therefore, VP3 is a suitable antigen for use in ELISA. Given the difficulty of purifying native VP3 from IBDV or virus-infected cells, recombinant VP3 expressed in E. coli can be considered for this purpose. This study was performed with the aim of cloning the VP3 gene of D78 vaccine strain of the virus in pMal-C2X plasmid (a prokaryotic expression plasmid) and the expression and purification of the recombinant protein. Thus, VP3 gene was amplified by RT-PCR and cloned in plasmid pMal-C2X, after digestion with appropriate restriction enzymes. After sequencing to ensure the successful cloning of the gene, the expression of recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE. In the following, the recombinant protein was purified using amylose resin chromatography column. Evaluation of the recombinant VP3 protein in immunoblotting showed that the produced protein was antigenically active. Considering the high efficiency of protein production in this system, the expressed protein is a good candidate for the design of ELISA to measure antibody titers against infectious bursal disease virus (IBDV).*

Keywords*: Infectious bursal disease virus (IBDV); VP3 protein; Cloning; pMal-C2X plasmid*

**Corresponding author: Seyfi Abad Shapouri, M.R.*
Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. *Tel: +989161133247*
Email: masoudrs@scu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir