JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره اول، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۴: ۹۸-۸۹

کلون و بیان ژن vp1 ویروس تب برفکی و *fliC* سالمونلا در باکتری *اشرشیاکلای*

مهرنوش قدیر [۱]، دکتر سید محمود عظیمی [۲*]، دکتر ناصر هرزندی [۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۲-استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش تب برفکی، کرج، ایران

۳-استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۵ *تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱۰*

چکیده

تب برفکی یک بیماری وزیکولی ویروسی است که منجر به بروز خسارات وسیع در صنعت دامپروری می‌گردد. امروزه برای کنترل این بیماری از ویروس غیرفعال شده استفاده می‌شود که مهمترین نقطه ضعف آن کوتاه بودن طول دوره ایمنی است. لذا تلاش‌های زیادی در زمینه بکارگیری ادجوانهای مؤثرتر در فرمولاسیون واکسن صورت گرفته است. هدف از این تحقیق تولید فیوژن پروتئین VP1 ویروس تب برفکی (Opanasia2) و فلاژلین سالمونلا (fliC)به عنوان یک ادجوانت مولکولی است. ژن 1D که مسئول سنتز پروتئین VP1است به طول ۸۰۰ bp توسط PCR تکثیر داده شد و در وکتور PTZ57 کلون گردید، سپس این وکتور توسط آنزیم‌های HindIII و XhoI برش داده شده و در داخل ناقل بیانی pET41b که حاوی ژن فلاژلین سالمونلا بود کلون گردید. پلاسمید نوترکیب به باکتری Escherichia coli(BL21DE3)انتقال داده شد و بیان توسط IPTG(0.5 mM)القا گردید. بیان پروتئین توسط SDS-PAGE در ژل آکریل آمید ۱۲٪ و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. الحاق ژن‌های vp1 و fliC با استفاده از روش PCR و هضم آنزیمی با دو آنزیم HindIII و XhoI با مشاهده باندهایی به طولهای تقریبی ۷۰۰bp و ۱۵۰۰ تأیید گردید. برای خالص‌سازی از رزین Ni-NTA و گرادیان pH استفاده شد که بیشترین میزان بازیافت پروتئین در pH ۴/۵ مشاهده گردید. بیان پروتئین با مشاهده باند ۷۶KDa در آزمایش SDS-PAGE در ژل ۱۲٪ آکریل آمید ووسترنبلات توسط AntiHis دررسوب باکتری القاءشده تاییدگردید. با توجه به نتایج به دست آمده ژن فیوژن vp1- $fliC_{salmonella}$ با طول 2200 bp کلون گردیده و پروتئین حاصل باوزن KDa76 با موفقیت بیان و تخلیص گردید.

کلید واژگان: ویروس تب برفکی- کلون و بیان- ژن vp1

*نویسنده مسئول: سید محمود عظیمی

آدرس: موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش تب برفکی، کرج، ایران. تلفن: ۲۲۲۸-۳۴۵۷۰۰۳۸

پست الکترونیکی: M.azimi@rvsri.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ویروس بیماری تب برفکی (Food- and- Mouth Disease) عامل یکی از بیماری‌هایی است که باعث زیان‌های اقتصادی زیادی در دام‌ها می‌گردد و یکی از موانع اصلی در تأمین بهداشت و تولید دام و فراورده‌های دامی محسوب می‌شود، که توجه اغلب دامپزشکان کنترل کننده بیماری‌ها را به خود جلب نموده است. به دلیل سرعت انتقال بالا، تکثیر سریع، درگیر نمودن طیف وسیعی از حیوانات زوج سم اهلی و وحشی و انتشار فرا قاره‌ایی و خساراتی که به تولید شیر و گوشت و سایر محصولات حیوانی وارد می‌کند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. واگیری در دام‌های حساس بسیار بالا (۱۰۰ درصد) ولی میزان مرگ‌ومیر پایین است و اغلب دام‌های جوان را در برمی‌گیرد. از نظر دفتر بین‌المللی بیماری‌های واگیر مشترک انسان و دام (OfficInternational Des Epizootic-OIE) تب برفکی مهم‌ترین بیماری عفونی در تجارت بین‌المللی حیوانات و محصولات حیوانی است (۱). عامل بیماری یک RNA ویروس از خانواده *پیکورنا ویریده* از جنس *آفتوویروس*است که دارای هفت سروتیپ A, O, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3 و سویه‌های متعددی می‌باشد (۱, ۶). عامل مولد بیماری تب برفکی تنها عضو جنس *آفتو ویروس* است. این ویروس دارای تقارن بیست ۲۰ وجهی با قطر ۳۰-۲۵ نانومتر است. دارای ریبو نوکلئیک اسید تک رشته ایبا پلارتیه مثبت بوده و از حدود ۸۴۵۰ باز تشکیل شده است. این ویروس فاقد پوشش لیپوپروتینی است. در میان نشخوارکنندگان اهلی در درجه اول گاو سپس گوسفند و بز نسبت به این بیماری حساس هستند. اعضای این خانواده در زمره کوچکترین ویروس‌های شناخته شده حاوی RNA هستند. در عین حال یکی از بزرگترین و مهمترین خانواده‌های ویروسی را از لحاظ وجود عوامل بیماری زای در انسان و دام به خود اختصاص می‌دهند. کپسید این ویروس از ۴ عدد پروتئین ساختمانی به نام‌های VP4,VP3,VP2,VP1 تشکیل شده است. مطالعات ایمونولوژیک حاکی از آن است که اپیتوپ غالب مسئول القای پاسخ آنتی بادی خنثی کننده، آمینواسیدهای موجود در لوپ-G H واقع در سطح VP1 است (۱). تاکنون مطالعات و تحقیقات وسیعی برای کنترل این بیماری مخرب صورت گرفته است. اما هنوز واکسن سنتی که دارای ویروس غیرفعال است، بعنوان تنها فرآورده تجاری و قابل عرضه در حجم انبوه جهت ایمن سازی جمعیت‌های حساس دامی مورد استفاده قرار می‌گیرد. عمده‌ترین ضعف واکسن‌های سنتی نقص آن‌ها در ایجاد ایمنی دراز مدت در دام‌های واکسینه می‌باشد. این موضوع عمدتاً ناشی از ناتوانی واکسن‌های غیر فعال شده درتحریک ایمنی سلولی و ایجاد خاطره ایمنی پایدار می‌باشد. برای رفع این مشکل لازم است که طی فرآیند ایمن سازی، واکسیناسیون‌های متعدد و نزدیک به هم صورت گیرد. این موضوع علاوه بر تحمیل هزینه‌های اضافی با مشکلات مدیریتی و بهداشتی درگله ها همراه خواهد بود. از سوی دیگر خطر انتشار ویروس عفونی از سایت‌های تولید کننده واکسن خصوصاً در کشورهای که عاری از بیماری می‌باشند، بر نگرانی‌های استفاده از تکنولوژی قدیمی می‌افزاید (۱, ۷ و ۸). در سال‌های اخیر تحقیقات وسیعی جهت تولید واکسن‌های نوین از قبیل واکسن‌های تحت واحدی، نوترکیب،DNA واکسن‌ها و یا بکارگیری ادجوان های مختلف در فرمولاسیون نهایی واکسن صورت گرفته است. نتایج بکارگیری

Archive of SID

www.SID.ir

اینگونه فرآورده‌ها هنوز مورد بحث و بررسی می‌باشد (۷ و ۸). فلاژلین یکی از گزینه‌ها یست که اخیراً بعنوان ادجوان در تولید واکسن‌ها مطرح شده است. فلاژلین ممکن است بعنوان یک ادجوان مولکولی بصورت منفک یا فیوز شده به پروتئین هدف مورد استفاده قرار گیرد (۳). هدف از مطالعه حاضر کلونینگ ژن *vp1*(1D) ویروس تب برفکی و فلاژلین در یک قاب ترجمه ایی واحد و تولید پروتئین فیوژن می‌باشد.

مواد و روش ها

ویروس تب برفکی

سویه واکسینال ویروس تب برفکی، سروتیپ $O_{Panasia2}$ برروی کشت مونولایر BHK- 21 تهیه گردید. برای این منظور بذر ویروس به فلاسک کشت سلول ۱۷۵ سانتی مربعی افزوده شد. پس از ۴۸ ساعت تمامی سلول‌ها دچار CPE (Cytophaticeffect) شدند. از مایع بالایی پس از سانتریفوژ (۲۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه) به عنوان استوک ویروسی استفاده شد.

سویه‌های باکتری، پلاسمیدها و محیط‌های کشت

از *اشرشیاکلی* سویهBL21DE3 به عنوان میزبان کلونینگ و بیان استفاده شد. پلاسمیدهایPTZ57 (FermentasLithuania), و PET41b(Novagen, USA) به عنوان ناقل‌های کلونینگ و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند. سلول باکتری حاوی ناقل نوترکیب، برروی محیط کشت مایع Luria Brittany Broth) ۱ درصد تریپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ درصد کلرید سدیم) حاوی ۱۰۰µl/ml کانامایسین کشت داده شد. PH محیط کشت ۷/۵ تنظیم و سلول‌ها به شکل هوازی در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

استخراج RNA ویروسی و تهیه cDNA

استخراج RNA ویروس از کشت سلول BHK-21 با استفاده از کیت (Roche) High purification viral extraction مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. RNA ی استخراج شده در دمای ۲۰- نگهداری شد. ساخت cDNA ژنومی با استفاده از کیت Prime RT Premix 2x(Genet Bio) و در حجم نهایی ۲۰ µl(Random hexamer0.4µl, DEPC Water 14.6 RNA 4µl, Oligo(dt)1µl) طبق برنامه دمایی,۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد.

تکثیر و کلونینگ ژن *vp1* در ناقل PTZ57

ژن *vp1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت 5` GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC 3` و برگشت 5` TAGTGCTGGTAAAGACTTTGAGCT 3` که حاویی جایگاه برشی آنزیم‌های XhoI در انتهای ۵` آغازگر رفت و *Hind*III در انتهای ۳`آغازگر برگشت بود، تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده ازکیت Prime Tag Premix 2x(Genet Bio) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (forward ۱۰pM ,Primer Revers۱۰pM,Primer cDNA 5 µl, 2x 25 µl, Water15µlDEPC) طبق سیکل دمایی شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۵ چرخه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید. محصول PCR ژن *vp1* با استفاده از دو آنزیم برشی (*Xho*I TakaRa) و HindIII طبق شرایط (PCR Product 3µl, BufferM2µl, *Hind* III 1µL, *Xho*L 3µL, DEPC Water 11µl) برش داده شد و در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و استخراج گردید

Archive of SID

سپس با استفاده از کیت TA Cloning (FermentasLitvani) و آنزیم لیگاز (T4 DNA Ligase, درون ناقل فوق الحاق شد. استخراج پلاسمید های حاصل از کلونی‌های به دست آمده با کیت GF-1(vivantis) انجام شد. برای ارزیابی کلون‌سازی ژن *vp1*, ناقل PTZ57 از باکتری‌های کشت شده استخراج گردیده و با آنزیم‌های *Xho*I و *Hind*III برش داده و تعیین توالی گردید (۹, ۱۱).

ساخت وکتور بیانی pET41b

پس از هضم آنزیمی PTZ57 الحاق شده، ژن 1D از ژل استخراج شد. سپس به ناقل بیانیpET41b (Novagen, USA) که حاوی ژن مقاومت به کاناماییسن، His-Tag و فلاژلین سالمونلا بود انتقال داده شد. در پلاسمید بیانی استقرار سایت‌های برش بنحوی طراحی شد که ژن *vp1* به انتهای C ژن فلاژلین متصل گردد. باکتری اشریشیا کلی سویه BL21DE3 با کلرید کلسیم M ۰/۱ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به صورت سوسپانسیون درآمده سپس جهت ترنسفورماسیون، پلاسمید را به سوسپانسیون سلول‌های مستعد اضافه کرده و مخلوط را پس از یک شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی گراد و بلافاصله شوک سرد ۴ درجه سانتی گراد پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی پلیت LB Agar+Kanamaycine کشت دادخ شد. جهت تأیید پلاسمید نوترکیب حاصل با روش PCR با استفاده از آغازگر T7 در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (forward Primer ۲/۵ µl, Primer Revers ۲/۵ µl, WaterDEPC15 µl, Plasmid 5 µl, 2x 25 µl) طبق سیکل دمایی شامل ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی گراد،۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۵ چرخه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و هضم با آنزیم‌های *Xho*I و HindIII و تعیین توالی انجام گردید.

بیان ژن 1D

سلول‌های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت LB agar حاوی۱۰۰µl/ml کانامایسین در ۳۷ درجه سانتی گراد رشد داده شدند. یکی از پرگنه های حاصل در ۵ میلی لیتر محیط LB تلقیح گردید. پس از کشت شبانه، ۱۰۰ میکرولیتر از آن به لوله فالکون حاوی ۱۰ میلی لیتر از محیط LB حاوی کانامایسین منتقل گردید. کشت سلول‌ها تا رسیدن به ۰/۵–۰/۷OD درطول موج ۶۰۰ نانومتر ادامه یافت. سپس جهت افزایش بیان پروتئین از غلظت‌های مختلف (۰/۵IPTG, ۱ و ۱/۵ میکرومول) و طیف دمایی ۲۷, ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. طی فواصل زمانی ۲, ۴ و ۸ ساعت پس از شروع کشت ۱/۵ میلی لیتر نمونه اخذ شد. نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۵۰µl/ml بافر نمونه که حاوی 2ml SDS10%, (Glycerol2.5 ml,Mercaptoethanol ,Tris1.25ml 0.5 ml bromephenolblue0.3 g) بود به رسوب باکتری و مایع رویی اضافه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شدند. پس از آن ۱۰ میکرو لیتر از هر نمونه بر روی ژل ۱۲ درصد آکریل آمید الکتروفورز گردید (۵).

وسترنبلاتینگ

پس ازالکترفورز پروتئین، بلاتینگ بر روی کاغذ نیتروسلولز صورت گرفت. غشا بااستفاده ازسرم آلبومین گاو(BSA) ۵ درصد در بافر TBS بلوکه گردید. سپس غشا در مجاورت محلول حاویی آنتی بادی مونوکلونال ضد His-tag (Roche Germany)

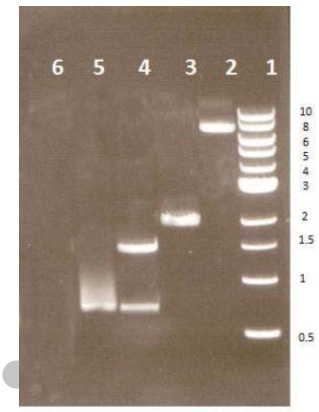
Archive of SID

www.SID.ir

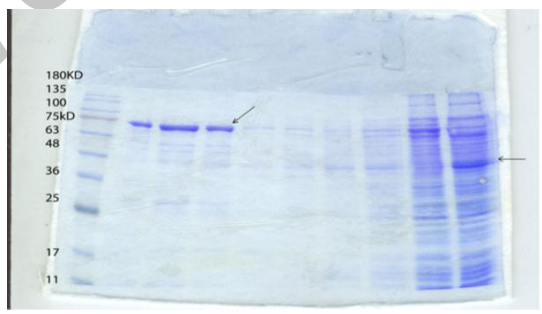
در TBST (TBS همراه با ۱ درصد Tween 20) با رقت 1:1000در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. در ادامه سه بار شستشو با TBST انجام گرفت سپس غشا با استفاده از محلول (TBS15 ml, DABDAB9mg, $H_2O_2$25µl) رنگ‌آمیزی شد.

تخلیص پروتئین نوترکیب

جهت تأیید بیان، رسوب باکتری استحصال شده توسط سونیکاتور لیز گردید. در مرحله بعد اجسام گنجیدگی رها شده با سانتریفوژ دردور بالا (10000g) رسوب داده شد. پروتئین بیان شده با بافر دناتوره کننده حاوی اوره ۸ M بصورت محلول در آمده و توسط کیت Ni-NTA(Qiagen,Germany) تخلیص گردید. کیفیت پروتئین تخلیص شده با استفاده از SDS-PAGE ارزیابی شد (۹ و ۱۱). لازم به ذکر است که رها شدن پروتئین از رزین توسط بافر Elution در گرادیان pH در محدوده ۸، ۶/۷،۳، ۵/۹ و ۴/۵ انجام شد.

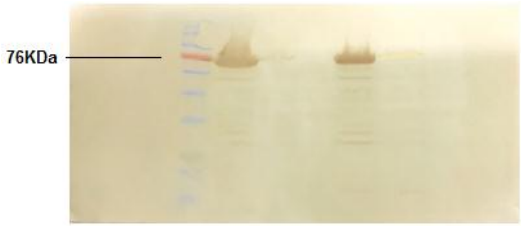


تصویر ۱- ارزیابی محصول PCR. از سمت راست گوده اول Ladder 1kb، گوده دوم pET41b حاوی قطعه فیوژن با طول تقریبی bp۷۲۰۰ اسخراج شده از باکتری BL21DE3، گوده سوم محصول PCR قطعه فیوژن با پرایمرهای T7 promoter با طول حدود bp۲۲۰۰، گوده سوم محصول PCR قطعه فیوژن که با آنزیم‌های XhoI و HindIII هضم شده‌اند. قطعه ۱۵۰۰ مربوط به فلاژلین و قطعه ۷۰۰ مربوط به ژن 1D می‌باشد. گوده سوم محصول PCR ژن 1D ویروس تب برفکی $O_{Panasia2}$ با استفاده از پرایمر اختصاصی تیپ O.



تصویر ۲- نتیجه آزمایش SDS-PAGE باکتری BL21DE3 حاوی پلاسمید بیانی و القا شده توسط IPTG(۰/۵ میلی مولار و به مدت ۴ ساعت) از سمت راست: گوده اول باکتری حاوی پلاسمید بیانی که فقط دارای فلاژلین است (باند KDa۵۴ قابل رویت است). گوده دوم باکتری حاوی پلاسمید دارای قطعه فیوژن که باند KDa۷۶ را بیان نموده است. گوده سوم تا ششم مراحل شستشوی رزین NI-NTA با بافرهای شستشو دهندهبا pH معادل ۷ ،۸ ،را نمایش می‌دهد. گوده‌های هفتم الی نهم مراحل شستشو با بافر Elution با pH معادل ۴/۵ را نشان می‌دهد. در این مرحله پروتئین فیوژن تا سه بار قابل استحصال است. گوده آخر مارکر (Prestained protein ladder PR911654 Cinagen).

Archive of SID



تصویر ۳- نتیجه بیان پروتئین فیوژن در آزمایش وسترن بلات توسط Anti-His کونژوگه (۰/۵ mM IPTG). از سمت چپ: گوده اول مارکر (prestained protein ladder PR911654 Cinagen)، گوده دوم کشت ۲ ساعته باکتری حاوی پلاسمید والقاء شده با IPTG. گوده سوم کشت ۲ ساعته باکتری فاقد پلاسمید و القاء شده با IPTG. گوده چهارم کشت ۲ ساعته باکتری حاوی پلاسمید و فاقدIPTG. گوده پنجم کشت ۴ ساعته باکتری حاوی پلاسمید و القاء شده باIPTG . گوده ششم کشت ۴ ساعته باکتری فاقد پلاسمید و القا شد باIPTG. گوده هفتم کشت ۴ ساعته باکتری حاوی پلاسمید و فاقدIPTG.

نتایج و بحث

در این تحقیق از ویروس تب برفکی سویه $O_{panasia2}$ استفاده شد. با توجه به اینکه هدف اصلی در این تحقیق تولید کلون بیانی VP1-fliC است. بدین منظور ابتدا ژن هدف در ناقل pET41b کلون شده و سپس ژن هدف از این ناقل برش یافته و درون ناقل بیانی PTZ57 کلون شد.

ارزیابی محصول PCR ژن vp1

پس از انجام آزمون PCR, توالی مربوط به ژن *vp1* حاصل از پرایمرهای NK61 و C244 به روش بیوانفورماتیک مورد آنالیز قرار گرفت. به این ترتیب که در سایت NCBIبا استفاده از سرویس نوکلئوتید بلاست صحت توالی ژن *vp1* ویروس تب برفکی سویه O تأیید گردید. پس از الکتروفورز قطعه ۷۰۰bp مربوط به ژن *vp1* نیز مشاهده شد (تصویر ۱).

کلون نمودن قطعات ژنی تکثیر یافته در درون وکتور بیانی

پلاسمید بیانی PTZ57 از باکتریBL21DE3 کشت شده، استخراج گردید. سپس توسط پرایمر های T7 promoter قطعه فیوز شده تکثیر یافت و پس از الکتروفورز قطعه ۲۲۰۰ bp مربوط به قطعه فیوژن مشاهده گردید. در مرحله بعد جهت تأیید بیشتر هضم آنزیمی با HindIII و *Xho*I بروی محصول PCR صورت گرفت و بر روی آگاروز ۱٪ الکتروفورز انجام شد. در این مرحله ژنهای *vp1* و فلاژلین سالمونلا باطولهای تقریبی ۷۰۰ bp و ۱۵۰۰ مشاهده گردیدند. (تصویر ۱)

بیان پروتئین

جهت بهینه سازی بیان از شیب غلظت IPTG درمحدوده ۰/mM5, ۱, ۱/۵ و بازه زمانی ۲، ۴ و ۸ ساعت و دمای oC37 و oC27 استفادهشد. بررسی نتایج در SDS-PAGE حاکی از آن بود که افزایش غلظت IPTG از ۰/۵ mM به بالا تاثیری بر میزان پروتئین استحصالی ندارد. همچنین افزایش طول زمان القاء به بیش از ۴ ساعت تاثیری بر میزان بیان پروتئین مورد نظرنداشت. لازم به ذکر است که اکثر محققین غلظت نهایی IPTG در محدوده ۰/۵ mM و یا ۱mM و در زمان ۴ و یا ۶ ساعت را جهت حصول بیشرین میزان پروتئین نوترکیب توصیه نموده‌اند. (تصویر ۲) طبق مطالعات صورت گرفته دمای مطلوب جهت بیان پروتئین در سیستم پروکاریوتی در طیف ۳۰,۳۷°C و بعضاً ۲۵°C می‌باشد (۳). اما در این تحقیق میزان تولید پروتئین فیوژن در دمای ۲۷°C بیش از ۳۷°C بود. نکته دیگر اینکه پروتئین بیان شده در مایع بالایی مشاهده نشدو تنها ردپای آن دررسوب باکتری لیز

Archive of SID

www.SID.ir

شده قابل رویت بود. بنابراین نتیجه‌گیری شد که پروتئین بیان شده بصورت نامحلول و به شکل اجسام گنجیدگی در سیتوپلاسم باکتری تجمع می‌یابند. لذا جهت استحصال آن نیاز به استفاده از بافر دناتوره کننده حاوی اوره M ۸ بود. در مرحله بازیافت پروتئین از رزین Ni-NTA و گرادیان pH بافر Elution استفاده شد که در pH معادل ۴/۵ بیشترین میزان بازیافت مشاهده گردید. در این شرایط تا سه بار آزادسازی پروتئین از رزین مشاهده شد (تصویر ۳).

پروتئین VP1 ویروس تب برفکی از ۲۲۶ اسید آمینه تشکیل شده است و وزن مولکولی آن حدود ۲۴KDa می‌باشد. پروتئین فلاژلین سالمونلا (*fliC*) از ۴۹۷ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی آن درحدود KDa54 می‌باشد. توسط آنالیز بیوانفورماتیک وزن مولکولی پروتئین فیوژن با طول ۷۲۳ اسید آمینه در حدود KDa76 برآورد گردید. در آزمایش SDS-PAGE در ژل ۱۲% آکریل آمید بوضوح باند ۷۶KDa در باکتری القاء شده مشاهده گردید. به منظور تأیید ژن ویروس تب برفکی از آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستدین استفاده گردید و تولیدپروتئین مذبور در وسترنبلات تأیید شد. لازم به ذکر است که به دلیل زمان‌بر بودن مراحل تهیه آنتی‌سرم هومولوگ و سرم شناساگر کونژوگه، از بکارگیری آنتی سرم هومولوگ صرف نظر شد.

بیماری تب برفکی از جایگاه ویژه‌ای در بین بیماری‌های عفونی مسری دام‌ها برخوردار است. با انجام مطالعات آماری و بررسی پراکندگی جغرافیایی بیماری تب برفکی در جهان در می‌یابیم که بیش از ۷۵ درصد نقاط دنیا آلوده به این بیماری هستند و همچنان تهدیدی برای کشورهای پاک به حساب می‌آیند. در حال حاضر از ویروس کشته شده به عنوان واکسن ویروس تب برفکی استفاده می‌شود. هر چند که این واکسنها به صورت تجاری وجود دارد ولی فرایند غیرفعالسازی کامل دارای نواقصی است که منجر به شیوع تکگیراین بیماری در منطقه می‌شود، بنابراین درسال ها اخیر باتوجه به محدودیتهای تولید واکسن غیرفعال، ایده استفاده از واکسنهای نسل جدید جهت کنترل بیماری تب برفکی قوت بیشتری گرفته است. اما نقطه چالش برانگیز واکسن‌های نوترکیب تولید اندک آنتی ژن نوترکیب در میزبان پروکاریوتی می‌باشد. جهت رفع این نقص استفاده از ادجوان مناسب با هدف تحریک گسترده سیستم ایمنی می‌تواند این مشکل را تا حدودی مرتفع نمود. درحال حاضر گزارشات متعددی وجود دارد که از فلاژلین بعنوان یک ادجوان مناسب جهت برانگیختن سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی بر علیه آنتی ژن هدف استفاده می‌گردد. بکارگیری فلاژلین در شرایط آزمایشگاهی وتجربی برای افزایش ایمنی زای ویروس‌هایی نظیر آنفولانزا، آبله، انسفالیت مورای و تب نیل غربی مورد بررسی قرار گرفته است که از نتایج قابل توجهی برخوردار بوده‌اند (۳, ۱۰ و ۱۲). در این تحقیق هدف اصلی تولید فیوژن پروتئین VP1-fliC *Salmonella* در یک قاب ترجمه ایی واحد می‌باشد. سیستم بیانی انتخاب شده در این مطالعه جهت آنتی ژن ویروس تب برفکی, پلاسمید PTZ57 و سلول‌های باکتری BL21DE3 بوده است.

Nagarajan و همکارانش در سال ۲۰۰۸ به منظور ایجاد عملکرد بهتر در واکسن تب برفکی به جای استفاده از فیوژن پروتئین تک ظرفیتی از فیوژن پروتئین ۳ ظرفیتی استفاده کردند. به همین منظور ابتدا قسمت ایمونوژنیک ژن *vp1* سویه A1 و Asia1

Archive of SID

www.SID.ir

تکثیر داده شد. سپس ژن vp1 سویه A1 و Asia1 در وکتور pBSKs و تیپ O در pETBlue کلون گردیدند. سپس توسط آنزیم *Xho*I برش داده شدند و هر کدام ب طور جداگانه برای تولید pETA و pETAs و pETO در pET32a کلون شدند. پلاسمیدهای نو ترکیب در محیط LB حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین به مدت ۱ شب در ۳۷ درجه همراه با تکان کشت داده شدند. برای القا از IPTG و برای لیز از سدیم دودسیل سولفات ۱۰٪ استفاده شد. خالص‌سازی توسط ستون نیکل انجام شد. برای بررسی واکنش آنتی ژن آنتی بادی از الایزا غیر مستقیم و برای تأیید پروتئین بیان شده از وسترن بلات استفاده شد. با توجه به این تحقیق استفاده از واکسن ۳ ظرفیتی میزان پاسخ ایمنی بهتری حاصل می‌شود و دامنه برای تولید و توسعه واکسن بر پایه Protein/DNA برای FMD را نشان می‌دهد (۷).

در مطالعاتی مشابه Qiumei و همکارانش در سال ۲۰۱۲ قطعه ژن vp1 ویروس تب برفکی توسط RT-PCR تکثیر داده شد و در ناقل PGEM-Teasy کلون گردید. ژن *vp1* توسط آنزیم‌های BamHI و XhoI مورد هضم قرارگرفت و در داخل وکتور بیانی pTE28a کلون شد. VP1 کلون شده به وسیله PCR و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. برای ترنسفورم پلاسمید نوترکیب حاصل از E. *coli* Bl21 استفاده شد. القای بیان توسط IPTG انجام شد. باکتری حاویی pTE28a –VP1 در زمان‌های مختلفی جمع آوری گردید و توسط روش‌های SDS-PAGE و وسترن مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که *vp1* با موفقیت در *E. coli* بیان شد.

با توجه به نتایج به دست آمده ژن vp1 ویروس تب برفکی و فلاژلین سالمونلا به درستی کلون و بیان گردید. از انجا که تا کنون هیچ مطالعه‌ای در جهت استفاده از فلاژلین بعنوان پروتئین ایمنی زا علیه ویروس تب برفکی انجام نشده است. امید می‌رود که در آینده نزدیک تحقیقات هدفمندی جهت بررسی کارایی فلاژلین بعنوان یک ادجوانت مولکولی جهت القا ایمنی پایدار برعلیه ویروس تب برفکی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی، بخش تب برفکی که در انجام این پروژه مساعدت نموده‌اند، همچنین دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تشکر نماییم.

References

1-Baxt B, Grubman, Marvin J (2004). Foot – and – Mouth Disease, *Clinical Microbiology Reviews*, **27**: 465– 493

2-Delaney, K. N., Phipps, J. P., Johnson, J. B., &Mizel, S. B. (2010). "A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice".*Viral immunology*, **23**: 201-210.

3-Cuadros, C., Lopez-Hernandez, F. J., Dominguez, A. L., McClelland, M., &Lustgarten, J. (2004). "Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses". *Infection and immunity,* **72**: 2810-2816

4-Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease.*ClinMicrobiol* Rev 2004; **17**: 465-93.

5-Guisheng G, Guiling Z, Hua X, Qiumei S, Yanying Z (2012). Cloning of Structural Protein VP1 Gene of Foot and Mouth Disease Viruse and its Expression in *Escherichia coli*, *International Conference on Biological and Medical Sciences*, **7**: 117- 122.

6-Hema M, Chandran D, Nagendrakumar S B, Madhanmohan M, SrinivasanV A (2009).

Archive of SID

www.SID.ir

Construction of an infectious cDNA clone of foot-and-mouth disease virus type O1BFS 1860 and its use in the preparation of candidate vaccine.*Journal of Biosciences***34**: 45-58.

7-Nagarajan G, Ashok Kumar C, Dechamma HJ, Reddy GR, Ganesh K, and Suryanarayana VVS(2008). Cloning and expression of FMDV-VP1 immunoreactive peptide in trivalent form and its application as immunogen.*Indian J Biotechnol*,**7**: 472-7.

8-Rodriguez, L. L., &Grubman, M. J. (2009).“Foot and mouth disease virus vaccines”.*Vaccine*, **27**: D90- D94.

9-Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001).Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 1–3.

10-Song, L., Zhang, Y., Yun, N. E., Poussard, A. L., Smith, J. N., Smith, J. K., …&Paessler, S. (2009). “Superior efficacy of a recombinant flagellin: H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin”. *Vaccine*, **27:**5875-5884.

11-Tanom, A., Farajnia, S., Peerayeh, S. N., &Majidi, J. (2013).“Cloning, expression and characterization of recombinant exotoxin A-flagellin fusion protein as a new vaccine candidate against Pseudomonas aeruginosa infections”.*Iranian biomedical journal*, **17**: 1.

12-Whittle, B. L., Lee, E., Weir, R. C., &Verma, N. K. (1997).“Immune response to a Murray Valley encephalitis virus epitope expressed in the flagellin of an attenuated strain of Salmonella”. *Journal of medica l microbiology,* **46***: 129-138.*

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 1, 2017

Cloning and Expression of *vp1* gene of Foot- and- mouth Disease Virus and *fliC*geneof *Salmonella* in *Escherichia coli*

Qadir, M.[1], Azimi, S.M.[2*], Harzandi, N.[3]

1- Department Of Microbiology Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2- Assistant professor of Razi Vaccine & Serum Research Inst. FMD Dept., Karaj, Iran
3- Assistant professor, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received Date: 25 November 2016 *Accepted Date: 30 April 2017*

Abstract

Background and Aim: Foot& mouth disease (FMD) is a vesicular viral disease which cause severe damage in livestock industry. Today FMD is controlled by traditional inactivated vaccine. Due to short duration of immunity, using molecular adjuvant is recommended to increase efficiency of vaccine. Purpose of this study is synthesis fusion protein from VP1 protein of FMDV (Opanasia2) and flagelline of the Salmonella (fliC) in E. coli. Methods: 1D gene that is responsible for producing VP1 protein was produced by PCR (800bp)and cloned in PTZ57 vector. After cutting cloned fragment from the recombinant plasmid by HindIII&XhoI, inserted to expression vector (pET41b) that containsfliC of the Salmonella. The construct was transfected to competent E. coli (BL21DE3) cell. The expression was induced by IPTG (0.5mM) and purified by Ni-NTA Resin. Production of recombinant protein was resolved by SDS-PAGE in 12% acrylamide gel and western blotting. Results:Recombinant fusion protein was evaluated by PCR and enzyme digestion. By molecular analysis, PCR product by length 700 and 1500 bp was observed. Ni-NTA Resin and gradient pH was used for purification. The most amount of protein recovering was observed in pH 4.5. Recombinant protein by molecular weight of 76 KDa determined in SDS-PAGE (12% acrylamide gel) and was confirmed by western blot by AntiHis. In this study, the fused gene of FMDV vp1 and flagelline of Salmonella (fliC/2200 bp) was cloned successfully in E.coliand recombinant protein (76 KDa) was expressed and purified.

Keyword: FMDV- clone and Expression- vp1 gen

**Corresponding author: S.Mahmoud Azimi*
Address: Razi Vaccine & Serum Research Inst. FMD Dept. Tel: 34570038-2228
Email: m.azimi@rvsri.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir