Archive of SID

کلونینگ و بیان ژن VP28 از یک جدایه ویروس لکه سفید ایران در باکتری *E.Coli* سویه TG1

حسین هوشمند[۱*]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۲]، رحیم پیغان[۳]، جاسم غفله‌مرمضی[۴] و محمد افشارنسب[۵]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۱۶

خلاصه

ویروس لکه‌ی سفید عامل بیماری‌زای مهمی در میگوهای خانواده‌ی پنائیده است که در چند سال گذشته تلفات قابل توجهی را در میگوهای پرورشی ایران ایجاد کرده است. مطالعات لازم در خصوص ساخت کیت‌های تشخیص سریع و ایجاد مقاومت در برابر ویروس محلی با استفاده از پروتئین‌های مختلف غشاء و کپسید ویروس ضروری به نظر می‌رسد. در راستای این هدف، در این مطالعه، قطعه‌ای از ژن VP28 ویروس لکه سفید (جدایه‌ی ایرانی) با طول bp ۵۲۸ از میگوهای پرورشی آلوده به ویروس در چوئبده آبادان جداسازی و با روش PCR تکثیر داده شد، سپس ژن مذکور در پلاسمید pMal-c2X کلون گردید و پروتئین مورد نظر در باکتری *اشریشیاکلی سویه* TG1 بیان گردید. بررسی نتایج SDS-PAGE وجود پروتئین بیان شده VP28 با وزن KDa ۱۹/۳۶ را تأیید نمود. مشاهده‌ی پروتئین مذکور با وزن مولکولی قابل انتظار در SDS-PAGE و بررسی توالی ژن کلون شده نشان دهنده‌ی بیان موفق این پروتئین در باکتری *اشریشیاکلی* TG1 بود. در این تحقیق، ژن VP28 برای اولین بار از یک جدایه ویروس ایرانی جداسازی و پروتئین آن در یک سیستم بیانی پروکاریوتی بیان شده است.

کلمات کلیدی: ویروس لکه سفید، پروتئین VP28، کلونینگ و بیان

مقدمه

ویروس‌ها به عنوان مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای میگو مورد توجه هستند. مراحل مختلف زندگی میگوها ممکن است به عفونت ویروسی خاصی حساس باشد که سبب تلفات، رشد آهسته و بدشکلی‌های آناتومیکی شود . تا کنون بیش از ۲۰ ویروس بیماری‌زای میگوها گزارش شده است (Tan et al. 2009, Walker and Mohan 2009).

ویروس لکه سفید به عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم مورد توجه است. این ویروس، کشورهای تولید کننده‌ی میگو در آسیا مثل بنگلادش، کامبوج، چین، هند، اندونزی، ایران، ژاپن، کره، مالزی، میانمار، فیلیپین، سریلانکا، تایلند، تایوان، ویتنام و شمال، مرکز و جنوب قاره‌ی آمریکا مثل بلیز، برزیل، کلمبیا، اکوادور، گواتمالا، هندوراس، مکزیک، نیکاراگوآ، پاناما، پرو و آمریکا را تحت تأثیر قرار داده است (Bondad-Reantaso et al. 2005, Lightner 1996, FAO 2003, Rosenberry 2002).

[۱*] دانش‌آموخته دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز (نویسنده‌ی مسئول) E-mail: Houshmand_h@yahoo.com

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز

[۴] دانشیار پژوهشی مؤسسه‌ی تحقیقات علوم شیلاتی کشور، اهواز

[۵] دانشیار پژوهشی مؤسسه‌ی تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری لکه سفید موجب تلفات سنگینی در انواع میگوهای خانواده‌ی پنائیده می‌شود به طوری که در چین در سال ۱۹۹۲، تایلند طی سال‌های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۷، ژاپن، تایوان، اندونزی، هند و اکوادور در سال ۱۹۹۹ سبب خسارت در تولید، اشتغال و صادرات شده است (Feigon 2000, Flegel 2006, Huang et al. 1994, Rodriguez et al. 2003, Wang et al. 1995, Wongteera et al. 1995).

در ایران نیز طی سال‌های ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۳ در استان خوزستان و سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر اغلب استخرها و مزارع آلوده و کل صنعت با خطر تعطیلی مواجه و در حدود ۱۰ میلیارد تومان به پرورش دهندگان خسارت وارد شد (افشارنسب و همکاران ۱۳۸۸، آمارنامه شیلات ایران ۱۳۸۴).

ویروس لکه سفید نام خود را از لکه‌های سفید با قطر ۰/۵ تا ۳ میکرونی روی اسکلت خارجی میگوی آلوده گرفته است. به نظر می‌رسد لکه‌های سفید، نقاط کلسیفیه شده‌ای هستند که در نتیجه نقص عملکرد درست پوشش خارجی میگو بروز می‌کند (Lo et al. 1996, Wang Q et al. 1999).

ویروس لکه سفید یک ویروس غشاءدار با ژنوم DNA دو رشته‌ای، تخم‌مرغی تا میله‌ای شکل با یک زائده‌ی دم مانند در یک انتها می‌باشد (van Hulten et al. 2001, Yang et al. 2001). این ویروس برای حداقل ۷۸ گونه از بیش‌تر سخت پوستان ده پا شامل میگوهای دریایی و آب شیرین مانند: میگوی سفید چینی، میگوی سفید هندی، میگوی موزی، میگوی ببری سیاه، میگوی سفید شمالی، میگوی آبی غربی و میگوی سفید غربی (Lo et al. 1996, Wang et al. 1999)، خرچنگ پهن، خرچنگ دراز آب شیرین و لابستر بیماری‌زا است (Flegel 2006, Lightner 1996).

ویروس لکه سفید یکی از بزرگترین DNA ویروس‌هایی است که تا کنون تعیین توالی شده‌اند (Filee and Chandler 2008). ویریون‌های ویروس بیضی تا میله‌ای شکل بوده و اندازه‌ی قابل توجهی دارند. ویریون‌ها ۱۳۸–۷۰ نانومتر در ۳۴۰–۲۴۰ نانومتر اندازه دارند. این ویروس شامل یک نوکلئوکپسید میله‌ای شکل با اندازه‌ی ۳۵۰–۲۰۰×۹۰–۷۰ نانومتر است (Kasornchandra et al. 1998, Wang et al. 1999).

بیش از ۵۰ پروتئین ساختاری و یک پروتئین غیر ساختاری VP9 در ویروس لکه سفید شناسایی شده است (Liu et al. 2006). این پروتئین‌ها را بر اساس وزن تخمینی آن‌ها در آزمایشات SDS-PAGE یا بر اساس تعداد اسید آمینه پروتئین‌ها نامگذاری کرده‌اند (Huang et al. 2002a,b, Li et al. 2006, Li L. et al. 2006, Li L.J. et al. 2006, Tsai et al. 2004, Tsai et al. 2006, van Hulten et al. 2000, van Hulten et al. 2001, van Hulten et al. 2002, Wu et al. 2005, Xie et al. 2006, Yi et al. 2004, Zhang et al. 2002, Zhu et al. 2005, 2006).

در آزمایشات خنثی‌سازی مشخص شد که پروتئین‌های غشاء (VP24، VP28، VP31، VP36B، VP68، VP76، VP281 و VP466) در مراحل اولیه‌ی رونوشت‌برداری ویروس لکه سفید نقش دارند (Huang et al. 2005, Li et al. 2006, Li L. et al. 2006, Li L.J. et al. 2006, van Hulten et al. 2001, Wu et al. 2005, Xie and Yang 2006).

پروتئین VP28 در اتصال و نفوذ ویروس به سلول‌ها و عفونت عمومی دخالت دارد (van Hulten et al. 2001, Wu et al. 2005, Yi et al. 2004). پرایمرهای طراحی شده برای ژن VP28 و آنتی‌بادی‌های تولیدی علیه این پروتئین در تشخیص جدایه‌های این ویروس استفاده شده‌اند (Mushtaq et al. 2006, Poulos et al. 2001).

با توجه به وجود این ویروس در ایران، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی امکان جداسازی ژن VP28 از ویروس جدا شده از میگوهای بیمار در ایران، بیان پروتئین مربوط در باکتری *اشریشیا کلی* بوده است تا ضمن دستیابی به یکی از پروتئین‌های عمده‌ی غشاء ویروس نسبت به ایجاد مقاومت ضد ویروس (ایمن‌سازی) و تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این پروتئین به منظور استفاده در روش‌های تشخیصی سرم شناسی اقدام گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و استخراج DNA

به منظور دستیابی به ژنوم ویروس لکه سفید برای استفاده در این پژوهش، طی مراجعه به مزارع پرورش میگوی استان خوزستان در منطقه‌ی چوئبده آبادان (خرداد تا مهرماه ۱۳۹۰) از میگوهای بیمار و دارای علائم بالینی از سطح مزارع پرورش میگوی این منطقه، نمونه‌گیری شد. به منظور استخراج DNA، مقداری از هر نمونه (آبشش و پای شنا) درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. استخراج DNA با استفاده از محلول‌های DTAB و CTAB (شرکت Genereach، تایوان) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. DNA استخراج شده در آب دوبار تقطیر استریل محلول گردید و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آزمایش نمونه‌ها با استفاده از کیت تشخیص مولکولی بیماری لکه سفید (Iq2000، Genereach، تایوان) نمونه‌ای که دارای بالاترین حدت بود (براساس دستورالعمل شرکت Genereach) به عنوان الگو در آزمایش‌های بعدی استفاده شد. این جدایه IRI-KHZ/904 نام‌گذاری گردید.

آزمایش PCR

پرایمرهای اختصاصی ژن کدکننده‌ی پروتئین VP28 براساس پرایمرهای طراحی شده توسط Witteveldt (۲۰۰۶) انتخاب گردید و به منظور انجام کلونینگ در انتهای '۵ این پرایمرها مکان برش آنزیم‌های محدودگر SalI و HindIII قرارداده شد تا امکان انتقال و بیان در سیستم بیانی پروکاریوتی فراهم گردد (جدول ۱). با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و DNA الگوی استخراج شده، تکثیر ژن VP28 به وسیله‌ی PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر ژنوم الگو، ۰/۴ میکرولیتر (۲/۵ واحد در میکرولیتر) آنزیم Pfu، ۵ میکرولیتر بافر آنزیم Pfu، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی-مولار، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر پرایمر و ۳۸/۱ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، استریل انجام شد. واکنش PCR با برنامه‌ی دمایی دناتوره شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۸ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه بود. در پایان، یک مرحله‌ی دمایی ۷۲ درجه نیز به مدت ۷ دقیقه اجرا گردید.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

VP28F 5'	GCCGTCGACCACAACACTGTGACCA (Sal I)
VP28R 5'	GCGAAGCTTACTCGGTCTCAGTGCCAGA (Hind III)

بررسی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز

۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری در ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی رنگ سیف استین (سیناکلون، ایران) بارگذاری شد. هم‌چنین برای اطمینان از صحت طول قطعه‌ی تکثیر شده از نشانگر ۱۰۰ جفت باز (فرمنتاس، لیتوانی) استفاده گردید و با تابش نور فرابنفش روی ژل، باند DNA تکثیر یافته از نظر صحت طول مورد بررسی قرار گرفت. محصول قابل انتظار قطعه‌ای به طول ۵۲۸ جفت باز بود.

کلونینگ و بیان ژن VP28

محصول PCR برای انجام آزمایش‌های بعدی (هضم آنزیمی و کلونینگ) از ژل آگارز یک درصد با استفاده از کیت استخراج از روی ژل (بایونیر، کره جنوبی) و مطابق

www.SID.ir

Archive of SID

دستورالعمل شرکت سازنده خالص گردید و محصول در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. در این تحقیق به منظور کلونینگ و بیان ژن VP28، از وکتور بیانی پروکاریوتی pMal-c2X، (محصول شرکت نیوانگلندبیولب) استفاده شد. به منظور تکثیر و ازدیاد پلاسمید، باکتری *E. Coli* سویه TG1 توسط این پلاسمید مورد ترانسفورماسیون قرار گرفت. ترانسفورماسیون با روش کلرید کلسیم و شوک حرارتی انجام شد. سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (شرکت ویوانتیس، مالزی) از کلونی‌های باکتری، پلاسمید استخراج شد. برای انجام کلونینگ روی هر دو محصول PCR و پلاسمید تکثیر یافته عمل هضم آنزیمی صورت گرفت. برای هضم آنزیمی ژن VP28 و وکتور با توجه به طراحی پرایمر، از آنزیم‌های محدود کننده‌ی *Hind* III و *Sal* I (شرکت ینابایوساینس، آلمان) استفاده شد. به این منظور پلاسمید به طور مستقل با هر یک از آنزیم‌ها و ژن VP28 در واکنشی مضاعف هضم شدند. پس از هضم، کارآیی واکنش با الکتروفورز ۱ میکرولیتر از پلاسمید هضم شده مورد تأیید قرار گرفت (Ausbel et al. 1992).

برای اتصال محصول PCR و پلاسمید به یکدیگر، هر دو محصول هضم شده با استفاده از کیت خالص سازی از ژل (بایونیر، کره جنوبی) خالص شدند. میزان DNA و پلاسمید هضمی تخمین زده شده و اتصال با استفاده از آنزیم لیگاز T4 به مدت ۷۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس یک شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از سپری شدن زمان فوق برای غیرفعال کردن آنزیم از دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد (Ausbel et al. 1992). سپس محصول اتصال با فرض تشکیل پلاسمیدهای حلقوی حاوی ژن VP28 برای ترانسفورماسیون به کار رفت. مجدداً با استفاده از روش شوک حرارتی و به کمک کلرید کلسیم ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال به باکتری *E. Coli* سویه TG1 انتقال داده شد. پس از انجام ترانسفورماسیون برای بررسی حضور پلاسمید حاوی ژن VP28 در کلون‌ها، از دو روش غربالگری شامل PCR و بررسی بیان پروتئین استفاده گردید.

پس از غربالگری کلون‌های باکتریایی TG1 به روش PCR و تأیید وجود پلاسمیدهای حاوی ژن VP28، بیان پروتئین نوترکیب VP28، توسط کلون‌ها بررسی شد.

برای القاء بیان پروتئین از محلول ۰/۱ مولار IPTG استفاده شد. هم‌زمان به عنوان شاهد منفی یک باکتری حاوی پلاسمید pMAL-c2X بدون ژن مورد مطالعه که القاء بیان پروتئین روی آن در حضور IPTG، اعمال گردیده بود نیز استفاده شد. این نمونه‌ها در آزمایش SDS-PAGE بررسی شدند. نمونه‌های باکتری قبل از افزودن IPTG و نمونه‌های بعد از IPTG در کنار نشانگر وزنی مولکولی مورد استفاده در این مطالعه (فرمنتاس، آمریکا) که از ۷ باند پروتئینی در محدوده‌ی KDa ۱۴/۴ تا KDa ۱۱۶ تشکیل شده بود در ژل، بارگذاری گردید.

پس از غربالگری کلون‌های حاصل از ترانسفورماسیون، سه کلونی که در آزمایش PCR حاوی ژن بوده و در بررسی بیان نیز پروتئین با وزن مولکولی مورد انتظار را بیان نموده بودند برای اطمینان از عدم موتاسیون در ژن، انتخاب شده و پلاسمید آن‌ها با کیت استخراج و تخلیص شد. سپس پلاسمیدهای خالص شده جهت تعیین توالی ژن VP28 به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند تا با استفاده از پرایمرهای ویژه پلاسمید (پرایمرهای M13 و MalEF) از دو جهت، تعیین توالی گردند.

نتایج

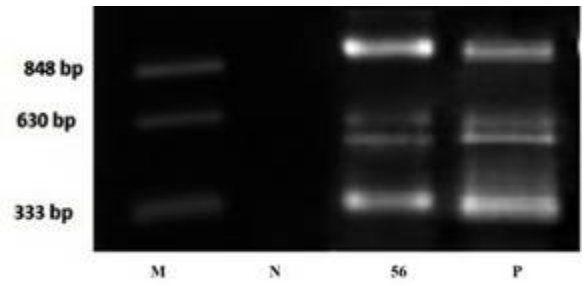
تشخیص ویروس لکه سفید در بافت میگوی سفید غربی

پس از انجام نمونه‌برداری از مزارع پرورش میگوی استان در چوئبده آبادان تعدادی نمونه با آزمایش کیت تشخیصی Iq2000 مثبت بودند، نمونه‌ای که براساس دستورالعمل کیت دارای حدت بالا (sever) بود به عنوان جدایه‌ی ایرانی ویروس لکه سفید با نام IRI-KHZ/904 به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان الگو در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت (تصویر ۱).

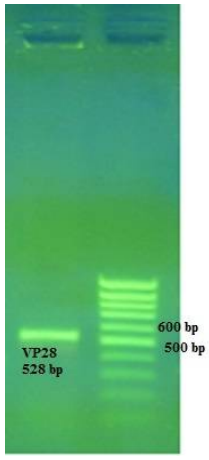


تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR کیت تشخیص مولکولی Iq2000

M: مارکر، N: نمونه منفی، 56: نمونه مثبت حاد، P: کنترل مثبت

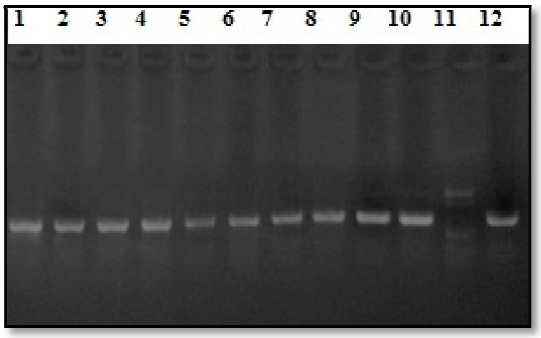
نتایج PCR برای تکثیر ژن سازنده VP28

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای توصیف شده منجر به ساخت محصولی به اندازه‌ی ۵۲۸ bp شد. محصول ژن تکثیر یافته در ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی رنگ سیف استین، در کنار یک نردبان ژنی ۱۰۰bp الکتروفورز شد و به وسیله‌ی نور ماوراء بنفش مشاهده گردید که با نتایج قابل انتظار هم‌خوانی داشت (تصویر ۲).



تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن VP28 ویروس لکه سفید جدایه IRI-KHZ/904

به دنبال تکثیر DNA مورد نظر در PCR و انجام مراحل هضم، اتصال محصول PCR و پلاسمید pMAL-c2X و سپس ترانسفورماسیون محصول اتصال در باکتری TG1، ظهور کلونی‌های باکتری روی محیط آگار LB حاوی آمپی‌سیلین نشان دهنده‌ی ورود موفق پلاسمید حاوی ژن مقاوم به آمپی‌سیلین در باکتری بود. برای اطمینان بیش‌تر، ۱۰ کلون تولید شده از لحاظ دارا بودن وکتور حاوی ژن توسط PCR بررسی شدند (تصویر ۳).



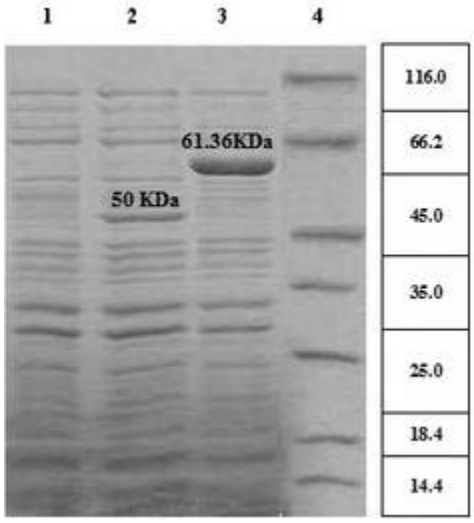
تصویر ۳: الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی ژن استخراج شده از باکتری TG1

ستون ۱-۱۰: کلون‌های حاوی ژن، ستون ۱۱: نمونه کنترل منفی، ستون ۱۲: ژن VP28

پس از اطمینان از کلونینگ موفق ژن سازنده‌ی VP28 در پلاسمید pMal-c2X، در حضور IPTG وجود پروتئین بیان شده در این باکتری‌ها با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد. نتایج این بررسی روی یکی از کلونی‌های مورد آزمایش که مثبت تشخیص داده شد در تصویر ۴ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل مشخص شده است، با توجه به استاندارد پروتئینی استفاده شده (فرمنتاس، آمریکا)، باکتری مجاور با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG دارای پروتئینی با وزن مولکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی بود. پروتئین بیانی با احتساب وزن ۱۹/۳۶KDa برای VP28 و پروتئین MBP (حدود ۴۲ KDa) باید دارای وزنی حدود ۶۱/۳۶KDa باشد. هم‌چنین در بررسی نتایج تعیین توالی مشخص گردید که قطعه ژن کلون شده بدون هیچ گونه حذف و جهشی به پلاسمید مربوط، متصل شده بود.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۴: SDS - PAGE القای بیان پروتئین VP28 در باکتری اشریشیاکلی سویه‌ی TG1

ستون ۱: باکتری حاوی پلاسمید قبل از بیان،

ستون ۲: باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب بعد از بیان،

ستون ۳: کلون مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از بیان،

ستون ۴: مارکر پروتئین

بحث

پروتئین VP28 با وزن مولکولی تقریبی ۲۲ کیلودالتون، فراوان‌ترین پروتئین ساختاری موجود در غشاء ویروس لکه سفید می‌باشد که هیچ‌گونه شباهتی را به سایر پروتئین‌های شناخته شده به جز برخی از پروتئین‌های ساختاری ویروس لکه سفید نشان نمی‌دهد (Robalino et al. 2006, Tang et al. 2007).

این پروتئین موجب اتصال ویروس به سلول‌های میگو شده و نقش مهمی را در نفوذ ویروس به درون سلول میزبان ایفا می‌کند. هم‌چنین مشخص شده است که آنتی‌بادی‌های تولید شده بر ضد این پروتئین می‌توانند ویروس را خنثی کرده و عفونت ویروسی را مهار نمایند (Yi et al. 2004). پروتئین VP28 و ژن کدکننده‌ی آن به منظور تشخیص و کنترل بیماری لکه سفید مورد توجه قرارگرفته‌اند (Mavichak et al. 2011).

تجزیه و تحلیل رونویسی از ژن VP28 در مطالعات بیان ژن نشان داده است که این پروتئین محصول یک ژن بیانی تأخیری است و ایمنی‌زا می‌باشد و واکسیناسیون با این پروتئین سبب محافظت میگوها در برابر بیماری لکه سفید می‌گردد (Witteveldt et al. 2004a,b).

در این مطالعه، آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به گونه‌ای که انتهای آمینی پروتئین حذف شده باشد برای این پژوهش منجر به ساخت محصولی با اندازه‌ی ۵۲۸ جفت باز شد. پس از خالص‌سازی ژن VP28 و پلاسمید pMal-c2X، هر دو توسط آنزیم‌های محدود کننده‌ی *Hind* III و *Sal* I به صورت جداگانه هضم شدند. پس از هضم آنزیمی پلاسمید و محصول PCR تکثیر یافته، ژن VP28 وارد پلاسمید pMal-c2X شد و ورود آن به داخل پلاسمید با انجام آزمایش PCR و تعیین توالی تأیید شد.

براساس اطلاعات نویسندگان مقاله، در ایران برای اولین بار است که ژن VP28 از یک جدایه ویروس ایرانی جداسازی و پروتئین آن در یک سیستم بیانی پروکاریوتی بیان شده است.

پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن VP28 جدایه IRI-KHZ/904 و بررسی آن مشخص شد که قطعه‌ی ژن VP28 از محل‌های مورد انتظار برش خورده و بدون هیچ گونه حذف و جهشی به پلاسمید مورد نظر متصل شده است.

پروتئین نوترکیب VP28 در سیستم‌های بیانی مختلفی از قبیل باکتری گرم منفی مانند *E.Coli* سویه‌ی BL21، باکتری گرم مثبت، سلول‌های حشرات، مخمر و کرم ابریشم بیان شده است (Caipang et al. 2008, Du et al. 2006, Jha et al. 2006a,b, Jha et al. 2007, Mavichak et al. 2009, Namikoshi et al. 2004, Witteveldt et al. 2004a,b, Witteveldt et al. 2006, Xu et al. 2006).

در این پژوهش پروتئین نوترکیب VP28 در سیستم بیانی پروکاریوتی pMal-c2X و باکتری *E.Coli* سویه‌ی TG1 بیان گردید. با استفاده از پروتئین VP28 بیان شده در سیستم پروکاریوتی محافظت میگو در برابر ویروس لکه سفید مشاهده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه‌ی حاضر پس از بیان پروتئین نوترکیب VP28 با توجه به این که قسمت آمینی پروتئین به منظور بیان بهتر در سیستم بیانی پروکاریوتی حذف شده بود وزن مورد انتظار حدود ۱۹/۳۶ کیلو دالتون بود که در آزمایش SDS-PAGE بررسی و تأیید شد. از این پروتئین به عنوان ماده‌ای ایمن‌زا برای ایجاد محافظت میگوها در برابر ویروس لکه سفید در مطالعات بعدی استفاده خواهد شد.

Witteveldt نیز در سال ۲۰۰۶ به منظور تولید پروتئین نوترکیب VP28 برای استفاده در محافظت میگو در برابر بیماری لکه سفید از روشی استفاده کرد که از انتهای آمینی پروتئین حذف شد و در آزمایش ایمن‌سازی و چالش نتایج قابل قبولی را به دست آورد.

Braunig و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن VP28 محصول PCR را درون وکتور pET-14b کلون نمودند و پروتئینی با وزن تقریبی ۲۱ کیلودالتون را بیان نمودند. به گفته‌ی این محققین برای اولین بار است که در کشور برزیل این کار صورت گرفته است که نتایج آن با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

در چندین پژوهش، موفقیت ایجاد حفاظت در برابر بیماری لکه سفید در میگوهای مختلف با استفاده از پروتئین‌های ویروسی و یا پروتئین‌های نوترکیب ویروسی VP19، VP26، VP28، VP31 و VP292 گزارش شده است (Du et al. 2006, Jha et al. 2006a,b, Jha et al. 2007, Namikoshi et al. 2004, Rout et al. 2007, Vaseeharan et al. 2006, Witteveldt et al. 2004a,b, Witteveldt et al. 2006).

استفاده از پروتئین نوترکیب VP28 در جیره‌ی غذایی میگوی ببری سیاه و خرچنگ دراز آب شیرین در کاهش تلفات ناشی از ویروس لکه سفید مؤثر بوده است (Jha et al. 2007, Witteveldt et al. 2004a). آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پروتئین نوترکیب VP28 یا آنتی‌بادی پلی‌کلونال در برابر پروتئین‌های نوترکیب VP28+VP19 می‌تواند عفونی‌زایی ویروس لکه سفید را خنثی کند (Li, H-X et al. 2005, Musthaq et al. 2006, Natividad et al. 2007).

پروتئین نوترکیب به دست آمده در این تحقیق در صورت خالص‌سازی و یا حتی به شکل بیان شده در باکتری، به منظور استفاده در چندین کاربرد بیوتکنولوژیک مثل تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این پروتئین و استفاده در روش‌های تشخیصی سرم شناسی قابل استفاده می‌باشد. هم‌چنین با توجه به تحقیقات متعدد صورت گرفته روی پروتئین غشاء ویروس لکه سفید می‌توان از آن به عنوان یک واکسن نوترکیب زیر واحد و یا حتی استفاده از ژن مورد نظر در واکسن‌های DNA استفاده کرد. امید آن می‌رود که با دستیابی به چنین ترکیباتی در آینده بتوان بیماری کشنده‌ی لکه سفید را در مزارع پرورش میگوی کشورمان مهار نمود.

منابع

افشارنسب، محمد؛ سیدمرتضایی، سیدرضا؛ آهنگرزاده، مینا؛ هوشمند، حسین؛ کر، نیازمحمد؛ جرفی، الهام و همکاران (۱۳۸۸). بررسی وضعیت بهداشت و بیماری-های مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، موسسه تحقیقات شیلات ایران.

آمار نامه شیلات ایران (۱۳۸۴). میزان میگوی پرورشی در سال ۱۳۸۴. انشارات سازمان شیلات ایران، صفحه ۶۱.

Ausbel, F.M.; Brent, R.; Kingstone, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. (1992). Short Protocols in Molecular Biology. 2nd edition. John Wiley and sons. New york. pp:A1-15.

Bondad-Reantaso, M.G.; Subasinghe, R.P.; Arthur, J.R.; Ogawa, K.; Chinabut, S.; Adlard, R. et al. (2005). Disease and health management in Asian Aquaculture. Veterinary Parasitology, 132: 249-272.

www.SID.ir

Archive of SID

Braunig, P.; Diego da Rosa, R.; Seibert, C.H.; Borsa, M.; Hermes Stoco, P.; Grisard, E.C. and Pinto, A.R. (2011). Molecular cloning and recombinant expression of the VP28 carboxyl-terminal hydrophilic region from a Brazilian white spot syndrome virus isolate. Brazilian Archives of Biology and Technology, 54(2): 399-404.

Caipang, C.M.A.; Verjan, N.; Ooi, E.L.; Kondo, H.; Hirono, I.; Aoki, T. et al. (2008). Enhanced survival of shrimp, *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus* from white spot syndrome disease after oral administration of recombinant VP28 expressed in *Brevibacillus brevis*. Fish and Shellfish Immunology, 25: 315-320.

Du, H.; Xu, Z.; Wu, X.; Li, W. and Dai, W. (2006). Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculvirus. Aquaculture, 260, 39-43.

FAO/NACA, (2003). Myanmar Aquaculture and Inland Fisheries. FAO, Bangkok, Thailand, 60.

Feigon, L. (2000). A harbinger of the problems confronting China's economy and environment: the great Chinese shrimp disaster of 1993. Journal of Contemporary China, 9: 323-332.

Filee, J. and Chandler, M. (2008). Convergent mechanisms of genome evolution of large and giant DNA viruses. Research in Microbiology, 159: 325-331.

Flegel, T.W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture, 258: 1-33.

Huang, J.; Song, XL.; Yu, J. and Yang, C.H. (1994). Baculoviral and haematopoietic necrosis-pathology of the shrimp explosive epidemic disease. Yellow Sea Fishery Research Institute. Qingdae, P.R. China.

Huang, C.; Zhang, X.; Lin, Q.; Xu, X. and Hew, C.L. (2002a). Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. Journal of General Virology, 83: 2385-92.

Huang, C.; Zhang, X.; Lin, Q.; Xu, X.; Hu, Z. and Hew, C.L. (2002b). Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. Molecular and Cellular Proteomics, 1: 223-231.

Huang, R.; Xie, Y.; Zhang, J. and Shi, Z. (2005). A novel envelope protein involved in white spot syndrome virus infection. Journal of General Virology, 1357-61.

Jha, R.K.; Xu, Z.R. and Pandey, A. (2006a). Protection of *Procambarus clarkia* against white spot syndrome virus using recombinant subunit injection vaccine expressed in *Picha pastoris*. Fisheries Science, 72:1011-1019.

Jha, R.K.; Xu, Z.R.; Shen, J.; Bai, S.J.; Sun, J.Y. and Li, W.F. (2006b). The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkia*. Immunology Letters, 105:68-76.

Jha, R.K.; Xu, Z.R.; Bai, S.J.; Sun, J.Y.; Li, W.F. and Shen, J. (2007). Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed in *Pichia pastoris*. Fish and Shellfish Immunology, 224:295-307.

Kasornchandra, J.; Boonyaratpalin, S. and Itami, T. (1998). Detection of white spot syndrome in cultured peaneid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. Aquaculture, 164: 243-251.

Li, H.; Zhu, Y.; Xie, X. and Yang, F. (2006). Identification of a novel envelope protein (VP187) gene from shrimp white spot syndrome virus. Virus Research, 115: 76-84.

Li, H-X.; Meng, X-L.; Xu, J-P.; Lu, W. and Wang, J. (2005). Protection of crayfish, Cambarus clarkii, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein. Journal of Fish Diseases, 28: 285-291.

Li, L.; Lin, S. and Yang, F. (2006). Characterization of an envelope protein (VP110) of white spot syndrome virus. Journal of General Virology, 87: 1909-1915.

Li, L.J.; Yuan, J.F.; Cai, C.A.; Gu, W.G. and Shi, Z.L. (2006). Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. Archives of Virology, 151: 1309-1317.

Lightner, D.V. (1996). A hand book of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304.

Liu, Y.; Wu, J.; Song, J.; Sivaraman, J. and Hew, C.L. (2006). Identification of a novel nonstructural Protein, VP9, from white spot syndrome virus: its structure reveals a ferredoxin fold with specific metal binding sites. Journal of Virology, 80: 10419-10427.

www.SID.ir

Archive of SID

Lo, C.F.; Leu, J.H.; Ho, C.H.; Chen, C.H.; Peng, S.E.; Chen, Y.T. et al. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. Diseases in Aquatic Organisms, 25: 133–141.

Mavichak, R.; Kondo, H.; Hirono, I.; Aoki, T.; Kiyono, H. and Yuki, Y. (2009). Protection of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* against white spot virus following administration of N-terminus truncated recombinant VP28 protein expressed in Gram-positive bacteria, *Brevibacillus choshinensis*. Aquaculture Science, 57: 83-90.

Mavichak, R.; Kondo, H.; Hirono, I. and Aoki, T. (2011). The utilization of VP28 gene to protect penaeid shrimps from white spot syndrome virus disease: a review.,pp. 157-170. In Bondad-Reantaso, M.G., Jones, J.B., Corsin, F. and Aoki, T. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VII. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. 385.

Mushtaq, S.S.; Sudhakaran, R.; Ahmed, V.P.I.; Balasubramanian, G.; Sahul Hameed, A.S. (2006). Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. Aquaculture, 256: 34-41.

Namikoshi, A.; Wu, J.L.; Yamashita, T.; Nishizawa, T.; Nishioka, T.; Arimoto M. and Muroka K. (2004). Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. Aquaculture, 229: 25-35.

Natividad, K.D.T.; Hagio, M.; Tanaka, M.; Nomura, N. and Matsumura, M. (2007). White spot syndrome virus (WSSV) inactivation in *Penaeus japonicus* using purified monoclonal antibody targeting viral envelope protein. Aquaculture, 269: 54-62.

Poulos, B.T.; Pantoja, C.R.; Bradley-Dunlop, D.; Aguilar, J. and Lightner, D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. Diseases in Aquatic Organisms, 47: 13-23.

Robalino, J.; Payne, C.; Parnell, P.; Shepard, E.; Grimes, A.C.; Metz, A. et al. (2006). Inactivation of white spot syndrome virus (WSSV) by normal rabbit serum: implications for the role of the envelope protein VP28 in WSSV infection of shrimp. Virus Research, 118: 55-61.

Rodriguez, J.; Bayot, B.; Amano,Y.; Panchana, F.; de B I.; Alday, V. and Calderon, J. (2003). White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. Journal of Fish Disease, 26: 439-450.

Rosenberry, B. (2002). World shrimp farming 2002. Shrimp News International, San Diego, CA,USA., 3-6.

Rout, N.; Kumar, S.; Jaganmohan, S. and Murugan, V. (2007). DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. Vaccine, 25, 2778-2786.

Tan, Y., Xing, Y., Zhang, H., Feng, Y., Zhou, Y. and Shi, ZL. (2009). Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of white spot syndrome virus in Hainan Province, China, in 2007. Journal of Fish Disease, 32: 777-784.

Tang, X.; Wu, J.; Sivaraman, J. and Hew C.L. (2007). Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. Journal of Virology, 81: 6709-6717.

Tsai, J.M.; Wang, H.C.; Leu, J.H.; Hsiao, H.H.; Wang, A.H.; Kou, G.H. et al. (2004). Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. Journal of Virology, 78: 11360–11370.

Tsai, J.M.; Wang, H.C.; Leu, J.H.; Wang, A.H.; Zhuang, Y.; Walker, P.J. et al. (2006). Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. Journal of Virology, 80: 3021-3029.

van Hulten, MC.; Westenberg, M.; Goodall, SD. and Vlak, JM. (2000). Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. Virology, 266: 227-36.

van Hulten, M.C.W.; Witteveldt, J.; Snippe, M. and Vlak, J.M. (2001). White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. Virology, 285: 228-233.

van Hulten, MC.; Reijns, M. Vermeesch, A.M.; Zandbergen, F. and Vlak, JM. (2002). Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. Journal of General Virology, 83: 257-265.

Vaseeharan, B., Anand, T.P., Murugan, T., Chen, J.C., (2006). Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. Letters in Applied Microbiology, 43: 137-142.

Walker, PJ. and Mohan, CV. (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. Review in Aquaculture, 1: 125-154.

Wang, C.H.; Lo, C.F.; Leu, J.H.; Chou, C.M.; Yeh, P.Y.; Chou, H.Y. et al. (1995). Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Diseases in Aquatic Organisms, 23: 239-242.

www.SID.ir

Archive of SID

Wang, Q.; White, BL.; redman, RM. and Lightner, DV. (1999). Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture, 170: 179-194.

Witteveldt, J.; Cifuentes, C.C.; Vlak, J.M. and van Hulten, M.C. (2004a.). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. Journal of Virology, 78: 2057-2061.

Witteveldt, J.; Vlak, J.M. and van Hulten, M.C. (2004b). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. Fish and Shellfish Immunology, 16: 571-579.

Witteveldt, J.; Vlak, J.M. and van Hulten, M.C. (2006). Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. Diseases of Aquatic Organisms, 70: 167-170.

Witteveldt, J. (2006). On the vaccination of shrimp against white spot syndrome virus., Thesis Wageningen University. ISBN: 90-8504-331-X.

Wongteera-Supaya, C.; Vickers, J.E.; Sriurairatana, S.; Nash, G.L.; Akarajamorn, A.; Boonsaeng, V. et al. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Diseases in Aquatic Organisms, 21: 69–77.

Wu, W.; Wang, L. and Zhang, X. (2005). Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. Virology, 332: 578-83.

Xie, X. and Yang, F. (2006). Wihte spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection. Journal of General Virology, 87: 1903-1908.

Xie, X.; Xu, L. and Yang, F. (2006). Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. Journal of Virology, 80: 10615-10623.

Xu, Z.; Du, H.; Xu, Y.; Sun, J. and Shen, J. (2006). Crayfish *Procambarus clarkii* protected against white spot syndrome virus by oral administration of viral proteins expressed in silkworms. Aquaculture, 253: 179-183.

Yang, F.; He, J.; Lin, X.H.; Li, Q.; Pan, D.; Zhang, X.B. and Xu, X. (2001). Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. Journal of Virology, 75: 11811– 11820.

Yi, G.; Wang, Z.; Qi, Y.; Yao, L.; Qian, J.; Hu, L. (2004). VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in attachment and penetration into shrimp cells. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37: 726-734.

Zhang, X.; Huang, C.; Xu, X. and Hew, C.L. (2002). Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. Journal of General Virology, 83: 1069-1074.

Zhu, Y.; Xie, X. and Yang, F. (2005). Transcription and identification of a novel envelope protein (VP124) gene of shrimp white spot syndrome virus. Virus Research, 113: 100-106.

Zhu, Y.B.; Li, J.Y. and Yang, F. (2006). Identification of an envelope protein (VP39) gene from shrimp white spot syndrome virus. Archives of Virology, 151: 71-82.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 11, No. 1, Spring, 2015

Cloning and expression of VP28 gene of white spot virus (Iran isolate) in *E. coli,* TG1

Houshmand, H.[1]; Seyfi Abad Shapouri, M.R.[2]; Peyghan, R.[3]; G.Marammazi, J.[4] and Afsharnasab, M.[5]

Received: 15.04.2014 Accepted: 08.10.2014

Abstract

White spot virus is concerned as a major pathogen in shrimp Penaeids family. In recent years, heavy mortalities in cultured shrimps Iran and other countries necessitate doing studies to construct kits for rapid detection and eliciting resistance against the virus by using different membrane proteins. For this purpose, in this study, a piece of VP28 gene of white spot virus with 528 bp length was isolated and amplified by PCR from the infected shrimps in Choebdeh Abadan. After cloning of the gene in the plasmid pMal-c2X, the protein was expressed in *E. coli* strain TG1. Target protein with a molecular weight of 19.38 kDa was evaluated by SDS-PAGE. Expression of protein with the expected molecular weight in SDS-PAGE accompanied with evaluation of the cloned sequences revealed the successful expression of the protein in *Escherichia coli* TG1. This study for the first time succeeded in cloning and experssion of VP28 in a prokaryotic organism.

Key Word: White Spot Virus, VP28, Cloning, Expression

1- PhD Graduated of Fish Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
4- Associate Professor, Iranian Fisheries Research Organization, Ahvaz, Iran
5- Associate Professor, Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, Iran
Corresponding Author: Houshmand. H., E-mail: Houshmand_h@yahoo.com

www.SID.ir