Archive of SID

بیان اپیتوپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی توسط سازه‌ی نوترکیب pET24-G1 در *اشرشیاکلی*

رضا پسندیده[۱]، محمدتقی بیگی‌نصیری[۲*] و مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۳]

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۸

چکیده

تب بی‌دوام گاوی (BEF) یک بیماری ویروسی در گاو و گاومیش است که در سال‌های اخیر در برخی از استان‌های ایران به ویژه مناطق جنوبی و گرم دیده شده است. گلیکوپروتئین G، آنتی‌ژن اصلی حفاظتی ویروس تب بی‌دوام گاوی (BEFV) و هدف آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ضدویروسی است. هدف از مطالعه‌ی حاضر، کلونینگ و بیان اپیتوپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس BEF در یک سیستم پروکاریوتی بود. به این منظور، اپیتوپ G1 درون ناقل بیانی پروکاریوتی pET-24a(+)، تحت کنترل پروموتر T7، کلون و سپس سازه‌ی نوترکیب pET24-G1 به سویه‌ی Rosetta *اشرشیاکلی* منتقل شد. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از روش‌های SDS-PAGE و ایمونوبلات بررسی شد. در آنالیز SDS-PAGE پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۸ کیلو دالتون رویت شد که با وزن مورد انتظار برای پروتئین نوترکیب متصل به دنباله‌ی ۶ تایی هیستیدین هم‌خوانی داشت. آنالیز ایمونوبلات نشان داد که پروتئین G1 بیان شده به طور اختصاصی با سرم پلی کلونال موشی حاوی آنتی‌بادی ضد BEF واکنش داد. بنابراین در این مطالعه پروتئین G1 از ویروس BEF با موفقیت توسط سازه‌ی نوترکیب pET24-G1 در *اشرشیاکلی* بیان شد. براساس نتایج این مطالعه می‌توان ایمنی‌زایی و کارآیی این محصول را به عنوان کاندید احتمالی جهت تولید یک واکسن زیرواحدی علیه این ویروس در مدل‌های حیوانی بررسی نمود.

کلمات کلیدی: ژن، ویروس تب بی‌دوام گاوی، پروتئین نوترکیب G1، *اشرشیاکلی*

مقدمه

تب بی‌دوام گاوی (BEF)[۱] یک بیماری ویروسی در گاو و گاومیش است که در افریقا، استرالیا، خاورمیانه و آسیا دیده می‌شود. عفونت ممکن است از نظر بالینی آشکار نباشد یا منجر به علائم بالینی خفیف تا شدید از جمله تب دو فازی[۲]، ترشحات بزاق، چشم و بینی، گرفتگی عضلانی، لنگش و بی اشتهایی گردد (Walker 2005, Zheng et al. 2009). ویروس تب بی‌دوام گاوی (BEFV)[۳] یک رابدوویروس[۴] منتقل شونده توسط بندپایان است که در جنس افمروویروس‌ها طبقه‌بندی می‌شود. این ویروس در طبیعت تنها از طریق نیش حشرات دور پرواز گسترش می‌یابد. ویروس این بیماری به عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند به سرعت گسترش یافته و منجر به خسارات اقتصادی قابل توجهی در صنعت گاو از طریق کاهش تولید شیر در گله‌های شیری، از دست دادن شرایط بدنی در گاوهای گوشتی و عدم تحرک حیوانات بارکش شود

[۱] دانش‌آموخته‌ی دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

[۲*] استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

E-mail: mt_nassiri@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۳] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

1- Bovine ephemeral fever
2- Bi-phasic fever
3- Bovine ephemeral fever virus
4- Rhabdovirus

www.SID.ir

Archive of SID

(Walker 2005, Aziz-Boaron et al. 2013). ویریون‌های BEF، مشابه دیگر رابدوویروس‌ها، شبیه گلوله تفنگ یا مخروطی شکل می‌باشند. ژنوم این ویروس از نوع RNA تک رشته‌ای منفی با طول ۱۴۹۰۰ باز است و پنج پروتئین L (با وزن مولکولی ۱۸۰ کیلو دالتون)، G (با وزن مولکولی ۸۱ کیلو دالتون)، N (با وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون)، P (با وزن مولکولی ۴۳ کیلو دالتون) و M (با وزن مولکولی ۲۹ کیلو دالتون) را کد می‌کند. پروتئین G آنتی‌ژن اصلی حفاظتی ویروس BEF است که دارای پنج جایگاه آنتی‌ژنیک (G1, G2, G3a, G3b, G4) در سطح خود می‌باشد (Cybinski et al. 1992, Kongsuwan et al. 1998, Dhillon et al. 2000). G1 یک جایگاه خنثی‌سازی خطی (Y^{487}-K^{503}) است که در انتهای دومین ترایمریزاسیون، دقیقاً قبل از ناحیه C-انتهایی پروتئین G قرار دارد (Trinidad et al. 2014).

پیش‌گیری و کنترل بیماری تب بی‌دوام گاوی از طریق واکسیناسیون و درمان دارویی حیوانات آلوده صورت می‌گیرد (Wallace and Viljoen 2005, Aziz-Boaron et al. 2013). تا کنون تحقیقات گوناگونی در زمینه‌ی ساخت انواع واکسن از جمله واکسن‌های زنده ضعیف شده، واکسن‌های غیرفعال شده، واکسن‌های زیر واحد مبتنی بر پروتئین G و واکسن‌های نوترکیب برای این بیماری انجام شده است (Walker and Klement 2015). در مطالعات پیشین مشخص شده است که پروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی هدف آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ضد ویروسی است (Cybinski et al. 1992, Uren et al. 1994). همچنین بر اساس خصوصیات محافظتی بسیار بالای پروتئین G طبیعی ویروس BEF، به نظر می‌رسد که محصول نوترکیب این پروتئین بتواند به عنوان یک واکسن آنتی‌ژنی، جایگزین مناسبی برای واکسن‌های متداول این بیماری باشد (Johal et al. 2008, Uren et al. 1994). در تحقیقی اپیتوپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی توسط ناقل نوترکیب pGEX-G1 در سویه BL21 (DH3) *اشرشیاکلی* بیان گردید (Zheng et al. 2007a). در مطالعه‌ی دیگر، ژن G1 پس از تکثیر توسط PCR به ناقل بیانی یوکاریوتی pPIC9K منتقل و در مخمر *پیکیا پاستوریس* GS115 بیان شد (Zheng et al. 2007b). این محققان از پروتئین G1 نوترکیب بیان شده در باکتری و مخمر به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده‌ی کف پلیت الایزا به منظور طراحی کیت تشخیصی برای ویروس BEF استفاده نمودند (Zheng et al. 2009, Zheng et al. 2010). در تحقیقی دیگر، پروتئین G1 با استفاده از سازه‌ی نوترکیب pMALc2x-G1 و به صورت همجوش با پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP)[1] در سویه‌ی Rosetta *اشرشیاکلی* بیان شد (Beygi Nassiri et al. 2016). بر اساس مطالب گفته شده و کاربرد بالقوه‌ی پروتئین G1 در ساخت یک واکسن زیرواحدی برای بیماری BEF، هدف از این مطالعه‌ی کلونینگ مولکولی ژن G1 و بیان پروتئین حاصل از آن در یک سیستم بیانی پروکاریوتی بود.

مواد و روش کار

سویه‌ی ویروس تب بی‌دوام گاوی مورد استفاده در این مطالعه توسط مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم-سازی رازی (کرج، ایران) از کشور ژاپن تهیه شد. تکثیر این ویروس در سلول‌های ریه‌ی همستر (HmLu-1)، کشت داده شده در محیط کشت سلولی RPMI (Bio Idea، ایران) حاوی ۵ درصد سرم جنین گاو صورت گرفت. همچنین در این تحقیق از ناقل بیانی پروکاریوتی pET-24a(+) و سویه‌های DH5α و Rosetta *اشرشیاکلی* (سیناژن، ایران) به عنوان میزبان‌های پروکاریوتی جهت کلونینگ و بیان ژن استفاده گردید.

توالی نوکلئوتیدی ژن G با شماره دسترسی AB462028 از بانک ژن استخراج و برای طراحی پرایمر به منظور تکثیر ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن G1 (نوکلئوتیدهای ۱۱۶۸ تا ۱۵۸۸) استفاده شد. سپس با در نظر گرفتن الگوی هضمی آنزیم‌های محدودکننده در توالی این ژن و

1- Maltose binding protein

www.SID.ir

Archive of SID

نیز با توجه به توالی نوکلئوتیدی پلاسمید بیانی پروکاریوتی (+)pET-24a، توالی محل برش آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و SalI به انتهای '۵ پرایمرها اضافه شد . در نهایت، توالی پرایمرها با برنامه‌ی Oligo Analyzer آنالیز و سفارش ساخت به شرکت دنازیست آسیا (ایران) داده شد (جدول ۱).

جدول ۱: پرایمرهای G1F-PET و G1R-PET جهت تکثیر ژن G1. زیر توالی برشی آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و SalI به ترتیب در انتهای '۵ پرایمرهای رفت و برگشت خط کشیده شده است

پرایمر	توالی
G1F-PET	5'-GCCGGAATTCAGAGCTTGGTGTGAATACA-3'
G1R-PET	5'-CATTGTCGACCCAACCTACAACAGCAGATA-3'

یک سازه‌ی نوترکیب حاوی ژن گلیکوپروتئین G (pTZ57R/T-G)، طراحی شده در مطالعه‌ی قبلی (Pasandideh et al. 2016)، به عنوان الگو برای تکثیر ناحیه‌ی کدکننده‌ی اپیتوپ G1 توسط PCR استفاده شد. این واکنش به این صورت انجام شد: یک میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-G، ۰/۸ پیکومول از هر کدام از آغازگرها، ۱ میکرولیتر آنزیم Pfu DNA پلیمراز (۵U)، ۲/۵ میکرولیتر بافر Pfu PCR 10X (بدون $MgSO_4$)، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs، ۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۱۶/۲ میکرولیتر آب دو بار تقطیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مخلوط و تکثیر طی ۳۰ چرخه‌ی دمایی شامل ۹۵ °C برای ۳۰ ثانیه، ۵۰°C برای ۴۵ ثانیه و ۷۲°C برای ۹۰ ثانیه انجام شد. مراحل دمایی پیش و پس از تکثیر به ترتیب شامل ۹۵°C برای ۳ دقیقه و ۷۲°C برای ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR توسط کیت (GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR (Vivantis، مالزی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی شد.

در این مطالعه از ناقل بیانی (+)pET-24a به منظور کلونینگ و بیان ژن G1 در *اشرشیاکلی* استفاده شد. به منظور آماده‌سازی ناقل بیانی، ابتدا سویه‌ی DH5α باکتری *اشرشیاکلی* حاوی این ناقل در محیط LB مایع دارای کانامایسین در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک شب کشت داده شد و سپس توسط کیت GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis، مالزی) استخراج پلاسمید گردید.

برای انجام کلونینگ لازم بود که ناقل و ژن مورد نظر دارای نواحی انتهایی مکمل بوده تا به راحتی به هم متصل شوند. به همین جهت روی هر دو محصول (ناقل و ژن تخلیص شده) عمل هضم با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده EcoRI و SalI (Fermentas، امریکا) صورت گرفت و سپس محصولات با استفاده از کیت (GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR (Vivantis، مالزی) خالص‌سازی شدند. پس از این مرحله، عمل اتصال پلاسمید و محصول PCR با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز (۱۰X) طبق دستورالعمل آنزیم صورت گرفت. سپس محصول اتصال، با فرض تشکیل پلاسمیدهای حلقوی، با روش شوک حرارتی به سویه DH5α باکتری *اشرشیاکلی*، پذیرا شده با کلریدکلسیم، انتقال داده شد. در پایان، باکتری‌ها در محیط LB جامد کانامایسین‌دار کشت داده شدند. پس از رشد کلونی‌های باکتریایی، غربالگری با استفاده از روش PCR و هضم آنزیمی صورت گرفت. کلونی‌های مثبت به عنوان کلونی‌های دارای پلاسمید نوترکیب (پلاسمید حاوی ژن مورد نظر) تلقی شدند که در مرحله‌ی بعد با استفاده از کیت استخراج پلاسمید از سه عدد از آن‌ها استخراج صورت گرفت و به منظور تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست (ایران) ارسال گردید. تعیین توالی با استفاده از پرایمر T7 انجام گرفت. پس از اطمینان از صحت کلونینگ، پلاسمیدهای نوترکیب خالص شده که توالی آن‌ها مورد تأیید قرار گرفته بود، به باکتری *اشرشیاکلی* سویه Rosseta منتقل شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

یک کلونی باکتریایی سویه‌ی Rosseta حاوی سازه‌ی نوترکیب pET24-G1 پس از کشت شبانه، در محیط LB مایع دارای کانامایسین به نسبت ۱ به ۱۰۰ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با شیک متوسط کشت داده شد. با رشد باکتری و رسیدن به کدورت ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به منظور القای بیان پروتئین از IPTG (ایزوپروپیل بتا دی‌گالاکتوپیرانوزید) با غلظت ۰/۱ مولار استفاده شد و کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تا ۱۸ ساعت ادامه یافت. محیط کشت‌های LB مایع حاوی باکتری پیش از افزودن IPTG و نیز پس از ۱۸ ساعت کشت در حضور IPTG، به مدت ۲ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و رسوب به دست آمده با بافر نمونه[1] (۲X) (حاوی آب مقطر، تریس ۰/۵ مولار با ۶/۸ = pH، بتا–مرکاپتو اتانول، برومو فنول بلو، گلیسرول و SDS ده درصد) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و در نهایت به منظور بررسی الگوی بیان، روی ژل ۱۵ درصد پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) الکتروفورز شدند.

به منظور بررسی حلالیت پروتئین نوترکیب، پس از بیان مقداری از رسوب باکتری به صورت جداگانه در بافرهای شستشو- تعادل[2] (فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار و ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، pH=۷/۴) بدون اوره و دارای اوره ۸ مولار مخلوط شدند. جهت از بین بردن استحکام و شکستن دیواره‌ی باکتری‌ها، این سوسپانسیون‌ها پس از ۱۰ مرتبه انجماد و ذوب متوالی به مدت ۲۰ دقیقه سونیکه و سپس روی ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) الکتروفورز شدند. در مرحله بعد، خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی رزین کبالت مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. آخرین مرحله‌ی خالص‌سازی، جدا نمودن و استحصال پروتئین‌های متصل شده به رزین کبالت بود که با استفاده از بافر شوینده[3] (فسفات سدیم ۵۰ میلی-مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۱۵۰ میلی-مولار و اوره ۸ مولار، pH=۷/۴) انجام شد. به محض ریختن این محلول، اقدام به جمع‌آوری نمونه‌های ۱ میلی‌لیتری درون میکروتیوب‌های استریل گردید. در آخر حضور پروتئین نوترکیب در نمونه‌های جمع‌آوری شده و نیز در رسوب (پروتئین‌های نامحلول) و مایع رویی (پروتئین‌های محلول)، به صورت جداگانه با الکتروفورز روی ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریل‌آمید بررسی شد.

به منظور تهیه‌ی سرم پلی‌کلونال موشی ضد ویروس BEF، ۲۰۰ میکرولیتر از واکسن غیر فعال شده تب بی‌دوام گاوی (Kyoton Biken، ژاپن) به سه سر موش ماده‌ی نژاد Balb/c با سن ۶ هفته به صورت عضلانی به ماهیچه پشت پا و نیز داخل صفاقی تزریق شد. تزریق سه مرتبه با فواصل زمانی دو هفته تکرار شد. یک هفته پس از ایمن‌سازی سوم، از انتهای دم حیوانات خون گرفته شد و سرم آن‌ها در یک آزمایش الایزای غیرمستقیم خانگی و با استفاده از ویروس BEF تکثیر داده شده به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده کف پلیت، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه سرم با بالاترین جذب نوری در الایزا در آزمایش ایمنوبلات استفاده شد.

به منظور تأیید خصوصیات آنتی‌ژنی پروتئین نوترکیب G1 از آزمایش ایمنوبلات استفاده شد. به این منظور پروتئین نوترکیب بیان شده در *اشرشیاکلی* پس از مخلوط شدن با بافر SDS-PAGE 2X به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. از مخلوط تهیه شده جهت الکتروفوروز روی ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریل‌آمید استفاده شد. در مرحله بعد، باندهای پروتئینی تفکیک شده طی سه ساعت با جریان الکتریسیته ۶۰ ولت به غشای نیتروسلولزی انتقال پیدا کردند. پس از انتقال، غشاء به مدت یک شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در محلول فسفات بافر سالین دارای ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBST) حاوی ۵ درصد پودر شیر خشک، به عنوان بافر بلوک کننده، قرار داده شد تا سطوحی از غشاء که عاری از پروتئین بودند، پوشانده شوند. پس از ۳ بار شستشو با بافر PBST، سرم پلی

1- Sample buffer
2- Equilibration/Wash Buffer
3- Elution Buffer

www.SID.ir

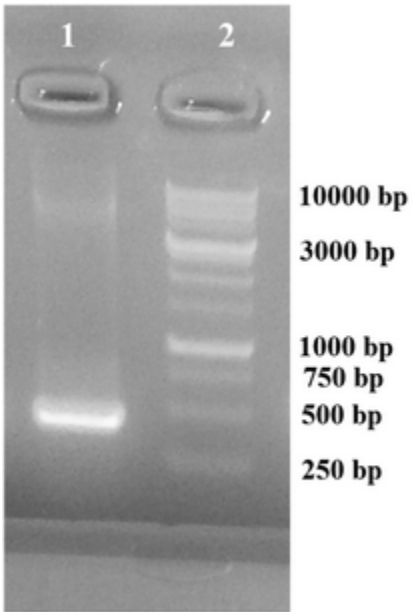
Archive of SID

کلونال موشی ضد ویروس BEF با رقت ۱ به ۲۰۰۰ در PBST حاوی ۵ درصد شیرخشک به غشاء اضافه شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و ۳ بار شستشو با بافر PBST، غشاء به مدت ۱ ساعت در مجاورت محلول کونژوگه پراکسیداز ضد IgG موش (Bio-Rad، امریکا) (با رقت ۱/۳۰۰۰ در PBST حاوی ۵ درصد شیرخشک) قرار داده شد. در انتها پس از ۳ بار شستشو با بافر PBST، جهت رویت نتیجه واکنش از محلول کروموژن سوبسترای کلرونفتول (Sigma، امریکا) و آب اکسیژنه استفاده شد.

نتایج

ساخت سازه‌ی بیانی نوترکیب pET24-G1

نتایج به دست آمده از توالی‌یابی ژن G و BLAST کردن آن با توالی‌های این ژن از سویه‌های مختلف ویروس BEF ثبت شده در پایگاه بانک ژن NCBI نشان داد که سویه‌ی ویروسی مورد استفاده در این مطالعه بیش-ترین قرابت را با سویه‌ی YHL (یاماگوچی، ژاپن، ۱۹۶۶) داشت (Pasandideh et al. 2016). پس از تکثیر ژن G1 توسط PCR، محصول تکثیر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار نردبان ژنی (سیناکلون، ایران) الکتروفورز شد. نتایج الکتروفورز نشان داد که قطعه‌ای با طول ۴۲۰ جفت باز با موفقیت توسط PCR تکثیر شده است که با نتیجه قابل انتظار هم‌خوانی داشت (تصویر ۱). پس از انجام مرحله‌ی اتصال بین محصول PCR و ناقل مورد استفاده، محصولات اتصال یافته به سویه‌ی DH5α باکتری *اشرشیاکلی* انتقال یافت. ظهور کلونی‌های رشد یافته روی محیط LB جامد کانامایسین‌دار، نشان‌دهنده‌ی ورود موفقیت‌آمیز ناقل حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها بود. غربالگری کلونی‌های باکتریایی مذکور با روش PCR نشان از صحت کلونینگ ژن G1 در سویه‌ی DH5α باکتری *اشرشیاکلی* داشت. توالی‌یابی کلونی‌های مثبت حاوی ناقل نوترکیب با استفاده از پرایمر T7 توسط شرکت تکاپوزیست، نشان‌دهنده‌ی عدم بروز جهش در نتیجه PCR در قطعه‌ی ژنی کلون شده بود.



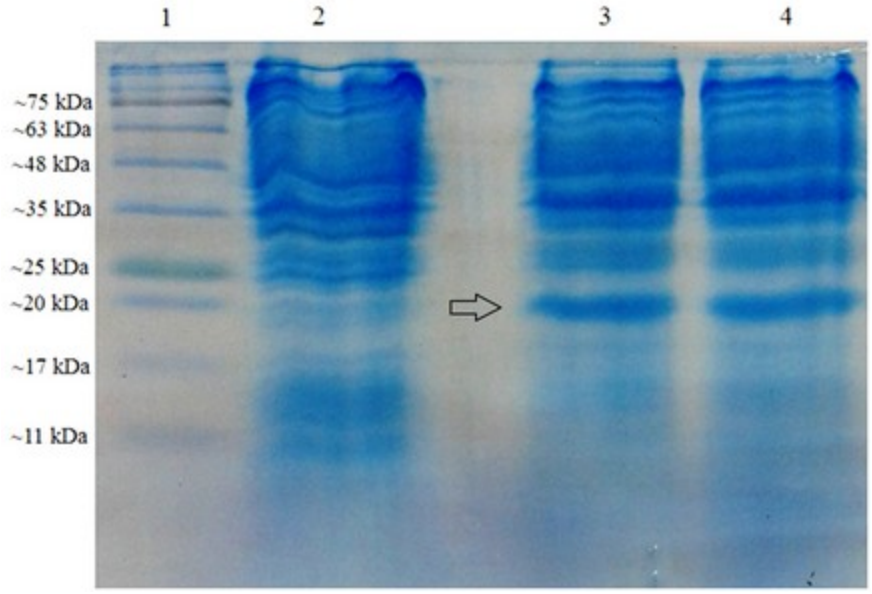
تصویر ۱: محصول PCR حاصل از تکثیر ژن G1.
ستون ۱: محصول bp ۴۲۰ ژن G1؛ ستون ۲: نردبان ژنی (سیناکلون، ایران).

بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب

پس از اطمینان از صحت کلونینگ، بیان پروتئین نوترکیب G1 در باکتری *اشرشیاکلی* با آزمایش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ی این آزمایش در تصویر ۲ نشان داده شده است. همان گونه که در این تصویر مشخص است، باکتری القاء شده با IPTG در مقایسه با همان باکتری قبل از القاء، حاوی یک پروتئین اضافی با وزن تقریبی ۱۸ کیلو دالتون بود که با احتساب وزن مولکولی پروتئین کوچک اضافه شده از طریق دنباله‌ی ۶ تایی هیستیدین، با وزن پیش‌بینی شده برای پروتئین نوترکیب G1 هم‌خوانی داشت. بنابراین سازه‌ی نوترکیب pET24-G1 توانست پروتئین مورد نظر را به میزان بالایی در *اشرشیاکلی* بیان کند (تصویر ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

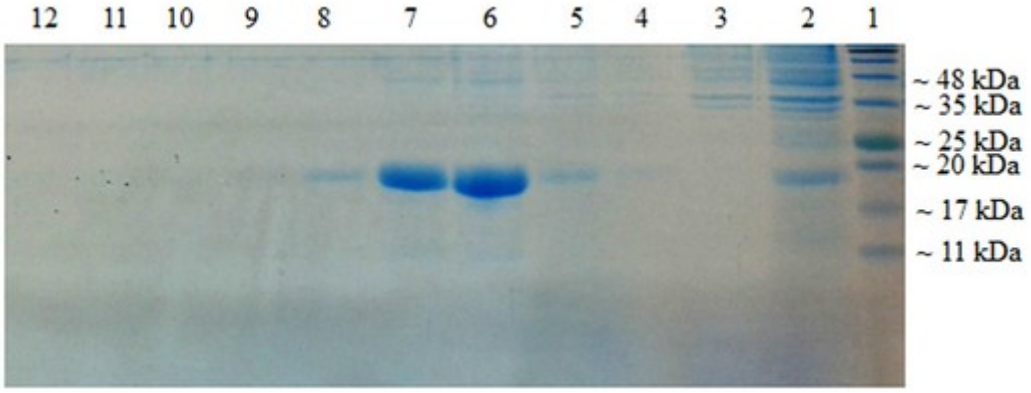


تصویر ۲: القاء بیان پروتئین نوترکیب G1 در سویه‌ی Rosetta/*شرشیاکلی* با روش SDS-PAGE. ستون ۱: نشان‌گر پروتئینی (سیناکلون، ایران)؛ ستون ۲: باکتری حاوی سازه نوترکیب pET24-G1 قبل از بیان ژن G1؛ ستون‌های ۳ و ۴: باکتری‌های حاوی سازه نوترکیب pET24-G1 بعد از بیان ژن G1.

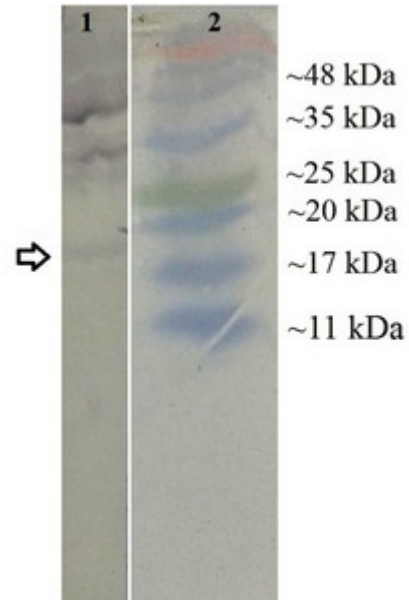
به منظور بررسی حلالیت پروتئین نوترکیب، پس از بیان مقداری از رسوب باکتری به صورت جداگانه در بافرهای شستشو- تعادل بدون اوره و دارای اوره ۸ مولار مخلوط و سپس روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. پیش از واسرشت‌سازی توسط اوره، پروتئین G1 بیان شده تنها در رسوب مشاهده شد که نشان دهنده‌ی نامحلول بودن این پروتئین بود. اما پس از واسرشت‌سازی، پروتئین بیان شده به مایع رویی منتقل شد (تصویر ۳). در تصویر ۳ الکتروفورز نمونه‌های متوالی از پروتئین G1 خالص شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی رزین کبالت روی ژل SDS-PAGE نشان داده شده‌اند. نتایج این آزمایش نشان‌دهنده‌ی خالص شدن مطلوب پروتئین نوترکیب با استفاده از رزین کبالت بود. ویژگی آنتی‌ژنیک پروتئین G1 بیان شده با استفاده از آزمایش ایمنوبلات بررسی شد. در آنالیز ایمنوبلات، ظهور باند پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۸ کیلو دالتون در واکنش با سرم پلی‌کلونال موشی مورد استفاده نشان‌دهنده‌ی واکنش اختصاصی پروتئین بیان شده با آنتی‌بادی‌های ضد ویروس BEF بود (تصویر ۴). در این آزمایش، علاوه بر باند مذکور باندهایی با وزن‌های مولکولی بیش‌تر نیز دیده شد که ظهور آن‌ها به دلیل واکنش غیراختصاصی پروتئین‌های بیان شده توسط *اشرشیاکلی* با سرم پلی‌کلونال مورد استفاده بود.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۳: الکتروفورز نمونه‌های متوالی از پروتئین G1 خالص شده با ستون کروماتوگرافی رزین کبالت. ستون ۱: نشانگر پروتئینی (سیناکلون، ایران)؛ ستون‌های ۲ و ۳: به ترتیب مایع رویی و رسوب حاصل از باکتری بیان‌کننده‌ی پروتئین G1 پس از واسرشت‌سازی توسط اوره؛ ستون‌های ۴ تا ۱۲: نمونه‌های متوالی از پروتئین G1 خالص شده.



تصویر ۴: آنالیز ایمنوبلات پروتئین G1 نوترکیب. ستون ۱: واکنش پروتئین G1 خالص شده با سرم پلی کلونال موشی ضد ویروس BEF. باند مربوطه با وزن مولکولی تقریبی ۱۸ کیلو دالتون با فلش نشان داده شده است؛ ستون ۲: نشانگر پروتئینی (سیناکلون، ایران).

بحث

در این مطالعه اپیتوپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی درون ناقل بیانی پروکاریوتی pET-24a(+) و تحت کنترل پروموتر قوی T7 کلون و متعاقباً به سویه DH5α باکتری *اشرشیاکلی* منتقل شد. طبق دستورالعمل ناقل‌های pET، سویه‌ی DH5α میزبان باکتریایی مناسبی برای کلونینگ اولیه DNA هدف درون این نوع از ناقل‌ها و نگهداری پلاسمید نوترکیب است زیرا کارایی بالایی در ترانسفورماسیون و تکثیر پلاسمید دارد. بررسی بیوانفورماتیکی نشان داد که قالب خوانش باز (ORF)[1] کدکننده‌ی ژن G1 دارای تعداد زیادی کدون‌های نایاب است که این کدون‌ها توسط سویه‌های متداول *اشرشیاکلی* مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. بنابراین پس از اطمینان از کلونینگ موفق ژن G1 در پلاسمید

1- Open reading frame

www.SID.ir

Archive of SID

pET-24a(+) و در سویه‌ی DH5α *اشرشیاکلی*، پلاسمید نوترکیب غربال شده جهت بیان مؤثر پروتئین به سویه‌ی Rosseta *اشرشیاکلی* انتقال داده شد. سویه‌ی Rosetta حاوی ژن‌های کدکننده‌ی برخی از RNAهای ناقل برای کدون‌های نایاب جهت بیان یک پروتئین نوترکیب است. این خصوصیات برای بیان مؤثر و شکل‌گیری ساختار طبیعی‌تر یک پروتئین نوترکیب، که به آن یک حالت عمل کننده و دارای وظیفه‌ی زیستی را القا می‌کند، ضروری می‌باشند. سیستم بیانی pET یک سیستم قوی برای کلونینگ و بیان پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *اشرشیاکلی* است. همچنین، pET-24a(+) یک دنباله‌ی ۶ تایی هیستیدین[1] را در پایین دست پروتئین بیان شده اضافه می‌کند که موجب تسهیل خالص‌سازی پروتئین نوترکیب توسط کروماتوگرافی تمایل فلز بی‌حرکت (IMAC)[2] می‌شود (Terpe 2003). دنباله‌ی ۶ تایی هیستیدین در pH= ۸ کوچک و بدون بار[3] است، به همین دلیل عموماً روی ترشح، ساختار، تاشودگی و یا عملکرد پروتئین نوترکیب در سلول تأثیری نمی‌گذارد. این دنباله، ایمنی‌زایی بسیار ضعیفی دارد بنابراین پروتئین نوترکیب را می‌توان بدون حذف آن به عنوان یک آنتی‌ژن برای تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین مورد نظر استفاده کرد (Qiagen 2001). بر این اساس، پروتئین G1 بیان شده توسط سازه‌ی نوترکیب pET24-G1 می‌تواند در مطالعات آینده به طور مستقیم به منظور بررسی ایمنی‌زایی آن علیه ویروس BEF مورد آزمایش قرار گیرد. مزیت دیگر دنباله‌ی ۶ تایی هیستیدین نسبت به دنباله‌هایی نظیر GST یا FLAG این است که پروتئین هم‌جوش بیان شده می‌تواند در شرایط واسرشت‌سازی پروتئین نیز خالص شود زیرا برهمکنش بین دنباله‌های متوالی هیستیدین و ستون میل تمایلی رزین، برای مثال رزین کبالت، در گوانیدین ۶ مولار یا اوره ۸ مولار که واسرشت کننده‌های قوی پروتئینی هستند، پایدار است (Ramos et al. 2004). در این مطالعه پیش از واسرشت‌سازی توسط اوره، پروتئین G1 بیان شده تنها در رسوب مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی نامحلول بودن این پروتئین بود اما پس از واسرشت‌سازی، پروتئین بیان شده به مایع رویی منتقل شد. دلیل این امر این است که بسیاری از پروتئین‌ها به ویژه پروتئین‌های یوکاریوتی بیان شده در *اشرشیاکلی*، در اجسام متراکم[4] محبوس و در نتیجه به فرم نامحلول تبدیل می‌شوند. در این شرایط استفاده از دنباله‌ی ۶ تایی هیستیدین طی فرآیند واسرشت‌سازی پروتئین، می‌تواند کمک کننده باشد (Ramos et al. 2004).

تا کنون مطالعاتی در زمینه‌ی کلونینگ و بیان ژن کد کننده‌ی اپیتوپ G1 در سیستم‌های بیانی مختلف گزارش شده است. در یک مطالعه پروتئین G1 از ویروس BEF درون ناقل بیانی pGEX–4T-1 کلون و در سویه‌ی (DE3) BL21 از *اشرشیاکلی* بیان شد. وزن مولکولی پروتئین بیان شده در حدود ۴۲ کیلو دالتون بود که با وزن مورد انتظار برای پروتئین هم‌جوش (شامل ۱۶~ کیلو دالتون برای پروتئین G1 و ۲۶~ کیلو دالتون برای پروتئین GST بیان شده توسط پلاسمید pGEX-4T-1) هم‌خوانی داشت و اختصاصیت و فعالیت واکنشی مناسبی را با یک سرم ضد ویروس BEF در آزمایش ایمنوبلات نشان داد (Zheng et al. 2007a). در تحقیق دیگر محققان توانستند پروتئین G1 را توسط سازه‌ی نوترکیب pMALc2x-G1 در سویه‌ی Rosetta از باکتری *اشرشیاکلی* بیان کنند. وزن مولکولی پروتئین بیان شده در حدود ۵۸ کیلو دالتون بود که با وزن مورد انتظار برای پروتئین هم‌جوش (شامل ۱۶~ کیلو دالتون برای پروتئین G1 و ۴۲~ کیلو دالتون برای پروتئین MBP بیان شده توسط پلاسمید pMALc2x) هم‌خوانی داشت و دارای واکنش اختصاصی با یک سرم موشی ضد ویروس BEF بود (Beygi Nassiri

1- 6xHis tag
2- Immobilized metal-affinity chromatography (IMAC)
3- Uncharged

4- Inclusion bodies

www.SID.ir

Archive of SID

et al. 2016). در مطالعه‌ای محققان ژن اپیتوپ G1 از گلیکوپروتئین G ویروس BEF را درون ناقل بیانی pPIC9K کلون و در مخمر *پیکیا پاستوریس* GS115 بیان نمودند. آن‌ها گزارش کردند که پروتئینی با وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون بیان شد که بسیار بزرگ‌تر از اندازه‌ی پیش‌بینی شده بود. اما پس از دِگلیکوزیلاسیون توسط آنزیم *Endo* H، وزن مولکولی پروتئین به ۱۶ کیلو دالتون کاهش یافت (Zheng et al. 2007b). با احتساب دنباله ۶ تایی هیستیدین، وزن مولکولی تقریبی پروتئین نوترکیب بیان شده در این مطالعه با مطالعات ذکر شده هم‌خوانی داشت.

در مطالعات پیشین آزمایش‌های واکسیناسیون با استفاده از ناقل‌های ویروسی نوترکیب بیان‌کننده‌ی پروتئین G ویروس BEF انجام شده است (Hertig et al. 1996, Wallace and Viljoen 2005). بنابراین به نظر می‌رسد که گلیکوپروتئین G طبیعی ویروس BEF ویژگی‌های محافظتی علیه این ویروس داشته و احتمالاً پروتئین نوترکیب آن بتواند به عنوان یک واکسن آنتی‌ژنی مفید استفاده شود (Johal et al. 2008). اپیتوپ G1 از گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی تنها جایگاه خطی در میان پنج جایگاه آنتی‌ژنیک G1، G2، G3a، G3b و G4 این پروتئین می‌باشد که از لحاظ نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی در بیش‌تر سویه‌های این ویروس (به جز یک جایگزینی آمینو اسیدی در موقعیت ۴۹۹ برای چند سویه محدود) حفاظت شده است (Kato et al. 2009, Zheng and Qiu 2012). از طرفی در مطالعات پیشین مشخص شده است که تغییرات آمینواسیدی شناسایی شده در جایگاه‌های آنتی‌ژنیک پروتئین G روی خصوصیات خنثی‌سازی این جایگاه‌ها مؤثر نیستند (Trinidad et al. 2014). با توجه به ایمنی‌زایی بالای پروتئین G و این واقعیت که اپیتوپ G1 از لحاظ ژنتیکی و آنتی‌ژنیکی در میان سویه‌های مختلف این ویروس حفاظت شده است و نیز واکنش مثبت پروتئین نوترکیب بیان شده در این تحقیق با آنتی‌بادی‌های ضد ویروس BEF، در مطالعات آینده می‌توان ایمنی‌زایی و کارایی این محصول را به عنوان یک نامزد احتمالی جهت تولید یک واکسن زیرواحدی علیه این ویروس در مدل‌های حیوانی بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری و مساعدت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان و بخش ویروس‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز کمال تشکر را به جا آورند.

منابع

Aziz-Boaron, O.; Leibovitz, K.; Gelman, B.; Kedmi, M. and Klement, E. (2013). Safety, immunogenicity and duration of immunity elicited by an inactivated bovine ephemeral fever vaccine. PloS one, 8(12): 1-9.

Beigi Nassiri, M.T.; Pasandideh, R. and Seyfi Abad Shapouri, M.R. (2016). Cloning and expression of the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus G glycoprotein in *Escherichia Coli*. Genetics in the 3rd millennium, 14(2): 4250-4255.

Cybinski, D.; Davis, S. and Zakrzewski, H. (1992). Antigenic variation of the bovine ephemeral fever virus glycoprotein. Archives of virology, 124(3-4): 211-224.

Dhillon, J.; Cowley, J.A.; Wang, Y. and Walker, P.J. (2000). RNA polymerase (L) gene and genome terminal sequences of ephemeroviruses bovine ephemeral fever virus and Adelaide River virus indicate a close relationship to vesiculoviruses. Virus research, 70(1): 87-95.

Hertig, C.; Pye, A.D.; Hyatt, A.D.; Davis, S.S.; McWilliam, S.M.; Heine, H.G. et al. (1996). Vaccinia virus-expressed bovine ephemeral fever virus G but not GNS glycoprotein induces neutralizing antibodies and protects against experimental infection. Journal of general virology, 77(4): 631-640.

www.SID.ir

Archive of SID

Johal, J.; Gresty, K.; Kongsuwan, K. and Walker, P.J. (2008). Antigenic characterization of bovine ephemeral fever rhabdovirus G and GNS glycoproteins expressed from recombinant baculoviruses. Archives of Virology, 153(9): 1657-1665.

Kato, T.; Aizawa, M.; Takayoshi, K.; Kokuba, T.; Yanase, T.; Shirafuji, H. et al. (2009). Phylogenetic relationships of the G gene sequence of bovine ephemeral fever virus isolated in Japan, Taiwan and Australia. Veterinary Microbiology, 137(3): 217-223.

Kongsuwan, K.; Cybinski, D.H.; Cooper, J. and Walker, P.J. (1998). Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. Journal of General Virology, 79(11): 2573-2581.

Pasandideh, R.; Beygi Nassiri, M.T.; Seyfi Abad Shapouri, M.R.; Fayazi, J.; Roshanfekr, H. and Lotfi, M. (2016). Cloning and sequencing of G glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus in Escherichia coli. Iranian Journal of Animal Science Reaserch, 8(3): 511-519 (in persian).

Qiagen (2001). The QIAexpressionist. In Handbook for High-Level Expression Purification of 6xHis-Tagged Proteins. Hilden, Germany, 1-125.

Ramos, C.R.R.; Abreu, P.A.E.; Nascimento, A.L.T.O. and Ho, P.L. (2004). A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 37(8): 1103-1109.

Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(5): 523-533.

Trinidad, L.; Blasdell, K.R.; Joubert, D.A.; Davis, S.S.; Melville, L.; Kirkland, P.D. et al. (2014). Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian episystem. Journal of Virology, 88(3): 1525-1535.

Uren, M.F.; Walker, P.J.; Zakrzewski, H.; St George, T.D. and Byrne, K.A. (1994). Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. Vaccine, 12(9): 845-852.

Walker, P.J. (2005). Bovine ephemeral fever in Australia and the world. Current Topics in Microbiology and Immunology, 292: 57-80.

Walker, P.J. and Klement, E. (2015). Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. Veterinary Research, 46(1): 1-17.

Wallace, D.B. and Viljoen, G.J. (2005). Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. Vaccine, 23(23): 3061-3067.

Zheng, F.Y.; Lin, G.Z. and Qiu, C.Q. (2007a). Expression, purification and antigenic characterization of the epitope-G1 gene of bovine ephemeral fever virus in *Escherichia coli*. Acta microbiologica Sinica, 47(3): 498-502.

Zheng, F.Y. and Qiu, C. (2012). Phylogenetic relationships of the glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus isolated from mainland China, Taiwan, Japan, Turkey, Israel and Australia. Virology Journal, 9(1): 1-8.

Zheng, F.Y.; Lin, G.Z..; Qiu, C.Q.; Yuan, K.Z. and Song, J.Y.. (2007b). Expression and antigenic characterization of the epitope-G1 of the bovine ephemeral fever virus glycoprotein in *Pichia pastoris*. Virologica Sinica, 22(5): 347-352.

Zheng, F.Y.; Lin, G.Z.; Qiu, C.Q.; Zhou, J.Z.; Cao, X.A. and Gong, X.W. (2009). Development and application of G 1-ELISA for detection of antibodies against bovine ephemeral fever virus. Research in Veterinary Science, 87(2): 211-212.

Zheng, F.Y.; Lin, G.Z.; Qiu, C.Q.; Zhou, J.Z.; Cao, X.A. and Gong, X.W. (2010). Serological detection of bovine ephemeral fever virus using an indirect ELISA based on antigenic site G 1 expressed in *Pichia pastoris*. The Veterinary Journal, 185(2): 211-215.

www.SID.ir

Vol. 15, No. 1, Spring, 2019
Archive of SID

Expression of the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus G glycoprotein gene by pET24-G1 recombinant construct in *Escherichia coli*

Pasandideh, R.[1]; Beigi Nassiri, M.T.[2] and Seyfi Abad Shapouri, M.R.[3]

Received: 27.09.2017 Accepted: 08.05.2018

Abstract

Bovine ephemeral fever (BEF) is a viral disease of cattle and water buffalo seen in some provinces of Iran, generally southern and warm regions in recent years. The G glycoprotein is the main protective antigen of the bovine ephemeral fever virus (BEFV) and the target of anti-BEFV neutralizing antibodies. The aim of the present study was cloning and expression of the G1 epitope of BEF virus G glycoprotein gene in a prokaryotic system. For this purpose, the G1 epitope was cloned in a prokaryotic expression vector, pET-24a(+), under the control of the T7 promoter and subsequently the recombinant pET24-G1 construct was transformed into Rosetta strain of *Escherichia coli*. Expressed recombinant protein was analyzed using SDS-PAGE and immunoblotting methods. SDS-PAGE analysis showed that a protein with ~18 kDa molecular weight, consistent with the expected molecular weight of recombinant protein fused to 6xHis tag, was expressed. Immunoblotting analysis showed that the expressed G1 protein specifically reacted with a mouse polyclonal serum against BEFV. Thus, in this study the G1 protein of BEFV was successfully expressed by the pET24-G1 recombinant construct in *Escherichia coli*. Based on the results of this study, immunization and the efficacy of this product can be consider as a possible candidate for the production of subunit vaccine against the virus in animal models.

Key words: Gene, Bovine Ephemeral Fever Virus, Recombinant G1 protein, *Escherichia coli*

1- PhD Graduated of Animal Genetics and Breeding, Faculty of Animal & Food Science, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mollasani, Iran
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal & Food Science, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mollasani, Iran
3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Beigi Nassiri, M.T., E-mail: mt_nassiri@yahoo.com

www.SID.ir