



## کلونینگ قطعات ژنی NS3 و 5'UTR از عامل اسهال ویروسی گاوها در پلاسمید لنتی ویروسی pWPI-linker B

اعظم مختاری<sup>۱\*</sup>، امید مددگار<sup>۲</sup>، آرشی قلیانچی لنگرودی<sup>۳</sup>، محمدرضا معزونی<sup>۴</sup>

۱. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.

۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.

۴. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

پذیرش: ۹ دی ماه ۹۴

دریافت: ۹ اردیبهشت ماه ۹۴

### چکیده

عامل ایجاد اسهال ویروسی گاو (BVD) از جنس پستی ویروس از خانواده فلیوی ویریده است که خود موجب پدید آمدن مشکلات اقتصادی، بهداشتی قابل توجهی در مزارع پرورش گاو می‌شود. این ویروس گسترش جهانی دارد و با وجود کاربرد تدابیر کنترلی متعدد علیه آن، بیماری BVD همچنان شیوع دارد. در سال‌های اخیر روش‌های مختلفی نظیر ژن درمانی ضدویروسی برای کنترل بیماری BVD به کار گرفته شده است. یکی از این راه‌ها، کلونینگ نواحی حفاظت شده از ویروس در وکتورهای مناسب به منظور تهیه رده‌های سلولی بیان کننده رپلیکون‌های تحت ژنومی این ویروس است. در پژوهش حاضر، توالی‌های حفاظت شده از قطعات ژنی 5'UTR و NS3 از سویه NADL از ویروس BVD پس از تکثیر با آزمون RT-PCR، در وکتور لنتی ویروسی pWPI-linker B در فرادست ژن GFP کلون شد. صحت کلونینگ با استفاده از هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت. به این ترتیب پلاسمید نوترکیب تولید شده، می‌تواند در سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی به عنوان وکتور حامل ترانس ژن استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: اسهال ویروسی گاو، NS3، 5'UTR، کلونینگ، pWPI-Linker B

### مقدمه

زنده تغییر یافته و غیرفعال، آزمایش‌های انتخابی برای شناسایی گاوهای PI و کشتار آن‌ها، بیماری BVD در گله‌های گاو هنوز هم دیده می‌شود (۷ و ۸). یکی از علل این امر، تنوع آنتی‌ژنی قابل ملاحظه در BVDV است که مانعی اصلی برای توسعه کارآمد واکسن‌های جدید و شایع محسوب می‌شود. به همین دلیل در سال‌های اخیر طراحی روش‌های ژن درمانی برای کنترل بیماری BVD توسعه یافته است (۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۷). اولین قدم برای هر گونه اقدامی در راستای ژن درمانی کلونینگ توالی‌های ویروسی مورد هدف در وکتورهای مناسب است

عامل ایجاد اسهال ویروسی گاو (BVD) ویروسی متعلق به جنس پستی ویروس از خانواده فلیوی ویریده (Flaviviridae) است که سبب خسارت‌های اقتصادی و بهداشتی زیادی در مزارع پرورش گاو می‌شود. این ویروس در سراسر دنیا پراکنده و در سراسر جهان بسیار شایع است و به دلیل اهمیت بیماری ناشی از این ویروس، در صنعت دامپروری کوشش‌های فراوانی برای مبارزه با این ویروس انجام شده است (۱، ۲ و ۳). با وجود استفاده از تدابیر کنترل BVD نظیر واکسیناسیون با واکسن‌های





ترجمه ORF، تنظیم رونویسی ژنوم و بیان ژن است و بخش‌هایی مرتبط با حدت ویروس دارد (۱۹). با در نظر گرفتن وظایف عملکردی ویژه این دو بخش از ژنوم، این نواحی برای تولید یک رده سلولی به منظور ارزیابی استراتژی‌های ضد این ویروس انتخاب شد. یکی از جدیدترین روش‌های القای بیان ژن با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی است. لنتی ویروس‌ها در بخشی از چرخه زندگی، ژنوم خود را در ژنوم میزبان ادغام می‌کنند و بنابراین می‌توانند ابزاری برای بیان طولانی مدت یک ترانس ژن را حتی برای تمام عمر فراهم کنند. برای ایجاد چنین وکتورهای ویروسی، یکی از جدیدترین روش‌ها وارد کردن اجزای مختلف ژنوم در سه یا چهار پلاسمید مختلف و متعاقباً ترانسفکشن هم‌زمان این پلاسمیدها برای تولید یک ویروس در یک رده سلولی مناسب است. در این پژوهش پلاسمید لنتی ویروسی برای کلونینگ دو بخش از ویروس BVD، انتخاب شد، تا در مراحل بعد وکتورهای لنتی ویروسی حامل این دو ژن با استفاده از این پلاسمید و پلاسمیدهای حاوی ژن‌های ضروری لنتی ویروس تولید شود (۴، ۲۲ و ۲۵).

#### مواد و روش کار

به منظور کشت ویروس BVD در رده سلولی بیضه گاو (BT=Bovine testicular cell line) در ابتدا سویه استاندارد (NC-001461) BVDV-NADL از آزمایشگاه مرجع سلامت حیوانات Sekans دانشگاه آنکارا تهیه و به رده سلولی بیضه گاو BT فراهم شده از مؤسسه سرم و واکسن‌سازی رازی، تلقیح شد. از محیط کشت DMEM (محصول GIBCO، آمریکا، به شماره کاتالوگ ۱۱۶-۱۲۸۰۰) 10%FBS+ (محصول GIBCO، آمریکا، به شماره کاتالوگ ۱۰۶-۱۰۲۷۰) 1x + penicillin streptomycin (محصول Sigma، آمریکا به شماره کاتالوگ ۱۱۶-۱۲۸۰۰) به عنوان محیط نگهداری سلول‌ها استفاده شد. هنگامی که به ۹۰ درصد

تا در مراحل بعدی، با استفاده از این وکتورها، استراتژی‌های درمانی و نیز رده‌های سلولی شاخص برای مانیتورینگ بیماری طراحی و تولید شود. ویروس عامل BVD بر اساس توانایی آسیب رساندن به سلول‌های میزبان دو بیوتیپ سایتوپاتیک (cp) و غیرسایتوپاتیک (ncp) و بر مبنای تفاوت در توالی نوکلئوتیدی دو ژنوتیپ BVDV-1 و BVDV-2 دارد (۷، ۱۱ و ۲۶). ژنوم این ویروس RNA تک‌ رشته‌ای با سنس مثبت، فاقد کلاسهک ترجمه و حدوداً ۱۲/۵ کیلو باز است و یک چهارچوب قرائت باز (ORF) به طول ۴۰۰۰ کدون و دو منطقه ترجمه نشونده (UTRs) در دو انتهای 3' و 5' دارد (۷، ۱۴ و ۲۸). ORF در این ویروس برای یک پیش‌ساز پلی‌پروتئینی رمز صادر می‌کند که دچار شکافت شده و پروتئین‌های زیر را تولید می‌کند:

NH2-Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-

NS3(NS23)-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH

NS3 به عنوان پروتئین نشان‌دهنده cpBVDV

شناخته شده و با فعالیت سرین پروتئازی در  $\frac{1}{3}$  انتهای آمینی خود ژنوم ویروس را در جایگاه‌های شکاف NS3/NS4A NS4A/NS4B، NS4B/NS5A، NS5A/NS5B، برش می‌دهد و علاوه بر این NS3 فعالیت نوکلئوزید تری فسفاتاز و RNA هلیکاز هم دارد. بیان NS2-3 در ویروس‌های سایتوپاتیک و غیرسایتوپاتیک برای تشکیل ویروئین‌های عفونی ضروری است. فعالیت پروتئازی NS3 در عفونت cpBVDV در سلول‌های آلوده سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول می‌شود. ۱۵ آمینواسید انتهای آمینی NS3 در به راه انداختن آبشار پروتئولیتیک آپوپتوز ناشی از عفونت BVDV نقش دارند (۱۸، ۲۴ و ۲۷). منطقه‌ی 5'UTR به طول ۳۷۰ b، ثابت‌ترین و حفاظت‌شده‌ترین ناحیه ژنوم این ویروس در طول تکامل و شامل یک توالی ورود به ریبوزوم داخلی (IRES) است. این توالی ساختار ثانویه مهمی برای





واکنش RT-PCR به منظور افزودن‌سازی BVDV NS3 و BVDV 5'UTR با استفاده از کیت TaqMan Reverse Transcription Reagents Invitrogen (N8080234) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به طور خلاصه، واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر که شامل ۱ μl بافر ۱۰ RT x، ۱۰ μl mM ۲/۲، ۲۵ μl MgCl<sub>2</sub> ۱۰ mM، ۱۰ μl dNTP، ۰/۵ μl RNase، ۰/۲ μl Random hexamers، ۰/۲۵ μl آنزیم رونوشت بردار معکوس (۵۰ U/ μl) و مقدار محاسبه شده از RNA الگو و آب عاری از DNase/RNase (۴۰۰ - ۵۰۰ ng/ μl) بود. برنامه دمایی واکنش RT ۲۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۸ °C به مدت ۳۰ دقیقه و ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه بود. cDNA سنتز شده تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰ °C - قرار گرفت.

طراحی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Beacon designer (BVDV- NC001461) برای NADL)ac. به انجام رسید. توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر BVDV NS3 و BVDV 5'UTR و شرایط دمایی واکنش PCR در جدول‌های ۱ الی ۳ درج شده است.

تراکم سلولی رسید، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع کشت سلولی حاوی ویروس BVDV-NADL به هر چاهک از پلیت ۶ خانه کشت سلول اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد؛ سپس هر روز سلول‌ها برای مشاهده اثرات سایتوپاتیک بررسی شدند و پس از مشاهده CPE استخراج RNA ویروسی انجام می‌شد.

برای استخراج BVDV-RNA، پس از تریپسینه کردن سلول‌ها، به ازای هر خانه از پلیت ۶ خانه ۵۰۰ میکرولیتر QIAzol (QIAGEN، آلمان، به شماره کاتالوگ: ۷۹۳۰۶) به رسوب سلولی اضافه و با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم به اپندروف حاوی سلول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ °C، سانتریفیوژ گردید. آنگاه به میزان دو برابر حجم به فاز رویی ایزوپروپانول سرد مطلق افزوده شد و یک شب در دمای ۲۰ °C - قرار گرفت؛ سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C و با ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. در پایان، برحسب اندازه رسوب مقدار ۵۰ میکرولیتر آب عاری از RNase اضافه و کاملاً پیپتاژ شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای رفت و برگشتی جهت کلونینگ نواحی BVDV NS3 و BVDV 5'UTR

نام پرایمر	توالی پرایمر	TM (°C)	اندازه محصول (bp)
NS3 F	5'-CGCCACAGATCTACCGCAAGAGTACTGGGGAA-3'	۷۶	۲۲۳
NS3 R	5'-CGCCACAGATCTACCCATCAGTAGGTTATAGTC-3'	۷۴	۲۲۳
5'UTR F	5'-CGCGGATCCACCACTCGTATACGTATTGGGC-3'	۷۶	۳۸۰
5'UTR R	5'-GTTCCCGGGCGTCCATGTACACAGAGAT-3'	۷۵	۳۸۰



جدول ۲- برنامه دمایی واکنش PCR برای افزوده‌سازی BVDV NS3

تکرار	زمان	دما (°C)	مراحل
۱	۲ دقیقه	۹۵	مرحله آغازین
۳۰	{ ۳۰ ثانیه ۳۵ ثانیه ۳۵ ثانیه	۹۵	مرحله واسرشت
		۶۹/۷	مرحله اتصال
		۷۲	مرحله توسعه (ازدیاد)
۱	۵ دقیقه	۷۲	طویل شدن نهایی

جدول ۳- برنامه دمایی واکنش PCR برای افزوده‌سازی BVDV 5' UTR

تکرار	زمان	دما (°C)	مراحل
۱	۲ دقیقه	۹۵	مرحله آغازین
۳۰	{ ۳۰ ثانیه ۳۵ ثانیه ۴۵ ثانیه	۹۵	مرحله واسرشت
		۷۰/۷	مرحله اتصال
		۷۲	مرحله توسعه (ازدیاد)
۱	۵ دقیقه	۷۲	طویل شدن نهایی

(محصول Roche آلمان، به شماره کاتالوگ: ۱۰۲۲۰۵۶۶۰۰۱) برش داده شد. برای این کار، بسته به برش منفرد یا دوگانه پلاسمید در یک ویال ۱ μl پلاسمید با غلظت ۱ μg/μl - ۰/۵، ۲ μl بافر ۱۰x مربوط به آنزیم و ۱ μl آنزیم (یا ۰/۵ μl از دو آنزیم) اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰ μl رسید و یک شب در دمای ۳۷ °C به منظور هضم منفرد NS3 و ۳۰ °C برای هضم دوگانه 5'UTR قرار گرفت. پس از تأیید صحت برش با الکتروفورز در ژل ۰/۸ درصد، واکنش لیگاسیون انجام شد. ۱ μl پلاسمید با غلظت ۱ μg/μl، ۱ μl از T4 بافر ۱۰x (فرمنتاز، آلمان، شماره کاتالوگ: B69)، ۲ μl محلول ۵۰ درصد از PEG-4000 (فرمنتاز، آلمان)، ۱ μl (۵U) آنزیم T4 DNA ligase (فرمنتاز، آلمان، به شماره کاتالوگ: EL0013) و ۱۵۰ ng قطعه insert اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰ μl رسید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۲ °C و یک شب در ۴ °C قرار داده شد. صحت اولیه Ligation با الکتروفورز

کنترل مثبت (نمونه‌ی cDNA یگ گاو مثبت از نظر BVDV با مشخصات C474) و منفی (نمونه‌ی cDNA یگ گاو منفی از نظر BVDV با مشخصات N001) تهیه شده از نمایندگی آزمایشگاه‌های دامپزشکی و سلامت حیوانات (AHVLA) انگلستان در هر آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در کنار مارکر سایز ۱۰۰bp (Fermentas، آلمان) مشاهده شد.

به منظور برش پلاسمید، لیگاسیون، پس از خالص سازی محصول PCR با استفاده از ۲ μl سدیم استات (M)، ۳، ۲ μl محلول EDTA (۱۲۵mM) و ۵۰ μl اتانول مطلق به ازای هر ۲۰ μl محصول PCR، پلاسمید لنتی ویروسی pWPI-Linker B تهیه شده از مرکز تحقیقات زیست‌پزشکی و (IMIM) در اسپانیا توسط آنزیم‌های اندونوکلئاز محدود کننده BamHI (محصول Roche، آلمان، شماره کاتالوگ: ۱۰۲۲۰۶۱۲۰۰۱) و SmaI





شد. این اثرات شامل گردش، متورم شدن، دانه دار شدن و کنده شدن سلول‌ها از حاشیه کشت به سمت مرکز بود که در مقایسه با گروه کنترل تشخیص داده شد (شکل ۱). اثرات سایتوپاتیک ناشی از BVDV-NADL معمولاً در بازه زمانی ۳-۷ روز پس از عفونت قابل مشاهده خواهد بود. زمان بروز و نوع اثرات سایتوپاتیک به مؤید حضور و تکثیر ویروس عفونی BVDV سایتوپاتیک بود.

باند‌های مورد نظر مربوط به BVDV- 5' UTR (۳۸۰ bp) و باند مربوط به BVDV-NS3 (۲۲۳bp) در نمونه‌های مربوط به سلول‌های آلوده شده به BVDV و نمونه‌های کنترل با استفاده از نشانگر وزن مولکولی تشخیص داده شد. صحت برش پلاسمید pWPI-Linker B با مقایسه اندازه و تفاوت الگوی باند‌های مربوط به پلاسمید pWPI-Linker B برش داده شده با آنزیم و پلاسمید اصلی به اندازه ۱۱۱۰۱ bp پس از الکتروفورز محصول در ژل ۱٪، تأیید شد (شکل ۲).

پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌هایی که در Colony PCR نتیجه مثبت داشتند، صحت استخراج پلاسمید و وجود قطعه مورد نظر (5' UTR, ۳۸۰ bp و NS3, ۲۲۳ bp) در پلاسمیدهای نوترکیب تولید شده برشی با آنزیم‌های اندونوکلاز محدود کننده BamHI برای آنزیم‌های BamHI و SmaI و NS3pWPI-Linker B و برای 5' UTR -pWPI-Linker B و سپس الکتروفورز محصول استخراج شده در ژل ۰/۸ درصد تأیید شد (شکل‌های ۳ و ۴).

هم‌ترازی توالی گرفته شده از خوانش سکانس پلاسمید با امپلیکون مورد انتظار به خوبی کفایت کلونینگ انجام شده را تأیید کرد (شکل‌های ۴ و ۵).

محصول در ژل ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

پس از ترانسفورماسیون محصولات Ligation به صورت مجزا در Competent Cell مناسب از باکتری *E. coli* (Stbl4) به روش شوک حرارتی، رسوب باکتری‌ها در پلیت LB آگار حاوی ۱۰۰mg/ml آمپی‌سیلین به صورت یکنواخت کشت داده شد و به مدت ۱۴-۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. کنترل مثبت (Stbl4) واجد pWPI-Linker B مقاوم به آمپی‌سیلین و منفی (فقط Stbl4) در آزمایش استفاده شد؛ سپس واکنش Colony PCR انجام گرفت. به این صورت که ۱۰ عدد تک کلون از هر پلیت به طور جداگانه به یک میکروتیوب PCR حاوی ۴µl آب دیونیزه استریل منتقل گردید. ۱ µl از هر میکروتیوب، به ۲ ml محیط LB واجد ۱۰۰mg/ml آمپی‌سیلین اضافه شد و برای استخراج پلاسمید در شیکر انکوباتور ۳۷ °C با دور rpm ۱۸۰-۲۰۰ قرار گرفت. ۳µl باقی مانده از محلول تک کلون برای انجام واکنش PCR مطابق شرایط ذکر شده در بخش ۳ استفاده گردید. در صورت مشاهده باند مورد نظر، از پیش کشت تهیه شده از همان کلونی در LB Broth واجد Amp، پلاسمید نوترکیب به روش Mini preparation of DNA استخراج شد و در ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد. محصولات استخراج پلاسمید برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

## نتایج

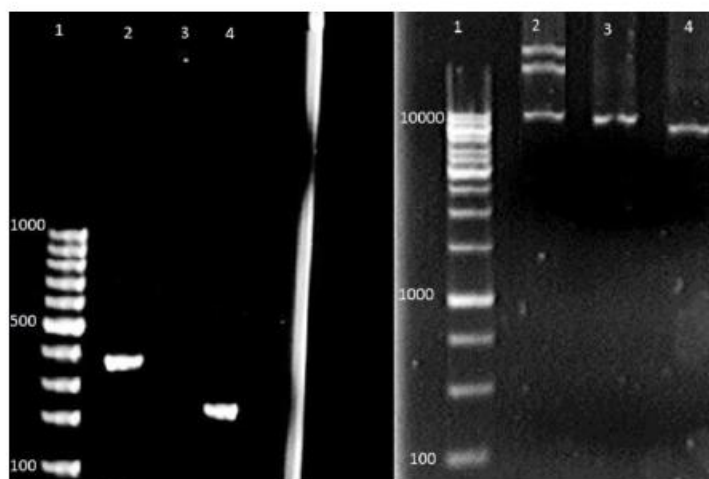
بعد از گذشت پنج روز از آلوده‌سازی سلول‌های BT با BVDV-NADL اثرات سایتوپاتیک ناشی از حضور و تکثیر ویروس عفونی در کشت سلول (CPE) مشاهده





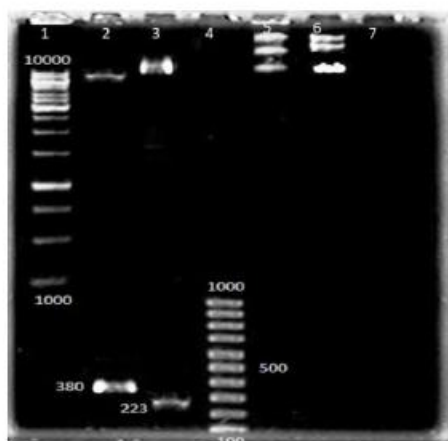
شکل ۱- اثرات سایتوپاتیک BVDV

سمت چپ: رده سلولی BT قبل از تلقیح BVDV، سمت راست: رده سلولی BT بعد از تلقیح BVDV RT-PCR به منظور افزودن سازی BVDV NS3 و 5' UTR، برش پلاسمید



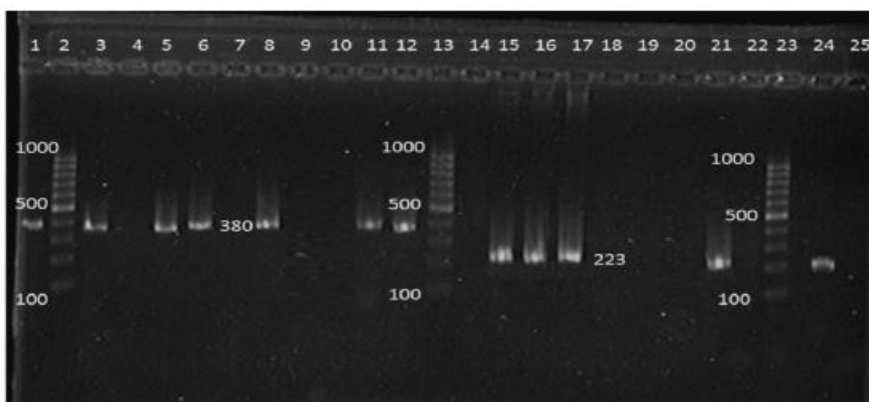
شکل ۲- افزودن سازی ژنهای BVDV - NS3 و BVDV - 5' UTR و برش پلاسمید pWPI-Linker

تصویر چپ: RT-PCR به منظور ترایید BVDV - NS3 و BVDV - 5' UTR پس از تلقیح ویروس به رده سلولی BT: از راست به چپ: کنترل منفی NS3، باند NS3 (۲۲۳bp)، کنترل منفی 5' UTR، باند 5' UTR (۳۸۰bp)، نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp تصویر راست: هضم منفرد و دوگانه پلاسمید pWPI-Linker B: ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱kb؛ ۲: pWPI-Linker B برش نخورده؛ ۳: هضم منفرد pWPI-Linker B؛ ۴: هضم دو تایی pWPI-Linker B

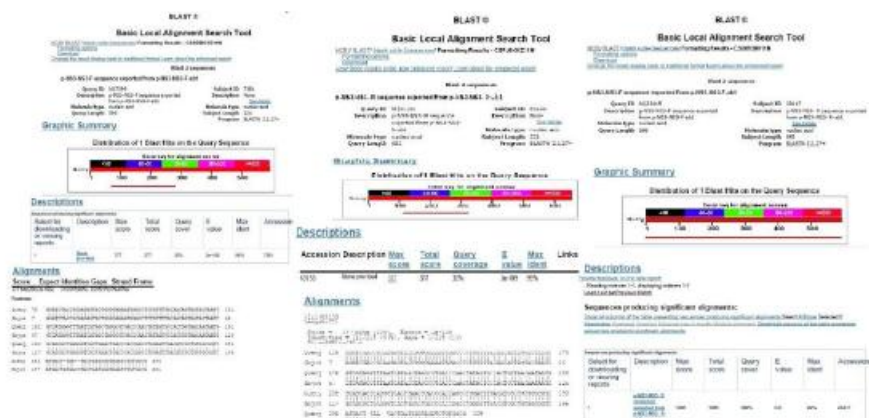


شکل ۳- تأیید تولید پلاسمیدهای نوترکیب pWPI-Linker B- NS3 و pWPI-Linker B- 5' UTR

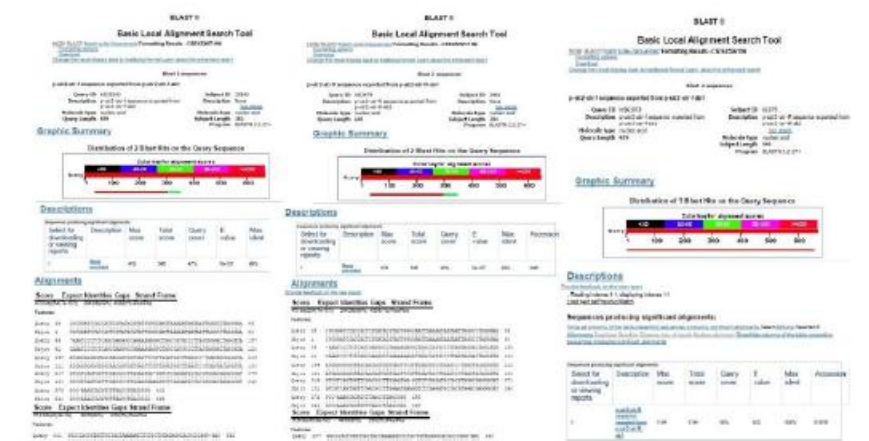
۱: لدر (1kb)، ۲: pWPI-Linker B-5' UTR برش خورده، ۳: pWPI-Linker B-NS3 برش خورده، ۴: نشانگر وزن مولکولی (100bp)، ۵: pWPI-Linker B-5' UTR برش نخورده، ۶: pWPI-Linker B-NS3 برش نخورده



شکل ۴- Colony PCR Reaction برای ۱۰ کلونی از هر یک از پلاسمیدهای ترانسفورم شده pWPI-Linker B- NS3 و pWPI-Linker B- 5' UTR  
 ۲۵: کنترل منفی NS3، ۲۴: کنترل مثبت NS3 (۲۲۳bp)، ۲۳: لدر (100bp)، ۱۴ تا ۲۲: نتایج مثبت و منفی NS3، ۱۳: نشانگر وزن مولکولی (100bp)، ۳ تا ۱۲: نتایج مثبت و منفی 5' UTR (۴: کنترل منفی 5' UTR، ۲: نشانگر وزن مولکولی (100bp)، ۱: کنترل مثبت 5' UTR (۳۸۰bp)



شکل ۵- هم‌ترازی توالی مستخرج از خوانش پلاسمید pWPI-Linker B-NS3 با امپلیکون مورد انتظار



شکل ۶- هم‌ترازی توالی مستخرج از خوانش پلاسمید pWPI-Linker B-5' UTR با امپلیکون مورد انتظار



## بحث

بیماری BVD به دلیل طبیعت مزمن و پیش‌رونده، تحلیل توان گله، توان و قابلیت بالای سرایت ویروس از گاوهای بیمار به سالم، معضل حضور گوساله‌های PI (مخازن دایم ویروس)، راه‌های متعدد انتقال بیماری، حفظ و انتشار ویروس توسط تعدادی از گونه‌های حیوانی و وجود تحت ژنوتیپ‌ها و سویه‌های آنتی‌ژنی زیاد ویروس اهمیت دارد. به این دلیل کنترل این ویروس ضروری و در عین حال دشوار است (۴، ۵، ۸، ۱۳ و ۲۸). تغییرات مداوم در نواحی آنتی‌ژنیک ویروس خصوصاً پادگن‌های اصلی C، Ems، E1 و E2 و تشکیل موتانت‌های فراری که با گریز از سیستم ایمنی میزبان پاسخ دفاعی کافی و مؤثر میزبان را خنثی کرده است و متکی بودن اکثر روش‌های پیش‌گیرانه موجود علیه ویروس به گلیکوپروتئین و پروتئین‌های یاد شده، از عوامل مؤثر در توفیق متوسط یا اندک برنامه‌های کنترل بیماری است (۷، ۸، ۱۳، ۱۶، ۲۷، ۲۶، ۲۵ و ۲۸). هدف کاربردی این پژوهش تهیه‌ی پلاسمید لنتی ویروسی مناسب حاوی توالی‌های 5' UTR و NS3 از BVDV به منظور تهیه لنتی وکتورهای حامل این دو بخش و مانیتورینگ استراتژی‌های درمانی و پیش‌گیرانه علیه این ویروس است.

همچنان که در مقدمه ذکر شد، به دلیل ثابت ماندن توالی کد کننده‌ی 5' UTR در روند تکاملی ویروس یا نقش‌های عملکردی ویژه پروتئین‌های NS3، NS2-3، NS5A و NS5B این بخش‌ها در ژن درمانی علیه BVD بیشتر مورد توجه بوده‌اند و با بررسی کارآمدی مهار هریک از این پروتئین‌ها در ممانعت از عفونت‌های ناشی از ویروس‌های این خانواده، در پژوهش حاضر بخش‌های NS3 و 5' UTR، به صورت حفاظت شده در طول تکامل و نقش‌های زیست‌شناختی ویژه در تکثیر، بقا و حدت ویروس برای کلونینگ در پلاسمید لنتی ویروسی انتخاب شدند (۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۲۰، ۲۶ و ۲۷). استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی تأثیر پایدارتر و اثرات نابجای

بسیار کمتری در اثر برانگیخته شدن سیستم دفاعی ذاتی نسبت به سایر وکتورهای ویروسی دارد. در عین حال لنتی وکتورها قادرند به مدت طولانی بسیاری از رده‌های سلولی اعم از فعال و در حال تقسیم یا ساکن و بدون تقسیم را آلوده کنند؛ علاوه بر این قابلیت انتقال قطعات بزرگ ژنی (تا ۳۰۰۰ جفت باز) را دارند و از این نظر بر سایر وکتورهای ویروسی برترند؛ همچنین به دلیل فراوانی کمتر ادغام ژنوم لنتی وکتورها در نزدیکی یا میان پروتئانکوژن‌های سلولی نسبت به رترو وکتورها، احتمال موتاژن و سرطان‌زایی در اثر ادغام ژنوم وکتورهای لنتی ویروسی کم است (۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۲، ۲۳ و ۲۵). لذا، برای پایدار کردن بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌ها و افزایش طول مدت بیان و انتقال این ویژگی به نسل بعد استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی تحویل ژن‌های مورد نظر به سلول هدف روشی تأیید شده و کاربردی بوده و کلونینگ ژن‌های مورد نظر در پلاسمید لنتی ویروسی انتقال در سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی باید انجام شود.

متأسفانه در خصوص تهیه لنتی وکتورهای حامل ژن‌هایی از BVDV مطالعه‌ای در دسترس نیست اما در این زمینه گزارشی در مورد ویروس بسیار مشابه HCV وجود دارد. هنری و همکاران در سال ۲۰۰۶ از وکتورهای لنتی ویروسی برای آلوده کردن رده سلولی Huh-7 استفاده کردند و بدین منظور با استفاده از لنتی وکتورهای ایجاد شده در سیستم بسته‌بندی نسل سوم بیان NS3، NS5b و IRES از 5' UTR در این رده سلولی القا شده و تغییر میزان بیان ژن پس از القای RNAi با استفاده از آزمون‌های فلوسایتومتتری و Real time PCR مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت (۶).

در پژوهش حاضر، در سیستم بسته‌بندی نسل سوم از پلاسمید انتقال pWPI-Linker B واجد ژن eGFP برای تهیه‌ی لنتی وکتورهای حاوی ژن‌هایی از BVDV استفاده شد و ناحیه 5' UTR در یک پلاسمید و بخش NS3 در پلاسمید دیگری در فرادست ژن eGFP کلون





## منابع

- 1- Carmona, M.A; Quasdorff, M; Vogt, A; Tamke, A., Yildiz, Y; Hoffmann, P; Lehmann, T; Bartenschlager, R; Engels, J.W; Kullak-Ublick, G.A; Sauerbruch, T. and Caselmann, W.H; Inhibition of hepatitis C virus RNA translation by antisense bile acid conjugated phosphorothioate modified oligodeoxynucleotides (ODN). *Antiviral Research*, 2012; 97(1):49-59.
- 2- Fan, Z.C; and Bird, R.C; Development of a reporter bovine viral diarrhea virus and initial evaluation of its application for high throughput antiviral drug screening. *J. Virol. Methods*, 2012; 180 (1-2): 54-61.
- 3- Gamlen, T; Richards, K.H; Mankouri, J; Hudson, L; McCauley, J; Harris, M. and Macdonald, A; Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *J. Gen. Virol.*, 2010; 91: 133-144.
- 4- Haga, K; Lemp, N.A; Logg, C.R; Nagashima, J; Faure-Kumar, E; Gomez, G.G; Kruse, C.A; Mendez, R; Stripecke, R; Kasahara, N. and Ciccirelli, J.C; Permanent, Lowered HLA Class I Expression Using

شدند تا با استفاده از این پلاسمیدها وکتورهای لنتی ویروسی ارائه کننده این دو ژن برای ترانسداکشن پایدار سلول‌ها و تولید رده سلولی بیان کننده پایدار این دو ژن تهیه گردد. با این نوع طراحی، وقتی ژن‌های مورد نظر در فرادست ژن گزارشگر (eGFP) کلون شده باشند، مشاهده نقاط سبز درخشان (که نمایانگر بیان ژن گزارشگر در سلول‌های میزبان هستند) در فلورسنت میکروسکوپی تأیید کننده بیان ژن‌های مورد نظر است (۴).

پلاسمید pWPI-Linker B واجد جایگاه برش آنزیم‌های اندونوکلاز محدود کننده متداول در کارهای کلونینگ بوده و به عنوان پلاسمید انتقال در بسته‌بندی لنتی وکتورها برای ارائه‌ی 5'UTR و NS3 از ویروس BVDV مناسب است. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر به درستی تولید پلاسمیدهای لنتی ویروسی نو ترکیب pWPI-Linker B -BVDV NS3 و pWPI-Linker B -BVDV 5'UTR را تأیید کرد. بدیهی است پلاسمیدهای تهیه شده به منظور پژوهش‌های آتی در خصوص تولید رده سلولی شاخص و نیز ارزیابی مولکول‌های درمانی علیه این ویروس کاربرد حائز اهمیتی دارند.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های مالی صندوق ملی حمایت از پژوهشگران و زیست فناوریان ریاست جمهوری (در قالب طرح شماره ۹۰۰۰۸۰۰۷)، معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (در قالب طرح پایان نامه دوره Ph.D شماره ۲۸۰۸۸/۶/۷) و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تشکر می‌کنند. در عین حال از حمایت‌های علمی و اجرایی آقایان دکتر فالدو اشتینباخ، دکتر دستجردی، دکتر فرجی، دکتر لطفی و دکتر برین قدردانی می‌شود.





- detecting pestivirus antigen in persistently infected cattle around Tehran. Pajouhesh & Sazandegi, 2004; 63: 21-25.
- 10- Keyvanfar, H. and Hemmatzadeh, F; Effects of NADL strain of BVD virus on sheep white blood cells. J. Vet. Res., 2000; 55(1): 17-20.
  - 11- Khaliq, S; Khaliq, S.A; Zahur, M; Ijaz, B; Jahan, S; Ansar, M; Riazuddin, S. and Hassan, S; RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. Biotechnol. Adv., 2010; 28: 27-34.
  - 12- KuÈmmerer, B.M; Tautz, N; Becher, P; Thiel, H. and Meyers, G; The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. Vet. Microbiol., 2000; 15 (77): 117-128.
  - 13- Lambeth, L.S; Moore, R.J; Muralitharan, M.S; and Doran, T.J; Suppression of bovine viral diarrhea virus replication by small interfering RNA and short hairpin RNA-mediated RNA interference. Vet. Microbiol, 2007; 119: 132-143.
  - 14- Li, J; Guo, H; Shi, Z. and Tu, C; In vitro inhibition of CSFV replication by retroviral vector-mediated RNA interference. J. Virol. Methods, 2010; 169: 316-321.
  - 15- Lv, K; Guo, Y; Zhang, Y; Wang, K; Li, K; Zhu, Y. and Sun, S; Transient Lentivirus Vectors With shRNA constructs: Averting Cytotoxicity by Alloreactive T- Lymphocytes. Transplant. Proc., 2006; 38(10): 3184-3188.
  - 5- Hemmatzadeh, F; Momtaz, H; Keyvanfar, H. and Banihasan, E; Antigenic pattern of BVD viruses isolated in Iran. Indian Vet. J., 2006; 83(10): 1048-1050.
  - 6- Henry, S.D; van der Wegen, P; Metselaar, H.J; Tilanus, H.W; Scholte, B.J. and van der Laan, L.J; Simultaneous Targeting of HCV Replication and Viral Binding with a Single Lentiviral Vector Containing Multiple RNA Interference Expression Cassettes. Mol. Ther., 2006; 14(4): 485-493.
  - 7- Houe, H; Economic impact of BVDV infection in dairies. Biologicals, 2003; 31: 137-143.
  - 8- Jordao, R.S; Ribeiro, C.P; Pituco, E.M; Okuda, L.H; Claudia Del Fava, C.D. and Stefano, E; Serological response of guinea pigs to oily and aqueous inactivated vaccines containing a Brazilian isolate of the Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV). Res.Vet. Sci., 2011; 91: 311-315.
  - 9- Kargar Moakhar, R; and Hemmatzadeh, F; A Survey for





- 21- Randall, G. and Rice, C.M; Interfering with hepatitis C RNA replication. *Virus Res.*; 2004; 102: 19-25.
- 22- Salmon, P. and Trono, D; Production and Titration of Lentiviral Vectors. In: *Current Protocols in Neuroscience*. Sibley, D., McKay, R., Charles Gerfen, C. and Rogawski, M. John Wiley & Sons publications. Wiley Drive, USA; 2006; 4.21.1-4.21.24
- 23- Spurgers, K.B; Sharkey, C.M; Warfield, K.L. and Bavari, S; Oligonucleotide antiviral therapeutics: Antisense and RNA interference for highly pathogenic RNA viruses. *Antiviral Res.*; 2008; 78:26-36.
- 24- St-Louis, M.C; Massie, B. and Archambault, D; The bovine viral diarrhea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation. *Vet. Res.*; 2005; 36: 213-227.
- 25- Tiscornia, G.; Singer, O. and Verma, I.M; Production and purification of lentiviral vectors. *Nat. Protoc.*, 2006; 1(1): 241-245.
- 26- Wilson, J.A. and Richardson, C.D; Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by siRNAs silencing VP1 protein coding region, *Res. Vet. Sci.*, 2009; 86 : 443-452.
- 16- Meyers, G. and Thiel, H.J; Molecular characterization of pestiviruses. *Adv.Virus Res.*, 1996; 47: 53-118.
- 17- Ni, W; Hu, S; Qiao, J; Yu, Y; Wang, D; Tong, Q; Zhang, Y. and Chen, C; Suppression of bovine viral diarrhea virus replication by single and dual short hairpin RNA-mediated RNA interference. *Res.Vet. Sci.*, 2012; 93(1): 544-548.
- 18- Pankraz, A; Simone, P; Thiel, H.J; Gallei, A; and Becher, P; A single point mutation in nonstructural protein NS2 of bovine viral diarrhea virus results in temperature-sensitive attenuation of viral cytopathogenicity. *J. Virol.*, 2009; 83(23): 12415-12423.
- 19- Poole, T.L; Wang, C.Y; Popp, R.A; Potgieter, L.N.D; Siddiqui, A. and Collett, M.S; Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology*, 1995; 206: 750-754.
- 20- Randall, G; Grakoui, A. and Rice, C.M; Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *PNAS publications*, New York, USA, 2003; 100(1): 235-240.







- theNS5B coding region J. Virol.; 2005; 79: 7050-8.
- 27- Xu, J; Mendez, E; Caron, P.R; Lin, C; Murcko, M.A; Collett, M.S. and Rice, C.M; Bovine Viral Diarrhea Virus NS3 Serine Proteinase: Polyprotein Cleavage Sites, Cofactor Requirements, and Molecular Model of an Enzyme Essential for Pestivirus Replication. J. Virol.; 1997; 71(7): 5312-5322.
- 28- Zemke, J; Ko nig, P; Mischkale, K; Reimann, I. and Beer, M; Novel BVDV-2 mutants as new candidates for modified-live vaccines. Vet. Microbiol.; 2010; 142: 69-80.



## Cloning of BVDV NS3 and BVDV 5'UTR into pWPI- linker B lentiviral plasmid

Mokhtari, A.<sup>1\*</sup>; Madadgar, O.<sup>2</sup>; Ghalyanchi Langeroudi, A.<sup>3</sup>; Mahzounieh, M.<sup>4</sup>

1. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord- Iran.
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.
4. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord- Iran.

*Received:* 29 April 2015

*Accepted:* 30 December 2015

### Summary

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a genus Pestivirus of the family Flaviviridae and causes significant economic and hygienic losses in cattle farms throughout the world. The virus has spread worldwide and despite the wide use of various control strategies against it, BVD remains prevalent. In recent years, numerous measures such as anti-viral gene therapies are frequently employed to control BVDV infection. One way to evaluate these measures is the cloning of conserved areas of the viral genome into suitable vectors for the preparation of cell lines expressing sub- genomic replicons of the virus. In this study, after multiplication of conserved sequences of BVDV- NADL NS3 and 5'UTR by RT-PCR, these fragments were cloned in pWPI- linker B lentiviral vector at the upstream of GFP gene. The validity of cloning was confirmed using restriction enzyme digestion and sequencing. Therefore these recombinant plasmids will be available to produce lentiviral transfer vectors carrying the transgenes using the lentiviral packaging systems.

**Keywords:** BVDV, NS3, 5'UTR, cloning, pWPI- linker B.

\* Corresponding Author E-mail: [a.mokhtari@alumni.ut.ac.ir](mailto:a.mokhtari@alumni.ut.ac.ir)

