



Cloning and Expression of the Gene Encoding Antigenic Regions of 3D Non-Structural Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Moghaddam P.¹ MSc,
Zahmatkesh A.^{*2} PhD,
Airian S.¹ PhD,
Bagheri M.² PhD,
Mahravani H.³ PhD,
Aghaiypour K.² PhD

How to cite this article

Moghaddam P, Zahmatkesh A, Airian S, Bagheri M, Mahravani H, Aghaiypour K. Cloning and Expression of the Gene Encoding Antigenic Regions of 3D Non-Structural Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):241-247.

ABSTRACT

Foot-and-Mouth Disease (FMD) is a highly contagious and devastating disease that spreads rapidly and causes many economic damages. One of the important methods for the detection of FMD and particularly differentiation of vaccinated from infected animals, is the use of non-structural proteins as antigens in ELISA kits. The purpose of the present study was cloning the gene sequence and expression of the antigenic regions of 3D nonstructural protein as one of the diagnostic options. For amplification of the antigenic regions of FMD virus 3D protein, specific primers containing NdeI and EcoRI restriction sites were designed and the polymerase chain reaction was performed. The sequence cut by these two enzymes were inserted into pET21a+ vectors. The recombinant plasmids were then transformed into *E. coli* (DH5α). Colony-PCR tests and enzymatic digestions were performed on the resulting colonies and the presence of the target gene was confirmed. The gene sequence was further confirmed after sequencing. For the production of recombinant antigens, the recombinant vector was transferred to the expression host of *E. coli* BL21. The bacteria containing the recombinant gene were induced with IPTG and the expression of the recombinant protein was confirmed using the SDS-PAGE method. The molecular weight of the recombinant protein was about 24kDa, and it can be used in the design of ELISA diagnostic kit.

Keywords 3D Gene; Epitope; Foot-and-Mouth Disease; Recombinant Protein

¹Cell & Molecular Biology Department, Biological Sciences Faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran

²"Department of Genomics and Genetic, Razi Vaccine and Serum Research Institute" and "Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO)", Karaj, Iran

³"Foot & Mouth Disease Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute" and "Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO)", Karaj, Iran

*Correspondence

Address: Razi Vaccine & Serum Research Institute (RVSR), Hesarak, Beheshti Street, Karaj, Iran. Postal code: 3197619751.

Phone: +98 (26) 34570038

Fax: +98 (26) 34552194

a.zahmatkesh@rvsri.ac.ir

Article History

Received: April 14, 2019

Accepted: February 15, 2020

ePublished: June 10, 2020

CITATION LINKS

[1] Expression of the major epitope regions of 2C integrated with the 3AB non-structural protein of foot-and-mouth disease virus and its potential for ... [2] Foot-and-Mouth Disease Virus neutralizing antibodies production induced by pcDNA3 and Sindbis virus based ... [3] Developments in diagnostic techniques for differentiating ... [4] The structure of foot-and ... [5] The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen ... [6] Identification of foot-and-mouth disease virus-specific linear B-cell epitopes to differentiate ... [7] Identification of a conserved linear epitope using a monoclonal antibody against non-structural protein 3B ... [8] Differentiation of foot-and-mouth disease virus-infected from vaccinated pigs by enzyme-linked immunosorbent assay using nonstructural ... [9] Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ... [10] Indirect ELISA using recombinant nonstructural protein 3D to detect foot and mouth disease ... [11] Identification of a major antibody binding epitope in the non-structural protein 3D of foot-and-mouth disease virus in cattle ... [12] Mapping of immunodominant regions of the non structural protein 3D of FMDV, relevant for the ... [13] Recombinant non-structural polyprotein 3AB-based serodiagnostic strategy for FMD surveillance ... [14] Comparative genomics of foot-and-mouth ... [15] Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot ... [16] Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together ... [17] Expression of foot-and-mouth disease virus non-structural protein, 3D in insect ... [18] Multiplexed detection of antibodies to nonstructural proteins of foot ...

کلونینگ و بیان ژن کدکننده نواحی آنتی ژنی پروتئین غیرساختاری 3D ویروس بیماری تب برفکی

پروین مقدم MSc

گروه آموزشی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

آزاده زحمت کش PhD

"بخش ژنومیکس و مهندسی ژنتیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی" و "سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی"، کرج، ایران

سعید آریان PhD

گروه آموزشی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

معصومه باقری PhD

"بخش ژنومیکس و مهندسی ژنتیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی" و "سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی"، کرج، ایران

همایون مهروانی بهبهانی PhD

"آزمایشگاه تخصصی تب برفکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی" و "سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی"، کرج، ایران

خسرو آقایی پور PhD

"بخش ژنومیکس و مهندسی ژنتیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی" و "سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی"، کرج، ایران

چکیده

تب برفکی (FMD) بیماری بسیار واگیردار و ویرانگر است که به سرعت انتشار می یابد و خسارات اقتصادی زیادی را موجب می شود. یکی از روش های مهم تشخیص بیماری و خصوصاً تفکیک حیوان واکسینه شده از حیوان مبتلا به این بیماری، استفاده از پروتئین های غیرساختاری به عنوان آنتی ژن در کیت های تشخیصی الایزا است. هدف از مطالعه حاضر، کلونینگ توالی ژنی و بیان نواحی آنتی ژنی پروتئین غیرساختاری 3D به عنوان یکی از گزینه های تشخیصی است. برای تکثیر ژن کدکننده نواحی آنتی ژنی پروتئین 3D ویروس تب برفکی، آغازگرهای اختصاصی دارای جایگاه برشی آنزیم های EcoRI و NdeI طراحی و واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد. توالی برش خورده توسط این دو آنزیم، به ناقل pET21a+ انتقال داده و در باکتری های *شریشیا کلی* DH5α ترانسفورم شد. آزمایشات کلونی PCR و برش آنزیمی برای کلونی های حاصل انجام و حضور ژن هدف تایید شد. توالی ژنی نیز پس از توالی یابی تایید شد. برای تولید آنتی ژن نوترکیب، وکتور بیانی نوترکیب به میزبان بیانی باکتری *شریشیا کلی* BL21 انتقال داده شد. باکتری های حاوی ژن نوترکیب، با IPTG القا شدند و بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از روش SDS-PAGE تایید شد. وزن مولکولی پروتئین نوترکیب مورد نظر حدود ۲۴ کیلو دالتون بود و از آن می توان در طراحی کیت تشخیصی الایزا استفاده کرد.

کلیدواژه ها: ژن 3D، اپی توپ، بیماری تب برفکی، پروتئین نوترکیب

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۶

*نویسنده مسئول: a.zahmatkesh@rvsri.ac.ir

مقدمه

تب برفکی (FMD) بیماری بسیار واگیردار و ویرانگر است که به سرعت انتشار می یابد و خسارات اقتصادی زیادی را موجب

می شود^[1]. در صنعت دامداری از این بیماری به عنوان طاعون یاد می شود و به دلیل کاهش تولید شیر و گوشت، خسارات فراوانی به این صنعت وارد می کند^[2]. در ایران نیز این بیماری مهم ترین عامل تهدیدکننده سرمایه و تولیدات دامی است و اولین بیماری دامی در جدول مبارزه با بیماری های دام محسوب می شود.

ویروس تب برفکی (FMDV) دارای RNA تک رشته ای مثبت است و به جنس Aphthovirus از خانواده Picornaviridae تعلق دارد. ژنوم آن دارای ۸۴۰۰ نوکلئوتید است و ۱۲ پروتئین کد می کند که هشت پروتئین غیرساختاری و بقیه ساختاری هستند. پروتئین های ساختاری بخشی از ساختار ویروس هستند ولی پروتئین های غیرساختاری در تکثیر و عملکرد ویروس در سلول میزبان نقش دارند. از میان آنها پروتئین 3D در مراحل ابتدایی چرخه زندگی ویروس به عنوان RNA پلیمرز وابسته به RNA نقش مهمی را ایفا می کند^[3]. عواملی مانند تعداد سروتیپ های ویروس، جهش پذیری بالای آن (که نتیجه آن تغییرات سریع آنتی ژنیکی است)، بقای زیاد ویروس در طبیعت، شیوع سریع، شکل گیری حاملین، هزینه زیاد کنترل بیماری و مقررات سنگین بین المللی برای کشورهای دارای این بیماری، اهمیت بیماری تب برفکی را افزایش می دهد^[4]. واکسن های متداول FMDV دارای ذرات ویروسی غیرفعال شده و خالص شده هستند. در نتیجه احتمال شناسایی آنتی بادی علیه پروتئین های غیرساختاری در دام های واکسینه دور از انتظار و یا در حد بسیار کمی خواهد بود. پروتئین های غیرساختاری تنها پس از آلودگی سلول به ویروس زنده حضور دارند و بیان می شوند و آنتی بادی اختصاصی علیه آنها تنها پس از آلودگی ایجاد می شود^[5]. همچنین توالی های آمینواسیدی پروتئین های غیرساختاری برخلاف پروتئین های ساختاری در میان سروتیپ ها و تحت تیپ های مختلف FMDV بسیار حفاظت شده هستند و در نتیجه برای تشخیص همه سروتیپ های بیماری قابل استفاده خواهند بود^[6,7].

مطالعات روی تولید پروتئین های غیرساختاری تولید شده به صورت نوترکیب نشان داده اند که این پروتئین های نوترکیب قابلیت شناسایی توسط آنتی بادی و تشخیص و تمایز بین دام های آلوده و واکسینه را دارند^[8]. تشخیص بیماری مبتنی بر علایم کلینیکی و جداسازی ویروس زمان بر است، در حالی که آزمون های الایزا نتایج اختصاصی تر، حساس تر و سریع تر ارایه می کنند و می توانند در کنار روش های سنتی در تشخیص هر چه دقیق تر بیماری موثر باشند. مطالعات مختلفی روی پروتئین های غیرساختاری برای بررسی امکان ایجاد پاسخ ایمنی در دام های آلوده و واکسینه انجام شده که نشان داده است پروتئین 3D توسط سرم دام های آلوده، مستقل از نوع سویه شناسایی می شود و نسبت به سایر پروتئین های غیرساختاری در فاصله زمانی کوتاه تری پس از آلودگی در سرم دام آلوده این پروتئین ایجاد می شود و ماندگاری بالاتری نیز دارد^[9, 10]. نواحی اپی توپی خطی اصلی اتصال به آنتی بادی در پروتئین 3D در ناحیه انتهای آمینی آن شناسایی

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA ویروس توسط کیت Purification mini Kit (فیورژن؛ تایوان) استخراج شد. سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت سنتز Cdna (یکتا تجهیزآزما؛ ایران) انجام شد.

تکثیر و کلونینگ ژن

برای تکثیر توالی ژنی 3D به طول مورد انتظار ۵۶۰ جفت باز، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر بافر Pfu (۱۰X)، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول بر میکرولیتر)، یک میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار) و ۲/۵ میکرولیتر آنزیم Pfu DNA پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۷ سیکل واسرشت سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸°C به مدت ۴۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

محصول نهایی PCR بعد از تخلیص، توسط آنزیم‌های برشی، برش داده و تخلیص شد. وکتور pET21a+ هم با آنزیم‌های NdeI و EcoRI برش داده و روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از کیت Plasmid DNA Extraction Mini Kit (فیورژن؛ تایوان) تخلیص شد. واکنش درج قطعه در وکتور (ligation) به کمک آنزیم T4 DNA لیگاز (تاکارا؛ ژاپن) در دمای ۱۶°C به صورت شبانه انجام و محصول واکنش به باکتری /شریشیا کلی DH5α منتقل شد (ترانسفورماسیون). باکتری‌ها روی محیط کشت LB آگار حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شدند. آزمایشات کلنی-PCR و هضم آنزیمی (به صورت تک برش با آنزیم EcoRI و همچنین دو برش با دو آنزیم NdeI و EcoRI) برای کلنی‌های حاصل انجام شد تا حضور وکتور نوترکیب تایید شود. سپس، استخراج پلاسمید از کلنی‌های دارای وکتور نوترکیب انجام و نمونه برای توالی‌یابی با استفاده از پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator ارسال شد.

بررسی بیوانفورماتیک پروتئین

برای پیش‌بینی اندازه تقریبی پروتئین نوترکیب از برنامه تحت وب ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) استفاده شد. همچنین برای بررسی میزان آب‌گریزی پروتئین نوترکیب و پیش‌بینی وضعیت حلالیت آن از نرم‌افزار Peptide Calculator استفاده شد.

بیان پروتئین نوترکیب 3D

وکتور نوترکیب استخراج شده پس از تعیین توالی و تایید صحت کلونینگ توالی 3D، به میزبان /شریشیا کلی BL21 منتقل و از کلنی‌های حاصل، یک تک کلنی انتخاب شد و در محیط کشت LB لبراث حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین درون شیکر انکوباتور با دمای ۳۷°C، به‌طور شبانه کشت داده شد. کشت

شده‌اند^[11, 12]. در مطالعه حاضر، از توالی ژنی کدکننده نواحی آنتی ژنی پروتئین 3D از سروتیپ 01 سویه PanAsia ویروس تب برفکی، برای کلونینگ و بیان ژن، به‌منظور استفاده از پروتئین نوترکیب در تولید کیت تشخیصی الیزا در آینده استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

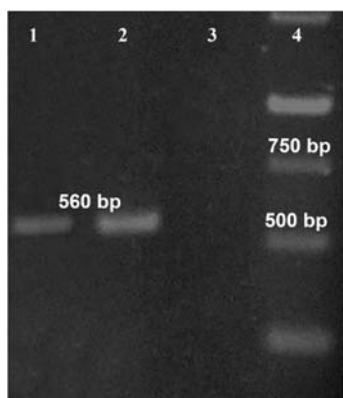
تهیه ویروس، باکتری و وکتور

سلول‌های BHK-21 آلوده به ویروس تب برفکی سروتیپ 01 سویه PanAsia، از بخش تب برفکی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج تهیه شد. نمونه‌های کشت سلول در ویال‌های ۵/۱ میلی‌لیتری ریخته و به دمای ۷۰°C منتقل شدند. سویه DH5α /شریشیا کلی، به‌عنوان میزبان کلونینگ و سویه BL21 pET21a+ به‌عنوان ناقل کلونینگ و بیان ژن استفاده شد. این وکتور تحت رونویسی توسط T7 RNA پلیمرز قرار می‌گیرد و دارای پروموتور T7 در انتهای آمینی خود و همچنین تگ هیستیدین در انتهای کربوکسیل است که برای هدف تخلیص پروتئین نوترکیب در این مطالعه استفاده شد. طراحی سازه به گونه‌ای انجام شد که توالی ژنی کدکننده پروتئین 3D در جایگاه بین دو آنزیم برشی NdeI و EcoRI در وکتور قرار گیرد و تگ هیستیدین و کدون پایان درج‌شده در وکتور نیز در انتهای کربوکسیل توالی به آن افزوده شود.

طراحی آغازگر

از توالی ژنی کدکننده پلی پروتئین ویروس تب برفکی سروتیپ 0 در پایگاه داده‌های NCBI (با کد دسترسی AH012985.2) برای طراحی آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. نواحی اپی‌توپی خطی سلول‌های B گاو در پروتئین 3D با توجه به مقالات در ناحیه انتهای آمینی پروتئین مشخص شد^[11, 12]. طراحی به کمک نرم‌افزار Oligo 7 با در نظر گرفتن دو جایگاه برشی برای آنزیم‌های NdeI و EcoRI که به ترتیب در آغازگرهای رفت و برگشت بودند، انجام شد. توالی آغازگرها به این ترتیب بود: رفت 5'-gtgtactcatatgggattgatagttgacacc-3' و برگشت 5'-gtatagaattcaaagcttgcgcgcac-3'. جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی با خط زیرین نشان داده شده است. اندازه دنباله نوکلئوتیدی (اورهنگ) نیز براساس تعداد نوکلئوتیدهای مورد نیاز برای برش بهینه براساس سایت NEB (<https://international.neb.com>) در نظر گرفته شد. آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۵۶۰ جفت باز که در نهایت منجر به تولید پروتئین اپی‌توپی به طول ۱۹۹ آمینواسید می‌شود (با توجه به توالی وکتور) در نظر گرفته شدند. دمای ذوب آغازگرهای رفت و برگشت به ترتیب ۶۱/۷ و ۶۰/۹°C به کمک نرم‌افزار Oligo 7 تعیین شد.

آنزیم NdeI و EcoRI منجر به جدا شدن قطعه 3D از وکتور شد که در شکل ۲- ب چاهک‌های ۴ و ۵ مشخص است. ضمن اینکه وکتور خطی تک‌برش خورده دارای قطعه 3D (چاهک‌های ۱ و ۲) از وکتور خطی بدون قطعه (چاهک‌های ۴ و ۵) در جایگاه بالاتری قرار گرفت (شکل ۲- ب). برای تایید نهایی، وکتور pET21a+ حاوی ژن پروتئین نوترکیب توالی‌یابی شد. نتیجه توالی‌یابی با توالی‌های پلی‌پروتئین ویروس تب برفکی سروتیپ O موجود در پایگاه داده‌های NCBI آنالیز بلاست گذاشته شد و همولوژی و صحت چارچوب توالی تایید شد. بیشترین یکسانی نوکلئوتیدی این توالی ژنی (۹۳٪) با توالی ژن 3D ویروس تب برفکی سروتیپ O بنگلادش (KX712091.1)، امارات (MG983738.1) و عربستان سعودی (MG983729.1)، و کمترین تشابه (۹۰٪) با ایزوله BFS 1860 B3.3D.V انگلستان (JX570653.1) بود. نتیجه توالی‌یابی در پایگاه داده‌ها با کد دسترسی MK814881 ثبت شد. بررسی بیوانفورماتیک نشان داد که پروتئین مورد انتظار دارای وزن احتمالی حدود ۲۴ کیلودالتون و میانگین آب‌دوستی ۲۷٪ است. بررسی پروتئین نوترکیب تولیدشده روی ژل SDS-PAGE حضور باند پروتئین نوترکیب در محدوده ۲۴ کیلودالتونی را در ساعات پس از القا نسبت به قبل از القا تایید کرد که این نتیجه با پیش‌بینی‌های اولیه اندازه پروتئین منطبق بود. بیان پروتئین در هر سه ساعت مورد بررسی نسبتاً یکسان بود ولی در ساعت چهارم کمی بیشتر به نظر می‌رسید. همچنین پروتئین مورد نظر در حالت استفاده از بافر دناتوره جداسازی شد که این مساله نیز با توجه به میزان آب‌دوستی پایین پروتئین نوترکیب و احتمالاً حلالیت پایین آن قابل انتظار بود. جداسازی پروتئین در فاز نامحلول منوط به تغییر ساختار آن به کمک بافر دناتوره است که با توجه به اینکه اپی‌توپ‌های مورد نظر برای الیزا، خطی و نه ساختاری هستند، این تغییر ساختار اثر چندانی در تشخیص بیماری نخواهند داشت. تخلیص پروتئین به کمک ستون کروماتوگرافی نیکل منجر به جداسازی باند پروتئینی حدود ۲۴ کیلودالتونی با خلوص بسیار بالا شد که خود تاییدی بر صحت پروتئین بیان‌شده 3D دارای تگ هیستیدین است (شکل ۳).



شکل ۱) الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ (۱ و ۲) قطعات ژنی تکثیرشده 3D؛ ۳) کنترل

حاصل با نسبت ۱ به ۱۰۰ با محیط کشت مایع تازه حاوی آمپی‌سیلین، رقیق شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷°C قرار گرفت تا زمانی که جذب آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵-۰/۸ رسید. در این زمان، حدود ۲۵ میلی‌لیتر از کشت به‌عنوان نمونه قبل القا در زمان صفر برداشته و به بقیه آن ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی یک میلی‌مولار اضافه شد. بعد از گذشت زمان‌های ۲، ۳ و ۴ ساعت، نمونه برداشته شد تا زمان مناسب برای القای بیان ژن مشخص شود. نمونه‌ها در دمای ۴°C به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۲۸۰۰g سانتریفیوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد. بعد از تجزیه‌کردن سلول‌ها در بافر دارای ۵۰ میلی‌مولار مونسدیم فسفات (NaH₂PO₄)، ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و ۵۰ میلی‌مولار فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید (PMSF) به مدت ۲۰ دقیقه به همراه ورنکس و پیپت‌کردن، سانتریفیوژ در دمای ۴°C با دور ۹۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه انجام و محلول رویی برداشته و به فریزر ۷۰°C- منتقل شد. رسوب حاصل نیز در بافر دناتوره (۵۰ میلی‌مولار مونسدیم فسفات، ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و ۸ مولار اوره) به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد و محلول رویی بعد از سانتریفیوژ در دمای ۴°C با دور ۹۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و تا زمان الکتروفورز به فریزر ۷۰°C- منتقل شد. به‌منظور تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون کروماتوگرافی نیکل (کیاژن؛ آلمان) استفاده شد. رسوب حاصل از باکتری به کمک بافر دارای مونسدیم فسفات (۱/۰ مولار)، تریس بازی (۱/۰ مولار) و اوره (۸ مولار) لیز شد تا پروتئین‌های تجمع‌یافته به فاز محلول وارد شوند و در دور ۹۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا و به ستون کروماتوگرافی افزوده شد. در نهایت با چند بار شست‌وشو با بافر، فراکشن‌های مختلف جداسازی شدند و پروتئین مورد نظر تخلیص شد. پروتئین خالص‌شده با روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت.

SDS-PAGE

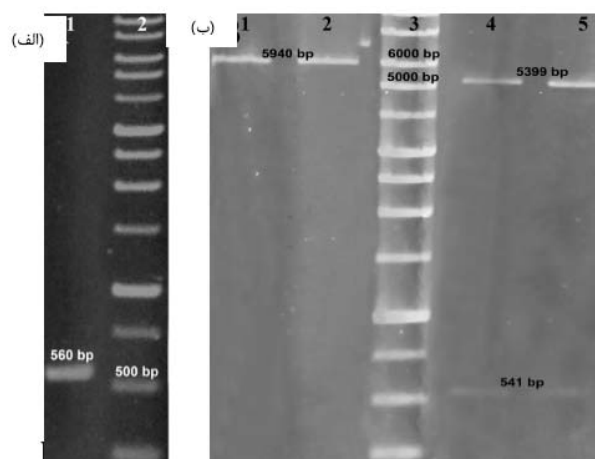
الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی به همراه مارکر اندازه پروتئینی تحت شرایط دناتوره در ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲٪ با ولتاژ ۲۰۰ ولت به مدت یک ساعت انجام شد. سپس ژل پلی‌آکریل‌آمید با رنگ کوماسی بریلیانت‌بلو رنگ‌آمیزی شد و پس از رنگ‌بری باندها رویت شدند.

یافته‌ها و بحث

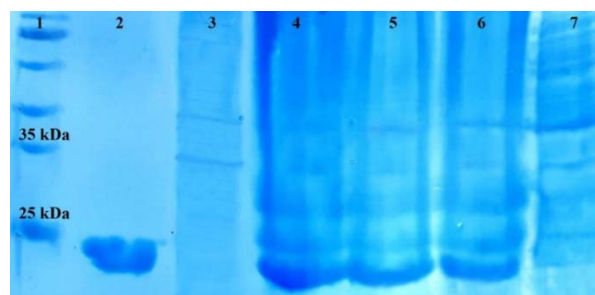
محصولات PCR مربوط به قطعه 3D روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و باند ۵۶۰ جفت بازی طبق انتظار مشاهده شد (شکل ۱). عدم وجود باند در کنترل منفی و وجود باند اختصاصی در چندین PCR نشان‌دهنده دقت و صحت واکنش بوده است. حضور ژن 3D در کلنی باکتری‌های حاوی وکتور pET21a+ با آزمایش کلنی-PCR تایید شد (شکل ۲- الف). آزمایش هضم آنزیمی نیز کلونینگ ژن 3D را تایید کرد. به این صورت که برش وکتور نوترکیب با دو

بیان پروتئین‌های نوترکیب در سیستم بیانی /شریشیا کلی دارای مزیت‌هایی از جمله ساده‌تر بودن، هزینه اندک و زمان کمتر است. ژنوم ویروس تب برفکی کوچک است و نرخ جهش بالایی دارد. پروتئین‌های ساختاری ویروس نسبت به غیرساختاری متغیرتر هستند و جهش یا حذف نوکلئوتیدی در آنها ممکن است به گریز ویروس از پاسخ ایمنی میزبان منجر شود. توالی آمینواسیدی پروتئین‌های غیرساختاری برخلاف پروتئین‌های ساختاری در میان سروتیپ‌های مختلف ویروس تب برفکی بسیار حفاظت‌شده هستند^[14]. در مطالعه حاضر ناحیه اپی‌توپی توالی 3D برای تکثیر انتخاب و در میزبان /شریشیا کلی کلون و بیان شد. قطعه 3D به این علت انتخاب شد که طبق گزارش سایر محققین، پروتئین 3D بسیار حفاظت‌شده است و مستقل از نوع سویه ویروس، توسط سرم دام‌های آلوده به هر هفت سروتیپ ویروس تب برفکی شناسایی می‌شود و نسبت به سایر پروتئین‌های غیرساختاری، آنتی‌بادی علیه آن در فاصله زمانی کوتاه‌تری (۵-۶ روز) پس از آلودگی در سرم دام آلوده این پروتئین ایجاد می‌شود و ماندگاری بالاتری (تا ۷۰۰ روز) نیز دارد^[9, 15]. در این مطالعه تنها ناحیه اپی‌توپی پروتئین 3D در نظر گرفته شد و از بیان کل توالی پروتئینی آن خودداری شد، زیرا تعدد اپی‌توپ‌هایی که در یک پروتئین بزرگ موجود است، ممکن است باعث واکنش غیراختصاصی با آنتی‌بادی‌ها و یا سایر اعضای خانواده پیکورناویروس شود^[16]. استفاده از این پروتئین در کیت‌های الایزا می‌تواند در تشخیص به موقع بیماری و مهم‌تر از آن در تفکیک دام‌های آلوده و بیمار بسیار موثر واقع شود.

پروتئین کامل 3D در سیستم بیانی باکولوویروس بیان شده و در تشخیص بیماری تب برفکی به روش الایزا مورد استفاده قرار گرفته و نشان داده شده است که در کنار سایر روش‌های تشخیصی مبتنی بر پروتئین غیرساختاری در پایش سرمی بیماری تب برفکی موثر و کاربردی خواهد بود^[17]. همچنین آزمایش الایزا براساس پپتید سنتزی از ناحیه آمینی پروتئین 3D منجر به تشخیص سرم‌های آلوده به ویروس شد^[18]. آزمایش ساندویچ الایزا علیه پروتئین نوترکیب 3D به‌صورت فیوژن با GST نشان داد که این پروتئین قادر به ردیابی آنتی‌بادی علیه ویروس تب برفکی در دام‌های آلوده حتی از ۵ روز پس از ایجاد عفونت است و نتایج آن دقیق، اختصاصی و تکرارپذیر هستند. الایزا براساس پروتئین 3D به‌عنوان یک ابزار کاربردی در نظارت بر فعالیت ویروس و صدور گواهی دام‌های عاری از ویروس تب برفکی در صادرات و واردات دام توصیه شده است^[9]. آزمایش الایزای غیرمستقیم براساس پروتئین نوترکیب کامل 3D حساسیت بالای تشخیص و دوام بالای آنتی‌بادی علیه این پروتئین را در سرم دام‌های آلوده نشان داده است^[10]. در مطالعه حاضر، نواحی آنتی‌ژنی این پروتئین در انتهای آمینی آن به‌صورت نوترکیب بیان شد. این پروتئین به‌دلیل ماندگاری زیاد در سرم دام‌های آلوده انتخاب مناسبی در تشخیص



شکل ۲) آزمایشات تایید کلونینگ؛ الف) الگوی الکتروفورز کلنی-PCR؛ ۱) قطعه ۵۶۰ جفت بازی 3D؛ ۲) نشانگر با اندازه اکیلوگفت باز؛ ب) الگوی الکتروفورز برش آنزیمی وکتور pET21a+/3D؛ ۱ و ۲) قطعات حاصل از تک‌برش وکتور با آنزیم NdeI؛ ۳) نشانگر با اندازه اکیلوگفت باز؛ ۴ و ۵) قطعات حاصل از برش وکتور با آنزیم‌های EcoRI و NdeI



شکل ۳) الکتروفورز عمودی پروتئین نوترکیب در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲٪؛ ۱) نشانگر اندازه پروتئینی ۱۸۰-۱۰۰ کیلو دالتون؛ ۲) پروتئین 3D تخلیص‌شده؛ ۳) محلول حاصل از لیز باکتری چهار ساعت پس از القا؛ ۴ تا ۶) رسوب باکتری لیزشده با بافر دناتوره به ترتیب چهار، سه و دو ساعت پس از القا؛ ۷) رسوب باکتری لیزشده با بافر دناتوره قبل از القا

تشخیص اولیه آلودگی به ویروس FMD برای کنترل و جلوگیری از بیماری، از مهم‌ترین مسایل در مبارزه با بیماری تب برفکی است. روش‌های تشخیصی سریع و صحیح بیماری برای جلوگیری از شیوع بیماری و ریشه‌کن کردن آن، امری بسیار مهم و حیاتی است. از جمله این روش‌ها، تست‌های الایزا با اختصاصیت و حساسیت بالا هستند. در حال حاضر تشخیص بر مبنای آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های غیرساختاری روش سرولوژی ترجیحی و رایج در تشخیص و تفکیک دام‌های آلوده به تب برفکی از واکسینه است^[3]. به همین دلیل، سیستم‌های الایزا براساس این پروتئین‌ها به‌عنوان بخش مهمی از برنامه‌های پایش و کنترل به کمک واکسن در کشورهای مختلف جهان در نظر گرفته شده‌اند^[13]. در ایران استفاده از کیت‌های تشخیصی الایزا، مستلزم ورود آنها از خارج از این کشور است. بنابراین راه‌اندازی این کیت به کمک تولید پروتئین‌های غیرساختاری نوترکیب می‌تواند اهمیت ویژه‌ای در راستای خودکفایی در این زمینه داشته باشد.

- 4- Fry EE, Stuart DI, Rowlands DJ. The structure of foot-and-mouth disease virus. In: Mahy BW, editor. Foot-and-mouth disease virus. Berlin: Springer; 2005. pp. 71-101.
- 5- De Diego M, Brocchi E, Mackay D, De Simone F. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. Arch Virol. 1997;142(10):2021-33.
- 6- Höhlich BJ, Wiesmüller KH, Schlapp T, Haas B, Pfaff E, Saalmüller A. Identification of foot-and-mouth disease virus-specific linear B-cell epitopes to differentiate between infected and vaccinated cattle. J Virol. 2003;77(16):8633-9.
- 7- Li Ch, Liang W, Liu W, Yang D, Wang H, Ma W, et al. Identification of a conserved linear epitope using a monoclonal antibody against non-structural protein 3B of foot-and-mouth disease virus. Arch Virol. 2016;161(2):365-75.
- 8- Chung WB, Sorensen KJ, Liao PC, Yang PC, Jong MH. Differentiation of foot-and-mouth disease virus-infected from vaccinated pigs by enzyme-linked immunosorbent assay using nonstructural protein 3AB as the antigen and application to an eradication program. J Clin Microbiol. 2002;40(8):2843-8.
- 9- O'Donnell VK, Boyle DB, Sproat K, Fondevila NA, Forman A, Schudel AA, et al. Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. J Vet Diagn Investig. 1996;8(2):143-50.
- 10- Mahajan S, Mohapatra JK, Pandey LK, Sharma GK, Pattnaik B. Indirect ELISA using recombinant nonstructural protein 3D to detect foot and mouth disease virus infection associated antibodies. Biologicals. 2015;43(1):47-54.
- 11- Yang M, Clavijo A, Li M, Hole K, Holland H, Wang H, et al. Identification of a major antibody binding epitope in the non-structural protein 3D of foot-and-mouth disease virus in cattle and the development of a monoclonal antibody with diagnostic applications. J Immunol Methods. 2007;321(1-2):174-81.
- 12- Grazioli S, Brocchi E. Mapping of immunodominant regions of the non structural protein 3D of FMDV, relevant for the recognition of an infection status. European Commission for the Control of Foot-and Mouth Disease Session, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008 October 14-17, Erice, Italy. Brescia: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; 2008.
- 13- Mohapatra JK, Pandey LK, Sanyal A, Pattnaik B. Recombinant non-structural polyprotein 3AB-based serodiagnostic strategy for FMD surveillance in bovines irrespective of vaccination. J Virol Methods. 2011;177(2):184-92.
- 14- Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, Lu Z, Carreno A, Vagnozzi A, et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. J Virol. 2005;79(10):6487-504.
- 15- Bergmann IE, De Mello PA, Neitzert E, Beck E, Gomes I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. Am J Vet Res. 1993;54(6):825-31.
- 16- Neitzert E, Beck E, De Mello PA, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene

بیماری در گله‌های دامی و خصوصاً ردیابی بیماری در حیات وحش است.

نتیجه‌گیری

پروتئین نوترکیب ساخته‌شده در مطالعه حاضر، علاوه بر اینکه نواحی آنتی‌ژنی پروتئین 3D را در بردارد، مشکلات مربوط به هزینه بالای سنتز پپتید را ندارد و می‌تواند گزینه مناسبی برای استفاده در طراحی کیت الیزا برای تشخیص بیماری تب برفکی باشد. با توجه به اینکه نواحی آنتی‌ژنی در نظر گرفته‌شده اپی‌توپ‌های خطی و نه اپی‌توپ‌های ساختاری سلول‌های B گاو را شامل می‌شود، بنابراین با وجود خالص‌سازی آن در فاز غیرمحلول، مشکلات بازسازی ساختار پروتئینی چندان مطرح نخواهند بود. در نظر گرفتن نواحی آنتی‌ژنی این پروتئین به جای بیان کل پروتئین ممکن است در حساسیت و اختصاصیت تشخیص به کمک روش الیزا تغییراتی ایجاد کند که در مطالعات آتی قابل بررسی خواهد بود.

تشکر و قدردانی: مطالعه حاضر در راستای پروژه مصوب موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج با کد ۲۴۰۹۵۰۰۱-۱۸-۱۸-۲۰ انجام شده است، بنابراین از تمامی همکاران این مطالعه سپاسگزاری می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط هیچ نشریه دیگری منتشر نشده و به‌طور همزمان برای نشریه دیگری نیز ارسال نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: پروین مقدم (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪)، آزاده زحمت‌کش (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪)، سعید آرییان (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۲٪)، معصومه باقری (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۲٪)، همایون مهروانی‌بهبهانی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۸٪)، خسرو آقایی‌پور (نویسنده ششم)، پژوهشگر کمکی (۸٪)

منابع مالی: هزینه مطالعه حاضر از محل اعتبار پژوهشی پروژه با کد مصوب ۲۴۰۹۵۰۰۱-۱۸-۱۸-۲۰ توسط موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تامین شده است.

منابع

- 1- Lu Z, Zhang X, Fu Y, Cao Y, Tian M, Sun P, et al. Expression of the major epitope regions of 2C integrated with the 3AB non-structural protein of foot-and-mouth disease virus and its potential for differentiating infected from vaccinated animals. J Virol Methods. 2010;170(1-2):128-33.
- 2- Dory D, Rémond M, Béven V, Cariolet R, Zientara S, Jestin A. Foot-and-Mouth Disease Virus neutralizing antibodies production induced by pcDNA3 and Sindbis virus based plasmid encoding FMDV P1-2A3C3D in swine. Antivir Res. 2009;83(1):45-52.
- 3- Clavijo A, Wright P, Kitching P. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. Vet J. 2004;167(1):9-22.

and its application in detection of anti-FMDV antibodies. Indian J Virol. 2012;23(3):326-32.

18- Perkins J, Clavijo A, Hindson BJ, Lenhoff RJ, McBride MT. Multiplexed detection of antibodies to nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. Anal Chem. 2006;78(15):5462-8.

in Escherichia coli and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. Virology. 1991;184(2):799-804.

17- Kumar R, Hosamani M, Sreenivasa BP, Kotyal A, Venkataramanan R. Expression of foot-and-mouth disease virus non-structural protein, 3D in insect cells