کلونینگ ژن پروتئین F ویروس نیوکاسل و تعیین توالی آن

دکتر مصطفی جعفرپور*[۱]، دکتر هادی کیوانفر[۲]، دکتر رسول مدنی[۳]، مهندس فریبا گلچین فر[۳]، تارا امامی[۳]

چکیده

ویروس عامل بیماری نیوکاسل (NDV) یکی از مهمترین عوامل بیماری های ویروسی طیور می باشد، که سبب واگیری و مرگ و میر شدید در طیور و گونه های متعددی از پرندگان می شود. پروتئین F ویروس جهت نفوذ و تکثیر ویروسی در حیوانات آلوده نقش محوری دارد.کلونینگ و بیان ژنوم کد کننده پروتئین F جهت تولید واکسن تحت واحد و همچنین تولید آنتی بادی مونوکلنال علیه پروتئین F می تواند گام های جدیدی برای شناسائی و پیشگیری از بیماری نیوکاسل باشد. در این پژوهش ژنوم کد کننده پروتئین F ویروس نیوکاسل توسط تکنیک RT-PCR تکثیر گردید. ژنوم دلخواه پس از خالص سازی در T.A وکتور (RTZ 57R/T) کلون گردیده و سپس در باکتری α 5 DHترانسفورم شد. پس از تائید کلونینگ، قطعه مورد نظر از حامل پلاسمیدی جدا گردیده، و توالی نوکلئوتیدی تشکیل دهنده آن تعیین و جهت مقایسه با توالی کد کننده پروتئین F ویروسهای نیوکاسل موجود در بانک ژن توسط نرم افزار Blast مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین مشابهت نوکلئوتیدی با سویه های Sterna / astr و Italy/3286/00 (۹۸ ٪) و کمترین تشابه نوکلئوتیدی با سویه های JS-2/98 و LZ-CH-A7/96 (۹۳ ٪) گزارش شد.

واژگان کلیدی: *ویروس بیماری نیوکاسل ، پروتئین F ، RT-PCR، کلونینگ، واکسن ساب یونیت*

مقدمه

خانواده پارامیکسوویریده در برگیرنده عوامل ویروسی مهم و خطرناکی همانند ویروس نیوکاسل طیور، ویروس طاعون گاوی، ویروس سن سنیال تنفسی گاو می باشد، که خسارات اقتصادی فوق العاده زیادی ایجاد می کنند(٤). ویروس عامل بیماری نیوکاسل (NDV) که در جنس روبولا قرار گرفته است(۲ و ۳). در طیور و پرندگان وحشی بیماری عمومی شدیدی توام با درگیری اعصاب مرکزی ایجاد می کند(٤). ژنوم NDV طولی حدود ۱۵۱۸٦ نوکلئوتید دارد که حداقل ۷ پروتئین نوکلئوکپسید (NP)فسفو پروتئین (P)، پروتئین V، پروتئین ماتریکس (M) پروتئین هماگلوتینین نورامینیداز (HN)، پروتئین ادغام (F)، پروتئین پلی مراز (L) را کد می کند(٤،٦).

Cloning of F protein gene of Newcastle virus and determination of nucleotide sequence

Jafarpoor, M.[1] , Keyvanfar, H.[2] , Madani, R.[3] , Golchinfar, F.[3] , Emami,T.[3]

1-Postgraduate Student of Veterinary Microbiology Faculty of Specialised Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran

2-Department of Microbiology, Faculty of Specialised Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran

3-Razi Research Institute, Karaj, Iran.

Newcastle disease virus (NDV) is one of the most important viral disease of poultry. It is an infectious, highly contagious disease that causes up to 100% mortality in chicken and other bird species. The fusion protein (F-protein) is of crucial importance in allowing virus penetration and spread in infected animals. Cloning and expression of Genome encoding F protein for production of sub unit vaccine and production of monoclonal antibody against F protein would be a new strategy for recognition and prevention of the disease. In this investigation genome encoding F protein amplified by RTPCR technique. At first, the desirdd genome was purifi and cloned in TA vector and then transformed In Ecoli DH5. After confirming of cloning, intended fragment was separated from plasmid vector, comparing of nucleotide sequence for F-protein with Newcastle viruses in gene bank was examined. The results showed the most nucleotide identity with strains sterna/astra and italy/3286/00 (%98) and at the least with strains JS-2/98/ and LZ-CH-A7/96 (%93).

Key words:*Newcastle disease virus, F protein, RT PCR, Cloning, Sub unit vaccine*

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی،دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳- بخش بیوتکنولوژی موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

اساس بیماری زائی ویروس نیوکاسل به تجزیه پروتئولیتیک پیش ساز پروتئین F (F0) به دو تحت واحد F_2, F_1 که بوسیله باندهای دی سولفید به هم متصل شده اند، بر می گردد. این شکست پروتئولیتیک در منطقه ای بنام محل شکافته شدن صورت می گیرد و معمولاً بین اسیدهای آمینه ۱۱۷- ۱۱۲ قرار گرفته است و باعث آشکار سازی انتهای آمینی جدید F_1 که ناحیه هیدروفوبیک می باشد، می گردد. و در نتیجه فرم فعال بیولوژیکی پروتئین تشکیل می شود، که باعث تخریب غشاء سلول هدف و القاء الحاق غشائی می گردد. (٤ ، ١٨، ١٩) این ناحیه هیدروفوبیک که پپتید فیوژن نامیده می شود، در پروتئینهای F پارامیکسوویروسها حفظ شده و بنظر می رسد قرارگیری این قسمت از پروتئین در غشاء سلول هدف باعث شروع فیوژن می شود. حساسیت پیشساز F0 به شکست توسط آنزیمها گرایش ویروس را به بافتها و میزبان خاصی مشخص می کند. در سویه های بیماری زای NDV ، پپتید فیوژن می تواند در اکثر بافتها شکسته شود، اما در سویه های غیر بیماری زا این امر رخ نمی دهد و فقط در حضور تریپسین شکست پروتئولیتیک پروتئین F صورت می گیرد، در نتیجه تنها در بافتهائی که دارای این آنزیم هستند ویروس قادر به رشد می باشد.(١١، ١٦، ٢) هدف این پژوهش تعیین توالی نوکلئوتیدی و کلونینگ پروتئین F ایزوله بومی کشور (NR43) است، که می تواند راهگشای تحقیقات در جهت طراحی واکسن های نوترکیب و تشخیص مولکولی این ویروس باشد. علاوه بر این می تواند به عنوان یک مدل مطالعاتی و تحقیقاتی جهت بررسی اثرات پپتیدهای حاصل از نواحی مختلف پروتئین F (HR_1, HR_2) بر روی فعالیت ادغام به منظور طراحی داروهای ضد ویروسی و ضد توموری بکار رود.

مواد و روش کار

الف- مواد مورد استفاده

۱- تهیه ویروس

ویروس از بخش تشخیص بیماری های طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردید. بافت آلوده طیور مبتلا به بیماری پس از سلایه کردن روی تخم مرغ SPF کشت داده و تکثیر می کنند. ویروس جدا شده متوسط زمان مرگ (MDT) کمتر از ٤٠ ساعت داشت و تیتر هماگلوتینین پاساز دوم و سوم ویروس۱/۲۵٦ می باشد.

۲- کیت استخراج RNA (RNX) شرکت سینا ژن

۳- کیت RT-PCR تک مرحله ای Titan one tube RT-PCR System

٤- امکانات مربوط به الکتروفوز ژل آگارز شامل بافر TBE. محلول اتیدیوم بروماید، آگارز مخصوص الکتروفورز، پلیت و شانه ژل، تانک الکتروفورز افقی

۵- کیت کلونینگ شرکت Fermentas (PTZ 57 R/T . T vector)

۶- کیت تخلیص پلاسمید (شرکت Roche)

ب- روش کار

۱- تکثیر ژن کد کننده پروتئین F ویروس نیوکاسل

پس از استخراج RNA الگو توسط کیت تخلیص، بمنظور تکثیر ژن کد کننده پروتئین F واکنش RT-PCR در حجم نهایی ۵۰ μl در دو میکروتیوپ جداگانه به صورت زیر انجام شد.

محتویات میکروتیوپ اول را مخلوط نموده و به دستگاه ترموسایکلر منتقل می کنیم میکروتیوپ اول را به مدت ۳ دقیقه در ٦٨ درجه سانتیگراد قرار داده و سپس محتویات میکروتیوپ دوم را به آن اضافه نموده و مخلوط می کنیم میکروتیوپ ۵۰ μL را جهت سنتز CDNA در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده سپس جهت تکثیر CDNA برنامه سیکلیک طراحی شده RT-PCR انجام گرفت.

جدول ۱: محتویات میکروتیوپ ها جهت تکثیر ژن کد کننده پروتئین F ویروس نیوکاسل

ردیف	میکروتیوپ اول	میکروتیوپ دوم
۱	$Depc\ water: 10/5\ \mu L$	$Depc\ water: 11\mu L$
۲	$dNTPs: 4\ \mu L$	$RT-PCR\ buffer: 10\ \mu L$
۳	$Forward\ Primer: 1\mu L (10\ ^{Pmol}/_{\mu L})$	$MgCl_2: 3\mu L$
٤	$Reverse Primer: 1\mu L (10\ ^{Pmol}/_{\mu L})$	$Enzyme: 1\mu L$
٥	تخلیص شده RNA : $6\mu L$	---
٦	$DTT: 2/5\ \mu L$	---
حجم کلی	$25\mu L$	$25\mu L$

حرارت	زمان
۱- ۹٤ c° درجه سانتیگراد	۲ دقیقه
۲- ۹٤ c° درجه سانتیگراد	۱۰ ثانیه
۳- ٦۲ c° درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه
٤- ٦۸ c° درجه سانتیگراد	۲ دقیقه
٥- ۱۰ سیکل	(شروع: شماره ۲)
٦- ۹٤ c° درجه سانتیگراد	۱۰ ثانیه
۷- ٥۰ c° درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه
۸- ٦۸ c° درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه (زمان در هر سیکل ٥ ثانیه اضافه شود)
۹- ۲٥ سیکل	(شروع: شماره ٦)
۱۰- ٦۸ c° درجه سانتیگراد	۲٥ دقیقه

پرایمرهای مورد استفاده در واکنش RT-PCR از مقاله منتشر شده کسب گردیده و مشخصات آن که بدین صورت می باشد(۲۰)

(Fd3):5-
CGATTCCATCCGCAAGATCCA
AGGGTCTC-3 :پرایمرجلودار

(Fd5)5'-
GATCTAGGGTATTATTCCCAAGCCA-3'
پرایمر برگشتی

۲- کلونینگ قطعه ۱۳٥۹ bp ژن پروتئین F در T.Vector جهت تائید تکثیر ژن کد کننده پروتئین F محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید.

پس از تائید تکثیر ژن هدف، محصول PCR را بر روی ژل آگارز LMT الکتروفورز نموده، باند مورد نظر را جهت تخلیص ژن تکثیر شده برای مقاصد لیگیشن جدا کردیم. در یک میکرو اپندروف تمیز با اپتیمم کردن مقادیر مورد استفاده زیر عمل لیگیشن را انجام دادیم.

پلاسمید رکتور RTZ 57 R/T	۱/٥µl
لیگیشن بافر ۱۰ X	۱/٥µl
قطعه PCR تخلیص شده	۳µl
محلول پلی اتیلن گلیکول ٤۰۰۰ l	۱/٥µ l
آب دیونیزه	۷µl

T4 DNA لیگاز ۱/۵µl

سپس محصول لیگیشن را در باکتری DH5a ترانسفورم نموده و در محیط LB-agar حاوی آمپی سیلین، IPT G و XGal جهت انتخاب کلون های نوترکیب کشت دادیم.جهت تائید کلونینگ قطعه دلخواه خالص سازی پلاسمید کلون های نوترکیب با کیت شرکت Roch انجام گرفت. پس از تائید کلونینگ ژن مورد نظر، نمونه پلاسمیدی جهت تعیین توالی به منظور مقایسه توالی آن با سایر F پروتئین های ویروسهای ایزوله در بانک ژن به شرکت فرآیند دانش فرستاده شد.

نتایج

الف- تعیین قطعه 1359 bp پروتئین F ویروس نیوکاسل

با استفاده از پرایمرهای گزارش شده و روش RTPCR تک مرحله ای ژن مورد نظر تکثیر گردید. در این روش هر دو پرایمر جلودار و برگشتی جهت ساخت CDNA و همچنین تکثیر آن در یک زمان به تیوپ افزوده می شود.

نگاره۱ تائید اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از نشانگر شماره ۷ شرکتRoche بر روی ژل آگارز ۱٪

1 2

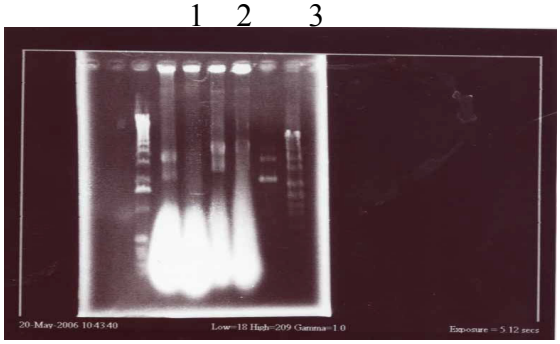
نگاره۱- تائید اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از نشانگر شماره ۷ شرکتRoche بر روی ژل آگارز ۱٪

۱- نشانگر شماره ۷ شرکت Roche ۲- قطعهbp 1359

ب- تائیدکلونینگ قطعه مورد نظر در T.vector

پس از انتخاب کلون های نوترکیب پلاسمید آنها توسط روش Miniprep جدا گردیده و جهت تائید حضور قطعه تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ الکترفورز گردید.

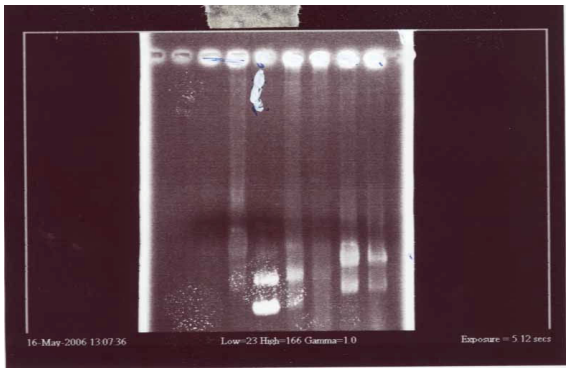
1 2 3



نگاره ۲ - تصاویر تائید کلونینگ قطعه مورد نظر در T.vector

۱- مارکر شماره VII ۲- کنترل پلاسمید بدون قطعه ۳- پلاسمید حاوی قطعه دلخواه

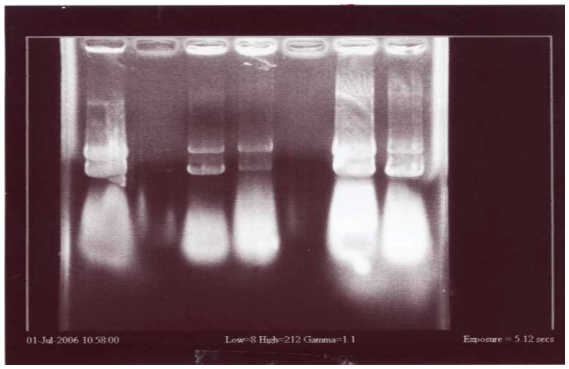
1 2



نگاره ۳- تصاویر تائید کلونینگ قطعه مورد نظر در T.vector

۱- کنترل پلاسمید ۲- پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر

1 2



نگاره٤- تصاویر تائید کلونینگ قطعه مورد نظر در T.vector

۱و۲- پلاسمیدهای حاوی قطعه مورد نظر

ج- آنالیز توالی قطعه 1359 نوکلئوتیدی کلون شده

جهت تعیین توالی قطعه مورد نظر پلاسمید نوترکیب به شرکت فرآیند دانش فرستاده شد. با استفاده از پرایمرهای جلودار و برگشتی اختصاصی ژن و برنامه نرم افزاری مگا الاین قطعه 1359 نولکئوتیدی تعیین توالی گردید.

د- بررسی مشابهت نوکلئوتیدی قطعه کلون شده با توالی کد کننده F پروتئین ویروسهای نیوکاسل موجود در بانک ژن

در این بررسی مشابهت نوکلئوتیدی قطعه مورد نظر (1359 bp) با توالی های F پروتئین ویروسهای نیوکاسل موجود در بانک ژن توسط نرم افزار Blast تعیین گردید. بیشترین مشابهت نوکلئوتیدی (۹۸٪) با سویه های Sterna/astr و Italy/3286/00 و کمترین تشابه نوکلئوتیدی (۹۳٪) با سویه های LZ CH-A7/96,Js-2/98 گزارش شد.

بحث

الف- اپتیمم کردن متغیرها در مراحل سیلیک RTPCR، بهینه سازی متغیرهای موجود در مراحل RTPCR، در تکثیر ژن دلخواه و کسب باند اختصاصی در الکتروفورز نقش اساسی ایفا می کند. در این پژوهش استفاده از مقادیر عددی متغیرها غیر از دمای اتصال پرایمر به رشته الگو براساس توسعه کیت one tube RTPCR صورت پذیرفت. دمای انتخابی اتصال پرایمر به رشته الگو در سیکل اول تکثیر ۶۲ °C و در سیکل دوم تکثیر ۵۰ °C می باشد. این تفاوت دمائی جهت اتصال پرایمر در مراحل سیکلیک RTPCR نقش مهمی در تشکیل باند اختصاصی دارا می باشد. (۶و۸ و۱۳و۱۷)

ب- مقادیر مواد مورد استفاده در مرحله لیگیشن جهت کارائی کلونینگ قطعه مورد نظر، تعیین مناسب و دقیق مقادیر مواد مورد استفاده در مرحله لیگیشن نقش بسزائی در کارائی کلونینگ قطعه دلخواه دارا می باشد.در این پژوهش با توجه با اندازه وکتور کلونینگ (2886 bp) مورد استفاده و اندازه نسبتاً بزرگ قطعه تکثیر شده (1359, bp) و همچنین نسبت غلظت مولار قطعه تکثیر شده به وکتور (Insert: Vector Ratio) مقادیر متفاوتی از مواد در مرحله لیگیشن در مقایسه با توصیه های کیت استفاده گردید.

مقادیر مورد استفاده در مرحله لیگیشن براساس توصیه کیت کلونینگ

1- Plasmid Vector 3µl
2- 4 قطعه PCR تخلیص شده
3- 10x buffer Legation 3 µl
4- PEG 4000 Solution 3 µl
5- deionizer water 29 µl
6- T4 DNA Ligase 5 u 1µ

مقادیر مواد موارد استفاده در مرحله لیگیشن در پژوهش انجام شده

1- Plasmid Vector 1.5 µl
2- 3 قطعهPCR تلخیص شده
3- 10 X Legation buffer 1.5 µl
4- de Ionized water 7 µl
5- PEG 4000 1.5 µl
6- T4 DNA Ligase 5 u 1.5µl

جهت ساخت وکتور کلونینگ، مولکول حلقوی پلاسمیدی توسط آنزیم ECO321 شکسته شده و بوسیله آنزیم داکسی نوکلئوتیدیل ترانفسراز انتهائی به انتهای ´۳ آن نوکلئوتید تیمیدینی اضافه شده است. از طرفی بواسطه حضور Taq DNA پلی مراز در RTPCR و ایجاد انتهای پلی A توسط آنزیم، هنگامی که محصول PCR وارد وکتور می گردد یک مولکول حلقوی با دو شکاف ایجاد می شود، یکی از مزایای مهم این روش این است که حضور باقیمانده تیمیدین در دو انتهای وکتور از دوباره حلقوی شدن وکتور در طول پروسه لیگیشن جلوگیری می کند و شانس حضور کلون های غیرنوترکیب کاهش می یابد. [۹ و۱۰ و۱۴ و۱۶] پژوهش های متعددی در این خصوص در ایران و سایر کشورهای

جهان صورت گرفته است. کلونینگ ژن پروتئین F ویروس نیوکاسل بصورت دو قطعه ۷۰۰ bp (A,B) و همچنین تکثیر و بیان توالی نوکلئوتیدی ناحیه HR1 قطعA، در وکتور بیان PET32a (+)، از مطالعاتی است که توسط بخش بیوتکنولوژی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی و دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفته است. [۳ و۲] کلونینگ و بیان ژن کد کننده پروتئین F و حمل آن توسط وکتورهای ویروسی (باکولو ویروس) و پلاسمیدی (DNA واکسن) جهت مقاصد واکسیناسیون، از دیگر پژوهش هایی است که در خارج از کشور انجام شده است (۱۵ و ۱۲ و ۷). در این تحقیق سعی بر این شد که توالی نوکلئوتیدی کد کننده پروتئین F سوش ایرانی(NR43) بصورت یک قطعه نسبتاً کامل جهت مطالعه و مقایسه توالی نوکلئوتیدی آن با سایر ایزوله ها کلون گردد. از طرفی بواسطه تفاوت های نوکلئوتیدی موجود در ژن پروتئین F ویروس های نیوکاسل جدا شده از مناطق مختلف جهان، تحقیق بر روی سوش ایرانی جهت مقاصد شناسایی ویروس واکسیناسیون از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. امید است پژوهش های بعدی در جهت بیان ژنی این قطعه کلون شده در میزبان یوکاریوتی (مخمر) انجام شود، تا بتوان با تولید پروتئین F در مقیاس فراوان گامی موثر جهت طراحی واکسن نوترکیب علیه بیماری نیوکاسل و همچنین تشخیص مولکولی ویروس بیماری، توسط تولید آنتی بادی مونوکلنال ضد پروتئین F، برداشت.

فهرست منابع

۱- تیرزاد، الف، ترجمه: ربانی، م، محزونیه، م، (۱۳۸۳) ایمنی شناسی دامپزشکی،، تهران، مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران.

۲- دهقانی، م(۱۳۸۳) ، کلونینگ و بیان، ناحیه HR1 از ژنوم پروتئین F ایزوله NR43 ایران درEcoli، پایان نامه کارشناسی ارشد«بیوتکنولوژی» ،دانشگاه تربیت مدرس.

۳- طهماسیان، الف. (۱۳۸۲) ، کلونینگ و تعیین توالی قطعات HR2, HR1 ژن پروتئین F ویروس نیوکاسل از ایزوله بومی ایران، پایان نامه کارشناسی ارشد «بیوتکنولوژی»، دانشگاه تربیت مدرس.

٤- فنر، اف.جی.گیس، ای.پی.، ترجمه: کیوانفر،ه. همت زاده، ف.،(۱۳۷۷) ، ویروس شناسی دامپزشکی، تهران، مرکز نشر دانشگاهی .

5-Alexander, D.J. (1991): Newcastle Disease and other avian Paramyxovivus Infection, 8th edition. Disease of poultry. Lowa State University Press, Ames, Lowa.

6-Deleeuw, O., B.Peeters., (1999): Complete Nucleotide Sequence of Newcastle Disease virus, J.Gen . Virol. 80:131-136.

7-Espion, D, C. Letellier, (1987): Expression at the cell surface of native fusion protein of the Newcastle disease virus strain Italian from clone CDNA, Archives of Virology, Vol. 95. PP. 79-95.

8-Eppendorf. Catalog of Master cycle gradient, Pp: 67-86.

9-Hanahan, D, J, (1983): Techniqes fortrans formation of E.coli, Journal of Molecular biology, Vol. 166, Pp: 557-580.

10-Krowczynska, AM. (1992): etal., Mulecularcloning, Biotechniques, Vol. 13, Pp:286-289.

11-Lelong, Portelle, Ghyslael. J, (1986): Monoclonal antibody to haemagglutinin. Neuraminidase and fusion glycoprotein of Newcastle disease virus, J. Virol, vol. 57, PP. 1198-1202.

12-Nakayx, Takaaklo. Cros, Jerme, (2001): Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector, Journal of Virology, Vol. 75. No. 23, PP, 11868-11873.

13-Nanthakumart, Kataria RS, (2000): Pathotyping of Newcastle disease virus by RTPCR and restriction enzyme and lysis, Veternity Research Common, 24.275-286.

14-Russel D., Sambrook J. (2001): Molecular cloning A Laboratory Manual, 3rd Edition, CPT 1, 5, 8, 12,15.

15-Romer-oberdo, A, E. Mundt, (1999): Generation of recombinant Lentogenic

Newcastle disease virus from CDNA, T.Gen. Virol, vol. 80, Pp: 2987-2995.
16-Sam brook, J. ritsch, E.F., (2001): Molecular cloning A Laboratory Manual, 3rd Edition, coldspring Harbor Laboratory Press.
17-SatoH, oh-hiram, (1987): Molecular cloning and nucleotide sequence of P.M.F gene of Newcastle disease virus virulent strain D 26, Virus Resarch. Pp: 1501-1507.
18-Wang L.F., Eaton B.T, (2001): Emerging paramyxovivus, the infectious disease Review-microbes of Man, Animal, and Environment, 3, Pp: 52-69.
19-White J.M, (1990): viral and cellular Membrane fusion Protein. Annual Review of Physiology, 52, Pp: 675-697.
20-Yin-Takeout, Ling-Ling and Ching–How ANG, (1999): Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of\ the Fgene of Newcastle Disease viruses Isolated from chicken and an owlinTaiwan j.Vet. Med. Sci, Vol.61, Pp: 1191-1195.