

معرفی آزمایش الیזای مبتنی بر پروتئین MBP-G1 به عنوان روش شناسایی گاو میش های آلوده به ویروس تب بی دوام گاوی

محمد تقی بیگی نصیری^۱، رضا پسندیده^{۲*}، مسعود رضا صیفی شاپور آبادی^۳
(تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۱)

چکیده

تب بی دوام گاوی (BEF) یک بیماری غیر واگیردار در گاو و گاو میش می باشد که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، استرالیا و افریقا پراکنده شده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی واکنش پذیری پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در باکتری *اشرشیاکلی* در یک آزمایش الیزای غیر مستقیم خانگی بود. به این منظور پس از کلونینگ ژن G1 از گلیکوپروتئین G ویروس تب بی دوام گاوی در ناقل pMalc2x و متعاقباً بیان پروتئین در سوبه Rosetta/*اشرشیاکلی*، پروتئین نو ترکیب MBP-G1 تولید شده به عنوان آنتی ژن پوشاننده کف پلیت در یک آزمایش الیزا استفاده شد. نتایج آزمایش الیزا نشان داد که این پروتئین نو ترکیب توانایی واکنش با سرم موش های ایمن شده با واکنش تجاری تب بی دوام گاوی و شناسایی آنتی بادی های ضد ویروس BEF را داشت. بنابراین می توان پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در *اشرشیاکلی* را به عنوان یک نامزد مناسب جهت طراحی کیت الیزا برای شناسایی گاو میش های آلوده به ویروس BEF معرفی نمود.

کلمات کلیدی: *اشرشیاکلی*، آزمایش الیزا، پروتئین نو ترکیب MBP-G1، گاو میش، ویروس تب بی دوام گاوی (BEFV)

۱- گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ملاتانی، ایران

۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* نویسنده مسئول: Rezapasandideh63@gmail.com

مقدمه

خوزستان، گلستان، مازندران، البرز و اردبیل دیده شده است.

تب بی دوام گاوی از بیماری‌های ویروسی نادری است که پاسخ درمانی به آن بسیار مناسب است. در صورتی که تشخیص آن در اوایل بیماری صورت گیرد، درمان بسیار موثرتر خواهد بود. آزمایش‌های سرولوژی شامل خنثی‌سازی ویروس (VN)^۱ و الایزای مهاری^۲ برای تشخیص تب بی دوام وجود دارند. آزمایش الایزای مهاری یک روش اختصاصی و سریع جهت تشخیص این بیماری از سایر ویروس‌هایی است که قرابت پادگنی با تب بی دوام دارند. بنابراین این نوع از روش الایزای، اهمیت خاصی به عنوان یک آزمایش مطلوب پاراکلینکی دارد. با توجه به اینکه تاکنون تلاشی در زمینه ساخت کیت تشخیصی الایزای برای بیماری تب بی دوام گاوی در ایران صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی واکنش‌پذیری پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در باکتری *شرشیاکلی* در یک آزمایش الایزای غیر مستقیم خانگی بود. در صورتی که خصوصیات آنتی‌ژنی این پروتئین در آزمایش الایزای مطلوب ارزیابی شود، می‌توان از آن در مطالعات آینده به منظور طراحی کیت الایزای برای شناسایی گاومیش‌های آلوده به این ویروس استفاده نمود.

ویروس تب بی دوام گاوی (BEFV) یک رابدوویروس منتقل شونده توسط بندپایان است که در جنس افموویروس‌ها طبقه‌بندی می‌شود. این ویروس موجب بروز تب حاد در گاو و گاومیش آبی می‌شود که تحت عنوان بیماری تب بی دوام گاوی (BEF) شناخته می‌شود. نام‌های محلی آن بیماری ۳ روزه، تب بومی گاوی، آنفولانزای گاوی و یا بیماری سفت و سخت می‌باشند (۶). ویروس BEF در طبیعت تنها از طریق نیش حشرات دور پرواز گسترش می‌یابد. مشابه دیگر رابدوویروس‌ها، ویرونی‌های BEF شبیه گلوله تفنگ یا مخروطی شکل می‌باشند. ژنوم این ویروس از نوع RNA تک رشته‌ای منفی با طول ۱۴۹۰۰ جفت باز است و پنج پروتئین L، G، N، P و M را کد می‌کند. پروتئین G یک گلیکوپروتئین سطحی است که دارای پنج جایگاه آنتی‌ژنیک (G1، G2، G3a، G3b، G4) در سطح خود می‌باشد. G1 یک جایگاه خنثی‌سازی خطی (Y⁴⁸⁷-K⁵⁰³) است که در انتهای دومین تراپمیزاسیون، دقیقاً قبل از ناحیه C-انتهایی پروتئین G قرار دارد (۵). اپیتوپ G1 تنها با آنتی‌بادی‌های ضد ویروس BEF واکنش می‌دهد در حالی که سایر جایگاه‌های آنتی‌ژنیک این پروتئین، واکنش‌های متقاطع با سایر ویروس‌های وابسته به این خانواده نشان می‌دهند (۴). تب بی دوام گاوی ممکن است از نظر بالینی آشکار نباشد یا منجر به علائم بالینی خفیف تا شدید از جمله تب دو فازی، ترشح بزاق، چشم و ترشحات بینی، گرفتگی عضلانی، لنگش و بی‌اشتهایی شود. طبق گزارش‌های سازمان دامپزشکی ایران، این بیماری تاکنون در دامداری‌های واقع در سطح استان‌های تهران، فارس، ایلام، قم، خراسان شمالی، یزد،

¹. Virus neutralisation

². Blocking ELISA

مواد و روش ها

بیان پروتئین همجوش MBP-G1 در باکتری اشرشیاکلی

در مطالعه قبل، توالی کد کننده ژن G1 از ویروس تب بی دوام گاوی درون ناقل بیانی پروکاریوتی pMalc2x تحت کنترل پروموتور قوی *lac* کلون و در سویه Rosetta از باکتری اشرشیاکلی بیان شد (۲). به طور خلاصه، یک سازه نوترکیب حاوی ژن گلیکوپروتئین G (pTZ57R/T-G)، طراحی شده در مطالعه گذشته (۱)، به عنوان الگو برای تکثیر ناحیه کدکننده اپیتوپ G1 توسط PCR استفاده شد. تکثیر با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت دارای جایگاه‌های برشی برای آنزیم‌های به ترتیب *EcoRI* و *SalI* صورت گرفت. پس از انجام هضم آنزیمی برای محصول PCR و پلاسمید pMalc2x، واکنش اتصال و در ادامه انتقال توسط روش شوک حرارتی به سویه DH5 α از اشرشیاکلی صورت گرفت. پس از تایید صحت کلونینگ، سازه نوترکیب به سویه Rosetta/اشرشیاکلی منتقل و سپس بیان پروتئین با افزودن IPTG ۰/۱ مولار به محیط کشت حاوی کلونی باکتری و انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷°C القا شد. پروتئین بیان شده با استفاده از روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت.

خالص سازی پروتئین همجوش MBP-G1

ناقل pMalc2x در بخش N-انتهایی ژن بیان شده، پروتئینی را به نام پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP)^۱ بیان می‌کند. در این ناقل با

استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، MBP برای اتصال محکم‌تر به آمیلوز بهینه شده است. بنابراین خالص‌سازی پروتئین همجوش MBP-G1 با استفاده از یک ستون رزین آمیلوز انجام گرفت. به این منظور پس از بیان پروتئین، رسوب باکتریایی در بافر ستون (شامل TrisHCl ۲۰ میلی مولار، NaCl ۲۰۰ میلی مولار، EDTA ۱ میلی مولار و ۷۰۰ میکرولیتر از بتا-مرکاپتوتانول) مخلوط شد. سپس به منظور آزادسازی پروتئین‌های باکتریایی داخل سلولی، این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه سونیکه شد. این مخلوط با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی به نسبت ۱ به ۶ با بافر ستون مخلوط و از ستون رزین آمیلوز عبور داده شد. سپس پروتئین همجوش MBP-G1 با استفاده از بافر ستون حاوی مالتوز ۱۰ میلی مولار از رزین آمیلوز جداسازی شد. در نهایت، نتیجه خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از روش SDS-PAGE^{*} بررسی شد.

ایمن‌سازی موش‌ها توسط واکسن تجاری

تب بی دوام گاوی

به منظور ایمن‌سازی موش‌ها جهت به دست آوردن سرم آن‌ها به عنوان آنتی‌بادی ضد ویروس BEF، ۲۰۰ میکرولیتر از واکسن غیرفعال شده تب بی دوام گاوی (KYOTO BIKEN، ژاپن) به ناحیه پشت پا و شکم دو سر موش ماده نژاد Balb/c با سن ۶ هفته تزریق شد. تزریق سه مرتبه با فواصل زمانی دو هفته تکرار شد. یک هفته پس از ایمن‌سازی سوم، از حیوانات خون گرفته شد و سرم آن‌ها به عنوان آنتی‌بادی ضد ویروس BEF در آزمایش الیزای غیر مستقیم خانگی استفاده شد.

^۱. Maltose-binding protein

ارزیابی واکنش‌پذیری پروتئین نوترکیب MBP-G1 در آزمایش الایزای غیر مستقیم خانگی

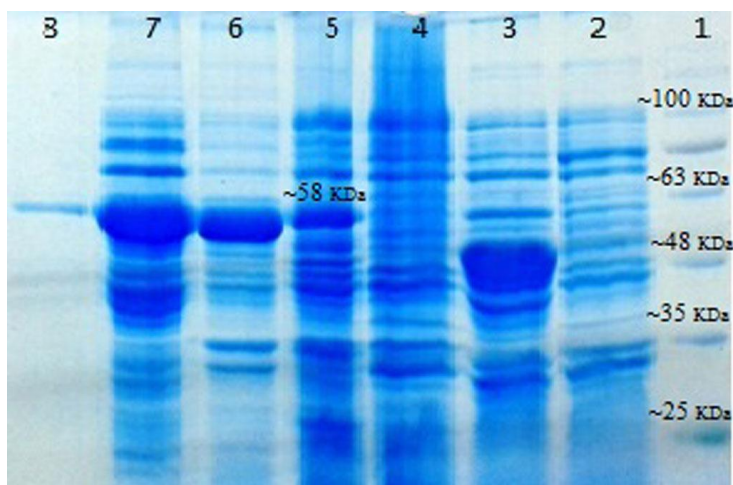
در اولین مرحله برای انجام این آزمایش، پلیت الایزا با پروتئین MBP-G1 نوترکیب پوشش‌دهی شد. به این منظور پروتئین نوترکیب با غلظت ۰/۱ میکروگرم آنتی‌ژن در هر ۵۰ میکرولیتر بافر پوشاننده رقیق شد. سپس در هر حفره پلیت الایزا، ۵۰ میکرولیتر از این مخلوط اضافه گردید. همزمان به عنوان شاهد آنتی‌ژن، بافر پوشاننده فاقد پروتئین نیز در تعدادی حفره به تعداد سرم مورد آزمایش پوشش‌دهی شد. سپس پلیت داخل یک ظرف مرطوب به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون در یخچال، محتویات پلیت کاملاً تخلیه و سه مرتبه با محلول PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBST) شستشو شد (۳۰۰ میکرولیتر به ازای هر حفره). در مرحله بعد به منظور پوشاندن سطوحی از کف حفرات که با آنتی‌ژن پوشانده نشده بودند، پلیت با محلول شیرخشک ۵ درصد تهیه شده در PBST به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بلوک شد (۳۰۰ میکرولیتر به ازای هر حفره). پس از

سه مرتبه شستشو مانند مرحله قبل، سرم موش‌های تلقیح شده با واکسن تجاری BEF و نیز سرم موش منفی در رقت‌های ۱/۵۰ تا ۱/۴۰۰ در PBST حاوی ۵ درصد شیرخشک، به حفرات اضافه شدند (۵۰ میکرولیتر به ازای هر حفره). پس از افزودن سرم‌ها، پلیت به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس محتویات پلیت تخلیه شد و حفرات سه مرتبه توسط PBST مانند دفعات قبل، شستشو گردید. در مرحله بعد کونژوگه پراکسیداز ضد IgG موش به نسبت ۱/۳۰۰۰ در PBST حاوی ۵ درصد شیرخشک رقیق و به حفرات اضافه شد (۵۰ میکرولیتر به ازای هر حفره). پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، محتویات پلیت تخلیه و حفرات مانند قبل شستشو شدند. سپس محلول کروموژن - سوبسترا (تترامیتیل بنزیدین + استات سدیم + آب اکسیژنه) به میزان ۵۰ میکرولیتر به تمام حفرات اضافه و ده دقیقه در تاریکی، در دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول اسید کلریدریک ۱ مولار (محلول توقف) متوقف شد. در پایان، پلیت با استفاده از دستگاه خوانش الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد.

بیان و خالص سازی پروتئین نو ترکیب MBP-G1

بیان پروتئین G1 با استفاده از PAGE SDS- مورد بررسی قرار گرفت. نتایج الکتروفورز روی ژل اکریلامید نشان داد که باکتری حاوی سازه نو ترکیب مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG، حاوی یک پروتئین جدید در محدوده ۵۸ کیلو دالتون بود که با وزن مولکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی (با احتساب وزن مولکولی تقریبی ۱۶ کیلو دالتون برای پروتئین حاصل از ناحیه کلون شده ژن G1 و ۴۲ کیلو دالتون برای پروتئین MBP کد شده توسط پلاسمید) تقریباً همخوانی داشت (تصویر ۱). بررسی حلالیت پروتئین بیانی نشان داد که این پروتئین به میزان بیشتری در فاز مایع قرار داشت و در نتیجه

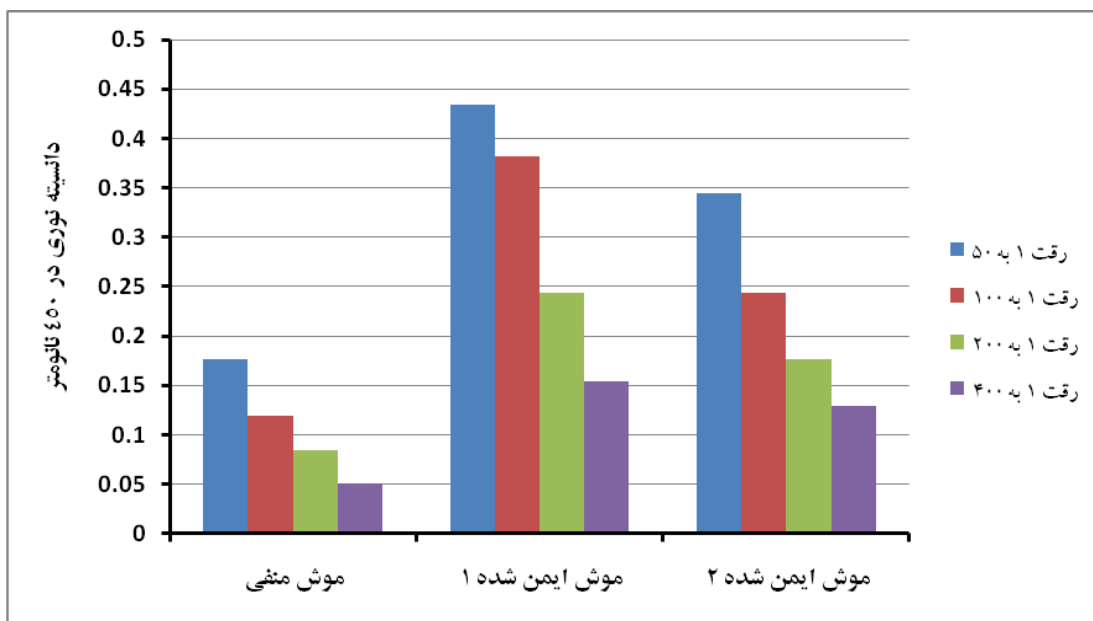
محلول و به سهولت قابل خالص سازی بود (تصویر ۱). پلاسمید pMalc2x استفاده شده در این تحقیق دارای پروموتور قوی *lac* است که موجب بیان موثر و بیشتر پروتئین در مقایسه با بسیاری از پلاسمیدهای بیانی پروکاریوتی می شود. مزیت دیگر استفاده از پلاسمید pMalc2x این است که MBP امکان خالص سازی پروتئین بیانی را با استفاده از رزین آمیلوز به نحو مطلوب فراهم می کند. رزین آمیلوز نسبت به سایر رزین های مورد استفاده برای خالص سازی پروتئین های بیانی در /شرشیاکلی، قیمت ارزان تری داشته و با جذب پروتئین های دارای دنباله MBP به خوبی و با بازده بالا موجب خالص سازی این پروتئین ها می شود (۳).



تصویر ۱- القای بیان پروتئین در باکتری حاوی سازه نو ترکیب pMALc2x-G1. ستون ۱: مارکر پروتئینی (سیناژن)؛ ستون های ۲ و ۳: به ترتیب باکتری حاوی پلاسمید pMALc2x قبل و بعد از بیان؛ ستون های ۴ و ۵: به ترتیب باکتری حاوی سازه نو ترکیب pMALc2x-G1 قبل و بعد از بیان؛ ستون های ۶ و ۷: به ترتیب رسوب و مایع رویی باکتری بیان کننده پروتئین MBP-G1 پس از سونیکاسیون و ستون ۸: پروتئین خالص MBP-G1.

است. همان طور که از نمودار ۱ مشخص است دانسیته نوری مربوط به سرم موش‌های ایمن شده با واکسن در مقایسه با سرم موش منفی افزایش قابل توجهی داشت. نتایج آزمایش الیزا نشان داد که پروتئین نوترکيب MBP-G1 توانایی واکنش با سرم موش‌های ایمن شده با واکسن تجاری تب بی‌دوام گاوی و شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس BEF را داشت. بنابراین می‌توان پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در /شرشیاکلی را به عنوان یک نامزد مناسب جهت طراحی کیت الیزا برای شناسایی گاومیش‌های آلوده به ویروس BEF معرفی نمود.

واکنش‌پذیری پروتئین نوترکيب MBP-G1 در آزمایش الیزای غیر مستقیم خانگی
به منظور بررسی واکنش‌پذیری پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در باکتری /شرشیاکلی از یک آزمایش الیزای غیر مستقیم خانگی استفاده شد. در این آزمایش از پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده کف پلیت و از سرم موش‌های ایمن شده با واکسن تجاری BEF به عنوان آنتی‌بادی اولیه در رقت‌های ۱ به ۵۰ تا ۱ به ۴۰۰ استفاده شد. نتایج آزمایش الیزا و دانسیته نوری موش‌های ایمن شده با واکسن و موش منفی در نمودار ۱ نشان داده شده



نمودار ۱- دانسیته نوری مربوط به سرم موش‌های ایمن شده با واکسن تجاری BEF در مقایسه با سرم موش منفی در آزمایش الیزا. در این آزمایش از پروتئین نوترکيب MBP-G1 به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده کف پلیت و از سرم موش‌ها در چهار رقت ۱ به ۵۰ تا ۱ به ۴۰۰ استفاده شد.

بحث

کیلو دالتون کاهش یافت. وزن مولکولی مورد انتظار برای پروتئین G1 حدود ۱۶ کیلو دالتون است ولی با توجه به اینکه توالی این ژن شامل سه جایگاه بالقوه برای گلیکوزیلاسیون می باشد (۴)، قطعاً می توان نتیجه گیری نمود که پروتئین G1 یک گلیکوپروتئین است. پروتئین G1 نو ترکیب بیان شده در مخمر پیکیا پاستوریس به عنوان آنتی ژن پوششی برای تولید کیت الایزای غیرمستقیم برای تشخیص ویروس BEF با موفقیت مورد استفاده قرار گرفت (۷).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین نو ترکیب MBP-G1 بیان شده در شرشیاکلی توانایی واکنش با سرم موش های ایمن شده با واکسن تجاری تب بی دوام گاوی و شناسایی آنتی بادی های ضد ویروس BEF را داشت. بنابراین می توان این پروتئین نو ترکیب را به عنوان یک نامزد مناسب جهت طراحی کیت الایزا برای شناسایی گاو میش های آلوده به ویروس BEF در مطالعات آینده معرفی نمود.

تاکنون دو مطالعه در زمینه کلونینگ و بیان ژن G1 به منظور طراحی کیت تشخیصی الایزا برای ویروس BEF صورت گرفته است. در تحقیقی، ژن G1 از ویروس BEF درون ناقل بیانی pGEX-4T-1 کلون و در سویه (DH3) BL21 از شرشیاکلی بیان شد (۹). 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. این محققان با موفقیت توانستند از این پروتئین نو ترکیب جهت طراحی کیت تشخیصی الایزا برای شناسایی آنتی بادی های ضد ویروس BEF استفاده کنند (۱۰). در مطالعه دیگر، ژن اپیتوپ G1 از ویروس BEF درون ناقل بیانی pPIC9K کلون و در مخمر پیکیا پاستوریس GS115 بیان گردید (۸). این محققان نشان دادند که پروتئینی با وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون بدست آمد که بسیار بزرگتر از اندازه پیش بینی شده بود. اما پس از دگلیکوزیلاسیون توسط آنزیم *Endo H* وزن مولکولی پروتئین به ۱۶

منابع

- (۱) پسندیده، ر.، بیگی نصیری، م. ت. صیفی آباد شاپوری، م. ر. فیاضی، ج. روشنفر، ه و لطفی، م. ۱۳۹۵. همسانه‌سازی مولکولی و تعیین توالی ژن گلیکوپروتئین G و ویروس تب بی‌دوام گاوی در اشرشیاکلی. مجله پژوهش‌های علوم دامی ایران. جلد ۸، شماره ۳، ص: ۱۰-۱.
- 2) Beygi Nassiri, MT., Pasandideh, R and Seyfi Abad Shapouri, MR. 2016. Cloning and Expression of the G1 Epitope of Bovine Ephemeral Fever Virus G Glycoprotein in *Escherichia Coli*. G3M. 14: 4250-4255.
 - 3) Fox, JD., Routzahn, KM. Bucher, MH and Waugh, DS. 2003. Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. FEBS Letters. 537:53-57.
 - 4) Jin, H., Li, Y. Yu, K. Yan, J and Liu, B. 2000. Nucleotide sequence of G protein gene of bovine ephemeral fever rhabdovirus JB76H strain. Chin. J. Prev. Vet. Med. 22: 43-47.
 - 5) Trinidad, L., Blasdel, KR. Joubert, DA. Davis, SS. Melville, L. Kirkland, PD. Coulibaly, F. Holmes, EC and Walker, PJ. 2014. Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian epizootic. J. Virol. 88: 1525-1535.
 - 6) Walker, PJ and Klement, E. 2015. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. Vet Res. 46: 1-17.
 - 7) Zheng, FY., Lin, GZ. Qiu, CQ. Zhou, JZ. Cao, XA and Gong, XW. 2010. Serological detection of bovine ephemeral fever virus using an indirect ELISA based on antigenic site G 1 expressed in *Pichia pastoris*. Vet. J. 185:211-15.
 - 8) Zheng, FY., Lin, GZ. Qiu, CQ. Yuan, KZ and Song, JY. 2007a. Expression and antigenic characterization of the epitope-G1 of the Bovine ephemeral fever virus glycoprotein in *Pichia pastoris*. Virol. Sin. 22:347-352.
 - 9) Zheng, F.; Lin, G and Qiu, C. 2007b. Expression, purification and antigenic characterization of the Epitope-G1 gene of bovine ephemeral fever virus in *Escherichia coli*. Acta Microbiol. Sin. 47: 498-502.
 - 10) Zheng, Fy.; Lin, Gz. Qiu, Cq. Zhou, Jz. Cao, Xa and Gong, Xw. 2009. Development and application of G1-ELISA for detection of antibodies against bovine ephemeral fever virus. Res. Vet. Sci. 87: 211-212.