Journal of Microbial World
Volume 15, No. 3, December 2022

Original Article

Cloning and expression of H gene of PPRV in baculovirus expression system

Mehdi Taheri Asl[1], Majid Moghbeli[2], Mohammad Kargar[3], Mohsen Lotfi[4], Farshid Kafilzadeh[3]

[1]Ph.D student, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. [3]Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [4]Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Small ruminant plague is one of the most economically important pathogens in sheep and goats caused by morbilli viruses. Protein H is one of the major proteins for immunity against PPRV. The aim of the present study was to clone and express the H gene of this virus by the baculovirus expression system.

Materials and Methods: H gene was amplified by RT-PCR and specific primers and then cloned into pFastBac Dual plasmid. The recombinant vector with the gene was transferred to the DH10Bac host cell. By transfection Sf9 cell with recombinant vector, its expression and characteristics were evaluated by SDS-PAGE, western blotting and Bradford methods.

Results: The H gene was amplified using specific primers from the PPR virus genome and the specific band was obtained. Cloning of the H gene on the pFastBac Dual vector and baculovirus genome was proved with PCR and enzymatic digestion. By transfection the recombinant vector into Sf9 cells and performing sequential passages, the recombinant protein was shown to be completely pure and specific using SDS-PAGE, Western blotting and Bradford methods. The expression level of this gene was obtained 218 µg/ml.

Conclusion: Considering the production of an appropriate amount of recombinant H protein, this protein can be a suitable candidate for the production of recombinant vaccine against PPRV.

Keywords: Peste des petits ruminants, Sf9 Cell, Recombinant.

Received: 13 July 2022 Revised: 11 September 2022 Accepted: 5 November 2022

Correspondence to: Majid Moghbeli
Tel: +98 9122218612
E-mail: moghbeli552@gmail.com

Journal of Microbial World 2022, 15(3): 183-191
DOI:10.30495/jmw.2022.1934002.1985

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره سوم (پیاپی ۵۲) پاییز ۱۴۰۱
صفحات ۱۹۱-۱۸۳

Original Article

کلون کردن و بیان ژن H ویروس PPR در سیستم بیانی باکولوویروس

مهدی طاهری اصل[۱]، مجید مقبلی [۲*]، محمد کارگر[۳]، محسن لطفی[۴]، فرشید کفیل زاده[۳]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. [۲]استادیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، دامغان، ایران. [۳]استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. [۴]دانشیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا از نظر اقتصادی در گوسفند و بز است که بوسیله موربیلی ویروس‌ها ایجاد می‌شود. پروتین H یکی از پروتین‌های اصلی ایجاد ایمنی بر علیه PPRV است. هدف از پژوهش حاضر کلون و بیان ژن H این ویروس بوسیله سیستم بیانی باکولو ویروس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ژنH با روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی، تکثیر و در پلاسمید pFastBac Dual کلون شد. سپس بکمید نوترکیب واجد ژن فوق در سلول میزبان DH10Bac تولید شد. با ترانسفکت کردن سلول Sf9 با بکمید نوترکیب، میزان بیان و خصوصیات آن با روش‌های SDS-PAGE، western blotting و بردفورد بررسی گردید.

یافته‌ها: ژن H با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از روی ژنوم ویروس PPR به درستی تکثیر و باند اختصاصی بدست آمد و بعد از انتقال بر روی وکتور pFastBac Dual و سپس بر روی ژنوم باکولو ویروس، صحت کار با استفاده از PCR و هضم آنزیمی اثبات شد. با ترانسفکت کردن بکمید نوترکیب در سلول‌های Sf9 و انجام پاساژهای متوالی، با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات نشان داده شد که پروتین نوترکیب حاصل، کاملا خالص و اختصاصی می‌باشد. میزان بیان این ژن ۲۱۸ µg/ml بدست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به تولید میزان مناسبی از پروتین نوترکیب H، این پروتین می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید واکسن نوترکیب بر علیه PPRV باشد.

واژگان کلیدی: طاعون نشخوار کنندگان کوچک، سلول Sf9، نوترکیب.

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۴/۲۲ ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۶/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۸/۱۴

مقدمه

ویروس طاعون نشخوارکنندگان (PPR)، ویروسی بسیار مسری در نشخوارکنندگان کوچک بوده که باعث مرگ سالانه میلیون‌ها گوسفند و بز می‌شود (۱). این بیماری یک تهدید همیشگی برای اقتصاد کشور و معیشت کشاورزان در بسیاری از کشورهای آفریقا، خاورمیانه و آسیا می‌باشد و توسط ویروس peste-des-petits-ruminants از خانواده Paramyxoviridae ایجاد می‌شود (۲). از مهم‌ترین واکسن‌های موجود بر علیه PPR، همولوگ PPR یعنی Nigeria 75/1 می‌باشد (۳). حساسیت حرارتی این ویروس، ایمنی موقت و جهش‌های ثانویه، که ممکن است منجر به ایجاد انواع جدید ویروس شود، از جمله معایب این نوع واکسن‌ها بوده و ضرورت تولید واکسن‌های جدید را افزایش داده است. پارامیکسوویروس‌ها دارای گلیکوپروتین‌های غشایی ایمنی‌زا هماگلوتینین H

*) آدرس برای مکاتبه: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد دامغان، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۲۲۱۸۶۱۲ پست الکترونیک: moghbeli552@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

می‌باشند که گزینه بسیار مناسبی در تولید واکسن‌های زیر واحدی است. ویروس توسط پروتین H به غشاء سلول میزبان میچسبد؛ سپس توسط پروتین F به غشاء سلول ملحق شده و باعث ورود ژنوم ویروس به سیتوپلاسم سلول می‌شود (٤).

سیستم بیانی باکولوویروس (BEVS) یک سیستم بیانی مطمئن برای ابراز ژن‌های یوکاریوتی و ویروس‌ها می‌باشد. غالبا پروتین‌های نوترکیبی که درسیستم‌های باکتریایی بیان می‌شوند نا محلول، متراکم بوده و دارای Folding ناصحیح هستند ولی پروتین‌های بیان شده در سیستم بیانی باکیولوویروس در بیشتر موارد محلول بوده و از لحاظ عملکرد فعال هستند. همچنین این سیستم دارای سطح بیان بالایی می‌باشد (۵). ازاین‌رو هدف از این مطالعه کلون و بیان پروتین H ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک درسیستم باکلوویروس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه ویروس PPR: ویروس PPR به صورت واکسن غیر فعال از موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد. استخراج RNA ژنومی از ویروس با استفاده از کیت استخراج RNA (Intron, Korea) انجام و غلظت و خلوص RNA تخلیص شده با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی گردید.

ب) سنتز cDNA: با استفاده از سکانس ژنی Nigeria 75/1 موجود در بانک ژن NCBI، (Accession Number: Z37017) پرایمرهای اختصاصی ژن H با جایگاه‌های آنزیمی BamHI و XbaI طراحی شد (جدول۱).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای جداسازی و تکثیر ژن‌های H.

Name	Primer	Tm	bp
HPPR	F:CCATGGATGTCCGCACAAAGGGAAAG R:GGTACCTCAGACTGGATTACATGTTACCTC	66	1833

واکنش RT- PCR برای سنتز cDNA با استفاده از کیت ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen™, USA) و پرایمر Reverse با استفاده از برنامه دمایی شامل ٦٠ دقیقه در ٤٢°C برای فعالیت Reverse transcription، ٥ دقیقه در ٣٧°C برای تکمیل دوره سنتز، ٥ دقیقه در ٧٠°C به منظور غیر فعال کردن آنزیم و در انتها ١٥ دقیقه در ٤°C انجام شد.

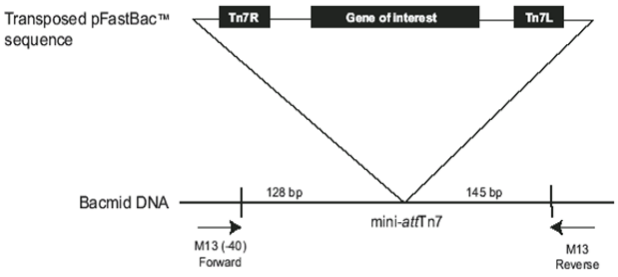
ج) تکثیر ژن H: به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر ژن H از مستر میکس Exprime (2X) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ١٢/٥ میکرولیتر مسترمیکس، ١ میکرولیتر (١٠ پیکومول) از پرایمرهای فوروارد و ریورس و محصول cDNA به میزان ١ میکرولیتر (تقریباً ١٠٠ ng/µl) در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر بود. برنامه دمایی شامل ٩٥ °C به مدت ٣ دقیقه برای یک سیکل، ٩٥ °C به مدت ٣٠ ثانیه، ٦٤ °C به مدت ٣٠ ثانیه و ٧٢ °C به مدت ١ دقیقه و ٣٠ ثانیه و برای ٣٢ سیکل و در انتها ٧٢ °C به مدت ٥ دقیقه و برای یک سیکل می‌باشد. نتایج بر روی ژل آگارز ١ ٪ الکتروفورز بررسی شد.

د) آماده سازی ژن H و وکتور pFastBacDual: به منظور ایجاد انتهای چسبنده، ژن H و وکتور pFastbacDual از دو آنزیم *Nco*I و *Kpn*I مطابق دستورالعمل آنزیم ThermoFisher Scientific استفاده شد. مخلوط واکنش اتصال قطعه ژنی به وکتور pFastbacDual، شامل ٢ میکرولیتر وکتور pFastBacDual، ٥ میکرولیتر از ژن H، ١ میکرولیتر آنزیم لیگاز T4 DNA شرکت Geneon Germany، ١ میکرولیتر بافر لایگشن ١٠X و ١ میکرولیتر PEG4000 در حجم کلی ١٠ میکرولیتر بود. مخلوط واکنش به مدت ٦٠ دقیقه در ٢٢ درجه سلسیوس قرار گرفت. غیرفعال سازی آنزیم در دمای ٦٠ درجه سلسیوس به مدت ١٠ دقیقه انجام شد.

سلول مستعد باکتری *E.coli* DH5α به روش cacl2 تهیه و ٥ میکرولیتر از محصول لایگیشن به روش استاندارد شوک حرارتی به ناقل باکتریایی DH5α ترانسفورم شد. کلنی‌های بدست آمده بر روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین از لحاظ وجود پلاسمید حاوی ژن H مورد بررسی قرارگرفتند.

د) ساخت بکمید نوترکیب: به منظور ساخت بکمید نوترکیب از سویه خاصی از *E. coli* به نام DH10 Bac استفاده شد (شکل ١). پلاسمیدهای نوترکیب pfastH با استفاده از روش استاندارد شوک حرارتی به سلول مستعد *E. coli* DH10Bac منتقل گردید (١٠). سپس سلول‌های نوترکیب در

محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۵۰µg/ml، تتراسایکلین با غلظت ۱۰µg/ml و جنتامایسین با غلظت ۷µg/ml که ژن مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب در بکمید، پلاسمید کمکی و pFastbacDual وجود داشت، کشت داده شدند. استفاده از پرایمرها اختصاصی forward primer,5′-CCCAGTCAC GAC GTT GTA AAA CG-3′ و reverse primer, 5′-AGCGGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3′ و آنزیم DreamTaq DNA Polymerase در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور تائید بکمید نوترکیب استفاده شد. برنامه دمایی شامل ۹٤ °C به مدت ٤ دقیقه برای یک سیکل، ۹٤ °C به مدت ٤٥ ثانیه، ٥٥ °C به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ٥ دقیقه و برای ۳٥ سیکل و در انتها ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه و برای یک سیکل تنظیم شد.



شکل ۱ : طرح کلی محل ورود ژن در بکمید.

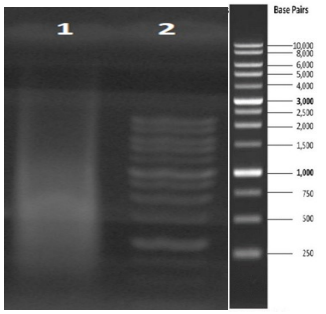
ه) تلقیح پروتین نوترکیب به سلول حشره: سلول حشرات Sf9 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. در این فرآیند $10^6 \times 800$ سلول جوان در فاز لگاریتمی در پلیت کشت ٦ خانه‌ای در محیط کشت گریس حاوی ۱۰٪ FBS ، و ۱٪ آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین پاساژ داده و در دمای ۳۷ سلسیوس نگهداری شد. برای تشکیل کمپلکس، ۸ میکرولیتر سلفکتین و ۱ میکروگرم DNA بکمید نوترکیب Bac-PPRH، که هر کدام به طور جداگانه در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلول حشره گریس بدون مکمل و بدون آنتی‌بیوتیک و سرم رقیق شده بودند، بایکدیگر تلفیق شدند. مخلوط، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری شد. مخلوط ترانسفکشن قطره قطره به سلول اضافه و سلول‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ٥ ساعت نگهداری شدند سپس مخلوط ترانسفکشن حذف و پس از شستشو، به سلول ۲ میلی لیتر محیط کشت کامل حاوی ۱۰٪ FBS اضافه و سلول‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار داده و به مدت ٥ روز مورد بررسی قرار گرفت. شش پاساژ متوالی نیز بر روی سلول‌های Sf9 انجام شد. محلول رویی از نظر وجود پروتین بوسیله SDS-PAGE به روش ناپیوسته و با استفاده از روش‌های استاندارد بررسی گردید (۱۱).

و) بررسی پروتین با وسترن بلاتینگ: ابتدا نمونه ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ الکتروفورز شد. سپس از روی ژل با استفاده از روش نیمه خشک (*semi-dry*) با دستگاه (Bio Rad, USA) بر روی غشاء نیتروسلولزی انتقال یافت. از سرم موش ایمن شده با واکسن PPR به عنوان آنتی‌بادی استفاده شد. فرایند بلاکینگ با قرار دادن با قرار دادن غشاء در ml ۵۰ بافر PBS دارای ۲٪ Skim- Milk و ۰/۰۵٪ Tween به مدت دو ساعت انجام شد. برای اتصال آنتی‌بادی به باندهای پروتین، µl ۱۰۰ از رقت ۱/۳۲ سرم موشی به غشاء اضافه گردید. فرایند شستشو غشاء با بافر PBS دارای ۰/۰۵٪ Tweenانجام شد. سپس غشاء به درون ۱۵ml بافر PBS دارای۵/۷ µl آنتی آنتی‌بادی موشی کونژوگه با آلکالین فسفاتاز(AP) انتقال داده و مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه به آرامی هم زده شد تا فرایند کونژوگیشن کامل گردد. با انتقال غشاء به مکان تاریک باندها ظاهر شد.

غلظت پروتین با استفاده از روش بردفورد محاسبه و نمودار استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی رسم شد. به ۰/۱ml نمونه ۲/۵ml معرف اضافه و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب نمونه در طول موج ۵۹۵nm خوانده و سپس با استفاده از منحنی استاندارد و فرمول زیر نمودار، مقدار پروتین در نمونه محاسبه گردید.

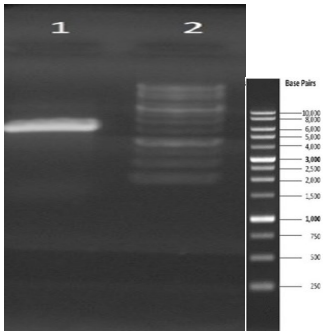
یافته‌ها

در انجام واکنش RT-PCR به منظور سنتز cDNA باند تک و شارپ بدست نیامده و به‌صورت اسمیر مشخص شده است که با توجه به استفاده از فقط پرایمر ریورس انتظار چنین نتیجه‌ای بود (شکل۲).



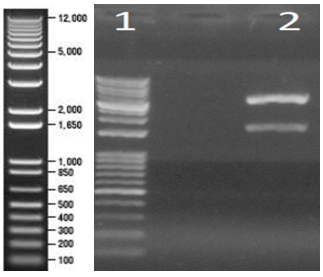
شکل ۲: الکتروفورز نمونه‌های سنتز cDNA. ۱: cDNA سنتز شده با استفاده از پرایمر ژن H، ۲: 1kb ladder.

محصول واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن H، یک باند اختصاصی حدود ۱۸۰۰ bp بود که نشان دهنده اختصاصی بودن واکنش PCR و محصول آن می‌باشد (شکل۳).



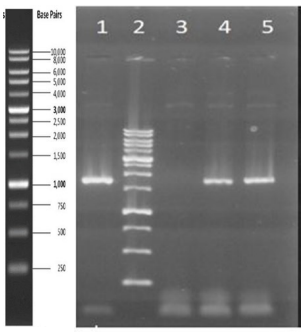
شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز. ۱: محصول PCR ژن H با اندازه ۱۸۰۰ bp ۲: 1kb ladder.

بعد از انجام واکنش اتصال بین ژن H و وکتور pFastBacDual و انتقال آن به *E. coli*، تعداد زیادی کلنی سفید و آبی به‌دست آمد. وجود ژن بر روی وکتور با جداسازی پلاسمید از کلنی‌های سفید و هضم آنزیمی اثبات شد (شکل ٤). ۲ وکتور حامل ژن،pfastH1 و pfastH2 نامگذاری شدند. بر اساس طراحی انجام شده ژن H در جلوی پروموتر P10 قرار می گیرد.

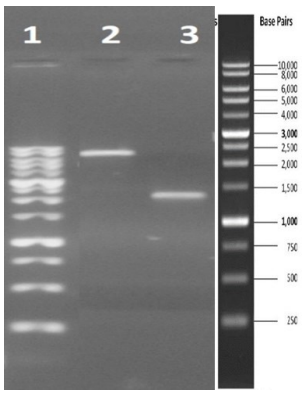


شکل ٤: الکتروفورز نمونه وکتور pFastBacTM Dual هضم شده با دو آنزیم. ۱: 1kb plus ladder، ۲: وکتور هضم شده با دو آنزیم.

به منظور بررسی وجود ژن بر روی بکمید نوترکیب از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن H بطور جداگانه استفاده شد و همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد، بکمید نوترکیب واجد ژن H می‌باشد. برای تایید کامل از پرایمرهای عمومی M13 نیز استفاده گردید. در صورتیکه بر روی بکمید ژن H وجود داشته باشد محصول PCR با اندازه باند ٤۳۰۰ bp حاصل می‌شود و اگر هیچکدام از ژن‌ها نباشند (کنترل منفی) باند ۲۵۰۰ bp ایجاد می‌شود. همانطور که در تصویر ۷ مشخص شد، بکمید نوترکیب دارای ژن H می‌باشد.



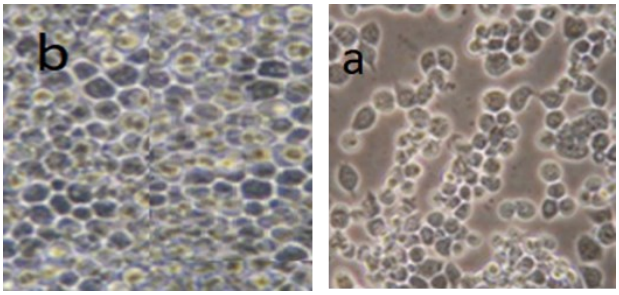
شکل ۵: الکتروفورز محصول PCR بکمیدهای نوترکیب. ۱، ٤ و ۵: محصول PCR ژن H. بکمیدهای نوترکیب، ۲: 1kb ladder، ۳ بکمید بدون ژن.



شکل ٦: الکتروفورز محصول PCR بکمید نوترکیب و کنترل منفی. ۱: 1kb ladder، ۲: محصول PCR بکمید نوترکیب با پرایمرهای عمومی M13، ۳: محصول PCR بکمید کنترل منفی با پرایمرهای عمومی M13.

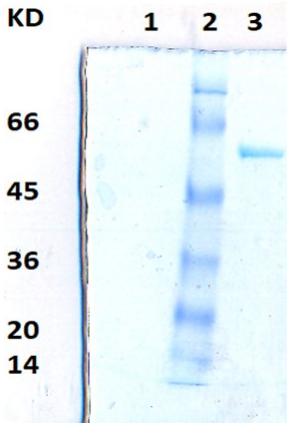
ترانسفکت بکمید نوترکیب به داخل سلول‌های حشره Sf9 و پاساژهای متوالی و مشاهده و عکس‌برداری از سلول‌ها و مقایسه با سلول‌هایی که ترانسفکت نشده بودند نشان داد بکمیدهای نوترکیب کاملا در سلول‌های Sf9 تکثیر و باعث

ایجاد اثرات سایتوپاتیک (CPE) در سلول‌های Sf9 شده است (شکل۷).



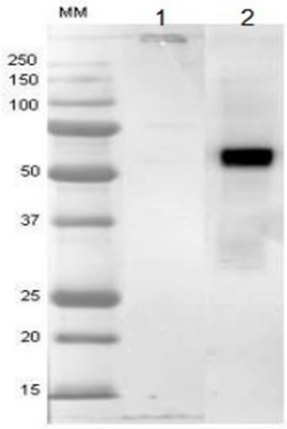
شکل ۷: تصویر میکروسکپی از سلول‌های sf9 آلوده (a) و آلوده نشده (b). در سلول‌های sf9 آلوده شده با ویروس نوترکیب تقسیم سلولی و بزرگ شدن متوقف شده است.

در بررسی محلول رویی سلول‌های Sf9 دارای CPE به‌وسیله SDS-PAGE، وجود یک باند در محدوده ۶۲ kD مشاهده شد. از آنجایی که وزن پروتین H حدود ۶۵ کیلو دالتون است لذا حضور این باند نشان دهنده وجود پروتین H در محیط کشت سلول Sf9 حاوی وکتور نوترکیب می‌باشد (شکل۸).



شکل ۸: بررسی پروتین‌های نوترکیب بر روی SDS-PAGE. ۱: محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده با بکمید بدون ژن، ۲: لدر ، ۳: محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده با بکمید نوترکیب.

غلظت پروتین با استفاده از روش بردفورد ۲۱۸ µg/ml برآورد گردید. در بررسی پروتین نوترکیب با استفاده از وسترن بلات، باند اصلی حدود ۶۳ kD در نمونه محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده با بکمید نوترکیب کاملا با آنتی‌بادی پلی‌کلونال مشخص شده است در حالی که در نمونه محلول روئی سلول‌های ترانسفکت شده با بکمید بدون ژن هیچگونه باندی ظاهر نشده است (شکل ۹).



شکل ۹: وسترن بلات پروتین نوترکیب. ۱: کنترل منفی. ۲: پروتین H متصل به آنتی‌بادی پلی‌کلونال.

بحث

طاعون نشخوارکنندگان کوچک یک بیماری ویروسی بسیار واگیر در گوسفند و بز است. اولین بار در کشور آفریقایی ساحل عاج گزارش و توصیف شد. این بیماری در آفریقا، هند خاورمیانه و ایران اتفاق می‌افتد (۱۲). عامل بیماری موربیلی ویروس از خانواده پارامیکسوویریده است. بیماری PPR جزء فهرست بیماری‌های مهم در سازمان جهانی دام (OIE) می‌باشد و کشورها موظف هستند که در صورت وقوع، بیماری را به این سازمان گزارش نمایند (۱۳). این بیماری با شروع ناگهانی تب، ریزش ترشحات از چشم و بینی، زخم دهان، تنگی نفس، اسهال بدبو و سرفه بروز می‌کند و دام مبتلا به شدت لاغر شده و تلف می‌شود. ترشحات چشم، بینی، آب دهان و مدفوع حاوی مقادیر زیادی از ویروس این بیماری است و شیر حیوان نیز حاوی ویروس است. با توجه به اینکه در واکسن‌های مختلف مورد استفاده در گاو، بز و گوسفند نشان داده شده است که میزان مناسبی آنتی‌بادی علیه پروتین H ایجاد شده است (۱۴)، بنابراین تولید واکسن‌های هموولوگ پروتین‌های H می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. برای شناسایی سرولوژیکی حیوانات آلوده به PPRV، پروتین‌های H و یا F ویروس به عنوان مارکر برای تمایز آن‌ها از حیوانات واکسینه شده (DIVA) استفاده

می‌شود. بر اساس استراتژی طراحی این واکسن، واکسن اصلاح شده ویروسی Ankara (MVA) با بیان پروتین‌های F و H ویروس PPR برای مقاومت به عفونت PPRV توسعه یافت، اما به دو دوز از واکسن نیاز بود (۱۵). Hebert و همکاران در سال ۲۰۱۴ یک واکسن آدنوویروس نوترکیب که پروتین H ویروس PPR را بیان می‌کرد (Ad-H) تهیه کرد. ویروس نوترکیب capripox بیان کننده ژن F ویروس PPR، در بزهای واکسینه شده ایمنی ایجاد کرد. این واکسن حتی در صورت استفاده از دوز کمتر از ۰/۱pfu، از حیوانات در برابر PPRV محافظت می‌کرد. این واکسن نوترکیب دوگانه توانست برای محافظت در برابر دو بیماری (PPR و capripox) که از نظر اقتصادی برای خیلی از کشورهای درحال توسعه از اهمیت زیادی برخوردار هستند استفاده شود (۱۶). سابق بر این پیشرفت‌هایی در زمینه‌ی واکسن‌های نوترکیب برای طاعون گاوی گزارش شده بود. هنگام واکسینه کردن با واکسن تضعیف شده که هم‌زمان ژن H ویروس طاعون گاوی را بیان می‌کرد، بزها کاملا در برابر PPRV ایمن شدند، اگرچه آن‌ها فقط آنتی‌بادی علیه RPV تولید کرده بودند و نه PPRV. (۱۷).

از سال‌ها پیش سیستم بیانی باکیلوویروس به عنوان بستر مناسبی برای بیان پروتین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است. ژن‌های هترولوگ زیادی از جمله ژن‌های ایمنی‌زای برخی از ویروس‌ها در این سیستم بیان گردیده و پروتین تولید شده به عنوان واکسن زیر واحدی با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸). این سیستم واجد بسیاری از فعالیت‌های حیاتی یاخته‌های یوکاریوتی نظیر پردازش و انتقال پروتین می‌باشد و در واقع پروتین تولید شده ماهیت خود را حفظ می‌کند. بطوری‌که تشکیل باندهای دی‌سولفیدی، الیگومریزاسیون، گلیکوزیلاسیون، فسفریلاسیون و فولدینگ صحیح روی آن‌ها صورت می‌گیرد، اسپلایسینگ اینترون‌ها بطور طبیعی انجام می‌شود و پروتین حاصله هم از نظر ساختاری و هم از نظر کار کردی مشابه پروتین طبیعی می‌باشد (۱۸). در این مطالعه، ژن H با دارا بودن جایگاه‌های *NcoI* و *KpnI* در جلوی پروموتر P10 وکتور pFastBacDual کلون شد و بعد از انتقال بر روی بکمید و در نهایت ترانسفکت کردن سلول Sf9، میزان تولید پروتین نوترکیب ۲۱۸ µg/ml برآورد شد که نسبت به مطالعه Apsana و همکاران در سال ۲۰۱۶، که میزان تولید پروتین نوترکیب H ویروسی را در سلول *E.coli* برابر ۱۵۶ µg/ml گزارش نموده بودند، بیشتر بود (۱۹). همچنین در این مطالعه از خود ویروس به‌عنوان منبع حاوی ژن پروتین H استفاده و روش‌های جداسازی و خالص سازی از بهترین روش و با کمترین هزینه امکان پذیر شد که از مزایای این مطالعه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت واکسیناسیون نشخوار کنندگان کوچک در مقابل ویروس PPR و بیان موفقیت آمیز پروتین H این ویروس بوسیله سیستم بیانی باکولو ویروس در سلول Sf9، این پروتین نوترکیب می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان واکسن در مقابل این بیماری باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم در خصوص حمایت‌های اجرایی و موسسه سرم سازی کرج در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

Reference

1. Marashi M, Masoudi S, Moghadam MK, Modirrousta H, Marashi M, Parvizifar M, Dargi M, Saljooghian M, Homan F, Hoffmann B, Schulz C. Peste des petits ruminants virus in vulnerable wild small ruminants, Iran, 2014–2016. Emerging infectious diseases. 2017 Apr;23(4):704.
2. Woma TY, Adombi CM, Yu D, Qasim AM, Sabi AA, Maurice NA, Olaiya OD, Loitsch A, Bailey D, Shamaki D, Dundon WG. Co-circulation of peste-des-petits-ruminants virus Asian lineage IV with lineage II in Nigeria. Transboundary and emerging diseases. 2016 Jun;63(3):235-42.
3. Tounkara K, Kwiatek O, Niang M, Abou Kounta Sidibe C, Sery A, Dakouo M, Salami H, Lo MM, Ba A, Diop M, Mamy E. Genetic evidence for transboundary circulation of peste des petits ruminants across West Africa. Frontiers in veterinary science. 2019 Aug 21;6:275.
4. FAOSTAT Food and Agriculture Data of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. (https://www.fao. org/faostat/en/#data/QA) Accessed June 2020
5. Kumar N, Barua S, Riyesh T, Tripathi BN. Advances in peste des petits ruminants vaccines. Veterinary microbiology. 2017 Jul 1;206:91-101.
6. Baazizi R, Mahapatra M, Clarke BD, Ait-Oudhia K, Khelef D, Parida S. Peste des petits ruminants (PPR): A neglected tropical disease in Maghreb region of North Africa and its threat to Europe. PloS one. 2017 Apr 20;12(4):e0175461.
7. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger AM, Hughes J, Mietzsch M, Modha S, Ogliastro M, Pénzes JJ, Pintel DJ. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. The Journal of general virology. 2019 Mar;100(3):367.
8. Fakri F, Bamouh Z, Ghzal F, Baha W, Tadlaoui K, Fihri OF, Chen W, Bu Z, Elharrak M. Comparative evaluation of three capripoxvirus-vectored peste des petits ruminants vaccines. Virology. 2018 Jan 15;514:211-5.
9. Niyokwishimira A, de D Baziki J, Dundon WG, Nwankpa N, Njoroge C, Boussini H, Wamwayi H, Jaw B, Cattoli G, Nkundwanayo C, Ntakirutimana D. Detection and molecular characterization of Peste des Petits Ruminants virus from outbreaks in Burundi, December 2017–January 2018. Transboundary and emerging diseases. 2019 Sep;66(5):2067-73.
10. Zhou XY, Wang Y, Zhu J, Miao QH, Zhu LQ, Zhan SH, Wang GJ, Liu GQ. First report of peste des petits ruminants virus lineage II in Hydropotes inermis, China. Transboundary and emerging diseases. 2018 Feb;65(1):e205-9.
11. Schägger H. Tricine–sds-page. Nature protocols. 2006 Jun;1(1):16.
12. Zhou XY, Wang Y, Zhu J, Miao QH, Zhu LQ, Zhan SH, Wang GJ, Liu GQ. First report of peste des petits ruminants virus lineage II in Hydropotes inermis, China. Transboundary and emerging diseases. 2018 Feb;65(1):e205-9.

13. Patel JM, Patel DR, Mavadiya SV, Solanki JB, Vihol PD, Sharma KK, Trangadia BJ, Kalyani IH. Clinicopathological investigation of an outbreak of peste des petits ruminants in small ruminants in South Gujarat, India. Indian Journal of Veterinary Pathology. 2015;39 (1):20-3.

14. Truong T, Boshra H, Embury-Hyatt C, Nfon C, Gerdts V, Tikoo S, Babiuk LA, Kara P, Chetty T, Mather A, Wallace DB. Peste des petits ruminants virus tissue tropism and pathogenesis in sheep and goats following experimental infection. PloS one. 2014 Jan 30;9 (1):e87145.

15. Zhou XY, Wang Y, Zhu J, Miao QH, Zhu LQ, Zhan SH, Wang GJ, Liu GQ. First report of peste des petits ruminants virus lineage II in Hydropotes inermis, China. Transboundary and emerging diseases. 2018 Feb;65(1):e205-9.

16. Herbert, R., et al. (2014). "Recombinant adenovirus expressing the haemagglutinin of peste des petits ruminants virus (PPRV) protects goats against challenge with pathogenic virus; a DIVA vaccine for PPR." Veterinary research **45**(1): 24.

17. Fakri F, Ghzal F, Daouam S, Elarkam A, Douieb L, Zouheir Y, Tadlaoui K, Fassi-Fihri O. Development and field application of a new combined vaccine against Peste des Petits Ruminants and Sheep Pox. Trials in vaccinology. 2015 Jan 1;4:33-7.

18. Liu F, Wu X, Zhao Y, Li L, Wang Z. Budding of peste des petits ruminants virus-like particles from insect cell membrane based on intracellular co-expression of peste des petits ruminants virus M, H and N proteins by recombinant baculoviruses. Journal of virological methods. 2014 Oct 1;207:78-85.

19. Apsana R, Balamurugan V, Veeregowda BM, Abraham S, Raju DS, Rathnamma D, Byregowda SM, Rahman H, Shaila MS. Expression and characterization of immunodominant region of fusion protein of Peste des petits ruminants virus in E. coli. Small Ruminant Research. 2016 Nov 1;144:75-82.