

کلون و بیان ژن vp1 ویروس تب برفکی و *fliC* سالمونلا در باکتری اشرشیاکلا

مهرنوش قدیر^۱، دکتر سید محمود عظیمی^{۲*}، دکتر ناصر هرزندی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۲- استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش تب برفکی، کرج، ایران

۳- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۵

چکیده

تب برفکی یک بیماری وزیکولی ویروسی است که منجر به بروز خسارات وسیع در صنعت دامپروری می‌گردد. امروزه برای کنترل این بیماری از ویروس غیرفعال شده استفاده می‌شود که مهمترین نقطه ضعف آن کوتاه بودن طول دوره ایمنی است. لذا تلاش‌های زیادی در زمینه بکارگیری ادجوانهای مؤثرتر در فرمولاسیون واکسن صورت گرفته است. هدف از این تحقیق تولید فیوژن پروتئین VP1 ویروس تب برفکی (Opnasia2) و فلاژلین سالمونلا (*fliC*) به عنوان یک ادجوانت مولکولی است. ژن 1D که مسئول سنتز پروتئین VP1 است به طول ۸۰۰ bp توسط PCR تکثیر داده شد و در وکتور PTZ57 کلون گردید. سپس این وکتور توسط آنزیم‌های *HindIII* و *XhoI* برش داده شده و در داخل ناقل بیانی pET41b که حاوی ژن فلاژلین سالمونلا بود کلون گردید. پلاسمید نوترکیب به باکتری *Escherichia coli* (BL21DE3) انتقال داده شد و بیان توسط IPTG (0.5 mM) القا گردید. بیان پروتئین توسط SDS-PAGE در ژل آکریل آمید ۱۲٪ و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. الحاق ژن‌های vp1 و *fliC* با استفاده از روش PCR و هضم آنزیمی با دو آنزیم *HindIII* و *XhoI* با مشاهده باندهایی به طولهای تقریبی ۷۰۰bp و ۱۵۰۰bp تأیید گردید. برای خالص‌سازی از رزین Ni-NTA و گرادیان pH استفاده شد که بیشترین میزان بازیافت پروتئین در pH ۴/۵ مشاهده گردید. بیان پروتئین با مشاهده باند ۷۶kDa در آزمایش SDS-PAGE در ژل ۱۲٪ آکریل آمید و وسترن‌بلات توسط AntiHis در رسوب باکتری القاء شده تأیید گردید. با توجه به نتایج به دست آمده ژن فیوژن *vp1-salmonella fliC* با طول 2200 bp کلون گردیده و پروتئین حاصل با وزن 76kDa با موفقیت بیان و تخلیص گردید.

کلید واژگان: ویروس تب برفکی - کلون و بیان - ژن vp1

*نویسنده مسئول: سید محمود عظیمی

آدرس: موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش تب برفکی، کرج، ایران. تلفن: ۲۲۲۸-۰۳۸-۳۴۵۷۰

پست الکترونیکی: M.azimi@rvsri.ac.ir

مقدمه

شناخته شده حاوی RNA هستند. در عین حال یکی از بزرگترین و مهمترین خانواده‌های ویروسی را از لحاظ وجود عوامل بیماری زای در انسان و دام به خود اختصاص می‌دهند. کپسید این ویروس از ۴ عدد پروتئین ساختمانی به نام‌های VP4, VP3, VP2, VP1 تشکیل شده است. مطالعات ایمونولوژیک حاکی از آن است که اپیتوپ غالب مسئول القای پاسخ آنتی بادی خنثی کننده، آمینواسیدهای موجود در لوپ-G H واقع در سطح VP1 است (۱). تاکنون مطالعات و تحقیقات وسیعی برای کنترل این بیماری مخرب صورت گرفته است. اما هنوز واکسن سنتی که دارای ویروس غیرفعال است، بعنوان تنها فرآورده تجاری و قابل عرضه در حجم انبوه جهت ایمن سازی جمعیت‌های حساس دامی مورد استفاده قرار می‌گیرد. عمده‌ترین ضعف واکسن‌های سنتی نقص آن‌ها در ایجاد ایمنی دراز مدت در دام‌های واکسینه می‌باشد. این موضوع عمدتاً ناشی از ناتوانی واکسن‌های غیر فعال شده در تحریک ایمنی سلولی و ایجاد خاطره ایمنی پایدار می‌باشد. برای رفع این مشکل لازم است که طی فرآیند ایمن سازی، واکسیناسیون‌های متعدد و نزدیک به هم صورت گیرد. این موضوع علاوه بر تحمیل هزینه‌های اضافی با مشکلات مدیریتی و بهداشتی درگله‌ها همراه خواهد بود. از سوی دیگر خطر انتشار ویروس عفونی از سایت‌های تولید کننده واکسن خصوصاً در کشورهای که عاری از بیماری می‌باشند، بر نگرانی‌های استفاده از تکنولوژی قدیمی می‌افزاید (۱، ۷ و ۸). در سال‌های اخیر تحقیقات وسیعی جهت تولید واکسن‌های نوین از قبیل واکسن‌های تحت واحدی، نوترکیب، DNA واکسن‌ها و یا بکارگیری ادجوان‌های مختلف در فرمولاسیون نهایی واکسن صورت گرفته است. نتایج بکارگیری

ویروس بیماری تب برفکی (Food- and- Mouth Disease) عامل یکی از بیماری‌هایی است که باعث زیان‌های اقتصادی زیادی در دام‌ها می‌گردد و یکی از موانع اصلی در تأمین بهداشت و تولید دام و فرآورده‌های دامی محسوب می‌شود، که توجه اغلب دامپزشکان کنترل کننده بیماری‌ها را به خود جلب نموده است. به دلیل سرعت انتقال بالا، تکثیر سریع، درگیر نمودن طیف وسیعی از حیوانات زوج سم اهلی و وحشی و انتشار فرا قاره‌ای و خساراتی که به تولید شیر و گوشت و سایر محصولات حیوانی وارد می‌کند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. واگیری در دام‌های حساس بسیار بالا (۱۰۰ درصد) ولی میزان مرگ‌ومیر پایین است و اغلب دام‌های جوان را در برمی‌گیرد. از نظر دفتر بین‌المللی بیماری‌های واگیر مشترک انسان و دام (Office International Des Epizootic-OIE) تب برفکی مهم‌ترین بیماری عفونی در تجارت بین‌المللی حیوانات و محصولات حیوانی است (۱). عامل بیماری یک RNA ویروس از خانواده پیکورنا ویریده از جنس آفتوویروس است که دارای هفت سروتیپ A, O, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3 و سویه‌های متعددی می‌باشد (۱، ۶). عامل مولد بیماری تب برفکی تنها عضو جنس آفتو ویروس است. این ویروس دارای تقارن بیست و ۲۰ وجهی با قطر ۲۵-۳۰ نانومتر است. دارای ریو نوکلئیک اسید تک رشته ایبا پلار تیه مثبت بوده و از حدود ۸۴۵۰ باز تشکیل شده است. این ویروس فاقد پوشش لیپوپروتینی است. در میان نشخوارکنندگان اهلی در درجه اول گاو سپس گوسفند و بز نسبت به این بیماری حساس هستند. اعضای این خانواده در زمره کوچکترین ویروس‌های



استخراج RNA ویروسی و تهیه cDNA
استخراج RNA ویروس از کشت سلول BHK-21 با استفاده از کیت (Roche) High purification viral extraction مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. RNA ی استخراج شده در دمای ۲۰- نگهداری شد. ساخت cDNA ژنومی با استفاده از کیت (Genet Bio) Prime RT Premix 2x و در حجم نهایی ۲۰ DEPC μl (Random hexamer 0.4 μl , DEPC ۲۰ μl , Water 14.6 μl , Oligo(dt) 1 μl , RNA 4 μl) طبق برنامه دمایی، ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد.

تکثیر و کلونینگ ژن *vp1* در ناقل PTZ57

ژن *vp1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت 5' GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC 3' و برگشت 3' TAGTGCTGGTAAAGACTTTGAGCT 5' که حاوی جایگاه برشی آنزیمهای XhoI در انتهای 5' آغازگر رفت و HindIII در انتهای 3' آغازگر برگشت بود، تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با استفاده از کیت (Genet Bio) Prime Tag Premix 2x (Bio) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (۱۰ pM forward, ۱۰ pM Primer Revers, 2x 25, cDNA 5 μl , DEPC 15 μl Water) طبق سیکل دمایی شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای انجام گردید. محصول PCR ژن *vp1* با استفاده از دو آنزیم برشی (TakaRa) XhoI و HindIII طبق شرایط (PCR Product 3 μl , Buffer M2 2 μl , Hind III 1 μl ,) در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و استخراج گردید

اینگونه فرآورده‌ها هنوز مورد بحث و بررسی می‌باشد (۷ و ۸). فلاژلین یکی از گزینه‌ها است که اخیراً بعنوان ادجوان در تولید واکسن‌ها مطرح شده است. فلاژلین ممکن است بعنوان یک ادجوان مولکولی بصورت منفک یا فیوز شده به پروتئین هدف مورد استفاده قرار گیرد (۳). هدف از مطالعه حاضر کلونینگ ژن *vp1* (ID) ویروس تب برفکی و فلاژلین در یک قاب ترجمه ایی واحد و تولید پروتئین فیوژن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ویروس تب برفکی

سویه واکسینال ویروس تب برفکی، سروتیپ O_{PanAsia2} بر روی کشت مونولایر BHK-21 تهیه گردید. برای این منظور بذر ویروس به فلاسک کشت سلول ۱۷۵ سانتی مربعی افزوده شد. پس از ۴۸ ساعت تمامی سلول‌ها دچار CPE (Cytophatic effect) شدند. از مایع بالایی پس از سانتریفوژ (g ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) به عنوان استوک ویروسی استفاده شد.

سویه‌های باکتری، پلاسمیدها و محیط‌های کشت

از *اشرشیاکلی* سویه BL21DE3 به عنوان میزبان کلونینگ و بیان استفاده شد. پلاسمیدهای PTZ57 (Fermentas Lithuania)، و PET41b (Novagen، USA) به عنوان ناقل‌های کلونینگ و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند. سلول باکتری حاوی ناقل نوترکیب، بر روی محیط کشت مایع Luria Brittany (Broth ۱ درصد تریپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ درصد کلرید سدیم) حاوی ۱۰۰ $\mu\text{l}/\text{ml}$ کانامایسین کشت داده شد. PH محیط کشت ۷/۵ تنظیم و سلول‌ها به شکل هوازی در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

برای ۳۵ چرخه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و هضم با آنزیم‌های *XhoI* و *HindIII* و تعیین توالی انجام گردید.

بیان ژن ID

سلول‌های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت LB agar حاوی ۱۰۰ μl/ml کانامایسین در ۳۷ درجه سانتی گراد رشد داده شدند. یکی از پرگنه‌های حاصل در ۵ میلی لیتر محیط LB تلقیح گردید. پس از کشت شبانه، ۱۰۰ میکرولیتر از آن به لوله فالکون حاوی ۱۰ میلی لیتر از محیط LB حاوی کانامایسین منتقل گردید. کشت سلول‌ها تا رسیدن به ۰/۵-۰/۷ OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر ادامه یافت. سپس جهت افزایش بیان پروتئین از غلظت‌های مختلف (۱/۵ IPTG، ۱ و ۱/۵ میکرومول) و طیف دمایی ۲۷، ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. طی فواصل زمانی ۲، ۴ و ۸ ساعت پس از شروع کشت ۱/۵ میلی لیتر نمونه اخذ شد. نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۵۰ μl/ml بافر نمونه که حاوی ۲ ml ۱۰% SDS, Tris 1.25 ml, Mercaptoethanol 2.5 ml, Glycerol 0.3 g bromophenolblue 0.5 ml بود به رسوب باکتری و مایع رویی اضافه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. پس از آن ۱۰ میکرو لیتر از هر نمونه بر روی ژل ۱۲ درصد آکریل آمید الکتروفورز گردید (۵).

وستر بلاتینگ

پس از الکتروفورز پروتئین، بلاتینگ بر روی کاغذ نیتروسولز صورت گرفت. غشا با استفاده از سرم آلبومین گاو (BSA) ۵ درصد در بافر TBS بلوکه گردید. سپس غشا در مجاورت محلول حاوی آنتی بادی مونوکلونال ضد His-tag (Roche Germany)

سپس با استفاده از کیت TA Cloning (Fermentas/Litvani) و آنزیم لیگاز (T4 DNA Ligase)، درون ناقل فوق الحاق شد. استخراج پلاسمید‌های حاصل از کلونی‌های به دست آمده با کیت GF-1 (vivantis) انجام شد. برای ارزیابی کلون‌سازی ژن *vp1*، ناقل PTZ57 از باکتری‌های کشت شده استخراج گردیده و با آنزیم‌های *XhoI* و *HindIII* برش داده و تعیین توالی گردید (۹، ۱۱).

ساخت وکتور بیانی pET41b

پس از هضم آنزیمی PTZ57 الحاق شده، ژن ID از ژل استخراج شد. سپس به ناقل بیانی pET41b (Novagen, USA) که حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، His-Tag و فلاژلین سالمونلا بود انتقال داده شد. در پلاسمید بیانی استقرار سایت‌های برش بنحوی طراحی شد که ژن *vp1* به انتهای C ژن فلاژلین متصل گردد. باکتری اشریشیا کلی سویه BL21DE3 با کلرید کلسیم ۰/۱ M در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به صورت سوسپانسیون درآمده سپس جهت ترانسفورماسیون، پلاسمید را به سوسپانسیون سلول‌های مستعد اضافه کرده و مخلوط را پس از یک شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد و بلافاصله شوک سرد ۴ درجه سانتی‌گراد پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی پلیت LB Agar+Kanamycine کشت دادخ شد. جهت تأیید پلاسمید نو ترکیب حاصل با روش PCR با استفاده از آغازگر T7 در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (۲/۵ μl forward Primer, ۲/۵ μl Primer Revers, Plasmid 5 μl, 2x 25 μl Water DEPC 15 μl) طبق سیکل دمایی شامل ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد



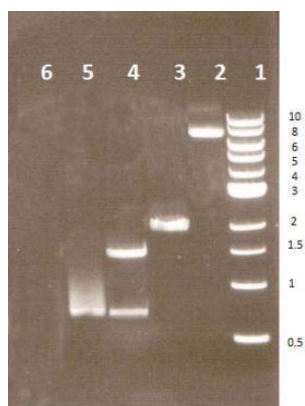
کلون و بیان ژن vp1 ویروس تب برفکی... ۹۳

رسوب داده شد. پروتئین بیان شده با بافر دناتوره کننده حاوی اوره ۸ M بصورت محلول در آمده و توسط کیت Ni-NTA(Qiagen,Germany) تخلیص گردید. کیفیت پروتئین تخلیص شده با استفاده از SDS-PAGE ارزیابی شد (۹ و ۱۱). لازم به ذکر است که رها شدن پروتئین از رزین توسط بافر Elution در گرادیان pH در محدوده ۸، ۳، ۶/۷، ۵/۹ و ۴/۵ انجام شد.

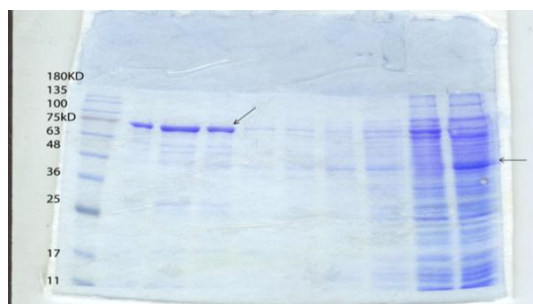
در TBST (TBS همراه با ۱ درصد Tween 20) با رقت 1:1000 در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. در ادامه سه بار شستشو با TBST انجام گرفت سپس غشا با استفاده از محلول (TBS15 ml, DABDAB9mg, H₂O₂25μl) رنگ آمیزی شد.

تخلیص پروتئین نو ترکیب

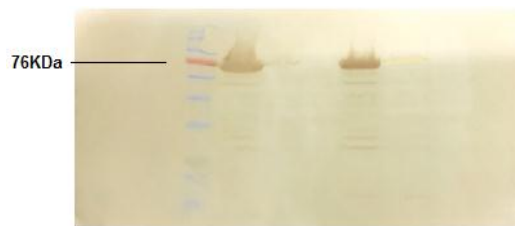
جهت تأیید بیان، رسوب باکتری استحصال شده توسط سونیکاتور لیز گردید. در مرحله بعد اجسام گنجیدگی رها شده با سانتریفوژ در دور بالا (10000g)



تصویر ۱- ارزیابی محصول PCR. از سمت راست گوده اول Ladder 1kb. گوده دوم pET41b حاوی قطعه فیوژن با طول تقریبی ۷۲۰۰ bp استخراج شده از باکتری BL21DE3. گوده سوم محصول PCR قطعه فیوژن با پرایمرهای T7 promoter با طول حدود ۷۲۰۰ bp. گوده سوم محصول PCR قطعه فیوژن که با آنزیمهای XhoI و HindIII هضم شده‌اند. قطعه ۱۵۰۰ مربوط به فلاژلین و قطعه ۷۰۰ مربوط به ژن ID می‌باشد. گوده سوم محصول PCR ژن ID ویروس تب برفکی OPanasia2 با استفاده از پرایمر اختصاصی تیپ O.



تصویر ۲- نتیجه آزمایش SDS-PAGE باکتری BL21DE3 حاوی پلاسمید بیانی و القا شده توسط IPTG (۰/۵ میلی مولار و به مدت ۴ ساعت) از سمت راست: گوده اول باکتری حاوی پلاسمید بیانی که فقط دارای فلاژلین است (باند ۵۴ kDa قابل رویت است). گوده دوم باکتری حاوی پلاسمید دارای قطعه فیوژن که باند ۷۶ kDa را بیان نموده است. گوده سوم تا ششم مراحل شستشوی رزین Ni-NTA با بافرهای شستشو دهنده با pH معادل ۷، ۸، ۷ را نمایش می‌دهد. گوده‌های هفتم الی نهم مراحل شستشو با بافر Elution با pH معادل ۴/۵ را نشان می‌دهد. در این مرحله پروتئین فیوژن تا سه بار قابل استحصال است. گوده آخر مارکر (Prestained protein ladder PR911654 (Cinagen).



تصویر ۳- نتیجه بیان پروتئین فیوژن در آزمایش وسترن بلات توسط Anti-His کونژوگه (۰/۵ mM IPTG). از سمت چپ: گوده اول مارکر (prestained protein ladder PR911654 Cinagen)، گوده دوم کشت ۲ ساعته باکتری حاوی پلاسمید و القاء شده با IPTG. گوده سوم کشت ۲ ساعته باکتری فاقد پلاسمید و القاء شده با IPTG. گوده چهارم کشت ۲ ساعته باکتری حاوی پلاسمید و فاقد IPTG. گوده پنجم کشت ۴ ساعته باکتری حاوی پلاسمید و القاء شده با IPTG. گوده ششم کشت ۴ ساعته باکتری فاقد پلاسمید و القا شد با IPTG. گوده هفتم کشت ۴ ساعته باکتری حاوی پلاسمید و فاقد IPTG.

نتایج و بحث

در این تحقیق از ویروس تب برفکی سویه O_{panasia2} استفاده شد. با توجه به اینکه هدف اصلی در این تحقیق تولید کلون بیانی VP1-fliC است. بدین منظور ابتدا ژن هدف در ناقل pET41b کلون شده و سپس ژن هدف از این ناقل برش یافته و درون ناقل بیانی PTZ57 کلون شد.

ارزیابی محصول PCR ژن vp1

پس از انجام آزمون PCR، توالی مربوط به ژن vp1 حاصل از پرایمرهای NK61 و C244 به روش بیوانفورماتیک مورد آنالیز قرار گرفت. به این ترتیب که در سایت NCBI با استفاده از سرویس نوکلئوتید بلاست صحت توالی ژن vp1 ویروس تب برفکی سویه O تأیید گردید. پس از الکتروفورز قطعه ۷۰۰bp مربوط به ژن vp1 نیز مشاهده شد (تصویر ۱).

کلون نمودن قطعات ژنی تکثیر یافته در درون وکتور بیانی

پلاسمید بیانی PTZ57 از باکتری BL21DE3 کشت شده، استخراج گردید. سپس توسط پرایمرهای T7 promoter قطعه فیوز شده تکثیر یافت و پس از الکتروفورز قطعه ۲۲۰۰ bp مربوط به قطعه فیوژن مشاهده گردید. در مرحله بعد جهت تأیید بیشتر

هضم آنزیمی با HindIII و XhoI بروی محصول PCR صورت گرفت و بر روی آگاروز ۱٪ الکتروفورز انجام شد. در این مرحله ژنهای vp1 و فلاژلین سالمونلا با طولهای تقریبی ۷۰۰ bp و ۱۵۰۰ مشاهده گردیدند. (تصویر ۱)

بیان پروتئین

جهت بهینه سازی بیان از شیب غلظت IPTG در محدوده ۰/۵، ۱، ۱/۵ و بازه زمانی ۲، ۴ و ۸ ساعت و دمای oC37 و oC27 استفاده شد. بررسی نتایج در SDS-PAGE حاکی از آن بود که افزایش غلظت IPTG از ۰/۵ mM به بالا تاثیری بر میزان پروتئین استحصالی ندارد. همچنین افزایش طول زمان القاء به بیش از ۴ ساعت تاثیری بر میزان بیان پروتئین مورد نظر نداشت. لازم به ذکر است که اکثر محققین غلظت نهایی IPTG در محدوده ۰/۵ mM و یا ۱mM و در زمان ۴ و یا ۶ ساعت را جهت حصول بیشترین میزان پروتئین نوترکیب توصیه نموده‌اند. (تصویر ۲)

طبق مطالعات صورت گرفته دمای مطلوب جهت بیان پروتئین در سیستم پروکاریوتی در طیف ۳۰، ۳۷°C و بعضاً ۲۵°C می‌باشد (۳). اما در این تحقیق میزان تولید پروتئین فیوژن در دمای ۲۷°C بیش از ۳۷°C بود. نکته دیگر اینکه پروتئین بیان شده در مایع بالایی مشاهده نشد و تنها ردپای آن در رسوب باکتری لیز

کلون و بیان ژن *vp1* ویروس تب برفکی... ۹۵

می‌آیند. در حال حاضر از ویروس کشته شده به عنوان واکسن ویروس تب برفکی استفاده می‌شود. هر چند که این واکسنها به صورت تجاری وجود دارد ولی فرایند غیرفعالسازی کامل دارای نواقصی است که منجر به شیوع تکگیران بیماری در منطقه می‌شود، بنابراین در سال‌ها اخیر باتوجه به محدودیتهای تولید واکسن غیرفعال، ایده استفاده از واکسنهای نسل جدید جهت کنترل بیماری تب برفکی قوت بیشتری گرفته است. اما نقطه چالش برانگیز واکسنهای نوترکیب تولید اندک آنتی ژن نوترکیب در میزبان پروکاریوتی می‌باشد. جهت رفع این نقص استفاده از ادجوان مناسب با هدف تحریک گسترده سیستم ایمنی می‌تواند این مشکل را تا حدودی مرتفع نمود. در حال حاضر گزارشات متعددی وجود دارد که از فلاژلین بعنوان یک ادجوان مناسب جهت برانگیختن سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی بر علیه آنتی ژن هدف استفاده می‌گردد. بکارگیری فلاژلین در شرایط آزمایشگاهی و تجربی برای افزایش ایمنی زای ویروس‌هایی نظیر آنفلوانزا، آبله، انسفالیت مورای و تب نیل غربی مورد بررسی قرار گرفته است که از نتایج قابل توجهی برخوردار بوده‌اند (۳، ۱۰ و ۱۲). در این تحقیق هدف اصلی تولید فیوژن پروتئین *VP1-fliC Salmonella* در یک قاب ترجمه ایی واحد می‌باشد. سیستم بیانی انتخاب شده در این مطالعه جهت آنتی ژن ویروس تب برفکی، پلاسمید PTZ57 و سلول‌های باکتری BL21DE3 بوده است. Nagarajan و همکارانش در سال ۲۰۰۸ به منظور ایجاد عملکرد بهتر در واکسن تب برفکی به جای استفاده از فیوژن پروتئین تک ظرفیتی از فیوژن پروتئین ۳ ظرفیتی استفاده کردند. به همین منظور ابتدا قسمت ایمونوژنیک ژن *vp1* سویه A1 و A1a

شده قابل رویت بود. بنابراین نتیجه‌گیری شد که پروتئین بیان شده بصورت نامحلول و به شکل اجسام گنجدگی در سیتوپلاسم باکتری تجمع می‌یابند. لذا جهت استحصال آن نیاز به استفاده از بافر دنا توره کننده حاوی اووه ۸ M بود. در مرحله بازیافت پروتئین از رزین Ni-NTA و گرادیان pH بافر Elution استفاده شد که در pH معادل ۴/۵ بیشترین میزان بازیافت مشاهده گردید. در این شرایط تا سه بار آزادسازی پروتئین از رزین مشاهده شد (تصویر ۳).

پروتئین VP1 ویروس تب برفکی از ۲۲۶ اسید آمینه تشکیل شده است و وزن مولکولی آن حدود ۲۴KDa می‌باشد. پروتئین فلاژلین سالمونلا (*fliC*) از ۴۹۷ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی آن در حدود ۵۴KDa می‌باشد. توسط آنالیز بیوانفورماتیک وزن مولکولی پروتئین فیوژن با طول ۷۲۳ اسید آمینه در حدود ۷۶KDa برآورد گردید. در آزمایش SDS-PAGE در ژل ۱۲% آکریل آمید بوضوح باند ۷۶KDa در باکتری القاء شده مشاهده گردید. به منظور تأیید ژن ویروس تب برفکی از آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستدین استفاده گردید و تولید پروتئین مذبور در وسترن بلات تأیید شد. لازم به ذکر است که به دلیل زمان بر بودن مراحل تهیه آنتی سرم هومولوگ و سرم شناساگر کونژوگه، از بکارگیری آنتی سرم هومولوگ صرف نظر شد.

بیماری تب برفکی از جایگاه ویژه‌ای در بین بیماری‌های عفونی مسری دامها برخوردار است. با انجام مطالعات آماری و بررسی پراکندگی جغرافیایی بیماری تب برفکی در جهان در می‌یابیم که بیش از ۷۵ درصد نقاط دنیا آلوده به این بیماری هستند و همچنان تهدیدی برای کشورهای پاک به حساب

با توجه به نتایج به دست آمده ژن vp1 ویروس تب برفکی و فلاژلین سالمونلا به درستی کلون و بیان گردید. از آنجا که تا کنون هیچ مطالعه‌ای در جهت استفاده از فلاژلین بعنوان پروتئین ایمنی زا علیه ویروس تب برفکی انجام نشده است. امید می‌رود که در آینده نزدیک تحقیقات هدفمندی جهت بررسی کارایی فلاژلین بعنوان یک ادجوانت مولکولی جهت القا ایمنی پایدار بر علیه ویروس تب برفکی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی، بخش تب برفکی که در انجام این پروژه مساعدت نموده‌اند، همچنین دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تشکر نمایم.

References

- 1-Baxt B, Grubman, Marvin J (2004). Foot – and – Mouth Disease, *Clinical Microbiology Reviews*, **27**: 465– 493
- 2-Delaney, K. N., Phipps, J. P., Johnson, J. B., & Mizel, S. B. (2010). “A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice”. *Viral immunology*, **23**: 201-210.
- 3-Cuadros, C., Lopez-Hernandez, F. J., Dominguez, A. L., McClelland, M., & Lustgarten, J. (2004). “Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses”. *Infection and immunity*, **72**: 2810-2816
- 4-Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *ClinMicrobiol Rev* 2004; **17**: 465-93.
- 5-Guisheng G, Guiling Z, Hua X, Qiumei S, Yanying Z (2012). Cloning of Structural Protein VP1 Gene of Foot and Mouth Disease Viruse and its Expression in *Escherichia coli*, *International Conference on Biological and Medical Sciences*, **7**: 117- 122.
- 6-Hema M, Chandran D, Nagendrakumar S B, Madhanmohan M, SrinivasanV A (2009).

تکثیر داده شد. سپس ژن vp1 سویه A1 و Asia1 وکتور pBSKs و تیپ O در pETBlue کلون گردیدند. سپس توسط آنزیم *XhoI* برش داده شدند و هر کدام ب طور جداگانه برای تولید pETA و pETAs و pETO در pET32a کلون شدند. پلاسمیدهای نو ترکیب در محیط LB حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین به مدت ۱ شب در ۳۷ درجه همراه با تکان کشت داده شدند. برای القا از IPTG و برای لیز از سدیم دودسیل سولفات ۱۰٪ استفاده شد. خالص‌سازی توسط ستون نیکل انجام شد. برای بررسی واکنش آنتی ژن آنتی بادی از الایزا غیر مستقیم و برای تأیید پروتئین بیان شده از وسترن بلات استفاده شد. با توجه به این تحقیق استفاده از واکسن ۳ ظرفیتی میزان پاسخ ایمنی بهتری حاصل می‌شود و دامنه برای تولید و توسعه واکسن بر پایه Protein/DNA برای FMD را نشان می‌دهد (۷).

در مطالعاتی مشابه Qiumei و همکارانش در سال ۲۰۱۲ قطعه ژن vp1 ویروس تب برفکی توسط RT-PCR تکثیر داده شد و در ناقل PGEM-Teasy کلون گردید. ژن vp1 توسط آنزیم‌های BamHI و *XhoI* مورد هضم قرار گرفت و در داخل وکتور بیانی pTE28a کلون شد. VP1 کلون شده به وسیله PCR و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. برای ترانسفورم پلاسمید نو ترکیب حاصل از *E. coli* B121 استفاده شد. القای بیان توسط IPTG انجام شد. باکتری حاوی VP1 – pTE28a در زمان‌های مختلفی جمع آوری گردید و توسط روش‌های SDS-PAGE و وسترن مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که vp1 با موفقیت در *E. coli* بیان شد.



- Construction of an infectious cDNA clone of foot-and-mouth disease virus type O1BFS 1860 and its use in the preparation of candidate vaccine. *Journal of Biosciences* **34**: 45-58.
- 7-Nagarajan G, Ashok Kumar C, Dechamma HJ, Reddy GR, Ganesh K, and Suryanarayana VVS(2008). Cloning and expression of FMDV-VP1 immunoreactive peptide in trivalent form and its application as immunogen. *Indian J Biotechnol*, **7**: 472-7.
- 8-Rodriguez, L. L., & Grubman, M. J. (2009). "Foot and mouth disease virus vaccines". *Vaccine*, **27**: D90- D94.
- 9-Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 1-3.
- 10-Song, L., Zhang, Y., Yun, N. E., Poussard, A. L., Smith, J. N., Smith, J. K., ...& Paessler, S. (2009). "Superior efficacy of a recombinant flagellin: H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin". *Vaccine*, **27**: 5875-5884.
- 11-Tanom, A., Farajnia, S., Peerayeh, S. N., & Majidi, J. (2013). "Cloning, expression and characterization of recombinant exotoxin A-flagellin fusion protein as a new vaccine candidate against *Pseudomonas aeruginosa* infections". *Iranian biomedical journal*, **17**: 1.
- 12-Whittle, B. L., Lee, E., Weir, R. C., & Verma, N. K. (1997). "Immune response to a Murray Valley encephalitis virus epitope expressed in the flagellin of an attenuated strain of *Salmonella*". *Journal of medical microbiology*, **46**: 129-138.

Cloning and Expression of *vp1* gene of Foot- and- mouth Disease Virus and *fliC* gene of *Salmonella* in *Escherichia coli*

Qadir, M.¹, Azimi, S.M.^{2*}, Harzandi, N.³

1- Department Of Microbiology Faculty of Sciences, Karaj Branch,
Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- Assistant professor of Razi Vaccine & Serum Research Inst. FMD Dept., Karaj, Iran

3- Assistant professor, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received Date: 25 November 2016

Accepted Date: 30 April 2017

Abstract

Background and Aim: Foot & mouth disease (FMD) is a vesicular viral disease which cause severe damage in livestock industry. Today FMD is controlled by traditional inactivated vaccine. Due to short duration of immunity, using molecular adjuvant is recommended to increase efficiency of vaccine. Purpose of this study is synthesis fusion protein from VP1 protein of FMDV (Opanasia2) and flagelline of the *Salmonella* (*fliC*) in *E. coli*. *Methods:* 1D gene that is responsible for producing VP1 protein was produced by PCR (800bp) and cloned in PTZ57 vector. After cutting cloned fragment from the recombinant plasmid by *HindIII* & *XhoI*, inserted to expression vector (pET41b) that contains *fliC* of the *Salmonella*. The construct was transfected to competent *E. coli* (BL21DE3) cell. The expression was induced by IPTG (0.5mM) and purified by Ni-NTA Resin. Production of recombinant protein was resolved by SDS-PAGE in 12% acrylamide gel and western blotting. *Results:* Recombinant fusion protein was evaluated by PCR and enzyme digestion. By molecular analysis, PCR product by length 700 and 1500 bp was observed. Ni-NTA Resin and gradient pH was used for purification. The most amount of protein recovering was observed in pH 4.5. Recombinant protein by molecular weight of 76 KDa determined in SDS-PAGE (12% acrylamide gel) and was confirmed by western blot by AntiHis. In this study, the fused gene of FMDV *vp1* and flagelline of *Salmonella* (*fliC*/2200 bp) was cloned successfully in *E. coli* and recombinant protein (76 KDa) was expressed and purified.

Keyword: FMDV- clone and Expression- *vp1* gen

*Corresponding author: S.Mahmoud Azimi

Address: Razi Vaccine & Serum Research Inst. FMD Dept. Tel: 34570038-2228

Email: m.azimi@rvsri.ac.ir