بیان ژن کد کننده‌ی پروتئین E2 ویروس اسهال ویروسی گاو در *E. coli*

محمد رشنو[۱]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۲*]، مسعود قربانپور[۲]، محسن لطفی[۳]، نغمه موری‌بختیاری[۴] و سیدمرتضی قریشی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۶

چکیده

اسهال ویروسی گاو (Bovine Viral Diarrhea) یکی از بیماری‌های ویروسی بسیار مهم این حیوان است که به وسیله‌ی یک پستی ویروس (BVDV) از خانواده‌ی فلاوی ویریده، ایجاد می‌شود. BVDV با تأثیرگذاری بر روند تولید مثل نیز خسارت‌های بسیاری را موجب می‌شود. پروتئین E2 مهم‌ترین پروتئین ساختمانی این ویروس در القای پاسخ ایمنی محافظت کننده است. هدف از این پژوهش، کلونینگ و بیان ژن پروتئین E2 در باکتری *E. coli* بود. ژن مورد نظر با استفاده از RT-PCR تکثیر و در پلاسمید pMAL-c2X کلون گردید. از طرفی، صحت ردیف نوکلئوتیدی محصول‌های کلون شده با تعیین توالی نوکلئوتیدی مورد تأیید قرار گرفته و بیان پروتئین توسط *E. coli* با استفاده از روش SDS-PAGE بررسی شد. از طرف دیگر، ویژگی آنتی‌ژنی پروتئین E2 نوترکیب در آزمایش ایمنوبلات تأیید گشته و پس از انجام دادن سونیکاسیون سلول‌های باکتری مشخص گردید که پروتئین نوترکیب به شکل محلول می‌باشد. این نتایج، نشان دهنده‌ی این است که پلاسمید نوترکیب فوق، پروتئین E2 را به صورت کارا بیان می‌کند.

کلمات کلیدی: ویروس اسهال ویروسی گاو، پروتئین E2، کلونینگ، بیان ژن، *E. coli*

مقدمه

در میان بیماری‌های واگیردار، اسهال ویروسی گاو، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گاو است که حتی در برخی از کشورهای پرورش دهنده‌ی آن، این بیماری به عنوان مهم‌ترین بیماری گاو شناخته می‌شود (Radostits et al. 2007). بیماری اسهال ویروسی گاو، اولین بار در دهه‌ی ۱۹۴۰ میلادی به عنوان یک بیماری مبتلا کننده‌ی گاو با منشاء نامشخص، در کانادا مطرح و ابتدا با نام بیماری مجهول نامیده شد (Childs 1946). بیماری اسهال ویروسی گاو، یکی از بیماری‌های عفونی حاد و تحت حاد گاو است و اگرچه این بیماری به واسطه‌ی ایجاد ضایعات گوارشی، اسهال ویروسی گاو نامیده می‌شود، ولی در واقع باید بیماری را یک بیماری تولیدمثلی مخرب دانست که با ایجاد سقط جنین، مرده‌زایی، بازگشت به فحلی و کاهش تولید شیر، عملاً بازده مفید و سودآوری گله‌های پرورش گاو را از بین می‌برد و خسارت‌های اقتصادی هنگفتی را سبب می‌شود. این بیماری توسط ویروس اسهال ویروسی گاو از خانواده‌ی *فلاوی‌ویریده* و از جنس *پستی‌ویروس* ایجاد می‌گردد. اعضای شاخص این جنس، ویروس اسهال ویروسی گاو، ویروس تب کلاسیک خوک (وبای خوک) و ویروس بیماری مرزی گوسفند می‌باشند (Thiel et al. 2005). علاوه بر گاو، گونه‌های دیگر نشخوارکنندگان اهلی (گوسفند و بز) و

[۱] دانش‌آموخته‌ی دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۲*] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: masoudrs@scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۳] استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، حصارک، کرج

[۴] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه دانشگاه شهیدچمران اهواز

[۵] دانش‌آموخته‌ی دکترای تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، دانشکده‌ی‌دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

حتی نشخوارکنندگان وحشی در سراسر دنیا نسبت به ویروس BVD حساس هستند و از این طریق، آثار زیان‌بار بی‌شماری بر صنایع تولید شیر، گوشت و فرآورده‌های آنان تحمیل می‌گردد (Carlsson 1991, Depner et al. 1991, Hewicker-Trautwein 1994, Loken 1995, Van Campen et al. 2001, Goyal et al. 2002, Frolich et al. 2002).

ویروس BVD، یک ویروس پوشینه‌دار کروی ۴۰ تا ۶۰ نانومتری با یک هسته‌ی داخلی متراکم در حدود ۳۰ نانومتر می‌باشد که ژنوم آن از یک RNA تک رشته‌ای مثبت با طول حدود ۱۲/۳ کیلوباز تشکیل شده است (Lindenbach and Rice 2001). ژنوم ویروس BVDV به صورت یک پلی‌پروتئین ترجمه می‌شود که در ادامه توسط پروتئازهای سلولی و ویروسی به پروتئین‌های ساختمانی (C، E^{rns}، E1 و E2) و پروتئین‌های غیر ساختمانی (NS2، NS3، NS4 و NS5) شکسته می‌شود (Collett et al. 1988, Collett et al. 1991, Meyers et al. 1992). از میان پروتئین‌های ویروس BVD، پروتئین ساختمانی E2 ویروس اسهال ویروسی گاو، نه تنها یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های ساختمانی این ویروس است، بلکه در میان جنس *پستی‌ویروس* نیز نقش بسیار کلیدی در تولید آنتی‌بادی خنثی کننده دارد و به عنوان آنتی‌ژن انتخابی برای ایمن‌سازی دام‌ها در واکسن، استفاده می‌گردد (Bolin and Ridpath 1996, Bruschke et al. 1997, Harpin et al. 1999, Thomas et al. 2009).

این پروتئین با وزنی حدود ۵۳ کیلودالتن به همراه گلیکوپروتئین‌های E^{rns} و NS3، ایمنی‌زاترین پروتئین‌های BVDV هستند و قادرند پاسخ قوی آنتی‌بادی را در بدن میزبان برانگیزند (Collett 1992, Zoth and Taboga 2006)؛ بنابراین، پروتئین E2 قابلیت استفاده به عنوان یک آنتی‌ژن تشخیصی مناسب یا تولید واکسن BVD را دارا می‌باشد و همواره در پژوهش‌های گوناگون به عنوان یک نمونه‌ی آنتی‌ژنی مهم در ایمن‌سازی مورد بررسی قرار می‌گیرد؛ بنابراین، هدف از این پژوهش کلونینگ و بیان ژن پروتئین E2 در *E. coli* می‌باشد.

مواد و روش کار

سویه‌ی ویروسی

در این تحقیق، از ویروس اسهال ویروسی گاو (BVDV)، سویه‌ی سیتوپاتیک NADL، استفاده شد که از موسسه‌ی واکسن‌سازی و سرم‌سازی رازی به عنوان سویه‌ی مرجع، تهیه گردید. به منظور تکثیر ویروس، کشت سلول‌های بوقک بینی گاو (BT) در محیط حداقل DMEM (Gibco، اسکاتلند) به همراه ۵ درصد سرم اسب (شرکت کارن اطلس پژوه، ایران) مورد استفاده قرار گرفت و با مشاهده‌ی آثار تخریب سلول، کشت آن، متوقف گردید و سلول‌ها یک بار در دمای ۴۰- درجه‌ی سانتی‌گراد، منجمد و پس از آن در دمای اتاق ذوب شدند و به عنوان منبع ویروس برای استخراج RNA ویروسی در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد در فریزر، نگه‌داری شدند.

تکثیر ژن پروتئین E2 با RT-PCR

برای طراحی پرایمر، توالی نوکلئوتیدی ژن E2 سویه‌ی NADL ویروس BVD، از بانک ژن با شماره‌ی دسترسی "NC_001461.1" استخراج گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار Primer3، پرایمرهای لازم برای تکثیر ناحیه‌ی کدکننده‌ی این ژن (بدون انتهای کربوکسیلی مسئول اتصال پروتئین به غشا) طراحی شد و در انتهای پرایمرها توالی جایگاه آنزیم محدودکننده‌ی BamHI اضافه گردید. سپس RNA ژنومی ویروس با استفاده از محلول تجاری TriPure (Roche، آلمان) طبق دستور شرکت سازنده، استخراج شد و با استفاده از کیت ساخت cDNA (Revert Aid، Fermentas، لیتوانی) و در حضور پرایمر معکوس (5′-TAAAGCGGCCGCGGATCCAGCGAAGTAATC CCGGTG -3′)، از روی RNA استخراج شده، cDNA ساخته شد. سپس با استفاده از هر دو پرایمر مستقیم (5′-CGCGGATCCCACTTGGATTGCAAACCTGA-3)

و معکوس و cDNA تکثیر یافته و طی مراحل زیر، PCR انجام گرفت : مقدار ۲۵ میکرولیتر مستر میکس 2x (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر کدام از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۴ میکرولیتر cDNA در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط و تکثیر ژن مورد نظر با برنامه‌ی دمایی ۹۵°C ، ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل ۹۴°C، ۳۰ ثانیه، ۵۲°C ، ۴۵ ثانیه، ۷۲°C ، ۲ دقیقه و در آخر ۷۲°C، ۱۰ دقیقه صورت گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و در کنار مارکر DNA الکتروفورز گردید.

کلونینگ و بیان ژن E2 در *E. coli*

پس از تایید صحت PCR، محصول PCR و پلاسمید pMAL-c2X خالص شده توسط کیت استخراج پلاسمید (Gene JET^{TM} Plasmid Miniprep Fermentas شرکت (kit توسط آنزیم محدودکننده‌ی *BamHI* (Fermentas، لیتوانی) برش داده شد و بعد از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد با کیت استخراج DNA از ژل (شرکت Vivantis، مالزی) خالص گردیدند. واکنش لیگاسیون بین پلاسمید و محصول PCR با استفاده از آنزیم لیگاز T4(Fermentas، لیتوانی) و طبق دستورالعمل آنزیم، انجام شد. برای ترانسفورماسیون، از سویه‌ی DH5α باکتری *E. Coli* پذیرا شده توسط کلرید کلسیم، استفاده شد و در پایان، باکتری‌ها در محیط LB جامد آمپی‌سیلین‌دار، کشت گردیدند. پس از رشد کلون‌های باکتریایی، غربالگری کلون‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب با روش PCR و هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده، انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب با کیت استخراج پلاسمید از سه کلونی، استخراج گردیدند و به منظور تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست، ارسال شدند. پس از اطمینان از صحت کلونینگ، یک کلون باکتری حاوی پلاسمیدنوترکیب پس از کشت شبانه، در محیط LB مایع دارای آمپی‌سیلین (۱۰۰µg/ml، شرکت جابرابن حیان، ایران) و گلوکز (۲ درصد) به نسبت ۱ به ۱۰۰ کشت داده شد. با رشد باکتری و رسیدن به کدورت ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به منظور القای بیان پروتئین، IPTG (ایزوپروپیل بتا دی‌گالاکتوپیرانوزید، شرکت Vivantis، مالزی) با غلظت نهایی ۱ mM اضافه گردید و کشت باکتری در دمای ۳۷°C تا ۲ ساعت ادامه یافت. نمونه‌های تهیه شده پیش و پس از افزودن IPTG، با الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید (با غلظت اکریلامید ۴ درصد در بخش متراکم کننده و ۱۰ درصد در بخش جدا کننده) و رنگ-آمیزی ژل با رنگ آبی کوماسی (AppliChem، آلمان) از نظر بیان، مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی حلالیت پروتئین بیانی، ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری القا شده با IPTG ، سانتریفیوژ گردید (با قدرت ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) و رسوب باکتری در ۳ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین (PBS) مخلوط شد. سپس، باکتری مخلوط شده در PBS به مدت ۲۰ دقیقه مورد سونیکاسیون قرار گرفت تا پروتئین‌های محلول در فاز مایع وارد شوند. پس از سونیکاسیون، سوسپانسیون باکتری با قدرت ۹۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده از این مرحله، به عنوان پروتئین‌های نامحلول و مایع روی رسوب به عنوان پروتئین‌های محلول، برداشت شدند و مورد آزمایش SDS-PAGE قرار گرفتند.

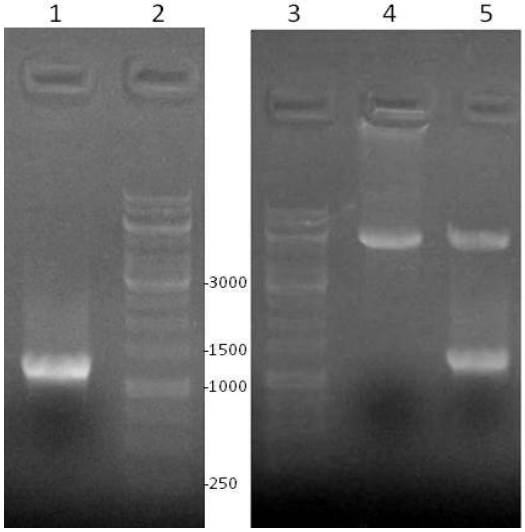
ایمونوبلاتینگ

به منظور شناسایی آنتی‌ژنی پروتئین حاصل از بیان پروکاریوتی ژن E2، پروتئین های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب و باکتری حاوی پلاسمید بدون ژن پس از القا بیان پروتئین و در دو تکرار در ژل پلی اکریلامید الکتروفورز شدند. سپس پروتئین‌ها در طی ۳ ساعت و با ولتاژ ۶۰ ولت به غشای نیتروسلولز انتقال داده شدند. پس از انتقال، غشای نیتروسلولز به مدت ۲ ساعت در محلول فسفات بافر سالین (PBS) حاوی ۰/۲ درصد توئین ۲۰، به عنوان بافر بلوک کننده، قرار داده شد. پس از ۳ بار شست و شو با بافر PBS، غشاء به دو قطعه تقسیم گردید؛ به شکلی که در هر قطعه، یک ستون حاوی پروتئین‌های باکتری دارای پلاسمید نوترکیب و یک ستون حاوی

پروتئین‌های باکتری دارای پلاسمید بدون ژن باشد. در مرحله‌ی بعد، یکی از این قطعات غشاء در رقت ۱/۱۵۰ از یک نمونه سرم گاو دارای آنتی‌بادی ضد BVDV، رقیق شده در بافر PBST (PBS دارای ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) و قطعه‌ی دیگر در رقت ۱/۱۵۰ از یک نمونه سرم گاو فاقد آنتی‌بادی ضد BVDV قرار داده شد. مثبت و منفی بودن این سرم‌ها قبلاً با استفاده از یک کیت الیزای تجاری آنتی-بادی BVDV و آزمایش خنثی‌سازی ویروس تأیید شده بود. برای پیش‌گیری از واکنش احتمالی آنتی‌بادی های موجود در این سرم‌ها با پروتئین‌های باکتری، به PBST مورد استفاده برای رقیق کردن سرم‌ها ۵ درصد عصاره‌ی باکتری بدون پلاسمید سونیکه شده نیز افزوده شده بود. پس از ۱ ساعت انکوباسیون و سپس ۳ بار شست و شو با بافر PBST قطعات غشای نیتروسلولز به مدت ۱ ساعت در رقت ۱/۱۰۰۰ از یک کنژوگه پراکسیداز ضد IgG گاو (شرکت سیگما، آمریکا) در بافر PBST قرار داده شدند. در آخر، پس از ۳ بار شست و شو با PBST نتیجه‌ی واکنش با استفاده از محلول کروموژن سوبسترای کلرونفتول (شرکت سیگما، آمریکا) و آب اکسیژنه، ظاهر گردید.

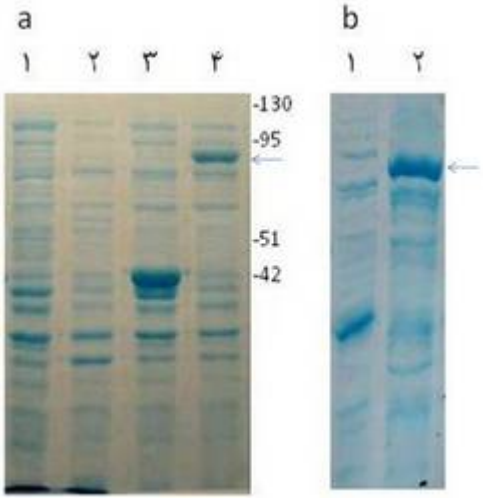
نتایج

پس از ساخت cDNA و انجام دادن واکنش PCR، محصول PCR در ژل آگاروز ۱ درصد در کنار مارکر ۱Kb (Fermentas، لیتوانی) به عنوان استاندارد، الکتروفورز شد. نتایج الکتروفورز، نشان داد که آزمایش PCR با موفقیت منجر به ساخت قطعه‌ی DNA مورد نظر با طول ۱۰۲۳bp گردیده است (تصویر ۱). پس از انجام دادن مرحله‌ی اتصال محصول PCR و پلاسمید pMAL-c2X برش داده شده توسط آنزیم محدودکننده، ترانسفورماسیون محصول‌های اتصال یافته در سویه‌ی DH5α باکتری *E. coli* انجام شد و ظهور کلونی‌های رشد یافته روی محیط جامد LB آمپی‌سیلین‌دار، نشان‌دهنده‌ی ورود موفق پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در باکتری‌ها بود. پس از اطمینان از صحت کلونینگ، با غربالگری به وسیله‌ی PCR و هضم آنزیمی (تصویر ۱)، بیان پروتئین E2 در SDS- PAGE مورد بررسی قرار گرفت. همان گونه که در تصویر ۲ مشخص شده است، باکتری مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG، حاوی پروتئینی جدید در محدوده‌ی ۸۰ کیلودالتون است که با وزن مولکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی (با احتساب وزن ۳۷/۵ کیلودالتون برای ناحیه‌ی انتخاب شده از پروتئین E2 و ۴۲ کیلودالتون برای پروتئین MBP کد شده توسط پلاسمید) هم‌خوانی دارد. هم‌چنین تعیین توالی پلاسمید نوترکیب توسط پرایمرهای یونیورسال M13 F و MalE صحت تکثیر و کلونیگ ژن E2 را مورد تأیید قرار داده است. بررسی حلالیت پروتئین بیانی با روش ذکر شده در بخش مواد و روش کار، نشان داده که این پروتئین کاملاً در فاز مایع قرار دارد و در نتیجه، محلول است و به سهولت، قابل خالص‌سازی می‌باشد.



تصویر ۱: الکتروفورز محصول RT-PCR و پلاسمیدهای pMAL-c2X استخراج و هضم شده. ستون‌های ۲ و ۳ مارکر DNA ۱ کیلوباز (اندازه‌ی برخی از قطعات مارکر بر حسب زوج باز، نشان داده شده است)، ستون ۱ محصول RT-PCR و ستون‌های ۴ و ۵ به ترتیب پلاسمیدهای بدون ژن و حاوی ژن را پس از هضم با آنزیم *BamHI* نشان می‌دهند.

از سویی، ویژگی آنتی‌ژنیک پروتئین بیان شده، به کمک آزمایش ایمونوبلاتینگ بررسی شد. بدین منظور، باکتری سازنده‌ی پروتئین E2 و باکتری حاوی پلاسمید بدون ژن مورد الکتروفورز قرار گرفتند و سپس پروتئین‌ها به غشای نیتروسلولز انتقال داده شدند. پس از انتقال و طی مراحل ایمونوبلاتینگ، مشخص گردید که یک نمونه‌ی سرمی، دارای آنتی‌بادی ضد BVDV با پروتئین بیان شده، واکنش داده بود؛ در حالی که یک نمونه‌ی سرم منفی فاقد آنتی‌بادی ضد BVDV هیچ‌گونه واکنشی نسبت به پروتئین مورد نظر نداشت؛ بنابراین پروتئین بیان شده از لحاظ ساختاری، حاوی اپی‌تاپ‌های آنتی‌ژنیک ویروسی می‌باشد.



تصویر ۲: الکتروفورز محصول‌های آزمون بیان E2 ویروس BVD. قسمت a) ستون ۱: کلونی حاوی پلاسمید pMAL-c2X (شاهد منفی)، قبل از القا با IPTG. ستون ۲: کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب، قبل از القا با IPTG، ستون ۳: کلونی حاوی پلاسمید pMAL-c2X (شاهد منفی)، بعد از القا با IPTG، ستون ۴: کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب، بعد از القا با IPTG، موقعیت برخی از پروتئین‌های استاندارد بر حسب کیلو دالتون در سمت راست ژل، نشان داده شده است. قسمت b) ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب، رسوب و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ عصاره‌ی سونیکه شده‌ی باکتری حاوی پروتئین نوترکیب E2 را نشان می‌دهد. در قسمت‌های a و b پروتئین نوترکیب E2 با پیکان (←)، نشان داده شده است.

تصویر ۳: واکنش پروتئین نوترکیب E2 بیان شده با سرم‌های مثبت و منفی (از لحاظ وجود آنتی‌بادی ضد BVDV) در آزمایش ایمنوبلات. ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب، نشان‌گر واکنش سرم مثبت دارای آنتی‌بادی ضد BVDV با باکتری‌های حاوی پروتئین نوترکیب E2 و فاقد این پروتئین می‌باشند. ستون‌های ۳ و ۴ به ترتیب، نشان‌گر واکنش یک سرم فاقد آنتی‌بادی ضد BVDV با باکتری‌های حاوی پروتئین نوترکیب E2 و فاقد این پروتئین می‌باشند.

بحث

تاکنون تلاش‌های بسیاری برای دست‌یابی به واکسن‌های مؤثرتر برای پیش‌گیری از مشکلات ناشی از ویروس اسهال ویروسی گاو و یا ساخت کیت‌های تشخیص عفونت‌های BVDV صورت گرفته است. E2، با وزن مولکولی ۵۳ KDa (پس از گلیکوزیله شدن)، پروتئین ایمنوژن اصلی ویروس است و سبب القای آنتی‌بادی‌های محافظت کننده در حیوانات ایمن یا آلوده می‌گردد. به همین دلیل E2 به عنوان نمونه‌ی اصلی برای تولید واکسن‌های نسل جدید و یا به عنوان یک آنتی‌ژن برای استفاده در آزمایش‌های تشخیصی، مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه‌ی حاضر که گامی ابتدایی در راه مبارزه

با عفونت‌های ناشی از BVDV می‌باشد، ژن E2 با استفاده از وکتور بیانی پروکاریوتی pMal-c2X به صورت فیوژن همراه با پروتئین متصل شونده به مالتوز (Maltose binding protein; MBP) که توسط این پلاسمید بیان می‌گردد، در باکتری *E. Coli* بیان شد. تاکنون در چندین مطالعه‌ی دیگر نیز اقدام به کلونینگ ژن E2 شده؛ اما در هیچ یک از آن‌ها پلاسمید pMal-c2X مورد استفاده قرار نگرفته است. برای مثال Westbury و همکاران در سال ۱۹۹۴ ژن کامل پروتئین E2 را در *E. coli* به صورت یک پروتئین فیوژن همراه با پروتئین گلوتاتیون- اس - ترانسفراز بیان کردند. این محققان، هم‌چنین یک قطعه از ناحیه‌ی N-Terminal پروتئین E2 را که ۲۸ کیلو دالتون وزن داشت، به صورت جداگانه بیان کردند. نتایج آن مطالعه، حاکی از این بود که پروتئین‌های نوترکیب باکتریایی، خصوصیات ایمونولوژیک مشابهی با پروتئین طبیعی ویروس دارند و می‌توانند ابزار تشخیصی مفیدی محسوب شوند. Bolin و Ridpath در سال ۱۹۹۶ ژن E2 را با استفاده از سیستم باکولوویروس در سلول‌های حشره، بیان کردند و سپس این پروتئین را برای ایمنی کردن گوساله‌ها مورد استفاده قرار دادند. گوساله‌های ایمن شده با این پروتئین، آنتی‌بادی خنثی کننده‌ی ویروس را تولید کردند و تا حدی نسبت به عفونت با ویروس BVD مقاوم شدند. Thomas و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز از پروتئین E2 نوترکیب بیان شده در سیستم بیانی باکولوویروس و سلول پستانداران برای ایمنی‌زایی در گوساله، استفاده نمودند و نشان دادند که این پروتئین نوترکیب، قادر به محافظت گوساله‌های مواجهه شده با ویروس می‌باشد.

در تحقیق حاضر، به منظور فراهم ساختن زمینه‌ی مطالعات بیش‌تر روی این ویروس در ایران، ژن E2 سویه‌ی NADL ویروس BVD در سویه‌ی DH5α باکتری *E. Coli* بیان گردید. القای بیان پروتئین با IPTG نشان داد که باکتری ترانسفورمه شده با پلاسمید نوترکیب، به خوبی قادر به بیان پروتئین E2 می‌باشد و پروتئین بیان شده کاملاً به شکل محلول تولید می‌گردد. بر اساس نتایج ایمونوبلاتینگ، این پروتئین دارای ساختار آنتی‌ژنیک لازم برای واکنش با آنتی‌بادی‌های تولید شده در طی عفونت طبیعی با ویروس نیز است. پلاسمید pMALc2x استفاده شده در این تحقیق، دارای پروموتری قوی است که موجب بیان بیش‌تر پروتئین در مقایسه با بسیاری از پلاسمیدهای بیانی پروکاریوتی می‌گردد. یکی از معایب بیان پروتئین‌های هترولوگ در *E. Coli* تولید اشکال نامحلول پروتئین بیانی به شکل گنجیدگی است که نسبتاً به فراوانی، روی می‌دهد؛ اما استفاده از پلاسمید pMALc2x تا حد بسیار زیاد، موجب رفع این مشکل می‌شود؛ زیرا، MBP کد شونده توسط این پلاسمید به عنوان یکی از مؤثرترین عوامل محلول کننده‌ی پروتئین‌های با قابلیت تشکیل گنجیدگی، محسوب می‌شود و استفاده از پلاسمید pMALc2x تاحد زیادی به دلیل این ویژگی MBP می‌باشد (Fox et al. 2003). مزیت دیگر استفاده از پلاسمید pMALc2x این است که MBP ضمن کمک به بیان پروتئین‌های هترولوگ به شکل محلول، امکان خالص‌سازی پروتئین بیانی را نیز با استفاده از رزین آمیلوز به نحو مطلوب، میسر می‌کند. رزین آمیلوز، یکی از ارزان‌ترین رزین‌های مورد استفاده برای خالص‌سازی پروتئین‌های بیانی در *E. Coli* محسوب می‌شود. این رزین با جذب پروتئین‌های دارای دنباله‌ی MBP به خوبی و با بازده بالا موجب خالص‌سازی پروتئین‌های بیانی می‌گردد.

به طور کلی و با توجه به بیان موفق پروتئین E2 در این مطالعه، در آینده‌ی نزدیک پروتئین تولید شده پس از تخلیص در جهت طراحی آزمایش الیزا یا تولید آنتی‌بادی منوکلونال ضدویروس BVD مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت.

منابع

Bolin, S. and Ridpath, J.F. (1996). Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. Archives of Virology, 141(8), 1463-1477.

Bruschke, C.J.; Moormann, R.J.; van Oirschot, J.T. and van Rijn, P.A. (1997). A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. Vaccine, 15(17-18):1940-5.

Carlsson, U. (1991). Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhea virus. The Veterinary Record, 128: 145-147.

Childs, T. (1946). X disease in cattle-Saskatchewan. Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science, 10: 316-319.

Collett, M.S. (1992). Molecular genetics of pestiviruses. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 15: 145-154.

Collett, MS.; Wiskerchen, M.; Welniak, E. and Belzer, SK. (1991). Bovine viral diarrhea virus genomic organization. Archives of Virology. Supplementum, 3: 19-27.

Collett, M.S.; Larson, R.; Gold, C.; Strick, D.; Anderson, D.K. and Purchio, A.F. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. Virology, 165 (1): 191-199.

Depner, K.; Hubschle, OJB. and Liess, B. (1991). BVD-virus infection in goats-experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. Archives of Virology. Supplementum, 3: 253-256.

Fox, JD., Routzahn, KM., Bucher, MH. and Waugh, DS. (2003). Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. FEBS Letter, 537: 53-57.

Frolich, K.; Thiede, S.; Kozikowski, T. and Jakob, W. (2002). A review of mutual transmission of important infectious diseases between livestock and wildlife in Europe. Annals of the New York Academy of Sciences, 969: 4-13.

Goyal, S.M.; Bouljihad, M.; Haugerud, S. and Ridpath, J.F. (2002). Isolation of bovine viral diarrhea virus from an alpaca. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 14: 523-525.

Harpin, S.; Hurley, D.J.; Mbikay, M.; Talbot, B. and Elazhary, Y. (1999). Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. Journal of General Virology; 80, 3137-3144.

Hewicker-Trautwein, M.; Liess, B.; Frey, HR. and Trautwein, G. (1994). Virological and pathological findings in sheep fetuses following experimental infection of pregnant ewes with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 41: 264-276.

Lindenbach, BD. and Rice, CM. (2001). *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, Pp: 991-1041.

Loken, T. (1995). Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, 11: 597-614.

Meyers, G.; Tautz, N.; Stark, R.; Brownlie, J.; Dubovi, E.J.; Collett, M.S. and Thiel, H.J. (1992). Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. Virology, 191 (1): 368-386.

Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. (2007). Veterinary Medicine. 10th ed., W.B. Saunders, London, Pp: 1248-1277.

Thiel, H.J.; Collett, M.S.; Gould, E.A.; Heinz, F.X.; Houghton, M. and Meyers, G, (2005). Family *Flaviviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al., eds. Virus Taxonomy. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Academic Press, 979-996.

Thomas, L.; Young, N.J.; Heaney, J.; Collins, M.E. and Brownlie, J. (2009). Evaluation of efficacy of mammalian and baculovirus expressed E2 subunit vaccine candidates to bovine viral diarrhoea virus. Vaccine; 27: 2387-2393.

Van Campen, H.; Ridpath, J.F. and Williams, E. (2001). Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. Journal of Wildlife Diseases, 37: 306-311.

Westbury, H.A.; Morrissy, C.J. and Gould, A.R. (1994). High level expression of the envelope glycoprotein (gp53) of bovine viral diarrhea virus (Singer) and its potential use as diagnostic reagent. Virus Research, 34 (2): 178-186.

Zoth, C.S. and Taboga, O. (2006). Multiple recombinant ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies in cattle sera. Journal of Virological Methods, 138: 99-108.

Yu, M.; Gould, A.R.; Morrissy, C.J. and Westbury, H.A. (1994). High level expression of the envelope glycoprotein (gp53) of bovine viral diarrhoea virus (Singer) and its potential use as diagnostic reagent.Virus Research, 34(2): 178-186.

Expression of the gene encoding E2 protein of bovine viral diarrhea virus in *E.coli*

Rashno, M.[1]; Seyfi Abad Shapouri, M.R.[2]; Ghorbanpoor, M.[2]; Lotfi, M.[3]; Moori Bakhtyari, N.[4] and Ghoreishi, S.M.[5]

Received: 27.11.2014 Accepted: 25.02.2015

Abstract

Bovine viral diarrhea is one of the most important diseases of cattle caused by a pestivirus (BVDV) within the family Falviviridae. BVDV also affects reproduction system and results in a great loss. E2 protein is the most important structural protein of the virus for induction of protective immunity. The purpose of this study was to clone and express the E2 protein gene in *E.coli*. The gene was amplified by RT-PCR and cloned into pMAL-c2x plasmid. The identity of the cloned gene and the accuracy of cloning were confirmed by sequencing and the protein expression in *E.coli* was assessed by SDS-PAGE. Antigenic nature of the recombinant E2 was determined by immunoblotting and the protein was shown to be soluble, after sonication of bacterial cells. Results indicate that the aforementioned recombinant plasmid expresses the E2 protein, efficiently.

Key words: Bovine viral diarrhea virus, E2 protein, Cloning, Expression, *E. coli*

1- DVSc Graduated of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
4- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
5- DVSc Graduated of Large Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Seyfi Abad Shapouri, M.R., E-mail: masoudrs@scu.ac.ir