دوره سیزدهم ـ شماره ۴ ـ زمستان ۱۳۹۶
10.22055/ivj.2017.60443.1793

طراحی پلاسمید یوکاریوتی بیان کننده‌ی اپی‌توپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی در سلول‌های جنینی کلیه‌ی انسان

رضا پسندیده[۱*]، محمدتقی بیگی‌نصیری[۲]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۳]، جمال فیاضی[۴]، هدایت‌الله روشنفکر[۲] و محسن لطفی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۴

چکیده

گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی (BEFV) به عنوان یک نامزد احتمالی جهت ایمن‌سازی حیوانات در برابر بیماری تب بی‌دوام شناخته شده است. در سال‌های اخیر، این پروتئین جهت تولید یک واکسن نوترکیب مورد توجه ویژه بوده است. هدف از مطالعه‌ی حاضر، ساخت یک پلاسمید یوکاریوتی بیان کننده‌ی اپی‌توپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی، برای استفاده به عنوان یک واکسن DNA احتمالی در مطالعات آینده بود. به این منظور، اپی‌توپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G در ناقل بیانی یوکاریوتی pEGFP-N1، تحت کنترل پروموتر سیتومگالوویروس انسانی (CMV) کلون شد. سپس سازه‌ی نوترکیب pEGFPN1-G1 به سلول‌های جنینی کلیه‌ی انسان (HEK 293) انتقال یافت و کارایی بیان پروتئین با استفاده از روش‌های ایمونوفلورسنس غیرمستقیم (IFA) و ایمنوبلات بررسی شد. مشاهده‌ی فلورسنس درون سیتوپلاسم سلول‌های ترانسفکت شده و ظهور یک باند مجزا با وزن مولکولی تقریبی ۲۶ کیلو دالتون در آزمایش ایمنوبلات در واکنش به یک سرم موش ضد پروتئین G1، نشان‌دهنده‌ی بیان موفق پروتئین G1 توسط این سازه‌ی نوترکیب در سلول‌های میزبان بود.

کلمات کلیدی: ویروس تب بی‌دوام گاوی (BEFV)، پروتئین نوترکیب G1، واکسن DNA

مقدمه

ویروس تب بی‌دوام گاوی (BEFV) یک رابدوویروس منتقل شونده توسط بندپایان است که در جنس افمروویروس‌ها طبقه‌بندی می‌شود. این ویروس در طبیعت تنها از طریق نیش حشرات دور پرواز گسترش می‌یابد. مشابه دیگر رابدویروس‌ها، ویریون‌های BEF شبیه گلوله‌ی تفنگ یا مخروطی شکل می‌باشند. ژنوم این ویروس از نوع RNA تک رشته‌ای منفی با طول ۱۴۹۰۰ 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 (Cybinski et al. 1992, Kongsuwan et al. 1998, Dhillon et al. 2000). G1 یک جایگاه خنثی‌سازی خطی (Y^{487}-K^{503}) است که در انتهای دومین ترایمریزاسیون، دقیقاً قبل از ناحیه‌ی C– انتهایی پروتئین G قرار دارد (Trinidad et al. 2014). این ویروس موجب بروز تب حاد در گاو و گاومیش آبی می‌شود که تحت عنوان بیماری تب بی‌دوام گاوی (BEF) شناخته می‌شود. نام‌های محلی آن، بیماری ۳ روزه، تب بومی

[۱*] دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
E-mail: Rezapasandideh63@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] استاد گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
[۳] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۴] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
[۵] استادیار پژوهشی مدیریت کنترل کیفی فرآورده‌های بیولوژیک، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

گاوی، آنفولانزای گاوی یا بیماری سفت و سخت می‌باشند (Walker and Klement 2015).

بیماری تب بی‌دوام گاوی در دامنه‌ی وسیعی از جهان، از قسمت‌های جنوبی افریقا تا دلتای رود نیل، از خاورمیانه تا جنوب و جنوب شرق آسیا، در شمال و شرق استرالیا و در بیش‌تر چین، تایوان، کره و جنوب ژاپن، گسترده شده است (Walker and Klement 2015). طبق گزارش‌های سازمان دامپزشکی ایران، این بیماری تاکنون در دامداری‌های واقع در سطح استان‌های تهران، فارس، ایلام، قم، خراسان شمالی، یزد، خوزستان، گلستان، مازندران، البرز و اردبیل دیده شده است. تب بی‌دوام 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. معمولاً این بیماری با شروع و بهبود سریع، طی تنها ۱ تا ۳ روز، شناخته می‌شود اما گزارش‌هایی نیز از فلج و عدم تعادل طولانی مدت در برخی از حیوانات پس از مرحله‌ی حاد عفونت ارایه شده است. درصد ناخوشی و شیوع بیماری ممکن است بسیار بالا (تقریباً ۱۰۰ درصد) باشد ولی درصد مرگ و میر معمولاً پایین (کم‌تر از ۱ درصد) است (Walker and Klement 2015). در موارد بسیار شدید، ممکن است بیماری موجب مرگ و میر به دلیل بی‌اشتهایی و یا ذات‌الریه شود اما در حال حاضر، اطلاعات کمی در مورد علت مستقیم مرگ وجود دارد. اثرات اقتصادی BEF می‌تواند قابل توجه باشد که در درجه‌ی اول به علت قطع شیردهی در گاوهای شیری، از دست دادن شرایط بدنی در گاو گوشتی و عدم تحرک گاومیش‌های آبی که برای بارکشی استفاده می‌شوند، می‌باشد (Aziz-Boaron et al. 2013, Walker 2005).

پیش‌گیری و کنترل بیماری تب بی‌دوام از طریق واکسیناسیون و درمان دارویی حیوانات آلوده صورت می‌گیرد (Aziz-Boaron et al. 2013, Wallace and Viljoen 2005). تا کنون تحقیقات مختلفی در زمینه‌ی ساخت انواع واکسن از جمله واکسن‌های زنده ضعیف شده، واکسن‌های غیرفعال شده، واکسن‌های زیر واحد مبتنی بر پروتئین G و واکسن‌های نوترکیب برای این بیماری انجام شده‌اند (Walker and Klement 2015). در مطالعات پیشین مشخص شده است که پروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی هدف آنتی‌بادی‌های خنثی کننده‌ی ویروسی می‌باشد (Cybinski et al. 1992, Uren et al. 1994). علاوه بر این، ویژگی‌های محافظتی بسیار بالای پروتئین G طبیعی ویروس BEF نشان داد که ممکن است محصول نوترکیب این پروتئین بتواند به عنوان یک واکسن آنتی‌ژنی، مفید باشد (Johal et al. 2008). بر این اساس، واکسن DNA و یا نوترکیب مبتنی بر پروتئین G ممکن است یک جایگزین مناسب برای واکسن‌های متداول این بیماری باشد (Uren et al. 1994). امروزه واکسن‌های DNA یا واکسن‌های نسل سوم به دلیل مزایای فراوان از جمله ایمن و بی خطر بودن، پایداری، هزینه‌های پایین‌تر نسبت به سایر واکسن‌ها و ایمنی‌زایی طولانی‌تر مورد توجه گسترده قرار گرفته‌اند (Gurunathan et al. 2000). این نوع از واکسن‌ها توانایی القای پاسخ‌های ایمنی خونی و سلولی را دارند (Khan 2013). از طرفی، واکسن‌های DNA با موفقیت برای ایمن نمودن تعدادی از گونه‌های حیوانی در برابر برخی از عوامل عفونی استفاده شده‌اند (Fynan et al. 1993, Robinson et al. 1993, Corr et al. 1996, Sakaguchi et al. 1996). از این رو، هدف از مطالعه‌ی حاضر، ساخت یک پلاسمید یوکاریوتی بیان کننده‌ی اپی‌توپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی بود. این مطالعه اولین تحقیق در زمینه‌ی طراحی و ساخت یک پلاسمید یوکاریوتی مبتنی بر اپی‌توپ G1 برای استفاده به عنوان یک واکسن DNA احتمالی علیه ویروس BEF در مطالعات آینده است.

مواد و روش کار

سویه‌ی ویروس تب بی‌دوام گاوی مورد استفاده در این مطالعه توسط موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم-

سازی رازی (کرج، ایران) از کشور ژاپن تهیه شده بود. نتایج به دست آمده از توالی‌یابی ژن G این ویروس و BLAST کردن آن با توالی‌های ژن G سویه‌های مختلف از ویروس BEF ثبت شده در پایگاه بانک ژن NCBI نشان داد که سویه‌ی ویروسی مورد استفاده در این مطالعه بیش‌ترین قرابت را با سویه‌ی YHL (یاماگوچی، ژاپن، ۱۹۶۶) داشت (پسندیده و همکاران ۱۳۹۵). تکثیر این ویروس در سلول‌های ریه‌ی همستر (HmLu-1)، کشت داده شده در محیط کشت سلولی RPMI (Bio Idea، ایران) حاوی ۵ درصد سرم جنین گاو صورت گرفت. سلول‌های جنینی کلیه‌ی انسان (HEK 293) به عنوان کنترل مثبت در آزمایش‌های ایمنی‌سنجی و ترانسفکشن پلاسمید بیانی استفاده شدند. این رده‌های سلولی از بانک سلولی ایران (NCBI) وابسته به انستیتو پاستور خریداری شدند.

پلاسمید بیانی یوکاریوتی pEGFP-N1 به عنوان ناقل برای کلونینگ اپی‌توپ G1 از شرکت تراژن ساز ویستا (ایران) و سویه‌ی باکتریایی DH5α *اشرشیاکلی* به عنوان میزبان جهت کلونینگ و تکثیر پلاسمید بیانی از شرکت سیناژن (ایران) تهیه شدند.

توالی نوکلئوتیدی ژن G با شماره‌ی دسترسی AB462028 از بانک ژن استخراج و برای طراحی پرایمرهای اختصاصی تکثیرکننده‌ی اپی‌توپ G1 (نوکلئوتیدهای ۱۱۶۸ تا ۱۵۸۸) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور کلونینگ قطعه مربوطه در پلاسمید pEGFP-N1، توالی محل برش آنزیم‌های محدودکننده‌ی مناسب به انتهای '۵ پرایمرها افزوده شد. توالی نهایی پرایمرها توسط نرم‌افزار Oligo Analyzer 3.0 بررسی و سفارش ساخت به شرکت دنازیست آسیا (ایران) داده شد (جدول ۱).

جدول ۱: پرایمرهای G1F و G1R جهت تکثیر اپی‌توپ G1. زیر توالی برشی آنزیم‌های محدودکننده *Kpn*I و *Bam*HI به ترتیب در ابتدای پرایمرهای رفت و برگشت خط کشیده شده است.

پرایمر	توالی
G1F	5'-GTGGGTACCGCCACCATGGTGAGAGCTTGGTGTGAATACA-3'
G1R	5'-CATTGGATCCTCACCAACCTACAACAGCAGATA-3'

یک سازه‌ی نوترکیب حاوی ژن گلیکوپروتئین G (pTZ57R/T-G)، طراحی شده در مطالعه‌ی قبلی (پسندیده و همکاران ۱۳۹۵)، به عنوان الگو برای تکثیر ناحیه‌ی کدکننده‌ی اپی‌توپ G1 توسط PCR استفاده شد. این واکنش به این صورت انجام شد: ۱ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-G، ۰/۸ پیکومول از هر کدام از آغازگرها، ۱ میکرولیتر آنزیم *Pfu* DNA پلیمراز (۵U)، ۲/۵ میکرولیتر بافر *Pfu* PCR 10X (بدون $MgSO_4$)، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs، ۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۱۶/۲ میکرولیتر آب دو بار تقطیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مخلوط و تکثیر طی ۳۰ چرخه‌ی دمایی شامل ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، ۵۰°C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲°C برای ۹۰ ثانیه انجام شد. مراحل دمایی پیش و پس از تکثیر به ترتیب شامل ۹۵°C برای ۳ دقیقه و ۷۲°C برای ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR توسط کیت (GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR (Vivantis، مالزی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی شد.

به منظور آماده‌سازی پلاسمید یوکاریوتی pEGFP-N1، ابتدا این پلاسمید در باکتری *اشرشیاکلی* DH5α و در محیط مایع LB دارای کانامایسین، کشت شبانه داده شد و سپس توسط کیت استخراج پلاسمید GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis، مالزی) خالص‌سازی گردید. به منظور انتقال ژن G1 به ناقل، ابتدا محصول PCR تخلیص شده و پلاسمید pEGFP-N1، هر دو توسط

آنزیم‌های برشی *Kpn*I و *Bam*HI هضم و با استفاده از کیت خالص‌سازی شدند. پس از این مرحله، عمل اتصال پلاسمید و DNA با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز (۱۰X) طبق دستورالعمل آنزیم صورت گرفت. سپس محصول اتصال، با فرض تشکیل پلاسمیدهای حلقوی، با روش شوک حرارتی به باکتری *اشرشیاکلی* سویه‌ی DH5α پذیرا شده با کلریدکلسیم انتقال یافت. در پایان، باکتری‌ها در محیط LB جامد کانامایسین‌دار کشت داده شدند. پس از رشد کلونی‌های باکتریایی، غربالگری کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب با روش PCR صورت گرفت. پس از اطمینان از صحت کلونینگ، پلاسمید نوترکیب با کیت استخراج پلاسمید Endofree (Qiagen، آلمان) خالص‌سازی شد و به منظور بررسی وقوع جهش‌های احتمالی برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست (ایران) ارسال گردید.

به منظور ورود سازه‌ی نوترکیب حاوی ژن G1 به سلول‌های جنینی کلیه‌ی انسان، ابتدا این سلول‌ها در ظرف کشت سلولی ۹۶ گوده، در انکوباتور مرطوب با دمای ۳۷°C و ۵ درصد گاز دی‌اکسیدکربن، برای رسیدن به تراکم ۹۰ درصد در هنگام ترانسفکشن، کشت داده شدند. محیط کشت مورد استفاده برای سلول‌ها، محیط RPMI واجد ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله (FBS) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. ترانسفکشن سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen، امریکا) طبق روش زیر انجام شد: ابتدا به ازای هر گوده، ۰/۵ میکرولیتر از لیپوفکتامین به ۲۵ میکرولیتر از محیط کشت افزوده شد و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. همچنین به ازای هر گوده، ۰/۳ میکروگرم از پلاسمید با ۲۵ میکرولیتر از محیط کشت مخلوط شد. سپس رقت‌های پلاسمید و لیپوفکتامین با یکدیگر مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه جهت تشکیل کمپلکس پلاسمید-لیپوفکتامین، در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، ۵۰ میکرولیتر از مخلوط فوق به هر گوده اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°C ادامه پیدا کرد. یک شاخص مناسب برای بررسی کارایی ترانسفکشن، استفاده از پلاسمید pEGFP-N1 کدکننده‌ی پروتئین فلورسنسی سبز (GFP) است که در معرض اشعه‌ی فرابنفش، نور سبز درخشان را از خود ساطع می‌کند. بنابراین به طور همزمان عمل ترانسفکشن با پلاسمید pEGFP-N1 (به منظور بررسی کارایی ترانسفکشن) و سلول‌های بدون پلاسمید (به عنوان کنترل منفی) نیز صورت گرفت.

به منظور ردیابی پروتئین G1 بیان شده در سلول‌های یوکاریوتی، از یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی موش علیه پروتئین G1 در آزمایش‌های ایمنی‌سنجی استفاده شد. برای تهیه‌ی این آنتی‌بادی، پروتئین G1 هم‌جوش با پروتئین MBP (MBP-G1) که در تحقیق گذشته در باکتری *اشرشیاکلی* تولید شده بود (Beygi Nassiri et al. 2016)، پس از مخلوط کردن با ادجوانت ناقص فروند، چهار مرتبه با فواصل زمانی دو هفته، به سه سر موش نژاد Balb/c تزریق شد. یک هفته پس از ایمن‌سازی چهارم، از حیوانات خون گرفته شد و سرم آن‌ها در یک آزمایش ELISA غیرمستقیم خانگی و با استفاده از پروتئین MBP-G1 نوترکیب، به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده‌ی کف پلیت، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ی سرم با بالاترین جذب نوری در ELISA به عنوان آنتی‌بادی علیه G1 در آزمایش‌های ایمنی‌سنجی برای ردیابی پروتئین بیان شده در سلول‌های HEK 293 استفاده شد.

به منظور بررسی بیان پروتئین G1 از روش ایمونوفلورسنس غیرمستقیم (IFA) استفاده شد. به این منظور پس از تخلیه‌ی مایع رویی حفرات، سلول‌ها با استفاده از متانول به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در کف حفرات ثابت شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با فسفات بافر سالین (PBS) حاوی ۰/۵ درصد تریتون X-۱۰۰ تراوا شدند. به منظور مهار کردن اتصال‌های غیراختصاصی، از سرم بز ۱۰ درصد در PBS به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. سپس سلول‌ها با آنتی‌بادی

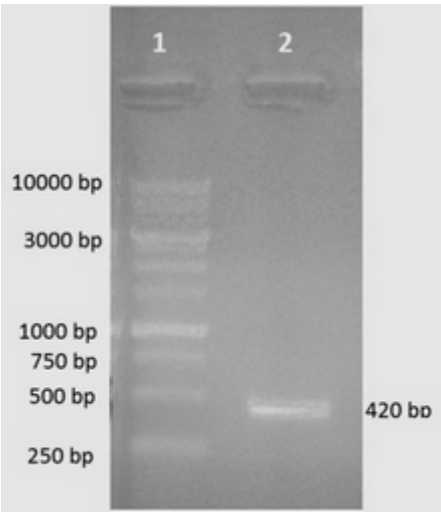
پلی‌کلونال اختصاصی موش علیه پروتئین G1 (با رقت ۱ به ۲۰ در PBS حاوی ۱ درصد آلبومین سرم گاوی و ۱/۵ درصد سرم بز) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس آنتی IgG موشی کونژوگه به FITC (زیست فناوران سینا، ایران) با رقت ۱ به ۲۰ در PBS حاوی ۱ درصد آلبومین سرم گاوی و ۱/۵ درصد سرم بز به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C به عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد. پس از سه مرتبه شستشو با PBS، سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنس معکوس بررسی شدند.

بیان پروتئین G1 با استفاده از آزمایش ایمنوبلات نیز مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور سلول‌های ثابت شده، توسط بافر ۲X سولفات دودسیل سولفات (SDS) از کف حفرات جدا و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. از سوسپانسیون سلولی تهیه شده جهت الکتروفوروز روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE استفاده شد. سپس باندهای پروتئینی تفکیک شده طی سه ساعت با جریان الکتریسیته ۶۰ ولت به غشای نیتروسلولزی انتقال پیدا کردند. پس از انتقال، غشای نیتروسلولزی یک شب در دمای ۴°C در محلول تریس بافر سالین (TBS) حاوی ۵ درصد شیرخشک، به عنوان بافر بلوک کننده، قرار داده شد تا سطوحی از غشا که عاری از پروتئین بودند، پوشانده شوند. پس از ۳ بار شستشو با بافر TBS حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰ (TBST)، آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی موش علیه پروتئین G1 (با رقت ۱ به ۱۰۰ در TBS حاوی ۰/۲ درصد تریتون X-۱۰۰، ۲ درصد آلبومین سرم گاوی و ۱۰ درصد سرم اسب) به غشاء اضافه شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و ۳ بار شستشو با بافر TBST، غشا به مدت ۱ ساعت در مجاورت محلول کونژوگه پراکسیداز ضد IgG موش (Bio-Rad، امریکا) (با رقت ۱/۳۰۰۰ در TBS حاوی ۰/۲ درصد تریتون X-۱۰۰، ۲ درصد آلبومین سرم گاوی و ۵ درصد سرم اسب) قرار داده شد. در انتها پس از ۳ بار شستشو با بافر TBST، جهت مشاهده باندهای پروتئین، از کیت شناسایی ایمنوبلات ECL (زیست فناوران نجم، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

نتایج

ساخت سازه‌ی بیانی

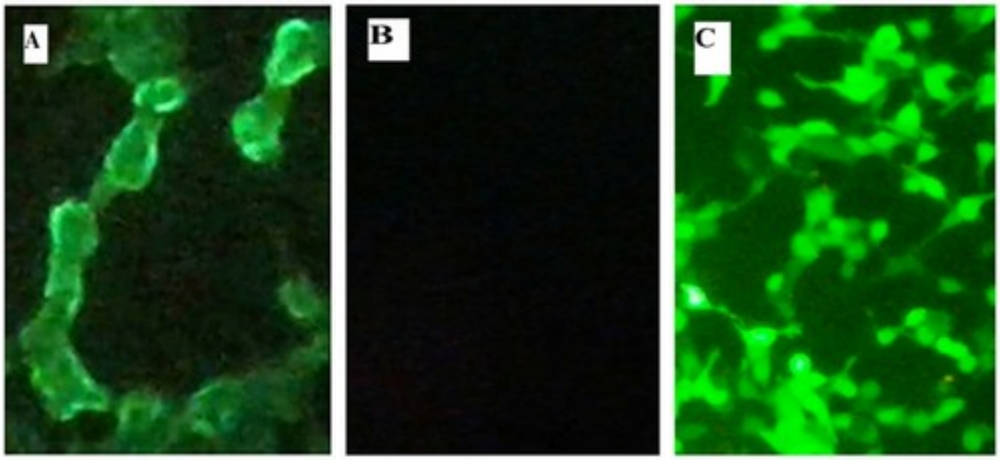
پس از تکثیر اپی‌توپ G1 توسط واکنش PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار نردبان ژنی (سیناکلون، ایران) الکتروفورز شد. نتایج الکتروفورز نشان داد که قطعه‌ی DNA مورد انتظار با طول ۴۲۰ جفت باز با موفقیت توسط PCR تکثیر شده است (تصویر ۱). پس از انجام مرحله‌ی اتصال بین محصول PCR و پلاسمید یوکاریوتی pEGFP-N1، محصولات اتصال یافته به سویه‌ی DH5α باکتری *اشرشیاکلی* منتقل شدند. ظهور کلونی‌های رشد یافته روی محیط جامد LB کانامایسین‌دار، نشان‌دهنده‌ی ورود موفقیت‌آمیز پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها بود. غربالگری کلونی‌های باکتریایی مذکور با روش PCR، نشان از صحت کلونینگ ژن G1 در سویه‌ی DH5α باکتری *اشرشیاکلی* داشت. توالی‌یابی کلونی‌های مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب با استفاده از پرایمر عمومی توسط شرکت تکاپوزیست، نشان‌دهنده‌ی عدم بروز جهش در نتیجه‌ی PCR بود.



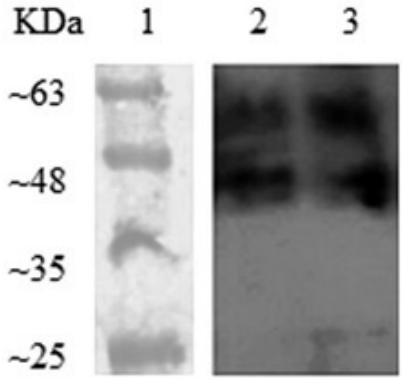
تصویر ۱: محصول PCR حاصل از تکثیر ژن G1. ستون ۱: نردبان ژنی (سیناکلون، ایران)؛ ستون ۲: محصول ۴۲۰ bp ژن G1.

بیان پروتئین نوترکیب G1 در سلول‌های یوکاریوتی

بیان پروتئین G1 توسط روش‌های ایمونوفلورسنس غیرمستقیم (IFA) و ایمنوبلات بررسی شد. همان طور که در تصویر ۲ نشان داده شده است، حضور فلورسنس در سلول‌ها نشان‌دهنده‌ی ترانسفکت موفق سازه‌ی نوترکیب pEGFPN1-G1 به سلول‌های HEK 293 و بیان پروتئین G1 در سیتوپلاسم سلول‌های میزبان می‌باشد (تصویر ۲). در سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pEGFP-N1، نور سبز درخشان در معرض اشعه‌ی فرابنفش توسط میکروسکوپ فلورسنس، مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی کارایی بالای ترانسفکشن با استفاده از معرف لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در این مطالعه بود (تصویر ۲).



تصویر ۲: بررسی بیان پروتئین G1 توسط روش ایمنوفلورسنس. (A) سلول‌های HEK 293 ترانسفکت شده با سازه‌ی pEGFPN1-G1 نوترکیب. (B) سلول‌های HEK 293 ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی. (C) سلول‌های HEK 293 ترانسفکت شده با پلاسمید pEGFP-N1.



تصویر ۳: بررسی بیان پروتئین G1 توسط آزمایش ایمنوبلات. ستون ۱: نشان‌گر پلی‌پپتیدی. ستون ۲: محتویات سلول‌های HEK 293 ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی. ستون ۳: محتویات سلول‌های HEK 293 ترانسفکت شده با سازه نوترکیب pEGFPN1-G1.

با استفاده از آزمایش وسترن بلات، محتویات پروتئینی سلول‌های HEK 293 روی غشای نیتروسلولزی منتقل شدند. همان طور که در تصویر ۳ نشان داده شده است، در سلول‌های ترانسفکت شده با pEGFPN1-G1 نسبت به سلول‌های ترانسفکت نشده، یک باند مجزا با وزن مولکولی تقریبی ۲۶ کیلو دالتون در واکنش با آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی علیه پروتئین G1 ظاهر شد. این نتیجه، بیان پروتئین G1 توسط ناقل نوترکیب pEGFPN1-G1 را در سلول‌های یوکاریوتی تأیید می‌کند. علاوه بر باند مذکور، باندهایی با وزن‌های مولکولی بیش‌تر نیز در آزمایش ایمنوبلات دیده شد که ظهور آن‌ها به دلیل واکنش غیراختصاصی پروتئین‌های سلول‌های HEK 293 با سرم پلی‌کلونال مورد استفاده در این آزمایش بود (تصویر ۳).

بحث

گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی یکی از پنج پروتئین ساختاری این ویروس است و پنج جایگاه آنتی‌ژنیکی (G1, G2, G3a, G3b, G4) در سطح آن واقع شده‌اند (Cybinski et al. 1992, Trinidad et al. 2014). آنتی‌ژن G1، اختصاصی ویروس BEF است و تنها با آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ضد این ویروس واکنش می‌دهد (Yin and Liu 1997, Hsieh et al. 2006). در مطالعه‌ی حاضر، به منظور انتقال سازه‌ی نوترکیب pEGFPN1-G1 به داخل سلول‌های یوکاریوتی از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ که یک معرف مبتنی بر لیپوزوم کاتیونی است، استفاده شد که موجب انتقال ساده و کارآمد برای ژن خارجی به داخل سلول‌های میزبان می‌شود (Dalby et al. 2004). همچنین سلول‌های HEK 293 برای ترانسفکشن و به عنوان میزبان بیانی مورد استفاده قرار گرفتند. ویژگی‌های عمده‌ای که این رده سلولی را برای انتقال و بیان مناسب می‌کنند شامل تکثیر و نگهداری سریع و آسان، کارایی بالا در ترانسفکشن و تولید پروتئین و انجام بسیاری از تاخوردگی‌های پس از ترجمه و پردازش‌هایی که برای تولید یک پروتئین کاربردی و کامل مورد نیاز است، می‌باشند (Thomas and Smart 2005). در این مطالعه، بیان پروتئین G1 با استفاده از روش‌های ایمنی‌شناسی ایمونوفلورسنس غیرمستقیم (IFA) و ایمنوبلات به خوبی تأیید شد. حضور فلورسنس درون سیتوپلاسم سلول‌های ترانسفکت شده در واکنش با آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی موش علیه پروتئین G1، مؤید بیان پروتئین بود. با استفاده از آزمایش ایمنوبلات یک باند مجزا با وزن مولکولی تقریبی ۲۶ کیلو دالتون در مواد استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده قابل رویت بود. این مشاهده با وزن مولکولی پروتئین نوترکیب G1 بیان شده در مخمر *پیکیا پاستوریس* GS115 توسط Zheng و همکاران در سال ۲۰۰۷a کاملاً مطابقت داشت. وزن مولکولی مورد انتظار برای پروتئین G1 حدود ۱۶ کیلو دالتون است ولی با توجه به این که توالی این ژن شامل سه جایگاه بالقوه برای گلیکوزیلاسیون می‌باشد (Jin et al. 2000)، قطعاً می‌توان نتیجه‌گیری نمود که آنتی‌ژن نوترکیب G1، گلیکوپروتئینی است که در سلول‌های میزبان برای به دست آوردن پیکربندی طبیعی، گلیکوزیله شده است. مطالعات متعددی تأیید کرده‌اند که گلیکوزیلاسیون می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر ساختار، عملکرد، ثبات، خاصیت آنتی‌ژنی و ایمنی‌زایی مولکول‌های گلیکوپروتئینی ویروسی مختلف داشته باشد. علاوه بر این، مشخص شده است که در بسیاری از عفونت‌ها، پاسخ‌های ایمنی بیش‌تر علیه بخش گلیکوزیله پروتئین ایجاد می‌شوند (Goffard et al. 2005, Dowling et al. 2007, Marth and Grewal 2008, Vigerust 2011). گلیکوپروتئین G1 بیان شده توسط سازه‌ی نوترکیب pEGFPN1-G1، ساختاری مشابه پروتئین طبیعی دارد؛ بنابراین در صورت استفاده به عنوان یک واکسن DNA، ممکن است بتواند پاسخ‌های ایمنی را به شکل مناسبی القا کند.

تا کنون مطالعاتی در زمینه‌ی تولید پروتئین G1 در سیستم‌های بیانی مختلف گزارش شده است. Zheng و همکاران در سال ۲۰۰۷a پروتئین G1 ویروس BEF را توسط سازه‌ی نوترکیب pGEX-G1 در سویه BL21 (DE3) از باکتری *اشرشیاکلی* بیان کردند. 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 و اختصاصیت و فعالیت واکنشی مناسبی را با یک سرم ضد ویروس BEF در آزمایش ایمنوبلات نشان داد. Beygi Nassiri و همکاران در سال ۲۰۱۶ توانستند پروتئین G1 را توسط سازه‌ی نوترکیب pMALc2x-G1 در سویه‌ی Rosetta از باکتری *اشرشیاکلی* بیان کنند. وزن مولکولی پروتئین بیان شده در حدود ۵۸ کیلو دالتون بود که با وزن مورد انتظار برای پروتئین همجوش (شامل

۱۶~ کیلو دالتون برای پروتئین G1 و ۴۲~ کیلو دالتون برای پروتئین MBP بیان شده توسط پلاسمید pMALc2x) هم‌خوانی داشت و دارای واکنش اختصاصی با یک سرم موشی ضد ویروس BEF بود. Zheng و همکاران در سال ۲۰۰۷b ژن اپی‌توپ G1 از ویروس BEF را توسط ناقل بیانی نوترکیب pPIC9K-G1 در مخمر *پیکیا پاستوریس* GS115 بیان کردند. آن‌ها گزارش کردند که پروتئینی با وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون بیان شد که بسیار بزرگ‌تر از اندازه‌ی پیش‌بینی شده بود. اما پس از دِگلیکوزیلاسیون توسط آنزیم *Endo H*، وزن مولکولی پروتئین به ۱۶ کیلو دالتون کاهش یافت.

گزارش‌های متناقضی در مورد نقش آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در محافظت در برابر بیماری تب بی‌دوام گاوی وجود دارند. با این حال، محتمل است که پاسخ‌های با واسطه‌ی سلولی نیز در ایجاد ایمنی نقش داشته و برای حفاظت در مقابل این بیماری مورد نیاز باشند (Della-Porta and Snowdon 1979)، به ویژه برای عوارض بلند مدت که در برخی از حیوانات رخ می‌دهند. با توجه به توانایی بالقوه‌ی پروتئین G در حفاظت و نیز توانایی واکسن‌های DNA در القای پاسخ‌های ایمنی خونی و سلولی، در مطالعات آینده می‌توان ایمنی‌زایی سازه‌ی نوترکیب بیان کننده‌ی پروتئین G1 در این تحقیق را در مدل‌های حیوانی بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری و مساعدت کارشناس و تکنسین‌های محترم بخش‌های میکروب‌شناسی و رادیولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز، کمال تشکر را به جا آورند.

منابع

پسندیده، رضا؛ بیگی‌نصیری، محمدتقی؛ صیفی-آبادشاپوری، مسعودرضا؛ فیاضی، جمال؛ روشنفکر، هدایت‌الله و لطفی، محسن (۱۳۹۵). همسانه‌سازی مولکولی و تعیین توالی ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی در *اشرشیاکلی*. مجله پژوهش‌های علوم دامی ایران، جلد ۸، شماره ۳، صفحات ۵۲۰-۵۱۱.

Aziz-Boaron, O.; Leibovitz, K.; Gelman, B.; Kedmi, M. and Klement, E. (2013). Safety, immunogenicity and duration of immunity elicited by an inactivated bovine ephemeral fever vaccine. PloS One, 8(12): e82217.

Beygi Nassiri, M.T.; Pasandideh, R. and Seyfi Abad Shapouri, M.R. (2016). Cloning and expression of the G1 Epitope of Bovine ephemeral fever virus G glycoprotein in *Escherichia Coli*. Genetics in the 3rd Millennium, 14(2): 4250-4255.

Corr, M.; Lee, D.J.; Carson, D.A. and Tighe, H. (1996). Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. The Journal of Experimental Medicine, 184(4): 1555-1560.

Cybinski, D.H.; Davis, S.S. and Zakrzewski, H. (1992). Antigenic variation of the bovine ephemeral fever virus glycoprotein. Archives of Virology, 124(3-4): 211-224.

Dalby, B.; Cates, S.; Harris, A.; Ohki, E.C.; Tilkins, M.L.; Price, P.J. et al. (2004). Advanced transfection with lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Methods, 33(2): 95-103.

Della-Porta, A.J. and Snowdon, W. (1979). An experimental inactivated virus vaccine against bovine ephemeral fever 2. Do neutralizing antibodies protect against infection? Veterinary Microbiology, 4(3): 197-208.

Dhillon, J.; Cowley, J.A.; Wang, Y. and Walker, P.J. (2000). RNA polymerase (L) gene and genome terminal sequences of ephemeroviruses bovine ephemeral fever virus and Adelaide River virus indicate a close relationship to vesiculoviruses. Virus Research, 70(1): 87-95.

Dowling, W.; Thompson, E.; Badger, C.; Mellquist, J.L.; Garrison, A.R.; Smith, J.M. et al. (2007). Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. Journal of Virology, 81(4): 1821-1837.

Fynan, E.F.; Webster, R.G.; Fuller, D.H.; Haynes, J.R.; Santoro, J.C. and Robinson, H.L. (1993). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(24): 11478-11482.

Goffard, A.; Callens, N.; Bartosch, B.; Wychowski, C.; Cosset, F.L.; Montpellier, C. et al. (2005). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. Journal of Virology, 79(13): 8400–8409.

Gurunathan, S.; Klinman, D.M. and Seder, R.A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization. Annual Review of Immunology, 18(1): 927-974.

Hsieh, Y.C.; Wang, S.Y.; Lee, Y.F.; Chen, S.H.; Mak, P.O. and Chu, C.Y. (2006). DNA sequence analysis of glycoprotein G gene of bovie ephemeral fever virus and development of a double oil emulsion vaccine against bovine ephemeral fever. Journal of Veterinary Medical Science, 68(6): 543-548.

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. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 22: 43-47.

Johal, J.; Gresty, K.; Kongsuwan, K. and Walker, P.J. (2008). Antigenic characterization of bovine ephemeral fever rhabdovirus G and GNS glycoproteins expressed from recombinant baculoviruses. Archives of Virology, 153(9): 1657-1665.

Khan, K.H. (2013). DNA vaccines: roles against diseases. Germs, 3(1): 26-35.

Kongsuwan, K.; Cybinski, D.H.; Cooper, J. and Walker, P.J. (1998). Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. Journal of General Virology, 79(11): 2573-2581.

Marth, J.D. and Grewal, P.K. (2008). Mammalian glycosylation in immunity. Nature Reviews Immunology, 8(11): 874-887.

Robinson, H.L.; Hunt, L.A. and Webster, R.G. (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine, 11(9): 957-960.

Sakaguchi, M.; Nakamura, H.; Sonoda, K.; Hamada, F. and Hirai, K. (1996). Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus. Vaccine, 14(8): 747-752.

Thomas, P. and Smart, T.G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 51(3): 187-200.

Tomok, K.; Maki, A.; Katsunori, T.; Tamostsu, K.; Tohru, Y.; Hiroaki, Sh. Et al. (2009). Phylogenetic relationships of the G gene sequence of bovine ephemeral fever virus isolated in Japan, Taiwan and Australia. Veterinary Microbiology, 137(3-4): 217-223.

Trinidad, L.; Blasdell, K.R.; Joubert, D.A.; Davis, S.S.; Melville, L.; Kirkland, P.D. et al. (2014). Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian episystem. Journal of Virology, 88(3): 1525-1535.

Uren, M.; Walker, P.; Zakrzewski, H.; St George, T.D. and Byrne, K. (1994). Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. Vaccine, 12(9): 845-850.

Vigerust, D. (2011). Protein glycosylation in infectious disease pathobiology and treatment. Central European Journal of Biology, 6(5): 802-816.

Walker, P. (2005). Bovine ephemeral fever in Australia and the world. Current Topics in Microbiology and Immunology, 292: 57-80.

Walker, P.J. and Klement, E. (2015). Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. Veterinary Research, 46(1): 1-17.

Wallace, D.B. and Viljoen, G.J. (2005). Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. Vaccine, 23(23): 3061-3067.

Yin, Z. and Liu, J. (1997). Animal virology. 2nd ed. Science Press. Beijing, China, p. 645–667 (in Chinese).

Zheng, F.Y.; Lin, G.Z.; Qiu, C.Q.; Yuan, K.Z. and Song, J.Y. (2007a). Expression and antigenic characterization of the epitope-G1 of the bovine ephemeral fever virus glycoprotein in *Pichia pastoris*. Virologica Sinica, 22(5): 347-352.

Zheng, F.; Lin, G.Z. and Qiu, C.Q. (2007b). Expression, purification and antigenic characterization of the Epitope-G1 gene of bovine ephemeral fever virus in *Escherichia coli*. Acta Microbiologica Sinica, 47(3): 498-502.

Designing of the expressing eukaryotic plasmid of the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus G glycoprotein in human embryonic kidney cells

Pasandideh, R.[1]; Beygi Nassiri, M.T.[2]; Seyfi Abad Shapouri, M.R.[3]; Fayazi, J.[4]; Roshanfekr, H.[2] and Lotfi, M.[5]

Received: 30.08.2016 Accepted: 23.01.2017

Abstract

The G glycoprotein of bovine ephemeral fever virus (BEFV) has been identified as a plausible candidate for immunization against BEF disease. In recent years, this protein has been investigated to produce a recombinant vaccine. The aim of the present study was to construct a eukaryotic plasmid, expressing the G1 epitope of BEFV G glycoprotein gene, for application as a possible DNA vaccine in future studies. For this purpose, the G1 epitope of G glycoprotein gene was cloned into a eukaryotic expression vector, pEGFP-N1, under the control of the human cytomegalovirus (CMV) promoter. Then, the recombinant pEGFPN1-G1 construct was transfected into the human embryonic kidney (HEK 293) cell line and the expression efficiency was verified by indirect immunofluorescent (IFA) staining and immunoblotting techniques. Observation of intracytoplasmic fluorescence in transfected cells and appearance of a distinct band at an approximate molecular weight of 26 kDa in immunoblotting in reaction to an anti-G1 mouse serum indicated that G1 protein was successfully expressed by this recombinant construct in the host cells.

Key words: Bovine ephemeral fever virus (BEFV); Recombinant G1 protein; DNA vaccine

1- PhD Student of Animal Genetics and Breeding, Faculty of Animal and Food Technology Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Technology Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Technology Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
5- Research Assistant Professor, Department of Quality Control of Biological Products, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension, Karaj, Iran
Corresponding Author: Pasandideh, R., E-mail: Rezapasandideh63@gmail.com