تولید پروتئین نوکلئوکپسید نوترکیب ویروس برونشیت عفونی طیور سویه‌ی ماساچوست H120

مریم مهرآقا[۱*] و مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۲]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۶

چکیده

برونشیت عفونی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی ماکیان است، که به علت ایجاد مشکلات تنفسی با حدت بالا، نفریت، کاهش و تولید تخم‌های غیرعادی خسارات اقتصادی قابل توجهی به صنعت پرورش طیور در سرتاسر جهان وارد می‌کند. این بیماری درمان ندارد و تنها راه پیشگیری واکسیناسیون می‌باشد. ایمنیت ضد برونشیت عفونی اکثراً به وسیله‌ی آزمایش‌های سرولوژیکی از جمله الایزا سنجیده می‌شود. ویروس برونشیت عفونی طیور (جنس *کروناویروس*، خانواده‌ی *کروناویریده*) دارای یک رشته RNA مثبت به طول ۲۷/۶ کیلوباز می‌باشد. یکی از پروتئین‌های ساختاری کد شده توسط ژنوم ویروس فسفوپروتئین نوکلئوکپسید با وزن ۴۳ تا ۵۰ کیلودالتون (KD) می‌باشد. هدف از این مطالعه تهیه‌ی پروتئین نوکلئوکپسید (Nucleocapsid) نوترکیب جهت استفاده در کیت‌های تشخیصی به عنوان جایگزین ویروس کامل می‌باشد. برای این هدف بعد از استخراج RNA از ویروس، ژن مورد نظر با طول bp۱۲۲۷ به وسیله‌ی RT-PCR تکثیر شد. سپس این ژن در یک پلاسمید بیانی ($pMAL-C_2X$) کلون شد و پلاسمید نوترکیب به سویه‌ی Rosetta باکتری *E.coli* منتقل شد. بیان پروتئین نوکلئوکپسید به وسیله‌ی روش SDS-PAGE بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی حاکی از بیان با غلظت بالای این پروتئین نوترکیب در سیستم باکتریایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: ویروس برونشیت عفونی طیور، پروتئین نوکلئوکپسید، بیان

مقدمه

در حال حاضر با توجه به افزایش سریع جمعیت و کاهش منابع غذایی، سعی بر آن است که مواد غذایی مورد نیاز مردم با هزینه‌ی کم‌تر تأمین شود، بر این اساس بهترین گزینه برای تولید پروتئین حیوانی، مرغ می‌باشد، زیرا نژادهای اصلاح شده‌ی آن‌ها بهترین ضریب تبدیل غذایی و بالاترین سرعت رشد را دارند. بدین منظور ماکیان از نژادهای مختلف در تعداد و تراکم بالا در مرغداری‌های سراسر دنیا پرورش می‌یابند. این تعداد و تراکم بالا در کنار مزایا، معایبی نیز دارد که واگیری بیماری‌های عفونی یکی از این معایب می‌باشد. بنابراین داشتن درک صحیحی از بیماری‌های مؤثر بر میزان تلفات و کیفیت پوسته و کیفیت درونی تخم در صنعت طیور اهمیت بسیار زیادی دارد.

ویروس برونشیت عفونی بخش‌های بالایی دستگاه تنفس و گاهی مجاری ادراری-تناسلی را درگیر می‌کند. گزارش شده که تمایل بافتی ویروس تغییر کرده (Liu et al. 2006). بیماری در مرغان تخم‌گذار معمولاً بر اندام تولید مثلی اثر می‌گذارد که نه تنها منجر به نارسایی در هچ شدن تخم می‌شود، بلکه باعث کاهش کیفیت جوجه‌ها نیز می‌شود و می‌تواند موجب توقف کامل تولید تخم یا تولید تخم با پوسته‌ی نازک و زبر و تخم‌هایی با شکل نامناسب گردد (Sang et al. 2000). واگیری بیماری برونشیت

[۱*] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: mrymehragha@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

عفونی بیش از ۱۰۰ درصد گزارش شده در حالی که میزان مرگ و میر آن حدود ۲۵ درصد است اما ممکن است به ۷۵ درصد و یا بیش‌تر، در پرندگان جوان برسد (Anjum 1997).

خسارت‌های ناشی از تولید ناکارآمد معمولاً نگرانی بزرگتری نسبت به خسارت‌های ناشی از مرگ و میر در بیماری IB است (Emikpe et al. 2010). IB اولین بار در سال ۱۹۳۰ در آمریکا به عنوان بیماری حاد تنفسی که عمدتاً جوجه‌های جوان را درگیر می‌کند، توصیف شد (Schalk and Hawn 1931).

اولین شیوع IBV در گله‌های طیور ایران در سال ۱۹۹۴ گزارش شد (Aghakhan et al. 1994).

ویروس برونشیت عفونی (IBV) پرندگان متعلق به خانواده‌ی *کروناویریده* وراسته *نیدوویرالز* می‌باشد (Cavanagh 1997). زیر خانواده‌ی *کروناویرینه* شامل چهار جنس آلفا، بتا، گاما و دلتا کروناویروس است (MacLachlan et al. 2011) و IBV به عنوان یکی از اعضای مهم این خانواده در جنس گاماکروناویروس طبقه-بندی شده است . کروناویروس‌ها دارای پوشش، Pleomorphic و دارای قطر ۸۰- ۲۲۰ نانومتر با زوائد چماقی در سطح‌شان می‌باشند (Siddell 1995). ماساچوست رایج‌ترین سروتیپ ویروس برونشیت عفونی طیور در جهان است (Seify abad Shapouri et al. 2002).

ویروس برونشیت عفونی ۴ نوع پروتئین ساختاری را کد می‌کند: گلیکوپروتئین S (Spike) با وزن مولکولی ۲۰۰-۱۵۰ kDa، پروتئین غشایی E با وزن ۱۲/۴ kDa، گلیکوپروتئین ماتریکس M (integralmembrane) با وزن مولکولی ۲۰-۳۰ kDa و فسفو پروتئین نوکلئوکپسید N (Nucleocapsid) با وزن مولکولی ۵۰-۴۳ kDa (Saif 1993). پروتئین نوکلئوکپسید یک فسفوپروتئین متشکل از ۴۰۹ اسیدآمینه است که در میان سویه‌های IBV به خوبی حفظ شده است (Williams et al. 1992).

پروتئین نوکلئوکپسید با RNA ژنومی ویروس واکنش می‌دهد تا نوکلئوکپسید ویروس ساخته شود. همچنین ممکن است در سنتز RNA ویروسی نقش داشته باشد (Compton et al. 1987). پروتئین نوکلئوکپسید احتمالاً در بیماری‌زایی ویروس نقش دارد و در داخل ویریون قرار می‌گیرد و ارتباط نزدیکی با ژنوم ویروس دارد و با پروتئین‌های هسته‌ی سلول میزبان و پروتئین‌های ویروسی واکنش می‌دهد (Ignjatovic and Sapats 2005). پروتئین نوکلئوکپسید ممکن است منجر به پاسخ ایمنی سلولی علیه IBV شود (Boots et al. 1992). این پروتئین یک آنتی‌ژن ایمنی‌زای غالب است که باعث القای تولید آنتی‌بادی‌هایی با واکنش متقاطع در تیتر بالا می‌شود (Ignjatovic and Galli 1993). طبق نتایج حاصل از تحقیقات پیشین مشخص شده کهکلون ژن نوکلئوکپسید ممکن است برای تولید پروتئین نوترکیب برای استفاده در کیت‌های تشخیصی استفاده شود (Ndifuna et al. 1998). شناسایی پروتئین نوکلئوکپسید آسان است چون بیش‌ترین محصول پروتئینی مشتق شده در طی پروسه‌ی عفونت‌زایی ویروس می‌باشد. یک عامل سرولوژی ایده‌آل به قابلیت ایجاد پاسخ ایمنی قوی نیاز دارد (Kant et al. 1992). پروتئین-های آنتی‌ژنیکی نوترکیب بیان شده در سیستم‌های پروکاریوتی، مخمری و یا ویروس‌های حشرات یک تمایل جدید برای ساخت آنتی‌ژن پوشاننده‌ی مخصوص برای کیت‌های الایزا شده (Niesters et al. 1986).

پرندگان جوان از سن ۳ هفتگی به بعد به این بیماری مبتلا می‌شوند زیرا آنتی‌بادی مادری پرندگان در ۳ هفته‌ی اول زندگی عفونت را کنترل می‌کند. برخی از علائم کلینیکی بیماری برونشیت عفونی طیور شامل : رال تنفسی، خفگی، سرفه و عطسه است. وقتی مجاری تولید مثلی متأثر می‌شوند کاهش تولید و کاهش کیفیت تخم‌مرغ در گله‌ی رخ می‌دهد (Ignjatovic and Sapats 2005). افزایش ترشحات بینی و چشم، کاهش وزن و کاهش بازدهی غذا در جوجه‌ها نیز از نشانه‌های بیماری است (Jakwood et al. 2007). علائم بالینی معمولاً به مدت

۱۰-۱۴ روز طول می‌کشند. این بیماری وقتی که با عفونت‌های باکتریایی ثانویه مثل *اشریشیاکلای* و *مایکوپلاسما* همراه شود مرگ و میر بالایی در پرندگان جوان ایجاد می‌کند.

واکسنی که به طور عادی در گله‌های طیور در ایران استفاده می‌شود، واکسن زنده تخفیف حدت یافته H120 می‌باشد (Abdel-Moneim et al. 2006). بسیاری از کشورها فقط اجازه می‌دهند واکسن‌های زنده‌ی تیپ ماساچوست به عنوان مثال H120 استفاده شود.

پروتئین N ویروس برونشیت عفونی سویه‌ی Gray توسط Zhou و همکارانش در سیستم بیانی باکتریایی بیان شد (Zhou et al. 1996). برای بررسی پاسخ جوجه‌ها به واکسیناسیون IBV تعیین تیتر آنتی‌بادی به دست آمده علیه IBV تعدادی از تست‌های سرولوژیکی بر اساس ویروس کامل (Marquardt et al. 1981)، پروتئین S_1 (Wang et al. 2002) و پروتئین نوترکیب N (Ndifuna et al. 1998) گزارش شده. Breslin و همکارانش توالی ژننوکلئوکپسید و ناحیه‌ی غیرترجمه شونده[1] انتهای ′۳ کروناویروس بوقلمون را بررسی کردند و گزارش کردند این ویروس رابطه‌ی نزدیک با ویروس برونشیت عفونی طیور دارد.

با توجه به این که سویه‌ی واکسن ویروس برونشیت عفونی استفاده شده برای گله‌های تجاری در ایران سویه H120 است به کارگیری روش‌های تشخیصی ارزان، مؤثر و قابل اعتمادتر بر اساس پروتئین نوترکیب این سویه بسیار ارزشمند می‌باشند.

مواد و روش کار

ویروس و استخراج RNA: به عنوان منبع ویروس، واکسن برونشیت عفونی سویه‌ی H120 تهیه شد. این واکسن به شکل ویال لیوفیلیزه و ۲۵۰۰ دوزی بود، که به آن ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640 استریل اضافه شد و ۲۰۰ میکرولیتر از آن برای استخراج RNA استفاده گردید. استخراج RNA به وسیله‌ی کیت استخراج RNA (Roach، آلمان) و طبق دستورالعمل کیت و با استفاده از محلول‌های موجود در کیت، انجام شد. در آخرین مرحله‌ی مایع عبوری از فیلتر کیت به عنوان RNA خالص در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر استریل جمع‌آوری شد.

برای نگهداری نمونه (موقتاً و چند ساعت) تا پیش از انجام RT-PCR، RNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

جهت طراحی پرایمر، توالی نوکلئوتیدی ژن N (نوکلئوکپسید) سویه‌ی H120 ویروس IB، از بانک ژن NCBI با شماره دسترسی "AM260960" استخراج گردید و با استفاده از نرم‌افزار Primer3، پرایمرهای لازم برای تکثیر ناحیه‌ی کدکننده‌ی این ژن در RT-PCR طراحی شدند.

توالی پرایمر مستقیم : ′5-
GTCGAATTCATGGCGAGCGGTAAGACAA -′3
توالی پرایمر معکوس : ′5-
GTCGTCGACTTACAACTCATTTCTTCCAAGT
GC-′3

سپس با توجه به توالی این ژن و ردیف نوکلئوتیدی ناحیه‌ی MCS پلاسمید بیانی پروکاریوتی pMAL-c2X، به این پرایمرها برای تسهیل کلون محصول در وکتور، جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده‌ی *ISal* و *EcoR I* نیز افزوده شد.

پس از استخراج RNA، جهت انجام RT-PCR برای تکثیر ژن N از Master mix لیوفیلیزه RT-PCRAccuPower (Bioneer، کره جنوبی) استفاده شد. به این منظور مقدار ۱µl از پرایمر مستقیم (20pmol /µl)، ۱µl از پرایمر معکوس (20pmol/µl)، ۱۰µl از RNA و ۸µl آب DEPC (Diethyl pyrocarbonate) دو بار تقطیر به میکروتیوپ ۰/۲ میلی‌لیتر مخصوص کیت AccuPower که حاوی RT-PCR premix بود اضافه شد.

برای ساخت cDNA میکروتیوپ حاوی مواد به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت پس از این زمان میکروتیوب به مدت ۳۰ ثانیه در دور rpm۱۴۰۰۰

1- Untranslated region(UTR)

سانتریفیوژ شد و بلافاصله در دستگاه Thermal cycler قرار گرفت. برنامه‌ی دمایی استفاده شده در آزمایش RT-PCR برای تکثیر ژن N برای ساخت cDNA دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، سیکل دوم (در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۴۵ ثانیه با ۳۵ بار تکرار سیکل دوم) و سیکل سوم (سنتز نهایی) در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه می‌باشد.

جهت کلونینگ محصول RT-PCR با استفاده از کیت TA کلونینگ، در ابتدا محصول RT-PCR با هدف خالص‌سازی و بر طرف شدن آلودگی‌هایی همچون باند اضافی تکثیر شده، پرایمرها و سایر مواد موجود، محصول واکنش RT-PCR روی ژل آگارز منتقل شد و باند DNA با طول مورد نظر از روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بریده و با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت Vivantis کشور مالزی و طبق دستور کیت تخلیص شد و محصول PCR استخراج شده از ژل آگارز برای کلون در وکتور استفاده شد.

در این تحقیق به منظور کلونینگ ابتدایی ژن N، از وکتور PTZ57R/T (Fermentas، لیتوانی) کیت TA کلونینگ محصول شرکت Fermentas استفاده شد.

محصول RT-PCR خالص شده به وسیله‌ی کیت، پلاسمید PTZ57R/T ، آنزیم لیگاز و بافر لیگاز با یکدیگر مخلوط شده و پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای محیط و سپس به مدت یک شب در یخچال محصول لیگاسیون به باکتری*E.coli* سویه‌ی DH5α که با روش کلرید کلسیم‌پذیرا شده بود، انتقال داده شد.

پس از ظاهر شدن کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون کیت TA کلونینگ از روش غربال‌گری سفید و آبی استفاده شد . پس از انکوباسیون شبانه در انکوباتور ۳۷ درجه کلونی‌های سفید رنگ شناسایی شده و از کلونی اولیه‌ی آن‌ها برای تکثیر باکتری و استخراج پلاسمید استفاده شد. باکتری *E.coli* سویه‌ی DH5α دارای پلاسمید نوترکیب در ۳ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک به صورت شبانه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با شیک متوسط کشت داده شد. سپس پلاسمید نوترکیب از باکتری‌ها به وسیله‌ی کیت استخراج پلاسمید (Feldon، کانادا) استخراج شد.

پلاسمید PTZ57/R/T حاوی ژن کلون شده پس از استخراج از باکتری در یک واکنش هضم مضاعف تحت تأثیر آنزیم‌های *EcoR I* و *Sal I* قرار داده شد. این مخلوط به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس برای غیرفعال شدن آنزیم‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. برای اطمینان از صحت واکنش هضم، کارایی واکنش با الکتروفورز ۳ میکرولیتر از پلاسمید هضم شده مورد تأیید قرار گرفت. برای خالص-سازی محصول ژن N از ترکیب با پلاسمید برای انجام آزمایش‌های بعدی (کلون کردن) از ژل آگارز ۱ درصد و کیت استخراج از ژل شرکت ویوانتیس (Vivantis) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید و محصول خالص شده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای انجام عمل اتصال ژن N به پلاسمید بیانی pMalc2x (New England Biolabs، آمریکا) ابتدا باید پلاسمید pMalc2x نیز با استفاده از آنزیم‌های *EcoR I* و *Sal I* هضم می‌شد تا دارای نواحی انتهایی قابل اتصال به ژن N جدا شده از پلاسمید PTZ57R باشد.

پلاسمید pMalc2x خالص شده طبق ترکیبات در شرایط هضم با آنزیم‌های *EcoR I* و *Sal I* قرار داده شد و سپس با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR شرکت ویوانتیس (Vivantis) خالص‌سازی شد. میزان ژن N و پلاسمید با الکتروفورز تخمین زده شد و فرایند اتصال با استفاده از آنزیم لیگاز T4 (T4 DNA Ligase – فرمنتاز، لیتوانی) به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس یک شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد

صورت گرفت. طبق دستورالعمل آنزیم لیگاز، پس از سپری شدن زمان فوق برای غیرفعال کردن آنزیم از دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سپس محصول اتصال با فرض تشکیل پلاسمیدهای حلقوی حاوی ژن N برای ترانسفورماسیون باکتری *E.coli* سویه‌ی Rosetta به کار رفت. برای غربالگری کلونی‌های باکتری حامل پلاسمید نوترکیب از روش PCR استفاده شد.

برای القای بیان پروتئین با IPTG ، ۳ عدد از کلونی-های مثبت انتخاب شدند کلونی‌ها به صورت شبانه در محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شدند. کشت‌های شبانه‌ی باکتری به نسبت ۱/۱۰۰ وارد محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین و گلوکز (۰/۲ درصد) گردیده و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با چرخش متوسط تا حدود ۳/۵ ساعت (برای رسیدن به OD حدود ۰/۶) انکوبه شدند. یک نمونه از هر کشت تهیه شد سپس برای القای بیان پروتئین به کشت‌های باکتری IPTG (isopropyl-B-D-thiogalctopyranoside) اضافه شد. پس از گذشت سه ساعت نمونه از کشت‌ها اخذ شد. همزمان به عنوان شاهد منفی یک باکتری حاوی پلاسمید pMAL-c2X که القای بیان پروتئین بر روی آن در حضور IPTG، اعمال گردیده بود نیز استفاده شد. این نمونه‌ها در آزمایش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت (تهیه‌ی ۳۰ میلی‌لیتر ژل پلی‌آکریل‌آمید جدا کننده ۱۰ درصد و ۱۰ میلی‌لیتر ژل پلی‌آکریل‌آمید متراکم‌کننده ۴ درصد، بر اساس دستوالعمل‌های Ausubel و همکاران در سال ۱۹۹۲ تهیه شد. در این بررسی از ژل ۱۰ درصد جهت تفکیک باندهای پروتئینی استفاده شد. رسوب نمونه‌های مورد نظر (محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد) و همچنین مارکر پروتئینی با حجم مساوی از بافر نمونه مخلوط شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار گرفتند. برای بارگذاری نمونه‌ها در داخل چاهک‌ها، بین ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر از نمونه‌ها با استفاده از سمپلر به آهستگی در داخل چاهک-ها تخلیه گردید. در داخل مخزن بالا و پایین، بافر حرکت دهنده ریخته شد. سپس الکترود بالایی تانک به قطب منفی و الکترود پائینی به قطب مثبت منبع برق مستقیم وصل شده و میزان شدت جریان بر روی ۱۰۰ ولت تنظیم گردید.

با این شدت جریان، الکتروفورز در زمانی بین ۳ تا ۴ ساعت انجام شد. با ردگیری مسیر حرکت رنگ بروموفنل بلو در ژل، نحوه‌ی الکتروفورز و سرعت آن بررسی شد. زمانی که رنگ برومو فنل بلو به پائین‌ترین سطح خود در ژل رسید، عمل الکتروفورز خاتمه داده شد). سپس ژل پلی‌اکریل‌آمید حاوی SDS به وسیله‌ی کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد.

پس از بررسی بیان پروتئین توسط کلونی‌های نوترکیب، یکی از کلون‌ها انتخاب شده و پلاسمید آن با کیت تجاری خالص شد و جهت تعیین توالی ژن N با استفاده از پرایمرهای ویژه‌ی پلاسمید pMalc2x (پرایمرهای M13F-20 و malE) از دو جهت تعیین توالی گردید.

پس از دریافت نتایج، توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار CLC Free Workbench نسخه‌ی ۴ مورد ارزیابی قرار گرفتند و با توالی مرجع مربوط به ژن N ویروس برونشیت عفونی سویه‌ی H120 موجود در بانک ژن NCBI با شماره‌ی دسترسی AM260960 مقایسه شدند تا صحت کلونینگ و وجود جهش‌های احتمالی ناشی از PCR بررسی گردد.

بعد از اطمینان از بیان پروتئین نوترکیب و کسب نتایج تعیین توالی، مرحله‌ی بعدی خالص‌سازی این پروتئین با ستون کروماتوگرافی رزین-آمیلوز بود. کلیه‌ی مراحل خالص‌سازی مطابق با پروتکل راهنمای استفاده از پلاسمید انجام شد. بدین منظور کلون باکتریایی تعیین توالی شده در حجم زیاد (۲۵۰ میلی‌لیتر) کشت داده شد. بیان پروتئین‌ها همانند آنچه که قبلاً شرح داده شد، القاء گردید. ۴ ساعت بعد از افزودن IPTG، سوسپانسیون

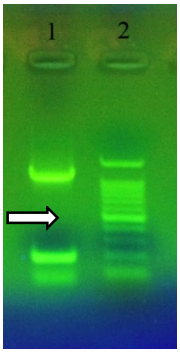
باکتریایی در دور ۶۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و به رسوب باکتریایی بافر ستون اضافه شد (به ازای ۸۰ میلی‌لیتر رسوب باکتری کشت داده شده، ۵ میلی-لیتر بافر ستون افزوده می‌شد).

این سوسپانسیون به مدت یک شب در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد شد. در مرحله‌ی بعدی جهت از بین بردن استحکام و شکستن دیواره‌ی باکتری‌ها ۹ مرتبه ذوب و انجماد متوالی انجام شد. به منظور سهولت عمل لیز باکتری‌ها و جلوگیری از تخریب پروتئین‌ها، قبل از انجام عمل ذوب و انجماد متناوب، موادی نظیر لیزوزیم، تریتون X-100، مرکاپتواتانول و PMSF نیز به سوسپانسیون باکتریایی اضافه شدند. پس از سانتریفیوژ مایع رویی به لوله‌ی دیگری منتقل شده و اقدام به انتقال آن روی ستون کروماتوگرافی رزین- آمیلوز گردید. مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ باکتری‌های لیز شده که با نسبت ۱ به ۵ با بافر ستون رقیق شده بود، با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و به صورت قطره قطره روی رزین شسته شده، اضافه گردید. آخرین مرحله‌ی خالص‌سازی، جدا نمودن و استحصال پروتئین‌های متصل شده به رزین آمیلوز بود که با استفاده از بافر ستون حاوی ۱۰ میلی‌مولار مالتوز انجام شد. به محض ریختن این محلول، اقدام به جمع‌آوری نمونه‌های ۱/۵ میلی‌لیتری درون میکروتیوب-های استریل گردید. در آخر حضور این پروتئین نوترکیب در نمونه‌های جمع‌آوری شده، با SDS-PAGE بررسی گردید.

نتایج

در بسیاری از کشورها صنعت طیور یک صنعت مهم می‌باشد و محصولاتش بخش مهمی از منبع غذای روزانه-اند. IBV در لیست B، OIE قرار دارد که نشان دهنده اهمیت اقتصادی این ویروس است. ویروس برونشیت عفونی عامل یک بیماری حاد تنفسی با واگیری بالا در جوجه‌ها با قابلیت درگیر کردن کلیه و مجاری تناسلی است (Cavanagh 1997) و در سرتاسر جهان برونشیت عفونی طیور با اثرات شدید اقتصادی در جوجه‌ها منجر به کاهش وزن و مرگ و میر و در پرندگان تخم‌گذار منجر به کاهش تولید تخم و تولید تخم‌های بی‌کیفیت می‌شود (Ignjatovic and Sapats 2005).

در مطالعه‌ی حاضر ژن پروتئین نوکلئوکپسید در آزمایش RT-PCR تکثیر شد. بر اساس نتایج الکتروفورز با استفاده از پرایمرهای طراحی شده یک قطعه DNA به طول۱۲۰۰جفت باز (bp) و یک قطعه ۲۰۰ جفت بازی ساخته شده بود (ولی قطعه‌ی کوچک‌تر توالی‌یابی نشد. در مطالعات مشابه نیز دو باند حاصل شده بود از جمله Tripti و همکارانش ژن N ویروس برونشیت عفونی را در سیستم پروکاریوتی بیان کردند. ژن N از جدایه‌ی محلی ویروس IBV در وکتور PQE30 و باکتری *E.coli* کلون و بیان شد. آنالیز SDS-PAGE دو باند ۵۲ و ۴۵ کیلودالتونی را نشان داد. تصور می‌شود پروتئین کوچک‌تر از تجزیه‌ی پروتئین کامل یا توقف زود هنگام ترجمه منشا گرفته است) که تولید قطعه ۱۲۰۰جفت بازی با نتیجه قابل انتظار هم‌خوانی داشت (تصویر ۱).



شکل ۱: محصول RT-PCR روی ژل آگارز

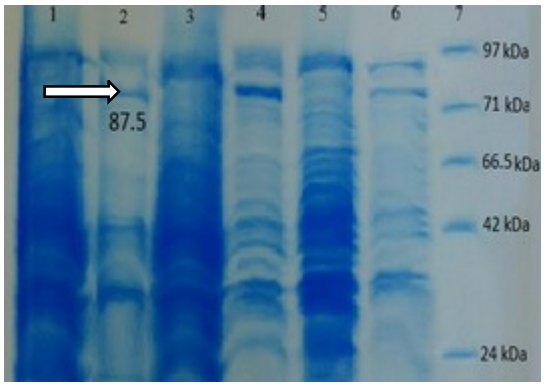
۱- محصول RT-PCR

۲- مارکر وزن مولکولی bp۱۰۰

به منظور تایید صحت کلونینگ ژن N در پلاسمید pTZ57RT و اطمینان از عدم بروز جهش در این ژن در مرحله‌ی PCR، قطعه‌ی ژن کلون شده در یکی از کلونی-

های سفید تعیین توالی شد. بر اساس توالی به دست آمده و پس از آنالیز توسط بلاست مشخص شد که قطعه‌ی تکثیر شده مربوط به ژن N ویروس IB می‌باشد و هیچ جهشی در اثر PCR روی نداده است. همچنین محل برش آنزیمی وکدون آغاز در ناحیه‌ی بالا دست ژن کاملاً درست و در قاب ترجمه پروتئین بود. در فاصله‌ی ۱۸ نوکلئوتید پس از آخرین کدون، توالی محل برش آنزیم *SalI* متعلق به پلاسمید وجود داشت که ازآن برای برش ژن و انتقال آن به پلاسمید بیانی استفاده شد.

باکتری نوترکیب در معرض IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG، حاوی پروتئینی جدید در محدوده بین ۷۰ تا ۹۷ کیلودالتون بود که با وزن مولکولی قابل انتظار (۸۷/۵KDa) برای پروتئین بیان شده (با احتساب ۴۵ کیلو دالتون برای پروتئین N و ۴۲/۵ کیلودالتون برای MBP) هم‌خوانی دارد.



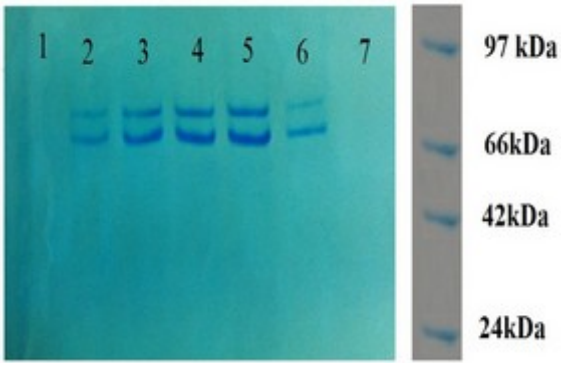
تصویر ۲: بررسی بیان پروتئین نوترکیب N–MBP با SDS-PAGE

ستون‌های ۱تا ۶- به ترتیب نشان‌گر باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pMAL-N قبل و بعد از افزودن IPTG

۷ – مارکر پروتئینی با ۵ باند پروتئین

در این مطالعه از رزین آمیلوز جهت خالص‌سازی پروتئین N نوترکیب استفاده شد. آمیلوز شکل متفاوتی از مالتوز است. چون پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق (pMAL-c2X) یک پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP) در انتهای آمینی پروتئین نوترکیب بیانی اضافه می‌کند، از این طریق می‌توان "فیوژن پروتئین‌های تولیدی" (MBP- N)را با کمک رزین–آمیلوز، جذب و از سایر پروتئین‌های *E.coli* جدا نمود.

حضور پروتئین در فرکشن‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمایش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی نتایج این آزمایش حاکی از خالص شدن مطلوب پروتئین نوترکیب در محدوده‌ی بین ۷۰ تا ۹۷ کیلودالتون بود که با وزن مولکولی قابل انتظار (۵/۸۷ کیلودالتون) برای پروتئین بیان شده هم‌خوانی دارد. تصاویر مربوط به الکتروفورز تعدادی از فرکشن‌های متوالی خالص شده پروتئین نوترکیب در تصویر زیر ارائه شده است.



تصویر ۳: الکتروفورز فرکشن‌های متوالی پروتئین خالص شده با ستون کروماتوگرافی رزین– آمیلوز

ستون‌های ۱ تا ۷: فرکشن‌های متوالی پروتئین خالص شده

بحث

تست‌های HI و ELISA مناسب‌ترین روش‌ها برای بررسی‌های سرولوژی هستند. آزمایش ELISA روش سرولوژی حساسی است و نسبت به سایر تست‌ها تیتر آنتی‌بادی بالاتر و واکنش بیش‌تری می‌دهد (Mockett and Darbyshire 1981). محبوبیت روش الایزا در شرایط مزرعه ناشی از آسانی، سرعت، قیمت کم و امکان آزمایش چندین نمونه در یک زمان است. داشتن آنتی‌ژن مناسب، در دسترس، ارزان قیمت و قابل اعتماد از ضروریات این روش محسوب می‌گردد. کیت‌های تجاری الایزا که در

دسترس می‌باشند، معمولاً از ویروس کامل به عنوان آنتی-ژن استفاده می‌کنند. خالص‌سازی ویروس خیلی گران است و مهارت و امکانات زیادی نیاز دارد.

در رابطه با بیماری برونشیت عفونی طیور، از آنجایی که پروتئین IBV-N، ۹۴-۹۹ درصد تشابه بین سویه‌های مختلف این ویروس دارد (Huang et al. 2004) و دارای قدرت ایمنی‌زایی بالایی نیز می‌باشد (Ignjatovic and Galli 1993)، این پروتئین کاندید مناسبی برای تست‌های تشخیصی برای ارزیابی پاسخ واکسیناسیون و تشخیص عفونت با ویروس می‌باشد. لازمه‌ی به کارگیری این پروتئین در موارد ذکر شده وجود پروتئین به صورت خالص و با غلظت بالا می‌باشد که تحقیق حاضر با این هدف اجرا گردید که نتایج بسیار رضایت‌بخشی به دست آمد.

Zhou و همکارانش ژن N ویروس برونشیت عفونی سویه‌ی Gray را در سیستم بیانی باکتریایی و وکتور pQE8 بیان نمودند و پروتئین N خالص شده با وزن ۵۰ کیلودالتون به دست آمده را در آزمایش وسترن بلات استفاده کردند و پروتئین N نوترکیب با سرم حاوی آنتی-بادی ضد IBV واکنش داد.

Zhang و همکارانش یک آزمایش الایزا بر اساس پروتئین نوکلئوکپسید به دست آمده از طریق بیان در *E.coli* سویه‌ی LM194، طراحی کردند. در این مطالعه ژن N سویه‌ی X ویروس برونشیت عفونی که در چین جدا شده در سیستم پروکاریوتی بیان و پروتئین N نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل خالص گردید. پروتئین به دست آمده در SDS-PAGE و وسترن بلات وزنی حدود ۵۰ کیلودالتون داشت، به علاوه یک باند تقریباً ۴۶ کیلودالتونی و چند باند پروتئینی با وزن کم‌تر نیز مشاهده شد.

Gibertoni و همکارانش ژن N سویه‌ی M41 ویروس برونشیت عفونی را پس از کلون کردن در مخمر *ساکارومایسز سرویسه* بیان کردند و پروتئین نوترکیب (با وزن مولکولی ۴۹/۵ کیلودالتون) را پس از خالص‌سازی برای استفاده در آزمایش الایزا (Y-N-ELISA) برای تشخیص Ab علیه IBV به کار بردند و با توجه به نتایج به دست آمده گزارش کردند که این آزمایش یک روش سریع، حساس و اختصاصی برای تشخیص Ab در سرم-های IBV در مقایسه با کیت‌های تجاری الایزا می‌باشد. همبستگی بین Y-N-ELISA و کیت‌های الایزای تجاری ۰/۹۱۸۸ بود که معنی‌دار می‌باشد (Gibertoni et al. 2005).

در تحقیق حاضر ژن نوکلئوکپسید پس از کلون شدن دارای دو باند به اندازه‌های ۱۲۰۰ و ۲۰۰ bp بود که احتمالاً علت وجود قطعه‌ی کوچک‌تر مربوط به غیراختصاصی عمل کردن پرایمرهای طراحی شده می-باشد. در این پژوهش با توجه به این که هدف کلون کردن کل ژن نوکلئوکپسید بود و محدودیت موجود در طراحی پرایمرها این احتمال هست که اتصال به توالی مشابه دیگری نیز رخ داده که باعث ایجاد باند کوچک‌تر شده، به همین علت فقط باند ۱۲۰۰ bp از روی ژل آگارز بریده و خالص‌سازی شد و با تعیین توالی از صحت کلون ژن مورد نظر اطمینان خاطر به دست آمد و در ادامه‌ی پژوهش از تک باند مورد نظر استفاده گردید.

پس از طی مراحل شرح داده شده، صحت کلون و بیان ژن نوکلئوکپسید و خالص‌سازی پروتئین تأیید شد. در این پژوهش بر خلاف مطالعات گذشته پروتئین N به صورت فیوژن با MBP بیان شد. اگر چه MBP پروتئینی نسبتاً بزرگ (۵/۴۲ کیلودالتون) است اما مزیت آن این است که هزینه‌ی خالص‌سازی پروتئین‌های متصل به MBP کم‌تر از هزینه‌ی خالص‌سازی پروتئین‌های دارای دنباله‌ی هگزا هیستیدین (استفاده شده در مطالعات گذشته) می‌باشد.

منابع

Abdel-Moneim, A.S.; El-Kady, M.F.; Ladman, B.S. and Gelb, j. Jr. (2006). S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. Virology Journal, 3: 1-9.

Aghakhan, SM.; Abshar, N.; Fereidouni, SR.; Marunesi, C. and Khodashenas, M. (1994). Studies on avian viral infections in Iran, Archives of Razi Institute,44: 1-5.

Anjum, AD. (1997). Poultry Diseases. 2th ed. Veterinary Ag Publication, Faisalabad, Pakistan. Pp:24-29.

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, RE.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. (1992). Short Protocols in Molecular Biology. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York. Pp: A1-15.

Boots, A.M.H.; Benaissa-Trouw, B.J.; Hesselink, W.; Rijke, E.; Schrier, C. and Hensen, E.J. (1992). Induction of anti-viral immune responses by immunization with recombination-DNAencoded avian coronavirus nucleocapsid protein. Vaccine, 10 (2): 119-124.

Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new ordor comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Archive of Virology, 142 (3): 629-633.

Compton, S.R.; Rogers, D.B.; Holmes, K.V.; Fertsch, D.; Remenick, J. and McGowan, J.J. (1987). In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A59. Virology, 61(6): 1814-1820.

Emikpe, B.O.; Ohore, O.G.; Olujonwo, M. and Akpavie, S.O. (2010). Prevalence of antibodies to infectious bronchitis virus (IBV) in chickens in Southwestern Nigeria. African Journal Microbiology Research, 4(1): 092-095.

Gibertoni, A.M.; Montassier, M. de F.; Sena, J.A.; Givisiez, P.E.; Furuyama, C.R. and Montassier, H.J. (2005). Developmentand application of a Saccharomyces cerevisiae expressed nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against infectious bronchitis virus. Journal of Clinical Microbiology, 43(4): 1982-1984.

Huang, Y.P.; Lee, H.C.; Cheng, M.C. and Wang, C.H. (2004). S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. Avian Disease, 48(3): 581-589.

Ignjatovic, J. and Galli, L. (1993). Structural proteins of avian infectious bronchitis virus: role in immunity and protection. Advances in Experimental Medicine and Biology - Springer, 342: 449-453.

Ignjatovic, J. and Galli, L. (1993). Structural proteins of avian infectious bronchitis virus: role in immunity and protection. Advance ExperimentalMedical Biology, 342: 449-453.

Jackwood, MW.; Hilt, DA.; Williams, SM.; Woolcock, P.; Cardona, C. and O'Connor, R. (2007). Molecular and serologic characterization, pathogenicity, and protection studies with infectious bronchitis virus field isolates from California. Avian Diseases, 51(2): 527-533.

Kant, A.; Koch, G.; van Roozelaar, D.J.; Kusters, J.G.; Poelwijk, F.A. and van derZeijst, B.A. (1992). Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. General Virology, 73(3): 591-596.

Liu, S.W.; Zhang, Q.X.; Chen, J.D.; Han, Z.X.; Liu, X.; Feng, L. et al. (2006). Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. Archive of Virology, 151(6): 1133–1148.

MacLachlan, N.; James, and Dubovi, Edward J. (2011). Fenner's Veterinary Virology, 4th ed.,Amesterdam, Pp: 16-19.

Marquardt, W.W.; Snyder, D.B. and Schlotthober, B.A. (1981). Detection andquantification of antibodies to infectious bronchitis virus byenzyme-linked immunosorbent assay. Avian Disease, 25(3): 713-722.

Mockett, A.P.A. and Darbyshire, J.H. (1981). Comparative studies with an enzyme-linkedimmunosorbent assay(Elisa) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. Avian Pathology, 10(1): 1-10.

Ndifuna, A.; Waters, A.K.; Zhou, M. and Collisson, E.W. (1998). Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. Virological Methods, 70(1): 37-44.

Niesters, H.G.; Lenstra, J.A.; Spaan, W.J.; Zijderveld, A.J.; Bleumink-Pluym, N.M.; Hong, F. et al. (1986). The peplomer protein sequence of the M41 strain of coronavirus IBV and its comparison with Beaudette strains. Virus Research, 5(2-3): 253-263.

Sang Heui, Seo.; Jianwu, Pei.; W. Elwood, Briles.; Jennifer, Dzielawa. andEllen, W. Collisson. (2000). Adoptive Transfer of Infectious Bronchitis Virus Primed alphabeta T Cells Bearing CD8 Antigen Protects Chicks from Acute Infection.Virology, 269(1): 183-189.

Schalk, A.F. and Hawn, M.C. (1931). Anapparently new respiratory disease of babychicks. Journal of the American Veterinary Medical Association, 78: 413-422.

Seify abad Shapouri, M.R.; Mayahi, M.; Charkhkar, S. and Assasi, K. (2002). Serotype identification of recent Iranian isolates of infectious bronchitis virus by type-specific multiplex RT-PCR. Archives of Razi Institute, 53: 79-85.

Siddell, S.G. (1995). The coronaviridae: an introduction. In:Siddell, SG. Jr. (Ed). The Coronaviridae. Plenum Press,New York, Pp: 1-10.

Tripti, Jain.; Megha, Kadam.; Asit, Jain. and Sarkhel, B.C. (2013). Prokaryotic Expression of N Gene of Infectious Bronchitis Virus and Assessment of its Immunogenicity and Antigenicity. Indian Journal of Animal Research, 47(4): 292-300.

Wang, C.H.; Hong, C.C. and Seak, J.C. (2002). An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using an S1 spike polypeptide. Veterinary Microbiology, 85(4): 333-342.

Williams, A.K.; Wang, L.; Sneed, L.W. and Collisson, E.W. (1992). Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses.Virus Research, 25(3): 213-222.

Zhang, Jinliang; Guo, Yan.; Xiao, Yuncai.; Wang, Xiliang.; Zhonghua, Li.; Sishun, Hu. and Dingren, Bi. (2010). A Simple and Rapid Strip Test for Detection of Antibodies to Avian Infectious Bronchitis Virus. Veterinary Medicine Science,72(7): 883-886.

Zhou, M.; Williams, A.K.; Chung, S.I.; Wang, L. and Collisson, E.W. (1996). The infectious bronchitis virus nucleocapsid protein binds RNA sequences in the 3' terminus of the genome. Virology, 217: 191-199.

Expression Of Nucleocapsid Gene Of Chicken Infection Bronchitis Virus Strain Massachuset H120

Mehragha, M.[1] and Seyfi Abad Shapouri, M.R.[2]

Received: 20.01.2017 Accepted: 28.10.2017

Abstract

Infectious bronchitis (IB) is one of the most important viral diseases of poultry that causes significant economic loses to chicken industry worldwide. Infectious Bronchitis Virus causes a contagious and acute respiratory disease. Some nephrotropic serotypes of IBV cause nephritis. IBV is responsible for decrease of egg production and laying abnormal eggs. IB has no treatment and the only way to protect the chicken flocks is vaccination against the virus. Immunity to IBV has most often been assessed using serological assays; like enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).IBV (genus *Gamacoronavirus*, family *Coronaviridae*) contains a 27.6 kb single stranded positive sense RNA. The genome encodes three major structural proteins; the spike (S) glycoprotein, the integral membrane glycoprotein (M), and the 43 to 50 kDa nucleocapsid (N) phosphoprotein. The aim of this study was to prepare recombinant nucleocapsid protein. For this purpose after RNA extraction the corresponding gene with a length of 1227 bp was amplified by RT-PCR. Then this gene cloned into expression plasmid (pMAL-C_2X) and recombinant plasmid was transferred to strain Rosetta of *E.coli.* Expression of protein N was detected by SDS-PAGE. The results of this study showNucleocapsid recombinant protein could be expression whit high concentration in bacterial system.

Key words: Infectious bronchitis virus, Nucleocapsid Protein, Expression

1- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Mehragha, M., E-mail: mrymehragha@gmail.com