طراحی و ساخت یک سازه‌ی ژنی نوترکیب بیان‌کننده‌ی پروتئین p24 ویروس لکوز گاوی در *اشرشیاکلی*

زهره نجفی[۱]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۲*] و رضا پسندیده[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲۶

چکیده

لکوز انزئوتیک گاوی (EBL) یک بیماری رتروویروسی است که به وسیله‌ی ویروس لکوز گاوی (BLV) ایجاد و عموماً در دامداری‌های صنعتی مشاهده می‌شود. این بیماری موجب کاهش توان تولید و بروز خسارت‌های اقتصادی قابل توجه در گله می‌شود. کنترل عفونت‌های ناشی از BLV با انجام آزمایش‌های سرولوژی، شناسایی و جداسازی یا حذف حیوانات سرم مثبت انجام می‌گردد. در این مطالعه، ژن پروتئین p24 از BLV پس از تکثیر توسط PCR، به پلاسمید بیانی پروکاریوتی pMalc2x منتقل و در سویه‌ی DH5α از *اشرشیاکلی* بیان شد. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از روش SDS-PAGE و متعاقب آن وسترن بلات (ایمونوبلات) بررسی شد. وزن مولکولی پروتئین بیان شده (۶۳ کیلودالتون) با وزن مولکولی مورد انتظار از پروتئین فیوژن، مطابقت داشت. آنالیز وسترن بلات نشان داد که پروتئین p24 بیان شده به طور اختصاصی با یک سرم مثبت تجاری حاوی آنتی‌بادی ضد BLV واکنش می‌دهد. بنابراین در این مطالعه پروتئین p24 از ویروس لکوز گاوی با موفقیت توسط سازه‌ی نوترکیب pMalc2x-p24 در *اشرشیاکلی* بیان گردید.

کلمات کلیدی: ویروس لکوز گاوی (BLV)، پروتئین نوترکیب p24، *اشرشیاکلی*

مقدمه

لکوز انزئوتیک گاوی (EBL)[۱] یکی از بیماری‌های مهم در گاوداری‌های متراکم و صنعتی در ایران و جهان است که با ایجاد تومور در بافت‌های لنفاوی مشخص می‌شود. عامل ایجاد کننده‌ی این بیماری، ویروس لکوز گاوی (BLV)[۲] از خانواده رتروویریده و جنس دلتارتروویروس است. این ویروس به طور طبیعی غالباً تنها در گاو ایجاد عفونت می‌کند، ولی موارد عفونت در گاومیش نیز گزارش شده است. گاوهای مبتلا به عفونت BLV تا آخر عمر آلوده باقی می‌مانند و بیش‌تر آن‌ها بدون علائم بالینی به زندگی ادامه می‌دهند، اما به عنوان حامل می‌توانند موجب انتقال ویروس گردند. کم‌تر از ۱ درصد از گاوهای آلوده به BLV پس از یک دوره‌ی نهفته نسبتاً طولانی به لکوز مبتلا شده و حدود ۱ تا ۵ ماه پس از ظهور اولین نشانه‌ها می‌میرند. تقریباً ۳۰ درصد از گاوهای آلوده به BLV به لنفوسیتوز پایدار مبتلا می‌شوند. این حیوانات در اثر بروز بی‌نظمی در پاسخ‌های ایمنی، مستعد ابتلا به عفونت‌های ثانویه می‌باشند و در کل، بازده‌ی کم‌تری دارند. با توجه به خسارت‌های مرتبط با بیماری لکوز، لنفوسیتوز پایدار و به ویژه ایجاد محدودیت در امر صادرات گاو و اسپرم، BLV یکی از ویروس‌های نسبتاً مهم گاو محسوب

[۱] دانش آموخته‌ی دکتری حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

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

[۳] دانش‌آموخته‌ی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

1- Enzootic bovine leukemia
2- Bovine leukemia virus

می‌شود و در حال حاضر به دلیل فقدان واکسن بر ضد این ویروس، تنها راه مقابله با آن، شناسایی حیوانات حامل با انجام آزمایش‌های سرولوژی یا PCR و جدا کردن و مدیریت جداگانه این حیوانات از سایر گاوهای گله می‌باشد (Burridge et al. 1981, D'Angelino et al. 1998, EFSA AHAW Panel 2015, Hopkins and Digiacomo 1997).

آزمایش PCR برای شناسایی گاوهای آلوده به BLV آزمایشی بسیار حساس است که از روز ۵ تا ۷ پس از آلودگی می‌تواند مثبت گردد (EFSA AHAW Panel 2015). با این حال کاربرد این آزمایش در سطح وسیع در مقایسه با آزمایش‌های سرولوژی دشوار است. از میان آزمایش‌های سرولوژی، AGID اولین آزمایش سرولوژی استفاده شده برای ردیابی آنتی‌بادی‌های ضد BLV بود (Miller and Olson 1972) اما به تدریج، آزمایش‌های دیگری به ویژه آزمایش الایزا طراحی و مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش AGID آزمایشی ساده و با ویژگی بالا برای تشخیص عفونت BLV محسوب می‌شود، اما حساسیت آن از الایزا کم‌تر است. همچنین بر خلاف الایزا که از هفته‌ی ۲ تا ۳ پس از آلودگی، مثبت می‌گردد، پاسخ مثبت به AGID به ۳ تا ۱۲ هفته زمان نیاز دارد. با توجه به سهولت انجام الایزا در حال حاضر این آزمایش رایج‌ترین آزمایش سرولوژی برای شناسایی گاوهای آلوده به BLV می‌باشد (EFSA AHAW Panel 2015). برای انجام الایزا از پروتئین‌های ساختاری ویروس به عنوان آنتی‌ژن استفاده می‌گردد. ژنوم ویروس لکوز گاوی دارای ۳ ژن *gag*، *pol*، *env* و ژن‌های تنظیم کننده است (Sagata et al. 1985). بیش‌تر پروتئین‌های ساختاری BLV که به وسیله‌ی ژن‌های *gag* و *env* کد می‌شوند ایمونوژن هستند، اما در طی عفونت‌های طبیعی با BLV، آنتی‌بادی‌ها بیش‌تر علیه پروتئین‌های gp30 و gp51 (کد شده توسط ژن *env*) و p15 و p24 (کد شده توسط ژن *gag*) تولید می‌شوند (Deshayes et al. 1980). بر این اساس، می‌توان از هر یک از این آنتی‌ژن‌ها در طراحی آزمایش‌های سرولوژیک BLV استفاده نمود، اما به نظر می‌رسد پروتئین p24 هسته‌ی مرکزی ویروس و gp51 غشایی از قابلیت بهتری برای این منظور برخوردار باشند (Bex et al. 1979) و در حال حاضر کیت‌های تجاری الایزای BLV با استفاده از gp51 یا p24 تهیه می‌شوند.

Bicka و همکاران در سال ۲۰۰۰ توانستند پروتئین p24 را توسط ناقل بیانی pT7This در سویه‌ی BL21 (DE3) *اشرشیاکلی* کلون و بیان کنند. در ایران Momtaz و همکاران در سال ۲۰۰۸ آنتی‌ژن پروتئینی p24 را با استفاده از ناقل بیانی pET-28(a) و در سویه‌ی BL21 (DE3) *اشرشیاکلی* کلون و بیان کردند. آنالیز خصوصیات آنتی‌ژنیکی این پروتئین بیان شده با استفاده از وسترن بلات، نشان از اختصاصیت و حساسیت بالای آن در اتصال به آنتی‌بادی ضد BLV در سرم گاوهای آلوده داشت. همچنین Larsen و همکاران در سال ۲۰۱۳ پروتئین p24 را با استفاده از سیستم بیانی باکولوویروس و در سلول‌های حشره Sf21[1] بیان نمودند که از آن به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده‌ی کف پلیت الایزا استفاده شد. بر اساس مطالب گفته شده و اهمیت کاربردی پروتئین p24 نوترکیب در طراحی آزمایش‌های الایزای تشخیصی برای BLV، هدف از این مطالعه کلونینگ مولکولی و بیان این پروتئین در یک سیستم بیانی پروکاریوتی بود.

مواد و روش کار

در این مطالعه از خون یک گاو مبتلا به عفونت با ویروس لکوز گاوی که عفونت آن با آزمایش الایزا تایید شده بود، به عنوان نمونه‌ی آزمایشی استفاده شد. مثبت بودن این نمونه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ویروس لکوز گاوی و انجام PCR، طبق دستورالعمل OIE (OIE 2013) نیز مورد تایید قرار گرفت. همچنین در این تحقیق از پلاسمید بیانی پروکاریوتی pMalc2x (NewEngland Biolabs, USA) و از سویه‌ی DH5α

1- Spodoptera frugiperda

اشرشیاکلی به عنوان میزبان پروکاریوتی جهت کلونینگ و بیان ژن استفاده گردید.

توالی نوکلئوتیدی ژن *p24* با شماره‌ی دسترسی M10987 از بانک ژن استخراج شد و برای طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار بر خط Primer3 مورد استفاده قرار گرفت. همچنین الگوی هضمی توالی این ژن با استفاده از نرم‌افزار BioEdit مشخص گردید. سپس با در نظر گرفتن آنزیم‌های محدود کننده‌ی قابل استفاده برای کلونینگ این ژن در پلاسمید pMalc2x، توالی مکان برش آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III همراه با چند نوکلئوتید اضافی به منظور تسهیل برش‌های آنزیمی در ناحیه‌ی '5 پرایمرهای طراحی شده، قرار داده شد. متعاقباً توالی نهایی پرایمرها (جدول ۱) با نرم‌افزار Oliganalyzer مورد ارزیابی قرار گرفته و ساخت آن‌ها به شرکت تکاپوزیست (ایران) سفارش داده شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن P24 ویروس BLV. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای رفت و برگشت، به ترتیب دارای جایگاه برشی آنزیم‌های محدودکننده *Eco*RI و *Hind*III می‌باشند

پرایمر	توالی
p24F	3'–AATGGAATTCGCACTCCGAGAATTACAAGA -5'
p24R	3'-TATGAAGCTTTTATGCACAAGCCTGCAGTTTT–5'

برای انجام آزمایش PCR ابتدا از ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه‌ی خون گاو مبتلا به عفونت با ویروس لکوز، با استفاده از کیت CinnaPure-DNA (سیناکلون، ایران) استخراج DNA صورت گرفت. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و مسترمیکس 2XPCR (Amplicon، دانمارک)، واکنش PCR به شرح زیر انجام شد: مقدار ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۵ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر یک از پرایمرها، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ mM) و ۱۸/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط و تکثیر ژن مورد نظر با برنامه‌ی دمایی ۹۴ درجه-ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه‌ی تکثیر شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه در هر چرخه و در انتها ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه صورت پذیرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد و در کنار خط‌کش DNA الکتروفورز شد. پس از تایید صحت PCR، محصول PCR توسط کیت GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR) (Vivantis، مالزی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی شد.

در این مطالعه از ناقل بیانی pMalc2x برای کلونینگ و بیان ژن p24 در *اشرشیاکلی* استفاده شد. این پلاسمید، پروتئینی را به نام پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP)[1] کد می‌کند که به صورت فیوژن در انتهای آمینی پروتئین بیانی قرار می‌گیرد. به منظور آماده‌سازی ناقل بیانی pMalc2x، ابتدا سویه‌ی DH5α باکتری *اشرشیاکلی* حاوی این پلاسمید در محیط LB مایع دارای آمپی‌سیلین (µg/ml)، کشت شبانه داده شد و سپس توسط کیت استخراج پلاسمید GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis، مالزی) خالص‌سازی پلاسمید انجام گردید.

برای انتقال ژن *p24* به ناقل، ابتدا محصول PCR تخلیص شده و پلاسمید pMalc2x، هر دو توسط آنزیم‌های محدودکننده‌ی *Eco*RI و *Hind*III (Fermentas، امریکا) هضم و با استفاده از کیت (GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR (Vivantis، مالزی) خالص‌سازی شدند.

1- Maltose binding protein

پس از این مرحله، عمل اتصال پلاسمید و محصول PCR 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 سویه‌ی DH5α باکتری *اشرشیاکلی*، پذیرا شده با کلریدکلسیم، انتقال داده شد. در پایان، باکتری‌ها در محیط LB جامد آمپی‌سیلین‌دار کشت داده شدند. پس از رشد کلونی‌های باکتریایی، غربالگری کلونی‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب با روش PCR و هضم آنزیمی صورت گرفت. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید از سه کلونی مثبت استخراج و به منظور تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند. تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای عمومی M13F و MalE صورت گرفت . پس از اطمینان از صحت کلونینگ، یک کلون باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب 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 ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به منظور القاء بیان پروتئین، IPTG (ایزوپروپیل بتا دی‌گالاکتوپیرانوزید) با غلظت ۱ mM اضافه شد و کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تا ۴/۵ ساعت ادامه یافت. بیان ژن مورد نظر با الکتروفورز نمونه‌های تهیه شده پیش و پس از افزودن IPTG در ژل پلی‌اکریلامید (SDS-PAGE) و رنگ‌آمیزی ژل با رنگ آبی کوماسی (AppliChem، آلمان) بررسی شد.

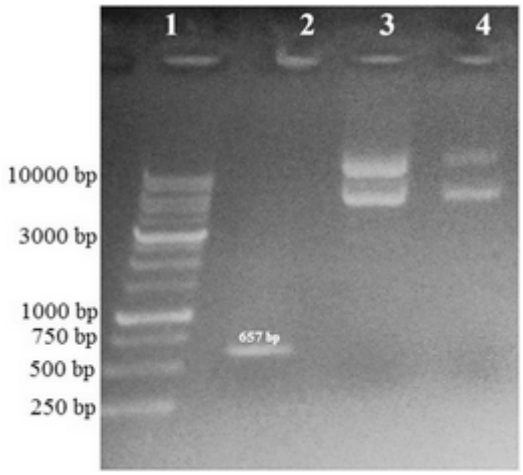
به منظور بررسی حلالیت پروتئین بیانی MBP-P24، ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری القا شده با IPTG به مدت ۱۰ دقیقه و با قدرت ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و رسوب باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر بافر تریس (۲۰ mM TrisHCl، ۲۰۰mM NaCl، ۱mM EDTA , pH 7.4) مخلوط و به مدت ۱ ساعت مورد سونیکاسیون قرار گرفت. سپس سوسپانسیون باکتری با قدرت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده از این مرحله به عنوان پروتئین‌های فاز نامحلول و مایع روی رسوب به عنوان پروتئین‌های فاز محلول جمع‌آوری و توسط SDS-PAGE آنالیز شد. همچنین طبق دستورالعمل شرکت سازنده (NewEngland Biolabs, USA)، با استفاده از یک ستون حاوی رزین آمیلوز، خالص‌سازی پروتئین بیانی از مایع رویی انجام گردید.

به منظور تعیین خصوصیات آنتی‌ژنی پروتئین نوترکیب حاصل از بیان ژن *p24*، پروتئین‌های خالص شده MBP-P24 و MBP، در ژل پلی‌اکریلامید الکتروفورز شدند. سپس پروتئین‌ها طی ۳ ساعت و با جریان الکتریسیته ۶۰ ولت به غشای نیتروسلولزی منتقل شدند. پس از انتقال، غشای نیتروسلولزی به مدت ۲ ساعت در محلول فسفات بافر سالین دارای ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBST) حاوی ۵ درصد پودر شیر خشک، 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 PBS دارای ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBST)، سرم کنترل مثبت یک کیت تجاری الایزای BLV (IDVet، فرانسه)، رقیق شده با نسبت ۱/۵۰ در بافر PBST، روی غشا اضافه شد. پس از ۱ ساعت انکوباسیون و ۳ بار شستشو با بافر PBST، غشا به مدت ۱ ساعت در رقت ۱/۱۰۰۰ از یک کنژوگه پراکسیداز ضد IgG گاو (Komabiotech، کره‌ی جنوبی) در بافر PBST قرار داده شد. در انتها پس از ۳ بار شستشو با بافر PBST، جهت رویت نتیجه‌ی واکنش، از محلول کروموژن سوبسترای کلرونفتول (Sigma،امریکا) و آب اکسیژنه استفاده شد.

نتایج

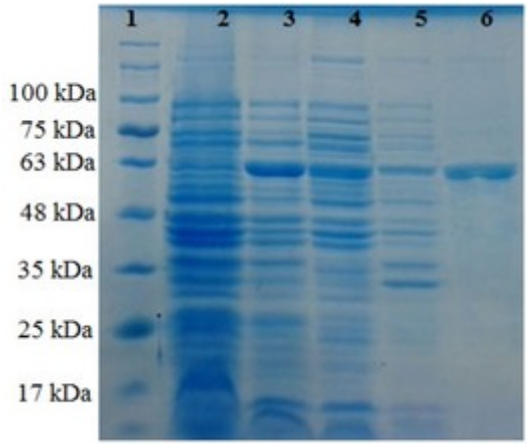
پس از تکثیر ژن *p24* توسط واکنش PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد در کنار خط‌کش DNA الکتروفورز شد. نتایج الکتروفورز نشان داد که واکنش PCR با موفقیت منجر به ساخت قطعه‌ی DNA مورد انتظار با طول ۵۶۷ جفت باز شده است (تصویر ۱). پس از انجام مرحله‌ی اتصال بین محصول PCR و ناقل

pMalc2x، انتقال محصولات اتصال یافته به سویه‌ی DH5α باکتری *اشرشیاکلی* صورت گرفت. ظهور کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط LB جامد آمپی‌سیلین‌دار، نشان‌دهنده‌ی ورود موفقیت‌آمیز پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در باکتری‌ها بود. غربالگری کلونی‌های باکتریایی مذکور با روش PCR نشان از صحت کلونینگ ژن *p24* در سویه‌ی DH5α باکتری *اشرشیاکلی* داشت (تصویر ۱). سه کلونی حاوی پلاسمیدهای نوترکیب تایید شده با PCR، تعیین توالی شدند. بررسی توالی‌های به دست آمده با توالی مرجع ژن *p24* ثبت شده در بانک اطلاعات ژنی، نشان از عدم بروز جهش در این توالی‌ها داشت.

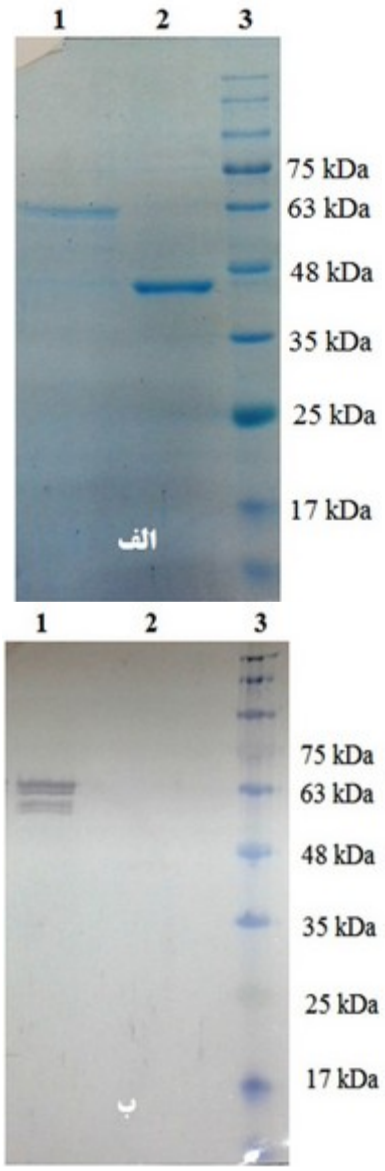


تصویر ۱: الکتروفورز محصول تکثیر شده توسط PCR و پلاسمیدهای استخراج شده. ستون ۱: خط‌کش DNA (اندازه‌ی برخی از قطعات خط‌کش ژنی برحسب جفت باز نشان داده شده است)، ستون ۲: محصول ۵۶۷ جفت بازی ژن *p24* و ستون‌های ۳ و ۴: به ترتیب پلاسمید pMalc2x بدون ژن و دارای ژن *p24* را نشان می‌دهند. پلاسمید دارای قطعه‌ی ژنی *p24* بالاتر از پلاسمید فاقد ژن قرار گرفته است (پلاسمیدها به صورت دو باندی مشاهده شدند).

پس از اطمینان از صحت کلونینگ، بیان پروتئین p24 با استفاده از SDS- PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج الکتروفورز روی ژل اکریلامید نشان داد که باکتری مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG، حاوی یک پروتئین جدید در محدوده‌ی ۶۳ کیلودالتون بود که با وزن مولکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی (با احتساب وزن مولکولی تقریبی ۲۰/۵۵ کیلودالتون برای پروتئین حاصل از ناحیه‌ی کلون شده ژن *p24* و ۴۲ کیلودالتون برای پروتئین MBP کد شده توسط پلاسمید) تقریباً هم‌خوانی داشت (تصویر ۲). بررسی حلالیت پروتئین بیانی نشان داد که این پروتئین به میزان بیش‌تری در فاز مایع قرار داشت و در نتیجه محلول و به سهولت قابل خالص‌سازی بود (تصویر ۲). ویژگی آنتی‌ژنیک پروتئین بیان شده نیز به کمک آزمایش وسترن بلات بررسی شد. نتایج وسترن بلات نشان داد که پروتئین بیان شده به طور اختصاصی با سرم تجاری دارای آنتی‌بادی ضد BLV واکنش داد. این در حالی است که هیچ واکنشی با پروتئین MBP بیان شده توسط پلاسمید دیده نشد (تصویر ۳). در آنالیز وسترن بلات، پروتئین p24 بیان شده به صورت دو باند دیده شد که این امر به دلیل شکستگی این پروتئین حین فرآیند خالص‌سازی بود.



تصویر ۲: القای بیان پروتئین در باکتری *اشرشیاکلی* دارای سازه‌ی pMALc2x-p24. ستون ۱: نشان‌گر پروتئینی (سیناژن، ایران)، ستون ۲: کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب قبل از القا با IPTG، ستون ۳: کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از القا با IPTG، ستون‌های ۴ و ۵: به ترتیب مایع رویی و رسوب حاصل از سانتریفیوژ عصاره‌ی سونیکه شده باکتری حاوی پروتئین نوترکیب p24، ستون ۶: پروتئین نوترکیب p24 پس از خالص‌سازی.



تصویر ۳: الکتروفورز پروتئین‌های MBP-P24 و MBP خالص شده روی ژل پلی اکریلامید (الف) و وسترن بلاتینگ (ب). در این تصویر ستون‌های ۱ تا ۳ به ترتیب نشان‌گر پروتئین‌های MBP-P24، MBP خالص شده و نشان‌گر پروتئینی می‌باشند.

بحث

P24 به عنوان یکی از پروتئین‌های ساختاری و ایمونوژن BLV در مطالعات گوناگون و در سیستم‌های متفاوت، بیان و مورد تحقیق قرار گرفته است. هدف کلی از این مطالعات در بیش‌تر موارد دستیابی به آنتی‌ژن مناسب برای استفاده در آزمایش‌های سرولوژی بوده است. علاوه بر ایمنی‌زایی بالای این پروتئین، یکی از دلایل مهم توجه به p24 این بوده است که احتمالاً در آینده واکسن‌های نوترکیب ضد BLV با استفاده از گلیکوپروتئین gp51 ساخته خواهند شد و در این صورت آزمایش‌های الایزا باید قادر به متمایز نمودن حیوانات آلوده به ویروس از حیوانات واکسینه شده باشند (Larsen et al. 2013). از جمله مطالعات صورت گرفته در خصوص بیان p24 نوترکیب می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

در سال ۱۹۸۹ Dumont و همکاران پروتئین p24 را در مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* بیان نمودند. این محققین دریافتند که p24 بیان شده در این مخمر از مقاومت بالایی در برابر تخریب پروتئولیتیک برخوردار بود. Zajac و همکاران و Bicka و همکاران به ترتیب در سال‌های ۱۹۸۹ و ۲۰۰۰ امکان بیان پروتئین p24 را در سیستم باکتریایی بررسی نموده و نشان دادند که پروتئین بیان شده در *اشرشیاکلی* در آزمایش وسترن بلات به وسیله‌ی سرم گاوهای مبتلا به عفونت BLV و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد p24 طبیعی قابل شناسایی می‌باشد. Juliarena و همکاران در سال ۲۰۰۷ پس از بیان p24 در *اشرشیاکلی*، از آن برای تولید آنتی‌بادی ضد p24 در مرغ استفاده نموده و نشان دادند که به جای اتصال مستقیم p24 به پلیت الایزا می‌توان از آنتی‌بادی مرغی ضد آن به عنوان واسطه استفاده نمود. طبق نظر این محققین، متصل نمودن آنتی-ژن به پلیت الایزا با واسطه‌ی آنتی‌بادی می‌تواند از مخفی شدن اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی پروتئین مورد نظر ممانعت نماید. Momtaz و همکاران در سال ۲۰۰۸ قطعه‌ایی از پلی پروتئین gagBLV با وزن ۳۹ کیلودالتون که در بر گیرنده‌ی توالی پروتئین p24 بود را با استفاده از ناقل بیانی pET-28(a) و در سویه BL21 (DE3) از *اشرشیاکلی* بیان نمودند. این محققین نشان دادند که پروتئین بیان شده به خوبی توسط سرم گاو آلوده به BLV در آزمایش وسترن بلات قابل شناسایی بود. در یکی از آخرین مطالعات صورت گرفته در راستای تولید p24 نوترکیب، Larsen و

همکاران در سال ۲۰۱۳ اقدام به تولید این پروتئین در سیستم بیانی باکولوویروس نمودند. نتایج به دست آمده نشان داد پروتئین تولید شده در این سیستم از ویژگی‌های آنتی‌ژنی مناسب برای شناسایی آنتی‌بادی ضد BLV در آزمایش‌های وسترن بلات و الایزا برخوردار بود.

در مطالعه‌ی حاضر، پروتئین p24 در سویه‌ی DH5α *اشرشیاکلی* بیان گردید. نتایج وسترن بلات، نشان از قابلیت پروتئین بیان شده برای جذب آنتی‌بادی‌های ضد BLV و دارا بودن اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک ویروسی داشت. یک پروتئین دارای اپی‌توپ‌های متعددی است و به دلیل این که سرم استفاده شده در این تحقیق از نوع پلی‌کلونال بود که طبیعتاً علیه اپی‌توپ‌های مختلف ایجاد شده است، بنابراین پروتئین p24 بیان شده علی‌رغم شکسته شدن حین فرآیند خالص‌سازی، توانست با این نوع آنتی‌بادی واکنش دهد. این موضوع می‌تواند توجیه کننده‌ی دو باندی دیده شدن این پروتئین در آزمایش وسترن بلات باشد. به منظور معرفی این پروتئین به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده‌ی کف پلیت جهت طراحی آزمایش الایزای تشخیصی برای حیوانات آلوده به ویروس لکوز در مطالعات آینده، لازم است واکنش این پروتئین نوترکیب با آنتی‌بادی‌های تولید شده طی عفونت طبیعی با ویروس بررسی شود. پلاسمید pMalc2x استفاده شده در این تحقیق دارای پروموتر قوی *lac* است که موجب بیان مؤثر و بیش‌تر پروتئین در مقایسه با بسیاری از پلاسمیدهای بیانی پروکاریوتی خواهد شد. مزیت دیگر استفاده از پلاسمید pMalc2x این است که MBP امکان خالص‌سازی پروتئین بیانی را با استفاده از رزین آمیلوز به نحو مطلوب فراهم می‌کند. رزین آمیلوز نسبت به سایر رزین‌های مورد استفاده برای خالص‌سازی پروتئین‌های بیانی در *اشرشیاکلی*، قیمت ارزان‌تری داشته و با جذب پروتئین‌های دارای دنباله‌ی MBP به خوبی و با بازده بالا موجب خالص‌سازی این پروتئین‌ها می‌شود. با توجه به بیان موفق پروتئین p24 در این مطالعه، در تحقیق‌های آینده می‌توان کارایی این پروتئین نوترکیب را در طراحی یک آزمایش الایزای تشخیصی و یا تولید آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد ویروس BLV بررسی نمود.

منابع

Bex, F.; Bruck, C.; Mammerickx, M.; Portetelle, D.; Ghysdael, J.; Cleuter, Y. et al. (1979). Humoral antibody response to bovine leukemia virus infection in cattle and sheep. Cancer Research, 39(3): 1118-1123.

Bicka, L.; Kuźmak, J.; Kozaczyńska, B.; Plucienniczak, A. and Skorupska, A. (2000). Expression of bovine leukemia virus protein p24 in *Escherichia coli* and its use in the immunoblotting assay. Acta Biochimica Polonica, 48(1): 227-232.

Burridge, M.J.; Puhr, D.M. and Hennemann, J.M. (1981). Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. Journal of the American Veterinary Medical Association, 179(7): 704-707.

D'Angelino, J.L.; Garcia, M. and Birgel, E.H. (1998). Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. Tropical Animal Health and Production, 30(1): 13-15.

Deshayes, L.; Levy, D.; Parodi, A.L. and Levy, J.P. (1980). Spontaneous immune response of bovine leukemia virus-infected cattle against five different viral proteins. International Journal of Cancer, 25(4): 503-508.

Dumont, J.; Legrain, M.; Portetelle, D.; Brasseur, R.; Burny, A. and Hilger, F. (1989). High yield synthesis of the bovine leukemia virus (BLV) p24 major internal protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 79(2): 219-226.

EFSA Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare),. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. EFSA Journal, 2015, 13(7): 4188, 63 P.

Hopkins, S.G. and DiGiacomo, R.F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice, 13(1): 107-128.

Juliarena, M.; Gutierrez, S. and Ceriani, C. (2007). Chicken antibodies: a useful tool for antigen capture ELISA to detect bovine leukaemia virus without cross-reaction with other mammalian antibodies. Veterinary Research and Communication, 31(1):43-51.

Larsen, A.; Gonzalez, E.T.; Serena, M.S.; Echeverría, M.G. and Mortola, E. (2013). Expression of p24 gag protein of bovine leukemia virus in insect cells and its use in immunodetection of the disease. Molecular Biotechnology, 54(2): 475-483.

Miller, J.M. and Olson, C. (1972). Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. Journal of the National Cancer Institute, 49: 1459-1462.

Momtaz, H.; Hemmatzadeh, F. and Keyvanfar, H. (2008). Expression of bovine leukemia virus p24 protein in bacterial cell. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(20): 2433-2437.

OIE (2013). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013. Available online: http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/

Sagata, N.; Yasunaga, T.; Tsuzuku-Kawamura, J.; Ohishi, K.; Ogawa, Y. and Ikawa, Y. (1985). Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 82: 677-681.

Zajac, V.; Sláviková, K. and Reinerová, M. (1989). Bacterial expression of the p24 gag protein of the bovine leukaemia virus. Folia Biologica (Praha), 35(1): 42-44.

Design and construction of a recombinant gene construct expressing bovine leukemia virus p24 protein in *Escherichia coli*

Najafi, Z.[1]; Seyfi Abad Shapouri, M.R.[2] and Pasandideh. R.[3]

Received: 03.09.2016 Accepted: 16.05.2017

Abstract

Enzootic bovine leukemia (EBL) is a retroviral disease which is caused by bovine leukemia virus (BLV) and typically occurs in the industrial farms. The disease reduces the productivity of animals and therefore causes considerable economic losses in herd. BLV infections control program is consisted on serological assays, identification and isolation or culling the seropositive animals. In this study, the gene encoding p24 protein of BLV was amplified by PCR, ligated into the prokaryotic expression vector, pMalc2x, and subsequently expressed in DH5α strain of *Escherichia coli*. Expressed recombinant protein was analyzed using SDS-PAGE and western blotting (immunoblot) assay. Molecular weight of the expressed protein (63 kDa) was consistent with the expected molecular weight of maltose binding protein-p24 fusion protein. Western blotting analysis showed that the expressed p24 protein specifically reacted with a positive anti-BLV commercial serum. Thus, in this study the p24 protein of BLV was successfully expressed by the pMalc2x-p24 recombinant construct in *Escherichia coli*.

Key words: Bovine leukemia virus (BLV), p24 recombinant protein, *Escherichia coli*

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
3- PhD Graduated Animal Genetics and Breeding, Faculty of Animal and Food Technology Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
Corresponding Author: Seyfi Abad Shapouri, M.R., E-mail: masoudrs@yahoo.com