

همسانه‌سازی و تعیین توالی ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی در اشرشیاکلی

رضا پسندیده^{*1} - محمد تقی بیگی نصیری² - مسعود رضا صیفی‌آباد شاپوری³ - جمال فیاضی⁴ - هدایت‌الله روشنفکر² - محسن لطفی⁵

تاریخ دریافت: 1394/07/26

تاریخ پذیرش: 1395/01/16

چکیده

تب بی‌دوام گاوی (BEF) یک بیماری ویروسی قابل انتقال توسط بندپایان در گاو و گاومیش می‌باشد که در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آسیا، استرالیا و آفریقا پراکنده شده است. در سال‌های اخیر این بیماری در بسیاری از استان‌های ایران نیز شایع شده و موجب بروز خسارت‌های اقتصادی گردیده است. در این مطالعه ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی پس از تکثیر با واکنش PCR در ناقل pTZ57R/T کلون و تعیین توالی شد. پس از اطمینان از صحت همسانه‌سازی، محصول PCR با استفاده از آغازگرهای دارای جایگاه برشی آنزیم BamHI تکثیر و به پلاسمید بیانی pMalc2x انتقال داده شد و سپس به سلول‌های پذیرا شده اشرشیاکلی (سویه‌های DH5α و Rosetta) منتقل گردید. غربال‌گری کلونی‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب با روش PCR و هضم آنزیمی، نشان از ورود موفقیت‌آمیز سازه pMalc2x-G به اشرشیاکلی داشت. این مطالعه اولین گزارش از همسانه‌سازی ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی در ایران است که می‌تواند پایه‌ای برای تولید واکسن و ساخت کیت تشخیصی الایزا برای این بیماری در مطالعات آینده باشد.

واژه‌های کلیدی: اشرشیاکلی، تب بی‌دوام گاوی (BEF)، ژن گلیکوپروتئین G، همسانه‌سازی.

مقدمه

بررسی‌های سرولوژیک نشان داده‌اند که کشور نیوزیلند و جزایر پاسیفیک عاری از این بیماری هستند (6). در ایران نیز 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. علاوه بر گاو، گاومیش آبی نیز به بیماری حساس است و علائم بالینی صرفاً در این دو حیوان بروز می‌کند. اولین نشانه بالینی بیماری، تب ناگهانی 40-41/5 درجه سانتی‌گراد به صورت دو مرحله‌ای و گاهی هم سه مرحله‌ای است که معمولاً 12-18 ساعت طول می‌کشد. اغلب سایر علائم چند ساعت پس از کاهش و قطع تب در اکثر گاوها بروز می‌کند. قطع اشتها و کاهش شدید شیر، یبوست شدید در بعضی از دامها و اسهال در دامهای دیگر، ترشحات غلیظ و چسبندگی در بینی و ترشحات سروزی آبکی از چشم، جمود شدید عضلات و مفاصل توأم با ضعف در عضلات اندام‌های حرکتی و لنگش از جمله علائم بالینی این بیماری می‌باشند. تأثیرات اقتصادی بیماری تب بی‌دوام شدید و دامنه آن از مرگ و میر تا کاهش تولید و تأثیر بر روی تجارت داخلی و خارجی است. درصد شیوع ممکن است بالا باشد، ولی درصد مرگ و میر پایین است. کاهش وزن در اثر کاهش عضلات و چربی بسیار اندک است و وزن دام بیمار 2 هفته بعد از بهبودی به حالت اولیه باز می‌گردد. کاهش میزان شیر 95-34 درصد

تب بی‌دوام گاوی (BEF)⁶ یک بیماری ویروسی قابل انتقال توسط بندپایان، همه‌گیر و غیر واگیردار است. منشأ بیماری نامشخص است، ولی اولین گزارش‌ها در اواسط قرن نوزدهم از شرق آفریقا و سپس از رودزیا، کنیا، آفریقای جنوبی، اندونزی، هندوستان، مصر، فلسطین، استرالیا و در سال 1949 در ژاپن داده شد. تب بی‌دوام گاوی هرگز از نیمکره غربی (آمریکای شمالی و جنوبی) گزارش نشده و

1- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ملاتانی، ایران.

2 و 4- به ترتیب استادان و دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ملاتانی، ایران.

3- استاد بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

5- مدیریت کنترل کیفی فرآورده‌های بیولوژیک موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

* - نویسنده مسئول: (Email: Rezapasandideh63@gmail.com)

DOI: 10.22067/ijasr.v0i0.50712

6- Bovine Ephemeral Fever

بیماری در مطالعات آینده است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های ویروسی و باکتریایی

سویه ویروس تب بی‌دوام گاوی مورد استفاده در این مطالعه توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (کرج، ایران) از کشور ژاپن تهیه شده بود. تکثیر این ویروس در سلول‌های ریه همستر (HmLu-1)⁷، کشت داده شده در محیط کشت سلولی RPMI⁸ (Bio Idea، ایران) حاوی پنج درصد سرم جنین گاو صورت گرفت. سویه‌های اشرشیاکلی DH5 α و Rosetta نیز به‌عنوان میزبان‌های پروکاریوتی جهت کلونینگ از شرکت سیناژن (ایران) تهیه شدند.

طراحی آغازگر

توالی نوکلئوتیدی ژن G با شماره دسترسی AB462028 از بانک ژن استخراج و ناحیه کدکننده این ژن مشخص گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار آنلاین BioEdit محل برش آنزیم‌های محدودگر روی این ژن مشخص گردید. در مرحله بعد با در نظر گرفتن الگوی هضمی این ژن با آنزیم‌های محدودکننده و نیز با توجه به توالی نوکلئوتیدی پلاسمید بیانی پروکاریوتی pMalc2x، توالی محل برش آنزیم BamHI (Fermentas، آمریکا) به ابتدای آغازگرهای ژن G (GR و GF)، طراحی شده توسط وانگ و همکاران (12)، افزوده شد. توالی آغازگرهای جدید (GF+B و GR+B) با برنامه Oligo Analyzer بررسی و همراه با آغازگرهای اولیه GR و GF به شرکت Bioneer (کره جنوبی) سفارش ساخت داده شد. توالی‌های آغازگرهای مورد استفاده در جدول 1 نشان داده شده‌اند.

استخراج RNA و واکنش RT-PCR

با مشاهده آثار تخریب سلول‌های HmLu-1 توسط ویروس، کشت سلول متوقف گردید. استخراج RNA از مایع محیط کشت سلول‌های تلقیح شده با ویروس با استفاده از محلول تجاری RNXP^{plus} (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. RNA استخراج شده، برای انجام مرحله‌ی نسخه‌برداری معکوس و ساخت cDNA توسط کیت AccuPower[®] RT PreMix kit (کره جنوبی) مورد استفاده قرار گرفت. این واکنش در حجم نهایی 20 میکرولیتر و طبق دستور زیر صورت گرفت: 10 میکرولیتر از RNA استخراج شده، 0/5 پیکومول آغازگر رفت GF و 9/5 میکرولیتر آب دو بار تقطیر در یک میکروتیوب حاوی RT PreMix لیوفیلیزه شده

و به طور متوسط 46 درصد است و میزان شیر تولیدی در دوران نقاهت به میزان قبل از بیماری نخواهد رسید. در دام‌های ماده ممکن است سقط و در دام‌های نر نازایی موقت ایجاد شود. بنابراین بیماری تب بی‌دوام تهدید مهمی برای تجارت داخلی و خارجی است (7، 12 و 15).

ویروس تب بی‌دوام در طبیعت تنها از طریق نیش حشرات دور پرواز گسترش می‌یابد. این ویروس در جنس افمروویروس¹ از خانواده رابدوویریده طبقه‌بندی شده است. مشابه دیگر رابدوویروس‌ها، ویروس‌های BEF شبیه گلوله تفنگ² یا مخروطی شکل³ می‌باشند. ژنوم این ویروس از نوع RNA تک‌رشته‌ای منفی با طول 14900 جفت باز است و پنج پروتئین L، G، N، P و M را کد می‌کند (11 و 16). پروتئین G یک گلیکوپروتئین پیراگیر ویرونی می‌باشد که دارای پنج جایگاه آنتی‌ژنیک (G1، G2، G3a، G3b، G4) در سطح خود می‌باشد (5 و 13). طبق مطالعات گذشته مشخص شده است که پروتئین سطحی G ایمنی حفاظتی در گاو را القا می‌کند (3، 4 و 9). این پروتئین تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده خاص ویروسی را القا کرده و موجب ایجاد ایمنی غیر فعال در مقابل عفونت داخل مغزی⁴ در موش‌های شیرخوار (1) و نیز حفاظت گاو در مقابل تزریق داخل وریدی ویروس BEF به‌صورت آزمایشگاهی شده است (3 و 9).

در صورتی که تشخیص تب بی‌دوام در اوایل این بیماری باشد، درمان بسیار مؤثر خواهد بود. آزمایش‌های سرولوژی شامل خنثی‌سازی ویروس (VN)⁵ و الیازی مهاری⁶ برای تشخیص تب بی‌دوام وجود دارند. آزمایش الیازی مهاری یک روش اختصاصی و سریع جهت تشخیص این بیماری از سایر ویروس‌هایی است که قرابت پادگنی با تب بی‌دوام دارند (14). بنابراین این نوع از روش الیاز، از اهمیت خاصی به‌عنوان یک آزمایش مطلوب پاراکلینیکی برخوردار است. از طرفی به دلیل ماهیت ایمنی‌شناسی تب بی‌دوام در گاو، تقریباً تمامی دام‌هایی که یک‌بار با این ویروس آلوده شوند در مقابل چالش طبیعی و تجربی بیماری ایمن می‌باشند. از این رو واکسیناسیون به‌عنوان روشی مؤثر جهت کنترل و پیشگیری علیه این بیماری عنوان شده است (10). با این حال تاکنون تلاشی در زمینه تولید واکسن و ساخت کیت تشخیصی الیازا برای بیماری تب بی‌دوام گاوی در ایران صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه، همسانه‌سازی ژن گلیکوپروتئین G ویروس BEF در ناقل پلاسمیدی به‌منظور تولید واکسن و طراحی کیت تشخیصی الیازا برای این

- 1- Ephemerovirus
- 2- Bullet shaped
- 3- Cone-shaped
- 4- Intracerebral infection
- 5- Virus neutralisation
- 6- Blocking ELISA

7- Hamster lung

8- Roswell Park Memorial Institute

ثانیه، اتصال در 52 درجه سانتی‌گراد برای 60 ثانیه، بسط در 72 درجه سانتی‌گراد برای 105 ثانیه و در آخر یک مرحله بسط نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد برای هفت دقیقه صورت گرفت. محصول تکثیر شده توسط PCR در کنار نردبان ژنی یک کیلوباز (Fermentas، امریکا) بر روی ژل آگارز 1/5 درصد الکتروفورز شد. به دلیل رنگ‌آمیزی ژل با DNA safe stain، نتیجه الکتروفورز در دستگاه ژل داک و در معرض اشعه فرابنفش قابل مشاهده بود. پس از تأیید صحت PCR، محصول PCR توسط کیت (Gel & GF-1 Ambiclean kit (Vivantis، مالزی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مخلوط و یک ساعت در دمای 50 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس جهت توقف واکنش، این مخلوط در 95 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انکوبه گردید.

در مرحله بعد با استفاده از هر دو آغازگر GF و GR، تکثیر cDNA از طریق واکنش PCR صورت گرفت. به این منظور مقدار پنج میکرولیتر از cDNA، 0/8 پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، 12/5 میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon، دانمارک)، یک میلی‌مولار $MgCl_2$ و پنج میکرولیتر آب دو بار تقطیر در حجم نهایی 25 میکرولیتر مخلوط و تکثیر cDNA با برنامه دمایی 94 درجه سانتی‌گراد برای چهار دقیقه (واشرت‌سازی اولیه) و سپس 35 سیکل به صورت واشرت‌سازی در 94 درجه سانتی‌گراد برای 45

جدول 1- آغازگرهای GF و GR جهت تکثیر اولیه ژن G و آغازگرهای GF+B و GR+B که دارای توالی برشی آنزیم BamHI می‌باشند. زیر توالی برشی این آنزیم خط کشیده شده است

Table 1- GF and GR primers used for the primary amplifying of G gene and GF+B and GR+B primers containing the BamHI restriction endonuclease sequence. BamHI restriction sequence is underlined

آغازگر Primer	توالی Sequence
GF	5'-ATGTTCAAGGTCCTMATAATTACC-3'
GR	5'-TAATGATCAAAGAACTATCATCAC-3'
GF+B	5'-GTCTGGATCCGATATGGCTAAGGTCCTCATAATTACC-3'
GR+B	5'-GTCGGGATCCCTTAATGATCAAAGAACCTATCATCAC-3'

آغازگرهای عمومی¹ F¹ (-40) M13 و R (-40) M13 انجام گرفت. هم‌ترازی توالی آمینواسیدی پیش‌بینی شده ژن هدف با توالی مرجع ژن G ویروس BEF موجود در پایگاه² NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 صورت گرفت.

همسانه‌سازی ژن G در ناقل بیانی pMalc2x

در این مطالعه از ناقل بیانی pMalc2x برای همسانه‌سازی مجدد ژن G استفاده شد. به این منظور لازم بود که توالی برشی آنزیم BamHI در انتهای محصول PCR قرار داده شود. بنابراین از یک پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-G که حضور ژن هدف در آن تأیید شده بود به عنوان الگو برای واکنش PCR در حضور آغازگرهای دارای توالی برشی آنزیم BamHI استفاده شد. این واکنش به صورت زیر انجام شد: یک میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-G، 0/32 پیکومول از هر کدام از آغازگرهای GF+B و GR+B، یک میکرولیتر آنزیم Pfu DNA پلیمرز (5U)، 2/5 میکرولیتر بافر 10X Pfu PCR (بدون $MgSO_4$)، 0/4 میلی‌مولار dNTPs، پنج میلی‌مولار $MgCl_2$ و 16/2 میکرولیتر آب دو بار تقطیر در حجم نهایی 25 میکرولیتر مخلوط و تکثیر طی 35 چرخه دمایی 94 درجه

همسانه‌سازی ژن G در ناقل pTZ57R/T و تعیین توالی

پس از خالص‌سازی، ژن G با روش همسانه‌سازی T/A به ناقل pTZ57R/T (Fermentas، امریکا) منتقل شد. برای انجام این واکنش، سه میکرولیتر محصول PCR خالص شده، 2 میکرولیتر ناقل، 40 واحد آنزیم DNA T4 لیگاز، 1/5 میکرولیتر بافر لیگاز (10X) و 7/5 میکرولیتر آب دو بار تقطیر در حجم نهایی 15 میکرولیتر مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار گرفت. واکنش اتصال به مدت یک شبانه روز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد ادامه پیدا کرد. سپس محصول اتصال با استفاده از روش شوک حرارتی به سویه $DH5\alpha$ /اشرشیاکلی پذیرا شده توسط کلرید کلسیم منتقل گردید. کلونی‌های مثبت توسط غربال‌گری آبی/سفید با استفاده از X-gal و IPTG (Sigma، امریکا) بر روی محیط کشت LB جامد آمپی‌سیلین‌دار (جابر ابن حیان، ایران) جداسازی شدند. به منظور تأیید حضور ژن هدف در کلونی‌های سفید، از روش کلونی-PCR نیز استفاده شد. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis، مالزی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از سه کلونی استخراج و به منظور بررسی وقوع جهش‌های احتمالی برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) ارسال گردید. تعیین توالی با استفاده از

1- Universal primers

2- National Center for Biotechnology Information

نوترکیب تأیید شده با PCR، توسط شرکت تکاپوزیست تعیین توالی شدند. جمع‌بندی نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی این سه کلونی و BLAST کردن آن با توالی‌های ژن G سویه‌های مختلف از ویروس BEF ثبت شده در پایگاه بانک ژن NCBI نشان داد که سویه ویروسی مورد استفاده در این مطالعه بیش‌ترین قرابت را با سویه YHL (یاماگوچی، ژاپن، 1966) داشت. با این وجود چهار جایگزینی در توالی آمینواسیدی پیش‌بینی شده ژن هدف در مقایسه با سویه YHL مشاهده شد. از بین آن‌ها، جایگزینی‌های آمینواسیدی در موقعیت‌های 75 (E به G)، 170 (N به T) و 333 (K به R) در برخی دیگر از جدایه‌های ویروس BEF نیز مشاهده شدند، ولی جایگزینی در موقعیت 19 (I به T) تنها در سویه مورد مطالعه در این تحقیق وجود داشت. با این حال هم‌ترازی توالی‌های آمینواسیدی پیش‌بینی شده مربوط به جایگاه‌های آنتی‌ژنیکی G1، G2 و G3 ژن G کلون شده در ناقل pTZ57R/T با برخی سویه‌های ویروس BEF ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که هیچ جهش تأثیرگذاری در نتیجه PCR در این جایگاه‌ها رخ نداده است (جدول 2). با استفاده از نرم‌افزار آنالین ExPASy ProtParam و بررسی توالی به‌دست آمده از شرکت تکاپوزیست مشخص شد که این ژن با 608 آمینواسید دارای نقطه ایزوالکتریک 6/25 می‌باشد و می‌تواند پروتئینی با وزن مولکولی 70/456 کیلو دالتون را کد کند.

انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای GF+B و GR+B روی یک پلاسمید pTZ57R/T-G حاوی ژن هدف، منجر به تکثیر محصولاتی به طول 1823 جفت باز گردید که دارای توالی برشی آنزیم BamHI جهت انتقال به ناقل بیانی pMalc2x بودند (شکل 2). غربال‌گری کلونی‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب pMalc2x-G با روش PCR و هضم آنزیمی، نشان از صحت همسانه‌سازی ژن G در باکتری/اشرشیاکلی سویه‌ی DH5α داشت (شکل 2). در پایان استخراج پلاسمیدهای نوترکیب از کلونی‌های مذکور و انتقال آن‌ها به اشرشیاکلی سویه Rosetta صورت گرفت که رشد کلونی‌های باکتریایی روی محیط LB جامد آمپی‌سیلین‌دار نشان از ورود موفقیت‌آمیز سازه pMalc2x-G به این سویه داشت.

بحث

در سال‌های اخیر بیماری تب بی‌دوام گاوی در ایران گسترش یافته و موجب بروز خسارت‌های اقتصادی در برخی از گاو‌داری‌های کشور شده است. اگرچه وجود تفاوت‌های آنتی‌ژنیکی در سویه‌های مختلف ویروس این بیماری به کمک آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مشخص شده است، اما سویه‌های مختلف این ویروس از مناطق جغرافیایی متفاوت، موجب ایمنی محافظت‌کننده علیه یکدیگر می‌شوند (10). بنابراین واکسیناسیون به‌عنوان روشی مؤثر جهت

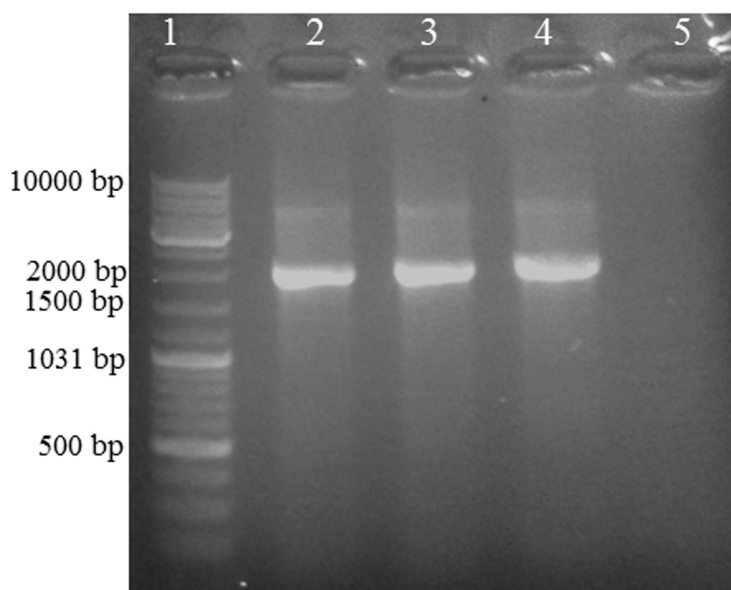
سانتی‌گراد 45 ثانیه، 52 درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و 72 درجه سانتی‌گراد 2 دقیقه انجام شد. مراحل دمایی پیش و پس از تکثیر به ترتیب شامل 94 درجه سانتی‌گراد چهار دقیقه و 72 درجه سانتی‌گراد 10 دقیقه بود. محصول PCR توسط کیت (GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR (Vivantis، مالزی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی شد. به منظور آماده‌سازی ناقل بیانی pMalc2x، ابتدا این پلاسمید در باکتری/اشرشیاکلی DH5α و در محیط مایع LB دارای آمپی‌سیلین، کشت شبانه داده شد و سپس توسط کیت استخراج پلاسمید GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis، مالزی) خالص‌سازی گردید.

به منظور انتقال ژن G به ناقل، ابتدا محصول PCR تخلیص شده و پلاسمید pMalc2x، هر دو توسط آنزیم BamHI هضم و با استفاده از کیت خالص‌سازی شدند. برای جلوگیری از اتصال مجدد ناحیه برش خورده پلاسمید به خود، پلاسمید هضم شده با استفاده از آنزیم آلکالین فسفاتاز به دست آمده از میگو (SAP) طی سه ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی‌گراد دفسفریله شد. پس از این مرحله، عمل اتصال پلاسمید و DNA با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز (10X) طبق دستورالعمل آنزیم صورت گرفت. سپس محصول اتصال، با فرض تشکیل پلاسمیدهای حلقوی، با روش شوک حرارتی به باکتری/اشرشیاکلی سویه DH5α پذیرا شده با کلرید کلسیم 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 صورت گرفت. پس از اطمینان از صحت همسانه‌سازی، پلاسمید نوترکیب استخراج و با استفاده از روش شوک حرارتی به اشرشیاکلی سویه Rosetta انتقال داده شد.

نتایج

پس از ساخت cDNA و انجام واکنش PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد در کنار نردبان ژنی یک کیلوباز الکتروفورز شد. نتایج الکتروفورز نشان داد که واکنش PCR با موفقیت منجر به ساخت قطعه DNA مورد انتظار با طول 1823 جفت‌باز شده است (شکل 1). پس از انجام مرحله اتصال بین محصول PCR و ناقل pTZ57R/T، انتقال محصولات اتصال یافته به سویه DH5α باکتری/اشرشیاکلی صورت گرفت. ظهور کلونی‌های سفید بر روی محیط LB جامد دارای IPTG و Xgal نشان‌دهنده ورود موفق پلاسمید حاوی ژن G در باکتری‌ها بود. با استفاده از روش کلونی-PCR، از صحت همسانه‌سازی و حضور ژن هدف در کلونی‌های سفید اطمینان حاصل شد (شکل 1). سه کلونی حاوی پلاسمیدهای

کنترل و پیشگیری بیماری تب بی‌دوام گاوی عنوان شده است.



شکل 1- باند 1823 جفت بازی حاصل از تکثیر ژن G و نتیجه PCR روی کلونی‌های سفید DH5 α بر روی ژل آگارز 1/5%. ستون 1: نردبان ژنی 1 کیلوباز؛ ستون 2: محصول 1823 جفت بازی ژن G؛ ستون‌های 3 و 4: کلونی‌های سفید مثبت؛ ستون 5: کلونی منفی.

Figure 1- The 1823 bp band of G gene and colony PCR from random selected DH5 α white colonies on 1.5% agarose gel. Lane 1: 1 Kb DNA Ladder; Lane 2: 1823 bp product of G gene; Lanes 3 and 4: positive colonies; Lane 5: negative colony.

جدول 2- هم‌ترازی توالی‌های آمینواسیدی پیش‌بینی شده مربوط به جایگاه‌های آنتی‌ژنیکی G1، G2 و G3 ژن G کلون شده در ناقل pTZ57R/T با برخی سویه‌های ویروس BEF ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI. تفاوت‌های آمینواسیدی با سویه مورد مطالعه، به صورت برجسته و زیر خطدار مشخص شده‌اند.

Table 2- Alignment of the predicted amino acid sequences corresponding to the antigenic sites of G1, G2 and G3 of G gene cloned into the pTZ57R/T vector with some strains of BEFV in NCBI. The residues differing from the sequence of the studied strain are bolded and underlined.

	G3a (49-63)	G2 (168-189)	G3b (215-231)	G3c (262-271)	G1 (487-503)
Studied strain	QAHHNLAKEDEHYNKI	FLTPCTINDSKTKGCPLKDITG	KSFRSELNDTERLWEAP	IENQTESDFQ	YEEDEKFKPVNLSPHEK
CS1818	QAHHNLAKEDEHYNKI	FLTPCTINDSKTKGCPLKDITG	<u>TS</u> FRSELNDKERLWEAP	<u>IK</u> NQTESDFQ	YEEDEKFKPVNLS <u>NP</u> HEK
YHL	QAHHNLAKEDEHYNKI	<u>FL</u> NPCTINDSKTKGCPLKDITG	KSFRSELNDTERLWEAP	IENQTESDFQ	YEEDEKFKPVNLSPHEK
HL-2002	QAHHNLAKEDEHYNKI	FLTPCTINDSKTKGCPLKDITG	KSFRSELN <u>E</u> TERLWEAP	IENQTESDFQ	YEEDEKFKPVNLSPHEK
2008/TR/CP62	QAHHNLAKEDEHYNKI	FLTPCTINDSKTKGCPLKDITG	KSFRSELNDTERLWEAP	IENQTESDFQ	YEEDEKFKPVNLS <u>PHET</u>
ISR 10/3	QAHHNLAKEDEHYNKI	FLTPCTINDSKTKGCPLKDITG	KSFRSELNDTERLWEAP	IENQTESDFQ	YEEDEKFKPVNLS <u>PHET</u>

pUCI8 کلون و به ویروس واکسینیا¹ انتقال داده شد (3). این محققان گزارش کردند که پروتئین G توانست تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده را القا کند و موجب حفاظت در مقابل عفونت تجربی گردد. پلاسمید pMalc2x استفاده شده در این تحقیق دارای پروموتور قوی lac است که موجب بیان مؤثر و بیشتر پروتئین در مقایسه با سایر پلاسمیدهای بیانی پروکاریوتی خواهد شد. یکی از مشکلات بیان پروتئین‌های هترولوگ در اشرشیاکلی، تولید اشکال نامحلول پروتئین بیانی به صورت اجسام متراکم² است. برای فایق آمدن بر این مشکل،

همچنین تشخیص به موقع این بیماری می‌تواند کمک شایانی به اجرای دستورهای درمانی مناسب کند. بنابراین هدف از این مطالعه، همسانه‌سازی ژن گلیکوپروتئین G ویروس BEF در ناقل‌های pMalc2x و pTZ57R/T به منظور پایه‌ای جهت ساخت واکسن و طراحی کیت تشخیصی الایزا برای این بیماری در مطالعات آینده بود. در تحقیقی، پروتئین G ویروس BEF توسط ناقل باکولوویروسی BacPAK6 کلون و بیان شد (4). این محققان با توجه به خصوصیات محافظتی بالای پروتئین G، پیشنهاد کردند که احتمالاً این پروتئین نوترکیب می‌تواند به‌عنوان واکسن استفاده شود (4). در مطالعه‌ای بر روی گلیکوپروتئین G ویروس BEF، این ژن در ناقل پلاسمیدی

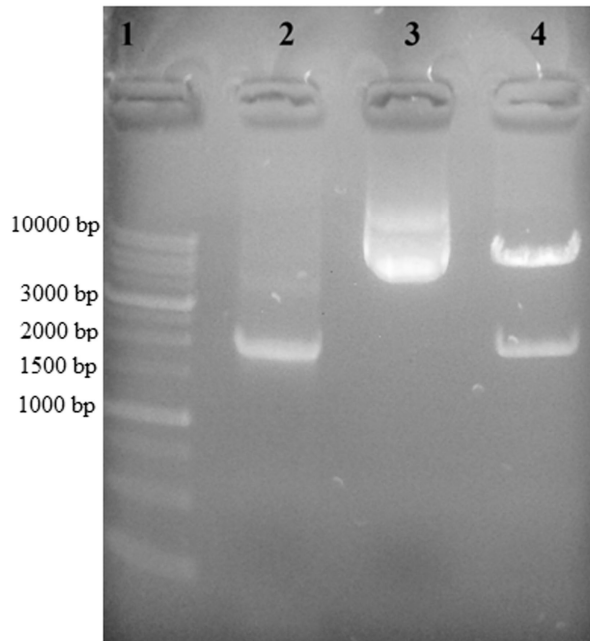
1- Vaccinia virus

2- Inclusion bodies

از پلاسمید pMalc2x جهت همسانه‌سازی ژن G استفاده شد، زیرا این پلاسمید قادر به بیان پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP)¹ می‌باشد که به صورت فیوژن همراه با پروتئین نوترکیب بیان می‌شود و می‌تواند قابلیت حل‌الیت به آن دهد و بنابراین از تشکیل اشکال نامحلول پروتئین در *اشریشیاکلی* جلوگیری خواهد کرد (2). مزیت دیگر استفاده از پلاسمید pMalc2x این است که MBP امکان خالص‌سازی پروتئین بیانی را با استفاده از رزین آمیلوز به نحو مطلوب فراهم خواهد کرد. رزین آمیلوز نسبت به سایر رزین‌های مورد استفاده برای خالص‌سازی پروتئین‌های بیانی در *اشریشیاکلی*، قیمت ارزان‌تری داشته و با جذب پروتئین‌های دارای دنباله MBP به خوبی و با بازده بالا موجب خالص‌سازی این پروتئین‌ها خواهد شد.

اپیتوپ‌های آنتی‌ژنی خنثی‌کننده در پنج جایگاه آنتی‌ژنیکی مستقل (G1 تا G4) در اکتودومین پروتئین G واقع شده‌اند. G1 یک جایگاه خطی در ناحیه C-انتهایی از اکتودومین است که در موقعیت آمینواسیدی 487 تا 503 واقع شده است. G2 یک جایگاه فضایی غیر خطی است که به نظر می‌رسد در دمین فیوژن مجاور به دو آمینواسید سیستئینی به شدت حفاظت شده، قرار گرفته است و در موقعیت آمینواسیدی 168 تا 189 می‌باشد. G3 یک جایگاه فضایی پیچیده است که از سه جزء G3a، G3b و G3c به ترتیب در موقعیت‌های آمینواسیدی 49 تا 63، 215 تا 231 و 262 تا 271 تشکیل شده است. G3 در "سر" غنی از سیستئین¹ از پروتئین G واقع شده است و به نظر می‌رسد این ناحیه، گیرنده اتصال دمین همولوژی پلکستین (PH)² را تشکیل می‌دهد. موقعیت جایگاه آنتی‌ژنیک G4 تاکنون مشخص نشده است (8، 12). هم‌ترازی توالی آمینواسیدی پیش‌بینی شده ژن G کلون شده در این مطالعه با برخی سویه‌های ویروس BEF نشان از عدم وقوع جهش مؤثر در این جایگاه‌ها و بنابراین حفاظت شدن این نواحی داشت.

در این مطالعه پس از اطمینان از همسانه‌سازی موفق ژن G در پلاسمید pMalc2x و در باکتری *اشریشیاکلی* سویه DH5 α ، پلاسمیدهای نوترکیب غربال شده به سویه Rosetta از این باکتری انتقال داده شدند، زیرا سویه Rosetta حاوی ژن‌های کدکننده برخی از RNAهای ناقل برای کدون‌های نایاب جهت بیان یک پروتئین نوترکیب است. این خصوصیات برای بیان مؤثر و شکل‌گیری ساختار طبیعی‌تر یک پروتئین نوترکیب، که به آن یک حالت عمل‌کننده و دارای وظیفه زیستی را القا می‌کند، ضروری می‌باشند.



شکل 2- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن G با آغازگرهای دارای جایگاه برشی آنزیم *Bam*HI و نتیجه هضم آنزیمی سازه نو ترکیب pMalc2x-G. ستون 1: نردبان ژنی 1 کیلو باز؛ ستون 2: محصول جفت بازی ژن G؛ ستون 3: پلاسمید pMalc2x حاوی ژن G قبل از هضم با آنزیم *Bam*HI؛ ستون 4: پلاسمید pMalc2x حاوی ژن G بعد از هضم آنزیمی

Figure 2- The PCR product of G gene amplified using primers containing the *Bam*HI restriction endonuclease sequence and the result of enzyme digestion of pMalc2x-G construct on 1.5% agarose gel. Lane 1: 1 Kb DNA Ladder; Lane 2: 1823 bp product of G gene; Lane 3: pMalc2x-G containing G gene before enzyme digestion with *Bam*HI; Lane 4: pMalc2x-G containing G gene digested with *Bam*HI

1- Cysteine-rich "head"

2- Receptor-binding pleckstrin homology (PH) domain

نتیجه گیری کلی

است. همچنین هر یک از این پلاسמידهای نوترکیب می‌توانند به‌عنوان پایه‌ایی برای انتقال و بیان ژن G در یک سیستم بیانی یوکاریوتی به منظور تولید واکسن برای بیماری تب بی‌دوام گاوی مورد بهره‌برداری قرار گیرند.

در این مطالعه برای اولین بار در ایران ژن کلیکوپروتئین G ویروس BEF با استفاده از پلاسמידهای pTZ57R/T و pMalc2x در اشرشیاکلی کلون شد. سازه بیانی pMalc2x-G برای تولید پروتئین نوترکیب G جهت طراحی کیت تشخیصی الایزا قابل استفاده

منابع

- 1- Cybinski, D., P. Walker, K. Byrne and H. Zakrzewski. 1990. Mapping of antigenic sites on the bovine ephemeral fever virus glycoprotein using monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*, 71:2065-2072.
- 2- Fox, J. D., K. M. Routzahn, M. H. Bucher and D. S. Waugh. 2003. Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. *FEBS Letters*, 537:53-57.
- 3- Hertig, C., A. D. Pye, A. D. Hyatt, S. S. Davis, S. M. Mcwilliam, H. G. Heine, P. J. Walker and D. B. Boyle. 1995. Vaccinia virus-expressed bovine ephemeral fever virus G but not GNS glycoprotein induces neutralizing antibodies and protects against experimental infection. *Journal of General Virology*, 77:631-640.
- 4- Johal, J., K. Gresty, K. Kongsuwan and P. J. Walker. 2008. Antigenic characterization of bovine ephemeral fever rhabdovirus G and GNS glycoproteins expressed from recombinant baculoviruses. *Archives of Virology*, 153:1657-1665.
- 5- Kongsuwan, K., D. H. Cybinski, J. Cooper and P. J. Walker. 1998. Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *Journal of General Virology*, 79:2573-2581.
- 6- Nandi, S. and B. Negi. 1999. Bovine ephemeral fever: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 22:81-91.
- 7- Sharma, L. K. 1992. A report on bovine ephemeral fever in cattle. *Indian Veterinary Journal*, 69:544-546.
- 8- Trinidad, L., K. R. Blasdel, D. A. Joubert, S. S. Davis, L. Melville, P. D. Kirkland, F. Coulibaly, E. C. Holmes and P. J. Walker. 2014. Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian epizootic. *Journal of Virology*, 88(3):1525-35.
- 9- Uren, M. F., P. J. Walker, H. Zakrzewski, T. D. St George and K. A. Byrne. 1994. Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. *Vaccine*, 12:845-852.
- 10- Walker, P. J. and E. Klement. 2015. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Veterinary research*, 46, 1-19.
- 11- Walker, P. J., K. A. Byrne, D. H. Cybinski, D. L. Doolan and Y. Wang. 1991. Proteins of bovine ephemeral fever virus. *Journal of General Virology*, 72:67-74.
- 12- Wang, F. I., A. Hsu and K. Huang. 2001. Bovine ephemeral fever in Taiwan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13:462-467.
- 13- Yin, Z. and J. Liu. 1997. *Animal virology*. Science Publication, Beijing.
- 14- Zakrzewski, H., D. H. Cybinski and P. J. Walker. 1992. A blocking ELISA for the detection of specific antibodies to bovine ephemeral fever virus. *Journal of Immunological Methods*, 151:289-297.
- 15- Zheng, F. Y., G. Z. Lin, C. Q. Qiu, K. Z. Yuan and J. Y. Song. 2007. Expression and antigenic characterization of the epitope-G1 of the Bovine ephemeral fever virus glycoprotein in *Pichia pastoris*. *Virologica Sinica*, 22:347-352.
- 16- Zheng, F. Y., G. Z. Lin, C. Q. Qiu, J. Z. Zhou, X. A. Cao and X. W. Gong. 2009. Development and application of G1-ELISA for detection of antibodies against bovine ephemeral fever virus. *Research in Veterinary Science*, 87:211-212.



Cloning and sequencing of G glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus in *Escherichia coli*

R. Pasandideh^{1*} - M. T. Beygi Nassiri² - M. R. Seyfi Abad Shapouri³ - J. Fayazi⁴ - H. Roshanfeker² - M. Lotfi⁵

Received: 18-10-2015

Accepted: 04-04-2016

Introduction Bovine ephemeral fever (BEF) is an arthropod-borne viral disease of cattle and water buffalo, spanning tropical and subtropical zones in Asia, Australia, and Africa continents. The clinical signs of BEF disease in cattle are acute febrile reaction, stiffness, lameness, depression, cessation of rumination, and constipation. This disease was caused by *Ephemerovirus* of the Rhabdoviridae. Bovine ephemeral fever virus (BEFV) has a negative single stranded RNA genome and viral particles are bullet or cone-shaped. Five structural proteins of BEFV have been described comprising a nucleoprotein (N), a polymerase-associated protein (P), a matrix protein (M), a large RNA-dependent RNA polymerase (L) and a surface glycoprotein (G) spanning the viral envelope. The G protein is a class I transmembrane glycoprotein that forms clear projections on the virion surface. The protein G is main protective antigen and there are four antigenic sites (G1, G2, G3, and G4) on its surface. The G glycoprotein of BEFV is a type-specific neutralizing antigen and induces protective immunity in cattle. It has been shown to induce virus-specific neutralizing antibodies that confer passive protection against intracerebral infection of suckling mice and protect cattle against experimental intravenous BEFV challenge. In recent years, BEF has been distributed in many provinces of Iran such as Tehran, North Khorasan, Golestan, Mazandaran, Ardebil, Ilam, Khuzestan, Fars, and Yazd and caused economic losses. Treatment will be very effective if BEF is diagnosed early. The blocking ELISA test is preferred for the diagnosis and monitoring of clinical bovine ephemeral fever. On the other hand, vaccination has been suggested as an effective approach for control and prevention against to BEF. Nevertheless, no effort has yet been accomplished for production of a vaccine and development of an ELISA kit for BEF diagnosis in Iran. Hence, the aim of this study was molecular cloning and sequencing of G glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus (BEFV) in *Escherichia coli*. These findings provide the basis for the production of a vaccine and development of an ELISA kit for BEF diagnosis in future studies.

Materials and method The strain of BEFV used in this study was provided of Razi Vaccine and Serum Research Institute (Hesarak, Karaj, Iran). BLAST analysis based on G gene sequence showed that this strain had the most identity with the YHL strain isolated in Japan's Yamaguchi prefecture in 1966. DH5 α and Rosetta Strains of *E. coli* were used for cloning of G gene. Total RNA was extracted from the supernatant of BEFV-infected cells and reverse-transcribed into cDNA. The cDNA template was amplified by PCR using the primer pairs GF and GR in order to amplify the full length of G gene. The amplified G fragment was cloned into pTZ57R/T vector and then transferred into *E. coli* DH5 α . Insert-positive clones were isolated by blue/white screening of bacterial colonies using X-gal and IPTG on LB ampicillin plates. The transformed colonies were screened for desired gene performing colony PCR. In order to confirm of cloning accuracy, the recombinant plasmids were sequenced. Then a recombinant pTZ57R/T plasmid (pTZ57R/T-G) was used as the template for PCR amplification using primers containing the *Bam*HI restriction endonuclease sequence. A pMalc2x vector was used in this study. In order to introduce the amplified gene into pMalc2x vector, plasmid DNA and purified PCR products were digested with *Bam*HI restriction enzyme through the sites created by the primers. After ligation, pMalc2x-G construct was transformed into susceptible *E. coli* (DH5 α and Rosetta strains) cells.

Results and Discussion The 1823 bp fragment of G gene was successfully amplified in RT-PCR and visualized on 1.5% agarose gel. The transformed DH5 α colonies (with recombinant pTZ57R/T vector) were

1- PhD candidate of Animal Genetics and Breeding, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran,

2, 4- Respectively, Professors and Associate Professor of Animal Genetics and Breeding, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran,

3- Professor of Virology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran,

5- Quality Control Dep. Razi Vaccine and Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

(* Corresponding Author Email: Rezapasandideh63@gmail.com)

confirmed and selected for having 1823 bp fragment using colony PCR method. The result of sequencing of pTZ57R/T-G showed that the predicted amino acid sequence of G gene had four amino acid substitutions in sequence that have no significant effect on antigenic sites. Amplification of a recombinant pTZ57R/T plasmid (pTZ57R/T-G) using primers containing the *Bam*HI restriction endonuclease sequence produced an amplified fragment of G gene to introduce into pMalc2x vector. After verification, the recombinant plasmid was extracted and then transformed into *E. coli* Rosetta competent cells. Screening of bacterial colonies containing recombinant plasmid by PCR and restriction enzyme digestion showed that pMalc2x-G construct was successfully transformed into *E. coli*.

Conclusion This study is the first report of cloning of G glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus using pTZ57R/T and pMalc2x vectors into *E. coli* in Iran. The pMalc2x-G construct can be used for production of G recombinant protein for development of an ELISA kit for diagnosing BEF in future studies. Furthermore, each of these recombinant plasmids can be used as the basis for transformation and expression of G gene into a eukaryotic expression system in order to production of a vaccine for BEF in future studies.

Key word: Bovine ephemeral fever (BEF); Cloning; *Escherichia coli*; G glycoprotein gene.