

ساخت ناقل بیانی حاوی ژن VP1 ویروس تب برفکی سویه O (FMDV type O/IRN/1/2007)، تأیید پروتئین تولید شده در سلول‌های کلیه بچه هامستر (BHK7) و ارزیابی پاسخ ایمنی در مدل موشی

فرحناز معتمدی‌سده^۱، حوریه سلیمان‌جاهی^{۲*}، امیررضا جلیلیان^۳، همایون مهروانی^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه پزشکی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران

۴- استادیار، بخش تب برفکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

دریافت مقاله: ۹۰/۰۵/۰۱

پذیرش مقاله: ۹۰/۰۸/۰۲

چکیده

هدف: ساخت ناقل بیانی حاوی ژن VP1 ویروس تب برفکی سویه O جداسازی شده در ایران، بیان پروتئین و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی در موش است.

مواد و روش‌ها: سویه ویروس تب برفکی O از گوساله‌ای در شهر ری در سال ۱۳۸۶ جداسازی، سروتایپ و ژن VP1 این ویروس در ناقل PTZ57R/T و ناقل بیانی pcDNA3.1⁺ الحاق شد. برای بررسی بیان پروتئین، ژن VP1 بدون کدون خاتمه در ناقل pEGFP-N1 به‌لادست ژن GFP کلون شد. ناقل‌های pEGFP-N1-VP1 و pcDNA3.1⁺-VP1 در رده سلولی کلیه بچه هامستر ترانسفکت و بیان پروتئین الحاقی GFP-VP1 با میکروسکوپ معکوس فلوروسنت و بیان پروتئین VP1 به روش الکتروفورز عمودی پروتئین‌ها و لکه‌گذاری وسترن تأیید شد. ناقل بیانی pcDNA3.1⁺-VP1 به‌عنوان DNA واکسن به موش‌ها تلقیح و پاسخ آنتی‌سرم خنثی‌کننده (SNT) و قدرت تکثیر لئوسیت‌های T (SI) در این حیوانات اندازه‌گیری شد.

نتایج: هضم آنزیمی ناقل‌های کلون شده با ژن VP1، ورود این ژن در سه ناقل را تأیید و بیان پروتئین VP1 در ناقل بیانی pcDNA3.1⁺ به روش لکه‌گذاری وسترن با مشاهده باند اختصاصی پروتئین هدف کاملاً تأیید شد. وجود لکه‌های سبز نیز بیان پروتئین الحاقی VP1-GFP را تأیید نمود. مقادیر SI و SNT در گروه موش‌های تلقیح شده با DNA واکسن نسبت به گروه‌های کنترل دارای افزایش معنی‌داری بود.

نتیجه‌گیری: این ژن با موفقیت تکثیر، کلون و بیان شد. با توجه به تأیید بیان پروتئین VP1 و افزایش معنی‌دار SI و SNT از ناقل pcDNA3.1⁺-VP1 به‌عنوان DNA واکسن استفاده شد و پاسخ‌های ایمنی در مدل موشی ارزیابی شد.

کلیدواژگان: ویروس تب برفکی، ناقل، واکسن، پروتئین VP1

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

Email: soleim_h@modares.ac.ir

۱- مقدمه

ویروس بیماری تب برفکی (Foot and Mouth Disease) عامل یکی از بیماری‌هایی است که باعث زیان‌های اقتصادی زیادی در دام‌ها می‌شود و یکی از موانع اصلی در تأمین بهداشت و تولید دام و فراورده‌های دامی محسوب می‌شود، که توجه اغلب دامپزشکان کنترل‌کننده بیماری‌ها را در اکثر کشورها به خود جلب نموده است. به دلیل سرعت انتشار سریع آن، و خساراتی که به تولید شیر و گوشت و سایر محصولات حیوانی وارد می‌کند، شدت واگیری در دام‌های حساس بسیار بالا (۱۰۰ درصد) ولی میزان مرگ و میر پایین است و اغلب دام‌های جوان را در برمی‌گیرد. از نظر دفتر بین‌المللی بیماری‌های واگیر مشترک انسان و دام (Office International Des Epizootic-OIE) تب برفکی مهم‌ترین بیماری عفونی در تجارت بین‌المللی حیوانات و محصولات حیوانی است [۱]. ویروس تب برفکی از خانواده پیکورناویریده (Picornaviridae)، جنس آفتوویروس (Aphthovirus) بوده که دارای ۷ سروتایپ است. هر ویرون حاوی ژنوم RNA تک رشته با طول حدود ۸۵۰۰ جفت‌باز و یک ساختار کپسیدی بیست وجهی، دارای ۶۰ کپی پروتئین‌های ساختمانی (VP1-VP4) و همچنین ۷ پروتئین غیرساختمانی است [۲]. مطالعات ایمونولوژیکی ویروس تب برفکی نشان داده است، اپی‌توپ غالب اصلی که مسئول القای پاسخ آنتی‌بادی خنثی‌کننده است، باقیمانده‌های آمینو اسیدی موجود در لوپ G-H است که لوپ سطحی پروتئین ساختمانی VP1 بوده و در سویه‌های O و A این لوپ در باقیمانده‌های آمینو اسیدی ۱۳۱-۱۵۹ قرار دارد [۳]. هدف از این تحقیق جداسازی ژن VP1 ویروس تب برفکی سویه O ایزوله شده از ایران در سال ۱۳۸۶ و ساخت ناقل بیانی حاوی این ژن، بررسی بیان پروتئین VP1 در رده سلولی کلیه بچه هامستر (BHK7) و در نهایت استفاده این ناقل حاوی ژن هدف به‌عنوان DNA واکسن برای ایجاد پاسخ ایمنی در مدل‌های موشی است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی و تکثیر ویروس

این ویروس از سلول‌های پوششی وزیکول‌های گاوی که علائم بیماری تب برفکی را نشان داده در شهر ری در خرداد ۱۳۸۶ (ژوئن ۲۰۰۷) جداسازی شده است. رده سلولی پایدار کلیه خوک (IBRS₂) با استفاده از محیط کشت EMEM (Earl's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله به‌صورت تک لایه کشت داده شد، سپس برای کشت ویروس فوق به‌کار رفت. سلول‌هایی که در پاساژ اول علائم تخریب سلولی (سایتوپاتیک: Cytopathic) را نشان دادند جمع‌آوری شده و برای سروتایپینگ به روش الیزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) و استخراج RNA استفاده شدند.

۲-۲- تعیین سروتایپ آنتی‌ژن ویروس تب برفکی

سروتایپ آنتی‌ژن ویروس تب برفکی با استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی (Polyclonal Antibody) ضد ۷ سروتایپ تعیین شد. آزمون خنثی‌سازی آنتی‌ژن دو بعدی برای تعیین ارتباط بین ویروس جداسازی شده و سویه واکسن رایج (واکسن مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی) انجام شد. ارتباط بین سویه واکسن و ویروس جداسازی شده به‌عنوان ارزش 'r' ('r' value) بیان می‌شود [۴].

۲-۳- استخراج RNA ویروس

سلول‌های پایدار کلیه خوک (IBRS₂) عفونی شده با ویروس جداسازی شده فوق، که علائم تخریب سلولی را نشان دادند، جمع‌آوری و چندین بار منجمد و ذوب شدند. پس از سانتریفوژ ۱۰۰۰ g به‌مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از کیت استخراج RNA (RNeasy Mini Kit) (Qiagen; USA) و مطابق با دستورالعمل آن تمام RNA استخراج شد و غلظت آن توسط دستگاه نانودراپ (ND-1000)

اندازه‌گیری شد.

۲ واحد آنزیم DNA پلیمراز *Taq* (Taq DNA Polymerase) و ۳۰۰ نانوگرم از DNA الگو (ژن VP1 محصول واکنش RT-PCR) انجام شد. واکنش به‌صورت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ چرخه و در نهایت ۲۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس محصول واکنش با استفاده از کیت استخراج (Silica Bead Extraction-Fermentas #K0513) خالص‌سازی شد.

۲-۴- طراحی آغازگرها و واکنش زنجیره

پلیمراز- رونویسی معکوس (RT-PCR)

با استفاده از نرم‌افزار AlleleID6 و توالی ژن VP1 ویروس بیماری تب برفکی نوع O ایزوله شده از انگلستان در سال ۲۰۰۱ (FMDV O/2001/UKG) با کد دستیابی DQ165019.1 و سایر توالی‌های ژن VP1 این ویروس که در بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) موجود بود، آغازگرهای اختصاصی پیشرو و معکوس برای کل قطعه ژنی طراحی و توسط شرکت Metabion (Germany) سنتز شد. در آغازگر پیشرو (Forward: F) ۹ نوکلئوتید اول مربوط به جایگاه برش آنزیم *KpnI* و سه نوکلئوتید گوشواره (Overhang) است که کارایی برش را افزایش می‌دهد، سپس توالی کوزک (Kozak Sequence) و کدون شروع ترجمه قرار دارد. در آغازگر معکوس (Reverse: R) ۹ نوکلئوتید اول مربوط به جایگاه برش آنزیم *BamHI* و سه نوکلئوتید گوشواره، سپس دو کدون خاتمه ترجمه قرار داده شد. توالی آغازگرها شامل:

F:
5'-CGGGGTACCA~~CC~~ATGGTTGACGCTCGCACGCAG-3',
R:
5'-CGCGGATCCCTATTACAGGTCAAAGTCAAAAAGC-3'

با استفاده از کیت واکنش زنجیره پلیمراز- رونویسی معکوس یک مرحله‌ای (One-step RT-PCR-Bioneer) و آغازگرهای سنتز شده DNA دو رشته‌ای تکثیر داده شد. محصول واکنش به طول ۶۹۹ جفت‌باز به‌دست آمد.

۲-۵- تکثیر ژن VP1 به روش PCR

این واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۰/۵ میکرومول از هر آغازگر، ۵ میکرولیتر بافر واکنش با غلظت ۵ برابر (PCR Buffer-5x) واجد سولفات منیزیم ($MgSO_4$)، ۰/۲ میلی‌مول از هر دزکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTP)،

۲-۵- کلون کردن (Cloning) ژن VP1 در ناقل

PTZ57R/T و ناقل بیانی pcDNA3.1⁺

ناقل PTZ57R/T (Fermentas #K1213)، یک ناقل خطی بوده که در دو انتهای آن بازهای آویزان از نوع تیمین (3'-ddT) دارد و در الحاق قطعات ژنی تکثیر یافته با آنزیم DNA پلیمراز *Taq* دارای ۹۰ درصد بازده است. ابتدا محصول واکنش زنجیره پلیمراز ژن VP1 با استفاده از دو آنزیم برشی *KpnI* و *BamHI* برش داده شد و در ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. پس از استخراج ژن هضم شده از ژل آگارز، طبق دستور کیت PCR Cloning (Fermentas) InsTAclone و با استفاده از آنزیم لیگاز (T4 DNA Ligas)، درون ناقل فوق الحاق شد. سپس درون باکتری مستعد اشریشیا کلی (*Escherichia Coli* DH5α) ترانسفورم شد. برای تأیید کلون‌سازی ژن VP1 درون ناقل، پس از کشت باکتری حاوی ناقل فوق و استخراج ناقل کلون شده، هضم دو آنزیمی با آنزیم‌های *KpnI* و *BamHI* انجام شد. همچنین ناقل الحاق شده به‌عنوان DNA الگو در واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده مورد استفاده قرار گرفت.

پس از هضم دو آنزیمی ناقل PTZ57R/T الحاق شده با ژن VP1، قطعه DNA حدود ۷۰۰ جفت‌باز از ژل جداسازی شد و با ناقل بیانی pcDNA3.1⁺ (Invitrogen; USA) که توسط همان دو آنزیم بریده شده بود با آنزیم لیگاز، الحاق شد.

سپس باکتری اشریشیا کلی سویه DH5 α که به روش شوک حرارتی و کلرید کلسیم مستعد دریافت ناقل شده بود، برای ترانسفورماسیون به کار رفت. کلون‌های مثبت باکتری توسط روش هضم آنزیمی و کلونی PCR مورد تأیید قرار گرفتند. ژن VP1 الحاق شده با استفاده از آغازگر پیشرو T7 برای تعیین توالی ارسال شد [5-6]. این ناقل بیانی (VP1-pcDNA3.1+) حاوی ژن VP1، به عنوان DNA واکسن برای ایجاد پاسخ‌های ایمنی در مدل‌های موشی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۶- کلون کردن ژن VP1 در ناقل pEGFP-N1 و تأیید آن

به منظور تأیید بیان ژن هدف، محصول واکنش RT-PCR با آغازگر پیشرو و آغازگر معکوس که در آن کدون‌های خاتمه حذف شده، طی واکنش PCR با آنزیم pfu پلیمرراز (pfu DNA polymerase) تکثیر شد. پس از هضم محصول این واکنش با آنزیم‌های *Bam*HI و *Kpn*I، در ناحیه بالادست ژن مربوط به پروتئین سبز فلوئورسنت (Green Fluorescent Protein: GFP) در ناقل pEGFP-N1 الحاق شد. سپس ناقل pEGFP-N1-VP1 درون باکتری اشریشیا کلی سویه DH5 α ترانسفورم و کلون‌های مثبت باکتری با هضم دو آنزیمی تأیید شد. به این ترتیب اگر ژن هدف بیان شود چون دارای کدون خاتمه نیست و در بالادست ژن مربوط به GFP قرار دارد، بنابراین این دو پروتئین با هم بیان می‌شوند.

۲-۷- ترانسفکشن ناقل pEGFP-N1-VP1 و

VP1-pcDNA3.1+ در سلول‌های پایدار کلیه بچه هامستر (BHK77-C534) و تأیید بیان پروتئین VP1

چهار میکروگرم از هریک از ناقل‌های حاوی ژن هدف (VP1-pcDNA3.1 و VP1-pEGFP-N1) و ۴ میکروگرم از

هریک از ناقل‌های بدون ژن هدف (VP1-pcDNA3.1+ و VP1-pEGFP-N1) با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamine 2000) (Invitrogen; USA) در چهار خانه از کشت ۴۸ ساعته رده سلولی پایدار کلیه بچه هامستر که در فلاسک ۶ خانه‌ای آماده‌سازی شده بود وارد شد. پس از ۴۸ ساعت سلول‌های خانه‌های مربوط به ناقل‌های EGFP-N1 و VP1-pEGFP-N1 با استفاده از میکروسکوپ معکوس ایمونوفلوئورسنت از نظر بیان GFP ملحق شده با پروتئین VP1 بررسی شدند، وجود لکه‌های سبز درون سلول‌ها نشان دهنده بیان پروتئین الحاقی است. سلول‌هایی که با ناقل‌های VP1-pcDNA3.1+ با استفاده از ترانسفکشن شده بود پس از شستشوی آن‌ها با فسفات بافر (Phosphate Buffered Saline: PBS) استریل، با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز [۱۵۰ میلی‌مول کلرید سدیم، ۱ درصد نونیدت-پی ۴۰ (Nonidet-P40)، ۵۰ میلی‌مولار تریس-کلریدریک اسید (Tris-HCl)]، و ممانعت کننده پروتئاز (PMCSF)، به کمک پاروی پلاستیکی استریل سلول‌ها جمع‌آوری شدند. سلول‌های فوق به مدت یک دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سونیکاسیون (Sonication) شدند و مایع رویی حاصل از سانتریفوژ سلول‌ها با دور ۱۶۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای بررسی بیان پروتئین VP1 با استفاده از روش الکتروفورز عمودی (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE) و لکه‌گذاری وسترن استفاده شد.

۲-۸- لکه‌گذاری وسترن (Western Blotting)

به منظور بررسی واکنش‌دهی پروتئین نوترکیب حاصل از بیان ژن VP1 در ناقل بیانی VP1-pcDNA3.1+ با آنتی‌بادی چند تبار ضد ویروس تب برفکی سویه O آزمون لکه‌گذاری وسترن انجام شد. ابتدا سوسپانسیون حاصل از لیز سلول‌های پایدار کلیه بچه هامستر ترانسفکشن شده با ناقل VP1-pcDNA3.1+ به روش SDS-PAGE عمودی الکتروفورز شد، سپس

است. بنابراین عکس ضریب رقت در آخرین رقتی از سرم که علایم تخریب سلولی را ایجاد نکرده به‌عنوان تیتراژ آنتی‌سرم خنثی کننده تعیین شد.

۱۱-۲- ایمنی سلولی

بررسی ایمنی سلولی با روش تکثیر لنفوسیت‌های T طحال تحریک شده با آنتی‌ژن ویروسی با استفاده از کیت تجاری MTT (Roche; Germany) انجام شد و ضریب شاخص تحریکی لنفوسیت‌ها نسبت به آنتی‌ژن ویروسی محاسبه شد [۷].

۱۲-۲- تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین تیتراژ آنتی‌سرم خنثی کننده و ضریب شاخص تحریکی در سه گروه حیوانات واکسینه شده از روش آنوای یک سویه (ANOVA-One way) (Duncan Method) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

۳- نتایج

ویروس جداسازی شده از شهر ری در خرداد ۱۳۸۶، سروتایپ O را نشان داد و r Value این ویروس با سویه واکسن رایج در کشور ۰/۸۸ تعیین شد. این ویروس FMDV type O/IRN/1/2007 نام‌گذاری شد.

۱-۳- توالی نوکلئوتیدی ژن VP1 ویروس تب برفکی سویه O جداسازی شده از ایران در سال ۱۳۸۶ (FMDV/O/IRN/2007)

پس از تعیین توالی ژن VP1 الحاق شده، طول ناحیه کد کننده این ژن ۶۳۹ نوکلئوتید و ۲۱۳ باقیمانده آمینواسیدی تعیین شد. توالی نوکلئوتیدی فوق در پایگاه اطلاعاتی بانک ژنی با کد دستیابی JF288761 به‌نام ایران به ثبت رسید. نتیجه واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی

باند‌های پروتئینی از ژل اکریل آمید به کاغذ نیتروسلولز با ولتاژ ۱۰۰ ولت منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با آنتی‌بادی چند تبار (Pirbright; England) (Guinea pig anti FMDV type O) رنگ‌آمیزی شده و باند اختصاصی پروتئین VP1 با آنتی‌بادی ثانویه ضد آنتی‌بادی اولیه کونژوگه شده با آنزیم HRP نمایان شد.

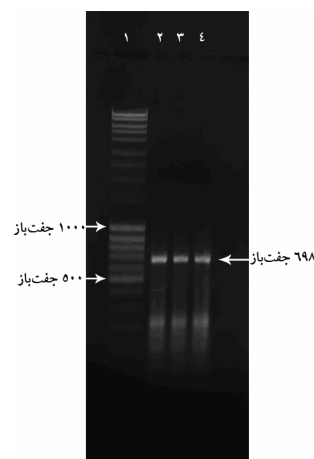
۹-۲- واکسیناسیون

در این قسمت هیجده موش BALB/c با سن ۴-۵ هفته استفاده شد، موش‌ها یک هفته قبل از شروع برنامه واکسیناسیون به سه گروه ۶ تایی تقسیم شدند. به هر موش گروه اول، فسفات بافر استریل به میزان ۱۰۰ میکرولیتر، به گروه دوم ناقل pcDNA3.1⁺ بدون ژن هدف و به گروه سوم ناقل بیانی حاوی ژن هدف (به هر موش ۱۰۰ میکروگرم ناقل در ۱۰۰ میکرولیتر) به‌صورت زیر پوستی تزریق شد. واکسیناسیون گروه‌ها در سه دوز با فاصله دو هفته یک‌بار انجام شد و ده روز پس از آخرین تزریق واکسن، خونگیری از قلب حیوانات بعد از بیهوشی کامل انجام شد. همچنین طحال این حیوانات جداسازی و لنفوسیت‌های طحال کشت داده شدند.

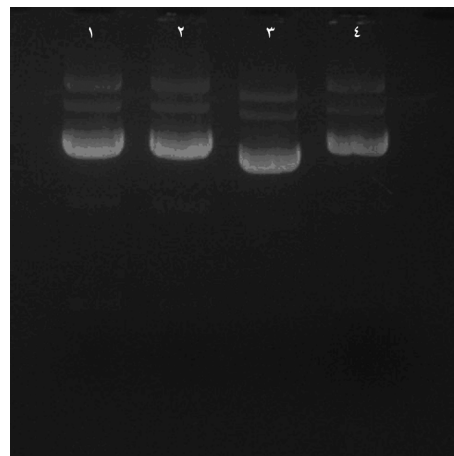
۱۰-۲- تعیین تیتراژ آنتی‌سرم خنثی کننده

پس از جداسازی سرم حیوانات و غیرفعال‌سازی کمپلمان به‌مدت نیم ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، تیتراژ آنتی‌سرم خنثی کننده در این نمونه‌ها به روش کربر (Karber) اندازه‌گیری شد. ابتدا سلول‌های BHK21 به‌صورت تک لایه در چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه ته صاف کشت داده شدند، سپس رقت‌های ۱/۲ تا ۱/۱۲۸ از سرم‌ها تهیه و با ویروس تب برفکی سویه O (با تیتراژ ۱۰۰ TCID₅₀ Tissue Culture Infection Dose) به ازای هر میلی‌لیتر مخلوط شد و مخلوط مربوط به هر رقت در سه خانه میکروپلیت تلقیح شد. ظهور علایم تخریب سلولی در چاهک‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح بررسی شد. ظهور علایم تخریب سلولی به معنی عدم خنثی شدن ویروس با رقت آنتی‌سرم

شده در این تحقیق، یک باند نزدیک به ۷۰۰ نوکلئوتید است که در شکل ۱ مشاهده می شود.



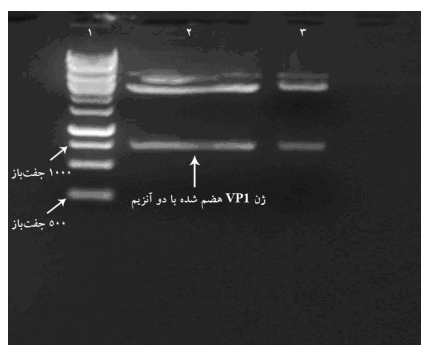
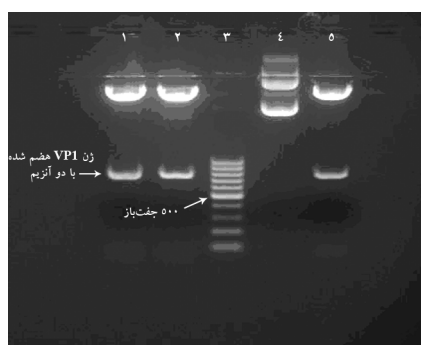
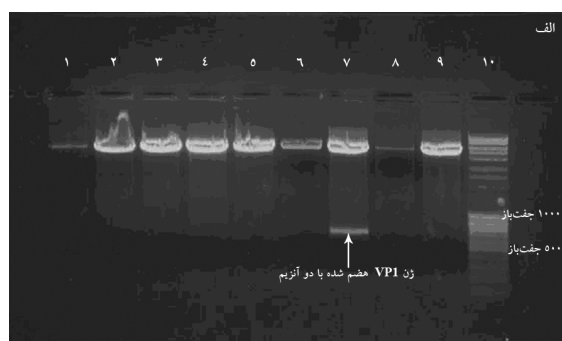
شکل ۱ محصول واکنش RT-PCR که نشانگر حضور قطعه حدود ۷۰۰ جفت باز است (ردیف های ۲، ۳، ۴). نشانگر DNA از شرکت Fermentas با کد SM0403 (ردیف ۱)



شکل ۲ ناقل های استخراج شده از چهار کلونی باکتری پس از الحاق ژن VP1 در ناقل PTZ57R/T، ردیف ۳ مربوط به کلونی آبی و ردیف های ۱، ۲ و ۴ مربوط به کلونی های سفید است.

در شکل ۲ ناقل های استخراج شده از چهار کلونی باکتری پس از الحاق ژن VP1 در ناقل PTZ57R/T دیده می شود. ردیف ۳ مربوط به کلونی آبی و ردیف های ۱، ۲ و ۴ مربوط به

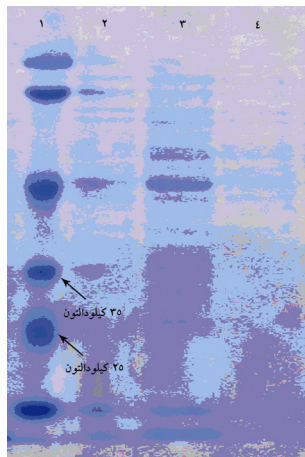
کلونی های سفید است. با توجه به محل قرار گرفتن باند ناقل ها، ردیف های شماره ۱، ۲ و ۴ کمی بالاتر از ردیف ۳ قرار گرفته است که می تواند نشان دهنده وارد شدن ژن VP1 در ناقل باشد.



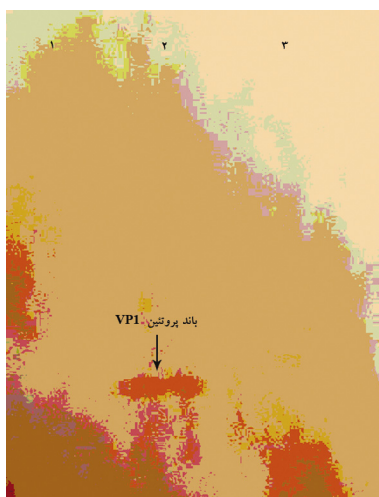
شکل ۳ تأیید ژن VP1 الحاق شده در ناقل ها با استفاده از هضم قطعه ژنی با دو آنزیم برشی *KpnI* و *BamHI* (الف) ردیف های ۱-۶ و ۸-۹) هضم ناقل های pcDNA3.1⁺ بدون ژن هدف، ردیف ۷) هضم ناقل pcDNA3.1⁺ الحاق شده با ژن VP1، ردیف ۱۰) نشانگر DNA، (ب) ردیف های ۱، ۲ و ۵) هضم ناقل pEGFP-N1 الحاق شده با ژن هدف، ردیف ۳) نشانگر DNA، ردیف ۴) هضم ناقل pEGFP-N1 بدون ژن هدف، (ج) ردیف ۱) نشانگر DNA، ردیف های ۲ و ۳) هضم ناقل PTZ57R/T الحاق شده با ژن VP1

۳-۲- کلونی سازی

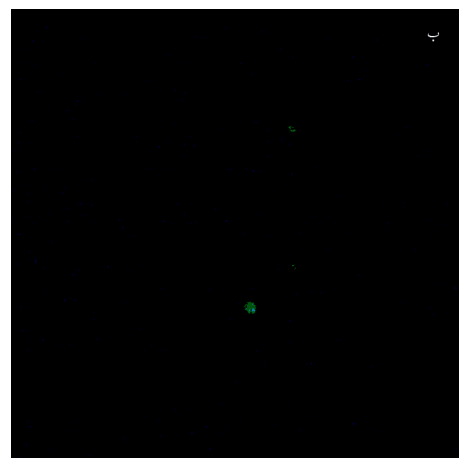
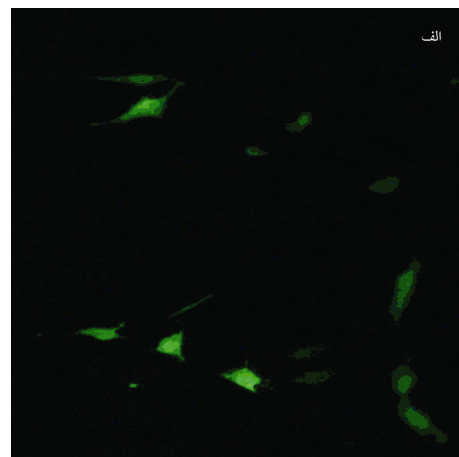
تأیید ژن VP1 الحاق شده در ناقل‌های PTZ57R/T. $pcDNA3.1^+$ و pEGFP-N1 که با استفاده از هضم قطعه ژنی با دو آنزیم برشی *KpnI* و *BamHI* انجام شده به ترتیب در شکل ۳ مشاهده می‌شود.



شکل ۵ بیان پروتئین در رده سلولی پایدار کلیه بچه هامستر ترانسفکت شده با ناقل $pcDNA3.1^+$ حاوی ژن VP1 (ردیف ۳)؛ ترانسفکت شده با ناقل $pcDNA3.1^+$ بدون ژن VP1 (ردیف ۲) سلول کنترل ترانسفکت نشده (ردیف ۴)، نشانگر پروتئینی (ردیف ۱) با کد SM0441 Fermentas



شکل ۶ نتیجه آزمون لکه‌گذاری و سترن با آنتی‌بادی چندتبار ضد ویروس تب برفکی سویه O، (ردیف ۱) سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل $pcDNA3.1^+$ بدون ژن VP1، (ردیف ۲) سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل $pcDNA3.1^+$ حاوی ژن VP1، (ردیف ۳) سلول بدون ترانسفکشن ناقل



شکل ۷ بیان پروتئین الحاقی VP1-GFP که خاصیت فلورسنت از خود نشان می‌دهد در رده سلولی پایدار کلیه نوزاد هامستر (BHK7) با بزرگنمایی $\times 1500$ (الف) سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل pEGFP-N1 حاوی ژن VP1، (ب) سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل pEGFP-N1 بدون ژن VP1

۳-۳- بیان پروتئین

چهل و هشت ساعت پس از ترانسفکت رده سلولی پایدار کلیه بچه هامستر با ناقل pEGFP-N1 حاوی ژن VP1 عکس

همچنین سوپ حاصل از لیز سلول‌های پایدار کلیه بچه هامستر ترانسفکت شده با ناقل $pcDNA3.1^+$ حاوی ژن VP1 با انجام SDS-PAGE از نظر وجود پروتئین‌های نو ترکیب بررسی شد که نتایج در شکل ۵ مشاهده می‌شود. با توجه به اندازه تقریبی پروتئین VP1 ویروس تب برفکی (۲۵ کیلودالتون)، باند مورد نظر مشاهده شد. در شکل ۶ نیز باند حاصل از انتقال پروتئین‌ها از ژل اکریل آمید به کاغذ نیتروسلولز پس از رنگ‌آمیزی اولیه و ثانویه با آنتی‌بادی اختصاصی سویه O ویروس تب برفکی مشاهده می‌شود.

۳-۴- پاسخ‌های ایمنی

تیتراژ آنتی‌سرم خنثی کننده و ضریب شاخص تحریکی لنفوسیت‌های T طحال در جدول ۱ آمده شده است. نتایج نشان می‌دهد که هم تیتراژ آنتی‌سرم خنثی کننده و هم ضریب شاخص تحریکی گروه موش‌های واکسینه شده با ناقل بیانی حاوی ژن هدف نسبت به دو گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$).

جدول ۱ میانگین تیتراژ آنتی‌بادی خنثی کننده و ضریب شاخص تحریکی لنفوسیت‌های T در سه گروه موشی $\pm$ خطای استاندارد

گروه واکسن	تیتراژ آنتی‌سرم خنثی کننده $\pm$ خطای استاندارد	ضریب شاخص تحریکی $\pm$ خطای استاندارد
فسفات بافر	0.6 ± 0.10	0.98 ± 0.113
ناقل بیانی بدون ژن هدف	0.6 ± 0.10	1.03 ± 0.113
ناقل بیانی حاوی ژن هدف	1 ± 0.10	1.23 ± 0.113

۴- بحث

هر چند که واکسن‌های غیرفعال بیماری تب برفکی تجاری وجود دارد ولی فرایند غیرفعال‌سازی کامل دارای نواقصی است که منجر به شیوع تک‌گیر (اسپورادیک: Sporadic) این بیماری در منطقه می‌شود، بنابراین تهیه واکسن‌های سالم و کارآمد از

جمله DNA واکسن و ساب‌یونیت واکسن دارای اهمیت است. در تحقیقات قبلی مشخص شده که واکسیناسیون با DNA پلاسمید (DNA Plasmid) منجر به پاسخ ایمنی حفاظتی در مقابل آنتی‌ژن بیان شده از آن پلاسمید در مدل‌های حیوانی می‌شود [۸-۱۱]. این پاسخ به این دلیل است که آنتی‌ژن به‌صورت درون سلول تولید و از نظر ساختاری به آنتی‌ژن‌های حاصل از عفونت طبیعی ویروس نزدیک‌تر است. این آنتی‌ژن‌ها از مسیر MHC (Major Histocompatibility Complex) کلاس ۱ و ۲ پردازش و باعث فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی می‌شود [۱۲-۱۴]. وجود قسمت‌های Unmethylated CpG در DNA پلاسمید منجر به پاسخ ایمنی ذاتی در میزبان می‌شود [۱۵، ۱۶]. فن (Fan) و همکارانش (۲۰۰۷) DNA واکسن مربوط به ژن VP1 ویروس تب برفکی سویه O/ES/2001 را به خوکچه‌های هندی تزریق نمودند و پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را بررسی کردند. آن‌ها متوجه شدند که تیتراژ آنتی‌بادی‌های متصل شونده به ویروس (اندازه‌گیری به روش ELISA) و تولید اینترلوکین ۴ (Interleukin 4) و اینترفرون گاما (Interferon Gamma) در گروهی از حیوانات که پلاسمیدهای حاوی ژن VP1 به آن‌ها تزریق شده افزایش یافته است [۱۷]. چادری (Choudary) و همکارانش (۲۰۰۸) گزارش نمودند که DNA واکسن مربوط به قسمتی از ژن VP1 ویروس تب برفکی سویه A که به‌صورت درون عضلانی به خوکچه‌های هندی تزریق شده بود، منجر به تولید تیتراژ آنتی‌سرم ۱/۵ در آزمون ELISA و ضریب شاخص تحریکی لنفوسیت‌های طحال ۱/۲۹ شد که افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل منفی داشت [۷].

در این تحقیق ویروس تب برفکی سویه O/IRN/1/2007 در سال ۱۳۸۶ از گوساله‌ای در شهر ری جداسازی شد. با توجه به این‌که هدف اصلی در این تحقیق تولید کلون بیانی $pcDNA3.1$ -VP1 است تا بتوان از آن به‌عنوان یک واکسن DNA در مدل‌های حیوانی استفاده نمود؛ بدین منظور ابتدا ژن هدف در ناقل خطی PTZ57R/T کلون شده و سپس ژن هدف

همچنین به منظور بررسی دقیق‌تر بیان پروتئین، سوپ سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل حاوی ژن هدف را پس از الکتروفورز به روش دودسیل سولفات پلی اکریل آمید و انتقال باندهای پروتئینی به غشای نیتروسولوز، با استفاده از لکه‌گذاری و سترن و آنتی‌بادی ضد این ویروس تأیید نمودند [۱۹]. لازم به ذکر است که نتایج مطالعه حاضر با به‌کارگیری ژن VP1 ویروس جدایه (Isolate) ایران با مطالعه پارک مطابقت داشت.

با توجه به این که تولید واکسن در مورد بیماری تب برفکی منوط به جدایه‌های بومی هر منطقه است لازم بود که ژن VP1 با ویژگی‌های ذکر شده برای مطالعه واکسن در این تحقیقات کلون و بیان آن تأیید شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که این ژن با ویژگی‌های ذکر شده به علت حضور ناحیه کد کننده لوپ G-H و به علت کامل بودن طول ژن VP1 که واجد پلی‌توپ‌های مهم سرولوژیکی است، می‌تواند به عنوان کاندید واکسن بیماری تب برفکی مطرح شود.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق براساس رساله دکتری مصوب دانشگاه تربیت مدرس و با حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و معاونت تحقیقات پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای و ریاست پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج و موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شده است.

از این ناقل برش یافته و درون ناقل بیانی pcDNA3.1⁺ (ناقل بیانی در سلول‌های پستانداران) کلون شد. به‌منظور کنترل بیان پروتئین VP1 از ناقل دیگری به نام pEGFP-N1 استفاده شد که دارای ژن گزارشگر مربوط به GFP است. همچنین بیان پروتئین VP1 الحاق شده در ناقل بیانی pcDNA3.1⁺ از طریق ترانسفکت نمودن این ناقل حاوی ژن VP1 در سلول‌های پایدار کلیه بچه هامستر به روش لکه‌گذاری و سترن با آنتی‌بادی اختصاصی ضد این ویروس مشخص شد. بررسی پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی در گروه‌های موشی واکسینه شده با ناقل بیانی حاوی ژن هدف، افزایش معنی‌داری نسبت به دو گروه کنترل نشان داد.

مورگان (Morgan) و همکارانش (۱۹۹۰) نیز با ساخت ناقل حاوی غالب‌ترین اپی‌توپ‌های سرولوژیکی ویروس تب برفکی که توالی‌های آمینواسیدی VP1₁₄₁₋₁₆₀ و VP1₂₀₀₋₂₁₃ بوده باعث القای پاسخ آنتی‌بادی خنثی‌کننده در خوکچه‌های هندی و برخی از گوساله‌ها شدند [۱۸].

در تحقیق مشابهی پارک (Park) و همکارانش ژن VP1 ویروس تب برفکی سویه O جداسازی شده از کره شمالی در سال ۲۰۰۲ را در ناقل بیانی pSLIA که دارای پروموتور سیتومگالوویروس (Cytomegalovirus) است، الحاق نمود و برای بررسی بیان پروتئین، این ناقل را در رده سلولی پایدار کلیه میمون (MA104) ترانسفکت نموده و با آنتی‌بادی گاوی ضد این ویروس که با ماده فلوئورسنت (Fluorescein FITC Isothiocyanate) کوئزوگه شده بود، رنگ نمودند. مشاهده نقاط سبز درخشان نشان دهنده بیان پروتئین VP1 بود.

۶- منابع

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. Clin Microbiol Rev 2004; 17(2): 465-93.
- [2] Cedillo-Barron L, Foster-Cuevas M, Cook A, Gutiérrez-Castañeda B, Kollnberger S, Lefevre F, Parkhouse RM. Immunogenicity of plasmids encoding T and B cell epitopes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in swine. Vaccine 2003; 21(27-30): 4261-9.
- [3] Kim SA, Liang CM, Cheng IC, Cheng YC, Chiao MT, Tseng CJ, Lee F, Jong MH, Tao MH, Yang NS, Liang SM. DNA vaccination against foot-and-mouth disease via electroporation: study of molecular approaches for enhancing VP1 antigenicity. J Gene Med

- 2006; 8(9): 1182-91.
- [4] Barnett P, Stham B. Two dimensional virus neutralization tests. World Reference Laboratory for FMD protocol. 2004 OIE guideline. <http://www.oie.int/index.php?id=483>
- [5] Lv K, Guo Y, Zhang Y, Wang K, Li K, Zhu Y, Sun S. Transient inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by siRNAs silencing VP1 protein coding region. *Res Vet Sci* 2009; 86(3): 443-52.
- [6] Nagarajan G, Ashok Kumar C, Dechamma HJ, Reddy GR, Ganesh K, and Suryanarayana VVS. Cloning and expression of FMDV-VP1 immunoreactive peptide in trivalent form and its application as immunogen. *Indian J Biotechnol* 2008; 7: 472-7.
- [7] Choudary S, Ravikumar P, Ashok Kumar C, Suryanarayana VV, Reddy GR. Enhanced immune response of DNA vaccine (VP1-pCDNA) adsorbed on cationic PLG for foot and mouth disease in guinea pigs. *Virus Genes* 2008; 37(1): 81-7.
- [8] Lodmell DL, Ray NB, Ewalt LC. Gene gun particle-mediated vaccination with plasmid DNA confers protective immunity against rabies virus infection. *Vaccine* 1998; 16(2-3): 115-8.
- [9] Somasundaram C, Takamatsu H, Andréoni C, Audonnet JC, Fischer L, Lefèvre F, Charley B. Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 70(3-4): 277-87.
- [10] Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Hawe LA, Leaner KR, Martinez D, Perry HC Shiver JW, Montgomery DC, Liu MA. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259(5102): 1745-9.
- [11] Meshkat Z, Soleimanjahi H, Mirshahabi H, Meshkat M, Kheirandish M, Hassan ZM. Strong immune responses induced by a DNA vaccine containing HPV16 truncated E7 C-terminal linked to HSP70 gene. *Iran J Immunol* 2011; 8(2): 65-75.
- [12] Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004; 199: 201-16.
- [13] Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1992; 1(6): 363-9.
- [14] Yankauckas MA, Morrow JE, Parker SE, Abai A, Rhodes GH, Dwarki VJ, Gromkowski SH. Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA cell Biol* 1993; 12(9): 771-6.
- [15] Babiuk LA, Van Drunen S, Loehr BI, Uwiera R. Veterinary application of DNA vaccines. *Dev Biol (Basel)* 2000; 104: 73-81.
- [16] Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 927-74.
- [17] Fan H, Tong T, Chen H, Guo A. Immunization of DNA vaccine encoding C3d-VP1 fusion

- enhanced protective immune response against foot-and-mouth disease virus. *Virus Genes* 2007; 35(2): 347-57.
- [18] Morgan DO, Moore DM. Protection of cattle and swine against foot-and-mouth disease, using biosynthetic peptide vaccines. *Am J Vet Res* 1990; 51(1): 40-5.
- [19] Park JH, Kim SJ, Oem JK, Lee KN, Kim YJ, Kye SJ, Park JY, Joo YS. Enhanced immune response with foot and mouth disease virus VP1 and interleukin-1 fusion genes. *J Vet Sci* 2006; 7(3): 257-62.