دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

طراحی، ساخت و بیان اپی‌توپ‌های پروتئین VP_1 ویروس تب برفکی سروتیپ O ایران

محمد دوستی[۱]، محمدرضا نصیری[۲]، مجتبی طهمورث‌پور[۳]، علیرضا حق‌پرست[۴] و سعید زیبایی[۵]

۱، ۳ و ۴- دانشجوی دکترا، استاد و استادیار، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد، دانشگاه فردوسی مشهد، (نویسنده مسوول: nassiryr@gmail.com)
۵- استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مشهد
تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۷

چکیده

تب برفکی (FMD)، یک بیماری حاد بسیار مسری در حیوانات زوج سم است و باعث زیان‌های اقتصادی قابل توجه‌ای می‌شود. بنابراین، ساخت یک واکسن امن‌تر و کارآمدتر در برابر ویروس تب برفکی (FMDV) ضروری است. هدف از این مطالعه توسعه یک واکسن کاملاً ایمن چند اپی‌توپی نوترکیب به جای واکسن‌های سنتی غیرفعال، در برابر ویروس (FMDV) تب برفکی O ایران بود. برای هم‌سانه‌سازی و بیان اپی‌توپ‌های نوترکیب ایمنی‌زا بر علیه ویروس تب برفکی، ژن پروتئین نوترکیب متشکل از ترکیبات مختلف اپی‌توپ‌های سلول‌های B و سلول‌های T از پروتئین VP_1 کپسید ویرس FMD سنتز شد. قطعه ۱۱۵۵ جفت بازی ژن نوترکیب با روش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و محصول PCR خالص و در ناقل بیانی pET-32A کلون شد. بیان پروتئین نوترکیب، با استفاده از یک میلی‌مولار ایزوپروپیل -بتا-D-گالاکتوزید (IPTG) القا و تأئید بیان پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از الکتروفورز پروتئین SDSPAGE و دات بلاتینگ انجام گرفت. صحت کلونینگ ژن پروتئین نوترکیب چند اپی‌توپی با روش PCR و هضم آنزیمی و تعیین توالی تأئید شد. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE نشان داد که سیستم بیانی پروکاریوتی pET32a-RP تولید پروتئین نوترکیب هدف، با وزن مولکولی در حدود ۶۰ کیلو دالتون کارایی دارد و پروتئین نوترکیب چند اپی‌توپ به صورت نامحلول بیان شد. نتایج نشان داد سیستم بیانی پروکاریوتی جهت تولید ساختارهای چند اپی‌توپی نوترکیب ایمنی‌زای ویروس تب برفکی مؤثر و می‌تواند به عنوان یک روش بالقوه برای سازه‌های پلی‌اپی‌توپ‌ها استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: چنداپی‌توپی، تب برفکی، پروتئین نوترکیب، ویروس FMD

مقدمه

ویروس بیماری تب برفکی (foot-and-mouth disease) از جنس Aphtovirus و از خانواده پیکور ناوریده (Picornaviride) است و عامل ایجاد این بیماری عفونی و به‌شدت واگیر در حیوانات زوج سم مانند گاو، گوسفند و خوک است (۲۳). این ویروس بر اساس توانایی‌های آن، در ایجاد بیماری در حیوانات به هفت سروتیپ عمده شامل چهار سروتایپ اروپایی- آسیایی A,O,C, Asia-1 و سه سروتایپ آفریقای جنوبی شامل SAT_1، SAT_2 و SAT_3 تقسیم‌بندی شده است (۲). در بین این سروتیپ‌ها، سروتیپ A و O در ایران دارای اهمیت بالاتری هستند و عمده خسارت در سال‌های اخیر به دلیل جهش ژنتیکی این دو سویه در کشور بوده است. این بیماری زیان‌های اقتصادی سنگینی را به صنعت دامپروری وارد می‌کند و یکی از موانع اصلی در تأمین بهداشت دام‌ها و فرآورده‌های دامی می‌باشد (۱). در حال حاضر از واکسن غیرفعال شده تأئید ایمن‌سازی دام‌های حساس علیه بیماری تب برفکی استفاده می‌شود. واکسن غیرفعال شده تب برفکی، ایمنی پایدار و یا نسبتاً پایدار ایجاد نمی‌کنند و ممکن است در طی تولید واکسن، ویروس به طور ناقص غیرفعال شده و خود باعث شیوع بیماری شود. هم‌چنین واکسن‌های غیرفعال قادر به القائ پاسخ ایمنی سلولی نمی‌باشند (۱۴). علاوه بر این، حیوانات واکسینه شده با واکسن غیرفعال را نمی‌توان از حیواناتی که به طور طبیعی آلوده شده‌اند تشخیص داد، لذا با توجه به این مشکلات تلاش برای توسعه واکسن‌های جدید از جمله واکسن‌های نوترکیب زیر واحدی، واکسن‌های پپتیدی مصنوعی، DNA واکسن، واکسن‌های زنده با ژنوم حذف شده و واکسن‌های وکتوری ضروری می‌باشد (۱۹). در این میان واکسن‌های چند اپی‌توپی با متمرکز کردن پاسخ‌های ایمنی بر اپی‌توپ‌های مهم ویروس، پتانسیل خوبی تأئید تحریک سیستم ایمنی علیه چندین اپی‌توپ منحصر به سلول‌های B یا T به طور هم‌زمان و اختصاصی را دارا هستند. اپی‌توپ‌ها بخشی از ساختار یک آنتی‌ژن هستند که به‌وسیله سلول‌های B یا T شناخته می‌شوند. مطالعات ایمونولوژیکی ویروس تب برفکی نشان داده است که اپی‌توپ‌های غالب اصلی که مسئول القای پاسخ ایمنی سلول‌های B یا T هستند، در پروتئین ساختمانی VP_1 قرار دارند (۱۵). دو اپی‌توپ سلول‌های B پروتئین ساختمانی VP_1 شامل (اسیدهای آمینه شماره ۱۴۱ تا ۱۶۱ و ۲۱۳-۲۰۰) توانایی پاسخ آنتی‌بادی خنثی‌کننده در گاو را دارا می‌باشند (۷). در پروتئین VP_1 ویروس در لوپ G-H (اسیدهای آمینه ۱۴۱ تا ۱۶۱) که مربوط به اپی‌توپ‌های سلول‌های B می‌باشد یک منطقه کاملاً حفاظت شده شامل سه اسید آمینه آرژنین، گلایسین و اسید آسپارتیک (Arg,Gly Asp) وجود دارد. این اسیدهای آمینه نقش مهمی در اتصال ویروس به گیرنده سلول ندارد (۱۷). اپی‌توپ‌های سلول‌های T شامل (اسید آمینه ۸۸، ۶۶، ۴۰ و ۲۰) پروتئین VP_1 به طور مؤثری به سلول‌های B در القای پاسخ آنتی‌بادی خنثی‌کننده ویروس تب برفکی کمک می‌کنند (۲۰،۱۴،۱۱). پژوهش‌گران برای تقویت ایمنی‌زایی واکسن‌های پلی‌توپی، پروتئین زنجیره سنگین IgGخوکی (۱۹،۱۴) یا با آلفا اینترفرون بزی (۹) و یا ماکروفاژ

گرانولوسیت (۷) را به اپی‌توپ‌ها متصل و افزایش پاسخ ایمنی را گزارش کرده‌اند. مورگان و مور (۱۸) با ساخت حامل حاوی غالب‌ترین اپی‌توپ‌های سرولوژکی ویروس تب برفکی که حاوی توالی‌هایی باعث القای پاسخ آنتی‌بادی خنثی‌کننده و ایجاد ایمنی علیه ویروس تب برفکی در خوکچه‌های هندی و برخی از گوساله‌ها شدند. شائو و همکاران (۲۰) با طراحی واکسن نوترکیب چند اپی‌توپی با استفاده از اپی‌توپ‌های VP_1 ویروس تب برفکی و بیان آن در میزبان باکتریایی باعث ایجاد ایمنی در خوک شدند.

در ایران تاکنون گزارشی مبنی بر کلونینگ، بیان، طراحی ساختارهای اپی‌توپی ویروس تب برفکی سروتیپ O انجام نشده است، لذا با توجه به شناسایی اپی‌توپ‌های پروتئین‌های مختلف ویروس تب برفکی (۲). هدف از این مطالعه طراحی و بیان یک آنتی‌ژن چند اپی‌توپی نوترکیب، شامل نسخه‌های متعددی از اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T از پروتئین VP_1 ویروس تب برفکی بود.

مواد روش‌ها

آنالیز توالی‌های ژنی و پروتئینی

توالی ژن و پروتئین VP_1 ویروس تب برفکی سروتیپ O ایزوله شده از ایران در سال ۲۰۱۰ (FMDV O/2010/IRN) با کد دسترسی HQ663879 از پایگاه اطلاعات ژنتیک (NCBI) استخراج شد. سپس تأئید ساخت پروتئین نوترکیب مصنوعی اپی‌توپ‌های سلول‌های B (اسید آمینه‌های شماره ۱۶۰–۱۴۰ و اسید آمینه‌های شماره ۲۱۳–۲۰۰) و اپی‌توپ سلول‌های T (اسید آمینه‌های شماره ۱۶–۴۴ و اسید آمینه‌های شماره ۸۰–۶۶ AA) از این توالی‌ها استخراج شد. با توجه به اپی‌توپ‌های انتخاب شده سه قطعه A، B و C که شامل اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T بودند، طراحی و از چیدمان این قطعات توالی پروتئین نوترکیب A-B-A-B-A-B-C-C که در اینجا پروتئین نوترکیب نامیده می‌شود ساخته شد. در این سازه از لینکر گلیسین–گلیسین (-GG-) بین اپی‌توپ‌ها استفاده شد (شکل ۱). پیش‌بینی ساختار پروتئین نوترکیب و مدل‌سازی آن با استفاده از پایگاه Swiss Model انجام شد و ساختار پیش‌بینی شده با پروتئین طبیعی VP_1 ویروس تب برفکی با شماره دسترسی (PDB code: 1FOD chain 1) با استفاده از نرم‌افزار PyMOL مقایسه و تجزیه و تحلیل شد. توالی پروتئین نوترکیب مصنوعی مورد نظر، با نرم‌افزار5.5 CLC Main Workbench به توالی ژنی، تبدیل و بهینه‌سازی کدون[1] این سازه ژنی با نرم‌افزار آنلاین شرکت ژن Gene Script (۲۵) برای میزبان بیانی *E. coli* انجام و سازه ژنی طراحی شده، سنتز (شرکت Script Gene) و در وکتور حد واسط pUC57 هم‌سانه شد.

تکثیر ژن پروتئین نوترکیب: با استفاده از نرم‌افزار طراحی پرایمر Primer primier v5 و توالی ژن پروتئین نوترکیب که در وکتور pUC57 کلون شده بود، آغازگرهای لینکر دار طراحی شدند. شبیه‌سازی کلونینگ ژن پروتئین نوترکیب با نرم افزار CLC Main Workbench 5.5 انجام و پس از اطمینان از صحیح بودن قالب خواندن[2] و بیان صحیح پروتئین نوترکیب مورد نظر، آغازگرها توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) سنتز شد. در آغازگر پیشرو سایت برشی آنزیم *EcoR* I و در آغازگر برگشت سایت برشی آنزیم *Xho* I طراحی شد و در ابتدای هر آغازگر از توالی سه نوکلئوتید به عنوان گوشوارک[3] تأئید افزایش کارایی برش آنزیمی استفاده شد.

CCG***GAATTC***CGGGATCCGATACTTACCATG 3 F: 5'
R: 5' CCG***CTCGAG***GGCCAGCTGCATGCTATACATG 3'

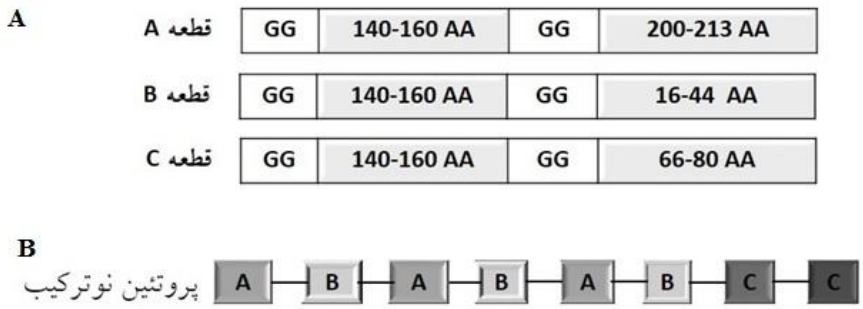
تکثیر ژن پروتئین نوترکیب به روش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، حاوی ۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، ۴ میلی‌مولار $MgCl_2$، 1U آنزیم *pfu* پلیمراز (شرکت فرمنتاز) و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو (pUC57-rP) انجام شد. چرخه‌های حرارتی برای انجام واکنش PCR شامل ۳۲ چرخه حرارتی ۳ مرحله ای شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه تأئید تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و با ژل‌رد (Gel Red) شرکت (biotium انگلستان) رنگ‌آمیزی شد.

هم‌سانه‌سازی ژن پروتئین نوترکیب: دو میکروگرم از محصول PCR تخلیص شده و ناقل بیانی pET-32a (Novagen امریکا) با دو آنزیم برشی *EcoR* I و *Xho* I به‌صورت جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت شش ساعت هضم آنزیمی شدند. محصولات حاصل از هضم، بر روی ژل اگارز ۰/۷ درصد الکتروفورز شده و پس از آن قطعات مورد نظر از ژل بریده و با کیت استخراج از ژل شرکت (Thermos) تخلیص شدند. واکنش الحاق در حجم ۲۰ میکرولیتر با غلظت ۱۶۰ نانوگرم از وکتور pET32a و ۹۰ نانوگرم از قطعه ژنی پروتئین نوترکیب هضم شده و دو واحد آنزیم DNA ligase T_4 و بافر 1x در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. محصول الحاق با روش شوک حرارتی به باکتری مستعد E.coli سوش BL21(D3) انتقال یافت و غربال‌گری باکتری‌های دریافت کننده وکتور روی محیط کشت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین انجام شد. به منظور صحت کلونینگ از روش کلونی PCR (با پرایمرهای T_7 و T terminator) و هضم دو آنزیمی (با آنزیم‌های *EcoR* I و *Xho* I) استفاده شد و برای صحت ترادف و صحیح بودن قالب خواندن ژن وکتور pET32-rP تأئید توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره فرستاده شدند.

1- Codon Optimization 2- Inframe 3- Overhang

بررسی بیان سازه ژنی pET32- rP: یک میلی‌لیتر از محیط کشت شبانه باکتری‌های نوترکیب به ده میلی‌لیتر از محیط LB مایع حاوی غلظت ۱۰۰ µg/ml آمپی‌سیلین تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دور ۲۵۰ rpm کشت داده شد و پس از رسیدن جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ IPTG در غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه شد تا عمل القا انجام گیرد، سپس در زمان‌های ۰، ۱، ۲ و ۴ ساعت هر بار ۱میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته و با دور g ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی را حذف کرده و به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر لاملی بافر (2x Laemmli sample buffer) اضافه کرده و رسوب در آن حل شده و به مدت پنج دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

الکتروفورز SDS Page و بلاتینگ نمونه‌های پروتئینی، تحت شرایط دناتوره روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد و سپس با روش کوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شدند. تأئید بررسی محلولیت پروتئین نوترکیب، از محیط کشت باکتری القا شده با IPTG بعد از ۴ ساعت انکوباسیون یک میلی‌لیتر برداشته و سلول‌ها با دور g دور۸۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه رسوب داده شد، رسوب حاصل در PBS 1X به خوبی حل شده و باکتری‌ها به روش سونیکاسیون (آملیفیکاسیون ۸۰ و به مدت ده دقیقه) بر روی یخ لیز شده و سوسپانسوین حاصل در دور g۸۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی و رسوب حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز و با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد.



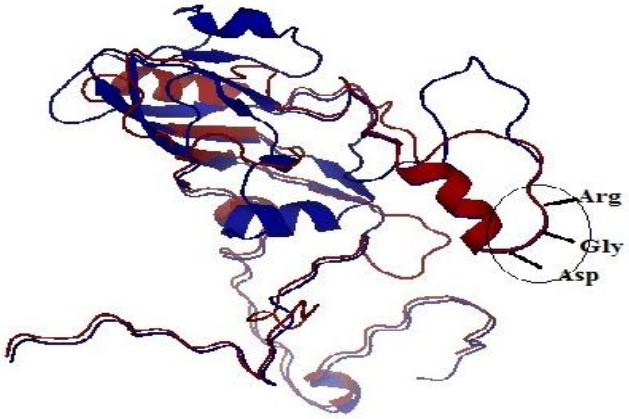
شکل ۱- ساختار شماتیک از پروتئین نوترکیب. (الف) قطعات اپی‌توپی برای ساخت پروتئین نوترکیب که قطعات شامل اپی‌توپ‌های سلول های T و B پروتئین VP_1 ویروس تب برفکی که به‌وسیله لینکرهای گلیسین– گلسین جدا شده‌اند. (ب) ساختار نهایی پروتئین نوترکیب

Figure1. The schematic structure of six of recombinant proteins (a). Fragments were used for constructing the recombinant proteins. Each square represents B cell epitope or T cell epitope of VP1 of FMDVwhich have been separated using Gly-Gly linkers.(b) Recombinant proteins final structure.

ژن مورد نظر در ناقل بیانی pET32-a، کلون شد این پلاسمید به انتهای پروتئین نوترکیب برچسب هیستیدنی اضافه می‌کند. بنابراین با استفاده ازآنتی‌بادی ضد His tag و روش تأئید دات بلاتینگ وجود پروتئین مورد تأئید قرار داد. تأئید دات بلاتینگ دو میکرولیتر از پروتئین استخراج شده بر روی کاغذ نیتروسلولوز نقطه گذاری شد. کاغذ نیتروسلولز با بافر TBS حاوی یک درصد BSA به مدت یک ساعت در دمای اتاق بلاک شد. نمونه‌ها پس از سه بار شستشو به مدت پنج دقیقه با بافر TBST ، به مدت یک ساعت به ترتیب با رقت ۱/۱۰۰۰۰ با آنتی‌بادی اولیه Anti-His tag (Roch، آلمان) و ثانویه ضدموشی کنژوگه با HRP انکوبه و پس از سه بار شستشو تأئید آشکارسازی پروتئین از سوبسترای DAB استفاده شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه از اپی‌توپ‌های تحریک کننده سلول‌های ایمنی B و T پروتئین VP_1 که از سوی سایر محققین گزارش شده بود استفاده شد (۳،۲۵) از اتصال و چیدمان اپی‌توپ‌های سلولB و T به یکدیگر سه قطعه A، B وC طراحی شد، زیرا اپی‌توپ‌های سلول T وقتی به اپی‌توپ‌های سلول B (۱۴۰–۱۶۰ AA) متصل می‌شوند، پاسخ ایمنی شدیدتری ایجاد می‌کنند (۱۰). هم‌چنین برای دسترسی بیش‌تر اپی‌توپ‌ها به انتهای N–ترمینال هر قطعه لینکر انعطاف‌پذیر گلیسین–گلیسین متصل و قطعات پشت سرهم قرار گرفتند و ساختار فضایی سه بعدی پروتئین نوترکیب حاصل از چیدمان توالی‌های اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T پروتئین VP_1 ویروس تب برفکی با نرم‌افزار آنلاین پیش‌بینی‌کننده ساختار پروتئین (۲۷) و مشاهده فایل PDB آن با نرم‌افزار PyMOL در دسترس بودن اپی‌توپ‌ها را در ساختار فضایی تأئید کرد. نتایج نشان می‌دهد که ناحیه لوپ G-H (اسیدهای آمینه ۱۴۱ تا ۱۶۱) که نقش مهمی در اتصال ویروس به گیرنده سلول دارد، در پروتئین نوترکیب تولید شده و پروتئین طبیعی ویروس کامل بر هم منطبق می‌باشند (شکل ۲).

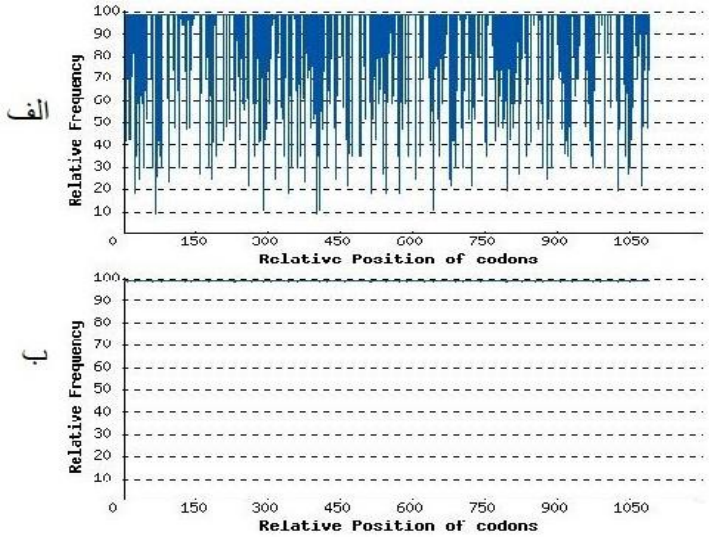


شکل ۲- ساختار سه بعدی پروتئین VP1 طبیعی و نوترکیب ویروس تب برفکی که با نرم‌افزار Swiss Model پیش‌بینی شده است این شکل از قرار دادن ساختار پروتئین نوترکیب و طبیعی بر روی هم توسط نرم‌افزار PyMOL ایجاد شده است که پروتئین نوترکیب به رنگ قرمز و پروتئین طبیعی به رنگ آبی می‌باشد.

Figure 2. 3D structure of recombinant proteins and the VP1 of FMD virus The structure of the recombinant proteins was predicted with Swiss Model software. This figure showed the structure superimposition between the recombinant protein and the VP1 of FMDV by PyMOL software. The natural VP1 of FMDV was shown by blue line and the recombinant protein was shown by red line.

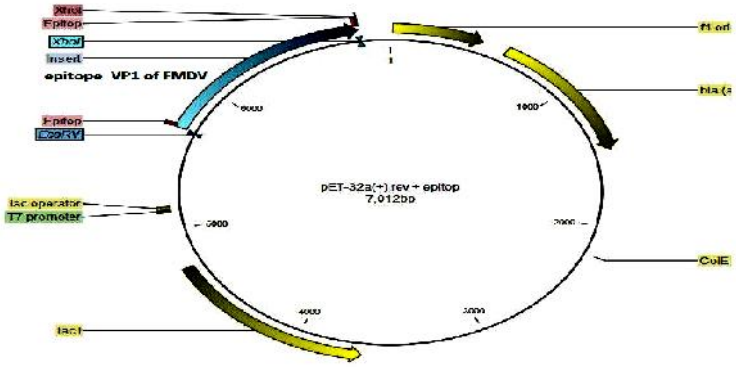
به‌منظور دست‌یابی به بالاترین میزان بیان پروتئین، بهینه‌سازی کدون‌ها برای بیان در میزبان *E. coli* از سوی شرکت Gene script انجام شد که شاخص ارجحیت کدون ژن پروتئین نوترکیب قبل از بهینه‌سازی ۰/۶۸ و بعد از بهینه سازی با شاخص بیانی بالای یک بیان شده است. بر اساس شاخص‌های نرم‌افزاری در صورتی که این شاخص یک باشد، ایدال بوده و در صورتی که بالای ۰/۸ باشد نشان‌دهنده بیان مناسب یک ژن در داخل میزبان است (شکل ۳). با توجه به بیان ژن VP_1 در سلول‌های جانوری و استفاده ما از میزبان باکتریایی، بررسی ارجحیت کدون‌ها و تغییر کدون‌ها و جایگزینی آنها به کدون‌های میزبان باعث افزایش بیان پروتئین می‌شود، زیرا در این حالت tRNA میزبان عامل محدود کننده در سنتز پروتئین‌ها نیستند (۵). پژوهش‌گران نشان داده‌اند که بهینه‌سازی کدون‌ها با توجه به میزبان بیانی باعث افزایش میزان بیان پروتئین VP_1 می‌شود (۲۲).

بررسی بیان مجازی ژن پروتئین نوترکیب با نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5 نشان داد که آغازگرهای لینکردار به درستی طراحی شده و قالب خواندن صحیح بوده و بیان پروتئین مورد نظر به درستی انجام شده است (شکل ۴).



شکل ۳- بهینه سازی کدون‌ها (الف) شاخص ارجحیت کدونی (CAI: codon adaption index) ژن قبل از بهینه سازی کدون‌ها (ب) شاخص ارجحیت کدون‌ها بعد از بهینه‌سازی کدون‌ها.

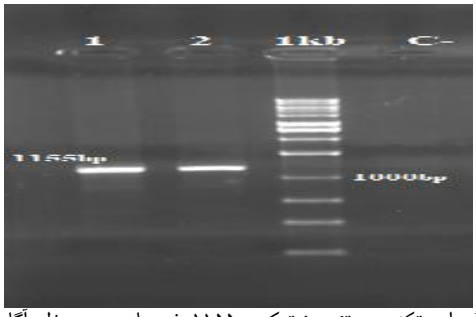
Figure 3. codon usage optimization. (A) Before codon adaption index (B) After codon adaption index



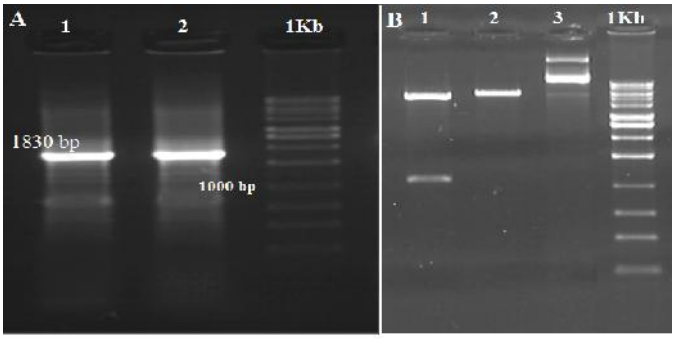
شکل ۴- ساخت پلاسمید حاوی پروتئین نوترکیب شامل اپی توپ های سلول‌های B و T.
Figure 4. Construction of the recombinant plasmid including B cell and T cell epitope

تکثیر و هم‌سانه‌سازی پروتئین نوترکیب در pET (+)32a: ژن پروتئین نوترکیب با طول ۱۱۵۵ bp توسط آغازگرهایی طراحی شده به صورت اختصاصی به‌وسیله آنزیم *pfu* تکثیر شد (شکل ۵).

نتایج مربوط به کلونی PCR وکتور نوترکیب pET32a(+)-rP با آغازگرهای T7 و Tterminator و ظهور باند ۱۸۳۰bp نشان از حضور ژن پروتئین نوترکیب در وکتور می‌باشد همچنین نتایج هضم آنزیمی pET32a(+)-rP با جفت آنزیم‌های *Xho* I و *EcoR* I نیز الحاق ژن پروتئین نوترکیب را در وکتور بیانی pET32a(+)-rP تأیید کرد (شکل ۶).



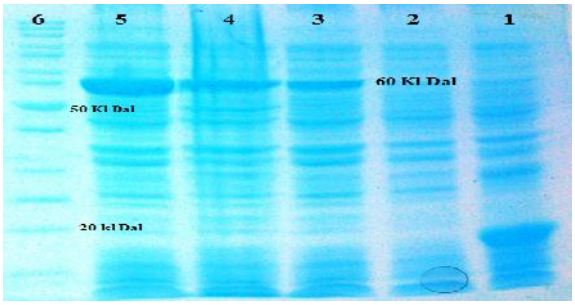
شکل ۵- الکتروفورز محصولات PCR برای تکثیر پروتئین نوترکیب ۱۱۵۵جفت بازی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد، نشان‌گر کیفیت مناسب قطعه تکثیر شده می‌باشد (نشان‌گر وزنی کیلو جفت بازی ردیف ۱ و ۲ محصولات PCR و نشان‌گر وزنی ۱kb).
Figure 5. Electrophoresis of PCR products on 1% agarose gel: Lan1-2: recombinant protein gene (1155 bp). Lane 3: 1kb DNA Ladder. Lane4: Negative control



شکل ۶- A: تأئید حضور ژن پروتئین نوترکیب با استفاده از روش کلونی PCR با آغازگرهای T7 و Tterminator ستون ۱ و ۲ باند ۱۸۳۰ جفت بازی در کلونی مثبت و ستون ۳ DNA لدر ۱kb B: هضم دو آنزیمی وکتور pET32a(+)-rP با آنزیم‌های *EcoR* I و *Xho* I حضور باند ۱۱۵۵ جفت بازی پروتئین نوترکیب، ستون ۲ هضم وکتور بدون قطعه نوترکیب، ستون ۳ وکتور هضم نشده و DNA لدر ۱kb.
Figure 6. (A) Electrophoresis of colony PCR of the ligated constructs into Pet32a. Primers used in the ligation of pET32a vectors were the T7 Forward and T7 Reverse (terminator) primers (1830bp). (B) Double digestion of recombinant pET32a(+)-rP vector. Lane 1 and 2: double digested pET32a(+)-rP vector. Lane 3: undigested pET32a(+)-rP vector and Lane 4: 1kb DNA ladder.

آنالیز نتایج توالی‌یابی وکتور pET32a(+)-rP با آغازگرهای T_7 و Tterminator با نرم‌افزار CLC کلون و صحیح بودن قالب خواندن ژن را تأئید کرد آنالیز پروتئین‌های نوترکیب تولید شده با ژل SDS-PAGE در نمونه‌های قبل و بعد از القا، حضور باند پروتئین نوترکیب در محدوده ۶۰ کیلو دالتونی را نشان می‌دهد (شکل ۷). سیستم بیانی باکتری اشرشیاکولی قادر به تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقادیر بالا بوده و کم هزینه می‌باشد، هم‌چنین ناقل‌های بیانی pET تحت کنترل پروموتور T_7 قرار دارند و با توجه به داشتن راه انداز LacO برای کنترل بیان ژن‌های خود القا با IPTG باعث رونویسی ژن T_7 می‌شوند که در نتیجه تولید پروتئین ژن هدف را فعال می‌کنند (۱۰). به هر حال بیان بالای پروتئین‌ها در سیستم بیانی E.coli باعث می‌شود که پروتئین‌ها به صورت توده متصل به هم تولید شوند. پلاسمید pET32a یک پروتئین تیرودوکسین را به ابتدای پروتئین نوترکیب اضافه می‌کند و باعث افزایش حلالیت پروتئین می‌شود (۱۳). در تحقیق حاضر پروتئین نوترکیب تولید شده به‌صورت توده متصل به هم بود که با گزارشات سایر محققین که پروتئین VP_1 ویروس تب برفکی را در این وکتور بیان کرده بودند مطابقت داشت (۲۰) که این می‌تواند به علت عدم تاخوردگی کامل پروتئین نوترکیب در میزبان باشد.

هم‌چنین میزان آبگریزی پروتئین نوترکیب با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5 و میزان ۰/۵۰ آب‌دوستی آن ۰/۲۲ بود که می‌تواند علت عدم محلولیت آن باشد. عوامل وابسته به توالی پروتئین، از طریق تغییر خواص بیوفیزیکی پروتئین و تأثیر بر ساختار آن، انحلال‌پذیری پروتئین نوترکیب را متأثر می‌سازند. انحلال پروتئین‌ها، از دیدگاه ساختاری، تحت تأثیر فاکتورهایی از قبیل پایداری گرمایی پروتئین، تعداد اسیدهای آمینه، انواع ساختمان‌های دوم موجود در پروتئین، درصد آب گریزی پروتئین، پایداری دمایی و ... می‌باشد (۱۳). بنابراین برای خالص‌سازی پروتئین‌هایی که به صورت توده متصل به هم تولید می‌شوند، باید از مواد شیمیایی مانند اوره که باعث باز شدن پیوندهای هیدروژنی و حل شدن آن‌ها می‌شوند، استفاده کرد (۲۴).



شکل ۷- تجزیه و تحلیل SDS-PAGE پروتئین نوترکیب ردیف ۱: عصاره سلول‌ها از سلول‌های اشرشیاکولی حاوی pET32a (کنترل مثبت) که بیان Trx.tag نشان از القا می‌باشد ردیف ۲ :عصاره سلول‌ها از سلول‌های اشرشیاکولی حاوی pET32a-RP قبل از القاء .بیان ردیف۳،۴ و ۵: عصاره سلول‌ها از سلول‌های اشرشیاکولی حاوی pET32a-RP پس از القاء.بیان و تولیدپروتئین نوترکیب ۶۰ کیلودالتونی ردیف ۶: نشانگر مولکولی وزنی پروتئین۱۴ باند (۲۰۰، ۱۵۰، ۱۲۰، ۱۰۰، ۸۵، ۷۰، ۶۰، ۵۰، ۴۰، ۳۰، ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰ کیلودالتون).

Figure 7. Expression of recombinant protein in E. coli., Lane 1: induced pET32a Lane 2: un-induced pET32a-RP, Lane 3: 2 hours post-induction sample, Lane 4: 3 hours post-induction sample, Lane 5: 4 hours post-induction, , lane 6: Protein ladder.

نتایج دات بلاتینگ با Anti-His tag تأئیدکننده تولید پروتئین نوترکیب در pET32a است که با نتایج توالی یابی مطابقت دارد. در دات بلاتینگ، شدت رنگ لکه‌های مربوط به سلول‌های حاوی پلاسمید نوترکیب القاء شده و تفاوت مشخص آنها با لکه‌های سلول‌های غیرترنسفکت شده (کنترل منفی) نشان‌دهنده بیان پلاسمیدهای پلی‌توپ در این سلول‌ها بود (شکل ۸).

شکل ۸- تأئید بیان ژن توسط روش دات بلات. لکه ۱: وکتور بیان فاقد ژن پروتئین نوترکیب بعداز القا با IPTG لکه ۲: وکتور بیان حاوی ژن قبل از القا با IPTG لکه ۳، ۴ وکتور حاوی ژن پروتئین نوترکیب بعد از القا با IPTG

Figure 8. Dot blotting analysis: 1: IPTG induced pET32a 2: IPTG un-induce pET32a-RP 3-4: IPTG induced pET32a-RP

ویروس تب برفکی عامل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های احشام می باشد و در سال ۲۰۰۱، بیماری تب برفکی در انگلستان تأثیر اقتصادی زیادی روی صنعت دام داشته است و باعث ایجاد سیاست‌های کنترل و پیش‌گیری سر سختی در برابر این بیماری شد (۲۱). واکسیناسیون هنوز هم یکی از راه های مهم برای کنترل و پیش‌گیری از (معادل فارسی استفاده شود) FMD است، با این حال، واکسن غیرفعال در بیش‌تر کشورهای توسعه یافته به دلیل معایبی مانند عدم ایجاد ایمنی پایدار و یا نسبتاً پایدار، به‌صورت ناقص غیرفعال شدن، عدم القائ پاسخ ایمنی سلولی عدم تشخیص حیوانات واکسینه شده می‌باشند (۱۴). مورد تأئید نیست، بنابراین توسعه یک واکسن بی‌خطر و مؤثر به جای واکسن های سنتی برای کنترل و ریشه‌کنی تب برفکی در سراسر جهان ضروری است. در این مطالعه، پروتئین نوترکیبی مبتنی بر اپی‌توپ نوترکیب پروتئین VP_1 ویروس تب برفکی سویه O تأئید ساخت واکسن اپی‌توپی طراحی و بیان شد فانگ و همکاران مطابق با تحقیق حاضر اپی‌توپ‌های ایمنی‌زای پروتئین VP_1 را بصورت پپتید سنتز کرده و نشان دادند که این ساختار آنتی‌ژنیک قادر بر ایجاد پاسخ ایمنی می‌باشد (۱۱).

مطالعات متعدد نشان داده است که پروتئین VP1 ویروس تب برفکی حامل غالب اپی‌توپ‌های ایمنی‌زا می‌باشد که می‌توانند پاسخ آنتی بادی خنثی‌کننده را القا کند (۱،۳،۱۲).

تحقیقات نشان داده است که حیواناتی که با پروتئین VP_1 واکسینه شده‌اند در برابر ویروس تب برفکی محافظت می‌شوند (۵). سایر محققین نیز اپی‌توپ‌های ایمنی‌زای انتخاب شده پروتئین VP_1 ویروس تب برفکی در این تحقیق را در پلاسمید pET کلون و بیان کردند که پروتئین نوترکیب تولید شده قادر به ایجاد ایمنی محافظتی در خوک می‌باشد (۲۰). استفاده از واکسن‌های اپی‌توپی که از چند اپی‌توپ ایمونوژن در ساختار خود استفاده می‌کنند، باعث تحریک هم‌زمان پاسخ ایمنی برگرفته از آنتی‌ژن‌های مختلف، متمرکز ساختن پاسخ ایمنی و ممانعت از بروز اثرات ناخواسته ناشی از به‌کارگیری آنتی‌ژن‌های کامل می‌شوند (۲۰). نتایج این پژوهش نشان داد که بیان این اپی‌توپ‌ها در این میزبان باکتریایی و پلاسمید بازه بالایی دارد. امید است نتایج به‌دست آمده از این تحقیق راه‌گشایی برای تولید یک واکسن نوترکیب مؤثر بر علیه ویروس تب برفکی باشد. در مطالعات آینده می‌توان این پروتئین نوترکیب را به حیوانات آزمایشگاهی تزریق و میزان آنتی‌ژنسیته آن را مورد بررسی قرار داد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی که امکانات انجام این پایان نامه را فراهم نموده اند کمال تقدیر و تشکر را دارم.

منابع

1. Abdul-Hamid, N.F., N.M. Hussein, J. Wadsworth, A.D. Radford, N.J. Knowles and D.P. King. 2011. Phytogeography of foot and mouth disease virus types O and A in malaysia and surrounding countries. Infection, Genetics and Evolution, 11: 320-328.
2. Al-Shawkany, A., M. Nassiri, S. Zibaei, M. Tahmoorespour, S.M. Ziaratnia, M.F. Najafi, A.R. Haghparast, S. Ghovvati, S.H. Pourseyed and M. Rashtibaf. 2012. Amino acid diversity of antigenic sites of iranian type O foot-and-mouth disease virus. Journal of Cell and Molecular Research, 3: 66-74.
3. Bachrach, H.L. 1968. Foot-and-Mouth Disease. Annual Reviews in Microbiology, 22: 201-244.
4. Bittle, J.L., R.A. Houghten, H. Alexander, T.M. Shinnick, J.G. Sutcliffe and R.A. Lerner. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature, 298: 30-33.
5. Brinkmann, U., R.E. Mattes and P. Buckel. 1989. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia Coli* is dependent on the availability of the DNA Y gene product. Gene, 85: 109-114.
6. Brown, F. 1992. New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. Vaccine 10: 1022-1026.
7. Caron, L., M. Brum, M.P. Moraes, W.T. Golde, C.W. Arns and M.J. Grubman. 2005. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor does not increase the potency or efficacy of a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine. Pesquisa Veterinária Brasileira, 25: 150-158.
8. DiMarchi, R., G. Brooke, C. Gale, V. Cracknell, T. Doel and N. Mowat. 1986. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. Science, 232: 639-641.
9. Du, Y., Y. Li, H. He, J. Qi, W. Jiang, X. Wang, B. Tang, J. Cao, X. Wang and P. Jiang. 2008. Enhanced immunogenicity of multiple-epitopes of foot and mouth disease virus fused with porcine interferon α in mice and protective efficacy in guinea pigs and swine. Journal of Virological Methods, 149: 144-152.
10. Elmorjani, K., V. Lurquin, A. Lelion, H. Rogniaux and D. Marion. 2004. A bacterial expression system revisited for the recombinant production of cystine-rich plant lipid transfer proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 316: 1202-1209.
11. Fang, M., J. Li, H. Wang, M. Yang, Y. Zhang, L. Zhou, H. Wei, G. Yang, Y. Yu and X. Wei. 2012. Correlation between efficacy and structure of recombinant epitope vaccines against bovine type O foot and mouth disease virus. Biotechnology letters, 34: 839-847.
12. Gerner, W., M.S. Denyer, H.H. Takamatsu, T.E. Wileman, K.H. Wiesmüller, E. Pfaff and A. Saalmüller. 2006. Identification of novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitopes in c/c and d/d haplotype miniature swine. Virus Research, 121: 223-228.

13. W.N. P., S.K. Handelman, J.K. Everett, S.N. Tong, A. Bracic, J.D. Luff, V. Naumov, T. Acton, P. Manor and R. Xiao. 2011. Large-scale experimental studies show unexpected amino acid effects on protein expression and solubility in vivo in E. coli. . Microb Inform, 27:1(1):6
14. King, A., B. Underwood, D. McCahon, J. Newman and F. Brown. 1981. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK.
15. Li, G., W. Chen, W. Yan, K. Zhao, M. Liu, J. Zhang, L. Fei, Q. Xu, Z. Sheng and Y. Lu. 2004. Comparison of immune responses against foot-and-mouth disease virus induced by fusion proteins using the swine IgG heavy chain constant region or β-galactosidase as a carrier of immunogenic epitopes. Virology, 328: 274-281.
16. Liu, X.-S., Y.L. Wang, Y.G. Zhang, Y.Z. Fang, L. Pan, J.L. Lu, P. Zhou, Z.W. Zhang and S.T. Jiang. 2011. Identification of H-2d restricted T cell epitope of foot-and-mouth disease virus structural protein VP_1. Virol Journal, 7: 426.
17. Mateu, M.G., J.A. Camarero, E. Giralt, D. Andreu and E. Domingo. 1995. Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. Virology, 206: 298-306.
18. Morgan, D. and D. Moore. 1990. Protection of cattle and swine against foot-and-mouth disease, using biosynthetic peptide vaccines. American Journal of Veterinary Research, 51: 40-45.
19. Rodriguez, L.L. and M.J. Grubman. 2009. Foot and mouth disease virus vaccines. Vaccine, 27: 90-94.
20. Shao, J.J., C.K. Wong, T. Lin, S.K. Lee, G.Z. Cong, F.W.Y. Sin, J.Z. Du, S.D. Gao, X.T. Liu and X.P. Cai. 2011. Promising multiple-epitope recombinant vaccine against foot-and-mouth disease virus type O in swine. Clinical and Vaccine Immunology, 18: 143-149.
21. Sobrino, F., M. Sáiz, M.A. Jiménez-Clavero, J.I. Núñez, M.F. Rosas, E. Baranowski and V. Ley. 2001. Foot and mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. Veterinary research, 32:1-30.
22. Song, H., L. Zhou, W. Fang, Y. Li, X. Wang, H. Fang, X. Li, M. Wu and B. Qiu. 2004. High-level expression of codon optimized foot-and-mouth disease virus complex epitopes and cholera toxin B subunit chimera in *Hansenula polymorpha*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 315: 235-239.
23. Sutmoller, P., S.S. Barteling, R.C. Olascoaga and K.J. Sumption. 2003. Control and eradication of foot-and-mouth disease. Virus Research, 91: 101-144.
24. Upadhyay, A.K., A. Murmu, A. Singh and A. K. Panda. 2012. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. PLoS One, 7: e33951.
25. Zamorano, P., A. Wigdorovitz, M. Perez-Filgueira, C. Carrillo, J. Escribano, A. Sadir and M. Borca. 1995. A 10-Amino-Acid linear sequence of VP_1 of foot and mouth disease virus containing B-and T-cell epitopes induces protection in mice. Virology, 212: 614-621.
26. http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis
27. www.expasy.org/

Design and Construction of Multiple-Epitope Recombinant Vaccine Against Foot-and-Mouth Disease Virus Type O

Mohammad Doosti[1], Mohammadreza Nassiri[2], Moitaba Tahmoorespur[3], Alireza Haghparast[4] and Saeed Zibaei[5]

1, 3 and 4- PhD. Student, Professor and Assistant Professor, Ferdowsi University of Mashhad
2- Professor, Ferdowsi University of Mashhad, (Corresponding author: nassiryr@gmail.com)
5- Assistant Professor, Institute Razi Vaccine and Serum Research Branch of Mashhad
Received: July 11, 2015 Accepted: September 8, 2015

Abstract

Foot-and-mouth disease (FMD) is an extremely infectious and occasionally fatal viral disease with a rapid onset and a short course that affects cloven-hoofed animals and results in considerable financial losses. For this reason, availability of more reliable and efficient vaccines against Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is felt as a necessity. The purpose of this study is to develop a perfectly safe immunogen in order to supplant the usual inactivated vaccine. A tandem repeat multiple-epitope recombinant vaccine against foot-and-mouth disease (FMD) virus (FMDV) type O was developed. In order to develop recombinant epitope vaccines against foot-and-mouth disease virus (FMDV), multiple-epitope recombinant vaccine (rP) comprising various combinations of B cell and T cell epitopes from VP1 capsid protein were synthesized. A 1155-bp gene fragment was amplified by PCR using specific primers. The amplicon was purified and then cloned into expression vector pET-32a. For expression of recombinant protein, pET32a-rP plasmid was transformed into Escherichia coli BL21 (DE3) cells. Recombinant protein was overexpressed with isopropythio-beta-D-galctoside (IPTG). SDSPAGE and DOT blotting were performed for protein determination and verification.The multiple-epitope recombinant was validated by colony-PCR and enzymatic digestion. IPTG with a dosage of 1.0 mmol/L could effectively promote protein expression. SDS-PAGE analysis demonstrated that our constructed prokaryotic expression system pET32a-rP efficiently produces a target recombinant protein with a molecular weight of about 60 kDa. Results showed that prokaryotic expression system is effective in producing the multiple-epitope recombinant immunogen for FDM virus and can be used as a potential method for poly epitope constructs.

Keywords: Foot and Mouth Disease, FMDv viruse, Multiple Epitope, Recombinant Vaccine