



طراحی، ساخت و بیان اپی توپ‌های پروتئین VP₁ ویروس تب برفکی سروتیپ O ایران

محمد دوستی^۱، محمدرضا نصیری^۲، مجتبی طهمورث پور^۳، علیرضا حق پرست^۴ و سعید زیبایی^۵

۱- ۳، ۴- دانشجوی دکترا، استاد و استادیار، دانشگاه فرودوسی مشهد
۲- استاد، دانشگاه فرودوسی مشهد، (نویسنده مسؤل: nassiry@gmail.com)
۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات واکنس 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 واکنس امن‌تر و کارآمدتر در برابر ویروس تب برفکی (FMDV) ضروری است. هدف از این مطالعه توسعه یک واکنس کاملاً ایمن چند اپی توپ‌های نوترکیب به جای واکنس‌های سنتی غیرفعال، در برابر ویروس (FMDV) تب برفکی O ایران بود. برای هم‌سازسازی و بیان اپی توپ‌های نوترکیب ایمنی‌زا بر علیه ویروس تب برفکی، ژن پروتئین نوترکیب متشکل از ترکیبات مختلف اپی توپ‌های سلول‌های B و سلول‌های T از پروتئین VP₁ کپسید ویروس 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 تأیید بیان پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از الکتروفورز پروتئین SDS-PAGE و دات بلاتینگ انجام گرفت. صحت کلونینگ ژن پروتئین نوترکیب چند اپی توپ‌ها با روش PCR و هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید 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 اپی توپ به صورت نامحلول بیان شد. نتایج نشان داد سیستم بیانی پروکاریوتی جهت تولید ساختارهای چند اپی توپ‌ها نوترکیب ایمنی‌زای ویروس تب برفکی مؤثر و می‌تواند به عنوان یک روش بالقوه برای سازدهای پلی‌اپی توپ‌ها استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: چنداپی توپی، تب برفکی، پروتئین نوترکیب، ویروس FMD

مقدمه

ویروس بیماری تب برفکی (foot-and-mouth disease) از جنس Aphotovirus 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 سروتیپ اروپایی- آسیایی A, O, C, Asia-1 و سه سروتیپ آفریقای جنوبی شامل SAT₁، SAT₂ و SAT₃ 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 واکنس غیرفعال شده تأیید ایمن‌سازی دام‌های حساس علیه بیماری تب برفکی استفاده می‌شود. واکنس غیرفعال شده تب برفکی، ایمنی پایدار و یا نسبتاً پایدار ایجاد نمی‌کنند و ممکن است در طی تولید واکنس، ویروس به طور ناقص غیرفعال شده و خود باعث شیوع بیماری شود. هم‌چنین واکنس‌های غیرفعال قادر به القای پاسخ ایمنی سلولی نمی‌باشند (۱۴). علاوه بر این، حیوانات واکنسینه شده با واکنس غیرفعال را نمی‌توان از حیواناتی که به طور طبیعی آلوده شده‌اند تشخیص داد، لذا با توجه به این مشکلات تلاش برای توسعه واکنس‌های جدید از جمله واکنس‌های نوترکیب

زیر واحدی، واکنس‌های پپتیدی مصنوعی، DNA واکنس، واکنس‌های زنده با ژنوم حذف شده و واکنس‌های وکتوری ضروری می‌باشد (۱۹). در این میان واکنس‌های چند اپی توپی با متمرکز کردن پاسخ‌های ایمنی بر اپی توپ‌های مهم ویروس، پتانسیل خوبی تأیید تحریک سیستم ایمنی علیه چندین اپی توپ منحصر به سلول‌های B یا T به طور هم‌زمان و اختصاصی را دارا هستند. اپی توپ‌ها بخشی از ساختار یک آنتی‌ژن هستند که به‌وسیله سلول‌های B یا T شناخته می‌شوند. مطالعات ایمونولوژیکی ویروس تب برفکی نشان داده است که اپی توپ‌های غالب اصلی که مسئول القای پاسخ ایمنی سلول‌های B یا T هستند، در پروتئین ساختمانی VP₁ قرار دارند (۱۵). دو اپی توپ سلول‌های B پروتئین ساختمانی VP₁ شامل (اسیدهای آمینه شماره ۱۴۱ تا ۱۶۱ و ۲۱۳-۲۰۰) توانایی پاسخ آنتی‌بادی خنثی‌کننده در گاو را دارا می‌باشند (۷). در پروتئین VP₁ ویروس در لوپ G-H (اسیدهای آمینه ۱۴۱ تا ۱۶۱) که مربوط به اپی توپ‌های سلول‌های B می‌باشد یک منطقه کاملاً حفاظت شده شامل سه اسید آمینه آرژنین، گلايسین و اسید آسپارتیک (Arg, Gly Asp) وجود دارد. این اسیدهای آمینه نقش مهمی در اتصال ویروس به گیرنده سلول ندارد (۱۷). اپی توپ‌های سلول‌های T شامل (اسید آمینه ۸۸، ۶۶، ۴۰ و ۲۰) پروتئین VP₁ به طور مؤثری به سلول‌های B در القای پاسخ آنتی‌بادی خنثی‌کننده ویروس تب برفکی کمک می‌کنند (۲۰، ۱۴، ۱۱). پژوهش‌گران برای تقویت ایمنی‌زایی واکنس‌های پلی‌توپی، پروتئین زنجیره سنگین IgG₁ (۱۹، ۱۴) یا با آلفا اینترفرون بزی (۹) و با ماکروفاژ

اِپی‌توپ‌های انتخاب شده سه قطعه A، B و C که شامل اِپی‌توپ‌های 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 اِپی‌توپ‌ها 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 VP₁ 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 نرم‌افزار 5.5 CLC Main Workbench به توالی ژنی، تبدیل و بهینه‌سازی کدون^۱ 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 v5 و توالی ژن پروتئین نوترکیب که در وکتور pUC57 کلون شده بود، آغازگرهای لینکر دار طراحی شدند. شبیه‌سازی کلونینگ ژن پروتئین نوترکیب با نرم‌افزار 5.5 CLC Main Workbench انجام و پس از اطمینان از صحیح بودن قالب خواندن^۲ 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^۳ تأیید افزایش کارایی برش آنزیمی استفاده شد.

CCGGAATTCCGGGATCCGATACTTACCATG 3' F: 5'
R: 5' CCGCTCGAGGGCCAGCTGCATGCTATACATG 3'

به‌صورت جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت شش ساعت هضم آنزیمی شدند. محصولات حاصل از هضم، بر روی ژل آگارز 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 الحاقی 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 T₄ و بافر 1x در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. محصول الحاقی با روش شوک حرارتی به باکتری مستعد *E. coli* سوش BL21(D3) انتقال یافت و غربال‌گری باکتری‌های دریافت‌کننده وکتور روی محیط کشت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمیبی‌سلین انجام شد. به منظور صحت کلونینگ از روش کلونی PCR (با پرایمرهای T₇ 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 تأیید توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره فرستاده شدند.

گرانولوسیت (۷) را به اِپی‌توپ‌ها متصل و افزایش پاسخ ایمنی را گزارش کرده‌اند. مورگان و مور (۱۸) با ساخت حامل حاوی غالب‌ترین اِپی‌توپ‌های سرولوژیکی 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 اِپی‌توپی با استفاده از اِپی‌توپ‌های VP₁ 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 اِپی‌توپی ویروس تب برفکی سروتیپ O انجام نشده است، لذا با توجه به شناسایی اِپی‌توپ‌های پروتئین‌های مختلف ویروس تب برفکی (۲)، هدف از این مطالعه طراحی و بیان یک آنتی‌ژن چند اِپی‌توپی نوترکیب، شامل نسخه‌های متعددی از اِپی‌توپ‌های سلول‌های B و T از پروتئین VP₁ ویروس تب برفکی بود.

مواد روش‌ها

آنالیز توالی‌های ژنی و پروتئینی

توالی ژن و پروتئین VP₁ 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 تأیید ساخت پروتئین نوترکیب مصنوعی اِپی‌توپ‌های سلول‌های B (اسید آمینه‌های شماره ۱۶۰-۱۴۰ و اسید آمینه‌های شماره ۲۱۳-۲۰۰) و اِپی‌توپ سلول‌های T (اسید آمینه‌های شماره ۱۶-۴۴ و اسید آمینه‌های شماره ۸۰-۶۶ AA) از این توالی‌ها استخراج شد. با توجه به

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 MgCl₂، 1U آنزیم *Pfu* پلیمرز (شرکت فرمنتاز) و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو (pUC57-rP) انجام شد. چرخه‌های حرارتی برای انجام واکنش PCR شامل ۳۲ چرخه حرارتی ۳ مرحله‌ای 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 تأیید 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 آمریکا) با دو آنزیم برشی *EcoR* I و *Xho* I

الکتروفورز SDS Page و بلاتینگ نمونه‌های پروتئینی، تحت شرایط دناتورده روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد و سپس با روش کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شدند. تأیید بررسی محلولیت پروتئین نوترکیب، از محیط کشت باکتری القا شده با IPTG بعد از ۴ ساعت انکوباسیون یک میلی‌لیتر برداشته و سلول‌ها با دور ۶۰۰۰ دور ۸۰۰۰ 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 سوسپانسیون حاصل در دور ۸۰۰۰g 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.

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 ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته و با دور ۸۰۰۰g 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.

A

قطعه A	GG	140-160 AA	GG	200-213 AA
قطعه B	GG	140-160 AA	GG	16-44 AA
قطعه C	GG	140-160 AA	GG	66-80 AA



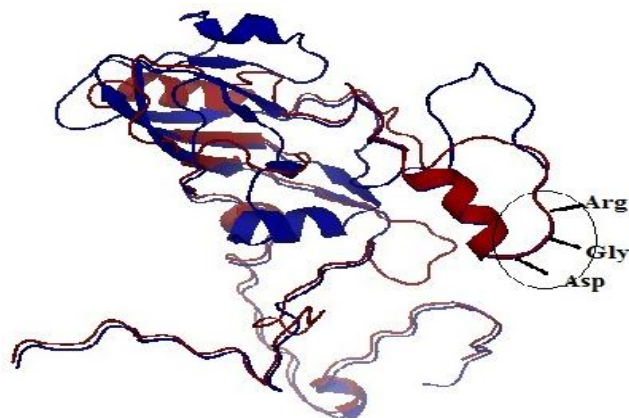
شکل ۱- ساختار شماتیک از پروتئین نوترکیب. (الف) قطعات اپی‌توپی برای ساخت پروتئین نوترکیب که قطعات شامل اپی‌توپ‌های سلول‌های T و B پروتئین VP₁ ویروس تب برفکی که به‌وسیله لینکرهای گلیسین-گلیسین جدا شده‌اند. (ب) ساختار نهایی پروتئین نوترکیب Figure 1. The schematic structure of six of recombinant proteins (a). Fragments were used for constructing the recombinant proteins. Each square represents B cell epitope or T cell epitope of VP₁ of FMDV which have been separated using Gly-Gly linkers. (b) Recombinant proteins final structure.

شده بود استفاده شد (۳،۲۵) از اتصال و چیدمان اپی‌توپ‌های سلول B و T به یکدیگر سه قطعه A، B و C 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 VP₁ 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 تأیید 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).

ژن مورد نظر در ناقل بیانی pET32-a، کلون شد این پلاسمید به انتهای پروتئین نوترکیب برچسب هیستیدینی اضافه می‌کند. بنابراین با استفاده از آنتی‌بادی ضد His tag و روش تأیید دات بلاتینگ وجود پروتئین مورد تأیید قرار داد. تأیید دات بلاتینگ دو میکرولیتر از پروتئین استخراج شده بر روی کاغذ نیتروسولولوز نقطه گذاری شد. کاغذ نیتروسولولوز 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 ضد موشی کنژوگه با HRP انکوبه و پس از سه بار شستشو تأیید آشکارسازی پروتئین از سوبسترای DAB استفاده شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه از اپی‌توپ‌های تحریک کننده سلول‌های ایمنی B و T پروتئین VP₁ که از سوی سایر محققین گزارش

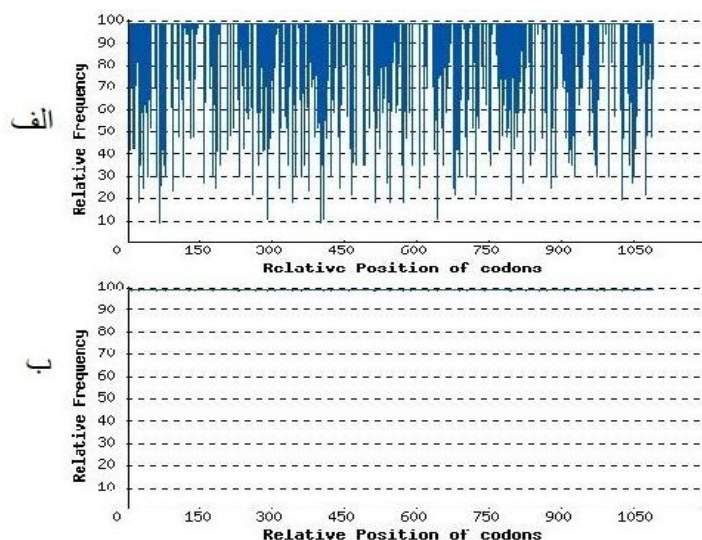


شکل ۲- ساختار سه بعدی پروتئین VP₁ طبیعی و نوترکیب ویروس تب برفکی که با نرم‌افزار Swiss Model پیش‌بینی شده است این شکل از قرار دادن ساختار پروتئین نوترکیب و طبیعی بر روی هم توسط نرم‌افزار PyMOL ایجاد شده است که پروتئین نوترکیب به رنگ قرمز و پروتئین طبیعی به رنگ آبی می‌باشد.

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.

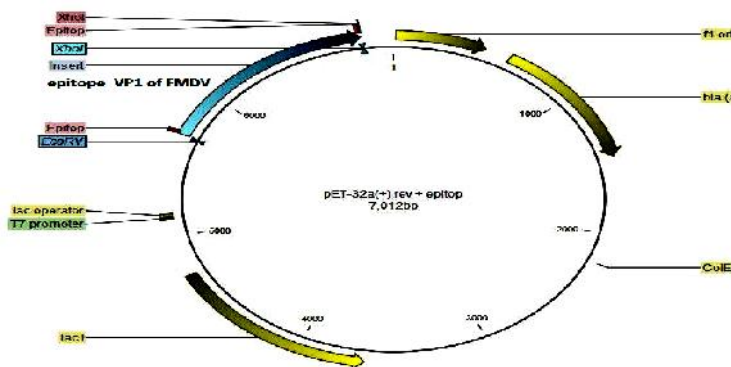
جایگزینی آنها به کدون‌های میزبان باعث افزایش بیان پروتئین می‌شود، زیرا در این حالت tRNA میزبان عامل محدود کننده در سنتز پروتئین‌ها نیستند (۵). پژوهش‌گران نشان داده‌اند که بهینه‌سازی کدون‌ها با توجه به میزبان بیانی باعث افزایش میزان بیان پروتئین VP₁ می‌شود (۲۲). بررسی بیان مجازی ژن پروتئین نوترکیب با نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5 نشان داد که آغازگرهای لینکر دار به درستی طراحی شده و قالب خواندن صحیح بوده و بیان پروتئین مورد نظر به درستی انجام شده است (شکل ۴).

به منظور 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 بهینه‌سازی 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 VP₁ در سلول‌های جانوری و استفاده ما از میزبان باکتریایی، بررسی ارجحیت کدون‌ها و تغییر کدون‌ها و



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

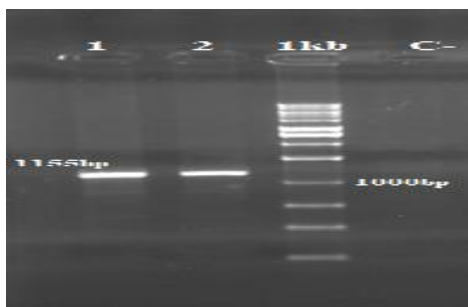
Figure 3. codon usage optimization. (A) Before codon adaption index (B) After codon adaption index



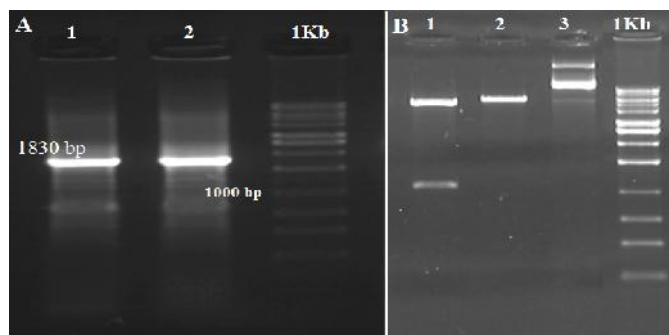
شکل ۴- ساخت پلاسمید حاوی پروتئین نوترکیب شامل اپی توپ های سلول های B و T.
Figure 4. Construction of the recombinant plasmid including B cell and T cell epitope

باند ۱۸۳۰ bp نشان از حضور ژن پروتئین نوترکیب در وکتور می باشد هم چنین نتایج هضم آنزیمی pET32a(+)-rP با جفت آنزیم های *EcoRI* و *XhoI* نیز الحاق ژن پروتئین نوترکیب را در وکتور بیانی pET32a(+)-rP تأیید کرد (شکل ۶).

تکثیر و هم‌سانه‌سازی پروتئین نوترکیب در pET32a(+)
ژن پروتئین نوترکیب با طول ۱۱۵۵ bp توسط آغازگرهایی طراحی شده به صورت اختصاصی به وسیله آنزیم *pfi* تکثیر شد (شکل ۵). نتایج مربوط به کلونی PCR وکتور نوترکیب pET32a(+)-rP با آغازگرهای T7 و Terminator و ظهور



شکل ۵- الکتروفورز محصولات PCR برای تکثیر پروتئین نوترکیب ۱۱۵۵ جفت بازی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد، نشان گر کیفیت مناسب قطعه تکثیر شده می باشد (نشان گر وزنی کیلو جفت بازی ردیف ۱ و ۲ محصولات PCR و نشان گر 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

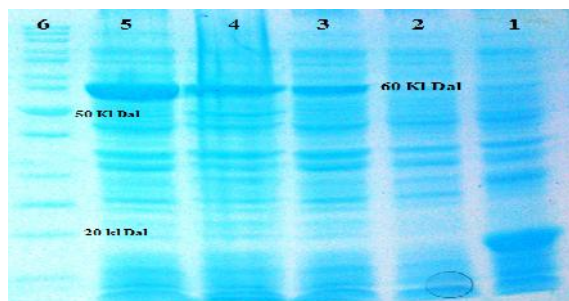


شکل ۶- A: تأیید حضور ژن پروتئین نوترکیب با استفاده از روش کلونی PCR با آغازگرهای T7 و Terminator ستون ۱ و ۲ باند ۱۸۳۰ جفت بازی در کلونی مثبت و ستون ۳ DNA لدر ۱kb B: هضم دو آنزیمی وکتور pET32a(+)-rP با آنزیم های *EcoRI* و *XhoI* حضور باند ۱۱۵۵ جفت بازی پروتئین نوترکیب، ستون ۲ هضم وکتور بدون قطعه نوترکیب، 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.

به صورت توده متصل به هم بود که با گزارشات سایر محققین که پروتئین VP₁ 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 5.5 CLC Main Workbench ۰/۵۰ و میزان 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 آب‌گریزی 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).

آنالیز نتایج توالی‌یابی وکتور pET32a(+)-rP با آغازگرهای T₇ و Terminator با نرم‌افزار CLC کلون و صحیح بودن قالب خواندن ژن را تأیید 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 T₇ قرار دارند و با توجه به داشتن راه انداز LacO برای کنترل بیان ژن‌های خود القا با IPTG باعث رونویسی ژن T₇ 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 تیرویدوکسین را به ابتدای پروتئین نوترکیب اضافه می‌کند و باعث افزایش حلالیت پروتئین می‌شود (۱۳). در تحقیق حاضر پروتئین نوترکیب تولید شده



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 القا بیان ردیف ۳ و ۴: عصاره سلول‌ها از سلول‌های اشرشیاکولی حاوی pET32a-RP پس از القا. بیان و تولید پروتئین نوترکیب ۶۰ کیلودالتونی ردیف ۵: نشانگر مولکولی وزنی پروتئین ۱۴ 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.

مشخص آنها با لکه‌های سلول‌های غیرترنسفکت شده (کنترل منفی) نشان‌دهنده بیان پلاسمیدهای پلی‌توپ در این سلول‌ها بود (شکل ۸).

نتایج دات بلاتینگ با Anti-His tag تأییدکننده تولید پروتئین نوترکیب در pET32a است که با نتایج توالی‌یابی مطابقت دارد. در دات بلاتینگ، شدت رنگ لکه‌های مربوط به سلول‌های حاوی پلاسمید نوترکیب القا شده و تفاوت



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

تحقیقات نشان داده است که حیواناتی که با پروتئین VP₁ واکسینه شده‌اند در برابر ویروس تب برفکی محافظت می‌شوند (۵). سایر محققین نیز اپی‌توپ‌های ایمنی‌زای انتخاب شده پروتئین VP₁ 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 اپی‌تویی 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 آنتی‌ژن‌سیسته 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.

ویروس تب برفکی عامل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های احشام می‌باشد 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 راه‌های 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 القای پاسخ ایمنی سلولی عدم تشخیص حیوانات واکسینه شده می‌باشند (۱۴). مورد تأیید نیست، بنابراین توسعه یک واکسن بی‌خطر و مؤثر به جای واکسن‌های سنتی برای کنترل و ریشه‌کنی تب برفکی در سراسر جهان ضروری است. در این مطالعه، پروتئین نوترکیبی مبتنی بر اپی‌توپ نوترکیب پروتئین VP₁ ویروس تب برفکی سویه O تأیید ساخت واکسن اپی‌تویی طراحی و بیان شد فانگ و همکاران مطابق با تحقیق حاضر اپی‌توپ‌های ایمنی‌زای پروتئین VP₁ 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 آنتی‌بادی خنثی‌کننده را القا کند (۱۲،۳،۱۲).

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 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 α -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 VP₁. *Virol Journal*, 7: 426.
17. Mateu, M.G., J.A. Camarero, E. Giral, 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. Suttmoller, 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 VP₁ 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 Doosti¹, Mohammadreza Nassiri², Mojitaba Tahmoorespur³, Alireza Haghparast⁴ and Saeed Zibaei⁵

1, 3 and 4- PhD. Student, Professor and Assistant Professor, Ferdowsi University of Mashhad

2- Professor, Ferdowsi University of Mashhad, (Corresponding author: nassiry@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 isopropylthio-beta-D-galactoside (IPTG). SDS-PAGE 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 FMD virus and can be used as a potential method for poly epitope constructs.

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