



کلونینگ و بیان ژن غیر ساختاری 3ABC ویروس تب برفکی سروتایپ O در باکتری اشرشیاکلی

سید امیررضا پریزاده^۱، محمد رضا نصیری^۲، سعید زیبایی^{۳*}، مجتبی طهمورث پور^۲، محمدرضا باسامی^۱

^۱ دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

^۲ استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

^۳ استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق کشور مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۳

چکیده

بیماری تب برفکی اولین بیماری ویروسی شناخته شده در حیوانات است که با گذشت بیش از صد سال از شناخت آن، همچنان یکی از مهمترین خطراتی است که صنعت دامپروری دنیا را تهدید می‌نماید. یکی از مهمترین روش‌های شناسایی حیوان واکسینه شده از حیوان مبتلا به تب برفکی استفاده از پروتئین غیرساختاری 3ABC به عنوان آنتی ژن در کیت الایزا می‌باشد. از این رو، ژن 3ABC ویروس تب برفکی سروتایپ O با استفاده از واکنش زنجیره پلیمرز و پرایمرهای اختصاصی حاوی سایت‌های برشی *BamHI* و *HindIII* جداسازی شد. به منظور بررسی خصوصیات نوکلوتیدی، ژن تکثیر شده به ناقل pTZ57R/T انتقال و حضور ژن هدف در ناقل کلونینگ pTZ57R/T با استفاده از روش‌های کلونی PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی تایید شد. به منظور تولید آنتی ژن نوترکیب، ژن هدف به ناقل بیانی (+) pET21a وارد و سپس به باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3) به عنوان میزبان بیان منتقل شد. باکتری حاوی ناقل نوترکیب با استفاده از IPTG در غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار القا شد. تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از الکتروفورز پروتئین و وسترن بلائینگ تایید شد. وزن مولکولی پروتئین تولید شده در حدود ۵۰ کیلودالتون مشخص شد. نتایج نشان داد که از پروتئین نوترکیب تولید شده می‌توان به خوبی به عنوان آنتی ژن در کیت تشخیصی الایزا برای حیوانات استفاده شود.

کلید واژه‌ها: ژن 3ABC، تب برفکی، FMDV، پروتئین نوترکیب

مقدمه

بیماری تب برفکی اولین بیماری ویروسی شناخته شده در حیوانات است که با گذشت بیش از صد سال از شناخت آن، همچنان یکی از مهمترین خطراتی است که صنعت دامپروری دنیا را تهدید می‌نماید. این بیماری حیوانات وحشی و اهلی زوج سم به ویژه تولید کنندگان شیر و گوشت را آلوده می‌کند (Tully et al., 2009; Qian et al., 2004; Dory et al., 2009). علاوه بر حیوانات اهلی، این ویروس همچنین می‌تواند بیش از ۳۰ گونه از حیوانات حیات وحش را آلوده نماید (Thomson., 2003). ویروس عامل بیماری تب برفکی از خانواده پیکورناویریده و از جنس آفتوویروس است که دارای هفت سروتیپ A، O، Asia1، SAT1، SAT2 و SAT3 و سویه‌های متعددی می‌باشد (Hemaet et al., 2009). عواملی نظیر تعداد سروتایپ‌ها و تحت تیپ‌های ویروس، استعداد بالای این ویروس به جهش (در نتیجه تغییرات سریع آنتی ژنیکی)، قابلیت بقاء بالای ویروس در طبیعت، قابلیت شیوع سریع (شدت واگیری ۱۰۰٪)، دور ماندن علائم کلینیکی در اثر ابتلا به بعضی از تحت تیپ‌های خاص در بعضی از حیوانات، به خصوص گوسفند، قدرت انتقال بین گونه‌ای، شکل‌گیری حاملین، هزینه بسیار زیاد کنترل و مبارزه، هزینه زیاد تشخیص و اعمال مقررات سنگین بین‌المللی برای کشورهایی که واجد بیماری هستند سبب افزایش اهمیت بیماری تب برفکی می‌شوند (Fry et al., 2005).

واکسن‌های متداول تب برفکی با استفاده از کشت سلولی (BHK21) تهیه می‌شوند. ویروس تکثیر شده در این سلول‌ها توسط روش‌های شیمیایی، مانند روش اتیلن ایمین مضاعف (BEI) غیر فعال می‌شود (Song et al., 2005). در بعضی موارد ویروس به شکل کامل غیر فعال نشده و در نتیجه منبعی برای آلودگی محسوب می‌گردد (Kim et al., 2006; Pengyan et al., 2008; Yi et al., 2004). در این میان، جدا کردن حیوانات واکسینه شده و غیر واکسینه ممکن است به علت فقدان تکنولوژی تفریقی لازم، مشکل باشد (Brown et al., 2007; Priyadharshini et al., 2003). با توجه به معایب ذکر شده در واکسن‌ها، اولین گام در کنترل بیماری تب برفکی، تشخیص دقیق و سریع بیماری و سروتایپ عامل آن می‌باشد. برای تشخیص دقیق و درست آن به آزمون‌های تشخیصی سریع و حساس نیاز است که توانایی تفکیک حیوانات واکسینه از حیوانات ناقل را دارا باشند. در حال حاضر سنجش آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های غیرساختاری به خصوص پروتئین غیرساختاری 3ABC ویروس بیماری تب برفکی تنها ابزار کارآمد جهت تفکیک حیوانات واکسینه از حیوانات آلوده گزارش شده است (Priyadharshini et al., 2007). تولید سنتتیک پپتیدهای غیرساختاری بسیار هزینه بر و نیازمند تکنولوژی خاص است. از طرفی در این روش تنها یک اپی‌توپ تولید می‌شود که سبب کاهش احتمال تفرق حیوان مبتلا از حیوان واکسینه شده می‌شود (Clavijo et al., 2004). از این نظر،

و pET21a(+) (Novagen) به عنوان ناقلهای کلونینگ و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند. سلول باکتری حاوی ناقل دستورزی شده بر روی محیط کشت مایع Luria Broth (۱ درصد تریپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ کلرید سدیم) حاوی ۱۰۰ µg/ml آمپی سیلین کشت داده شد. pH محیط کشت ۷/۵ تنظیم و سلول ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به شکل هوازی کشت داده شدند.

تکثیر و کلونینگ ژن 3ABC

استخراج RNA ژنومی از محیط کشت سلول BHK-21 با استفاده از کیت استخراج Nucleic Acid Kit High Pure viral (ساخت شرکت Roche) انجام شد. ساخت cDNA ژنومی با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit/ Thermo صورت گرفت. به منظور تأیید سروتیپ O بودن ویروس مورد استفاده، واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای

5`GCTGCCTACCTCCTTCAA3 و

5`AGCTTGTACCAGGGTTTGGC3`

جهت تکثیر قطعه ۴۰۲ جفت بازی 1D/2B به منظور تایید سروتیپ O ویروس تب برفکی انجام گردید (Reidet al., 2001). ژن 3ABC با

استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت 5'

GGATCCGCGATCTCAATTCCTTCCC

3' AAAAGTC و برگشت 5'

CCTGAACCACAACACGAGCCCAAGC

3' TT که حاوی جایگاه برشی آنزیم های

BamHI در انتهای 5' آغازگر رفت و HindIII در

تولید نوترکیب پروتئین های غیرساختاری در باکتری /شرشیاکلی به دلیل سهولت در تخلیص و ارزان بودن پیشنهاد شده است. ویروس مربوطه در بدن حیوانات ناقل تولید پروتئین های غیرساختاری می نماید، در صورتیکه در حیوانات واکسینه شده این پروتئین ها وجود ندارند. با توجه به نقش مهم ژن های 3A ، 3B و 3C (ناحیه ژنی 3ABC) در تولید پروتئین غیرساختاری، به نظر می رسد کلونینگ و بیان این ناحیه ژنی و استفاده از آن به عنوان پروتئین نوترکیب جهت تحریک سیستم ایمنی میزبان و جهت استفاده به عنوان آنتی ژن در کیت تشخیصی الایزا برای حیوانات مورد نظر امکان پذیر می باشد. بنابراین، در این مقاله ژن 3ABC سروتیپ O ویروس تب برفکی به عنوان ژن کانیدا جهت توالی یابی و کلونینگ و بیان ژن با هدف استفاده از آن در تولید کیت تشخیصی الایزا در آینده انتخاب شد.

مواد و روش ها

ویروس تب برفکی

ویروس تب برفکی سروتیپ O از موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق بر روی محیط کشت BHK-21 تهیه گردید. سویه های باکتری، پلاسمیدها و محیط کشت ها

سویه های /شرشیاکلی DH5a و BL21(DE3) به ترتیب به عنوان میزبان کلونینگ و بیان انتخاب شدند. پلاسمیدهای pTZ57 R/T (Fermentas)

گردید. از الگوریتم و نرم افزار PHRED (Ewing and Green, 1998) به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی ها استفاده شد. وزن مولکولی پپتید قابل پیش بینی جهت تولید با استفاده از نرم افزار CLC Workbench 5 محاسبه گردید. ساختار پروتئینی 3ABC با استفاده از Swiss-pdbv (http://www.expasy.ch/spdbv) مدل سازی و مشخص شد.

بیان پروتئین 3ABC

استخراج پلاسمید pTz57R/T+3ABC با استفاده از کیت Miniprep شرکت Thermo صورت گرفت. هضم آنزیمی برای پلاسمیدهای pTz57R/T+3ABC و ناقل بیانی pET21a(+) با استفاده از آنزیم های برشی *HindIII* و *BamHI* انجام شد. سپس محصول هضم با استفاده از کیت #K0513 ساخت شرکت Promega از روی ژل استخراج گردید و واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز (Roche) صورت گرفت. پلاسمید نو ترکیب حاصل به منظور تکثیر به باکتری *شرشیا کلی DH5α* وارد شد و بر روی محیط کشت LB-Agar حاوی $100 \mu\text{g/ml}$ آمپی سیلین کشت داده شد. غربالگری و انتخاب کلنی حاوی ژن هدف با استفاده از روش کلنی PCR و هضم آنزیمی انجام گردید. ناقل بیانی جهت بررسی چارچوب خوانش صحیح با استفاده از پرایمرهای عمومی T7 Primer و T7 terminator جهت توالی یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. سپس ناقل بیانی نو ترکیب به میزبان بیان *شرشیا کلی BL21(DE3)*

انتهای 3' آغازگر برگشت بود، تکثیر شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم *Pfu* (Fermentas)، ۱/۲۵ واحد از آنزیم *Pfu* پلی مرز (Fermentas)، ۱ میکروگرم cDNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر dNTP و ۰/۲۵ میکرومول از آغازگرها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن 3ABC با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (T-Personal) ساخت آلمان به صورت زیر انجام شد: واسرشت سازی ۶۰ ثانیه در 94°C ، اتصال ۳۰ ثانیه در 60°C و بسط ۳۰ ثانیه در 72°C برای ۳۵ سیکل. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای 94°C برای ۳ دقیقه و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در 72°C نیز انجام گردید. محصول PCR به ناقل کلونینگ pTZ57R/T وارد و سپس به *شرشیا کلی DH5α* منتقل شد.

توالی یابی ژن 3ABC

ناقل نو ترکیب pTZ57R/T حاوی ژن 3ABC به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. مقدار ۳۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای عمومی رفت و برگشت به ترتیب T7 Primer و T7 terminator با غلظت ۱۰ پیکومول به همراه نمونه ها جهت توالی یابی فرستاده شد. این نمونه ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی یابی شدند. ابزار BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی ها استفاده

۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از شستشو آنتی بادی ثانویه، غشا با استفاده از محلول رنگزای DAB (امریکا، Sigma) رنگ آمیزی شد.

نتایج و بحث

کلونینگ ژن 3ABC در ناقل pTZ57R/T

نتایج PCR پرایمرهای 1D/2B، سروتایپ O ویروس تب برفکی استفاده شده در این پژوهش را تایید کرد. برای قطعه ژنی 1D/2B بانندی به طول ۴۰۲ جفت باز روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۱). ناحیه کد کننده 3ABC بروی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی به طول ۱۳۲۰ جفت باز، به خوبی تکثیر شده است (شکل ۲). عدم حضور باند در کنترل منفی و حضور قطعات اختصاصی، نشان از دقت و صحت انجام واکنش داشت. حضور ژن 3ABC در ناقل pTZ57R/T با روش کلونی PCR و هضم آنزیمی تایید گردید (شکل ۳). در سال ۲۰۰۴، پژوهشگران ژن 3ABC ویروس تب برفکی سروتایپ O برزیل را به طول ۱۳۰۳ جداسازی نمودند (Clavijo et al., 2004). همچنین اولین گزارش مربوط به تولید پروتئین غیرساختاری ویروس تب برفکی در مخمر پیشیا پاستوریس مربوط به سال ۲۰۰۷ است که در آن محققان ژن 3AB را به طول ۶۷۰ جفت باز بیان کردند (Priyadharshiniet al., 2007). گزارش شده که پروتئین غیر ساختاری 3C باعث تحریک پاسخ ایمنی هومورال، القا تکثیر سلول‌های T و کاهش حساسیت شدید به واکسن DNA

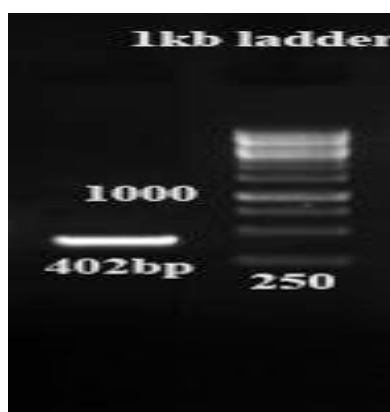
منتقل گردید و تک کلنی نوترکیب به مدت ۱۶ ساعت در ۳ میلی لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. یک میلی لیتر از محیط کشت تهیه شده به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی آمپی سیلین اضافه و تا رسیدن به OD، ۶۲۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. در این مرحله، نمونه صفر برداشته و سپس IPTG در غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار به محیط کشت اضافه شد. نمونه برداری در ساعت های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ به منظور مشخص کردن بیان آنتی ژن 3ABC نوترکیب صورت گرفت. سلول ها در ۸۰۰۰ rpm سانترفیوژ و پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر بافر لاملی به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوشانده شدند. محصول در ۸۰۰۰ rpm سانترفیوژ و محلول رویی و انتهایی بر روی ژل اکریل امید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند.

وسترن بلائینگ

پس از الکتروفورز پروتئین، وسترن بلائینگ با استفاده از کاغذ نیترو سلولز صورت گرفت. غشا با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) ۵ درصد محلول در TBS بلوکه گردید. سپس غشا در محلول آنتی بادی اولیه آنتی His-tag در TBST (TBS همراه با ۱ درصد Tween20) با رقت ۱:۱۰۰۰ برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس سه بار شستشو با TBST انجام گرفت و غشا در محلول آنتی بادی ثانویه با رقت ۱:۱۵۰۰ برای یک ساعت در دمای

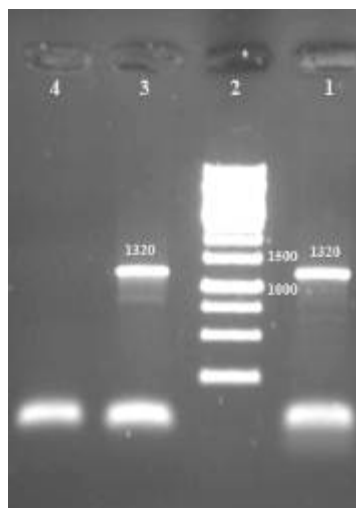
غیرساختاری موجود در سرم خوک‌های آلوده یا واکسینه شده بررسی نمودند. نتایج به دست آمده نشان داد که پلی‌پپتید 3ABC ایمن‌زاترین پروتئین غیرساختاری بود و می‌تواند برای تشخیص مؤثر خوک‌های آلوده از خوک‌های واکسینه شده به کار گرفته شود (Rodriguez *et al.*, 1999).

می‌شوند (Barron *et al.*, 2001). در پژوهش Rodriguez *et al.* (1994) ایمن‌زایی پروتئین‌های غیرساختاری Leader، 2C، 3A، 3B، 3C، 3AB، 3ABC و 3D را در خوک ارزیابی نمودند و اختصاصی بودن آنتی‌بادی‌های ضد ویروس بیماری تب‌برفکی را علیه این پروتئین‌های



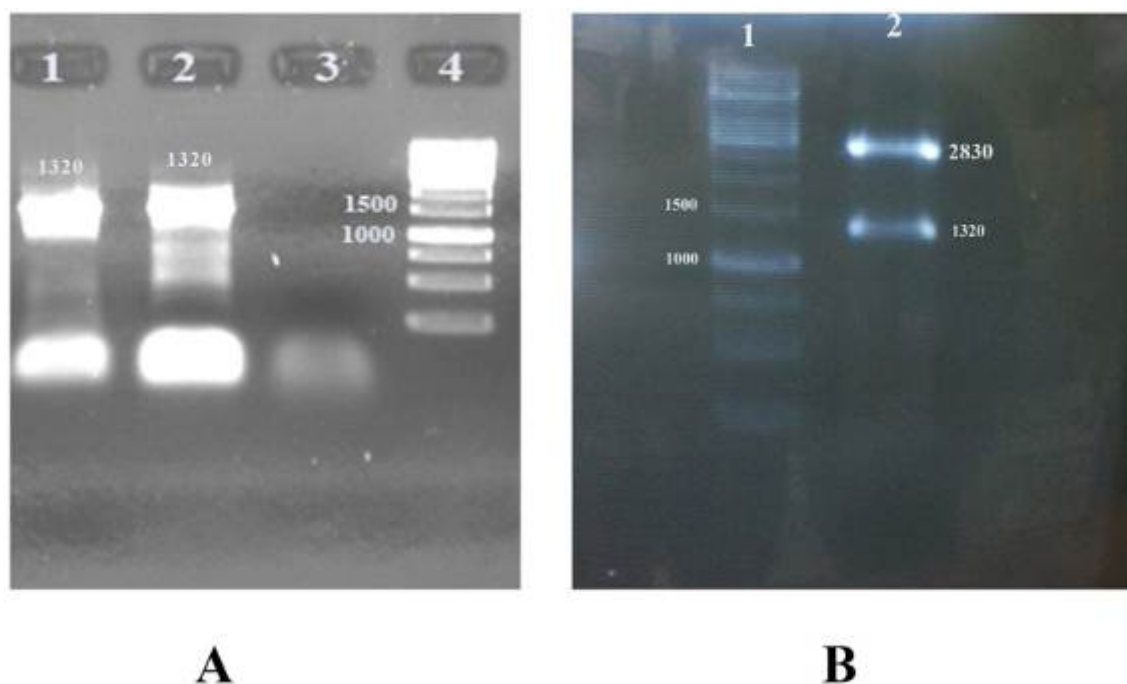
شکل ۱- الگوی الکتروفورز ژل آگارز تکثیر قطعه‌ای 1D/2B

Figure 1- Agarose electrophoresis pattern of 1D/2B gene PCR products.



شکل ۲- الگوی الکتروفورز ژل آگارز (یک درصد) تکثیر قطعه‌ای ژنی 3ABC ویروس تب برفکی با آغازگرهای لینکر دار. ستون‌های ۱ و ۳ قطعه‌ای ژنی 3ABC، ستون ۲ مارکر 1Kb و ستون ۴ کنترل منفی.

Figure 2- Electrophoresis of PCR products 3ABC FMDV with linker primer on agarose gel (1%). S1 and S3: 3ABC PCR Product (1320bp), S2: M = 1kb DNA Ladder, S4: negative control.



شکل ۳- شکل A- الگوی الکتروفورزی ژل آگارز کلونی PCR، ستون ۱ و ۲ کلونی PCR، ستون ۳ کنترل منفی و ستون ۴ مارکر 1kb. شکل B- ستون ۱ مارکر 1kb و ستون ۲ : هضم آنزیمی pTZ57R/TP1-3ABC

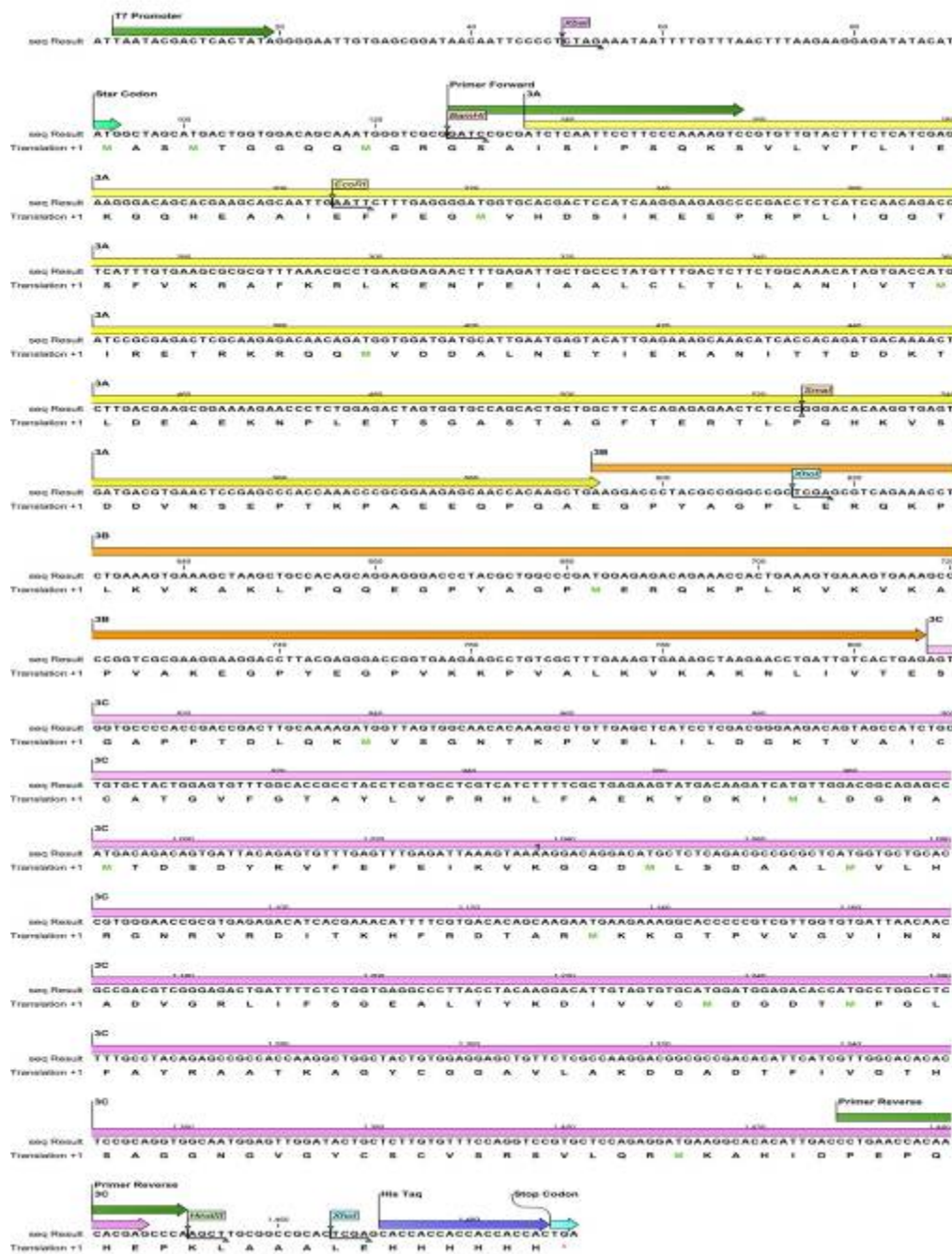
Figure 3- Figure A- Agarose electrophoresis of Colony PCR. S1 and S2:Clony PCR, S3:negative control, S4:1kb DNA Ladder, Figure B- S1: 1kb DNA Ladder, S2: Double digest of pTZ57R/TP1-3ABC.

اطلاعاتی بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده از این مقایسه، کمترین شباهت (۶۳/۷ درصد) با ایزوله SAT2- Uga 1-07 آفریقای جنوبی و بیشترین شباهت (۹۳/۹ درصد) با ایزوله Asia1-IND 148-01 هند به دست آمد. پژوهشگران ژن 3AB تب برفکی سروتایپ O را در ناقل pTZ57R/T بیان کردند و ارتباط فیلوژنتیکی این ژن را با دیگر سروتایپها بررسی کردند (Ahmadpoor, 1391). با آنالیزهای مجازی تولید پروتئین، با ترجمه ناحیه کدکننده آنتی ژن 3ABC و با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Expasy انجام شد. پروتئین نوترکیب

آنالیز توالی آنتی ژن 3ABC

توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن 3ABC ویروس تب برفکی سروتایپ O ایران در شکل ۴ نمایش داده شده است. ژن 3ABC بیان شده شامل ۱۳۶۲ جفت باز و ۴۵۵ اسید آمینه می باشد. همانطور که در شکل مشخص شده چارچوب خوانش صحیح +1 می باشد که پروتئین ها را به درستی بیان کرده است. همچنین توالی ژنی این ناحیه به منظور درک روابط بین سروتایپهای مختلف در حال گردش با توالی های 3ABC سروتایپهای A، O، Asia1، SAT1، SAT2 و SAT3 ثبت شده در پایگاه

تولید شده در این پژوهش دارای وزن مولکولی در حدود ۵۰ کیلو دالتون است. ساختار سه بعدی این پروتئین پیش بینی شد (شکل ۵).



شکل ۴- توالی نوکلوتیدی و پروتئینی ژن 3ABC.

Figure 4- Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of 3ABC gene.



شکل ۵- ساختار پروتئینی پیش بینی شده توسط Swiss-pdbv.

Figure 5- The secondary structural model of 3ABC in Swiss-pdbv.

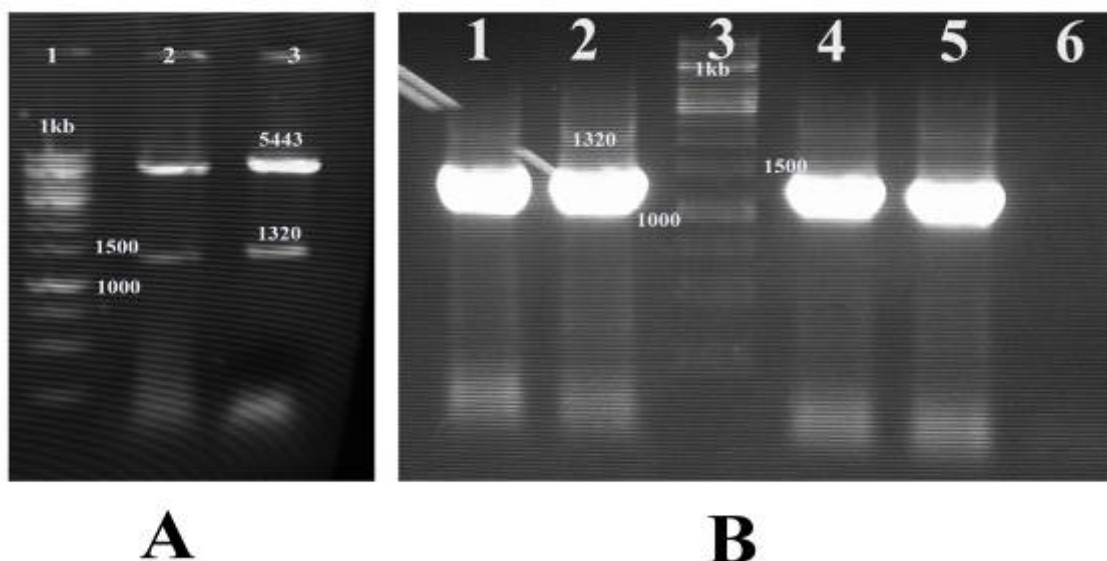
۲۰۰۴ محققان پروتئین نو ترکیب 3ABC را در اشرشیاکلی بیان نمودند و وزن ملکولی آن را ۶۲ کیلودالتون تخمین زدند (Clavijo *et al.*, 2004). ۱۳ کیلودالتون وزن مولکولی اضافه تولید شده این پروتئین نسبت به تحقیق حاضر، به دلیل حضور توالی محلول کننده‌ی است که در پایان ژن 3ABC در نظر گرفته شده است. اگرچه محققان توانستند با بیان ژن 3AB در مخمر مقدار پروتئین بیشتری تولید کنند، اما از آنجا که مخمرها تغییرات بعد از ترجمه ای شدیدی را بر روی پروتئین تحمیل می‌کنند، بررسی های بالینی جهت موفق عمل کردن پروتئین بایستی انجام گردد (Priyadharshiniet *al.*, 2007).

تشکر و قدردانی

این پروژه در آزمایشگاههای دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق انجام گرفته و بدین ترتیب از مسولان مربوطه کمال تشکر را داریم.

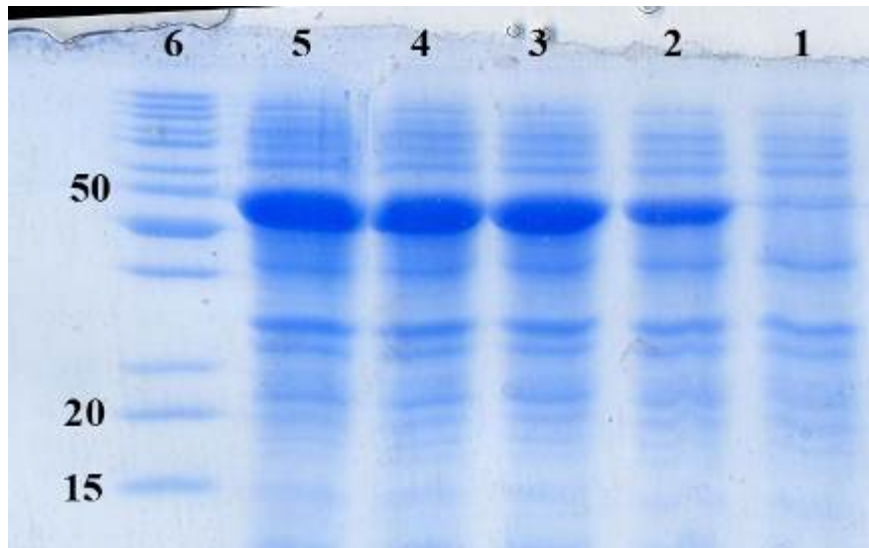
بیان آنتی ژن 3ABC در اشرشیاکلی

ناحیه کدکننده آنتی ژن 3ABC به شکل موفق از پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/T+3ABC هضم و از ژل تخلیص شد. فرآورده تکثیر خالص سازی شده حاوی جایگاه های برشی برای آنزیم های *BamHI* و *HindIII* بود در جایگاه همسانه سازی ناقل pET21a(+) با موفقیت الحاق شد. محصول الحاق به شکل موفق به اشرشیاکلی BL21(DE3) منتقل گردید و نتیجه کلنی PCR و هضم آنزیمی با آنزیم های *BamHI* و *HindIII* صحت انجام واکنش را تایید کرد (شکل ۶). پس از القای بیان ژن با استفاده IPTG ۱/۵ میلی مولار، الکتروفورز محصولات القا باند پروتئینی بزرگی را در وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون نشان داد (شکل ۷). وزن مولکولی آنتی ژن با مقدار تخمین زده شده در نرم افزار CLC با استفاده از آنالیزهای دات بلات و وسترن بلات باندهای پروتئینی به غشای نیتروسولوز منتقل و تشکیل باند در ناحیه ۵۰ کیلودالتون تولید آنتی ژن نو ترکیب را تایید نمود (شکل ۸). در سال



شکل ۶- هضم و کلونی PCR پلاسمید نو ترکیب. شکل A- ستون ۱ مارکر 1kb، ستون ۲ و ۳ هضم آنزیمی. شکل B- ستون ۳: مارکر 1kb، ستون های ۱، ۲، ۴، ۵ و ۶ کلونی PCR.

Figure 6- Electrophoresis of colony PCR and double digestion. Figure A- 1kb DNA Ladder, S1,S2: Double digest of pET21-ABC. Figure B- S1-S6 colony PCR, S3: 1kb DNA Ladder.



شکل ۷- SDS-PAGE پروتئین نو ترکیب 3ABC استخراج شده از باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3) (رنگ آمیزی کوماسی بلو). ستون ۱ تا ۵ به ترتیب مربوط به زمان های (ساعت) صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ می باشد.

Figure 7- SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the recombinant 3ABC in *E. coli* BL21 (DE3).S1:Negative control, S2, S3, S4,S5 cell extracts from *E. coli* BL21 (DE3) cultured for 1, 2, 3 and 4 h after 1 mM IPTG induction and lane S6, Molecular mass markers.



شکل ۸- آنالیز دات بلات و وسترن بلات پروتئین 3ABC نو ترکیب. شکل A- ستون S1: نمونه BL21/3ABC، ستون S2: BL21/pET21، ستون S3: کنترل منفی. شکل B- ستون S1 و S2: عصاره سلولی *E. coli* BL21 (DE3) کشت داده شده در زمان های ۱ و ۵، S3: مارکر پروتئینی.

Figure 8- Dot blot and western blot analysis of 3ABC. Figure A- Lane S1: BL21/3ABC, S2: BL21/pET21, S3: negative control. Figure B- S1 and S2: cell extracts from *E. coli* BL21 (DE3) cultured for 1 and 5, S3: molecular mass markers.

منابع

- Ahmadpoor K (2012). Cloning of 3AB non-structural protein coding region of FMD disease virus serotype O in Iran. MsC thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
- Barron L, Cuevas MF, Belsham GJ, Lefevre F, Parkhouse RME (2001). Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. *Journal of General Virology* 82: 1713-1724.
- Brown F, Mowat N (2003). Control of foot-and-mouth disease by vaccination. *Veterinary Research*. 152: 376.
- Clavijo A, Zhou E M, Hole K, Galic B, Kitching P (2004). Development and use of a biotinylated 3ABC recombinant protein in a solid-phase competitive ELISA for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virological Methods* 120: 217-227
- Dory D, Rémond M, Béven V, Cariolet R, Zientara S, Jestin A (2009). Foot-and-Mouth Disease Virus neutralizing antibodies production induced by pcDNA3 and Sindbis virus based plasmid encoding FMDV P1-2A 3C 3D in swine. *Antiviral Research* 83: 45-52.
- Ewing B, Green P (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research* 8:186-194.
- Fry E, Stuart D, Rowlands D (2005). The Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus. Pages 71-101 in B. Mahy, ed. *Foot-and-Mouth Disease Virus: Springer Berlin Heidelberg*.

- Hema M, Chandran D, Nagendrakumar S B, Madhanmohan M, Srinivasan V A (2009). Construction of an infectious cDNA clone of foot-and-mouth disease virus type O1BFS 1860 and its use in the preparation of candidate vaccine. *Journal of Biosciences* 34: 45-58.
- Kim S A, Liang C M, Cheng I C, Cheng Y C, Chiao M T, Tseng C J, Lee F, Jong M H, Tao M H, Yang N S, Liang S M (2006). DNA vaccination against foot-and-mouth disease via electroporation: study of molecular approaches for enhancing VP1 antigenicity. *The Journal of Gene Medicine* 8: 1182-1191.
- Pengyan W, Yan R, Zhiru G, Chuangfu C (2008). Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication in vitro and in vivo by small interfering RNA. *Virology Journal* 5: 86.
- Priyadarshini M L, Balamurugan V, Prabhudas K, Suryanarayana V V S, Reddy G R (2007). Expression of 3AB protein of foot and mouth disease virus in *Pichia pastoris*. *Indian Journal of Biotechnology* 6: 329-335.
- Qian P, Li X M, Jin M L, Peng G Q, Chen H C (2004). An approach to a FMD vaccine based on genetic engineered attenuated pseudorabies virus: one experiment using VP1 gene alone generates an antibody response on FMD and pseudorabies in swine. *Vaccine* 22: 2129-36.
- Reid S M, Ferris N P, Hutchings G H, DeClercq K, Newman B J, Knowles N J, Samuel A R (2001). Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: use of phylogenetic data to evaluate primers for the typing of viral RNA in clinical samples. *Archives of Virology* 146, 2421-2434.
- Rodriguez A, Dopazo J, Saiz J C, Sobrino F (1994). Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: Differences between infected and vaccinated swine. *Archives of Virology* 136: 123-131.
- Song H, Wang Z, Zheng D, Fang W, Li Y, Liu Y, Niu Z, Qiu B (2005). A novel mucosal vaccine against foot-and-mouth disease virus induces protection in mice and swine. *Biotechnology Letters* 27: 1669-74
- Thomson G R, Coetzer J, Thomsen A W, Tustin R C, Kriek N P J (1994). Foot-and-mouth disease. In: *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Oxford University Press, Cape Town: 825-852.
- Tully D C, Fares M A (2009). Shifts in the Selection-Drift Balance Drive the Evolution and Epidemiology of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Virology*. 83: 781-790.
- Yi J Z, Liu M Q, Zhu C Z, Zhang Q, Sheng Z T, Du Q Y, Yan W Y, Zheng Z X (2004). Recombinant bivalent vaccine against foot-and-mouth disease virus serotype O/A infection in guinea pig. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)* 36: 589-96.

Cloning and expression of non-structural 3ABC gene from FMD virus serotype O in *Escherichia coli*

Parizadeh S.A.R.¹, Nassiry M.R.², Zibae S.*³, Tahmoorespur M.², Bassami M.R.¹

¹ Ph.D. Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

² Professor, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

³ Assistant Professor, Department of Veterinary Research and Biothecnology, Razi vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Mashhad, Iran

Abstract

After about one hundred year after its identification, Foot and Mouth Disease (FMD) is the first viral disease in animals that impose a major risk to the world's livestock industry. The main method to identify animals vaccinated from animals infected with FMD is using of non-structural 3ABC protein as antigen in the ELISA kit. Hence, 3ABC gene of FMDV serotype O was isolated with PCR using specific primers containing *BamHI* and *HinDIII* restriction sites. The isolated fragment was then inserted in pTZ57R/T vector for cloning and nucleotide characterization. In order to produce recombinant antigens, 3ABC was inserted in pET21a (+) vector and then transform to *E. coli* BL21 (DE3). Recombinant protein production was induced with 1.5 mM IPTG. Production of recombinant proteins confirmed with SDS electrophoresis and Western blotting. The molecular weight of recombinant protein was determined approximately 50 kDa. The results showed that the produced protein can be used as an antigen in the ELISA kit for animals.

Keywords: 3ABC Gene, FMDV, Foot and Mouth Disease, Recombinant Protein.

* Corresponding Author: Zibae S.

Tel: 05138437180

Email: s.zibae@mrazi.ac.ir

