

## **Assembling of gene sequences encoding epitopic regions of foot and mouth disease virus non-structural proteins using one-step OE-PCR**

**Parvin Moghaddam**

MSc graduate, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: moghaddam.parvin1@gmail.com

**Azadeh Zahmatkesh** 

\*Corresponding author. Assistant professor, Department of Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: a.zahmatkesh@rvsri.ac.ir

**Masoumeh Bagheri** 

Assistant professor, Department of Honeybee, Silk Worm & Wild life Pathology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: m.bagheri@rvsri.ac.ir

**Parvaneh Esmailnejad-Ahranjani** 

Assistant professor, Department of Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: p.esmailnejad@rvsri.ac.ir

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

Foot-and-mouth disease (FMD) is an acute highly contagious viral disease in susceptible cloven-hoofed animals, which causes extensive economic loss in livestock industry. Recently, diagnostic methods have been developed to detect antibodies against non-structural proteins of this virus. Non-structural proteins 3ABC and 3D that provide linear B cells epitopes allow effective detection of virus-infected animals. In this study, immuno-dominant epitopes of 3ABD proteins were considered for the synthesis of a new gene sequence and assembling of 3AB and 3D fragments.

#### **Materials and Methods**

Overlap extension-polymerase chain reaction (OE-PCR) was used to synthesize 3ABD antigenic sequences. Viral RNA was isolate from BHK-infected cells and reverse transcribed. In order to remove 654 nucleotides of the middle 3C genomic sequence, a pair of internal primers with 29

overlapping nucleotides and two external primers were designed. The 3AB and 3D fragments were each amplified in separate PCR reactions and purified from the gel after electrophoresis. These fragments were used as templates in a one-step OE-PCR for the synthesis of 3ABD sequence by external primers and Pfu DNA polymerase.

### Results

The results showed amplification of 3AB (418 bp) and 3D (557 bp) fragments with overlapping sequences at the end of 3' and 5', respectively. The OE-PCR experiment resulted in amplification of multiple fragments, and the 3ABD fragment with the desired length (946 bp) was confirmed after sequencing. Only by considering 29 homologous nucleotides in the design of overlapping primers and a high-fidelity, highly accurate DNA polymerase, two epitopic regions of non-structural proteins of FMD virus (3'-3AB and 5'-3D) were linked together.

### Conclusions

The new gene sequence synthesized by a one-step OE-PCR technique has the antigenic sites of 3ABD non-structural proteins of FMD virus, obviates the need for expensive peptide synthesis, and can be a proper alternative for production of 3ABD recombinant protein for application in detection of FMD by Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

**Keywords:** B-cell epitopes, Overlap extension, Overlapping primers, Site-directed mutagenesis.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Moghaddam P, Zahmatkesh A, Bagheri M, Esmaeilnejad-Ahramjani P (2022) Assembling of gene sequences encoding epitopic regions of foot and mouth disease virus non-structural proteins using one-step OE-PCR. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 85-100.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 85-100.

DOI: 10.22103/jab.2022.16686.1275

Received: February 14, 2022.

Received in revised form: April 18, 2022.

Accepted: April 19, 2022.

Published online: May 5, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

## اتصال توالی‌های ژنی کدکننده‌ی نواحی اپی‌توپی پروتئین‌های غیرساختاری ویروس تب برفکی به روش OE-PCR یک مرحله‌ای

### پروین مقدم

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه آموزشی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه:

moghaddam.parvin1@gmail.com

### آزاده زحمت‌کش

\*نویسنده مسئول: استادیار بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی، موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی،

سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: a.zahmatkesh@rvsri.ac.ir

### معصومه باقری

استادیار بخش تحقیقات بیماری‌های زنبور عسل، کرم ابریشم و حیات وحش، موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی،

سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: m.bagheri@rvsri.ac.ir

### پروانه اسمعیل‌نژاد اهرنجانی

استادیار بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی، موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات،

ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: p.esmaeilnejad@rvsri.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

### چکیده

**هدف:** تب برفکی یک بیماری بسیار ویرانگر در حیوانات زوج سم می‌باشد که خسارات اقتصادی گسترده‌ای در صنعت دامپروری ایجاد می‌کند. اخیراً روش‌های تشخیصی این بیماری برای ردیابی آنتی‌بادی‌های علیه پروتئین‌های غیرساختاری ویروس تب برفکی بسیار توسعه یافته‌اند. پروتئین‌های غیرساختاری 3ABC و 3D که ارائه‌دهنده‌ی اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B هستند، تشخیص مؤثر دام‌های آلوده به ویروس را امکان‌پذیر می‌کنند. در این تحقیق، اپی‌توپ‌های خطی ایمنی‌زای غالب از پروتئین‌های 3ABD برای طراحی ساخت توالی ژنی جدید و اتصال قطعات 3AB و 3D در نظر گرفته شد.

**مواد و روش‌ها:** از تکنیک گسترش نواحی همپوشان به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (OE-PCR) برای سنتز توالی 3ABD آنتی‌ژنی استفاده شد. RNA ویروسی از سلول‌های BHK آلوده به ویروس جداسازی و رونویسی معکوس شد. برای حذف توالی میانی ۶۵۴ نوکلئوتیدی ژن 3C، یک جفت آغازگر داخلی با ۲۹ نوکلئوتید همپوشان و یک جفت آغازگر خارجی طراحی شدند. قطعات 3AB و 3D هر کدام در واکنش‌های جداگانه‌ی PCR تکثیر شدند و پس از الکتروفورز از ژل تخلیص شدند. این قطعات به عنوان الگو در OE-PCR برای سنتز توالی 3ABD به کمک آغازگرهای خارجی و آنزیم Pfu پلیمرز در یک واکنش یک مرحله ای مورد استفاده قرار گرفتند.

**نتایج:** نتایج این مطالعه نشان داد که هر کدام از قطعات 3AB (۴۱۸ جفت باز) و 3D (۵۵۷ جفت باز) با توالی‌های همپوشان به ترتیب در انتهای ۳' و ۵' تکثیر شدند. OE-PCR منجر به تکثیر چندین قطعه شد و قطعه‌ی 3ABD با طول مورد نظر (۹۴۶ جفت باز) پس از توالی‌یابی تایید شد. تنها با در نظر گرفتن ۲۹ جفت باز همولوژی در طراحی آغازگرهای همپوشان و یک آنزیم پلیمرز با دقت بالا، دو ناحیه‌ی اپی‌توپی از پروتئین‌های غیرساختاری ویروس تب برفکی (3AB-3' و 3D-5') به هم متصل شدند.

**نتیجه‌گیری:** توالی ژنی ساخته شده به روش OE-PCR یک مرحله‌ای، علاوه بر این که نواحی آنتی‌ژنی پروتئین‌های غیرساختاری 3ABD ویروس تب برفکی را دارا می‌باشد، مشکلات مربوط به هزینه‌ی بالای سنتز پپتید را ندارد و می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای تولید پروتئین نوترکیب و بررسی امکان استفاده در تشخیص بیماری تب برفکی به روش الایزا باشد.

**کلیدواژه‌ها:** آغازگرهای همپوشان، اپی‌توپ‌های سلول‌های B، جهش‌زایی هدفمند، گسترش نواحی همپوشان.

نوع مقاله: پژوهشی.

**استناد:** مقدم پروین، زحمت‌کش آزاده، باقری معصومه، اسمعیل‌نژاد اهرنجانی پروانه (۱۴۰۱) عنوان مقاله. مجله بیوتکنولوژی

کشاورزی، ۱۴(۲)، ۸۵-۱۰۰.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

## مقدمه

حیوانات بومی به عنوان سرمایه‌ی ملی کشور هستند و حفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است (Badakhshan and Mohammadabadi 2015). این حیوانات نقش کلیدی در بقای انسان، حفاظت محیط زیست و

بهره‌مندی از تطابق‌پذیری این حیوانات با هدف تولید گوشت قرمز و شیر خام و حتی توسعه‌ی تمدن دارند ( Kharrati koopaei and Mohammadabadi 2013). تنوع ژنتیکی در نژادهای گاو به علت فرایند اهلی‌سازی در طول قرن‌ها، جهش، انتخاب، سازگاری با محیط و رانش ژنتیکی می‌باشد (Mohammadabadi and Ghasemi 2011). توده‌های مختلف گاو بومی در ایران سالیان متمادی و با پراکندگی متفاوت در مناطق گوناگون ایران وجود داشته و در تأمین مواد لبنی و دامی و امرار معاش جمعیت‌های روستایی کشور نقش دارند (Ghasemi et al. 2010). این دام‌ها با شرایط اقلیمی و آب و هوایی مناطق مختلف سازگاری پیدا کرده بطوریکه در مقایسه با نژادهای اصیل خارجی موجود در کشور کمتر به بیماری‌های دامی مبتلا شده و استرس‌های محیطی (مدیریتی و تغذیه‌ای و اقلیمی) را به راحتی تحمل می‌نمایند (Barazandeh et al. 2016; Mohammadabadi et al. 2011). بنابراین با توجه به شرایط تولیدی و پتانسیل تغییرات آینده، ضروری است که برای بقای آنها همه جوانب را در نظر گرفت و مورد مطالعه قرار داد (Mohammadabadi et al. 2004). تب برفکی (FMD) بیماری ویروسی بسیار مسری در حیوانات زوج سم می‌باشد که خسارات اقتصادی زیادی را به صنعت دامپروری وارد می‌کند. ویروس عامل آن متعلق به خانواده‌ی پیکورناویریده و جنس آفتوویروس‌ها می‌باشد (Thomson and Bastos 2004). آلودگی به این ویروس تجارت بین‌المللی دام‌ها و محصولات دامی را به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهد. تشخیص دام‌های آلوده در گله‌ها بخش مهمی از استراتژی ریشه‌کرد کردن مؤثر بیماری است (Clavijo et al. 2004). روش‌های جدیدی برای تشخیص زودهنگام فعالیت ویروس و حذف به‌موقع دام‌های آلوده توسعه‌یافته‌اند.

ژنوم RNA ویروس تب برفکی ۱۲ پروتئین کد می‌کند که عبارت‌اند از 1A، 1B، 1C، 1D (پروتئین‌های ساختاری) و 2A، 2B، 2C، 3A، 3B و 3D (پروتئین‌های غیرساختاری) (Clavijo et al. 2004). دام‌های آلوده به ویروس تب برفکی آنتی‌بادی علیه هر دو پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری تولید می‌کنند؛ درحالی‌که، دام‌های واکسینه تنها آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های ساختاری تولید می‌کنند. بنابراین، ردیابی آنتی‌بادی‌های علیه پروتئین‌های غیرساختاری در سرم دام‌ها یک روش تشخیصی مناسب جهت تفکیک دام‌های آلوده به ویروس از دام‌های واکسینه (DIVA) و همچنین تشخیص آلودگی‌های تحت بالینی با سروتیپ‌های نامشخص ویروس خواهد بود (De Diego et al. 1997; Höhlich et al. 2003). روش‌های تشخیصی برای ردیابی آنتی‌بادی‌های علیه پروتئین‌های غیر ساختاری ویروس تب برفکی بسیار توسعه‌یافته‌اند (De Diego et al. 1997). پپتیدهای متعدد مشتق شده از پروتئین‌های 3ABC با قابلیت ارائه‌ی اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B سنتز شده‌اند که قادر به تفکیک مؤثر دام‌های واکسینه و آلوده به ویروس بوده‌اند (Shen et al. 1999). همچنین ردیابی آنتی‌بادی‌های علیه پروتئین 3D ویروس تب برفکی به‌عنوان مشخصه‌ی غیرمستقیم آلودگی در مطالعات سرواپیدمیولوژیک مورد مطالعه قرار گرفته است (Yang et al. 2007). آنتی‌بادی‌های علیه 3D دارای حساسیت تشخیصی بسیار بالا در دام‌های غیرواکسینه به‌دلیل ماندگاری طولانی‌تر در سرم می‌باشند. نشان داده‌شده است که اپی‌توپ‌های خطی ایمنی‌زای غالب در پروتئین 3D در گاو در آمینواسیدهای ۱۶ تا ۳۰ ناحیه N-ترمینال پروتئین 3D قرار دارند (Yang et al. 2007). همچنین اپی‌توپ‌های زیادی در ناحیه‌ی C-ترمینال پروتئین 3A و

سرتاسر 3B وجود دارند که می‌توانند در تشخیص مؤثر مورد استفاده قرار گیرند (Shen et al. 1999; Höhlich et al. 2003). جهش‌زایی هدفمند به‌طور گسترده برای ایجاد تغییرات موردنظر در توالی‌های ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. روش‌های جهش‌زایی به کمک PCR به دلیل سرعت و کارایی بالا بسیار سودمند هستند (Lu et al. 2009). جهش‌زایی به کمک روش گسترش نواحی همپوشان (OE) به‌عنوان روشی برای جهش‌زایی هدفمند برای ایجاد جهش‌های جانشینی، حذف و اضافه در توالی‌های ژنی (Horton et al. 1990) و یا ایجاد ژن‌های کایمریک با اتصال دو یا چند قطعه‌ی DNA بدون نیاز به آنزیم‌های برشی (Kuwayama et al. 2009) معرفی شده است. روش OE-PCR به دلیل سادگی و کارایی مناسب در جهش‌زایی در مکان‌های متعدد شناخته شده است. این روش شامل دو واکنش PCR اولیه می‌باشد که به ساخت قطعات DNA با پایانه‌های همپوشان منتهی می‌شود و یک واکنش ثانویه که در آن دو قطعه‌ی ساخته شده به هم متصل می‌شوند (Duan et al. 2013). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که گسترش نواحی همپوشان چندگانه (MOE-PCR) قادر به اتصال ۸ قطعه با اندازه‌های متفاوت با ۵۰ جفت باز توالی همپوشان در آغازگرها می‌باشد (Kadkhodaei et al. 2016).

پروتئین‌های غیرساختاری ویروس تب برفکی به صورت in-house و یا در کیت‌های تشخیصی تجاری الیزا برای تشخیص بیماری تب برفکی و یا تفکیک دام‌های آلوده و واکسینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از روش‌هایی که برای به کارگیری نواحی آنتی‌ژنی پروتئین‌های غیرساختاری در آزمایشات الیزای تشخیص بیماری تب برفکی استفاده می‌شود، سنتز پپتیدهای آنتی‌ژنی موردنظر است (Fu et al. 2014; Inoue et al. 2006). سنتز پپتید روشی مناسب ولی با هزینه‌ی بالا است، بنابراین به نظر می‌رسد جایگزینی روشی با هزینه مناسب‌تر جهت اهداف بلندمدت تشخیصی راه‌کار مناسبی باشد. هدف از مطالعه‌ی حاضر استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند به کمک OE-PCR جهت ساخت توالی ژنی 3ABD آنتی‌ژنی از پروتئین‌های غیرساختاری ویروس تب برفکی (با حذف توالی 3C از توالی 3ABCD) است که کدکننده‌ی ناحیه‌ی C- ترمینال پروتئین 3A، کل پروتئین 3B و ناحیه‌ی N- ترمینال پروتئین 3D به‌عنوان اپی‌توپ‌های شناخته شده‌ی لنتو سیت‌های B در گاو می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

**جداسازی ویروس:** ویروس تب برفکی سویه‌ی OpanAsia از وزیکول‌های گاوی که علائم بیماری تب برفکی را نشان داده بود، جداسازی شد و بر روی تک لایه‌ی رده‌ی سلولی BHK (کلیه نوزاد همستر) تلقیح شد و پس از ۳۰ دقیقه مجاورت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، محیط کشت Eagle's maintenance medium دارای ۱۰٪ آلبومین جنین گاوی افزوده شد و کشت به مدت ۳۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. سلول‌هایی که در پاساژ اول علائم تخریب سلولی را نشان دادند جمع‌آوری شدند. سروتیپ آنتی ژن ویروس تب برفکی با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال ضد هفت سروتیپ به روش

الایزا تعیین شد (Motamedi et al. 2011). نمونه‌های کشت سلول آلوده به ویروس با سروتیپ O جهت انجام ادامه آزمایشات در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و به دمای ۷۰- درجه‌ی سانتیگراد منتقل شدند.

**تهیه cdNA ویروسی:** RNA ویروسی از سلول‌های BHK آلوده به ویروس به کمک مینی کیت استخراج RNA از سلول (فیورژن بیوتک، تایوان) بر اساس دستور شرکت سازنده استخراج شد. واکنش رونویسی معکوس نیز به کمک کیت سنتز cdNA (فیورژن بیوتک، تایوان) صورت گرفت.

**طراحی آغازگر:** آغازگرها به کمک نرم‌افزار اولیگو-۷ بر اساس توالی‌های در دسترس سروتیپ O ویروس تب برفکی سویه PanAsia (با کد دسترسی AH012985.2) طراحی شدند. برای جهش‌زایی هدفمند (حذف ۶۵۴ نوکلئوتید از توالی 3C که بین ژن‌های 3B و 3D در ژنوم ویروس قرار دارد)، یک جفت آغازگر داخلی با ۲۹ جفت باز همپوشانی طراحی شد: یک آغازگر داخلی (رفت) برای تکثیر توالی 3D به همراه بخشی از ناحیه‌ی ۳' از توالی 3AB به‌عنوان انتهای آویزان، و یک آغازگر داخلی دیگر (برگشت) برای تکثیر توالی 3AB به‌همراه بخشی از ناحیه‌ی ۵' از توالی 3D به‌عنوان انتهای آویزان. همچنین دو آغازگر خارجی رفت و برگشت دارای جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی برای اهداف کلونینگ در آینده طراحی شدند. همه‌ی آغازگرها از نظر دمای ذوب، GC، تشکیل دایمر و ساختارهای سنجاق‌سری توسط نرم‌افزار اولیگو-۷ بررسی شدند. توالی آغازگرها و اطلاعات مربوط به آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. توالی آغازگرها با کد دسترسی AH012985.2 و اطلاعات مربوط به آن‌ها

Table 1. Primer sequences and their related information

اندازه محصول* (جفت باز) Product length (bp)	دمای ذوب (سانتی‌گراد) Tm (C)	طول (جفت باز) Length (bp)	توالی (5'-3') Sequence	آغازگرها Primers
418	63.8	37	GTCAACTATCAATCCGTTCTTTGCTTT CACTTTCAA	داخلی همپوشان-۱ (Internal overlap-1)
946	418	26	AGCAGAATTCATGGTGAACGAGTACA	خارجی رفت (External forward)
946	557	24	TATAAGCTTAGTCTTGCCGGCACG	خارجی برگشت (External reverse)
557	64.2	32	TGAAAGCAAAGAACGGATTGATAGTT GACA CC	داخلی همپوشان-۲ (Internal overlap-2)

\* منظور اندازه‌ی محصولات واکنش با آغازگرهای داخلی همپوشان-۱ و خارجی رفت، داخلی همپوشان-۲ و خارجی برگشت، و در نهایت خارجی رفت و خارجی برگشت می‌باشد.

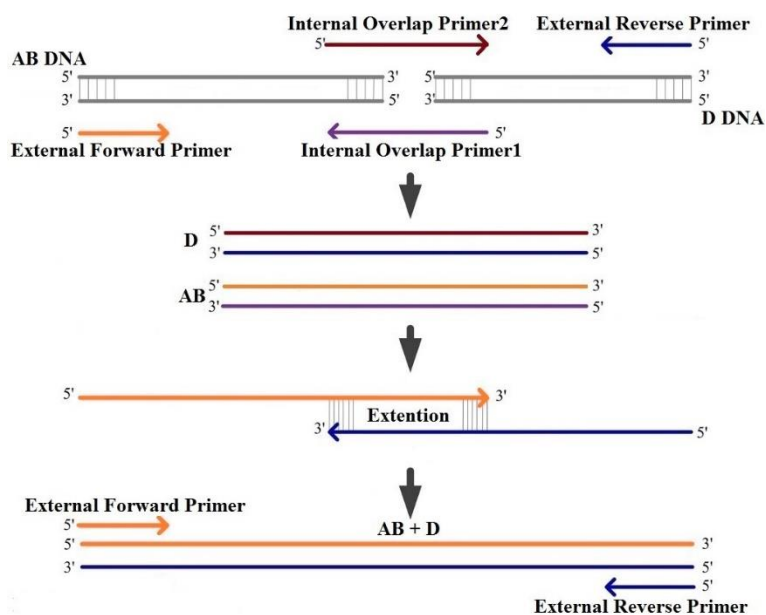
\*Product length refers to the products of Internal overlap-1 and External forward primers, Internal overlap-2 and External reverse primers, and External forward and External reverse primers.

**آزمایش OE-PCR:** ابتدا واکنش PCR برای تکثیر هر یک از قطعات 3AB به طول ۴۱۸ جفت باز و 3D به طول ۵۵۷ جفت باز در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۷ میکرولیتر  $MgCl_2$  (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول در میکرولیتر) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Pfu* (پنج واحد در میکرولیتر). آغازگرهای خارجی رفت و داخلی برگشت برای تکثیر توالی 3AB، و آغازگرهای خارجی برگشت و داخلی رفت برای تکثیر قطعه‌ی 3D مورد استفاده قرار گرفتند. شرایط واکنش با توجه به دمای ذوب آغازگرها و طول قطعات مورد نظر به صورت زیر در نظر گرفته شد: پنج دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای  $94^{\circ}C$ ، ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی در دمای  $94^{\circ}C$  به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای  $59^{\circ}C$  به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر در دمای  $72^{\circ}C$  به مدت یک دقیقه، و در نهایت پنج دقیقه تکثیر نهایی در دمای  $72^{\circ}C$ . پس از این که قطعات 3AB و 3D تکثیر شدند، محصولات واکنش پس از الکتروفورز در ژل آغاز یک در صد رنگ‌آمیزی و مشاهده شدند. پس از تایید صحت تکثیر، محصولات واکنش از ژل تخلیص شدند تا در واکنش OE-PCR جهت اتصال قطعات 3AB و 3D برای ساخت توالی 3ABD مورد استفاده قرار گیرند. نحوه‌ی انجام واکنش در شکل ۱ نشان داده شده است.

واکنش OE-PCR در حجم ۵۰ میکرولیتری شامل ۲۰ نانوگرم از هر محصول PCR (AB و D)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر  $MgCl_2$  (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از هر آغازگر خارجی رفت و برگشت (۱۰ پیکومول در میکرولیتر) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Pfu* (پنج واحد در میکرولیتر) بود. شرایط واکنش با توجه به دمای ذوب آغازگرها و طول قطعه‌ی مورد نظر به صورت زیر در نظر گرفته شد: پنج دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای  $94^{\circ}C$ ، ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی در دمای  $94^{\circ}C$  به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای  $59^{\circ}C$  به مدت ۹۰ ثانیه و تکثیر در دمای  $72^{\circ}C$  به مدت ۱۱۰ ثانیه، و در نهایت ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در دمای  $72^{\circ}C$ . محصولات OE-PCR پس از الکتروفورز در ژل آغاز یک درصد به کمک safe stain رنگ‌آمیزی و مشاهده شدند.

**توالی یابی:** در حال حاضر در روش‌های توالی‌یابی، توالی‌یابی سنجر دارای دقت بالایی است و در تشخیص‌های پزشکی هم کاربرد دارد. برای تایید صحت ژن‌ها و همچنین بررسی جهش‌های احتمالی و تغییرهای اعمال شده، توالی‌یابی برای هر دو ژن انجام شد. به دلیل اینکه تعداد خوانش نوکلئوتیدها در هر خوانش محدود است و تمام توالی ژن را پوشش نمی‌دهد، توالی‌یابی از دو سو برای ابتدا و انتهای ژن‌ها انجام شد.





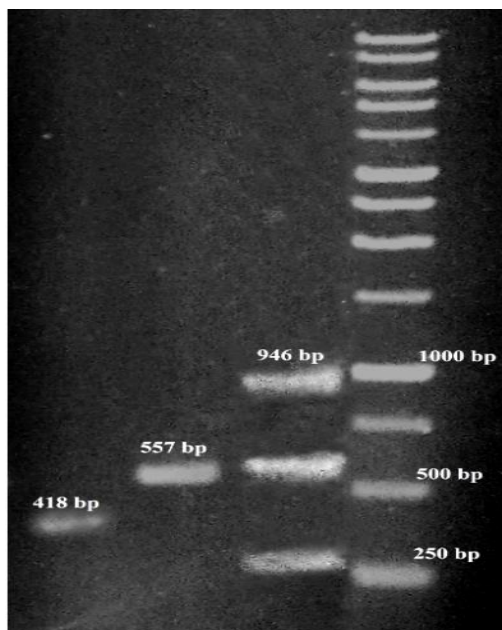
شکل ۱. نحوه‌ی انجام OE-PCR به صورت شماتیک. قطعات 3AB و 3D برای ساخت قطعه‌ی 3ABD به کمک آغازگرهای همپوشان به هم متصل شدند

Figure 1. A schematic drawing of OE-PCR. 3AB and 3D fragments were assembled to produce 3ABD fragment using overlapping primers

## نتایج و بحث

الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد نشان داد که قطعات 3AB به طول ۴۱۸ جفت باز، و 3D به طول ۵۵۷ جفت باز به ترتیب با توالی‌های همپوشان در پایانه‌های ۳' و ۵' تکثیر شدند (شکل ۲). محصولات واکنش از ژل تخلیص شدند تا دایمرهای آغازگرها حذف شوند و از تکثیر غیراختصاصی در مرحله‌ی بعد جلوگیری شود. OE-PCR منجر به تکثیر چند قطعه شد (شکل ۲). باند دارای طول موردنظر (۹۴۶ جفت باز) از ژل جدا و تخلیص شد. توالی‌یابی انجام شد و ساخت قطعه‌ی 3ABD به کمک جهش‌زایی هدفمند به روش گسترش نواحی همپوشان تایید شد. چون اغلب کیت‌های تشخیصی الایزا بر اساس پروتئین 3ABC هستند در حالی که مشخص شده، اپی‌توپ‌های لئفوسیت B گاوی، در ناحیه‌ی C ترمینال 3A و سراسر پروتئین 3B وجود دارند، هیچ اپی‌توپ لئفوسیت B در ناحیه‌ی پروتئین 3C یافت نشده است (Höhlich et al. 2003). پروتئین 3C خاصیت پروتئازی دارد که به نظر می‌رسد بر روی پروتئین نو ترکیب 3ABC ساخته شده در *E. coli* اثر گذاشته و منجر به شکسته شدن پروتئین 3ABC شود (Sariya et al. 2011). در نتیجه قطعه‌ی C به کمک جهش‌زایی هدفمند حذف شد. اخیراً در مطالعه‌ی ای توالی‌های C ترمینال پروتئین 3A و کل پروتئین 3B به صورت یکپارچه (3AB) و ناحیه N-ترمینال

پروتئین 3D به صورت جداگانه در میزبان *E.coli* بیان شدند و هر کدام از دو پروتئین نوترکیب تولید شده جداگانه در آزمایشات الایزا برای تشخیص بیماری تب برفکی در گاو مورد بررسی قرار گرفتند و قابلیت بالای این نواحی اپی توپی خصوصاً پروتئین 3AB در تشخیص سرم دام‌های بیمار مورد تایید قرار گرفت (Moghaddam et al, 2021).



شکل ۲. الکتروفورز در ژل آگارز/TAE یک درصد. از راست به چپ: نشانگر اندازه یک کیلوباز، محصول OE-PCR، قطعه‌ی 3D و قطعه‌ی 3AB

**Figure 2. Electrophoresis in 1% agarose/TAE. Right to left: 1 Kb DNA ladder, OE-PCR product, 3D fragment and 3AB fragment**

اتصال قطعات DNA به کمک برش آنزیم‌های محدودکننده و اتصال مجدد آن‌ها یک دستیافت بزرگ در علم زیست‌شناسی قرن بیستم بود (Danna and Nathans, 1971; Smith and Welcox, 1970). اتصال سریع چندین قطعه‌ی DNA اغلب در بسیاری از مطالعات DNA نوترکیب مورد نیاز است. روش‌های کلونینگ رایج و آداپتورها ممکن است در برخی شرایط به‌خوبی عمل نکنند. روش کلاسیک OE-PCR عمدتاً دارای دو مرحله و دو ترکیب مجزای واکنش است: در مرحله‌ی گسترش نواحی همپوشان احتیاجی به آغازگرهای خارجی نیست و دمای اتصال نسبتاً پایین‌تر از مرحله‌ی بعد است. در مرحله‌ی تکثیر DNA فیوز شده، ترکیب واکنش جدیدی به‌همراه آغازگرهای خارجی و برنامه‌ای جدید در نظر گرفته می‌شود. در واقع محصولات حاصل از مرحله‌ی قبل به‌عنوان الگو برای مرحله‌ی بعد استفاده می‌شوند (Li et al. 2013). درحالی‌که در مطالعه‌ی حاضر این دو مرحله با هم ادغام شده‌اند، به این معنی که آغازگرهای خارجی از ابتدای واکنش OE-PCR به واکنش افزوده شده و یک دمای اتصال برای کل واکنش در نظر گرفته شد. این امر نقش مؤثری در کاهش زمان واکنش خواهد داشت (Zhang et al. 2013).

یکی از روش‌های اتصال قطعات مختلف به کمک نوترکیبی هومولوگ، SLIC می‌باشد که در مطالعه‌ای با روش گسترش نواحی همپوشان مورد مقایسه قرار گرفت و نشان داده شد با اینکه نتایج هر دو آزمایش برای اتصال قطعات مختلف با موفقیت همراه بود، ولی روش گسترش نواحی همپوشان که مبتنی بر PCR است، نیازمند واکنش‌های آنزیمی و مراحل تخلیص کم‌تری است که از نظر زمان و هزینه مقرون به صرفه‌تر خواهد بود (Kadkhodaei et al. 2016). در تحقیق حاضر، به کمک یک روش PCR معمولی، یک توالی ۶۵۴ نوکلئوتیدی (ژن C) از توالی کدکننده‌ی پلی‌پروتئین 3ABCD حذف شد و دو قطعه‌ی 3AB و 3D به هم متصل شدند و توالی 3ABD ساخته شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که حذف نوکلئوتیدهای مورد نظر به درستی انجام شد. گسترش نواحی همپوشان به همراه تکثیر کامل قطعات DNA اتصال یافته به‌طور هم‌زمان در یک واکنش PCR و یک دمای اتصال، بسیار سریع‌تر و ساده‌تر از دو واکنش مجزا (Li et al. 2013) یا دو دمای اتصال متفاوت (Luo et al. 2013) خواهد بود. اخیراً یک آزمایش MOE-PCR نشان داد که با ۵۰ نوکلئوتید همولوژی در نواحی همپوشان در DNA و یک برنامه‌ی اختصاصی Touchdown-PCR می‌توان تا هشت قطعه‌ی DNA را با موفقیت به هم متصل کرد (Kadkhodaei et al. 2016). در مطالعه‌ی حاضر، تنها با ۲۹ نوکلئوتید همولوژی در طراحی آغازگرهای داخلی، دو توالی کدکننده‌ی نواحی اپی‌توبی از پروتئین‌های غیرساختاری ویروس تب برفکی به هم متصل شدند. این توالی می‌تواند برای تولید پروتئین آنتی‌ژنی نوترکیب 3ABD و راه‌اندازی روش‌های تشخیصی بیماری تب برفکی در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

قرار گرفتن قطعات DNA در معرض اتیدیوم بروماید و پرتو فرابنفش به‌مدت طولانی به ساختار مولکول آسیب می‌رساند (Shevchuk et al. 2004). به همین منظور هنگام تخلیص محصولات PCR اولیه (الگوهای OE-PCR) از ژل، به جای اتیدیوم بروماید از safe stain برای رنگ‌آمیزی استفاده شد. همچنین برش ژل حاوی DNA در کم‌تر از یک دقیقه و تحت تابش طول موج بلندتر پرتوی فرابنفش (۳۱۲ به‌جای ۲۵۴ نانومتر) انجام شد. عوامل متعددی همچون آغازگرها، دمای اتصال، کیفیت الگو، شرایط یونی و آنزیم DNA پلیمرز بر کیفیت و کمیت محصولات PCR مؤثر است. برای اتصال موفقیت‌آمیز قطعات DNA به هم این شرایط اهمیت ویژه‌ای پیدا می‌کنند (Luo et al. 2013). در این مطالعه آغازگرهای داخلی طراحی شده دارای دمای ذوب ( $T_m$ ) بالایی نبودند و در دامنه‌ی دمای ذوب آغازگرهای خارجی قرار گرفتند و این نکته در تنظیم شرایط واکنش OE اهمیت زیادی دارد. هنگامی که قطعات 3AB و 3D دارای توالی‌های همپوشان در واکنش‌های مجزای PCR اولیه ساخته شدند، این توالی‌ها در OE-PCR علاوه بر این که به‌عنوان الگو عمل می‌کنند، نقش آغازگر برای ساخت رشته‌ی دیگر را نیز ایفا می‌کنند. استفاده از آنزیم *Pfu* پلیمرز نیز به‌عنوان آنزیمی با قابلیت ویرایش و قدرت بالا (high fidelity) نقش مؤثری در انجام دقیق این واکنش داشته است (André et al. 1997).

برآورد اندازه‌ی صحیح محصولات OE-PCR، حتی اگر چندین قطعه ساخته شده باشند، نیاز به بهینه‌سازی واکنش را مرتفع می‌کند. در این مواقع می‌توان قطعه‌ی مورد نظر را از ژل جدا و تخلیص کرد که نسبت به بهینه‌سازی واکنش تا رسیدن به تک باند

بسیار ساده تر خواهد بود. در این تحقیق، دو قطعه‌ی جداگانه‌ی 3AB و 3D به کمک آغازگرهای همپوشان و آنزیم *Pfu* به‌عنوان یک آنزیم پلیمرز با دقت بالا با موفقیت به هم متصل شدند (شکل ۲). روش OE-PCR روشی سریع، مطمئن و قدرتمند در اتصال و سرهم کردن توالی‌های متعدد ژن‌های کدکننده‌ی نواحی اپی‌توبی پروتئین‌های آنتی‌ژنی می‌باشد. این تکنیک خصوصاً در تکنولوژی تولید پروتئین‌های نو ترکیب و استفاده در کیت‌های تشخیصی بسیار پرکاربرد خواهد بود.

در تحقیق حاضر تنها نواحی اپی‌توبی پروتئین‌های غیر ساختاری 3ABD در نظر گرفته شد و از تکثیر کل توالی کدکننده‌ی آن ها خودداری شد. زیرا تعدد اپی‌توب‌های موجود در یک پروتئین بزرگ می‌تواند باعث واکنش غیراختصاصی با آنتی‌بادی‌ها و یا سایر اعضای خانواده‌ی پیکورناویروس شود (Neizert et al. 1991). پروتئین‌های 3A و 3B بخشی از پلی‌پروتئین غیرساختاری ویروس تب برفکی هستند که در همه سروتیپ‌های FMDV بسیار حفاظت شده‌اند (Gao et al. 2012; Grubman et al. 2003; Höhlich et al. 1987) و قابلیت ایمنی‌زایی بالایی پس از آلودگی به ویروس تب برفکی ایجاد می‌کنند (Clavijo et al. 1997, De Diego et al. 2004). توالی 3D نیز به این علت انتخاب شد که طبق گزارشات، پروتئین 3D بسیار حفاظت شده است و مستقل از نوع سویه‌ی ویروس، توسط سرم دام‌های آلوده به هر هفت سروتیپ ویروس تب برفکی شناسایی می‌شود و آنتی‌بادی علیه آن پس از آلودگی در سرم دام آلوده در فاصله‌ی زمانی کوتاه‌تری نسبت به سایر پروتئین‌های غیرساختاری ایجاد می‌شود و ماندگاری طولانی‌تری نیز دارد (Bergmann et al. 1993; Mahajan et al. 2015; O'Donnell et al. 1996). با استفاده از این توالی سنتز شده‌ی جدید در تکنولوژی پروتئین نو ترکیب و در نهایت آزمایشات الایزا، ضمن اینکه از توالی آنتی‌ژنی موردنظر بدون توالی‌های اضافی استفاده می‌شود، از هزینه‌های مربوط به سنتز پپتید جلوگیری می‌گردد و می‌تواند در تشخیص بیماری تب برفکی مورد استفاده قرار گیرد.

**نتیجه‌گیری:** در مطالعه‌ی حاضر نواحی اپی‌توبی پروتئین‌های غیر ساختاری 3AB و 3D به کمک طراحی آغازگرهای اختصاصی همپوشان در واکنش PCR تکثیر شدند. مطالعات نشان داده که این توالی‌های اپی‌توبی هرکدام بصورت جداگانه قابلیت تشخیص سرم دام‌های آلوده به ویروس تب برفکی را در آزمایشات الایزا دارا می‌باشند (Moghaddam et al, 2021). توالی 3AB به دلیل قدرت بالاتر در تشخیص ویروس و توالی 3D به دلیل ماندگاری طولانی مدت در سرم دام آلوده برای آزمایش OE-PCR انتخاب شدند. توالی ژنی ساخته شده به روش OE-PCR، علاوه بر این که نواحی آنتی‌ژنی پروتئین‌های غیر ساختاری 3ABD ویروس تب برفکی را دارا می‌باشد، مشکلات مربوط به هزینه‌ی بالای سنتز پپتید را ندارد و می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای تولید پروتئین نو ترکیب و بررسی امکان استفاده در تشخیص بیماری تب برفکی به روش الایزا باشد.

**سپاسگزاری:** این تحقیق در راستای پروژه‌ی مصوب موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج با کد مصوب ۹۵۰۰۲۴-۰۰۱-۱۸-۱۸-۲ انجام شده است، لذا از تمامی همکاران این پروژه سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از آقای دکتر همایون

مهرروانی بهبهانی، عضو هیات علمی بخش تولید واکسن تب برفکی، موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج به خاطر تهیه نمونه‌های کشت سلول آلوده به ویروس تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

- خراتی کوپایی حامد، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۲) استفاده از روش رگرسیون متغیرهای ظاهری برای پیش‌بینی مقدار تولید شیر و چربی در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۵(۲)، ۱۷-۲۸.
- محمدآبادی محمدرضا، قاسمی مریم (۱۳۹۰) ارزیابی تنوع ژنتیکی گاوهای هلشتاین و بومی استان کرمان با نشانگرهای ISSR. ژنتیک نوین ۶(۱)، ۴۵-۵۱.
- معمدی سده فرحناز، سلیمان جاهی حوریه، جلیلیان امیررضا، مهرروانی همایون (۱۳۹۰) ساخت ناقل بیانی حاوی ژن VP1 ویروس تب برفکی سویه O (FMDV type O/IRN/1/2007)، تایید پروتئین تولید شده در سلول‌های کلیه بچه هامستر (BHKT7) و ارزیابی پاسخ ایمنی در مدل موشی. مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی ۱۴(۳)، ۶۹-۷۹.

## References

- Andre P, Kim A, Khrapko K (1997) Fidelity and mutational spectrum of Pfu DNA polymerase on human mitochondrial DNA sequence. *Genome Res* 7(8),843-852.
- Badakhshan Y, Mohammadabadi MR (2015) Thermoregulatory Mechanisms of Jersey Adult Cattle and Calves Based on Different Body Sites Temperature. *Iran J Appl Anim Sci* 5 (4), 793-798.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. *Iran J Appl Anim Sci* 6 (3), 571-579.
- Bergmann IE, Neitzert E, Beck E, Gomes I (1993) Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am J Vet Res* 54, 825-831.
- Clavijo A, Wright P, Kitching, P (2004) Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet J* 167, 9-22.
- Danna K, Nathans D (1971) Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *PNAS* 68, 2913-2917.
- De Diego M, Brocchi E, Mackay D, De Simone F (1997) The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch Virol* 142, 2021-2033.

- Duan X, Chen J, Wu J (2013) Improving the thermostability and catalytic efficiency of *Bacillus deramificans* pullulanase by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* 79, 4072-4077.
- Gao MC, Zhang RX, Li M, et al. (2012) An ELISA based on the repeated foot-and-mouth disease virus 3B epitope peptide can distinguish infected and vaccinated cattle. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 1271-1279.
- Fu Y, Lu Z, Li P, et al. (2014) Development of a blocking ELISA based on a monoclonal antibody against a predominant epitope in non-structural protein 3B2 of foot-and-mouth disease virus for differentiating infected from vaccinated animals. *PLoS One* 9, e111737.
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Abadi MRM (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Aust J Basic Appl Sci* 4 (12), 5758-5760.
- Grubman MJ, Zellner M, Wagner J (1987) Antigenic comparison of the polypeptides of foot-and-mouth disease virus serotypes and other picornaviruses. *Virology* 158, 133-140.
- Höhlich BJ, Wiesmüller KH, Schlapp T, et al. (2003) Identification of foot-and-mouth disease virus-specific linear B-cell epitopes to differentiate between infected and vaccinated cattle. *J Virol* 77, 8633-8639.
- Horton RM, Cai ZL, Ho SN, Pease LR (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8(5), 528-535.
- Inoue T, Parida S, Paton DJ, et al. (2006) Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of foot-and-mouth disease virus nonstructural protein antibody using a chemically synthesized 2B peptide as antigen. *J Vet Diagn Invest* 18, 545-552.
- Kadkhodaei S, Memari HR, Abbasiliasi S, et al. (2016) Multiple overlap extension PCR (MOE-PCR): an effective technical shortcut to high throughput synthetic biology. *RSC Adv* 6, 66682-66694.
- Kharrati koopaei H, Mohammadabadi MR (2013) Model for prediction of fat and milk production traits using of DGAT1 gene polymorphism in Iranian Holstein cattle population. *Agric Biotechnol J* 5 (2), 17-28 (In Persian).
- Kuwayama H, Obara S, Morio T, et al. (2002) PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res* 30, e2-e2.
- Li G, Dong BX, Liu YH, Li CJ, Zhang LP (2013) Gene synthesis method based on overlap extension PCR and DNAWorks program. *Methods Mol Biol* 1073, 9-17.

- Lu H, Yu H, Guo R, Jia Y (2009). Improvement of megaprimer method for site-directed mutagenesis and its application to phytase. *Front Agric China* 3, 43-46.
- Luo WG, Liu HZ, Lin WH, et al. (2013) Simultaneous splicing of multiple DNA fragments in one PCR reaction. *Biol Proced Online* 15, e9.
- Mahajan S, Mohapatra JK, Pandey LK, et al. (2015) Indirect ELISA using recombinant nonstructural protein 3D to detect foot and mouth disease virus infection associated antibodies. *Biologicals* 43(1), 47-54.
- Moghaddam P, Zahmatkesh A, Bagheri M, Mahravani H (2021) Are Epitopic Sites of 3AB and 3D Nonstructural Proteins Sufficient for Detection of Foot and Mouth Disease? *Viral Immunol* 34(2), 79-85.
- Mohammadabadi MR, Ghasemi M (2011) Assessment of genetic diversity of Holstein and native cattle in Kerman province using Inter Simple Sequence Repeats. *Modern Genet J* 6 (1), 45-51 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Shaikhaev GO, Sulimova GE et al. (2004) Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in Yaroslavl, Mongolian and black pied cattle by PCR. *Cell Mol Biol Lett* 9 (4A), 766-768.
- Mohammadabadi MR, Soflaei M, Mostafavi H, Honarmand M (2011) Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. *Genet Mol Res* 10 (4), 2658-2663.
- Motamedi Sedeh F, Soleimanjahi H, Jalilian AR, Mahravani H (2011) Construction of PCDNA3.1+ vector containing FMDV type O/IRN/1/2007-VP1 gene, confirmation of protein expression in BHKT7 cells and evaluation of immune response in mice model. *Pathobiol Res (Modares J Med Sci)* 14(3), 69-79.
- Neitzert E, Beck EWALD, de Mello PA, Gomes I, Bergmann IE (1991) Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. *Virology* 184, 799-804.
- O'Donnell VK, Boyle DB, Sproat K, et al. (1996) Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. *J Vet Diagn Invest* 8, 143-150.
- Shen F, Chen PD, Walfield AM, et al. (1999) Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by a peptide ELISA. *Vaccine* 17, 3039-3049.
- Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, et al. (2004) Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res* 32, e19.

- Smith HO, Welcox KW (1970) A restriction enzyme from Hemophilus influenzae: I. Purification and general properties. J Mol Biol. 51, 379-391.
- Thomson GR, Bastos ADS (2004) Foot-and-mouth disease. In: Infectious Diseases of Livestock (2nd edn) Coetzer JAW, Tustin RC (eds). Oxford University Press, UK. pp. 1324-1365.
- Yang M, Clavijo A, Li M, et al. (2007) Identification of a major antibody binding epitope in the non-structural protein 3D of foot-and-mouth disease virus in cattle and the development of a monoclonal antibody with diagnostic applications. J Immunol Methods 321, 174-181.
- Zhang P, Ding Y, Liao W, et al. (2013). A simple, universal, efficient PCR-based gene synthesis method: sequential OE-PCR gene synthesis. Gene 524(2), 347-354.