Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Induction of specific immune responses in inoculated mice by a eukaryotic plasmid expressing the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus

Reza Pasandideh

*Corresponding author. Iranian Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran. E-mail address: Rezapasandideh63@gmail.com

Masoud Reza Seyfi Abad Shapouri

Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail address: masoudrs@scu.ac.ir

Mohammad Taghi Beygi Nassiri

Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal & Food Science, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Ahvaz, Iran. E-mail address: Mt_nassiri@yahoo.com

Abstract

Objective

Bovine ephemeral fever (BEF) is an arthropod-borne viral disease of cattle and water buffalos which causes considerable economic and commercial losses in the cattle industry. The G glycoprotein of bovine ephemeral fever virus (BEFV) has been identified as a plausible candidate to product recombinant vaccines against this disease. The aim of this study was to investigate the immunogenicity of a eukaryotic plasmid expressing the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus G glycoprotein as a possible DNA vaccine in mice.

Materials and methods

At first, a eukaryotic plasmid expressing the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus G glycoprotein was constructed and designated as pEGFPN1-G1. After transfection of the pEGFPN1-G1 recombinant construct to human embryonic kidney 293 (HEK 293) cells, the expression of G1 protein was confirmed by indirect immunofluorescent staining (IFA). Immunization experiments were intramuscularly carried out by inoculating 6-8-week-old female mice in four groups with five repeats, including the pEGFPN1-G1 recombinant construct, bovine ephemeral fever-inactivated vaccine, pEGFP-N1 plasmid alone, and phosphate-buffered saline

(PBS) (1X) three times with 2-week intervals. Fourteen days after the last immunization, the animals were bled and the resulting sera were tested for anti-G1-specific antibodies by immunoblotting analysis, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and virus neutralisation (VN) test. The optical density values of all the serum samples obtained from the ELISA assay were statistically analyzed in the form of a completely randomized design with four treatments and five replications using SAS software.

Results

Immunoblotting analysis and statistical analysis of serum samples obtained from the ELISA assay showed that the pEGFPN1-G1 recombinant construct was able to elicit specific antibodies against G1 antigen of bovine ephemeral fever virus in mice. However, the serum of mice inoculated with this plasmid could not neutralize the replicating bovine ephemeral fever virus in virus neutralization assay.

Conclusions

Since the pEGFPN1-G1 recombinant construct had the ability to produce specific antibodies against the G1 antigen of bovine ephemeral fever virus, the results of this study can be a step towards the development of new vaccines for bovine ephemeral fever in the future.

Keywords: Bovine ephemeral fever, DNA vaccine, Immunogenicity, pEGFPN1-G1 recombinant construct.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Pasandideh R, Seyfi Abad Shapouri MR, Beygi Nassiri MT (2023) Induction of specific immune responses in inoculated mice by a eukaryotic plasmid expressing the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (2), 45-62.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (2), 45-62. DOI: 10.22103/jab.2023.19991.1419

Received: February 20, 2023. Received in revised form: April 08, 2023.

Accepted: April 09, 2023. Published online: June 10, 2023.

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

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

القای پاسخ‌های ایمنی اختصاصی در موش‌های تلقیح شده با پلاسمید یوکاریوتی بیان کننده اپیتوپ G1 از ویروس تب بی دوام گاوی

رضا پسندیده

*نویسنده مسئول: پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، بوشهر، ایران. رایانامه: Rezapasandideh63@gmail.com

مسعودرضا صیفی آباد شاپوری

استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه: masoudrs@scu.ac.ir

محمدتقی بیگی نصیری

استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران. رایانامه: Mt_nassiri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۰

چکیده

هدف: تب بی دوام گاوی (BEF) یک بیماری ویروسی قابل انتقال توسط بندپایان در گاو و گاومیش آبی است که موجب بروز خسارات اقتصادی و تجاری قابل توجهی بر صنعت دامپروری می‌گردد. گلیکوپروتئین G از ویروس تب بی‌دوام گاوی (BEFV) به عنوان یک کاندیدای احتمالی جهت تولید واکسن‌های نوترکیب در برابر این بیماری شناخته شده است. هدف از این مطالعه، بررسی ایمنی‌زایی یک پلاسمید یوکاریوتی بیان کننده اپیتوپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی به عنوان یک واکسن DNA احتمالی در موش بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا پلاسمید یوکاریوتی بیان کننده اپیتوپ G1 تحت عنوان pEGFPN1-G1 ساخته شد. پس از انتقال سازه نوترکیب pEGFPN1-G1 به سلول‌های جنینی کلیه انسان (HEK 293)، بیان پروتئین G1 با استفاده از روش ایمونوفلورسنس غیر مستقیم (IFA) تایید شد. سپس به منظور انجام آزمایش‌های ایمنی‌زایی، موش‌های ماده با سن شش تا هشت هفته در چهار گروه پنج تایی، سه مرتبه و به صورت داخل عضلانی با سازه نوترکیب pEGFPN1-G1، واکسن تجاری تب بی دوام گاوی، پلاسمید pEGFP-N1 و بافر PBS 1X با فواصل زمانی دو هفته‌ای مورد تلقیح قرار گرفتند. ۱۴ روز پس از آخرین تزریق، حیوانات خونگیری شدند و سرم آن‌ها به منظور بررسی تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 در آزمایش‌های

ایمونوبلات، الایزا (ELISA) و خنثی سازی ویروس (VN) مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر چگالی نوری تمامی نمونه‌های سرمی بدست آمده از آزمایش الایزا در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و پنج تکرار با استفاده از نرم افزار SAS مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

نتایج: نتایج آزمایش‌های ایمونوبلات و آنالیز آماری نمونه‌های سرمی بدست آمده از آزمایش الایزا نشان دادند که سازه نوترکیب pEGFPN1-G1 توانست موجب القای ایمنی و تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن G1 در موش‌ها شود. با این حال، سرم موش‌های تلقیح شده با این پلاسمید نتوانست ویروس تب بی دوام گاوی در حال تکثیر را خنثی کند.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که سازه نوترکیب pEGFPN1-G1 توانایی تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آنتی ژن G1 از ویروس تب بی دوام گاوی را در مدل حیوانی داشت، نتایج این مطالعه می‌تواند گامی در جهت توسعه واکسن‌های نوین برای بیماری تب بی دوام گاوی در آینده باشد.

کلیدواژه‌ها: ایمنی‌زایی، تب بی‌دوام گاوی، سازه نوترکیب pEGFPN1-G1، واکسن DNA.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: پسندیده رضا، صیفی آباد شاپوری مسعودرضا، بیگی نصیری محمدتقی (۱۴۰۲) القای پاسخ‌های ایمنی اختصاصی در موش‌های تلقیح شده با پلاسمید یوکاریوتی بیان کننده اپیتوپ G1 از ویروس تب بی دوام گاوی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۲)، ۶۲-۴۵.

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

© the authors

مقدمه

ویروس تب بی‌دوام گاوی[۱] (BEFV) یک رابدوویروس[۲] منتقل شونده تو سط بندپایان ا ست که در جنس افمروویروس‌ها طبقه‌بندی می‌شود. این ویروس موجب بروز نوعی بیماری در گاو و گاومیش آبی می‌شود که تحت عنوان تب بی‌دوام گاوی (BEF)

۱. Bovine ephemeral fever virus

۲. rhabdovirus

شناخته می شود (Lee 2019). این بیماری دارای نام‌های مختلفی مانند تب سه روزه[۱]، بیماری سخت[۲]، تب دانگ گاوها[۳] و تب همه‌گیری گاوی[۴] بوده ولی تب بی‌دوام گاوی معمول‌ترین نام مورد استفاده آن است. مشخصه این بیماری آماس بافت‌های مزودرم است که با بروز ناگهانی تب، بی‌حالی، جمود مفصلی و لنگش خود را نشان می‌دهد (Tobin et al. 2020). این بیماری در بخش‌های وسیعی از جهان از قسمت‌های جنوبی آفریقا تا دلتای رود نیل، از خاورمیانه تا جنوب و جنوب شرق آسیا، در شمال و شرق استرالیا و در بیشتر چین، تایوان، کره و جنوب ژاپن گسترده شده است (George & Standfast 2019). سازمان دامپزشکی ایران، وقوع این بیماری را در دامداری‌های واقع در سطح استان‌های تهران، فارس، ایلام، قم، خراسان شمالی، یزد، خوزستان، گلستان، مازندران، البرز و اردبیل گزارش کرده است. گسترش این ویروس در طبیعت تحت تاثیر تغییرات آب و هوایی و از طریق نیش حشرات دور پرواز و نیز با تجارت دام به مناطق عاری از بیماری صورت می‌گیرد. در صد شیوع بیماری تب بی دوام گاوی ممکن است بالا باشد، ولی در صد مرگ و میر آن پایین است. آثار این بیماری بر تولیدات دامی گاوهای بالغ، گاوهای نر و گاوهای کار از همیت بالاتری برخوردار است. به طور کلی این بیماری موجب بروز خسارات اقتصادی و تجاری قابل توجهی بر صنعت دامپروری جهان می‌گردد (Stokes et al. 2020).

ژنوم ویروس تب بی دوام گاوی از نوع RNA تک رشته‌ای منفی با طول ۱۴/۹ کیلو باز است که پنج پروتئین L، G، N، P و M را کد می‌کند (شماره دستر سی: NC_002526.1). پروتئین G یک گلیکوپروتئین سطحی ویروس است که دارای پنج جایگاه آنتی‌ژنیک به نام‌های G1، G2، G3a، G3b و G4 می‌باشد (Dhillon et al. 2000; Hou et al. 2018). G1 یک جایگاه خنثی سازی خطی (Y487-K503) است که در انتهای دومین ترایمریزاسیون، دقیقاً قبل از ناحیه C– انتهایی پروتئین G قرار دارد (Trinidad et al. 2014). اپیتوپ G1 به طور اختصاصی تنها با آنتی‌بادی‌های ضد ویروس تب بی دوام گاوی واکنش می‌دهد در حالی که بقیه جایگاه‌های آنتی‌ژنیک این پروتئین، واکنش‌های متقاطع با سایر ویروس‌های وابسته به این خانواده نشان می‌دهند (Cheng et al. 2019; Pasandideh et al. 2019). در مطالعات پیشین نشان داده شده است که پروتئین G از ویروس تب بی دوام گاوی توانایی القای آنتی‌بادی‌های خنثی کننده اختصاصی علیه این ویروس و ایجاد ایمنی غیر فعال در مقابل عفونت داخل مغزی در موش‌های شیرخوار (Cybinski et al. 1990) و نیز حفاظت گاو در مقابل تزریق داخل وریدی ویروس تب بی دوام گاوی به صورت آزمایشگاهی را داشته است (Johal et al. 2008; Hertig et al. 1990; Uren et al. 1996).

پیشگیری و کنترل بیماری تب بی‌دوام گاوی از طریق واکسیناسیون و درمان دارویی حیوانات آلوده صورت می‌گیرد (Aziz-Boaron et al. 2013; Wallace & Viljoen et al. 2005). در مطالعات پیشین مشخص شده است که پروتئین

۱. Three days sickness
۲. Stiff sickness
۳. Dengu fever of cattle
٤. Bovine epizootic fever

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

G از ویروس تب بی‌دوام گاوی هدف آنتی‌بادی‌های خنثی کننده این ویروس می‌باشد (Cybinski et al. 1992; Uren et al. 1994). علاوه بر این، ویژگی‌های محافظتی بسیار بالای پروتئین G طبیعی ویروس نشان داد که ممکن است محصول نوترکیب این پروتئین بتواند به عنوان یک واکسن آنتی‌ژنی، مفید باشد (Johal et al. 2008; Uren et al. 1994). بر این اساس، ممکن است واکسن DNA و یا نوترکیب مبتنی بر پروتئین G یک جایگزین مناسب برای واکسن‌های متداول این بیماری باشند (Uren et al. 1994). واکسن‌های DNA یا واکسن‌های نسل سوم ممکن است ایمنی‌زایی طولانی‌تری نسبت به سایر واکسن‌ها ایجاد کنند و برخی از مزایای این واکسن‌ها نظیر ایمن و بی خطر بودن، پایداری و توانایی القای پاسخ‌های ایمنی خونی و سلولی مورد توجه گسترده قرار گرفته است (Gurunathan et al. 2000; Khan 2013). از طرفی برای مقابله با برخی عوامل عفونی در گونه‌های مختلف حیوانی، واکسن‌های DNA با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Corr et al. 1996; Fynan et al. 1993; Robinson et al. 1993; Sakaguchi et al. 1996). از این رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی ایمنی‌زایی و کارآیی یک پلاسمید یوکاریوتی بیان کننده اپیتوپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی به عنوان یک واکسن DNA احتمالی علیه این بیماری بود.

مواد و روش‌ها

سویه ویروسی، لاین‌های سلولی، پلاسمید بیانی و سویه باکتریایی: سویه ویروس تب بی‌دوام گاوی مورد استفاده در این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی (کرج، ایران) از کشور ژاپن تهیه شد. بر اساس نتایج توالی‌یابی ژن G از این ویروس و همترازی آن با سایر توالی‌های این ژن از سویه‌های مختلف ویروس تب بی‌دوام گاوی ثبت شده در پایگاه بانک ژن NCBI، مشخص گردید که سویه ویروسی مورد استفاده در این مطالعه بیشترین قرابت را با سویه YHL جدا شده در شهر یاماگوچی ژاپن در سال ۱۹۶۶ داشت (Pasandideh et al. 2016). به منظور تکثیر این ویروس از لاین سلولی ریه همستر (HmLu-1)[۱] در محیط کشت سلولی RPMI[۲] (Bio Idea، ایران) حاوی ۵ در صد سرم جنین گاو استفاده شد. لاین سلولی جنینی کلیه انسان (HEK 293)[۳] در آزمایش‌های ترانسفکشن پلاسمید و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. این رده‌های سلولی از بانک سلولی ایران (NCBI)[۴] وابسته به انستیتو پاستور تهیه شدند. پلاسمید بیانی یوکاریوتی pEGFP-N1 به عنوان

۱. Hamster lung (HmLu-1) cells

۲. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium

۳. Human embryonic kidney 293 (HEK 293) cells

۴. National Cell Bank of Iran (NCBI)

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

ناقل برای کلونینگ ژن G1 از شرکت تراژن ساز وی ستا (ایران) و سویه باکتریایی DH5α ا شر شیاکلی به عنوان میزبان جهت کلونینگ و تکثیر پلاسمید بیانی از شرکت سیناژن (ایران) خریداری شدند.

آماده سازی سازه نوترکیب حاوی ژن G1 و تایید بیان پروتئین: در مطالعه پیشین یک قطعه ۴۲۰ جفت بازی از ژن G1 در ناقل بیانی یوکاریوتی pEGFP-N1 تحت کنترل پروموتر سیتومگالوویروس انسانی (CMV) کلون شد (Pasandideh et al. 2018). به طور خلا صه برای این منظور، ابتدا پرایمرهای اخت صا صی تکثیرکننده ژن G1 (نوکلئوتیدهای ۱۱۶۸ تا ۱۵۸۸) که توالی محل برش آنزیم‌های محدودکننده منا سب به انتهای '۵ آن‌ها افزوده شده بود، تو سط نرم‌افزار Oligo Analyzer 3.0 طراحی و سفارش ساخت به شرکت دنازی ست آ سیا (ایران) داده شد (جدول ۱). سپس به منظور برر سی بیان پروتئین G1، سازه نوترکیب حاوی این ژن به سلول‌های جنینی کلیه انسان ترانسفکت و بیان پروتئین با استفاده از روش ایمونوفلور سنس غیر م ستقیم (IFA) برر سی شد (Pasandideh et al. 2018). پس از تایید بیان پروتئین G1 تو سط سازه نوترکیب یوکاریوتی pEGFPN1-G1، این پلاسمید در باکتری *اشرشیاکلی* DH5α و در محیط کشت مایع LB دارای کانامایسین، کشت شبانه داده شد و سپس تو سط کیت ا ستخراج پلا سمید Endofree (کیاژن، آلمان) طبق د ستورالعمل شرکت سازنده در حجم زیاد خالص‌سازی و برای تلقیح به موش‌ها استفاده شد.

جدول ۱. پرایمرهای G1F و G1R جهت تکثیر ژن G1. زیر توالی برشی آنزیم‌های محدودکننده *KpnI* و *BamHI* به ترتیب در انتهای '۵ پرایمرهای رفت و برگشت خط کشیده شده است

Table 1. G1F and G1R primers used for amplifying of G1 gene. *KpnI* and *BamHI* restriction sequence is underlined

پرایمر Primer	توالی Sequence
G1F	5'-GTGGGTACCGCCACCATGGTGAGAGCTTGGTGTGAATACA-3'
G1R	5'-CATTGGATCCTCACCAACCTACAACAGCAGATA-3'

گروه‌های مورد آزمایش: به منظور بررسی ایمنی زایی و تولید آنتی‌بادی علیه اپیتوپ G1 توسط پلاسمید نوترکیب ساخته شده در این مطالعه، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و پنج تکرار برای هر تیمار طراحی شد. به این منظور موش‌های ماده نژاد N-MARI با سن شش تا هشت هفته به صورت داخل عضلانی و در هر دو پای چپ و راست با استفاده از سرنگ انسولین با غلظت مناسبی از پلاسمید تلقیح شدند (جدول ۲). جهت ایمن شدن کامل، به هر موش سه تزریق در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ انجام گرفت. گروه‌بندی موش‌ها به صورت جدول ۲ انجام شد.

خونگیری و جمع آوری سرم موش‌ها: به منظور ارزیابی سطح ایمنی موش‌ها، ۱۴ روز پس از تزریق سوم، حدود ۲۰۰ میکرولیتر از خون هر حیوان با بریدن ۰/۲ سانتی‌متر انتهای دم جمع آوری و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت گرمادهی شد. سپس خون جمع آوری شده به منظور جداسازی سرم به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سرم به دست آمده از هر موش در حجم ۱۰ میکرولیتر به صورت جداگانه درون چند میکروتیوب تقسیم و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جدول ۲. گروه‌های آزمایشی و مقدار تلقیح شده از هر تیمار به هر موش

Table 2. Experiment groups and inoculated dose of the treatment per mice

شماره گروه Group number	تیمار Treatment	مقدار تلقیح شده از تیمار به هر موش Inoculated dose of the treatment per mouse
1	گروه پلاسمید pEGFP-N1 pEGFP-N1 plasmid group	100 میکروگرم از پلاسمید pEGFP-N1 100 μg/animal of pEGFP-N1 plasmid
2	گروه بدون پلاسمید (گروه شاهد) The group without plasmid (control group)	100 میکرولیتر از بافر PBS 1X 100 μL/animal of PBS (1X)
3	گروه پلاسمید نوترکیب pEGFPN1-G1 pEGFPN1-G1 recombinant plasmid group	100 میکروگرم از پلاسمید pEGFPN1-G1 100 μg/animal of pEGFPN1-G1 plasmid
4	گروه واکسن تجاری تب بی‌دوام گاوی BEF commercial vaccine group	200 میکرولیتر از واکسن غیر فعال شده تب بی‌دوام گاوی (Kyoto Biken، ژاپن) 200 μL/animal of BEF-inactivated vaccine (Kyoto Biken Laboratories, Japan)

بررسی تولید آنتی بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 با آزمایش ایمونوبلات: به منظور بررسی تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 در خون موش‌ها توسط پلاسمید نوترکیب pEGFPN1-G1، از آزمایش ایمونوبلات استفاده شد. به این منظور، ابتدا یک پروتئین نوترکیب G1 با وزن مولکولی حدود ۱۸ کیلو دالتون که در مطالعه پیشین در

اشرشیاکلی تولید و خالص سازی شده بود (Pasandideh et al. 2018)، به عنوان آنتی ژن پوشاننده روی ژل SDS-PAGE (۱۵ درصد) الکتروفوروز شد. سپس باندهای پروتئینی تفکیک شده طی سه ساعت با جریان الکتریسیته ۶۰ ولت به غشاء نیتروسلولزی انتقال پیدا کردند. پس از انتقال، غشاء نیتروسلولزی یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محلول بافر بلاک کننده حاوی PBST (PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) و ۵ درصد شیرخشک قرار داده شد تا سطوحی از غشاء که عاری از پروتئین بودند، پوشانده شوند. پس از ۳ بار شستشو با بافر PBST، سرم‌های بدست آمده با رقت ۱ به ۲۰ در PBST حاوی ۵ در صد شیرخشک به غشاء اضافه شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و ۳ بار شستشو با بافر PBST، غشا به مدت ۱ ساعت در مجاورت محلول کونژوگه پراکسیداز ضد IgG موش (Bio-Rad، امریکا) (با رقت ۱/۳۰۰۰ در PBST حاوی ۵ درصد شیرخشک) قرار داده شد. در انتها پس از ۳ بار شستشو با بافر PBST، جهت مشاهده واکنش آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین G1 با پروتئین نوترکیب از محلول ظهور حاوی کلرونفتول استفاده شد.

بررسی تیتر آنتی بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 با آزمایش الایزا: به منظور بررسی تیتر آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 در خون موش‌ها، از آزمایش الایزا استفاده شد. در این آزمایش پروتئین نوترکیب G1 پروکاریوتی تولید شده در *اشرشیاکلی* در مطالعه پیشین، به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده کف پلیت مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، رقت ۱/۲۰۰ از پروتئین G1 خالص شده در بافر پوشاننده کربنات (NaHO3/Na2CO3 ۰/۵ مولار، pH=۹/۳) تهیه و در یک پلیت ۹۶ گودهای الایزا (هر گوده به میزان ۵۰ میکرولیتر) ریخته و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن، سه مرتبه شتسشو با محلول PBST (حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰) (۳۰۰ میکرولیتر در هر گوده در هر بار شستشو) صورت گرفت. سپس گودههای پلیت با ۳۰۰ میکرولیتر از محلول ۵ در صد شیر خشک بدون چربی (پس چرخ) در PBST ۰/۰۵ درصد به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بلاک شدند. پس از شستشو همانند مرحله قبل، نمونه‌های سرمی مورد نظر با رقت ۱/۱۰۰ به میزان ۵۰ میکرولیتر به هر گوده به مدت ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه اضافه شد. پس از شستشو همانند مرحله قبل، ۵۰ میکرولیتر کونژوگه پراکسیداز (Goat Anti-Mouse IgG) رقیق شده به نسبت ۱/۳۰۰۰ در PBST حاوی ۵ در صد شیر خشک، به هر گوده برای ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه اضافه شد. پس از شستشوی گودههای پلیت برای چهار مرتبه همانند قبل، محلول سوبسترا–کروموژن (تترا متیل بنزیدین (TMB) + آب اکسیژنه) به میزان ۵۰ میکرولیتر به تمام گودهها اضافه و واکنش پس از ۱۰ دقیقه با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول اسید کلریدریک ۱ مولار متوقف شد. در نهایت مقادیر چگالی نوری گودههای پلیت الایزای مورد نظر با استفاده از دستگاه قرائت کننده الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت.

بررسی آنتی بادی‌های خنثی کننده ضد ویروس تب بی دوام گاوی با آزمایش خنثی‌سازی ویروس: به منظور بررسی آنتی بادی‌های خنثی کننده ضد ویروس تب بی دوام گاوی از یک آزمایش خنثی‌سازی ویروس استفاده شد. در ابتدا به منظور غیر فعال‌سازی سیستم کمپلمان، تمامی نمونه‌های سرمی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد گرمادهی

شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های سرمی مورد آزمایش در دو گوده مجاور (در یک ستون) از یک میکروپلیت ۹۶ گوده ریخته شد. سپس۴۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI بدون سرم حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی سیلین (۱۰۰ U/mL) و استرپتومایسین (۰/۱ mg/mL) و ضد قارچ (آمفوتریسین B ۱/۲۵ µg/mL)) به هر یک از نمونه‌های سرمی افزوده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از ویروس تب بی دوام گاوی تعیین عیار شده و رقیق شده در محیط کشت سلولی RPMI حاوی آنتی‌بیوتیک، ضد قارچ و ۲ درصد سرم جنین گاو که حاوی ۱۰۰ TCID50 ویروس بود، به هر یک از گودهها اضافه گردید. پس از آن میکروپلیت به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در انکوباتور کشت سلول گرمادهی شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، ۵۰ میکرولیتر از سلول‌های Vero تریپسینه شناور در محیط کشت سلولی RPMI حاوی آنتی‌بیوتیک، ضد قارچ و ۲ درصد سرم جنین گاو که به طور تقریبی حاوی ۱۵۰۰۰ سلول بود، به هر یک از گودهها اضافه شد و میکروپلیت در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در حضور ۲/۵ درصد CO2 و ۸۸ درصد رطوبت قرار گرفت. میکروپلیت با یک میکروسکوپ نوری معکوس Olympus IX71 بررسی شد و پس از ۳ تا ۵ روز، بر اساس وجود یا عدم وجود آثار تخریب سلول (CPE)، وجود یا عدم وجود آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ضد ویروس تب بی دوام گاوی در نمونه‌های سرمی مورد آزمایش مشخص گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: مقادیر چگالی نوری تمامی نمونه‌های سرمی بدست آمده از آزمایش الایزا در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و پنج تکرار با استفاده از رویه مدل خطی تعمیم یافته (GLM) و بر اساس مدل آماری زیر در نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شد:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

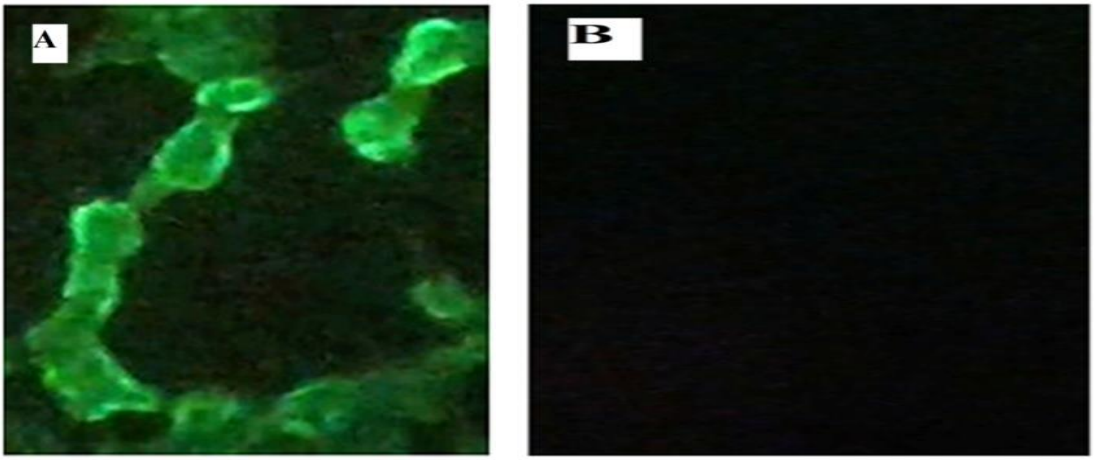
که Yij: مشاهده j ام از تیمار i ام، µ: میانگین مشاهدات، Ti: اثر تیمار i ام و eij: اشتباه آزمایشی انجام شده در تکرار j ام از تیمار i ام می‌باشند. به منظور مقایسه میانگین دانسیته‌های نوری گروه‌های موش از آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار (*LSD*) استفاده شد. از لحاظ آماری ارزش–P (P-value) کمتر از ۰/۰۱ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

تایید بیان پروتئین G1 توسط روش ایمونوفلور سنس غیر مستقیم (IFA): بیان پروتئین G1 با استفاده از روش ایمونوفلورسنس غیر مستقیم (IFA) تایید شد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، حضور فلورسنس در سلول‌ها نشان‌دهنده ورود موفق سازه نوترکیب pEGFPN1-G1 به سلول‌های جنینی کلیه انسان و بیان پروتئین G1 در سیتوپلاسم سلول‌های میزبان می‌باشد (شکل ۱).

تایید تولید آنتی بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 با آزمایش ایمونوبلات: تولید آنتی بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 با آزمایش ایمونوبلات تایید شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، ظهور باند پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۸ کیلو دالتون در واکنش با سرم موش‌های تلقیح شده توسط پلاسمید pEGFPN1-G1 و واکسن تجاری تب بی دوام گاوی و عدم ظهور باند مشابه در گروه پلاسمید pEGFP-N1 و گروه تزریق شده با PBS 1X، نشان دهنده تولید آنتی‌بادی ضد پروتئین G1 در این گروه‌ها بود (شکل ۲).

تیتر آنتی بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 در آزمایش الایزا: نتایج آزمایش الایزا بر اساس میانگین چگالی نوری سرم گروه‌های مختلف موش در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که از نتایج این آزمایش مشخص است، تیتر آنتی بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 در گروه تلقیح شده با پلاسمید نوترکیب pEGFPN1-G1 به طور معنی داری از گروه پلاسمید pEGFP-N1 و گروه تزریق شده با PBS 1X بالاتر بود ($P<۰/۰۱$). بیشترین میزان تیتر آنتی بادی‌های اختصاصی علیه پروتئین G1 در سرم موش‌های ایمن شده با واکسن تجاری تب بی دوام گاوی تولید شد ($P<۰/۰۱$).

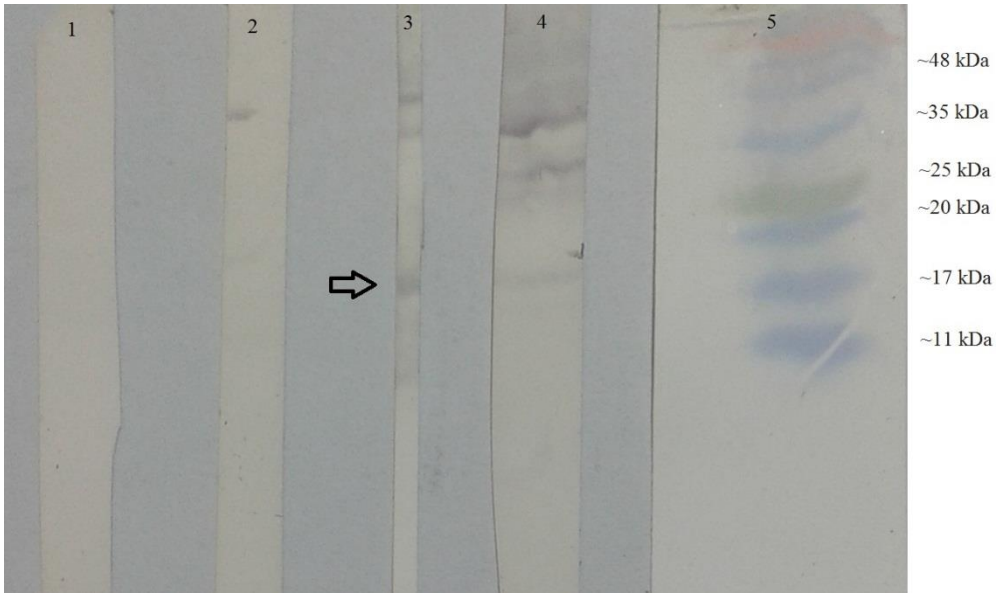


شکل ۱. بررسی بیان پروتئین G1 توسط روش ایمنوفلورسنس. (A) سلول‌های جنینی کلیه انسان ترانسفکت شده با سازه pEGFPN1-G1 نوترکیب. (B) سلول‌های جنینی کلیه انسان ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی

Figure 1. Verification of G1 protein expression by immunofluorescence staining. (A) Image of the transfected human embryonic kidney 293 (HEK 293) cells with the pEGFPN1-G1 recombinant construct. (B) Untransfected HEK 293 cells as negative control

آزمایش خنثی‌سازی ویروس: به منظور بررسی توانایی پلاسمید نوترکیب pEGFPN1-G1 در القای آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ضد ویروس تب بی دوام گاوی از آزمایش خنثی‌سازی ویروس استفاده شد. در بررسی میکروسکوپی مشخص شد که

در گودههای مربوط به گروه پلاسمید pEGFP-N1 و گروه تزریق شده با PBS 1X، آثار تخریب سلولی ناشی از تکثیر ویروس مشاهده گردید. بنابراین همان‌طور که انتظار می‌رفت، این گروهها فاقد آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ضد ویروس تب بی دوام گاوی بودند. در مقابل، در گروه ایمن شده توسط واکسن تجاری تب بی دوام گاوی، آثار تخریب سلولی ناشی از تکثیر ویروس مشاهده نشد. بنابراین واکسن تجاری تب بی دوام گاوی توانایی تولید آنتی بادی‌های خنثی کننده ضد ویروس را داشت. اما سرم موش‌های ایمن شده با پلاسمید نوترکیب pEGFPN1-G1 نتوانست ویروس تب بی دوام گاوی در حال تکثیر را خنثی کند و آثار تخریب سلولی در گودههای مربوطه دیده شد (شکل ۳). این تفاوت بین گروههای تلقیح شده با پلاسمید نوترکیب pEGFPN1-G1 و واکسن تجاری تب بی دوام گاوی ممکن است به دلیل پایین بودن تیتر آنتی‌بادی تولید شده در سرم موش‌های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب باشد.



شکل ۲. واکنش سرم گروههای مورد بررسی با پروتئین نوترکیب G1 در آزمایش ایمونوبلات. ۱ و۲: عدم ظهور باند پروتئینی برای سرم گروههای به ترتیب تزریق شده با PBS 1X و پلاسمید pEGFP-N1؛ ۳ و ٤: ظهور باند پروتئینی با وزن تقریبی ۱۸ کیلو دالتون برای سرم گروههای به ترتیب تلقیح شده با پلاسمید نوترکیب pEGFPN1-G1 و واکسن تجاری تب بی دوام گاوی؛ ۵: نشانگر پروتئینی (سیناکلون، ایران)

Figure 2. Serum reaction of the studied groups with G1 recombinant protein in immunoblotting assay. 1 and 2: Absence of protein band for serum of the injected groups with PBS 1X and pEGFP-N1 plasmid, respectively; 3 and 4: Appearance of protein band with an approximate molecular weight of 18 kDa for serum of the inoculated groups with pEGFPN1-G1 and inactivated BEF vaccine, respectively; 5: marker polypeptides (sinaclon, Iran)

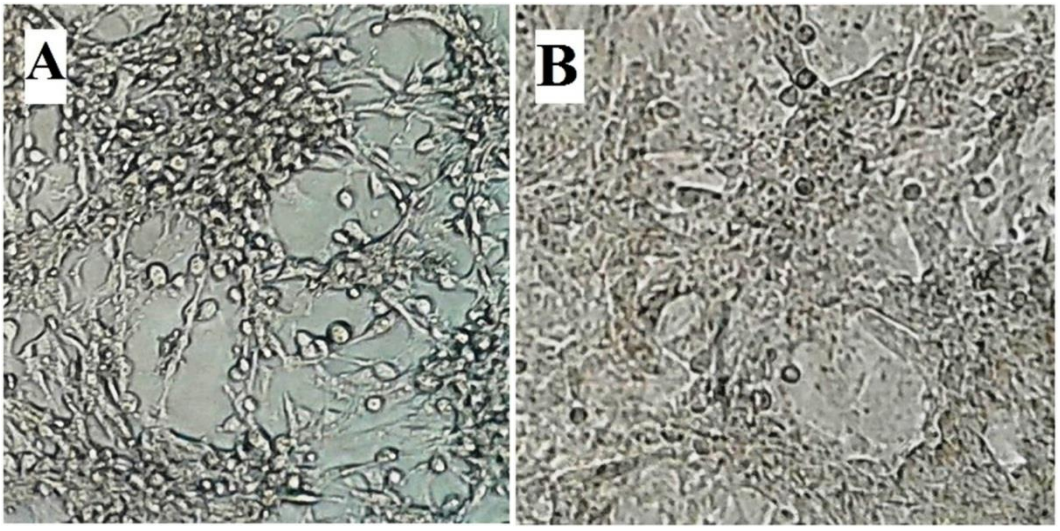
در حال حاضـــر همه‌گیری بیماری تب بی‌دوام گاوی به طور گســـترده در برخی از نقاط جهان رخ می‌دهد و گزارش‌های زیادی از خ سارات اقت صادی و تجاری این بیماری وجود دارد. از آنجایی که عفونت طبیعی ویروس تب بی دوام گاوی موجب ایمنی طولانی مدت در حیوانات می شود (Mackerras et al. 1940)، از این رو واکسینا سیون به عنوان یک روش موثر در پیشگیری علیه این بیماری مطرح می‌باشد. تاکنون چهار گروه واکسن برای تب بی‌دوام گاوی ساخته شده‌اند: ۱) واکسن‌های زنده ضعیف شده؛ ۲) واکســـن‌های غیرفعال شـــده؛ ۳) واکســـن‌های زیر واحدی مبتنی بر پروتئین G و ۴) واکســـن‌های نوترکیب. در حال حاضـــر واکسن‌های زنده ضعیف شده، واکسن‌های غیرفعال شده و واکسن‌های زیر واحدی در مزرعه ا ستفاده می شوند (Walker & Klementet al. 2015). با این حال، مطالعات محدودی در خصوص طراحی یک واکسن DNA با استفاده از ژن G1 از ویروس تب بی‌دوام گاوی برای ایمن‌ســـازی علیه این بیماری انجام گرفته اســـت. بنابراین هدف از این مطالعه، طراحی یک پلاســـمید یو کاریوتی نوترکیب بیان کننده اپیتوپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی دوام گاوی به منظور ارز یابی ایمنی‌زایی و کارایی آن به عنوان یک واکسن DNA احتمالی در مدل حیوانی بود. نتایج آزمایش‌های ایمونوبلات و الایزا ن شان دادند که سازه نوترکیب طراحی شده در این تحقیق توانست موجب القای ایمنی اختصاصی و تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن G1 در موش‌ها شود.

جدول ۳. تجز یه وار یانس داده های آز مایش الایزا مربوط به اثرات تی مار های مورد بررســـی بر تولید آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین G1 در گروه‌های مختلف موش

Table 3. Variance analysis of ELISA data related to the effects of the studied treatments on produced antibodies against G1 protein in different groups of mice

گروه مورد بررسی The studied group	میانگین چگالی نوری± انحراف معیار Mean of optical density (OD)±SD
BEF Vaccine	0.307 ± 0.073^{a}
pEGFPN1-G1	0.199 ± 0.024^{b}
pEGFP-N1	0.076 ± 0.009^{c}
PBS (1X)	0.056 ± 0.002^{c}

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک نباشند، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند ($P<۰/۰۱$).



شکل ۳. برر سی میکرو سکوپی سلول‌های Vero تخریب شده به وا سطه تکثیر ویروس تب بی دوام گاوی (A) و سالم (B) در آزمایش خنثی سازی ویروس

Figure 3. Microscopic examination of the Vero cells for evidence of viral cytopathic effects (A) and absence of viral cytopathic effects (B) in virus neutralisation assay

گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی دارای پنج جایگاه آنتی‌ژنیک G1، G2، G3a، G3b و G4 اســت که اپیتوپ G1 تنها جایگاه خطی در میان آن‌ها می‌با شد. به جز یک جایگزینی آمینو ا سیدی در موقعیت ۴۹۹ برای چند سویه محدود، اپیتوپ G1 از لحاظ نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی در سایر سویه‌های ویروس تب بی دوام گاوی حفاظت شده است (Kato et al. 2009; Zheng & Qiu 2012). از طرفی در مطالعات پیشین مشخص شده است که تغییرات آمینو اسیدی شناسایی شده در جایگاه‌های آنتی ژنیک پروتئین G روی خ صو صیات خنثی سازی این جایگاه‌ها موثر نی ستند (Trinidad et al. 2014). بنابراین با توجه به ایمنی‌زایی بالای پروتئین G و این واقعیت که اپیتوپ G1 از لحاظ ژنتیکی و آنتی‌ژنیکی در میان ســویه‌های مختلف این ویروس حفاظت شده ا ست، این آنتی ژن از ویروس تب بی دوام گاوی جهت برر سی کارآیی آن به عنوان یک واک سن DNA احتمالی در مدل حیوانی انتخاب شد.

در مطالعات پی شین توانایی پروتئین G از ویروس تب بی دوام گاوی در القای پا سخ‌های ایمنی اثبات شده ا ست. یورن و همکاران با ا ستفاده از ت ست الایزای مهاری و اندازه‌گیری سطوح آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ن شان دادند که واک سینا سیون گاو با گلیکوپروتئین G اســتخراج شــده از ویروس تب بی دوام گاوی موجب القای ایمنی در مقابل این ویروس گردید (Uren et al. 1994). در چین، واک سینا سیون تو سط قطعه پروتئینی G بد ست آمده از یک ویروس تب بی دوام گاوی نیمه خالص شده موجب القای پاسـخ آنتی‌بادی خنثی‌کننده و حفاظت ۵۰ درصـدی گاوها گردید. در اسـترالیا، یک واکسـن زیر واحدی مبتنی بر پروتئین G

همراه با ادجوانت Quil A موجب حفاظت ۱۰۰ درصدی گاوها در مقابل چالش آزمایشی شد (Uren et al. 1994). تاکنون هیچ ارزیابی مزرعه‌ای برای این دو واکسن انجام نشده و به شکل تجاری نیز تولید نشده‌اند، اما به نظر می‌رسد که این واکسن‌ها ایمن و موثر باشند. آزمایش‌های واکسیناسیون با استفاده از ناقل‌های ویروسی نوترکیب بیان کننده پروتئین G از ویروس تب بی دوام گاوی نیز انجام شده است. واکسیناسیون با چهار دوز از سویه Neethling ویروس بیماری لمپی اسکین گاو بیان کننده پروتئین G ویروس تب بی دوام گاوی توانست پاسخ‌های آنتی بادی خنثی کننده اختصاصی و ایمنی به واسطه سلول را القا کند، ولی ایمنی گاوهای مواجهه شده با ویروس ۱۰ هفته پس از آخرین دوز از بین رفت (Wallace & Viljoen et al. 2005). به طور مشابه واکسیناسیون گاوها با پروتئین G نوترکیب ویروس تب بی دوام گاوی بیان شده توسط سویه NYBH ویروس واکسینیا توانست آنتی بادی‌های خنثی‌کننده اختصاصی را القا کند ولی نتیجه این آزمایش قطعی نبود (Hertig et al. 1996). در یک مطالعه دیگر مشخص شد که سازه نوترکیب pcDNA3.1-G1 بیان کننده پروتئین G1 توانایی تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ضد ویروس تب بی دوام گاوی را در موش‌های تلقیح شده داشت (Pasandideh et al., 2018). تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه ویروس تب بی دوام گاوی در موش توسط سازه نوترکیب pEGFPN1-G1 طراحی شده در این تحقیق با نتایج مطالعات ذکر شده که توانایی ایمنی‌زایی و حفاظت توسط واکسن‌های زیر واحدی و نوترکیب مبتنی بر پروتئین G را اثبات کرده بودند، مطابقت داشت. با این حال، نتایج آزمایش خنثی‌سازی ویروس نشان داد که سرم موش‌های تلقیح شده با پلاسمید نوترکیب pEGFPN1-G1 نتوانست ویروس تب بی دوام گاوی در حال تکثیر را خنثی کند و آثار تخریب سلولی در گودههای مربوطه دیده شد. این نتیجه می‌تواند به دلیل پایین بودن تیتر آنتی‌بادی تولید شده در این گروه از موش‌ها باشد. در این مطالعه بالاترین تیتر آنتی بادی ضد آنتی ژن G1 در گروه تلقیح شده با واکسن تجاری تب بی دوام گاوی دیده شد. این واکسن از نوع ویروس غیر فعال شده می‌باشد در حالی که سازه نوترکیب طراحی شده در این مطالعه تنها یک آنتی ژن ساختاری از ویروس تب بی دوام گاوی را بیان می‌کند. معمولاً پلاسمیدهای بیانی یوکاریوتی کدکننده یک آنتی‌ژن در مقایسه با عوامل بیماری‌زای زنده تضعیف شده یا غیرفعال شده که کل پیکره آن عامل بیماری‌زا را شامل می شوند، پاسخ‌های ایمنی کمتری را القا می‌کنند (Shah et al. 2011). بنابراین پایین بودن تیتر آنتی بادی تولید شده توسط سازه نوترکیب pEGFPN1-G1 طراحی شده در این مطالعه نسبت به واکسن تجاری تب بی دوام گاوی از لحاظ علمی قابل توجیه است.

اگرچه واکسن‌های آزمایشی و تجاری با فرمولاسیون‌های مختلفی برای تب بی‌دوام گاوی تولید شده‌اند، اما گزارش‌های اندکی در مورد ارزیابی کارایی آن‌ها در مزرعه وجود دارد. به نظر می‌رسد که ایمنی محافظتی برای بیشتر واکسن‌ها برای مدت محدودی ادامه می‌یابد و نیز کارایی آن‌ها ممکن است ناچیز باشد، مگر اینکه دوزهای تقویت کننده اضافی در فواصل زمانی ۶ ماه تا یک سال تجویز شوند. بدیهی است به منظور بدست آوردن اطلاعات جامع‌تر از عملکرد این واکسن‌ها در مزرعه به مطالعات بیشتری نیاز است تا تعداد دوزهای تجویز واکسن کاهش و مدت ایمنی افزایش یابند (Walker & Klementet al. 2015).

نتیجه‌گیری: نتیجه کلی این مطالعه نشـــان داد که ســـازه نوترکیب pEGFPN1-G1، توانایی تولید آنتی‌بادی‌های اختصـــاصـــی علیه آنتی ژن G1 از ویروس تب بی دوام گاوی را در مدل حیوانی داشـــت. با این حال احتمالاً به دلیل تیتر پایین آنتی‌بادی تولید شده، سرم موش‌های تلقیح شده با این پلا سمید نتوانست ویروس تب بی دوام گاوی در حال تکثیر را خنثی کند. بنابراین به منظور بهبود ایمنی‌زایی این ســـازه نوترکیب می‌توان از روش‌هایی نظیر ادغام کردن بعضـــی از ژن‌های ســـایتوکاینی یا ژن‌های مربوط به سیستم کمپلمان با آنتی‌ژن مورد نظر و طراحی یک واکسن DNA چندگانه در مطالعات آینده استفاده نمود.

سپاسگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از تمامی کارکنان و همکاران محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز به ویژه بخش میکروب شـــناســـی که برای انجام این تحقیق از همکاری و پیشـــنهادات ارزنده‌شـــان بهره‌مند شـــدیم، صمیمانه سپاسگزاری نمایند. همچنین از داوران محترم و اساتید ارجمند مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، به خاطر ارزیابی متن مقاله و ارائه نظرات ساختاری و علمی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

پسندیده رضا؛ بیگی نصیری محمدتقی؛ صیفی آباد شاپوری مسعودرضا (۱۳۹۸) بیان اپیتوپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی توسط سازه نوترکیب pET24-G1 در *اشرشیاکلی*. مجله دامپزشکی ایران ۱۵، ۲۴-۱۵.

پسندیده رضا؛ بیگی نصیری محمدتقی؛ صیفی آباد شاپوری مسعودرضا و همکاران (۱۳۹۵) همسانه‌سازی مولکولی و تعیین توالی ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی در *اشرشیاکلی*. مجله پژوهش‌های علوم دامی ایران ۸، ۵۲۰-۵۱۱ .

پسندیده رضا؛ بیگی نصیری محمدتقی؛ صیفی آباد شاپوری مسعودرضا و همکاران (۱۳۹۶) طراحی پلاسمید یوکاریوتی بیان کننده اپی‌توپ G1 از ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی در سلول‌های جنینی کلیه انسان. مجله دامپزشکی ایران ۱۳، ۱۹-۲۷.

References

Aziz-Boaron O, Leibovitz K, Gelman B et al. (2013) Safety, immunogenicity and duration of immunity elicited by an inactivated bovine ephemeral fever vaccine. PloS one 8**,** e82217.

Cheng L-T, Zeng Y-J, Chu C-Y et al. (2019) Development of a quick dot blot assay for the titering of bovine ephemeral fever virus. BMC Vet Res 15**,** 1-7.

Corr M, Lee DJ, Carson DA et al. (1996) Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. J Exp Med 184**,** 1555-1560.

Cybinski D, Davis S, Zakrzewski H (1992) Antigenic variation of the bovine ephemeral fever virus glycoprotein. Arch Virol 124**,** 211-224.

Cybinski D, Walker P, Byrne K et al. (1990) Mapping of antigenic sites on the bovine ephemeral fever virus glycoprotein using monoclonal antibodies. J Gen Virol 71**,** 2065-2072.

Fynan EF, Webster RG, Fuller DH et al. (1993) DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. Proc Natl Acad Sci USA. 90**,** 11478-11482.

George TS, Standfast H (2019) Bovine ephemeral fever. In: The arboviruses: epidemiology and ecology. CRC Press. pp. 71-86.

Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. Annu Rev Immunol 18**,** 927-974.

Hertig C, Pye AD, Hyatt AD et al. (1996) Vaccinia virus-expressed bovine ephemeral fever virus G but not GNS glycoprotein induces neutralizing antibodies and protects against experimental infection. J Gen Virol 77**,** 631-640.

Hou P, Zhao G, He C et al. (2018) Biopanning of polypeptides binding to bovine ephemeral fever virus G1 protein from phage display peptide library. BMC Vet Res 14**,** 1-9.

Johal J, Gresty K, Kongsuwan K et al. (2008) Antigenic characterization of bovine ephemeral fever rhabdovirus G and GNS glycoproteins expressed from recombinant baculoviruses. Arch Virol 153**,** 1657-1665.

Kato T, Aizawa M, Takayoshi K et al. (2009) Phylogenetic relationships of the G gene sequence of bovine ephemeral fever virus isolated in Japan, Taiwan and Australia. Vet Microbiol 137**,** 217-223.

Khan KH (2013) DNA vaccines: roles against diseases. Germs 3**,** 26.

Lee F (2019) Bovine ephemeral fever in Asia: recent status and research gaps. Viruses 11**,** 412.

Mackerras IM, Mackerras MJ, Burnet F (1940) Experimental Studies of Ephemeral Fever in Australian Cattle. Bulletin of the Council for Scientific and Industrial Research, Australia.

Pasandideh R, Beygi Nassiri MT, Seyfi Abad Shapouri MR (2018) Expression of the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus G glycoprotein gene by pET24-G1 recombinant construct in *Escherichia coli*. Iran J Vet Res 15, 15-24. (In Persian)

Pasandideh R, Beygi Nassiri MT, Seyfi Abad Shapouri MR, Fayazi J, Roshanfekr H, Lotfi M (2016) Cloning and sequencing of G glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus in *Escherichia coli*. Int J Appl Sci Res 8, 511-519. (In Persian)

Pasandideh R, Beygi Nassiri MT, Seyfi Abad Shapouri MR, Fayazi J, Roshanfekr H, Lotfi M (2018) Designing of the expressing eukaryotic plasmid of the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus G glycoprotein in human embryonic kidney cells. Iran J Vet Res 13, 19-27. (In Persian)

Pasandideh R, Seyfi Abad Shapouri MR, Beigi Nassiri MT (2018) Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding G1 epitope of bovine ephemeral fever virus G glycoprotein in mice. Onderstepoort J Vet Res 85**,** 1-6.

Pasandideh R, Seyfi Abad Shapouri MR, Beigi Nassiri MT (2019) Production of monoclonal antibody against prokaryotically expressed G1 protein of bovine ephemeral fever virus. Iran J Appl Anim Sci 9**,** 51-57.

Robinson H, Hunt L, Webster R (1993) Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine 11**,** 957-960.

Sakaguchi M, Nakamura H, Sonoda K et al. (1996) Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus. Vaccine 14**,** 747-752.

Shah MAA, Song X, Xu L et al. (2011) Construction of DNA vaccines encoding Eimeria acervulina cSZ-2 with chicken IL-2 and IFN-γ and their efficacy against poultry coccidiosis. Res Vet Sci 90**,** 72-77.

Stokes JE, Darpel KE, Gubbins S et al. (2020) Investigation of bovine ephemeral fever virus transmission by putative dipteran vectors under experimental conditions. Parasit Vectors 13**,** 1-11.

Tobin C, Bailey DW, Trotter MG et al. (2020) Sensor based disease detection: A case study using accelerometers to recognize symptoms of Bovine Ephemeral Fever. Comput Electron Agric 175**,** 105605.

Trinidad L, Blasdell KR, Joubert DA et al. (2014) Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian episystem. J Virol 88**,** 1525-1535.

Uren M, Walker P, Zakrzewski H et al. (1994) Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. Vaccine 12**,** 845-852.

Walker PJ, Klement E (2015) Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. Vet Res 46**,** 1-19.

Wallace DB, Viljoen GJ (2005) Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. Vaccine 23**,** 3061-3067.

Zheng F, Qiu C (2012) Phylogenetic relationships of the glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus isolated from mainland China, Taiwan, Japan, Turkey, Israel and Australia. Virol J 9**,** 1-8.