معرفی آزمایش الایزای مبتنی بر پروتئین MBP-G1 به عنوان روش شناسایی گاومیش‌های آلوده به ویروس تب بی‌دوام گاوی

محمدتقی بیگی نصیری[1]، رضا پسندیده[2*]، مسعودرضا صیفی شاپور آبادی[3]

(تاریخ دریافت ۹۵/۲/۱۰:تاریخ پذیرش ۹۵/۵/۱۱)

چکیده

تب بی‌دوام گاوی (BEF) یک بیماری غیر واگیردار در گاو و گاومیش می‌باشد که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، استرالیا و افریقا پراکنده شده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی واکنش‌پذیری پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در باکتری *اشرشیاکلی* در یک آزمایش الایزای غیر مستقیم خانگی بود. به این منظور پس از کلونینگ ژن G1 از گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی در ناقل pMalc2x و متعاقباً بیان پروتئین در سویه Rosetta/*اشرشیاکلی*، پروتئین نوترکیب MBP-G1 تولید شده به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده کف پلیت در یک آزمایش الایزا استفاده شد. نتایج آزمایش الایزا نشان داد که این پروتئین نوترکیب توانایی واکنش با سرم موش‌های ایمن شده با واکسن تجاری تب بی‌دوام گاوی و شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس BEF را داشت. بنابراین می‌توان پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در *اشرشیاکلی* را به عنوان یک نامزد مناسب جهت طراحی کیت الایزا برای شناسایی گاومیش‌های آلوده به ویروس BEF معرفی نمود.

کلمات کلیدی: اشرشیاکلی، آزمایش الایزا، پروتئین نوترکیب MBP-G1، گاومیش، ویروس تب بی‌دوام گاوی (BEFV)

۱و۲-گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ملاثانی، ایران

۳-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* نویسنده مسئول: Rezapasandideh63@gmail.com

مقدمه

ویروس تب بی‌دوام گاوی (BEFV) یک رابدوویروس منتقل شونده توسط بندپایان است که در جنس افموویروس‌ها طبقه‌بندی می‌شود. این ویروس موجب بروز تب حاد در گاو و گاومیش آبی می‌شود که تحت عنوان بیماری تب بی‌دوام گاوی (BEF) شناخته می‌شود. نام‌های محلی آن بیماری ۳ روزه، تب بومی گاوی، آنفولانزای گاوی و یا بیماری سفت و سخت می‌باشند (۶). ویروس BEF در طبیعت تنها از طریق نیش حشرات دور پرواز گسترش می‌یابد. مشابه دیگر رابدویروس‌ها، ویریون‌های BEF شبیه گلوله تفنگ یا مخروطی شکل می‌باشند. ژنوم این ویروس از نوع RNA تک رشته‌ای منفی با طول ۱۴۹۰۰ جفت باز است و پنج پروتئین L، G، N، P و M را کد می‌کند. پروتئین G یک گلیکوپروتئین سطحی است که دارای پنج جایگاه آنتی‌ژنیک (G1,G2,G3a,G3b,G4) در سطح خود می‌باشد. G1 یک جایگاه خنثی‌سازی خطی (Y^{487}-K^{503}) است که در انتهای دومین ترایمریزاسیون، دقیقاً قبل از ناحیه C– انتهایی پروتئین G قرار دارد (۵). اپیتوپ G1 تنها با آنتی‌بادی‌های ضد ویروس BEF واکنش می‌دهد درحالی که سایر جایگاه‌های آنتی‌ژنیکی این پروتئین، واکنش‌های متقاطع با سایر ویروس‌های وابسته به این خانواده نشان می‌دهند (۴). تب بی‌دوام گاوی ممکن است از نظر بالینی آشکار نباشد یا منجر به علائم بالینی خفیف تا شدید از جمله تب دو فازی، ترشح بزاق، چشم و ترشحات بینی، گرفتگی عضلانی، لنگش و بی‌اشتهایی شود. طبق گزارش‌های سازمان دامپزشکی ایران، این بیماری تاکنون در دامداری‌های واقع در سطح استان‌های تهران، فارس، ایلام، قم، خراسان شمالی، یزد، خوزستان، گلستان، مازندران، البرز و اردبیل دیده شده است.

تب بی‌دوام گاوی از بیماری‌های ویروسی نادری است که پاسخ درمانی به آن بسیار مناسب است. در صورتی که تشخیص آن در اوایل بیماری صورت گیرد، درمان بسیار موثرتر خواهد بود. آزمایش‌های سرولوژی شامل خنثی‌سازی ویروس (VN)[1] و الایزای مهاری[2] برای تشخیص تب بی‌دوام وجود دارند. آزمایش الایزای مهاری یک روش اختصاصی و سریع جهت تشخیص این بیماری از سایر ویروس‌هایی است که قرابت پادگنی با تب بی‌دوام دارند. بنابراین این نوع از روش الایزا، اهمیت خاصی به عنوان یک آزمایش مطلوب پاراکلینکی دارد. با توجه به اینکه تاکنون تلاشی در زمینه ساخت کیت تشخیصی الایزا برای بیماری تب بی‌دوام گاوی در ایران صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی واکنش‌پذیری پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در باکتری *اشرشیاکلی* در یک آزمایش الایزای غیر مستقیم خانگی بود. در صورتی که خصوصیات آنتی‌ژنی این پروتئین در آزمایش الایزا مطلوب ارزیابی شود، می‌توان از آن در مطالعات آینده به منظور طراحی کیت الایزا برای شناسایی گاومیش‌های آلوده به این ویروس استفاده نمود.

---

[1]. Virus neutralisation
[2]. Blocking ELISA

مواد و روش ها

بیـــان پـــروتئین همجـــوش MBP-G1 در باکتری اشرشیاکلی

در مطالعه قبل، تـوالی کـد کننـده ژن G1 از ویـــروس تـــب بـــی‌دوام گـــاوی درون ناقـــل بیـــانی پروکاریوتی pMalc2x تحت کنترل پروموتر قـوی *lac* کلـــون و در ســـویه Rosetta از بـــاکتری *اشرشیاکلی* بیان شد (۲). به طور خلاصه، یک سـازه نوترکیـــــب حـــــاوی ژن گلیکـــــوپروتئین G (pTZ57R/T-G)، طراحی شده در مطالعه گذشته (۱)، بـه عنـوان الگـو بـرای تکثیـر ناحیـه کدکننـده اپیتوپ G1 توسـط PCR اسـتفاده شـد. تکثیـر بـا اســـتفاده از پرایمـــرهـــای رفـــت و برگشـــت دارای جایگاه‌های برشی برای آنزیم‌های به ترتیب *Eco*RI و *Sal*I صورت گرفت. پـس از انجـام هضـم آنزیمـی بـــرای محصـــول PCR و پلاســـمید pMalc2x، واکنش اتصال و در ادامه انتقال توسـط روش شـوک حرارتـی بـه سـویه DH5α از *اشرشـیاکلی* صـورت گرفت. پس از تایید صحت کلونینگ، سازه نوترکیـب به سویه Rosetta/*اشرشیاکلی* منتقل و سپس بیـان پـروتئین بـا افـزودن IPTG ۰/۱ مـولار بـه محـیط کشت حاوی کلونی باکتری و انکوباسـیون بـه مـدت ۱۸ ساعت در ۳۷°C القا شد. پروتئین بیان شـده بـا استفاده از روش SDS-PAGE مورد بررسـی قـرار گرفت.

خالص‌سازی پروتئین همجوش MBP-G1

ناقـل pMalc2x در بخـش N- انتهـایی ژن بیان شده، پروتئینی را به نام پروتئین متصل شـونده به مالتوز (MBP)[1] بیان مـی‌کنـد. در ایـن ناقـل بـا استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، MBP بـرای اتصال محکم‌تر به آمیلوز بهینه شده اسـت. بنـابراین خـالص‌سـازی پـروتئین همجـوش MBP-G1 بـا استفاده از یک ستون رزین آمیلوز انجـام گرفـت. بـه این منظور پس از بیان پروتئین، رسوب باکتریایی در بـافر سـتون (شـامل TrisHCl ۲۰ میلـی مـولار، NaCl ۲۰۰ میلی مولار، EDTA ۱ میلی مـولار و ۷۰۰ میکرولیتر از بتا-مرکاپتواتـانول) مخلـوط شـد. سپس به منظور آزادسازی پـروتئین‌هـای باکتریـایی داخـل سـلولی، ایـن مخلـوط بـه مـدت ۲۰ دقیقـه سونیکه شد. ایـن مخلـوط بـا دور rpm ۱۰۰۰۰ بـه مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس مـایع رویـی بـه نسبت ۱ به ۶ با بافر ستون مخلوط و از ستون رزیـن آمیلـوز عبـور داده شـد. سـپس پـروتئین همجـوش MBP-G1 با استفاده از بافر سـتون حـاوی مـالتوز ۱۰ میلی مولار از رزیـن آمیلـوز جداسـازی شـد. در نهایت، نتیجـه خـالص‌سـازی پـروتئین نوترکیـب بـا استفاده از روش SDS-PAGE بررسی شد.

ایمن‌سازی موش‌ها توسط واکسن تجـاری تب بی‌دوام گاوی

به منظور ایمن سازی موش‌ها جهت بـه دسـت آوردن سرم آن‌ها به عنوان آنتـی‌بـادی ضـد ویـروس BEF، ۲۰۰ میکرولیتر از واکسن غیرفعال شده تـب بـی‌دوام گـاوی (KYOTO BIKEN، ژاپـن) بـه ناحیـه پشـت پـا و شـکم دو سـر مـوش مـاده نـژاد Balb/c با سن ۶ هفته تزریق شد. تزریق سه مرتبه با فواصل زمانی دو هفته تکرار شد. یک هفته پـس از ایمن‌سازی سوم، از حیوانات خون گرفته شد و سـرم آن‌ها به عنـوان آنتـی‌بـادی ضـد ویـروس BEF در آزمایش الایزای غیر مستقیم خانگی استفاده شد.

---

[1]. Maltose-binding protein

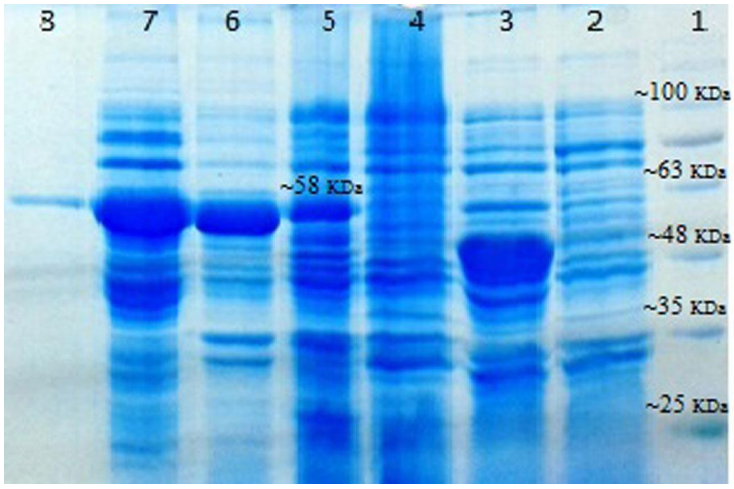
ارزیابی واکنش‌پذیری پروتئین نوترکیب MBP-G1 در آزمایش الایزای غیر مستقیم خانگی

در اولین مرحله برای انجام این آزمایش، پلیت الایزا با پروتئین MBP-G1 نوترکیب پوشش‌دهی شد. به این منظور پروتئین نوترکیب با غلظت ۰/۱ میکروگرم آنتی‌ژن در هر ۵۰ میکرولیتر بافر پوشاننده رقیق شد. سپس در هر حفره پلیت الایزا، ۵۰ میکرولیتر از این مخلوط اضافه گردید. همزمان به عنوان شاهد آنتی‌ژن، بافر پوشاننده فاقد پروتئین نیز در تعدادی حفره به تعداد سرم مورد آزمایش پوشش‌دهی شد. سپس پلیت داخل یک ظرف مرطوب به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون در یخچال، محتویات پلیت کاملاً تخلیه و سه مرتبه با محلول PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBST) شستشو شد (۳۰۰ میکرولیتر به ازای هر حفره). در مرحله بعد به منظور پوشاندن سطوحی از کف حفرات که با آنتی‌ژن پوشانده نشده بودند، پلیت با محلول شیرخشک ۵ درصد تهیه شده در PBST به مدت ۳ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد بلوک شد (۳۰۰ میکرولیتر به ازای هر حفره). پس از سه مرتبه شستشو مانند مرحله قبل، سرم موش‌های تلقیح شده با واکسن تجاری BEF و نیز سرم موش منفی در رقت‌های ۱/۵۰ تا ۱/۴۰۰ در PBST حاوی ۵ درصد شیرخشک، به حفرات اضافه شدند (۵۰ میکرولیتر به ازای هر حفره). پس از افزودن سرم‌ها، پلیت به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس محتویات پلیت تخلیه شد و حفرات سه مرتبه توسط PBST مانند دفعات قبل، شستشو گردید. در مرحله بعد کونژوگه پراکسیداز ضد IgG موش به نسبت ۱/۳۰۰۰ در PBST حاوی ۵ درصد شیرخشک رقیق و به حفرات اضافه شد (۵۰ میکرولیتر به ازای هر حفره). پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، محتویات پلیت تخلیه و حفرات مانند قبل شستشو شدند. سپس محلول کروموژن – سوبسترا (تترامتیل بنزیدین + استات سدیم + آب اکسیژنه) به میزان ۵۰ میکرولیتر به تمام حفرات اضافه و ده دقیقه در تاریکی، در دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول اسید کلریدریک ۱ مولار (محلول توقف) متوقف شد. در پایان، پلیت با استفاده از دستگاه خوانش الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد.

نتایج

بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب MBP-G1

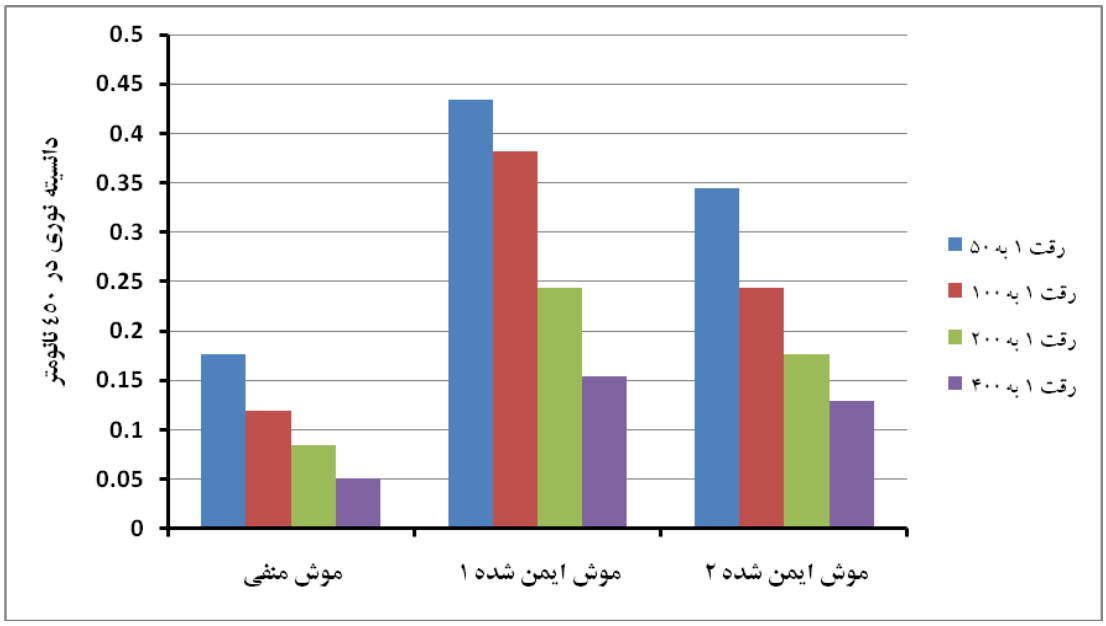
بیان پروتئین G1 با استفاده از PAGE-SDS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج الکتروفورز روی ژل اکریلامید نشان داد که باکتری حاوی سازه نوترکیب مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG، حاوی یک پروتئین جدید در محدوده ۵۸ کیلو دالتون بود که با وزن مولکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی (با احتساب وزن مولکولی تقریبی ۱۶ کیلو دالتون برای پروتئین حاصل از ناحیه کلون شده ژن G1 و ۴۲ کیلو دالتون برای پروتئین MBP کد شده توسط پلاسمید) تقریباً همخوانی داشت (تصویر ۱). بررسی حلالیت پروتئین بیانی نشان داد که این پروتئین به میزان بیشتری در فاز مایع قرار داشت و در نتیجه محلول و به سهولت قابل خالص‌سازی بود (تصویر ۱). پلاسمید pMalc2x استفاده شده در این تحقیق دارای پروموتر قوی *lac* است که موجب بیان موثر و بیشتر پروتئین در مقایسه با بسیاری از پلاسمیدهای بیانی پروکاریوتی می‌شود. مزیت دیگر استفاده از پلاسمید pMalc2x این است که MBP امکان خالص‌سازی پروتئین بیانی را با استفاده از رزین آمیلوز به نحو مطلوب فراهم می‌کند. رزین آمیلوز نسبت به سایر رزین‌های مورد استفاده برای خالص‌سازی پروتئین‌های بیانی در *اشرشیاکلی*، قیمت ارزان‌تری داشته و با جذب پروتئین‌های دارای دنباله MBP به خوبی و با بازده بالا موجب خالص‌سازی این پروتئین‌ها می‌شود (۳).



تصویر ۱- القای بیان پروتئین در باکتری حاوی سازه نوترکیب pMALc2x-G1. ستون ۱: مارکر پروتئینی (سیناژن)؛ ستون‌های ۲ و ۳: به ترتیب باکتری حاوی پلاسمید pMALc2x قبل و بعد از بیان؛ ستون‌های ۴ و ۵: به ترتیب باکتری حاوی سازه نوترکیب pMALc2x-G1 قبل و بعد از بیان؛ ستون‌های ۶ و ۷: به ترتیب رسوب و مایع رویی باکتری بیان کننده پروتئین MBP-G1 پس از سونیکاسیون و ستون ۸: پروتئین خالص MBP-G1.

واکنش‌پذیری پروتئین نوترکیب MBP-G1 در آزمایش الایزای غیر مستقیم خانگی

به منظور بررسی واکنش‌پذیری پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در باکتری *اشرشیاکلی* از یک آزمایش الایزای غیر مستقیم خانگی استفاده شد. در این آزمایش از پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده کف پلیت و از سرم موش‌های ایمن شده با واکسن تجاری BEF به عنوان آنتی بادی اولیه در رقت‌های ۱ به ۵۰ تا ۱ به ۴۰۰ استفاده شد. نتایج آزمایش الایزا و دانسیته نوری موش‌های ایمن شده با واکسن و موش منفی در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان طور که از نمودار ۱ مشخص است دانسیته نوری مربوط به سرم موش‌های ایمن شده با واکسن در مقایسه با سرم موش منفی افزایش قابل توجهی داشت. نتایج آزمایش الایزا نشان داد که پروتئین نوترکیب MBP-G1 توانایی واکنش با سرم موش‌های ایمن شده با واکسن تجاری تب بی‌دوام گاوی و شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس BEF را داشت. بنابراین می‌توان پروتئین همجوش MBP-G1 بیان شده در *اشرشیاکلی* را به عنوان یک نامزد مناسب جهت طراحی کیت الایزا برای شناسایی گاومیش‌های آلوده به ویروس BEF معرفی نمود.



نمودار ۱- دانسیته نوری مربوط به سرم موش‌های ایمن شده با واکسن تجاری BEF در مقایسه با سرم موش منفی در آزمایش الایزا. در این آزمایش از پروتئین نوترکیب MBP-G1 به عنوان آنتی‌ژن پوشاننده کف پلیت و از سرم موش‌ها در چهار رقت ۱ به ۵۰ تا ۱ به ۴۰۰ استفاده شد.

بحث

تاکنون دو مطالعه در زمینه کلونینگ و بیان ژن G1 به منظور طراحی کیت تشخیصی الایزا برای ویروس BEF صورت گرفته است. در تحقیقی، ژن G1 از ویروس BEF درون ناقل بیانی pGEX-4T-1 کلون و در سویه (DH3) BL21 از *اشرشیاکلی* بیان شد (۹). وزن مولکولی پروتئین بیان شده در حدود ۴۲ کیلو دالتون بود که با وزن مورد انتظار برای پروتئین همجوش (شامل ۱۶~ کیلو دالتون برای پروتئین G1 و ۲۶~ کیلو دالتون برای پروتئین GST بیان شده توسط پلاسمید pGEX-4T-1) همخوانی داشت. این محققان با موفقیت توانستند از این پروتئین نوترکیب جهت طراحی کیت تشخیصی الایزا برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس BEF استفاده کنند (۱۰). در مطالعه دیگر، ژن اپیتوپ G1 از ویروس BEF درون ناقل بیانی pPIC9K کلون و در مخمر *پیکیا پاستوریس* GS115 بیان گردید (۸). این محققان نشان دادند که پروتئینی با وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون بدست آمد که بسیار بزرگتر از اندازه پیش بینی شده بود. اما پس از دِگلیکوزیلاسیون توسط آنزیم *Endo H* وزن مولکولی پروتئین به ۱۶ کیلو دالتون کاهش یافت. وزن مولکولی مورد انتظار برای پروتئین G1 حدود ۱۶ کیلو دالتون است ولی با توجه به اینکه توالی این ژن شامل سه جایگاه بالقوه برای گلیکوزیلاسیون می‌باشد (۴)، قطعاً می‌توان نتیجه‌گیری نمود که پروتئین G1 یک گلیکوپروتئین است. پروتئین G1 نوترکیب بیان شده در مخمر *پیکیا پاستوریس* به عنوان آنتی‌ژن پوششی برای تولید کیت الایزای غیرمستقیم برای تشخیص ویروس BEF با موفقیت مورد استفاده قرار گرفت (۷).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین نوترکیب MBP-G1 بیان شده در *اشرشیاکلی* توانایی واکنش با سرم موش‌های ایمن شده با واکسن تجاری تب بی‌دوام گاوی و شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس BEF را داشت. بنابراین می‌توان این پروتئین نوترکیب را به عنوان یک نامزد مناسب جهت طراحی کیت الایزا برای شناسایی گاومیش‌های آلوده به ویروس BEF در مطالعات آینده معرفی نمود.

منابع

۱) پسندیده، ر.، بیگی نصیری، م. ت. صیفی آباد شاپوری، م. ر. فیاضی، ج. روشنفکر، ه و لطفی، م. ۱۳۹۵. همسانه‌سازی مولکولی و تعیین توالی ژن گلیکوپروتئین G ویروس تب بی‌دوام گاوی در *اشرشیاکلی*. مجله پژوهش های علوم دامی ایران. جلد ۸، شماره ۳، ص: ۱۰-۱.

2) Beygi Nassiri, MT., Pasandideh, R and Seyfi Abad Shapouri, MR. 2016. Cloning and Expression of the G1 Epitope of Bovine Ephemeral Fever Virus G Glycoprotein in *Escherichia Coli*. G3M. 14: 4250-4255.

3) Fox, JD., Routzahn, KM. Bucher, MH and Waugh, DS. 2003. Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. FEBS Letters. 537:53-57.

4) Jin, H., Li, Y. Yu, K. Yan, J and Liu, B. 2000. Nucleotide sequence of G protein gene of bovine ephemeral fever rhabdovirus JB76H strain. Chin. J. Prev. Vet. Med. 22: 43-47.

5) Trinidad, L., Blasdell, KR. Joubert, DA. Davis, SS. Melville, L. Kirkland, PD. Coulibaly, F. Holmes, EC and Walker, PJ. 2014. Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian episystem. J. Virol. 88: 1525-1535.

6) Walker, PJ and Klement, E. 2015. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. Vet Res. 46: 1-17.

7) Zheng, FY., Lin, GZ. Qiu, CQ. Zhou, JZ. Cao, XA and Gong, XW. 2010. Serological detection of bovine ephemeral fever virus using an indirect ELISA based on antigenic site G 1 expressed in *Pichia pastoris*. Vet. J. 185:211-15.

8) Zheng, FY., Lin, GZ. Qiu, CQ. Yuan, KZ and Song, JY. 2007a. Expression and antigenic characterization of the epitope-G1 of the Bovine ephemeral fever virus glycoprotein in *Pichia pastoris*. Virol. Sin. 22:347-352.

9) Zheng, F.; Lin, G and Qiu, C. 2007b. Expression, purification and antigenic characterization of the Epitope-G1 gene of bovine ephemeral fever virus in *Escherichia coli*. Acta Microbiol. Sin. 47: 498-502.

10) Zheng, Fy.; Lin, Gz. Qiu, Cq. Zhou, Jz. Cao, Xa and Gong, Xw. 2009. Development and application of G1-ELISA for detection of antibodies against bovine ephemeral fever virus. Res. Vet. Sci. 87: 211-212.