کلونینگ و بیان ژن کدکننده پروتئین نوکلئوکپسید ویروس سپتی‌سمی‌هموراژی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در باکتری اشیرشیاکلی

رویا رهنما[۱*]، رحیم پیغان[۲]، مسعود رضا صیفی آباد شاپوری[۳]، آناهیتا رضایی[۴]، نسترن شهبازیان[۵]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۲. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۳. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۴. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۵. استادیار، سازمان دامپزشکی کل کشور، تهران- ایران.

دریافت: ۱۲ آذرماه ۹۶ **پذیرش:** ۲۱ خردادماه ۹۷

چکیده

بیماری ویروسی سپتی‌سمی‌هموراژِی (VHS) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان است که اخیراً در ایران شیوع گسترده‌ای یافته و خسارت‌های بسیار سنگینی را بر پرورش‌دهندگان تحمیل کرده است. به منظور شناسایی و اطمینان از وجود عامل بروز این تلفات، نمونه‌برداری از مزارع پرورشی استان چهارمحال و بختیاری- که کانون اصلی همه‌گیری و تلفات بالا بود- صورت گرفت. ماهیانی که علایم بالینی داشتند، انتخاب شدند و اندام‌های کلیه قدامی، طحال، قلب و مغز آن‌ها جدا و در الکل ۷۰ درصد ذخیره گردید. بر اساس آزمایش RT-PCR، بیماری VHS تأیید شد، سپس برای استفاده در بررسی سرولوژیک VHS، یک قطعه از ژن نوکلئوکپسید (N) ویروس VHS، با پرایمرهای پیشنهادی OIE و اندکی تغییر، تکثیر شد و قطعه موردنظر در وکتور PMAL-C2X کلون و سپس در باکتری اشیرشیاکلی Rosetta بیان گردید. پروتئین بیانی با کمک ستون کروماتوگرافی رزین آمیلوز خالص گردید. پروتئین هدف با وزن ۶۱KDa از طریق SDS-PAGE و متعاقب آن ایمونوبلاتینگ ارزیابی شد. مشاهده بیان پروتئین با وزن ملکولی قابل انتظار در SDS-PAGE و واکنش مثبت این پروتئین با سرم موش ایمن شده با پروتئین MBP در ایمونوبلات نشان دهنده بیان موفق این قطعه از پروتئین در باکتری اشیرشیاکلی بود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین نوترکیب نوکلئوکپسید، ویروس سپتی‌سمی‌هموراژی، قزل‌آلا.

مقدمه

در دهه‌های اخیر صنعت آبزی‌پروری در همه دنیا و خصوصاً کشور ما رشد قابل توجهی داشته و به یک صنعت در حال توسعه تبدیل شده است. طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل ویروسی منجر به بروز بیماری در ماهی و مرگ و میر در پرورش متراکم و نیمه‌متراکم ماهیان می‌شوند. شیوع بیماری‌های ویروسی تلفات بالا، خسارت‌های شدید اقتصادی و تأثیرات مهم اکولوژیکی را به همراه دارند. یکی از مشکلات گریبان‌گیر صنعت آبزی‌پروری کشور در سال‌های اخیر، شیوع بیماری‌های واگیردار در مزارع پرورشی آبزیان است. در این میان بیماری ویروسی سپتی‌سمی‌هموراژِی (VHS) یکی از خطرناک‌ترین بیمارهای ویروسی است که موجب تلفات زیاد در مزارع پرورشی قزل‌آلا شده و به عنوان یکی از جدی‌ترین بیماری‌های آبزی‌پروری مطرح بوده است (۷، ۹ و ۲۸).

حساس‌ترین گونه ماهی در برابر بیماری سپتی‌سمی‌هموراژی ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: royarahnama60@yahoo.com

(*Onchorhynchus mykiss*) است (۳۲). این بیماری به دلیل تخریب سلول‌های آندوتلیالی عروق ماهی توسط ویروس موجب، بروز علایم کلینیکی مانند خون‌ریزی در سطح بدن و اندام‌های داخلی و در نهایت منجر به مرگ می‌شود (۲۵). ویروس VHS یک پراکنش گسترده در گونه‌های مختلف ماهیان دریایی و آب شیرین دارد که نشان‌دهنده پتانسیل خطر در گسترش این بیماری به جمعیت ماهیان وحشی و بین مزارع مختلف است (۱۲)؛ بنابراین تشخیص سریع و صحیح عامل بیماری برای جلوگیری از گسترش آن ضروری به نظر می‌رسد. این ویروس (VHSV)، متعلق به جنس *NovirhabdoVirus* از خانواده Rhabdoviridae است که یک RNA تک‌رشته‌ای با وزن تقریبی حدود ۱۱/۱Kb (۱۱۱۸۵) نوکلئوتید دارد (۳، ۱۸ و ۳۲).

ژنوم ویروس VHS شش ژن دارد که شامل پنج پروتئین ساختاری: نوکلئوپروتئین (N)، فسفوپروتئین (P)، پروتئین ماتریکس (M)، گلیکوپروتئین (G)، RNA پلیمراز (L) و یک پروتئین غیرساختاری (NV) است (۶ و ۱۶). بعد از آلودگی، شش ژن به تدریج از سمت '۳ به '۵ رونویسی می‌شوند. با توجه به این که ژن N در انتهای '۳ قرار دارد در نتیجه فراوان‌ترین ژن بوده، بنابراین برای آزمون‌های تشخیصی، به عنوان ژن هدف استفاده می‌شود (۱۲). این پروتئین به همراه گلیکوپروتئین G ایمنی‌زاترین پروتئین‌های VHSV هستند و قادرند پاسخ قوی آنتی‌بادی را در بدن میزبان برانگیزند؛ بنابراین پروتئین N قابلیت استفاده به عنوان یک آنتی‌ژن تشخیصی مناسب در آزمایش‌های الایزا یا تولید واکسن VHS را دارد و همواره در پژوهش‌های گوناگون به عنوان یک گزینه آنتی‌ژنی مهم در ایمن‌سازی بررسی شده است (۷، ۱۴، ۱۶ و ۳۳).

دلیل انتخاب پروتئین N ویروس VHS برای استفاده در آزمون الایزا را می‌توان چنین بیان کرد که: ۱- پروتئین نوکلئوکپسید (N)، بیشترین فراوانی را در بین پنج پروتئین ساختاری ویروس VHS دارد و می‌تواند پتانسیل آنتی‌ژنیکی برای تحریک ایمنی سلولار و تولید آنتی‌بادی ضد نوکلئوکپسید با فعالیت ضد ویروسی را داشته باشد. ۲- این پروتیئن ثبات بیشتری نسبت به دیگر پروتئین‌های ویروس دارد، بنابراین برای استفاده در آزمون‌های سرولوژیکی مانند الایزا می‌تواند به عنوان یک گزینه مناسب باشد. ۳- جایگزینی پروتئین نوترکیب N در الایزا به جای ویروس VHS، نیاز به کشت ویروس و خالص‌سازی دارد و همچنین امکان آلودگی را کاهش می‌دهد.

مهم‌ترین ویژگی پژوهش حاضر که آن را از پژوهش‌های مشابه متمایز می‌کند، استفاده از پروتئین نوترکیب N ویروس VHS بوده که یک پروتئین فراوان و ایمنوژن در ساختار ویروس است؛ بنابراین این پروتئین نوترکیب نیاز به کشت و خالص‌سازی ویروس برای استفاده در الایزا را کاهش می‌دهد و از سویی چون نسبت به دیگر پروتئین‌های ساختاری ویروس فراوانی و ثبات بیشتری دارد، احتمالاً می‌تواند آنتی‌بادی‌هایی که علیه سروتیپ‌های مختلف است، را شناسایی کند. مطالعه حاضر با هدف کلونینگ و بیان ژن پروتئین N در اشرشیاکلی انجام شد تا درمطالعات بعدی از این پروتئین به عنوان آنتی‌ژن در الایزا یا ایمن‌سازی ماهیان قزل‌آلا ارزیابی شود.

مواد و روش کار

برای جداسازی ویروس به روش RT-PCR از ۷ مزرعه در استان چهارمحال و بختیاری که کانون همه‌گیری این بیماری بود، (حداقل تعداد ۲۱ قطعه ماهی، از هر مزرعه ۳ قطعه ماهی) نمونه‌برداری شد. نمونه‌های تهیه شده از این ماهیان شامل بافت‌های کلیه، طحال، قلب و مغز بود که به صورت جداگانه در الکل ۷۰ درصد و ظروف استریل قرار گرفته و در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا موقع انجام آزمایش نگه‌داری شدند (۵).

برای استخراج RNA، کلیه قدامی، قلب، طحال و مغز ماهیان موردنظر برداشته شد و در نیتروژن مایع، پودر گردید. برای استخراج RNA از محلول تجاری RNXplus (سیناژن، ایران) استفاده شد و مطابق پروتکل ذکر شده به انجام رسید (۳۱)، سپس از کیت ساخت cDNA AccuPower® RocketScript™ (RT PreMix kit) ساخت شرکت Bioneer (کره جنوبی) و در حضور پرایمر معکوس، cDNA ساخته شد. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه (جدول ۱) ازجمله پرایمرهایی پیشنهاد شده OIE بوده‌اند (۲۰). برای اطمینان از صحت توالی تکثیر یافته در RT-PCR و استفاده از این توالی برای بیان پروتئین در مراحل بعدی، یکی از محصولات PCR که توسط آنزیم Taq و پرایمرهای اختصاصی ناحیه‌ای از ژن N ساخته شده بود، با روش TA کلونینگ به پلاسمید PTZ57R/T انتقال داده شد؛ سپس پلاسمید نوترکیب به دست آمده در باکتری اشیرشیاکلی سویه DH5α تکثیر شد و پس از تخلیص با کیت استخراج پلاسمید (ویوانتیس، مالزی)، پلاسمید نوترکیب برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. پس از توالی‌یابی، توالی دریافت شده به کمک برنامه‌های کامپیوتری (BLAST) با اطلاعات موجود در بانک ژنی بررسی شد.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده برای تشخیص ژن نوکلئوکپسید (N) ویروس VHS

پرایمر	VHS-N
مستقیم	5'- GCGGTGAAGTGCTGCAGTTCCC -3'
معکوس	5'- ATGGAAGAAGAAATTCGTGAAGCG -3'

در این پژوهش از باکتری *اشیرشیاکلی*(*Escherichia coli*) سویه‌های DH5α و Rosetta استفاده شد. باکتری *E.coli* سویه DH5α به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر سازه‌های ایجاد شده و از سویه Rosetta به منظور بیان ژن N ویروس VHS استفاده شد.

پس از تأیید ویروس VHS، کلونینگ قطعه موردنظر از ژن N انجام شد. بدین منظور به پرایمرهای مربوط به ژن N که پیشنهاد شده OIE بوده‌اند، توالی جایگاه برش آنزیم‌های محدودکننده *BamHI* و *HindIII* به ترتیب در انتهای ۵'پرایمرهای Forward و Reverse افزوده شدند (جدول ۲).

جدول ۲- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای با جایگاه برشی مورد استفاده به منظور کلونینگ ژن نوکلئوکپسید (N) ویروس VHS

پرایمر	VHS-N
مستقیم	*BamHI* 5'- TAATGGATCCGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG -3'
معکوس	*Hind*III 5'- TTATAAGCTTTCAGGTGAAGTGCTGCAGTTCCC -3'

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای با جایگاه برشی، آنزیم DNA پلیمراز PFU و پلاسمید PTZ57R/T نوترکیب حاوی ژن N طی مراحل زیر، انجام شد: مقدار ۵ میکرولیتر بافر PFU (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر آنزیم PFU، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر کدام از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۱ میکرولیتر الگو (پلاسمید PTZ57R/T)، ۲/۵ میکرولیتر MgCl2 (۵۰mM)، ۱ میکرولیتر dNTPs mix (۱۰mM) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط و تکثیر ژن موردنظر با برنامه دمایی۹۴ درجه ۳ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۹۰ ثانیه و در آخر ۷۲ درجه ۷ دقیقه صورت گرفت (۲۰). محصول

PCR، در ژل آگارز ۱ درصد و در کنار نشانگر DNA، الکتروفورز گردید.

پس از انجام PCR، محصول PCR و پلاسمید pMAL-c2X خالص شده با کیت استخراج پلاسمید شرکت Fermentas (Gene JET^{TM} Plasmid Miniprep kit) با آنزیم محدودکننده *BamHI* (Fermentas، لیتوانی) برش داده شد و بعد از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ با کیت استخراج DNA از ژل (شرکت Vivantis، مالزی) خالص شدند. برای واکنش لیگاسیون بین پلاسمید و محصول PCR از آنزیم لیگاز T4 (Fermentas، لیتوانی) و طبق دستوالعمل آنزیم استفاده شد. به منظور ترانسفورماسیون، از سویه DH5α باکتری *E.Coli* پذیرا شده توسط کلرید کلسیم استفاده شد و در پایان، باکتری‌ها در محیط LB جامد آمپی‌سیلین‌دار کشت داده شدند. پس از رشد کلون‌های باکتریایی، غربالگری کلون‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب با روش PCR، هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده و غربالگری کلونی سفید- آبی انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب با کیت استخراج پلاسمید از سه کلونی استخراج گردید و به منظور تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند. پس از اطمینان از صحت کلونینگ، پلاسمید نوترکیب استخراج شده در باکتری مستعد *E.coli* سویه بیانی Rosetta به روش شوک حرارتی ترانسفورمه گردید؛ سپس یک کلون باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب پس از کشت شبانه، در محیط LB مایع دارای آمپی‌سیلین (۱۰۰μg/ml، شرکت جابرابن حیان، ایران) و گلوکز (۲٪) به نسبت ۱ به ۱۰۰ کشت داده شد. با رشد باکتری و رسیدن به کدورت ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به منظور القا بیان پروتئین، IPTG (ایزوپروپیل بتا دی‌گالاکتوپیرانوزید، شرکت Vivantis، مالزی) با غلظت نهایی ۱ mM اضافه شد و کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه تا ۲ ساعت ادامه یافت (۱۳). نمونه‌های تهیه شده پیش و پس از افزودن IPTG، با الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید (با غلظت اکریل آمید ۴ درصد در بخش متراکم کننده و ۱۰ درصد در بخش جدا کننده) و رنگ‌آمیزی ژل با رنگ آبی کوماسی (AppliChem، آلمان)، از نظر بیان ارزیابی شدند. برای بررسی حلالیت پروتئین بیانی، ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری القا شده با IPTG سانتریفیوژ گردید (با قدرت ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) و رسوب باکتری در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS) مخلوط شد، سپس باکتری مخلوط شده در PBS به مدت۲۰ دقیقه سونیکه شد تا پروتئین‌های محلول در فاز مایع وارد شوند. پس از سونیکاسیون، سوسپانسیون باکتری با قدرت ۹۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده از این مرحله به عنوان پروتئین‌های نامحلول و مایع روی رسوب به عنوان پروتئین‌های محلول برداشت و آزمایش SDS-PAGE انجام شد (۱۳). پس از اطمینان از بیان پروتئین نوترکیب، مرحله بعدی خالص‌سازی این پروتئین با ستون کروماتوگرافی رزین- آمیلوز بود. کلیه مراحل تخلیص مطابق با پروتکل راهنمای استفاده از پلاسمید pMAL-c2X (۱۳) انجام شد. حضور این پروتئین نوترکیب در نمونه‌های جمع‌آوری شده با SDS-PAGE بررسی گردید.

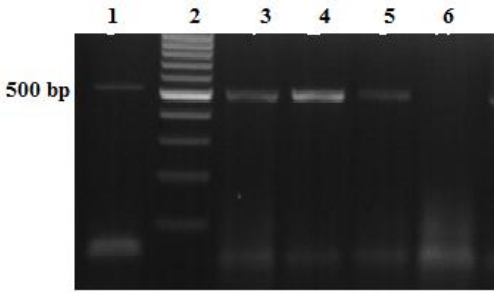
به منظور اطمینان از بیان صحیح پروتئین موردنظر از آزمایش وسترن بلاتینگ استفاده شد. پروتئین (N) پس از خالص‌سازی همراه با پروتئین MBP در ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند، همچنین از سرم یک سر موش Balb/C ایمن شده با پروتئین MBP (به عنوان آنتی‌بادی اولیه) استفاده شد، سپس پروتئین‌ها در ۳ ساعت و با ولتاژ ۶۰ به غشا نیتروسلولز انتقال داده شدند (۱). پس از انتقال، کاغذ در محلول بلوک کننده Skim (%۵milk در PBST) به مدت یک شب در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت، کاغذ، سه مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با بافرPBST شسته شد (۱ و ۱۳).

غشا نیتروسلولز به مدت ۹۰ دقیقه در بافر بلاک کننده حاوی رقت ۱:۱۰۰۰ از سرم یک سر موش Balb/C ایمن شده با پروتئین MBP قرار گرفت. غشاء نیتروسلولز پس از ۳ بار شست و شو با PBST به مدت ۱ ساعت در بافر بلوک کننده حاوی رقت ۱:۵۰۰۰ آنتی‌بادی کونژوگه پراکسیداز ضد IgG موش (Komabiotech، کره) قرار داده شد. پس از انجام شست و شو شامل ۲ مرحله شست و شو با PBST و یک مرحله شست و شوی نهایی با PBS معمولی، غشا در محلول ظهور قرار داده شد. محلول ظهور از مخلوط دو محلول A (حاوی ۳۰ میلی‌گرم کروموژن آلفا کلرونفتول در ۱۰ میلی‌لیتر متانول سرد) و محلولB (حاوی ۱۰۰ میکرولیتر H2O2 در ۵۰ میلی‌لیتر PBS) به دست می‌آمد که بلافاصله قبل از مصرف و به صورت تازه تهیه می‌شد. کاغذ نیتروسلولز برای ظهور به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در این محلول قرار داده شد. با مشاهده مناطق حاوی باند پروتئینی به رنگ آبی نفتی، محلول ظهور تخلیه و به منظور توقف واکنش، کاغذ نیتروسلولز با آب معمولی شسته شد (۱ و ۳۴).

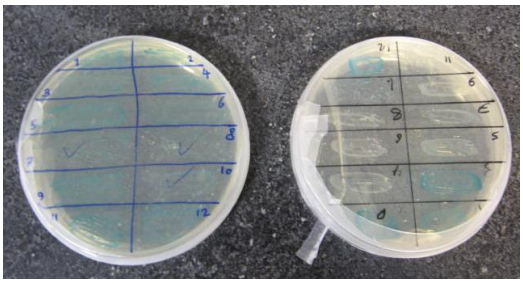
نتایج

پس از ساخت cDNA و انجام واکنش PCR، محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ در کنار مارکر ۱Kb(Fermentas، لیتوانی) به عنوان استاندارد، الکتروفورز شد (شکل ۱). الکتروفورز محصول PCR، روی ژل آگارز ۱ درصد و در کنار مارکر DNA نشان‌دهنده ساخت یک قطعه DNA به طول تقریبی ۵۰۵ جفت باز (bp) شده است که با نتیجه قابل انتظار هم‌خوانی داشت (شکل ۱). پس از انجام مرحله اتصال محصول PCR و پلاسمید pMAL-c2X برش داده شده با آنزیم محدودکننده، ترانسفورماسیون محصولات اتصال یافته در سویه DH5α باکتری *E.coli* انجام شد و ظهور کلونی‌های رشد یافته روی محیط جامد LB آمپی‌سیلین‌دار، نشان‌دهنده ورود موفق پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در باکتری‌ها بود. پس از اطمینان از صحت کلونینگ با غربالگری به وسیله (شکل ۲) PCR و هضم آنزیمی، بیان پروتئین N در SDS- PAGE بررسی شد. همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص شده است، باکتری مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG، حاوی پروتئینی جدید در محدوده ۶۱ کیلودالتون است که با وزن مولکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی (با احتساب ۱۸/۵ کیلودالتون برای پروتئین نوکلئوکپسید و ۴۲/۵ کیلودالتون برایMBP) هم‌خوانی دارد، همچنین تعیین توالی پلاسمید نوترکیب توسط پرایمرهای یونیورسال M13 F و MalE صحت تکثیر و کلونینگ ژن را تأیید کرد. بررسی حلالیت پروتئین بیانی با روش ذکر شده در بخش مواد و روش کار نشان داد که این پروتئین کاملا در فاز مایع قرار دارد و به سهولت قابل خالص‌سازی است.

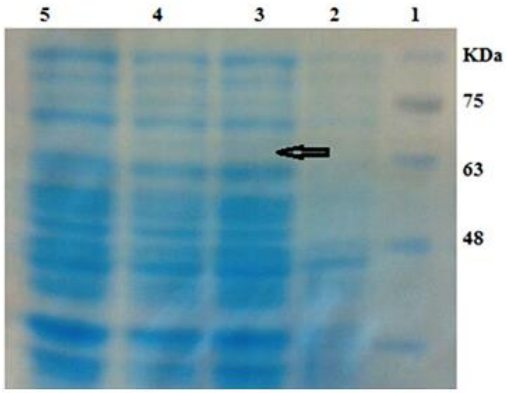
به منظور اطمینان از صحت بیان پروتئین موردنظر از آزمایش وسترن بلاتینگ استفاده شد. پروتئین (N) پس از خالص‌سازی همراه با پروتئین MBP در ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شد. وسترن بلات پروتئین‌های خالص شده حضور چند باند پروتئینی به رنگ تیره در محدوده وزن مولکولی ۶۳ تا ۴۵ کیلودالتون را نشان داد که بیانگر تولید پروتئینی با وزن تقریباً قابل انتظار است؛ اما در باکتری دچار شکستگی‌های پروتئولیتیک شده است (شکل ۴)؛ بنابراین پروتئین بیان شده از لحاظ ساختاری حاوی اپی تاپ‌های آنتی‌ژنیک ویروسی است.



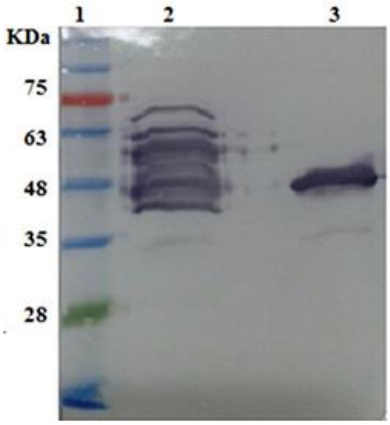
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR برای تشخیص ویروس VHS، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲: مارکر DNA ۱ کیلوباز (اندازه برخی از قطعات مارکر بر حسب زوج باز نشان داده شده است.)، ستون ۳، ۴ و ۵ محصول RT-PCR و ستون ۶ کنترل منفی.



شکل ۲- غربالگری سفید و آبی. کلونی‌های آبی در پلیت سمت چپ بیانگر عدم ترانسفورماسیون ژن در پلاسمید است و کلونی‌های سفید موجود در پلیت سمت راست نشان دهنده ترانسفورماسیون صحیح ژن در پلاسمید هستند.



شکل ۳- الکتروفورز محصولات آزمون بیان پروتئین N ویروس VHS، ستون ۱: استاندارد وزن مولکولی پروتئین، ستون ۲: کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب، قبل از القا با IPTG، ستون ۴، ۳ و ۵: کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب، بعد از القا با IPTG. موقعیت پروتئین نوترکیب (۶۱ KDa) با فلش مشخص شده است.



شکل ۴- واکنش پروتئین نوترکیب N بیان شده با سرم موش تلقیح شده با MBP در آزمایش ایمنوبلات. ستون ۱: استاندارد وزن مولکولی پروتئین، ۲: یکی از فرکشن‌های پروتئین نوترکیب تخلیص شده، ۳: پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP).

بحث

اگرچه پژوهش‌ها برای توسعه واکسن علیه بیماری VHS برای سه دهه در حال انجام است؛ اما تاکنون هیچ واکسن تجاری برای آن در دسترس نیست (۱۶) و این بیماری ویروسی تاکنون توانسته است همه ماهیان یک مزرعه را درگیر و خسارت‌های فراوانی ایجاد کند. تنها راه جلوگیری از بیماری‌های ویروسی نابود کردن ماهیان آلوده، جلوگیری از شیوع بیماری‌های ویروسی با اجرای قرنطینه مناسب و جلوگیری از انتقال ماهیان آلوده به سایر مناطق و در برخی موارد واکسیناسیون است. ویروس VHS یک پراکنش گسترده در گونه‌های مختلف ماهیان دریایی و آب شیرین دارد که نشان‌دهنده پتانسیل خطر در گسترش این بیماری به جمعیت ماهیان وحشی و بین مزارع مختلف است (۱۲)، بنابراین تشخیص سریع و صحیح عامل بیماری برای گسترش آن ضروری به نظر می‌رسد. پس از انجام آزمایش RT-PCR و مقایسه این توالی با توالی‌های دیگر این ژن در بانک ژن نشان داد که توالی نوکلئوتیدی محصول PCR کلون شده، ۱۰۰٪ با توالی قابل انتظار از ژن N شباهت دارد.

تاکنون پژوهشگران زیادی از روش‌های مولکولی برای شناسایی اختصاصی ویروس VHS استفاده کرده‌اند. روش مولکولی اطلاعات وسیعی را در مورد نوع ویروس و مولکولار اپیدمیولوژی آن عرضه می‌کند. نتایج به دست آمده پژوهشگران نشان داده است که تعیین توالی ژن‌های N و G یک روش دقیق و مناسب برای شناسایی ویروس VHS و بررسی تنوع ژنتیکی بین آن‌هاست (۳، ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۲، ۳۰ و ۳۲).

در مطالعه حاضر، هدف از کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب N ویروس VHS، در باکتری *E.coli*، تولید این پروتئین برای استفاده در پژوهش‌های آینده و ارزیابی سرولوژیک ماهیان مشکوک به بیماری VHS بود. پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش با موفقیت امکان تکثیر قطعه ژنی موردنظر را میسر کردند و محصول PCR نیز با موفقیت در پلاسمید بیانی pMal-c2X کلون و در سویه Rosetta باکتری *E.coli* بیان گردید.

یکی از معایب بیان پروتئین‌های هترولوگ در *E.Coli* تولید اشکال نامحلول پروتئین بیانی به شکل گنجیدگی است که نسبتاً به فراوانی روی می‌دهد؛ اما استفاده از پلاسمید pMAL-c2x تا حد بسیار زیاد موجب رفع این مشکل می‌شود؛ زیرا MBP کد شونده با این پلاسمید به عنوان یکی از مؤثرترین عوامل محلول کننده پروتئین‌های با قابلیت تشکیل گنجیدگی محسوب می‌شود و استفاده از پلاسمید pMAL-C2X تاحد زیادی به دلیل این ویژگی MBP است (۱۰). پلاسمید pMAL-c2x استفاده شده در این مطالعه پروموتری قوی دارد که موجب بیان بیشتر پروتئین در مقایسه با بسیاری از پلاسمیدهای بیانی پروکاریوتی می‌شود. مزیت دیگر استفاده از پلاسمید pMAL-c2x این است که MBP ضمن کمک به بیان پروتئین‌های هترولوگ به شکل محلول، امکان خالص‌سازی پروتئین بیانی را نیز با رزین آمیلوز به نحو مطلوب میسر می‌کند. رزین آمیلوز یکی از ارزان‌ترین رزین‌های استفاده شده برای خالص‌سازی پروتئین‌های بیانی در *E. Coli* محسوب می‌شود.

بررسی منابع نشان داد که Lorenzen و همکاران در سال ۱۹۹۳(۱۷) با هدف ایمن‌سازی ماهیان قزل‌آلا اقدام به تولید پروتئین نوترکیب گلیکوپروتئین (G) ویروس VHS در باکتری اشیرشیاکلی کردند، همچنین آن‌ها از پلاسمید pCMHV و میزبان *E. coli* برای کلونینگ و بیان استفاده کردند؛ پروتئین حاصل کاملاً به صورت نامحلول بیان و منجر به تشکیل گنجیدگی در باکتری شده بود که با نتیجه این پژوهش مغایرت داشت؛ زیرا استفاده از وکتور pMal-c2X موجب شده که بخشی از پروتئین بیان شده در *E.coli* به صورت محلول باشد.

دلیل انتخاب پروتئین N ویروس VHS برای استفاده در آزمون الایزا در این پژوهش را می‌توان چنین بیان کرد که پروتئین نوکلئوکپسید (N)، بیشترین فراوانی در بین پنج پروتئین ساختاری ویروس VHS را دارد و می‌تواند پتانسیل آنتی‌ژنیکی برای تحریک ایمنی سلولار و تولید آنتی‌بادی ضد نوکلئوکپسید با فعالیت ضدویروسی را داشته باشد؛ اما به هر حال مطالعات روی پروتئین N نتایج متفاوتی را نشان داده است (۱۵ و ۲۹)، همچنین در مطالعه Lorenzen و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۱۶) سطح حفاظتی نسبتاً پایینی را بعد از ایمن‌سازی ماهیان قزل‌آلا با DNA واکسن حاوی ژن نوکلئوکپسید گزارش کردند؛ اما نتایج مطالعه Lorenzen و همکاران (۱۴) که به بررسی کارآیی DNA واکسن کدکننده ژن N و G از ویروس VHS در ماهیان انگشت قدی پرداخته بودند، نشان داد که علاوه بر DNA واکسن ژن G، DNA واکسن N نیز توانست سطح حفاظتی نسبتاً خوبی را ایجاد کند، همچنین Oberg و همکاران (۱۹) افزایش کارآیی DNA واکسن زیر واحد G، با افزودن پروتئین N را گزارش کردند؛ البته برخی پژوهشگران عدم بهبود و تأثیر پروتئین N را در ایجاد حفاظت علیه رابدو ویروس‌ها بیان کردند (۲، ۴، ۲۶ و ۲۷). این پژوهشگران دلیل وجود

تفاوت در ایمن‌سازی ماهیان با DNA واکسن N ویروس را به وجود تفاوت در سایز ماهیان مورد بررسی در مطالعات مختلف ذکر کردند به طوری که در مطالعاتی که ماهیان وزن بالاتری داشتند، سطح حفاظتی بیشتری ایجاد شده است. آن‌ها همچنین نیاز به مطالعات بیشتر برای تأثیر پروتئین‌های داخلی ویروس VHS در میزان سطح حفاظت را یادآور شدند. این پروتیئن ثبات بیشتری نسبت به دیگر پروتئین‌های ویروس دارد بنابراین برای آزمون‌های سرولوژیکی مانند الایزا، می‌تواند یک گزینه مناسب باشد. علی‌رغم این که DNA واکسن ژن G سطح حفاظتی نسبتاً بالایی را ایجاد می‌کند؛ اما به دلیل تغییراتی که در این ژن رخ می‌دهد توصیه شده است که همراه آن DNA واکسن ژن N نیز استفاده شود، خصوصاً زمانی که احتمال وجود سروتیپ‌های مختلف ویروس وجود دارد؛ همچنین ثبات ژن N یک مزیت استفاده از آن را به عنوان واکسن مشخص می‌سازد (۱۱، ۱۴، ۲۲ و ۲۴).

جایگزینی پروتئین نوترکیب N در الایزا به جای ویروس VHS، نیاز به کشت ویروس و خالص‌سازی و همچنین امکان آلودگی را کاهش می‌دهد. برخی پژوهشگران (۲۱ و ۲۳)، به جای استفاده از ویروس، از ایمنوگلوبولین خرگوشی ضدویروس VHS استفاده کرده و مزیت این جایگزینی را عدم نیاز به کشت ویروس و خالص‌سازی و کاهش احتمال آلودگی بیان کرده‌اند.

مهم‌ترین ویژگی مطالعه حاضر، کلونینگ پروتئین نوترکیب N ویروس VHS است که یک پروتئین فراوان و ایمنوژن در ساختار ویروس است، لذا این پروتئین نوترکیب نیاز به کشت و خالص‌سازی ویروس به منظور استفاده در الایزا را کاهش می‌دهد از سویی چون نسبت به دیگر پروتئین‌های ساختاری ویروس فراوانی و ثبات بیشتری دارد، احتمالاً می‌تواند آنتی‌بادی‌هایی که علیه سروتیپ‌های مختلف است را شناسایی کند. علی‌رغم موفقیت و تولید پروتئین نوترکیب، برای رسیدن به شرایط استاندارد و اپتیمایز شده برای انجام آزمون سرولوژیک در صنعت آبزی‌پروری ایران، نیاز به پژوهش‌های گسترده‌ای برای بهینه‌سازی روش کار است. امید است تولید این پروتئین نوترکیب بتوانند در تهیه برنامه‌ای مدون به منظور کنترل عفونت‌های ناشی از ویروس VHS استفاده شود تا بتوان از خسارات اقتصادی قابل ملاحظه ایجاد شده توسط این بیماری جلوگیری کرد.

منابع

1- Al-Harbi, A. H; Truax, R. and Thune, R. L; Production and characterization of monoclonal antibodies against tilapia *Oreochromis niloticus* immunoglobulin. Aquacultre; 2000; 188(3: 219-227.

2- Anderson, E. D; Mourich, D. V; Fahrenkrug, S. C; LaPatra, S; Shepherd, J. and Leong, J. A; Genetic immunization of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. Mol. Mar. Biol. Biotechnol.; 1996; 5(2): 114-122.

3- Benmansour, A; Basurco, B; Monnier, A. F; Vende, P; Winton, J. R. and de Kinkelin, P; Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. J. Gen. Virol; 1997; 78: 2837-2846.

4- Corbeil, S; LaPatra, S. E; Anderson, E. D; Jones, J; Vincent, B; Hsu, Y. L. and Kurath, G; Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic

9- Fisheries FAO; Aquaculture Department; Global Aquaculture Production Statistics for the year. 2010.

10- Fox, J. D; Routzahn, K. M, Bucher, M. H. and Waugh, D. S; Maltodextrinbinding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. FEBS Letter, 2003; 537:53-55.

11- Fregeneda-Grandes, J. M. and Olesen, N. J; Detection of rainbow trout antibodies against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) by neutralization test is highly dependent on the virus isolate used. Dis. Aquat. Organ.; 2007; 74(2): 151-158.

12- Garver, K. A; Traxler, G. S; Hawley, L. M; Richard, J; Ross, J. P. and Lovy, J; Molecular epidemiology of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in British Columbia, Canada, reveals transmission from wild to farmed fish. Dis. Aquat. Organ.; 2013; 104(2): 93-104.

13- Haas, A; Brehm, K; Kreft, J. and Goebel, W; Cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of a gene encoding Listeria seeligeri catalase, a bacterial enzyme highly homologous to mammalian catalases. J. Bacterial.; 1991; 173(16): 5159-5167.

14- Lorenzen, E; Carstensen, B. and Olesen, N. J; Inter-laboratory necrosis virus in rainbow trout Oncorhynchus mykiss using DNA vaccines. Dis. Aquat. Organ.; 1999; 39(1): 29-36.

5- Dale, O. B; Ørpetveit, I; Lyngstad, T. M; Kahns, S; Skall, H. F; Olesen, N. J. and Dannevig, B. H; Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. Dis. Aquat. Organ.; 2009; 85: 93-103.

6- Duesund, H; Nylund, S; Watanabe, K; Ottem, K. F. and Nylund, A; Characterization of a VHS virus genotype III isolated from rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*) at a marine site on the west coast of Norway. Virol. J.; 2010; 7: 19.

7- Einer-Jensen, K, Ahrens, P; Forsberg, R. and Lorenzen N., Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. J. Gen. Virol.; 2004; 85: 1167-1179.

8- Elsayed, E; Faisal, M; Thomas, M; Whelan, G; Batts, W. and Winton, J; Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, Esox masquinongy (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sub lineage of the North American genotype. J. Fish Dis.; 2006; 29(10): 611-619.

comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. Dis. Aquat. Organ.; 1998; 37(2): 81-88.

15- Lorenzen, E; Lorenzen, N; Einer-Jensen, K; Brudeseth, B. and Evensen, Ø; Time course study of in situ expression of antigens following DNA vaccination against VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) fry. Fish Shellfish Immunol.; 2005; 19(1): 27-41.

16- Lorenzen, N; Olesen, N. J. and Koch, C; Immunity to VHS virus in rainbow trout. Aquaculture; 1999; 172(1): 41-61.

17- Lorenzen, N; Olesen, N. J. and Jørgensen, P. E. V; Antibody response to VHS virus proteins in rainbow trout. Fish and Shellfish Immunol.; 1993; 3(6): 461-473.

18- Nishizawa, T; Iida, H; Takano, R; Isshiki, T; Nakajima, K. and Muroga, K; Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. Dis. Aquat. Organ.; 2002; 48(2): 143-148.

19- Oberg, L. A; Wirkkula, J; Mourich, D. and Leong, J. C; Bacterially expressed nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus augments protective immunity induced by the glycoprotein vaccine in fish. Virol. J.; 1991; 65(8): 4486-4489.

20- OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals Chapter 2.3.9; viral haemorrhagic septicaemia. OIE; 2009; pp: 279-298.

21- Olesen, J; Lorenzen, N. and Jorgensen, P. E. V; Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. Dis. Aquat. Organ.; 1993; 16: 163-170.

22- Olesen, N. J. and Jorgensen, P. V; Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout Salmo gairdneri under various environmental conditions. Dis. Aquat. Organ.; 1986; 1: 183-189.

23- Olesen, N. J. and Jørgensen, P. E. V; Rapid detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in fish by ELISA. J. Appl. Ichthyol.; 1991; 7(3): 183-186.

24- Olesen, N. J; Lorenzen, N. and Jørgensen, P. E. V; Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. Dis. Aquat. Organ.; 1993; 16: 163-163.

25- Pierce, L. R; Willey, J. C; Palsule, V. V; Yeo, J; Shepherd, B. S; Crawford,

63(1): 35-44.

30- Snow, M; King, J. A; Garden, A; Shanks, A. M. and Raynard, R. S; Comparative susceptibility of turbot Scophthalmus maximus to different genotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus. Dis. Aquat. Organ.; 2005; 67(1-2): 31-38.

31- Soliman, H. and El-Matbouli, M; Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS). Vet. Microbial.; 2006; 114(3): 205-213.

32- Thiery, R; De Boisseson, C; Jeffroy, J; Castric, J; De Kinkelin, P. and Benmansour, A; Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France (1971-1999). Dis. Aquat. Organ.; 2002; 52(1): 29-37.

33- Thompson, T. M; Batts, W. N; Faisal, M; Bowser, P; Casey, J. W; Phillips, K. and Kurath, G; Emergence of Viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. Dis. Aquat. Organ.; 2011; 96(1): 29-43.

34- Towbin, H; Staehelin, T. and Gordon, J; Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and E. L. and Stepien, C. A; Accurate detection and quantification of the fish viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) with a two-color fluorometric real-time PCR assay. PloS one; 2013; 8(8): e71851.

26- Raja-Halli, M; Vehmas, T. K; Rimaila-Pärnänen, E; Sainmaa, S; Skall, H. F; Olesen, N. J. and Tapiovaara, H; Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish rainbow trout farms. Dis. Aquat. Organ.; 2006; 72(3): 201-211.

27- Schyth, B. D; Ariel, E; Korsholm, H. and Olesen, N. J; Diagnostic capacity for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) is greatly increased by combining viral isolation with specific antibody detection. Fish and Shellfish Immunol.; 2012; 32(4): 593-597.

28- Skall, H. F; Olesen, N. J. and Mellergaard, S; Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming–a review. J. Fish Dis.; 2005; 28(9): 509-529.

29- Snow, M; Cunningham, C. O; Melvin, W. T; and Kurath, G; Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. Virus Res.; 1999;

some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A; 1979; 76(9): 4350-4354.

Cloning and expression of viral haemorrhagic septicaemia nucleocapsid (N) gene of Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in *Escherichia coli*

Rahnama, R.[1*]; Peyghan, R.[2]; Seyfi Abad Shapouri, M.R.[3]; Rezaie, A.[4]; Shahbazian, N[5]

1. Ph.D. in Fish Diseases, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.
2. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.
3. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.
4. Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.
5. Assistant Professor, Aquaculture sector, Iranian Veterinary Organization, Tehran- Iran.

Received: 12 December 2017 ***Accepted:*** 11 June 2018

Summary

Septicemia viral disease (VHS) is one of the most important diseases of fish that has recently been developed in Iran and has caused severe damage to breeders. In order to identify the possible cause of the losses, farmed fish were sampled from epicenter where massive mortalities and economic losses had been occurred. Samples were collected from relevant tissues (i.e. liver, kidney, spleen, heart, and brain) of rainbow trout with clinical signs of VHS disease. The samples were stored in 70% ethanol, to perform RT-PCR. Then, recombinant plasmids were tested for protein expression in *E. coli* Rosetta strain. SDS-PAGE analysis indicated the production of a recombinant protein with an expected molecular weight of 61KDa. Thereafter, the recombinant protein was purified by amylose resin and its antigenicity was accessed by immunoblotting using a mouse polyclonal serum prepared against MBP protein. Positive reaction of the expressed protein with anti-MBP protein indicated that the expressed N protein possess antigenic epitopes and could be applied in future immunological studies.

Keywords: Nucleocapsid Recombinant protein, viral hemorrhagic septicemia (VHS), Rainbow trout.

* Corresponding Author E-mail: royarahnama60@yahoo.com