

## کلونینگ و بیان ژن VP3 ویروس بیماری بورس عفونی در اشرشیا کولی و تخلیص پروتئین VP3 نوترکیب

مسعود رضا صیفی آباد شاپوری<sup>۱\*</sup>، مسعود قربانپور<sup>۱</sup>، علی محبت<sup>۲</sup>، محمد رشنو<sup>۲</sup>، غلامرضا دهنوی زاده کازرونی<sup>۳</sup>

۱- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانش آموخته دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۳۰ خرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۰ شهریور ۱۳۹۳

**چکیده:** بیماری بورس عفونی یا گامبورو، یکی از بیماری‌های ویروسی بسیار واگیر طیور است که در صنعت طیور در سراسر جهان باعث زیان‌های اقتصادی می‌شود. از آنجایی که پس از عفونت با ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV) اولین آنتی‌بادی‌ها بر ضد پروتئین ساختمانی VP3 تولید می‌شوند، این پروتئین آنتی ژن مناسبی برای استفاده در الیزا می‌باشد. با توجه به دشوار بودن تهیه VP3 طبیعی از IBDV یا سلول‌های آلوده به ویروس، VP3 نوترکیب بیان شده در اشرشیا کولی می‌تواند آنتی ژن مطلوبی برای این منظور محسوب شود. مطالعه حاضر با هدف کلونینگ ژن VP3 سویه ویروس واکسن D78 در پلاسمید pMal-C2X (یک پلاسمید بیانی پروکاریوتی) و بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب انجام گردید. بنابر این ژن VP3 با آزمایش RT-PCR تکثیر داده شده و پس از هضم با آنزیم‌های محدودگر مناسب در پلاسمید pMal-C2X کلون گردید. پس از تعیین توالی و اطمینان از کلونینگ موفق این ژن، بیان پروتئین نوترکیب با آزمایش SDS-PAGE تایید گردید. در ادامه پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی حاوی رزین آمیلوز خالص شد. بررسی واکنش پروتئین VP3 نوترکیب در آزمایش ایمونوبلاتینگ نشان داد که پروتئین تولید شده از نظر آنتی ژنی فعال می‌باشد. با توجه به راندمان بالای تولید در این سیستم، پروتئین بیان شده کاندیدای مناسبی برای طراحی آزمایش الیزا و سنجش تیتراژ آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری بورس عفونی می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV)، پروتئین VP3، کلونینگ، پلاسمید pMal-C2X

نویسنده مسئول: مسعود رضا صیفی آباد شاپوری

آدرس: اهواز، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی. تلفن: ۱۹-۳۳۳۰۰۱۰ داخلی ۴۱۲۶ همراه: ۰۹۱۶۱۱۳۳۲۴۷

پست الکترونیکی: masoudrs@scu.ac.ir

## مقدمه

بیماری بورس عفونی (Infectious Bursal Disease) یا گامبورو یکی از بیماری‌های بسیار واگیر طیور است که در صنعت طیور در سراسر جهان باعث زیان‌های اقتصادی می‌شود (۴، ۱۴ و ۲۳). عامل ایجاد کننده این بیماری، ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV) است (۹). عفونت با این ویروس در جوجه‌های با سن کمتر از ۳ هفته، می‌تواند موجب یک فرم تحت بالینی بیماری گردد که متعاقباً به علت از دست رفتن عملکرد بورس فابریسیوس به سرکوب شدید سیستم ایمنی می‌انجامد (۱۷). در جوجه‌های بزرگتر از ۳ هفته، بسته به حدت ویروس، عفونت ممکن است به یک بیماری حاد و با تلفات بالا منجر گردد (۸ و ۱۸). کنترل عفونت IBDV در حال حاضر بوسیله واکسیناسیون حاصل می‌شود (۱۴) و سرولوژی برای تعیین روز مطلوب واکسیناسیون بسیار ضروری است (۵). ویروس IBDV از جنس آوی بیروناویروس و از خانواده بیروناویریده است. ژنوم شامل دو قطعه RNA دو رشته‌ای، به نام قطعات A و B است (۱۵). قطعه B تنها آنزیم RNA پلیمراز ویروس (VP1) را کد می‌کند اما قطعه A پلی پپتیدی با طول ۱۰۸ کیلو دالتون را کد می‌کند که به طور خودبخود و با فعالیت پروتئازی VP4 شکسته شده و پروتئین‌های VP2، VP3 و VP4 از یکدیگر جدا می‌گردند. پروتئین ساختاری اصلی ویروس است که حاوی نواحی آنتی ژنی مسئول ایجاد آنتی‌بادی خنثی کننده است (۸). VP3 با وزن مولکولی ۳۲ کیلو دالتون پروتئین اسکلتی ویرونی را تشکیل می‌دهد و پس از عفونت با ویروس و یا واکسیناسیون با واکسن غیر فعال IBDV، اولین آنتی-بادی‌ها بر ضد VP3 ظاهر می‌شوند. از سوی دیگر این پروتئین بر خلاف VP2 نقش بسیار مهمی در تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ندارد و توالی آن به خوبی در

جدایه‌های IBDV حفاظت شده است (۶). بنابراین VP3 می‌تواند بعنوان آنتی ژنی مناسب برای تشخیص آنتی‌بادی‌های القا شده توسط ویروس بکار رود. در حال حاضر برای تشخیص آنتی‌بادی ضد IBDV کیت‌های تجاری ELISA در دسترس است. منبع معمول آنتی ژن برای این کیت‌ها غالباً ویرون کامل است (۱۲، ۲۰، ۲۱ و ۲۲) که با استفاده از گرادیان کلرید سزیم و اولتراسانتریفیوژ خالص سازی می‌شود. با توجه به هزینه بالا برای خالص سازی ویروس کامل IBDV، تاکنون مطالعات متعددی به منظور جایگزین کردن ویروس کامل با پروتئین‌های نوترکیب IBDV صورت گرفته است (۲، ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۹ و ۲۴). هدف از مطالعه حاضر کلونینگ و بیان ژن VP3 ویروس بیماری بورس عفونی در *شرشیا کولی*، با استفاده از پلاسمید pMal-C2X، برای تولید پروتئین VP3 نوترکیب قابل استفاده در الیزا می‌باشد.

## مواد و روش کار

### استخراج RNA و RT-PCR برای تکثیر ناحیه

#### ژنی کد کننده VP3

به عنوان ویروس مرجع، از سویه ویروس واکسن D78 بیماری بورس عفونی (شرکت اینتروت، هلند) استفاده شد. RNA این ویروس با استفاده از محلول تجاری Tripure (شرکت روش، آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (VP3F: GCGAGAATTCGGTTCCCTCACAAATCCAC) و (VP3R: GCGAGTCGACTCACATCTCCATCGCAGTCA) براساس توالی ژنوم این ویروس (با شماره دسترسی AF499929 در بانک ژن)، ناحیه‌ای از ژن کد کننده VP3 بطول ۷۵۰ نوکلئوتید که فاقد ۴۰ اسید آمینه انتهایی ناحیه کربوکسیل می‌باشد (۲۴) با آزمایش RT-

نیوانگلندز بیولب، آمریکا) توسط آنزیم‌های محدودگر *EcoRI* و *Sall* که محل برش آنها در پرایمرها در نظر گرفته شده بود هضم و پس از خالص‌سازی با کیت استخراج DNA از ژل (شرکت ویوانتیس، مالزی) خالص شدند. واکنش لیگاسیون بین پلاسمید و محصول PCR با استفاده از آنزیم لیگاز T4 (شرکت فرمتاس، لیتوانی) و طبق دستورالعمل آنزیم انجام شد. سپس سویه TG1 با کتری/شرشیا کولی با محصول لیگاسیون و با روش استفاده از کلرید کلسیم و شوک حرارتی ترانسفورمه شد (۳). غربالگری کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون، رشد یافته بر روی محیط آگار LB دارای  $100 \mu\text{g/ml}$  آمپی‌سیلین، با روش PCR انجام شد. سه کلونی حاوی پلاسمید نو ترکیب انتخاب و از نظر بیان پروتئین MBP-VP3 و توالی نوکلئوتیدی ژن VP3 مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی بیان پروتئین نو ترکیب، کلونی‌های منتخب هریک در  $3$  میلی لیتر محیط LB مایع دارای  $100 \mu\text{g/ml}$  آمپی‌سیلین بطور شبانه کشت داده شدند. سپس کشت‌های شبانه به نسبت  $1/100$  در محیط LB مایع دارای  $100 \mu\text{g/ml}$  آمپی-سیلین تا رسیدن به کدورت  $0.5$  در طول موج  $600$  نانومتر رشد داده شدند. در این مرحله به منظور القاء بیان پروتئین، IPTG (ایزوپروپیل بتادی-گالاکتوپیرانوزید) با غلظت نهایی  $1 \text{ mM}$  اضافه شد و کشت باکتری در دمای  $37$  درجه تا  $2$  ساعت ادامه یافت. نمونه‌های تهیه شده پیش و پس از افزودن IPTG، با الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید و رنگ-آمیزی ژل با رنگ آبی کوماسی، از نظر بیان پروتئین نو ترکیب مورد ارزیابی قرار گرفتند. پلاسمیدهای نو ترکیب از سه کلونی بیان‌کننده پروتئین با کیت استخراج پلاسمید (شرکت فلدان، کانادا) استخراج و به

PCR تکثیر گردید. به این منظور در ابتدا  $10/5$  میکرولیتر از RNA استخراج شده با  $1$  میکرولیتر (پیکومول) از هریک از پرایمرهای طراحی شده (به دلیل دو رشته‌ای بودن ژنوم ویروس) مخلوط و به مدت  $5$  دقیقه در دمای  $95^\circ\text{C}$  قرار داده شد. سپس میکروتیوب حاوی این مواد بلافاصله و به مدت  $5$  دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. در مرحله بعد به این مخلوط  $4$  میکرولیتر بافر  $5X$  واکنش رونوشت برداری معکوس،  $2$  میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتیدهای چهارگانه (dNTP mix) با غلظت  $10$  میلی مولار،  $0.5$  میکرولیتر ( $20$  واحد) مهارکننده RNase (شرکت فرمتاس-لیتوانی) و  $1$  میکرولیتر ( $200$  واحد) آنزیم نسخه بردار معکوس M-MuLV RevertAid™ (شرکت فرمتاس-لیتوانی) اضافه شد. واکنش نسخه برداری معکوس در حجم نهایی  $20$  میکرولیتر و به مدت یک ساعت در دمای  $42^\circ\text{C}$  انجام و با  $10$  دقیقه گرمخانه گذاری در دمای  $70^\circ\text{C}$  پایان داده شد. پس از انجام واکنش نسخه برداری معکوس، DNA مکمل (cDNA) ساخته شده در این مرحله با آزمایش PCR و با استفاده از پرایمرهای فوق تکثیر داده شد. در آزمایش PCR  $5$  میکرولیتر از cDNA با  $25$  پیکومول از هریک از پرایمرهای فوق،  $25$  میکرولیتر مسترمیکس PCR 2X (شرکت سیناژن، ایران) که غلظت کلرید منیزیم آن  $3$  میلی مولار می‌باشد در حجم نهایی  $50$  میکرولیتر مخلوط و طی برنامه دمایی  $95$  درجه بمدت  $3$  دقیقه،  $35$  چرخه دمایی  $1$  دقیقه در  $95$  درجه،  $1$  دقیقه در  $60$  درجه و  $1$  دقیقه در  $72$  درجه و یک مرحله  $72$  درجه نهایی بمدت  $7$  دقیقه تکثیر داده شد.

### کلونینگ و بیان قطعه ژن VP3

پس از انجام PCR و دستیابی به قطعه DNA مورد نظر، محصول PCR و پلاسمید pMAL-C2X (شرکت

منظور تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M13 F و malE به شرکت تکاپو زیست ارسال شد.

### خالص سازی پروتئین نوترکیب MBP-VP3

یکی از کلون‌های باکتریایی حاوی پلاسמיד نوترکیب که پروتئینی با وزن ملکولی قابل انتظار برای پروتئین MBP-VP3 را تولید می‌نمود برای کشت و خالص سازی پروتئین نوترکیب انتخاب شد. کشت شبانه این باکتری به نسبت ۱/۱۰۰ در ۵۰۰ میلی لیتر محیط LB مایع دارای ۱۰۰ μg/ml آمپی سیلین مخلوط و تا رسیدن به کدورت ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رشد داده شد. سپس برای القاء بیان پروتئین، همانند قبل IPTG با غلظت نهایی ۱ mM اضافه شد. دو ساعت بعد از افزودن IPTG، سوسپانسیون باکتریایی در دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و به رسوب باکتریایی بافر ستون خالص سازی (حاوی ۲۰ mM Tris، ۲۰۰ mM NaCl و ۱ mM EDTA با pH ۷/۴) به نسبت ۵ میلی لیتر بافر ستون برای رسوب ۸۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتریایی افزوده شد. سوسپانسیون باکتری در بافر ستون پس از ۵ مرتبه انجماد در فریزر -۷۰ درجه و ذوب در آب سرد با قدرت ۱۸۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به عنوان فاز پروتئین‌های محلول به لوله دیگری منتقل شد تا از ستون حاوی رزین آمیلوز عبور داده شود.

برای تهیه ستون رزین آمیلوز، ۳ میلی لیتر رزین آمیلوز (شرکت نیوانگلندز بیولاب، آمریکا) در یک سرنگ پلاستیکی ۱۰ میلی لیتری که انتهای خروجی آن توسط الیاف پشم شیشه مسدود شده بود، ریخته شد. بعد از رسوب رزین در سرنگ، ستون تهیه شده چندین مرتبه با بافر ستون شستشو داده شد. سپس فاز

پروتئین‌های محلول باکتری که روش تهیه آن در بالا ذکر گردید با نسبت ۱ به ۵ با بافر ستون رقیق شده و به آرامی از ستون رزین آمیلوز عبور داده شد. در ادامه، ستون با ۱۲ برابر حجم رزین با بافر ستون شستشو گردید. در آخرین مرحله بافر ستون حاوی ۱۰ میلی-مولار مالتوز به ستون اضافه گردید و اقدام به جمع-آوری ۱۵ نمونه ۱/۵ میلی لیتری از خروجی ستون درون میکروتیوب‌های استریل گردید. در آخر حضور پروتئین نوترکیب در نمونه‌های جمع‌آوری شده، با SDS-PAGE بررسی گردید.

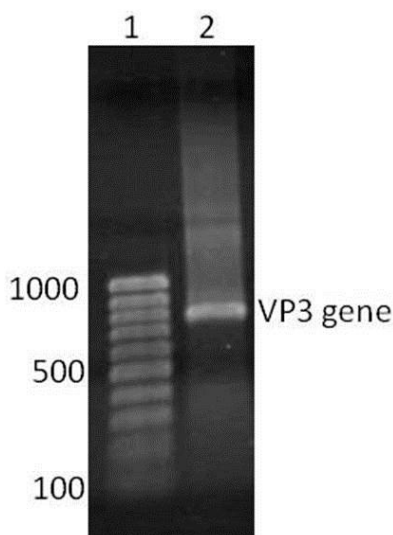
### ایمونوبلاتینگ

جهت بررسی واکنش پروتئین نوترکیب بیان شده با سرم‌های مثبت و منفی (از نظر آنتی بادی ضد IBDV) از آزمایش ایمونوبلاتینگ استفاده شد. در این آزمایش پس از الکتروفورز نمونه‌ای از پروتئین نوترکیب خالص شده و نیز پروتئین خالص شده MBP در ژل پلی اکریلامید (SDS-PAGE)، پروتئین‌ها از ژل به غشای نیتروسولولز انتقال داده شدند. سپس غشاء نیتروسولولز برای بلاک شدن به مدت ۳ ساعت در محلول PBS حاوی ۵٪ درصد شیر خشک بر روی روتاتور قرار گرفت. پس از پایان مرحله بلاک کردن، محلول بلاک کننده تخلیه گردید و غشاء نیتروسولولز سه مرتبه، هر مرتبه ۵ دقیقه، با PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBST) شستشو گردید. پس از شستشو، سرم‌های مثبت و منفی مرغی که قبلاً از نظر وجود آنتی‌بادی ضد IBDV با یک کیت الیزای تجاری (شرکت آیدکس، آمریکا) آزمایش شده بودند به نسبت ۱/۵۰۰ در PBST حاوی ۲ درصد شیر خشک رقیق شده و روی غشاء اضافه گردیدند. انکوباسیون غشا در این محلول به مدت ۱ ساعت و بر روی روتاتور انجام شد. بعد از اتمام این

مرحله، شستشو همانند مرحله اول انجام شد و سپس غشاء به مدت ۱ ساعت در رقت ۱/۴۰۰۰ کونژوگه پراکسیداز Anti-Chicken IgG (شرکت سیگما، آمریکا) در PBST حاوی ۲ درصد شیر خشک، روی روتاتور قرار داده شد. پس از انجام شستشو شامل ۲ مرحله شستشو با PBST و یک مرحله شستشوی نهایی با PBS معمولی، غشاء به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ظهور حاوی کلروفتول و آب اکسیژنه (۱۰) قرار داده شد. با ظاهر شدن باند پروتئینی، محلول ظهور تخلیه و به منظور توقف واکنش، غشا نیتروسولونز با آب معمولی شسته شد

### نتایج

پس از انجام واکنش RT-PCR روی RNA استخراج شده از سویه ویروس واکسن، محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۵٪ در کنار یک مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمتاس، لیتوانی) به عنوان استاندارد الکتروفورز شد. نتایج الکتروفورز نشان داد که آزمایش PCR با موفقیت منجر به ساخت قطعه DNA مورد انتظار (با طول ۷۷۳ bp با احتساب توالی‌های غیر اختصاصی قرار داده شده در 5' پرایمرها) شده است (شکل ۱). با انجام مراحل هضم و اتصال محصول PCR و پلاسمید pMAL-C2X و سپس انتقال محصول اتصال به سویه ی TG1 باکتری اشرشیا کولی، ظهور کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط جامد LB آمپی‌سیلین‌دار نشان‌دهنده ورود موفق پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در باکتری‌ها بود. پس از اطمینان از صحت وجود ژن‌ها با غربالگری با PCR، بیان پروتئین‌ها در آن کلون‌ها در SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۲ مشخص شده است، باکتری مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن

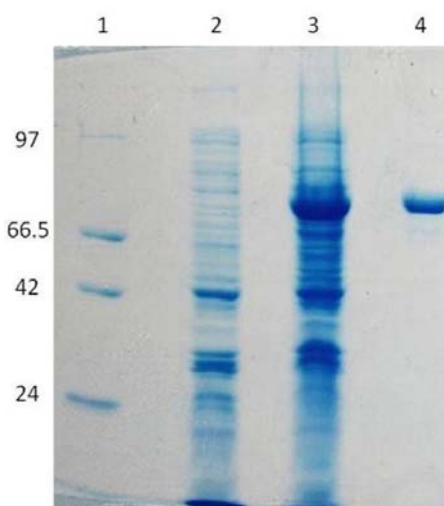


شکل ۱- الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز. چاهک شماره ۱ مارکر ۱۰۰ زوج بازی و چاهک شماره ۲ محصول RT-PCR را نشان می‌دهند. طول قطعات ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ زوج بازی مارکر در کنار آن‌ها نشان داده شده است.

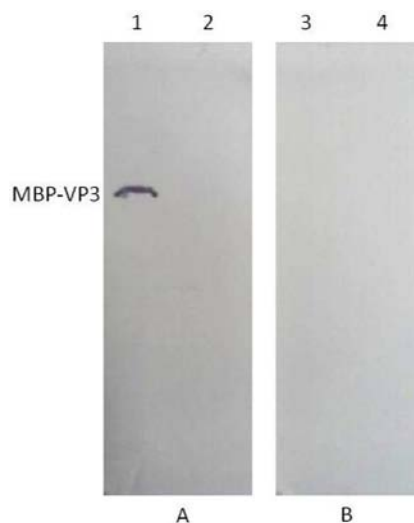
گرفته است، زیرا استفاده از ویروس کامل در الیزا مستلزم انجام مراحل خالص سازی ویروس با دستگاه اولتراسانتریفیوژ و بطور کلی روشی هزینه بر است. علاوه بر این عدم مراقبت در نگهداری و استفاده از پلیت های الیزای پوشش داده شده با ویروس کامل ممکن است خطر شیوع عفونت را در پی داشته باشد. از سوی دیگر پروتئین های نوترکیب فاقد خطر بیولوژیک بوده و می توانند با خلوص و راندمان بالا تولید شوند. بر این اساس پروتئین های نوترکیب VP2 و VP3 IBDV در سیستم های مختلف بیانی تولید و بعنوان آنتی ژن الیزا مورد ارزیابی قرار گرفته اند. برای تولید پروتئین VP2 یا پیش ساز VP2 (VPX) از سیستم بیانی با کلوویروس در سلول حشره (۱۱ و ۱۳) و مخمر (۷) استفاده شده است. همچنین پروتئین VP3 نوترکیب را در /شرشیا کولی (۲)، ۱۹ و ۲۴) و سلول حشره (۱۳) بیان کرده اند.

Jackwood و همکاران (۱۹۹۶) با بیان یک بخش ۹۴۴ زوج بازی از ناحیه کد کننده ژن VP2 تحت تیپ آنتی ژنی Del-A ویروس IBDV در سیستم باکولوویروس و استفاده از پروتئین بیان شده در الیزا دریافتند که این بخش پروتئین تا حد زیادی بطور اختصاصی آنتی بادی های ضد این تیپ را ردیابی می کند (۱۱).

Martinez-Torrecuadrado و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از باکولوویروس، پروتئین های نوترکیب VPX و VP3 را در سلول های حشره بیان کرده و سپس آزمایش های الیزای طراحی شده با این پروتئین ها را با کیت الیزای تجاری (بر اساس ویروس کامل) و آزمایش خنثی سازی مقایسه نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد الیزای طراحی شده با VPX در مقایسه با VP3 همخوانی بیشتری با الیزای تجاری و آزمایش خنثی سازی داشت (۱۳).



شکل ۲- آزمایش الکتروفورز در ژل پلی الیلامید (SDS-PAGE): چاهک های شماره ۱ الی ۴ بترتیب نشان دهنده استاندارد وزن ملکولی، پروتئین های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب قبل از افزودن IPTG، پروتئین های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از افزودن IPTG و پروتئین نوترکیب خالص شده با ستون رزین آمیلوز می باشد. وزن های ملکولی پروتئین های استاندارد بر حسب کیلودالتون در سمت چپ ژل نشان داده شده اند.



شکل ۳: آزمایش ایمونوبلاتینگ. در بخش های A و B ستون های ۱ و ۳ حاوی پروتئین نوترکیب MBP-VP3 و ستون های ۲ و ۴ حاوی پروتئین MBP می باشد. غشا نیتروسولوز در بخش A با سرم کنترل مثبت و در بخش B با سرم کنترل منفی مجاور شده است.

## بحث

تاکنون مطالعات مختلفی در خصوص استفاده از فناوری DNA نوترکیب برای تولید آنتی ژن های IBDV که قابل استفاده در آزمایش الیزا باشند صورت

تولید آنتی بادی‌های خنثی‌کننده، از خاصیت ایمنی زایی بالای برخوردار است. براساس شواهد موجود اولین آنتی بادی‌هایی که در پاسخ به عفونت با IBDV یا واکسیناسیون تولید می‌شوند با این پروتئین واکنش می‌دهند (۶) و این نشانگر ایمنی‌زایی بالای VP3 است. از سوی دیگر بدلیل عدم ارتباط این پروتئین با محافظت و نیز حضور آن در داخل ویروس، ژن کُدکننده VP3 از ثبات ژنتیکی بالایی برخوردار است و در نتیجه احتمال تغییرات اسید آمینه ایی ناشی از جهش که در VP2 بروز می‌کنند در VP3 بسیار کمتر است.

با توجه به شیوع بالای بیماری گامبورو در ایران و متداول شدن آزمایش الیزا برای بررسی سطح ایمنی گله‌های طیور و تعیین سن مناسب واکسیناسیون، در این تحقیق با هدف نهایی ساخت کیت الیزای گامبورو، تلاش گردید تا آنتی ژن مورد نیاز از طریق کلونینگ و بیان ژن VP3 با استفاده از پلاسمید بیانی پروکاریوتی pMA1-C2X تولید گردد. علت انتخاب این پلاسمید این است که اولاً این پلاسمید از پروموتور (پروموتور lac) کارآمدی برای بیان ژن برخوردار است. ثانیاً پروتئین‌های تولید شده در این سیستم بصورت متصل به MBP تولید می‌شوند. دنباله MBP اگرچه پروتئینی نسبتاً بزرگ است اما براساس مطالعات قبلی (۱) تداخلی در انجام آزمایش الیزا با استفاده از سرم‌های مرغ ایجاد نمی‌کند. مزیت دیگر که در انتخاب این پلاسمید تاثیرگذار است اقتصادی بودن هزینه خالص‌سازی پروتئین با استفاده از رزین آمیلوز است. رزین آمیلوز که برای خالص‌سازی پروتئین‌های دارای دنباله MBP بکار می‌رود در مقایسه با ستون کروماتوگرافی افینیتی نیکل ارزان قیمت تر است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که حتی در صورت عدم دسترسی به رزین آمیلورز می‌توان با شیوه‌ای بسیار کم هزینه و با استفاده آرد برنج

Dey و همکاران (۲۰۰۹) با بیان ژن کُدکننده VP2 در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* موفق به تولید ذرات شبه ویروسی (Virus like particles; VLP) تشکیل شده از پروتئین VP2 شدند. سپس با استفاده از VLP‌های تولید شده آزمایش الیزا برای IBDV را طراحی نمودند. آزمایش طراحی شده در مقایسه با آزمایش خنثی‌سازی ویروس دارای حساسیت ۹۹ و ویژگی ۹۴ درصد بود (۷).

در سال ۲۰۰۸، Wang و همکاران (۲۴) پروتئین VP3 را در سویه BL21(DE3) / *شرشیا کولی* بیان نموده و با استفاده از دنباله ۶ هیستیدینی اضافه شده به پروتئین آن را با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل خالص نمودند. سپس آزمایش الیزای طراحی شده با این پروتئین با الیزای تجاری، الیزای طراحی شده با ذرات شبه ویروسی VP2 و آزمایش خنثی‌سازی مقایسه گردید. نتایج گویای این واقعیت بود که آزمایش الیزا بر مبنای VP3 بیان شده در *شرشیا کولی*، نسبت به الیزای VP2 و الیزای تجاری، در مقایسه با آزمایش خنثی‌سازی (بعنوان آزمایش استاندارد) از عملکرد بهتری برخوردار بود. محققین اختلاف مشاهده شده میان نتایج خود و نتایج Martinez-Torrecedrad و همکاران (۱۳) را که در آن الیزای VPX را بهتر از VP3 یافته بودند، ناشی از روند خالص‌سازی غیر موثر VP3 بیان شده در سلول حشره عنوان نمودند.

پس از مطالعه Wang و همکاران (۲۴)، Alfonso و همکاران (۲) و Singh و همکاران (۱۹) نیز با بیان VP3 دارای دنباله هیستیدینی در *شرشیا کولی* و سپس طراحی آزمایش الیزا، قابلیت بالای این پروتئین را برای ردیابی آنتی بادی‌های ضد IBDV تایید نمودند. قابلیت بالای VP3 برای استفاده در الیزا می‌تواند به این دلیل باشد که این پروتئین علیرغم درگیر نبودن در روند محافظت و

4. Balamurugan, V., Kataria, J.M. (2006). Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral diseases of chicken current status. *Veterinary Research Communication* **30**: 541-66.
5. De Wit, J.J., Van de Sande, H.W., Counotte, G.H., Wellenberg, G.J. (2007). Analyses of the results of different test systems in the 2005 global proficiency testing schemes for infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus antibody detection in chicken serum. *Avian Pathology* **36**: 177-83.
6. Deng, X., Gao, Y., Gao, H., Qi, X., Cheng, Y., Wang, X. (2007). Antigenic structure analysis of VP3 of infectious bursal disease virus. *Virus Research* **129**: 35-42.
7. Dey, S., Upadhyay, C., Mohan, C.M., Kataria, J.M., Vakharia, V.N. (2009). Formation of sub-viral particles of the capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus and its application for serological diagnosis. *Journal of Virological Methods* **157**: 84-9.
8. Fahey, K.J., Erny, K., Crooks, J. (1989). A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus. *Virology* **70**: 1473-81.
9. Giambrone, J.J., Ewert, D.L., Eidson, C.S. (1977). Effect of infectious bursal disease virus on the immunological responsiveness of the chicken. *Poultry Science* **56**: 1591-4.
10. Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1<sup>st</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, United States of America, PP: 139-239.
11. Jackwood, D.J., Henderson, K.S., - Jackwood, R.J. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay-based detection of antibodies to antigenic subtypes of infectious bursal disease viruses of chickens. *Clinical Diagnosis and Laboratory Immunology* **3**: 456-63.
12. Marquardt, W.W., Johnson, R.B., Odenwald, W.F., Schlotthober, B.A. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Diseases* **24**: 375-85.
13. Martinez-Torrecuadrada, J.L., Lazaro, B., Rodriguez, J.F., Casal, J.I. (2000). Antigenic properties and diagnostic

که منبعی از آمیلوز می باشد این نوع پروتئین ها را تا حدی خالص نمود (۱۶).

بطور کلی نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که باکتری / شرشیا کولی سویه TGI، ترانسفورمه شده با پلاسمید pMAL-C2X حاوی ژن VP3 بخوبی این پروتئین را بیان می کند. پروتئین بیانی (MBP-VP3) تولید شده نیز محلول و با استفاده از ستون رزین آمیلور کاملاً قابل تخلیص است. از سوی دیگر آزمایش ایمونوبلاتینگ نشان داد که این پروتئین از نظر خصوصیات آنتی ژنی فعال است و توسط یک سرم دارای آنتی بادی ضد IBDV شناسایی می گردد. بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که سیستم بیانی مورد استفاده در این تحقیق از کارآمدی لازم برای تولید VP3 نو ترکیب مورد نیاز برای طراحی الیزا برخوردار می باشد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله حاضر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه اجرای این تحقیق را فراهم نمود تشکر می گردد.

### منابع

۱. جایدری، ا. (۱۳۹۰). کلونینگ و بیان ژن NP ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در / شرشیا کلی، رساله دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
2. Alfonso, A., Noda, J. (2010). Factibilidad del uso de la proteína recombinante VP3 de Gumboro en un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA. *Revista Electrónica de Veterinaria* **11**: 1-8.
3. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1992). *Short protocols in molecular biology*, 2<sup>nd</sup> ed., Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, United States.





22. Thayer, S.G., Villegas, P., Fletcher, O.J. (-1987). Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays and conventional methods for avian serology. *Avian Diseases* **31**: 120-4.
23. Van der Berg, T.P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology*. **29**: 175-94.
24. Wang, M.Y., Hu, H.L., Suen, S.Y., Chiu, F.Y., Shien, J.H., Lai, S.Y.(2008). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting infectious bursal disease virus (IBDV) infection based on the VP3 structural protein. *Veterinary Microbiology* **131**: 229-36.
- potential of baculovirus-expressed infectious bursal disease virus proteins VPX and VP3. *Clinical Diagnosis and Laboratory Immunology* **7**: 645-51.
14. Muller, H., Islam, M.R., Raue, R. (2003). Research on infectious bursal disease- the past, the present and the future. *Veterinary Microbiology* **97**: 153-65.
15. Mundt, E., Muller, H. (1995). Complete nucleotide sequences of 5 and 3-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. *Virology* **209**: 10-8.
16. Neissi, A., Seyfi Abad Shapouri, M.R., Ghorbanpoor Najafabadi, M., Jaydari, A. (2013). Using rice flour for purification of maltose binding fusion proteins expressed in *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology* **6**: 233-6.
17. Okoye, J.O., Uzoukwu, M. (1981). An outbreak of infectious bursal disease among chickens between 16 and 20 weeks old. *Avian Diseases* **25**: 1034-8.
18. Sharma, J.M., Kim, I.J., Rautenschlein, S., Yeh, H.Y. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental Comparative Immunology* **24**: 223-35.
19. Singh, N. K., Sohini, D.C., Madhan, M., Kataria, J.M., Vikram, N.V. (2010). Evaluation of four enzyme linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to infectious bursal disease in chickens. *Journal of Virological Methods* **165**: 277-82.
20. Snyder, D.B., Marquardt, W.W., Mallinson, E.T., Savage, P.K., Allen, D.C. (1984). Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis, infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. *Avian Diseases* **28**: 12-24.
21. Snyder, D.B., Marquardt, W.W., Mallinson, E.T., Russek-Cohen, E., Savage, P.K., Allen, D.C. (1986). Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. IV. Association of infectious bursal disease serology with broiler flock performance. *Avian Diseases* **30**: 139-48.

## **Cloning and Expression of VP3 Gene of Infectious Bursal Disease Virus in *E. coli* and Purification of the Recombinant Protein**

**Seyfi Abad Shapouri, M.R.<sup>1\*</sup>, Mohebat, A.<sup>2</sup>, Ghorbanpour, M.<sup>1</sup>, Rashno, M.<sup>2</sup>**

1. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. PhD Student, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received Date: 1 September 2014

Accepted Date: 20 June 2015

---

**Abstract:** Infectious bursal disease or Gumboro, is a highly contagious viral disease of poultry which causes economic losses in the poultry industry, worldwide. Following infection, the first antibodies are produced against the structural VP3 protein of the Infectious bursal disease virus (IBDV); therefore, VP3 is a suitable antigen for use in ELISA. Given the difficulty of purifying native VP3 from IBDV or virus-infected cells, recombinant VP3 expressed in *E. coli* can be considered for this purpose. This study was performed with the aim of cloning the VP3 gene of D78 vaccine strain of the virus in pMal-C2X plasmid (a prokaryotic expression plasmid) and the expression and purification of the recombinant protein. Thus, VP3 gene was amplified by RT-PCR and cloned in plasmid pMal-C2X, after digestion with appropriate restriction enzymes. After sequencing to ensure the successful cloning of the gene, the expression of recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE. In the following, the recombinant protein was purified using amylose resin chromatography column. Evaluation of the recombinant VP3 protein in immunoblotting showed that the produced protein was antigenically active. Considering the high efficiency of protein production in this system, the expressed protein is a good candidate for the design of ELISA to measure antibody titers against infectious bursal disease virus (IBDV).

---

**Keywords:** Infectious bursal disease virus (IBDV); VP3 protein; Cloning; pMal-C2X plasmid

---

\*Corresponding author: Seyfi Abad Shapouri, M.R.

Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Tel: +989161133247

Email: masoudrs@scu.ac.ir