



## کلونینگ و بیان ژن غیر ساختاری 3ABC ویروس تب برفکی سروتاپ O در باکتری اشرشیاکلی

سید امیر رضا پریزاده<sup>۱</sup>، محمد رضا نصیری<sup>۲</sup>، سعید زیبایی<sup>\*</sup><sup>۳</sup>، مجتبی طهمورث پور<sup>۲</sup>، محمدرضا باسامی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>۲</sup> استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>۳</sup> استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق کشور مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۳

## چکیده

بیماری تب برفکی اولین بیماری ویروسی شناخته شده در حیوانات است که با گذشت بیش از صد سال از شناخت آن، همچنان یکی از مهمترین خطراتی است که صنعت دامپوری دنیا را تهدید می‌نماید. یکی از مهمترین روش‌های شناسایی حیوان واکسینه شده از حیوان مبتلا به تب برفکی استفاده از پروتئین غیرساختاری 3ABC به عنوان آنتی ژن در کیت الایزا می‌باشد. از این رو، ژن 3ABC ویروس تب برفکی سروتاپ O با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز و پرایمرهای اختصاصی حاوی سایت‌های برشی BamHI و pTZ57R/T جداسازی شد. به منظور بررسی خصوصیات نوکلوتیدی، ژن تکثیر شده به ناقل pTZ57R/T و *HinDIII* جداسازی شد. به منظور تولید آنتی ژن نوترکیب، ژن هدف به ناقل بیانی (+) pET21a وارد و سپس و توالی یابی تایید شد. به منظور تولید آنتی ژن نوترکیب، ژن هدف به ناقل بیانی (+) pET21a وارد و سپس به باکتری اشرشیاکلی (BL21(DE3)) به عنوان میزبان بیان منتقل شد. باکتری حاوی ناقل نوترکیب با استفاده از IPTG در غلاظت نهایی ۱/۵ میلی مولار القا شد. تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از الکتروفورز پروتئین و وسترن بلاتینگ تایید شد. وزن مولکولی پروتئین تولید شده در حدود ۵۰ کیلو Dalton مشخص شد. نتایج نشان داد که از پروتئین نوترکیب تولید شده می‌توان به خوبی به عنوان آنتی ژن در کیت تشخیصی الایزا برای حیوانات استفاده شود.

کلید واژه‌ها: ژن 3ABC، تب برفکی، FMDV، پروتئین نوترکیب

## مقدمه

واکسن‌های متداول تب برفکی با استفاده از کشت سلولی (BHK21) تهیه می‌شوند. ویروس تکثیر شده در این سلول‌ها توسط روش‌های شیمیابی، مانند روش اتیلن ایمین مضاعف (BEI) غیر فعال می‌شود (Song *et al.*, 2005). در بعضی موارد ویروس به شکل کامل غیر فعال نشده و در نتیجه منبعی برای آلدگی محسوب می‌گردد (Kim *et al.*, 2006; YI *et al.*, 2008; Pengyan *et al.*, 2006). در این میان، جدا کردن حیوانات واکسینه شده و غیر واکسینه ممکن است به علت فقدان تکنولوژی تفریقی لازم، مشکل باشد (Brown *et al.*, 2003; Priyadharshini *et al.*, 2007) توجه به معایب ذکر شده در واکسن‌ها، اولین گام در کنترل بیماری تب برفکی، تشخیص دقیق و سریع بیماری و سروتاپ عامل آن می‌باشد. برای تشخیص دقیق و درست آن به آزمون‌های تشخیصی سریع و حساس نیاز است که توانایی تفکیک حیوانات واکسینه از حیوانات ناقل را دارا باشند. در حال حاضر سنجش آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های غیرساختاری به خصوص پروتئین غیرساختاری 3ABC ویروس بیماری تب برفکی تنها ابزار کارآمد جهت تفکیک حیوانات واکسینه از حیوانات آلدوه گزارش شده است (Priyadharshini *et al.*, 2007). تولید سنتیک پیتیدهای غیرساختاری بسیار هزینه بر و نیازمند تکنولوژی خاص است. از طرفی در این روش تنها یک اپی‌توب تولید می‌شود که سبب کاهش احتمال تفرق حیوان مبتلا از حیوان واکسینه شده می‌شود (Clavijo *et al.*, 2004). از این نظر،

بیماری تب برفکی اولین بیماری ویروسی شناخته شده در حیوانات است که با گذشت بیش از صد سال از شناخت آن، همچنان یکی از مهمترین خطراتی است که صنعت دامپروری دنیا را تهدید می‌نماید. این بیماری حیوانات وحشی و اهلی زوج سم به ویژه تولید کنندگان شیر و گوشت را آلدوه می‌کند (Tullyet *al.*, 2009; Qianet *al.*, 2009; Doryet *al.*, 2004). علاوه بر حیوانات اهلی، این ویروس همچنین می‌تواند بیش از ۳۰ گونه از حیوانات حیات وحش را آلدوه نماید (Thomson., 2003). ویروس عامل بیماری تب برفکی از خانواده پیکورناویریده و از جنس Aفتوفیروس است که دارای هفت سروتیپ O, SAT1, SAT2, Asia1 و SAT3 متعددی می‌باشد (Hemaet *al.*, 2009). عواملی نظیر تعداد سروتاپ‌ها و تحت تیپ‌های ویروس، استعداد بالای این ویروس به جهش (در نتیجه تغییرات سریع آنتی‌ژنیکی)، قابلیت بقاء بالای ویروس در طبیعت، قابلیت شیوع سریع (شدت واگیری٪ ۱۰۰)، دور ماندن علائم کلینیکی در اثر ابتلا به بعضی از تحت تیپ‌های خاص در بعضی از حیوانات، به خصوص گوسفند، قدرت انتقال بین گونه‌ای، شکل‌گیری حاملین، هزینه بسیار زیاد کنترل و مبارزه، هزینه زیاد تشخیص و اعمال مقررات سنگین بین‌المللی برای کشورهایی که واجد بیماری هستند سبب افزایش اهمیت بیماری تب برفکی می‌شوند (Fry *et al.*, 2005).

و (+) Novagen pET21a(+) به عنوان ناقلهای کلونینگ و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند. سلول باکتری حاوی ناقل دستورالزی شده بر روی محیط کشت مایع Luria Broth (درصد تریپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ کلرید سدیم) حاوی  $100 \mu\text{g/ml}$  آمپی سیلین کشت داده شد. pH محیط کشت ۷/۵ تنظیم و سلول‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به شکل هوایی کشت داده شدند.

### تکثیر و کلونینگ ژن 3ABC

استخراج RNA ژنومی از محیط کشت سلول Nucleic acid Kit High Pure viral (ساخت شرکت Roche) انجام شد. ساخت cDNA ژنومی با RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit/ Thermo استفاده از کیت سروتاپ O ویروس با مورد استفاده، واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای ۵' GCTGCCTACCTCCTCAA3 و ۳' AGCTTGTACCAGGGTTGGC3' جهت تکثیر قطعه ۴۰۲ جفت بازی 1D/2B به منظور تایید سروتاپ O ویروس تب برفرکی انجام گردید (Reidet *et al.*, 2001). ژن 3ABC با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت ۵' GGATCCCGCGATCTCAATTCCCTCCC ۳' و برگشت ۳' AAAAGTC ۵' CCTGAACCACAAACACGAGCCCCAAGC ۳' که حاوی جایگاه برشی آنزیم های TT در انتهای ۵' آغازگر رفت و HindIII در

تولید نوترکیب پروتئین های غیرساختاری در باکتری اشرشیا کلی به دلیل سهولت در تخلیص و ارزان بودن پیشنهاد شده است. ویروس مربوطه در بدن حیوانات ناقل تولید پروتئین های غیرساختاری می نماید، در صورتیکه در حیوانات واکسینه شده این پروتئین ها وجود ندارند. با توجه به نقش مهم ژن های ۳C، ۳B و ۳A (ناحیه ژنی 3ABC) در تولید پروتئین غیرساختاری، به نظر می رسد کلونینگ و بیان این ناحیه ژنی و استفاده از آن به عنوان پروتئین نوترکیب جهت تحریک سیستم ایمنی میزان و جهت استفاده به عنوان آنتی ژن در کیت تشخیصی الایزا برای حیوانات مورد نظر امکان ۳ABC پذیر می باشد. بنابراین، در این مقاله ژن ۳ABC سروتاپ O ویروس تب برفرکی به عنوان ژن کاندیدا جهت توالی یابی و کلونینگ و بیان ژن با هدف استفاده از آن در تولید کیت تشخیصی الایزا در آینده انتخاب شد.

### مواد و روش ها

#### ویروس تب برفرکی

ویروس تب برفرکی سروتاپ O از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق بر روی محیط کشت BHK-21 تهیه گردید. سویه های باکتری، پلاسمیدها و محیط کشت ها

سویه های اشرشیا کلی DH5a و BL21(DE3) به ترتیب به عنوان میزان کلونینگ و بیان انتخاب شدند. پلاسمیدهای pTZ57 R/T (Fermentas)

گردید. از الگوریتم و نرم افزار PHRED (Ewing and Green, 1998) به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی ها استفاده شد. وزن مولکولی پیتید قابل پیش‌بینی جهت تولید با استفاده از نرم افزار CLC Workbench 5 محاسبه گردید. ساختار پروتئینی Swiss-pdbv - 3ABC با استفاده از (http://www.expasy.ch/spdbv) مدل سازی و مشخص شد.

### بيان پروتئين 3ABC

استخراج پلاسمید pTz57R/T+3ABC با استفاده از کیت Miniprep، شرکت Thermo صورت گرفت. هضم آنزیمی برای پلاسمیدهای pET21a(+) با pTz57R/T+3ABC استفاده از آنزیم های برشی HindIII و BamHI و انجام شد. سپس محصول هضم با استفاده از کیت #K0513 ساخت شرکت Promega از روی ژل استخراج گردید و واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز (Roche) صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب حاصل به منظور تکثیر به باکتری اشرشیا کلی DH5α وارد شد و بر روی محیط کشت LB-Agar حاوی  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  آمپیسیلین کشت داده شد. غربالگری و انتخاب کلی حاوی ژن هدف با استفاده از روش PCR و هضم آنزیمی انجام گردید. ناقل بیانی جهت بررسی چارچوب خوانش صحیح با استفاده از پرایمرهای عمومی T7 Primer و terminator جهت توالی یابی به شرکت Bioneer کرده جنوبی ارسال شد. سپس ناقل بیانی BL21(DE3) نوترکیب به میزبان بیان اشرشیا کلی

انتهای ۳ آغازگر برگشت بود، تکثیر شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم *Pfu* (Fermentas)، ۱/۲۵ واحد از آنزیم *Pfu* پلی مراز (Fermentas)، ۱ dNTP میکروگرم cDNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر میکرومول از آغازگرها در حجم نهایی ۰/۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن 3ABC با استفاده از دستگاه ترموسايكلر (T-Personal) ساخت آلمان به صورت زیر انجام شد: واسرشت سازی ۶۰ ثانیه در  $94^{\circ}\text{C}$ ، اتصال ۳۰ ثانیه در  $60^{\circ}\text{C}$  و بسط ۳۰ ثانیه در  $72^{\circ}\text{C}$  برای ۳۵ سیکل. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  برای ۳ دقیقه و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در  $72^{\circ}\text{C}$  نیز انجام گردید. محصول PCR به ناقل کلونینگ pTZ57R/T وارد و سپس به اشرشیا کلی DH5α منتقل شد.

### توالی یابی ژن 3ABC

ناقل نوترکیب pTZ57R/T حاوی ژن 3ABC به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کرده جنوبی ارسال گردید. مقدار ۳۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای عمومی رفت و برگشت به ترتیب T7 Primer و T7 terminator با غلظت ۱۰ پیکومول به همراه نمونه‌ها جهت توالی یابی فرستاده شد. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی یابی شدند. ابزار BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده

۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از شستشو آنتی بادی ثانویه، غشا با استفاده از محلول رنگزای DAB (امریکا، Sigma) رنگ آمیزی شد.

#### نتایج و بحث

##### کلونینگ ژن 3ABC در ناقل pTZ57R/T

نتایج PCR پرایمرهای 1D/2B، سروتاپ O ویروس تب بر فکی استفاده شده در این ۱D/2B پژوهش را تایید کرد. برای قطعه ژنی B باندی به طول ۴۰۲ جفت باز روی ژل آگارز 3ABC مشاهده شد (شکل ۱). ناحیه کد کننده 3ABC بروی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی به طول ۱۳۲۰ جفت باز، به خوبی تکثیر شده است (شکل ۲). عدم حضور باند در کترول منفی و حضور قطعات اختصاصی، نشان از دقت و صحت انجام واکنش داشت. حضور ژن 3ABC در ناقل pTZ57R/T با روش کلونی PCR و هضم آنزیمی تایید گردید (شکل ۳). در سال ۲۰۰۴، پژوهشگران ژن 3ABC ویروس تب بر فکی سروتاپ O بزریل را به طول ۱۳۰۳ جداسازی نمودند (Clavijo *et al.*, 2004).

همچنین اولین گزارش مربوط به تولید پروتئین غیرساختاری ویروس تب بر فکی در مخمر پیشیا پاستوریس مربوط به سال ۲۰۰۷ است که در آن محققان ژن 3AB را به طول ۶۷۰ جفت باز بیان کردند (Priyadarshini *et al.*, 2007).

شده که پروتئین غیر ساختاری 3C باعث تحریک پاسخ ایمنی هومورال، القا تکثیر سلولهای T و کاهش حساسیت شدید به واکسن DNA

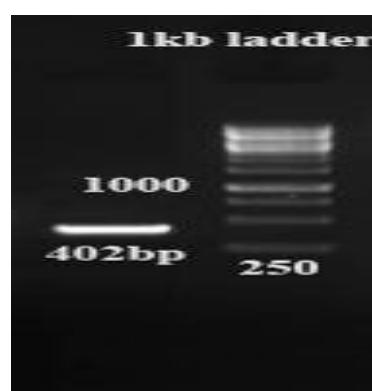
متقل گردید و تک کلنی نوترکیب به مدت ۱۶ ساعت در ۳ میلی لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. یک میلی لیتر از محیط کشت تهیه شده به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی آمپی سیلین اضافه و تا رسیدن به OD، ۶۲۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. در این مرحله، نمونه صفر برداشته و سپس IPTG در غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار به محیط کشت اضافه شد. نمونه برداری در ساعت های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ به منظور مشخص کردن بیان آنتی ژن 3ABC نوترکیب صورت گرفت. سلول ها در ۸۰۰۰ rpm سانترفیوژ و پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر بافر لاملی به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوشانده شدند. محصول در ۸۰۰۰ rpm سانترفیوژ و محلول رویی و انتهایی بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند.

#### وسترن بلاستینگ

پس از الکتروفورز پروتئین، وسترن بلاستینگ با استفاده از کاغذ نیترو سلولز صورت گرفت. غشا با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) ۵ درصد محلول در TBS بلوکه گردید. سپس غشا در TBST محلول آنتی بادی اولیه آنتی His-tag (TBS) همراه با ۱ درصد Tween20 با رقت ۱:۱۰۰۰ برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس سه بار شستشو با TBST انجام گرفت و غشا در محلول آنتی بادی TBST ثانویه با رقت ۱:۱۵۰۰ برای یک ساعت در دمای

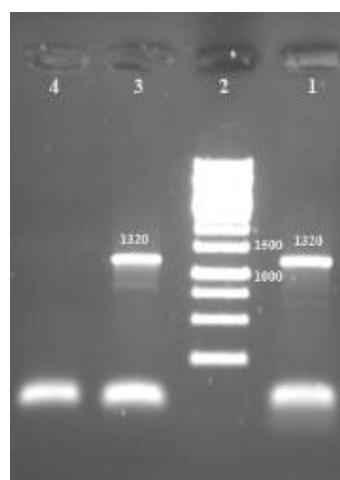
غیرساختاری موجود در سرم خوک‌های آلدۀ یا واکسینه شده بررسی نمودند. نتایج به دست آمده نشان داد که پلی‌پیتید 3ABC ایمن‌ترین پروتئین غیرساختاری بود و می‌تواند برای تشخیص مؤثر خوک‌های آلدۀ از خوک‌های واکسینه شده به کار گرفته شود (Rodriguez *et al.*, 1999).

می‌شوند (Barron *et al.*, 2001). در پژوهش ایمن زایی پروتئین‌های 3AB, 3C, 3A, 2C, Leader غیرساختاری 3ABC و 3D را در خوک ارزیابی نمودند و اختصاصی بودن آنتی‌بادی‌های ضد ویروس بیماری تب‌برفکی را علیه این پروتئین‌های



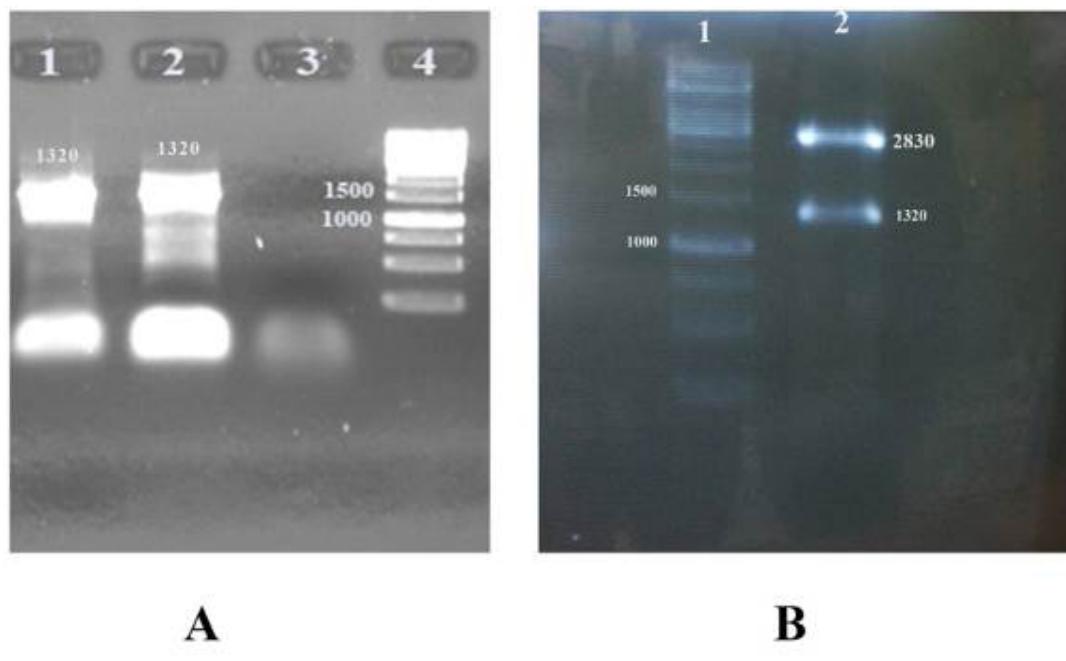
شکل ۱- الگوی الکتروفورز ژل آگارز تکثیر قطعه‌ای 1D/2B

**Figure 1- Agaros electrophoresis pattern of 1D/2B gene PCR products.**



شکل ۲- الگوی الکتروفورز ژل آگارز (یک درصد) تکثیر قطعه‌ای ژنی 3ABC ویروس تب برفکی با آغازگرهای لینکر دار. ستون‌های ۱ و ۳ قطعه‌ای ژنی 3ABC، ستون ۲ مارکر 1Kb و ستون ۴ کنترل منفی.

**Figure 2- Electrophoresis of PCR products 3ABC FMDV with linker primer on agarose gel (1%). S1and S3:3ABC PCR Product (1320bp), S2:M = 1kb DNA Ladder, S4: negative control.**



شکل ۳- شکل A- الگوی الکتروفورزی ژل آگارز کلونی PCR. ستون ۱ و ۲ کلونی PCR. ستون ۳ کنترل منفی و ستون ۴ مارکر 1kb. شکل B- ستون ۱ مارکر 1kb و ستون ۲ : هضم آنزیمی pTZ57R/TP1-3ABC

**Figure 3- Figure A- Agaros electrophoresis of Colony PCR. S1 and S2:Clony PCR, S3:negative control, S4:1kb DNA Ladder, Figure B- S1: 1kb DNA Ladder, S2: Double digest of pTZ57R/TP1-3ABC.**

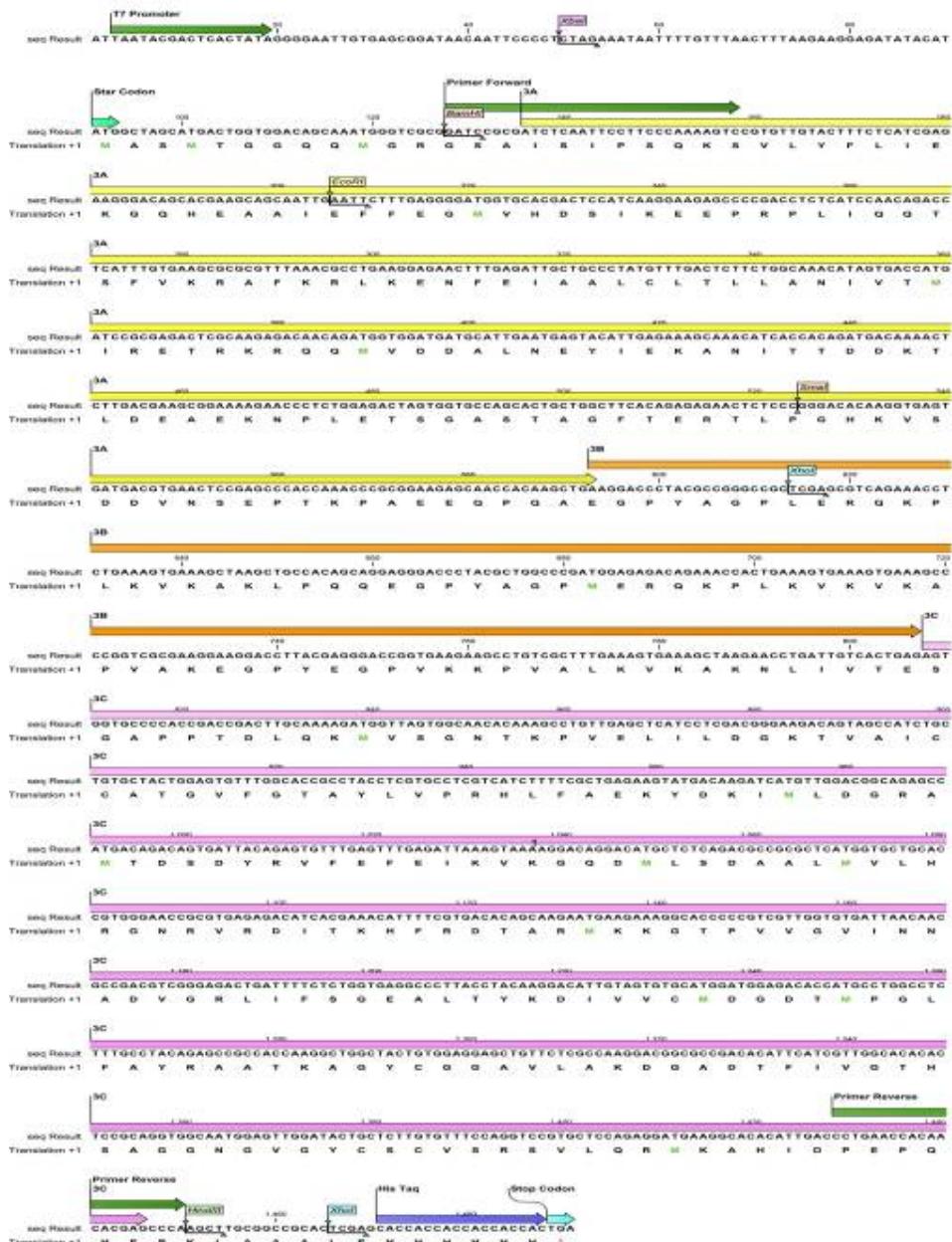
اطلاعاتی بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده از این مقایسه، کمترین شباهت ۶۳/۷ درصد) با ایزوله SAT2- Uga 1-07 آفریقای جنوبی و بیشترین شباهت ۹۳/۹ درصد) با ایزوله Asia1-IND 148-01 هند ۳AB تب بر فکی به دست آمد. پژوهشگران ژن ۳AB تب بر فکی سروتاپ O را در ناقل pTZ57R/T ارتباط فیلوزنوتیکی این ژن را با دیگر سروتاپ ها بررسی کردند (Ahmadpoor, 1391). با آنالیزهای مجازی تولید پروتئین، با ترجمه ناحیه کدکننده آنتی ژن ۳ABC و با استفاده از پایگاه Expasy انجام شد. پروتئین نوترکیب

آنالیز توالی آنتی ژن ۳ABC توالی نوکلوتیدی و پروتئینی ژن ۳ABC ویروس تب بر فکی سروتاپ O ایران در شکل ۴ نمایش داده شده است. ژن ۳ABC بیان شده شامل ۱۳۶۲ جفت باز و ۴۵۵ اسید آمینه می باشد. همانطور که در شکل مشخص شده چارچوب خوانش صحیح +1 می باشد که پروتئین ها را به درستی بیان کرده است. همچنین توالی ژنی این ناحیه به منظور درک روابط بین سروتاپ های مختلف در حال گردش با توالی - ۳ABC سروتاپ های Asia1, O, A های SAT2, SAT1 و SAT3 ثبت شده در پایگاه

این پروتئین پیش بینی شد (شکل ۵).

تولید شده در این پژوهش دارای وزن مولکولی

در حدود ۵۰ کیلو دالتون است. ساختار سه بعدی



شکل ۴- توالی نوکلوتیدی و پروتئینی ژن 3ABC

Figure 4- Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of 3ABC gene.



شکل ۵- ساختار پروتئینی پیش بینی شده توسط Swiss-pdbv.

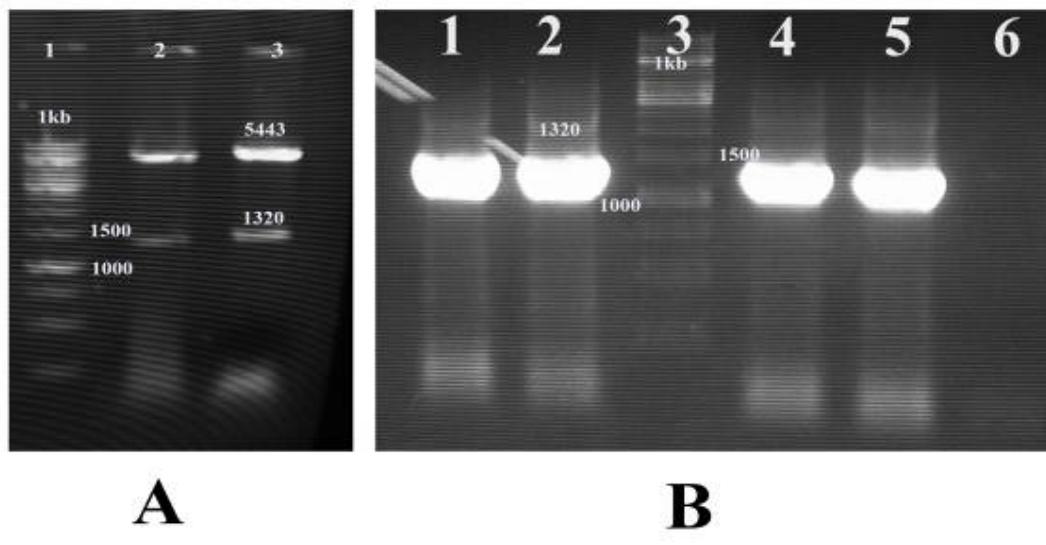
**Figure 5- The secondary structural model of 3ABC in Swiss-pdbv.**

۲۰۰۴ محققان پروتئین نوترکیب 3ABC را در اشرشیاکلی بیان نمودند و وزن مولکولی آن را ۶۲ کیلو Dalton تخمین زدند (Clavijo *et al.*, 2004). ۱۳ کیلو Dalton وزن مولکولی اضافه تولید شده این پروتئین نسبت به تحقیق حاضر، به دلیل حضور توالي محلول کننده است که در پایان ژن 3ABC در نظر گرفته شده است. اگرچه محققان توائستند با بیان ژن 3AB در مخمر مقدار پروتئین بیشتری تولید کنند، اما از آنجا که مخمرها تغییرات بعد از ترجمه ای شدیدی را بر روی پروتئین تحمیل می کنند، بررسی های بالینی جهت موفق عمل کردن پروتئین باستی انجام گردد (Priyadarshini *et al.*, 2007).

### تشکر و قدردانی

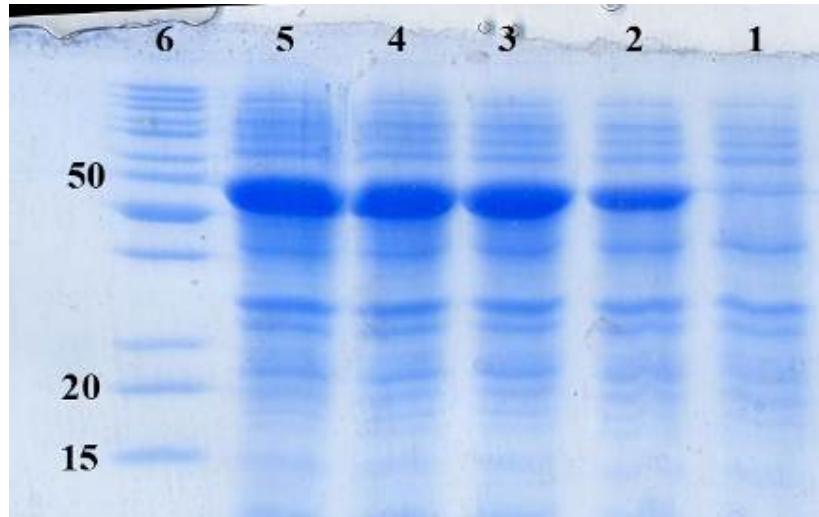
این پژوهه در آزمایشگاههای دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق انجام گرفته و بدین ترتیب از مسولان مربوطه کمال تشکر را داریم.

**بیان آنتی ژن 3ABC در اشرشیاکلی**  
ناحیه کدکننده آنتی ژن 3ABC به شکل pTZ57R/T+3ABC موفقی از پلاسمید نوترکیب HINDIII و BamHI بود در جایگاه آنزیم های BamHI و HINDIII همسانه سازی ناقل (+) pET21a با موفقیت الحاق شد. محصول الحاق به شکل موفقی به اشرشیاکلی (BL21(DE3)) منتقل گردید و نتیجه کلی PCR و هضم آنزیمی با آنزیم های BamHI و HINDIII صحت انجام واکنش را تایید کرد (شکل ۶). پس از القای بیان ژن با استفاده IPTG ۱/۵ میلی مolar، الکتروفورز محصولات القا باند ۷ نشان داد (شکل ۷). وزن مولکولی آنتی ژن ۵۰ Dalton نشان داد (شکل ۷). با مقدار تخمین زده شده در نرم افزار CLC Workbench 5 و Swiss-pdbv با استفاده از آنالیزهای دات بلات و وسترن بلات باندهای پروتئینی به غشای نیتروسلولز منتقل و تشکیل باند در ناحیه ۵۰ کیلو Dalton تولید آنتی ژن نوترکیب را تایید نمود (شکل ۸). در سال



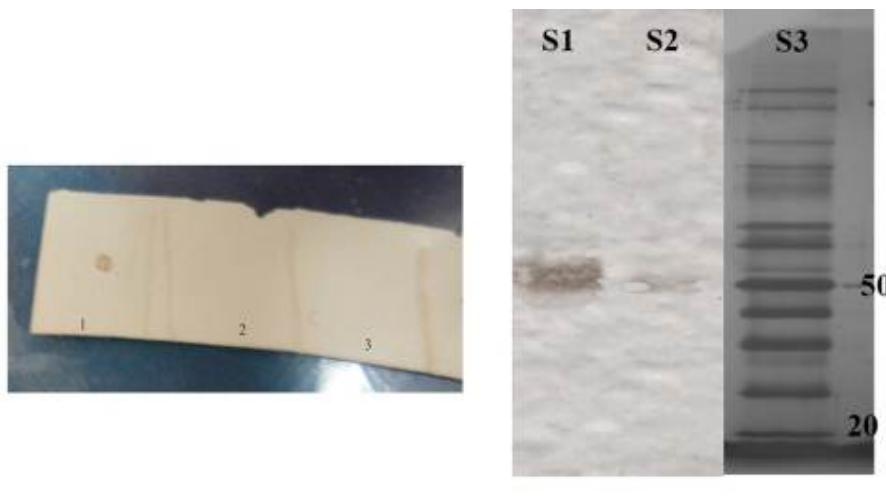
شکل ۶- هضم و کلونی PCR پلاسمید نوترکیب. شکل A- ستون ۱ مارکر 1kb، ستون ۲ و ۳ هضم آنزیمی. شکل B- ستون ۳: مارکر 1kb، ستون های ۱، ۲، ۴، ۵ و ۶ کلونی PCR.

Figure 6- Electrophoresis of colony PCR and double digestion. Figure A- 1kb DNA Ladder, S1,S2: Double digest of pET21-ABC. Figure B- S1-S6 colony PCR, S3: 1kb DNA Ladder.



شکل ۷- SDS-PAGE اس تی دی پی ای جل الکتروفورزی بررسی انتشار ۳ABC در *E. coli* BL21 (DE3) (رنگ آمیزی کوماسی بلو). ستون ۱ تا ۵ به ترتیب مربوط به زمان های (ساعت) صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ می باشد.

Figure 7- SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the recombinant 3ABC in *E. coli* BL21 (DE3). S1:Negative control, S2, S3, S4,S5 cell extracts from *E. coli* BL21 (DE3) cultured for 1, 2, 3 and 4 h after 1 mM IPTG induction and lane S6, Molecular mass markers.



شکل ۸- آنالیز دات بلات و وسترن بلات پروتئین 3ABC نوترکیب. شکل A- ستون S1: نمونه BL21/pET21، ستون S2: کنترل منفی. شکل B- ستون S1 و S2: عصاره سلولی اشرشیا کلی نوترکیب کشت داده شده در زمان های ۱ و ۵، S3: مارکر پروتئینی.

**Figure 8- Dot blot and western blot analysis of 3ABC. Figure A- Lane S1: BL21/3ABC, S2: BL21/pET21, S3: negative control. Figure B- S1 and S2: cell extracts from *E. coli* BL21 (DE3) cultured for 1and 5, S3: molecular mass markers.**

#### منابع

- Ahmadpoor K (2012). Cloning of 3AB non-structural protein coding region of FMD disease virus serotype O in Iran. MsC thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
- Barron L, Cuevas MF, BelshamGJ, LefevreF, ParkhouseRME (2001). Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. Journal of General Virology 82: 1713–1724.
- Brown F, Mowat N (2003). Control of foot-and-mouth disease by vaccination. Veterinary Research. 152: 376.
- Clavijo A, Zhou E M, Hole K, Galic B, Kitching P (2004). Development and use of a biotinylated 3ABC recombinant protein in a solid-phase competitive ELISA for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. Journal of Virological Methods 120: 217–227
- Dory D, RémondM, Béven V, Cariolet R, ZientaraS, Jestin A (2009). Foot-and-Mouth Disease Virus neutralizing antibodies production induced by pcDNA3 and Sindbis virus based plasmid encoding FMDV P1-2A 3C 3D inswine. AntiviralResearch 83: 45-52.
- Ewing B, Green P(1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. Genome Research 8:186-194.
- Fry E, StuartD, Rowlands D (2005). The Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus. Pages 71-101 in B. Mahy, ed. Foot-and-Mouth Disease Virus: SpringerBerlinHeidelberg.

- Hema M, Chandran D, Nagendrakumar S B, Madhanmohan M, Srinivasan V A (2009). Construction of an infectious cDNA clone of foot-and-mouth disease virus type O1BFS 1860 and its use in the preparation of candidate vaccine. *Journal of Biosciences* 34: 45-58.
- Kim S A, Liang C M, Cheng I C, Cheng Y C, Chiao M T, Tseng C J, Lee F, Jong M H, Tao M H, Yang N S, Liang S M (2006). DNA vaccination against foot-and-mouth disease via electroporation: study of molecular approaches for enhancing VP1 antigenicity. *The Journal of Gene Medicine* 8: 1182-1191.
- Pengyan W, Yan R, Zhiru G, Chuangfu C (2008). Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication in vitro and in vivo by small interfering RNA. *Virology Journal* 5: 86.
- Priyadarshini M L, Balamurugan V, Prabhudas K, Suryanarayana V V S, Reddy G R (2007). Expression of 3AB protein of foot and mouth disease virus in *Pichia pastoris*. *Indian Journal of Biotechnology* 6: 329-335.
- Qian P, Li XM, Jin ML, Peng GQ, Chen HC (2004). An approach to a FMD vaccine based on genetic engineered attenuated pseudorabies virus: one experiment using VP1 gene alone generates an antibody responds on FMD and pseudorabies in swine. *Vaccine* 22: 2129-36.
- Reid S M; Ferris N P, Hutchings G H; DeClercq K; Newman B J; Knowles N J; Samuel A R (2001). Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: use of phylogenetic data to evaluate primers for the typing of viral RNA in clinical samples. *Archives of Virology* 146, 2421-2434.
- Rodriguez A, Dopazo J, Saiz J C, Sobrino F (1994). Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: Differences between infected and vaccinated swine. *Archives of Virology* 136: 123-131.
- Song H, Wang Z, Zheng D, Fang W, Li Y, Liu Y, Niu Z, Qiu B (2005). A novel mucosal vaccine against foot-and-mouth disease virus induces protection in mice and swine. *Biotechnology Letters* 27: 1669-74
- Thomson G R, Coetzer J, Thomsen A W, Tustin R C, Kriek N P J (1994). Foot-and-mouth disease. In: *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Oxford University Press, Cape Town: 825-852.
- Tully D C, Fares M A (2009). Shifts in the Selection-Drift Balance Drive the Evolution and Epidemiology of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Virology*. 83: 781-790.
- Yi J Z, Liu M Q, Zhu C Z, Zhang Q, Sheng Z T, Du Q Y, Yan W Y, Zheng Z X (2004). Recombinant bivalent vaccine against foot-and-mouth disease virus serotype O/A infection in guinea pig. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)* 36: 589-96.

## Cloning and expression of non-structural 3ABC gene from FMD virus serotype O in *Escherichia coli*

Parizadeh S.A.R.<sup>1</sup>, Nassiry M.R.<sup>2</sup>, Zibae S.\*<sup>3</sup>, Tahmoorespur M.<sup>2</sup>, Bassami M.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ph.D. Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

<sup>2</sup> Professor , Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor ,Department of Veterinary Research and Biohecnology, Razi vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Mashhad, Iran

### Abstract

After about one hundred year after its identification, Foot and Mouth Disease (FMD) is the first viral disease in animals that impose a major risk to the world's livestock industry. The main method to identify animals vaccinated from animals infected with FMD is using of non-structural 3ABC protein as antigen in the ELISA kit. Hence, 3ABC gene of FMDV serotype O was isolated with PCR using specific primers containing *BamHI* and *HinDIII* restriction sites. The isolated fragment was then inserted in pTZ57R/T vector for cloning and nucleotide characterization. In order to produce recombinant antigens, 3ABC was inserted in pET21a (+) vector and then transform to *E. coli* BL21 (DE3). Recombinant protein production was induced with 1.5 mM IPTG. Production of recombinant proteins confirmed with SDS electrophoresis and Western blotting. The molecular weight of recombinant protein was determined approximately 50 kDa. The results showed that the produced protein can be used as an antigen in the ELISA kit for animals.

**Keywords:** 3ABC Gene, FMDV, Foot and Mouth Disease, Recombinant Protein.

\* Corresponding Author: Zibae S.

Tel: 05138437180

Email: s.zibae@mrasi.ac.ir

