دانشگاه فردوسی مشهد
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

رساله دکتری

کلونینگ و بیان ژن‌های کد کننده نواحی P1 و 3C ژنوم ویروس تب برفکی سروتیپ O و بررسی ایمنی‌زایی آن‌ها

عبد الرؤف الشوکانی

تیر 1391

دانشگاه فردوسی مشهد

رساله دکتری رشته علوم دامی

کلونینگ و بیان ژن‌های کدکننده نواحی P1 و 3C ژنوم ویروس تب برفکی سروتیپ O و بررسی ایمنی‌زایی آن‌ها

عبد الرؤف الشوکانی

اساتید راهنما

دکتر محمد رضا نصیری

دکتر سعید زیبایی

اساتید مشاور

دکتر مجتبی طهمورث پور

دکترسید مهدی زیارت نیا

دکتر محسن فتحی نجفی

دکتر علیرضا حق پرست

تیر 1391

دانشگاه فردوسی مشهد

دانشکده کشاورزی

تصویب نامه

این رساله با عنوان " کلونینگ و بیان ژن‌های کد کننده نواحی P1 و 3C ژنوم ویروس تب برفکی سروتیپ O و بررسی ایمنی‌زایی آن‌ها " توسط آقای"عبد الرؤف الشوکانی" در تاریخ با نمره و درجه ارزشیابی در حضور هیأت داوران با موفقیت دفاع شد.

هیأت داوران

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه	سمت در هیأت داوران	امضاء
1	دکتر محمدرضا نصیری	دانشیار	استاد راهنما	
2	دکتر سعید زیبایی	استادیار	استاد راهنما	
3	دکتر مجتبی طهمورث پور	دانشیار	استاد مشاور	
4	دکتر سید مهدی زیارت نیا	استادیار	استاد مشاور	
5	دکتر محسن فتحی نجفی	استادیار	استاد مشاور	
6	دکتر علیرضا حق پرست	استادیار	استاد مشاور	
7	دکتر محمد آبادی	دانشیار	استاد داور خارجی	
8	دکتر محمد رضا باسامی	دانشیار	استاد داور خارجی	
9	دکتر سید حسن مرعشی	دانشیار	استاد داور داخلی	
10	دکتر فرج الله شهریاری	دانشیار	استاد داور داخلی	
11	دکتر احمد حسن آبادی	استادیار	استاد نماینده تحصیلات تکمیلی	

تعهد نامه

عنوان پایان نامه:

کلونینگ و بیان ژن‌های کد کننده نواحی P1 و 3C ژنوم ویروس تب برفکی سروتیپ O و بررسی ایمنی‌زایی آن‌ها

اینجانب عبدالرؤف الشوکانی دانشجوی دوره دکتری رشته ژنتیک و اصلاح دام دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی آقای دکتر نصیری و آقای دکتر زیبایی متعهد می‌شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می‌گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیر گذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آن‌ها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ

نام و امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.**

استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست

سپاس گزاری

سپاس بی‌پایان پروردگار یکتا را که مجال دانش اندوزی را عطا فرمود تا در راستای پیش برد سطح علمی کشور عزیزم یمن، عضوی پویا باشم. از اساتید راهنمای گران‌قدرم، آقایان دکتر محمدرضا نصیری و دکتر سعید زیبایی که شمع این راه شدند و از هیچ کمکی در انجام این پژوهش دریغ نکرده‌اند، بی‌شمار سپاسگزارم. راهکارهای استاد ارجمند، جناب آقای دکتر طهمورث پور، دکتر مهدی زیارت نیا، دکتر فتحی نجفی و دکتر حق پرست همواره در گره‌گشایی و گذر از موانع دستگیرم شدند و بر خود لازم میدانم در قالب واژگانی هرچند نارسا، لطف ایشان را سپاسگزار باشم. همچنین از مسئولین و همه کارکنان محترم موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق به ویژه بخش تحقیقات و بخش تشخیص به ویژه آقای دکتر کیانی، زاده دکتر طرقی، خانم مجیدی و خانم رضایی تشکر فراوان دارم. از مدیریت محترم پژوهشکده فناوری زیستی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی آقای دکتر بهرامی و خانم دکتر متین به پاس کمک‌های شایانی که در راستای انجام الکتروپوریشن متحمل شده‌اند، کمال تشکر را دارم. از یکایک دوستانی که در گام به گام این پژوهش یاری رسان بنده بودند به ویژه آقایان مهندس دوستی، قوتی، دکتر پور سید، دکتر رشتی باف، حداد، مؤمنی مقدم، بهاری، محقی، حسینی، خانم تیموری، خانم غلامی، خانم پیش بین صمیمانه متشکرم. از عزیزانم در یمن، آقایان ربیع العزعزی، دکتر سیف المقطری، دکتر ابراهیم الشیبانی، دکتر عادل العنسی، علی العنسی، هلال الشوکانی، شوقی العزعزی، ولید العزعزی و عادل المطری که طی سال‌های تحصیل از هیچ کمکی دریغ نکرده‌اند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

در پایان ضمن سپاس بیکران از مهر بی‌پایان پدر بزرگم، پدرم و مادر عزیزم، این رساله را به عنوان هدیه‌ای ناچیز، به پاس یک عمر زحمت بی چشم داشت به نور چشمانم پسرم، دخترم و همسر مهربانم تقدیم می‌کنم.

چکیده

این مطالعه با هدف همسانه سازی و بیان پروتئین‌های ساختاری P1 و غیر ساختاری 3C ویروس تب برفکی سروتیپ O جدا شده از استان خراسان رضوی در مخمر پیشیا پاستوریس و ارزیابی پاسخ ایمنی آن‌ها در خوکچه هندی، انجام گرفت. ژن‌های پروتئین‌های ساختاری P1 و غیر ساختاری 3C این ویروس تکثیر و تعیین توالی شدند و توالی‌های به دست آمده با توالی سایر سویه‌های سروتیپ O و سویه‌های سروتیپ‌های این ویروس از نظر فیلوژنتیکی مقایسه شدند. نتایج آنالیز تعیین توالی و فیلوژنتیکی نشان دادند که ژن P1 بیشترین شباهت نوکلئوتیدی و اسید آمنیه‌ی را با سویه سروتیپ O پاکستان PAK/39/2008 به ترتیب (93% /94) و (98/37%) داشت. ژن 3C بیشترین میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ی را با دو سویه سروتیپ A هندوستان AIND288/07 و AIND 287/96 به ترتیب با 93/74 و 100 درصد داشت. این نتایج نشان می‌دهند که ویروس شیوع یافته در ایران در سال 1389 ممکن است از کشورهای همسایه شرقی به ایران وارد شده باشد. در این تحقیق ژن P1-2A و 3C با دنباله‌های چسبان *Kpn*I و *Xba*I توسط PCR تکثیر شدند و ژن P1-2A درون ناقل pTZ57R/T الحاق و به باکتری DH5α انتقال داده شد. پس از تائید صحت همسانه سازی به روش هضم آنزیمی و PCR، ژن P1-2A و 3C به درون ناقل بیانی pPICZ-B مخمر الحاق و به باکتری DH5α جهت تکثیر انتقال داده شدند. ناقل‌های بیانی pPICZ-BP1-2A و pPICZ-B3C پس از غربالگری و تائید صحت همسانه سازی به روش هضم آنزیمی و توالی‌یابی با آنزیم *Pme*I خطی شده و با روش الکتروپوریشن به مخمر پیشیا پاستوریس انتقال داده شدند. مخمر پیشیا پاستوریس نوترکیب در محیط MMH کشت داده و با متانول بیان پروتئین‌های مورد نظر القاء شد. بیان پروتئین‌های P1-2A و 3C به روش لکه‌گذاری، SDS-PAGE و وسترن بلات تایید گردید. پروتئین‌های تولید شده از مخمر استخراج و با کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA خالص سازی شد ند و به عنوان آنتی ژن تحریک کننده سیستم ایمنی به خوکچه‌های هندی تزریق شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که ژن P1-2A در ناقل pTZ57R/T و ناقل بیانی pPICZ-B و ژن 3C در ناقل بیانی pPICZ-B به درستی همسانه شده‌اند. ورود ژن‌های P1-2A و 3C به داخل ژنوم مخمر پیشیا پاستوریس با روش نوترکیبی همولوگ با استخراج DNA ژنومی مخمر و انجام PCR تائید شد. بیان پروتئین‌های P1-2A و 3C در مخمر به روش وسترن بلات با مشاهده باند اختصاصی پروتئین هدف کاملا تایید شدند. غلظت پروتئین‌های نوترکیب P1-2A و 3C با روش برادفورد به ترتیب، 100 و 40 میکروگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نوع پروتئین نوترکیب در تحریک سیستم ایمنی در برابر ویروس تب برفکی در سطح 0/05 معنی دار بود. ولی اثر افزودن یاور در تحریک سیستم ایمنی معنی دار نبود ($P>0.05$). بین دو تیمار P1-2A و P1-2A3C همراه با یاور در تحریک سیستم ایمنی تفاوت معنی داری مشاهده نشد. به طور کلی می‌توان گفت که در این تحقیق ژن‌های P1-2A و 3C با موفقیت در مخمر پیشیا پاستوریس تکثیر، همسانه و بیان شدند و پروتئین‌های تولید شده قادر به تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی علیه ویروس تب برفکی سروتیپ O می‌باشند.

کلید واژه‌ها ژن P1-2A، ژن 3C، کلونینگ و بیان، مخمر پیشیا پاستوریز، ویروس تب برفکی سروتیپ O

فهرست مطالب

فصل اول - کلیات 1

1-1. مقدمه 1

1-2 اهداف این تحقیق 4

فصل دوم - بررسی منابع 5

2-1. تاریخچه بیماری تب برفکی در جهان و ایران 5

2-2. ویروس تب برفکی 7

2-3 سروتیپ‌ها 8

2-4. ژنوتیپ‌ها 10

2- 5. انتقال و انتشار ویروس تب برفکی 11

2-6. علایم بیماری تب برفکی 12

2-7. رونوشت ویروس تب برفکی 15

2-8 ساختار ژنوم تب برفکی 18

2-8-1. ناحیه تنظیم‌کننده غیرترجمه‌ای '5 19

2-8-1-1 پروتئین VPg 20

2-8-1-2. قطعه‌های S، PKs و Poly(c) 21

2-8-1-3. قطعه " عامل فعال سازی ترجمه cis" 22

2-8-1-4. قطعه (IRES) 24

2-8-2 ناحیه الگوی قرائت شونده (ORF) 25

2-8-3 ناحیه غیر ترجمه‌ای '3 26

2-9. پروتئین‌های ساختاری 27

2-9-1. پروتئین Vp1 30

2-9-2. پروتئین VP2 35

2-9-3. پروتئین VP3 35

2-9-4. پروتئین Vp4 36

2-10. پروتئین‌های غیر ساختاری 36

2-10-1. 2A/B/C 37

2-10-2. 3A/B 38

2-10-3. 3C Proteinase 39
2-10-4. (3D polymerase) (3Dpro) 42
2-11. کنترل بیماری تب برفکی 43
2-11-1. تولید واکسن 44
2-11-2. انواع واکسن‌ها 46
2-11-2-1. واکسن‌های غیر فعال 46
2-11-2-2. واکسن‌های زنده تخفیف حدت‌یافته 47
2-11-3. واکسن‌های نسل جدید یا نوترکیب 48
2-11-3-1. واکسن‌های تحت واحدی 48
2-11-3-2. واکسن‌های تولید شده با استفاده از ناقل‌های زنده 49
2-11-3-3 واکسن‌های ساخته شده به وسیله اسید نوکلئیک 50
2-11-3-4. واکسن‌های تخفیف حدت یافته نوین 50
2-11-3-5 واکسن‌های بر مبنای پپتیدهای صناعی 50
2-12. بیان ژن‌ها و سیستم‌های بیانی 58
فصل سوم- مواد و روش‌ها 63
3-1. تهیه ویروس تب برفکی سروتیپ O 63
3-2. استخراج RNA و ساخت cDNA 63
3-4. تکثیر قطعه 1D/2B جهت تایید تشخیص و تعیین سروتیپ ویروس تب برفکی توسط RT-PCR 64
3-4 طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های P1 و 3C 65
3-5. تکثیر قطعه‌های L/2B و 3B/3D جهت تعیین توالی ژن‌های P1 و 3C توسط PCR 67
3-6. استخراج قطعه‌های L/2B و 3B/3D از روی ژل آگارز جهت خالص سازی 68
3-7. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی ژن‌های P1 و 3C 68
3-7-1. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی ژن‌های P1 68
3-7-2. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی ژن‌های 3C 69
3-7-3. پیش بینی سه بعدی پروتئین‌های VP1 و 3C در فضای مجازی 70
3-8. طراحی آغازگرهای لینکر دار P1-2A و 3C 71
3-9. همسانه سازی قطعه P1-2A در ناقل pTZ57R/T 73
3-9-1. ناقل pTZ57R/T 73
3-9-2. تکثیر ژن P1-2A و A Tailing 74

3-9-3 تهیه سلول‌های مستعد باکتری 76
3-9-4. واکنش الحاق قطعه P1-2A به ناقل pTZ57R/T 77
3-9-5. انتقال ناقل به سلول‌های مستعد 78
3-9-6. غربالگری سلول‌های نوترکیب 79
3-9-7. تایید همسانه سازی ژن P1-2A درون ناقل pTZ57R/T 79
3-9-7-1. کلونی PCR 79
3-9-7-2. هضم دو آنزیمی 80
3-10. همسانه سازی ژن‌های P1-2A و 3C در مخمر 80
3-10-1. آماده سازی ژن‌های P1-2A و 3C و ناقل بیانی pPICZ-B 82
3-10-2. واکنش الحاق قطعه‌های P1-2A و 3C به ناقل pPICZ_B 83
3-10-3. انتقال ناقل pPICZ_BP1-2A و pPICZ_B3C به باکتری 84
3-10-4. غربالگری سلول‌های نوترکیب حاوی ناقل pPICZ_BP1-2A و pPICZ_B3C 85
3-10-5. توالی یابی ژن‌های P1-2A و 3C 85
3-10-6. خطی کردن ناقل‌های بیانی نوترکیب 86
3-10-7. تهیه سلول‌های مستعد مخمر پیشیا 87
3-10-8. الکتروپوریشن 88
3-10-9. تایید ورود ژن‌های P1-2A و 3C در ژنوم مخمر پیشیا 91
3-10-10. القا بیان ژن‌های P1-2A و 3C در مخمر پیشیا 93
3-11. استخراج پروتئین‌های نوترکیب P1-2A و 3C 94
3-12. شناسایی پروتئین‌های نوترکیب 95
3-12-1. شناسایی پروتئین‌ها نوترکیب P1-2A و 3C توسط دات بلات 95
3-12-2. SDS-PAGE پروتئین‌ها 97
3-12-2-1.آماده سازی نمونه: 98
3-12-2-2. تهیه ژل الکتروفورز SDS-PAGE 99
3-12-2-3.رنگ آمیزی با نیترات نقره 101
3-12-2-4. رنگ آمیزی با کوماسی بلو 103
3-12-3. شناسایی پروتئین‌ها توسط وسترن بلات 103

3-13. خالص‌سازی پروتئین نوترکیب 106
3-13-1. تعیین غلظت پروتئین‌های نوترکیب P1-2A و 3C خالص سازی شده 110
3-14. آزمایش اتصال آنتی ژن نوترکیب P1-2A با آنتی بادی اختصاصی 110
3-14-1. آزمایش اتصال آنتی ژن نوترکیب P1-2A با آنتی بادی ویروس تب برفکی در آزمایشگاه 110
3-14-2. آزمایش پروتئین‌های نوترکیب P1-2A و 3C در خوکچه هندی 113
فصل چهارم - نتایج و بحث 119
4-1 نتایج 119
4-1-1. استخراج RNA و ساخت cDNA 119
4-1-2. تکثیر قطعه ژنی 1D/2B جهت تایید تشخیص سروتیپ O ویروس تب برفکی 120
4-1-3. تکثیر ژن‌های کد کننده پروتئین‌های P1-2A و 3C جهت توالی یابی 120
4-1-4. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی ژن‌های P1 و 3C 122
4-1-4-1. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی ژن‌های P1 122
4-1-4-1-1. آنالیز نوکلئوتیدی ژن P1 122
4-1-4-1-2 آنالیز اسید آمینه ژن P1 123
4-1-4-1-3.آنالیز فیلوژنتیک ژن P1 129
4-1-4-1-4. پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین P1 131
4-1-4-2. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی ژن 3C 132
4-1-4-2-1. آنالیز نوکلئوتیدی ژن 3C 132
4-1-4-2-2. آنالیز اسیدهای آمینه ژن 3C 133
4-1-4-2-3. پیش بینی سه بعدی پروتئین 3C 136
4-1-5. تکثیر قطعه‌های P1-2A و 3C با آغازگرهای لینکر دار 137
4-1-6. الحاق TA قطعه P1-2A در ناقل pTZ57R/T 138
4-1-7. همسانه سازی ژن‌های P1-2A و 3C در مخمر 139
4-1-7-1—4. الحاق قطعه P1-2A در ناقل بیانی pPICZ-B 139
4-1-7-2. الحاق قطعه 3C در ناقل بیانی pPICZ-B 141
4-1-7-3. خطی کردن ناقل‌های بیانی نوترکیب و توالی یابی ژن‌های P1-2A و 3C 142
4-1-7-4. الکتروپوریشن و تایید انتقال ناقل‌های نوترکیب به مخمر 145
4-1-7-5. بیان و شناسایی پروتئین‌های نوترکیب P1-2A و 3C 147
4-1-7-5-1. شناسایی اولیه پروتئین‌های P1-2A و 3C توسط دات بلات 147

4-1-7-5-2. شناسایی پروتئین‌های P1-2A و 3C توسط SDS-PAGE 148
4-1-7-5-3. شناسایی پروتئین‌های P1-2A و 3C توسط وسترن بلات 150
4-1-8. خالص سازی پروتئین‌های P1-2A و 3C 151
4-1-9. تعیین غلظت پروتئین‌های نوترکیب 153
4-1-10. آزمایش اتصال آنتی ژن نوترکیب P1-2A با آنتی بادی اختصاصی 153
4-1-10-1. آزمایش اتصال آنتی ژن نوترکیب P1-2A با آنتی بادی اختصاصی در محیط آزمایشگاه 153
4-1-10-2. آزمایش اتصال آنتی‌ژن نوترکیب P1-2A با آنتی بادی اختصاصی پس از تزریق به خوکچه هندی 154
4-2. بحث 155
4-2-1. بحث مطالعات بیوانفورماتیک 155
4-2-2. بحث مطالعات بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها 164
5. نتیجه کلی و پیشنهادات 173
5-1. نتیجه کلی 173
5-2. پیشنهادات 173
6. منابع 176
پیوست‌ها 188

فهرست شکل‌ها

شکل2-1. علائم بیماری تب برفکی در دهان و پای گاو 12
شکل 2-2. بیماری تب برفکی در گاو..... 13
شکل 2-3. ساختار ژنوم ویروس تب برفکی 19
شکل 2-4. ساختار 5' UTR ژنوم ویروس تب برفکی 20
شکل 2-5. فرایند ویرایش پروتئین‌های ویروس تب برفکی و تشکیل ویرون..... 29
شکل 2-6. موقعیت و سایت‌های آنتی ژنیک سروتیپ‌های O، A و C ویروس تب برفکی..... 34
شکل 3-1. شکل شماتیک موقعیت آغازگرهای مورد استفاده درتکثیر وتعیین توالی ژن P1 و 3C..... 66
شکل 3-2. شبیه سازی تولید پروتئین‌های P1-2A..... 72
شکل 3-3. شبیه سازی تولید پروتئین‌های 3C..... 73
1 **شکل 3-4.** نقشه پلاسمید pTZ57R/T و مکان‌های برشی آن..... 74
شکل 3-5. ناقل مخمر pPICZ B همراه جایگاه‌های برشی آنزیم‌های KpnI و XbaI 81
شکل 3-6. دستگاه الکتروپوریشن 91
شکل 3-7. شناسایی پروتئین توسط روش دات بلات..... 96
شکل 3-8. شناسایی پروتئین توسط روش وسترن بلات 105
شکل 3-9. نحوه بستن ساندویچ وسترن بلات 105
شکل 3-10. اتصال تمایلی هیستیدین به فلز نیکل و واکنش بین آن‌ها 108
شکل 3-12. شکل شماتیک تزریق پروتئین‌های نوترکیب P1-2A، P1-2A3C و PBS همراه با یاور و بدون یاور..... 115
شکل 3-11. شکل شماتیک مراحل انجام همسانه سازی و بیان ژن‌های P1-2A و 3C 117
شکل 4-1. غلظت RNA تعیین شده توسط نانودراپ 119
شکل 4-2. الگوی الکتروفورز ژل آگارز تکثیر قطعه‌ای 1D/2B..... 120
شکل 4-3. الگوی الکتروفورز ژل آگارز تکثیر قطعه‌ای L/2B..... 121
شکل 4-4. الگوی الکتروفورز ژل آگارز تکثیر قطعه‌ای 3B/3D..... 121
شکل 4-5. قطعات 1D/2B ، L/2B و 3B/3D. تکثیر شده به صورت شماتیک 122
شکل 4-6. توالی بدست آمده ژن P1 که در آن قسمت‌های مختلف این ژن VP4، VP2، VP3 و VP1 قابل مشاهده است 126
شکل 4-7. شباهت و تفاوت‌های اسیدهای آمینه جایگزین شده در سایت‌های آنتی ژنیک ژن P1 سویه ایران 2010 127
شکل 4-8. شباهت و تفاوت‌های اسیدهای آمینه جایگزین شده در سایت‌های آنتی ژنیک ژن VP1 سویه ایران 2010..... 128
شکل 4-9. درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن P1 بین سویه‌های مختلف ویروس تب برفکی و سویه ایران 2010... 130
شکل 4-10. درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن VP1 بین سویه‌های مختلف ویروس تب برفکی 2010..... 130

شکل 4-11. پیش بینی ساختار سوم پروتئین VP1 ویروس تب برفکی سروتیپ O ایران 132
شکل 4-12. توالی بدست آمده ژن 3C به همراه ترجمه پروتئینی آن 134
شکل 4–13. قسمت‌های مهم ژن 3C، توالی اسید آمینه آن‌ها و موقعیت اسیدهای آمینه تغییر یافته در آن 135
شکل 4-14. پیش بینی ساختار سوم پروتئین 3C ویروس تب برفکی سروتیپ O ایران 136
شکل 4-15. الگوی الکتروفورزی ژل آگارز تکثیر قطعه‌ای ژنی P1-2A ویروس تب برفکی با آغازگرهای لینکر دار 137
شکل 4-16. الگوی الکتروفورز ژل آگارز تکثیر قطعه‌ای ژنی 3C ویروس تب برفکی با آغازگرهای لینکر دار 138
شکل 4-17. الگوی الکتروفورزی ژل آگارز کلونی PCR، pTZ57R/TP1-2A و برش آنزیمی ناقل نوترکیب pTZ57R/TP1-2A 139
شکل 4-18. الگوی الکتروفورزی کلونی PCR، ناقل pPICZ-BP1-2A و برش دو آنزیمی ناقل pPICZ-BP1-2A روی ژل آگارز ... 140
شکل 4-19. همسانه سازی ژن P1-2A در pPICZ-B و ساخت ناقل pPICZ-BP1-2A به شکل شماتیک 140
شکل 4-20. الگوی الکتروفورزی کلونی PCR، ناقل pPICZ-B3C و برش دو آنزیمی ناقل pPICZ-B3C روی ژل آگارز 142
شکل 4-21. شمای شماتیک از نحوه قرار گرفتن قطعه 3C در ناقل بیانی pPICZ-B..... 142
شکل 4-22. نتایج تعیین توالی ناقل pPIXZ-BP1-2A توسط آغازگرهای ناقل و صحیح بودن ترجمه پروتئین 143
شکل 4-23. نتایج تعیین توالی ناقل pPIXZ-B3C توسط آغازگرهای ناقل و صحیح بودن ترجمه پروتئین 144
شکل 4-24. الگوی الکتروفورزی تایید ورود ژن‌های P1-2A در ژنوم مخمر روی ژل آگارز..... 146
شکل 4-25. الگوی الکتروفورزی تایید ورود ژن‌های 3C در ژنوم مخمر روی ژل آگارز 146
شکل 4-26. نتایج دات بلات پروتئین P1-2A با استفاده از آنتی Anti-His-Tag..... 147
شکل 4-27. نتایج دات بلات پروتئین 3C با استفاده از آنتی Anti-His-Tag 148
شکل 4-28 الگوی الکتروفورزیSDS PAGE 12 درصد پروتئین P1-2A رنگ شده با نیترات نقره 149
شکل 4-29. الگوی الکتروفورزیSDS PAGE 12 درصد پروتئین 3C رنگ شده با نیترات نقره 149
شکل 4-30. نتایج وسترن بلات پروتئین P1-2A با استفاده از Anti-His-Tag 150
شکل 4-31. نتایج وسترن بلات پروتئین 3C با استفاده از Anti-His-Tag 151
شکل 4-32. الگوی الکتروفورزی SDS PAGE 12 درصد پروتئین‌های P1-2A پس از خالص سازی 152
شکل 4-33. الگوی الکتروفورزی SDS PAGE 12 درصد پروتئین‌های P1-2A پس از خالص سازی 152
شکل 4-34. معادله استاندارد غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین گاوی 153
شکل 4-35. نتایج دات بلات تست اتصال پروتئین P1-2A با آنتی بادی ویروس تب برفکی در محیط آزمایشگاه 154
شکل 4-36. نتایج الایزا تست اتصال پروتئین ژن P1-2A با آنتی بادی ویروس تب برفکی در محیط آزمایشگاه 154

فهرست جدول‌ها

جدول 3-1. اجزای واکنش PCR تکثیر قطعه‌ای 1D/2B 65
جدول 3-2. برنامه حرارتی واکنش زنجیره پلیمراز جهت تکثیر قطعه 1D/2B 65
جدول 3–3. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های P1 و 3C 66
جدول 3-4. اجزای واکنش PCR تکثیر قطعه‌های L/2B و 3B/3D 67
جدول 3-5. برنامه حرارتی واکنش زنجیره پلیمراز جهت تکثیر قطعه‌های L/2B و 3B/3D 67
جدول 3- 6. توالی‌های ژن VP1 ثبت شده در بانک ژنی 70
جدول 3-7. توالی‌های ژن 3C ثبت شده در بانک ژنی 71
جدول 3–8. توالی آغازگرهای لینکردار مورد استفاده درتکثیر وتعیین توالی قطعه P1-2A و 3C 72
جدول 3-9. عناصر ژنتیکی ناقل pTZ57R/T 74
جدول 3-10. برنامه حرارتی واکنش زنجیره پلیمراز جهت تکثیر قطعه‌ای P1-2A 74
جدول 3-11. اجزای واکنش A Tailing PCR 75
جدول 3-13. خصوصیات ژنتیکی باکتری DH5α 77
جدول 3-12. اجزای واکنش الحاق قطعه P1-2A در ناقل pTZ57R/T 78
جدول 3-14. اجزای واکنش هضم دو آنزیمی ناقل pTZ57R/TP1-2A 80
جدول 3-15. قسمت‌های ژنتیکی ناقل pPICZ-B 83
جدول 3-16. اجزای واکنش الحاق قطعه P1-2A در ناقل بیانی pPICZ_B 84
جدول 3-17. اجزای واکنش الحاق قطعه 3C در ناقل بیانی pPICZ_B 84
جدول 3–19. توالی آغازگرهای مورد استفاده در تعیین توالی قطعه P1-2A و 3C 86
جدول 3-18. اجزای واکنش خطی کردن ناقل‌های بیانی pPICZ_BP1-2A و pPICZ_B3C 86
جدول 3-20. برنامه‌های الکتروپوریشن MicroPulser شرکت BIORAD 90
جدول 3-21. آغازگرهای مورد استفاده در تایید انتقال ژن به مخمر 92
جدول 3-22. اجزای واکنش PCR جهت تایید ورود ژن‌های P1-2A و 3C در ژنوم مخمر 92
جدول 3-23. برنامه حرارتی واکنش زنجیره پلیمراز جهت تایید ورود ژن‌های P1-2A و 3C در مخمر 92
جدول 3-24. مواد مورد نیاز برای تهیه بافر Laemmli buffer samples 5X 100
جدول 3-25. مواد و مقادیر لازم جهت تهیه ژل جدا کننده SDS-PAGE 100
جدول 3-26. مواد و مقادیر لازم جهت تهیه ژل تراکم کننده SDS-PAGE 100
جدول 3-27. مواد و مقادیر مورد نیاز برای بافر 5X تانک SDS-PAGE 101
جدول 3-28. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه بافر پایدارکننده 101
جدول 3-29. مواد مورد نیاز در تهیه محلول نیترات نقره 102

جدول 3-30. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه محلول رنگ زا رنگ آمیزی نیترات نقره 102
جدول 3-31. مواد و مقادیر مورد نیاز برای بافر تانک وسترن بلات 104
جدول 4-1. نوکلئوتیدهای تغییر یافته در ژن 3C ویروس تب برفکی موقعیت و جایگزین آن‌ها..... 135
جدول 4-1. تجزیه واریانس اثرات پروتئین نوترکیب در تحریک سیستم ایمنی..... 155

فهرست علائم و اختصارات

علائم	لاتین	فارسی
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	۵- برومو-۴-کلرو-۳-ایندولیل-β-D-گلاکتوپیرانوزید
BEI	binary ethyleneimine	اتیلن ایمین مضاعف
DNA	deoxyribonucleic acid	اسید دزوکسی ریبونوکلئیک
RNA	ribonucleic acid	اسید ریبونوکلئیک
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	الایزا
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactoside	ایزوپروپیل- β-D- تیوگالاکتوزید
RGD	Arg-Gly-Asp	آرژنین- گلایسین- آسپارژین
WRL	world refrence laboratory	آزمایشگاه رفرنس جهانی
CF	complement fixation	آزمون‌هاي تثبیت مکمل
FMD	Foot and Mouth Disease	بیماری تب برفکی
SVD	swine vesicular disease	بیماری تاول دار خوک
$3C^{pro}$	3C protease	پروتناز 3C
PABP	poly(A)-binding protein	پروتئین متصل شونده به پلی A
VPg	Viral Protein,genome linked	پروتئین ویروسی متصل شونده به ژنوم
L^{pro}	Leader protease	پروتئیناز Leader
PEG	polyethylene glycol	پلی اتیلن گلایگول
poly(A)	polyadenylated	پلی آدنیلات
poly(C)	polycytidylate	پلی سیتیدیلات
$3D^{pol}$	3D polymerase	پلیمراز 3D
SNT	serum neutralization test	تست خنثی سازی سرم
VS	vesicular stomatis	التهاب مخاطی تاول دار
dNTP	deoxynucleoside-5'-triphosphate	دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات
Rpm	Round per minute	دور در دقیقه
ddA	dideoxy adenosine	دی داکسی آدنوزین
ddT	dideoxy thymidine	دی داکسی تیمیدین
RNase	Ribonuclease	ریبونوکلناز
lacZ	β-galactosidase gene	ژن بتا گالاکتوزیداز
OIE	Office International des Epizooties	سازمان جهانی بهداشت دام
IRES	internal ribosome entry site	سایت داخلی ورود به ریبوزوم
cre	*cis*-acting replication element	عامل فعال سازي ترجمه
TNF	tumour necrosis factor	فاکتور تومور نکروز
MHC	major histocompatability complex	کمپلکس سازگار بافتي
LB	Lauria bertani	لوریا برتانی
µg	microgram	ماکروگرم
µl	microliter	ماکرولیتر
BHK	baby hamster kidney	محیط کشت
NCBI	National center of biotechnology information	مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی
cDNA	complementary DNA	مکمل اسید دزوکسی ریبونوکلئیک
PKs	Pseudoknots	منطقه کدون‌هاي کاذب
mg/ml	miligram	میلی گرم/ میلی لیتر
UTR	untranslated region	ناحیه غیرترجمه‌ای
ORF	open reading frame	ناحیه الگوي قرائت شونده باز
Ng	nanogram	نانوگرم
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction	واکنش زنجیره پلیمراز ترانس‌کرپتاز معکوس
PCR	polymerase chain reaction	واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

فصل اول - کلیات

1-1. مقدمه

بیماری تب برفکی (FMD) یکی از مسری‌ترین بیماری‌های ویروسی دام است که حیوانات وحشی و اهلی (تولی و فاریز، 2009) زوج سم به ویژه تولید کنندگان شیر و گوشت را آلوده می‌کند (کاین و همکاران، 2004؛ سونگ و همکاران، 2005؛ چانسانگارام و همکاران، 2003؛ دوری و همکاران، 2009). این بیماری خسارت اقتصادی زیادی را به صنعت دامپروری وارد کرده است و یکی از تهدیدهای تجارت دام و فرآورده‌های دامی در سراسر جهان محسوب می‌شود (هیما و همکاران، 2009؛ کیم و همکاران، 2006 ؛ پینگان و همکاران، 2008).

ویروس عامل بیماری تب برفکی از خانواده پیکورناویریده و از جنس آفتوویروس است که داری هفت سروتیپ O، A، Asia1، SAT1، SAT2 و SAT3 و سویه‌های متعددی می‌باشد (هیما و همکاران، 2009؛ کاین و همکاران، 2004). تفاوت بین این سروتیپ‌ها بر اساس منطقه جغرافیایی می‌باشد و ایمنی متقاطع بین سروتیپ‌ها و تحت‌تیپ‌ها وجود ندارد. واکسیناسیون بر علیه یکی از سروتیپ‌های فوق در برابر

دیگر سروتیپ‌های ویروس تب برفکی ایمنی ایجاد نمی‌نماید، لذا برای کنترل بیماری از طریق واکسیناسیون اختصاصاً باید واکسنی از همان سویه خاص تولید و در همان منطقه استفاده شود (هیما و همکاران، 2009)؛ هر چند پیش بینی این مطلب که کدام سروتیپ در منطقه قبل از واکسیناسیون شیوع می‌یابد، سخت است (یا و همکاران، 2004). از طرف دیگر این ویروس فاقد سیستم اصلاح اشتباه در حین نسخه برداری بوده و در زمان تکثیر ژنومی، جهش‌های پی در پی در این ویروس اتفاق می‌افتد و منجر به ظهور تغییرات ژنتیکی و آنتی ژینیک این ویروس می‌شود، در نتیجه باید واکسن‌های جدید علیه سویه جهش یافته تولید نمود (باسواس و همکاران، 2006 و مانگکیو و همکاران، 2008). علاوه بر جهش، انتخاب هم یکی از علل مهم تغییرپذیری این ویروس به حساب می‌آید که قابلیت تغییرپذیری بالای RNA این ویروس منجر به ظهور هفت سروتیپ متفاوت از لحاظ ایمونولوژی شده است (دو و همکاران، 2008؛ هیما و همکاران، 2009).

واکسن‌های متداول یا سنتی FMD با استفاده از کشت سلولی (BHK21) تهیه می‌شوند. ویروس تکثیر شده در این سلول‌ها توسط روش‌های شیمیایی (هیما و همکاران، 2009؛ کاین و همکاران، 2004؛ سونگ و همکاران، 2005) مانند روش اتیلن ایمین مضاعف (BEI) غیر فعال می‌شود. از آنجا که تولید ویروس‌های حیوانی و انسانی به محیط کشت سلولی نیاز دارد بنابراین پر هزینه است. همچنین برای اجتناب از خطر رویارویی پرسنل آزمایشگاه و کارخانه با عامل بیماری‌زا به رعایت تدابیر امنیتی گسترده نیاز است (دو و همکاران، 2008) در بعضی موارد ویروس به شکل کامل غیر فعال نشده و در نتیجه منبعی برای آلودگی محسوب می‌گردد (کیم و همکاران، 2006؛ پینگان و همکاران، 2008؛ کاین و همکارن، 2004؛ یا و همکاران، 2004) از طرف دیگر ایمنی‌زایی واکسن تولید شده کوتاه بوده و جدا کردن حیوانات واکسینه شده و غیر واکسینه ممکن است به علت فقدان تکنولوژی تفریقی لازم مشکل باشد و در نهایت می‌توان به

ناپایداری حرارتی واکسن اشاره کرد (بارون و همکاران، 2001؛ دای، 2007) با توجه به معایب ذکر شده نیاز به تولید واکسنی که دارای این معایب نباشد ضروری به نظر می‌رسد.

در بعضی موارد از واکسن‌های حاوی چند سروتیپ استفاده می‌شود که این کار ممکن است منجر به شیوع بیش از یک سروتیپ در یک زمان گردد. بیشتر برنامه‌های واکسیناسیون در کنترل این بیماری، به ویژه در کشورهای در حال توسعه به علت کمبود منابع مالی، کاهش سرعت و دقت تشخیص سروتیپ‌ها موفق نبوده‌اند. با توجه به دلایل ذکر شده، تولید واکسن کم هزینه، کم خطر و با فعالیت و پایداری بالا ضروری به نظر می‌رسد. استراتژی‌های متعددی برای تولید واکسنی که نیاز به رشد زیاد ویروس و در نتیجه خطر شیوع بیماری نداشته باشد، از جمله: واکسن‌های پپتیدی، واکسن‌های DNA (دوری و همکاران، 2009؛ و سونگ و همکاران، 2005a)، پروتئین‌های نوترکیب، سویه‌های ضعیف شده و ناقل‌های همساز[1] معرفی شده‌اند. واکسن‌های DNA و پروتئین‌های نوترکیب به علت سهولت در اجرا، ایمن بودن، امکان نگهداری طولانی مدت، امکان تولید پروتئین حل پذیر، استفاده از آن‌ها به عنوان نشانگر و امکان تولید واکسن بر علیه سروتیپ‌های جدید جزء بهترین روش‌ها برای تولید واکسن ویروس تب برفکی به حساب می‌آید. پروتئین‌های مختلف این ویروس برای تولید واکسن نوترکیب در سیستم‌های متفاوتی کلون و بیان شده‌اند و سطوح متفاوتی از آنتی بادی را در میزبان‌های خودشان تولید کرده‌اند. اما استفاده از پروتئین‌های ساختاری P1-2A همراه با پروتئاز 3C بیشترین تولید آنتی بادی را به همراه داشته است (کیم و همکاران، 2006 ؛ یا و همکاران، 2004). این پروتئین‌ها در سیستم‌های مختلفی مانند *E. coli* و سلول‌های حشره کلون و بیان شده‌اند، هر چند که این سیستم‌ها نتوانستند به سطح بیان و پایداری مطلوب برسند که این امر می‌تواند به علت

[1] Replicating vectors

کاهش pH محیط، طبیعت ساخت، سیستم میزبان و یا همه این عوامل باشد (بالامیوروگان و همکاران، 2005؛ شا و همکاران ،2006؛ یا و همکاران، 2004). ژن‌های ویروس تب برفکی تحریک کننده سیستم ایمنی در گیاهان مانند یونجه و گوجه فرنگی و همچنین در سیستم باکتری غیر از *E. coli* مانند سالمونلا نیز کلون وبیان شده‌اند و برای تولید واکسن خوراکی این ویروس به کار رفته‌اند (مانگکو و همکاران، 2008؛ پینگان و همکاران، 2008؛ شا و همکاران2007).

مخمرها به عنوان موجودات یوکاریوتی هم بسیاری از مزایایی یوکاریوت‌های عالی نظیر تغییرات پس از ترجمه را دارند و هم مانند باکتری *E.coli* به راحتی قابل دستکاری هستند. سلول‌های مخمری هم سریع‌تر و آسان‌تر و ارزان‌تر از سلول‌های یوکاریوتی قابل کشت می‌باشند و معمولا سطوح بالایی بیان ژن را نشان می‌دهند لذا استفاده از مخمرها به عنوان بیوراکتورهای تولید کننده پروتئین‌های نوترکیب مورد توجه می‌باشد (بالامیوروگان و همکاران، 2007؛ پرادارشانا و همکاران، 2007؛ روگان وبابیوک، 2005).

2-1 اهداف این تحقیق

1- مطالعات بیوانفورماتیک ژن‌های P1 و 3C سروتیپ O ویروس تب برفکی

2- کلون و بیان ژن‌های P1 و 3C ویروس تب برفکی در مخمر *Pichia pstoris*

3- خالص‌سازی پروتئین نوترکیب توسط سیستم Anti-His-Tag

4- آزمایش فعالیت پروتئین نوترکیب در محیط آزمایشگاه و در حیوانات آزمایشگاهی