مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۴، ۳۲۳-۳۱۱
Original Article
Journal of Veterinary Research. 69,4:311-323, 2014

طراحی و تولید ردهٔ سلولی بیان کنندهٔ ژن‌های *5′UTR* و *NS3* از عامل اسهال ویروسی گاوها (BVDV) به منظور ارزیابی کارآیی روش‌های درمانی علیه این ویروس

اعظم مختاری[۱] امید مددگار[۱*] محمد معصومی[۲] محمدرضا محزونیه[۳] آرش قلیانچی لنگرودی[۱]

۱) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
۲) گروه زیست فناوری دام و آبزیان، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران، تهران- ایران
۳) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران

(دریافت مقاله: ۴ مهر ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۸ آذر ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: عامل مولد اسهال ویروسی گاو (BVDV) عامل مضرات اقتصادی، بهداشتی قابل توجهی در مزارع پرورش گاو است. به دلیل ناکارآمدی نسبی برنامه‌های ریشه کنی این ویروس، در سال‌های اخیر برای مبارزه با آن تدابیر متعدد ضد ویروسی نظیر ژن درمانی به فراوانی به کار گرفته شده است. یکی از روش‌های ارزیابی کیفیت این تدابیر، استفاده از این ابزارهای ضد ویروسی در رده‌های سلولی اختصاصی بیان کننده آن ژن از طریق القای بیان ژن توسط پلاسمید حامل یا عفونت با وکتورهای ویروسی است. **هدف:** این مطالعه با هدف تهیه یک رده ی سلولی بسیار بیان کننده بخشی از ژنوم BVDV برای ارزیابی کارآمدی روش‌های درمانی و پیشگیرانه علیه این ویروس انجام شد. **روش کار:** بدین منظور پس از کشت سویه استاندارد NADL از BVDV و استخراج vRNA، افزوده سازی ژن‌های کد کننده *5′UTR* و *NS3* از ژنوم این ویروس و سپس کلونینگ این قطعات ژنی در پلاسمید لنتی ویروسی pWPI- linker B در فرادست ژن GFP انجام شد. پس از تأیید کلونینگ، لنتی وکتورهای حاوی BVDV- NS3 و BVDV- 5'UTR در سلول‌های 293T با استفاده از سیستم packaging نسل سوم تولید شدند. در مرحله بعد سلول‌های MDBK بیان کننده دائمی *5′UTR* و *NS3* با استفاده از عفونت با لنتی ویروس‌های بیان کننده BVDV- NS3 و BVDV- 5'UTR تولید گردیدند. **نتایج:** کارآمدی عفونت با لنتی وکتورهای حامل ترانس ژن با آزمون‌های مشاهده مستقیم با میکروسکوپ فلورسنت، وسترن بلاتینگ و RT-PCR بررسی و با گروه کنترل مقایسه گردید و حضور و بیان ژن‌های مورد نظر تأیید شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج نشان دهنده تولید موفقیت‌آمیز رده ی سلولی MDBK بسیار بیان کننده این دو ژن از BVDV بود و لنتی وکتورها به دلیل بیان طولانی مدت و پایدار ژن تا چندین نسل سلولی و امکان عفونی نمودن بسیاری از رده‌های سلولی نسبت به سایر وکتورهای ویروسی ارجحیت دارند.

واژه‌های کلیدی: BVDV، عفونت، لنتی وکتور، MDBK، ترانسفکشن

مقدمه

عامل مولد اسهال ویروسی گاوان (BVDV) یکی از مهمترین عوامل ویروسی بیماریزای گاو و مسبب زیان‌های اقتصادی تأمل برانگیز ناشی از کاهش بازده تولید، ناکارآمدی و به تعویق افتادن برنامه‌های تولیدمثل و تبعات منتج از تضعیف سیستم ایمنی در گاوهای مبتلا (۵،۹،۱۰) در سراسر جهان است. این ویروس بر اساس توانایی آسیب رساندن به سلول‌های میزبان دارای دو بیوتیپ سایتوپاتیک (cp) و غیر سایتوپاتیک (ncp) و بر مبنای تفاوت در توالی نوکلئوتیدی واجد دو ژنوتیپ BVDV-1 و 2-BVDV می‌باشد (۷،۱۱،۲۶). قطر تقریبی ویریون‌های آن ۵۰nm بوده و واجد کپسید بیست وجهی و غشاء است. ژنوم این ویروس RNA تک رشته‌ای با سنس مثبت، فاقد کلاهک ترجمه و حدوداً ۱۲/۵Kb بوده و یک چهارچوب قرائت باز (ORF) به طول ۴۰۰۰ کدون و دو منطقه ترجمه نشونده (*UTRs*) در دو انتهای '3 و '5 دارد (۲،۱۴،۲۸). ORF در این ویروس برای یک پیش ساز پلی پروتئینی رمز صادر می‌کند که همزمان یا پس از ترجمه توسط پروتئازهای ویروس یا سلول دچار کلیواژ شده و پروتئین‌های زیر را به ترتیب از انتهای آمینی به سمت کربوکسیل تولید می‌کند:

-NS2-NS3 (NS23)-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH

$NH2-N^{pro}-C-E^{rns}-E1-E2-p7$

NS3 به عنوان مارکر cpBVDV شناخته شده و با فعالیت سرین پروتئازی در انتهای آمینی خود ژنوم ویروس را در جایگاه‌های کلیواژ NS3/NS4A NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B, برش می‌دهد. علاوه بر این NS3 فعالیت نوکلئوزید تری فسفاتاز و RNA هلیکاز هم دارد. بیان *NS2-3* در ویروس‌های سایتوپاتیک و غیرسایتوپاتیک برای تشکیل ویریون‌های عفونی ضروری است. فعالیت پروتئازی NS3 در عفونت cpBVDV در سلول‌های آلوده سبب القای مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌شود. مشخص شده است که ۱۵ آمینواسید انتهای آمینی NS3 در به راه انداختن آبشار پروتئولیتیک آپوپتوز ناشی از عفونت BVDV نقش دارند (۱۸،۲۴،۲۷). منطقه ی 5'UTR به طول ۳۷۰ b، ثابت ترین و حفاظت شده ترین ناحیه ی ژنوم این ویروس در طول تکامل بوده و شامل یک توالی ورود به ریبوزوم داخلی (*IRES*) است. این توالی ساختار ثانویه مهمی برای ترجمه ORF، تنظیم رونویسی ژنوم و بیان ژن است و

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۳-۰۲۱، نمابر: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱ Email: omadadgar@ut.ac.ir

بخش‌هایی مرتبط با حدت ویروس دارد (۱۹). با در نظر گرفتن وظایف عملکردی ویژه این دو بخش از ژنوم، این نواحی برای تولید یک رده سلولی جهت ارزیابی استراتژی‌های ضد این ویروس انتخاب گردید. در سال‌های اخیر برای مبارزه با BVDV استراتژی‌های مختلف ضد ویروسی نظیر ژن درمانی به فراوانی به کار گرفته شده است (۱۷،۱۳،۱۱،۱). یکی از راه‌های تأیید کیفیت ابزارهای درمانی یا کنترلی طراحی شده علیه یک ژن، ارزیابی این مولکول‌ها در رده‌های سلولی اختصاصی بیان کننده آن ژن است (۶). برای این کار، در این مطالعه وکتورهای لنتی ویروسی بیان کننده این دو ژن با استفاده از سیستم بسته بندی لنتی ویروسی نسل سوم تهیه شدند و برای آلوده سازی دائمی رده سلولی MDBK به کار گرفته شدند. لنتی ویروس‌ها در بخشی از چرخهٔ زندگی، ژنوم خود را در ژنوم میزبان ادغام می‌کنند و بنابراین می‌توانند ابزاری برای بیان طولانی مدت یک ترانس ژن را حتی برای تمام عمر فراهم کنند. وکتورهای لنتی ویروسی تغییر یافته هستند به طوری که تنها تعداد محدودی از ژن‌های مورد نیاز ویروس در ژنوم وکتور مهندسی شده وجود دارد و با همین تعداد اندک ژن‌های ضروری، ادغام پایدار ژنوم وکتور ویروسی در ژنوم میزبان فراهم می‌شود. با این استراتژی، ژن نوترکیب مورد نظر به طور مداوم بیان می‌گردد اما ویروس عفونی تولید نمی‌شود. برای ایجاد چنین وکتور ویروسی، یکی از جدیدترین روش‌ها وارد نمودن اجزای مختلف ژنوم در سه یا چهار پلاسمید مختلف و متعاقباً ترانسفکشن همزمان این پلاسمیدها برای تولید یک ویروس در یک رده سلولی مناسب است. با در نظر گرفتن پایداری عفونت القاشده توسط لنتی وکتورها و همچنین قابلیت ورود این وکتورها در تعداد بسیار زیادی از رده‌های سلولی (۲۲)، در این مطالعه از این وکتورها برای تولید رده ی سلولی MDBK بیان کننده ی BVDV NS3 و BVDV 5′UTR استفاده شد.

مواد و روش کار

کلونینگ دو ژن در وکتور لنتی ویروسی pWPI-Linker B (کشت ویروس BVDV در رده ی سلولی بیضه ی گاو (testicular cell line BT=Bovine)): به منظور استخراج و ازدیاد ژن‌های *5′UTR* و *NS3* از ژنوم BVDV آزمون RT-PCR انجام شد. برای این کار سویه استاندارد BVDV-NADL (NC-001461) از آزمایشگاه مرجع سلامت حیوانات sekans دانشگاه آنکارا (بزرگواری دکتر فرجی) تهیه گردید. رده سلولی بیضه گاو (BT=Bovine testicular cell line) تهیه شده از مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی کشت داده شد. محیط کشت DMEM (محصول GIBCO، آمریکا، به شماره کاتالوگ ۱۱۶- ۱۲۸۰۰) +10%FBS (محصول GIBCO، آمریکا، به شماره کاتالوگ ۱۰۶- ۱۰۲۷۰) + streptomycin 1x penicillin (محصول Sigma، آمریکا به شماره کاتالوگ ۱۱۶- ۱۲۸۰۰) به عنوان محیط نگهداری سلول‌ها استفاده گردید. ۲۴ ساعت پس از کشت (در زمان ۹۰٪ تراکم سلولی)، ۱۰۰ µL از مایع کشت سلولی حاوی ویروس BVDV-NADL به هر چاهک از پلیت ۶ خانه کشت سلول اضافه گردید. سپس سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه و هر روز برای مشاهده اثرات سایتوپاتیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از مشاهده CPE سلول‌ها برای استخراج RNA ویروسی آماده شدند.

استخراج BVDV-RNA با استفاده از کیازول (Qiazol) (برای این کار از کیت QIAzol (QIAGEN، آلمان، شماره کاتالوگ: ۷۹۳۰۶ استفاده شد. به طور خلاصه): پس از دو بار شستشوی سلول‌ها با PBS1x، سلول‌ها تریپسینه شدند و به ازای هر خانه از پلیت ۶ خانه ۵۰۰ µL کیازول به رسوب سلولی اضافه گردید و با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به ازای هر ۵۰۰µL کیازول استفاده شده، ۱۵۰µL کلروفرم به اپندروف اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ ^{o}C، سانتریفیوژ انجام گردید. فاز رویی به میکروتیوب جدیدی منتقل شده و مرحله ی قبل یکبار دیگر تکرار گردید تا اطمینان بیشتری از خلوص RNA جدا شده وجود داشته باشد. سپس فاز رویی به میکروتیوب جدیدی منتقل شد و به میزان دو برابر حجم آن اتانول و یا ایزوپروپانول سرد مطلق اضافه شد و یک شب در دمای ۲۰ ^{o}C- قرار گرفت. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ ^{o}C و با ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. پس از شستشو با ۱mL اتانول ۷۵٪ و تبخیر اتانول، بر حسب اندازه ی رسوب مقدار ۵۰-۱۰µL آبِ عاری از RNase اضافه شده و کاملاً پیپتاژ گردید. سپس تریتمنت با DNase در حجم ۵۰µL شامل ۱۰ µg از RNA استخراج شده، ۵ µL از بافر 1x مربوط به DNase I، ۱ µL از DNase I (Ambion، آمریکا، شماره کاتالوگ: AM2222) و آبِ عاری از RNase انجام شد. سپس جذب نوری نمونه با واحد نانوگرم در میکرو لیتر در طول موج ۲۶۰ nm قرائت شد و نمونه‌های RNA تا زمان انجام واکنش RT-PCR، در دمای ۷۰ ^{o}C- نگهداری گردیدند.

RT-PCR به منظور افزوده سازی BVDV NS3 و BVDV 5′UTR: واکنش RT با استفاده از کیت Invitrogen (Reagents/N8080234 TaqMan Reverse Transcription، آلمان، شماره کاتالوگ: N8080234) طبق دستورالعمل کیت انجام شد. به طور خلاصه، واکنش در حجم ۱۰µL و شامل ۱µL از بافر ۱۰xRT، ۲/۲µL از MgCl2 ۲۵mM، ۲µL از dNTP ۱۰mM، ۰/۵µL از Random hexamers، ۰/۲µL از مهارکننده RNase، ۰/۲۵µL از آنزیم رونوشت بردار معکوس (۵۰U/ µL) و مقدار محاسبه شده از RNA الگو و آب عاری از DNase/RNase (µL /۵۰۰ng- ۴۰۰) و آب دیونیزه ی استریل بود. برنامه ی دمایی واکنش RT عبارت بود از: ۲۵ ^{o}C به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۸ ^{o}C به مدت ۳۰ دقیقه و ۹۵ ^{o}C به مدت ۵ دقیقه. cDNA سنتز شده تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰ ^{o}C- نگهداری شد.

برای انجام آزمون PCR طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزار gene runner و برای توالی‌های مربوط به انتهای آمینی یا سرین پروتئاز از *NS3* (۳۷۹۰- ۴۰۰۰) و نیز *5′UTR* (۳۸۶ باز ابتدایی ژنوم) از (NC001461 ac. no: BVDV-NADL) با استفاده از بانک ژن NCBI انجام شد. برای

افزوده سازی BVDV NS3 از پرایمرهای ′AGT ACT GG GGA A-3 و ′TTA TAG TC-3 :F: 5′-CGC CAC A GA TCT ACC GC AAG استفاده R: 5′-CGC CAC AGA TCT ACC CA TCA GTA GG گردید. در دو انتهای پرایمر طراحی شده برای تکثیر این ژن جایگاه عمل آنزیم *Bgl*II تعبیه گردید. شرایط دمایی PCR عبارت بود از: ۹۵°C به مدت ۲ دقیقه که با ۳۰ چرخه دمایی ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۹/۷°C به مدت ۳۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۵ ثانیه دنبال شد و در نهایت یک مرحله نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه وجود داشت. برای ازدیاد BVDV 5′UTR از پرایمرهای ′TCC ACC A CTCGTAT ACG TAT TGG G C -3 F: 5′- CGC GGA با جایگاه عمل *Bam*HI و ′ACA CA GAG AT -3 R: 5′- GTT C C C C G G GC GT CCA TGT با جایگاه عمل آنزیم *Sma*I استفاده شد و شرایط دمایی PCR عبارت بود از: ۹۵°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه دمایی ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۰/۷°C به مدت ۳۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک مرحله نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه. کنترل مثبت تهیه شده از نمایندگی آزمایشگاه‌های دامپزشکی و سلامت حیوانات (AHVLA) در انگلستان (بزرگواری دکتر فالکو اشتینباخ و دکتر دستجردی) و منفی در هر آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفتند. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در کنار مارکر سایز ۱۰۰bp (Fermentas، آلمان) مشاهده شد.

خالص‌سازی محصول PCR به روش دستی: به ازای هر ۲۰µL محصول PCR، ۲ µL سدیم استات (۳ M)، ۲ µL محلول EDTA (۱۲۵mM) و ۵۰µL اتانول مطلق اضافه شده و ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای ۴°C قرار گرفت. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm، ۶۰ µL مایع رو به آرامی برداشته شده و دور ریخته شد. سپس با ۷۰µL اتانول ۷۰٪ شستشو انجام شده و پس از تبخیر کامل اتانول، رسوب در ۲۰-۱۰µL آب دیونیزه ی استریل حل شده و جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ nm قرائت گردید.

برش پلاسمید، لیگاسیون: پلاسمید لنتی ویروسی Linker B-pWPI تهیه شده از مرکز تحقیقات زیست ـ پزشکی و (IMIM) در اسپانیا (بزرگواری دکتر Fabien Delaspre) توسط آنزیم‌های اندونوکلئاز محدود کننده *Bam*HI (محصول Roche، آلمان، شماره کاتالوگ: ۱۰۲۲۰۶۱۲۰۰۱) و *Sma*I (محصول Roche، آلمان، شماره کاتالوگ: ۱۰۲۲۰۵۶۶۰۰۱) برش داده شد. برای این کار بسته به برش منفرد یا دوگانه پلاسمید در یک ویال ۱µL پلاسمید با غلظت ۱-۰/۵ µg/µL، ۲ µL بافر ۱۰x مربوط به آنزیم و ۱µL آنزیم (یا ۰/۵µL از دو آنزیم) اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰µL رسید و یک شب در دمای ۳۷°C برای هضم منفرد و ۳۰°C برای هضم دوگانه قرار گرفت. پس از تأیید صحت برش با الکتروفورز در ژل ۰/۸٪، واکنش لیگاسیون انجام شد. ۲ µL از T4 بافر ۱۰x (فرمنتاز، آلمان، شماره کاتالوگ: B69)، ۲ µL محلول ۵۰٪ از PEG-4000 (فرمنتاز، آلمان)، ۱µL (۵ U) آنزیم T4 DNA ligase (فرمنتاز، آلمان، شماره کاتالوگ: EL0013) و ۱۵۰ ng قطعه insert اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰µL رسید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۲°C و یک شب در ۴°C قرار داده شد. صحت Ligation با الکتروفورز محصول در ژل ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

ترانسفورماسیون محصول Ligation: محصولات Ligation به صورت مجزا در Competent Cell مناسب (Stbl4) به روش شوک حرارتی ترانسفورم گردید. به طور خلاصه به هر ۱۰۰µL از باکتری‌های مستعد ۱۰µL از محصول لیگاسیون اضافه شد و پس از یک ورتکس کوتاه، ۳۰ دقیقه روی یخ، ۹۰ ثانیه در بن ماری ۴۲°C و مجدداً، ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. پس از آن، به هر ویال ۹۰۰µL محیط LB بدون آنتی بیوتیک اضافه شده و ۶۰-۴۵ دقیقه در شیکر انکوباتور ۳۷°C با دور ۲۰۰rpm قرار گرفت. سپس، باکتری‌ها در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب باکتری‌ها پس از حل شدن در ۱۰۰µL محیط، بر روی یک پلیت LB آگار حاوی ۱۰۰mg/mL آمپی سیلین به صورت یکنواخت کشت داده شد. پلیت به مدت ۱۶-۱۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. برای اطمینان از صحیح بودن ترانسفورماسیون، از کنترل مثبت (Stbl4 واجد Linker B-pWPI مقاوم به آمپی سیلین) و منفی (فقط Stbl4) استفاده شد.

Colony PCR: پس از کشت باکتری‌های ترانسفورم شده، ۱۰ عدد تک کلون از هر پلیت به طور جداگانه به یک میکروتیوب PCR حاوی ۴µL آب دیونیزه استریل منتقل گردید. ۱µL از هر میکروتیوب، به فالکون ۱۵mL حاوی ۲mL محیط LB واجد ۱۰۰mg/mL آمپی سیلین اضافه شده و جهت رشد باکتری‌ها به مدت ۱۰-۶ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷°C با دور ۲۰۰-۱۸۰ rpm قرار داده شد. ۳µL باقی مانده از محلول تک کلون، جهت انجام واکنش PCR استفاده گردید. آزمون PCR برای هر ژن مطابق شرایط ذکر شده در بخش ۳-۱ انجام شد. در صورت مشاهده ی باند مورد نظر، از پیش کشت تهیه شده از همان کلونی در LB Broth واجد Amp، پلاسمید نوترکیب به روش Mini preparation of DNA استخراج گردید و صحت کلونینگ با الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸٪ شد. برای تأیید کلی پروسه کلونینگ انجام شده، به ازای هر پلاسمید نوترکیب، دو محصول استخراج پلاسمید به منظور تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

تولید لنتی ویروس: به منظور تولید لنتی ویروس‌های بیان کننده ژن‌های مورد نظر از BVDV، ترانسفکشن سلول‌های HEK-293T با پلاسمیدهای بیان کننده ی ژن‌های اصلی لنتی ویروس در سیستم بسته بندی نسل سوم به روش Salmon و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۲۲) انجام شد. بدین منظور سلول‌ها تریپسینه و شمارش شدند. به ازای هر پلیت ۱۰Cm، ۴×۱۰^{۶} سلول ریخته شد. روز بعد، ۲ ساعت قبل از ترانسفکشن، محیط سلول‌ها با ۷ ml محیط DMEM-high glucose + FBS ۱۰٪ (بدون پنیسیلین ـ استرپتومایسین) تعویض گردید. مخلوط DNA، شامل µg ۴ از (*Env* VSVG) pMD2G، ۷/۵µg از (*Gag-Pol*) PsPax2، ۱۱µg از

پلاسمید نوترکیب pWPI-Linker B تهیه شده از مرکز تحقیقات زیست-پزشکی و (IMIM) در اسپانیا (بزرگواری دکتر Fabien Delaspre) و آب دیونیزه ی استریل به حجم کلی ۳۸۰/۵µL آماده شد. سپس طی دو مرحله ۱۰/۵ µL و ۴۴ µL محلول 2M CaCl2 به آن اضافه گردید.

سپس، به ازای هر پلیت ۱۰ سانتی ۴۳۵ µL محلول HBS1x شامل ۱۰۰µL از HBS 10x (محتوی Hepes محصول Sigma، آمریکا، شماره کاتالوگ: H۳۳۷۵ ، NaCl محصول Sigma، آمریکا، شماره کاتالوگ: ۷۳۵۷۵ و آب دیونیزه ی استریل تا حجم ۵۰ mL)، ۲۰ µL از بافر فسفات (NaH2PO4.H2O ۰/۹۶۵g، Na2HPO4.2H2O ۱/۲۴۶g بـــا pH=۶/۸)، ۱۵ µL از NaoH 1N و ۸۶۵ µL از آب دیونیزه ی استریل آماده شد. مخلوط پلاسمیدها و کلسیم کلرید، به آرامی و به صورت قطره قطره در حالت هوادهی به محلول HBS به ۴۳۵ µL از این محلول اضافه گردید. مخلوط ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس قطره قطره به سلول های T۲۹۳، اضافه شد. ۱۲ ساعت بعد، محیط سلول ها به آرامی برداشته شده و با ۵mL محیط تازه (glucose+FBS٪۳+1x Penicillin streptomycin DMEM-high) تعویض گردید. ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن، محیط روی سلول ها برداشت شده و به منظور حذف بقایای سلولی مرده، به مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس مایع را پس از تقسیم در ویال های ۱/۵ mL آماده و تا زمان آلوده سازی سلول ها در $70^{o}C$- نگهداری گردید.

تعیین تیتر ویروس‌ها: تعداد 3×10^{5} سلول ۲۹۳T، در هر چاهک از پلیت ۶ خانه (ژلاتینه شده) ریخته شده و با مقدار ۱mL از محیط های ویروسی بیان کننده دو ژن *5'UTR* و *NS3* آلوده گردید. از محیط کشت DMEM high glucose + 5% FBS برای رشد سلول ها استفاده شد. ۱۲ ساعت بعد محیط سلول ها با محیط تازه (DMEM high glucose + 10% FBS) تعویض گردید. ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، سلول ها مشاهده شده، عکس برداری انجام گردید و درصد سلول های GFP مثبت تخمین زده شد. در همین زمان ها تعویض محیط با DMEM+ 3% FBS+ 1X Penicillin streptomycin انجام پذیرفت و تیتر ذرات لنتی ویروسی بر اساس واحد ترانسفکشن در هر میلی لیتر (TU/mL) محاسبه گردید و در نهایت بر مبنای (multiplicity of infection) MOI مورد نظر، حجم لنتی وکتور مورد نیاز برای آلوده نمودن سلول های MDBK محاسبه شد.

تعداد ذرات ویروسی در هر میلی لیتر محیط (TU/ml) =

(حجم ویروس استفاده شده به mL / (رقت ویروس) ×(۱۰۰/درصد سلول های GFP مثبت) ×(تعداد سلول های بذر پاشی شده "3×10^{5}").

نسبت تعداد ذرات ویروسی به ازای یک سلول (MOI) به صورت زیر محاسبه می شود:

MOI=T×V/N

T: تیتر ویروس (TU/mL)، V: حجم وکتور لنتی ویروسی در mL، N: تعداد سلول های بذر پاشی شده

بر مبنای اطلاعات به دست آمده از مقالات برای آلوده سازی سلول های MDBK مقدار MOI بین ۰/۵ تا ۲ برای عفونت کارآمد این سلول ها مناسب است (۲۵).

در این مطالعه در ابتدا با MOI= ۰/۵ آلوده نمودن سلول های MDBK انجام شد، ولی کفایت عفونت با لنتی وکتور راضی کننده نبود. لذا، با در نظر گرفتن احتمال عدم تحمل سلول های MDBK نسبت به عفونت با مقادیر بالای لنتی وکتور، MOI را به صورت پلکانی افزایش دادیم و در نهایت با MOI= ۰/۸، کفایت آلوده نمودن سلول های MDBK با لنتی وکتور موفقیت آمیز بود به نحوی که بالای ۹۵٪، بیان *GFP* دیده شد.

آلوده سازی سلول‌ها با لنتی ویروس: پس از تریپسینه نمودن و شمارش سلول های MDBK با لام هموسایتومتر، در هر خانه از پلیت ۶ خانه، 3×10^{5} سلول در ۱mL محیط glucose+10%FBS+Pen-Strep1x DMEM high بذر پاشی شد. ۲۴ ساعت بعد ۱mL محیط حاوی ویروس با MOI=۰/۸ و ۱ mL از محیط high glucose +3%FBS+Pen-Strep1x DMEM به هر خانه اضافه گردید. برای افزایش بازده آلودگی سلول ها، ۲µL پلی برن (۸µg/µL) به ازای هر خانه استفاده شد. به ازای هر ژن و هر مقدار مایع ویروسی ۲ تکرار در نظر گرفته شد. در چاهکهای کنترل منفی ژن ها، برای هر ژن، ویروسی اضافه نشد و در چاهک کنترل مثبت ژن ها BVDV-NADL تلقیح گردید. پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون در دمای $37^{o}C$، محیط سلول ها با محیط تازه FBS+ 1X Penicillin streptomycin DMEM+ 3% تعویض گردید. ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از عفونت، سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و عکس برداری شدند.

RT-PCR-۲ به منظور تأیید تولید سلول های MDBK بیان کننده BVDV 5′UTR و BVDV NS3

برای تأیید تولید سلول های MDBK بیان کننده BVDV-NS3 و BVDV-5′UTR آزمون PCR برای هر ژن انجام شد.

استخراج RNA به کمک کیازول از چاهک های تست و کنترل واکنش RT، تریتمنت با DNase و آزمون PCR به شرح ذکر شده در بخش های ۳-۱ و ۲-۱، انجام شد با این تفاوت که برای انجام آزمون PCR مجدداً طراحی پرایمر برای توالی های ذکر شده در بخش ۳-۱ با استفاده از نرم افزار Beacon designer انجام پذیرفت. پس از استخراج RNA و تریتمنت با DNase، جذب نوری نمونه ها در طول موج ۲۶۰nm توسط دستگاه اسپکترو فوتومتر نانودراپ لایت (محصول شرکت Thermo Scientific، آمریکا) قرائت گردید. مقادیر جذب نوری قرائت شده و نسبت ۲۸۰ nm/ ۲۶۰ و بررسی آلودگی نشان دهنده استخراج موفقیت آمیز و بدون آلودگی نمونه های RNA بود. برای افزوده سازی BVDV NS3 از پرایمرهای ′3- F: 5′- CAT AGG TAG GCG TGA CCC AAC GCT GC -3′ و R: 5′- TCA GTG ACC CTC AGT استفاده گردید. شرایط دمایی PCR عبارت بود از: $95^{o}C$ به مدت ۲ دقیقه که با ۳۰ چرخه ی دمایی $95^{o}C$

به مدت ۳۰ ثانیه، $60^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و $72^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه دنبال شد و در نهایت یک مرحله نهایی $72^{o}C$ به مدت ۵ دقیقه وجود داشت. برای ازدیاد BVDV 5′UTR از پرایمرهای ′3- GTC GTC AGT GGT TC و F: 5′- AGG GTA 5′- AGG TTA AGA TGT GCT TTG GG -3′ R: استفاده شد و شرایط دمایی PCR عبارت بود از: $95^{o}C$ به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه دمایی $95^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $55^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $72^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک مرحله نهایی $72^{o}C$ به مدت ۵ دقیقه. کنترل‌های منفی (MDBK آلوده نشده به وکتور) و کنترل مثبت (MDBK آلوده شده به BVDV - به بخش ۳-۱ رجوع شود). در هر آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفتند. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در کنار مارکر سایز ۱۰۰bp (Fermentas، آلمان) مشاهده شد. با توجه به چندین مرحله شستشو و تعویض محیط در سیستم بسته بندی لنتی وکتورهای حاوی ژن‌های BVDV 5′UTR و BVDV NS3 در رده ی سلولی 293T و سانتریفیوژ و فیلتراسیون فیلترهای ۰/۲۲ مایع حاوی لنتی ویروس‌های تولید شده، می‌شود و چندین مرحله شستشو و تعویض محیط در زمان تیتراسیون و اینفکشن، احتمال حضور پلاسمید لنتی ویروسی حاوی ژن‌های 5′UTR BVDV و BVDV NS3 به اندازه تقریبی ۱۱kb در مایع نهایی حاوی لنتی ویروس‌ها بسیار کم است. برای این افزوده‌سازی BVDV NS3 از پرایمرهای ′3- ACAAGT TCAGCG TGT CCG -5′: F و ′3- GGAC R: 5′- TCA CGA ACT CCA GCA استفاده گردید. شرایط دمایی PCR عبارت بود از: $95^{o}C$ به مدت ۵ دقیقه که با ۳۰ چرخه دمایی $95^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $58/4^{o}C$ به مدت ۴۵ ثانیه و $72^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه دنبال شد و در نهایت یک مرحله نهایی $72^{o}C$ به مدت ۱۰ دقیقه وجود داشت. کنترل مثبت، نمونه cDNA تهیه شده از RNA استخراج شده از سلول‌های 293T ترانسفکت شده با وکتور pWPI Linker B استفاده شد.

وسترن بلاتینگ (استخراج پروتئین): برای بررسی بیان ژن *NS3* در سطح پروتئین آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد این پروتئین انجام شد. بدین منظور در ابتدا استخراج پروتئین به روش دستی و با استفاده از بافر Ripa (شامل ۱۵۰mM NaCl، ۱٪NP40، ۰/۵٪DOC، ۰/۱٪SDS، Tris-HCl ۵۰mM pH =۸، ۲mM EDTA و آب دوبار تقطیر) به همراه pmsf (محصول Roche، آلمان، شماره Lot: ۷۰۲۹۹۷۲۲)، DTT (محصول Roche، آلمان، شماره کاتالوگ: ۱۰۱۹۷۷۷۷۰۰۱)، کوکتل مهار کننده ی پروتئاز (محصول Roche، آلمان، شماره کاتالوگ: ۱۱۸۳۶۱۵۳۰۰۱) هریک به میزان ۱۰µL انجام شد. پس از پروتئین سنجی به روش برادفورد- لوری، نمونه‌های پروتئین به نسبت مناسب (غلظت نهایی ۵۰µg) به بافر نمونه (Tris-HCl pH=6.8 ۶۲/۵mM، ۱۵٪SDS، برموفنول بلو ۰/۰۱٪، گلیسرول ۱۰٪، بتامرکاپتواتانول ۲۵٪ و آب) اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای $100^{o}C$ قرار گرفته و برای انتقال به ژل SDS-PAGE آماده شدند.

SDS-PAGE: برای انجام SDS-PAGE در دستگاه BIO-RAD (محصول آمریکا، شماره کاتالوگ: ۱۶۵-۲۹۴۰) ژل پائین یا تفکیک کننده ۱۲٪ شامل ۴/۴ mL از H2O دوبار تقطیر، ۲/۵ mL از ۱/۵M Tris-HCL - pH =۸/۸، ۳ mL از Acryl/Bis ۴۰٪، ۱۰۰ µL از ۱۰٪ SDS، ۱۰۰ µL از ۱۰٪ APS و ۷/۵ µL از TEMED و ژل بالا یا متراکم کننده ۵٪ شامل ۲/۵mL از H2O دوبار تقطیر، ۱۰/۵mL از ۰/۵ M Tris-HCL - pH =۶/۸، ۱۰/۴mL از Acryl/Bis ۴۰٪، ۴۰µL از ۱۰٪ SDS، ۴۰µL از ۱۰٪ APS و ۴µL از TEMED آماده شد.

از TGS به عنوان Running buffer استفاده گردید و ۴۰µL نمونه و کنترل‌های منفی و مثبت به ترتیب شامل سلول‌های MDBK فاقد لنتی وکتور حاوی ژن نوترکیب و آلوده شده به BVDV - NADL حاوی ۸۰-۵۰ میکروگرم از نمونه پروتئینی به آرامی درون چاهک Load گردید. ۶µL از لدر پروتئین (محصول فرمنتاز، آلمان، شماره کاتالوگ SM0671) به عنوان مارکر سایز استفاده شد. ژل به مدت یک ساعت تحت ولتاژ ثابت ۱۵۰-۱۲۰V قرار گرفت و پس از خروج بروموفنل بلو از ژل بلافاصله الکتروفورز قطع گردید.

Blotting یا لکه برداری: پس از تهیه ساندویچ بلاتینگ و قرار دادن آن در تانک BIO-RAD حاوی بافر سرد انتقال شامل ۱۰۰ mL بافر ۱۰ مرتبه غلیظ (Glycine ۱M و Tris ۱۰۰mM)، ۲۰۰ mL متانول و ۷۰۰ mL آب دوبار تقطیر مرحله لکه برداری به صورت شبانه در سردخانه با آمپراژ ثابت ۷۰-۶۰mAh انجام شد.

واکنش ایمیونولوژیکی: پس از دو مرتبه شستشوی غشای PVDF، هربار به مدت ۵ دقیقه با TBST (شامل ۱۰۰ mL TBS 10X، ۱ mL Tween-20، ۹۰۰ mL آب دو بار تقطیر) غشاء به وسیله ی محلول بلوکه کننده BSA (۵٪ در TBST) در دمای اطاق به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. پس از شستشوی غشاء سه مرتبه و هربار به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از TBST بر روی شیکر، غشای غوطه ور در مونوکلونال آنتی بادی اولیه ضد BVDV-NS3 تهیه شده در موش (محصول Santa Cruz، آمریکا، شماره کاتالوگ: sc-۱۰۱۵۹۲) تولید شده در موش و حل شده در محلول TBST حاوی ۲/۵٪ BSA (به نسبت ۱/۲۰۰) به مدت یک شب در سردخانه، بر روی شیکر انکوبه شد. پس از سه مرتبه شستشوی غشاء، واکنش آنتی بادی ثانویه با استفاده از غلظت ۱/۲۰۰۰ از آنتی بادی ثانویه ضد IgG موش تهیه شده در خرگوش و کونژوگه شده با HRP (محصول Santa Cruz، آمریکا، شماره کاتالوگ: sc-۳۵۸۹۱۴) در محلول TBST حاوی ۲/۵٪ BSA (محصول MERCK، آلمان، شماره کاتالوگ: ۱۲۰۱۸) بر روی غشاء در حال چرخش به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت انجام شد. پس از شستشوی غشاء برای واکنش سوبسترا با آنزیم پراکسیداز از کیت ECL (محصول شرکت زیست فن‌آوران نجم، ایران) مطابق دستور شرکت سازنده در اتاق تاریک استفاده شد. غشاء در تاریکخانه به مدت‌های

۳۰ ثانیه، یک، ۵ و ۱۰ دقیقه در تماس با فیلم عکاسی قرار گرفت و فیلم مجاور شده با غشاء به مدت‌های ۵،۱، ۲ و ۱ دقیقه به ترتیب در ظروف محلول ظهور، آب شستشوی ظهور، محلول ثبوت و آب شستشوی ثبوت قرار داده شد. به منظور اطمینان از صحت استخراج پروتئین، واکنش ایمیونولوژیکی بر روی غشا با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال اولیه ضد پروتئین کنترل آلفا توبولین تهیه شده در موش (محصول Sigma، آمریکا، شماره کاتالوگ: T۹۰۲۶) تکرار گردید و حضور باند مربوط به این پروتئین مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

کلونینگ دو ژن BVDV NS3 و BVDV 5′UTR در وکتور لنتی ویروسی pWPI-Linker B، RT-PCR به منظور افزوده سازی NS3 BVDV و BVDV 5′UTR، برش پلاسمید: پس از الکتروفورز محصولات PCR و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید باندهای مورد نظر مربوط به 5′UTR BVDV- (۳۸۰bp) و باند مربوط به NS3 -BVDV (۲۲۳bp) در نمونه‌های مربوط به سلول‌های آلوده شده به BVDV و نمونه‌های کنترل با استفاده از مارکر سایز تشخیص داده شد. صحت برش پلاسمید pWPI- Linker B با مقایسه‌ی اندازه و تفاوت الگوی باندهای مربوط به پلاسمید Linker B - pWPI برش داده نشده با اندازه ۱۱۱۰۱ bp و همین پلاسمید برش خورده با آنزیم توسط الکتروفورز محصول در ژل ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت و حاکی از برش صحیح پلاسمید مورد نظر بود (تصویر ۱).

Colony PCR: پس از انکوباسیون محصولات ترانسفورماسیون pWPI-LinkerB-NS3 و pWPI-LinkerB-5′UTR در Stbl4 و کنترل‌های مثبت و منفی کشت داده شده در LB آگار واجد آمپی سیلین در دمای 37^{o} به مدت یک شب کلونی‌های واجد محصول ligation و کنترل مثبت (حاوی پلاسمید pWPI-LinkerB مقاوم به آمپی سیلین و تأیید شده در آزمایشات قبلی) در محیط کشت قابل تشخیص بودند اما در Plate کنترل منفی (Stbl4 بدون محصول ligation) کلونی مشاهده نشد.

صحت کلونینگ با الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۰/۸٪ و مشاهده‌ی باندهای مورد انتظار برای هر ژن (*5′UTR*، ۳۸۰ bp و *NS3*، ۲۲۳bp) مورد تأیید اولیه قرار گرفت. پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های واجد نتیجه مثبت در Colony PCR صحت استخراج پلاسمید و وجود قطعه مورد نظر در پلاسمیدهای نوترکیب تولید شده که در این مطالعه pWPI-Linker B-NS3 و pWPI- Linker B-5′UTR نامیده شد با برش توسط آنزیم‌های اندونوکلئاز *Bam*HI برای B- NS3 pWPI-Linker و *Sma*I و *Bam*HI برای pWPI-Linker B-5′UTR و سپس الکتروفورز محصول استخراج شده در ژل ۰/۸٪ تأیید گردید. (تصویر ۲).

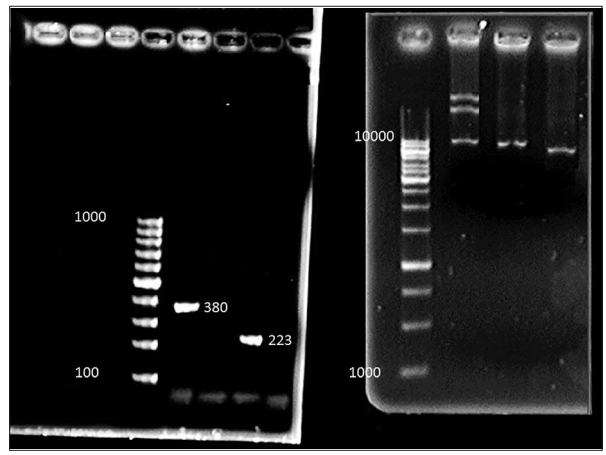
پس از استخراج پلاسمید به روش Mini preparation of DNA و انجام روش‌های تأیید مولکولی، در نهایت به ازای هر وکتور لنتی ویروسی نوترکیب تولید شده دو محصول استخراج پلاسمید به همراه پرایمرهای NS3-F و NS3-R و 5′UTR-F و 5′UTR-R برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. هم ترازی توالی گرفته شده از خوانش سکانس پلاسمید با امپلیکون مورد انتظار به خوبی کفایت کلونینگ انجام شده را تأیید نمود.

تولید لنتی ویروس: ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن پلاسمیدهای لنتی ویروسی ذکر شده در بخش ۸-۱ در قالب سیستم بسته بندی نسل سوم، محیط روی سلول‌ها برداشت شده و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن با مشاهده توسط میکروسکوپ فلورسنت درصد GFP سلول‌ها که نشان دهنده کارآمدی ترانسفکشن و تولید لنتی وکتور در مقدار قابل قبول برای عفونت‌زایی بعدی است به میزان تقریبی ۸۰-۷۰ ٪ قرائت گردید (تصویر ۳).

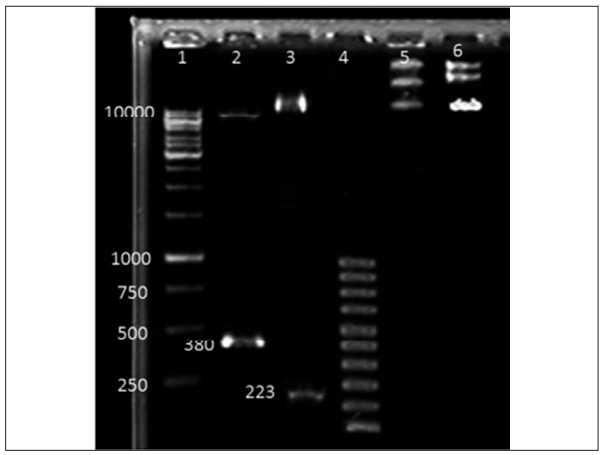
آلوده سازی سلول‌ها با لنتی ویروس: سلول‌ها ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از عفونت، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و عکس برداری شدند. به دلیل کارآمدی بالای عفونت و درصد GFP بالای ۹۷٪، این سلول‌ها به عنوان کلون سلولی بیان کننده دو ژن BVDV NS3 و 5′UTR BVDV ازدیاد شده و در دمای 196^{o}- برای آزمایشات بعدی نگهداری شدند (تصویر ۴).

RT-PCR به منظور تأیید تولید سلول‌های MDBK بیان کننده BVDV 5′UTR و BVDV NS3: محصولات PCR انجام شده روی نمونه‌های RNA استخراج گردیده از سلول‌های MDBK که توسط لنتی ویروس‌های بیان کننده BVDV 5′UTR و BVDV NS3 آلوده شده بودند و همچنین RNA مستخرج از کنترل منفی (MDBK آلوده نشده به وکتور) و کنترل مثبت (MDBK آلوده شده به BVDV) پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در کنار مارکر سایز مشاهده شدند. باندهای تأیید کننده (*NS3*: ۸۷ bp و *UTR*: ۶۸ bp) مشاهده گردید (تصویر ۵).

وسترن بلاتینگ: پس از خشک شدن فیلم باندهای سیاه رنگ در روی فیلم که محل واکنش سوبسترا با آنزیم و نشان دهنده حضور پروتئین NS3 بود در محل چاهک‌های حاوی پروتئین استخراج شده از سلول‌های MDBK آلوده به BVDV به عنوان کنترل مثبت و پروتئین استخراج شده از سلول‌های MDBK آلوده به لنتی وکتورهای بیان کننده protease BVDV-NS3 serine دیده شد. اختصاصی بودن باند مشاهده شده از تخمین وزن مولکولی تقریبی ۱۵kDa با استفاده از مارکر پروتئین مورد تأیید قرار گرفت در عین حال با اثر دادن آنتی بادی مونوکلونال ضد آلفاتوبولین به عنوان پروتئین کنترل داخلی صحت استخراج پروتئین مورد تأیید قرار گرفت. حضور باند ۵۵ کیلودالتونی صحت استخراج پروتئین از سلول را تأیید نمود. (تصویر ۶).



تصویر ۱. افزوده‌سازی ژن‌های BVDV- NS3 و BVDV- 5′UTR و برش پلاسمید pWPI-Linker B. تصویر چپ: RT-PCR به منظور تزاید BVDV- NS3 و BVDV- 5′UTR پس از تلقیح ویروس به رده سلولی BT: از راست به چپ: کنترل منفی *NS3*، باند (۲۲۳bpNS3)، کنترل منفی *5′UTR*، باند (۳۸۰pb*5′UTR*)، مارکر سایز ۱۰۰bp .تصویر راست: هضم منفرد و دوگانه پلاسمید pWPI-Linker B: از راست به چپ: هضم دوتایی pWPI-Linker B، هضم منفرد pWPI-Linker B، pWPI-Linker B برش نخورده، مارکر سایز ۱kb.



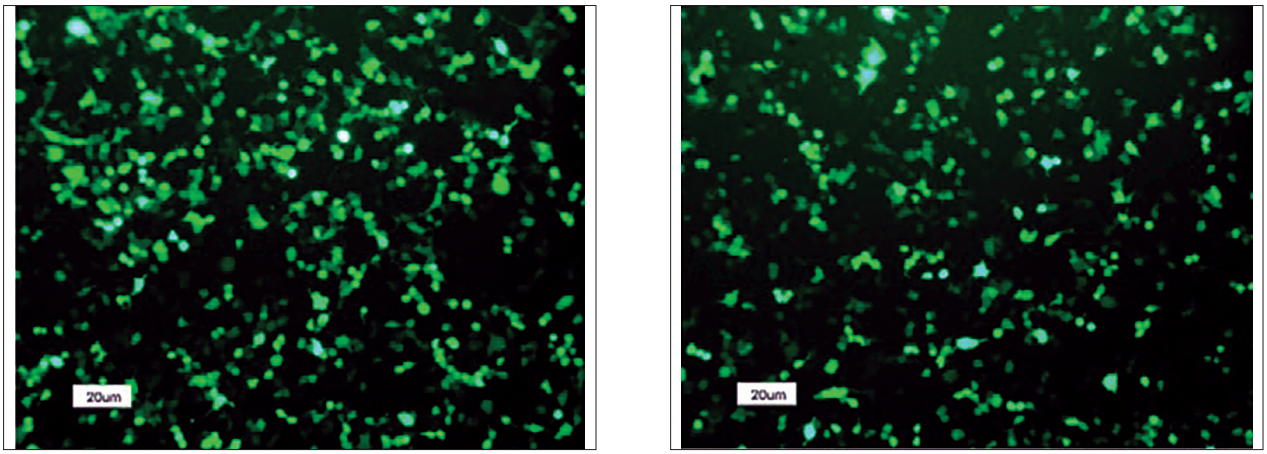
تصویر ۲. تأیید تولید پلاسمیدهای نوترکیب pWPI-Linker B- NS3 و pWPI-Linker B- 5′UTR. از چپ به راست: مارکر سایز (1kb)، pWPI-Linker B-5′UTR برش خورده، pWPI-Linker B-NS3برش خورده، مارکر سایز (100bp)، 5′UTR- pWPI-Linker B برش نخورده، pWPI-Linker B -NS3 برش نخورده.

بحث

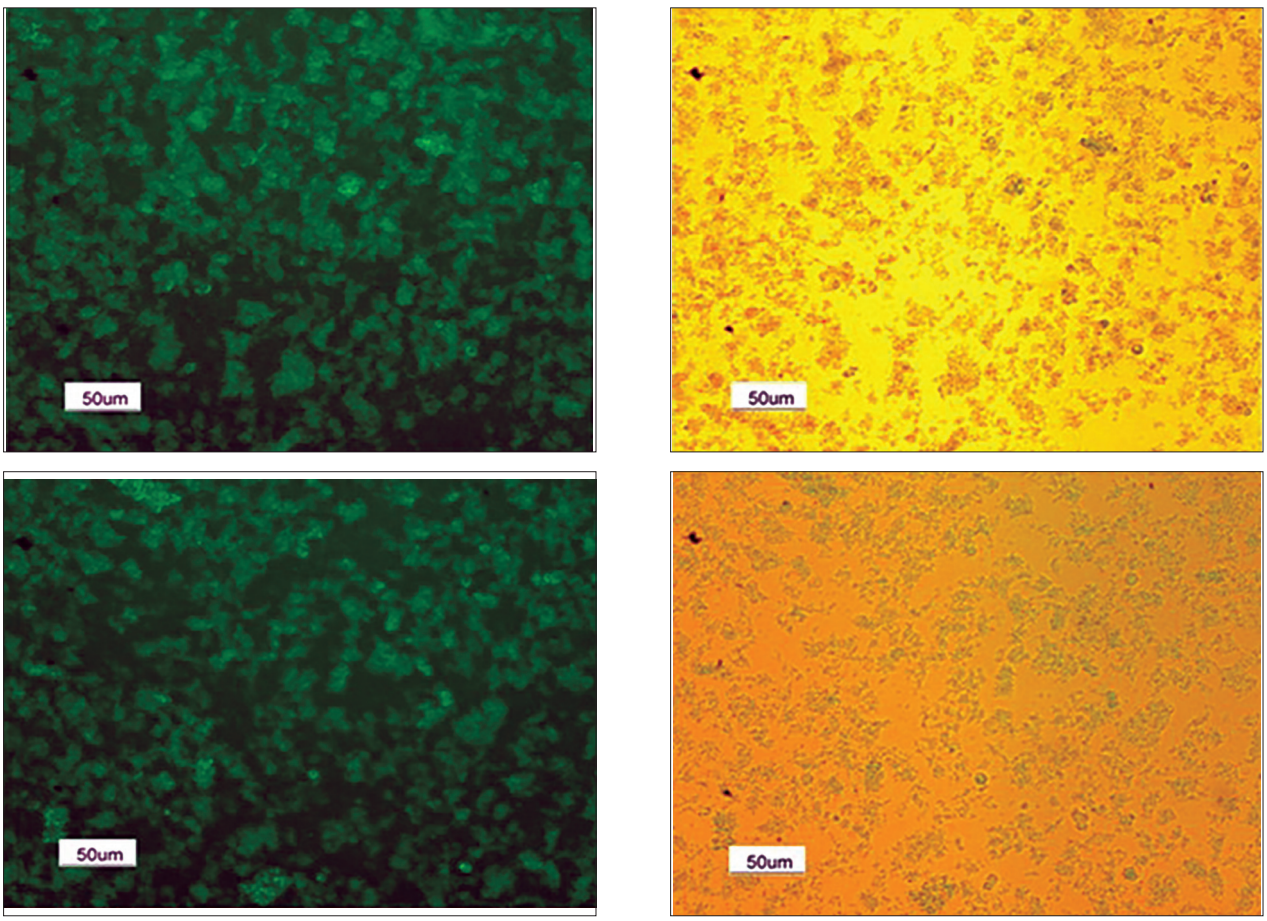
همان طور که در مقدمه ذکر گردید بیماری BVD در فارم‌های پرورش گاو به دلیل طبیعت مزمن و پیشرونده، تحلیل توان گله، توان و قابلیت بالای تسری این ویروس از گاوهای بیمار به سالم، معضل حضور گوساله‌های PI(مخازن دائم ویروس)، راه‌های فراوان انتشار مستقیم و غیر مستقیم بیماری، حفظ و انتشار ویروس توسط تعدادی از گونه‌های حیوانی و وجود تحت ژنوتیپ‌ها و سویه‌های آنتی ژنی زیاد ویروس که دستیابی به یک واکسن کارآمد برای ویروس‌های شایع را دشوار می‌نماید اهمیت دارد. همه این موارد سبب شده است به کارگیری روش‌های کنترلی این ویروس ضروری و در عین حال دشوار باشد (۸،۱۳،۲۸). تغییرات مداوم در نواحی آنتی ژنیک ویروس خصوصاً پادگن‌های اصلی C، E^{rns}، E1 و E2 و تشکیل موتانت‌های فراری که با گریز از سیستم ایمنی میزبان چه هومورال و چه سلولی دسترسی به پاسخ دفاعی با کفایت و دائمی یا طویل المدت و در عین حال مؤثر از طریق ایمن نمودن فعال و غیر فعال گاو را دشوار نموده است. متکی بودن اکثر روش‌های پیشگیرانه موجود علیه ویروس به گلیکوپروتئین و پروتئین‌های یاد شده از عوامل حائز اهمیت در توفیق متوسط یا اندک برنامه‌های کنترل بیماری است (۷،۸،۱۳،۱،۱۹،۲۸). هدف کاربردی از این پژوهش تهیه یک رده سلولی مناسب بیان کننده ژن‌هایی از BVDV به منظور ارزیابی جدیدترین استراتژی‌های درمانی و پیشگیرانه شناخته شده در درمان ضد ویروسی در دامپزشکی و آگاهی از میزان کارآمدی و رضایت بخشی راهبردهای دفاعی پیشنهاد شده علیه این ویروس است و برای ورود به مراحل تکمیلی اعم از آزمایشات in vivo و بررسی‌های بالینی در حیوان میزبان اصلی ضروری و گریز ناپذیر به نظر می‌رسد.

در مطالعات انجام شده بر مبنای ژن درمانی در ویروس‌های خانواده فلاوی ویریده تقریباً تمامی نواحی ژنوم ویروس مورد هدف قرار گرفته است اما به دلیل ثابت ماندن توالی کد کننده *5′UTR* در روند تکاملی ویروس یا نقش‌های عملکردی ویژه پروتئین‌های NS2-3، NS3، NS5A و NS5B بیشترین توجه به این بخش‌ها بوده است. بر مبنای مطالعات انجام گرفته در مورد کارآمدی مهار هر یک از این پروتئین‌ها در ممانعت از عفونت‌های ناشی از ویروس‌های این خانواده، در پژوهش حاضر بخش‌های *NS3* و *5′UTR*، به دلیل حفاظت شده بودن در طول تکامل و نقش‌های زیست شناختی ویژه در تکثیر، بقا و حدت ویروس برای کلونینگ در پلاسمید لنتی ویروسی به منظور ارزیابی ژن درمانی‌های بعدی انتخاب شدند (۱۰،۱۱،۱۳،۱۵،۲۰،۲۰،۲۶،۲۷).

در عین حال برای پایدار کردن بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌ها و افزایش طول مدت بیان و انتقال این ویژگی به نسل بعد از وکتورهای لنتی ویروسی با سیستم بسته بندی نسل سوم برای تحویل ژن‌های مورد نظر به سلول هدف استفاده شد. به منظور القای بیان ژن در سلول‌های هدف از ترانسفکشن وکتور پلاسمید نیز استفاده شده است اما تداوم بیان ژن ارائه شده از طریق وکتورهای پلاسمید حداکثر ۱۰-۴ روز و کوتاه مدت می‌باشد در حالیکه وکتورهای ویروسی سبب القای پایدارتر و کارآمدتر بیان ژن مورد نظر می‌شوند. وکتورهای ویروسی از نظر پایداری و سهولت ترانسفکشن، نسبت به سایر وکتورها ارجحیت دارند. درعین حال تروپیسم سلولی آنها بیشتر بوده و وسعت عمل افزونتری دارند. در مقالات مروری بررسی وکتورهای مختلف انتقال ژن توان عملیاتی آنها (خصوصاً اگر لنتی ویروس باشند) بسیار زیاد ارزیابی شده است. وکتورهایی نظیر لنتی وکتورها که قابلیت ادغام ژنوم خود در ژنوم سلول‌ها را دارند القای بیان بسیار پایدارتر

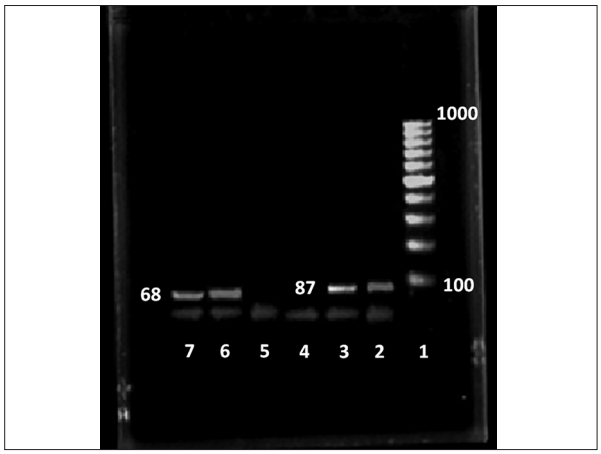


تصویر ۳. ترانسفکشن سلول‌های HEK-293T با پلاسمیدهای لنتی ویروسی بیان‌کننده BVDV NS3 و BVDV 5′UTR در قالب سیستم بسته بندی لنتی ویروسی نسل ۳. سمت چپ: میزان GFP مشاهده شده پس از ترانسفکشن pWPI-Linker B-5′UTR در قالب سیستم بسته بندی لنتی ویروسی نسل ۳. سمت راست: میزان GFP مشاهده شده پس از ترانسفکشن pWPI-Linker B- NS3 در قالب سیستم بسته بندی لنتی ویروسی نسل ۳.



تصویر ۴. عفونت سلول‌های MDBK با لنتی وکتورهای بیان‌کننده BVDV NS3 و BVDV 5′UTR. تصاویر بالا: شکل چپ: میزان GFP مشاهده شده پس از عفونت با لنتی وکتور بیان کننده BVDV NS3 ـ شکل راست: همان تصویر، merge شده با تصویر میکروسکوپ نوری. تصاویر پایین: شکل چپ: میزان GFP مشاهده شده پس از عفونت با لنتی وکتور بیان‌کننده BVDV 5′UTR ـ شکل راست: همان تصویر، merge شده با تصویر میکروسکوپ نوری.

ژن را فراهم می‌کنند. علاوه بر این، کارآمدی تحویل ژن به سلول هدف در مورد آنها تقریباً ۱۰۰٪ است. اعتبار یا Validity زیادی دارند و عملاً پاسخ التهابی کمی را در زمان ورود به سلول هدف بر می‌انگیزند. به شیوه‌ای طراحی شده اند که غیر پاتوژن هستند و به دلیل ماهیت ویروسی شان با صرف زمان و هزینه کمتری در مقایسه با استفاده از وکتورهای پلاسمیدی میزان بسیار زیادی از آنها را می توان در آزمایشگاه تولید نمود و به مصرف



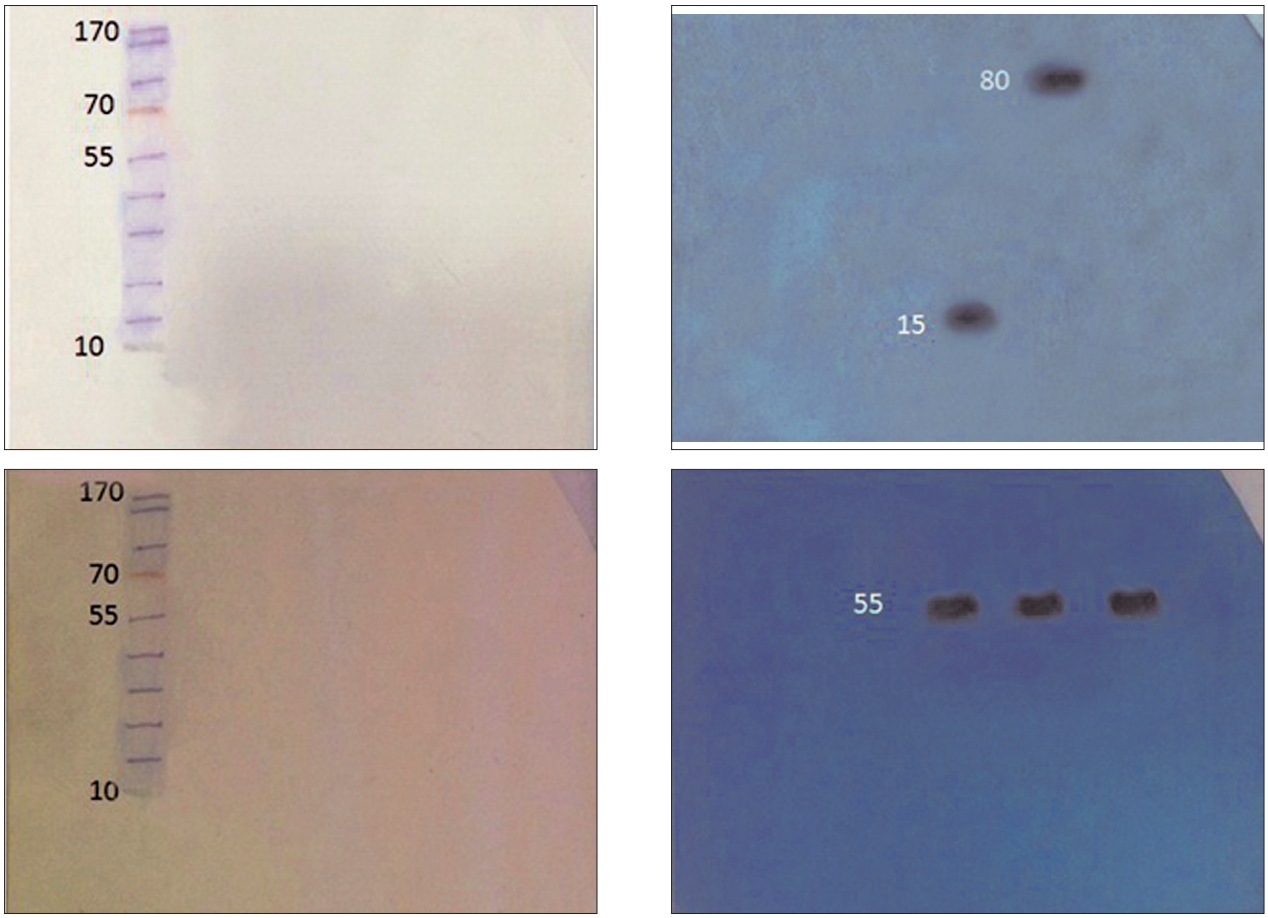
تصویر ۵. RT-PCR به منظور تایید بیان BVDV 5′UTR و BVDV NS3 در سلول‌های MDBK. از راست به چپ: مارکر سایز، NS3 MDBK، کنترل مثبت: NS3 BVDV، کنترل منفی *NS3*، کنترل منفی *5′UTR*. 5′UTR MDBK، کنترل مثبت: BVDV 5′UTR.

استفاده انتقال ژن رساند.

استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی تأثیر پایدارتری داشته و اثرات نابجای بسیار کمتری در اثر برانگیخته شدن سیستم دفاعی ذاتی نسبت به سایر وکتورهای ویروسی دارد. در عین حال لنتی وکتورها قادر به آلوده نمودن طویل المدت بسیاری از رده‌های سلولی اعم از فعال و در حال تقسیم یا ساکن و بدون تقسیم هستند. علاوه بر این قابلیت انتقال قطعات بزرگ ژنی (تا ۳۰۰۰ جفت باز) را دارند و از این نظر بر سایر وکتورهای ویروسی نظیر آدنو وکتور، رترو وکتور و وکتورهای ویروسی مرتبط با آدنو ویروس (AAV) ارجحیت دارند و به دلیل فراوانی کمتر ادغام ژنوم لنتی وکتورها در نزدیکی یا میان پروتوانکوژن‌های سلولی نسبت به رترو وکتورها، احتمال موتاژنز و سرطانزایی در اثر ادغام ژنوم وکتورهای لنتی ویروسی کم است (۴،۶،۸،۱۲،۲۲،۲۳،۲۵).

وجود تنوع آنتی ژنی قابل ملاحظه در BVDV یک مانع اصلی برای توسعه کارآمدی واکسن‌های جدید است. بنابراین داروهای ضد BVDV یک استراتژی جدید برای کنترل عفونت BVDV هستند. در دهه گذشته غربالگری داروهای ضد BVDV و HCV در شرایط in vivo در سیستم‌های سلولی از دو طریق هدف قرار دادن کل ذره عفونی ویروس BVDV انجام شده است. با هدف گیری رپلیکون‌های تحت ژنومی BVDV تنها نواحی غیر ساختاری قابل بررسی بوده و نواحی ساختاری BVDV در این خصوص قابل مطالعه نیستند. در عین حال هدف قرار دادن کل ذرات عفونی BVDV، زمان بر بوده و روش‌های RT-PCR کمی بسیار زمان بر و طاقت فرسا باید انجام شود. طراحی یک ویروس گزارشگر مونوسیسترونی با یک پروتئین غربالگر درخشان برای توسعه یک ابزار غربالگری که پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری ویروس را به طور هم زمان هدف قرار دهد و ظرفیت بالایی برای غربالگری داروهای ضد BVDV داشته باشد گزینه مناسبی است. ویروس‌های واجد RNA تک رشته‌ای سنس مثبت می‌توانند با سیستم ژنتیک رونوشت برداری معکوس که یک ابزار قدرتمند برای بررسی بسیاری از جنبه‌های زندگی ویروس و رشد آن فراهم می‌کند در شرایط آزمایشگاه بازسازی شوند. تاکنون چندین ویروس نوترکیب و رپلیکون‌های تحت ژنومی با اعضای خانواده فلیوی ویریده از کلون‌های cDNA ویروسی تهیه شده‌اند. چنانچه برای BVDV تلاش‌هایی برای تهیه یک سیستم رونوشت برداری معکوس که به آسانی قابل دست ورزی باشد توسط تعداد معدودی از گروه‌های تحقیقاتی انجام شده است در دهه گذشته برای تولید BVDV نوترکیب وابسته به سلول چند گام مهم برداشته شد. برای مثال با به کارگیری وکتور BAC ژنوم ویروسی با تکثیر در باکتری تثبیت و پایدار گردید. مطابق تحقیقات انجام شده، مشخص گردید BVDV یک وکتور ویروسی مناسب برای بیان پروتئین‌های هترولوگ نظیر eGFP ادغام شده بین پروتئین‌های N^{pro} و C است. در نهایت با استفاده از داده‌های حاصل از این پژوهش‌ها یک BVDV گزارشگر و بیان کننده eGFP ادغام شده بین NS3 و NS4A با استفاده از BAC cDNA عفونی و pBSD1 بازمینه سویه SD1 از BVDV توسط Fan و همکاران در سال ۲۰۱۲ تولید گردید. علیرغم مزیت بسیار بالای ویروس گزارشگر BVDV در غربالگری داروهای ضد ویروسی طراحی شده علیه تمامی پروتئین‌های ویروس اعم از ساختاری و غیر ساختاری، این سیستم غربالگری معایبی نیز دارد. اول آنکه طراحی و تولید دقیق آن زمانبر بوده و داشتن اطلاعات دقیق بیوانفورماتیک و بیوتکنولوژیک برای تهیه ویروس گزارشگر نوترکیب ضروری است.

یک ویروس گزارشگر مونوسیسترونی با یک پروتئین غربالگر سبز درخشان تقویت شده (eGFP) به عنوان مارکر مهندسی شده برای کاهش اثر ادغام خارجی و نابجا در تکثیر ویروسی و رشد آن، ژن *eGFP* طراحی شد. محل ادغام ژن گزارشگر در ژنوم BVDV نقش بسیار مهمی در صحت عملکرد ویروس گزارشگر دارد. زیرا ژنوتیپ و فنوتیپ ویروس نوترکیب نباید با ادغام ژن گزارشگر دچار تغییر شود و از سویی دیگر تکثیر و بیان ژن گزارشگر باید نه تنها در تکثیر و بیان پیش ساز پلی پروتئین اولیه اختلال ایجاد نکند بلکه می‌بایست تقویت کننده این تکثیر نیز باشد. پس از ادغام ژن گزارشگر در یک جایگاه مناسب در ویروس والد، مقدار RNA و پروتئین ویروس نوترکیب و والد آن و بیشینه بازده ویروسی در یک زمان معین نباید تفاوت چندانی داشته باشند تا ارزیابی درستی در هنگام غربالگری‌های ضد ویروسی در اختیار پژوهشگر قرار دهند. بیان ژن گزارشگر و شدت فلورسانس آن با تکثیر ویروس گزارشگر ارتباط مستقیم دارد و در موارد زیادی به دلیل ضعف در طراحی ویروس نوترکیب شدت این فلورسانس کمتر از مقدار تایید شده برای غربالگری صحیح داروی ضد ویروسی است. از سویی دیگر به دلیل تنوع و تغییرات ژنتیکی فراوانی که در ژنوتیپ ویروس‌های RNA اتفاق می‌افتد برای تولید ویروس نوترکیب در یک



تصویر ۶. وسترن بلاتینگ به منظور تایید بیان BVDV NS3 در سلول‌های MDBK. ردیف بالا: راست: غشای PVDF ـ چپ: فیلم رادیوگرافی پس از ظهور باند مربوط به کنترل مثبت: BVDV-NS3(سمت راست) به اندازه‌ی ۸۰کیلودالتون و MDBK-NS3 serine protease به اندازه‌ی تقریبی ۱۵کیلودالتون(سمت چپ). ردیف پایین: فیلم رادیوگرافی پس از ظهور باند مربوط به آلفاتوبولین به اندازه‌ی ۵۵کیلودالتون در کنترل منفی، کنترل مثبت (BVDV-NS3) و نمونه‌ی مورد آزمون (MDBK-NS3)(از راست به چپ).

مطالعه، حضور ویروس والد معتبر اولیه و یا کلون cDNA معتبر آن ضروری است و برای سنتز ژنوم ویروس از طریق داده‌های بیوانفورماتیک به گونه‌ای که فنوتیپ ویروس نوترکیب حاصله با ویروس والد متفاوت نباشد، اطلاعات دقیق زیستی و بیوانفورماتیک و صرف زمان زیاد گریز ناپذیر است. از سویی دیگر اثرات سایتوتوکسیک ویروس گزارشگر در سیستم کشت سلول میزبان باید حداقل میزان ممکن باشد تا غربالگری‌های دارویی بعدی به درستی انجام شود (۲).

به دلایل ذکر شده، از وکتورهای لنتی ویروسی برای القای بیان ژن‌های مورد نظر از BVDV استفاده گردید. متأسفانه در مورد تهیه کلون سلولی بیان کننده ژن‌هایی از BVDV با استفاده از عفونت با لنتی وکتورها یا ترانسفکشن توسط وکتور پلاسمید مطالعه‌ای در دسترس نیست و به این دلیل مقایسه روش به کار گرفته شده در این پژوهش به منظور بیان ژن هایی از BVDV در رده سلولی MDBK با مطالعه‌ای مشابه و ارزیابی مقایسه‌ای کارآمدی کلون سلولی تولید شده در قیاس با حداقل یک پژوهش مرتبط امکان پذیر نمی‌باشد. اما در این زمینه مطالعات محدودی بر روی ویروس بسیار مشابه HCV، از خانواده فلیوی ویریده وجود دارد. به دلیل مشابهت‌های ساختاری BVDV و HCV، مطالعات انجام شده بر روی این ویروس به عنوان الگویی برای بررسی در مورد BVDV مطرح شده اند و به همین ترتیب BVDV نیز در بعضی از پژوهش‌ها مدل جانشین HCV بوده است (۱۳). بر این اساس از پژوهش انجام شده بر HCV برای تهیه رده سلولی بیان کننده ژن‌هایی از BVDV الگوبرداری شد. با این وجود به دلیل تفاوت نوع سلول‌های استفاده شده برای بیان ژن‌های هر یک از این دو ویروس و تفاوت در پلاسمیدهای لنتی ویروسی استفاده شده در سیستم بسته بندی نسل سوم در هر مطالعه، هرگونه مقایسه کمی در مورد کارآمدی سلول‌ها در بیان ژن‌های مد نظر غیر واقعی و غیر علمی به نظر می‌رسد و تا حدودی قیاس در موارد محدودی از جمله نوع ژن‌های انتخاب شده برای انتقال به وکتور لنتی ویروسی و نیز نوع سیستم بسته بندی امکان پذیر است. در این خصوص Henry و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مورد میزان و نحوه هدف قرار دادن تکثیر و اتصال ویروس HCV با استفاده از کاست‌های RNAi ارائه شده در وکتورهای لنتی ویروسی آلوده کننده رده سلولی Huh-7 پژوهشی انجام دادند و بدین منظور با استفاده از لنتی وکتورهای ایجاد شده در سیستم بسته بندی نسل سوم بیان *NS3*، *NS5b*

و *IRES* از *5'UTR* در این رده ی سلولی القا شده و تغییر میزان بیان ژن پس از القای RNAi با استفاده از آزمون های فلوسایتومتری و time PCR Real مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت (۸). مطالعه مشابهی توسط Li و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از وکتورهای رتروویروسی آلوده کننده رده سلولی GP2-293 و القای بیان N^{pro} و *NS4A* از CSFV از خانواده فلیوی ویریده انجام شده و به منظور بررسی تغییر میزان بیان ژن صرفاً از آزمون Real time PCR استفاده گردیده است (۱۴). از لنتی وکتورها به منظور القای بیان ژن هایی از ویروس های FMDV، HIV، لوکوز طیور، هاری و غیره نیز استفاده شده است که به دلیل عدم تشابه خانواده ویروسی با BVDV از ذکر جزئیات پرهیز می گردد (۲۳). در این مطالعه با در نظر گرفتن اهمیت بخش های *NS3* و *5'UTR* و با استفاده از سیستم بسته بندی نسل سوم لنتی ویروسی کلون سلولی MDBK بیان کننده این دو ژن با موفقیت تولید گردیده و برای ارزیابی روش های درمانی و پیشگیرانه علیه این ویروس قابل استفاده می باشد. توفیق این پژوهش در تولید این رده سلولی برای اولین بار، در درجه اول کفایت سلول های MDBK را در عفونت با لنتی وکتورهای ارائه کننده ژن های مورد نظر نشان می دهد. در وهله دوم ابزار بسیار مناسبی برای ارزیابی درمان ها و واکسن های ضد BVDV در شرایط آزمایشگاه و سیستم کشت سلول در دسترس قرار داده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند از حمایت های مالی صندوق ملی حمایت از پژوهشگران و زیست فناوران ریاست جمهوری (در قالب طرح شماره ۹۰۰۰۸۰۰۷)، معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (در قالب طرح پایان نامه دوره Ph.D شماره ۲۸۰۸۸/۶/۷) و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری قدردانی نمایند. در عین حال مراتب تشکر صمیمانه از حمایت های علمی و اجرایی آقایان دکتر فالکوا شتینباخ، دکتر دستجردی، دکتر فرجی، دکتر لطفی و دکتر برین اعلام می گردد.

References

1. Carmona, M.A., Quasdorff, M., Vogt, A., Tamke, A., Yildiz, Y., Hoffmann, P., Lehmann, T., Bartenschlager, R., Engels, J.W., Kullak-Ublick, G.A., Sauerbruch, T., Caselmann, W.H. (2012) Inhibition of hepatitis C virus RNA translation by antisense bile acid conjugated phosphorothioate modified oligodeoxynucleotides (ODN). Antiviral Res. 97: 49-59.
2. Fan, Z.C., Bird, R.C. (2012) Development of a reporter bovine viral diarrhea virus and initial evaluation of its application for high throughput antiviral drug screening. J Virol Methods. 180: 54-61.
3. Gamlen, T., Richards, K.H., Mankouri, J., Hudson, L., McCauley, J., Harris, M., Macdonald, A. (2010) Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. J Gen Virol. 91: 133-144.
4. Haga, K., Lemp, N.A., Logg, C.R., Nagashima, J., Faure-Kumar, E., Gomez, G.G., Kruse, C.A., Mendez, R., Stripecke, R., Kasahara, N., Cicciarelli, J.C. (2006) Permanent, lowered HLA class I expression using lentivirus vectors with shRNA constructs: Averting cytotoxicity by alloreactive T-lymphocytes.Transplant Proc. 38: 3184-3188.
5. Hemmatzadeh, F., Momtaz, H., Keyvanfar, H., Banihasan, E. (2006) Antigenic pattern of BVD viruses isolated in Iran. Indian Vet J. 83: 1048-1050.
6. Henry, S.D., van der Wegen, P., Metselaar, H.J., Tilanus, H.W., Scholte, B.J., van der Laan, L.J. (2006) Simultaneous targeting of HCV replication and viral binding with a single lentiviral vector containing multiple RNA interference expression cassettes. Mol Ther. 14: 485-493.
7. Houe, H. (2003) Economic impact of BVDV infection in dairies. Biologicals. 31: 137-143.
8. Jordao, R.S., Ribeiro, C.P., Pituco, E.M., Okuda, L.H., Claudia Del Fava, C.D., Stefano, E., et.al. (2011) Serological response of guinea pigs to oily and aqueous inactivated vaccinescontaining a Brazilian isolate of the Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV). Res Vet Sci. 91: 311-315.
9. Kargar Moakhar, R., Hemmatzadeh, F. (2004) A Survey for detecting pestivirus antigen in persistently infected cattle around Tehran. Pajouhesh & Sazandegi. (In Persian). 63: 21-25.
10. Keyvanfar, H., Hemmatzadeh, F. (2000) Effects of NADL strain of BVD virus on sheep white blood cells. J Vet Res. 55: 17-20.
11. Khaliq, S., Khaliq, S.A., Zahur, M., Ijaz, B., Jahan,

S., Ansar, M., Riazuddin, S., Hassan, S. (2010) RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. Biotechnol Adv. 28: 27-34.

12. KuÈmmerer, B. M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H., Meyers, G. (2000) The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. Vet Microbiol. 15: 117-128.
13. Lambeth, L.S., Moore, R.J., Muralitharan, M.S., Doran, T.J. (2007) Suppression of bovine viral diarrhea virus replication by small interfering RNA and short hairpin RNA-mediated RNA interference. Vet Microbiol. 119: 132-143.
14. Li, J., Guo, H., Shi, Z., Tu, C. (2010) In vitro inhibition of CSFV replication by retroviral vector-mediated RNAinterference. J Virol Methods. 169: 316-321.
15. Lv, K., Guo, Y., Zhang, Y., Wang, K., Li, K., Zhu, Y., Sun, S.(2009) Transient inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by siRNAs silencing VP1 protein coding region. Res Vet Sci. 86: 443-452.
16. Meyers, G., Thiel, H.J. (1996) Molecular characterization of pestiviruses. Adv Virus Res. 47: 53-118.
17. Ni, W., Hu, S., Qiao, J., Yu, Y., Wang, D., Tong, Q., Zhang, Y., Chen, C. (2012) Suppression of bovine viral diarrhea virus replication by single and dual short hairpin RNA-mediated RNA interference. Res Vet Sci. 93: 544-548.
18. Pankraz, A., Simone, P., Thiel, H.J., Gallei, A., Becher, P. (2009) A single point mutation in nonstructural protein NS2 of bovine viral diarrhea virus results in temperature-sensitive attenuation of viral cytopathogenicity. J Virol. 83: 12415-12423.
19. Poole, T.L.,Wang, C.Y., Popp, R.A., Potgieter, L.N.D., Siddiqui, A., Collett, M.S. (1995) Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. Virology. 206: 750-754.
20. Randall, G., Grakoui, A., Rice, C.M. (2003) Clearance of Replicating Hepatitis C Virus Replicon RNAs in Cell Culture by Small Interfering RNAs. PNAS Publications, New York, USA.
21. Randall, G., Rice, C.M. (2004) Interfering with hepatitis C RNA replication. Virus Res. 102: 19-25.
22. Salmon, P., Trono, D. (2006) Production and Titration of Lentiviral Vectors. In: Current Protocols in Neuroscience. Sibley, D., McKay, R., Charles Gerfen, C., Rogawski, M. (eds.). John Wiley & Sons publications. Wiley Drive, USA. p. 4.21.1-4.21.24.
23. Spurgers, K.B., Sharkey, C.M., Warfield, K.L., Bavari, S. (2008) Oligonucleotide antiviral therapeutics: Antisense and RNA interference for highly pathogenic RNA viruses. Antiviral Res. 78: 26-36.
24. St-Louis, M.C., Massie, B, Archambault, D. (2005) The bovine viral diarrhea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation. Vet Res. 36: 213-227.
25. Tiscornia, G., Singer, O., Verma, I.M. (2006) Production and purification of lentiviral vectors. Nat Protoc. 1: 241-245.
26. Wilson, J.A., Richardson, C.D. (2005) Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against theNS5B coding region. J Virol. 79: 7050-8.
27. Xu, J., Mendez, E., Caron, P.R., Lin, C., Murcko, M.A., Collett, M.S., Rice, CM. (1997) Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: Polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. J Virol. 71: 5312-5322.
28. Zemke, J., Ko nig, P., Mischkale, K., Reimann, I., Beer, M. (2010) Novel BVDV-2 mutants as new candidates for modified-live vaccines. Vet Microbiol. 142: 69-80.

Design and production of a cell line expressing *5'UTR* and *NS3* genes of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in order to evaluate the efficacy of treatments against this virus

Mokhtari, A.[1], Madadgar, O.[1*], Massumi, M.[2], Mahzounieh, M.R.[3], Ghalyanchi langroudi, A.[1]

[1]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Department of Stem Cells, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran-Iran*

[3]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord- Iran*

(Received 2 September 2014, Accepted 19 December 2014)

Abstract:

BACKGROUND: Bovine viral diarrhea virus (BVDV) causes significant economic and health effects in cattle farms. Because of the relative inefficiency of BVDV eradication programs, in recent years, numerous strategies such as anti-viral gene therapy has been used extensively to fight it. One of the ways to evaluate the quality of these anti-viral strategies is the study of their efficacy in the specific cell lines expressing those viral genes through the induction of gene expression by transfection of plasmids or infection of viral vectors. **OBJECTIVES:** This study was performed for preparation of a cell line expressing some portions of BVDV genome to evaluate the efficacy of preventive and therapeutic strategies against this virus. **METHODS:** After the culture of BVDV NADL, vRNA was extracted and proliferation of *5'UTR* and *NS3*-coding genes and cloning of these gene segments was performed in the upstream of *GFP* gene in pWPI-linker B lentivirus plasmid. After confirmation of cloning, lentiviral vector containing BVDV-NS3 and BVDV-5'UTR were generated in 293T cells using third-generation packaging system. Then MDBK cells persistently express *5'UTR* and *NS3* were generated by the infection with lentiviral vectors containing BVDV-NS3 and BVDV-5'UTR. **RESULTS:** The efficacy of infection with lentiviral vectors carrying transgenes, examined by fluorescence microscopy, Western blotting and RT-PCR tests, were compared with control groups and the presence and expression of the above mentioned genes were confirmed. **CONCLUSIONS:** The results indicate that the successful production of a MDBK cell line expressing both genes of BVDV and lentiviral vectors are preferred to the others for their persistent and long-term gene expression in several cell generations and the ability to infect many different cell lines.

Key words: BVDV, infection, lentiviral vector, MDBK, transfection

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Amplification of BVDV-NS3 and BVDV - 5'UTR and digestion of pWPI-Linker B.

Figure 2. Production of pWPI-Linker B- NS3 and pWPI-Linker B- 5'UTR recombinant plasmids.

Figure 3. Transfection of HEK-293T cells with the lentivirus plasmids expressing the BVDV NS3 and BVDV 5'UTR in a third-generation lentiviral packaging system.

Figure 4. Infection of MDBK cells with lentiviral vectors expressing BVDV NS3 and BVDV 5'UTR.

Figure 5. RT-PCR test to confirm the expression of BVDV 5'UTR and BVDV NS3 in MDBK cells.

Figure 6. Western blotting to confirm the expression of BVDV NS3 in MDBK cells.

***Corresponding author's email: omadadgar@ut.ac.ir, Tel: 021-66427517, Fax: 021-61117053**