پژوهش سازندگی
امور دام و آبزیان شماره ۷۵ تابستان ۱۳۸۶

کلونینگ ژن F ویروس بیماری نیوکاسل در باکتری *Escherichia.coli*

• **فرج‌الله شهریاری**
عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
• **محمدرضا باسامی**
عضو هیات علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
• **سیدحسن مرعشی**
عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
• **سیدعلیرضا موسوی**
عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام(مسئول مکاتبات)

تاریخ دریافت: آبان‌ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: اردیبهشت‌ماه ۱۳۸۵

Email: sarmosavi@yahoo.com

چکیده

بیماری ویروسی نیوکاسل از مهمترین بیماری‌های طیور می‌باشد که سالیانه خسارات زیادی ایجاد می‌نماید. با توسعه مهندسی ژنتیک، امروزه از گیاهان برای تولید واکسنهای انسانی و دامی استفاده می‌شود. ژنهای فیوژن (F) و هماگلوتنین نورآمینیداز(HN) ژن‌هائی این ویروس هستند که در عفونت‌زایی و بیماریزایی اهمیت دارند. در اولین اقدام برای کلونینگ این ژن در باکتری *E.coli*، ژن F از طریق استخراج RNA از سویه B1 این ویروس جداسازی، و cDNA آن ساخته شد و سپس توسط واکنش PCR تکثیر گردید. جهت تائید اختصاصی بودن محصول PCR، از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های EcoRI و SacI استفاده شد. ژن F و ناقل pUC۱۸ توسط آنزیم‌های برشی XbaI و BamHI مورد هضم مضاعف قرار گرفتند. محصولات هضم مضاعف توسط آنزیم $T_۴$ DNA Ligase به هم متصل گردیدند و ناقل نوترکیب در باکتری *E.coli* ترانسفورم گردید. از پرگنه‌های سفید که نشان دهنده نوترکیب بودن باکتری حامل آنها بود استخراج پلاسمید انجام گرفت و توسط هضم با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Sac*I و *Xba*I و *Bam*HI وجود ژن در داخل پلاسمید تأئید گردید. تکوین کلون باکتری حامل این ژن منبعی پایدار جهت دسترسی به کلون فیوژن جهت بیان ژن در سیستم‌های مختلف از جمله انتقال به گیاه می‌باشد.

کلمات کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل (NDV)، کلونینگ و ژن فیوژن (Fusion)

Pajouhesh & Sazandegi: No 75 pp: 96-101

Cloning of fusion (F) gene of newcastle disease virus in *E.coli*

By: Sh. Farjollah, Member of Scientific Board of Agricultural Faculty of Ferdowsi University of Mashhad

Bassami, M.R., Member of Scientific Board of Agricultural Faculty of Ferdowsi University of Mashhad

Marashi, S. H., Member of Scientific Board of Agricultural Hural Faculty of Ferdowsi University of Mashhad

Mousavi, S.A., Member of Scientific Board of Agricultural faculty of Ilam University

Newcastle disease virus (NDV) might be the most important viral disease of avian species, including poultry. The emergence of genetic engineering technology provided the industry with new methods of manufacturing vaccines. The fusion protein, along with haemagglutinin-neuraminidase, serves as the target for the immune response of the host. After extraction of RNA from the B1 vaccinal strain of NDV, the viral RNA was converted to cDNA by a specific primer. The cDNA was amplificated by the polymerase chain reaction (PCR) and analyzed by agarose gel electrophoresis. To confirm the nature of the PCR product, the amplicon was digested with SacI and EcoRI restriction enzymes. The intact PCR product of fusion gene was cloned in pUC18 vector which had been digested with XbaI and BamHI enzymes. After of successful ligation, the constructed plasmid was transformed into DH5aα E.coli. Plasmid DNA from transformed bacteria was extracted in white clony and potential positive clones were confirmed with restriction digestion. Construction of a recombinant pUC18 plasmid containing the fusion gene was achieved as a first step towards the expression in transgenic plant.

Keywords: Cloning , Newcastle disease virus , Fusion gene (F)

مقدمه

بیماری ویروسی نیوکاسل (Newcastle Disease Virus)، از مهمترین عوامل بیماریزا از نظر اقتصادی و پراکنش در طیور است. اگرچه استفاده از واکسن‌ها برای مدتهای مدیدی است که برای کنترل این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی این ویروس به عنوان یک تهدید فزاینده برای صنعت مرغداری باقی مانده است(۱). ویروس نیوکاسل از جنس (Rubulavirus) و از خانواده (Paramyxoviridae) است که ویروسی غشادار[1] با تقارن نوکلئوکپسیدی مارپیچی، تک رشته‌ای، ژنوم RNAدار غیرقطعه‌ای با قطبیت منفی است و ۱۵ کیلو باز طول دارد. ژنوم این ویروس ۶ پروتئین ساختمانی و غیرساختمانی اصلی، نوکلئوکپسید (NP)، فسفوپروتئین (P)، ماتریکس (M)، فیوژن (F)، هماگلوتنین نورآمینیداز (HN)و RNAپلی مراز وابسته به RNA (L) را کد می‌کند(۳، ۱۰). ژن‌های (F) و (HN) از جنس گلیکوپروتئین بوده و برای عفونت‌زایی و بیمارگری اهمیت دارند و هر دو پروتئین می‌توانند سیستم ایمنی را تحریک کنند(۴، ۵). پروتئین F در پوشش ویروس وجود داشته و به صورت پیش‌ساز F0 ساخته می‌شود که در غشاء گلژی توسط آنزیم فورین در منطقهCleavage site (محل شکاف) شکسته شده و ایجاد دو پلی پپتیدF1 و F۲ می‌کند که بوسیله باندهای دی سولفیدی بهم متصل می‌شوند، این شکستگی برای فعال‌شدن و عفونت‌زایی لازم است (۹). این ژن ۱۶۵۹ جفت باز دارد که کدکننده یک پروتئین با ۵۵۳ اسید آمینه می‌باشد(۵). ویروس نیوکاسل سویه‌های زیادی دارد که از نظر عفونت‌زایی و حدت باهم تفاوت دارند و براساس شدت بیماری در طیور، جدایه‌های این ویروس در سه گروه ولوژنیک (فوق العاده بیماریزا)، مزوژنیک (متوسط) و لنتوژنیک (غیر بیماریزا) قرار داده شده‌اند که در تعداد اسیدهای آمینه بازی در ناحیه (Cleavage site) ژن F با هم اختلاف دارند. پاتوتایپ‌های ولوژنیک می‌توانند تا ۱۰۰ درصد کشنده باشند(۶). هدف از این پژوهش تکوین کلون باکتری حامل این ژن به عنوان منبعی پایدار جهت دسترسی به کلون فیوژن جهت بیان ژن در سیستم‌های مختلف از جمله انتقال به گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ویروس، باکتری، پلاسمید و معرف‌ها

ویروس بیماری نیوکاسل سویه B۱ از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی - شعبه شمال شرق خریداری شد. باکتری *E.coli* سویه DH۵α، پلاسمید pUC۱۸، آنزیم‌های محدودگر *Eco*RI و *Bam*HI، آنزیم پلیمراز Taqو سایر مواد واکنش PCR از شرکت سیناژن خریداری گردیدند. آنزیم‌های T۴ DNA Ligase، Reverse ، Ribonuclease Transcriptase (M-MULV) Inhibitor، *Sac*I و *Xba*I و نیز مارکرهای وزن مولکولی ۱۰۰bp و ۱Kb از شرکت فرمنتاز و آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین و آمپی‌سیلین از شرکت سیگما خریداری گردید. کیت‌های استخراج RNA و DNA از ژل از شرکت ایزوژن روسیه خریداری گردید.

طراحی آغازگر[2]

طراحی آغازگرها براساس نواحی ابتدائی و انتهایی ژن فیوژن با استفاده از نرم‌افزارهای Primer design و Primer premier ۵ انجام گرفت. به آغازگر رفت

(CFN: ۵´-GCATCTAGAGATGGGCTCCAGACCTT-۳´)

مکان آنزیم برشی *Xba*I و به آغازگر برگشت

(CRN: ۵′-ACGGGATCCGAAACCTTCGTTCCTCATC-۳′)

مکان آنزیم برشی *Bam*HI در انتهای ۵′ تعبیه گردیدند و در نواحی پیش از مکانهای برشی نوکلئوتیدهای GCA و ACG به ترتیب در آغازگرهای رفت و برگشت نیز منظور گردیدند. ویژگی و حساسیت آغازگرها با استفاده از نرم افزارهای ذکر شده در بالا تعیین گردید و بدین ترتیب آغازگر رفت به طول ۲۶ نوکلئوتید و دمای ذوب ۶۴ درجه و آغازگر برگشتی به طول ۲۸ نوکلئوتید و دمای ذوب ۶۵ درجه بود. محصول تکثیری توسط واکنش PCR، قطعه ۱۷۰۵ نوکلئوتیدی ایجاد می‌نماید. یک جفت آغازگر دیگر به منظور تائید ساخت cDNA و وجود ژن در پلاسمید طراحی گردید که قطعه تکثیر شونده توسط این جفت آغازگر ۳۱۰ جفت باز بود. در صورت تکثیر این ناحیه توسط واکنش PCR می‌توان از ساخته‌شدن کامل cDNA و همچنین وجود ژن در پلاسمید اطمینان حاصل کرد. آغازگر رفت

(PFN: ۵′- GGAGGATGTTGGCAGCATT-۳′)

به طول ۱۹ نوکلئوتید و دمای ذوب ۵۵ درجه و آغازگر برگشتی

(PRN: ۵′- GTCAACATATACACCTCATC-۳′)

به طول ۲۰ نوکلئوتید و دمای اتصال ۵۵ درجه نیز طراحی گردیده شد.

استخراج RNA

برای استخراج RNA از ویروس نیوکاسل از معرف ترایزول که حاوی فنل و گوانیدین ایزو تیوسیانات است استفاده گردید. در ابتدا به منظور عاری نمودن محلول‌ها و میکروتیوب‌ها و نوک سمپلرها از نظر وجود آنزیم RNase، از معرف DEPC استفاده گردید. به این ترتیب همه محلول‌ها با استفاده از آب تیمار شده با DEPC تهیه شد و میکروتیوب‌ها و نوک سمپلرها نیز با این آب شستشو داده شدند. روش استخراج براساس دستورالعمل کیت خریداری شده به شرح زیر صورت گرفت. ابتدا نمونه واکسن با استفاده از محلول PBS و ورتکس نمودن هموژن گردید. سپس محلول ترایزول به منظور لیز کردن سلول‌ها و دناتوره کردن پروتئین‌ها و غیرفعال نمودن نوکلئازها به مقدار یک میلی‌لیتر اضافه گردید و به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم- ایزوامیل الکل (۴۹ به ۱) اضافه گردید. میکروتیوب به آرامی تکان داده و ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. پس از تشکیل دو فاز کاملا مشخص، فاز بالایی که شفاف و حاوی RNA بود با دقت جمع‌آوری گردید و به یک میکروتیوب تمیز منتقل گردید. مقدار ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- قرار داده شد تا RNA رسوب نماید. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس یک میلی لیترالکل ۷۵ درصد اضافه گردید و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۷۵۰۰g سانتریفیوژ انجام گرفت. پس از خشک‌شدن کامل نمونه به آن ۵۰ میکرولیتر محلول اکستراژن (ماده مؤثره) اضافه شد. ارزیابی RNA ویروسی تخلیص شده با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر انجام شد ضمن محاسبه نسبت RNA تخلیص شده به پروتئین، مقدار RNA استخراج شده نیز محاسبه گردید. از آنزیم‌های Proteinase K و DNase I به ترتیب برای حذف پروتئین‌ها و DNA از RNA استخراجی استفاده گردید.

ساخت cDNA و تکثیر ژن F

برای ساخت cDNA، ۵ میکروگرم از RNA ویروسی با یک میکرولیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس M-MULV به همراه ۲ میکرولیتر از بافر آنزیم (۲۵۰ mmol/LTris-HCl, pH ۸,۳, ۳۷۵ mmol/L KCl, ۱۵ mmol/L MGCl۲, ۵۰ mmol/L DTT)

و ۱۵ پیکومول از آغازگر برگشتی و ۲۰ واحد از مهارکننده آنزیم ریبونوکلئاز[۳] مخلوط و در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد بمدت ۸۰ دقیقه انکوبه شد. در انتها برای غیرفعال کردن آنزیم رونوشت‌بردار معکوس، مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه انکوبه گردید. cDNA ساخته شده از طریق اسپکتروفتومتری تعیین غلظت گردید و با استفاده از cDNA ساخته شده و آغازگرهای (CFN) و (CRN) واکنش PCR انجام و ژن F تکثیر گردید. جهت انجام ۲PCR میکرولیتر از cDNA ساخته شده با ۱۰ پیکومول از هر دو آغازگر در حضور ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، dNTP دو میلی‌مولار، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز و ۲/۵ میکرولیتر از بافر آنزیم

(۱۰۰mm Tris-HCl (pH ۸/۸ at ۲۵°C), ۵۰۰mm KCl, ۰/۸٪ Nonidet P۴۰)

مخلوط گردیدند. مخلوط واکنش با در نظر گرفتن برنامه دمایی ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، (۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه یک دقیقه و ۷۲ درجه ۳ دقیقه) برای ۳۵ چرخه و ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر گردید. برای مشاهده و بررسی محصولات تکثیر، از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت و رنگ‌آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید انجام گرفت و با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور بررسی گردیدند.

تهیه نقشه هضم برشی

به منظور تطابق قطعه تکثیر شده با توالی اولیه، محصول PCRتوسط آنزیم‌های *Eco*RI و *Sac*I که ژن را به قطعاتی برش می‌دهند مورد هضم آنزیمی قرار گرفت.

اتصال و ترانسفورماسیون

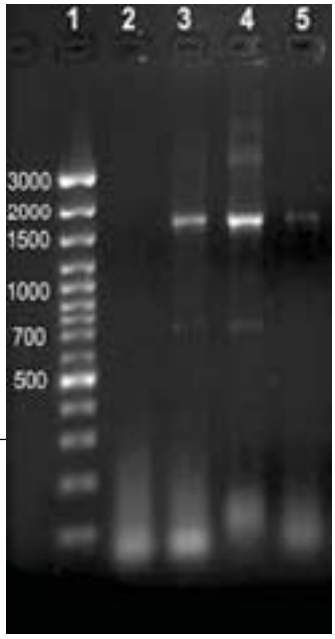
به منظور ایجاد انتهای چسبان، محصول PCR توسط دو آنزیم *Xba*I و *Bam*HI که مکان برش آنها در دو انتهای آغازگرها قرار داشت، مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. با استفاده از ژل آگارز با نقطه ذوب پائین خالص‌سازی محصول PCR از ژل انجام گرفت، پلاسمید pUC۱۸ نیز توسط دو آنزیم *Xba*I و *Bam*HI مورد هضم قرار گرفت. عمل اتصال[۴] بوسیله آنزیم T۴ DNA Ligase به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محصول مرحله اتصال به سلول‌های باکتریائی مستعد شده *E.coli* سویه DH۵α ترانسفورم گردید. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت LB حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، ۷ میکرولیتر ۲۰IPTG درصد و ۴۰ میکرولیتر ۲X-Gal درصد کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۴ ساعت در دمای ۴ درجه انکوبه گردیدند. چند پرگنه سفید و آبی انتخاب گردید و از آنها به روش mini-prep استخراج پلاسمید انجام گرفت. پلاسمیدهای استخراجی از پرگنه‌های سفید با استفاده از آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Sac*I و *Xba*I و *Bam*HI برای تأئید وجود ژن در پلاسمید مورد هضم مضاعف قرار گرفتند. از واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای (PFN) و (PRN) نیز برای تأئید وجود ژن استفاده گردید.

نتیجه‌گیری و بحث

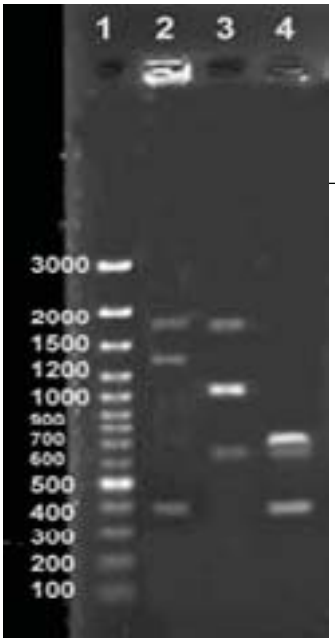
در این مطالعه ما جداسازی ژن F و سپس کلونینگ آن در ناقل pUC۱۸ گزارش نمودیم. جداسازی ژن از ویروس نیوکاسل و به دنبال آن کلونیگ در ناقل مناسب، اولین قدم در بیان ژنها در سیستم‌های مختلف از جمله گیاهان یا تولید واکسن‌های ژنی است. بیان ژن F در سیستم‌های مختلف موجب ایمنی‌زایی در طیور می‌شود و از این پادتن‌های تولید شده می‌توان به عنوان واکسن استفاده کرد که با گزارش‌های سایر پژوهشگران مطابقت دارد(۲، ۶، ۷). به طوریکه پادتن‌های تولید شده در گیاه سیب‌زمینی توسط ژن‌های F و HN این ویروس وقتی که به صورت واکسن خوراکی استفاده شدند توانستند سیستم ایمنی را تحریک کنند(۲). آنتی‌ژنهای بیان شده از پلاسمید حاوی ژنهای F و HN در جوجه‌های آلوده به سویه‌های ولوژنیک ایمنی‌زایی مناسبی را در میزبان بر علیه ویروس نیوکاسل بوجود آوردند(۶).

توالی آغازگرهای انتخاب شده با استفاده از برنامه جستجوگر BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI برای یافتن همولوژی با سایر موجودات جستجو گردید و هیچ همولوژی با سایر موجودات بدست نیامد. RNA استخراج شده در ارزیابی خلوص با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر نسبت ۲ را نشان داد که نشان‌دهنده خلوص RNA استخراجی بود و از الکتروفورز ژل آگاروز نیز برای بررسی کیفیت RNA استفاده شد که کیفیت نسبتاً خوبی داشت. اندازه‌گیری جذب نوری برای تعیین میزان cDNA نیز میزان ۲۴۳ نانوگرم در میکرولیتر را نشان داد.اندازه قطعات تکثیر شده توسط واکنش PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۲ درصد و مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp شرکت فرمنتاز تایید شد که قطعه‌ای حدود ۱۷۰۰ جفت بازی بدست آمد (چاهکهای ۳، ۴ و ۵ شکل ۱). در شاهد منفی از آب مقطر به جای cDNA در مخلوط واکنش استفاده شد(چاهک ۲ شکل ۱). با توجه به اینکه در واکنش PCR برای تکثیر این ژن قطعات غیر اختصاصی بدست آمد، قطعه ۱۷۰۰ جفت بازی برای افزایش خلوص DNA از ژل استخراج گردید. وجود این باندهای غیر اختصاصی مربوط به طراحی آغازگرها می‌باشد که آغازگرهای (CFN) و (CRN) علاوه بر تکثیر ژن به طول ۱۷۰۵ جفت باز، یک ناحیه حدود ۷۰۰ جفت بازی را نیز تکثیر می‌کردند که تکثیر این ناحیه با استفاده از این آغازگرها بعلت عدم وجود یک جفت آغازگر بهتر در نواحی ابتدایی و انتهایی ژن اجتناب ناپذیر بود. تکثیر باندهای اضافی حتی با استفاده از تغییر در مخلوط واکنش و دمای اتصال آغازگر نیز برطرف نشد. نتایج هضم آنزیمی برای تطبیق نقشه هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده با مکان آنزیمها در توالی اولیه به صورت زیر بود. از هضم توسط آنزیم*EcoRI*، دو قطعه ۳۸۰ و ۱۳۲۵ جفت بازی و از آنزیم *SacI*، دو قطعه ۶۳۹ و ۱۰۶۶ جفت بازی و همچنین از هضم آنزیمی مضاعف توسط آنزیم‌های *EcoRI* و *SacI* قطعات ۳۸۰ و ۶۳۹ و ۶۷۶ به دست آمدند که همه قطعات بدست آمده از هضم برشی منطبق با نقشه برشی توالی اولیه بود(شکل ۲) (۸).

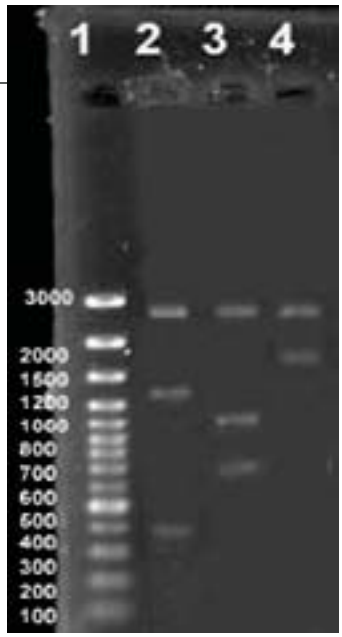
از آنجا که در آغازگر رفت مکان آنزیمی *XbaI* و در آغازگر برگشتی مکان آنزیمی *BamHI* طراحی شده بود، جهت کلون کردن ژن مذکور از دو آنزیم *XbaI* و *BamHI* استفاده گردید. قطعه حاصله در ناحیه مکانهای چندگانه کلونینگ[۵] (MCS) ناقل pUC۱۸ که با این دو آنزیم نیز هضم شده بود کلون گردید و به باکتری مستعد شده *E.coli* سویه DH۵α ترانسفورم گردید. رشد پرگنه‌ها در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نشانگر وجود پلاسمید در باکتری، وجود پرگنه‌های سفید نمایانگر نوترکیب بودن باکتری حامل آنها بود. DNA پلاسمیدی استخراج شده از پرگنه‌های سفید توسط اسپکتروفتومتر برای تعیین کیفیت در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر نسبت ۱/۸ را نشان داد که نشان دهنده خلوص DNA پلاسمیدی استخراج شده بود. از هضم آنزیمی مضاعف پلاسمیدهای استخراجی توسط آنزیم‌های *EcoRI* و *BamHI* سه قطعه ۳۷۹ و ۱۳۲۶ و ۲۶۸۰ جفت بازی و از هضم مضاعف توسط آنزیم‌های *SacI* و *BamHI* سه قطعه ۶۳۴ و ۱۰۷۵ و ۲۶۸۰ جفت بازی و همچنین از هضم آنزیمی مضاعف توسط آنزیم‌های *XbaI* و *BamHI* قطعات ۱۷۰۵ و ۲۶۸۰ جفت بازی به دست آمد که قطعه ۱۷۰۵ مربوط به ژن کلون شده و قطعه ۲۶۸۰ در تمام هضمها مربوط به پلاسمید pUC۱۸ می‌باشد. نتایج هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب نشانگر تطابق با نقشه هضم آنزیمی ژن تکثیر شده و توالی اولیه بود



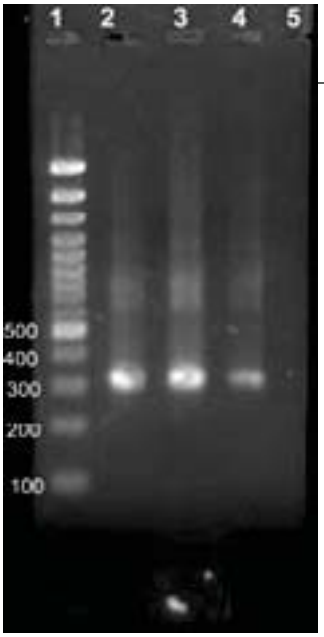
شکل شماره۱: الکتروفورز DNA تکثیر شده
چاهک اول: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp
چاهک دوم: شاهد منفی
چاهک سوم و چهارم و پنجم: باند ۱۷۰۵
چاهک چهارم: جهت استخراج DNA از ژل استفاده گردید.



شکل شماره ۲: هضم آنزیمی محصول PCR
چاهک اول: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp
چاهک دوم: هضم آنزیمی با آنزیم *EcoRI*
چاهک سوم: هضم آنزیمی با آنزیم *SacI*
چاهک چهارم: هضم مضاعف با آنزیم‌های *SacI* و *EcoRI*



شکل شماره ۳: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب
چاهک اول: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp
چاهک دوم: هضم چاهک سوم: هضم مضاعف با آنزیم‌های *SacI* و *XbaI*
چاهک چهارم: هضم مضاعف با آنزیم‌های *XbaI* و *BamHI*



شکل شماره ۴: واکنش PCR برای اطمینان از وجود ژن در پلاسمید
چاهک اول: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp
چاهک دوم و سوم و چهارم: باند ۳۱۰ جفت بازی (استخراج پلاسمید از کلونی سفید)
چاهک پنجم: بدون باند (استخراج پلاسمید از کلونی آبی)

که نشان‌دهنده وجود ژن در پلاسمید می‌باشد(شکل ۳)(۸). واکنش PCR برای پلاسمید نوترکیب (سفید) و پلاسمید بدون ژن (آبی به عنوان شاهد) که به عنوان الگو در واکنش PCR به منظور تأئید وجود ژن استفاده شده بودند انجام گرفت که باند ۳۱۰ جفت بازی در پلاسمید نوترکیب بدست آمد که نشان دهنده وجود ژن در پلاسمید pUC۱۸ می‌باشد. عدم تکثیر باند از پرگنه‌های آبی نشان دهنده عدم وجود این ژن در پرگنه‌های آبی است(شکل ۴).

علی‌رغم اینکه هضم آنزیمی و تکثیر محصول PCR نشان دهنده صحت کلونینگ ژن F در باکتری *Ecoli* می‌باشد، ضروری است که قبل از انجام هرگونه اقدام جهت بیان این ژن، توالی نوکلئوتیدی ژن کلون شده حداقل دوبار در هر دو جهت تعیین توالی شود. اگرچه استفاده از آنزیم pfu جهت تکثیر به میزان زیادی احتمال خطا توسط آنزیم را برای تکثیر کاهش می‌دهد ولی در صورتی توالی اولیه ژن F به طور صدرصد از ارجحیت برخوردار خواهد بود که عمل توالی‌یابی انجام گیرد. وجود ژن در ناقل pUC۱۸ سبب در دسترس بودن این کلون جهت آزمایشات تکمیلی و بیان ژن در محدوده وسیعی از ناقلین خواهد بود.

پاورقی‌ها

1- Enveloped
2- Primer
3- Ribonuclease inhibitor
4- Ligation
5- Multiple Cloning Site

منابع مورد استفاده

1. Alexander, D.J. 2000; Newcastle disease and other avian paramyxoviruses, Rev.Sci. Tech.19:443–462.

2. Berinstein A. and et al. 2005; Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. Vaccine, 23: 5583-5589.

3. Chambers P., Millar, N.S., Bingham, R.W. and Emmerson, P.T., 1986; Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus, and the nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin–neuramin idase and the large protein. J. Gen. Virol, 67: 475–486.

4. Loke C.F., Omar A.R., Raha A.R. and K. Yusoff. 2005; Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes.Veterinary Immunology and Immunopathology, 106: 259–267

5. Meulemans, G., Gonze, M., Carlier, M.C., Petit, P., Burny, A. and Long, L., 1986; Protective effects of HN and F glycoprotein-specific monoclonal antibodies on experimental Newcastle disease. Avian Path, 15: 761–768.

6. Peeters B. P. H. and et al. 1999; Rescue of Newcastle disease virus from Cloned CDNA: Evidence that Cleavability of the Fusion Protein Is a Major Determinant for Virulence.ournal of Virology, 73: 5001-5009.

7. Sakaguchi, M., Nakamura, H., Sonoda, K., Hamada, F., Hirai, K., 1996. Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus. Vaccine, 14: 747–752.

8. Sellers,H.S. and Seal,B.S.2000; Complete sequence for the B1 strain of Newcastle disease virus. Genbank, Submitted (28-SEP-2000).

9. Taylor, J. E., Rey-Senelonge, CH., Bouquet, A., Norton, F., Goebel, E., Desmettre, S. and Paoletti, PH. 1990; Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. Journal of Virology, 64: 1441-1450.

10. Wilde, A., McQuain, C. and Morrison, T., 1986; Identification of the sequence content of four polycistronic transcripts synthesized in Newcastle disease virus infected cell. Virus Res, 5: 77–95.