# پتانسیل واکسنی پروتئین کپسید خارجی (VP4) روتاویروس کلون شده در پلاسمید

**مظاهر خدابنده لو[۱]، بیژن بمبئی[۲]، زهره-آزیتا صدیق[۳]**

۱-استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۸۷۱-۶۱۳۱۴۱۱

uk.ac.irmazaher-khodabandehloo@m

۲-استادیار گروه بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۳- دکترای تخصصی ویروس شناسی، مرکز تحقیقات واکسن و سرم رازی، تهران، ایران

## چکیده

***زمینه و هدف:*** روتاویروسها عامل گاستروآنتریت کودکان زیر ۵ سال هستند و سالانه موجب حدود ۸۰۰۰۰۰ مرگ می‌شوند. افزودن واکسن روتاویروس در برنامه ایمن سازی کودکان می‌تواند باعث کاهش قابل ملاحظه مرگ و میر کودکان به خصوص در کشورهای درحال توسعه شود. پروتئین VP4 خار کپسید خارجی روتاویروس بوده که روتاویروس توسط آن به گیرنده خود متصل می‌شود. پروتئین VP4 موجب تولید آنتی بادی خنثی‌کننده می‌شود. با در نظر گرفتن موارد فوق ما، ژن VP4 روتاویروس را در پلاسمید به منظور بیان VP4 در آینده کلون کردیم.

***روش بررسی:*** سلول BSC-1 به صورت تک لایه کشت داده شد. وقتی کشت سلولی CPE کامل روتاویروس را نشان داد سه مرتبه ذوب و فریز شد. روتاویروس توسط اولتراسانتریفیوژ نسبتاً خالص گردید. پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی مخصوص قطعه ۴ ژنوم روتاویروس که VP4 را کد می‌کند ساخته شد. ژنوم RNA ویروس استخراج و به عنوان الگو برای ساخت cDNA توسط ترانس کریپتاز معکوس استفاده گردید. سپس به وسیله PCR تکثیر داده و محصول PCR در ناقل پلاسمید کلون شد. پلاسمید حاصل با آنزیمهای محدودالاثر و تعیین توالی مورد تحلیل قرار گرفت.

***یافته‌ها:*** نتیجه تعیین توالی به وسیله نرم افزار BLAST تحلیل شد که ۱۰۰٪ با توالی قطعه شماره ۴ روتاویروس موجود در بانک ژنی NCBI مشابه بود.

***نتیجه‌گیری:*** نتیجه تحلیل توالی تایید می‌کند که نوکلئوتیدهای ژن VP4 بعد از پاساژهای طولانی روتاویروس SA11 در آزمایشگاه ما ثابت مانده است.

***کلید واژه‌ها:*** روتاویروس، VP4، کلونینگ، واکسن

وصول مقاله: ۸۹/۳/۱۷ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۴/۳۰ پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۳۰

## مقدمه

روتاویروس شایعترین عامل گاستروآنتریت کودکان در سراسر جهان است. بیش از نیم تا یک میلیون مرگ سالانه در سراسر جهان در اثر از دست رفتن آب بدن به علت عفونت با روتاویروس رخ می‌دهد (۲و۱). روتاویروس همچنین یک پاتوژن مهم دامپزشکی است که باعث بیماری در گاو، گوسفند، خوک و ماکیان می‌شود (۲).

به نظر می‌رسد بهترین راه کاهش گاستروآنتریت روتاویروسی در جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه واکسیناسیون باشد (۵-۳).

واکسن خوراکی، زنده و تخفیف حدت یافته شامل ویروسهای نوترتیب (reassortant) روتاویروس انسانی-حیوانی (میمونی یا گاوی) در کودکان آزمایش شد. در

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]

سال ۱۹۹۸ واکسن چهارگانه میمونی Rotashield در ایالات متحده مجوز گرفت (٦و۲). اما به علت ایجاد چسبندگی روده (intussusception) مصرف آن در کودکان ممنوع شد (٦). بنابراین راه دیگری مانند تولید واکسنهای غیرزنده لازم است در نظر گرفته شود. روشهای دیگر در تولید واکسن روتاویروس عبارتند از: کپسید خالی، پروتئینهای کپسید خارجی (VP4 و VP7) بیان شده در ناقلهای مختلف، ذرات ویروس مانند (VLPs) تولید شده در باکولوویروس، واکسنهای DNA و ویروس کشته (۷).

روتاویروس متعلق به خانواده *رئوویریده* است. ویریون یک ذره بیست وجهی، بدون پوشینه است، ژنوم آن دارای ۱۱ قطعه dsRNA است که بوسیله سه لایه پروتئینی پوشیده شده است (۸). ژنوم ۱۱ قطعه‌ای پروتئینهای ساختمانی و غیرساختمانی ویروس را کد می‌کنند. شش پروتئین غیرساختمانی (NSP1-NSP6) در تکثیر و همانندسازی ویروس دخالت دارند. شش پروتئین ساختمانی کپسید روتاویروس عبارتند از: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7. داخلی ترین لایه ویروس از VP2 و لایه وسطی از VP6 تشکیل شده است. لایه خارجی از ۲۶۰ تریمر گلیکوپروتئین VP7 با وزن مولکولی ۳۷ kDa تشکیل شده است که فراوانترین پروتئین خارجی کپسید است و سطح صاف ویریون را تشکیل می‌دهد. ۶۰ خار دایمر VP4 (۸۸ kDa) که حساس به پروتئاز است از لایه صاف ویریون بیرون زده است (۶و۲). پروتئین VP4 در چند عمل مهم مانند اتصال به گیرنده سلولی، نفوذ به سلول، هماگلوتیناسیون، بیماریزایی و خنثی‌سازی ویروس دخالت دارد. شکست پروتئولیتیک VP4 به دو زیر واحد *VP8 (انتهای آمینو ۲۸ kDa) و *VP5 (انتهایی کربوکسیل ۶۰ kDa) برای عفونتزایی ویروس ضروری است (۹).

پروتئینهای کپسید خارجی (VP4, VP7) به طور مستقل باعث تولید آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده می‌شوند (۱۰). سیستم طبقه‌بندی دوگانه روتاویروس براساس ویژگی خنثی‌کنندگی پروتئین VP4 (P serotype) و پروتئین VP7 (G serotype) است (۱۱). آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده منوکلونال علیه هر کدام از قطعات *VP5 یا *VP8 پروتئین VP4 می‌توانند اتصال ویروس را مهار کرده و ویروس را در محیط آزمایشگاه خنثی نمایند (۱۲). با این حال عدم وجود آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال و منوکلونال به علت مقدار بسیار کم VP4 در ویریون، طبقه‌بندی روتاویروسها را (سروتیپهای P) با مشکل مواجه کرده است. بسیاری از سویه‌های انسانی و حیوانی به‌وسیله روشهای مولکولی مانند: تعیین توالی اسیدنوکلئیک، هیبریداسیون یا ژنوتیپ کردن به وسیله RT-PCR تعیین می‌شوند (۱۳). اگرچه ژنوتایپ کردن جانشین قابل اعتماد سروتایپ است و توافق کامل بین سروتایپ VP7 (G) و ژنوتایپ آن وجود دارد (۱۴)، اما تایید ویژگی سروتیپهای VP4 (P) به آنتی‌بادیهای ویژه P نیاز دارد که خیلی کمیاب است. فراهم کردن پروتئین خالص VP4، تولید سرم پلی‌کلونال را آسان خواهد کرد (۱۵و۲). چنین آنتی‌سرم‌هایی ماده کلیدی اصلی در ELISA برای سروتایپ P سویه‌های محلی روتاویروس خواهند بود.

با توجه به مقدار کم VP4 در ذرات ویروسی (۱/۵٪)، تولید کافی از این پروتئین به روش تکثیر ویروس در کشت سلولی و خالص سازی VP4 برای مطالعه ساختار، عمل و تهیه واکسن زیر واحد مشکل است (۲). کلون و بیان کردن پروتئین نوترکیب یکی از



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]

روشهای مفید برای تولید مقدار کافی VP4 برای مطالعه است. در این مطالعه آزمایشگاهی، ما سعی کردیم با کلون کردن ژن VP4 آن را به منظور مطالعه واکسن آماده کنیم.

## روش بررسی

**کشت سلول و ویروس:** رده سلولی فیبروبلاست کلیه میمون سبز آفریقایی (BSC-1) به صورت تک لایه در محیط کشت DMEM دارای ۱۰٪ سرم جنین گاو، ۲ mM ال-گلوتامین، ۱۰۰ U پنیسیلین و ۱۰۰ µg استرپتومایسین در میلی لیتر کشت داده شد. روتاویروس میمونی SA11 با ۱۰ µg/ml تریپسین به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا عفونت‌زایی ویروس فعال شود، سپس ویروس را در سلول BSC-1 در محیط بدون سرم و دارای ۰/۵ µg/ml تریپسین تکثیر داده شد. زمانیکه سلولهای آلوده ۸۰٪ CPE روتاویروس را نشان دادند، فلاسکها را سه مرتبه فریز و ذوب کرده و محیط حاوی ویروس با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت پائین شفاف شد. سپس روتاویروس با استفاده از اولتراسانتریفیوژ روی سوکروز ۴۰٪ در دور ۲۰۰۰۰ rpm به مدت ۲ ساعت تغلیظ گردید.

**میکروسکوپ الکترونی:** یک گرید از ویروس غلیظ شده تهیه شد و به وسیله اسید فسفوتنگستیک ۲٪ رنگ‌آمیزی سپس در زیر میکروسکوپ الکترونی بررسی شد.

**استخراج RNA:** استخراج RNA از رسوب روتاویروس به وسیله محلول استخراج RNA (RNAfast) ساخت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، طبق دستورالعمل آن استخراج شد و در آب مقطر DEPC و دمای $-20^{\circ}C$ نگهداری شد.

**طراحی پرایمر:** پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی ویژه قطعه شماره ۴ ژنوم که VP4 را کد می‌کند، با استفاده از توالی ژنوم روتاویروس SA11 موجود در بانک ژنی NCBI (Accession number: D16345) طراحی شد. پرایمر پیشرو از نوکلئوتید شماره ۹ الی ۳۱ و پرایمر پسرو از نوکلئوتید شماره ۲۳۱۷ الی ۲۳۴۱ قطعه شماره ۴ ژنوم روتاویروس بود. به این ترتیب ORF کامل ژن VP4 بدون ناحیه انتهایی غیر قابل ترجمه (NTR) در دو انتهای قطعه شماره ۴ ژنوم در آزمایش RT-PCR تکثیر خواهد شد. توالیهای نوکلئوتیدی پرایمرها به صورت زیر بود:

**VP4 F2**: 5'ATGGCTTCGCTCATTTATAGAC3'
**VP4 R2**: 5'CTACAACCTGCATTGCATAATC3'

**ساخت cDNA:** dsRNA استخراج شده روتاویروس به عنوان الگو برای ساخت cDNA از هر دو رشته ویروس استفاده شد. واکنش رونویسی معکوس با استفاده از ۱۰ µl dsRNA ، ۱ µl از ۱۰۰ µM از هر پرایمر شامل: حرارت در $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه که به سرعت در $4^{\circ}C$ سرد شد، سپس به مخلوط فوق، بافر انکوباسیون 5X ، ۱ µl از ۲/۵ mM مخلوط dNTPs، ۲۰ U/µl مهارکننده RNase (Fermantas)، و ۴۰ واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس M-MuL virus (Roche) در حجم کل ۲۰ µl اضافه شد و مخلوط حاصل در ترموسایکلر $37^{\circ}C$ به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد.

**تکثیر با استفاده از PCR:** مخلوط PCR در حجم کل ۵۰ µl دارای: ۵ µl مخلوط cDNA ، ۵ µl بافر 10X PCR ، ۱ µl از ۲۰ µM پرایمرها و ۴ µl از مخلوط ۱۰ mM dNTPs و ۲/۵ واحد آنزیم pfu DNA polymerase (Fermantas) بود. برنامه انکوباسیون PCR شامل تقلیب اولیه در $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، سپس $95^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $60^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و $72^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه، درکل ۳۵ چرخه تکرار شد، سپس طویل شدن



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]

نهایی ۱۰ دقیقه در C °۷۲ انجام شد. محصول نهایی در روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد.

**تایید محصول RT-PCR:** وزن مولکولی آمپلیکون تولید شده به وسیله الکتروفورز آگاروز در مقایسه با مارکر وزن مولکولی DNA تایید و سپس محصول PCR با کیت خالص سازی (Roche) خالص شد. سپس توسط هضم با آنزیمهای محدودالاثر Nde I تایید شد.

**لیگاسیون:** محصول PCR خالص شده و ناقل پلاسمید pGEM®-5Zf(-) (Promega)، که با آنزیم محدوالاثر EcoR V بریده شده بود، همراه آنزیم T4 DNA Ligase (Roche) در یک میکروتیوب یک شب در دمای اتاق، طبق روش کار سازنده آنزیم، گذاشته شد. پلاسمید حاصل که ژن VP4 در آن قرار گرفت VP4s-pGEM نامیده شد.

**تهیه باکتری پذیرا (competent) و ترانسفورماسیون:** سلول باکتری پذیرا DH5-α براساس روش مندل و هیگا تهیه و ترانسفورماسیون انجام شد (۱۶). به طور خلاصه، در یک میکروتیوب µl ۲ از پلاسمید یا مخلوط لیگاسیون فوق را به µl ۱۰۰ سلول پذیرای تازه اضافه کرده و در روی یخ، ۳۰ دقیقه گذاشته شد. سپس در C °۴۲ به مدت ۱ دقیقه گذاشته و فوراً در روی یخ ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سلولها را در µl ۹۰۰ محیط کشت مایع LB شناور ساخته و ۱ ساعت در انکوباتور شیکر دار C °۳۷ تکان داده شد. سپس µl ۵۰ از سوسپانسیون فوق را روی پلیت آگار LB دارای µg/ml ۵۰ آمپیسیلین، µl ۴۰ از x-gal 2%، و µl ۷ از IPTG 20% پخش کرده و در C °۳۷ انکوبه شد.

**غربال کردن کلنی‌ها:** کلنی‌های بی‌رنگ از روی پلیت آگار LB انتخاب شدند و مجدد در محیط کشت مایع LB دارای آمپی‌سیلین کشت داده شدند. سپس از باکتری‌های کشت شده، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Miniprep plasmids extraction kit, Roche) پلاسمید استخراج شد. پلاسمیدهای استخراج شده از نظر وجود ژن VP4 ابتدا با آنزیم های محدودالاثر DdE I و Bgl II (Roche) تایید شدند. سپس پلاسمیدهای تایید شده فوق با استفاده از پرایمرهای عمومی T7 و SP6 در دستگاه ژن آنالیز اتوماتیک (ABI 3130XL) با استفاده از کیت (BigDye Terminator V3.1 cycle Sequencing Kit) تعیین توالی شدند. نتیجه توالی با استفاده از نرم افزار BLAST مورد تحلیل قرار گرفت.

## یافته‌ها

**تحلیل RNA روتاویروس:** شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی روتاویروس نسبتاً خالص شده را نشان می‌دهد. شکل ۲ قطعات dsRNA روتاویروس را که از ویروس نسبتاً خالص استخراج شده است، نشان می‌دهد. ویروس در محلول لیز (loading buffer) در دمای C °۱۰۰ حرارت داده شد، یا RNA استخراج شده در بافر حل گردید. در هر دو حالت RNA روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ الکتروفورز شد، همانطوری که دیده می‌شود ۱۱ عدد باند dsRNA مربوط به الگوی (Pattern) الکتروفوروتیکی روتاویروس SA11 دیده می‌شوند (شکل ۲).

**RT-PCR**: محصول RT-PCR در شکل ۳ نشان داده شده است، باند VP4 DNA، ۲۳۳۳ جفت باز دارد و در الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ مشاهده می‌شود. درستی این باند توسط آنزیم محدودالاثر Nde I تایید شد زیرا

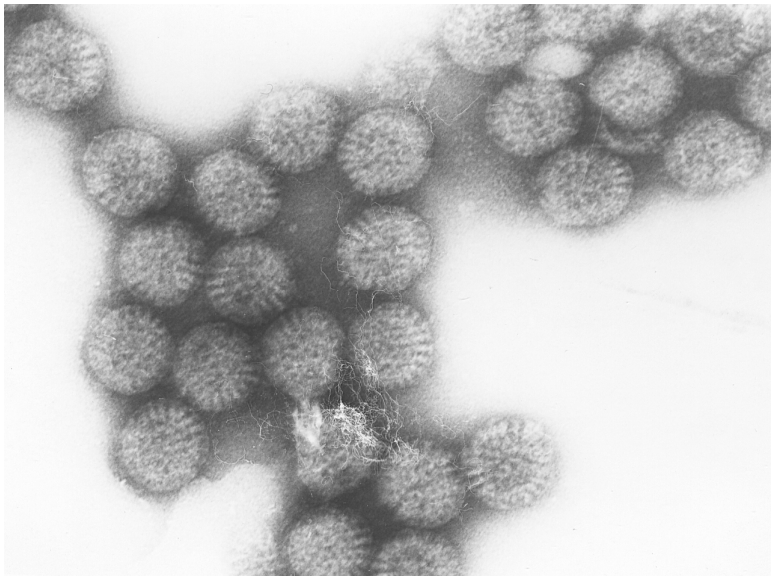


[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]

با این آنزیم دو قطعه ۱۹۰۰ جفت باز و ۵۳۷ جفت باز در اثر هضم DNA ژن VP4 حاصل می‌شود.

**کلونینگ VP4:** مولکول DNA حاصل از قطعه ۴ ژنوم روتاویروس به درون پلاسمید pGEM®-5Zf(-) که قبلا با آنزیم محدودالاثر EcoR V برش خورده بود (شکل ۴)، توسط لیگاسیون کند (blunt) کلون شد. کلون حاصل pGEM-VP4 نامیده شد. نقشه پلاسمید pGEM-VP4 در شکل ۵ نشان داده شده است. درستی ژن کلون شده و جهت قرار گرفتن آن توسط هضم با آنزیمهای محدودالاثر DdE I و Bgl II تایید شد. شکل‌های ۶ و ۷ محصولات برش یافته از پلاسمید pGEM-VP4 را نشان می‌دهند.

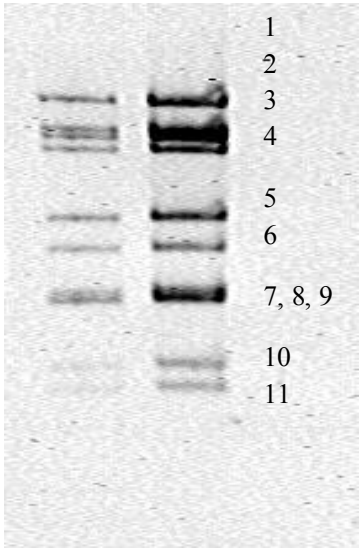
**تعیین توالی:** کلون تایید شده با آنزیمهای محدودالاثر، تعیین توالی شد. نتیجه توالی وقتی با نرم افزار BLAST تحلیل شد حدود ۱۰۰٪ با قطعه شماره ۴ ژنوم روتاویروس مشابه بود. همچنین نتیجه تحلیل توالی ژن کلون شده نشان داد که ژن قرار گرفته در پلاسمید pGEM قالب خواندن (ORF) درست دارد و حدود ۷۷۶ اسید آمینه را کد خواهد کرد.



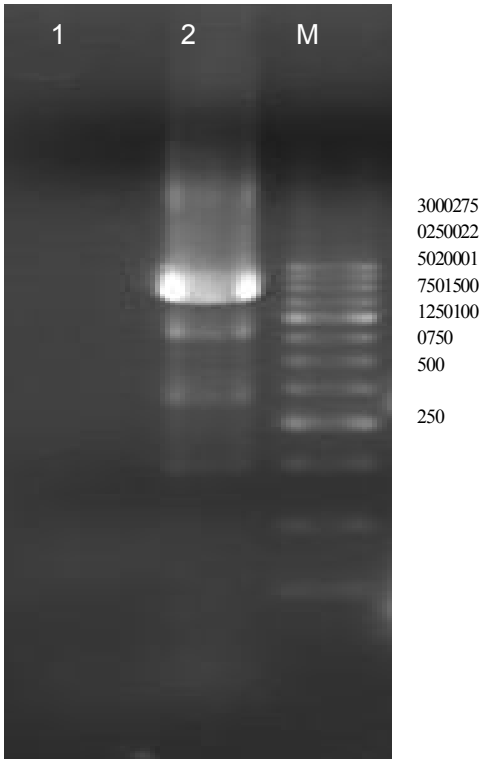
**شکل ۱: عکس میکروسکوپ الکترونی روتاویروس نسبتا خالص شده. رنگ آمیزی منفی، بزرگ نمایی ۹۰۰۰۰×**



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]



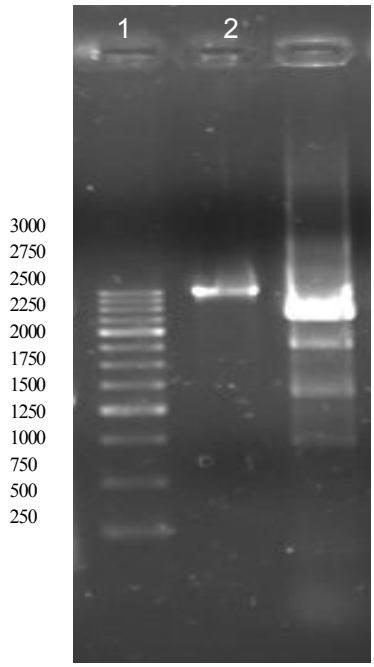

**شکل ۲: الکتروفوروگرام ژنوم روتاویروس SA11 . ۱۱ قطعه RNA دورشته‌ای (dsRNA) که در PAGE ۱۰٪ الکتروفورز شده است. مولکولهای dsRNA به ترتیب وزن مولکولی شامل ۴ قطعه بزرگ در بالا، دو قطعه متوسط، سه قطعه مجاور هم و دو قطعه کوچک در پایین. مقدار RNA در ستون سمت راست چند برابر بیشتر از سمت چپ است.**



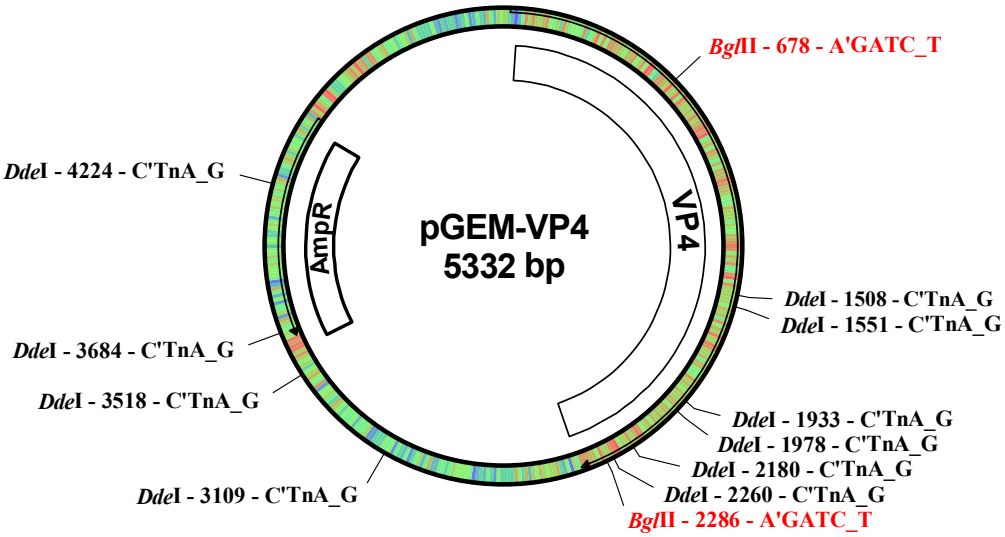

**شکل ۳: محصول PCR ژن VP4 در ژل آگاروز ۱٪. ستون ۱ مربوط به کنترل منفی، ستون دوم ژن VP4 با طول ۲۳۳۳ جفت باز، ستون سوم مارکر DNA.**



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]



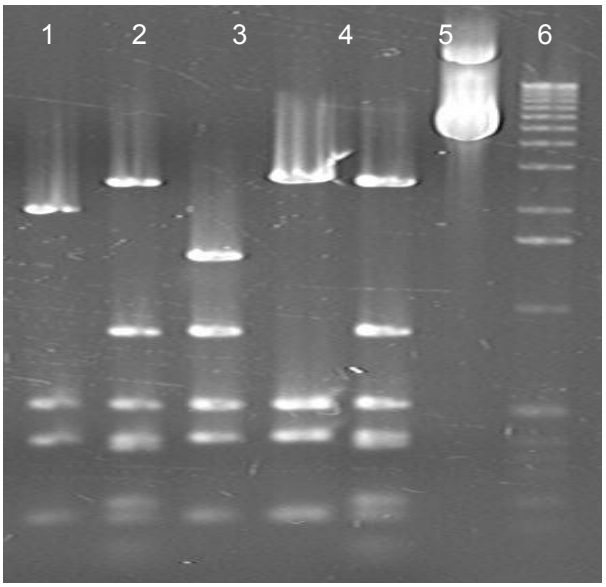

**شکل ٤: الکتروفورز DNA در ژل آگاروز ۱٪. ستون اول مارکر DNA، ستون اول مارکر وزن مولکولی، ستون دوم pGEM هضم شده با آنزیم محدودالاثر EcoR V که پلاسمید را کند برش داده و به صورت خطی در می آورد، ستون سوم پلاسمید pGEM بدون برش (حلقوی).**



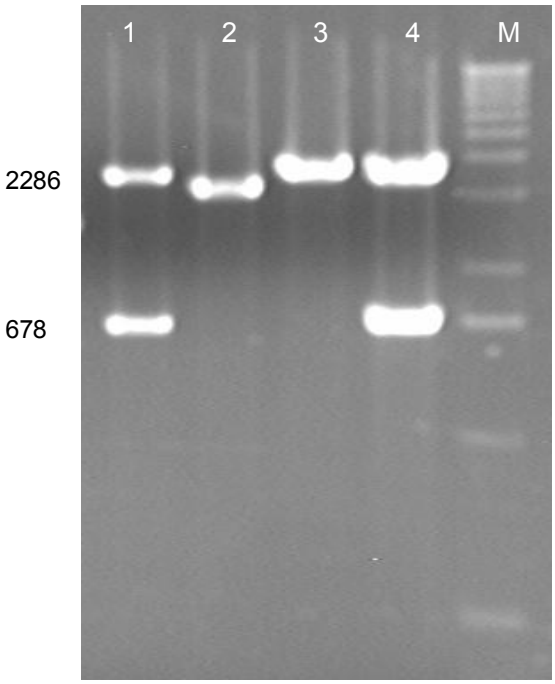

**شکل ٥: نقشه پلاسمید pGEM-VP4، به طول ۵۳۳۳۲ جفت باز، ORF کامل ژن VP4، ژن مقاومت به آمپیسیلین، مکان برش آنزیمهای محدودالاثر Bgl II و Dde I**



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]




**شکل ۶: الکتروفورز DNA در ژل آگاروز ۱٪. هضم پلاسمید دارای ژن VP4 (pGEM-VP4) با آنزیم محدودالاثر Dde I، ستون ۲ و ۵ محصولات مورد انتظار را دارد، یعنی ژن VP4 با جهت دلخواه در پلاسمید قرار گرفته است. پلاسمید هضم نشده مربوط به این دو ستون تعیین توالی شدند. ستون ۶ پلاسمید pGEM-VP4 هضم نشده. ستون M مارکر DNA.**




**شکل ۷: الکتروفورز DNA در ژل آگاروز ۱٪. هضم پلاسمید pGEM-VP4 با آنزیم محدودالاثر Bgl II .**
**ستون ۱ و ۴ محصولات مورد انتظار را دارد. پلاسمید هضم نشده مربوط به این دو ستون تعیین توالی شدند.**



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]

## بحث

اهمیت روتاویروس به عنوان عامل گاستروآنتریت در انسان و حیوان به خوبی اثبات شده است (۱۷). تلاشهایی شده است تا مرگ و میر در اثر عفونت روتاویروس را با تولید و به کارگیری یک واکسن مؤثر کنترل یا شاید حذف نمایند (۱۵). این تلاشها شامل ساخت واکسن زنده ویروسی، واکسن زیرواحد و دیگر واکسن‌ها است (۱۸). با این حال در استفاده از واکسن‌های زنده در پیشگیری گاستروآنتریت روتاویروس چالشهای مهمی مانند چسبندگی روده وجود داشته است (۱۵). خطر عوارض ناخواسته واکسن‌های زنده و ضعیف شده عبارتند از: مشکلات بالینی، برگشت بیماریزایی، میانکنش ژنتیکی با سویه‌های وحشی (۱۹). بنابراین تحقیقات بعد از تولید و مصرف واکسنهای زنده که امروزه مجوز هم گرفته‌اند همچنان ادامه دارد. هدف ایده‌آل استفاده از یک واکسن مؤثر در پیشگیری و داشتن کمترین اثرات جانبی است (۱۸). ما سعی داریم پروتئین‌هایی را تولید کنیم که در اتصال به سلول و خنثی شدن روتاویروس توسط آنتی بادی‌ها دخالت دارند، مانند پروتئین‌های VP4 و VP7.

با توجه به این که حساسیت و ایمنی میزبان در گاستروآنتریت شدید روتاویروسی کاملاً شناخته نشده است. همچنین نقش پاسخ‌های ایمنی هموتیپی و هتروتیپی در حفاظت علیه بیماری در ارتباط با تولید واکسن هنوز مبهم است. تولید تک تک یا قسمتهایی از پروتئین‌های روتاویروس برای مطالعه ساختار مولکولی و اعمال احتمالی آنها در طی عفونت ویروس راه دیگری برای پیدا کردن پاسخ به این سؤال‌ها است (۱۵).

روتاویروسها تنها ویروسهای شناخته شده پستانداران و پرندگان هستند که دارای ۱۱ قطعه dsRNA می‌باشند. در بیشتر موارد الگوی (Pattern) الکتروفوروتیپی ژنوم روتاویروسهای گروه A از چهار قطعه dsRNA با وزن مولکولی بالا (۱ تا ۴)، دو قطعه با وزن مولکولی متوسط (۶ و۵)، سه قطعه باهم (۷، ۸ و ۹) و دو قطعه کوچکتر (۱۱و۱۰) تشکیل شده‌اند. زمانیکه این الگوی اصلی دیده نشود، ممکن است یک روتاویروس گروه A پرنده یا روتاویروس غیرگروه A باشد. در روتاویروسهای مختلف انسانی و جانوری الگوهای الکتروفوروتیپی نیز از همدیگر قابل تشخیص هستند. بررسی الکتروفوروتایپی ژنوم روشی نسبتاً آسان، سریع و معمول برای تعیین ویروس در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و طغیانها است (۲۲-۲۰ و۲). الکتروفوروگرام ما هم الگوی الکتروفوروتایپی ژنوم روتاویروس SA11 را خوب نشان می‌دهد (شکل ۲).

روش کلونینگ ما ساده‌تر از روشهای گذشته اما با همان نتیجه بود. مانند ساخت mRNA در آزمایشگاه با استفاده از ترانس کریپتاز داخل ویروسی یا استفاده از ریبوآدنیل ترانسفراز انتهایی برای ساخت الگو در ساخت cDNA با طول کامل (۲۴و۲۳)، و این به علت پیشرفتهای جدید، مانند روش RT-PCR امروزه است. در مقایسه با توالی موجود در بانک ژن، مطالعه ما نشان می‌دهد که توالیهای نوکلئوتیدی قطعه ژن شماره ۴ بعد از پاساژهای طولانی و مداوم روتاویروس SA11 در آزمایشگاه ما، خیلی محفوظ مانده است. زیرا ژنوم روتاویروس RNA دو رشته‌ای است و ژنوم‌های دو رشته‌ای در برابر موتاسیونها مقاوم‌تر هستند (۲۵). ما، نوکلئوتیدهای غیرکد دهنده هر دو انتهای '3 و '5 را از ژن کلون شده حذف کردیم، زیرا می‌خواستیم ژن VP4 به پروموتر ناقل بیانی مناسب آینده نزدیک‌تر باشد.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]

## نتیجه‌گیری

این کار در آینده برای بیان پروتئین VP4، که از نظر آنتی‌ژنی خیلی شبیه به روتاویروسهای انسانی است، استفاده شده و مطالعه آن دنبال خواهد شد. با بیان بالای پروتئین VP4 و خالص کردن آن، مطالعه آنتی‌ژنی، ایمونوژنی و اعمال بیولوژی آن راحت‌تر خواهد بود و ممکن است در تولید یک واکسن مؤثر روتاویروسی کمک نماید.

## تشکر و قدردانی

ما از اساتید و کارکنان گروه ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به خاطر پشتیبانی تکنیکی تشکر و قدردانی می‌کنیم.

## References

1. Parashar UD, Alexander JP, Glass RI. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2006; 55: 1-13.
2. Estes MK, Kapikian AK. Rotaviruses in Knipe DM, Howley PM (eds). Fields virology. Philadelfia, Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Business, 2007, vol 2, pp:1917-1974.
3. Ciarlet M, Schodel F. Development of a rotavirus vaccine: Clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq®. Vaccine 2009; 27: G72-G81.
4. Higo-Moriguchi K, Akhori Y, Iba Y, Kurosawa Y, Taniguchi K. Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus. Journal of Virology 2004; 78: 3325-3332.
5. O'Ryan ML, Hermosilla G, Osorio G. Rotavirus vaccines for the developing world. Curr Opin Infect Dis 2009; 22: 483-489.
6. Blutt SE, Crawford SE, Warfield KL, Lewis DE, Estes MK, Conner ME: The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B-cell activation. Journal of Virology 2004; 78: 6974-6981.
7. Dennehy PH. Rotavirus vaccines-an update. Vaccine 2007; 25: 3137-3141.
8. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanok RM. Rotaviruses; in Knipe DM (ed): Fields virology. Philadelphia, Lippincott William and Wilkins, 2001, vol 2, pp 1787-1833.
9. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, and et al. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. Journal of Virology 2001; 75: 6052-6061.
10. Blutt SE, Crawford SE, Warfield KL, Lewis DE, Estes MK, Conner ME. The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B-cell activation. Journal of Vrology 2004; 78: 6974-6981.
11. Hoshino Y, Jones RW, Kapikian AZ. Characterization of neutralization specificities of outer capsid spike protein VP4 of selected murine, lapine, and human rotavirus strains. Virology 2002; 299: 64-71.
12. Zarate S, Espinosa R, Romero P, Mendez CF, Arias CF, Lopez S. TheVP5* domain of VP4 can mediate attachment of rotavirus to cells. Journal of Vrology 2000; 74: 593-599.
13. Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C. VP4 typing of bovine and porcine group a rotaviruses by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32:1333-1337.
14. Hoshino Y, Jones RW, Kapikian AZ. Characterization of neutralization specificities of outer capsid spike protein of selected murine, lapine and human rotavirus strains. Virology 2002; 299: 64-71.
15. Favacho ARM, Kurtenbach E, Sardi SI, Gouvea VS. Cloning, expression and purification of recombinant bovine rotavirus hemagglutinnin, VP8*, in Esherchia coli: protein expression & purification 2006; 46: 196-203.
16. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteroiophage DNA infection. Journal of Molecular Biology 1970; 53: 159-162.
17. Parashar UD, Baresee JS, Gentch JR, Glass RI. Rotavirus emerging infectious disease 1998; 4: 561-570.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]

18. Peixoto C, Sousus MFQ, Silva AC, Carrondo MJT, Alves PM. Downstream processing of triple layered rotavirus like particles. Journal of Biotechnology 2007; 127: 452-461.
19. Desselberger U, Manktelow E, Li W, Cheung W, Iturriza-Gomara M, Gray J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. Br Med Bull 2009; 90:37-51.
20. Dunn SJ, Ward RL, McNeal MM, Cross TL ,Greenberg HB. Identification of a new neutralization epitope on VP7 of human serotype 2 rotavirus and evidence for electropherotype differnce caused by single nucleotides. Virology 1993; 197: 397-404.
21. Small C, Barro M, Brown TL, Patton JT. Genomic heterogeneity of SA11 rotavirus due to reassortment with O agent. Virology 2006, 15; 359: 415-424.
22. Xu J, Yang Y, Sun J, Ding Y, Su L, Fang Z, and et al. Molecular epidemiology of rotavirus infections among children hospitalized for acute gastroenteritis in shanghai, china, 2001 through 2005. Journal of Clinical Virology 2009; 44: 58-61.
23. Arias CF, Lopez S, Bell JR, Strauss JH. Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus sa11 as deduced from cDNA sequence. Journal of Vrology 1984; 50: 657-661.
24. Both GW, Mattick JS, Bellamy AR. Serotype specific glycoprotein of simian 11 rotavirus: Coding assignment and gene sequence. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 3091-3095.
25. Blackhall J, Fuentes A, Magnusson G. Genetic stability of a porcine rotavirus rna segment during repeated plaque isolation. Virology 1996; 225: 181-190.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-14 ]