مقاله علمی – پژوهشی:

جداسازی، تکثیر و انتقال ژن VP_{28} ویروس عامل لکه سفید میگو در میکروجلبک *Chlorella vulgaris* به روش الکتروپوریشن (تراواسازی الکتریکی)

سید داود حسینی*[۱]، محدثه سادات حسینی[۲]، سید مهدی رضایی[۳]

*hosseinida@yahoo.com

۱- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان آموزش و تحقیقات و ترویج جهاد کشاورزی، اراک، ایران
۲- دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳- دانشگاه ساری، مازندران، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۱

چکیده

بیماری لکه‌سفید یکی از مهمترین بیماری‌ها در پرورش میگو می‌باشد که موجب کاهش تولید و خسارت اقتصادی شدیدی در کل دنیا از جمله ایران گردیده است. مرگ و میر ناشی از این بیماری شدید و بسیار بالا و به ۱۰۰٪ طی ۱۰-۳ روز از شروع بیماری می‌رسد. بر اساس آمارهای جهانی سالانه در دنیا حدود ۳۰۰ هزار تن میگو بر اثر این بیماری تلف می‌شود. برای مثال، در ایران در سال های ۱۳۸۶,۱۳۸۳, ۱۳۸۷,۱۳۹۴، ۱۳۹۵ و ۱۳۹۸ شیوع این بیماری خسارات میلیاردی به تولید کنندگان وارد کرد. با توجه به این‌که ژن پروتئین ویروسی VP_{28} یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های پوششی ویروس بیماری لکه سفید و در چسبیدن و نفوذ به سلول‌های میگو نقش دارد و از آن‌جایی‌که مهم‌ترین منبع غذایی میگو در مرحله لاروی میکروجلبک می‌باشد، می‌تواند منبع مناسبی برای ساخت واکسن باشد. در این تحقیق ژن VP_{28} به میکروجلبک انتقال داده شد تا از این راه کمکی در جهت تولید واکسن خوراکی برای جلوگیری از بیماری لکه‌سفیدمیگو انجام گیرد. در این تحقیق نمونه‌های میگو (*Penaeus indicus*) مشکوک به بیماری سندروم لکه سفید از استخرهای پرورشی آبادان (مهرماه ۱۳۹۰) به آزمایشگاه مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی-شعبه اراک منتقل و DNA ژنومیک ویروس با استفاده از روش پروتئیناز K و فنل/کلرفرم استخراج شد. با طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن VP_{28} به روش PCR تکثیر و به داخل وکتور pCAMBIA1304 منتقل و نهایتاً طی فرایند تراواسازی الکتریکی به میکروجلبک *Chlorella vulgaris* که خود یکی از میزبان‌های بسیار مناسب انتقال ژن می‌باشد، منتقل گردید.

لغات کلیدی: ژن VP_{28}، لکه سفید میگو، میکروجلبک، کلرلاولگاریس، الکتروپوریشن

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]

مقدمه

در طول سالیان اخیر، ریزجلبک‌ها کاربردهای گسترده‌ای در زندگی بشر پیدا کرده‌اند. این موجودات، اولین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده اکسیژن در سطح کره زمین بوده‌اند. دسته‌ای از ریزجلبک‌ها با تثبیت نیتروژن، شکل قابل استفاده این عنصر را (به صورت آمونیوم و نیترات) در اختیار گیاهان قرار می‌دهند. گونه‌های ریزجلبکی متعددی مانند اسپیرولینا و جلبک‌هایی مثل پورفیرا نقش عمده‌ای در تأمین غذای سایر جانداران ایفاء می‌کنند. علاوه‌براین، ترکیبات ارزشمند و دارای خواص دارویی تولیدی از این موجودات فتوسنتز کننده، علاقه محققین را برای یافتن ترکیبات جدید با خواص و قابلیت‌های مفید افزایش داده است (Cardozo *et al*., 2007; Yang *et al*., 2016; Kiataramgul *et al*., 2020).

از سویی، ریزجلبک‌ها را می‌توان به عنوان گیاهانی میکروسکوپی در نظر گرفت و از آنها جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب مانند گیاهان تراریخته بهره جست. با این مزیت که اولاً کشت ریزجلبک‌ها بسیار راحت‌تر است و با هزینه کمتری صورت می‌گیرد، ثانیاً در مواردی که گیاهان به‌راحتی قادر به رشد نیستند (زمین‌های شور)، ریزجلبک‌ها به‌خوبی رشد می‌کنند (Cardozo *et al*., 2007, Yang *et al*., 2016; Daliry *et al*., 2017).

ویروس عامل لکه سفید میگو دارای ۹ ساختمان پروتئینی است که تا به‌حال شناسائی شده‌اند و براساس اندازه آنها روی SDS-PAGE تعیین گردیده‌اند. پروتئین‌های ویروسی [1](VP) شامل VP_{19}، VP_{22}،VP_{28}، VP_{281} و VP_{466} در پوشش ویروس قرار دارند درحالی‌که VP_{15}، VP_{24}، VP_{26} و VP_{35} در نوکلئوکپسید ویروس قرار گرفته‌اند. ترجمه ژن‌های WSSV مشخص نموده است که ژن‌های پروتئین‌های ویروسی، شامل VP_{28}، VP_{26}، VP_{24}، VP_{19} وVP_{15} VP هنگام ایجاد بیماری با تأخیر ظاهر شده درحالی‌که آنزیم ردکتاز ریبونوکلئو اسیدها زودتر از این ژن‌ها ظاهر می‌شوند. به دنبال آن سایر ژن‌ها شبیه ریبونوکلئوتید ریدکتاز، پروتئین‌های شبیه کلاژن و پروتئین کینازها شناسائی و مطالعه گردیده‌اند. پروتئین‌های VP_{28}، VP_{26} و VP_{24} ممکن است با تکرار ژن‌ها رشد و تکثیر یابند. همه اینها به‌وسیله ORFs رمزگذاری شده و به طور تقریبی اندازه آنها حدود ۲۰۶ اسید آمینه برآورد گردیده است. مطالعات بعدی نشان داده است که VP_{28} که مهم‌ترین پروتئین پوشش ویروس می‌باشند، نقش کلیدی در عفونت سیستمی بیماری لکه‌سفید در میگو داشته و مشاهده شده است که پروتئین VP_{28} در چسبیدن و نفوذ به سلول‌های میگو نقش دارد (Soltani *et al*., 2006; Kiataramgul *et al*., 2020).

با توجه به اینکه ژن پروتئین ویروسی VP_{28} یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های پوششی ویروس بیماری لکه سفید میگو می‌باشد و از آن‌جایی‌که مهم‌ترین منبع غذایی میگو در مرحله لاروی میکروجلبک می‌باشد و بیشترین درصد مرگ و میر بیماری لکه سفید در مرحله لاروی اتفاق می‌افتد (Yi *et al*., 2004; Du *et al*., 2006)، در این تحقیق ژن VP28 به میکروجلبک انتقال داده شد تا از این راه، کمکی در جهت تولید واکسن خوراکی برای جلوگیری از بیماری لکه سفید میگو انجام گیرد.

مواد و روش کار

تهیه میگوهای آلوده به بیماری لکه سفید و استخراج DNA

نمونه‌های میگو (*Penaeus indicus*) مشکوک به بیماری سندروم لکه سفید و دارای علامت بیماری از استخرهای پرورشی آبادان (مهر ماه ۱۳۹۰) جهت انجام این تحقیق به مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی-شعبه اراک منتقل شدند. DNA ژنومیک ویروس با استفاده از روش پروتئیناز K و فنل/کلرفرم استخراج و مورد ارزیابی قرار گرفت.

طراحی آغازگر برای ژن Vp28

با استفاده از توالی ژن *Vp28* موجود در بانک ژن (http://web.expasy.org/translate) و نرم افزار (primer primer)، آغازگرهای رفت و برگشت به‌ترتیب زیر طراحی و از طریق شرکت تکاپو زیست سفارش ساخت داده شد به‌طوری‌که آغازگرها به ترتیب دارای ترادف لازم

[1] Viral Proteins

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]

برای شناسایی و برش با آنزیم‌های BamHI و EcoRI باشند.

5’-ATAGGATCCAGGATGGATCTTTCTTTCACT-3’ :Forward
5’-ATAGAATTCTTACTCGGTCTCAGTGCCA-3’ :Reverse

PCR جهت تکثیر ژن Vp28

برای تکثیر ژن vp_{28} واکنش PCR در حجم ۲۵ µl و بر نامه ۳۵ سیکل با دمای دناتور ۲۹ به مدت ۶۰ ثانیه، آنالینگ (اتصال) ۵۷ درجه سانتی‌گراد و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تکمیل پلیمریزاسیون انجام و روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز گردید.

همسانه سازی ژن در پلاسمید pTZ57R/T

ژن Vp_{28} حاوی سایت‌های برشی در طرفین با آنزیم‌های مرتبط هضم و تخلیص گردید و نهایتا با آنزیم T4DNA ligase شرکت فرمنتاز (Fermentas) در وکتور pTZ57R/T بر اساس پروتکل شرکت سازنده کلون و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز گرما گذاری انجام گردید. انتقال ژن به وکتور pTZ57R/T به علت داشتن یک مخزن برای تکثیر ژن VP_{28} و بررسی کارکرد صحیح جایگاه‌های آنزیم‌های برشی طراحی‌شده بر آغازگرها انجام شد. سپس وکتور نوترکیب شده به باکتری DH5α مستعد شده به روش شوک حرارتی منتقل شد. جهت تأیید انتقال وکتور نوترکیب به باکتری، از کلنی‌های سفید رشد کرده آزمایش PCR صورت گرفت.

ساخت سازه‌ی پلاسمیدی به منظور انتقال ژن Vp28 به میکروجلبکChlorella vulgaris

ژن Vp28 ابتدا از روی وکتور pTZ57R/T تکثیر شده در باکتری DH5α با استفاده از آنزیم‌های برشی منطبق، به پلاسمید pBI121 انتقال داده شد و سپس ژن مورد نظر به همراه پروموتور (آغاز گر) و ترمیناتور (پایان دهنده) موجود در پلاسمید pBI121 به جایگاه کلون پلاسمید pCAMBIA1304 انتقال داده شد. برای هضم آنزیمی محصولات PCR (خالص شده از روی ژل) و ناقل pBI121 از آنزیم‌های برشی BamH1 و Sac1 (FastDigest شرکت فرمنتاز) استفاده ومطابق دستوالعمل و بعد از ورتکس کوتاه، مخلوط واکنش در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه آنکوبه شد. در پایان، واکنش در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد.

مراحل واکنش اتصال (Ligation)

مخلوط اتصال بر اساس جدول ۱ تهیه و عمل اتصال در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انجام شد و محصول به مدت یک شب در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. محصول اتصال با روش شوک حرارتی (Sambrook *et al.*, 1989) به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α منتقل و در محیط مناسب و حاوی کانامایسین کشت داده شد. برای تأیید مولکولی نوترکیب بودن باکتری، Colony PCR و واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Sac*I صورت گرفت.

جدول ۱: واکنش اتصال قطعه Vp28 به ناقل pBI121
Table 1: Ligation reaction of Vp28 fragment into pBI121 vector

حجم	اجزای واکنش
۶µl	ناقل
۷µl	محصول هضم آنزیمی PCR
۳ µl	بافر اتصال (×۱۰)
۰/۵ µl	ATP
۱۲/۵ µl	ddH_2O
۱µl	DNA T4 لیگاز (۲u/µl)
۳۰ µl	حجم کل

انتقال سازه pBI121 دارای ژن Vp28 به پلاسمید pCAMBIA1304

برای انتقال قسمتی از پلاسمید pBI121 حاوی ژن Vp28 به پلاسمید pCAMBIA1304 ابتدا هر دو پلاسمید با دو آنزیم HindIII و EcoRI و مطابق جدول ۲

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]

و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برش داده شد. محصول واکنش الکتروفورز و سپس پلاسمید برش خورده pCAMBIA1304 و قطعه pBI121 حاوی ژن Vp28 متصل به پروموتور (آغاز گر) CaMV 35S از روی ژل جداسازی و تخلیص گردید. قطعات تخلیص شده از ژل مطابق جدول ۳ و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت به همدیگر اتصال داده شد. محصول اتصال جهت انتقال به سلول‌های میکروجلبک کلرلاولگاریس استفاده شد. پلاسمید نوترکیب به دو صورت حلقوی و خطی جهت انتقال به میکروجلبک آماده گردید.

جدول ۲: ترکیب و مقدار واکنشگرها برای هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 دارای ژن Vp28 و پلاسمید pCAMBIA1304

Table 2: Composition and reagents for enzymatic digestion of plasmid pBI121 bearing Vp28 gene and plasmid pCAMBIA1304

حجم	اجزای واکنش
۶ µl	پلاسمید pBI121 دارای ژن Vp28 یا پلاسمید pCAMBIA1304
۲µl	بافر آنزیم برشی (×۱۰)
۱µl	آنزیم *Hin dIII*
۱µl	آنزیم *Eco RI*
تا حجم۱۰µl	ddH_2O

جدول ۳: واکنش اتصال قطعه Vp28 به ناقل pCAMBIA1304

Table 3: Ligation reaction of Vp28 fragment into pCAMBIA1304 vector

حجم	اجزای واکنش
۶µl	پلاسمید pCAMBIA1304
۷µl	قطعه ژن به همراه پروموتور و ترمیناتور
۲ µl	بافر اتصال (×۱۰)
۰/۵ µl	ATP
تا حجم۳/۵ µl	ddH_2O
۱µl	DNA T4 لیگاز (۲u/µl)
۲۰ µl	حجم کل

آماده سازی میکرو جلبک برای انتقال ژن با روش تراواسازی الکتریکی

در این تحقیق از میکرو جلبک *Chlorella vulgaris* به عنوان میکروجلبک یوکاریوتی در محیط کشت مایع و جامد زاروک (Zarrouk`s medium) استفاده شد (Borowitzka, 1999). رشد جلبک کلرلا در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با شدت نور ۸۲۰۰ لوکس (۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی) و با تکان ۲۰۰ دور در دقیقه به شرح ذیل انجام گرفت:

۱. نمونه میکرو جلبک‌ها با دور ۴۵۰۰g در ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.
۲. محلول رویی دور ریخته شده و بر رسوب حاصل ۴۰ میلی‌لیتر آب استریل ریخته شد.
۳. نمونه مطابق مرحله ۱ سانتریفیوژ شد.
۴. مرحله شستشو ۲ بار انجام شد تا کلیه نمک‌ها حذف شود و در عملکرد دستگاه الکترپوریت اختلال ایجاد نکند. نمونه‌ها به همراه پلاسمیدهای خطی و حلقوی در کووت‌های الکترپوریت ریخته شد. نمونه‌ها شامل: ۸۰۰ میکرو لیتر کلرلا + ۲ میکرو لیتر پلاسمید حلقوی و ۸۰۰ میکرو لیتر کلرلا + ۲۰ میکرو لیتر پلاسمید خطی اماده بود و با ولتاژ حدود ۱۷۱۰ به مدت ۴ ثانیه الکتروپورت شد.
۵. نمونه‌ها بعد از تراواسازی الکتریکی روی یخ قرار داده شدند.
۶. از هر نمونه مقدار ۲۷۰ میکرو لیتر به داخل ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت زاروک مایع انتقال داده شد (از هر نمونه ۳ تکرار، کل نمونه‌ها ۱۲ نمونه).
۷. نمونه‌ها طبق شرایط رشد میکرو جلبک به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.

انتخاب و رشد میکرو جلبک‌های ترنسفورم شده

میکرو جلبک *Chlorella vulgaris* بعد از تراواسازی الکتریکی در محیط کشت زاروک و شرایط رشدی مذکور حاوی آنتی بیوتیک هاگرومایسین[1] انتقال داده شد. DNA نمونه‌های کلرلا و طبق روش ذکرشده استخراج

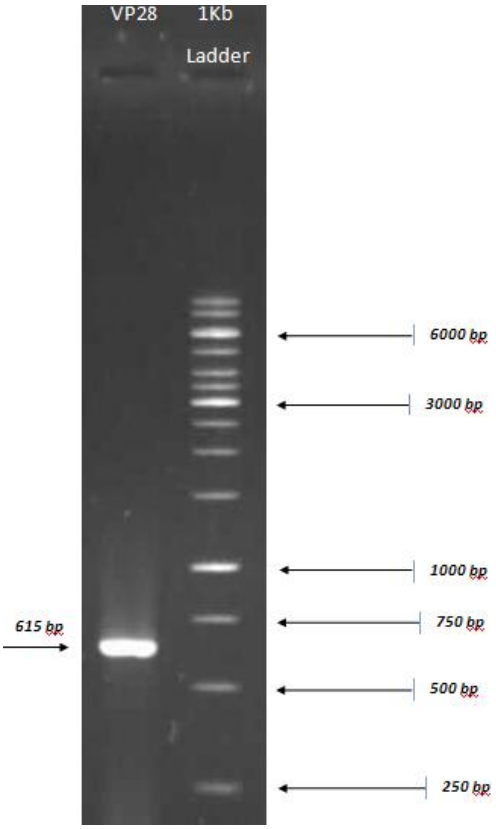
[1] Hygromycin

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]

گردید و به وسیله PCR صحت تراریخته شدن نمونه‌ها اثبات شد.

نتایج

تکثیر ژن کد کننده VP28 بوسیله PCR و پرایمر های اختصاصی انجام و طول ژن حدود ۶۱۵bp روی ژل آگارز نشان داده شده است (شکل ۱).



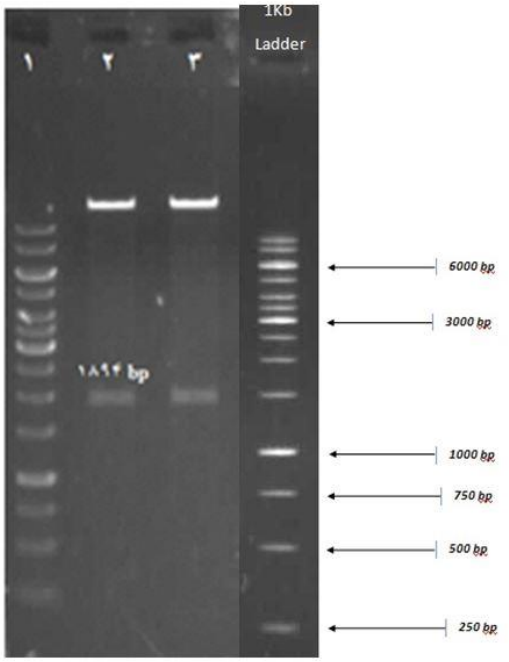
شکل ۱: تکثیر ژن Vp28 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱/۲ درصد و لدر 1kb

Figure 1: Amplification of Vp28 gene using specific primers on 1.2% agarose gel,Ladder 1kb

ساخت پلاسمید pBI121 نوترکیب حاوی ژن Vp28

با هضم پلاسمید pBI121 با دو آنزیم برشی SacI و BamHI قطعه مربوط به ژن GUS (bp۱۸۹۴) حذف گردید (شکل ۲).

سپس قطعه ژن Vp_{28} هضم شده با دو آنزیم SacIو BamHI به درون پلاسمید pBI121 منتقل و برای تایید انتقال ژن به پلاسمید از کلونی‌های مقاوم رشد کرده Colony PCR و هضم آنزیمی برای مشاهده ژن Vp_{28} به همراه پروموتور و ترمیناتورصورت گرفت. با توجه به شکل ۳ در Colony PCR قطعه ۶۱۵ bp ژن مورد نظر مشاهده و تأیید شد.



شکل ۲: هضم پلاسمید pBI121 به منظور خروج ژن GUS و توالی همراه آن بین دو آنزیم SacI و BamHI به طول bp ۱۸۹۴. چاهک‌های ۲ و ۳- هضم پلاسمید pBI121 به منظور خروج ژن GUS و توالی همراه آن بین دو آنزیم SacI و BamHI به طول bp ۱۸۹۴، چاهک ۱ -1Kbp DNA Ladder

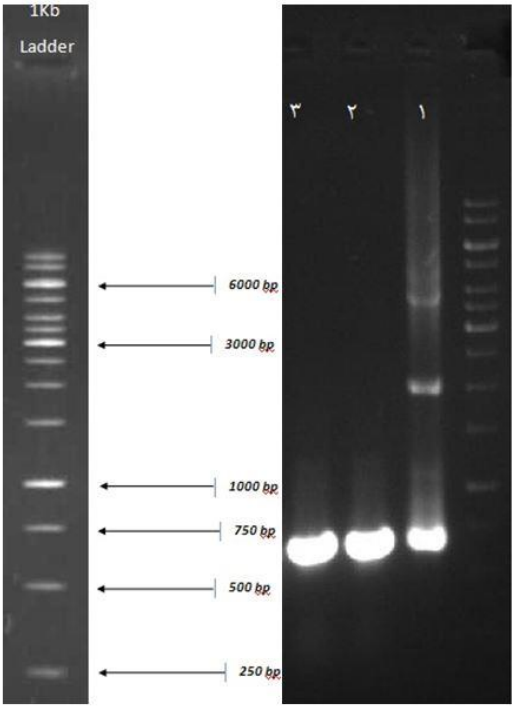
Figure 2: Digestion of plasmid pBI121 , removing the GUS gene and its accompanying sequence between two enzymes SacI and BamHI with a length of 1894 bp; LaneS 2 and 3 digestion of pBI121 plasmid , extracting the GUS gene and its accompanying sequence between two enzymes SacI and BamHI with a length of 1894 bp, Lane 1 DNA Ladder 1Kbp

هضم آنزیمی قطعه ژنی Vp28 داخل pBI121 به همراه پروموتور و ترمیناتور ۳۵S

جهت تایید وجود قطعه ژن در پلاسمید pBI121، هضم آنزیمی با آنزیم‌های Hin dIII و Eco RI صورت گرفت. قطعه ژن Vp_{28} به همراه پروموتور ۳۵S و ترمیناتور از پلاسمید pBI121 به اندازه ۱۵۲۴bp جدا و بر ژل اگاروز مشاهده گردید (شکل ۴).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]

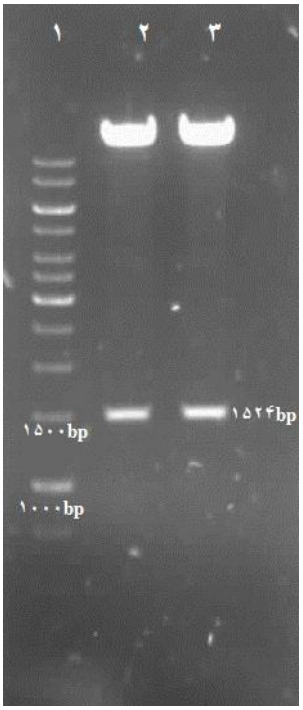


شکل ۳: PCR Colony از باکتری‌های ترنسفورم شده حاوی پلاسمید pBI121 دارای ژن Vp28 به طول bp ۶۱۵. چاهک ۱- کنترل مثبت، چاهک‌های ۲ و ۳- کلنی مثبت داری ژن Vp28. (DNA Ladder,1Kbp شرکت fermentase)

Figure 3: Colony PCR of transformed bacteria containing plasmid pBI121 bearing Vp28 gene with a length of 615 bp, Lane 1 positive control, Lanes 2 and 3 positive colony containing Vp28 gene. (DNA Ladder 1Kbp, Fermentase Company)

تأیید کلونی‌های نوترکیب از پلاسمید pCAMBIA1304 دارای ژن Vp28

قطعه ژن Vp28 به همراه پروموتور و ترمیناتور خارج شده از پلاسمید pBI121 به درون پلاسمید pCAMBIA1304 منتقل گردید و برای آزمون صحت انتقال ژن به پلاسمید از کلونی‌های مقاوم رشد کرده به روش Colony PCR از ژن Vp_{28} و هضم با آنزیم‌های برشی برای مشاهده ژن Vp_{28} به همراه پروموتور و ترمیناتورت است؛ شدند. در نتیجه Colony PCR قطعه bp ۶۱۵ مربوط به ژن VP_{28}تکثیر وهمچنین در روش هضم آنزیمی با آنزیم‌های Hin dIII و Eco RI، ژن Vp_{28} به همراه پروموتور و ترمیناتور به طول bp ۱۵۲۴ جدا و بر ژل آگارز مشاهده شد (شکل‌های ۵ و ۶).



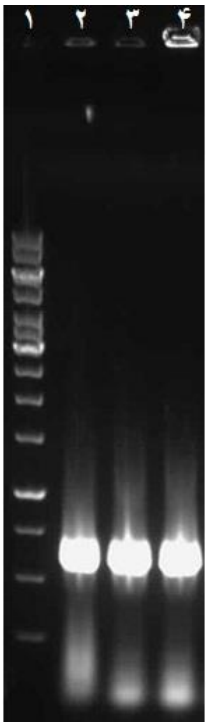
شکل ۴: هضم آنزیمی قطعه ژنی Vp28 داخل pBI121 به همراه پروموتور و ترمیناتور ۳۵S. چاهک‌های ۲ و ۳- هضم آنزیمی قطعه ژنی Vp28 داخل pBI121 به همراه پروموتور و ترمیناتور ۳۵S و مشاهده قطعه bp ۱۵۲۴، چاهک ۱- DNA Ladder 1Kbp

Figure 4: Enzymatic digestion of Vp28 gene fragment inside pBI121 along with S35 promoter and terminator; Lanes 2 and 3 Enzymatic digestion of Vp28 gene fragment inside pBI121 along with S35 promoter and terminator and observation of 1524 bp fragment. Lane 1 DNA Ladder 1Kbp

PCR ژن GUS و Hygromycin از DNA استخراج‌شده میکروجلبک‌های تراریخت

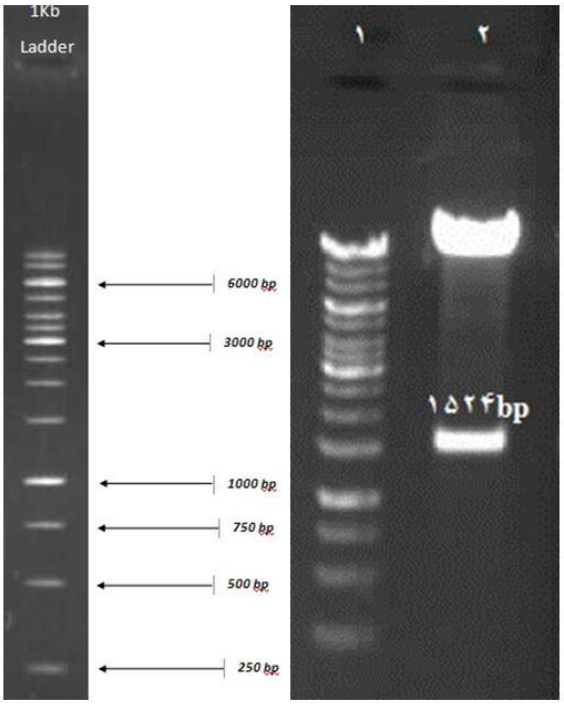
استخراج DNA از میکروجلبک‌های نوترکیب یا تراریخت به‌وسیله پلاسمید pCAMBIA1304 که دارای ژن Vp_{28}، ژن GUS و Hygromycin در داخل این پلاسمید می‌باشد، انجام شد. شکل ۷ نشان می‌دهد که PCR با ژن GUS و Hygromycin از DNA استخراج شده از کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*) تراریخت شده به‌وسیله تراواسازی الکتریکی با پلاسمید حلقوی نشان‌دهنده وجود ژن GUS و Hygromycin در نمونه‌های تراریخت می‌باشد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]



شکل ۵: Colony PCR از باکتری‌های ترنسفورم شده حاوی پلاسمید pCAMBIA1304 دارای ژن Vp28 به طول bp ۶۱۵. چاهک‌های ۲، ۳ و ۴- کلنی مثبت داری ژن Vp28، چاهک ۱- DNA Ladder1Kbp

Figure 5: Colony PCR from transformed bacteria containing plasmid pCAMBIA1304 bearing Vp28 gene with 615 bp length; Lanes 2, 3 and 4 Vp28 gene positive colony, Lane 1 DNA Ladder 1Kbp



شکل ۶: هضم آنزیمی پلاسمید pCAMBIA1304 با آنزیم‌های Hin dIII و Eco RI. چاهک ۲- هضم آنزیمی قطعه ژنی Vp28 داخل pCAMBIA1304 به همراه پروموتور و ترمیناتور ۳۵S و مشاهده قطعه bp ۱۵۲۴، چاهک ۱- DNA Ladder 1Kbp

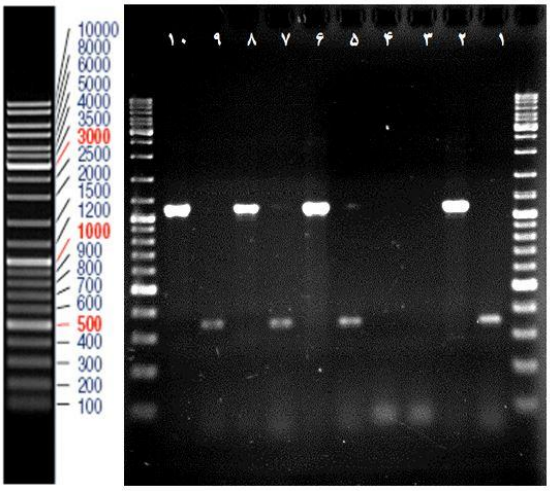
Figure 6: Enzymatic digestion of plasmid pCAMBIA1304 using Hind III and EcoRI enzymes; Lane 2 digestion of Vp28 gene fragment(1524bp) inside pCAMBIA1304 along with S35 promoter and terminator, Lane 1 DNA Ladder 1Kbp

بررسی و تأیید میکروجلبک‌های تراریخت با RT-PCR

میکروجلبک‌های بالقوه تراریخت انتخاب شده در مرحله قبل با روش‌های مولکولی مورد مطالعه قرار گرفته و ادغام ژن انتقالی مربوطه در ژنوم میکروجلبک تأیید گردید. پس از ساخت cDNA، واکنش RT- PCR برای تأیید حضور قطعات ژنی Vp28 درمیکروجلبک‌های بالقوه تراریخت، با آغازگر تخصصی ژن Vp28، انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که میکروجلبک‌های تراریخت مورد مطالعه دارای باند مربوط به ژن Vp_{28} بودند. در شکل ۸ RT- PCR *Chlorella vulgaris* تراریخت شده به‌وسیله تراواسازی الکتریکی با پلاسمید خطی و حلقوی نشان دهنده وجود ژن Vp_{28} در نمونه‌های تراریخت به‌جز نمونه *Chlorella vulgaris* تراریخت شده به‌وسیله تراواسازی الکتریکی با پلاسمید خطی می‌باشد.

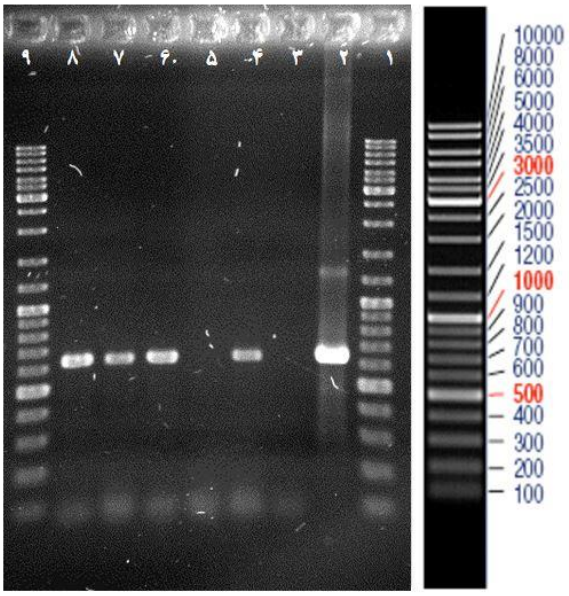
[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]



شکل ۷: PCR ژن GUS و Hygromycin از DNA استخراج‌شده میکروجلبک‌های تراریخت. چاهک ۱- کنترل مثبت ژن Hygromycin از پلاسمید pCAMBIA1304 ، چاهک ۲- کنترل مثبت ژن GUS از پلاسمید pCAMBIA1304، چاهک ۳-کنترل منفی ژن Hygromycin از نمونه کلرلا شاهد، چاهک ۴- کنترل منفی ژن GUS از نمونه کلرلا شاهد، چاهک‌های ۵، ۷ و ۹- Hygromycin از نمونه کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*) تراریخت شده با تراواسازی الکتریکی با پلاسمید حلقوی، چاهک‌های ۶، ۱۰ و ۸- GUS از نمونه کلرلا ولگاریس تراریخت شده با تراواسازی الکتریکی ، DNA Ladder Mix بر ژل آگارز ۱/۲ درصد

Figure 7: PCR of GUS and Hygromycin gene from extracted DNA of transgenic microalgae; Lane 1 Positive control of Hygromycin gene from plasmid pCAMBIA1304, Lane 2 Positive control of GUS gene from plasmid pCAMBIA1304, Lane 3 Negative control of Hygromycin gene from control sampl, Lane 4 Negative control of GUS gene from control sample, Lanes 5,7, and 9 Hygromycin from sample of Chlorella vulgaris transformed by electroporation, Lanes 6,10, and 8 GUS circular plasmid from Chlorella vulgaris sample transformed by electroporation, DNA Ladder Mix on 1.2% agarose gel



شکل ۸: RT-PCR ژن Vp28 از cDNA سنتز شده از میکروجلبک‌های تراریخت. چاهک ۲- کنترل مثبت ژن Vp28، چاهک ۳- کنترل منفی نمونه شاهد، چاهک ۴-کلرلا تراریخت به‌وسیله تراواسازی الکتریکی با پلاسمید حلقوی، چاهک ۵- کلرلا تراریخت با تراواسازی الکتریکی با پلاسمید خطی (نشان‌دهنده عدم وجود ژن مربوطه)، چاهک‌های ۷، ۸ و ۶- کلرلا تراریخت با تراواسازی الکتریکی با پلاسمید حلقوی، چاهک‌های ۱ و ۹- DNA Ladder Mix بر ژل ۱/۲ درصد اگارز

Figure 8: RT-PCR of Vp28 gene from cDNA synthesized from transgenic microalgae; Lane 2 Positive control of Vp28 gene, Lane 3 Negative control of the control sample, Lane 4 Chlorella transformed by electroporation with circular plasmid 5 Chlorella transformed by electroporation with linear plasmid (indicating the absence of the relevant gene); Lnaes 7, 8 and 6 Chlorella transformed by electroporation with circular plasmid; Lane 1 and 9 DNA Ladder Mix on 1.2% agarose gel

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]

بحث

تولید فرآورده‌های مختلف از ویروس‌های بیماری‌زا خطر انتقال و انتشار ویروس در محیط، و آلوده شدن محصولات تولیدی را به‌دنبال دارد. بنابراین، امروزه برای تولید فرآورده‌هایی از این ویروس‌ها بیشتر از روش‌های زیست‌فناوری استفاده می‌گردد. به همین منظور در سال‌های اخیر تلاش برای جداسازی، بیان ژن‌های مختلف این ویروس و تخلیص این پروتئین‌ها آغاز شد. اقدامات مهم و اساسی در این زمینه صورت گرفت و توالی‌های متفاوتی از این ژن تکثیر و بررسی شده است. تمامی این تلاش‌ها مبنی بر بیان این پروتئین و بررسی در خصوص آنتی ژنیسیته (خاصیت آنتی ژنی) آن، نشان‌دهنده یکسان و مشترک بودن نتایج حاصل از تحقیقات بوده و بیانگر بالا بودن آنتی ژنیسیته پروتئین حاصل از بیان ژن Vp_{28} می‌باشد (Kiataramgul *et al*., 2020).

در تحقیق حاضر ژن Vp_{28} با منشأ ویروسی انتخاب گردید. به منظور بررسی امکان ایجاد مقاومت در جلبک در اثر بیان ژن Vp_{28}، ناحیه کدکننده این ژن تحت کنترل پروموتر 35S به میکروجلبک *C. vulgaris* که خود یکی از میزبان‌های مناسب برای مهندسی و انتقال ژن می‌باشد، منتقل شد (Yang *et al*., 2016). جهت تراریخته‌سازی *C. vulgaris* از وکتور (حامل) دوتایی pCAMBIA1304 واجد توالی ژنی *Vp28* استفاده شد.

این فرضیه که این پروتئین‌ها می توانند آنتی‌ژن مناسبی جهت تشخیص ملکولی باشند یا به صورت نوترکیب در ساخت واکسن برای جلوگیری از بیماری لکه سفید ایجاد شده به‌وسیله گونه‌های مختلف این ویروس به‌کار بروند، اهمیت بررسی در این زمینه را آشکار نموده است Chaisvisuthangkura و همکاران (۲۰۰۴)، Namikoshi و همکاران (۲۰۰۴)، Makesh و همکاران (۲۰۰۶)، Caipang و Fagutao (۲۰۱۳) و van Hulten و همکاران (۲۰۰۱) از بین ۱۸۱ ORF غیرهمپوشان، ۵ ژن مهم (Vp_{15}, Vp_{19}, Vp_{24}, Vp_{26}, Vp_{28}) دخیل در ایجاد بیماری به‌وسیله ویروس را شناسایی کردند. در تحقیقات بعدی ژن Vp_{28} به عنوان مهم‌ترین ژن در فرآیند بیماری‌زایی بیماری لکه سفید میگو معرفی گردید. Yi و همکاران (۲۰۰۴) و Tang و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که ژن Vp28 دارای خاصیت آنتی ژنسیتیکی بالایی در بیماری لکه سفید است.

Jha و همکاران (۲۰۰۶) و Witteveldt و همکاران (۲۰۰۶) توانستند ژن Vp_{28} را در باکتری *E. coli* بیان کنند. Du و همکاران (۲۰۰۶) توانستند این ژن را در سلول‌های حشرات بیان کنند. Jha و همکاران (۲۰۰۷) توانستند ژن Vp_{28} را در سلول‌های مخمر بیان کنند. پروتئین‌های بیان شده در سیستم‌های پروکاریوت و یوکاریوت تفاوت ساختاری و عملکردی نشان نمی‌داد. این بیانگر نداشتن پیوندهای گلیکوزیدی و نبودن تغییرات پس از ترجمه زیاد در پروتئین‌های بیان شده از ژن Vp_{28} می‌باشد. Witteveldt و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند مقدار پروتئین مورد نیاز برای تحریک سیستم ایمنی میگو به عنوان واکسن ۴ میکروگرم از این پروتئین در یک میگوی بالغ می باشد و نتایج این بررسی نشان داد پس از استفاده از واکسن قبل از شروع بیماری، ۶۵ درصد و در ۲ روز اول آلودگی باعث جلوگیری از ۳۳ درصد تلفات می‌شود. Du و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند استفاده از پروتئین بیان شده از *E. coli* و سلول‌های حشرات به عنوان واکسن، اثرات معنی‌داری در جلوگیری از بیماری لکه سفید میگو دارد.

اخیراً نیز تحقیقات زیادی انجام شده است که نشان می‌دهند، همچنان پروتیِئن نوترکیب Vp_{28} می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های کنترلی و موثر در مهار ویروس WSS استفاده گردد (Taengchaiyaphum *et al*., 2017; Dyo and Purton, 2018, Ma *et al*., 2020). نویسنده امیدوار است در آینده نزدیک با استفاده از ساختار ژنتیکی حاوی ژن vp_{28} حاصل در این تحقیق، بتواند در آزمایش‌های تکمیلی *in-vivo* نقش موثری در کنترل بیماری لکه سفید ایفاء نماید.

در این پژوهش ژن کد کننده VP_{28} ویروس عامل لکه سفید میگو، به طور کامل در میکرو جلبک *C. vulgaris* منتقل شد و با توجه به میزان گلایکوزیلیش (گلیکوزلاسیون) پایین ژن، احتمالاً این جلبک نوترکیب می‌تواند کاندیدای مناسبی برای بیان و ایجاد مصونیت علیه ویروس لکه سفید در میگو به صورت خوراکی باشد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]

منابع

Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70, 313-321. DOI: 10.1016/S0168-1656(99)00083-8

Caipong, C.M.A. and Fagutao. F., 2013. Transcriptional upregulation of fortilin in shrimp, *Penaeus* (*Metapenaeus*) *japonicus* fed diets containing recombinant VP28, an antigenic protein of white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation. *International Journal of the Bioflux Society*, 6(4):345-351. http://www.bioflux.com.ro/aacl

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcao, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P. and Pinto, E., 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology part C Toxicology and Pharmacology*, 146, 60-78.DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007

Chaisvisuthangkura, P., Tangkhabuanbutra, J., Longyant, S., Sithigorngul, W., Rukpratanporn, S., Menasveta, P. and Sithigorngul, P., 2004. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. *ScienceAsia*, 30(4).359-363. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2004.30.359

Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi, R. J., Nouri, H. and Golzary, A., 2017. Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *Global Journal of Inviromental Science and Management*, 2(10),217-230. DOI: 10.22034/gjesm.2017.03.02.010

Du, H., Xu, Z., Wu, X., Li, W. and Dai, W., 2006. Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus. *Aquaculture*, 260, 39-43. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.032.

Dyo, Y. M. and Purton, S. 2018. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology (Reading)*, 164, 113-121.DOI: 10.1099/mic.0.000599.

YI, G.Z.W., Yipeng, Q.I., Lunguang, Y., Juan, Q. and Longbo, H., 2004. Vp28 of Shrimp White Spot Syndrome Virus Is Involved in the Attachment and Penetration into Shrimp Cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 726-734. DOI: 10.5483/bmbrep.2004.37.6.726.

Jha, R.K., Xu, Z.R., Shen, J., Bai, S.J., Sun, J.Y. and Li, W.F., 2006. The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in Procambarusclarkii. *Immunology Letters*, 105(1), 68-76. DOI: 10.1016/j.imlet.2006.01.004.

Kiataramgul, A., Maneenin, S., Purton, S., Areechon, N., Hirono, I., Brocklehurst, T.W. and Unalak, S., 2020. An oral delivery system for controlling white spot syndrome virus infection in shrimp using transgenic microalgae. *Aquaculture*, 521, 735022. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735022

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]

Ma, K., Bao, Q., Wu, Y., Chen, S., Zhao, S., Wu, H. and Fan, J., 2020. Evaluation of microalgae as immunostimulants and recombinant vaccines for diseases prevention and control in aquaculture. *Frontiers Bioengeenering Biotechnology*, 8, 590431. DOI: 10.3389/fbioe.2020.590431

Makesh, M., Koteeswaran, A., Chandran, N.D.J., Murali M.B. and Ramasamy, V., 2006. Development of monoclonal antibodies against VP28 of WSSV and its application to detect WSSV using immunocomb. *Aquaculture*, 261, 64-71. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.08.034

Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M. and Muroga, K. 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 229, 25-35. DOI: 10.1016/s0044-8486(03)00363-6

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, ISBN 0879693096, 267, 9289-9293.

Soltani, N., Khavari-nejad, R.A., Yazdi, M.T., Shokravi, S. and Fernandez-valiente, E., 2006. Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium Fischerellaambigua strain FS18 under different irradiance and pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 571-576.DOI: 10.1007/s11274-005-9073-5

Taengchiyaphum, S., Nakayama, H., Srisala, J., Khiev, R., Aldama-cano, D. J., Thitamadee, S. and Sritunyalucksana, K., 2017. Vaccination with multimeric recombinant VP28 induces high protection against white spot syndrome virus in shrimp. *Developmental and Comparative Immunology*, 76, 56-64.DOI:10.1016/j.dci.2017.05.016

Tang, X., Wu, J., Sivaraman, J. and Hew, C. L., 2007. Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. *Journal of Virology*, 81(12), 6709-17. DOI: 10.1128/JVI.02505-06

Van Hulten, M. C., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R. K. and Vlak, J. M., 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286(1), 7-22. DOI: 10.1006/viro.2001.1002

Witteveldt, J., Vlak, J. M. and van Hulten, M.C., 2006. Increased tolerance of Litopenaeusvannamei to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. *Disease of Aquatic Organisms*, 70(1-2), 167-70. DOI: 10.3354/dao070167

Yang, B., Liu, J., Jiang, Y. and Chen, F., 2016. *Chlorella* species as hosts for genetic engineering and expression of heterologous proteins: Progress, challenge and perspective. *Biotechnology Journal*, 11, 1244-1261.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]

Isolation, replication and transmission of VP28 gene of shrimp white spot virus into Chlorella vulgaris microalgae using electroporation

Hosseini S.D.[1]*; Hosseini M.S. [2]; Rezai S.M. [3]

*hosseinida@yahoo.com

1-Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural, Research Education and Extension Organization (AREEO), Arak, Iran
2-Alzahra University, Tehran, Iran
3-Sari University, Mazandaran, Iran

Abstract

White spot disease (WSD) is one of the most important diseases in shrimp farming, which has caused a decrease in production and severe economic damage all over the world, including Iran. Mortality caused by this severe disease is very high and reaches 100% within 3 to 10 days from the onset of the disease. According to global statistics, about 300,000 tons of shrimp are lost due to this disease every year in the world. For example, within the years 2004, 2006, 2007, 2015, 2016 and 2019, the outbreak of this disease caused millions of dollar losses to the producers in Iran. Since the VP28 viral protein gene is one of the most important white spot disease virus envelope proteins and plays a role in sticking to and penetrating shrimp cells, and since microalgae is the most important source of food for shrimp in the larval stage, So it can be a suitable host for making a vaccine. So in this study, samples of shrimp (*Penaeus indicus*) suspected of white spot disease from Abadan (Khuzestan province) breeding ponds were transferred to the laboratory of Razi Vaccine and Serum Institute of Arak branch and the genomic DNA of the virus was extracted using proteinase K and phenol/chloroform methods. The VP28 gene was proliferated by PCR method, inserted into pCAMBIA1304 vector and finally transferred to *Chlorella vulgaris* microalgae using electroporation method.

Keywords: VP28, white spot, Microalgae, Chlorella vulgaris, Electroporation

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.1.7]