14(1) 441-450, Spring 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Use of *Lactococcus*- expression system as oral recombinant vaccines as a new strategy

Asma Mohammadi [1], Mohammad Afsharnasab [1*], Hamid Kohram [2], Khosrow Aghayipour [3], Abasali Motalebi Moghanchoghi [4]

[1] *Department of Health, Aquatic Animal Health and Disease, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran*
[3] *Department of Genomics and Genetic Engineering, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran*
[4] *Department of Food Hygiene, Science and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

Key Words

Recombinant live vector vaccine
Lactococcus lactis
Fish

Abstract

Introduction: Infectious pancreatic necrosis (IPN) is a significant viral disease in the aquaculture industry that sometimes leads to widespread mortality in fish despite the lack of clinical signs, so the use of prevention methods including Vaccination is very important in this disease.

Materials & Methods: In this study, the DNA template and template used to amplify the VP2 gene of PCR product from an Iranian IPNV isolate (IR-IPNV). NZ9000 *L. lactis* strain was also used as host for cloning and as host for expression.

Results: The results showed that cloning and gene expression were well done and after the use of *lactobacillus* containing genes in the patient's fishes, it increased the antibody level and the viral infection decreased significantly ($P<0.05$). In this study, for the first time, *L. lactis* has been used to clone a candidate gene from an infectious pathogen of fish for the production of recombinant live vaccine.

Conclusion: It seems that this expression system can be used to deliver an oral vaccine, Potential is considered as a new platform for the development of oral vaccines in fish.

* Corresponding Author's email: mafsharnasab@yahoo.com
Received: 7 February 2021; Reviewed: 12 March 2021; Revised: 13 May 2021; Accepted: 19 June 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.280194.2496

مقاله پژوهشی

استفاده از روش‌های جدید برای به ثمر رساندن اثرات لاکتوباسیل‌ها به‌عنوان نسل جدید واکسن‌ها در صنعت آبزی‌پروری

اسماء محمدی[۱]، محمد افشارنسب[۱*]، حمید کهرام[۲]، خسرو آقایی‌پور کلیانی[۳]، عباسعلی مطلبی‌مغانچوقی[٤]

[۱] گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۳] گروه ژنتیک و مهندسی ژنتیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[٤] گروه بهداشت و موادغذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

لاکتوباسیلوس
واکسن نسل جدید
آبزیان

چکیده

مقدمه: بیماری نکروز عفونی پانکراس (IPN) یک بیماری ویروسی قابل توجه در صنعت آبزی‌پروری است که گاهاً با وجود عدم مشاهده علایم بالینی منجر به ایجاد تلفات گسترده‌ای در ماهی می‌گردد، فلذا استفاده از روش‌های پیشگیری از جمله واکسیناسیون در این بیماری اهمیت بسیاری می‌یابد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه قالب و الگوی DNA مورد استفاده برای تکثیر ژن VP2 محصول PCR، یک ایزوله ایرانی IPNV (IR-IPNV) بود و از *Lactococcus lactis* NZ9000 به‌عنوان میزبان کلونینگ و بیان ژن استفاده گردید.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار سطح آنتی‌بادی‌ها و علایم بیماری در نتیجه مصرف لاکتوباسیلوس لاکتیس حاوی ژن در ماهی‌های بیمار بود ($P<۰/۰۵$). در این مطالعه برای نخستین‌بار جهت‌تولید واکسن‌نسل جدیدنوترکیب ازباکتری لاکتوباسیلوس لاکتیس برای کلون کردن ژن کاندید از پاتوژن عفونی در ماهی استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد می‌توان از این سیستم بیانی به‌عنوان یک پلتفرم جدید جهت توسعه واکسن‌های خوراکی در ماهی استفاده نمود که در صنعت آبزی پروری بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mafsharnasab@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۹ بهمن ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۲۲ اسفند ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲۳ اردیبهشت ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش ۲۹ خرداد ۱٤۰۰

(DOI): 10.22034/AEJ.2021.280194.2496

مقدمه

نکروز عفونی پانکراس (IPN) از جمله شایع‌ترین بیماری‌های ویروسی آزادماهیان در سطح جهان است (۱). این ویروس در تعدادی از گونه‌های آزادماهیان، به‌ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان و قزل‌آلای جویباری، به‌خوبی شناخته شده است. دوره کمون این بیماری در شرایط مساعد کوتاه بوده و بین ۵-۳ روز می‌باشد. اولین علائم ظهور IPN با در هچری قزل‌آلای رنگین‌کمان عبارت‌است از افزایش تلفات ناگهانی در بین نوزادان و ماهیان انگشت‌قد، که در این‌جا ماهیان بزرگ‌تر و با ظاهر سالم زودتر تلف می‌شوند (۲). پراکنش ویروس IPN در اروپا (۳) به‌خصوص در نروژ و جزایر شیتلند اسکاتلند (۴، ۵، ۶، ۷)، آمریکای شمالی (۸، ۹، ۱۰، ۱۱)، آمریکای جنوبی (۱۲، ۱۳، ۱۴)، استرالیا (۱۵، ۱۶، ۱۷) و برخی کشورهای آسیایی ازجمله ایران (۱۸، ۱۹، ۲۰) گزارش شده است. تلفات گسترده ناشی از این ویروس به گونه‌ای است که در سال ۲۰۱۶، طی یک شیوع گسترده در استخرهای پرورش بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در چین، این ویروس منجر به مرگ و میر حدود ۱۰۰درصد از ماهیان شد (۲۱). به این ترتیب، این بیماری به‌دلیل شیوع جهانی و ایجاد خسارات اقتصادی چشمگیر، باعث ایجاد محدودیت‌هایی در توسعه صنعت تکثیر و پرورش آبزیان آب‌شیرین می‌گردد (۲۲). عامل اتیولوژیک این بیماری، ویروس IPN (IPNV) متعلق به خانواده Birnaviridae و جنس *Aquabirnavirus* است (۲۳). این ویروس در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه مقاوم است، در محیط آزمایشگاه و مجاورت هوا به‌مدت ۵ هفته می‌تواند زنده بماند و در دمای ۴ تا ۱۰ درجه‌سانتی‌گراد فعالیت ویروس بعد از ۱۰ هفته قرارگیری کمی کاهش می‌یابد (۲۴) که حاوی یک ژنوم دو قطعه‌ای (A-B) و RNA دو رشته‌ای (dsRNA) می‌باشد (۲۵). قطعه بزرگ‌تر در ژنوم این رویروس، قطعه A با طول تقریبی ۳/۱ کیلوباز و دارای قالب‌های خواندن باز (ORF) بوده که ORF کوتاه با انتهای آمینی ORF بلند هم‌پوشانی داشته و تولید یک پلی‌پپتید غیرساختاری ۱۲-۱۷ کیلودالتون یا همان VP5 را می‌کند (۲۶). در حالی‌که ORF بلندتر یک پروتئین پیش‌ساز ۱۰۶ کیلودالتونی (NH2–VP2–VP4 VP3–COOH) را رمزگذاری می‌کند که به‌طور کوترانسلیشنال از طریق یک پروتئاز ویروسی موجود در درون پلی پروتئین، VP4 را به pre-VP2 (۶۲ کیلودالتون) و VP3 (۳۱ کیلودالتون) تقسیم می‌کند. پس از گردایش (Assembly) کپسید، pre-VP2 تولید شده از طریق پروتئازهای سلول میزبان پردازش شده و باعث تولید یک پروتئین کپسید خارجی بالغ VP2 (۵۴ کیلودالتون) می‌گردد (۲۷) که این بخش در حدود ۶۰درصد ویریون را تشکیل می‌دهد (۲۸). پلیمراز RNA متصل به ویریون یک پروتئین VP1 داخلی فرعی رمزگذاری شده توسط قطعه B به طول ۹۴ کیلودالتون (۲۷۷۷ bp) می‌باشد (۲۹). در میان ۵ پروتئین ویروس IPN، پروتئین کپسید VP2 یک آنتی‌ژن اختصاصی است که حاوی اپی‌توپ‌های خنثی‌کننده ویروس IPN بوده و باعث القای آنتی بادی‌های خنثی‌کننده در میزبان می‌شود (۳۰). موثرترین شیوه برای پیشگیری از این بیماری عفونی واکسیناسیون است، فلذا توسعه واکسن‌های مؤثر یکی اولویت مهم در مواجهه با بیماری‌های ویروسی مهم در آبزیان محسوب می‌شود (۳۱). ازجمله واکسن‌های مورد بررسی در برابر IPN، می‌توان به برخی واکسن‌های نوترکیب ازجمله ذرات ریز ویروسی (SVP: Subviral particles) (۳۲، ۳۳، ۳۴)، ذرات شبه ویروس (VLP) (۳۵، ۳۶، ۳۷) و واکسن‌های DNA (۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲) اشاره نمود. مشکل اصلی در استفاده از این واکسن‌ها این است که با توجه به واگیری و تلفات بالا (نزدیک به ۷۰ درصد) این ویروس در استخرهای تفریخ (Hatchery) است (۳۶، ۳۷، ۳۸)، این فرمولاسیون‌های واکسن را نمی‌توان به‌صورت خوراکی و یا به‌روش محلول استفاده کرد، درحالی‌که تجویز خوراکی برای واکسیناسیون اولیه و زود هنگام مناسب‌تر است (۳۹، ۴۰، ۴۱). در سال‌های اخیر نوعی واکسن وکتور زنده نوترکیب مقاوم به ویروس IPN به‌صورت آزمایشی براساس *Lactobacillus casei* (*L. casei*) در چین تولید شد که از طریق تجویز خوراکی قادر به القای پاسخ ایمنی حفاظتی در ماهی‌های کوچک بود (۴۲، ۴۳، ۴۴). در این مطالعه با توجه به آن‌که تاکنون هیچ مطالعه‌ای برروی القای پاسخ‌های ایمنی با تجویز خوراکی محصول حاصل از کلونینگ ژن کاندید ویروس IPN در *L. casei* به منظور بیان محصول پروتئین در ماهی انجام نشده است، درحالی‌که واکسیناسیون خوراکی بچه‌ماهی‌ها با استفاده از یک میکروارگانیسم ایمن و قوی اصلاح‌شده از نظر ژنتیکی (*L. lactis*) نوآوری جالب توجهی در صنعت آبزی‌پروری خواهد بود، در این مطالعه با هدف، القای ژن IPNV VP2 به وکتور بیان pNZ8150 تحت کنترل پروموتور NICE و کلونینگ آن در *L. lactis*، پرداختیم.

مواد و روش‌ها

ایزوله ویروس و سویه باکتری: این آزمون در مجموعه تحقیقاتی رازف انجام شد. قالب و الگوی DNA مورد استفاده در این مطالعه برای تکثیر ژن VP2 محصول ژنی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) (از ATG تا کدون خاتمه، به طول ۱۳۵۰ جفت باز) از یک ایزوله ایرانی ویروس IPN (سویه IRIPNV) اهدا شده توسط دکتر دادار (۱۱) بود که این ایزوله در طی شیوع IPNV طی سال‌های ۲۰۱۲-۲۰۱۰ در استخرهای پرورش ماهی در شمال (مازندران) و غرب (چهارمحال بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد) ایران، از بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین

کمان بیمار جمع‌آوری شده بود. سویه به‌عنوان میزبان کلونینگ و میزبان‌بیان *L. lactis* NZ9000 (MoBiTec GmbH، آلمان) بود. تهیه *L.lactis* باکشت باکتری در محیط حاوی ۱۰ میلی‌لیتر SGLM17B دارای M17 v/v 50% براث (pH=۶/۸، سیگماالدریخ، ایالات متحده) با ۰/۵ درصد w/v گلوکز، ۰/۵ درصد w/v لاکتوز، ۰/۵ مول ساکاروز (۱/۵ درصدآگاربرای پلیت)و انکوباسیون دردمای ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد طی‌شب، به‌دست‌آمد و سپس‌سلول‌هادرگلیسرول ۱۵٪ ذخیره شدند.

طراحی پرایمر و انجام PCR: در وکتور بیان pNZ8150، با توجه به آن‌که پروموتور nisA در مکان *Sca*I برای پیوند و هم‌جوشی ترجمه‌ای، دقیقاً درکدون آغاز (ATG) قرار دارد(MoBiTec GmbH، آلمان)، ژن IPVN VP2 را از چندین مکان کلونینگ (MCS) وکتور بیان pNZ8150، بین مکان‌های محدودکننده *Sca*I (درانتهای '5 پرایمر رفت) و *Spe*I (در انتهای '5 پرایمر برگشت) قرار دادیم. در این مرحله با وجودآن‌که آنزیم محدودکننده *Sca*I تولید یک‌قطعه انتهایی کرده و نیازی به افزودن‌توالی سایت محدودکننده *Sca*I درانتهای '5 پرایمر رفت نیست، *Spe*I ایجاد یک انتهای چسبنده می‌کند و لذا لازم بود توالی سایت محدود کننده *Spe*I در انتهای '5 پرایمر برگشت در نظر گرفته‌شود. از آن‌جایی‌که آنالیزوسترن‌بلات(western blot analysis) با استفاده ازآنتی‌بادی‌آنتی‌هیستیدین (anti-histag) یکی‌ازروش‌های آزمایشی متداول در تأیید بیان پروتئین نوترکیب در میزبان است (۴۵)، توالی ۶-histag در انتهای '5 پرایمر برگشت (دقیقاً قبل از کدوم خاتمه بر روی رشته سنس) مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت، ژن IPVN-PV2 با استفاده از پرایم های اختصاصی طراحی شده توسط نرم‌افزار لیگو (Oligo) تکثیر گردید (۴۶). بر این اساس پرایمر رفت حاوی کدون آغاز (به‌صورت حروف بولد و پر رنگ نشان داده شده است)، پرایمر برگشت شامل مکان محدودکننده Spei (با حروفی که زیر آن‌خط کشیده‌شده است نشان‌داده‌شده‌است)، کدون خاتمه(که به‌صورت‌حروف پررنگ‌نشان داده شده است) و ۶-Histag (به‌صورت حروف‌ایتالیک نشان‌داد شده است) بود (جدول ۱).

جدول۱: پرایمرهای مورد استفاده در آزمون

پرایمر رفت	ATGAACACAAACAAGGCAACC3'
پرایمر برگشت	5'AAAATTACTAGT TTA*GTGA* *TGGTGA* *TGGTGAT G*GACTATGTCTCTCCAGCACCA3'

تکثیر ژن: برای این منظور با توجه به آن‌که قالب DNA برای تکثیر ژن VP2، محصول PCR بود (از ATG تا کدون خاتمه)، چهار واکنش PCR متفاوت‌در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر حاوی غلظت‌های مختلف محصول PCR (۱، ۵، ۱۰ و ۴۸ نانوگرم بر میکرولیتر) که شامل بافر واکنش، ۲۰۰ میکرو مول از هر d-NTP، ۱ واحد/ واکنش پلیمراز KOD DNA، ۱/۵ میلی‌مول mgcl2، ۰/۳ میلی‌مول از هردو پرایمر رفت و برگشت و آب دوبار تقطیر (تا۵۰ میکرولیتر) بود، انجام شد. در این مرحله واکنش‌های PCR توسط یک ترموسایکلر (بیوراد، هرکلوس، CA، آمریکا) بامشخصات‌چرخه‌گرمایی به‌صورت‌دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه در ۳۰ دور، در دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۲۰ ثانیه، ۵۳ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه و ۷۰ درجه به‌مدت ۲۷ ثانیه و اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه، انجام شد. مشاهده محصولات PCR به‌وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲٪ با استفاده از بافر TAE 1X و سپس رنگ‌آمیزی بارنگ ژل اسیدنوکلئیک GelRed™ (بیوتیوم،VWR، آمریکا) صورت گرفت و درنهایت تصویر با استفاده از ChemiDoc (بیوراد، امریکا) تهیه شد. در مرحله بعد، محصول PCR از طریق کیت تهیه قالب PCR خالص (روشه دیاگنوستیک، آلمان) تخلیص شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه نگه‌داری شد (۴۷).

کلونینگ‌ژن: این‌مرحله‌شامل‌مراحل مختلف هضم، لیگاسیون، ترانسفورماسیون است. در مرحله اول محصول PCR تخلیص شده و دارای مکان محدود کننده SPeI با استفاده از آنزیم محدود کننده SPeI هضم شد. به‌طورخلاصه این‌واکنش هضم با ترکیب‌بافر محدود کننده 1X، ۰/۲ میکروگرم محصول PCR، ۲۰ واحدSPeI (تاکارابیو، ژاپن) و ddH_2O و رساندن به حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر و سپس انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، به‌مدت ۵ ساعت، سپس افزودن ۱۰ واحد دیگر SPeI به ترکیب و انکوباسیون مجدداً به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه، انجام شد. هضم وکتور بیان pNZ8150 به‌صورت مجزا با استفاده از ScaI (تاکارابیو، ژاپن) و آنزیم‌های محدودکننده Spei (این دو آنزیم دارای شرایط بافر متفاوتی هستند و امکان هضم مجدد با دو آنزیم به‌طور هم زمان وجود ندارد) انجام پذیرفت. قابل ذکر است که هر دو واکنش هضم با شرایطی مشابه و با ترکیبات واکنشی‌حاوی بافرمحدود x۱، ۰/۱ میکروگرم وکتور، ۱۰ واحد آنزیم (*Sca*I یا *Spe*I) و رساندن به حجم نهایی ۶۰ میکرولیتر با آب مقطر دوبار تقطیر و سپس انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌و مدت ۲ ساعت اانجام شد. در نهایت ۱۰ واحد دیگر از آنزیم (*Sca*I یا *Spe*I) به ترکیب افزوده شده و مجدداً انکوباسیون به‌مدت ۱ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه صورت پذیرفت. پس از دفسفوریلاسیون با استفاده از آنزیم‌فسفاتاز قلیایی (روشه‌دایگنوستیک‌آلمان)، لیگاسیون با کیت لیگاسیون DNA (شرکت تاکارابیو، ژاپن) به این صورت انجام شد که ابتدا، ۰/۰۳ پیکومول/ وکتور واکنش pNZ8150 خطی (انحلال یافته در TE، ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl pH= 8.0, 1 mM EDTA) با ۰/۰۹ پیکومول/واکنش تزریق (محصول PCR انحلال یافته در TE) در حجم کلی ۵ میکرولیتر ترکیب شد، سپس حجم برابر و یکسان (۵ میکرولیتر) محلول I به ترکیب DNA افزوده شد و در نهایت،

محلول ترکیبی در دمای ۱۶ درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. در مرحله ترانسفورماسیون ترکیب پیوندی به سلول‌های پذیرا *L. lactis* NZ9000 با استفاده از الکتروپوریشن ترانسفورم شد. سلول‌های پذیرای *L. lactis* NZ9000 براساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده (MoBiTec GmbH، آلمان) تهیه شدند، به این صورت که ابتدا، ۵ میلی‌لیتر G-SGLM17B حاوی M17 ۵۰ v/v٪ براث مکمل‌دهی شده با ۲/۵درصد گلیسین، ۰/۵ درصد گلوکز، ۰/۵ درصد لاکتوز و ۰/۵ مول ساکاروز با گلیسرول *L. lactis* تلقیح شده و در طی شب در محفظه بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه انکوبه شدند. سپس، ۵۰ میلی‌لیتر G-SGLM17B به محیط کشت با رقت ۱:۱۰۰ تلقیح شده و در طی شب در دمای ۳۰ درجه بدون تهویه رشد یافت، سپس ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت به ۴۰۰ میلی لیتر محیط G-SGLM17B افزوده شده و تا زمانی‌که OD600 به ۰/۳-۰/۲ برسد رشد ادامه یافت. در نهایت، سلول‌ها چهار بار از طریق سانتریفیوژ پیوسته در ۶۰۰۰ و ۴ درجه به‌مدت ۲۰ دقیقه شسته شده و در یک محلول استریل آب یخ حاوی ۰/۵ مول ساکاروز و ۱۰ درصد گلیسرول تعلیق شدند. در دومین شست و شو، ۵۰ میلی‌مول EDTA نیز به محلول فوق الذکر افزوده شد (۴۸). پلاسمید بیان نوترکیب (۵۰۰ نانوگرم انحلال یافته در TE) حاوی ژن IPNV VP2 به سلول‌های پذیرای *L. lactis* (۴۰ میکرولیتر) با الکتروپوریشن و با استفاده از یک سیستم Genepulser (BioRad, USA) و پارامترهای ۲۰۰۰۰ V، ۲۵ Mf، ۲۰۰ Ω و زمان پالس ۵ میلی‌ثانیه در کووت الکتروپوریشن دو میلی‌متری پیش‌سرما دهی‌شده، ترانسفورم شد. سپس ۱ میلی‌لیتر GLM17B مکمل‌دهی شده با ۲۰ میلی‌مول منیزیم کلرید و ۲ میلی‌مول کلسیم کلرید به سلول‌های الکتروپوریته شده افزوده شده و کووت به‌مدت ۲ دقیقه بر روی یخ نگه‌داشته شده و به‌مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۰درجه انکوبه شد. در نهایت سلول‌های *L. lactis* ترانسفورم شده حاوی بزرگ‌ترین رونوشت پلاسمید از طریق انکوباسیون بر روی صفحات SGLM17 حاوی غلظت بالا (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کلرامفنیکول (سیگماالدریخ Chemie GmbH آلمان) به‌مدت ۲ روز در ۳۰ درجه غربالگری شدند.

PCR کلنی برای تأیید پلاسمید نوترکیب: در این مرحله هشت کلنی حاوی چندین رونوشت از وکتور نوترکیب PNZVP2 که بر روی پلیت‌های کلرامفنیکول+SGLM17 رشد یافته بودند، در ابتدا توسط PCR کلنی تأیید و انتخاب شدند. به گونه‌ای که همه شرایط PCR ازجمله مواد و غلظت‌های آن‌ها به‌علاوه پروفایل چرخه گرمایی، به‌جز قالب DNA، مشابه با PCR اصلی فوق‌الذکر بود. سپس قالب DNA بدون استخراج پلاسمید از کلنی‌های تبدیل شده و از طریق جوشش سلول‌ها در ۹۶ درجه به‌مدت ۱۵ دقیقه فراهم شد.

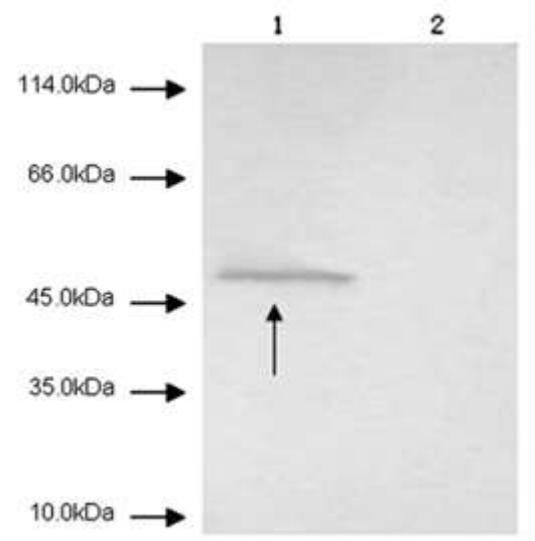
استخراج و هضم پلاسمید نوترکیب: کلنی‌های تأییدشده با استفاده از PCR کلنی و هضم آنزیم محدودکننده پلاسمید استخراج شده با استفاده از Spei بررسی شدند، که براساس نتایج محصولات هضم از طریق الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد با استفاده از بافر 1x TAE قابل رویت بودند که توسط ژل اسید نوکلیک GelRed™ رنگ‌آمیزی شده و تهیه تصاویر با استفاده از ChemiDoc انجام شد. پیش از واکنش هضم، استخراج پلاسمیدها از کلنی‌های *L. lactis* به این صورت انجام شد که ابتدا، ۵ میلی‌لیتر SGLM17B با سلول‌های *L. lactis* ترانسفورم شده تلقیح شده و در طی شب در دمای ۳۰ درجه انکوبه شدند و محیط کشت به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. سپس پلت در ۲۵۰ میکرولیتر بافر THM (30 mM Tris-HCl pH=8, 3 mM $MgCl_2$، ۲۵ درصد ساکاروز)+ ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لیزوزیم در یک لوله واکنش قرار گرفت و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس، 500 µl of 0.2 N NaOH + 1% SDS به ترکیب افزوده شده و به‌طور دقیق هم‌زده شد (بدون میکسر ورتکس) و به‌مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه گردید. سپس، ۳۷۵ میکرولیتر از پتاسیم‌استات ۳ مول (PH=۵/۵) به ترکیب افزوده‌شده و به‌طور دقیق هم‌زده‌شدند به‌مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شده و به‌مدت ۵دقیقه دیگر هم‌زده شدند. در مرحله بعدی، سوپرناتانت به لوله‌واکنش جدیدافزوده شده و درنهایت، ترکیب به‌مدت ده دقیقه سانتریفیوژ گردیده و پلت با استفاده از اتانول ۷۰ درصد شسته شده، در خلاء خشک شده و در ۵۰ میکرولیتر TE حل شدند.

توالی‌یابی DNA جهت تأیید پلاسمید نوترکیب: در این مرحله کلنی‌های تأییدشده مجدداً با استفاده‌از توالی‌یابی DNA تأییدشدند، به این ترتیب که توالی‌یابی برای دو نمونه در هر دو جهت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ذکرشده، کیت واکنش توالی‌یابی چرخه ترمیناتور BigDye (بیوسیستم‌های کاربردی، امریکا) و یک آنالیزور ABI 3730 XL DNA (ماکروژن، کره جنوبی) تأیید شدند و سپس توالی نوکلئوتیدی حاصله ژن رمزکننده IPNV VP2 و توالی آمینو اسیدی آن با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit (Hall , BioEdit v7.0.5) آنالیز و تحلیل شدند (۴۹).

نتایج

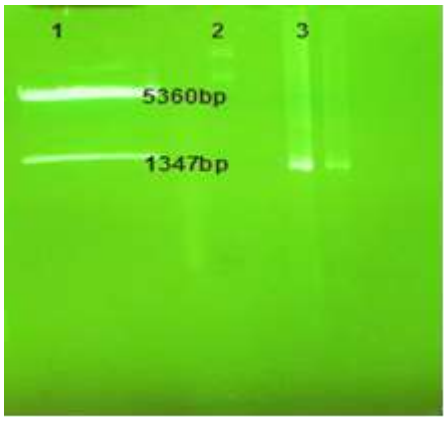
نتایج PCR: محصول PCR رمزکننده ژن VP2 در IPNV که حاوی مکان محدودکننده ScaI و توالی 6-histag در انتهای رشته سنس آن بود، با استفاده از یک محصول PCR اصلی به‌عنوان الگو و یک جفت ژن پرایمر اختصاصی ژن به‌دست آمد و انجام الکتروفورز بر روی ژل آگار برای چهار واکنش PCR متفاوت حاوی غلظت‌های مختلف

محصول PCR اصلی (۱، ۵، ۱۰ و ۴۸ نانوگرم بر میکرولیتر)، همه آملیکون‌ها تا ۱/۵ کیلوباز را تأیید کرد (شکل ۱).



شکل ۱: بیان پروتئین کپسید VP2 ویروس IPN در لاکتوکوکوس لاکتیس

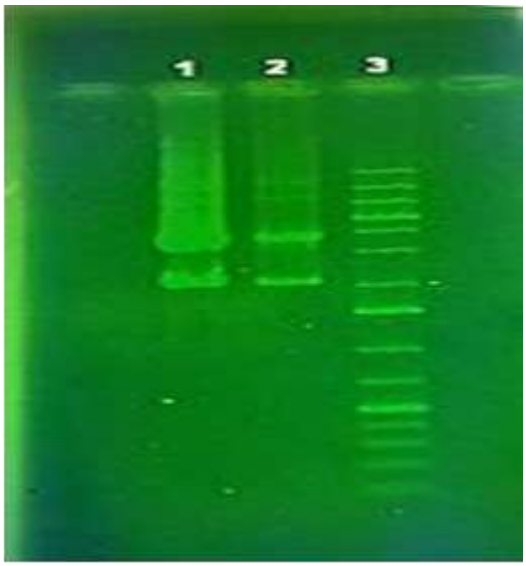
کلونینگ ژن: در این مرحله محصول PCR بین مکان‌های محدود کننده SpeIوScaI به وکتور بیان pNZ8150 تزریق شد (شکل ۲). با توجه به آن‌چه در شکل ۲ نشان داده شده است، ژن VP2-IPNV نوترکیب تحت کنترل PnisA (۱۸۳ جفت باز) که یک پروموتور قوی از ژن A نیسین است قرار دارد. هم‌چنین در انتهای ژن ۶-histag، کدون خاتمه و مکان محدودکننده SpeI مشاهده گردید (شکل ۲). این در حالی است که در pNZ8150، توالی پایان ژن pepN (۵۲ جفت باز) برای رونویسی خاتمه زن الحاق شده (شکل ۲) استفاده می‌شود. در این‌جا به‌منظور غربال‌سازی کلنی‌های ترانسفورم شده از کلنی‌های ترانسفورم نشده، ژن مقاومت کلرامفنیکل، cm(Cat) به‌عنوان یک نشانگر قابل انتخاب در pNZ8150 استفاده شد. اگرچه ساختار نوترکیب pNZVP2 ظاهراً دارای طول ۴۵۳۷ جفت باز است (pNZ8150، ۳۱۶۳ جفت باز، ژن VP2، ۱۳۴۷ جفت‌باز، 6-Histag، ۱۸ جفت‌باز، کدون خاتمه، ۳ جفت باز و مکان محدودکننده spei، ۶ جفت باز)، لازم به ذکر است که بخشی از منطقه MSC از وکتور ۲۷ جفت بازی pNZ8150 با کمک واکنش هضم و با استفاده از دو آنزیم محدود کننده حذف شد (Scai و Spei) و طول نهایی ساختار نوترکیب برابر با ۴۵۱۰ جفت باز گردید. در نهایت از لیگاسیونف ساختار نوترکیب pNZVP2، به سلول‌های *L. lactis* ترانسفورم شده و سلول‌های ترانسفورم شده با چندین رونوشت با استفاده از غلظت آنتی‌بیوتیک بالا انتخاب شدند (افزایش ده برابری غلظت کلرامفنیکول در پلیت‌های غربالگری نسبت به پلیت‌های اولیه).



شکل ۲: الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب VP2

۱- پلاسمید هضم شده حاوی ژنVP2 به طول ۱۳۴۷ bp- پلاسمید هضم نشده حاوی ژن VP2 ۳- ژن VP2

PCR کلنی: ساختار نوترکیب pNZVP2 در ابتدا با استفاده از قالب DNA توسط PCR به‌دست آمد و با جوشاندن سلول‌های دو کلنی متفاوت کشت‌شده بر روی پلیت‌های کلرامفنیکول+SGLM17 و یک جفت پرایمر VP2 اختصاصی تأیید شد. در نهایت الکتروفورز بر روی ژل آگاروز برای هر دو آملیکون را با اندازه ۱/۵ کیلوباز تأیید کرد (شکل ۳).

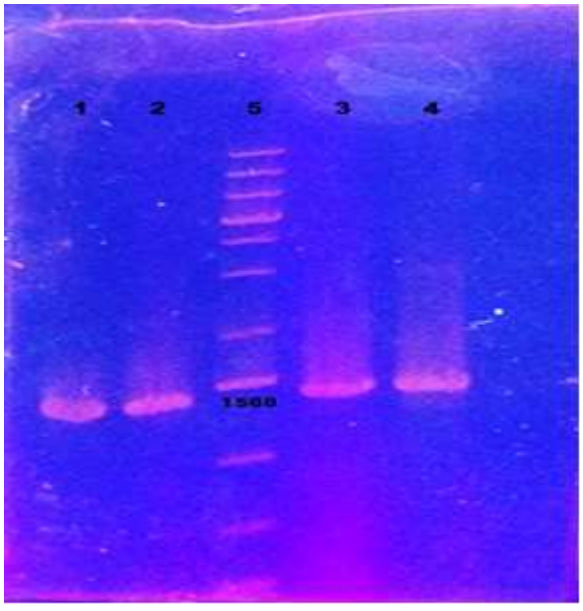


شکل ۳: الکتروفورز پلاسمید pNZ8150 استخراج شده

ستون‌های ۱، ۲:پلاسمید استخراج شده، ۳- مارکر kb ۱

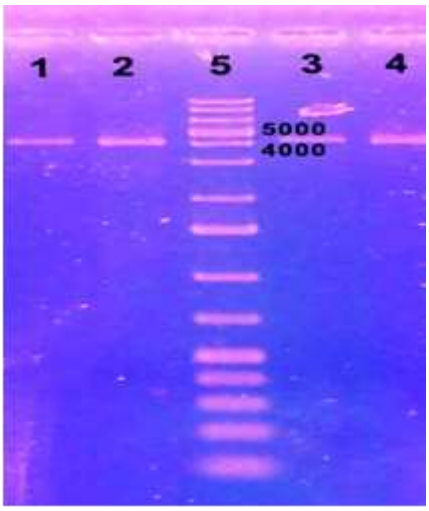
هضم آنزیم محدودکننده: ساخت وکتور بیان نوترکیب، pNZVP2 با استفاده از هضم آنزیم محدودکننده وکتورهای استخراج شده از دو کلنی متفاوت (که ابتدا با استفاده از PCR تأیید شد) با آنزیم محدود کننده SPei تأیید گردید. براساس شکل ۴، الکتروفورز بر روی ژل آگاروز تائیدکننده وکتور نوترکیب خطی (pNZVP2) از هر دو کلنی بود که دارای طول بیش‌تری از وکتورهای غیرنوترکیب خطی (pNZ8150) و به‌میزان ۴/۵ کیلوباز (شکل ۲ و ۴) در برابر ۳/۲ کیلوباز (شکل ۲) و به‌ترتیب وکتورهای نوترکیب و غیرنوترکیب بودند (شکل‌های ۵ و ۶).

شکل ۴: الکتروفورز ۱- محصول هضم PCR ۲- وکتور هضم شده ۳-وکتور حلقوی ۴- مارکر kb ۱



شکل ۵: الکتروفورز محصول PCR کلونی‌های باکتری لاکتوکوکوس حاوی ژن VP2

۱- مارکر kb۱، ۳، ۴ و ۵- کلون‌های حاوی ژن VP2 به طول bp۱۳۴۷



شکل ۶: الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب (pNZ8150) VP2

۱، ۲، ۳، ۴ پلاسمید هضم شده حاوی ژن **VP2** به طول ۱۳۴۷ bp

تحلیل توالی DNA: تشکیل وکتور بیان pNZVP2 نیز توسط توالی‌یابی DNA تأیید گردید. به این ترتیب که تحلیل توالی DNA نشان‌دهنده آن بود که آمپلیکون دقیقاً دارای اندازه ۱۳۷۴ جفت باز ازجمله مکان محدودکننده SPEI (۶ جفت باز)، 6-histag (۱۸ جفت باز)، کدون خاتمه (۳ جفت باز) و رمزگذاری توالی ژن IPNV VP2 (۱۳۴۷ جفت باز) گزارش شده از توالی رسوب شده در بانک ژنی (شماره اکسشن KC489465) می‌باشد.

بحث

گزارش‌های بسیاری مبنی بر عملکرد آنتی ژنیسیته پروتئین کپسید IPNV VP2 وجود دارند، زیرا این پروتئین به‌عنوان یک آنتی ژن غالب ایمنی و غیرعفونی شناسایی شده است (۴۸، ۵۰، ۵۱). در این راستا، بیش‌تر تیم‌های تحقیقاتی از این ژن برای تولید واکسن نوترکیب در برابر IPNV استفاده نموده‌اند (۵۲، ۵۳، ۵۴، ۵۵، ۵۶، ۵۷، ۵۸).اگرچه برخی از IPNV SVPهای نوترکیب از جمله پروتئین VP2 بیان شده توسط مخمر (۵۹، ۶۰، ۶۱) و نیز VLP نوترکیب تولید شده توسط رده‌های سلولی ماهی و پستانداران (۶۲) و سیستم بیان حشره باکولوویروس (۶۳) حفاظت شده‌اند، اما این حفاظت‌ها از طریق مسیرهای غیرخوراکی نظیر تزریق داخل صفاقی حاصل می‌شود. چون عفونت اولیه و همانندسازی پاتوژن IPNV عمدتاً در سطوح موکوسی (۶۴) و در مراحل بچگی بروز پیدا می‌کند (۶۵)، این راهبردهای تجویز واکسن در ماهی‌های کوچک‌تر مناسب نبوده و واکسیناسیون خوراکی مطلوب‌تر است. در رابطه با واکسن‌های IPVN نوترکیب تجاری، لازم به ذکر است که واکسن تولید شده براساس VP2 نوترکیب

(NP-INP)Norvax® Protect-IPN)) که در نروژ (۶۶)، کانادا و شیلی (۶۷) دارای مجوز است، یک واکسن تزریقی بوده که براساس مطالعات سطوح ایمنی متفاوتی را ایجاد کرده است (۶۸، ۶۹). واکسن‌های تجاری دیگر IPNV که در شیلی AquaVac® IPN Oral (مرک انیمال هلث، نیوجرسی امریکا) مجوز استفاده را گرفته است، واکسن خوراکی بر اساس آنتی‌ژن‌های نوترکیب VP2 و VP3 می‌باشد که از طریق سیستم بیان مخمر تولید می‌گردد (۷۰). با این‌حال، این بیماری هنوز در شیلی شایع است (۷۱، ۷۲، ۷۳)، زیرا در ۲۰۱۵، حدود ۳۰ درصد بیماری‌های شناسایی شده در مراکز تکثیر و پرورش سالمون در شیلی به بیماری IPN نسبت داده شده که موجب بروز تلفاتی با نرخ ۸ درصد گردید (۷۴، ۷۵، ۷۶). در اینجا لازم به ذکر هست که در صورت ایجاد که ایمنی قابل قبول از این واکسن تجاری نیز تولید واکسن پیچیده بوده و به‌دلیل برخی فرایندهای اضافی و پرهزینه از جمله لیزسلولی، تخلیص آنتی‌ژن و نانوکپسوله‌سازی، مقرون به‌صرفه نیست (۷۷). راهبرد دیگر در جهت ایمن‌سازی ماهی‌های کوچک در برابر IPNV، واکسیناسیون DNA خوراکی می‌باشد (۷۸، ۷۹، ۸۰، ۸۱). واکسن‌های DNA باید درون ذرات نانو و میکرو جهت حفاظت در دستگاه گوارش کپسوله شوند (۶۴، ۶۵، ۶۶، ۸۱). در این رابطه در سال ۲۰۰۵ نخستین واکسن DNA برای ویروس نکروز هماتوپویتیک عفونی (IHNV) (Appex-IHN، شرکت آکوا هلث)، در کانادا مجوز استفاده گرفت (۴۶)، اما بااین وجود براساس مطالعات واکسن‌های DNA برای بیماری غیر رابدوویروس موجب کاهش حفاظت در ماهی می‌شود (۴۷، ۴۸، ۴۹، ۵۰)، اگرچه برخی از پلاسمیدهای واکسن DNA رمزکننده پروتئین VP2 یک حفاظت بالا را در برابر IPNV نشان داده است (۳۶، ۴۸، ۵۲). علاوه براین این واکسن‌ها معمولاً با برخی مسائل اخلاقی از حیث ایمنی زیستی مواجه بوده و این مساله موجب محدود شدن کاربرد این فناوری در سطح تجاری می‌شود. در حقیقت، یک پلاسمید واکسن DNA را می‌توان در ژنوم سلول میزبان قرار داد (۵۱) که منجر به موتاژنز افزایشی شده و به‌طور بالقوه منجر به فعال‌سازی انکوژن یا غیرفعال‌سازی ژن‌های مهارکننده تومور می‌گردد (۷۷). یک واکسن ایده‌آل در برابر IPNV باید ایمن و مقرون به صرفه بوده و با تجویز خوراکی یا مسیرهای غوطه‌وری باعث القای حفاظت بلندمدت در مراحل اولیه رشد گردد (۷۸). در این‌خصوص، باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB)، واکسن‌های زنده دارای قابلیت وکتور هستند. پیش از استفاده از LAB برای تولید صنعتی واکسن‌های نوترکیب (۷۹، ۸۰)، این باکتری‌ها به‌مدت چندین قرن به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مفید (پروبیوتیک) برای تخمیر و نگه‌داری تعداد زیادی از لبنیات صنعتی و سایر محصولات غذایی استفاده می‌شدند (۶۸، ۶۹، ۷۰، ۷۱). بیش‌تر سویه‌های LAB بدون ایجاد اثرات جانبی در میزبان، قادر به بقا و تکثیر در روده هستند (۶۹، ۷۱). این باکتری‌ها جزو میکروارگانیسم‌های غذایی طبقه‌بندی می‌شوند که به‌عنوان ارگانیسم‌های ایمن (GRAS) توسط سازمان غذا و داروی امریکا (FDA) شناخته شده‌اند و معیارها و استانداردهای پیش‌بینی معتبر ایمنی (QPS: Qualified Presumption of Safety) بر طبق اداره ایمنی غذایی اروپا (EFSA) را دارا می‌باشند (۵۵). تاکنون از سویه‌های LAB برای القای پاسخ‌های ایمنی سیستمیک و موکوسی موضعی از طریق انتقال آنتی‌ژن برونزا به سطح موکوسی در موش (۷۵)، خوک (۶۳) و ماهی (۴۱، ۴۲، ۴۳، ۶۳) به‌صورت خوراکی تجویز شده‌اند. *L. casei* وکتور زنده انتخاب شده به‌عنوان بیان‌کننده و تحویل‌دهنده پروتئین کپسید IPNV VP2-VP3 در اشکال مجزا و ترکیبی برای القای پاسخ ایمنی حفاظتی از طریق مسیر خوراکی در بچه‌ماهی‌ها انتخاب کرده‌اند. براساس گزارشات هر دو شکل مجزا و ترکیبی پروتئین‌های IPNV VP2/VP3 به‌طور موفق در لاکتوباسیلوس با آنتی‌ژنیسیته طبیعی بیان شده و قادر به القای آنتی‌بادی‌ها در برابر IPNV طبیعی و کاهش معنی‌دار بار ویروسی بوده است، هرچند این واکسن‌ها تاکنون موفق به کسب مجوز تولید تجاری نشده‌اند (۵۵، ۶۳، ۷۵). ازجمله دیگر اعضای خانواده لاکتوباسیلوس‌ها، لاکتوباسیلوس لاکتیس (*L. lactis*) است که یک باکتریوم هموفرمنتیتیو (باکتریومی که محصول نهایی تخمیر آن، لاکتات است) بوده و باکتری شناخته شده در تولید پنیر و سایر محصولات لبنی می‌باشد (۶۹). در حال حاضر، اطلاعات ژنومی کامل چندین سویه *L. lactis* موجود است (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=lactococcus+lactis+complete+genome). این دانش و تجربه عظیم منجر به استفاده از لاکتوکوس در زمینه‌های بیوتکنولوژی و به‌خصوص بیان آنتی‌ژن‌های باکتریایی و ویروسی در جهت واکسیناسیون با ایمن‌سازی موکوسی (۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳) و تولید سیتوکین‌ها شده است (۲۲). دسترسی به یک سیستم بیان ژن کاملاً کنترل شده و آسان، NICE (بیان کنترل شده نیسین) برای توسعه بسیاری از این زمینه‌ها مهم بوده است. با استفاده از این سیستم، سطوح بیان بالای پروتئین‌ها با استفاده از مولکول گرید غذایی (نیسین) به‌عنوان القاگر برای پروموتور PnisA (۷۵، ۷۶، ۷۷، ۷۸، ۷۹) به‌دست می‌آید. اخیراً یک ثبت اختراع آمریکایی (شماره انتشار: US 20130004547 A1) به‌عنوان مخترعان واکسن‌های خوراکی تولید شده توسط سویه‌های *L. lactis* منتشر شده است که در یک مورد *L. lactis* بیان‌کننده ژن HA آنفلوانزای پرندگان را به عنوان واکسن خوراکی برای حفاظت در برابر عفونت ویروسی H5N1 معرفی کرده است و در مطالعه دیگری، *L. lactis* به‌صورت یک واکسن خوراکی همراه با ادجوانت‌هایی نظیر توکسین B تجویز شد (۶۴). در مطالعه حاضر، ژن VP2 از ایزوله ایرانی IPNV به‌طور موفق بین

مکان‌های محدودکننده ScaI و SpeI از وکتور بیان pNZ8150 تحت کنترل پروموتور PnisA قرار گرفت. سپس، وکتور بیان نوترکیب، pNZVP2 به *L. lactis* NZ9000 تبدیل و کلون شد. ساخت وکتور بیان نوترکیب pNZVP2 با استفاده از هضم آنزیم محدودکننده، PCR کلنی ژن VP2 و توالی‌یابی DNA تأیید شد. هم‌چنین در این بررسی یک توالی 6-Histag را به‌انتهای '3 رشته‌سنس متناظر با انتهای c پروتئین VP2 برای تأیید بیان پروتئین در سلول میزبان *L. lactis* NZ9000 با استفاده از Anti-histag در تحلیل وسترن بلات در مطالعات بیان آینده افزوده شد. این در حالی است که به‌طور مشابه، از وکتور بیان pNZ8150 برای تبدیل ژن HA ویروس آنفلوانزا H5N1 به *L. lactis* استفاده شده‌است و برعکس مطالعه حاضر، آن‌ها وکتور بیان نوترکیب pNZ8150-HA را از طریق افزودن ژن HA در مکان‌های محدود کننده SpeI/HindIII وکتور بیان pNZ8150 ایجاد کردند. براساس تحلیل توالی بین ژن تکثیر و کلون شده IPNV VP2 در کار فعلی و مطالعه Dadar و همکاران، هیچ‌گونه جهشی در ژن رمزکننده VP2 از INPV مشاهده نگردید(۱۰) که تائیدی بر فعالیت تصحیحی بالای پلیمراز KOD DNA می‌باشد (۱۱). از آن‌جایی‌که برخی جهش‌های نقطه‌ای موسوم به جهش‌های میس سنس یا جهش‌های بدمعنی (Missense mutations) در توالی DNA کدون (CDS) ژن‌ها منجر به جانشینی آمینواسیدی در توالی پروتئین‌ها می‌شوند، با این‌حال دقت توالی ژن تکثیر شده با استفاده از DNA پلیمراز در PCR برای بیان پروتئین نوترکیب بسیار مهم می‌باشد. برخی از DNA پلیمرازها نظیر Taq، فاقد فعالیت اگزونوکلئاز '5-'3 می‌باشند درحالی‌که برخی دیگر نظیر Pfu و KOD قادر به انجام فعالیت تصحیحی هستند (۷۷، ۷۸، ۷۹). به‌علاوه پروسسیتیویته (Processivity)، تعداد نوکلوتیدهای توسعه یافته قبل از جدایی پلیمراز، ۲۰-۵ برابر بزرگ‌تر برای KOD در مقایسه با Pfu و KOD می‌باشد(۷۱، ۷۲، ۷۳، ۷۴). این ویژگی همراه با فعالیت اگزونوکلئاز KOD موجب کاهش شانس گمارش غلط نوکلئوتیدها در طی تکثیر PCR می‌شود (۸۰، ۸۱). به‌علاوه، نرخ گسترش بالا (۵-۲ برابر) KOD در مقایسه با Taq و Pfu منجر به کاهش زمان تکثیر و تولید مقدار معادلی آمپلیکون می‌شود (۵۹). بنابراین، در این مطالعه، این آنزیم برای تکثیر ژن vp2 استفاده گردید. با توجه به آن‌که در این مطالعه قالب DNA برای PCR محصول VP2 PCR تکثیر شده توسط Dadar و همکاران بود (۱۰)، با این وجود به‌غیر از مکان‌های محدودکننده و توالی‌های 6-Histag افزوده شده به‌مناطق جانبی ژن، هیچ‌گونه تفاوتی بین این‌دو توالی مشاهده نشد. مقایسه توالی DNA بین ژن VP2 تکثیر شده در این مطالعه و ژن رسوب یافته در ژن بانک (شماره اکسشن:KC489465) توسط Dadar و همکاران (۱۰) هیچ‌گونه جهشی را درون توالی نشان نداد که این مساله موید فعالیت تصحیح‌کنندگی بالای پلیمراز *KOD* DNA است. مطالعه حال حاضر نخستین بررسی صورت گرفته برروی تولید واکسن وکتور زنده نوترکیب از *L. lactis* برای کلون کردن ژن کاندید از پاتوژن عفونی ماهی بوده است، که با توجه گزارشات متعدد درخصوص بروز تلفات گسترده در نتیجه آلودگی به IPNV در ماهی‌ها در ایران و سطح جهان، بر آن شدیم تا با استفاده از یک پروتئین آنتی‌ژنیک (VP2) از این ویروس به‌عنوان یک مدل تمرکز کنیم. با این‌حال، به‌نظر می‌رسد که می‌توان از این سیستم برای بیان و انتقال خوراکی آنتی‌ژن‌های دیگری به‌جز IPNV استفاده نمود. به این ترتیب که برای هر عامل عفونی از طریق سیستم بیان pNZ8150/*L. lactis* استفاده می‌شود و این سیستم به طور بالقوه به‌عنوان یک پلتفرم جدید برای توسعه واکسن‌های خوراکی در ماهی‌ها قابل استفاده خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان تشکر و قدردانی خود را صمیمانه از مدیریت و کادر مجموعه رازف ابراز می‌نمایند.

منابع

1. **Byrne, N., Castric, J., Lamour, F., Cabon, J. and Quentel, C., 2008**. Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunology. 24(5): 489-497.
2. **Bermúdez-Humarán, L.G., Aubry, C., Motta, J.P., Deraison, C., Steidler, L., Vergnolle, N., Chatel, J.M. and Langella, P., 2013**. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. Current Opinion in Microbiology. 16(3): 278-283.
3. **Biering, E., Villoing, S., Sommerset, I. and Christie, K., 2005**. Update on viral vaccines for fish. Developments in Biologicals. 121: 97-113.
4. **Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. and Schäfer, F., 2009**. Immobilized-metal affinity chromatography: a review. Methods in Enzymology. 463: 439-473.
5. **Bowden, T., Smail, D. and Ellis, A., 2002**. Development of a reproducible infectious pancreatic necrosis virus challenge model for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases. 25(9): 555-563.
6. **Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J. and Garcia Fruitós, E., 2015**. Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. Microbial cell factories. 14(1): 1-12.
7. **Claassen, E., Winsen, R.V., Posno, M. and Boersma, W., 1995**. New and safe" oral" live vacines based on *lactobacillus*. Advances in Experimental Medicine and Biology. 371: 1553.
8. **Crane, M.S.J., Hardy-Smith, P., Williams, L.M., Hyatt, A.D., Eaton, L.M., Gould, A., Handlinger, J., Kattenbelt, J. and Gudkovs, N., 2000**. First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. Diseases of Aquatic Organisms. 43(1): 1-14.
9. **Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., de Las Heras, A., Saint Jean, S.R., Perez-Prieto, S. and Tafalla, C., 2010**. An active DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than fish rhabdovirus DNA vaccines. Vaccine. 28(19): 3291-3300.
10. **Dadar, M., Rajabi Memari, H., Peyghan, R. and Seifi Abad Shapouri, M., 2014**. Isolation and expression of

pancreatic necrosis virus. Fish & Shellfish Immunology. 27(2): 120-129.

28. **Heras, A., Saint-Jean, S. and Pérez-Prieto, S., 2010**. Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. Fish Shellfish Immunol. 28(4): 562-570.
29. **Ballesteros, N.A., Saint-Jean, S.R. and Perez-Prieto, S.I., 2015**. Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosis virus carrier state in rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology. 165(3-4): 127-137.
30. **Benson, L.M., Null, A.P. and Muddiman, D.C., 2003**. Advantages of *Thermococcus kodakaraenis* (KOD) DNA polymerase for PCR-mass spectrometry based analyses. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 14(6): 601-604.
31. **Galdeano, C.M. and Perdigon, G., 2006**. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. Clinical and Vaccine Immunology. 13(2): 219-226.
32. **Gareau, M.G., Sherman, P.M. and Walker, W.A., 2010**. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 7(9): 503.
33. **Gudding, R., Lillehaug, A. and Evensen, Ø., 2014**. Fish vaccination, Wiley Online Library, New York.
34. **Hall, T.A., 2000**. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT'. Information Retrieval Ltd., c1979-c 2000. London. 95-98.
35. **Hølvold, L.B., Myhr, A.I. and Dalmo, R.A., 2014**. Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. Veterinary Research. 45(1): 1-11.
36. **Hou, X.L., Yu, L.Y., Liu, J. and Wang, G.H., 2007**. Surface-displayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria. Vaccine. 26(1): 24-31.
37. **Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M.M., Vaughan, E.E., De Vos, W.M. and Kuipers, O.P., 1997**. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. Applied and environmental Microbiology. 63(11): 4581-4584.
38. **Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P. and Poolman, B., 2000**. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. Current opinion in microbiology. 3(3): 276-282.
39. **Kurath, G., 2008**. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. Revue Scientifique et Technique-Office International des Épizooties. 27(1): 175.
40. **Labus, M.B., Breeman, S., Ellis, A.E., Smail, D.A., Kervick, M. and Melvin, W.T., 2001**. Antigenic comparison of a truncated form of VP2 of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus expressed in four different cell types. Fish & Shellfish Immunology. 11(3): 203-216.
41. **Lam, D.M.K. and Xu, Y., 2013**. Oral vaccines produced and administered using edible micro-organisms including lactic acid bacterial strains. United States Patent Application US, New York.
42. **LeBlanc, J.G., Aubry, C., Cortes-Perez, N.G., de Moreno de LeBlanc, A., Vergnolle, N., Langella, P., Azevedo, V., Chatel, J.M., Miyoshi, A. and Bermúdez-Humarán, L.G., 2013**. Mucosal targeting of therapeutic molecules using genetically modified lactic acid bacteria: an update. FEMS Microbiology Letters. 344(1): 1-9.
43. **Li-Li, Z., Min, L., Jun-Wei, G., Xin-Yuan, Q., Yi-Jing, L. and Di-Qiu, L., 2012**. Expression of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2–VP3 fusion protein in *Lactobacillus casei* and immunogenicity in rainbow trouts. Vaccine. 30(10): 1823-1829.
44. **Liu, C.Q., Su, P., Khunajakr, N., Deng, Y.M., Sumual, S., Kim, W., Tandianus, J. and Dunn, N., 2005**. Development of food-grade cloning and expression vectors for Lactococcus lactis. Journal of Applied Microbiology. 98(1): 127-135.
45. **Liu, D., Wang, X., Ge, J., Liu, S. and Li, Y., 2011**. Comparison of the immune responses induced by oral immunization of mice with *Lactobacillus casei*-expressing porcine parvovirus VP2 and VP2 fused to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein.

recombinant viral protein (VP2) from Iranian isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in *Escherichia coli*. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 13(4): 856-868.

11. **Davies, K.R., McColl, K.A., Wang, L.F., Yu, M., Williams, L.M. and Crane, M.S.J., 2010**. Molecular characterisation of Australasian isolates of aquatic birnaviruses. Diseases of Aquatic Organisms. 93(1): 1-15.
12. **De Ruyter, P., Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., van Alen-Boerrigter, I. and de Vos, W.M., 1996**. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. Journal of Bacteriology. 178(12): 3434-3439.
13. **Dhar, A.K., Bowers, R.M., Rowe, C.G. and Allnutt, F.T., 2010**. Expression of a foreign epitope on infectious pancreatic necrosis virus VP2 capsid protein subviral particle (SVP) and immunogenicity in rainbow trout. Antiviral Research. 85(3): 525-531.
14. **Dobos, P., 1995**. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Annual Review of Fish Diseases. 5: 25-54.
15. **Dobos, P., Hill, B., Hallett, R., Kells, D., Becht, H. and Teninges, D., 1979**. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes'. Journal of Virology. 32(2): 593-605.
16. **Dolatbadi, S., Falsafi, T. and Mahmoudi, M., 2015**. Lactococcus lactis as an oral vector for cloning of heat shock protein a from Helicobacter pylori. International Journal of Biosciences. 6: 410-415.
17. **Duncan, R., Mason, C.L., Nagy, E., Leong, J.A. and Dobos, P., 1991**. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. Virology. 181(2): 541-552.
18. **Embregts, C.W. and Forlenza, M., 2016**. Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. Developmental & Comparative Immunology. 64: 118-137.
19. **Evensen, Ø. and Leong, J.A., 2013**. DNA vaccines against viral diseases of farmed fish., Fish & Shellfish Immunology. Vol. 35, No. 6, pp. 1751-1758.
20. **Fridholm, H., Eliasson, L. and Everitt, E., 2007**. Immunogenicity properties of authentic & heterologously synthesized structural protein VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. Viral Immunology. 20(4): 635-648.
21. **Frost, P., Börsheim, K. and Endresen, C., 1998**. Analysis of the antibody response in Atlantic salmon against recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. Fish & Shellfish Immunology. 8(6): 447-456.
22. **Frost, P. and Ness, A., 1997**. Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. Fish & Shellfish Immunology. 7(8): 609-619.
23. **Ahmadivand, S., Soltani, M., Behdani, M., Evensen, Ø., Alirahimi, E., Hassanzadeh, R. and Soltani, E., 2017.** Oral DNA vaccines based on CS-TPP nanoparticles and alginate microparticles confer high protection against infectious pancreatic necrosis virus infection in trout. Developmental & Comparative Immunology. 74: 178-189.
24. **Ahmadi, N., Oryan, A., Akhlaghi, M. and Hosseini, A., 2013**. Tissue distribution of infectious pancreatic necrosis virus serotype S p in naturally infected cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: an immunohistochemical and nested-PCR study. Journal of Fish Diseases. 36(7): 629-637.
25. **Akhlaghi, M. and Hosseini, A., 2007.** First report on the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by RT-PCR in rainbow trout fry cultured in Iran. Bulletin-European Association of Fish Pathologists. 27(5): 205.
26. **Allnutt, F.T., Bowers, R.M., Rowe, C.G., Vakharia, V.N., LaPatra, S.E. and Dhar, A.K., 2007.** Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. Vaccine. 25(26): 4880-4888.
27. **Ana, I., Prieto, S.I.P. and Saint-Jean, S.R., 2009**. In vitro and in vivo immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious

challenge models for IPN vaccines. Journal of Fish Diseases. 30(12): 723-731.

63. **Roberts, R. and Pearson, M., 2005**. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases. 28(7): 383-390.

64. **Rønneseth, A., Wergeland, H.I., Devik, M., Evensen, Ø. and Pettersen, E.F., 2007**. Mortality after IPNV challenge of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) differs based on developmental stage of fish or challenge route. Aquaculture. 271(1-4): 100-111.

65. **Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C., 2002**. Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology. 79(1-2): 3-16.

66. **Shivappa, R., McAllister, P., Edwards, G. and Santi, N., 2005**. Using a baculovirus insect/larvae. Developments in Biologicals. 121: 165-174.

67. **Smail, D., Bain, N., Bruno, D., King, J., Thompson, F., Pendrey, D., Morrice, S. and Cunningham, C., 2006**. Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar*, post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohisto chemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. Journal of Fish Diseases. 29(1): 31-41.

68. **Smail, D., Bruno, D., Dear, G., McFarlene, L. and Ross, K., 1992**. Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus Sp serotype in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts associated with mortality and clinical disease. Journal of Fish Diseases. 15(1): 77-83.

69. **Smith, H.A., 1994**. Regulatory considerations for nucleic acid vaccines. Vaccine. 12(16): 1515-1519.

70. **Stagg, R. and Skjelstad, B., 2003**. Control of IPN', IPN in salmonids: a review. Fisheries and Aquaculture Industries Research Fund Oslo. 4: 10-16.

71. **Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M. and Imanaka, T., 1997**. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. Applied & environmental microbiology. 63(11): 4504-4510.

72. **Tapia, D., Eissler, Y., Torres, P., Jorquera, E., Espinoza, J. and Kuznar, J., 2015**. Detection & phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. Diseases of aquatic organisms. 116(3): 173-184.

73. **Tarrab, E., Berthiaume, L., Grothe, S., O'Connor McCourt, M., Heppell, J. and Lecomte, J., 1995**. Evidence of a major neutralizable conformational epitope region on VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. Journal of General Virology. 76(3): 551-558.

74. **Temin, H., 1998**. Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. Developments in Biological Standardization. 93: 37-44.

75. **Tonheim, T.C., Bøgwald, J. and Dalmo, R.A., 2008**. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. Fish & Shellfish Immunology. 25 (1-2): 1-18.

76. **Villatoro-Hernández, J., Kuipers, O.P., Saucedo Cárdenas, O. and Montes-de-Oca-Luna, R., 2012**. Heterologous protein expression by *Lactococcus lactis*, in Recombinant gene expression, Springer, New York. 155-165.

77. **Villena, J., Salva, S., Agüero, G. and Alvarez, S., 2011**. Immunomodulatory and protective effect of probiotic *Lactobacillus casei* against Candida albicans infection in malnourished mice. Microbiology and Immunology. 55(6): 434-445.

78. **Wells, J., 2011**. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. Annual Review of Food Science and Technology. 2: 423-445.

79. **Wolf, K., Snieszko, S., Dunbar, C. and Pyle, E., 1960**. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 104(1): 105-108.

80. **Wolff, J.A., Ludtke, J.J., Acsadi, G., Williams, P. and Jani, A., 1992**. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gone expression in mouse muscle. Human Molecular Genetics. 1(6): 363-369.

81. **Zhu, L., Wang, X., Wang, K., Yang, Q., He, J., Qin, Z., Geng, Y., Ouyang, P. and Huang, X., 2017**. Outbreak of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout in China. Acta Tropica. 170: 63-69.

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 34(1): 73-81.

46. **Lorenzen, N. and LaPatra, S., 2005**. DNA vaccines for aquacultured fish. International Office of Epizootics. 24(1): 201-213.

47. **Manríquez, R.A., Vera, T., Villalba, M.V., Mancilla, A., Vakharia, V.N., Yañez, A.J. and Cárcamo, J.G., 2017**. Molecular characterization of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from the three types of salmonids farmed in Chile. Virology Journal. 14(1): 1-16.

48. **Mierau, I. and Kleerebezem, M., 2005**. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis'*. Applied Microbiology and Biotechnology. 68(6): 705-717.

49. **Mierau, I., Leij, P., Van Swam, I., Blommestein, B., Floris, E., Mond, J. and Smid, E.J., 2005**. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: the case of lysostaphin. Microbial Cell Factories. 4(1): 1-9.

50. **Min, L., Li-Li, Z., Jun-Wei, G., Xin-Yuan, Q., Yi-Jing, L. and Di-Qiu, L., 2012**. Immunogenicity of *Lactobacillus*-expressing VP2 and VP3 of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout. Fish & Shellfish Immunology. 32(1): 196-203.

51. **Molloy, S.D., Pietrak, M.R., Bricknell, I. and Bouchard, D.A., 2013.** Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis virus from the blue mussel, *Mytilus edulis*, to cohabitating Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. Applied and Environmental Microbiology. 79(19): 5882-5890.

52. **Munang'andu, H.M. and Evensen, Ø., 2015**. A review of intra-and extracellular antigen delivery systems for virus vaccines of finfish. Journal of Immunology Research. 2015:960859. doi: 10.1155/2015/960859.

53. **Null, A.P. and Muddiman, D.C., 2001**. Perspectives on the use of electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for short tandem repeat genotyping in the post-genome era. Journal of Mass Spectrometry. 36(6): 589-606.

54. **Offerman, J.D. and Rychlik, W., 2003**. Oligo primer analysis software. Introduction to Bioinformatics, Springer, New York. 345-355.

55. **Ogawa, T., Asai, Y., Sakamoto, H. and Yasuda, K., 2006**. Oral immunoadjuvant activity of Lactobacillus casei subsp. casei in dextran-fed layer chickens. British Journal of Nutrition. 95(2): 430-434.

56. **Oryan, A., Ahmadi, N., Akhlaghi, M. and Hosseini, A., 2012**. A comparative histopathological, immunohisto chemical and nested-PCR study for diagnosis of infectious pancreatic necrosis in the naturally infected cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture International. 20(4): 725-734.

57. **Petit, S., Lejal, N., Huet, J.C. and Delmas, B., 2000**. Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. Journal of Virology. 74(5): 2057-2066.

58. **Platteeuw, C., van Alen-Boerrigter, I., van Schalkwijk, S. and De Vos, W., 1996**. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology. 62(3): 1008-1013.

59. **Pouwels, P.H., Leer, R.J. and Boersma, W.J., 1996**. The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. Journal of Biotechnology. 44(1-3): 183-192.

60. **Raissy, M., Momtaz, H., Ansari, M., Moumeni, M. and Hosseinifard, M., 2010**. Distribution of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in two major rainbow trout fry producing provinces of Iran with respect to clinically infected farms. Journal of Food, Agriculture & Environment. 8(3/4): 614-615.

61. **Ramstad, A. and Midtlyng, P., 2008**. Strong genetic influence on IPN vaccination-and-challenge trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases. 31(8): 567-578.

62. **Ramstad, A., Romstad, A., Knappskog, D. and Midtlyng, P., 2007.** Field validation of experimental