

**משרד החקלאות - דו"ח לחוכניות מחקר
להנהלת ענף בקר**

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
851-0351-15	פיתוח אבטיפוס (prototype) לחיסון רקומביננטי כנגד הזנים הישראליים השכיחים (סרוטיפים 2 ו-4) של נגיף הלשון הכחולה (Bluetongue virus)

ג. כללי	
מוסד מחקר של החוקר הראשי	
המכון הווטרינרי ע"ש קמרון	
סוג הדו"ח	תאריכים
שנתי	תקופת המחקר
	עבודה מוגשת הדו"ח
שנה חודש	שנה חודש
	שנה חודש
05/2016	05/2018
09/2018	09/2018

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	חוקר ראשי
אורן	ארסטר	
חוקרים משניים		
1	וליזר	בומברוב
2	גולנדר	נסליה
3	חיניץ	יבגני
4		
5		
6		
7		

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
הנהלת ענף הבקר המכון הווטרינרי	851-0000-14	50,000 90,000

ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתיבת דיווחים מטרת המחקר בכללותו היתה ייצור של חלבונים רקומביננטיים מזן Bluetongue virus (BTV) סרוטיפ 4, הנפוץ בישראל בשנים האחרונות, לשם יצירת אבטיפוס לחיסון רקומביננטי ולפיתוח מבחן ELISA מותאם לסרוטיפ הישראלי, השונה מ-BTV-4 האירופי. מטרת המחקר בשנה זו היו: ביטוי ביתר (Over-expression) בחיידקים, ניקוי וריכוז חלבוני המעטפת VP5 ו-VP2 של נגיף BTV-4 הישראלי, יצירת סרום היפר-אימוני בארנבות באמצעות החלבונים הרקומביננטיים, ופיתוח מבחן ELISA ספציפי לזן הישראלי על בסיס החלבונים הרקומביננטיים והסרום הספציפי להם. בתהליך הביטוי והניקוי נמצא כי החלבונים מתבטאים אבל שוקעים ויש צורך בתהליך משני של המסתם לפני ייצור הזרקה לארנבות. בוצעו מספר סבבים של ביטוי, ניקוי, ריכוז והמסה וכיול פרוטוקול הביטוי, עד לקבלת כמות ודרגת ניקיון מספקים שיאפשרו הזרקה לארנבות לקבלת סרום ספציפי. החלבון הרקומביננטי הועבר לחברה חיצונית ליצירת הסרום בארנבות. התהליך עדיין נמשך וטרם התקבל הסרום לאחר ההזרקה. המשך העבודה המתוכננת תכלול יצירת מבחן ELISA רקומביננטי ולאחר כילול, הכנסתו לשגרת האבחון במכון הווטרינרי.

ו. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

20.02.2019

תאריך
(שנה) (חודש) (יום)

רשות
המחקר

אמרכלות
(רשות המחקר)

מנהל המכרז
(פקולטה)

מנהל המחלקה

חוקר ראשי

ב. יעקובסון
מנהל המחלקה

אורן
חוקר ראשי

דו"ח לתכנית מחקר מספר 851-0351-15

**פיתוח אבטיפוס (prototype) לחיסון רקומביננטי כנגד הזנים הישראליים השכיחים
(סרוטיפים 2 ו-4) של נגיף הלשון הכחולה (Bluetongue virus)**

דו"ח התקדמות עבור שנת 2017-2018 מוגש להנהלת ענף הצאן ע"י

און ארטור	החטיבה לוורולוגיה, המכון הווטרנרי ע"ש קמרון
וליזר בומברוב	החטיבה לפרזיטולוגיה, המכון הווטרנרי ע"ש קמרון
נטליה גולנדר	החטיבה לוורולוגיה, המכון הווטרנרי ע"ש קמרון
יבגני חניניץ'	החטיבה לוורולוגיה, המכון הווטרנרי ע"ש קמרון

תקציר

מטרת המחקר בכללותו היתה ייצור של חלבונים רקומביננטיים מזן Bluetongue virus (BTV) סרוטיפ 4, הנפוץ בישראל בשנים האחרונות, לשם יצירת אבטיפוס לחיסון רקומביננטי ולפיתוח מבחן ELISA מותאם לסרוטיפ הישראלי, השונה מ-BTV-4 האירופי. מטרת המחקר בשנה זו היו: ביטוי ביתר (Over-expression) בחיידקים, ניקוי וריכוז חלבוני המעטפת VP5 ו-VP2 של נגיף BTV-4 הישראלי, יצירת סרום היפר-אימוני בארנבות באמצעות החלבונים הרקומביננטיים, ופיתוח מבחן ELISA ספציפי לזן הישראלי על בסיס החלבונים הרקומביננטיים והסרום הספציפי להם. בתהליך הביטוי והניקוי נמצא כי החלבונים מתבטאים אבל שוקעים ויש צורך בתהליך משני של המסתם לפני ייצור הזרקה לארנבות. בוצעו מספר סבבים של ביטוי, ניקוי, ריכוז והמסה וכויל פרוטוקול הביטוי, עד לקבלת כמות ודרגת ניקיון מספיקים שיאפשרו הזרקה לארנבות לקבלת סרום ספציפי. החלבון הרקומביננטי הועבר לחברה חיצונית ליצירת הסרום בארנבות. התהליך עדיין נמשך וטרם התקבל הסרום לאחר ההזרקה. המשך העבודה המתוכננת תכלול יצירת מבחן ELISA רקומביננטי ולאחר כיולו, הכנסתו לשגרת האבחון במכון הווטרנרי

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא.

חתימת החוקר _____ תאריך 20.02.2019

תוכן העניינים

1.	מבוא ותיאור הבעיה.....	2
2.	מטרות המחקר.....	3
3.	חומרים ושיטות לשנה הראשונה.....	3
4.	תוצאות לשנה הראשונה.....	4
5.	המשך העבודה המתוכננת.....	10
6.	רשימת ספרות.....	11

1. מבוא ותיאור הבעיה

מחלת כֶּחָלוֹן הַלְשׁוֹן או הַלְשׁוֹן הַכְחוּלָה (bluetongue – BT) נפוצה באוסטרליה, אסיה, אפריקה ואמריקה מהאזור הטרופי ועד לאזורים ממוזגים (צפון אירופה, צפון ודרום אמריקה) (Saegerman et al. 2008). המחלה דווחה לראשונה בישראל בשנות ה-40 של המאה ה-20 (Shimshony, 2004). המחלה פוגעת בבקר וכבשים, כאשר בבקר מופיעה וירמיה ממושכת שמלווה בהפסדים בתנובת החלב ובירידה משמעותית במשקל (>60%). בכבשים המופע הוא אקוטי על פי רוב, ומתבטא בחום גבוה, בצקות באזור הראש והלשון, כיחלון של הלשון במקרים מסוימים (מכאן שמה), דימום והפרשות מהאף. בחלק מהחיות החולות מופיעים נפיחות ובצקות באזור טלפיים (coronitis), מה שמביא לבעיות צליעה. במקרים רבים מביאה ההדבקה בזמן הריון להפלות ולידת וולדות עם מומים. אין הערכה עדכנית של העלויות השנתיות, אבל האומדן האחרון שפורסם הוא כ-3 מיליארד דולר בשנה בעולם כולו (Rushton and Lyons 2015). המחלה נגרמת על ידי נגיף מקבוצת ה-Rehoviridae, מהסוג Orbivirus ומועברת על ידי יבחושים מוצצי דם (מינים מהסוג *Culicoides*). עד כה זוהו בעולם כ-30 סרוטיפים (serotypes) שונים, מתוכם מעל לעשרה סרוטיפים בישראל (Brenner et al. 2010). החיסון המסחרי המצוי בשימוש באירופה כולל שילוב של מספר זנים, חלקם לא זוהו עדיין בישראל.

הבעיה: מיפוי שבוצע ב-בידודים ישראלים משנת 2012 של הזנים הישראליים הנפוצים בעדרי בקר וצאן, הראה כי הם שונים מהזנים המקבילים האירופיים, וכי חלו שינויים בבידודים החדשים, לעומת בידודים ישראלים משנים קודמות, של סרוטיפים אלה. בשל שינויים אלה עשויה להיווצר בעיה בחיסון המקומי כנגד סרוטיפים BTV אלה בישראל. למחלת BT אין תרופה או טיפול. טיפול מניעתי בישראל בוצע ע"י חיסון כבשים בלבד בתרכיב מוחלש עד שנת 2004, ומאז לא מחסנים כלל, למרות שהמחלה מתפרצת מדי שנה (אנדמית בישראל). אין כיום תרכיב מסחרי רקומביננטי. כל תרכיב חי ספציפי לסרוטיפ כנגדו הוכן, מכאן שאין לתרכיבים הקיימים הגנה צולבת. יתרה מזאת, נמצא כי הסרוטיפים השונים עוברים

הכלאות בשדה (reassortments) וזני תרכיב מוכלאים עם סרוטיפים בשדה (Batten et al., 2008). התמרות גנטיות אלה מביאות בחלק מהמקרים להגברת אלימות הנגיף מחד, ולירידה ביעילות התרכיב מאידך (Shaw et al. 2013). יתרה מזאת, השימוש בתרכיב מסחרי חי עלול להחדיר לישראל זנים שעדיין לא נמצאים כאן. לכן נוצר הצורך בפיתוח מקומי של תרכיב שייתן מענה כנגד הזנים הישראליים וזאת מבלי להפיץ במשק הישראלי זנים חדשים. מטרת עבודה זו ליצור חלבונים רקומביננטיים שמקורם בזנים המקומיים שבודדו לאחרונה, ולבחון את יעילותם ביצירת תגובה חיסונית בארנבות לשם יצירת סרום היפר-אימוני שימשמש לפיתוח מבחנים סרולוגיים וכבסיס ליצירת תרכיבים משופרים.

2. מטרת המחקר

מטרת המחקר

פיתוח אבטיפוס לתרכיב רקומביננטי כנגד BTV מבידודים ישראליים עדכניים ומדידת התגובה החיסונית שהוא יוצר בארנבות.

יעדי המחקר:

- (1) מיפוי וריצוף הגנים המקודדים לחלבונים VP2, VP5 של זני BTV הישראליים שבודדו מ-2012 ואילך.
- (2) יצירת חלבונים רקומביננטיים על בסיס הרצפים של התבדידים שזוהו כסרוטיפים 2 ו-4.
- (3) ביטוי וניקוי החלבונים הרקומביננטיים לדרגה שתאפשר יצירת סרום ספציפי.
- (4) בדיקת היווצרות תגובה ספציפית כנגד החלבון הרקומביננטי בארנבות
- (5) יצירת מבחן ELISA ספציפי בעזרת החלבונים הרקומביננטיים.

היעדים לשנה השלישית היו:

- (1) כיוול מערכת הביטוי החיידקית לביטוי חלבוני המעטפת VP5 ו-VP2 של סרוטיפ 4.
- (2) ייצור כמות מספקת בדרגת ניקיון מספקת של החלבונים ליצירת סרום בארנבות.
- (3) יצירת מבחן ELISA ספציפי שימדוד חשיפה לזן הישראלי בהתבסס על החלבונים הרקומביננטיים.

3. עיקרי החומרים והשיטות במחקר

3.1. בידודי זנים מקומיים 2 ו-4 של נגיף BT משנת 2012

הנגיפים בודדו מכבשים חולות ע"י גידול הנגיף בביצי SPF. זהות הנגיפים אומתה באמצעות בדיקות PCR וריצוף האזורים הקובעים את הסרוטיפיות. מיצוי ה-RNA הנגיפי בוצע באמצעות ערכת QIAMP viral RNA extraction של חברת Qiagen או עם ערכת InviSorb של חברת Stratec.

3.3. בדיקת רצף הגנים המקודדים ל-VP5 ו-VP2 ושיבוטם

לשם בדיקת הרצף של החלבונים האנטיגניים ותכנון השיבוט שלהם ממיצוי ה-RNA תוכננו מספר זוגות פריימרים שנועדו "לכסות" אזורים חופפים בגנום הנגיפי. הפריימרים הראשונים תוכננו על סמך רצפים ידועים של נגיף ה-BT ולאחר מכן תוכננו פריימרים על בסיס רצפי האזורים הנבדקים שהתקבלו בתהליך. התכנון בוצע בעזרת תוכנת Primer 3, באמצעות תוכנת Geneious. ה-RNA הנגיפי שימש כתבנית לריאקציית PCR עם Emerald Amp mix (Takara, Japan) עם מספר זוגות פריימרים. תנאי הריאקציה בכל שיבוט כוילו והותאמו לפי תוצאות ההגברה הראשונית עבור כל גן. בכדי לבצע את השיבוט המלא, את הבדיקות ואת קביעת הרצפים, תוכננו כ-8 זוגות פריימרים עבור VP2 BT2, כ-10 זוגות עבור BT4 VP2, כ-9 זוגות עבור VP5 BT2, וכ-5 זוגות עבור VP5 BT4 (כ-64 פריימרים). התוצרים ששימשו לשיבוט וקביעת הרצף נוקו לאחר הפרדה בג'ל אגרוז בערכת ניקוי תוצרים (GeneJet purification kit, Fermentas) והריכוז של כל הפקה נקבע באמצעות ספקטרופוטומטר (Fisher) Nanodrop.

3.4. איפיון הרצפים שהתקבלו מהבידודים המקומיים

לאחר קביעת הרצף המלא של ארבעת הגנים, בוצע ניתוח ביואנפורמטי שלהם ע"י השוואתם לגנים התואמים מסרוטיפים ידועים של הנגיף. הבדיקה בוצעה ע"י שימוש באלגוריתם ClustalW ולאחר מכן ע"י יצירת "בלוקים" עם תכנת Boxshade. אנליזה פילוגנטית בוצעה על ידי שימוש בשיטת Maximum Likelihood עם תכנת Mega6, בהסתמך על ה-alignment שבוצע עם ה-ClustalW.

3.5. שיבוט הגנים לפלסמיד ביטוי

בוצע ניסיון לשבט תחילה את הרצפים לפלסמיד השיבוט pGEM-T Easy (חברת Promega), אולם השיבוט היחיד שהצליח היה של הגן המקודד לחלבון VP5 של זן BT2. לאור זאת הוחלט לשבט את תוצרי ה-PCR ישירות לפלסמיד הביטוי pET28b, באמצעות ליגציה לאחר חיתוך, שאמורה להיות חזקה יותר מליגציית ה-T/A. לצורך כך תוכננו פריימרים שיחברו אתרי חיתוך לרצף המוחדר. גם ניסיונות אלה נכשלו. לפיכך תוכנן שיבוט סינתטי של הגנים ישירות לפלסמיד הביטוי ע"י ספק חיצוני, תוך שינוי ה-codon usage והתאמתו לביטוי במערכת חיידקית (Chung and Lee 2015).

הגנים הסינתטיים סונתזו כך שהם מאוחים ל- 6XHis tag בכדי לאפשר זיהוי באמצעות נוגדן ספציפי, וניקוי על ידי Affinity chromatography. הגנים חוברו בליגציה ישירות לפלסמיד הביטוי pET28b, אשר הוחדר לתאי *E. coli* מזן BL21 PLYS. מושבות החיידקים לאחר טרנספורמציה נבדקו בשלב הראשון לנוכחות הפלסמיד באמצעות PCR, ובשלב השני לביטוי החלבונים. הבדיקה בוצעה ע"י small scale induced expression באמצעות IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactoside, Sigma Aldrich). המושבות גודלו עד לשלב הגידול החצי-לוגריתמי ולאחר מכן בוצעה השראת ביטוי במשך 2-3 שעות. בוצעה השראת ביטוי ב-37°C וב-28°C לשם השוואה וקביעת התנאים האופטימליים לביטוי.

3.6. ביטוי ראשוני של החלבונים VP2, VP5 במערכת ביטוי חיידקית.

הפלסמיד pET28b הוחדר בתחילה לחיידקים מזן JM109 בכדי לקבל כמות מספקת לביצוע אנליזות רצף וטרנספורמציה לביטוי, ונוקה באמצעות Plasmid purification kit. לאחר מכן הוחדר הפלסמיד לחיידקים מזן BL21 PLYS באמצעות Heat-shock transformation. מושבות החיידקים נסרקו באמצעות PCR לנוכחות הפלסמיד. מושבות חיוביות נבחרות לגידול ונבדקו להשראת ביטוי באמצעות IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactoside, Sigma Aldrich). המושבות גודלו עד לשלב הגידול החצי-לוגריתמי ולאחר מכן בוצעה השראת ביטוי במשך 2-3 שעות. בוצעה השראת ביטוי ב-37°C וב-28°C לשם השוואה וקביעת התנאים האופטימליים לביטוי.

לאחר השראת הביטוי נאספה כל מושבה והורחפה ב- SDS PAGE sample buffer ע"י הרתחה במשך 5 דקות. דגימה מכל מושבה הוטענה על ג'ל polyacrylamide ובוצעה הפרדת חלבונים באמצעות Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). הג'ל נצבע בצביעת Coomassie לאיתור החלבון הרקומביננטי. במקביל בוצעה אנליזת Western עם נוגדן כנגד ה- 6XHis tag לזיהוי נוכחות החלבונים הרקומביננטיים בכל מושבה.

ביטוי חלבוני הנגיף הרקומביננטיים ב- *E. coli*

3.4. לאחר איתור מושבות המבטאות את החלבונים הרקומביננטיים, בוצעו ניסיונות לביטוי ובניקוי ב- Large scale של החלבונים. כל חלבון יוצר ע"י גידול התאים המבטאים אותו בנפח של 500 מ"ל LB, וצפיפות התאים נמדדה ב- O.D.₆₀₀ עד הגעה לקריאה של 0.6. בשלב זה הוספו 0.5mM IPTG והושרה ביטוי ביתר במשך 4 שעות. לאחר בדיקת הביטוי בטמפרטורות שונות נקבעה טמפר' של 28°C להמשך העבודה, עבור שני החלבונים – VP5 ו- VP2. התרבויות נדגמו לפני ואחרי השראת הביטוי, לשם הרצת ג'ל ביקורת לתהליך.

3.4.1. לאחר השראת ביטוי, התאים עברו 5 מחזורי סוניקציה ב- Lysis buffer (Tris-HCl pH8, 300mM) עד לקבלת תמיסה הומוגנית של תאים מפורקים. (NaCl, 10mM imidazole, 0.5% Triton X-100)

המשקע והפרקציה המסיסה הופרדו ע"י סרוז (10 דקות, 20K g, 4°C) ונבדקו באמצעות SDS-PAGE לנכחות החלבונים הרקומביננטיים.

3.4.2. המסת החלבונים לאחר ביטוי ויצירת משקע (aggregates) בוצעה באמצעות המסת בתמיסת Lysis buffer המכילה 8M Urea ע"י סוניקציה שניה והרחפה באמצעות Stirring במשך שעתיים ב-4°C. לאחר ההרחפה בוצע סרוז שני (30K g, 4°C, 15min), הפרקציה המסיסה נאספה ונמהלה ביחס 1:4 ב-Lysis buffer בכדי להוריד בהדרגה את ריכוז ה-Urea. התמיסה לאחר מיהול סוננה במסנן של 0.45µm. דגימה מכל שלב בתהליך נלקחה לשם הרצת ג'ל ביקורת.

3.4.3. ניקוי וריכוז החלבונים המורחפים ע"י Affinity chromatography בוצע ע"י ערבוב התמיסה המסוננת עם 1ml Nickel NTA beads במשך שעתיים ולאחר מכן העברת התערובת דרך עמודת ניקוי (Bio-Rad minicolumn). פרקציית ה-Flow through נאספה ומצע ה-beads נשטף עם עשרה נפחים של wash solution (Tris-HCl pH8, 300mM NaCl, 20mM imidazole). לאחר השטיפה בוצעה אלוציה לחלבונים באמצעות Elution buffer (Tris-HCl pH8, 300mM NaCl, 250mM imidazole).

3.5. יצירת סרום כנגד החלבון הרקומביננטי

החלבון BTV4VP2 הועבר לספק שירות חיצוני (אדר ביוטק) לשם יצירת hyper-immune serum באופן הבא:

א. כמות של 0.25mg אנטיגן (Ag) בבופר המינציו לאחר דיאליזה (לסילוק ה-imidazole) לארנבת, הוזרקה לשתי ארנבות (חיסון).

ב. נלקחו דגימות דם מכל חיה 21 יום לאחר החיסון.

ג. זריקת דחף (boost) עם כמות של 0.25mg אנטיגן (Ag) ניתנה חודש לאחר החיסון.

ד.

עם כמות זהה של אנטיגן. לאחר עוד 30 יום ניתן דחף זהה, נוסף.

ג. הסרום נוקה ונבדק ב-ELISA עם מיהולים סדרתיים כנגד החלבון הרקומביננטי, כאשר החלבון קובע לפלטת הניסוי בריכוז של 4µg/ml בבופר bicarbonate. הפלטה הוגבה עם נוגדן שניוני מצומד ל – Horseradish peroxidase (HRP), הוסף סובסטרט כרומוגני והיווצרות הצבע נמדד בספקטורופוטומטר באורך גל של 595nm.

4. תוצאות המחקר

4.1. קביעת הרצף לגנים המקודדים לחלבון VP2 מזנים 2 ו-4 וניתוח הרצפים

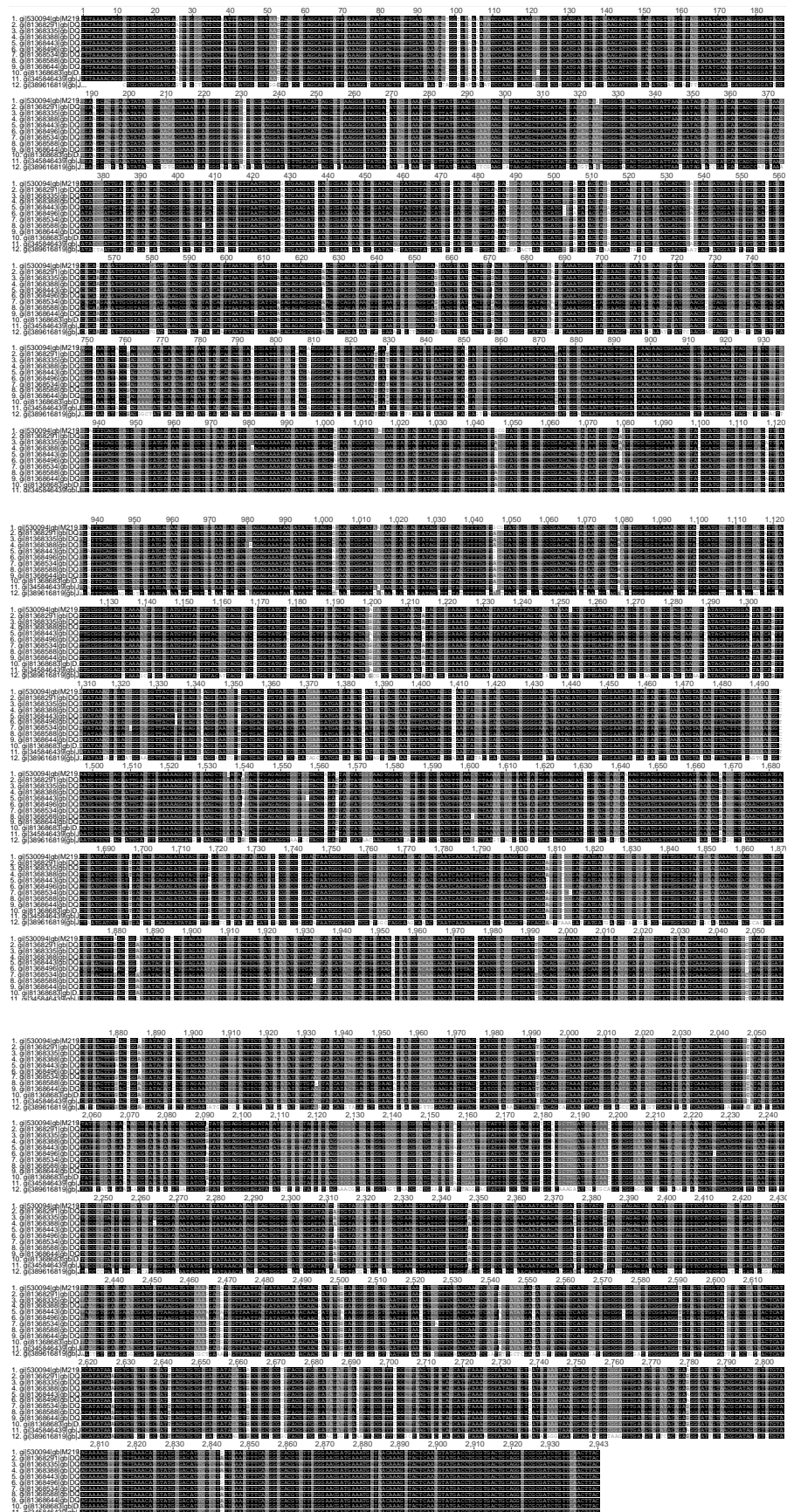
הגן מסרוטיפ 2 רוצף בחמישה מקטעים חופפים לפי הפירוט הבא:

מקטע	אזור בסגמנט 2
1	1-610
2	458-1168
3	790-1924
4	1710-2666
5	2010-2917

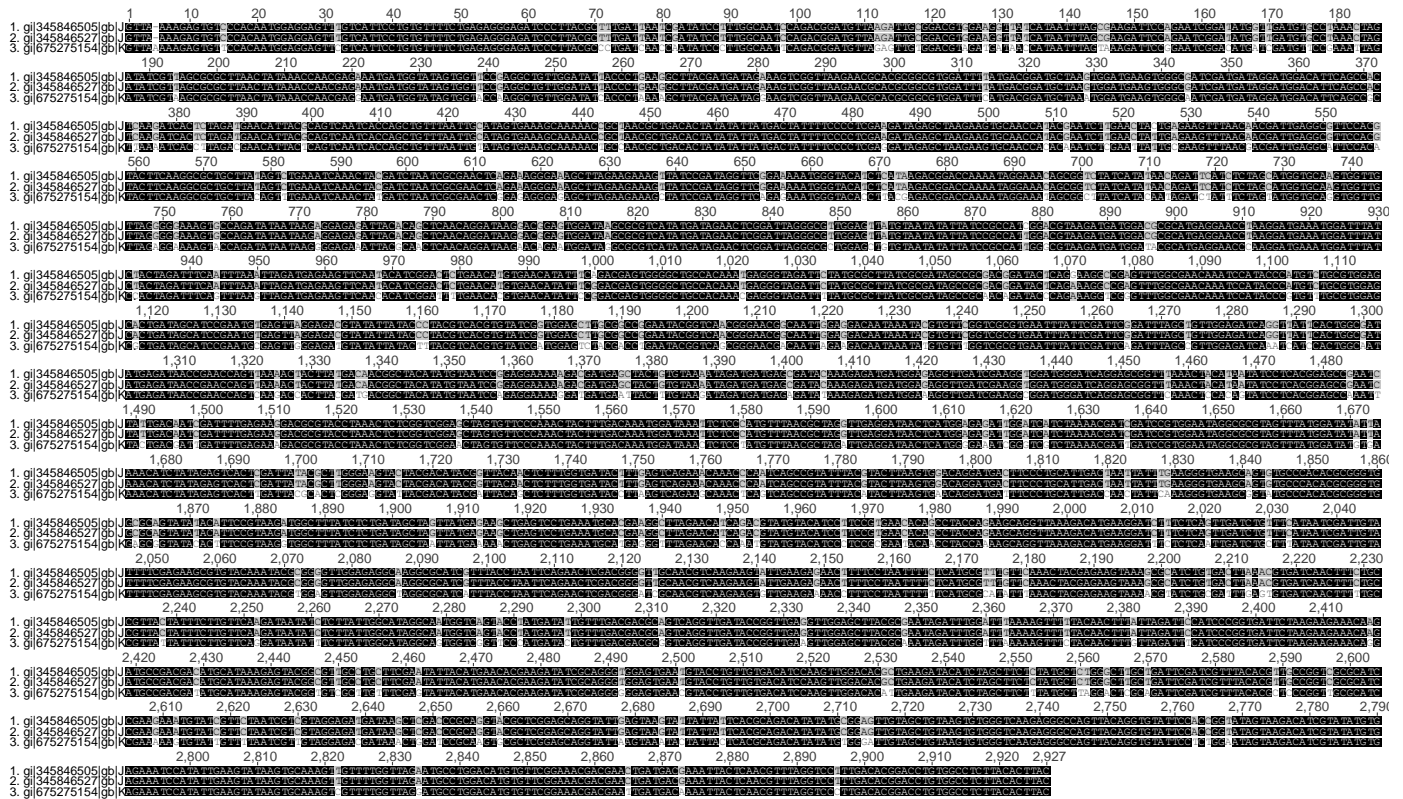
הגן מסרוטיפ 4 רוצף בארבעה מקטעים חופפים לפי הפירוט הבא:

מקטע	אזור בסגמנט 2
1	1-666
2	530-1610
3	940-2150
4	1570-2890

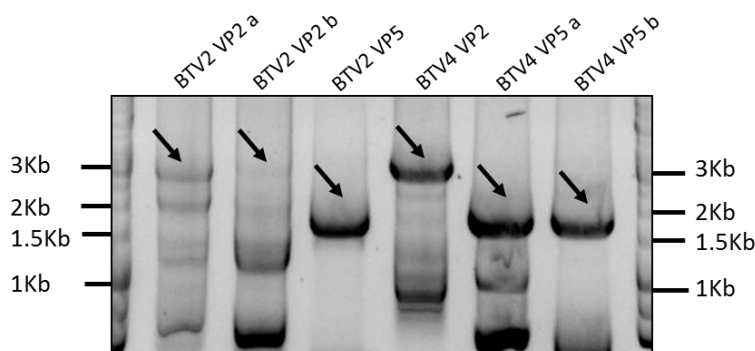
הרצפים הושוו לרצפים מתועדים של VP2 ונמצא כי בין הבידודים השונים של זן 2 יש זהות של 93.8% (איור 1), ואילו בזן 4 הזהות היא 92.8% (איור 2). השוואה בין שני הרצפים שבודדו בעבודה זו העלתה זהות של 53% ביניהם (איור 3). יש לציין שאלו שיעורי זהות נמוכים מאד ומצביעים על הצורך בבדיקה מתמדת של השתנות הגנים האלו, וזאת בניגוד לגנים אחרים כמו VP6 ו- NS3/3A שהדמיון שלהם זה לזה בין סרוטיפים שונים הוא גבוה הרבה יותר.



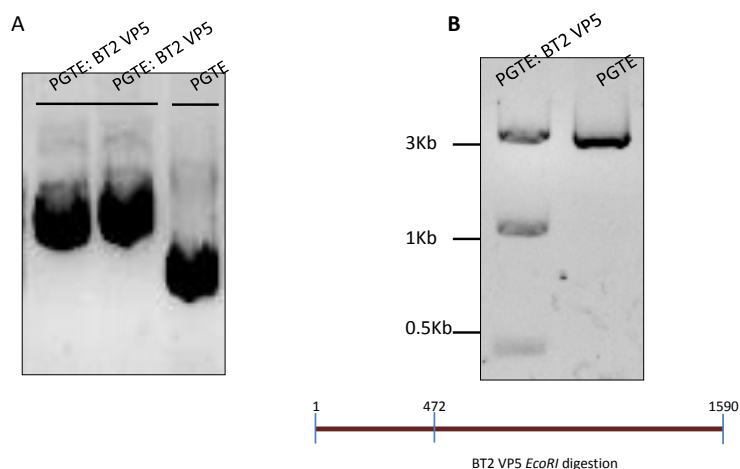
איור 1. ניתוח הרצף המקודד לחלבון VP2 מזן 2. הרצף השווה לרצפים מקבילים מבידודים אחרים מזן 2, באנליזת ClustalW ועובד בתכנת Boxshade. נמצאה זהות של 93.8% בין הרצפים.



איור 2. ניתוח הרצף המקודד לחלבון VP2 מזן 4. הרצף השווה לרצפים מקבילים מבידודים אחרים מזן 4, באנליזת ClustalW ועובד בתכנת Boxshade. נמצאה זהות של 92.8% בין הרצפים.



איור 4. הגברת הרצפים המלאים של הגנים המקודדים לחלבוני VP2, VP5 מזנים 2 ו-4 לשם שיבוט. לאחר כיוול תנאי הביטוי בוצעה בהצלחה הגברת PCR לארבעת הגנים. בנתיבים 1 ו-2 משמאל ניתן לראות תוצרים לא ספציפיים בהגברת BT2 VP2, כמו גם בנתיב 4 משמאל בהגברת BT4 VP2. לעומתם, תוצרי ה-PCR של VP5 היו ספציפיים יותר (נתיבים 3, 5 ו-6 משמאל).



איור 5. בדיקות שיבוט BT2 VP5 לפלסמיד pGEM-T Easy. (A) הפרדת ג'ל אגרוז של פלסמידים לא חתוכים. שני הנתיבים השמאליים מכילים פלסמיד עם הגן ואילו הימני מכיל פלסמיד ריק. (B) הפרדת ג'ל אגרוז לאחר חיתוך עם *EcoRI*. הפלסמיד נחתך פעמיים באתר השיבוט, משני צידי המחדר, והגן עצמו נחתך פעם אחת, כפי שמופיע במפת החיתוך מתחת לתמונת הג'ל. בנתיב השמאלי מופרד חיתוך של פלסמיד עם הגן ובימני פלסמיד ריק.

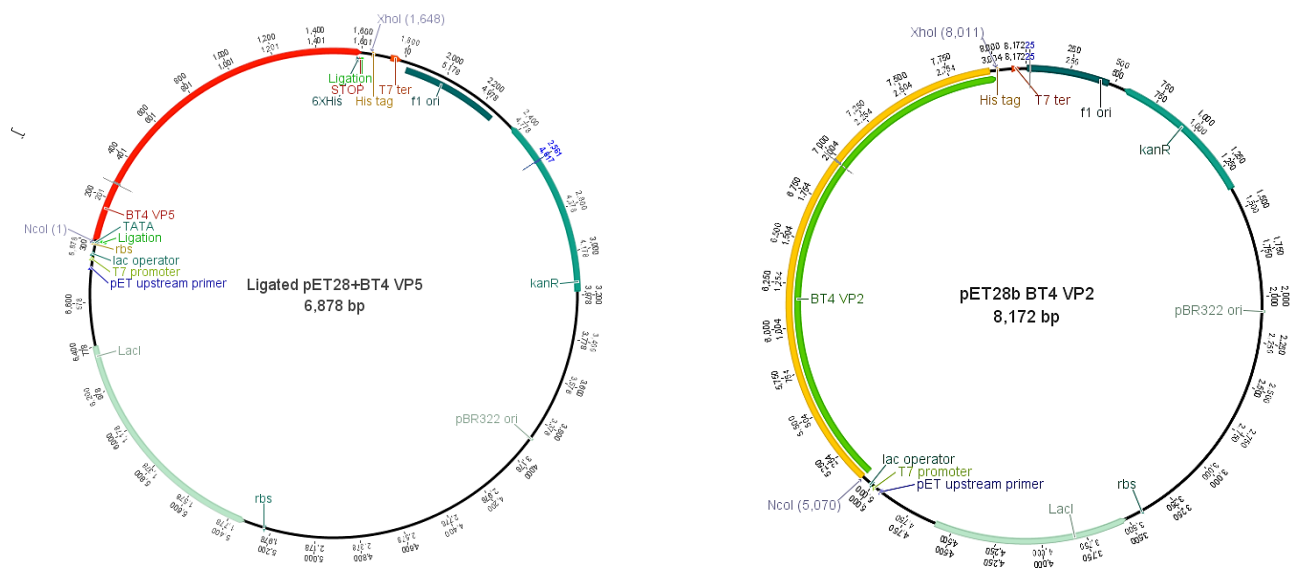
4.3. אופטימיזציה ל- *Bacterial codon usage* של הגנים המקודדים ל- BT4 VP2, BT4 VP5. חלבוני BT מבוטאים על ידי מערכת הביטוי של מאחסן הנגיף – היונק (כבשה, פרה, וכד') או החרק המעביר אותו (*Culicoides* spp.). על מנת לשפר את הסיכויים לביטוי יעיל בכמות גדולה של החלבונים הנגיפיים במערכת ביטוי חיידקית, הגנים עברו שינויים שאמורים להתאים אותם למערכות השיערוק

והתרגום החיידקיות (Chung and Lee 2015). הגנים ה"חדשים" עבור תרגום *In silico* בכדי לוודא שהחלבון המתורגם אכן זהה לחלבון שמקודד ע"י הגנים ה"מקוריים". הרצפים המותאם לביטוי חיידקי ותוצרי התרגום שלהם מופיעים באיור 5.

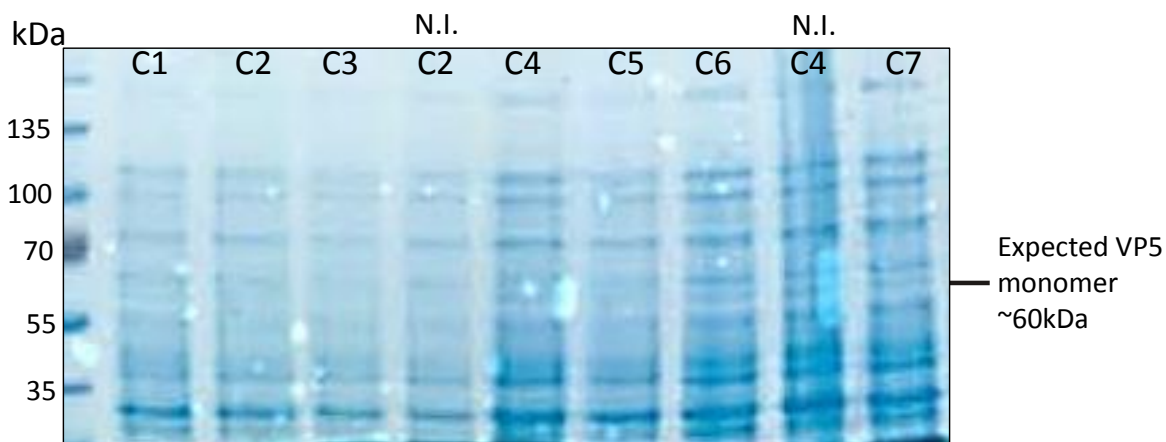
4.4. ביטוי החלבונים BT4 VP2, BT4 VP5 בחיידקי BL21.

לאחר ייצור כמות מספקת של פלסמידי הביטוי בזן JM109 (כ- 4 עד 5 מיקרוגרם מכל פלסמיד, איור 6), בוצעה טרנספורמציה לחיידקי BL21 PLYS המיועדים לביטוי מושרה של חלבונים רקומביננטיים. מכל טרנספורמציה נלקחו 8 מושבות לבדיקת ביטוי. המושבות הועברו לתרבית בטלטול וגודלו כ-16 שעות עד לשלב החצי לוגריתמי. בשלב זה פוצלו חלק מהתרביות לשתי מבחנות, כאשר מבחנה אחת גודלה כבקורת ללא IPTG (N.I. – Not Induced) ואילו לשניה הוסף IPTG בריכוז סופי של 0.4mM. התרביות גודלו במשך 2-3 שעות נוספות בטלטול ולאחר מכן הורתחה כל דוגמא עם protein loading buffer למשך 5-6 דקות לפירוק התאים והוצאת החלבון.

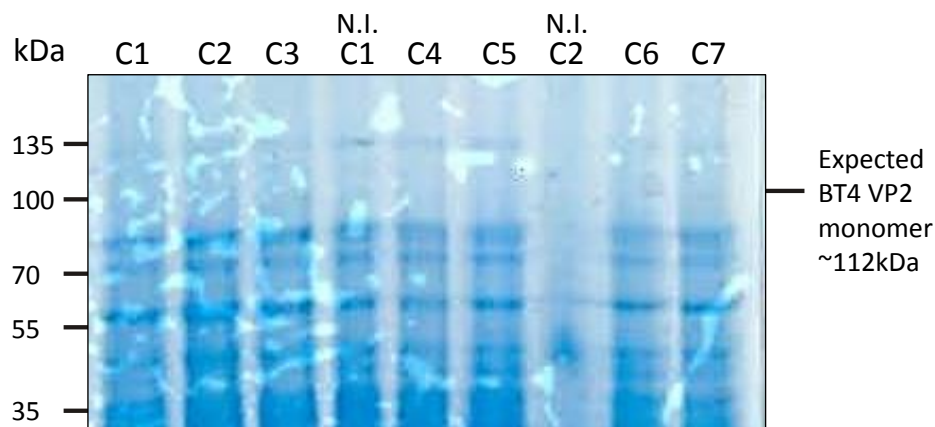
הדגימות הופרדו בג'ל אקרילאמיד ב-SDS PAGE והג'ל נצבע בצביעת Coomassie לאיתור הבדלים בין דגימות הבקורת (ללא IPTG) והדגימות שגודלו בתנאי אינדוקציה. בדיקת הביטוי של המושבות שעברו טרנספורמציה עם VP5 בטמפ' של 37°C הראתה ביטוי של חלבון בגודל הצפוי – כ-60kDa לצורת המונומר של VP5 (איור 7). בניסיון לשפר את הביטוי בוצע תהליך הגידול והאינדוקציה בטמפ' של 28°C, והתקבל ביטוי טוב קצת יותר, אבל עדיין חלש (איור 8). בדיקת המושבות שעברו טרנספורמציה עם פלסמיד לביטוי החלבון VP2 לא הראתה ביטוי בר גילוי בצביעת Coomassie, ועל פי דפוס ההרצה בג'ל תהליך פירוק החיידקים לפני ההרצה לא היה יעיל במידה הדרושה להפרדת חלבונים ב-SDS PAGE (איור 8). בכדי לבדוק את ביטוי החלבון, על אף הפירוק החלקי של התאים, בוצעה אנליזת Western blot עם שימוש בנוגדן ראשוני כנגד 6XHis tag, שנועד להגיב עם התג שהוסף לחלבוני הנגיף הרקומביננטיים. לבדיקת הביטוי הורצו מושבות לפני ואחרי השראת ביטוי ב-SDS-PAGE, בוצע טרנספר לממברנת ניטרצולוז והממברנה נחסמה והוגבה עם נוגדנים מתאימים, ובוצעה אנליזת ECL לגילוי נוכחות החלבונים הרקומביננטיים (איור 9).



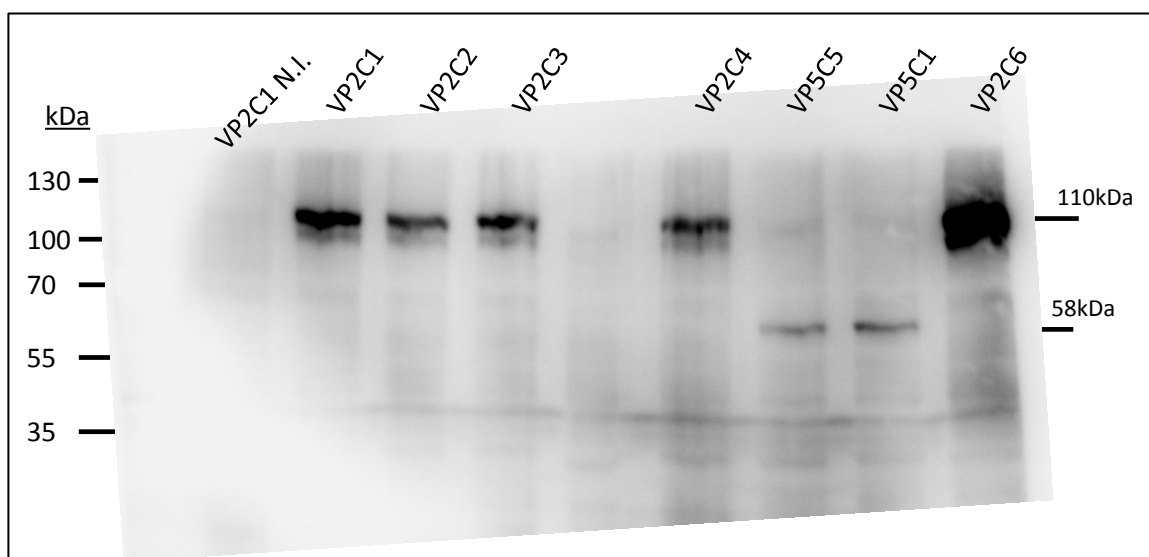
איור 6. פלסמיד הביטוי pET28 עם הגן המקודד ל- BT4 VP2 (ימין) והגן המקודד ל- BT4 VP5 (שמאל). הגנים הוחדרו לאחר אופטימיזצית Codon usage לביטוי חיידקי והוצמד להם His₆ Tag בקצה ה-C. ביטוי החלבון הרקומביננטי מבוצע תחת בקרה של Lac operon עם IPTG כ- Inducer.



איור 7. ביטוי מושרה של מושבות BL21 לחלבון BT4 VP5 ב- 28°C. תרביות שמקורן במושבות 1,2,3,4,5,6,7 גודלו כמתואר בהסבר לאיור 4, אבל השראת הביטוי בוצעה בטמ'פ של 28°C. תרביות ממושבות 2 ו- 4 גודלו במקביל ללא השראת ביטוי (ללא IPTG).



איור 8. ביטוי מושרה של מושבות BL21 לחלבון BT4 VP2 ב-28°C. תרביות שמקורן במושבות 1,2,3,4,5,6,7 גודלו כמתואר בהסבר לאיור 4, אבל השראת הביטוי בוצעה בטמפ' של 28°C. תרביות ממושבות 1 ו-2 גודלו במקביל ללא השראת ביטוי (ללא IPTG). הפירוק וההרצה של החיידקים בניסוי זה לא עבדו כראוי ואין אפשרות לקבוע האם היה ביטוי רקומביננטי של חלבון מסוים.



איור 9. בדיקת ביטוי מושרה של מושבות BL21 לחלבוני BTV4 באנליזת WB. הרצת הדגימות לפני ואחרי השראת ביטוי בוצעה כמתואר לעיל. לאחר ההפרדה בג'ל בוצע טרנספר לממברנה שנחסמה והוגבה עם נוגדן ראשוני כנגד 6XHis tag ולאחר מכן עם נוגדן שניוני מצומד ל-HRP. לאחר השטיפות בוצעה אינקובציית ECL והממברנה נחשפה לצילום.

סדר הדגימות משמאל לימין: מושבה 1 של חלבון VP2 ללא הוספת IPTG, מושבות 1,2,3 של חלבון VP2 עם IPTG, מושבה 2 של חלבון VP2 ללא הוספת IPTG, מושבות 5 ו-1 של חלבון VP5 עם IPTG, מושבה 6 של חלבון VP2 עם IPTG. משמאל לתמונה מופיעים סמני הגודל שהורצו בג'ל ומימין הגדלים הצפויים של המונומר של כל חלבון - עבור VP5 ~58kDa ו- עבור VP2 ~100kDa.

4.5. איתור מושבות החיידקים המבטאות ביתר את חלבוני הנגיף.

בדיקת הביטוי של חלבון BTV4VP5 ע"י הרצת מיצוי התאים בג'ל וצביעת Coomassie לא הראתה ביטוי ברור של החלבון הרקומביננטי, בהשוואה למושבות שלא עברו ביטוי מושרה עם IPTG (איור 10A). לכן בוצעה בהמשך אנליזת Western blot בה נעשה שימוש בנוגדן כנגד 6XHis tag שמאוחה לחלבונים הנגיפיים. בדיקה זו רגישה וספציפית בהשוואה לצביעת הג'ל. הבדיקה העלתה כי שמונה המושבות שנבדקו ביטאו כולן את החלבון. עוד העלתה הבדיקה כי גם ללא השראה באמצעות IPTG, התאים ביטאו את החלבון הרקומביננטי, אם כי בכמות מעטה יותר (איור 10B). בדיקה זו אישרה כי אכן חלבון VP5 מתבטא במלואו במערכת החיידקית.

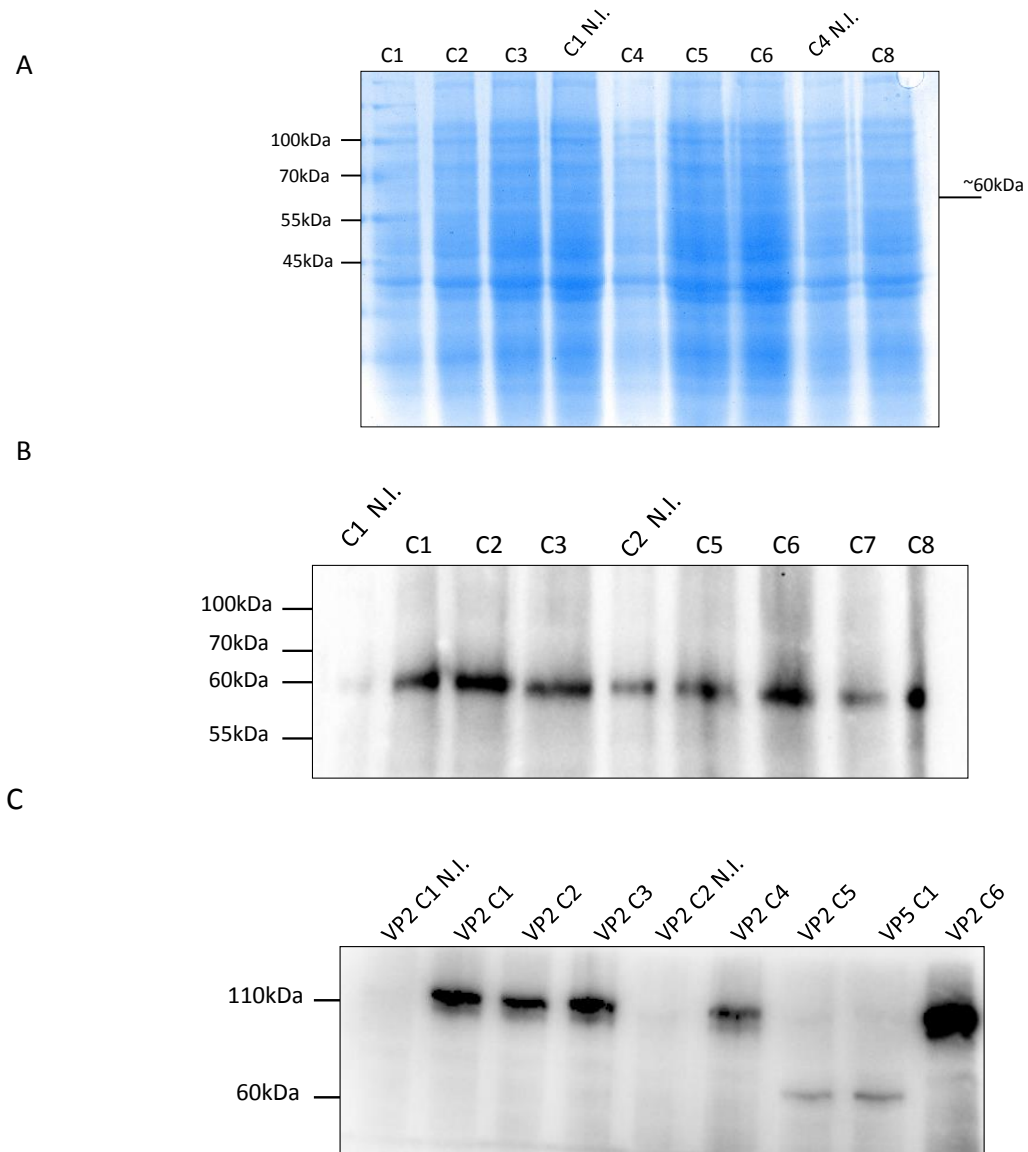
בדיקת הביטוי של חלבון VP2, הכפול כמעט בגודלו לעומת VP5 (110kDa לעומת כ-60kDa, בהתאמה), הראתה כי גם במקרה זה, כל המושבות שנבדקו ביטאו בהצלחה את החלבון. בניגוד לתוצאה שהתקבלה עם VP5, שתי המושבות שנבדקו ללא IPTG לא ביטאו את החלבון (איור 10C). בדיקות אלו הראו כי מערכת הביטוי החיידקית ביטאה בהצלחה את שני החלבונים הנגיפיים. באופן מפתיע נראה כי הביטוי של חלבון VP2 היה חזק יותר מזה של VP5, אע"פ שגודלו כמעט כפול (איור 10C).

4.6. ניקוי חלבוני הנגיף על ידי Affinity purification

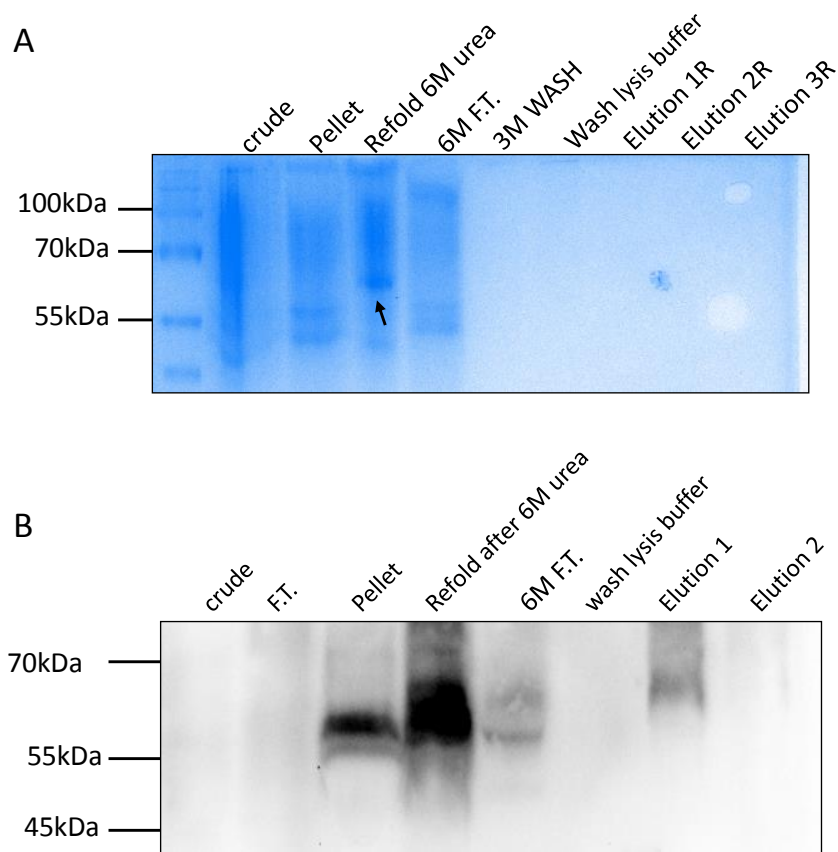
לאחר השגת ביטוי חזק של שני החלבונים הנגיפיים בתאי *E. coli*, נעשה ניסיון לרכז ולנקות אותם ישירות לאחר פירוק התאים בסוניקציה, ואולם בשני המקרים נמצא שהחלבונים התרכזו בפרקציית המשקע ולא ניתן היה למצות אותם ישירות. על מנת להמיס את החלבונים הנגיפיים בוצעה הרחפה למשקע (pellet) שנצר לאחר פירוק התאים בסוניקציה, באמצעות ריכוזים משתנים של Urea.

4.6.1. ניקוי וריכוז BTV4VP5

בניסיון לנקות ולרכז את חלבון VP5 התקבל מעט מאד חלבון על פי הרצת המיצויים בג'ל וצביעתם ב-Coomassie (איור 11A). אנליזת Western הראתה נוכחות של החלבון בפרקציית המשקע לאחר שהורחף עם 6M urea, ולאחר מכן בפרקציית ה-Flow through (F.T.). מתוצאות אלו נראה כי אין כלל קישור יעיל לקולונה ולמרות נוכחות ה-6XHis tag, החלבון לאחר המסה אינו נקשר לקולונה. בהמשך לכן, נראה כי פרקציות האלוציה לא הכילו כלל את החלבון (איור 11). התוצאות מניסיון הניקוי של VP5 הראו כי כל החלבון מתרכז במשקע וכי גם לאחר המסה עם urea, הקישור לקולונה אינו יעיל, ומרבית החלבון אינה נקשרת כלל (נשטפת עם ה-Flow through), או נשטפת בשלב השטיפה, עם חלבונים נוספים שנקשרים בצורה לא ספציפית לקולונה.



איור 10. בדיקת ביטוי ביתר לחלבוני נגיף BTV בתאי *E. coli*. (A) צביעת Coomassie לבדיקת ביטוי לחלבון VP5 בג'ל. נבדקו מושבות 1 עד 6, ו-8. מושבות C1 ו-C4 גודלו במקביל עם וללא המשרן IPTG, לשם השוואת הביטוי לפני ואחרי השראה וסומנו C1 N.I. ו-C4 N.I., בהתאמה. גודל החלבון הצפוי הוא כ-60kDa. (B) אנליזת Western עם נוגדן כנגד 6XHis tag לבדיקות ביטוי לחלבון VP5. נבדקו מושבות C1 עד 6, כאשר מושבות 1 ו-2 גודלו לשם ביקורת גם ללא השראת IPTG (C1 N.I., C2 N.I.). לשם השוואה הורצו מושבות C1, C5 המבטאות את VP5. (N.I.).

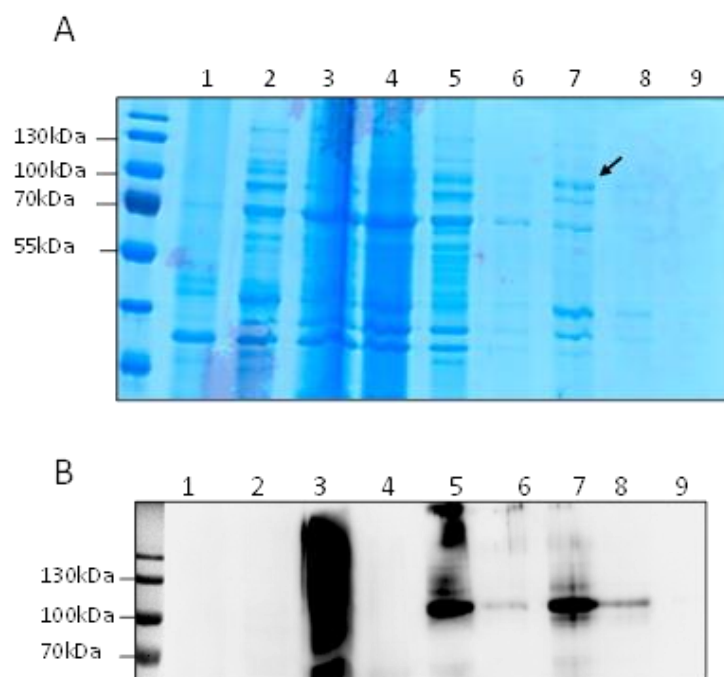


איור 11. ניסיון לניקוי וריכוז BTV4VP5 באמצעות המסת המשקע עם Urea. (A) צביעת Coomassie לבדיקת ביטוי לחלבון VP5 בג'ל. בכל שלב בניקוי נלקחה דגימה להרצה, כמפורט בכל נתיב הרצה. החלבון בנתיב הדגימה שנלקחה לאחר המסת המשקע עם 6M Urea מסומן בחץ. גודל החלבון הצפוי הוא כ-60kDa. (B) אנליזת Western עם נוגדן כנגד 6XHis tag לבדיקות נוכחות חלבון VP5 בכל שלב, כמפורט בכל נתיב הרצה.

4.6.2. ניקוי וריכוז BTV4VP2

לאחר התוצאות שהתקבלו עם חלבון VP5, הוחלט לנסות לרכז את חלבון VP2, שכאמור, למרות גודלו, הביטוי שלו היה חזק יותר מזה של VP5 ולכן הוערך כבעל סיכוי רב יותר לעבור ניקוי וריכוז. לאחר שבירת התאים בסוניקציה, הורחף המשקע מיידית עם 8M urea, ונמהל פי 5, על מנת לנסות ולשפר את הקישור לקולונה. התרחיף המהול עורבב למשך שעתיים עם NiNTA beads לקשירת החלבון ובוצעו שטיפות ואלוציות. מבחינת נוכחות החלבון בשלבי התהליך נראה כי עדיין חלק גדול מהחלבון לא נקשר לקולונה ועובר בפרקציית ה-F.T. (איור 12, נתיב 5) או נשטף לפני האלוציה (איור 12, נתיב 6). עם זאת, נראה כי הקישור שופר לעומת הניסיון עם VP5, והתקבל חלבון בדרגת העשרה טובה, בפרקציית Elution 1 (איור 12A,B). דרגת הניקיון היתה טובה יותר בפרקציית Elution 2, אבל הכמות היתה מועטה מאד (איור 12A,B). על סמך תוצאה זו בוצע ניסיון נוסף להעשיר עוד יותר את פרקציית האלוציה, ע"י מיצוי החלבון

מהג'ל לאחר הפרדה ועל ידי אינקובציה נוספת לפרקציית ה- F.T. עם NiNTA beads (איור 13). גם בתהליך זה חלק גדול מהחלבון הנגיפי לא נקשר או נשטף מיד לאחר הקישור לקולונה, אבל נראה כי תהליך ההעשרה שופר והתקבלה כמות רבה יותר של חלבון בדרגת ניקיון טובה יותר מאשר בניסיונות הקודמים (איור 13, נתיב 12 – Elution 1 urea). נמצאה כמות גדולה של חלבון VP2 בכל הפרקציות שהתקבלו לאחר ההרחפה עם urea (פרקציות 7-12 באיור 13).



איור 12. ניסיון לניקוי

BT4VP2 לאחר המסה ב-

Urea 8M (A) צביעת

Coomassie לבדיקת נוכחות החלבון VP2 בג'ל. בכל שלב בתהליך נלקחה דגימה להרצה, כמפורט מטה. החלבון בנתיב 7 (אלוציה ראשונה) מסומן בחץ.

גודל החלבון הצפוי הוא כ-

110kDa (B) אנליזת Western

עם נוגדן כנגד 6XHis tag

לבדיקות נוכחות חלבון VP2

בכל שלב בתהליך.

סדר הטענת הדגימות:

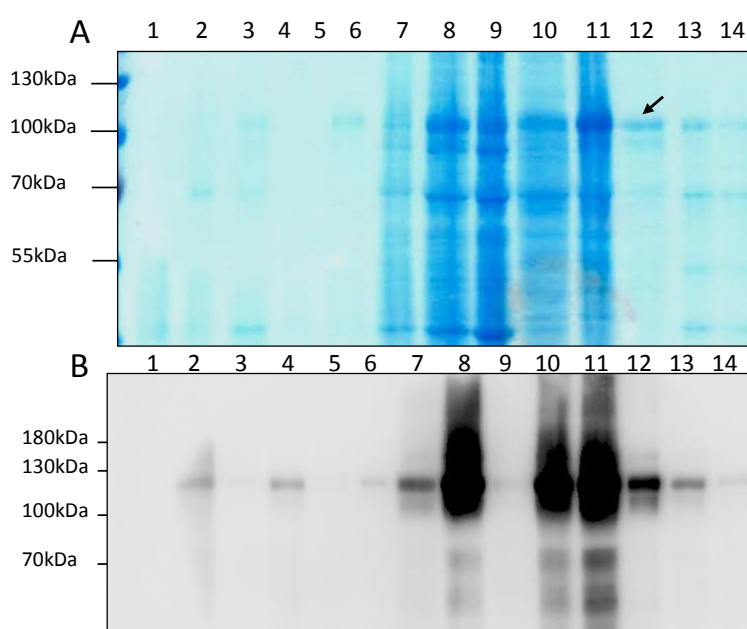
1. Crude C5, 2. BTV4VP2 sup after sonication and centrifugation, 3. Crude Pellet re-suspended in Urea 8M (U8), 4. Pellet sup after U8 and centrifugation, 5. BTV4VP2 F.T.II after dilution 5-Fold in lysis buffer and incubation with NiNTA beads for 2 hrs.
6. Wash II, 7. Elution 1 II, 8. Elution 2 II, 9. Elution 3 II

בפרקציה 9 (pellet after urea re-suspension) נראה בצביעת הג'ל כי יש כמות חלבון רבה, ואילו בתגובת ה- Western לא.

יתכן כי הריכוז הגבוה של חלבון דה-נטורטיבי יחד עם רב-סוכרים ושומן, שמתרכזים בפרקציית ה-pellet, עיכב את התגובה עם הנוגדן ולכן נתן תוצאת שווא שלילית בדגימה הזו.

4.6.3. הכנת חלבון BTV4VP2 להזרקה ליצירת סרום

בכדי להכין את הדגימה להזרקה, ולאחר בדיקה עם ספק החוץ המבצע את יצירת הנוגדים ע"י זרקה, הוחלט למצות את החלבון מג'ל לאחר הפרדה. לשם כך הורצה כמות גדולה של מיצוי החלבון כפי שהתקבל בניסוי המתואר לעיל. המיצוי הורץ במקביל ולאחר סימון החלבון בצביעת Coomassie (איור 14A) הוא נחתך מהג'ל, הורחף ודגימה הורצה שוב, עם דגימות ביקורת, על מנת לוודא את נוכחות וניקיון החלבון (איור 14B). בנתיב מס' 3 באיור 5B ניתן לראות כי החלבון נקי מאד בהשוואה לשלבי הניקוי הקודמים וכי העובדה שניתן לראות אותו בצביעת ג'ל מצביעה על כמות שאמורה להיות מספקת ליצירת תגובה חיסונית בהזרקה.



איור 13. ניקוי

BTV4VP2 לאחר

המסה ב- 8M Urea

ואינקובציה שניה עם

NiNTA beads (A)

צביעת Coomassie

לבדיקת ביטוי לחלבון

VP2 בג'ל. בכל שלב

בתהליך נלקחה דגימה

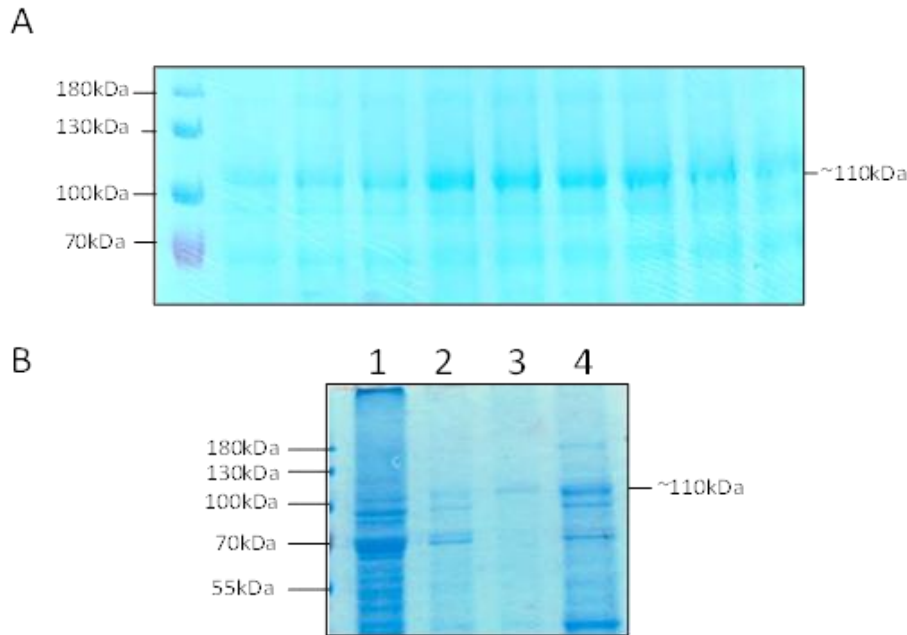
להרצה, כמפורט

מטה.

החלבון בנתיב 11 (אלוציה ראשונה לאחר המסה עם urea) מסומן בחץ. גודל החלבון הצפוי הוא כ- 110kDa. (B) אנליזת Western עם נוגדן כנגד 6XHis tag לבדיקות נוכחות חלבון VP2 בכל שלב בתהליך.

סדר הטענת הדגימות:

1. E1B, 2. Wash, 3. E2B, 4. E3B, 5. E1B gel extracted, 6. Non-Induced cells, 7. Induced cells,
8. Sup, 9. Pellet urea, 10. F.T. urea, 11. Wash urea, 12. E1 urea, 13. E2 urea, 14. E3 urea

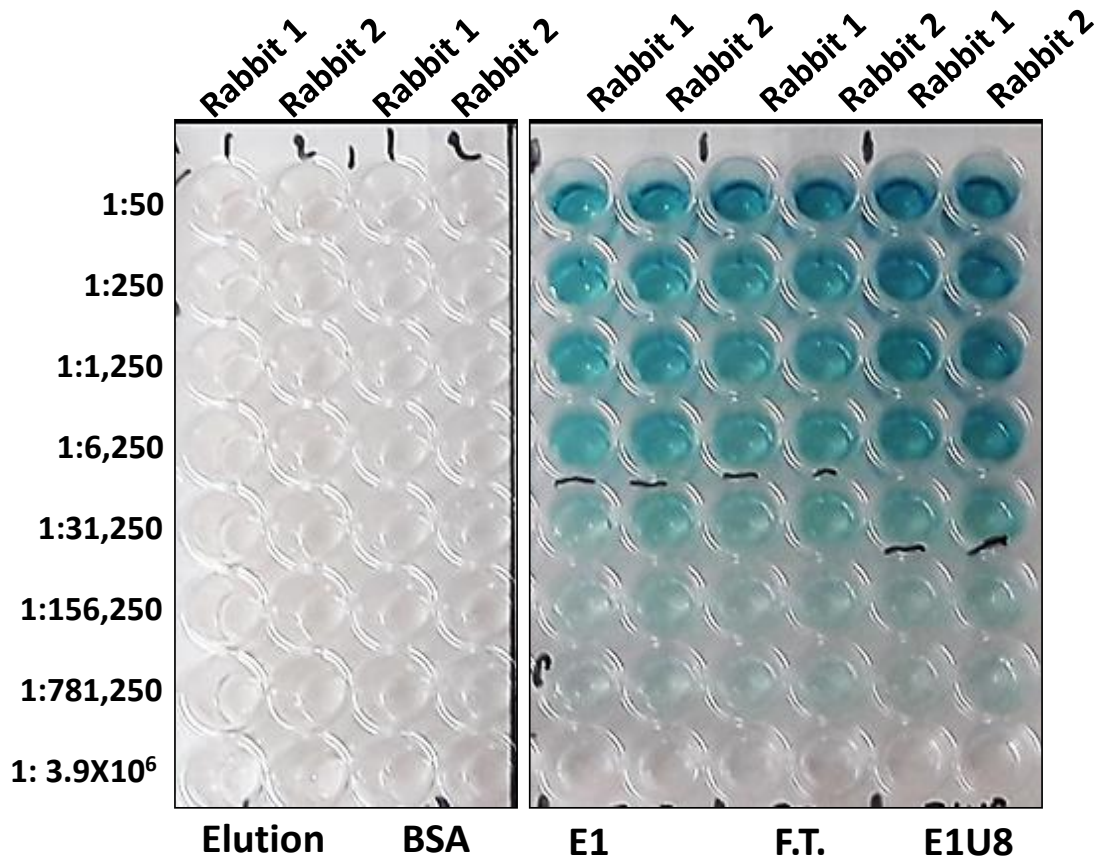


איור 14. הכנת החלבון BTV4VP2 להזרקה. (A) המיצוי לאחר המסה ב-urea (E1 urea) הורץ במקביל במספר נתיבים נחתך מהג'ל לאחר צביעה. גודל החלבון הצפוי הוא כ-110kDa. (B) צביעת Coomassie לאחר הרצת מיצוי מג'ל לצד ביקורות לבדיקת רמת הניקיון והכמות. סדר הטענת הדגימות: F.T. B, 2. WASH, 3. Gel extraction, 4. E1 B1.

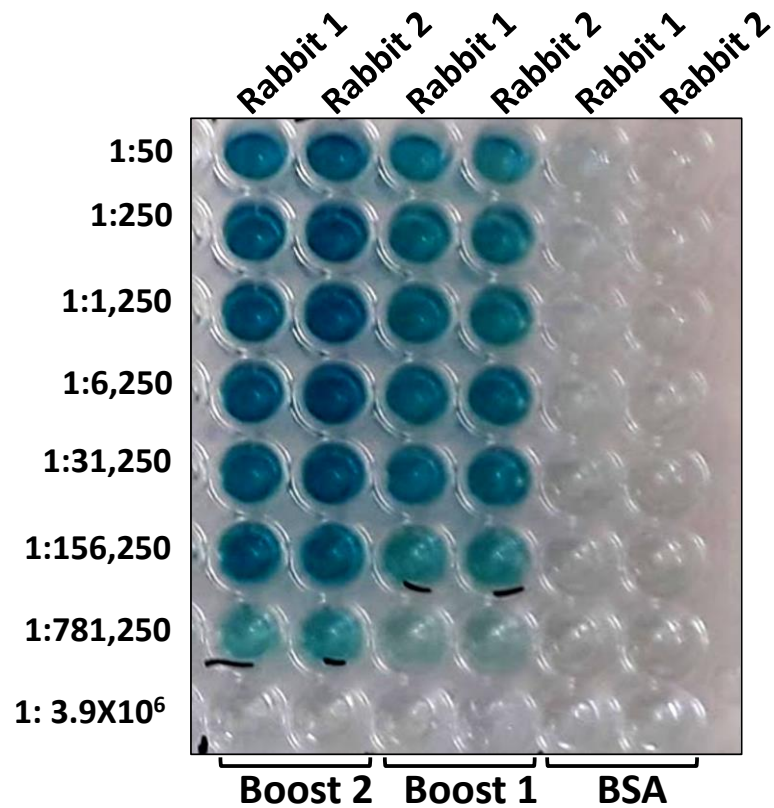
4.7. יצירת Hyper-immune serum כנגד החלבון הרקומביננטי

לאחר השוואה בין תוצרי הביטוי וההפקה (ניקוי, המסת משקע וריכוז) של החלבונים VP5 ו-VP2, נמצא כי למרות שגודלו של VP2 כמעט כפול מזה של VP5, ה-yield הסופי שלו היה טוב מזה של VP5. לפיכך נשלחו מנות של VP2 מנוקה ליצירת סרום ספציפי, כמתואר בפרק השיטות, סעיף 3.5. דגימות סרום משתי הארנבות שהשתתפו בניסוי נלקחו 21 יום לאחר ההזרקה ובוצעה בדיקת antigen ELISA כאשר החלבון הרקומביננטי קובע לפלטה בריכוז של $4\mu\text{g/ml}$.

התקבלה תגובה ספציפית בעצמה בינונית – בבדיקת ELISA נראית תגובה ספציפית במיהול של כ-1:31,000 עם הסרום שנלקח 21 יום לאחר החיסון, לעומת היעדר תגובה מוחלט עם סרום שנלקח טרם ההזרקה (איור 15). לאחר 15 יום מזריקת הדחף השניה נלקחו דגימות סרום נוספות ונבדקו באותו מבחן. הפעם כויל הנוגדנים הספציפיים היה גבוה באופן ניכר, ונמדד על לסף של 3.9×10^6 , פי מאה יותר מאשר לאחר זריקת החיסון (איור 16). תוצאה זו מראה כי תהליך היצור והניקוי של חלבון BTV4VP2 היה מספיק ליצירת סרום ספציפי שמתאים לשימוש בבדיקת ELISA לגילוי חשיפה ל-BTV-4.



איור 15. בדיקת נוכחות נוגדנים ספציפיים כנגד BTV4VP2 לאחר זריקת חיסון. דגימות סרום נלקחו 21 יום לאחר הזריקה ונמהלו סדרתית. דגימות הסרום נבדקו ע"י סדרת מיהולים לתגובה עם חלבון BTV-4VP2 רקומביננטי שקובע לפלטה במבחן ELISA. בכל שורת באריות המכילות VP2 רקומביננטי מקובע הוכנס מיהול עולה (ריכוז יורד) של סרום. דרגת המיהול מצוינת משמאל לכל שורה. Elution – סרום ללא אנטיגן מקובע. BSA – סרום עם BSA מקובע. E1 – סרום לאחר תגובה עם חלבון מקובע מהאלוציה הראשונה בניקוי. F.T. – סרום לאחר תגובה עם המיצוי שלא נצמד בניקוי (פרקציית ה- Flow through). E1U8 – סרום לאחר תגובה עם חלבון מקובע מהאלוציה הראשונה לאחר שעבר המסה ב- 8M urea. כל טור באריות מייצג סרום מארבת שונה.



איור 16. בדיקת נוכחות נוגדנים ספציפיים כנגד BTV4VP2 לאחר שתי זריקות דחף. דגימות הסרום נלקחו 15-21 יום לאחר זריקות הדחף ונמהלו סדרתית. דגימות הסרום נבדקו ע"י סדרת מיהולים לתגובה עם חלבון BTV-4VP2 רקומביננטי שקובע לפלטה במבחן ELISA. בכל שורת באריות המכילות VP2 רקומביננטי מקובע הוכנס מיהול עולה (ריכוז יורד) של סרום. דרגת המיהול מצוינת משמאל לכל שורה. Elution – סרום ללא אנטיגן מקובע. Boost 2 – מיהולי הסרום לאחר זריקת הדחף השניה. Boost 1 – מיהולי הסרום לאחר זריקת הדחף הראשונה. BSA – תגובה עם BSA מקובע.

5. מסקנות וכיווני מחקר עתידיים

הניסיון לבטא את חלבוני המעטפת VP5 ו-VP2 של נגיף BTV4 במערכת ביטוי חיידקית העלה כי אע"פ שמערכת הביטוי הוכחה כיעילה באלפי מחקרים, ואע"פ שביטוי חלבוני המעטפת של נגיפי Bluetongue בוצע במספר מעבדות בעולם (ככל הידוע לנו, לא בישראל) תהליך זה מורכב ודורש מאמץ רב. התהליך דרש עבודה רבה הן בשלב תכנון הגנים לביטוי, הן בניסיונות, שברובם כשלו, לשבט את הגנים מהגנום הנגיפי ולהכניסם לתוך פלסמיד הביטוי, והן בכיול התנאים לביטוי מוצלח. בנוסף נדרשה עבודה רבה לפיתוח תהליך המסת והעשרת החלבונים הנגיפיים, ברמה מספקת ליצירת סרום בהזרקה ולשימוש ב- ELISA ו-VNT. במגבלות המשאבים והזמן שהוקצו לפרויקט הוחלט להתמקד בייצור חלבוני מעטפת רקומביננטיים מנגיף BTV-4, שהוא הסרוטיפ הנפוץ בישראל בשנים האחרונות, על פי נתוני החטיבה לוורולוגיה במכון הווטרינרי. שני החלבונים בוטאו בהצלחה בתאי *E. coli* BL21, לאחר התאמת הגנים המקודדים להם ל-codon usage אופטימלי לביטוי בחיידקים. בדיקה חצי-כמותית של הביטוי הראתה כי למרות שחלבון VP2 גדול כמעט פי 2 מ-VP5 (110kDa לעומת 60kDa, בהתאמה), הוא התבטא טוב יותר וההעשרה שלו היתה טובה יותר. אמנם, הרכב חומצות האמינו בחלבון הוא הגורם העיקרי המשפיע על מסיסותו, אבל גם לגודל השפעה על איכות וכמות הביטוי, והיות ושני החלבונים, כאשר הם מתבטאים, חשופים לסביבת התא המאחסן, ניתן היה לצפות לתכונות מסיסות דומות. יש לסייג הנחה זו בכך שבאופן טבעי, החלבונים יוצרים מבנה טרימרי ואינם מופיעים על פני שטח הנגיף כמונומרים (Nason et al. 2004). הקשיים הרבים שהתעוררו, הן בשיבוט הגנים והן בתהליך העשרת החלבונים לאחר הביטוי בתאי חיידקים, גרמו לעיכוב ניכר בעבודה. לכן, לאחר המאמץ והזמן שהושקעו בשיבוט הגנים הנגיפיים, הוחלט להתמקד בשלב הביטוי, בחלבוני סרוטיפ 4 (BTV-4), הוא הסרוטיפ הנפוץ בישראל בשנים האחרונות, ושונה מזן BTV-4 האירופי. בדיקת ELISA שבוצעה עם החלבון הרקומביננטי BTV4VP2 ששימש ליצירת Hyper-immune serum הראתה כי נוצרו נוגדנים ספציפיים בכייל גבוה (מעל 8×10^5) לאחר החיסון. ניסוי זה אישר כי החלבון הרקומביננטי יצר תגובה מספקת וכי ניתן לפתח מבחן ELISA רגיש שיבדוק חשיפה לסרוטיפ זה בשדה. בטווח הרחוק יותר, וכתלות במימון המשך, מיועדים החלבונים הרקומביננטיים שיוצרו במחקר זה לשמש לניסויי התחסנות בכבשים, לשם בחינת הפוטנציאל לייצר תרכיב רקומביננטי כנגד זן הנגיף הישראלי.

הקושי בשיבוט החלבונים וביצירת תהליכי ביטוי, המסה והעשרה שלהם לאחר הפעלת מערכת הביטוי החיידקית, הביאו לעיכוב רב בהתקדמות וגרמו להתמקדות בסרוטיפ אחד מתוך השלושה שבהם היתה כוונה ראשונית לעסוק. עם זאת, חשוב לציין כי בנוסף לחומרים החדשים

שיוצרו ונבדקו בפרויקט – החיידקים המהונדסים, הגנים המשובטים והחלבונים הרקומביננטיים, נוצר סרום ספציפי שישמש לשיפור יכולת האבחון במכון הווטרינרי, ויתכן אף לפיתוח אבטיפוס לתרכיב רקומביננטי (subunit vaccine). מעבר לתרומה המידית הנובעת מתוצאות המחקר, הושגה במכון הווטרינרי במסגרת מחקר זה היכולת לשבט, לבטא ולנקות חלבוני BTV רקומביננטיים מסרוטיפ עדכני שנפוץ בישראל, דבר שככל הידוע לנו, טרם בוצע עד כה, ומהווה כאמור בסיס הכרחי להמשך פיתוח כלי אבחון ואולי אף חיסון, כנגד זני BTV המקומיים.

6. רשימת ספרות

- Brenner J, Oura C, Asis I, Maan S, Elad D, Maan N, Friedgut O, Nomikou K, Rotenberg D, Bumbarov V, Mertens P, Yadin H, Batten C. Multiple serotypes of bluetongue virus in sheep and cattle, Israel. *Emerg Infect Dis*. 2010 Dec;16(12):2003-4.
- Batten C. A, Maan S., Shaw A. E., Maan N. S., Mertens P.. A European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment. (2008) *V. Research*, 137(1):56-63.
- Chung BK, Lee DY. Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression. *BMC Syst Biol*. 2012 Oct 20;6:134.
- Nason EL, Rothagel R, Mukherjee SK, Kar AK, Forzan M, Prasad BV, Roy P. Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. *J Virol*. 2004 Aug;78(15):8059-67.
- Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS. Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg Infect Dis*. 2008 Apr;14(4):539-44.
- Shaw A. E., Ratniner M., Nunes S. F., Nomikou K., Caporale M., Golder M., Allan K., Hamers C., Hudelet P., Zientara S., Breard E., Mertens P., Palmarini M.. Reassortment between Two Serologically Unrelated Bluetongue Virus Strains Is Flexible and Can Involve any Genome Segment. (2013) *J. Virology*, 87(19):543-557.
- Shimshony A. Bluetongue in Israel - a brief historical overview. *Vet Ital*. 2004, 40(3):116-8.
- Rushton J, Lyons N. Economic impact of Bluetongue: a review of the effects on production. *Vet Ital*. 2015 Oct-Dec;51(4):401-6.