پژوهش و سازندگی
امور دام و آبزیان شماره ۷۶ پاییز ۱۳۸۶

تهیه پروتئین ۳۲ کیلو دالتونی ویروس آبله گوسفندی جهت ارزیابی پادتن اختصاصی ویروس آبله

• **روحانی کارگر مؤخر**
استاد پژوهشی مؤسسه رازی
• **رسول مدنی**
دانشیار پژوهشی مؤسسه رازی
• **فریبا گلچین‌فر**
مربی پژوهشی مؤسسه رازی
• **شبنم تاج منش**
کارشناس ارشد دانشگاه آزاد واحد قم

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۵

Email: dkarfar@yahoo.com

چکیده

آبلـه گوسـفندی (SPV) و آبله بزی (GPV) و بیماری لامپی اسـکینی گاو (LSD) جزء جنس کاپری پاکـس از خانواده پاکس ویریده می‌باشـد. آبله گوسـفند و بز جزء عوامل مهم بیماری آبله در گوسفند و بز در شمال و مرکز افریقا، جنوب غربی و مرکز آسیا و شبه قاره هند بوده و همچنین از جمله بیماریهای مهم ویروسـی گوسـفند و بز در ایران نیز می‌باشد. از جمله بیماریهای مهم دیگری که در بین گوسفندان و بزان ایران در گردش است بیماری اکتیمای مسری می‌باشد که همه ساله باعث تلفات و ضایعات فراوان در مراکز پرورش گوسـفند وبز می‌گردد. تسـت‌های سرولوژی مرسوم جهت تشخیص ویروس آبله گوسـفند و بز به علت داشتن واکنش‌های متقاطـع ایـن ویروس‌ها با ویروس عامل اکتیمای واگیر از حساسـیت چندانی برخوردار نبوده و معمولاً با نتایـج مثبت کاذب همراه است. جهت تعیین میزان پادتن علیه ویروس آبله گوسفند و بز نیاز به یک تست تشخیصی حساس و ویژه، بدون ایجاد واکنش‌های متقاطع با ویروس اکتیمای واگیر می‌باشـد. جهت دسـتیابی به این هدف از پروتئین ۳۲ که یک اپی‌توپ پادگنی خاص ویروس آبله گوسـفند و بز می‌باشـد و در ویروس اکتیمای واگیر (Orf) وجود ندارد بهره گرفته شد. بدین ترتیب که با خالص سازی این پروتئین از ویروس واکسـن آبله گوسـفندی و بکارگیری آن در فاز جامد الیزا امکان دستیابی به میزان پادتن اختصاصی علیه این ویروس‌ها در سرم دامهای واکسینه و بیمار بوجود آمد.

کلمات کلیدی: اکتیمای مسری،آبله گوسفندی، آبله بزی ،الیزا ،پروتئین ۳۲

Pajouhesh & Sazandegi No: 76 pp: 104-108

Purification of specific Capri pox virus protein (P32) for utilizing in ELISA kit

By: R.Kargar Moakhar, Research Professor of Razi Vaccine & Serum Research Institute. Karaj, Iran.
R.Madani, Research Associate Professor of Razi Vaccine & Serum Research Institute. Karaj, Iran.
F.Golchinfar , Research Assistant of Razi Vaccine & Serum Research Institute. Karaj, Iran.
Sh.Tajmanesh.Expert of Azad University of Qom. Qom ,Iran

Sheep pox (SPV), Goat pox (GPV) AND Lumpy skin (LSD) disease are diseases of sheep, goats and cattle respectively, caused by strains of pox virus, with in the genus Capri pox virus. SPV and GPV are important diseases in so many countries especially in south and central Africa, south west central Asia and India. These diseases are important in Iran also and cause economical losses. These diseases are not serologically distinguish able because of antigenic homology among them. A major difference between them is the presence of a protein 32KD (P32) in sheep pox virus that is absent in both goat pox virus and lumpy skin disease virus. In this regard by purification of P32 of SPV and used it in solid phase ELISA, possibility of diagnosing them exactly can be obtained.

Keywords: Echtyma,Sheep pox,Goat pox ,ELISA,Protein 32

مقدمه

آبلـه گوسـفند و بـز از بیماری‌های ویروسـی مهـم این حیوانات می‌باشـد کـه معمولاً همراه تب، بـروز پاپول و ندول و به‌نـدرت وزیکول در قسـمت‌های مختلف بـدن و همچنین لزیون‌های داخلی به ویژه در شـش‌ها و مرگ تشـخیص داده می‌شـود (۹،۷،۳،۱). ایـن بیماری‌ها در خیلی از نقـاط جهان به ویژه آسـیا و آفریقا اندمیک بوده و خسـارات اقتصادی قابل توجهی را در بر دارد (۱۲،۶،۴).

جنس کاپری پاکس جزو خانواده پاکس ویروس‌ها می‌باشد که دارای سـاختار کمپلکس بوده و یک غشاء خارجی هسته دمبلی شـکل و اجسـام کناری را در بر می‌گیرد. ویریون این ویروس‌ها شـبیه آجر بوده و پروتئین خارجی به صورت رشـته‌های نامرتب می‌باشـد(۵،۴). این ویروس‌ها دارای DNA دو رشـته‌ای بوده که حدوداً دارای kbp ۱۵۰ می‌باشد(۵). پروتئین‌های ساختمان اصلی این ویروس‌ها دارای وزن‌های مولکولی ۶۷ و ۳۲ و ۱۹ و ۱۷ کیلو دالتون می‌باشند.

میان اکثر پروتئین‌های سـاختمانی ویـروس کاپری پاکس و پاراپاکس (ویروس ارف) تشـابه آنتی‌ژنیکی وجود دارد که سـبب ایجاد واکنش‌های متقاطع بین آن‌ها می‌گردد.

این در حالی اسـت که هیچگونه واکنشی بین سرم هیپرایمن ویـروس ارف با پروتئیـن ۳۲ کیلو دالتنی ویـروس کاپری پاکس صـورت نمی‌گیـرد. لذا ایـن پروتئیـن در ویروس کاپـری پاکس کاملاً اختصاصی اسـت و یک شـاخص آنتی‌ژنیکی اصلی محسوب می‌گـردد (۱۳،۱۱،۱۰،۷،۶،۲،۱).

تست‌های سـرولوژی مرسوم جهت تعییـن میـزان پادتن علیـه ویـروس کاملاً اختصاصـی نبوده و در موارد آلودگی بـه پاراپاکس (ارف)که چندین پادگن مشـابه با ویـروس آبله دارد باعث خطای آزمایش می‌شود.

این خطاهـا که به‌دلیل ایجاد واکنش‌های متقاطـع و نتایج مثبت کاذب می‌باشـد، در آزمایشـات مختلف ماننـد SN، CIE، ELISA (کـه در فـاز جامد با تماس ویروس کوت شـده باشـد) و AGID مشـاهده می‌گـردد. حتی این خطاها در آزمایـش غیر مستقیم فلورسانت نیز مشاهده می‌گردد.

آزمایش وسـترن بلاتینگ یک تسـت اختصاصی و حسـاس می‌باشد و لیکن انجام آن مشکل است و از نظر اقتصادی پرهزینه می‌باشد(۱۰،۱).

بنابرایـن جهت تشـخیص پادتـن اختصاصی علیـه ویروس کاپری پاکس وجود یک تست تشـخیصی حساس، سریع، ساده، ارزان بدون ایجاد واکنش‌های متقاطع با سایر پاکس ویروس‌ها از جمله ویروس ارف لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد.

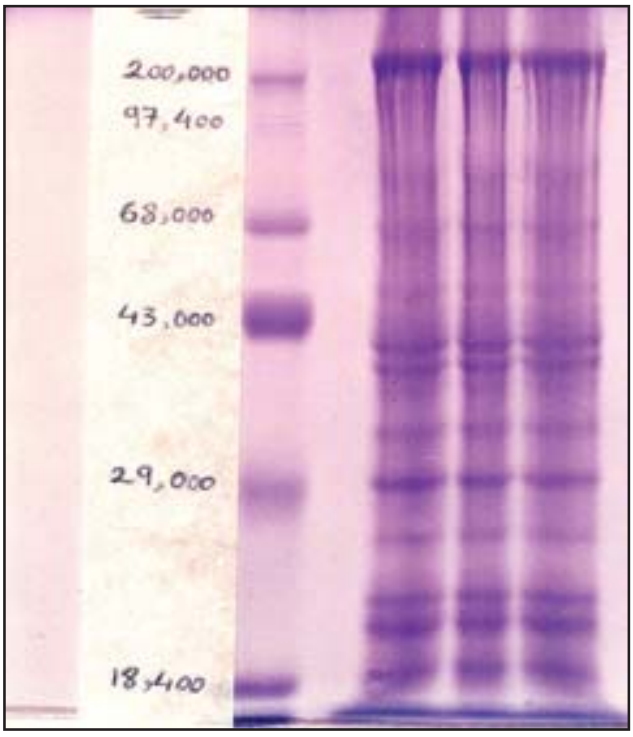
از آنجا که پروتئین ۳۲ کیلو دالتنی ($P_{۳۲}$) ویروس کاپری پاکس شـاخص آنتی‌ژنیکی اصلی محسـوب می‌شـود. لذا با تخلیص این پروتئین و به‌کارگیری آن در فاز جامد الیزا می‌توان پادتن اختصاصی علیه ویروس‌های آبله بز و گوسفند را مشخص نمود. (۶)

مواد و روش کار

۱ - تکثیر و تخلیص ویروس

آبله گوسفندی و تهیه پروتئین‌های ویروسی

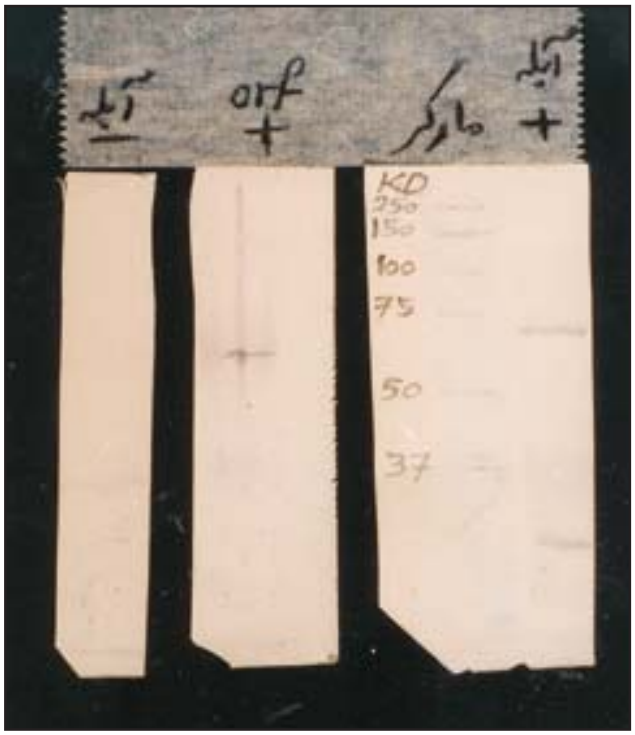
ویروس آبله گوسفندی سویه RM۶۵ که به‌عنوان واکسن علیه آبله گوسفند مصرف می‌شود، در کشت سلول اولیه، کلیه بره کشت داده شد و پس از حدود یک هفته که در سلول‌ها آثار سایتوپاتیک کامل مشاهده گردید برداشت شد. سپس مجموعه جمع‌آوری شده چندین بار منجمد و ذوب شده تا ویروس‌ها از سلول آزاد گردند. در این مرحله در دور ۱۲۵۰۰ دور دقیقه به مدت ۴/۵ ساعت سانتریفوژ شده و رسوبات در حداقل بافر TE (Tris EDTA) با چندین بار پیپتاژ حل گردید. به‌منظور تخلیص ویروس از بالشتک سوکروز ۳۰ درصد و اولتراسانتریفوژ در دور ۳۵۰۰۰ به مدت ۱/۵ ساعت استفاده شد. رسوب حاصل در TE حل گشته و مجدداً سه مرتبه منجمد و ذوب گردید تا پروتئین‌های ویروس آزاد شدند. سپس با سانتریفوژ نمودن محلول بدست آمده در ۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه مایع رویی که حاوی پروتئین‌های ویروس است جمع‌آوری گردید و میزان پروتئین بدست آمده به روش لوری محاسبه گردید.



شکل -۱: نتایج حاصل از الکترو فورز پروتئین‌های ویروس کاپری باکس

۲ - الکتروفورز پروتئین‌های ویروس

در این مرحله الکتروفورز PAGE SDS به روش Lammeli انجام گردید. پس از تهیه ۱۵٪ Gel Resolving و ۴٪Stacking gel و قرار دادن در شیشه‌های مربوطه، ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه که با حجم مساوی با Sample buffer مخلوط گردیده بود به مدت



شکل -۲: نتایج حاصل از وسترن بلات ویروس کاپری باکس با سرم‌های مثبت و منفی

۵ تا ۱۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه قرار داده و سپس به‌مقدار ۵۰ µl به هر چاهک در ژل منتقل نموده و با ولتاژ ابتدا ۸۰ ولت و سپس ۱۵۰ ولت برای Resolving gel الکتروفورز انجام می‌شود. پس از اتمام الکتروفورز برای مشاهده باندها اقدام به رنگ‌آمیزی ژل گردید (کوماسی بلو) و وزن ملکولی باندهای ایجاد شده با استفاده از مارکر مناسب و فرمول تعیین شد.

RF = فاصله طی شده توسط پروتئین از مبدأ

فاصله نقطه مرجع رنگی از مبدأ

جداسازی باند ۳۲ کیلودالتنی و خالص سازی آن از ژل

با مشخص شدن باند ۳۲ کیلو دالتنی در ژل ابتدا آن را از ژل جدا کرده و پس از خرد کردن داخل کیسه دیالیزا قرار داده و با ۵ تا ۱۰ میلی لیتر بافر استات تریس مخلوط می‌نمائیم و سپس آنرا طوری در دستگاه الکتروفورز قرار داده تا انتهای کیسه دیالیز که حاوی ژل است به سمت کاند و سر کیسه دیالیز به سمت‌اند باشد و با شدت جریانی حدود ۴۵ میلی آمپر در مدت ۴ ساعت پروتئین از ژل خارج گشته و داخل مایع می‌شود. مایع را به داخل کیسه دیالیز جدید منتقل کرده و در داخل بافر PBS دیالیز می‌نمائیم تا SDS و رنگ از پروتئین خارج شود و آنچه در کیسه دیالیز باقی می‌ماند پروتئین می‌باشد که به روش لوری میزان آن محاسبه گردید.

تهیه سرم مثبت آبله و اکتیما

آنتی‌سرم مورد نیاز در تست بلاتینگ و الیزا به شرح زیر تهیه گردید.

الف - تهیه آنتی‌سرم علیه سویه واکسینال

جهت این کار دو گوسفند نر یک‌ساله کاملاً سالم واکسن نخورده ابتدا با واکسن آبله واکسینه گردید (یک دوز زیر جلد) و پس از دو هفته ده دوز زیر جلد تزریق گردید. ۴۵ روز پس از تزریق دوم خونگیری به‌عمل آمد و سرم جداسازی شد.

ب - تهیه آنتی‌سرم علیه سویه حاد آبله جهت این کار دو گوسفند نر یکساله کاملاً سالم واکسن نخورده هریک با ۰/۵ میلی لیتر ویروس حاد آبله به‌طریق بین جلدی تزریق گردید. پس از ظهور علائم و متورم شدن موضع تزریق به حجم یک گردو و ظهور تب،گوسفندان تحت نظر قرار گرفته تا علائم بیماری فروکش کند. یک ماه پس از بهبودی کامل اقدام به خونگیری و جداسازی سرم گردید.

ج - تهیه آنتی‌سرم علیه سویه حاد اکتیما

برای این کار دو گوسفند نر یکساله کاملاً سالم که هیچگونه واکسنی دریافت نکرده بودند به روش خراش جلدی در ناحیه بدون پشم زیر بغل ۰/۵ میلی لیترویروس حاد اکتیما تزریق گردید. یکماه پس از فروکش کردن علائم اکتیما و بهبودی کامل اقدام به خونگیری و جداسازی سرم گردید.

وسترن بلاتینگ

آزمایش وسترن بلات به‌عنوان یک آزمایش اختصاصی به‌منظور تائید اختصاصی بودن باند ۳۲ کیلودالتنی ویروس آبله گوسفندی مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور پس از انجام الکتروفورز روی نمونه‌های ویروس آبله و اکتیما و جداسازی پروتئین‌های مختلف آن‌ها و مشخص شدن پروتئین ۳۲ کیلو دالتونی در میان پروتئین‌های ویروس‌ها، ژل مربوط به غشاء نیتروسلولز انتقال داده شده و براساس روش معمول وسترن بلاتینگ با سرم‌های مثبت (ناشی از تزریق ویروس واکسن آبله، ویروس حاد آبله و ویروس حاد اکتیما) مجاور گردید. پس از انکوباسیون مورد نظر باندهای پیوند شده بین پادتن‌های سرم‌های ویروس‌های فوق با پروتئین‌های ویروسهای فوق با پادتن ثانویه کونژوگه شده با آنزیم (Rabbit, Anti sheep Ig – HRP conjugate) در مجاورت سوبسترا و کروموژن (H_2O_2, oPD) آن‌ها ظاهر شدند.

الیزا

به منظور تشخیص حضور پادتن علیه ویروس آبله و اکتیما از یک الیزای غیر رقابتی استفاده شد که در فاز جامد آن در یک پلیت پادگن‌های ویروس و در پلیت دیگر پروتئین ۳۲ کیلودالتونی قرار گرفت که در مرحله بعدی با این پلیت‌ها سرم‌های تهیه شده علیه آبله و اکتیما در واکنش با پادگن‌های پوشانده شده در پلیت‌ها قرار گرفته و با ایجاد رنگ حاصل از اضافه نمودن پادتن ثانویه کونژوگه و قرائت آن در طول موج ۴۹۰ در دستگاه الایزا سرمهای مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج به شرح زیر می‌باشد.

۱ -میزان پروتئین‌های کل پیکره ویروسی پس از آزمایش Lowry و مقایسه با منحنی استاندارد بدست آمده ۱۰mg/ml و پادگن‌های ویروسی mg/ml ۲/۱ محاسبه شد که اندازه‌گیری میزان پروتئین برای فعالیت‌های کاری بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲ -با انجام الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل با ماده کماسی بلو و رنگ برای ژل و ظهور باندهای پروتئینی رنگ شده، باندهای پروتئین تفکیک شده ویروس کاپری پاکس همراه با معرفی باند ۳۲ کیلودالتونی با استفاده از فرمول Rf به صورت زیر مشاهده شد.

۳ - پس از جداسازی باند اختصاصی پروتئین ۳۲ کیلودالتونی با اندازه‌گیری جذب نوری (OD) لوله‌های استاندارد و نمونه (P۳۲) در طول ۷۵۰ نانومتر با روش لوری میزان پروتئین ۳۲ کیلودالتونی ویروس کاپری پاکس ۸۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بدست آمد (۸۰ µg/ml).

۴ - نتایج بدست آمده از سرم‌های تهیه شده و آزمایش وسترن بلات نشان داد که سرم مثبت آبله در دو ناحیه ۳۲ و ۶۷ کیلودالتونی دارای باند مشخص است، درحالی‌که سرم مثبت ارف تنها در ناحیه ۶۷ کیلو دالتونی باند مشخصی نشان می‌دهد. در ضمن در مجاورت سرم منفی از نظر آبله هیچ‌گونه باندی مشاهده نگردید.

نتایج تست الیزا به شرح زیر بود.

الف – قرائت تست در هنگامی‌که کل پیکره ویروس خالص در برابر سرم‌های مثبت و منفی آبله و سرم مثبت ارف قرار می‌گرفت. در جدول ۱ آمده است.

ب – قرائت تست در هنگامیکه P۳۲ در برابر سرم‌های مثبت ومنفی آبله و سرم مثبت ارف قرار گرفت درجدول ۲ آمده است.

بحث

با توجه به اینکه تست‌های سرولوژی رایج برای تشخیص آبله گوسفندی به علت مشابهت پادگن‌های سطحی ویروس با ویروس ارف منجر به ایجاد واکنش‌های متقاطع و نتایج مثبت کاذب می‌گردد. وجود

جدول ۱- نتایج الایزا با کل پیکره ویروس خالص به عنوان پادگن

	OD
سرم مثبت آبله	۱/۲۱۴
سرم منفی آبله	۰/۳۱۵
سرم مثبت ارف	۱/۳۱۶
بلانگ	۰/۰۸۷

جدول ۲- نتایج الایزا با پروتئین P_{32} تخلیص شده به عنوان پادگن

	OD
سرم مثبت	۰/۵۱۶
سرم منفی	۰/۲۱۵
سرم مثبت ارف	۰/۱۵۵
بلانگ	۰/۰۸۵

یک تست تشخیصی حساس، ساده و بدون ایجاد واکنش‌های متقاطع لازم وضروری به نظر می‌رسد. مطالعات نشان داده است که بین برخی پروتئین‌های دو ویروس فوق تشابهات آنتی‌ژنیکی وجود دارد و این در حالی است که بعضی پادگن‌ها مثل P۳۲ کاملاً در ویروس‌های گروه آبله اختصاصی می‌باشد این پروتئین اختصاصی در تحقیقات دیگران نیز که با انجام آزمایشات PCR-RFLP و PCR-ELISA بوده است نیز به اثبات رسید. (۷،۶، ۸) حتی در یک مقاله مروری بوسیله Rao & Bandyopadhyay در سال ۲۰۰۰ منتشر شده کاملاً به ویژگی پروتئین ۳۲ کیلودالتونی اشاره شده است(۱۲). این ویژگی تا حدی زیاد است که حتی سرم علیه ویروس ارف نیز با این پروتئین (P۳۲) واکنش نشان می‌دهد که در تحقیقات دیگران نیز نشان داده شده است (۲ ، ۱۰) در مطالعات ژنومی‌که Tulman و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بر روی ژنوم آبله گوسفندی و بزی انجام دادند نیز به این پروتئین ۳۲ کیلودالتون اشاره نموده‌اند و ویژگی آن را مشخص کرده‌اند(۱۳).

در این پژوهش با تخلیص پروتئین ۳۲ و بکارگیری آن در فاز جامد الیزا امکان تشخیص پادتن اختصاصی علیه ویروس آبله گوسفندی فراهم می‌گردد (۲،۹).

در این بررسی جهت تهیه پروتئین ۳۲ خالص از ویروس آبله گوسفندی ابتدا ویروس خالص شده روی ژل اکریل‌آمید الکتروفورز گردید و با استفاده از مارکر مناسب باند ۳۲ کیلودالتونی بر روی ژل مشخص و برداشت گردید. با انجام تست وسترن بلاتینگ روی نمونه‌های مختلف سرم آبله گوسفند و ارف اختصاصی بودن باند ۳۲ کیلو دالتنی برای آبله گوسفندی کاملاً به اثبات رسید.

علاوه بر آن واکنش پروتئین ۳۲ کیلودالتنی ویروس کاپری پاکس با پادتن‌های موجود در سرم مثبت آبله بیانگر آن است که پروتئین ۳۲ کیلودالتونی ویروس کاپری پاکس شاخص آنتی‌ژنیکی اختصاصی محسوب می‌گردد.

در نهایت با بهره‌گیری از تست الیزا با استفاده از ویروس کامل خرد شده و این پادتن (P۳۲) در فاز جامد و مقایسه جذب نوری سرم‌ها اختصاصی بودن (P۳۲) درتشخیص پادتن اختصاصی علیه ویروس آبله مشاهده گردید و ثابت گردید که هیچگونه واکنش متقاطعی با سرم ناشی از ویروس ارف ندارد.

بنابراین نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج سایر تحقیقات (۱۱،۱۰،۶،۲،۱) در زمینه تشخیص اختصاصی ویروس کاپری پاکس براساس پروتئین (P۳۲) مطابقت دارد.

منابع مورد استفاده

1- Carn, V.M.1995; An antigen trapping ELISA for the detection of capripox virus in tissue culture supernatant and biopsy samples. J. virol. Methods. 51, 95-102

2- Chand, P., Kitching, R.P. and Black, D.N. 1994; Western blot analysis of virus – specific antibody responses for capripox and contagious pustular dermatitis viral infections in sheep. Epidemiol.Infect. 113, 377-385.

3-Davies, F.G. 1991; Lumpy skin disease. A capripox virus infection of cattle in Africa FAO, Rome.

4- Fenner, F., Bachmann, P.A., Gibbs, E. P.J., Murphy, F.A., Studdert M.J. White, D.O.1987;Veterinary virology . Academic press.

5-Fields, B.N., Kinpe, D.M., Howley, D.M., Hooper, Jw. 1996; Fields virology.Third edition. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia .

6-. Heine, H. G., Stevens, M.P., Foord, A.J., Boyle,D.B.1999; A capripox virus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homology of the vaccinia virus H3L gene. J. Immunol.

Methools. 227, 187-196.

7- Hosamani, M., Mondal, B., Tembhurne, P.A.2004; Differentiation of sheep pox and goat pox poxviruses by sequence analysis and PCR-RFLP of P32 gene. Virus Genes . 29 (1) ; 73-80.

8- Kitching, R.P. and Taylor, W.P.1985; Clinical and antigenic relation ship between isolates of sheep and goat pox viruses. Trop. Anim. Hlth. Prod.17, 64-74.

9-Lowry, O.H., Rosen Brough, N.J., Farr, A.Z, and Randall, R.J. 1951;Protein measwment with the folin-phenol reagent J. biol. Chem. 193, 265-275.

10- Manual of standards diagnostic test and vaccines.2000; Office international Epizooties (OIE). 4th edition.

11- Nagichabe, C.K., Binepal, Y.S., Njiru, J.W., Carn, V.M. 1999; Evaluation of an immunocapture enzyme- linked immunosorbent assay for detection of capripox viruses. Veterinary Record. 145, 231-

232.

12- Rao, T.V.S, and Bandyopadhyay, S.K .,2000; A comprehensive review of goat pox and sheep pox and their diagnoses. Animal Health Research Reviews. 1(2); 127 – 136.

13- Tulman, E.R., A fonso, C.L., LU, Z.2002;The genomes of sheep pox and goat pox viruses. J. virol. 76 (12) ; 6054-61.