# ردیابی پاسخ پادگنی پروتئین H ویروس طاعون گاوی

محمود حسنی[۱]، رسول مدنی[۲]، مهدی ارجمند[۳*]، روحانی کارگر[۲]، فریبا گلچین‌فر[۲]،
صدیقه خامه‌چیان[٤]

## چکیده

طاعون گاوی Rinderpest یکی از بیماری های حاد و گاهی فوق حاد و خیلی مسری گاو و عده ای از نشخوار کنندگان بوده که از دیر باز شناخته شده است. ویروس طاعون گاوی دارای دو گلیکو پروتئین سطحی H و F است که آنتی بادی‌های خنثی کننده را القا می‌کنند. پس از خالص‌سازی ویروس و جداسازی پروتئین‌های سطحی ویروس (با استفاده از محلول Triton X-114) میزان پروتئین موجود با استفاده از روش پروتئین‌سنجی لوری اندازه‌گیری شد و پس از انجام الکتروفورز عمل انتقال پروتئین‌های حاصله بر روی کاغذ نیتروسلولز به روش وسترن بلات بدست آمد تا از ویژگی آنتی بادی مونوکلونال 4B4L1C6 (علیه پروتئین H ویروس طاعون گاوی) اطمینان حاصل شود.

**واژگان کلیدی:** طاعون گاوی، پروتئین H، الکتروفورز پروتئین، وسترن بلات

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۰

## مقدمه

ویروس طاعون گاوی (RinderpestVirus)، یکی از اعضای جنس Morbillivirus از خانواده Paramyxoviridae می‌باشد(۱).

جنس Morbillivirus علاوه بر RPV، شامل ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPRV) و ویروس سرخجه (MV) است که به ترتیب گوسفندان و بزها، گوشتخواران و انسان را مبتلا می‌کنند. بیماری موربیلی ویروسی جدیدی در فک‌ها، وال‌ها و دلفین‌ها گزارش شده است. از نظر ضرر و زیان‌های اقتصادی RPV مهمترین عضو این گروه است(۳).

ویروس ریندرپست، اساساً یک ویروس گاوی است اما می‌تواند باعث ایجاد علائم بیماری در گوسفندها و بزها شده که از نظر بالینی بیماری PPR که توسط ویروس PPRV ایجاد می‌شود غیر قابل تشخیص می‌باشد.

ویروس طاعون گاوی (RPV) دارای دو گلیکو پروتئین سطحی H و F است که آنتی بادی‌های خنثی کننده را القا، می‌کنند. پروتئین H به رسپتور سلولی متصل شده، فرایند infection را آغاز می‌کند و پروتئین F از طریق فیوژن پوشش

۱- گروه مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی دانشکده فنی مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- بخش بیوتکنولوژی موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
*۳- واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (mardjmand@yahoo.com)
٤- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

## Tracking of antigen response hemagglutinin protein (H) of rinderpest virus

**Hasani, M. [1], Madani, R. [2], Ardjmand, M. [3]*, Kargar, R. [2], Golchinfar, F. [2], Khamehchian, S.[4]**

*1-Department of Chemical engineering (Biotechnology), Faculty of engineering Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
*2-Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Tehran, Iran*
*3*- Department of Chemical Engineering, South Tehran Branch, Islamic Azad University.(E-mail: mardjmand@yahoo.com)*
*4- Department of Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran*

Rinderpest (RP), popularly known as cattle plague, is one of the oldest known acute and fatal viral disease of domestic livestock like cattle. Rinderpest virus (RPV), causative agent of rinderpest disease, was purified and concentration of its protein determined by lowry assay, and the concentration of RPV protein solution and separated surface proteins was determined 1536 and 329.5 µg/ml respectively. Hemagglutinin (H) protein of RPV separated by using Triton x-114 detergent. The H protein had an apparent molecular mass of 69 KD as measured by SDS-PAGE, with respect to molecular weight marker, at the end of, Immunogenenicity of this protein determined by SDS-PAGE and western immunoblotting by specific mAb for it. Immunogenic properties of recombinant baculovirus expressing the membrane-bound H protein have been shown, but separation of H protein of RPV by using detergent and investigation of its immunogenicity are novel works completely.

***Key word**: rinderpest- H protein- protein electrophores- western blot*

ویروس با غشای سلول به ورود ویروس به داخل سلول میزبان کمک می‌کند(۹و۱۰و۱۱).

بنابراین هدف از این مطالعه جداسازی پروتئین‌های سطحی ویروس و انتقال آنها برروی کاغذ نیتروسلولز برای اطمینان از ویژگی آنتی بادی مونوکلونال علیه پروتئین H می‌باشد، تا از طریق آن بتوان به طور قطعی آنتی بادی‌های ویروس را تشخیص داد و به دنبال آن وضعیت ایمنی حیوان واکسینه، در حال بهبود و بیمار را برآورد کرد(۱۲).

## مواد و روش کار

**الف- خالص‌سازی ویروس:**

کشت سلولی (B.K. Razi) حاوی ویروس ، چند مرتبه منجمد و ذوب شد تا ویروس داخل سلول در محیط مایع کشت قرار گیرد. نحوه انجماد و ذوب به این صورت بود که ابتدا کشت سلولی در C° ۲۰- فریز شده و بعد از فریز کامل ذوب شده به C° ۷۰- منتقل شد و بعد از ذوب مجدد، دوباره به C° ۷۰- منتقل شد و مجددا" ذوب گردید.

برای حذف اضافات سلولی، کشت سلولی حاوی ویروس ،۲۰ دقیقه در۲۵۰۰ دور سانتریفوز گردید (٤). مایع رویی کشت سلولی سانتریفوژ شده ،برداشته شد و به مدت ۲ ساعت در ۸۷۰۰۰g سانتریفوژگردید.

رسوب حاصله جمع آوری و در بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار حل شد. محلول حاصله بر روی سوکروز ۳۰٪ برده شده و به مدت ۲ ساعت در g ۸۷۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مجدداً رسوب حاصله جمع‌آوری و در بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار حل با روش لوری پروتئین سنجی گردید.

**ب- جداسازی پروتئین‌های سطحی:**

نمونه ویروسی را که دارای پروتئین با غلظت ۱-۰/۲ mg/ml می‌باشد را در محلول A (۱۰ میلی مول Tris، تنظیم شده در PH=7.4 +۱۵۰ میلی مول کلرید سدیم +Triton-X114 ۲٪) حل کرده ، غلظت نهایی آن به ۱-۰/۵ درصد رسیده، و به مدت ۱ ساعت در یخ قرارداده شد.

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه فوق، به ۳۰۰ میکرولیتر از محلول B (+۱۰ میلی مول Tris، تنظیم شده در PH=7.4، +۱۵۰ میلی مول کلرید سدیم ساکارز ٦٪ w/v+ Trion X-۱۱٤، ۰/۰٦٪) اضافی شد.

محلول حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری و به مدت ۳ دقیقه با دور Rpm ۳۰۰، سانتریفوژ شد.

محلول حاصل به یک لوله آزمایش تمیز انتقال داده شد، و تا رسیدن به غلظت اولیه لازم برای جداسازی، محلول A اضافه گردید.

* محلول حاصل (فاز دترجنت) در یخ نگهداری شده ،و با توجه به اینکه پروتئین‌های سطحی ویروس در فاز دترجنت تجمع کرده بودند با استفاده از کلروفرم و رسوب‌دهی به وسیله متانل جداسازی اصلی را طبق روش زیر انجام گرفت:

نمونه (فاز دترجنت) را با متانل مخلوط کرده و به مدت ۲۰ ثانیه در دور Rpm۹۰۰۰ سانتریفوژ، و پس از افزودن کلروفرم به مدت ۱۰ ثانیه در دور Rpm ۹۰۰۰ ، سانتریفوژ شد .

به محلول فوق آب مقطر افزوده و به مدت ۱ دقیقه با دور Rpm ۹۰۰۰ ، سانتریفوژ گردید ، با دقت سطح بالایی فاز حاصل از مرحله قبل ، را جدا می کنیم. در این مرحله باید دقت کرد (زیرا، پروتئین‌ها دقیقاً در مرز بین دو فاز قرار دارند) تا پروتئین‌ها اشتباهاً از سطح خارج نشوند.

این مرحله، مرحلهٔ رسوب‌دهی پروتئین بوده که باید متانل اضافه و به مدت ۲ دقیقه با دور Rpm ۹۰۰۰ ، سانتریفوژ کرده و قسمت بالایی را دور ریخته و در نتیجه پروتئین‌ها به صورت رسوب باقی می‌مانند.

سپس رسوب حاصل با PBS حل و برای مراحل خالص‌سازی نگهداری شد.

* جهت داشتن ویروسی با غلظت پروتئین بیشتر باید تغلیظ انجام داد که در این روش ویروس خالص را در کیسه دیالیز ریخته و در یک بشر حاوی ساکارز غوطه‌ور و به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال نگه‌داری شد. این روش فقط برای اینست که بتوانیم پروتئین زیادتری جهت جداسازی و خالص‌سازی داشته باشیم(۵،٦).

**ج – شناسایی پروتئین H با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال**

ژل حاصل از الکتروفوز به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در transfer bufferو در داخل یخچال نگهداری شد ، این عمل را در مورد کاغذ نیتروسلولز نیز که قبلا" به ابعاد ژل بریده شده بود انجام داده شد(۷).

بعد از اتمام زمان ، Extra thick Blot paper در ترانسفر بافر خیسانده و روی صفحه آند قرار گرفت. سپس به ترتیب کاغذ نیتروسلولز، ژل و Extra thick blot paper بعدی بر روی آن قرار داده و نهایتاً صفحه کاتد بر روی آن قرار گرفته و جریان برق ۱۵ ولت به مدت ۱۵ دقیقه برای بهترین انتقال برقرارگردید.

پس از پایان زمان, جریان برق راقطع کرده و کاغذ نیتروسلولز را خارج و به مدت ۱ ساعت داخل بافر بلاک کننده بر روی شیکر قرار داده می شود.

بعد از۵- ٤ مرتبه شستشو (شستشو با بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار توئین دار هربار به مدت ۵ دقیقه) کاغذ نیتروسلولز به تعداد چاهکها برش داده شد (در اینجا سه چاهک وجود دارد، دو چاهک مربوط به RPV و یک چاهک مربوط به مارکر، که یکی همراه با مارکر و دیگری به صورت جداگانه برش داده می شود)و هر یک از برش‌ها در مجاورت آنتی بادی مونوکلونال 4B4L1C6 قرار گرفت، این مرحله از آزمایش ۱/۵-۱ ساعت طول کشید.

بعد از ۵ بار شستشو، آنتی بادی ثانویه ضد ایمنوگلوبولین موشی در رقت ۱:۵۰۰ به هر یک از برش‌ها افزوده شد.

پس از شستشو، سوبسترا جهت مرئی کردن باندها استفاده شد. این سوبسترا، نوعی سوبسترای ترسیمی است که رنگ آبی ایجاد می‌کند.

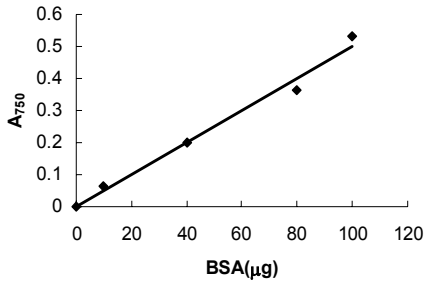
## نتایج

**پروتئین‌سنجی**:

پس از خالص‌سازی ویروس و پروتئین باید از میزان پروتئین ویروس جهت مراحل بعدی اطمینان حاصل کرد، که از روش پروتئین‌سنجی استفاده می‌شود.

ابتدا با استفاده از Blank دستگاه اسپکترو فتومتر را بر روی طول موج ۷۵۰ نانومتر تنظیم کرده و جذب محلولهای شاهد و مجهول را در طول موج فوق می‌خوانیم(۸).

در این حالت با دانستن میزان جذب نور و میزان نمونه معادلهٔ خط را نوشته و می‌توان میزان پروتئین نمونه مجهول را بدست آورد (نمودار۱ و جدول ۱)




نمودار۱ـ نمودار بدست آمده از پروتئین سنجی لوری و معادله آن

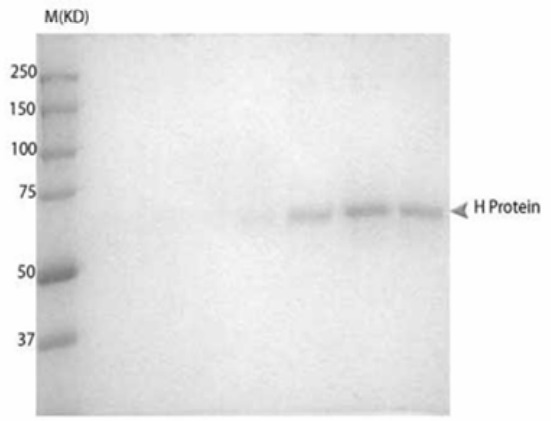
$5.006117\times10^{-3}X+1.518617\times10^{-3} =Y$

جدول ۱ـ میزان جذب محلول شاهد، ویروس خالص شده و پروتئین جدا شده

| جذب(نانومتر) | غلظت( میکرگرم بر میلی لیتر) |
|---|---|
| 0 | 0 |
| .0.064 | 10 |
| 0.198 | 40 |
| 0.395 | 80 |
| 0.532 | 100 |
| 0.386 | (whole virus)50 |
| 0.084 | (H-protein)50 |

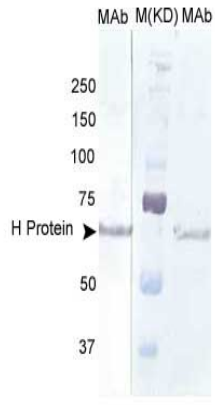
**ایمونوسیته پروتئین H ویروس طاعون گاوی**

از ژل الکتروفورز عکسبرداری نموده و وزن مولکولی پروتئینی را که مشخص شده است را بدست می‌آوریم (69KD ) که با وزن مولکولی پروتئین H برابر می‌باشد.(نگاره ۱)




نگاره ۱ـ الکتروفورز مارکر و پروتئین جدا شده که در تصویر مشخص شده است.

نهایتاً، اینکه این آنتی بادی (4B4L1C6) بر علیه پروتئین H ویروس طاعون گاوی واکنش داده که از انتخاب 4B4L1C6 به عنوان مناسب ترین واختصاصی‌ترین آنتی بادی مونوکلونال اطمینان حاصل می‌شود (نگاره۲).




نگاره ۲ـ انتقال پروتئین‌های ویروس RPV بر روی کاغذ نیتروسلولز و پروب آن با آنتی بادی مونوکلونال 4B4L1C6

**بحث**

بیماری طاعون گاوی، بومی کشور ایران نمی‌باشد ولی همانطور که از نام عامیانه بیماری (گاو میری یا گاو مرگی) بر می‌آید، هر چند سال یک بار به شکل همه‌گیر ظاهر و شایع می‌شده و موجب کشتار دسته جمعی گاوها در مناطق مختلف کشور ایران می‌گردیده است. از میان ویروس‌های یاد شده، RPV و PPRV (peste des petits ruminants Virus) از نظر آنتی ژنی بسیار با یکدیگر مشابهند. RPV اساساً یک ویروس گاوی است اما می‌تواند باعث ایجاد علائم بیماری در گوسفندان و بزها شود که از نظر کلینیکی از بیماری PPR که توسط ویروس PPRV ایجاد می‌شود غیر قابل تشخیص است. مشکلی که در حال حاضر وجود دارد تشخیص قطعی آنتی بادی‌های طاعون گاوی در سرم حیوانات نشخوار کننده (گاو، گوسفند و بز) است که به دلیل پلی کلونال بودن آنتی‌بادی‌های سرمی و تشابه دو ویروس امکان ناپذیر است. بنابراین سعی ما بر طراحی روشی بود که از طریق آن بتوان به طور قطعی آنتی بادی‌های ریندرپستی را تشخیص داد و به تبع آن وضعیت ایمنی حیوان واکسینه، در حال بهبود و بیمار را برآورد کرد. در این روش ابتدا امکان جداسازی پروتئین H با استفاده از محلول TritonX-114 (که بهترین محلول برای جداسازی پروتئین‌های سطحی از غشا سلولی می‌باشد) می‌باشد که با استفاده از الکتروفورز پلی آکریل آمید ژل رفتار پروتئین H مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه که در روش‌های قبلی از سانتریفوژ و یا انواع کروماتوگرافی برای خالص‌سازی پروتئین‌ها وهمچنین از زرده تخم پرندگان و تنباکوبه عنوان منبع حاوی پروتئین برای جداسازی پروتئین‌ها جهت ساخت واکسن استفاده شده که دقت و ظرافت روش فوق را نداشته و از لحاظ زمانی و هزینه نیز مقرون به صرفه نمی‌باشد، استفاده از خود ویروس به عنوان منبع حاوی انواع پروتئین و پروتئین مؤثر و روش‌های جداسازی و خالص‌سازی فوق بهترین روش بوده

و در کمترین زمان ممکن و با حداقل هزینه‌ها امکان پذیر می‌باشد.

و در آخر نیز با انتقال پروتئین‌های حاصله بر روی کاغذ نیتروسلولز به روش وسترن بلات از ویژگی آنتی بادی مونوکلونال 4B4L1C6 ( علیه پروتئینH ویروس طاعون گاوی) اطمینان حاصل شود.

## فهرست منابع


1. Benjamin, D.A., MION, (2001-2002): Design of Immunization Strategy based on recombinant Proteins of the measles virus in the context of a changing epidemiology, universite delege faculte des sciences biological properties of the structural proteins of MV, 19-23.
2. Das, B., Renuka, S., Roha, F., Pudi, (2004) Leader RNA RinderPest Virus binds Specifically with cellular La protein : a possible role in virus replication. Virus research 104(Z):101-109.
3. Minamato, N., Tanaka, S., and Sugiyama. M, N, ITO. (2002): Journal of Virology 76:1691-1696.
4. Naik, S., and Shaila, M. S. (1997): Characterization of membrane-bound and membrane anchor-less forms of hemagglutinin glycoproteins of rinderpest virus expressed by baculovirus recombinants. Virus Genes 14, 95-104
5. Rajasekhar. M., Renukaradhya, G. J., Shaila,Suresh K. B., M. S. (2003): Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibody and recombinant hemagglutinin for serosurveillance of rinderpest virus. Journal Clinical Microbiology. 41: 943-947.
6. Alpers, D. H, Seetharam, B, Tiruupathi, C. (1981): Phase separation of integral membrane proteins in Triton solution. Journal Biochemistry. 256: 1604-1607.
7. Angba, A., Bidjeh, K. Couacy-Hymann, E., Diallo, A., and Domenech, J., (1995): Protection of goats against goats by vaccination with attenuated peste des petits ruminants virus. research Veterinary Senccie. 59: 106-109.
8. Alpers. DH, Seetharam. B & Tira ppathic .C (1986): Phase separation of rat intestinal brush membrane proteins using Triton X-114, analytical biochemistry; 153:330-5 .
9. Bordier. C(1981): Phas separation of integral membrane proteins in Trituon X-114 solution. Journal of biological chemistry; 256: 1604-7.
10. Walker. J & Wilson. K, Practical (1994): *biochemistry* (principles and techniques). 4 Ed. Cambridge university press; p: 434-437.
11. Robert. K. Scopes. (1994): *Protein purification* (principles and practice). 3th Ed, Springer – verlag new york press; 291-298.
12. Kaushik-Mitra, S., Rajasekhar, M., Renukaradhya, G, J., Shaila, M. S. and Sinnathamby, G. (2002): Mapping of B-cell epitopes of hemagglutinin protein of rinderpest virus. Virology 298: 214-223.