مقایسه الگوی الکتروفورتیک پروتئینی ویروس های حاد نیوکاسل جداشده درایران با سویه های واکسن زنده

دکتر فرهید همت زاده[1]* دکتر آرزو علینژاد[2]

دریافت مقاله: ۲۶ مهرماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۱۷ اسفندماه ۱۳۸۱

هدف: این تحقیق با هدف مطالعه الگوی پروتئینی ویروسهای حاد نیوکاسل جدا شده در ایران و مقایسه آنها با الگوهای پروتئینی سویه های واکسینال B_1 و لاسوتا انجام گرفت.

طرح: مطالعه توصیفی.

نمونه ها: ۳۰ نمونه ویروس بیماری نیوکاسل جدا شده از ۵۰۷ نمونه مغز مرغ مبتلا به فرم حاد بیماری نیوکاسل در فاصله زمانی تابستان ۱۳۷۹ تا پاییز ۱۳۸۰ به همراه ۲ نمونه غیر حاد واکسینال (B_1 و لاسوتا).

روش: پس از آماده سازی و کشت ۵۰۷ نمونه مغز مرغ بیمار در حفره الانتوئیک جنین تخم مرغ ۸ روزه، ۳۰ نمونه ویروس نیوکاسل با توسل به آزمون HI تأیید تشخیص شده بودند، جدا گردید. این نمونه ها به همراه ۲ سویه واکسینال B_1 و لاسوتابه روش سانتریفوژ پرسرعت، خالص سازی شده و پس از تنظیم میزان پروتئین، به روش SDS-PAGE الکتروفورز گردیدند.

نتایج: نتایج آزمون SDS-PAGE بر روی نمونه‌ها حاکی از وجود حد اقل ۶ باند پروتئینی به اندازه های ۸۰، ۷۲، ۶۴، ۴۳، ۲۷ و ۲۳ کیلودالتونی بودند. این الگو در سویه‌های حاد و غیر حاد واکسینال (B_1 ولاسوتا) مشابه بوده ولی در ۳ مورد از ویروسهای حاد جدا شده به جای حضور باند ۶۴ کیلودالتونی باند ۴۹-۴۸ کیلودالتونی مشاهده گردید که در سایر منابع تاکنون چنین پروتئینی معرفی نشده است. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۱، ۶۵-۶۱.

واژه های کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل، الکتروفورز، ژل پلی اکریلامید، واکسن B_1 ، واکسن لاسوتا، پروتئین.

Study on Proteinal pattern of Isolated NDV in Iran and comparison with live vaccin strains

Hemmatzadeh, F.,[1] Alinegade, A.[2]

[1] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.* [2] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

Objective: In this research, protein patterns of 30 isolates of Newcastle disease virus (isolated in Iran) along with two vaccinal strains (B_1 and Lasota) were determined.

Design: Descriptive study.

Samples: These viruses were isolated from Jun.2000 to Oct.2001 out of 507 brains of chicken suspected to infection with virulent NDV.

Procedure: Following preparation and inoculation of 507 brain of infected chicken in allantoic cavity of 8 days embryonated eggs, 30 isolates of virus that identified by HI test, were isolated. These samples along with 2 vaccinal strains, B_1 and Lasota were purified by high-speed centrifugation and then electrophoresis by SDS-PAGE method.

Results: The results of SDS-PAGE test of samples, showed that the isolated viruses posses 80,72,64,43,27 and 23 kDa bands in their protein patterns. No difference in virulent and avirulent vaccinal (B_1 and Lasota) strains in protein patterns was observed. Only in three cases of virulent strains of NDV, 48-49 kDa bands were observed instead of 64 kDa band. This protein has not been previously identified. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 1: 61-65, 2003.***

Key words: Newcastle disease virus, Electerophoresis, Polyacrylamide gell, B1 vaccin, Lasota vaccin, Protein.

corresponding author email:fhemmat@chamran.ut.ac.ir

ویروس بیماری نیوکاسل(Newcastle disease virus "NVD")متعلق به جنس روبولا ویروس از خانواده پارامیکسوویریده ، می‌باشد. ویریون ویروسهای خانواده پارامیکسو ویریده چند شکلی و گاهی کروی یا رشته‌ای به قطر ۳۰۰-۱۵۰ نانومتر و دارای پوشینه‌ای می‌باشند که توسط پپلومرهای (Peplomer) بزرگ با طول ۲۰-۸ نانومتر احاطه شده‌اند (۸،۱۳).

این ویروسها نوکلئوکپسیدی با تقارن مارپیچی به طول ۸۰۰-۶۰۰ نانومتر و به قطر ۱۸ نانومتر دارند. ژنوم این ویروسها یک مولکول خطی از RNA تک رشته‌ای تک مولکولی با سنس منفی به اندازه ۲۰- ۱۵ کیلو باز است که ۷ ژن را شامل می شود این ژنها توسط ردیفهای حراست شده غیر کد شونده از هم جدا شده‌اند (۱۳).

ویروس بیماری نیوکاسل دارای خصوصیات بیولوژیکی منحصر به فردی است که به این طریق از سایر پارامیکسوویروس‌ها تفریق می‌شود. از جمله قدرت هماگلوتیناسیون یا جمع کردن گلبولهای قرمز که در درجه اول گلبولهای قرمز پرندگان بعد از آن خزندگان، دوزیستان و پستاندارانی مثل موش و خوکچه هندی را دارد، ولی قابلیت آگلوتیناسیون گلبولهای قرمز گاو، بز، گوسفند، خوک و اسب با سویه‌های ویروس نیوکاسل متفاوت است (۶).

سویه‌های ویروس بیماری نیوکاسل می‌توانند در طیف وسیعی از سلولهای اولیه یا تیره های سلولی تکثیر یابند. تأثیرات سیتوپاتیک (Cytopathic Effect "CPE") این ویروسها معمولاً همراه با تشکیل سن سیتیا (Syncytia) و متعاقباً مرگ سلولی می‌باشد. وقوع CPE با حدت ویروس برای مرغان نسبت مستقیم دارد (۶).

RNA ژنومی ویروس به همراه سه پروتئین (Large protein "L") ، (Nucleo protein "NP") و (Phospho protein "P") تشکیل نوکلئوکپسیدی با تقارن مارپیچی به عرض ۱۸ نانومتر را می‌دهد که داخل غشأ جای گرفته است. پوشینه ویروسی ترکیبی از چربیهای سلولی (۶۰ درصد فسفولیپید و مابقی آن کلسترول) و پروتئینهایی است که بواسطه اطلاعات ژنتیکی خود ویروس ساخته شده‌اند (۲،۱۴،۲۰).

ویروس بیماری نیوکاسل شامل ۳ پروتئین اصلی و چندین پلی پپتید جزیی می‌باشد، پلی پپتیدهای ویروس بیماری نیوکاسل شامل، پروتئینN.P یا نوکلئوپروتئین که محافظ RNA ژنوم است و دارای وزن مولکولی ۵۶- ۵۳ کیلودالتون می‌باشد، پروتئینP که فسفوپروتئین بخشی از پلی پپتید ترانس کریپتاز بوده و برای رونوشت برداری از RNA ژنوم لازم است و دارای وزن مولکولی ۵۶-۵۳ کیلودالتون می‌باشد، پروتئین F که پروتئین فیوژن که باعث امتزاج سلول، نفوذ به داخل سلول، انتشار ویروس از سلولی به سلول دیگر، ایجاد نقش در القای ایمنی می گردد، ابتدا به صورت پروتئین پیش ساز غیر فعال F_0 می‌باشد و سپس توسط پروتئاز یا آنزیمهای پروتئولتیک شکافته شده و تبدیل به F_1 و F_2 می‌شوند F_0 دارای وزن مولکولی ۶۸-۶۷ کیلودالتون می‌باشد F_1 دارای وزن مولکولی ۵۶-۵۵ کیلودالتون و F_2 دارای وزن مولکولی ۱۵-۱۲ کیلودالتون می‌باشد. پروتئین HN یا هماگلوتینین- نورآمینیداز، که نورآمینیداز تسهیل کننده آزاد شدن ویریون از غشأ سلولی است و هماگلوتینین جذب و اتصال و القای ایمنی را بر عهده داشته و دارای

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسئول fhemmat@chamran.ut.ac.ir

وزن مولکولی حدود ۷۴ کیلودالتون می‌باشد البته در برخی متون وزن مولکولی این پلی پپتید ۹۲-۹۶ کیلو دالتون ذکر شده است. HN برخی سویه‌هایNDV ممکن است نیاز به شکافتن بعد از ترجمه‌ای داشته است (۸،۹،۱۲،۱۵،۱۸،۱۹).

سایر پروتئینهای شناخته شده در این ویروس شامل پروتئینM یا پروتئین ماتریکس که بیشترین میزان پروتئینهای ویروسی را شامل شده و پایداری غشأ ویریون را بر عهده دارد، این پروتئین دارای وزن مولکولی حدود ۴۲-۳۸ کیلودالتون می‌باشد. پروتئین SH که هنوز کارش ناشناخته است. پروتئین L که بخشی از پلی پپتید ترانس کریپتاز بوده که برای رونوشت برداری ازRNA ژنوم لازم است و دارای وزن مولکولی ۲۲۰-۱۸۰ کیلودالتون می‌باشد (۱۲،۱۹).

سه پروتئین (P، N،P و L) به همراه ژنوم ویروس بیماری نیوکاسل مجموعه نوکلئوکپسید را تشکیل می‌دهند که این مجموعه توسط یک غشأ لیپیدی دولایه‌ای که در سطح داخلی خود دارای پروتئین ماتریکس و در سطح خارجی خود دارای گلیکو پروتئینها HN و F به صورت بیرون زدگیهای نابرابر می‌باشد، احاطه شده است (۱۳،۱۷).

مواد و روش کار

وسایل: پنس، قیچی، سواپ، چسب، تنطورید، سرنگ معمولی، سرنگ انسولین، لوله آزمایش، سمپلر (Sampler)، میکروپلیت، لوله اپندورف (Eppendorf)، انکوباتور، سانتریفوژ معمولی، سانتریفوژ با دور بالا، فریزر ۸۰ - درجه سانتیگراد، دستگاه الکتروفورز عمودی(Bio rad)، سمپلر متغیر در اندازه های گوناگون (Socorex)، دستگاه بایو فتومتر(Eppendorf) ظرف در دار شیشه‌ای، پلاستیکی یا استیل، میکروفیوژ (Spectrofuge)، فریم خشک کننده ژل.

مواد: سرم فیزیولوژی، گلبول قرمز یک درصد، تخم مرغ جنین دار هفت تا نه روزه محلولPBS حاوی آنتی بیوتیک و ضد قارچ، اکریل آمید(Acrylamide)، آمونیوم پرسولفات(Ammonium persulfate)، بیس اکریل آمید (Bis-Acrylamide)، برموفنل بلو (Bromophenol blue)، کوماسی برلیانت بلو(Commassic brillian blue)، اسید استیک گلاسیال(Glacial acetic acid)، گلیسرول(Glycerol)، گلیسین(Glycine)، مرکاپتواتانل(Mercaptoethanol)، متانول (Methanol)، سدیم دودسیل سولفات(("Sodium dodecyl sulphate "SDS")، تریس بازی (Tris base)، تمد("N,N,N',N'-tetramethylenediamine "TEMED")، مارکر وزنی با وزن کم (Low molecular weight markers) (Frementas)، محلول رنگ آمیزی (Staining solation) محلول رنگبر (Destaining solution)، غشأ سلوفان (SIGMA).

بافرها و محلولها: محلول استوک اکریلامید (۳۰ درصد)، تریس (۱/۵ مولار با pH ۸/۸)، تریس (۰/۵ مولار مولار با pH۶/۸) سدیم دودسیل سولفات (۱۰ درصد w/v)، پرسولفات آمونیوم (۱۰ درصد)، TEMED، (بافر الکترود (بافر مخازن)، بافر نمونه، PBS، محلول خشک کننده (۳).

روش کار

نمونه‌های مورد استفاده جهت جداسازی ویروس شامل ۵۰۷ نمونه سر مرغ مشکوک به بیماری نیوکاسل بود که از نقاط مختلف ایران با همکاری ادارات دامپزشکی استانها و دامپزشکان بخش خصوصی شاغل در مزارع پرورش طیور یا آزمایشگاههای تشخیص دامپزشکی، از تابستان ۱۳۷۹ تا پاییز ۱۳۸۰ جمع آوری و در شرایط مطلوب حمل و به بخش ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارجاع داده شده بود. برخی مشخصات این نمونه‌ها در جدول ۱ قید شده‌اند.

پس از از آماده سازی مغز مرغهای مشکوک به بیماری نیوکاسل اقدام به تلقیح نمونه ها به داخل حفره الانتوئیک تخم مرغ جنین دار ۷ تا ۹ روزه گردید. میزان ۰/۲-۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های فوق الذکر در شرایط استریل به داخل حفره الانتوئیک حدود ۱۰۱۴ عدد تخم مرغ جنین دار ۷ تا ۹ روزه طی یک دوره یک ساله نمونه گیری تلقیح گردید. پس از انکوباسیون جنینها، تلفات روزهای دوم تا پنجم را یاد داشت نموده و سپس در شرایط استریل و کنار شعله اقدام به استخراج مایع الانتوئیک گردید. مایعات استخراج شده جهت آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار می‌گرفت (۱،۲،۵،۷،۲۰).

سپس آزمون هماگلوتیناسیون بر روی کلیه نمونه‌های حاصله و تأیید حضور ویروس نیوکاسل توسط آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون انجام گرفت. به منظور انجام آزمون هماگلوتیناسیون از میکروپلیت U شکل ۹۶ گوده‌ای و رقتهای دو تایی از نمونه ویروس و گلبول قرمز شسته شده مرغ استفاده گردید. پس از انجام آزمون هماگلوتیناسیون و جداسازی موارد مثبت و منفی از لحاظ قدرت هماگلوتیناسیون، به منظور تأیید حضور ویروس نیوکاسل در نمونه‌های مثبت توسط آنتی سرم فوق ایمن خرگوشی با تیتر $\frac{1}{4096}$ که قبلاً در بخش ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی تهیه شده بود اقدام به انجام آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) گردید و تنها نمونه هایی که در آزمون HA پاسخ مثبت داده و در آزمون HI خنثی می گردیدند، به عنوان ویروس بیماری نیوکاسل در آزمونهای بعدی مورد استفاده قرار می گرفتند (۱۴).

خالص سازی و پروتئین سنجی نمونه‌های ویروسی: برای خالص سازی نمونه‌های ویروسی ابتدا نمونه‌ها را با ۱۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نموده، مایع رویی جدا شده مجدداً به مدت ۲ ساعت در ۳۰۰۰۰g و در حرارت ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده و رسوب حاصله پس از شستشو برداشت، به عنوان منبع ویروس به کار گرفته شد. به منظور به حداقل رساندن آسیب به نمونه‌های ویروسی، این نمونه‌ها را در لوله‌های اپندورف تقسیم بندی و در فریزر c ۸۰°- نگهداری شد. مرحله بعد پروتئین سنجی نمونه‌های ویروسی به روش لوری انجام گرفت. و میزان پروتئین نمونه ها در حد ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تنظیم گردید.

روش آزمایش: جهت انجام الکتروفورز ژل پلی اکریلامید نمونه ها از سیستم ژل نا پیوسته که شامل ژل پایین (ژل جداکننده) ۱۰ درصد و ژل بالا (ژل متراکم کننده) ۵ درصد حاوی SDS استفاده گردید. پس از انعقاد ژل پلی اکریلامید در شرایط مطلوب اقدام به استقرار نمونه های آماده شده در چاهکهای ژل متراکم کننده می گردید البته قبل از قرار دادن نمونه ها در ژل می بایستی یک حجم از نمونه های آماده شده در مراحل قبلی به یک حجم بافر نمونه اضافه شده و پس از ۵-۳ دقیقه حرارت در c°۹۵ قرار داده شود (۳). سپس ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه به هر چاهک ریخته شده و پس از استقرار صفحات حاوی ژل در تانک مربوطه اقدام به الکتروفورز نمونه ها در ولتاژ ۸۰ و سپس ۱۴۰ ولت گردید. پس از اتمام کار ژل مربوطه با استفاده از رنگ کوماسی برلیانت بلو R250 رنگ آمیزی شده و توسط محلول رنگ بر خطوط مربوط به باندهای پروتئینی آشکار گردیدند. سپس با استفاده از محلول ویژه خشک نمودن ژل و غشأ سلوفان اقدام به خشک نمودن ژلهای حاصله به منظور حفظ و نگهداری آنها گردید که تصویر ژل خشک شده در ادامه آورده شده است (۳).

جدول ۱ - مشخصات و تعداد نمونه‌های آزمایش شده و ویروس های مورد بررسی در فاصله زمانی تابستان ۱۳۷۹ تا پاییز ۱۳۸۰.

محل ارسال	سن مرغ	تعداد کل	موارد مثبت	موارد دارای الگوی متفاوت
اصفهان	۲۸ روزه	۳۶	۴	۱
اصفهان	۳۵ روزه	۱۸	۲	
اصفهان	۱۲ روزه	۲۴	-	
اصفهان	۱۲ روزه	۲۸	-	
اصفهان	۵ روزه	۱۲	-	
تهران	سنین مختلف	۱	۱	
چهارمحال و بختیاری	سنین مختلف	۲۴	-	
دامغان	۲۹ روزه	۱۲	-	
شهرکرد	۱۷ روزه	۲۸	۲	
شهرکرد	۱۴ روزه	۳۲	-	
قزوین	۲۲ روزه	۵۴	۳	
قزوین	۱۵ روزه	۳۰	۵	۱
قم	۳۱ روزه	۸	۴	
کرج	۲۰ روزه	۱۰	۱	
کرج	۲۵ روزه	۷	-	
گیلان	سنین مختلف	۳۶	۲	۱
گیلان	۱۸ روزه	۱۵	۲	
مازندران	۱۵ روزه	۱۵	۳	
مرکزی	۳۰ روزه	۲۰	-	
مرکزی	۱۸ روزه	۲۵	-	
مرکزی	۹ روزه	۲۵	-	
ورامین	۲۵ روزه	۱۸	-	
یزد	۲۱ روزه	۲۹	۱	
جمع کل		۵۰۷	۳۰	۳

نتایج

پس از انجام آزمونهای اولیه بر روی کلیه نمونه های حاصله و تأیید حضور ویروس بیماری نیوکاسل توسط آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون، تعداد ۳۰ نمونه ویروس بیماری نیوکاسل از ۵۰۷ نمونه مغز مرغ مبتلا به فرم حاد بیماری جدا گردید که برخی مشخصات این نمونه ها در جدول ۱ قید شده‌اند.

پس از رنگ آمیزی و رنگ زدایی ژلهای حاصله، اقدام به عکسبرداری و ثبت نتایج گردید جهت محاسبه وزن مولکولی هر کدام از باندهای پروتئینی حاصل، حرکت نسبی(Relative mobility "R_f")نمونه‌ها و مارکر مربوطه محاسبه و ثبت گردیدند.

نتایج حاصله حاکی از حضور حداقل ۶ باند پروتئینی در نمونه‌ها بود که وزن مولکولی هر کدام از باندها به ترتیب شامل باندهای ۸۰، ۷۲، ۶۴، ۴۳، ۲۷ و ۲۳ کیلودالتونی می باشد. همچنین الگو های الکتروفورتیک پروتئینی حاصل از سویه‌های واکسن (B_1 و لاسوتا) نیز مورد بررسی و ثبت قرار گرفت. با مقایسه نتایج حاصله از اغلب سویه‌های حاد با سویه‌های واکسن اختلافی در الگوی پروتئینی این ویروسها مشاهده نگردید. البته در ۳ مورد از ۳۰ نمونه ویروسی حاد جدا شده از موارد بیماری به جای حضور باند پروتئینی ۶۴کیلو دالتونی باند ۴۸ کیلو دالتونی مشاهده گردید که در تصویر ۱ با علامت پیکان مشخص شده است. در تصویر ۲ نیز علاوه برنمونه های خالص شده ۴ نمونه نیز قبل از خالص سازی الکتروفورز شده اند که حضور باندهای اضافی به خوبی مشخص می باشند.

بحث

تشخیص آزمایشگاهی کلاسیک بیماری نیوکاسل که براساس جداسازی اولیه این جرم و انجام آزمون سرولوژی و در نهایت سنجش میزان پاتوژنیسیته اجرام جدا شده از موارد بیماری کاری است بسیار وقت گیر و پر هزینه، لذا یافتن راه سریع و مطمئن که بتواند حضور جرم حاد بیماری نیوکاسل را در زمان کوتاهی مشخص نماید همیشه به عنوان یکی از مشغله‌های ذهنی دست اندرکاران تشخیص بیماریهای طیور بوده است. با علم به اینکه اختلافات موجوددر ویژگیهای اجرام مختلف ناشی ازتغییراتی است که در ژنوم این اجرام رخ داده است،پس می توان در بسیاری ازموارد (نه درهمه موارد) با مطالعه پروتئینهای کد شده توسط ردیفهای ژنتیکی این اجرام به تفاوتهای موجود در آنها پی برده و در جهت تشخیص سریع و دقیق بیماریهای ناشی از این اجرام به کار گرفت (۱۱،۱۲،۱۴،۱۶).

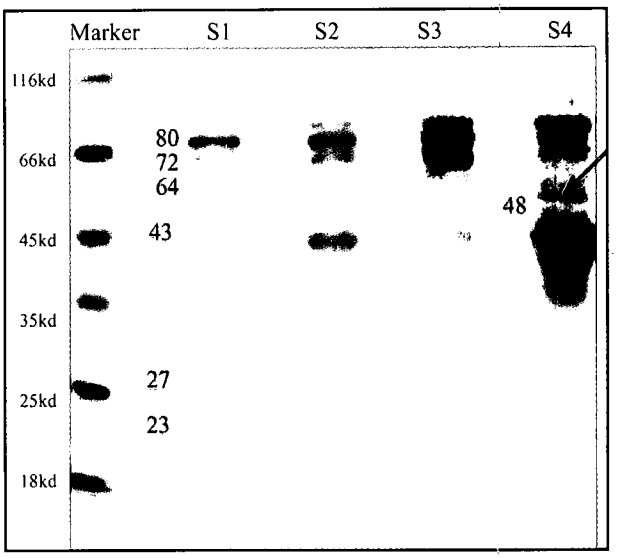
طی مطالعاتی که توسط محققین مختلف در نقاط مختلف دنیا صورت گرفته، به طور متوسط ۸ پروتئین در ویروس بیماری نیوکاسل مورد شناسایی قرار گرفته است و از طریق مطالعات تکمیلی، وظیفه و محل استقرار هر کدام از این پروتئینها، مشخص شده و اختلافات مختصر مشاهده شده در این موارد نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. در بررسی که توسط Kumanan و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام پذیرفته است تفاوتهای مشخصی را در اندازه‌ها و حتی عمل پروتئینهای کد شده توسط ویروس، در شرایط مختلف کشت مشخص نموده‌اند. برخی از پروتئینها فقط در شرایط محیط کشت سلولی قابل ردیابی بوده است و برخی دیگر در شرایط ویژه‌ای قادر به شکافته شدن و تبدیل به پروتئینهای کوچکتر می‌باشند، تشخیص داده شده‌اند(۱۰).

آنچه مشخص است عادت یافتن جرم به میزبانهای مختلف مثل تخم مرغ جنین دار و کشت سلولی فیبروبلاست جوجه یا سلول BHK تفاوتهای مختصری را در الگوهای پروتئینی ایجاد می‌نماید. به عنوان مثال پروتئین ۲۲۰-۱۸۰ کیلودالتون که به نام پروتئین L و ازمحصولات ژنی به همین نام حاصل می‌آید عموماً در ویروسهای عادت یافته به کشت سلولی قابل ردیابی است. جالب توجه آنکه تغییر در اندازه این پروتئین در ویروسهاس مختلف، نتیجه‌ای در تغییر پاتوژنسیته ویروس نداشته است. در بررسی حاضر از آنجایی که ویروسهای مورد نظر در تخم مرغ جنین دار تکثیر شده و حاصل آمده‌اند پروتئین ۱۸۰-۲۲۰ کیلودالتون ردیابی نگردید (۱۸،۱۹).

همان گونه که در مبحث نتایج نیز ذکر شده است ۶ باند پروتئینی به وزن مولکولی متوسط ۸۰، ۷۲، ۶۴، ۴۳، ۲۷، ۲۳ کیلو دالتونی تشخیص داده شده‌اند که چنین نتایجی با نتایج سایر محققین همخوانی دارد. مثلاً پروتئین ۷۲ کیلو دالتونی در منابع مختلف بین ۷۶-۷۴ کیلودالتون قید شده است. و وظیفه آن به عنوان HN معرفی گردید (۹،۱۰،۱۲،۱۹).

یکی از وجوه تفاوت سویه‌های حاد (ولوژنیک) از سویه های غیر حاد (لنتوژنیک و واکسینال) در ساختمان پروتئین HN می‌باشد که چنین اختلافی در آزمون SDS-PAGE غیر قابل تشخیص بوده و تنها از طریق آزمون PCR و تعیین ردیف نوکلئوتیدی این ژن قابل تشخیص است (۱۱).

پروتئین دیگر که در این بررسی مورد توجه قرار گرفته، پروتئین ۶۴ کیلو دالتونی است که در متون مختلف بین ۶۵-۵۵ کیلودالتون گزارش شده است این پروتئین به عنوان پروتئین فیوژن(F) این پروتئین جزء گلیکو پروتئینهای سطحی ویروس بوده و باعث امتزاج سلول، نفوذ به داخل سلول و انتشار ویروس از سلولی به سلول دیگر می گردد. پروتئین بعدی پروتئین ۴۳ کیلودالتونی است که در متون مختلف نیز در حد ۴۴ کیلودالتون معرفی شده است این پروتئین، پروتئین ماتریکس یا زمینه‌ای بوده و در فضای بین پوشینه و نوکلئوکپسید مستقر است. در بررسی حاضر در سه مورد از موارد آزمایش به جای باند پروتئینی ۶۴ کیلودالتون (پروتئین F) پروتئینی با وزن ۴۹-۴۸ کیلودالتون مشاهده گردید لازم به ذکر است که این سه مورد از



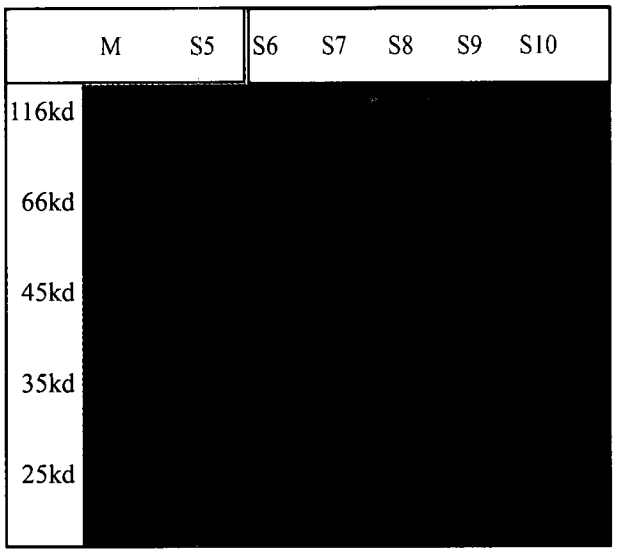
تصویر ۱- باندهای پروتئینی مشاهده شده در الکتروفورز ویروسهای حاد نیوکاسل جدا شده در ایران باندهای ۸۰-۷۲-۶۴-۴۳-۲۷-۲۳ کیلو دالتونی در نمونه های S_1 و S_2 (مربوط به سویه های حاد) S_3 (مربوط به واکسن) قابل مشاهده می باشند. در نمونه S_4 به جای باند ۶۴ کیلو دالتون باند ۴۸ کیلودالتون مشخص می باشد.

ویروسهای جدا شده از موارد حاد بیماری بوده و قبلاً در مقالات سایرین مورد توجه قرار نگرفته است. به نظر می‌رسد که این پروتئین یا حاصل بروز تغییری در پروتئین F ویروس و در نتیجه ایجاد تغییر در وزن مولکولی آن شده است و یا حاصل شکافتن پروتئین F_0 به F_1 و F_2 می‌باشد. به طوری که در مقاله Della-Porta در سال ۱۹۸۹ وAlexander در سال ۱۹۹۰ حاصل شکافته شدن پروتئین F_0 (به وزن مولکولی ۶۸-۶۷ کیلودالتون)، تولید پروتئینهای F_1(۵۵ کیلودالتون) و F_2(۱۵-۱۲ کیلودالتون) ذکر شده، از اینرو شاید بتوان حضور پروتئین ۴۹-۴۸ کیلودالتون و عدم حضور پروتئین ۶۴ کیلودالتون در نمونه‌های مورد نظر را به پروتئین F_1 نسبت داد (۴،۹،۱۰).

لازم به ذکر است شکافته شدن پروتئین F_0 به F_1 و F_2 تنها در شرایط حضور برخی پروتئازهای اختصاصی سلولی در طی مراحل آغازین عفونت زایی ویروس رخ می‌دهد اما چگونگی بروز این حالت در نمونه‌های فوق الذکر مشخص نبوده و نمی‌توان با قاطعیت رخداد چنین حالتی را توجیه نمود. البته نمی‌توان ارتباط مستقیمی بین حضور این پروتئین وحدت جرم برقرار نمود ولی می‌تواند به عنوان یکی از ملاکهای مورد نظر در جهت تفریق برخی از سویه‌های حاد از غیر حاد مورد توجه قرار گیرد (۱،۴).

پروتئینهای ۲۷ و ۲۳ کیلودالتونی که در ویروسهای مورد مطالعه در این تحقیق مشاهده شده‌اند، در متون سایر محققین مورد توجه قرارنگرفته و بعضاً به عنوان قطعات پروتئینی همراه با پروتئین H و یا قطعات پروتئینی حاصل شکافته شدن سایر پروتئینهای ویروسی اشاره شده‌اند. به نظر می‌رسد علاوه بر پروتئینهای ذکر شده در بالا، براساس تعداد ژن های موجوددر ژنوم این ویروسها، پروتئینهای دیگری نیز وجود داشته باشند (۱۰،۱۲).

این پروتئینها اغلب وظیفه آنزیمی داشته و در زمره پروتئینهای غیرساختمانی ویروس محسوب می‌شوند. برخی از این پروتئینها تنها در مرحله خاصی از چرخه تکثیر ویروس تولید شده و پس از انجام وظیفه محو می‌گردد. اصولاً به واسطه حساسیت فوق العاده این پروتئینها ردیابی چنین پروتئینهایی باتوسل به روشهای معمول ردیابی پروتئینهای ویروسی چندان موفقیت آمیز نخواهد بود. همانگونه که در اهداف تحقیق نیز مورد توجه قرار گرفته است یکی از اهداف این تحقیق، مشخص نمودن اختلافات احتمالی



تصویر ۲ - مشاهده باندهای اضافی قبل از خالص سازی در نمونه های S_7 و S_8 و S_9 و S_{10} و باندهای اختصاصی ویروس در نمونه های S_5 و S_6.

سویه‌های حاد از سویه‌های واکسینال می‌باشد که بدین منظور از سویه‌های واکسن زنده (B_1 ولاسوتا) نیز در آزمونSDS-PAGE بهره گرفته شده است. اما با مقایسه نتایج حاصله از اغلب سویه‌های حاد با سویه‌های واکسن اختلافی در الگوی پروتئینی این ویروسها مشاهده نگردید. شاید بتوان تنها وجه اختلاف این موارد را مشاهده پروتئین ۴۹-۴۸ کیلودالتونی درموارد خاصی از سویه‌های حاد و عدم مشاهده این پروتئین درسویه‌های واکسینال دانست (۱۰،۱۲،۱۵).

از آنجایی که در مقالات مختلف اشاره‌ای به نقش پروتئین ۴۸-۴۹ کیلودالتونی در بیماریزایی و ارتباط آن با حدت ذکر نشده است و تحقیق حاضر تقریباً تنها تحقیقی است که به حضور پروتئین ۴۹-۴۸ کیلو دالتون اشاره دارد، برقراری ارتباط علیتی بین حدت و اختلاف مشاهده شده در پروتئین مورد نظر نیاز به انجام تحقیقات بیشتری نظیر ردیابی پادتنهای ضد این پروتئین در موارد بیماری موارد واکسیناسیون و همچنین تعیین اختلافات ژنتیکی موجود در ژن کد کننده این پروتئین در ویروسهای مختلف، می‌تواند به عنوان ادامه راه این تحقیق توصیه گردد (۱۶).

ناگفته نماند که ممکن است پروتئینی به طور مستقیم در حدت یک جرم نقش نداشته باشد، یعنی پادتن های تشکیل شده بر علیه آن در پیشگیری از بیماریزایی نقش نداشته باشند اما این پروتئین به عنوان یک شاخص در اجرام حاد به همراه خواص حدت حضور داشته باشد. از این دیدگاه، حضور چنین پروتئینهایی در اجرام، اساس تفریق و تشخیص آزمایشگاهی اجرام حاد از غیر حاد را میسر می‌سازد. که دراین تحقیق پروتئین ۴۹-۴۸ کیلودالتون علی رغم عدم دخالت مستقیم در حدت، می‌تواند به عنوان یک ملاک در تحقیقات مربوط به تشخیص و تعیین پاتوژنوسیته برخی از جدایه های ویروس بیماری نیوکاسل معرفی گردد.

تقدیر و تشکر

هزینه های انجام این تحقیق از محل طرح تحقیقاتی شماره ۲۱۵/۱/۵۰۲ مصوب دانشگاه تهران تأمین گردیده است.

References

۱. کیوانفر،ه . همت زاده، ف. محمودیان، ع. (۱۳۸۰): ویروس‌شناسی دامپزشکی (بیولوژی ویروسها)، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۴۳، ۵۷، ۶۱، ۶۵، ۸۰، ۸۲.

۲.کیوانفر، ه . همت زاده، ف. (۱۳۸۰): راهنمای عملی درس ویروس‌شناسی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

۳. مصطفایی، ع. (۱۳۷۸): الکتروفورز پروتئین در ژل، راهنمای عملی و نظری، صفحه: ۱۲-۲، ۳۸-۳۳، ۵۴-۵۲، ۸۹-۸۷، ۱۰۲-۱۰۰.

4. Alexander, D.J. (1990): Avian Paramyxoviridae - recent developments -Vet. Mic. 23: 103-114.

5. Brianl, W.J.M. and Hillar, O.K. (1996): Virology Methods Manual, Academic press, PP: 30-33, 41 ,54-56.

6. Buxton, A. and Fraser, G. (1977): Animal Microbiology. Rickettsias and Viruses. Blackwell Scientific Publication Vol: 2, PP: 495-498.

7. Castro, AE. and Heuschele, W.P. (1992): Veterinary Diagnostic Virology, Mosby Year Book. PP: 54-57.

8. Collier, L. and Oxford, J. (2000): Human virology. 2nd ed, Oxford University Press. PP: 75-78.

9. Della-porta, AJ. and Spencer, T. (1989): Newcastle disease. Aust. Vet. J. 66: 224-226.

10. Heller, ED., Levy, AM., Vaiman, R. and Schwartsburd, B. (1997): Chicken-embryo fibroblasts produce two types of interferon upon stimulation with Newcastle disease virus. Vet. Imm. Immunopath. 57:289-303.

11. Kianizadeh, M., Ideris, A., Shahrabadi, M.S. ,Kargar, R., Pourbakhsh, S.A., Omar, A.R. and Yusoffl, K. (1999): Biological and Molecular characterization of Newcastle disease virus Isolated from Iran. Archive of Razi Institute. 50: 1-10.

12. Kumanan, K., Mustaq, A.N. and Venkatesan, RA. (1994): Protein profile of some strains of Ranikhet disease virus. Indian-J. Anim. Sci.64: 4, PP: 319-321.

13. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzine, K.M.C. and Studdert, M.J. (1999): Veterinary Virology. Academic press. 3rd ed, 411-428.

14. OIE, M. (2000): Newcastle disease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. OIE Publication 4th ed, chapter 2.1.15.

15. Ong, H.K.A., Ali, A.M., Omar, A.R. and Yusoff, K. (2000): Cloning and expression of the HN gene from the velogenic viscerotropic Newcastle disease virus strain AF 2240 in Sf9 insect cells. Cytotechnology. 32: 243-251.

16. Slosaris, M., Levy, B., Katz, E., Levy, R. and Zakay, R.Z. (1989): Elevated Virulence of Newcastle Disease Virus Strains Following Serial Passages in Kidney Cells in Vitro. Avi. Dis. 33: 2: 248-253.

17. Song, C.S. and Lee, T.C. (1988): Effects of chemical inactivants on viral polypeptides of Newcastle disease Vir. Res. Rep. Rural. Develop. Admin. Vet. 30:77-89.

18. Swain, P., Verma, K.C. and Kataria, J.M. (1997): Characterization of structural polypeptides of velogenic Newcastle disease virus. Ind. J. Com. Mic. Imm. Infec. Dis. 18: 125-129.

19. Tseung, HB., Lai, CK., Lin, DT., Lin,YL., Chen, CW., Lian, WC. and Chen, WF. (1993): Purification of envelope glycoproteins of the Newcastle disease virus. J. Chin. Soi. Vet. Sci. 19: 11-18.

20. Versteeg, J. (1985): A Colour Atlas of Virology. Medical Wolf Publication. PP: 45-49, 196-198, 189.