مطالعه پادگن‌های دخیل در ایمنی هومورال ویروس IBR

فرهید همت زاده[1]* هادی کیوانفر[1] مهدی احمدی[2]

دریافت مقاله: ۱شهریور ماه ۱۳۸۴
پذیرش نهایی: ۱۲ اردیبهشت ماه ۱۳۸۵

این تحقیق با هدف مطالعه الگوی پروتئینی وبررسی پادگن‌های دخیل در ایمنی هومورال در فاصله زمانی بهار ۱۳۸۲ تا بهار ۱۳۸۴ انجام گرفت. ۱۰ نمونه ویروس IBR جداشده از موارد تنفسی بیماری، که قبلا با توسل به آزمون خنثی‌سازی سرم تایید شده بودند. برای این منظور انتخاب گردیدند. کلیه نمونه‌ها در کشت سلولی تکثیرشده وپس از خالص‌سازی به روش اولتراسانتریفوژ، آزمون SDS-PAGE و ایمونوبلاتینگ با سرم‌های مثبت مربوط به گاوهای آلوده انجام گرفته و وزن ملکولی باندهای پروتئینی، در هر دوآزمون مشخص گردید. پس ازآزمایش مشخص گردید که تمام نمونه‌ها از لحاظ تعداد باند ووزن مولکولی با یکدیگر مشابه بودند، جز در یک نمونه که باند اضافه ۱۲۵-۱۲۰ کیلودالتونی مشاهده گردید. در ایمونوبلاتینگ نمونه‌های ویروسی با آنتی سرم گاوی، ۱۲ باند با وزن‌های مولکولی ۱۵۰، ۱۳۰، ۱۱۵، ۹۷، ۷۷، ۷۰، ۵۵، ۴۵، ۴۰، ۳۸، ۳۲ و ۲۵ کیلودالتونی شناسایی شد که نشانگر دخیل بودن این پادگن‌ها در تحریک ایمنی هومورال درگاوهای آلوده به این ویروس می‌باشد. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۱، ۶۱-۵۷.

واژه‌های کلیدی: ویروس IBR، SDS-PAGE، ایمونوبلاتینگ، پادگن.

STUDY OF EFFECTOR ANTIGENS OF IBR VIRUS ON HUMORALIMMUNITY

Hemmatzadeh, F.[1]*, Keyvanfar, H.[1], Ahmadi, M.[2]

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

The objective of this study was to determine the protein pattern and antigenic structure of BHV-1. Ten viral isolates from cows with clinical signs of respiratory infections were selected for this study and confirmed by SN test. All samples were cultured on cell cultures and purified by ultracentrifugation. Purified isolates were electerophorsed using SDS-PAGE method and immunoblotted. Viral antigens were detected using anti BHV-1 bovine antiserum and molecular weight of the bands were determined. All samples showed identical band number and molecular weight except for one sample which revealed an additional 120-125 KDa band. Also immunoblotting data resulted in identified of twelve bands (150, 130, 115, 97, 77, 70, 55, 45, 40, 38, 32 and 25 KDa) suggesting involvement of these antigens in evoking humoral immune response in affected cattle. ***J.Vet.Res. 62,1:57-61,2007***.

Key words: virus,IBR, SDS-PAGE, immunoblotting, antigen.

***Corresponding author's email: fhemmat@ut.ac.ir, Tel: 021-66026522, Fax: 021-66026524**

ویروس بیماری رینوتراکئیت عفونی گاوان (IBR) متعلق به خانواده هرپس ویریده، جنس واریسلا ویروس می‌باشد. ویریون‌های این خانواده، کروی و به قطر ۲۰۰ - ۱۲۰ نانومتر (معمولاً ۱۵۰ نانومتر) می‌باشند و دارای پوشینه‌ای هستند که توسط پپلومرهای متعددی تا اندازه ۸ نانومتر احاطه شده است. این ویروسها نوکلئوکپسیدی با تقارن ۲۰ وجهی به قطر ۱۰۰ نانومتر می‌باشد(۱،۱۳).

ژنوم این ویروس‌ها یک مولکول خطی DNA زوج رشته‌ای است. ترکیب، اندازه وساختمان DNA هرپس ویروسها اختلاف چشمگیری دارند. به طور مثال اندازه DNA هرپس ویروس‌ها ۲۴۰-۱۲۱ زوج کیلو باز، در صد گوانین و سیتوزین (G+C) ۷۴- ۳۲ درصد و وزن مولکولی DNA آنها $۶\times۱۵۰-۹۵$ دالتون در نوسان است[10]. ژنوم BHV-1 شامل ۱۳۶ کیلوباز (Kb) توالی نوکلئوتیدی است، که شامل ۶۷ ژن منفرد و ۲ ژن دوتایی در توالی‌های معکوس می‌باشد. ژنوم BHV-1 حداقل ۶۹ پروتئین را در شرایط مختلف کد می‌کند (۱۱،۱۵).

ویریون هرپس‌ویروس‌ها واجد بیش از ۳۰ پروتئین است که ۶ پروتئین در نوکلئوکپسید و ۲ پروتئین وابسته به DNA می‌باشد. حدود ۱۲-۱۰ گلیکوپروتئین در غشاء هرپس ویروسها وجود دارد. حداقل ۸ پروتئین کد شده توسط ویروس در غشاء جای گرفته است(۱۰،۱۵).

بولتن و همکاران در سال ۱۹۸۳ حضور ۳۳ پلی پپتید با وزن مولکولی ۲۷۵ - ۱۳ کیلودالتون در ویروس IBR نشان دادند. ۱۱ پلی پپتید در غشاء ویروس و ۱۵ پلی پپتید در نوکلئوکپسید حضور دارد(۴).

گلیکوپروتئین‌های اصلی شناخته شده در ژنوم BHV-1 گلیکو پروتئین‌های C,B و D می‌باشد. امروزه مشخص گریده که در ژنوم BHV-1، هفت گیلکوپروتئین E,I,H,L,G,K,M و تعدادی آنزیم نظیر ریبونوکلئوتیداز ردکتاز، DNA پلی مراز، dutpase و (تعدادی پروتئین‌های تنظیم کننده مانند BICPO, BICP4, BICP22, BICP27 و TIF و تعدادی پروتئین تگومنت مثل VP8 وجود دارد(۱۲).

۳۳ پلی پپتید با وزن مولکولی ۲۷۵-۱۳ کیلودالتون در ویریون ویروس IBR وجود دارد. ۱۱ پلی پپتید (۱۰ پلی پپتید گلیکوزیله و ۱ پلی پپتید ۱۰۷ کیلو

۱) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران -ایران.
۲) دانش آموخته دکتری دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.
*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۲۱۴۳۶-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱.
Email:f hemmat@ut.ac.ir

دالتونی غیر گلیکوزیله) در سطح غشاء، ۱۵ پلی پپتید در ساختار نوکلئوکپسید به همراه تعدادی پروتئین‌های تنظیم کننده تکثیر ویروس در ساختمان ویریون ویروس IBR شناسایی شده است. گلیکوپروتئین E(gE) واجد فعالیت رسپتور Fc است و به IgG متصل می‌گردد. ۱۰ گلیکو پروتئین با وزن‌های مولکولی ۱۸۰، ۱۵۰، ۱۳۰، ۱۱۵، ۹۷، ۷۷، ۷۴، ۶۴، ۵۵، ۴۵ کیلودالتونی و یک پروتئین غیر گلیکوزیله با وزن مولکولی ۱۰۷ کیلودالتون در سطح ویروس شناخته شده است (۱۵،۱۶).

رسوب با آنتی بادیهای منوکلنال و منواسپسفیک نشان می‌دهد که سه مجموعه رسوب دهنده ۵۵/۷۴/۱۳۰ و ۷۷/۱۵۰ و ۹۷/۱۸۰ کیلو دالتونی مهم‌ترین اجزاء غشاء ویروس است. این گلیکوپروتئینها در غشاء ویروس و در سطح سلول‌های آلوده با BHV-1 موجود بوده و با آنتی بادیهای منوکلنال خنثی کننده و منواسپسفیک واکنش نشان می‌دهند. آنتی‌بادی علیه پروتئین ۷۷/۱۵۰ بیشترین سهم از آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ویروس را تشکیل می‌دهد و پس از آن آنتی‌بادی علیه پروتئین ۹۷/۱۸۰ می‌باشد. آنتی‌بادیهای منوکلنال علیه مجموعه پروتئینی ۵۵/۷۴/۱۳۰ درصورت حضور کمپلمان خنثی کننده هستند. آنتی سرم منواسپسفیک تهیه شده از پروتئین ۵۵ خاصیت خنثی‌سازی را ندارد. پروتئین ۱۰۷ غیر گلیکوزیله است و تولید آنتی بادیهایی می‌نماید که خنثی کننده ویروس BHV-1 نمی‌باشد. پروتئین‌های ۶۴ و ۴۵ توسط آنتی سرم‌های دوره نقاهت رسوب نمی‌کنند و پروتئین‌هایی با منشاء سلولی می‌باشند که در غشاء ویروس جای گرفته‌اند (۳).

پروتئین‌های ۷۴و ۵۵ از طریق باندهای دی سولفیدی مولکول ۱۳۰ را ایجاد می‌نمایند. پروتئین ۱۸۰ دیمر پروتئین ۹۷ و پروتئین ۱۵۰ دیمر پروتئین ۷۷ می‌باشد، اما این دیمرها در خود پیوندهای دی سولفیدی ندارند. پروتئین ۱۰۷ در غشاء و نوکلئوکپسید به مقادیر زیاد دیده می‌شود. در برخی ژل‌های SDS-PAGE باندهای ۱۸۰K و ۱۵۰K ضعیف هستند و به سختی دیده می‌شوند (۴،۵).

هشت پروتئین با وزن‌های مولکولی ۱۵۰، ۱۳۰، ۱۱۵، ۱۰۷، ۹۷، ۷۷، ۷۴ و ۵۵ کیلو دالتونی با آنتی سرم‌های پلی کلنال گاوی پس از دوره نقاهت رسوب می‌دهند. پروتئین‌های ۶۴ و ۴۵ کیلو دالتونی توسط آنتی سرم گاوی شناسایی نمی‌شوند. سه گیلوپروتئین B (۱۳۰k)، C(۹۷k) و D(۷۷k) که قبلاً گلیکو پروتئین‌های I، III، IV نامگذاری می‌شدند، به عنوان مهم‌ترین اجزای غشاء ویروس می‌باشند (۵،۱۲).

پاسخ‌های قوی ایمنی هومورال همه گاوهای آلوده شده با BHV-1 علیه گلیکوپروتئین‌های اصلی ۵۵/۷۴/۱۳۰ و ۷۷/۱۵۰ و ۹۷/۱۸۰ در طی عفونت اولیه می‌باشد. علیه مجموعه پروتئینی ۵۵/۷۴/۱۳۰ پاسخ ایمنی سریع و پایدارتری ایجاد می‌شود. آنتی‌بادی‌ها علیه مجموعه پروتئینی ۷۷/۱۵۰ و ۹۷/۱۸۰ دیرتر و بعد از عفونت ظاهر می‌شود و مقادیر آن در آنتی سرم دامهای مختلف، متفاوت است. مقادیر آنتی‌بادی ضد سه مجموعه گلیکوپروتئینی پس از بهبودی کاهش می‌یابد، اما در طی عفونت مجدد یا فعال شدن ویروس مخفی با دگزامتازون شدیداً افزایش می‌یابند (۳،۱۷).

ویروس‌های IBR، مارک بورکیت لمفوما آنتی ژنهای مشترکی دارند که با آزمون‌های آگارژل دیفیوژن و ایمونوفلورسنت غیر مستقیم نشان داده شده‌اند. به طور مثال حداقل دو آنتی ژن مارک در ویروس IBR و بورکیت لمفوما یکسان است. وسترن بلاتینگ با سرمهای فوق ایمن خرگوش تعدادی پروتئین با واکنش متقاطع بین ویروس BHV-1 و ویروس‌هاری کاذب نشان داده است و در تحقیقی که روی سویه‌های IBR فرم تنفسی و فرم تناسلی انجام گرفت، نشان داده شد هر یک از سویه‌های تنفسی و تناسلی مشابه یکدیگر بودند ولی سویه‌های تنفسی و تناسلی در سه پلی پپتید VP7، VP12، VP1 با یکدیگر اختلاف داشتند (۸،۱۴).

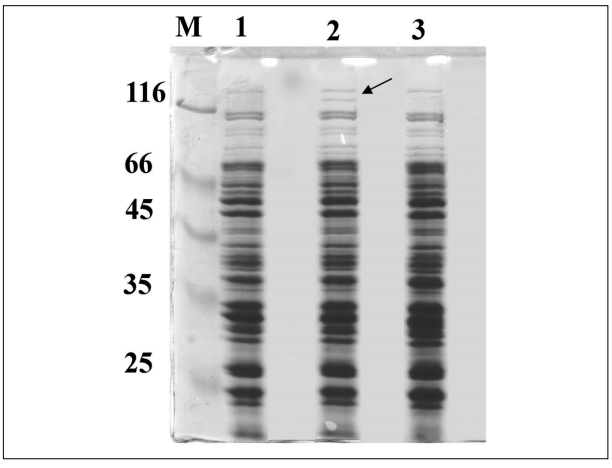
سویه‌های مختلف ویروس IBR از لحاظ آنتی ژنیک مشابه می‌باشند، هر چند اختلاف جزیی بین سویه‌های مختلف توسط آزمونهای خنثی‌سازی در کشت بافت نشان داده شده است. به طور خلاصه می‌توان گفت که سویه‌های مختلف BHV-1 اختلاف پادگنی فاحشی با یکدیگر ندارند و همه آنها را باید در یک گروه هرپس ویروس تیپ ۱ گاوی رده‌بندی نمود. اختلاف‌هایی بین ژنوم‌های جدایه‌های مختلف ویروس BHV-1 حاصل از اشکال مختلف بیماری با تجزیه و تحلیل آنزیم‌های محدودیت DNA تشخیص داده شده است. اما مطالعات همانندسازی اسید نوکلئیک DNA ویروسی حداقل ۹۵ درصد شباهت ژنتیکی را نشان می‌دهد. برخی محققین معتقدند که سویه‌های BHV-4 ممکن است شبیه BHV-1 باشند که متحمل تغییرات بیولوژیک خاصی شده‌اند (۳،۸).

جداسازی ویروس عامل بیماری در کشت سلول و ردیابی پادتن در دوبار خونگیری یکی در شروع بیماری ودیگری در دوره نقاهت برای تشخیص بیماری ضروری است. با استفاده از برخی روشهای سرولوژی از قبیل روش پادتن‌های درخشان، الایزا، رادیوایمونواسی، ایمونوپراکسیداز، ثبوت عناصر مکمل و خنثی‌سازی سرم می‌توان حضور پادتن ضد ویروس را در سرم تعیین نمود (۱،۲،۱۷).

مواد و روش کار

پس از انتخاب ۱۰ نمونه ویروس IBR جدا شده از شکل تنفسی بیماری IBR، ۲ میلی لیتر از هر کدام به یک فلاسک ۷۵ سانتیمتر مربعی واجد کشت سلولی RBK، که از نظر تراکم و زمان پاساژ قبلا کنترل شده بود، تلقیح گردید. پس از ۴۸ الی ۷۲ ساعت و به دنبال کامل شدن CPE اقدام به خالص‌سازی ویروس در طی ۲ مرحله گردید. در مرحله اول سانتریفوژ دور سبک ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در مرحله دوم سانتریفوژ با قدرت ۷۰۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک و نیم ساعت انجام شد. رسوب حاصله پس از یک بار شستشوی آرام با PBS در ۵۰۰ میکرولیتر PBS حل شده و جهت خلوص بالاتر، مجدداً در ۷۰۰۰۰g و در روی بالشتک سوکرز ۳۰ درصد سانتریفوژ گردید و پس از حل رسوب در PBS، میزان پروتئین آن به روش لوری سنجیده شد.

پس از سنجش میزان پروتئین نمونه‌ها میزان پروتئین در حد ۲۰۰۰ - ۱۰۰۰



تصویر۱-

میکروگرم در میلی لیتر تنظیم شده ونهایتا اقدام به الکتروفورز نمونه‌ها در سیستم ژل پلی اکریلامید ناپیوسته گردید.

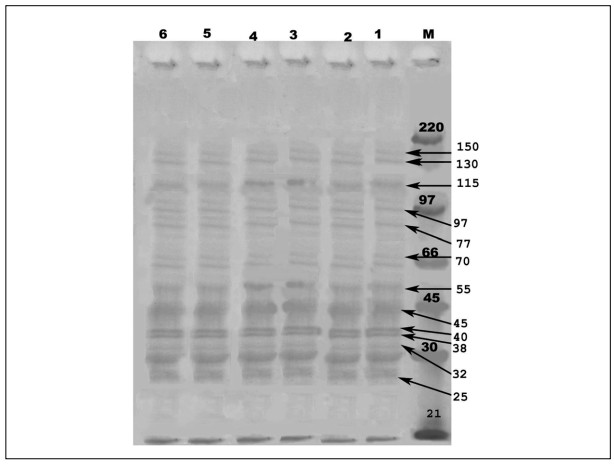
بدین منظور کلیه نمونه‌ها در ژل ۵ و ۱۰ درصد پلی اکریلامید حاوی SDS درولتاژ ۶۰ و ۱۰۰ میلی ولت الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ‌آمیزی ژل حاصله با کوماسی آبی درخشان و نیترات نقره اقدام به عکس‌برداری و ثبت نتایج گردید. جهت محاسبه وزن مولکولی هر کدام از باندهای پروتئینی حاصل، حرکت نسبی (Rf) نمونه‌ها و مارکر محاسبه و ثبت گردید.

در مرحله دوم، اقدام به انتقال پروتئین‌های ویروسی از ژل به کاغذ نیتروسلولزگردید بدین منظور از سیستم ترانس بلات ساخت شرکت Rad Bio استفاده گردید، انتقال باندهای پروتئینی در حضور بافر انتقال و در ولتاژ ۳۰ ولت به مدت یک شب برروی کاغذ نیتروسلولز و در مجاور یخ انجام گرفت. غشاء مذکور پس از انکوباسیون یک ساعته در بافر انسداد و طی مراحل شستشو به مدت دو ساعت در حضور سرم گاو واجد پادتن ضد ویروس IBR انکوبه گردید. پس از شستشوی مجدد و جهت تایید حضور پادتن‌های متصل به پادگن، غشا نیتروسلولز به مدت یک ساعت در حضور پروتئین G کنژوگه شده با پراکسیداز انکوبه شده و پس از شستشوی نهایی. اقدام به ظهور کمپلکس مذکور با استفاده از سوبسترای تترامتیل بنزیدین گردید. باندهای پادگنی به رنگ آبی تیره درروی غشا ظاهر شده و جهت انجام محاسبات بعدی اقدام به تصویربرداری از غشاهای رنگ‌آمیزی شده گردید.

نتایج

نتایج حاصله حاکی از حضور حداقل ۳۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۸۰-۱۲ کیلو دالتونی می‌باشد. نمونه‌های مختلف ویروسی از لحاظ تعداد باند و وزن مولکولی با یکدیگر مشابه می‌باشند، به جز حضور باند ۱۲۵ - ۱۲۰ کیلو دالتونی که در نمونه شماره۲ مشاهده شد. این نمونه مربوط به کلکسیون ویروس‌های IBR موجود در بخش ویروس شناسی بوده و از یک مورد گاو مبتلا به شکل تنفسی IBR جدا گردیده است (تصویر۱).

باندهای پروتئینی ۱۳۰، ۹۷، ۷۷ کیلو دالتونی در تمامی نمونه‌های



تصویر۲- نمایش باندهای پادگنی ویروسهای IBR مشاهده شده در آزمون ایمنوبلاتینگ.

ویروسی مشاهده شد که در واقع همان گلیکو پروتئین‌های اصلی ویروس IBR می‌باشند که به ترتیب گلیکو پروتئین‌های I(B)، III(C) و IV(D) نامگذاری شده‌اند. این سه باند پروتئینی در ایمونوبلاتینگ (تصویر۲) نیز مشاهده گردیدند. باندهای پروتئینی ۱۸۰ و ۱۵۰ کیلودالتونی بسیار ضعیف می‌باشند و به سختی قابل رؤیت می‌باشند.

در ایمونوبلاتینگ نمونه‌های ویروسی با سرم گاوی حاوی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس IBR، ۱۲ باند با وزن‌های مولکولی ۱۵۰، ۱۳۰، ۱۱۵، ۹۷، ۷۷، ۷۰، ۵۵، ۴۵، ۴۰، ۳۸، ۳۲ و ۲۵ کیلودالتونی شناسایی شد که نشانگر دخیل بودن این پادگن‌ها در تحریک ایمنی هومورال در گاوهای آلوده به این ویروس می‌باشد.

در تصویر۱ باندهای پروتئینی مربوط به جدایه‌های مختلف ویروسی IBR قابل مشاهده می‌باشند در نمونه شماره۲ باند اضافی ۱۲۵-۱۲۰ کیلودالتونی قابل مشاهده می‌باشد در حالی که در ایمونوبلاتینگ این باند قابل ردیابی نبود (تصویر۲).

بحث

کشورهای پیشرفته مهم‌ترین ابزار مبارزه با بیماری IBR را واکسیناسیون می‌دانند که این عمل به همراه بهبود و ارتقای شاخص‌های مدیریتی و بهداشتی گله نقش عظیمی در کاهش میزان عفونت و کاهش خسارات ناشی از بیماری به ویژه عوارض تنفسی و تناسلی داشته است (۱۳،۱۶). مطالعه ساختار آنتی ژنیک ویروس IBR اساس مطالعات بیولوژی ملکولی این ویروس بوده است و جهت تهیه واکسن‌های مارکر و تحت واحد پایه مطالعات قرار گرفته است. شناخت پلی پپتیدها و مکانیسم ایمنی زایی آنها جهت تهیه واکسن‌های تحت واحد از ملزمات این کار است. بنابراین مطالعه بر روی الگوی پروتئینی سویه‌های مختلف ویروس IBR در یک منطقه و حتی یک کشور جهت شناخت سویه‌های مختلف و حتی یافتن ساختارهای پادگنی جدید اساس برنامه‌های تولید واکسن و پیشگیری از این بیماری است (۷،۱۸).

طی مطالعاتی که توسط محققین مختلف در نقاط مختلف دنیا صورت گرفته است، به طور متوسط ۳۳-۳۰ پلی پپتید در ویروس IBR مورد شناسایی قرار گرفته است و از طریق مطالعات تکمیلی وظیفه و محل استقرار هر کدام از این پروتئین‌ها مشخص شده است. دو دسته گلیکوپروتئین طبقه‌بندی شده تحت عنوان اصلی و فرعی بر روی غشاء ویروس حاصل این مطالعات بوده است. نقش ساختمانی و عملکردی این پروتئین‌ها توسط محققین مختلف مورد مطالعه قرار گرفته شده است. همان‌گونه که در مبحث نتایج نیز ذکر شد، حداقل ۳۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی بین ۱۸۰ تا ۱۲ کیلودالتونی در الکتروفورز ویروس‌های خالص شده مشاهده شد که چنین نتایجی با نتایج سایر محققین همخوانی دارد.

این تحقیق که روی سویه‌های جدا شده از فرم تنفسی انجام گرفت، به جز یک مورد (نمونه شماره۲) که باند اضافه ۱۲۵-۱۲۰ کیلودالتونی مشاهده شد (تصویر۵)، اختلاف دیگری مشاهده نگردید. در حالی که این پروتئین در روش ایمونوبلاتینگ قابل ردیابی نبوده و به نظر می‌رسد یا پروتئینی جدیداً تغییر یافته است یا با منشاء غیر از ویروس می‌باشد. البته حضور و ردیابی این پروتئین در مرتبه دوم خالص‌سازی امکان خارجی بودن این پروتئین را ضعیف‌تر می‌سازد.

گلیکوپروتئین‌های ۱۳۰، ۹۷ و ۷۷ کیلودالتونی مشاهده شده در PAGE-SDS و ایمونو بلاتینگ در واقع همان گلیکو پروتئین‌های اصلی ویروس می‌باشد و به ترتیب گلیکو پروتئین‌های B(I)، C(III) و D(IV) نامگذاری شده‌اند. این گلیکو پروتئین‌ها نه تنها به عنوان اجزای ایمنی‌زای ویروس مطرح می‌باشند، بلکه به عنوان واسطه‌های ویروس جهت اتصال، ورود، خروج و گسترش سلول به سلول نیز مطرح می‌باشند و در پاتوژنز ویروس IBR نقش دارند. واکسن‌های تحت واحد B، C و D توسط محققین مختلف تولید و مورد استفاده قرار گرفته شده‌اند(۷،۱۶).

گلیکوپروتئین ۱۳۰ کیلودالتونی از طریق باندهای دی سولفیدی بین پروتئین‌های ۷۴ و ۵۵ کیلودالتونی حاصل می‌شود. از دیمریزاسیون پروتئین ۹۷ کیلودالتونی، پروتئین ۱۸۰ کیلودالتونی و از دیمریزاسیون پروتئین ۷۷ کیلودالتونی، پروتئین ۱۵۰ کیلودالتونی حاصل می‌آیدکه در خود پیوندهای دی سولفیدی ندارند(۱۰،۱۱،۱۵).

۱۰ گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۱۸۰، ۱۵۰، ۱۱۵، ۱۳۰، ۹۷، ۷۷، ۷۴، ۶۴، ۵۵، ۴۵ و یک پروتئین غیر گلیکوزیله با وزن مولکولی ۱۰۷ کیلودالتونی در سطح ویروس IBR متصورند. دو پروتئین ۶۴ و ۴۵ کیلودالتونی را پروتئین‌هایی با منشاء سلولی می‌دانند که در غشاء ویروس جای گرفته‌اند و با آنتی سرم‌های گاوی قابل ردیابی نیستند(۸،۱۵).

این مطالعه با تحقیق انجام شده توسط مارشال همخوانی دارد ولی پروتئین ۱۰۷ کیلودالتونی که تنها پروتئین غیر گلیکوزیله غشاء ویروس است، در ایمونوبلاتینگ با آنتی سرم گاوی بدست آمده توسط آزمون الیزا ردیابی نشد و به جای آن یک باند ۱۱۵ کیلودالتونی مشاهده گردید(۱۰).

همان طور که در مبحث کلیات نیز ذکر گردید، ژنوم ویروس IBR قادر به کد کردن حداقل ۶۹ پروتئین مختلف در شرایط مختلف است. برخی از این پروتئین‌ها تنها در مرحله خاصی از چرخه تکثیر ویروس تولید شده و پس از انجام وظیفه محو می‌شوند. این مطلب می‌تواند دلیلی برای یافتن باندهایی همچون ۴۵، ۳۸، ۳۲، ۲۵ کیلودالتونی باشد.

باند ۴۵ کیلودالتونی مشاهده شده در ایمونوبلاتینگ احتمالا پروتئینی غیر از گلیکو پروتئین ۴۵ کیلودالتونی شناخته شده در غشاء ویروس است. زیرا چنان‌که گفته شد این پروتئین را یک پروتئین با منشاء سلولی می‌دانند و قابلیت ایمنی‌زایی در گاو ندارد. اما از آنجایی که ویروس‌های مورد استفاده در این تحقیق حاصل تکثیر ویروس بر روی کشت سلولی بوده‌اند، ممکن است برخی اجزاء سلولی علی‌رغم خالص‌سازی به روش اولتراسانتریفوژ همچنان همراه با ویروس بوده یا حمل شده باشند، که این پدیده می‌تواند دال بر ردیابی شدن این پروتئین‌ها در SDS-PAGE و نمونه‌ها باشد.

References

۱.کیوانفر، هـ.، همت زاده، ف.، محمودیان، ع. (۱۳۸۰): ویروس شناسی دامپزشکی (بخش بیولوژی ویروس‌ها)، تألیف: ف.ج. فنر و همکاران. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ اول. صفحه: ۶۲،۵۴-۳۵، ۸۲-۸۰، ۲۱۲-۲۱۱، ۲۵۲-۲۵۰، ۲۶۴ و ۲۶۸.

۲.همت زاده، ف.، ممتاز، ح.، صفری، م.، تاجبخش، ا. (۱۳۸۱): بررسی سرولوژیکی آلودگی به ویروس IBR در گاوداریهای استان چهارمحال و بختیاری. پژوهش و سازندگی. شماره ۵۵. صفحه: ۴۳-۳۸.

3. Babiuk LA, Van Drunen Littel-Van den Hurk, S., Tikoo SK.(1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection.Vet. Microbiol. 53:31-42.
4. Bolton, D.C., Yuanchung Zee.(1983) Identification of envelope and nucleocapsid proteins of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Vet. Microbiol.8: 57-68.
5. Branowski, E., Keil, G., Lyaka, J.(1996) Structural and functional analysis of BHV-1 minor glycoproteins; Vet. Microbiol. 53: 91-101.
6. Eric, B., Gtinther, K.(1991) Structural and functional analysis of BHV-1 major glycoproteins. Vet. Microbiol. 27: 81-101.
7. Engels, M., Ackermann, M.(1996) Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. Vet Microbiol. 53:3-15.
8. Evans, D.L., Barnett, J.W.(1972) Antigenic relatioship between the viruses of Infections Bovine Rhinotrachietis, Marek`s disease and Burkitt`s lymphoma. J.Virol. 2: 227-287.

9. Kargar Moakhar, R., Bokaie, R.(2001) Seroepidemiological survey of antibodies against Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Herpes 4 viruses among cattle indiffrent provinces of Iran. Archive of Razi institut. 52: 93-90.
10. Marshall, R.L., Rodriguez, L.L., Letchworth, G. J. (1986) Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus(bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods.J Virol. 57:745-53.
11. Misra, V., Babiuk, L.A., Darcel, C.L.(1983) Analysis of bovine herpes virus-type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. Arch Virol.76:341-54.
12. Misra, V., Blumenthal, R.M., Babiuk, L.A.(1981) Proteins Specified by bovine herpesvirus 1(infectious bovine rhinotracheitis virus). J. Virol. 40:367-78.
13. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzine, M.C., Studdert, M.G.(1999) Veterinary virology. Academic Press. 2th Ed. pp. 212, 218, 301-311.
14. Schwyzer, M., Ackermann, M.(1996) Molecular virology of ruminant herpesviruses. Vet. Microbiol. 53:17-29.
15. Pastoret, P. P., Burtonboy, G., Aguilar-Setien, A., Godart, M., Lamy, M. E., Schoenaers, F.(1980) Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus(Bovid herpesvirus 1), from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural protein. Vet. Microbiol. 5: 187-194.
16. Strube, W., Auer, S., Block, W., Heinen, E., Kretzdorn, D., Rodenbach, C., Schmeer, N.(1996) A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs.Vet. Microbiol. 53:181-9.
17. Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., Barlough, J.E.(1992) Hagan and Burner`S Microbiology of domestic animals. 8th Ed. 594-602.
18. Van Oirschot, J.T., Kaashoek, M.J., Rijsewijk, F.A. (1996) Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. Vet. Microbiol. 53:43- 54.