مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۵، ۲۸۴ - ۲۸۱

ردیابی پادگن‌های دخیل در پاسخ ایمنی هومورال ناشی از ویروس لوکوزگاوی در عقده‌های لمفاوی تومری در گاو

فرهید همت زاده[1]* حسن ممتاز[2]

۱) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۰ خردادماه ۱۳۸۳، پذیرش نهایی: ۱۰ تیرماه ۱۳۸۵)

چکیده

در این بررسی ردیابی پادگن‌های دخیل در پاسخ ایمنی هومورال ناشی از ویروس لوکوزگاوی درگاو مورد مطالعه قرارگرفت. نمونه‌هاشامل ۱۵ عقده لنفاوی مربوط به‌گاوهایی که درآزمون‌های سرولوژیک الایزا و ژل دیفوزیون دارای واکنش سرمی مثبت علیه ویروس BLV بوده و به خاطر شکل‌گیری لنفوسارکوم بالینی به کشتارگاه اعزام‌شده یا کالبدگشایی‌شده بودند به همراه ۴ عقده لنفاوی مربوط به‌گاوهای به ظاهرسالم که درآزمون‌های مزبور پاسخ منفی نشان داده و از نقاط مختلف کشور تهیه‌شدند . پس از تهیه عصاره از عقده‌های لنفاوی، کلیه نمونه‌ها به روش لوری پروتئین‌سنجی‌شده و به روش SDS-PAGE روی سیستم ژل ناپیوسته ۱۰و۵ درصد الکتروفورزگردید سپس با قرار دادن ژل مربوطه روی غشاء نیتروسلولز جهت جستجوی پادگن‌های دخیل در پاسخ ایمنی هومورال ویروس BLV، در حضورآنتی‌سرم مثبت BLV به روش وسترن بلات‌آزمایش‌شد. حداقل ۲۵ باند پروتئینی مشترک در عصاره بافت‌های لنفاوی گاوهای بیمار و به ظاهرسالم مشاهده‌گردید . درآزمایش بلاتینگ، پادگن gp51 در تمام نمونه‌ها تشخیص داده‌شد ولی پادگن P24 تنها در ۵ نمونه ازبافت‌های توموری ردیابی‌گردید . به دلیل تفاوت در میزان وعرضه پروتئین‌های پادگنی ویروس ونظر به این که‌گلیکو پروتئین gp51 از جمله پادگن‌های پروتئینی غشاء ویروس BLV بوده وزودتر درسلول‌های آلوده عرضه می‌گردد . این پروتئین در تمام موارد عفونت به عنوان مهم ترین و اولین پادگن محرک ایمنی هومورال در گاومطرح می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لوکوزگاوی (BLV)، وسترن بلات، gp51 و p24.

مقدمه

لوکوز یک بیماری نئوپلاستیک بدخیم سلول‌های لنفوئیدی است که می‌تواند در سلسله حیوانات از نرم تنان مانند صدف تا گاو اتفاق افتد. توموری شدن بافت‌های لنفوئیدی در گاو به اسامی مختلفی مانند لوکوز (Leukosis)، لمفوسارکوم (Lymphosarcoma)، لنفومای بدخیم (Malignant Lymphoma) و لوسمی (Leukemia) شناخته شده است (۸،۱۳).

بیماری لوکوزانزئوتیک گاو (Enzootic Bovine Leukosis) در اثر ویروس لوسمی گاو BLV ایجاد و به صورت رشد نئوپلاستیک لنفوسیت‌ها که اغلب اعضای بدن را دربرمی‌گیرد اتفاق می‌افتد (۸).

ویروس لوکوز گاوها از خانواده رتروویریده (Retroviridae) و جنس دلتارترو ویروس (Delta retrovirus) است که ژنوم آن RNA تک رشته ای خطی سنس مثبت به صورت دیپلوئید بوده که ۷ تا ۱۰ کیلوباز اندازه دارد (۱۵).

بیماری ناشی از این ویروس در گاو اشکال مختلفی دارد که شامل لوکوز انزئوتیک گاو که شکل معمول بیماری در دام‌های بالغ است، لوکوز انفرادی گاو که در دام‌های کمتر از ۳ سال دیده می‌شود و لنفوسیتوز پایدار که در اثر ازدیاد خوش خیم لنفوسیت‌ها به وجود می‌آید (۸،۱۶).

تشخیص بیماری قبل از مرگ به وسیله بررسی‌های آزمایشگاهی امکان‌پذیر است که برای هر مرحله‌ای از بیماری باید روش مناسبی را انتخاب نمود (۱۵،۱۶). برای جدا کردن ویروس که معمولاً در لنفوسیت‌ها استقرار دارد، باید این سلول را در کشت بافت طحال بره کشت داد. اگر رشد ویروس صورت گرفته باشد می‌توان به روش‌های مختلف مثل استفاده از میکروسکوپ الکترونی، روش پادتن فلورسانت (Fleurescent Antibody Test) و الایزا آن را مشخص نمود. چون آزمایش کشت بافت گران تمام می‌شود، معمولاً به آزمایش‌های سرمی اکتفا می‌کنند (۱۰،۱۸،۱۹).

آزمایش ژل دیفوزیون (Agar Gel Immuno Diffusion) به عنوان آزمایشی برای برآورد و تشخیص گله آلوده به کار می‌رود ولی از آنجایی که بعضی از دام‌های غیربیمار نیز دارای واکنش مثبت کاذب هستند، برای تشخیص انفرادی کاربرد ندارد. در این آزمایش حتی موارد منفی کاذب نیز گزارش شده است (۱۶،۱۸). آزمون وسترن بلاتینگ (Western Blotting Test) جهت جستجوی پادتن‌های ضد BLV در گاو به کار رفته است. در تحقیقی، ۲۳۳ نمونه سرمی از گاوهایی که بطور طبیعی و تجربی با ویروس آلوده بودند با آزمون WB آزمایش شدند و نتایج حاصله با آزمون AGID مقایسه گردید. در ۹۰/۹ درصد موارد تشابه بین نتایج دو آزمون مشاهده گردید و تنها ۱/۷ درصد از نمونه‌های منفی شده در AGID بوسیله WB مثبت تشخیص داده شدند (۴).

مطالعات مختلفی در زمینه الگوی پروتئینی BLV انجام گرفته است که برحسب نوع سلول و حتی سویه ویروسی به کاررفته الگوهای نسبتاً متفاوتی بدست آمده است. Uckert درسال ۱۹۸۶ طی مطالعه ای برروی ویروس‌های تکثیریافته در کشت سلولی کلیه بره Fetal Lamb Kidney (FLK) مشخص نمود که پروتئین‌های مختلفی به اسامی p24, p15 (2), p15 (1), p12, p10

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۳-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email:f hemmat@ut.ac.ir

gp64, gp30, در الکتروفورز ویروس روی ژل پلی اکریل آمید قابل تشخیص هستند که توسط روش بلاتینگ مشخص گردید که p10 حاصل شکافته شدن p15 (2) درویروس می‌باشد(۲۰).

در مطالعه Schult درسال ۱۹۸۴ دو پروتئین gp60 , p30 درویروس BLV مورد مطالعه قرار گرفت و p30 به عنوان محصول ژن env معرفی گردید(۱۷). Mamoun چهار پروتئین p70, p45, p52 و p27 را معرفی نمود(۱۴). در مطالعه Deshayes مشخص گردید که پاسخ ایمنی هومورال علیه پادگن‌های gp51 gp12, gp45, شکل گرفته ولی پاسخ مشهودی علیه gp35 مشاهده نشد(۳).

در آزمون‌های سرولوژیک تشخیص BLV پروتئین‌های gP51 ,p24 عمده‌ترین پادگن‌ها هستند. p24 محصول ژن gag و جزء پروتئین‌های هسته مرکزی (Core Proteins) محسوب می‌گردد. گلیکوپروتئین gp51 جزء پروتئین‌های غشاء ویروس بوده و در اغلب آزمون‌های سرولوژیک پاسخ ایمنی قوی را باعث می‌شود (۲،۵،۱۰). پروتئین p24 و گلیکوپروتئین gp51 مهمترین پادگن‌های دخیل در پاسخ ایمنی هومورال بوده و ردپای پادتن‌های ضد این دو پادگن اصلی‌ترین راه تشخیص سرمی این بیماری می‌باشد(۱،۵).

در کل مطالعات انجام شده حاکی از وجود حداقل ۱۵ باند پروتئینی مختلف در SDS- PAGE ویروس و در سیستم‌های سلولی مختلف می‌باشد که عمدتاً دو پروتئین p24 و مخصوصاً gp51 در بروز پاسخ‌های ایمنی هومورال دخیل بوده است اما تعداد و الگوی استقرار این باندها بسته به نوع تیره سلولی و حتی سویه ویروس با هم متفاوت بوده است. با توجه به این یافته‌ها هنوز الگوی دقیقی که گویای پروتئین‌های ویروس BLV باشد به خوبی تعریف نشده است و بسته به نوع ویروس و نحوه استخراج پادگن، الگوهای متفاوتی حاصل خواهد شد. این تحقیق تلاشی است در جهت ردیابی پادگن‌های ویروس در عقده‌های لنفاوی گاوهای مبتلا به شکل لنفوسارکوم بیماری و تعیین پادگن‌های دخیل در پاسخ ایمنی هومورال ناشی از ویروس BLV که در نوع خود منحصربه فرد می‌باشد(۳،۶،۹،۱۱).

مواد و روش کار

نمونه‌ها: نمونه‌های مورد استفاده جهت انجام تحقیق شامل ۱۵ عقده لنفاوی مربوط به گاوهایی که در آزمون‌های سرمی الایزا و ژل دیفوزیون پاسخ سرمی مثبت داشته و بخاطر شکل‌گیری لوکوز بالینی به کشتارگاه اعزام شده و یا کالبدگشایی شده بودند. در کنار این موارد تعداد ۴ نمونه عقده لنفاوی مربوط به گاوهای به ظاهر سالم که در آزمون‌های فوق پاسخ سرمی منفی داشته نیز اخذ و مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌های مربوط از تابستان ۱۳۸۰ تا تابستان ۱۳۸۱ از نقاط مختلف کشور تهیه گردید.

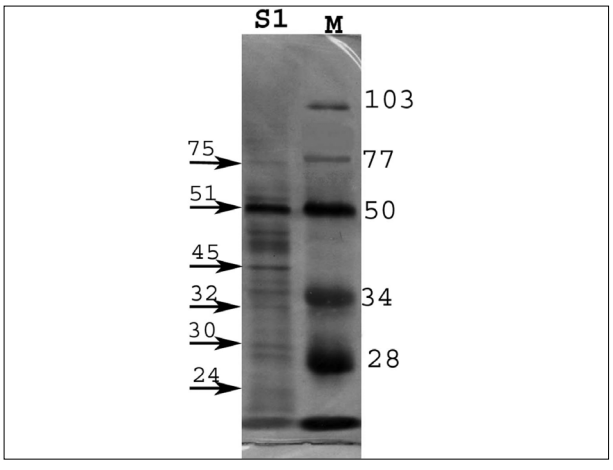
آماده‌سازی نمونه‌ها: تمام نمونه‌های اخذ شده توسط دستگاه خرد کننده بافت یا لوله تن بروک در حضور PBS به شکل شیرابه درآمده و عصاره حاصله پس از عبور از کاغذ صافی در ۱۴۰۰۰rpm به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید. مایع رویی تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۷۰- درجه نگهداری گردید. به منظور تنظیم میزان پروتئین نمونه‌ها در سیستم الکتروفوز، عصاره حاصل از عقده‌های لنفاوی به روش لوری پروتئین سنجی شده و با استفاده از PBS میزان پروتئین هر نمونه در حد ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تنظیم گردید(۷،۱۴).

مواد و وسایل: اکریل آمید، آمونیوم پرسولفات، بیس اکریل آمید، برموفنل بلو، کوماسی برلیانت بلو، اسید استیک گلاسیال، گلیسیرول، گلایسین، مرکاپتواتانل، متانل، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، تریس بازی، Temed، مارکرپروتئینی چند رنگ با وزن مولکولی کم (Roche) پروتئین G کنژوگه با پراکسیداز (Roche)، سمپلروسرسمپلر در اندازه‌های مختلف، دستگاه بایوفتومتر، ظروف درب‌دار شیشه‌ای و پلاستیکی، میکروفیوژ (Eppendrof) تریس بازی، گلایسین، متانل، سرم آلبومین گاوی، آنتی سرم BLV، محلول دی آمینو بنزیدین، دستگاه الکتروفورز و بلاتینگ (Bio Rad)، دستگاه شیکر انکوباتور ۳۷ درجه.

روش آزمایش: در ابتدا تمام نمونه‌های آماده شده روی ژل ناپیوسته پلی اکریل آمید شامل ژل پائینی (ژل جدا کننده) ۱۰ درصد و ژل بالایی (ژل متراکم کننده) ۵ درصد حاوی SDS در حضور مارکر پروتئینی ۱۰۸ تا ۲۱/۲ کیلودالتونی Rad Bio الکتروفورز گردید و سپس جهت انجام بلاتینگ ژل مربوطه روی غشاء نیتروسلولز قرار گرفته و به مدت یک شب (۱۶ ساعت) در ولتاژ ۳۰ ولت بلاتینگ گردید. پس از طی این زمان، غشاء نیتروسلولز خارج و جهت ظهور باندهای پروتئینی ابتدا ۳ تا ۵ نوبت و هر بار ۵ دقیقه با بافر PBS-Tween 20 شستشو داده شد و به مدت یک ساعت در بافر مسدود کننده Blocking Buffer (PBS -Tween 20 3% BSA in) قرار گرفت. پس از شستشوی مجدد غشاء با بافر Tween20-PBS (۳ تا ۵ نوبت هر بار ۵ دقیقه) آنتی سرم مثبت BLV روی غشاء ریخته شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درصد روی شیکر قرار گرفت. جهت حذف پادتن‌های متصل نشده، غشاء ۳ تا ۵ نوبت هر بار ۵ دقیقه با بافر PBS-Tween 20 شستشو داده شد. در مرحله بعد محلول پروتئین G کنژوگه با پراکسیداز بارقت ۱/۹۰۰۰۰ (Sigma) روی غشاء ریخته شده و به مدت یک ساعت روی شیکر در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از طی این مدت ۳ تا ۵ نوبت و هر بار ۵ دقیقه غشاء نیتروسلولز با بافر PBS-Tween 20 شستشو داده شد و جهت ظهور باندهای پروتئنی در محلول دی آمینو بنزیدین غوطه‌ور گردید. پس از ظهور باندهای مربوطه غشاء در آب مقطر شستشو داده شد و خشک گردید(۱۴).

نتایج

نتایج حاصل از SDS - PAGE نمونه‌های آماده شده حاکی از حضور حداقل ۲۵ باند پروتئینی مشترک در کلیه عقده‌های لنفاوی مربوط به گاوهای بیمار به ظاهر سالم بود در حالی که در الگوی پروتئینی عقده‌های لنفاوی گاوهای بیمار علاوه بر این موارد، حداقل ۲ باند پروتئینی واضح در SDS-PAGE مشاهده گردید که مربوط به ویروس لوکوز گاوها می‌باشند(تصویر۱). وزن مولکولی این پروتئین‌ها ۲۴ و ۵۱ کیلودالتون است که هر دو جزء پادگن‌های اختصاصی ویروس لوکوز بوده و قاعدتاً در بافت‌های لنفاوی غیر آلوده مشاهده نمی‌شوند(۶). پادگن ویروس BLV مورد استفاده در آزمون AGID ساخت Pourquier Montpellier Institut فرانسه نیز تحت شرایط مزبور به همراه نمونه‌های مورد آزمایش



تصویر۱- رنگ آمیزی نقره در SDS-PAGE عقده لمفاوی توموری گاو آلوده به BLV.

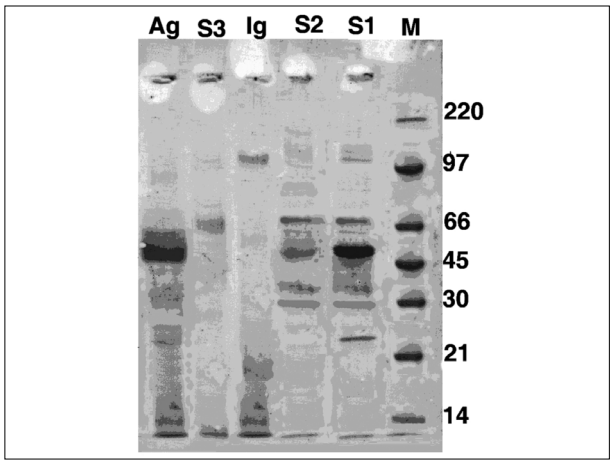
الکتروفورز گردید که تطابق کاملی با پادگن‌های ویروس BLV در بافت‌های لنفاوی آلوده از خود نشان داد. در آزمایش ایمنوبلاتینگ پادگن gp51 در تمام نمونه‌های مربوط به گاوهای بیمار (۱۵ نمونه) وجود داشت ولی پادگن p24 تنها در پنج نمونه شناسایی گردید (تصویر ۲). در مورد نمونه‌های مربوط به عقده‌های لنفاوی گاوهای به ظاهر سالم ۳ باند پروتئینی مشخص به وزن ۶۱،۶۹ و ۲۹ کیلو دالتون در آزمون وسترن بلات شناسایی شد که احتمالاً به ترتیب مربوط به پروتئین‌های آلبومین (با وزن مولکولی ۶۹ کیلو دالتون)، پرآلبومین (با وزن مولکولی ۶۱ کیلودالتون) و زنجیره بتامولکول MHC-II (باوزن مولکولی ۲۹ کیلو دالتون) می‌باشند (تصویر ۲).

بحث

اختلاف موجود در ویژگی اجرام مختلف ناشی از تغییراتی است که در ژنوم این اجرام رخ می‌دهد، لذا می‌توان در بسیاری از موارد (نه در تمام موارد) با مطالعه پروتئین‌هایی کد شده توسط ردیف‌های نوکلئوتیدی در ژنوم این اجرام به تفاوت‌های موجود در آنها پی‌برد و از آن در جهت تشخیص سریع و دقیق بیماری‌های ناشی از این اجرام، همچنین تفریق و دسته‌بندی اجرام بیماری زا استفاده کرد (۱۵).

در مطالعات مختلفی که در نقاط مختلف دنیا در زمینه الگوی پروتئینی ویروس BLV انجام گرفته، ۷ وحداکثر ۱۵ پروتئین در ویروس لوکوز گاوها شناسایی شده است و با مطالعات تکمیلی وظیفه و محل استقرار هر کدام از این پروتئین‌ها در ویروس مشخص گردیده است (۱،۹). مطالعات مزبور عمدتاً در مورد ویروس‌های کشت شده در سیستم‌های سلولی مختلف انجام گرفته و آن چنان که مشخص است تکثیر ویروس در کشت‌های سلولی مختلف از قبیل FLK، ریه خفاش و برخی تیره‌های سلولی تفاوت‌هایی را در الگوی پروتئینی ویروس ایجاد می‌نماید (۵،۷).

مطالعه خاصی در مورد بروز پادگن‌های ویروس در بافت‌های لنفاوی آلوده انجام نگرفته است، هر چند که مطالعه پادگن‌های ویروس در کشت‌های سلولی



تصویر۲- بلاتینگ حاصل از نمونه‌های مورد آزمایش، S۱ و S ۲ مربوط به گاوهای بیمارکه پادگن P24 تنها در نمونه اول مشاهده می‌گردد. Ig ایمونوگلبولین گاو به عنوان شاخص کارکرد پروتئین G. S۳ نمونه عقده لمفاوی گاو به ظاهر سالم. Ag پادگن استاندارد.

وخالص‌سازی ویروس به روش اولترا سانتریفوژ نتایج دقیق‌تری را حاصل می‌نماید ولی مطالعه پادگن‌های ویروس در حالت طبیعی و در بافت‌هایی که مستقیماً مورد تهاجم ویروس قرار گرفته‌اند می‌تواند به روشن نمودن وضعیت طبیعی عرضه پادگن‌های ویروس در بافت‌های لنفاوی کمک نماید. آنچه علت اصلی ایجاد تفاوت در الگوی پروتئینی و رفتاز پادگنی پروتئین‌های مختلف ویروس و بویژه gp51 می‌شود. نحوی گلیکوزیله شدن این پروتئین در سلول‌های مختلفی است که واجد سیستم‌های گلیکوزیلیشن متفاوتی می‌باشند، مطالعه این اختلافات و یافتن طبیعی‌ترین و فعال‌ترین شکل gp51 می‌تواند به عنوان دانش پایه لازم جهت ساخت واکسن لوکوز گاوی بکار آید (۵،۶).

پروتئین‌های مختلف ویروس در زمان‌های مختلفی از چرخه عفونت ویروسی و بسته به محل استقرار خود در ویروس در سطح سلول‌های آلوده به ویروس عرضه می‌گردند و در این میان پروتئین‌های غشاء ویروس زودتر از پروتئین‌های داخلی عرضه شده لذا پاسخ ایمنی را زودتر تحریک می‌کنند (۱۵). در مورد ویروس BLV نیز دو پروتئین اصلی در ویروس به عنوان پادگن محرک ایمنی هومورال شناخته شده‌اند. یکی گلیکوپروتئین gp51 که از پروتئین‌های غشاء ویروس است و دیگری پروتئین p24 که از دسته پروتئین‌های مربوطه به هسته مرکزی (Core) ویروس می‌باشد (۱۱،۱۵). در مطالعات مختلف پروتئین gp51 باوزن مولکولی بین ۴۹ تا ۵۱ کیلودالتون معرفی شده است به عنوان پادگن دخیل در شکل‌گیری پاسخ‌های سرمی شناخته شده است. پروتئین p24 نیز با وزن مولکولی ۲۴ کیلو دالتون جزء پروتئین‌های Core ویروس بوده که باعث امتزاج سلول‌ها، نفوذ ویروس به داخل سلول و انتشار سلول به سلول ویروس می‌گردد (۲).

در تحقیق حاضر نیز همان‌گونه که در قسمت نتایج اشاره شد دو پروتئین gp51 و p24 به عنوان پادگن‌های دخیل در پاسخ ایمنی هومورال شناسایی شدند که پادگن gp51 در تمام ۱۵ نمونه مربوط به گاوهای بیمار وجود داشت اما تنها در ۵ نمونه پادگن p24 تشخیص داده شد که این تفاوت خود به تفاوت در میزان و زمان

عرضه‌شدن پادگن‌های ویروسی درسطح سلول‌های آلوده است و به علت همین اختلاف حساسیت و ویژگی تست‌های سرمی با استفاده از دو پادگن gp51 و p24 در جستجوی پادتن‌های ضد ویروس متفاوت است به طوری که با بکارگیری پادگن p24 در آزمون ایمنوبلات حساسیت ۹۶/۵ و ویژگی ۵۳/۳تا۸۵ درصد می‌باشد که این نشانگر عدم کارآیی مطلوب این پادگن در سیستم بلاتینگ می‌باشد و بر همین اساس آزمون الایزا با استفاده از پادگن gp51 از نظر حساسیت و ویژگی کارآیی بسیار مطلوب‌تری را نسبت به p24 دارا است و پادتن‌های ضد gp51 چند روزی زودتر از پادتن‌های ضد p24 در خون ظاهر شده ردیابی این پادتن‌ها با سرعت زیادتری وجود آلودگی را نمایان می‌سازد(۹،۱۱).

در نهایت با شناسایی پادگن gp51 به عنوان پادگن اصلی محرک سیستم ایمنی هومورال در بیماری لوکوز گاوی، در مرحله بعدی می‌توان به جدا سازی و خالص سازی پادگن gp51 از عقده لنفاوی گاوهای بیمار به منظور استفاده از آن در آزمون‌های سرولوژیک تشخیص آلودگی با ویروس BLV به ویژه الایزا اقدام کرده و قدمی در راه خودکفایی کشور در این زمینه برداشت.

References

1. Altaner, C., Ban, J., Altanerova, V., Burny, A. and Kettmann, R.(1987) Bovine leukemia virus: isolation and characterization of nonproducer cell clones. Neoplasma,34:641-652.
2. Choi, K. Y., Liu, R.B. and Buehring,G.C.(2002) Ralative sensitivity and specifity of AGID, ELISA and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. Virol. Methods,104:33-39.
3. Deshayes, L., Levy, D., Parodi, A.L. and Levy, J.P.(1980) Spontaneaus immune response of bovine leukemia virus infected cattle against five different viral proteins. Int. J. Cancer, 25: 503-508.
4. Gonzalez, E.T., Oliva,G.I. and Norimine, J.(1980) Evaluation of western blotting (WB)for the diagnosis of BLV. Arqu. Brosilei. Med. Vet. Zootec.,51:299-305.
5. Hammar, L., Merza, M., Malm, K., Eriksson, S. and Morein, B.(1989) The use of aqueous two phase systems to concentrate and purify BLV outer envelope protein gp51. Biotechnol Appl Biochem,11:296-306.
6. Hammatzadeh, F.,Momtaz,H.(2004) Study on electrophoretic proteinal pattern of lymph nodes of cows with bovine leukosis and comparison with apparently healty cows. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.59:43-47.
7. Hudson, L., Hay, F.C.(1989) Practical immunology. 1thEd., Blackwell Sci.,Oxford, pp. 4-7.
8. Johnson, R., kaneene, J.B.(1992) Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis.Vet.Bull., 2: 287-314.
9. Kittelberger, R., Laybourn, B.J., Diack, D.S., Penrose, M.E. and Reichel, M.P.(1996) Evaluation of electerophoretic immunoblotting for the detection of antibodies against the BLV in cattle. Virol .Methods, 61:7-22.
10. Kitteleregrm, R., Reichel, M.P. and Meynell, R. M.(1999) Detection of antibodies against the core protein p24 BLV in cattle.Virol. Methods, 77: 109-114.
11. Liames, L., Gomez-Leucia, E., Domenech, A., Suarez, G. and Goyache, J.(2000) Analysis by SDS-PAGE and western blot of nonspecific and specific viral proteins frequently detected in different antigen preparations of BLV J.Vet. Diagn. Invest., 12:337-344.
12. Mamoun, R.Z., Astier, T., Guillemain, B. and Duplan, J.F.(1983) Bovine lymphosarcoma: expression of BLV -related proteins in cultured cells. J. Gen.Virol., 64:1895-1905.
13. Momtaz, H., Hammatzadeh, F.(2003) A serological survey of Bovine Leukemia Virus (BLV) on cattle in Chaharmahal and Bakhtiary province of Iran. Iranian J. Vet. Res. 4:37-43.
14. Mostafaei, a.(1999)Protein gel electrophoresis, paractical and theoretical guide. pp.104-120.
15. Murphy, F.A., Gibbs, E.P., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J.(1999) Veterinary virology. 3thEd., Academic press, San Diego, pp.361-391.
16. Radostits, O.M., Gay, C.C. and Blood, D.C.(2000) Veterinary medicine. 9thEd., W.B. Saunders Company, London, pp.1046-1058.
17. Schultz, A.M., Copeland, T.D. and Oroszlan, S.(1984) The envelope proteins of BLV: purification and sequence analysis. J.Virol.,135:417-427.
18. Simard, C., Richardson, S. and Dixon, P.(2000) AGID test for the detection of BLV antibodies lack of trans-atlontic standardization. Can. J. Vet. Res., 64:69-100.
19. Simard, C., Richardson, S. and Dixon, P.(2000) ELISA for the diagnosis of BLV: Comparison with the AGID test approved by the Canadian Food Inspection Agency. Can. J. Vet. Res., 64:101-106.
20. Uckert, W., Hertling, I., Kraft, R. and Bossmann, H.(1986) Structural components of BLV: further biochemical and immunological characterization of major structural proteins and glycoproteins. Virus Res. 4:343-356.

J.Vet.Res. 62,5:281-284,2007

DETECTION OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS ANTIGENS EXPRESSED IN LYMPH NODE TUMORS THAT INDUCE HUMORAL IMMUNITY IN COW

Hemmatzadeh, F.[1]*, Momtaz, H.[2]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord- Iran.*

(Received 10 June 2004 , Accepted 1 July 2005)

Abstract:

Detection of bovine leukemia virus antigens can induces humoral immunity in cow were evaluated. Fifteen lymph node from infected cows that had positive results in AGID and ELISA tests for BLV and have clinical signs of lymphosarcoma, in addition five lymph node from apparently healthy cows that had negative results in serological tests. After preparation of extract of lymph nodes, all of the samples electerophoresed in SDS-PAGE system in discontinuous 5 and 10% gel. All gels transferred to nitrocellulose membrane in Biorad blotting system. Antigens were detected by BLV positive antisera by using HRPO conjugated protein G and Tetramethyl benzidine as substrate. At least 25 proteinal band were detected in SDS-PAGE of tumoral and normal lymph node. In tumural tissues two additional band 24 and 51 kda were detected. In western blotting of those samples, gp51 antigen were detected in all tumoral lymph nodes , p24 antigen were detected in 5 samples from 15 samples and in non of apparently healthy samples non of those two antigens did not detect in WB test. These results were shown that gp51 were expressed in high level in tumors and induced a strong humoral immune response but p24 is a weak and non-common antigen in lymphatic tumors. Gp51 is most important and first antigen in all of the cases that infected by BLV.

Key words: BLV, Western blot, antigen, p24 and gp51.

***Corresponding author's email: fhemmat@ut.ac.ir, Tel: 021-61117053 , Fax:021-66933222**