

مطالعه پادگن‌های دخیل در ایمنی همورال ویروس IBR

فرهید همت زاده^{۱*}، هادی کیوانفر^۱، مهدی احمدی^۲

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

STUDY OF EFFECTOR ANTIGENS OF IBR VIRUS ON HUMORAL IMMUNITY

Hemmatzadeh, F.^{1*}, Keyvanfar, H.¹, Ahmadi, M.²

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. ²Graduated 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 electrophoresed 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

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

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

ویروس بیماری رینوتراکئیت عفونی گاو (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 پیلومرهای 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 و ساختمان 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 $10^6 \times 95-150$ دالتون در نوسان است. ژنوم BHV-1 شامل ۱۳۶ کیلو باز (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 هرپس ویروسها و اجزای 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 کیلو دالتون 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 گلیکوپروتئین‌های C، B و D می‌باشد. امروزه مشخص گردید که در ژنوم BHV-1، هفت گلیکوپروتئین E، I، H، L، G، K، M، و تعدادی آنزیم نظیر ریپو نوکلئوتیداز، 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 کیلو دالتون در ویریون ویروس IBR وجود دارد. ۱۱ پلی پپتید (۱۰ پلی پپتید گلیکوزیله و ۱ پلی پپتید ۱۰۷ کیلو

(۱) گروه میکرو بیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.
(۲) دانش آموخته دکتری دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.
(* نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۶۶۹۱۱۳۳۶، فاکس: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲، ایمیل: fhemmat@ut.ac.ir

Email: fhemmat@ut.ac.ir



مخفی با دگرمازون شدیداً افزایش می‌یابد (۳،۱۷).

ویروس‌های IBR، مارک بوریکی 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 بوریکی لمفوما یکسان است. وسترن بلاتینگ با سرم‌های فوق ایمن خرگوش تعدادی پروتئین با واکنش متقاطع بین ویروس BHV-1 و ویروس‌های کاذب نشان داده‌است 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 جزئی 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 آنتی‌ژن‌های 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 و دیگری 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 قبلاً 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 سانتریفیوژ دور سبک ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در مرحله دوم سانتریفیوژ با قدرت ۷۰۰۰g در ۴ دقیقه در ۴ 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 ۷۰۰۰g و در روی بالشتک سوکرز ۳۰ درصد سانتریفیوژ 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 ۲۰۰ - ۱۰۰۰

دالتونی غیر گلیکوزیله در سطح غشاء، ۱۵ پلی پپتید در ساختار نوکلئوکسپید به همراه تعدادی پروتئین‌های تنظیم کننده تکثیر ویروس در ساختمان ویروئین و ویروس IBR شناسایی شده است. گلیکوپروتئین E (gE) واجد فعالیت رسپتور Fc است و به IgG متصل می‌گردد. ۱۰ گلیکوپروتئین 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).

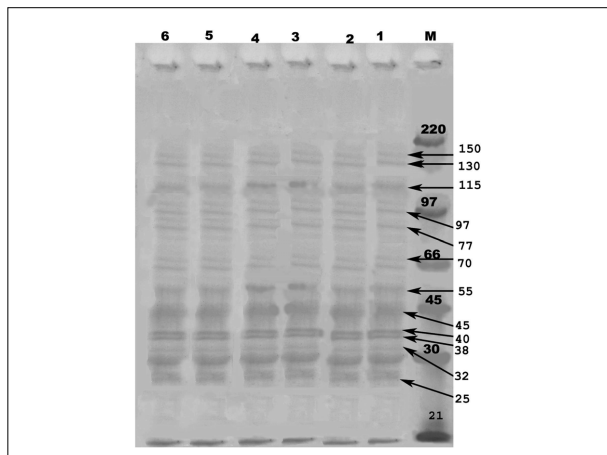
رسوب با آنتی بادی‌های منوکلنال و منواسپسیک نشان می‌دهد که سه مجموعه رسوب دهنده ۵۵/۷۴/۱۳۰ و ۷۷/۱۵۰ و ۹۷/۱۸۰ کیلو دالتونی مهم‌ترین اجزاء غشاء ویروس است. این گلیکوپروتئینها در غشاء ویروس و در سطح سلول‌های آلوده با BHV-1 موجود بوده و با آنتی بادی‌های منوکلنال خنثی کننده و منواسپسیک واکنش نشان می‌دهند. آنتی بادی علیه پروتئین ۷۷/۱۵۰ بیشترین سهم از آنتی بادی‌های خنثی کننده ویروس را تشکیل می‌دهد و پس از آن آنتی بادی علیه پروتئین ۹۷/۱۸۰ می‌باشد. آنتی بادی‌های منوکلنال علیه مجموعه پروتئینی ۵۵/۷۴/۱۳۰ در صورت حضور کمپلمان خنثی کننده هستند. آنتی سرم منواسپسیک 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 منشأ سلولی می‌باشند که در غشاء ویروس جای گرفته‌اند (۳).

پروتئین‌های ۷۴ و ۵۵ از طریق باندهای دی سولفیدی مولکول ۱۳۰ را ایجاد می‌نمایند. پروتئین ۱۸۰ دایمر پروتئین ۹۷ و پروتئین ۱۵۰ دایمر پروتئین ۷۷ می‌باشد، اما این دایمرها در خود پیوندهای دی سولفیدی ندارند. پروتئین ۱۰۷ در غشاء و نوکلئوکسپید 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 کیلودالتونی 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 گلیکوپروتئین B (۱۳۰k)، C (۹۷k) و D (۷۷k) که قبلاً گلیکوپروتئین‌های I، III، IV نامگذاری می‌شدند، به عنوان مهم‌ترین اجزای غشاء ویروس می‌باشند (۵،۱۲).

پاسخ‌های قوی ایمنی همورال همه گاوهای آلوده شده با BHV-1 علیه گلیکوپروتئین‌های اصلی ۱۳۰/۷۴/۵۵ و ۷۷/۱۵۰ و ۹۷/۱۸۰ در طی عفونت اولیه می‌باشد. علیه مجموعه پروتئینی ۵۵/۷۴/۱۳۰ پاسخ ایمنی سریع و پایدارتری ایجاد می‌شود. آنتی بادی‌ها 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 آنتی بادی ضد سه مجموعه گلیکوپروتئینی پس از بهبودی کاهش می‌یابد، اما در طی عفونت مجدد یا فعال شدن ویروس





تصویر ۲- نمایش باندهای پادگنی و پروتئینهای IBR مشاهده شده در آزمون ایمنوبلاتینگ.

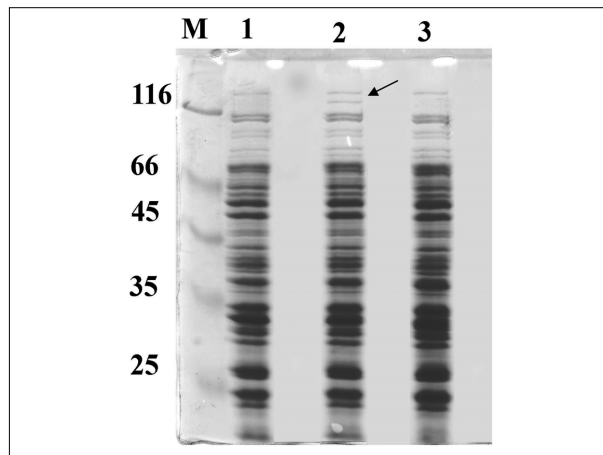
ویروس مشاهده شد که در واقع همان گلیکو پروتئین های اصلی ویروس IBR می باشند که به ترتیب گلیکو پروتئین های I(B), III(C) و IV(D) نامگذاری شده اند. این سه باند پروتئینی در ایمنوبلاتینگ (تصویر ۲) نیز مشاهده گردیدند. باندهای پروتئینی ۱۸۰ و ۱۵۰ کیلودالتونی بسیار ضعیف می باشند و به سختی قابل رؤیت می باشند.

در ایمنوبلاتینگ نمونه های ویروسی با سرم گاوی حاوی آنتی بادی های ضد ویروس IBR، ۱۲ باند با وزن های مولکولی ۱۵۰، ۱۳۰، ۱۱۵، ۹۷، ۷۷، ۷۰، ۵۵، ۴۵، ۴۰، ۳۸، ۳۲ و ۲۵ کیلودالتونی شناسایی شد که نشانگر دخیل بودن این پادگن هادر تحریک ایمنی همورال در گاو های آلوده به این ویروس می باشد.

در تصویر ۱ باندهای پروتئینی مربوط به جدایه های مختلف ویروسی IBR قابل مشاهده می باشند در نمونه شماره ۲ باند اضافی ۱۲۵-۱۲۰ کیلودالتونی قابل مشاهده می باشد در حالی که در ایمنوبلاتینگ این باند قابل ردیابی نبود (تصویر ۲).

بحث

کشورهای پیشرفته مهم ترین ابزار مبارزه با بیماری IBR را واکسیناسیون می دانند که این عمل به همراه بهبود و ارتقای شاخص های 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 مولکولی این ویروس بوده است و جهت تهیه واکسن های مارکرو تحت واحد پایه مطالعات قرار گرفته است. شناخت پلی پپتیدها و مکانیسم ایمنی زایی آنها جهت تهیه واکسن های تحت واحد از ملزومات این کار است. بنابراین مطالعه بر روی الگوی پروتئینی سویه های مختلف ویروس IBR در یک منطقه و حتی یک کشور جهت شناخت سویه های مختلف و حتی یافتن ساختارهای پادگنی جدید اساس برنامه های تولید واکسن و پیشگیری از این بیماری است (۷، ۱۸).



تصویر ۱-

میکروگرم در میلی لیتر تنظیم شده و نهایتا اقدام به الکتروفورز نمونه ها در سیستم ژل پلی اکریلامید ناپیوسته گردید.

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

در مرحله دوم، اقدام به انتقال پروتئین های ویروسی از ژل به کاغذ نیتروسولولز گردید 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 بر روی کاغذ نیتروسولولز و در مجاورت یخ انجام گرفت. غشاء مذکور پس از انکوباسیون یک ساعته در بافر انسداد و طی مراحل شستشوی مدت دو ساعت در حضور سرم گاو واجد پادتن ضد ویروس IBR انکوبه گردید. پس از شستشوی مجدد و جهت تایید حضور پادتن های متصل به پادگن، غشاء نیتروسولولز 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 تترامیل بنزیدین گردید. باندهای پادگنی به رنگ آبی تیره در روی غشا ظاهر شده و جهت انجام محاسبات بعدی اقدام به تصویر برداری از غشاهای رنگ آمیزی شده گردید.

نتایج

نتایج حاصله حاکی از حضور حداقل ۳۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۸۰-۱۲ کیلودالتونی می باشد. نمونه های مختلف ویروسی از لحاظ تعداد باند و وزن مولکولی با یکدیگر مشابه می باشند، به جز حضور باند ۱۲۵ - ۱۲۰ کیلودالتونی که در نمونه شماره ۲ مشاهده شد. این نمونه مربوط به کلکسیون ویروس های IBR موجود در بخش ویروس شناسی بوده و از یک مورد گاو مبتلا به شکل تنفسی IBR جدا گردیده است (تصویر ۱). باندهای پروتئینی ۱۳۰، ۹۷، ۷۷ کیلودالتونی در تمامی نمونه های



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 محومی شوند. این مطلب می‌تواند دلیلی برای یافتن باندهایی همچون ۲۵، ۳۲، ۳۸، ۴۵ کیلودالتونی باشد.

باند ۴۵ کیلودالتونی مشاهده شده در ایمونوبلاتینگ احتمالاً پروتئینی غیر از گلیکوپروتئین ۴۵ کیلودالتونی شناخته شده در غشاء ویروس است. زیرا چنان‌که گفته شد این پروتئین را یک پروتئین بامنشاء 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 اولتراسانتریفیوژ 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، ه.، 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، ۸۲-۸۰، ۲۱۲-۲۱۱، ۲۵۲-۲۵۰ و ۲۶۴ و ۲۶۸.
۲. همت زاده، ف.، ممتاز، ح.، صفری، م.، تاجبخش، ا. (۱۳۸۱): بررسی سرولوژیکی آلودگی به ویروس IBR در گاوداربهای 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 relationship between the viruses of Infections Bovine Rhinotrachietis, Marek's disease and Burkitt's lymphoma. *J. Virol.* 2: 227-287.

طی مطالعاتی که توسط محققین مختلف در نقاط مختلف دنیا صورت گرفته است، به طور متوسط ۳۳-۳۰ پلی‌پپتید 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 شماره ۲) که باند اضافه ۱۲۵-۱۲۰ کیلودالتونی مشاهده شد (تصویر ۵)، 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 بامنشاء غیر از ویروس می‌باشد. البته حضور 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 ایمونوبلاتینگ در واقع همان گلیکوپروتئین‌های اصلی ویروس می‌باشد و به ترتیب گلیکوپروتئین‌های B(I)، C(III) و D(IV) نامگذاری شده‌اند. این گلیکوپروتئین‌ها 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 C، B و D توسط محققین مختلف تولید و مورد استفاده قرار گرفته شده‌اند (۱۶، ۷).

گلیکوپروتئین ۱۳۰ کیلودالتونی از طریق باندهای دی‌سولفیدی 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 می‌آید که در خود پیوندهای دی‌سولفیدی ندارند (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 آنتی‌سرم‌های گاو 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 آنتی‌سرم گاو بدست آمده توسط آزمون الیزا ردیابی نشد و به جای آن یک باند ۱۱۵ کیلودالتونی مشاهده گردید (۱۰).

همان‌طور که در مبحث کلیات نیز ذکر گردید، ژنوم ویروس IBR قادر به کد



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.

