مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۳، ۲۷۱-۲۶۵
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.201949.2443

بررسی پروتئوم و شناسایی برخی پروتئین‌های لارو کنه ریپی‌سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس (سویه مازندران)

صدیقه نبیان[1*] محمد طاهری[2] زهرا اسدالهی[1] محمد مهدی رنجبر[3]

۱) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) آزمایشگاه مرکزی رستگار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، ایران

(دریافت مقاله: ۷ اسفند ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۲ تیر ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: ریپی‌سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس یک کنه تک میزبانه است که قادر به انتقال انگل‌ها و باکتری‌ها به گاو، آسیب به چرم، کاهش رشد و گاهی فلجی می‌باشد. لذا آلودگی به این کنه‌ها می‌تواند به عنوان یک مشکل عمده در صنعت دامپروری محسوب گردد. روش‌های کنترلی مختلف از جمله روش‌های شیمیایی جهت مبارزه با کنه‌ها استفاده می‌شود اما بدلیل ایجاد مقاومت به درمان شیمیایی، محققان در تلاش برای یافتن برخی پروتئین‌های ایمونوژن جهت تولید واکسن می‌باشند. بررسی پروتئین‌های این کنه، می‌تواند گامی مهم در شناخت بیشتر مولکول‌های بیولوژیک، جهت توسعه استراتژی‌های کنترل باشد. **هدف:** در مطالعه حاضر پروتئین‌های لارو ریپی‌سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس با الکتروفورز دوبعدی و شناسایی برخی پروتئین‌های ایمونوژن آن با وسترن بلاتینگ دوبعدی و اسپکترومتری جرمی MALDI TOF/TOF مربوط به سویه مازندران مورد ارزیابی قرار گرفت. **روش کار:** جهت انجام این پژوهش اقدام به کشت کنه، انجام الکتروفورز یک بعدی و دو بعدی، وسترن بلاتینگ و اسپکترومتری جرمی گردید و نتایج به دست آمده با کمک نرم افزار Mascot مورد آنالیز قرار گرفت. **نتایج:** درآنالیز تصویر دوبعدی به دست آمده از الکتروفورز دوبعدی، تقریبا ۸۰ نقطه پروتئینی با وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک (PI) متفاوت با رنگ آمیزی کوماسی بلو شناسایی شد. همچنین بر اساس دو فاکتور ایمنی‌زایی (براساس آزمون وسترن بلات) و بالا بودن غلظت، ۱۰نقطه پروتئینی (با وزن مولکولی بین KDa ۱۴ و ۹۷) برای انجام اسپکترومتری جرمی MALDI TOF و MALDI TOF-TOF MS انتخاب گردید. از بین این ۱۰ نقطه، پروتئین‌های وتیلوژنین، پیش ساز وتیلوژنین ، تروپومیوزین، و پروتئین فرضی ISCW۰۰۱۶۵۲ به عنوان پروتئین‌های با خاصیت ایمنی‌زایی شناسایی شدند. همچنین آنالیز محتوای عصاره نشان داد برخی پروتئین‌ها از جمله وتیلوژنین در محلول عصاره پروتئینی لارو دارای ایزوفرم‌های مختلفی هستند. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج مطالعه حاضر می‌تواند گامی نخست در جهت انتخاب پروتئین‌های کاندید برای ساخت و توسعه واکسن‌های ضد کنه باشد.

واژه‌های کلیدی: ریپی‌سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس، بررسی پروتئوم، الکتروفورز دوبعدی، اسپکترومتری جرمی MALDI TOF/TOF، پروتئین‌های ایمونوژن

مقدمه

ریپی‌سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس یک کنه تک میزبانه است که از نظر انتقال بابزیا بایژمینا، بابزیا بوویس و آناپلاسما مارژیناله و برخی باکتری‌ها به گاو حائز اهمیت ویژه می‌باشد. همچنین می‌تواند منجر به آسیب به چرم، کاهش رشد و برخی اوقات فلجی گردد (۷،۱۸).

تغذیه تعداد زیاد این کنه‌ها حیوان را دچار کم‌خونی نماید. لذا آلودگی به کنه‌ها می‌تواند به عنوان یک مشکل عمده در صنعت دامپروری محسوب گردد. از سالیان گذشته از روش‌های مختلفی جهت مبارزه با این دسته از موجودات استفاده شده است. امروزه جهت مبارزه با کنه‌ها از ترکیبات کنه‌کش، مانند ترکیبات آرسنیکی، هیدروکربن‌های کلره، ارگانوفسفره، کاربامات‌ها و پایروتروئیدها استفاده می‌شود که مصرف آن‌ها دارای موفقیت نسبی می‌باشد. ظهور مقاومت در جمعیت کنه‌ها و حضور باقیمانده شیمیایی در گوشت و شیر به دلیل استفاده از این روش‌های کنترلی نیاز به روش‌های کنترلی جایگزین از قبیل واکسن‌های ضد کنه بر اساس پروتئین‌های ایمونوژن را ضروری می‌سازد(۹،۳۱).

کنه‌ها دارای پروتئین‌های متعدد با عملکردهای بیولوژیک مختلف هستند (۲،۱۴،۲۹)، که برخی از آن‌ها دارای طبیعت ایمنی‌زایی و ایجاد آلرژی می‌باشند و شناسایی آن‌ها می‌تواند در تهیه واکسن‌های مناسب ضد کنه به ما کمک کند(۱،۶،۱۶،۱۹).

الکتروفورز دو بعدی یکی از روش‌های قدرتمند و متداول برای جداسازی، رسوب و آنالیز ترکیب پروتئیناز منابع مختلف می‌باشد. در این روش پروتئین‌ها بر اساس خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی (نقطه ایزوالکتریک (PI) و وزن مولکولی (Mw)) از هم جدا می‌شوند (۱۵،۲۳).

در این مطالعه تلاش گردیده است که با استفاده از روش الکتروفورز یک بعدی و دوبعدی و همچنین ایمونوبلاتینگ و اسپکترومتری جرمی اقدام به شناسایی پروتئین‌های ایمونوژن در عصاره تام لارو کنه‌های ریپی‌سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس پرداخته شود.

مواد و روش کار

کشت کنه: پس از جمع آوری کنه‌های ماده بالغ خونخورده

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۷۲، نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲
Email: nabian@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

ریپی‌سفالوس (بوافیلوس) اُتولاتوس از گاوهای ارجاعی به کشتارگاه روستای بندپی شهرستان بابل و انتقال به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، بر طبق پروتوکل براون و همکاران اقدام به پرورش کنه‌ها گردید(۴).

کنه‌های مذکور پس از شست و شو با اتانول ۷۰٪ در گروه‌های ۵ عددی در داخل لوله‌های پرورش کنه تقسیم شده و سپس در داخل انکوباتور با دمای ۲۸°C و رطوبت نسبی ۸۵٪ به منظور به دست آوردن تخم و لارو قرار داده شدند (۲۴). پس از تخمگذاری کامل کنه‌ها در طی هفت روز و از تخم‌برایی آن‌ها در طی مدت یک تا دوهفته، کنه‌های بالغ تلف شده حذف گردید. جهت ایجاد آلودگی تجربی تعدادی از لاروها بر روی گاو قرار داده شد، سپس سرم ایمیون از گاوهای آلوده در طی ۵ دوره اخذ گردید. همچنین تعدادی از لاروها به منظور تهیه آنتی‌ژن تا زمان استفاده در۷۰°C- ذخیره گردید.

الکتروفورز یک و دوبعدی: ابتدا الکتروفورز یک بعدی با روشPage SDS/ مشروحه توسط Lamelli در سال ۱۹۷۰ انجام شد (۱۵). لاروهای گرسنه کنه، له شده و در PBS (بافر فسفات سالین) هموژن گردید سپس µl ۶ (µg ۱۰) از پروتئین با µl ۶ از بافر نمونه SDS/Page رقیق شد و متعاقب آن در چاهک مربوطه روی ژل در V۸۰ به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز گردید. در انتها برای قابل رویت شدن پروتئین‌ها از رنگ کوماسی بلو R-۲۵۰ استفاده شد.

سپس الکتروفورز دوبعدی به منظور جداسازی بهتر پروتئین‌ها در عصاره لارو کنه انجام شد و ده نقطه پروتئینی برای اسپکترومتری جرمی MALDI-TOF و MALDI-TOF-TOF انتخاب گردید. g ۰/۱ لارو گرسنه در ml۳ بافر لیزکننده (حاوی M ۸ اوره، M۲ تیو اوره، ۴٪ چاپس، ۰/۲٪ بیولیت، mM ۴ تریس با PH ۷=) هموژن گردید. پس از آن مخلوط هموژن در g ۱۲۰۰۰ و دمای °C ۴ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی محلول رویی، پروتئین سنجی به روش برادفورد انجام پذیرفت. سپس جهت انجام ایزوالکتریک فوکوسینگ، µg ۳۰۰ از پروتئین روی نوارهای شیب PH (IPG) به طول cm ۷ قرار داده شد (PH=۳-۱۰ NL) و به مدت یک شب به منظور آبگیری مجدد در سینی مخصوص قرار گرفتند و پس از آن الکتروفورز انجام شد (۲۰ دقیقه با V۲۵۰ ، ۲ ساعت با V ۴۰۰۰ و نهایتا در طی ۴ ساعت به V۱۴۰۰۰ رسید). نوارهای IPG در ml ۱۰ بافر متعادل سازی (تریس mM۵۰ ، M۶ اوره، SDS ۲ ٪ ، گلیسرول ۳۰٪، PH = ۸/۸) به همراه دی تیوتریتیول mM ۳۰ ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه دیگر نوار فوق در بافر تعادل به همراه یدواستامید mM ۱۳۵ قرار داده شد.

سپس نوار IPG جهت انجام بُعد دوم الکتروفورز بر روی ژل جدا کننده SDS/Page با غلظت ۱۲٪ در سیستم الکتروفورز بیوراد ساخت آمریکا قرار گرفت و جهت قابل رویت شدن پروتئین‌ها از رنگ کوماسی بلو R-۲۵۰ استفاده شد.

وسترن بلاتینگ (ایمونوبلاتینگ): برای شناسایی پروتئین‌های ایمونوژن، وسترن بلاتینگ بر اساس روش مشروحه توسط Wang و همکاران در سال ۱۹۹۴(۳۰) با اندکی تغییرات جزیی انجام شد.

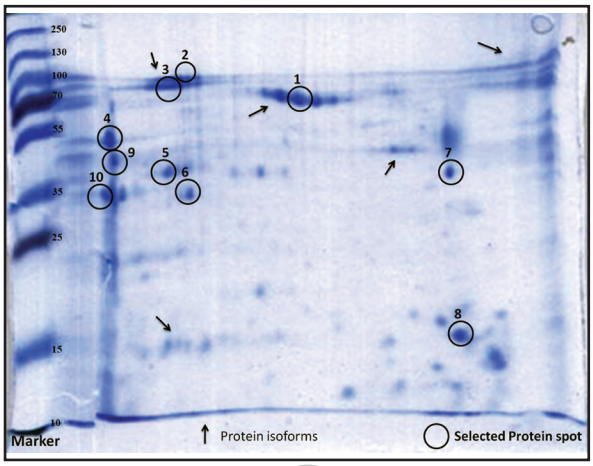
پروتئین‌های عصاره لارو کنه که با الکتروفورز دو بعدی تفکیک شده بودند بر روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند. کاغذ نیتروسلولز به مدت ۴۵ دقیقه در محلول PBS حاوی ۲/۵٪ تویین ۲۰ مسدود گردید و پس از آن، برای تمام مراحل شست و شو از PBSحاوی ۰/۰۵٪ تویین ۲۰ (سه مرتبه هر بار ۵ دقیقه) استفاده شد. کاغذ نیتروسلولز در محلول سرم گوساله آلوده شده با لارو ریپی‌سفالوس (بوافیلوس) اُتولاتوس به صورت تجربی و ۵۰ بار رقیق شده با PBS توئین۲۰ ۰/۰۵٪ به مدت یک ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه قرار داده شد. سپس شست و شو انجام شده و پس از آن صفحات نیتروسلولز به مدت نیم ساعت در مجاورت پادتن ضد ایمونوگلوبولین G گاو کونژوگه با آنزیم پراکسیداز قرار داده شد. پس از شست و شو واکنش رنگی نقطه‌های ایمونوژن با دی آمینوبنزیدین حاوی پراکسیداز هیدروژن صورت گرفت.

اسپکترومتری جرمی: شناسایی پروتئین‌ها از نقاط روی ژل با روش

جدول ۱ . نتایج MALDI-TOF- TOF و برنامه جستجوگر Mascotبرای ده نقطه پروتئینی در جدول زیر منظم شده است.

شماره نقطه	وزن مولکولی بر حسب دالتون (Da)	مشابهت پروتئین	نام کنه	نتایج ایمونوبلاتینگ
۱	۷۰	بدون شباهت	-	غیر ایمونوژن
۲	۹۷	وتیلوژنین	ریپی سفالوس میکروپلوس	ایمونوژن
۳	۸۵	وتیلوژنین و شباهت همولوگ با پیشساز GP۸۰	ریپی سفالوس میکروپلوس و ریپی سفالوس میکروپلوس	ایمونوژن
۴	۴۸	بدون شباهت	-	ایمونوژن
۵	۳۹	پیش ساز وتیلوژنین	درماسنتور واریابلیس	ایمونوژن
۶	۳۶	یک پپتید مشترک با IscW-ISCW۰۰۱۶۵۲ فرضی	ایکسودس اسکپولاریس	ایمونوژن
۷	۳۷	تروپومیوزین	ریپی سفالوس میکروپلوس	ایمونوژن
۸	۱۶	بدون شباهت	-	غیر ایمنوژن
۹	۴۳	پروسسور GP۸۰ و شباهت همولوگ با وتیلوژنین	ریپی سفالوس میکروپلوس و درماسنتور واریابلیس	ایمونوژن
۱۰	۳۶	بدون شباهت	-	ایمونوژن

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر۱. نقاط پروتئینی مربوط به الکتروفورز دوبعدی عصاره لارو ریپی سفالوس (بوفیلوس) آنولاتوس با رنگ آمیزی کوماسی بلو.

اسپکترومتری جرمی MALDI-TOF/TOF توسط گروه زیست شناسی دانشگاه یورک انگلستان انجام گردید و با نرم افزار Mascot (http://www.matrixscience.com/) مشخص شد که پروتئین‌های مذکور با کدام پروتئین‌های موجود در داده پایگاه‌ها شباهت دارند.

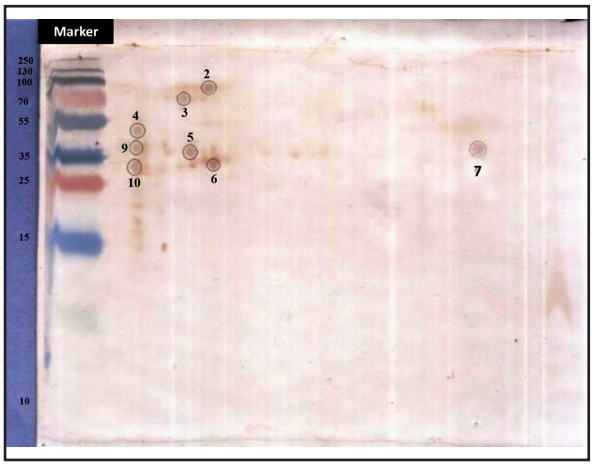
نتایج

الکتروفورز دوبعدی و ایمونوبلاتینگ و نتایج اسپکترومتری جرمی پروتئین‌های عصاره لارو کنه ریپی‌سفالوس (بوفیلوس) آنولاتوس بعد از انجام الکتروفورز دوبعدی نقاط پروتئینی آبی رنگ در زمینه شفاف دیده شد. آنالیز تصویر دوبعدی به دست آمده حدود ۸۰ نقطه پروتئینی با وزن مولکولی و PI (نقطه ایزوالکتریک) مختلف را با رنگ آمیزی کوماسی بلو مشخص نمود. آنالیز تعیین مقدار براساس چگالی و اندازه نقاط، نشان داد که برخی از پروتئین‌ها دارای مقدار بیشتری در عصاره استخراجی از لارو هستند. برخی از نقاط دارای وضوح و مقدار بیشتر، در تصویر ۱ نشان داده شده‌اند. همانطور که در آنالیز نقاط پروتئینی در ادامه بحث شده است، وتیلوژن به عنوان یک نقطه با تعدادی ایزوفرم شناسایی شده است.

پس از انجام الکتروفورز دوبعدی، اقدام به انجام آزمایش وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم تهیه شده از گوساله‌های آلوده شده با کنه ریپی‌سفالوس (بوفیلوس) گردید که تعدادی نقطه پروتئینی بعنوان پروتئین ایمونوژن معرفی شد که در تصویر ۲ نشان داده شده است.

۱۰ نقطه پروتئینی که بر اساس ایمونوژن بودن و غلظت بیشتر انتخاب شده بودند، برای آنالیز با استفاده از اسپکترومتری جرمی MALDI TOF و MALDI TOF – TOF انتخاب گردید. موقعیت نقاط روی ژل در تصویر ۱ نشان داده شده است. این نقاط حاوی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بین ۱۴ KDa و ۹۷ بودند و با سرسمپلر پلاستیکی از روی ژل خارج شدند.

نقاط مربوط به پروتئین‌های شماره ۲ (با وزن مولکولی ۹۷ KDa)، ۳ (۸۵ KDa)، ۴ (۴۸ KDa)، ۵ (۳۹ KDa)، ۶ (۳۶ KDa)، ۷ (۳۷ KDa)، ۹ (۴۳ KDa)، ۱۰ (۳۶ KDa) در آزمایش وسترن بلاتینگ مثبت بودند. نقاط شماره ۱ و ۸ با وزن‌های مولکولی به ترتیب ۷۰ KDa و ۱۶ ایمونوژن نبودند و صرفاً به دلیل وضوح (فراوانی) بیشتر انتخاب شده و از طریق شرکت سینا کلون جهت انجام آزمایشات اسپکترومتری جرمی به دانشگاه یورک انگلستان ارسال گردیدند.



تصویر۲. آنالیز ایمونوبلاتینگ عصاره لارو ریپی‌سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس با استفاده از سرم ایمن. M - وزن‌های مولکولی استاندارد.

پس از استفاده از اسپکترومتری جرمی MALDI TOF/TOF جهت شناسایی پروتئین، اطلاعات به دست آمده با نرم افزار Mascot مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در جدول ۱ و تصویر ۱ مرتب شده‌اند. همانطور که نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد از ۸ نقطه پروتئینی ایمونوژن، ۴ نقطه مربوط به وتیلوژن، پیش ساز وتیلوژن، تروپومیوزین و پروتئین فرضی ISCW۰۰۱۶۵۲ بعنوان پروتیئن‌های ایمونوژن شناسایی شدند. بنابراین این چهار پروتئین می‌توانند کاندیدی برای تولید واکسن باشند. همچنین چهار پروتیئن ایمونوژن دیگر با هیچ یک از پروتئین‌های موجود در داده پایگاه‌های پروتئینی شباهت نداشتند. به نظر می‌رسد این امر به واسطه عدم وجود اطلاعات کامل در رابطه با ژنوم کنه باشد.

بحث

کنه‌ها، از مهمترین انگل‌های خارجی دام‌ها می‌باشند که در طول زمان اتصال به میزبان، مقادیر فراوانی خون بر حسب گونه و موقعیت از میزبان دریافت می‌کنند و همچنین به واسطه انتقال عوامل عفونی متعدد به انسان و حیوانات، از نقطه نظر بهداشت عمومی حائز اهمیت هستند(۱۳). بزاق کنه‌ها حاوی مولکول‌های ضد التهاب، ضد هموستاز و تعدیل کننده سیستم ایمنی می‌باشد که باعث تغییر فیزیولوژی بدن میزبان در محل گزش می‌گردد و بدین وسیله کنه‌ها می‌توانند از میزبان خونخواری کنند(۲۸) میزبان‌هایی که به هنگام خونخواری کنه‌ها علیه پروتئین‌های بزاقی و غیره واکنش‌های ایمنی و آلرژیک نشان می‌دهند، کنه را از بدن خود دفع می‌نمایند (۳) و همچنین پاسخ‌های ایمنی به این پروتئین‌ها می‌تواند باعث جلوگیری از

Archive of SID
www.SID.ir

انتقال عوامل عفونی نیز گردد (۲۲). از این رو مطالعه در مورد اجزای بزاقی کنه‌ها می‌تواند منجر به توسعه واکسن‌های جدید ضدکنه‌ای و همچنین کشف مولکول‌های دارویی گردد(۳۲).

کنه رِیپی‌سفالوس (بوافیلوس) اَنولاتوس یک کنه تک میزبانه می‌باشد. مشخص کردن پروتئین‌هایی که در مراحل مختلف زندگی این کنه بیان می‌شوند، سبب شناخت بیشتر مولکول‌های بیولوژیک مهم می‌گردد، که برای توسعه استراتژی‌های کنترلی می‌تواند مؤثر واقع شوند. مطالعات الکتروفورز دو بعدی و ایمونوبلات پروتئین‌های لارو کنه رِیپی‌سفالوس (بوافیلوس) اَنولاتوس سبب شناخت بیشتر پروتئوم کنه و پاسخ‌های ایمنی میزبان علیه آن می‌گردد (۲۷).

در مطالعه حاضر اقدام به شناسایی پروتئین‌های لارو کنه رِیپی‌سفالوس (بوافیلوس) اَنولاتوس با استفاده از الکتروفورز یک و دوبعدی به همراه وسترن بلاتینگ با هدف یافتن پروتئین‌های مناسب جهت ساخت احتمالی واکسن گردید. ترادف اسیدهای آمینه ۴ نقطه از ۸ نقطه پروتئین‌های ایمونوژن با وزنهای مولکولی KDa ۹۷، ۸۵، ۴۳ و ۳۹ با ترادف اسیدهای آمینه ویتلوژنین و همولوگ‌های آن در کنه رِیپی‌سفالوس (بوافیلوس) اَنولاتوس شباهت داشته و ترادف اسیدهای آمینه یکی دیگر از نقاط پروتئینی ایمونوژن با وزن مولکولی KDa ۳۷ با ترادف اسیدهای آمینه تروپومیوزین این کنه مشابهت داشت. لازم به ذکر است که دوعدد دیگر از این نقاط ایمونوژن ارسال شده (با وزن‌های مولکولی KDa ۳۶ و ۴۸) با هیچ‌یک از پروتئین‌های موجود در داده پایگاه‌های پروتئینی شباهت نداشتند. ترادف یک نقطه پروتئینی با وزن مولکولی KDa ۳۶ با پروتئین فرضی ISCW۱۶۵۲ مربوط به کنه اِیکسودس اِسکاپولاریس شباهت داشته است. پروتئین‌های فرضی به پروتئین‌هایی گفته می‌شود که از روی ژنوم پیش‌بینی می‌گردند ولی ممکن است بیان آن‌ها تا به حال گزارش نشده باشد. ترادف دو نقطه غیر ایمونوژن با وزن مولکولی KDa ۷۰ و ۱۶ با ترادف اسیدهای آمینه هیچ‌یک از پروتئین‌های موجود در داده پایگاه‌های پروتئینی شباهت نداشت که علت آن ممکن است به دلیل وجود پروتئین‌های جدید باشد که تا به حال در داده پایگاه‌های مربوطه ثبت نشده است و یا ممکن است به واسطه عدم وجود اطلاعات کامل در رابطه با ژنوم کنه باشد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Untalana و همکاران با استفاده از الکتروفورز دوبعدی روی عصاره پروتئین‌های لارو کنه رِیپی‌سفالوس (بوافیلوس) میکروپلوس انجام پذیرفت، ۲۰ عدد از نقاط پروتئینی لارو کنه بر حسب فراوانی انتخاب گردیدند و با روش اسپکترومتری جرمی MALDI-TOF و Q-TOF MS MS انگشت نگاری پپتیدی و توالی اسیدهای آمینه ماهیت برخی از پپتیدهای آن‌ها تعیین گردید. از میان این نقاط پروتئینی هویت تنها یکی از آن‌ها به طور قطعی از روش انگشت نگاری پپتیدی مشخص گردید که مربوط به پروتئین تروپومیوزین بود (۲۷). همچنین در مطالعه‌ای مشابه که توسط Xiang و همکاران ۲۰۰۹ بر روی پروتئین‌های غدد بزاقی کنه‌های همافیزالوئیدس انجام پذیرفته بود پروتئین‌هایی از قبیل تروپومیوزین، تیروزین ۳ مونواکسیژناز، پروتئین ریبوزومی L۷/L۱۲، پروتئین شبیه Zinc finger، پروتئین حاوی والوسین، در کنه‌های خونخورده بیان شده بودند این محققین، پروتئین‌های بیان شده در کنه‌های خونخورده را به عنوان کاندید احتمالی واکسن پیشنهاد نمودند(۳۳).

در بررسی حاضر از نقاط پروتئینی ایمونوژنی که جهت آزمایشات اسپکترومتری ارسال شدند ۴ عدد آن‌ها با پروتئین ویتلوژنین کنه رِیپی‌سفالوس (بوافیلوس) میکروپلوس و همولوگ آن (GP۸۰) هم‌پوشانی داشته است. ویتیلین فراوان‌ترین پروتئین تخم کنه می‌باشد که از یک پیش‌ساز پروتئینی بزرگتر به نام ویتلوژنین مشتق می‌شود. به عبارت دیگر ویتلوژنین توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک خرد می‌شود و به ویتلین تبدیل می‌شود. پلی پپتیدهای ویتلین به صورت یک کمپلکس ماکرومولکولی و به شکل غیر کووالان به یکدیگر متصل می‌باشند(۵). شواهد متعددی در دست است که نشان می‌دهد واکسیناسیون میزبان با ویتلین مشتق از کنه دارای اثراتی در مقابله با کنه‌ها می‌باشد. ولی از آنجایی که این پروتئین با مقادیر بالا در کنه‌ها وجود دارد و همچنین بصورت غیراختصاصی به بعضی مواد متصل می‌گردد، ممکن است مقداری از این اثرات ناشی از واکنش ایمنی علیه مواد متصل به ویتلین باشد. لذا این بحث مطرح می‌شود که ممکن است در واکسیناسیون با این پروتئین اپی‌توپ‌های محافظتی مربوط به ساختمان سوم پروتئین بواسطه اتصال الیگوساکاریدهای متصل به آن، اثرات مخرب علیه کنه ایجاد کند (۲۶).

یکی دیگر از نقاط پروتئینی ارسال شده جهت آزمایشات اسپکترومتری جرمی در مطالعه حاضر، با وزن مولکولی KDa ۳۷ با پروتئین تروپومیوزین مشابهت داشته است که این پروتئین با سرم گاو آلوده شده با کنه به صورت تجربی، واکنش مثبت نشان داد. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط Nisbet و همکاران ۲۰۰۶ که با استفاده از جرب درمانیسوس و سرم پرنده آلوده با جرب صورت پذیرفته است هماهنگی نداشت در حالی که با نتایج به دست آمده توسط Huntley و همکاران ۲۰۰۴ که نشان دادند تروپومیوزین جرب پسوروپتس اویس در گوسفندان آلوده سبب ایجاد آنتی بادی‌های IgG و IgE می‌نماید(۱۲)، همخوانی داشته است.

تروپومیوزین، یک پروتئین متصل شونده به اکتین می‌باشد که فعالیت اکتین را تنظیم می‌کند و برای عمل انقباض عضلات حائز اهمیت است این پروتئین از چهار آلفا هلیکس (A,B,C,D) تشکیل شده است که به صورت دیمر به دور هم می‌پیچند (Coiled coil) و ساختمان چهارم ایجاد می‌کنند(۱۱). تروپومیوزین در واکنش‌های آلرژیک و ایمنی نقش دارد و در انسان به عنوان اتوآنتی ژن در برخی از بیماری‌ها مطرح است. این پروتئین ممکن است به عنوان تومور ساپرسور عمل کند به طوری که کاهش بیان ایزوفرم‌های غیرعضلانی تروپومیوزین معمولاً در سلول‌های ترانسفورمه بدخیم دیده می‌شود (۱۰،۱۷) تروپومیوزین به عنوان کاندید واکسن در

Archive of SID
www.SID.ir

ریپی‌سفالوس (بوفیلوس) ‌آنولاتوس و چندین گونه انگل معرفی می‌شود (۲۰،۲۱،۲۵). پاسخ‌های محافظتی تروپومیوزین و مشتقات آن در حیوانات مختلف علیه بسیاری از بندپایان توسط محققین مورد مطالعه قرار گرفته است (۸،۲۱،۳۴) آنالیز پروتئوم عصاره لارو کنه ریپی‌سفالوس (بوفیلوس) ‌آنولاتوس با استفاده از پاسخ‌های ایمنی میزبان در راستای تعیین آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا و همچنین بررسی فاکتورهای مهم در فیزیولوژی کنه می‌تواند منبع مناسبی جهت یافتن هدف‌های بالقوه برای توسعه روش‌های کنترلی و ساخت واکسن باشد و نتایج به دست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که پروتئین‌های ویتلوژنین و تروپومیوزین، می‌توانند انتخاب‌های مناسبی برای واکسن ضد کنه‌ای باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت حمایت مالی از این پروژه تشکر و قدردانی بعمل می‌آورند.

References

1. Ayuso, R., Reese, G., Leong-Kee, S., Plante, M., Lehrer, S.B. (2002) Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. Int Arch Allergy Immunol. 129: 38-48.
2. Andreotti, R., Pedroso, M.S., Caetano, A.R., Martins, N.F. (2008) Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. Rev Bras Parasitol Vet. 17(2): 93-98.
3. Brossard, M., Wikel, S.K. (2004). Tick immunobiology. Parasitology. 129: 161- 176.
4. Brown, S.J., Shapiro, S.Z., Askenase, P.W. (1984) Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. J Immunol.132:3319-3325. (PubMed).
5. Chen, T.T., Hillen, L. (1983). Expression of the vitellogenin genes in insects. Gamete Research. 7: 179-196.
6. Das, S., Banerjee, G., DePonte, K., Marcantonio, N., Kantor, F.S., Fikrig, E. (2001) Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. J Infect Dis. 184: 1056-1084.
7. De la Fuente, J., Estrada-Peña A. (2012) Ticks and tick-borne pathogens on the rise. Ticks Tick Borne Dis. 3(3): 115-6.
8. Ferreira, C.A., Barbosa, M.C., Silveira, T.C., Valenzuela, J.G., Vaz Ida, S. J., Masuda, A. (2002). cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. Parasitology. 125(3): 265-74.
9. Gindin, G., Samish, M., Zangi, G., Mishoutchenko, A., Glazer, L. (2002) The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. Exp Appl Acarol. 28: 283-288. (PubMed)
10. Helfman, D.M., Flynn, P., Khan, P., Saeed, A. (2008) Tropomyosin as a regulator of cancer cell transformation. Adv Exp Med Biol. 644:124-31.
11. Hooper, S.L., Thuma, J.B. (2005) Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. Physiology. 85(3): 1001-60.
12. Huntley, J.F., Machell, J., Nisbet, A.J., Vanden, B. A., Chua, K.Y., Cheong, N., Hales, B.J., Thomas, W.R. (2004) Identification of tropomyosin, paramyosin and apolipophorin/ vitellogenin as three major allergens of the sheep scab mite, Psoroptes ovis. Parasite Immunol. 26(8-9): 335-42.
13. Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. Parasitol. 129: 3-14.
14. Krasky, A., Rohwer, A., Schroeder, J., Selzer, P.M. (2007) A combined bioinformatics and chemoinformatics approach for the development of new antiparasitic drugs. Genomics 89(1): 36-43.
15. Lamelli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4.Nature. 227: 680-685.
16. Lehrer, S.B., Ayuso, R., Reese, G. (2003) Seafood allergy and allergens: a review. Biotechnol. 5: 339-348.
17. Mahadev, K., Raval, G., Bharadwaj, S., Willingham, M.C., Lange, E.M., Vonderhaar, B., Salomon, D., Prasad, G.L. (2002) Suppression of the transformed phenotype of breast cancer by tropomyosin-1. Exp Cell Res. 279(1): 40-51.
18. Miller , R., Yeater, K., Allen, A., Almazan, C., Allen, A. , Jory, L., Yeater, K. , Messenger, M. , Ellis, D. (2012) Exploring the use of an anti-tick

Archive of SID

www.SID.ir

vaccine as a tool for the integrated eradication of the cattle fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. Vaccine. 30(38): 5682-5682.

19. Mulenga, A., Sugimoto, C., Onuma, M. (2000) Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. Microbes Infect. 2: 1351-1361.
20. Nabian, S., Taheri, M., Fard, R.M., Aramoon, M. (2013) Identification of tropomyosin and its immunological properties from larvae of cattle tick, boophilus annulatus. Iran J Parasitol. 8(2):242-8.
21. Nisbet, A.J., Huntley, J.F., Mackellar, A., Sparks, N., Mc, D.R. (2006) A house dust mite allergen homologue from poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer). Parasite Immunol. 28: 401-5.
22. Nuttall, P.A., Labuda, M. (2004). Tick-host interactions: saliva-activated transmission. Parasitology. 129: 177-189.
23. O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem. 250: 4007-21.
24. Patrick, C.D. and Hair, J.A. (1975). Laboratory rearing procedures and equipment for multi-host ticks (Acarina: Ixodidae) J Med Entomol. 12: 389-390.
25. Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J.M., Raoult, D. (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 49(4): 552-3. doi:10.1086/600885. PMID 19583519.
26. Tellama, R.L., Kempa, D., Ridinga, G., Briscoea, S., Smithb, D., Sharpb, P., Irvingb, D., Willadsena, P. (2002). Reduced oviposition of Boophilus microplus feeding on sheep vaccinated with vitellin. Vet Parasitol. 103 (1-23): 141-156.
27. Untalana, P.M., Guerrero, F.D., Haines, L.R., Pearson, T.W. (2005) Proteome analysis of abundantly expressed proteins from unfed larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Biochem Mol Biol. 35:141-151.
28. Valenzuela, J.G. (2002). High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. Insect Biochem Mol Biol. 32: 1199-1209.
29. Valenzuela, J.G. (2004) Exploring tick saliva: from biochemistry to "sialomes' and functional genomics. Parasitology. 129: 83-94.
30. Wang, H., Nuttal, P.A. (1994) Comparison of the proteins in salivary glands, saliva and haemolymph of *Ripicephalus appendiculatus* female ticks during feeding. Parasitol. 109: 517-523.
31. Willadsen, P., Smith, D., Cobon, G., Mckenna, R.V. (1996) Comparative vaccination of cattle against *Boophilus micropolus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. Parasite Immunol. 18:241-246.
32. Wiladsen, P. (2004) Anti-tick vaccines. J Parasitol. 129: 367-387.
33. Xiang, F.Y., Zhang, J.W., Zhou, Y.Z., Li, Z., Gong, H.Y., Zhou, J.L. (2009) Proteomic analysis of proteins in the salivary glands of the fed and unfed female tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. Agricultural Sciences in China. 8(1): 121-127.
34. You, M.J. (2004) Immunization effect of recombinant P27/30 protein expressed in *Escherichia coli* against the hard tick *Haemaphysalis longicornis* in rabbits. Korean J Parasitol. 42(4): 195-200.

Archive of SID

www.SID.ir

Proteomic Profiling Survey and Identification of Some Immunogenic Proteins From Larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* Tick (Mazandaran Strain)

Nabian, S.[1*], Taheri, M.[2], Asadollahi, Z.[1], Ranjbar, M.M.[3]

[1]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran,Tehran, Iran*
[2]*Rastegar Reference Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3]*Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran*
(Received 26 February 2018, Accepted 3 July 2018)

Abstract:

BACKGROUND: *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* is an important tick, which can transmit parasites and bacteria to cattle. It can also cause hides damage, growth reduction and sometimes paralysis. So, the tick infestation can be regarded as a major problem in the livestock industry. Different control methods including the chemical ones are used to fight ticks, but because of developing resistance to chemical treatments, researchers try to find some immunogenic proteins for vaccine production. Investigating these tick proteins could be an important step in the identification of biological molecules for the purpose of developing control strategies. **OBJECTIVES:** The aims of present study were to evaluate and analyze Boophilus annulatus larval extract proteins by 2- dimensional gel electrophoresis patterns (proteomic profiling) and identification of some its immunogenic proteins by two dimensional immunoblotting and MALDI TOF/TOF mass spectrometry referred to as Mazandaran strains. **METHODS:** The steps followed here were: tick preparation and culture, 1-D electrophoresis, and then 2-D electrophoresis, Western blotting and Mass spectrometry and then Mass data were analyzed by Mascot software. **RESULTS:** Analysis of the produced 2D image identified approximately 80 protein spots with different Molecular weight and PI by Coomassi blue staining. Based on immunogenicity (through Western blotting) and high concentration, 10 protein spots (between 14 and 97 kDa) candidates for MALDI TOF and MALDI TOF - TOF MS. Among the 10 proteins spots, Vitellogenin, Vitellogenin-2 precursor, tropomyosin, hypotethical protein ISCW001652 were identified proteins with immunogenic properties. Also, quantification analysis showed some proteins had more quantity in soluble larvae protein extract and some such as vitellogenin had some isoforms. **CONCLUSIONS:** The results of this study could be a preliminary step towards selecting proteins candidated to develop vaccines against ticks.

Keyword: *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, Proteomic profiling, 2-Dimensional gel electrophoresis, MALDI TOF/TOF mass spectrometry, Immunogenic proteins

Archive of SID

Figure Legends and Table Captions

Table 1. MALDI-TOF-TOF and Mascot search program results of 10 protein spots are arranged in Table.

Figure 1. Representation of two-dimensional gel electrophoresis image of *Boophilus annulatus* larval extract by Coomassi blue staining.

Figure 2. Immunoblot analysis of *B. annulatus* larval extract using immune sera. M- Molecular weight standards.

***Corresponding author's email: nabian@ut.ac.ir, Tel: 021-61117072, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir