Archive of SID

جداسازی و شناسایی پروتیئن غشائی(H) ویروس ریندرپست

محمود حسنی[۱] ، مهدی ارجمند [۲]،رسول مدنی [۳]، روحانی کارگر[۳]، فریبا گلچین فر[۳]

۱- گروه مهندسی شیمی -بیوتکنولوژی دانشکده فنی مهندسی ، واحد علوم و تحقیقات تهران - دانشگاه آزاد اسلامی-تهران -ایران

۲- گروه مهندسی شیمی ، واحد تهران جنوب - دانشگاه آزاد اسلامی-تهران -ایران

۳- بخش بیوتکنولوژی موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج – ایران.

*نویسنده مسئول: mahmoudhasani2000@yahoo.com

چکیده :

طاعون گاوی را که به انگلیسی (Rinderpest) یا Cattle plague می نامند یکی از بیماریهای حاد و گاهی فوق حاد و خیلی مسری گاو وعده ای از نشخوار کنندگان می باشد که از دیر باز شناخته شده است.RPV دارای دو گلیکو پروتئین سطحی H وF است که آنتی بادیهای خنثی کننده را القا، می کنند (۱) . پس از خالص‌سازی ویروس و جداسازی پروتئین های سطحی ویروس با استفاده ازمحلول Triton X-114 میزان پروتئین موجود که با استفاده از روش پروتئین سنجی لوری اندازه گیری شد در سطح کل ویروس ۱۵۳۱ میکروگرم بر میکرو لیتر و غلظت پروتئین H جداشده ۳۲۹.۵ میکروگرم بر میکرو لیتر می باشد. و وزن مولکولی پروتئین تخلیص شده بر روی ژل پلی اکریل آمید به روش SDS-PAGE , و استفاده از روش RF ،69KD تعیین گردید. استفاده از خود ویروس به عنوان منبع حاوی انواع پروتئین و پروتئین موثر و روشهای جداسازی و خالص ساری فوق بهترین روش بوده و در کمترین زمان ممکن و با حداقل هزینه ها امکان پذیر می باشد.

واژگان کلیدی: طاعون گاوی – جداسازی- پروتئین- الکتروفورز- خالص سازی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویروس (Rinderpest) عامل طاعون گاوی یک عضو مهم از جنس Morbili virus از زیر خانواده Paramyxoviridae می باشد(۲). اثر این ویروس بر روی گاوهای اهلی،بوفالوها و حیوانات سم دار حیات وحش بوده و باعث ایجاد بیماری در آنها می گردد. این ویروس عامل طاعون گاوی بوده و خسارت ناشی از آن از نظر اقتصادی مهم می باشد (۳) .

ویروس ریندرپست(RPV) دارای دو نوع پروتئین می باشد : Proteine H : که به گیرنده های سلولی متصل شده و فرایند تولید بیماری را آغاز می کند،و **Proteine F** : که کمک می کند پوشش ویروس از طریق غشایی وارد سلول میزبان شود.این دو نوع پروتئین اولین انتخاب ها برای تولید واکسن می باشند، زیرا از طریق این دو می توان ایجاد مصونیت کرد (۴،۵ و۶) .

پروتئین H دارای مناطق عمده هیدروفوبیکی نزدیک N-terminal می باشد که به نظر می رسد جهت نگهداری غشاء و فرآورده های غشائی به کار می رود و احتمالا" پروتئین H ترشح شده از محدوده غشاء ویروس طاعون گاوی آزمایشات لازم برای مطالعه خواص ایمونوسیته در گاوها را راحت تر می کند (۷). ساختار هیدروفوبیکی پروتئین H کاملا" حفاظت شده است و وزن مولکولی ظاهری آن ۶۹ کیلو دالتون می باشد (۷) .

با توجه به این که یکی از راههای مهم جهت تشخیص اختصاصی این ویروس جداسازی و خالص سازی پروتئین H می باشد و از آنجا که از جهت بهداشت دام و متعاقب آن سلامت جامعه مصرف کننده فراورده های دامی، حائز اهمیت است، انجام این طرح گامی اساسی در نیل به هدف نهایی که مسلماً تشخیص قطعی این بیماری است خواهد بود. لازم به توضیح است که تهیه این آنتنی ژن جهت تشخیص اختصاصی از فعالیت های تحقیقاتی مورد نظر است و با عنایت به عدم وجود سابقه قبلی در کشور، انجام این طرح حائز اهمیت می باشد.

مواد و روش کار :

خالص سازی ویروس:

کشت سلولی (B.K. Razi) حاوی ویروس چند مرتبه منجمد و ذوب شد تا ویروس داخل سلول در محیط مایع کشت قرار گیرد. نحوه انجماد و ذوب به این صورتبود که ابتدا کشت سلولی در C° ۲۰- فریز شده و بعد از فریز کامل ذوب شده به C° ۷۰- منتقل شد و بعد از ذوب مجدد, دوباره به C° ۷۰- منتقل شد و مجددا" ذوب گردید. برای حذف اضافات سلولی, کشت سلولی حاوی ویروس ۲۰ دقیقه در۲۵۰۰ دور سانتریفوز گردید. مایع رویی کشت سلولی سانتریفوژ شده برداشته شد و به مدت ۲ ساعت در g۸۷۰۰۰سانتریفوزگردید. رسوب حاصله جمع آوری و در بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار حل شد. محلول حاصله بر روی سوکروز درصد ۳۰ برده شده و به مدت ۲ ساعت در g ۸۷۰۰۰ سانتریفوز گردید.

مجددا" رسوب حاصله جمع آوری و در بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار حل شد. محلول ویروسی حاصله به روش لوری پروتئین سنجی گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی پروتئین های سطحی:

جداسازی پروتئین های سطحی با استفاده از محلول Triton X-114 انجام شد و غلظت آن با استفاده از روش پروتئین سنجی محاسبه گردید (۸و۹) .

استفاده از الکتروفورز(SDS-PAGE):

این روش که تقریباً یک روش جامع بوده و در روش‌های دیگر خالص سازی نیز جهت اطمینان استفاده می‌شود(۱۰).

پس از آماده سازی محلولهای لازم ابتدا باید Resolving gel (که در این روش از ژل ۱۰درصد با حجم ۱۰ میلی لیتر استفاده شده) و Stacking gel (ژل ۵درصد با حجم ۵ میلی لیتر استفاده شده)را ساخت. در این مرحله پس از تزریق Stacking gel باید شانه چند شاخه را گذاشته تا همزمان با کامل شدن ژل محل چاهکاها نیز معلوم باشد (۱۱). جدول شماره ۱و۲.

جدول ۱- ساخت Resolving gel (۱۰درصد) در حجم های مختلف

حجم ساخته شدن/ مواد مصرفی	۱۰ml	۲۰ml	۳۰ml	۴۰ ml	۵۰ ml
آب مقطر	۴	۷/۹	۱۱/۹	۱۵/۹	۱۹/۸
اکریل آمید ۳۰درصد	۳/۳	۶/۷	۱۰	۱۳/۳	۱۶/۷
محلول۱/۵ مول Tris	۲/۵	۵	۷/۵	۱۰	۱۲/۵
سدیم دو دسیل سولفات(SDS)۱۰درصد	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵
آمونیوم پر سولفات ۱۰درصد	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵
ترا متیل – اتیلن دی آمین(TEMED)	۰/۰۰۴	۰/۰۰۸	۰/۰۱۲	۰/۰۱۶	۰/۰۲

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲- ساخت Stacking gel (۵درصد) در حجم‌های مختلف

حجم ساخته شدن/ مواد مصرفی	۲ ml	۵ml	۶ml	۸ml	۱۰ml
آب مقطر	۱/۴	۳/۴	۴/۱	۵/۵	۶/۸
اکریل آمید ۳۰درصد	۰/۳۳	۰/۸۳	۱	۱/۳	۱/۷
محلول۱ مول Tris	۰/۲۵	۰/۶۳	۰/۷۵	۱	۱/۲۵
SDS ۱۰درصد	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۰۸	۰/۱
آمونیوم پر سولفات ۱۰درصد	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۰۸	۰/۱
TEMED	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۸	۰/۰۱

در چاهکها ابتدا نمونه Marker ، سپس ویروس و پس از آن نمونه پروتئین را تزریق کرده و با ریختن بافر تانک دستگاه را در ولتاژ ۱۸۰-۱۲۰ ولت تنظیم و راه‌اندازی شد.

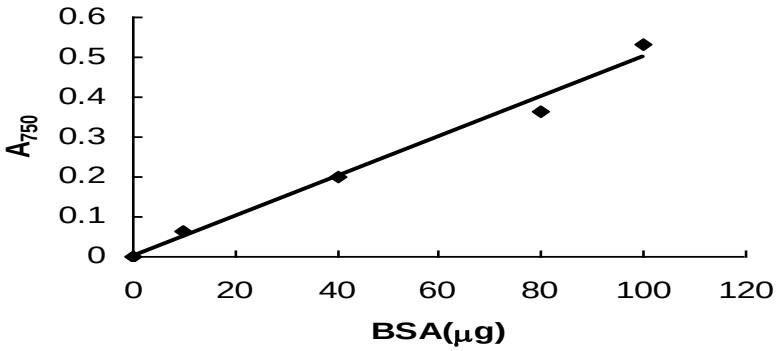
انتهای این عمل که حدوداً یک ساعت طول می‌کشد زمانی است که نمونه‌ها کاملاً به انتهای ژل رسیده باشند (دقت کنید که نمونه‌ها از ژل بیرون نیایند) سپس ژل را به آرامی از روی صفحات شیشه‌ای جدا کرده و آنها را در محلول رنگ کوماسی بلو که به عنوان محلول رنگ می‌باشد به مدت ۳-۲ ساعت قرار داده و به آرامی شیک می‌کنیم. پس از اتمام زمان رنگ کردن ژل را درون محلول بافررنگ بر تا لحظه نمایان شدن باندها قرار می‌دهیم:پس از نمایان شدن باندها می‌توان $Rf = \frac{\text{مسافت طی شده هر باند (نمونه)}}{\text{کل مسافت طی شده}}$ برای نمونه Marker محاسبه کرده و نمودار مورد نظر را رسم و محلی را که نمونه ما باندی ظاهر کرده است را نیز Rf آن را حساب کرده و با استفاده از نمودار و معادله آن می‌توان میزان جرم مولکولی ماده را محاسبه کرد. (RF برای پروتئین ۰/۴۹ می‌باشد).

نتایج :

غلظت پرئتین در کل ویروس و غلظت پروتئین H جداشده بدست آمده از روش پروتئین سنجی عبارت بود از ۱۵۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر و ۳۲۹.۵ میکرو گرم بر میلی لیتر.(نمودار ۱)

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۱: نمودار بدست آمده از پروتئین سنجی لوری و معادله آن

$$5.006117\times10^{-3}X+1.518617\times10^{-3}=Y$$

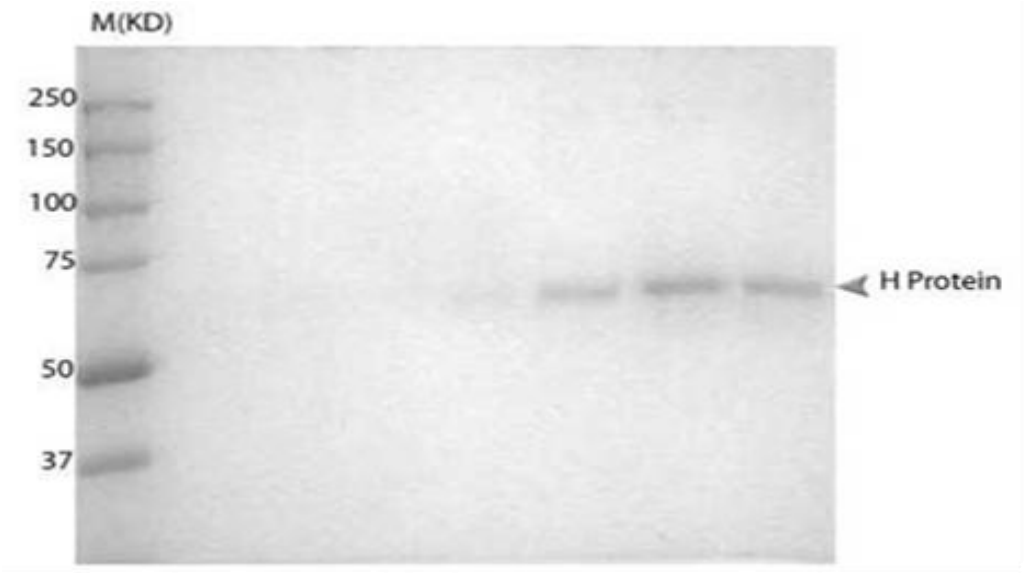
جدول ۳ : میزان جذب محلول شاهد، ویروس خالص شده و پروتئین جدا شده

غلظت(میکرورم بر میلی لیتر)	جذب(نانومتر)
0	0
10	.0.064
40	0.198
80	0.395
100	0.532
(whole virus)50	0.386
(H-protein)50	0.084

در نهایت نیز از ژل الکتروفورز عکسبرداری نموده و با استفاده از روش RF نمودار و معادلـه مربـوط بـه آن را بدسـت آورده و وزن مولکولی پروتئین بدست آمده 69KD بوده، که با وزن مولکولی پروتئین H برابر می باشد (شکل ۱) .

www.SID.ir

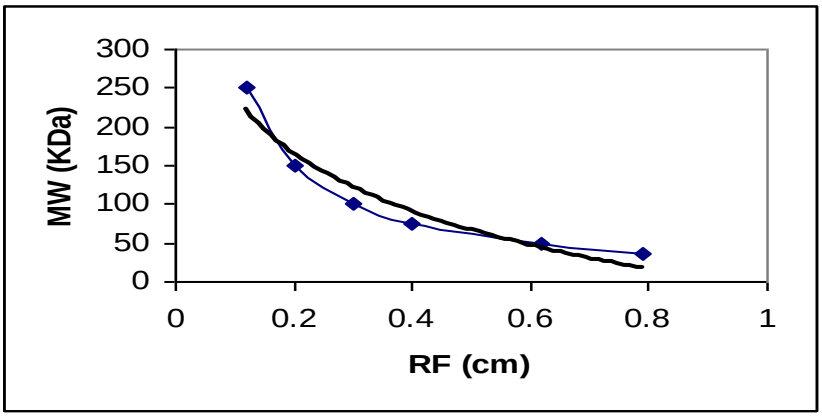
Archive of SID



شکل ۱: الکتروفورز مارکر و پروتئین جدا شده که در شکل مشخص شده است

جدول ۴: RF بدست آمده برای شاهد و نمونه پروتئین

شاهد(وزن مولکولی KDa)	RF	نمونه	RF
250	0.12	H-protein	0.49
150	0.2		
100	0.3		
75	0.4		
50	0.62		
37	0.79		



نمودار۲: نمودار بدست آمده از RF و معادله آن :Y=8.4032 – 108.54Ln(x) -

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری:

RPV دارای دو گلیکو پروتئین سطحی H و F است که آنتی بادیهای خنثی کننده را القا، می کنند. پروتئین H به رسپتور سلولی متصل شده, فرایند infection را آغاز می کند و پروتئین F از طریق فیوژن پوشش ویروس با غشای سلول به ورود ویروس به داخل سلول میزبان کمک می کند. (۱۴و۱۳، ۱۲).

H پروتئین, تغییرات زیادی به ویژه در نواحی non-conserve نشان داده است. وجود این تغییرات, مسأله غیر قابل انتظاری نیست؛ به دلیل اینکه در بین پروتئین های متعلق به ویروسهای جنس موربیلوویروس این پروتئین غیر حفظ شده ترین ساختار را داراست که احتمالا" نشان دهندۀ این حقیقت است که این پروتئین باید با یک یا تعداد بیشتری از پروتئین های سطحی سلول میزبان واکنش دهد و این جایگاههای پروتئینی برای هر ترکیب ویروس- میزبان متفاوت است(۱۴).

در این روش ابتدا امکان جداسازی پروتئین H با استفاده از محلول TritonX-114 (که بهترین محلول برای جداسازی پروتئین های سطحی از غشا سلولی می باشد) می باشد که با استفاده از الکتروفورز پلی آکریل آمید ژل رفتار پروتئین H مورد بررسی قرار گرفته که با استفاده از روش RF به وزن مولکولی مورد نظر ۶۹ کیلو دالتون رسیده ایم که میتوان در جهت تولید واکسن در مقابل بیماری طاعون گاوی پیش رفت. با توجه به اینکه که در روشهای قبلی از سانتریفوژ و یا انواع کروماتوگرافی برای خالص سازی پروتئین ها وهمچنین از زرده تخم پرندگان و تنباکوبه عنوان منبع حاوی پروتئین برای جداسازی پروتئین ها جهت سخت واکسن استفاده شده که دقت و ظرافت روش فوق را نداشته و از لحاظ زمانی و هزینه نیز مقرون به صرفه نمی باشد، استفاده از خود ویروس به عنوان منبع حاوی انواع پروتئین و پروتئین موثر و روشهای جداسازی و خالص ساری فوق بهترین روش بوده و در کمترین زمان ممکن و با حداقل هزینه ها امکان پذیر می باشد.

در نهایت اینکه جداسازی پروتئین H ویروس ریندرپست به وسیله دترجنت و مطالعه رفتار آن در الکتروفورز یک کار تحقیقی کاملا" نو و جدید میباشد که در آزمایشگاه بخش بیوتکنولوژی موسسه واکسن و سرم سازی رازی انجام شده است.

تقدیر و تشکر:

از کلیه عزیزانی که ما را در جمع آوری تحقیق حاضر یاری نموده اند قدردانی به عمل می آید.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES:

1-Damion,B.2001 . Design of Immunization Strategy based on recombinant Proteins of the measles virus in the context of a changing epidemiolo·gy, universite delege faculte des sciences biological properties of the structural proteins of MV,19-23.

2-Tamal,R., Renuka, P., Saumitra, O.,MS.S. 2004.eader RNA of RinderPest Virus binds Specifically with cellular La protein : a possible role in virus replication. *Virus research* 104(Z):PP.101-109.

3-Sugiyam, M., I to, N., Mina mato, No, Tanak,S. 2002. I denti fication of Immunodominant Neutralizing epitops on hemagglutinin protein of Rinderpest virus, jornal of virology. 76, 1691-1696.

4-Naik, S., and Shaila, M. S. (1997). Characterization of membrane-bound and membrane anchor-less forms of hemagglutinin glycoproteins of rinderpest virus expressed by baculovirus recombinants. *Virus Genes* 14**,** 95-104.

5- Renakara dya,G.J.,suresk,K.B.,Rajasekhar, M., shaila,M.s.2003. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibody and recombinant hemagglutinin for serosurveillance of rinderpest virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 41**,** 943-947.

6- Alpers, D. H , Seetharam, B ,Tiruupathi, C . 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton solution. *Journa of Biochemistry*. 256**,** 1604-1607.

7- Angba, A., Bidjeh, K. Couacy-Hymann, E., Diallo, A., and Domenech, J,. (1995). Protection of goats against goats by vaccination with attenuated peste des petits ruminants virus. *research Veterinary Senccie*. 59**,** 106-109

8- Alpers.DH, Seetharam.B&Tira ppathic .C.1986. Phase separation of rat intestinal brush membrane proteins using Triton X-114, *analytical biochemistry*. 153:330-5 .

9- Bordier,C.1981. Phas separation of integral membrane proteins in Trituon X-114 solution. *Journal of biological chemistry*.256:1604-7 .

10- Walker. J., Wilson .K. 1994. Practical biochemistry (principles and techniques). Fourth edition . Cambridge Vniversity press; 434-437 .

11- Robert ,K. 1994. Protein purification (principles and practice)_third edition , Springer –*verlag* new york press;PP:291-298 .

12- Kaushik-Mitra, S., Rajasekhar, M., Renukaradhya, G, J., Shaila, M. S. and Sinnathamby, G. 2002. Mapping of B-cell epitopes of hemagglutinin protein of rinderpest virus. Virology 298**,** 214-223.

13- Barrett, T., Black, D, N., Carn, V. M., Kitching, R. P., and Romero, C. H. 1994. Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease with a recombinant capripoxvirus expressing the fusion protein gene of rinderpest virus. 135**,** 152-154.

14- Dale, B., Jounes, L., Hsu, D., Grubman, M., Mebus, C., Owens, S., Yamanaka, M., and Yilma, T. 1988. Protection of cattle against rinderpest with infectious vaccinia virus recombinants expressing the HA or F gene Senccie 242**,** 1058-1061.

www.SID.ir