

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 پس 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 کیلودالتونی 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 کیلودالتونی 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، ۵۷-۶۱.

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

ویروس بیماری رینوتراکئیت عفونی گاو (IBR) متعلق به خانواده هرپس ویریده، جنس واریسلا ویروس می‌باشد. ویروئین‌های این خانواده، کروی و به قطر ۲۰۰ - ۱۲۰ نانومتر (معمولاً ۱۵۰ نانومتر) می‌باشند و دارای پوشینه‌ای هستند که توسط پیپومرهای 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 کیلوباز، 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 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).

ویروئین 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 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 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 ریپونوکلئوتیداز، 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 ویروئین 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

Email: fhemmat@ut.ac.ir



مخفی بادگزامتازون شدیداً افزایش می یابد (۳،۱۷).

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

سویه های مختلف ویروس IBR از لحاظ آنتی ژنیک مشابه می باشند، هر چند اختلاف جزئی بین سویه های مختلف توسط آزمونهای خنثی سازی در کشت بافت نشان داده شده است. به طور خلاصه می توان گفت که سویه های مختلف BHV-1 اختلاف پادگنی فاحشی با یکدیگر ندارند و همه آنها را باید در یک گروه هرپس ویروس تیپ ۱ گاوی رده بندی نمود. اختلاف هایی بین ژنوم های جدایه های مختلف ویروس BHV-1 حاصل از اشکال مختلف بیماری با تجزیه و تحلیل آنتیجیم های محدودیت DNA تشخیص داده شده است. اما مطالعات همانندسازی اسید نوکلئیک DNA ویروسی حداقل ۹۵ درصد شباهت ژنتیکی را نشان می دهد. برخی محققین معتقدند که سویه های BHV-4 ممکن است شبیه BHV-1 باشند که متحمل تغییرات بیولوژیک خاصی شده اند (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 پادتن های درخشان، الایزا، رادیوایمونواسی، ایمونوپراکسیداز، ثبوت عناصر مکمل و خنثی سازی سرم می توان 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 خالص سازی 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 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 سانتریفوژ گردید و پس از حل رسوب در PBS، میزان پروتئین آن به روش لوری سنجیده شد. پس از سنجش میزان پروتئین نمونه ها میزان پروتئین در حد ۲۰۰ - ۱۰۰۰

دالتونی غیر گلیکوزیله در سطح غشاء، ۱۵ پلی پپتید در ساختار نوکلئوکسپید به همراه تعدادی پروتئین های 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 می گردد. ۱۰ گلیکوپروتئین با وزن های 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).

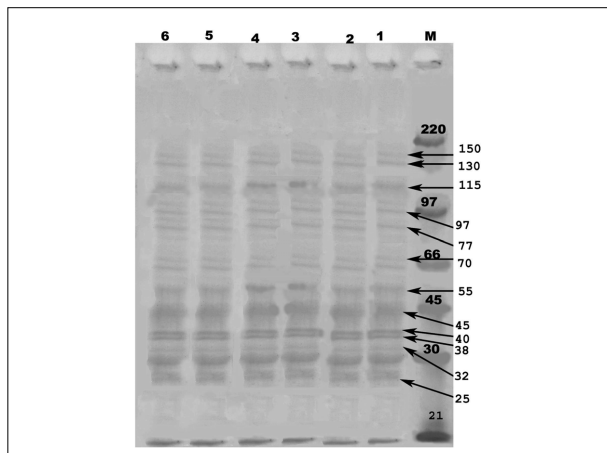
رسوب با آنتی بادیهای منوکلنال و منواسپسيفیک نشان می دهد که سه مجموعه رسوب دهنده ۵۵/۷۴/۱۳۰ و ۷۷/۱۵۰ و ۹۷/۱۸۰ کیلو دالتونی مهم ترین اجزاء غشاء ویروس است. این گلیکوپروتئینها در غشاء ویروس و در سطح سلول های آلوده با BHV-1 موجود بوده و با آنتی بادیهای منوکلنال خنثی کننده و منواسپسيفیک واکنش نشان می دهند. آنتی بادی علیه پروتئین ۷۷/۱۵۰ بیشترین سهم از آنتی بادی های خنثی کننده ویروس را تشکیل می دهد و پس از آن آنتی بادی علیه پروتئین ۹۷/۱۸۰ می باشد. آنتی بادیهای منوکلنال علیه مجموعه پروتئینی ۵۵/۷۴/۱۳۰ در صورت حضور کمپلمان خنثی کننده هستند. آنتی سرم منواسپسيفیک تهیه شده از پروتئین ۵۵ خاصیت خنثی سازی را ندارد. پروتئین ۱۰۷ غیر گلیکوزیله است و تولید آنتی بادیهایی می نماید که خنثی کننده ویروس BHV-1 نمی باشد. پروتئین های ۶۴ و ۴۵ توسط آنتی سرم های دوره نقاهت رسوب نمی کنند و پروتئین هایی با منشأ سلولی می باشند که در غشاء ویروس جای گرفته اند (۳).

پروتئین های ۷۴ و ۵۵ از طریق باندهای دی سولفیدی مولکول ۱۳۰ را ایجاد می نمایند. پروتئین ۱۸۰ دایمر پروتئین ۹۷ و پروتئین ۱۵۰ دایمر پروتئین ۷۷ می باشد، اما این دایمرها در خود پیوندهای دی سولفیدی ندارند. پروتئین ۱۰۷ در غشاء و نوکلئوکسپید به مقادیر زیاد دیده می شود. در برخی ژل های SDS-PAGE باندهای ۱۸۰K و ۱۵۰K ضعیف هستند و به سختی دیده می شوند (۴،۵).

هشت پروتئین با وزن های مولکولی ۱۵۰، ۱۳۰، ۱۱۵، ۱۰۷، ۹۷، ۷۴، ۷۷ و ۵۵ کیلودالتونی با آنتی سرم های پلی کلنال گاوی پس از دوره نقاهت رسوب می دهند. پروتئین های ۶۴ و ۴۵ کیلو دالتونی توسط آنتی سرم گاوی شناسایی نمی شوند. سه گلیکوپروتئین B (۱۳۰k)، C (۹۷k) و D (۷۷k) که قبلاً گلیکوپروتئین های I، III، IV نامگذاری می شدند، به عنوان مهم ترین اجزای غشاء ویروس می باشند (۵،۱۲).

پاسخ های قوی ایمنی همورال همه گاوهای آلوده شده با BHV-1 علیه گلیکوپروتئین های اصلی ۱۳۰/۷۴/۵۵ و ۷۷/۱۵۰ و ۹۷/۱۸۰ در طی عفونت اولیه می باشد. علیه مجموعه پروتئینی ۵۵/۷۴/۱۳۰ پاسخ ایمنی سریع و پایدارتری ایجاد می شود. آنتی بادی ها علیه مجموعه پروتئینی ۷۷/۱۵۰ و ۹۷/۱۸۰ دیرتر و بعد از عفونت ظاهر می شود و مقادیر آن در آنتی سرم دامهای مختلف، متفاوت است. مقادیر آنتی بادی ضد سه مجموعه گلیکوپروتئینی پس از بهبودی کاهش می یابد، اما در طی عفونت مجدد یا فعال شدن ویروس





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

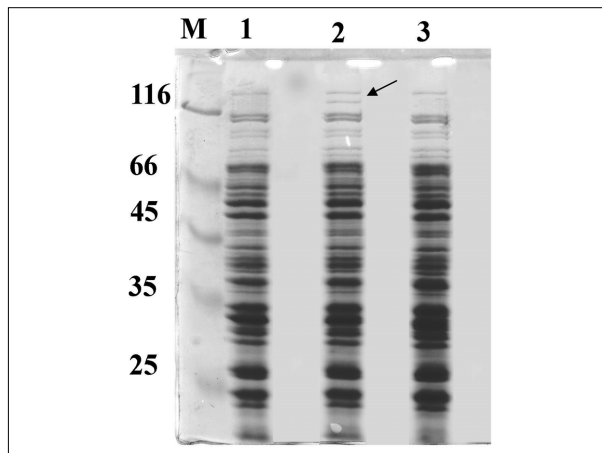
ویروس مشاهده شد که در واقع همان گلیکو پروتئین‌های اصلی ویروس IBR می‌باشند که به ترتیب گلیکو پروتئین‌های I(B), III(C) و IV(D) نامگذاری شده‌اند. این سه باند پروتئینی در ایمنوبلاتینگ (تصویر ۲) نیز مشاهده گردیدند. باندهای پروتئینی ۱۸۰ و ۱۵۰ کیلودالتونی بسیار ضعیف می‌باشند و به سختی قابل رؤیت می‌باشند.

در ایمنوبلاتینگ 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 همورال در گاوهای آلوده به این ویروس می‌باشد.

در تصویر ۱ باندهای پروتئینی مربوط به جدایه‌های مختلف ویروسی IBR قابل مشاهده می‌باشند در نمونه شماره ۲ باند اضافی ۱۲۵-۱۲۰ کیلودالتونی قابل مشاهده می‌باشد در حالی که در ایمنوبلاتینگ این باند قابل ردیابی نبود (تصویر ۲).

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 مولکولی این ویروس بوده است و جهت تهیه واکسن‌های مارکرو تحت واحد پایه مطالعات قرار گرفته است. شناخت پلی پپتیدها و مکانیسم ایمنی‌زایی آنها جهت تهیه واکسن‌های تحت واحد از ملزومات 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).



تصویر ۱-

میکروگرم در میلی لیتر تنظیم شده و نهایتاً اقدام به الکتروفورز نمونه‌ها در سیستم ژل پلی‌اکریلامید ناپیوسته گردید.

بدین منظور کلیه نمونه‌ها در ژل ۵ و ۱۰ درصد پلی‌اکریلامید حاوی SDS در ولتاژ ۶۰ و ۱۰۰ میلی‌ولت 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) نمونه‌ها و مارکر محاسبه و ثبت گردید.

در مرحله دوم، اقدام به انتقال پروتئین‌های 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 پادتن‌های 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 تصویربرداری از غشاهای رنگ آمیزی شده گردید.

نتایج

نتایج حاصله حاکی از حضور حداقل ۳۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۸۰-۱۲ کیلودالتونی می‌باشد. نمونه‌های مختلف ویروسی از لحاظ تعداد باند و وزن مولکولی با یکدیگر مشابه می‌باشند، به جز حضور باند ۱۲۵ - ۱۲۰ کیلودالتونی که در نمونه شماره ۲ 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 (تصویر ۱). باندهای پروتئینی ۱۳۰، ۹۷، ۷۷ کیلودالتونی در تمامی نمونه‌های



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 ۴۵، ۳۸، ۳۲، ۲۵ 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 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، 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 گاوداربه‌های 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، به‌طور 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، ۱۰).

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 (۱۵، ۸).

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.

