

ردیابی پادگن‌های دخیل در پاسخ ایمنی همورال ناشی از ویروس لوکوز گاوی در عقده‌های لمفاوی تومری در گاو

فرهید همت زاده^{۱*}، حسن ممتاز^۲

۱) گروه میکرو بیولوژی و ایمنولوژی، 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 همورال ناشی از ویروس لوکوز گاوی در گاو مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌ها شامل ۱۵ عقده لنفاوی مربوط به گاوهایی که در آزمون‌های سرولوژیک ایبزا و ژل دیفوزیون دارای واکنش سرمی مثبت علیه ویروس BLV بوده و به خاطر شکل‌گیری لئوسارکوم بالینی به کشتارگاه اعزام شده یا کالبدگشایی شده بودند به همراه ۴ عقده لنفاوی مربوط به گاوهای به ظاهر سالم که در آزمون‌های مزبور پاسخ منفی نشان داده و از نقاط مختلف کشور تهیه شدند. پس از تهیه عصاره از عقده‌های لنفاوی، کلیه نمونه‌ها به روش لوری پروتئین سنجی شده و به روش SDS-PAGE روی سیستم ژل ناپیوسته ۱۰ و ۵ درصد الکتروفورز گردید سپس با قرار دادن ژل مربوطه روی غشاء نیتروسولوز جهت جستجوی پادگن‌های دخیل در پاسخ ایمنی همورال ویروس BLV، در حضور آنتی سرم مثبت BLV به روش وسترن بلات آزمایش شد. حداقل ۲۵ باند پروتئینی مشترک در عصاره بافت‌های لنفاوی گاوهای بیمار و به ظاهر سالم مشاهده گردید. در آزمایش بلاتینگ، پادگن gp51 در تمام نمونه‌ها تشخیص داده شد ولی پادگن P24 تنها در ۵ نمونه از بافت‌های تومری ردیابی گردید. به دلیل تفاوت در میزان و عرضه پروتئین‌های پادگنی ویروس و نظر به این که گلیکو پروتئین gp51 از جمله پادگن‌های پروتئینی غشاء ویروس BLV بوده و زودتر در سلول‌های آلوده عرضه می‌گردد. این پروتئین در تمام موارد عفونت به عنوان مهم ترین و اولین پادگن محرک ایمنی همورال در گاو مطرح می‌باشد.

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

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 (Fluorescent 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 بر حسب نوع سلول و حتی سویه ویروسی به کاررفته الگوهای نسبتاً متفاوتی بدست آمده است. Uckert در سال ۱۹۸۶ طی مطالعه ای بر روی ویروس‌های تکثیر یافته در کشت سلولی کلیه بره (Fetal Lamb Kidney (FLK) مشخص نمود که پروتئین‌های مختلفی به اسامی p10، p12، p15 (1)، p15 (2)، 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)، لئوسارکوم (Lymphosarcoma)، لنفوما بدخیم (Malignant Lymphoma) و لوسمی (Leukemia) شناخته شده است (۸، ۱۳).

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

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

بیماری ناشی از این ویروس در گاو اشکال مختلفی دارد که شامل لوکوز انزوتیک 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 امکان پذیر است که برای هر مرحله ای از بیماری باید روش مناسبی را انتخاب نمود (۱۵، ۱۶). برای جدا کردن ویروس که معمولاً در لنفوسیت‌ها استقرار دارد، باید این سلول را



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، گلیسرول، گلیسین، مرکاپتواتانل، متانل، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، تریس بازی، Temed، مارکر پروتئینی چند رنگ با وزن مولکولی کم (Roche) پروتئین G کنژوگه با پراکسیداز (Roche)، سمپلر و سرسمپلر در اندازه‌های مختلف، دستگاه بیوفتومتر، ظروف درب دار شیشه‌ای و پلاستیکی، میکرو فیوژ (Eppendorf) تریس بازی، گلیسین، متانل، سرم آلبومین گاوی، آنتی سرم BLV، محلول دی آمینو بنزیدین، دستگاه الکتروفورز و بلاتینگ (Bio Rad)، دستگاه شیکر انکوباتور ۲۷ 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 کیلو دالتون Rad Bio الکتروفورز گردید و سپس جهت انجام بلاتینگ ژل مربوطه روی غشاء نیتروسولوز قرار گرفته و به مدت یک شب (۱۶ ساعت) در ولتاژ ۳۰ ولت بلاتینگ گردید. پس از طی این زمان، غشاء نیتروسولوز خارج و جهت ظهور باندهای پروتئینی ابتدا ۳ تا ۵ نوبت و هر بار ۵ دقیقه با بافر PBS-Tween 20 شستشوداده شد و به مدت یک ساعت در بافر مسدود کننده (Blocking Buffer) PBS-Tween 20 (BSA in 3% قرار گرفت. پس از شستشوی مجدد غشاء با بافر Tween 20-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 شستشوداده 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 نیتروسولوز با بافر PBS-Tween 20 شستشوداده شد و جهت ظهور باندهای پروتئینی در محلول دی آمینو بنزیدین غوطه‌ور گردید. پس از ظهور باندهای مربوطه غشاء در آب مقطر شستشوداده 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 (تصویر ۱). وزن مولکولی این پروتئین‌ها ۲۴ و ۵۱ کیلو دالتون است که هر دو جزء پادکن‌های اختصاصی ویروس لوکوز بوده و قاعدتاً در بافت‌های لنفاوی غیر آلوده مشاهده نمی‌شوند (۶). پادکن ویروس BLV مورد استفاده در آزمون AGID ساخت Pourquier Montpellier Institut فرانسه نیز تحت شرایط مزبور به همراه نمونه‌های مورد آزمایش

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

در مطالعه Schult در سال ۱۹۸۴ دو پروتئین gp60، gp30 در ویروس BLV مورد مطالعه قرار گرفت و p30 به عنوان محصول ژن env معرفی گردید (۱۷). Mamoun چهار پروتئین p52، p45، p70 و p27 را معرفی نمود (۱۴). در مطالعه Deshayes مشخص گردید که پاسخ ایمنی همورال علیه پادکن‌های gp51، gp12، gp45، شکل گرفته ولی پاسخ مشهودی علیه gp35 مشاهده نشد (۳). در آزمون‌های سرو لوژیک تشخیص BLV پروتئین‌های gp51، p24، عمده‌ترین پادکن‌ها 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 سرو لوژیک پاسخ ایمنی قوی را باعث می‌شود (۲، ۵، ۱۰). پروتئین p24 و گلیکوپروتئین gp51 مهمترین پادکن‌های دخیل در پاسخ ایمنی همورال بوده و رد پای پادتن‌های ضد این دو پادکن اصلی‌ترین راه تشخیص سرمی این بیماری می‌باشد (۱، ۵).

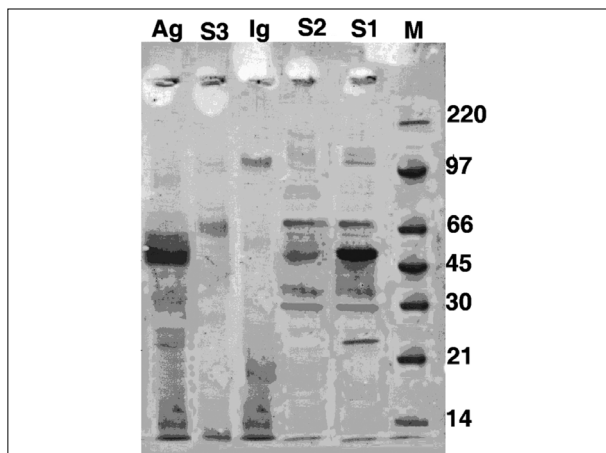
در کل مطالعات انجام شده حاکی از وجود حداقل ۱۵ باند پروتئینی مختلف در SDS-PAGE ویروس و در سیستم‌های سلولی مختلف می‌باشد که عمدتاً دو پروتئین p24 و مخصوصاً gp51 در بروز پاسخ‌های ایمنی همورال دخیل بوده است اما تعداد و الگوی استقرار این باندها بسته به نوع تیره سلولی و حتی سویه ویروس با هم متفاوت بوده است. 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 پادکن، الگوهای متفاوتی حاصل خواهد شد. این تحقیق تلاشی است در جهت ردیابی پادکن‌های ویروس در عقده‌های لنفاوی گاو‌های مبتلا به شکل لنفوسارکوم بیماری و تعیین پادکن‌های دخیل در پاسخ ایمنی همورال ناشی از ویروس BLV که در نوع خود منحصر به 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 در آمده و عصاره حاصله پس از عبور از کاغذ صافی در rpm ۱۴۰۰۰ 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 الکتروفورز، عصاره حاصل از عقده‌های لنفاوی به



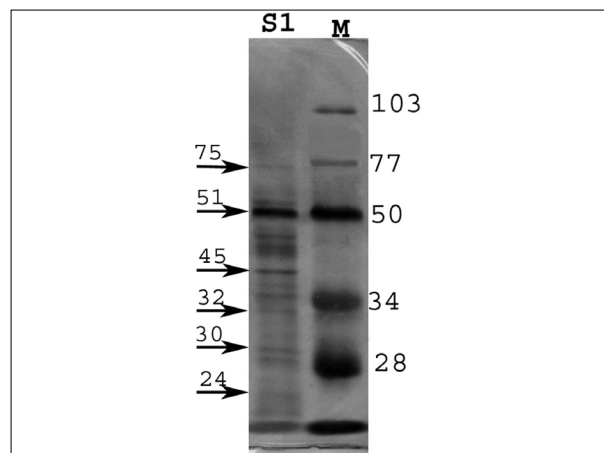


تصویر ۲- بلاتینگ حاصل از نمونه‌های مورد آزمایش، S1 و S2 مربوط به گاوهای بیمار که پادگن P24 تنها در نمونه اول مشاهده می‌گردد. Ig ایمونوگلوبولین گاو به عنوان شاخص کارکرد پروتئین G. S3 نمونه عقده لمفاوی گاو به ظاهر سالم. Ag پادگن استاندارد.

وخالص سازی ویروس به روش اولتراسانتریفیوژنتایخ دقیق تری را حاصل می‌نماید ولی مطالعه پادگن‌های ویروس در حالت طبیعی و دریافت‌هایی 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 رفتار 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 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 همورال 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 با وزن 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 کیلودالتون 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 همورال 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



تصویر ۱- 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 ایمنو بلاتینگ 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)، پراآلبومین (با وزن مولکولی ۶۱ کیلودالتون) و زنجیره بتامولکول MHC-II (با وزن 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 که شده توسط ردیف‌های نوکلئوتیدی در ژنوم این اجرام به تفاوت‌های موجود در آنها پی‌برد و از آن جهت تشخیص سریع و دقیق بیماری‌های ناشی از این اجرام، همچنین تفریق و دسته‌بندی اجرام بیماری‌زا استفاده کرد (۱۵).

در مطالعات مختلفی که در نقاط مختلف دنیا در زمینه الگوی پروتئینی ویروس BLV انجام گرفته، ۷ و حداکثر 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 (۱۰۹). 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



References

- 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.
- Choi, K. Y., Liu, R.B. and Buehring, G.C.(2002) Relative sensitivity and specificity of AGID, ELISA and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *Viol. Methods*,104:33-39.
- Deshayes, L., Levy, D., Parodi, A.L. and Levy, J.P.(1980) Spontaneous immune response of bovine leukemia virus infected cattle against five different viral proteins. *Int. J. Cancer*, 25: 503-508.
- Gonzalez, E.T., Oliva, G.I. and Norimine, J.(1980) Evaluation of western blotting (WB) for the diagnosis of BLV. *Arqu. Brasilei. Med. Vet. Zootec.*,51:299-305.
- 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.
- Hammatzadeh, F., Momtaz, H.(2004) Study on electrophoretic protein pattern of lymph nodes of cows with bovine leukosis and comparison with apparently healthy cows. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran*.59:43-47.
- Hudson, L., Hay, F.C.(1989) Practical immunology. 1th Ed., Blackwell Sci., Oxford, pp. 4-7.
- Johnson, R., Kaneene, J.B.(1992) Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.*, 2: 287-314.
- Kittelberger, R., Laybourn, B.J., Diack, D.S., Penrose, M.E. and Reichel, M.P.(1996) Evaluation of electrophoretic immunoblotting for the detection of antibodies against the BLV in cattle. *Viol. Methods*, 61:7-22.
- Kittelereg, R., Reichel, M.P. and Meynell, R. M.(1999) Detection of antibodies against the core protein p24 BLV in cattle. *Viol. Methods*, 77: 109-114.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mostafaei, a.(1999) Protein gel electrophoresis, practical and theoretical guide. pp.104-120.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J.(1999) Veterinary virology. 3th Ed., Academic press, San Diego, pp.361-391.
- Radostits, O.M., Gay, C.C. and Blood, D.C.(2000) Veterinary medicine. 9th Ed., W.B. Saunders Company, London, pp.1046-1058.
- Schultz, A.M., Copeland, T.D. and Oroszlan, S.(1984) The envelope proteins of BLV: purification and sequence analysis. *J. Virol.*,135:417-427.
- Simard, C., Richardson, S. and Dixon, P.(2000) AGID test for the detection of BLV antibodies lack of transatlantic standardization. *Can. J. Vet. Res.*, 64:69-100.
- 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.
- 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.



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

Hemmatzadeh, F.^{1*}, Momtaz, H.²

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

²Department 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 electrophoresed 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 tumoral 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

