مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۵، ۲۸۹ - ۲۸۵

ردیابی پادگن p24 ویروس لوسمی گاوی در عقده‌های لمفاوی گاوهای مبتلا به لکوز

غلامرضا نیکبخت بروجنی[1]* فرهید همت زاده[1] سید مهدی امام[1] مهدی غفاری[1]

۱) گروه میکرو بیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۸ اسفندماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۲۷ شهریورماه ۱۳۸۵)

چکیده

در این مطالعه تعداد ۱۹ عقده لمفاوی متعلق به گاوهای مبتلا به لکوز و دو نمونه عقده لمفاوی گاوسالم با استفاده از روش وسترن بلاتینگ جهت حضور پادگن p24 بررسی شدند. در روش فوق از سرم خرگوش ایمن‌شده با پادگن p24 و پادتن منوکلنال ضد پادگن p24 ویروس لکوز استفاده شد. پس از به کارگیری سرم خرگوشی در آزمون وسترن بلاتینگ در بین تمامی نمونه‌های عقده لمفاوی مبتلا به لکوز، باندهای ۴۵، ۵۰، ۵۴، ۵۸ و کمتر از ۱۹ کیلودالتن ردیابی گردیدند و در استفاده از پادتن منوکلنال باندهای ۳۰، ۳۲، ۳۹، ۴۵، ۵۰، ۵۳ کیلودالتون مشخص گشتند. نتایج این تحقیق نشان دهنده تنوع پادگنی موجود یا به عبارتی تنوع پروتئین‌های واجد اپی توپ‌های p24 در نمونه‌های ویروسی مورد مطالعه است. چنین به نظر می‌رسد که پروتئین‌های ساختاری ویروس BLV که حامل اپی توپ‌های p24 هستند از تنوع فنوتیپی قابل توجهی برخوردارند.

واژه‌های کلیدی: لکوز گاوی، عقده‌های لمفاوی، p۲۴، وسترن بلاتینگ.

مقدمه

ویروس لوسمی گاوی (BLV) با اثر بر روی بافت‌های لمفاوی و بخصوص لمفوسیت‌های B باعث بروز لوسمی واگیردار گاوان (EBL) در گاوهای گوشتی و شیری می‌گردد. این ویروس یکی از اعضای خانواده رتروویریده بوده و در جنس دلتا رتروویروس طبقه‌بندی می‌شود. از نظر ردیف‌های اسیدهای نوکلئیک و توالی اسیدهای آمینه در پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری، BLV ارتباط نزدیکی با ویروس لمفوتروپیک انسان (HTLV) دارد(۶،۹،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۷،۱۸).

ویریون BLV دارای پروتئین‌های مختلفی است که از مهمترین آنها می‌توان به گروه پروتئین‌های ساختاری شامل: گلیکوپروتئین‌های پوشینه gp30 و gp51 و پروتئین‌های مرکزی p15 و p24 و از گروه پروتئین‌های غیرساختاری به آنزیم‌هایی مثل رونوشت‌برداری معکوس و انتگراز اشاره نمود. اکثر این پروتئین‌ها ایمونوژن هستند. تاکنون مشخص شده است که پروتئین‌های gp51 و p24 از اهداف اصلی پاسخ ایمنی هستند(۳،۵،۱۴).

دو پیش ساز پلی پروتئینی ۴۵ و ۷۰ کیلودالتنی در ویروس لکوز توسط ژنی بنام gag رمز می‌شوند. پروتئین ۷۰ کیلودالتنی پیش ساز پروتئین‌های p15، p24، p12 و p14 است. پروتئین ۴۵ کیلودالتون در واقع همان ساختار پروتئین ۷۰ کیلو دالتون را دارا است با این تفاوت که فاقد پروتئین p15 و پروتئینی ۱۰ کیلو دالتنی است که محصولی اضافی در برش پروتئین‌ها محسوب می‌شود. p15 پروتئین ماتریکس، p24 پروتئین کپسید، p12 پروتئین نوکلئوکپسید و p14 آنزیم پروتئاز می‌باشند. پروتئین ترانسکریپتاز معکوس که فعالیت اندونوکلئازی نیز دارد به صورت یک پیش‌ساز gag-pol به وزن ۱۴۵ کیلودالتن تولید می‌شود. پروتئین مذکور تمامی ساختارهای پروتئین ۷۰ کیلودالتون gag را نیز در خود دارد.

در گاوهای مبتلا به لکوز به طور معمول پادتن‌های ضد پادگن‌های gp 51 جهت تشخیص بیماری استفاده می‌شوند(۵،۹). اما بر اساس برخی گزارش‌ها در دام‌های آلوده به طور غالب یا در برخی موارد منحصراً پادتن ضد p24 قابل تشخیص بوده است(۹،۱۲). از آنجایی که p24 یکی از پادگن‌های مهم در پاسخ ایمنی است(۵،۹،۱۲،۱۳،۲۱). ردیابی آن در عقده‌های لمفاوی گاوهای مبتلا به لکوز می‌تواند به کشف ماهیت این پروتئین در عقده‌های لمفاوی کمک نموده و از سوی دیگر به امکان استفاده از این پادگن جهت تشخیص کمک نماید. هدف از این مطالعه ردیابی پادگن p24 در عقده‌های لمفاوی گاوان مبتلا لکوز بوده است.

مواد و روش کار

نمونه‌های عقده‌های لمفاوی: در مجموع تعداد ۱۹ عقده لمفاوی متعلق به گاوهای مبتلا به لکوز و دو نمونه عقده لمفاوی گاو لکوز منفی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. ابتلا یا عدم ابتلا به لکوز در تمامی گاوهایی که عقده لمفاوی آنها مورد مطالعه قرار گرفته بود بر اساس علائم بالینی و با استفاده از روش آگار ژل ایمیونودیفیوژن (AGID)(Co. diagnostica-Invitro) و الیزا (Svanova Co.) در تجربیات قبلی به اثبات رسیده بود(۱۰). این عقده‌های لمفاوی در طی سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۳ از گاوداری‌ها اطراف تهران، اصفهان و شهرکرد اخذ شده بودند.

در مورد تمامی نمونه‌ها ابتدا عصاره عقده لمفاوی در PBS با استفاده از تن بروک به شکل شیرابه تهیه و در ۱۴۰۰۰ دور به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید. مایع رویی در ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش قرار گرفت.

در این تحقیق همچنین از کشت سلولی استاندارد آلوده به ویروس لکوز گاوی (FLK-BLV) (Svanova Co.) جهت کنترل سرم و نمونه‌های عقده لمفاوی بدلیل دارا بودن پادگن‌های ویروسی مورد استفاده قرار گرفت.

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۵-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email:Email:nikbakht@ut.ac.ir

جدول۱- تعداد نمونه‌ها و اوزان باندهای بدست آمده در هر پروفایل پروتئینی بدست آمده از آزمون وسترن بلات با استفاده از سرم خرگوش ایمن شده با p24.

کل نمونه‌ها	نمونه‌های منفی	FLK-BLV	پروفایل ۳	پروفایل ۲	پروفایل ۱	
۱۹	۱۲		۵	۱	۱	تعداد نمونه‌ها
			۹،۸،۷،۶،۲	۱۲	۱۳	× شماره نمونه
	---	۵۸			۵۸	اوزان باندهای ردیابی شده
	---		۵۴	۵۴		
	---	۵۰		۴۵	۵۰	
	---		<۱۹	<۱۹	<۱۹	

* نمونه‌ها از ۱ تا ۱۹ شماره‌گذاری شده اند و تنها شماره نمونه‌های مثبت در جدول ذکر شده است.

نمونه‌های سرم: در این تحقیق سرم ضد پادگن p24 تهیه شده در خرگوش و پادتن منوکلنال ضد p24 (شرکت Euro diagnostica) مورد استفاده قرار گرفتند.

سرم خرگوشی ضد P24 با استفاده از پادگن غیرفعال p24 خالص شده از یاخته‌های FLK-BLV (شرکت Euro diagnostica) تهیه گردید. تهیه آنتی سرم p24 در خرگوش با روش ذیل صورت گرفت: ۳۰۰ میکروگرم از پادگن p24 در یک میلی لیتر سالین مخلوط گشته سپس به یک میلی لیتر از ادجوانت کامل فروند اضافه و مخلوط گردید تا به صورت یک کرم سفید درآید. ۲۵۰ میکرولیتر از امولیسیون تهیه شده به صورت داخل عضلانی به عضله ران خرگوش تزریق شد، بعد از دو هفته یک تزریق دیگر نیز انجام گرفت، دو هفته بعد از دومین تزریق ۵ میلی لیتر خون از رگ کناری گوش خرگوش اخذ شده و تولید پادتن ضد p24 با استفاده از روش ایمونودیفوزیون به اثبات رسید. در خاتمه از خرگوش ایمن خونگیری به عمل آمده و سرم آن برای انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد(۱۱).

روش وسترن بلاتینگ: خصوصیات پادگنی نمونه‌ها با روش وسترن بلات به ترتیب زیر انجام گردید: ۵۰ میکرولیتر از عصاره عقده لمفاوی با ۵۰ میکرولیتر بافر دناتوره کننده مخلوط شده، ترکیب بافر مورد استفاده بدین قرار بود: تریس هیدروکلراید ۰/۱ مول (pH=6)، SDS ۴ درصد، برم فنل بلو ۰/۲ درصد، گلیسرول ۲۰ درصد و بتا مرکاپتواتانل ۵ درصد. پس از مخلوط کردن عصاره‌ها در بافر فوق، محلول به مدت ۳ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفته و سپس در ۵ هزار دور به مدت کوتاهی سانتریفوژ می‌شد. ۲۰ میکرولیتر از مایع رو جهت الکتروفورز در ژل اکریلامید ۱۲ درصد استفاده می‌گردید. در مرحله بعد و پس از انجام الکتروفورز انتقال پروتئین‌ها به غشای PVDF (Roche Co.) با استفاده از دستگاه ترانس بلات (شرکت Bio - RAD) و براساس دستورالعمل پیشنهادی همراه دستگاه صورت می‌گرفت. غشای PVDF پس از خروج از دستگاه به مدت یک ساعت در محلول بلوکینگ حاوی PBS و Tween 20 (0.5 %) قرار داده شده و سپس از محلول بلوکینگ خارج شده و در محلول بلوکینگ به همراه BSA (۳ درصد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار می‌گرفت.

جدول۳- اوزان باندهای پروتئینی بدست آمده در آزمون وسترن بلاتینگ با استفاده از پادتن منوکلونال.

پروفایل ۵	پروفایل ۴	
۱۲و۱۳	۲و۹	شماره نمونه‌ها
۵۳		اوزان باندهای ردیابی شده
۵۰	۴۵	
	۳۹	
	۳۲	
	۳۰	

از سرم مثبت خرگوش آلوده به p24 به عنوان پادتن اولیه استفاده شد. سرم در محلول بلوکینگ حاوی BSA به میزان ۱ به ۵ رقیق گردید. غشای PVDF به مدت یک شب در محلول حاوی پادتن قرار گرفته و روز بعد پس از سه بار شستشوی غشا در بافر بلوکینگ از پروتئین G کونژوگه پروکسیداز (Sigma Company) به عنوان پادتن ثانویه استفاده شد. در اینجا غشا به مدت یک ساعت در محلول بلوکینگ حاوی پروتئین G قرار گرفت. پس از آن سه بار غشای PVDF در بافر بلوکینگ شسته شده و برای رؤیت باندها از محلول آلفا کلرونفتول استفاده شد.

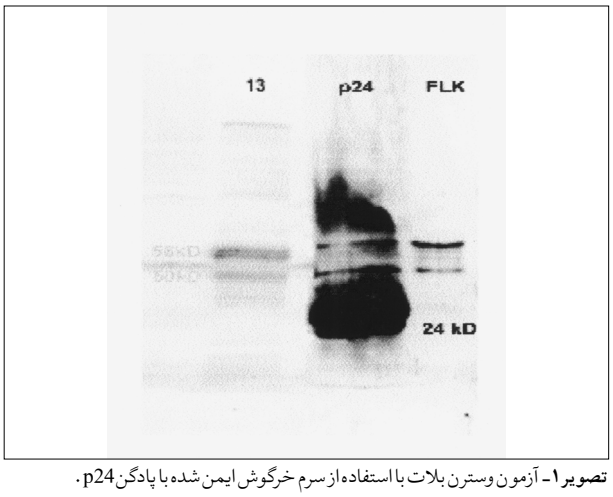
آزمون وسترن بلات بر روی نمونه‌های عقده‌های لمفاوی با پادتن منوکلنال نیز صورت گرفت. تمامی اعمال مشابه روش استفاده از سرم خرگوش بوده با این تفاوت که پس از الکتروفورز و ترانس بلات پروتئین‌ها برروی غشا از پادتن منوکلنال ضد p24 کنژوگه با آنزیم پراکسیداز به عنوان پادتن اولیه استفاده گردید و برای رؤیت باندها نیز از محلول آلفا کلرونفتول استفاده شد.

تمامی اعمال الکتروفورز و وسترن بلات انجام شده جهت ایمونوبلات پروتئین‌ها بر اساس روش شرح داده شده توسط Ausubel و همکاران درسال ۲۰۰۲ صورت گرفته است(۱).

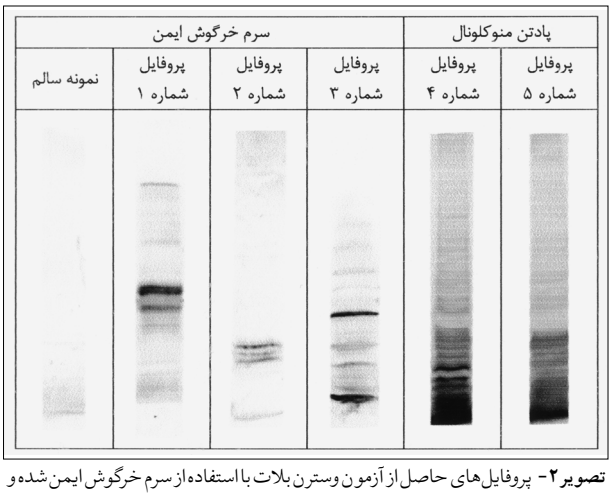
نتایج

نتایج بدست آمده از آزمون وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم خرگوش ایمن شده با پادگن p24 در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است. در مجموع سه پروفایل متفاوت پروتئینی با استفاده از سرم خرگوش ایمن بدست آمده است که تعداد نمونه‌ها و اوزان باندهای بدست آمده در هر پروفایل در جدول ۱ آمده است.

سرم خرگوش ایمن شده با پادگن p24 در آزمون وسترن بلاتینگ در مجموع تمامی نمونه‌های عقده لمفاوی باندهای ۴۵، ۵۰، ۵۴، ۵۸ و کمتر از ۱۹ کیلودالتن را نشان دادند. سرم مذکور باندهای ۵۰ و ۵۸ را در ۱ نمونه (پروفایل شماره ۱)، باندهای ۴۵ و ۵۴ کیلودالتون را نیز در یک نمونه (پروفایل شماره ۲) و در ۵ نمونه پروتئین ۵۴ کیلودالتون (پروفایل ۳) مشخص گردید. باند کمتر از ۱۹ کیلودالتن در همه پروفایل‌های بدست آمده حضور داشت. باندهای ۵۰ و ۵۸ کیلودالتون در نمونه یاخته FLK آلوده به ویروس BLV نیز به خوبی



تصویر ۱- آزمون وسترن بلات با استفاده از سرم خرگوش ایمن شده با پادگن p24. نمونه‌های FLK-BLV، پروتئین p24 و نمونه شماره ۱۳



تصویر ۲- پروفایل‌های حاصل از آزمون وسترن بلات با استفاده از سرم خرگوش ایمن شده و پادتن مونوکلونال ضد p24.

مشخص شد(تصویر۱).

نتایج بدست آمده از آزمون وسترن بلاتینگ با استفاده از پادتن منوکلنال p24 در جدول ۲ آمده است. پادتن منوکلنال در دو نمونه(شماره‌های ۲ و۹) باندهای ۴۵، ۳۹، ۳۲، و ۳۰ و در دو نمونه(شماره‌های ۱۲ و ۱۳) باندهای ۵۳ و ۵۰ کیلودالتون را مشخص نمود(جدول و تصویر ۲). دو نمونه اخیر پروفایل‌های ۱ و ۳ را در آزمون وسترن بلاتینگ با سرم خرگوش نشان داده بودند. پروتئین ۴۵ کیلودالتون مشخص شده با استفاده از پادتن منوکلونال در پروفایل شماره۲ نیز به چشم می‌خورد. نمونه‌های شماره ۲ و ۹ مشخص شده با پادتن منوکلنال در پروفایل ۴ قرار گرفته اند که نمونه‌های مذکور در آزمون یا سرم خرگوش نیز در پروفایل شماره ۳ قرار گرفته اند (جدول ۱و۲، تصویر ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

براساس اطلاعات موجود اولین بار پروتئین‌های ویروس لکوز توسط Deshayes و همکاران مورد بررسی قرار گرفت(۱۰). این محققین ویروس BLV را از کشت یاخته‌های کلیه جنین بره (FLK) استخراج کرده و الگوی الکتروفورتیک ویروس را مشخص نموده‌اند. در این بررسی هشت پلی پپتید مختلف با استفاده از روشهای کلاسیک مشخص شده که وزن مولکولی آن‌ها بین ۱۱ تا ۸۰ کیلودالتون گزارش شده است. در مطالعه مذکور پروتئین p24 به غلظت زیاد در نمونه‌های مورد آزمایش مشخص گشته و به پروتئین‌های گلیکوزیله دیگر با وزن حدود ۶۰ کیلودالتون نیز اشاره شده است(۸).

Tajima و همکاران پروتئین‌های ویروسی که در یاخته‌های مختلف ترانسفورمه بیان شده‌اند را با روش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار داده‌اند(۱۸). این محققین پروتئین‌های مهم در پاسخ ایمنی را حداقل به ۳ پیش ساز پروتئین ویروسی نسبت می‌دهند که شامل: gpr 72 env یا گلیکو پروتئین ۷۲ کیلودالتونی پوشش ویروس، پروتئین pr70gag و gag 45 که همان پروتئین‌های ۷۰ و ۴۵ کیلودالتونی مرکزی ویروس هستند. دو پروتئین بالغ که در نتیجه برش پروتئین‌های پیش ساز تولید می‌شوند شامل gp51 و p24 بوده که بیشتر مبنای تشخیص سرمی قرار می‌گیرند. لازم به ذکر است که تمامی نتایج بدست آمده فوق در آزمون وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم گوسفند آلوده شده با ویروس لکوز گاوی بدست آمده است (۱۸). Gonzalez و همکاران نیز از یاخته FLK آلوده به ویروس را به عنوان پادگن تشخیصی استفاده نموده‌اند و در سرم گاوهای مبتلا حضور پادتن‌های ضد p24 و gp51 را مشخص کرده‌اند(۹). تاکنون گزارشی مبنی بر ردیابی پادگن‌های ویروسی در عقده‌های لمفاوی گاوهای مبتلا به لکوز وجود ندارد. در یک گزارش از عقده‌های لمفاوی مبتلا برای تهیه پادگن‌های تشخیصی در ایمونودیفوزیون استفاده شده است و تنها در یک نمونه پادگن p24 قابل تشخیص بوده است(۴).

در تحقیق حاضر نتایج بدست آمده از آزمون وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم خرگوش ایمن شده با پادگن p24 سه پروفایل متفاوت را نشان می‌دهد. پروتئین حدود ۴۵ کیلودالتون در یکی از پروفایل‌ها می‌تواند پروتئین پیش ساز gag باشد ولی پروتئین پیش ساز ۷۰ کیلودالتون در هیچ یک از نمونه‌ها مشخص نشد(جدول ۱). از بین باندهای پروتئینی مشخص شده در پروفایل‌های مختلف تنها باند ۵۴ کیلودالتون در دو پروفایل از سه پروفایل مشترک بوده است. در مجموع سرم خرگوش ایمن چهار پروتئین مختلف را مشخص نموده است که در این میان سه پروتئین ۴۵، ۵۰ و ۵۸ کیلودالتون وجه تمایز پروفایل‌های مختلف هستند.

در استفاده از پادتن منوکلونال نیز پروفایل‌های متفاوتی مشاهده شد که از نمونه‌های مشخص شده با سرم خرگوش متمایز است. همانگونه که در بخش نتایج ذکر شد نمونه‌های عقده‌های لمفاوی مشخص شده با پادتن منوکلنال با سرم خرگوش نیز قابل تشخیص بودند. با این وجود این باندهای پروتئینی بدست آمده در مقایسه آزمون سرم خرگوش و پادتن منوکلنال در پروفایل‌های متفاوتی قرار می‌گیرند. تنوع پروتئین‌های قابل تشخیص در استفاده از دو روش پادتن منوکلنال و پلی کلونال(سرم خرگوش) بیشتر به ساختارهای پروتئینی قابل تشخیص توسط هر یک از این پادتن‌ها باز

می‌گردد. در مجموع توانایی تشخیص ۳ فنوتیپ ویروسی توسط سرم خرگوش در ۷ نمونه و تشخیص دو تیپ در بین چهار نمونه توسط پادتن مونوکلونال نشاندهنده تنوع پادگنی موجود در نمونه‌های ویروسی مورد مطالعه است. مطالعات صورت گرفته بیشتر بر روی تنوع ژنومی در ویروس HIV بوده است. عقیده بر این است که ژن gag در رتروویروس‌ها حراست شده و تنوع چندانی ندارد(۱۶،۱۸،۲۰). طبق یافته‌های Willems و همکاران درسال ۱۹۹۷ نیز در رتروویروس‌های مختلف تنها یک ناحیه حفاظت شده شامل ۲۰ اسید آمینه در پادگن p24 وجود دارد و در نواحی دیگر پروتئین ویروس بیشتر انتظار تنوع وجود دارد(۲۱).

به هر حال تحقیق حاضر حاکی از تنوع پروتئین‌های حامل اپی توپ‌های p24 در نمونه‌های مورد آزمایش است، چنانکه تنوع در پروتئین پیش‌ساز gag در تحت تیپ C ویروس HIV مشخص شده است. تنوع مشاهده شده در این تحقیق با توجه به ساختار حراست شده ژن gag نیز بیشتر به محل برش آنزیمی پروتئین gag-pol 172 باز می‌گردد. در واقع آن گونه که در مورد HIV بیان شده تنوع ساختار پروتئینی در پروتئیاز - ترانس کریپتاز معکوس ویروس منجر به تنوع در منطقه کاتالیتیک آنزیم گشته که خود باعث تنوع مناطق برش آنزیم بر روی پلی پروتئین ویروس و در نهایت تنوع پروتئین‌های حاصل خواهد شد(۲،۷،۲۰). از آنجایی که تاکنون گزارشی مبنی بر تنوع پروتئین‌های مذکور در ویروس لکوز موجود نیست و تاکنون نیز بر اساس اطلاعات ما تحقیقی بر روی پادگن p24 در عقده‌های لمفاوی مبتلا به لکوز صورت نگرفته، نتایج این تحقیق می‌تواند اولین گزارش مبنی بر حضور تنوع ساختاری پروتئین‌های حامل اپی توپ‌های p24 در ویروس لکوز باشد که احتمالا طی روندی مشابه با ویروس HIV شکل می‌گیرد.

پیش از این ذکر شده بود که در آلودگی تجربی پادتن‌های ضد gp51 غالب هستند در حالی که در آلودگی طبیعی این پادتن‌های ضد p24 هستند که غالب می‌باشند. گزارش‌های متناقض در خصوص حضور پادگن p24 و gp51 می‌تواند به تفاوت پادگن‌های طبیعی با پادگن‌هایی که برای تهیه پادتن‌های منوکلنال استفاده شده‌اند بازگردد و یا حتی مربوط به پادگن‌هایی باشد که در کشت و تکثیر ویروس دچار تغییر گشته و برای تشخیص در کیت‌های الیزا یا سایر روش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای مثال در آلودگی تجربی معمولا پادگن‌های همان سویه ویروسی که برای بیمار ساختن به کار رفته در تشخیص پادتن‌های گاو مبتلا نیز مورد استفاده قرار گرفته است ولی این پادگن قادر نیست پادتن‌های طبیعی مربوط به سایر سویه‌های ویروسی را مشخص کند که در طبیعت حضور دارند. بنابراین تنوع پادگنی در پروتئین‌های gag در اینجا نیز می‌تواند نتایج متناقض به دست آمده از بررسی‌های سرولوژیک را توجیه نماید. از آنجایی که پادگن مورد استفاده در کیت تشخیصی الیزا برای پادتن‌های ضد p24 با پادگنی که در واقع گاو را آلوده ساخته ممکن است متفاوت باشد ارزیابی‌های متفاوتی را نیز بدنبال خواهد داشت. به نظر می‌رسد که در طراحی واکسن‌های موثر و یا طراحی کیت‌های تشخیصی معتبر بر اساس p24 نیز در نظر داشتن تنوع اپی توپ‌ها ضروری است.

در مجموع به نظر می‌رسد که در صورت امکان اخذ نمونه‌های عقده لمفاوی از گاوهای مشکوک بتوان به صورتی کاملا اختصاصی آنتی ژن‌های ویروسی را تشخیص داد.

References

1. Ausubel, F., Brent, R., Kingstone, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K.(2002) Short protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA, pp. 102 - 109.
2. Barrie, K., Perez, E., Lamers, S., Farmerie, W., Dunn, B., Sleasman, J. and M. Goodenow, M. (1996) Natural variation in HIV-1 protease, Gag p7 and p6, and protease cleavage sites within gag/pol polyproteins: amino acid substitutions in the absence of protease inhibitors in mothers and children infected by human immunodeficiency virus type 1. J. 219:407-16.
3. Bicka, L., Kuzmak, J., Kozaczynska, B., Plucienniczak, A. and Skorupska, A. (2001) Expression of bovine leukemia virus protein p24 in Escherichia coli and its use in the immunoblotting assay. Acta Biochim.Pol. 48:227-32.
4. Bunger, I., Khalaf, H., Rimpler, M. (1996) Examination of antigen preparations from the virus of enzootic bovine leukosis with regard to suitability for immunoblotting. Dtsch Tierarztl Wochenschr., 103:516-9. 516-519.
5. Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., Van den Broeke, A., Willems, L. and Thomas,R. (1988) Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. Vet. Microbiol. 17:197-218. 197-218.
6. Choi, K., Liu, R., Buehring,G. (2002) Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. J.Virol. Methods. 104:33-9.
7. De Oliveira, T., Engelbrecht, E., Janse van Rensburg, M. F., Gordon, K. F., Bishop, J., zur

Megede. F., Barnett, S.W. and Cassol, S.(2003) Variability at human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease cleavage sites: an indication of viral fitness, J. Virol. 77:9422-30.

8. Deshayes, L., Levy, D., Parodi, A. and Levy, J.(1977) Proteins of bovine leukemia virus. I. Characterization and reactions with natural antibodies. J. Virol. 21:1056-60.
9. Gonzalez, E., Oliva, G., Norimine, J., Cid de la Paz, V. and Echeverr, M. (1998) Evaluation of western blotting for the diagnosis of enzootic bovine leukemia. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia. 51: 299-305.
10. Hemmatzadeh, F.,Momtaz,H.(2004) Study of electrophoretic proteinal pattern of lymph nodes of cows with bovine leukosis and comparission with apparently healty cows. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.59:43-48.
11. Hey, C., Westwood, O.(2002) Practical Immunology. Blackwel science?? publication .pp.326-328
12. Kittelberger, R., Reichel, M., Meynell, R., Tham, K. and Molloy,J. (1999) Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing. J. Virol. Methods. 77:109-14.
13. Licursi, M., Inoshima, Y., Wu, D., Yokoyama, T., Gonzalez, E. and Sentsui,H. (2002) Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. Virus. Res. 86:101-10.
14. Murphy, A. Gibbs, J. Horzinek, C. and Studdert, J. (1999) Veterinary viorology. Academic Press, California, USA. pp. 363-373, 383-384.
15. Ott, S., Johnson, R. and Wells, S. (2003) Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. Prev.Vet. Med. 61:249-62.
16. Tadjbakhsh, H.(1995) Essential immunology. 6thEd., Tehran University Publication, Tehran-Iran. pp.580-594.
17. Tajima, S., Takahashi, M., Takeshima, S., Konnai, S., Yin, S.A., Watarai, S., Tanaka, Y., Onuma, M., Okada, K. and Aida, Y. (2003) A mutant form of the tax protein of bovine leukemia virus (BLV), with enhanced transactivation activity, increases expression and propagation of BLV in vitro but not in vivo. J. Virol. 77:1894-903.
18. Tajima, S., Aida, Y. (2002) Mutant tax protein from bovine leukemia virus with enhanced ability to activate the expression of c-fos. J. Virol. 76:2557-62.
19. Tang, C., Loeliger, E., Kinde, I., Kyere, S., Mayo, K., Barklis, E., Sun, Y., Huang, M. and Summers F.(2003) Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein, J. Mol. Biol. 327:1013-20.
20. Tritch, R., Cheng, Y., Yin, F. and Erickson-Viitanen, S. (1991) Mutagenesis of protease cleavage sites in the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein. J. Virol. 65:922-30.
21. Willems, L., Kerkhofs, P., Attenelle, L., Burny, A., Portetelle, D., and Kettmann, R. (1997) The major homology region of bovine leukaemia virus p24gag is required for virus infectivity in vivo. J.Gen.Virol. 78:637-40.

J.Vet.Res. 62,5:285-289,2007

DETECTING THE P24 ANTIGEN IN LYMPH NODES OF BLV INFECTED CATTLE

Niknbakht Brujeni, GH.[1]*, Hemmatzadeh, F.[1], Emam, M.[2], Ghaffari, M.[1]

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

(Received 8 March 2005 , Accepted 18 September 2006)

Abstract:

In this study 19 BLV infected and 2 healthy lymph nodes were analysed by Western blotting to detect viral p24 antigen. Western blotting was carried out by Rabbit anti p24 serum and p24 monoclonal antibody. Rabbit serum in western blotting could detect 45, 50, 54, 58 and less than 19 kD bands of proteins and monoclonal antibody could detect 30, 32, 39, 45, 50 and 53 kD bands. Our results indicate polymorphism of proteins with p24 epitope in different BLV infected samples. Otherwise, it could be concluded that BLV structural proteins sharing p24 epitopes have high degree of phenotypic diversity.

Key words: BLV, Lymph nodes, p24, Western blotting.

***Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir, Tel: 021- 61117057, Fax: 021-66933222**