تعيين توالي ژن VP28 يک جدايه ويروس لکه‌سفيد از ميگوي سفيد غربي (*Litopenaeus vannamei*) در استان خوزستان- ايران

- **حسين هوشمند*:** گروه علوم درمانگاهي، دانشكده دامپزشكي، دانشگاه شهيدچمران، اهواز، صندوق پستی: 61355-145
- **رحيم پيغان:** گروه علوم درمانگاهي، دانشكده دامپزشكي، دانشگاه شهيدچمران، اهواز، صندوق پستی: 61355-145
- **مسعودرضا صيفي‌آبادشاپوري:** گروه پاتوبيولوژي، دانشكده دامپزشكي، دانشگاه شهيدچمران، اهواز، صندوق پستی: 61355-145
- **جاسم غفله‌مرمضي:** پژوهشكده آبزي‌پروري جنوب كشور، اهواز، صندوق پستی: 866-61645
- **محمد افشارنسب:** موسسه تحقيقات علوم شيلاتی كشور، تهران، صندوق پستی: 149- 14965

تاريخ دريافت: اسفند 1392 تاريخ پذيرش: خرداد 1393

چكيده

بيماری لكه سفيد يكي از خطرناك ترين بيماري‌هاي ويروسي است كه سبب تلفات زيادي در ميگوهاي پرورشي در سطح جهان مي‌شود. اين بيماري در ايران نيز خسارت جدي به پرورش‌دهندگان ميگو وارد نموده است. در اين تحقيق طی بازديد از مزارع پرورش ميگوی استان خوزستان در منطقه چوئبده آبادان از ميگوهای مبتلا به بيماری لكه سفيد كه دارای علائم باليني بودند نمونه‌برداري انجام شد. نمونه‌ای كه دارای بالاترين حدت از بيماري لكه سفيد بود به‌عنوان الگو در آزمايشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت و اين جدايه IRI-KHZ/904 نام‌گذاري شد. به‌وسيله پرايمرهاي طراحي شده، ژن VP28 از ژنوم ويروس تكثير گرديد و توالي آن در بانك ژن با شماره دسترسي AB855742 ثبت گرديد. نتايج نشان داد كه توالي نوكلئوتيدي ژن VP28 در جدايه ايراني، با توالی جدايه‌هاي بسياري از كشورهاي مختلف جهان داراي همساني 100 درصد بود و با 4 جدايه از كشورهای چين، كره جنوبي و هند 99 درصد همساني داشت.

كلمات كليدی: تعيين توالي، ژن VP28، ويروس لكه سفيد، ميگوي سفيد غربي، استان خوزستان

مقدمه

بيماری لكه‌سفيد يكي از خطرناك‌ترين بيماري‌هاي ويروسي است كه ميگوهاي پرورشي را در سطح جهان تحت تأثير قرار مي‌دهد (Flegel، 2007؛ Marks و همكاران، 2004). اين ويروس كشنده سبب تشكيل نقاط سفيدرنگي در اسكلت خارجي زير كاراپاس مي‌شود كه نه تنها ميگوهاي پنائيده بلكه ديگر سخت‌پوستان آب شيرين و دريايي را نيز آلوده مي‌كند (Lo و همكاران، 1996). اين ويروس يك ويروس غشاءدار بزرگ است كه در سال 1997 ژنوم ويروس با موفقيت از ميگوي ژاپني (*P. japonicus*) استخراج (Yang و همكاران، 2001) و كتابخانه ژنومی آن ساخته شد. تعيين توالي سه جدايه متفاوت ويروس مشخص كرد كه ژنوم ويروس از نوع DNA دو رشته‌اي با اندازه‌اي حدود 300 Kbp مي‌باشد (Marks و همكاران، 2004؛ Van Hulten و همكاران، b 2001؛ Yang و همكاران، 2001). براساس اطلاعات ژنتيكي منحصر به‌فرد و مورفولوژي، ويروس در يك جنس جديد از DNA ويروس‌ها به‌نام ويسپوويروس (*Whispovirus*) قرار مي‌گيرد كه متعلق به خانواده نيماويريده (Nimaviridae) است (Van Hulten و همكاران، a 2001). ويروس بيماري لكه‌سفيد داراي 5 پروتئين اصلی ساختاري است كه پروتئين‌های VP28 و VP19 در غشاء ويروس و VP15، VP24 و VP26 در نوكلئوكپسيد قرار دارند. VP28 با وزن مولكولي تقريبي 22 كيلودالتون فراوان‌ترين پروتئين ساختاري موجود در غشاء مي‌باشد (Braunig و همكاران، 2011؛ Tang و همكاران، 2007) كه هيچ‌گونه شباهتي را به‌ساير پروتئين‌هاي شناخته شده به‌جز با برخي از پروتئين‌هاي ساختاري ويروس لكه سفيد نشان نمي‌دهد (Robalino و همكاران، 2006). به‌نظر مي‌رسد اين پروتئين موجب اتصال ويروس به سلول‌هاي ميگو شده و نقش مهمي را نيز در نفوذ ويروس به‌درون

* پست الكترونيكی نويسنده مسئول: Houshmand_h@yahoo.com

سلول میزبان ایفا مي‌کند. همچنین مشخص شده است که آنتي‌بادي‌هاي تولید شده برضد این پروتئین مي‌توانند ویروس را خنثي کرده و عفونت ویروسي را مهار نمایند (Yi و همکاران، 2004). پروتئین VP28 و ژن کدکننده آن به‌منظور تشخیص و کنترل بیماري لکه‌سفید مورد توجه قرارگرفته‌اند (Mavichak و همکاران، 2011)، تحقیقات نشان داده است که با تهیه پروتئین VP28 نوترکیب می‌توان از آن برای تولید آنتي‌بادي‌هاي مونو و پلي کلونال بهره برد. این آنتي‌بادي‌ها در آزمایشات تشخیص ایمونولوژیك مانند کیت‌هاي ایمونوکروماتوگرافي کاربرد دارند (Wang و Zhan، 2006). هدف از مطالعه حاضر تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن کدکننده پروتئین VP28 در یک جدایه ایرانی ویروس بیماری لکه‌سفید میگو و مقایسه آن با توالی مربوطه در جدایه‌های نقاط دیگر جهان و حصول اطمینان از حفاظت توالی ژن VP28 در جدایه ایرانی به‌عنوان مقدمه‌ای برای مطالعات آتی در زمینه طراحی روش‌های تشخیص یا ساخت واکسن بوده است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور نمونه‌گیری و استخراج DNA ویروس، میگوهای مبتلا به بیماری لکه‌سفید که دارای علائم بالینی بودند از مزارع پرورش میگوی استان خوزستان در منطقه چوئبده آبادان (خرداد تا مهرماه 1390) به‌عنوان نمونه انتخاب شدند. جهت استخراج DNA، مقداری از هر نمونه (آبشش و پای شنا) درون یک میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتری قرار داده شد. استخراج DNA با استفاده از محلول‌های DTAB و CTAB (شرکت Genereach، تایوان) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. DNA استخراج شده در آب دوبار تقطیراستریل حل گردید و تا زمان آزمایش در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس از آزمایش نمونه‌ها با استفاده ازکیت تشخیص مولکولی بیماری لکه-سفید (Iq2000 شرکت Genereach، تایوان) نمونه‌ای که دارای بالاترین حدت[1] بود به‌عنوان الگو در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. این جدایه IRI-KHZ/904 نام‌گذاري گردید. پرایمرهای اختصاصی ژن کدکننده پروتئین VP28 بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط Witteveldt(2006)، انتخاب گردیدند. با این تفاوت که در انتهای '5 این پرایمرها مکان برش آنزیم‌های محدودگر SalI و HindIII نیز قرارداده شد تا امکان کلونینگ محصول PCR و بیان پروتئین VP28 در مطالعات آینده فراهم گردد.

تکثیر ژن VP_{28} به‌وسیله PCR در حجم نهایی 50 میکرولیتر شامل 2 میکرولیتر ژنوم الگو، 0/4میکرولیتر آنزیم Pfu (2/5 واحد در میکرولیتر)، 5 میکرولیتر بافر آنزیم Pfu، 1 میکرولیتر dNTP 10 میلی‌مولار، 1/5 میکرولیترکلرید منیزیوم 50 میلی‌مولار، 1 میکرولیتر (20 پیکومول) از هر پرایمر و 38/1میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل انجام شد.

واکنش PCR با برنامه دمایی دناتوره شدن ابتدایی در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 2 دقیقه و به‌دنبال آن 35 سیکل حرارتی 94 درجه به‌مدت 45 ثانیه، 48درجه به-مدت 1 دقیقه و 72 درجه به‌مدت 2 دقیقه بود. در پایان یک مرحله دمایی 72 درجه نیز به‌مدت 7 دقیقه اجرا گردید. محصول PCR در ژل آگارز 1/5% حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران)، در کنار یک مارکر 100 bp (Fermentas، لیتواني) الکتروفورز شد و با دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده گردید.

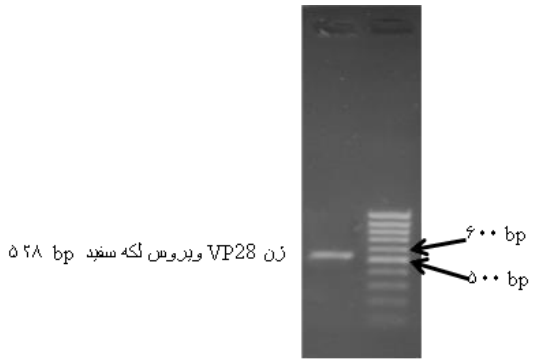
محصول PCR با استفاده از یک کیت تجاری استخراج DNA از ژل (Bioneer، کره جنوبی) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص گردید. به‌منظور تعیین توالي ژن VP28 محصول تخلیص شده به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. توالي مشخص شده پس از بررسی اولیه با برنامه Blast در بانك ژن ثبت گردید. هم-چنین با استفاده از برنامه Bioedit این توالي با تعداد 14توالي دیگر ژن VP28 ثبت شده در بانك ژن از مناطق جغرافیایي مختلف مورد مقایسه قرارگرفت.

نتایج

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای توصیف شده منجر به تکثیر محصولي به اندازه 528 bp شد (شکل 1). توالی به‌دست آمده با شماره دسترسي AB855742 در بانک ژن ثبت گردید. نتایج نشان داد که جدایه ایرانی با 10 جدایه از کشورهاي کره جنوبي، چین، هند، ژاپن، آمریکا، اندونزي، تایوان، تایلند، ویتنام و برزیل 100 درصد همساني داشت.

همچنین در مقایسه با 4 توالي دیگر از کشورهاي کره جنوبي، هند و چین داراي همساني99 درصد بود. همترازی توالی‌ها درشکل 2 نشان داده شده است.

[1] . براساس دستورالعمل کیت Iq2000 سطح آلودگي در نمونه مورد آزمایش به 4 سطح Very light،Light، Moderate و Severe تقسیم‌بندي مي‌شود. جدایه مورد بررسي در این پژوهش از مزرعه پرورش میگو داراي تلفات، نمونه‌گیري شده و در بررسي با کیت Iq2000 داراي آلودگي شدید (Severe) بود.

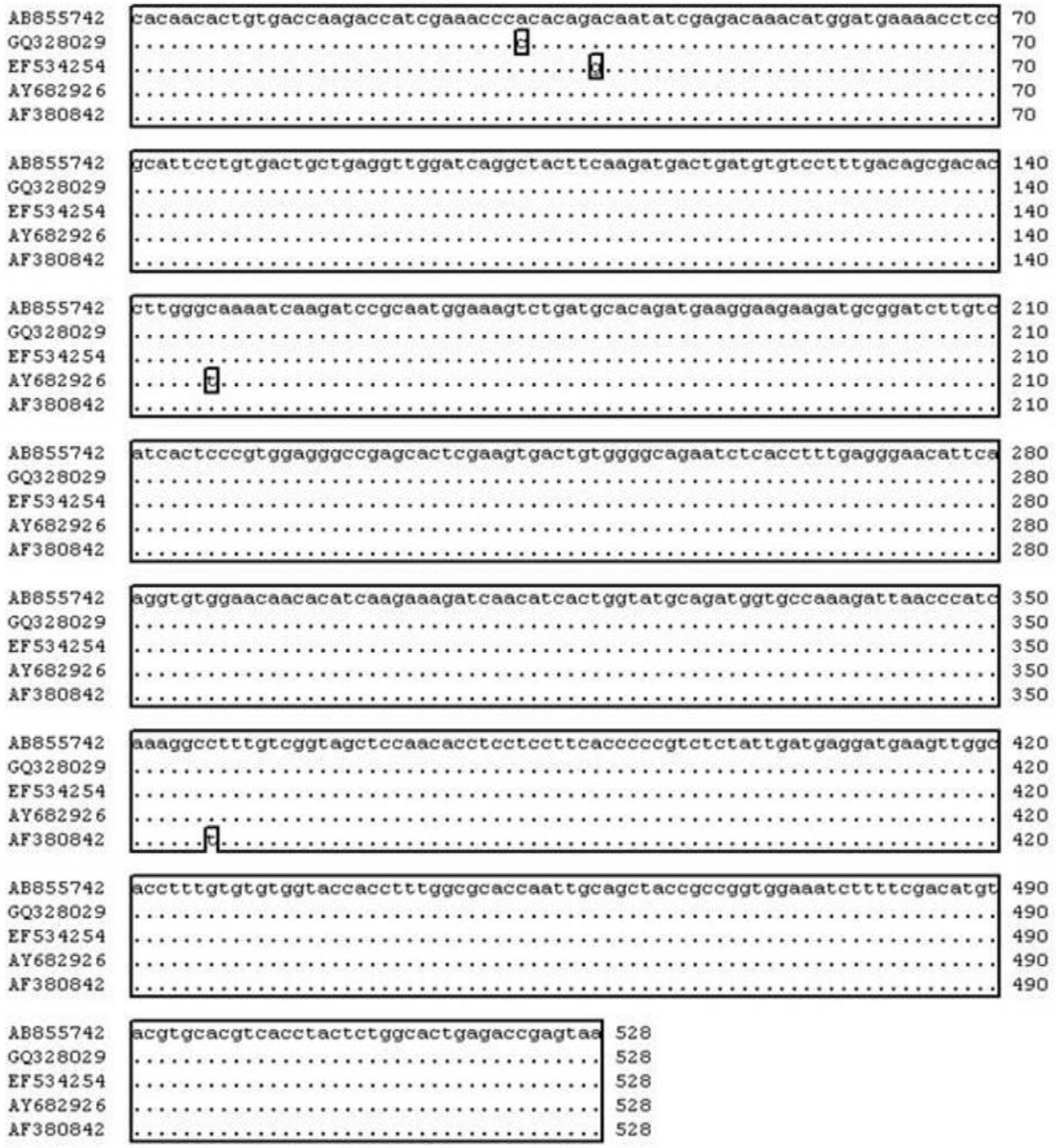


شکل 1: الکتروفورز محصول PCR ژن VP28 ویروس لکه سفید جدایه IRI-KHZ/904

بحث

مطالعه ژن‌هاي ساختاري و پروتئین‌های ویروس لکه-سفید و عملکرد آن‌ها به‌منظور طراحی و توسعه تکنیك‌هاي تشخیصي و تدوین استراتژي‌هاي جدید کنترل بیماري رو به فزوني است. ویروس بیماري لکه‌سفید شامل 5 پروتئین عمده ساختاري (VP15, VP19, VP24,VP26, VP28) است که از میان آن‌ها VP28 با وزن مولکولي تقریبي 22 کیلودالتون فراوان‌ترین پروتئین ساختاري موجود در غشاء مي‌باشد (Tang و همکاران، 2007). VP28 نقش کلیدي در عفونت عمومي در آلودگي میگو به‌بیماري لکه‌سفید ایفا مي-کند (Van Hulten و همکاران، 2001 a). در خصوص سخت‌پوستان از جمله میگو، عموماً اعتقاد بر این بوده است که این موجودات داراي ایمني اکتسابي نیستند و در نتیجه راهکار واکسیناسیون نمی‌تواند برای کنترل بیماری‌های این حیوانات موثر باشد. اخیراً این نکته مورد ابهام قرار گرفته است و محققین نشان داده‌اند که با استفاده از پروتئین‌هاي غشایی ویروس بیماری لکه‌سفید مي‌توان پاسخ ایمني و محافظت مناسبي را در برابر بیماري لکه‌سفید در میگوها ایجاد نمود (Dehghan و همکاران، 2011). واکسیناسیون مؤثر میگوهای مونودون و ژاپونیکوس با استفاده از ویبریوی غیرفعال شده نیز توسط بسیاری از محققین گزارش شده است (Witteveldt و همکاران، 2004).

حضور فعالیت خنثی‌سازی ویروس در پلاسمای میگوهای آلوده به ویروس از 20 روز تا 2 ماه پس از عفونت مشاهده گردیده است. این نتایج سبب شده است که محققین به این فرضیه که القاء پاسخ ضدویروس و شاید واکسیناسیون برعلیه



شکل 2: همترازی توالی ژن VP28 جدایه ایرانی با چهار توالی دیگر که با ویروس ایرانی دارای شباهت 99 درصدی بودند. نوکلئوتیدهای متفاوت در باکس های کوچک مشخص شده اند.

ویروس روش مناسبی باشد بیش‌تر توجه کنند (Witteveldt و همکاران، 2004). برهمین اساس و با توجه به اهمیت این ویروس برای صنعت پرورش میگو تاکنون تحقیقات متعددی در جهت ساخت واکسن بر ضد این ویروس انجام شده است. در این تحقیقات آنتی‌ژن‌های سطحی VP19 و VP28 که در واکنش اولیه ویروس با سلول‌های میزبان نقش دارند (Yi و همکاران، 2004) موردتوجه قرارگرفته و به‌ویژه پروتئین VP28 به‌عنوان کاندید ساخت واکسن نوترکیب مطرح شده است. از سوی دیگر تفاوت‌های ژنتیکي در میان جدایه‌های ویروسی اهمیت بالايي در تشخیص و مطالعات همه‌گیرشناسي دارد (Mavichak و همکاران، 2011). وقوع جهش‌های نقطه‌ای در توالی ژن-ها مي‌تواند از اتصال پرایمرها به توالي هدف در مراحل PCR جلوگیري نماید (Kwok و همکاران، 1990).

این رویداد با ایجاد نتایج منفي كاذب و یا تولید محصولاتي غیراختصاصي در PCR سبب محدودیت در استفاده از PCR در كیت‌هاي تشخیصي در بعضي از سویه‌هاي ویروس‌ها مي‌شود. در مطالعه حاضر پس از تعیین توالي نوكلئوتیدي ژن VP28 جدایه ایراني و مقایسه آن با توالی مربوطه در جدایه‌هاي بسیاري از كشورهاي مختلف جهان مشخص گردید كه جدایه ایرانی داراي همساني 100 درصد با 10 جدایه از جدیدترین توالي‌هاي ثبت شده در بانك ژن بود. بین توالي جدایه ایراني با 4 جدایه دیگر ثبت شده در بانك ژن نیز 99 درصد همساني وجود داشت.

چهار جدایه ویروس كه میزان شباهت ژن VP28 آن-ها با جدایه ایرانی 99 درصد بود متعلق به كشورهای هندوستان (جدایه EF534254)، چین (AY682926) و كره جنوبی (جدایه های GQ328029 و AF380842) بودند. توالي ایراني با توالي ژن VP28 این جدایه‌ها به‌ترتیب در موقعیت‌های 38 (باز G به‌جاي A) با توالی جدایه هند، 147 (باز T به‌جاي C) با توالی جدایه چین، 32 (باز C به‌جاي T) با توالی جدایه GQ328029 كره جنوبی و 357(باز T به‌جاي C) با توالي جدایه دیگر كره جنوبی (AF380842) اختلاف داشت. در دو مورد از این جهش‌ها (AF380842 و AY682926) تغییر نوكلئوتیدی منجر به تغییر اسیدآمینه‌ای نشده بودند ولي در جدایه GQ328029 اسیدآمینه هیستیدین به‌جاي پرولین و در جدایه EF534254 اسیدآمینه آسپارتات به‌جاي گلیسین قرار گرفته بودند. توالی-های مورد مقایسه در این مطالعه متعلق به جدایه‌هایی از كشورهای آسیایی و نیز جدایه‌هایی از قاره آمریكا بودند. شباهت بسیار بالای ژن VP28 در میان این جدایه‌ها نشان می‌دهد كه احتمال وقوع موتاسیون در این قسمت از ژنوم ویروس بسیار پایین مي‌باشد. میزان بالای حفاظت ژن VP28 در جدایه‌های مختلف این ویروس توسط Kasornchandra و همكاران (1998) نیز مورد تایید قرار گرفته است.

به‌طوركلی براساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه و سایر تحقیقات در این زمینه به‌نظر مي‌رسد ژن VP28 ویروس لكه‌سفید به‌دلیل میزان حفاظت بسیار بالا كاندید مناسبي برای بررسی‌های اپیدمیولوژی نمی‌باشد اما در مقابل
می‌توان از این ژن و پروتئین حاصل از آن براي توسعه روش‌هاي تشخیص بیماري لكه‌سفید بر پایه PCR یا آنتي‌بادي و نیز تولید واكسن‌هاي نوتركیب به‌منظور تحریك سیستم ایمني میگوها استفاده نمود.

تشكر وقدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه دكتری دانشگاه شهید چمران اهواز صورت گرفته است. از اعطای منابع مالی مربوطه توسط دانشگاه شهید چمران تشكر و قدردانی می-گردد.
هم‌چنین ازمؤسسه تحقیقات علوم شیلاتي كشور كه در انجام این تحقیق همكاری زیادی نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. **Braunig, P.; Diego da Rosa, R.; Heidrich, S.C.; Borsa, M.; Hermes, S.P.; Grisard, E.C. and Pinto, A.R., 2011.** Molecular cloning and recombinant expression of the VP28 carboxyl-terminal hydrophilic region from a Brazilian white spot syndrome virus isolate. Brazilian Archives of Biology and Technology. vol.54, No.2, pp: 399-404.
2. **Dehghan, M.; Jafariyan, H.; Habibi Rezai, M.; Amoozagar, M.A. and Sahandi, J., 2011.** Potential of Brine Shrimp (*Artemia urmiana*) Enrichment with Two Species of Bacillus and Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). World Journal of Fish and Marine Sciences. Vol. 3, No.6, pp: 523-528.
3. **Flegel, T.W., 2007.** Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. Dev.andcomp.immun. Vol. 31, pp: 217-231.
4. **Kasornchandra, J.; Boonyaratpalin, S. and Itami, T., 1998.** Detection of white spot syndrome in cultured peaneid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. Aquaculture. Vol. 164, pp: 243-251.
5. **Kwok, S.; Kellogg, D.E.; Mikinney, N.; Spasic, D.; Goda, L.; Levenson, C. and Sninsky, J.J., 1990.** Effects of primers template mismatches on the Polymerase chain reaction. Human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nuc. Acids Res. Vol. 18, pp: 199-1005.
6. **Lightner, D.V., 2003.** The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV .History in the Americas and current status. 32nd Aquaculture Panel Meeting. California. USA, 120 p.
7. **Lo, C.F.; Ho, C.H.; Peng, S.E.; Chen, C.H.; Hsu, H.C.; Chiu, Y.L.; Chang, C.F.; Liu, K.F.; Su, M.S.; Wang, C.H. and Kou, G.H.,1996.** White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis. of Aqua. Org. Vol. 27, pp: 215-225.
8. **Marks, H.; Goldbach, R.W.; Vlak, J.M. and van Hulten, M.C.W., 2004.** Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. Arch. of Virol. Vol. 149, pp: 673–697.
9. **Mavichak, R.; Kondo, H.; Hirono, I. and Aoki, T., 2011.** The utilization of VP28 gene

to protect penaeid shrimps from white spot syndrome virus disease: a review. Dis. in Asian Aqua. VII. Fish Health Section. pp: 157-170.

10. **Morse, S.S., 1994.** Towards an evolutionary biology of viruses. Raven Press, New York. pp: 1-28.
11. **Robalino, J.; Payne, C.; Parnell, P.; Shepard, E.; Grimes, A.C.; Metz, A.; Prior, S.; Witteveldt, J.; Vlak, J.M.; Gross, P.S.; Warr, G. and Browdy, C.L., 2006.** Inactivation of white spot syndrome virus (WSSV) by normal rabbit serum: implications for the role of the envelope protein VP28 in WSSV infection of shrimp. Virus Res. Vol. 118, pp: 55-61.
12. **Tang, X.; Wu, J.; Sivaraman, J. and Hew, C.L., 2007.** Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. Journal of Virol. Vol. 81, pp: 6709-6717.
13. **Van Hulten, M.C.; Witteveldt, J.; Snippe, M. and Vlak, J.M., 2001a.** White spot syndrome virus envelope protein VP 28 is involved in the systemic infection of shrimp. Virol. Vol. 285, pp: 228-233.
14. **Van Hulten, M.C.W.; Witteveldt, J.; Peters, S.; Kloosterboer, N.; Tarchini, R.; Fiers, M.; Sandbrink, H.; Lankhorst, R.K. and Vlak, J.M.,2001b.** The white spot syndrome virus DNA genome sequence.Virol. Vol. 286, pp: 7-22.
15. **Wang, X. and Zhan, W., 2006.** Development of an immuno chromatographic test to detect White Spot Syndrome Virus of shrimp. Aquac. Vol. 225, pp: 196-200.
16. **Witteveldt, J., 2006.** On the vaccination of shrimp against white spot syndrome virus. Thesis Wageningen University. 178 p.
17. **Witteveldt, J.; Vlak, J.M. and van Hulten, M.C.W., 2004.** Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. Fish & Shell. Immun. Vol. 16, pp: 571-579.
18. **Yang, F.; He, J.; Lin, X.; Li, X.; Pan, D.; Zhang, X. and Xu, X., 2001.** Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. Journal of Virol. Vol. 75, pp: 11811 – 11820.
19. **Yang, F.; Wang, W.; Chen, R.Z. and Xu, X., 1997.** A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA. Journal of Virol. Meth. Vol. 67, pp: 1– 4.
20. **Yi, G.; Wang, Z.; Qi, Y.; Yao, L.; Qian, J. and Hu, L., 2004.** VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in attachment and penetration into shrimp cells**.** Journal of Bio.and Mol. Bio.Vol. 37, pp: 726-734.