تعیین توالی ژن VP28 یک جدایه ویروس لکه سفید از میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در استان خوزستان– ایران

- **حسین هوشمند***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران، اهواز، صندوق پستی: ۱٤٥-٦۱۳٥٥
- **رحیم پیغان**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران، اهواز، صندوق پستی: ۱٤٥-٦۱۳٥٥
- **مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران، اهواز، صندوق پستی: ۱٤٥-٦۱۳٥٥
- **جاسم غفله مرمضی**: پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، اهواز، صندوق پستی: ۸٦٦-٦۱٦٤٥
- **محمد افشارنسب**: موسسه‌تحقیقات‌علوم‌شیلاتی‌کشور، تهران، صندوق پستی: ۱٤۹- ۱٤۹٦٥

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۳

چکیده

بیماری لکه سفید یکی از خطرناک ترین بیماری‌های ویروسی است که سبب تلفات زیادی در میگوهای پرورشی در سطح جهان می‌شود. این بیماری در ایران نیز خسارت جدی به پرورش‌دهندگان میگو وارد نموده است. در این تحقیق طی بازدید از مزارع پرورش میگوی استان خوزستان در منطقه چوئبده آبادان از میگوهای مبتلا به بیماری لکه سفید که دارای علائم بالینی بودند نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ای که دارای بالاترین حدت از بیماری لکه سفید بود به‌عنوان الگو در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت و این جدایه IRI-KHZ/904 نام‌گذاری شد. به‌وسیله پرایمرهای طراحی شده، ژن VP28 از ژنوم ویروس تکثیر گردید و توالی آن در بانک ژن با شماره دسترسی AB855742 ثبت گردید. نتایج نشان داد که توالی نوکلئوتیدی ژن VP28 در جدایه ایرانی، با توالی جدایه‌های بسیاری از کشورهای مختلف جهان دارای همسانی ۱۰۰ درصد بود و با ٤ جدایه از کشورهای چین، کره جنوبی و هند ۹۹ درصد همسانی داشت.

کلمات کلیدی: تعیین توالی، ژن VP28، ویروس لکه سفید، میگوی سفید غربی، استان خوزستان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Houshmand_h@yahoo.com

مقدمه

بیماری لکه‌سفید یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های ویروسی است که میگوهای پرورشی را در سطح جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد (Flegel، ۲۰۰۷؛ Marks و همکاران، ۲۰۰۴). این ویروس کشنده سبب تشکیل نقاط سفیدرنگی دراسکلت خارجی زیر کاراپاس می‌شود که نه تنها میگوهای پنائیده بلکه دیگر سخت‌پوستان آب شیرین و دریایی را نیز آلوده می‌کند (Lo و همکاران، ۱۹۹۶). این ویروس یک ویروس غشاءدار بزرگ است که در سال ۱۹۹۷ ژنوم ویروس با موفقیت از میگوی ژاپنی (*P. japonicus*) استخراج (Yang و همکاران، ۲۰۰۱) و کتابخانه ژنومی آن ساخته شد. تعیین توالی سه جدایه متفاوت ویروس مشخص کرد که ژنوم ویروس از نوع DNA دو رشته‌ای با اندازه‌ای حدود ۳۰۰ Kbp می‌باشد (Marks و همکاران، ۲۰۰۴؛ Van Hulten و همکاران، ۲۰۰۱b؛ Yang و همکاران، ۲۰۰۱). براساس اطلاعات ژنتیکی منحصر به‌فرد و مورفولوژی، ویروس دریک جنس جدیداز DNA ویروس‌ها به‌نام ویسپوویروس (*Whispovirus*) قرار می‌گیرد که متعلق به خانواده نیماویریده (Nimaviridae) است (Van Hulten و همکاران، ۲۰۰۱ a). ویروس بیماری لکه‌سفید دارای ۵ پروتئین اصلی ساختاری است که پروتئین‌های VP28 و VP19 در غشاء ویروس و VP15، VP24 و VP26 در نوکلئوکپسید قرار دارند. VP28 با وزن مولکولی تقریبی ۲۲ کیلودالتون فراوان‌ترین پروتئین ساختاری موجود در غشاء می‌باشد (Braunig و همکاران، ۲۰۱۱؛ Tang و همکاران، ۲۰۰۷) که هیچ‌گونه شباهتی را به‌سایر پروتئین‌های شناخته شده به‌جز با برخی از پروتئین‌های ساختاری ویروس لکه‌سفید نشان نمی‌دهد (Robalino و همکاران، ۲۰۰۶). به‌نظر می‌رسد این پروتئین موجب اتصال ویروس به سلول‌های میگو شده و نقش مهمی را نیز در نفوذ ویروس به‌درون سلول میزبان ایفا می‌کند. هم‌چنین مشخص شده است که آنتی‌بادی‌های تولید شده برضد این پروتئین می‌توانند ویروس را خنثی کرده و عفونت ویروسی را مهار نمایند (Yi و همکاران، ۲۰۰۴). پروتئین VP28 و ژن کدکننده آن به‌منظور تشخیص و کنترل بیماری لکه‌سفید مورد توجه قرارگرفته‌اند (Mavichak و همکاران، ۲۰۱۱)، تحقیقات نشان داده است که با تهیه پروتئین VP28 نوترکیب می‌توان از آن برای تولید آنتی‌بادی‌های مونو و پلی کلونال بهره برد. این آنتی‌بادی‌ها در آزمایشات تشخیص ایمونولوژیک مانند کیت‌های ایمونوکروماتوگرافی کاربرد دارند (Wang و Zhan، ۲۰۰۶). 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 ۱۳۹۰) به‌عنوان نمونه انتخاب شدند. جهت استخراج DNA، مقداری از هر نمونه (آبشش و پای شنا) درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. استخراج DNA بااستفاده‌ازمحلول‌های 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 ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس از آزمایش نمونه‌ها با استفاده ازکیت تشخیص مولکولی بیماری لکه‌سفید (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 نام‌گذاری گردید. پرایمرهای اختصاصی ژن کدکننده پروتئین VP28 بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط Witteveldt (۲۰۰۶)، انتخاب گردیدند. با این تفاوت که در انتهای '۵ 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 ۵۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر ژنوم الگو، ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Pfu (۲/۵ واحد در میکرولیتر)، ۵ میکرولیتر بافر آنزیم Pfu، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیترکلرید منیزیوم ۵۰ میلی‌مولار، ۱

[1]. براساس دستورالعمل کیت Iq2000 سطح آلودگی در نمونه مورد آزمایش به ۴ سطح Very light، Light، Moderate و Severe تقسیم‌بندی می‌شود. جدایه مورد بررسی در این پژوهش از مزرعه پرورش میگو دارای تلفات، نمونه‌گیری شده و در بررسی با کیت Iq2000 دارای آلودگی شدید (Severe) بود.

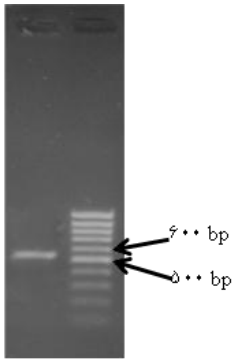
میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر پرایمر و ۳۸/۱میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل انجام شد.

واکنش PCR با برنامه دمایی دناتوره شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و به‌دنبال آن ۳۵ سیکل حرارتی ۹۴ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۴۸درجه به‌مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به‌مدت ۲ دقیقه بود. در پایان یک مرحله دمایی ۷۲ درجه نیز به‌مدت ۷ دقیقه اجرا گردید. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران)، در کنار یک مارکر bp ۱۰۰ (Fermentas، لیتوانی) 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 توالی ژن VP28 محصول تخلیص شده به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. توالی مشخص شده پس از بررسی اولیه با برنامه Blast در بانک ژن ثبت گردید. هم‌چنین با استفاده از برنامه Bioedit این توالی با تعداد ۱۴توالی دیگر ژن VP28 ثبت شده در بانک ژن از مناطق جغرافیایی مختلف مورد مقایسه قرارگرفت.

نتایج

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای توصیف شده منجر به تکثیر محصولی به اندازه bp ۵۲۸ شد (شکل ۱). توالی به‌دست آمده با شماره دسترسی AB855742 در بانک ژن ثبت گردید. نتایج نشان داد که جدایه ایرانی با ۱۰ جدایه از کشورهای کره جنوبی، چین، هند، ژاپن، آمریکا، اندونزی، تایوان، تایلند، ویتنام و برزیل ۱۰۰ درصد همسانی داشت. هم‌چنین در مقایسه با ۴ توالی دیگر از کشورهای کره جنوبی، هند و چین دارای همسانی۹۹ درصد بود. هم‌ترازی توالی‌ها درشکل ۲ نشان داده شده است.



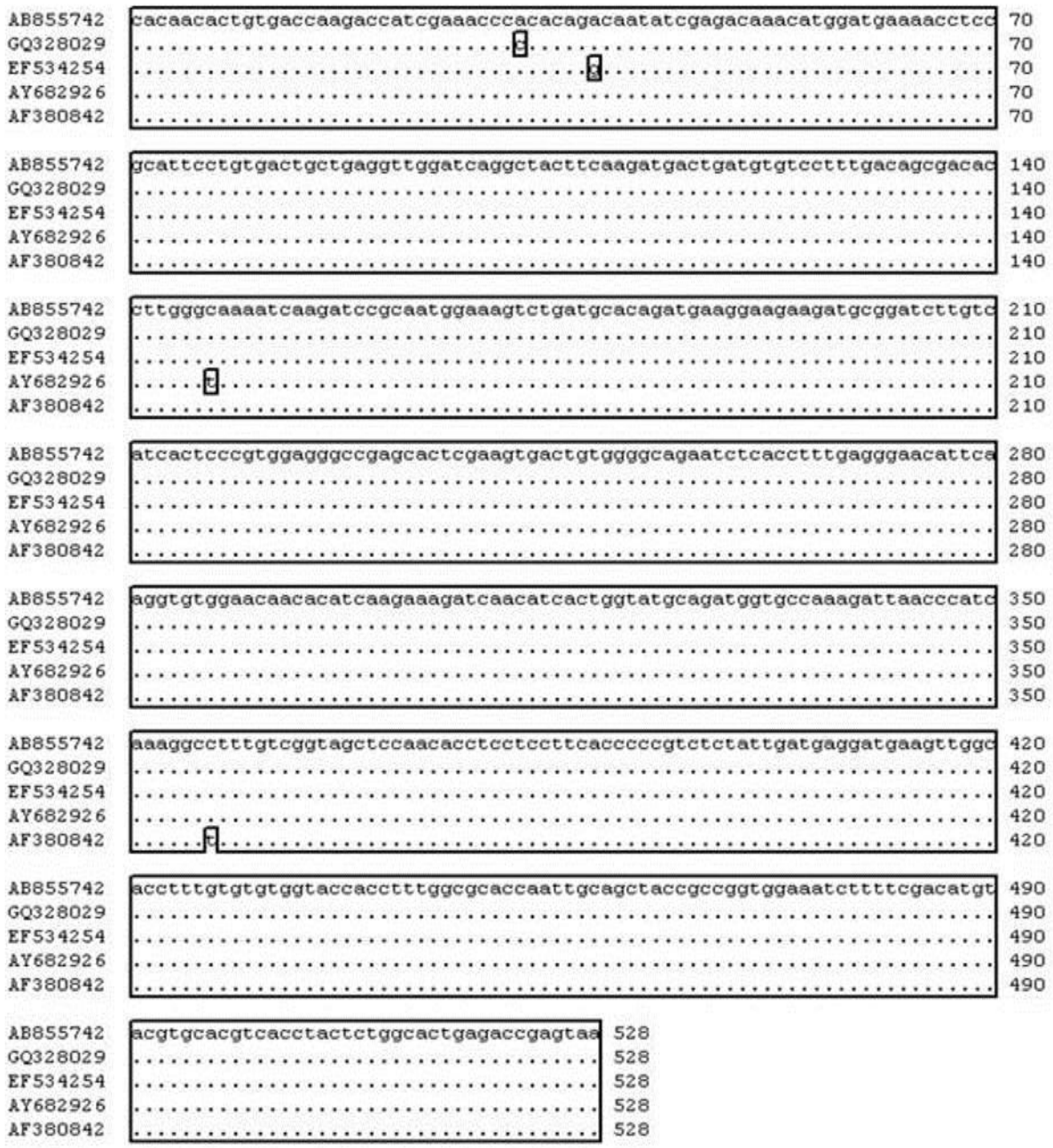
شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن VP28 ویروس لکه سفید جدایه IRI-KHZ/904

بحث

مطالعه ژن‌های ساختاری و پروتئین‌های ویروس لکه‌سفید و عملکرد آن‌ها به‌منظور طراحی و توسعه تکنیک‌های تشخیصی و تدوین استراتژی‌های جدید کنترل بیماری رو به فزونی است. ویروس بیماری لکه‌سفید شامل ۵ پروتئین عمده ساختاری (VP15, VP19, VP24,VP26, VP28)است که از میان آن‌ها VP28با وزن مولکولی تقریبی ۲۲کیلودالتون فراوان‌ترین پروتئین ساختاری موجود در غشاء می‌باشد (Tang و همکاران، ۲۰۰۷). VP28نقش کلیدی در عفونت عمومی در آلودگی میگو به‌بیماری لکه‌سفید ایفا می‌کند (Van Hulten و همکاران، ۲۰۰۱a). در خصوص سخت‌پوستان از جمله میگو، عموماً اعتقاد بر این بوده است که این موجودات دارای ایمنی اکتسابی 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 پروتئین‌های غشایی‌ویروس‌بیماری لکه‌سفید می‌توان پاسخ ایمنی و محافظت مناسبی را در برابر بیماری لکه‌سفید در میگوها ایجاد نمود (Dehghan و همکاران، ۲۰۱۱). واکسیناسیون مؤثر میگوهای مونودون و ژاپونیکوس با استفاده از ویبریوی غیرفعال شده نیز توسط بسیاری از محققین گزارش شده است (Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴).

حضور فعالیت خنثی‌سازی ویروس در پلاسمای میگوهای آلوده به ویروس از ۲۰ روز تا ۲ 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 ۲: همترازی توالی ژن VP28 جدایه ایرانی با چهار توالی دیگر که با ویروس ایرانی دارای شباهت ۹۹ درصدی بودند. نوکلئوتیدهای متفاوت در باکس های کوچک مشخص شده اند.

ویروس روش مناسبی باشد بیش‌تر توجه کنند (Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴). 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، ۲۰۰۴)مورد توجه قرار گرفته و به‌ویژه پروتئین VP28 به‌عنوان کاندید ساخت واکسن نوترکیب مطرح شده است. از

سوی دیگر تفاوت‌های ژنتیکی در میان جدایه‌های ویروسی اهمیت بالایی در تشخیص و مطالعات همه‌گیرشناسی دارد (Mavichak و همکاران، ۲۰۱۱). وقوع جهش‌های نقطه‌ای در توالی ژن‌ها می‌تواند از اتصال پرایمرها به توالی هدف در مراحل PCR جلوگیری نماید (Kwok و همکاران، ۱۹۹۰).

این رویداد باایجاد نتایج منفی کاذب و یا تولید محصولاتی غیراختصاصی در PCR سبب محدودیت در استفاده از PCR در کیت‌های تشخیصی در بعضی از سویه‌های ویروس‌ها می‌شود. در مطالعه حاضر پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن VP28 جدایه ایرانی و مقایسه آن با توالی مربوطه در جدایه‌های بسیاری از کشورهای مختلف جهان مشخص گردید که جدایه ایرانی دارای همسانی ۱۰۰ درصد با ۱۰ جدایه از جدیدترین توالی‌های ثبت شده در بانک ژن بود. بین توالی جدایه ایرانی با ۴ جدایه دیگر ثبت شده در بانک ژن نیز ۹۹ درصد همسانی وجود داشت.

چهار جدایه ویروس که میزان شباهت ژن VP28 آن‌ها با جدایه ایرانی ۹۹ درصد بود متعلق به کشورهای هندوستان (جدایه EF534254)، چین (AY682926) و کره جنوبی (جدایه های GQ328029 و AF380842) بودند. توالی ایرانی با توالی ژن VP28 این جدایه‌ها به‌ترتیب در موقعیت‌های ۳۸ (باز G به‌جای A) با توالی جدایه هند، ۱۴۷ (باز T به‌جای C) با توالی جدایه چین، ۳۲ (باز C به‌جای T) با توالی جدایه GQ328029 کره جنوبی و ۳۵۷(باز T به‌جای C) با توالی جدایه دیگر کره جنوبی (AF380842) اختلاف داشت. در دو مورد از این جهش‌ها (AF380842 و AY682926) تغییر نوکلئوتیدی منجر به تغییر اسیدآمینه‌ای نشده بودند ولی در جدایه GQ328029 اسیدآمینه هیستیدین به‌جای پرولین و در جدایه EF534254 اسیدآمینه آسپارتات به‌جای گلیسین قرار گرفته بودند. توالی‌های مورد مقایسه در این مطالعه متعلق به جدایه‌هایی از کشورهای آسیایی و نیز جدایه‌هایی از قاره آمریکا بودند. شباهت بسیار بالای ژن VP28 در میان این جدایه‌ها نشان می‌دهد که احتمال وقوع موتاسیون در این قسمت از ژنوم ویروس بسیار پایین می‌باشد. میزان بالای حفاظت ژن VP28 در جدایه‌های مختلف این ویروس توسط Kasornchandra و همکاران (۱۹۹۸) نیز مورد تایید قرار گرفته است.

به‌طورکلی براساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه و سایر تحقیقات در این زمینه به‌نظر می‌رسد ژن VP28 ویروس لکه‌سفید به‌دلیل میزان حفاظت بسیار بالا کاندید مناسبی برای بررسی‌های اپیدمیولوژی نمی‌باشد اما در مقابل می‌توان از این ژن و پروتئین حاصل از آن برای توسعه روش‌های تشخیص بیماری لکه‌سفید بر پایه PCR یا آنتی‌بادی و نیز تولید واکسن‌های نوترکیب به‌منظور تحریک سیستم ایمنی میگوها استفاده نمود.

تشکر وقدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه دکتری دانشگاه شهید چمران اهواز صورت گرفته است. از اعطای منابع مالی مربوطه توسط دانشگاه شهید چمران تشکر و قدردانی می‌گردد. هم‌چنین ازمؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور که در انجام این تحقیق همکاری 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.