بررسی اثر محافظت کنندگی پروتئین‌های نوترکیب VP28 و VP19 یک جدایه ویروس لکه سفید به‌روش خوراکی در برابر ویروس بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی

- **حسین هوشمند***: پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
- **مینا آهنگرزاده**: پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
- **سیدرضا سیدمرتضایی**: پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
- **مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
- **مریم داغری**: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
- **جمال اسماعیلی‌فر**: پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۶

چکیده

ویروس بیماری لکه سفید یکی از آسیب‌رسان‌ترین ویروس‌ها در پرورش میگوی جهان و ایران است. پروتئین‌های سطحی این ویروس در مراحل اولیه برخورد با سلول‌های میزبان نقش بسیار مهمی دارند و کاندیدی برای ساخت واکسن‌های زیر واحد یا نوترکیب محسوب می‌شوند. این مطالعه به‌منظور دستیابی به این پروتئین‌ها جهت انجام ایمن‌سازی میگو وانامی طراحی گردید. ژنوم ویروس لکه سفید از میگوهای بیمار و دارای علائم بالینی مزارع پرورش میگوی چوئبده آبادان استخراج گردید. پس از تکثیر و خالص‌سازی، ژن پروتئین‌های VP28وVP19در باکتری TG1 کلون شدند. بیان پروتئین بررسی و پلیت‌های تجاری توسط باکتری حاوی پروتئین نوترکیب غیرفعال‌شده پوشانده شد. پست لاروهای مرحله ۳۰ میگوی سفید غربی با پلت‌های نوترکیب تغذیه شده و در روزهای ۹ و ۲۳ پس از تغذیه، با ویروس لکه سفید چالش شدند. نتایج آزمایش مواجهه اول نشان داد که کم‌ترین درصد تلفات در گروه‌های مختلف مربوط به گروه VP28 برابر ۳۰±۳/۸٤٪ و بالاترین درصد مربوط به گروه TG1 برابر ۷۲/۲۲±۲/۹۳٪ بود. در آزمایش مواجهه دوم کم‌ترین درصد تلفات مربوط به گروه VP28 (۵۰/۰۹٪±۵) و بالاترین درصد مربوط به گروه TG1 (۷۵/۲±۵۵/۲۲٪) بود. با توجه به نتایج تحقیق پروتئین نوترکیب VP28 قابلیت ایجاد محافظت را در برابر ویروس لکه سفید دارد درحالی‌که پروتئین نوترکیب VP19 قابلیت محافظت را نخواهد داشت. هم‌چنین میزان بازماندگی ارتباط مستقیم با مدت زمان در اختیار داشتن پروتئین نوترکیب دارد.

کلمات کلیدی: ویروس لکه سفید، پروتئین نوترکیب VP28 و VP19، میگوی وانامی، خوزستان، ایران

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Houshmand_h@yahoo.com

مقدمه

بیش از ۲۰ نوع ویروس عامل بیماری در میگو شناخته شده است که سبب کاهش تولید می‌شوند(OIE، ۲۰۰۳). ویروس لکه سفید به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ویروس‌ها سبب زیان‌های اقتصادی بزرگی به صنعت پرورش میگو شده است (Lightner، ۱۹۹۶). ویروس لکه سفید عامل مسبب بیماری لکه سفید با انتشار جهانی همراه با تلفات بالا در میگوهای پرورشی است (Inouye و همکاران، ۱۹۹۴). این ویروس باعث تلفات تا ۱۰۰٪ در ۱۰ روز اول بروز بیماری در مزارع پرورش میگو شده و خسارات عظیمی را به صنعت پرورش میگو وارد می‌کند (Lightner، ۱۹۹۶). این ویروس در تمام کشورهای پرورش دهنده میگو گسترش یافته و به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای جدی برای سخت‌پوستان شناخته شده است (Walker و همکاران، ۲۰۰۹). ویروس لکه سفید یک ویروس غشاءدار، فاقد اکولوژن و باسیلی شکل است(Wang و همکاران، ۱۹۹۵).ویریون‌های غشاءدار سالم محدوده‌ای بین ۳۸۰-۲۱۰ نانومتر در طول و ۱۶۷-۷۰ نانومتر پهنا دارند (Flegel و AldaySanz، ۱۹۹۸). یک زائده دم مانند در یک انتهای ویریون ویروس برخی اوقات در میکروگراف‌های الکترونی نگاتیو دیده می‌شود (Durand و همکاران، ۱۹۹۶).

راهبردهای مرسوم کنترل بیماری از قبیل بهبود شرایط محیطی، ذخیره‌سازی پست‌لاروهای عاری از بیماری و افزایش مقاومت به بیماری با استفاده از محرک‌های ایمنی خوراکی در عفونت‌های لکه سفید به‌کار گرفته شده است (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۶؛ Lightner، ۲۰۰۳). با توجه به اهمیت اقتصادی و اجتماعی جهانی پرورش میگو، توسعه اقدامات کنترلی جدید در برابر وقوع بیماری لکه سفید به امری اجتناب‌ناپذیر بدل گشته‌است.واکسیناسیون می‌تواند یکی از راهبردهای بالقوه برای غلبه بر بیماری‌های ویروسی باشد. مفهوم واکسیناسیون میگو به‌شدت توسط مطالعات اخیر که در آن‌ها محافظت در برابر بیماری‌های ویروسی شرح داده شده‌است پشتیبانی می‌شود(Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴a؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۶a). این گزارشات نشان می‌دهد که برخلاف تصور گذشته که بی‌مهرگان به‌طور کامل به سیستم ایمنی ذاتی متکی هستند برخی از جنبه‌های ایمنی خاص مانند توانایی القاءکنندگی (به‌نظر می‌رسد در بعضی از موارد) و پاسخ ایمنی ویژه‌و محافظت در میگوی مونودون می‌تواند با استفاده از پروتئین‌های ویروسی نوترکیب تحریک شود (Loker و همکاران، ۲۰۰۴). با این حال محافظت ایجاد شده به‌وسیله این واکسن‌های نوترکیب کوتاه اثر بوده است، بنابراین بیان طولانی مدت آنتی‌ژن از طریق ایمن‌سازی ژنتیکی می‌تواند راهبرد مفیدی در برابر بیماری‌های ویروسی باشد (Rout و همکاران، ۲۰۰۷). بیش از ۴۰ پروتئین ویروس لکه سفید شناسایی شده است. برخی پروتئین‌های غیرساختاری شاید در ارتباط با تنظیم رونوشت‌برداری(VP9)،تکثیر ویروس(WSV021) و یا تنظیم رونویسی DNA (WSV477) است (Zhu و همکاران، ۲۰۰۷). پروتئین VP28 در اتصال و نفوذ ویروس به سلول‌ها (Yi و همکاران، ۲۰۰۴) و عفونت عمومی دخالت دارد. هم‌چنین VP19نیز ممکن است در عفونت عمومی به تنهایی و یا در ترکیب با VP28 دخالت داشته باشد (Wu و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات نشان داده است که پرایمرهای طراحی شده برای ژن پروتئین‌های VP28 و VP19 و آنتی‌بادی تولیدی بر علیه این پروتئین‌ها در تشخیص جدایه‌های متفاوت این ویروس مناسب بوده است (Musthaq وهمکاران، ۲۰۰۶).

با این پیش‌زمینه، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی پتانسیل‌های ایمنی‌زایی پروتئین‌های VP28 و VP19 غشاء ویروس لکه سفید انجام شده و اثر بخشی آن به‌عنوان یک راه محافظت میگوی سفید غربی در برابر بیماری لکه سفید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA: به‌منظور دستیابی به ویروس لکه سفید میگوهای بیمار و دارای علائم بالینی از سطح مزارع پرورش میگوی چوئبده آبادان (خرداد تا مهرماه ۱۳۹۰) انتخاب گردیدند، پای شنا، نیمی از آبشش‌ها و قسمتی از عضله میگو به‌منظور بررسی آلودگی به ویروس لکه سفید در الکل ۹۶ درجه قرار داده شد و باقی‌مانده بافت میگو پس از تأیید آلودگی، به‌عنوان منبع ویروس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. DNA ویروس براساس دستورالعمل شرکت Iq2000 (®) و با استفاده از محلول‌های DTAB و CTAB (ژن ریچ، تایوان)از نمونه‌های میگو(آبشش و پای‌شنا)استخراج گردید. پرایمرهای اختصاصی ژن‌های کدکننده پروتئین VP28 و VP19 براساس پرایمرهای طراحی شده توسط Witteveldt (۲۰۰۶) انتخاب و به‌منظور انجام کلونینگ در انتهای'۵ این پرایمرها مکان برش آنزیم‌های محدودگر SalI و HindIII نیز قرارداده شد.

آزمایش PCR: تکثیر ژن‌های پروتئین VP28 وVP19 به‌وسیله PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیترژنوم الگو، ۰/۴ میکرولیتر (۲/۵واحد در میکرولیتر) آنزیم Pfu، ۵ میکرولیتر بافر آنزیم Pfu، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار،۱/۵ میکرولیترکلرید منیزیوم ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر پرایمر و ۳۸/۱ میکرولیتر 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, Lithuania) الکتروفورز و با دستگاه ترانس‌لومیناتور مشاهده گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲). محصول PCR با استفاده از کیت استخراج از روی ژل شرکت بایونیر (Gel Purification Kit®AccuPrep) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

کلونینگ و بیان پروتئین: به‌منظور کلونینگ و بیان پروتئین‌های VP28 و VP19 از وکتور بیانی پروکاریوتی pMal-c2X، (New England Biolabs) استفاده شد. به‌منظور تکثیر و ازدیاد pMAL-c2X، این وکتور به‌روش ترانسفورماسیون و با استفاده از شوک حرارتی با کمک کلرید کلسیم به باکتری *E. coli* (TG1) انتقال داده شد و از کیت استخراج پلاسمید شرکت ویوانتیس (مالزی) برای دستیابی به وکتور استفاده شد. با انجام هضم آنزیمی (Hind III و Sal I) و آنزیم لیگاز T4 محصول PCR و پلاسمید به یکدیگر متصل شده و مجدداً به درون باکتری منتقل گردیدند (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲). از دو روش PCR و بررسی بیان پروتئین برای بررسی حضور پلاسمید حاوی ژن‌های پروتئین VP28 و VP19 در این کلونی‌ها، استفاده گردید. برای القاء بیان پروتئین از محلول ۰/۱ مولار IPTG استفاده شد. هم‌زمان به‌عنوان شاهد منفی یک باکتری حاوی پلاسمید pMAL-c2X بدون ژن مورد مطالعه که القاء بیان پروتئین بر روی آن در حضور IPTG، اعمال گردیده بود نیز استفاده شد. این نمونه‌ها در آزمایش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های باکتری قبل از افزودن IPTG و نمونه‌های بعد از IPTG در کنار نشانگر وزنی مولکولی مورد استفاده در این مطالعه (فرمنتاس، آمریکا) که از ۷ باند پروتئینی در محدوده ۱۴/۴KDa تا ۱۱۶KDa تشکیل شده بود در ژل بارگذاری گردید. پس از غربال‌گری، سه کلونی از هر ژن که در آزمایش PCR حاوی ژن بوده و در بررسی بیان نیز پروتئین با وزن مولکولی مورد انتظار را بیان نموده بودند، انتخاب گردیدند. محصول PCR به‌منظور تعیین توالی ژن‌های پروتئین VP28 و VP19 به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. پس از تأیید بیان پروتئین، از کشت باکتری رقت‌های متوالی به نسبت ۱/۱۰ تهیه و تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر از کشت مایع با OD۶۰۰=۱ به‌دست آمد. باکتری‌ها با میزان ۰/۵ میلی‌لیتر فرمالین ۳۷٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه و سپس ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد غیرفعال شدند. پس از غیرفعال نمودن باکتری و اطمینان از عدم رشد باکتری، سوسپانسیون باکتری‌های غیرفعال با استفاده از PBS شستشو گردید. برای تولید غذای حاوی پروتئین مورد نظر هر گرم از پلت‌های تجاری (شرکت هوواش) با ۱۰۸ باکتری غیرفعال شده پوشانده شد. به این صورت که پس از سه بار شستشو، سوسپاسیون باکتری و پلت‌های غذا با هم مخلوط شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ نگه‌داری شد تا باکتری‌ها جذب پلت شوند سپس به‌منظور جلوگیری از هم پاشیدگی پلت‌ها در پایان با اسپری کردن روغن مایع پلت‌های حاوی باکتری بیان‌کننده پروتئین مورد نظر تهیه گردید.

آزمایش ایمن‌سازی و چالش: تعداد ۱۰۲۰ پست لارو میگوی سفید غربی مرحله ۳۰ (PL۳۰) نگه‌داری شده در پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، قبل از انجام تیماربندی از نظر آلودگی به ویروس لکه سفید توسط کیت تشخیص ویروس Iq2000 (ژن ریچ، تایوان) بررسی و به ۶ گروه تقسیم شدند. پست لاروها با تراکم ۲۰ قطعه در هرلیتر آب دریای فیلتر شده با شوری ۲۵ قسمت در هزار با هوادهی مناسب،روزانه و به‌مدت ۷ روز طبق جدول ۱ تغذیه شدند:

جدول ۱: تیمارها و نوع غذای مورد استفاده در هر تیمار

ردیف	تیمار	تعداد	نوع پلت
۱	VP28	۱۸۰	پلت حاوی باکتری دارای پلاسمید نوترکیب VP28
۲	VP19	۱۸۰	پلت حاوی باکتری دارای پلاسمید نوترکیب VP19
۳	VP28+VP19	۱۸۰	پلت حاوی باکتری دارای پلاسمید نوترکیب VP28 +VP19
۴	pMal	۱۸۰	پلت حاوی باکتری دارای پلاسمید غیر نونوترکیب (pMal-c2X)
۵	TG1	۱۸۰	پلت حاوی باکتری بدون پلاسمید (TG1)
۶	کنترل مثبت	۶۰	پلت مخلوط شده با PBS
۷	کنترل منفی	۶۰	پلت مخلوط شده با PBS

برای تعیین میزان ویروس مورد نیاز یک چالش مطلوب با تقریباً ۷۵٪ تلفات، ازهمولنف لابستر آلوده به ویروس لکه سفید (۱۰۵,۴ LD50/ml) رقت‌های مختلف ۱:۱۰ تهیه شد. پست لاروهای مرحله ۳۰ (PL30) در رقت‌های مختلف همولنف آلوده به ویروس به‌مدت ۷

ساعت به‌صورت غوطه‌ور قرار گرفتند(Witteveldt، ۲۰۰۶). پس از این مدت زمان، میگوها از آب حاوی ویروس لکه سفید خارج شده و با آب شستشو و در آکواریوم غیرآلوده جداگانه‌ای نگه‌داری شدند. دو بار در طول شبانه روز تلفات ثبت گردیده و میگوهای تلف شده به‌روش پاتولوژی مورد آزمایش قرار گرفتند. در آخر پایین‌ترین رقتی از همولنف آلوده به ویروس که سبب تلفات حداقل ۷۵ درصدی شده بود در آزمایشات چالش مورد استفاده قرار گرفت.

در پایان روز هفتم پس از تغذیه، پست‌لاروها طبق جدول ۲ تیماربندی شده، در تیمارهای ۱ تا ۶ در آزمایش اول ۲ روز پس از اتمام تغذیه با پلت‌ها و در آزمایش دوم،۲۱ روز پس از اتمام تغذیه با ویروس لکه‌سفید به‌مدت ۷ ساعت مورد چالش قرار گرفتند،در تیمار ۷ پست‌لاروها با ویروس مواجه نشدند. علایم بالینی و تلفات در زمان‌های ۱۲،۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۲، ۴۸، ۵۴، ۶۰، ۷۲، ۹۶و ۱۲۰ ساعت و تا ۱۴ روز پس از چالش بررسی و ثبت گردید.

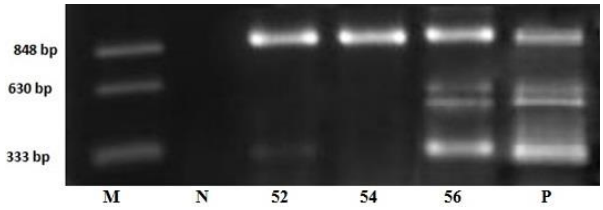
جدول۲: تیماربندی پست لاروهای مورد آزمایش

ردیف	تیمار	آزمایش اول	آزمایش دوم
۱	VP28	۳۰پست لارو(۳ تکرار)	۳۰پست لارو(۳ تکرار)
۲	VP19	۳۰پست لارو(۳ تکرار)	۳۰پست لارو(۳ تکرار)
۳	VP28+VP19	۳۰پست لارو(۳ تکرار)	۳۰پست لارو(۳ تکرار)
۴	Pmal	۳۰پست لارو(۳ تکرار)	۳۰پست لارو(۳ تکرار)
۵	TG1	۳۰پست لارو(۳ تکرار)	۳۰پست لارو(۳ تکرار)
۶	کنترل مثبت	۳۰پست لارو(۳ تکرار)	۳۰پست لارو(۳ تکرار)
۷	کنترل منفی	۳۰ پست لارو	۳۰ پست لارو

تلفات میگوها پس از ثبت به‌منظور تأیید آلودگی به ویروس لکه سفید در محلول تثبیت کننده دیویدسون نگه‌داری شده و در زمان مناسب از بافت‌ها اسلاید تهیه گردید هم‌چنین از برخی میگوها که دارای علائم بالینی مثل بروز لکه سفید بودند نیز گسترش مرطوب از کاراپاس تهیه شد. در پایان آزمایش چالش، میزان بازماندگی نسبی محاسبه شده و توصیف آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSSS ۱۶ صورت گرفت.

نتایج

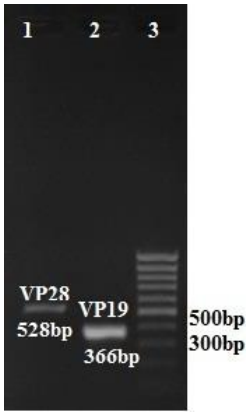
در بررسی آلودگی میگوها، نمونه‌ای که براساس دستورالعمل کیت Iq2000 دارای حدت بالا (Severe) بود به‌عنوان جدایه ایرانی ویروس لکه سفید با نام IRI-KHZ/904 به‌عنوان الگو در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR کیت تشخیص مولکولی Iq2000

M: مارکر(۳۳۳ bp، ۶۳۰ bp، ۸۴۸ bp)، N: نمونه کنترل منفی، ۵۲: نمونه مثبت خیلی خفیف، ۵۴: نمونه میگوی منفی، ۵۶: نمونه مثبت خیلی شدید،P: کنترل مثبت

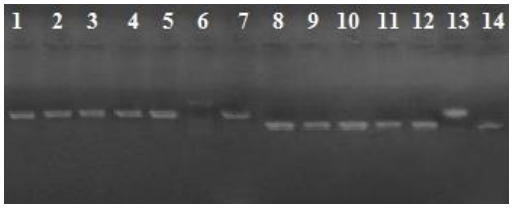
آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای توصیف شده منجر به ساخت محصولی به اندازه ۵۲۸ جفت باز برای VP28 و ۳۶۶ جفت باز برای VP19 شد که با نتایج قابل انتظار هم‌خوانی داشت (شکل ۲).



شکل۲: الکتروفورز محصول PCR ژن‌های سازنده پروتئین VP28و VP19ویروس لکه سفید جدایه IRI-KHZ/904

۱: محصول PCRژن VP28 ۲: محصول PCRژن VP19 ۳: مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاس، لیتوانی)

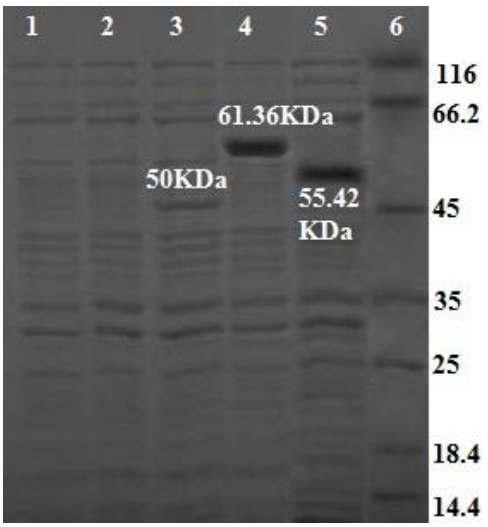
بررسی وجود ژن‌ها در کلونی‌های ترانسفورم شده حاکی از صحت عمل هضم و انتقال ژن‌ها به درون پلاسمید و باکتری بود (شکل ۳).



شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR بر روی پلاسمیدهای نوترکیب موجود در کلونی‌های باکتری TG1

ستون‌های ۵-۱: کلون‌های VP28، ۶: کنترل VP28، ۷: محصول PCR، VP28، ستون‌های ۱۲-۸: کلون‌های VP19، ۱۳: کنترل منفی VP19، ۱۴: محصول PCR، VP19

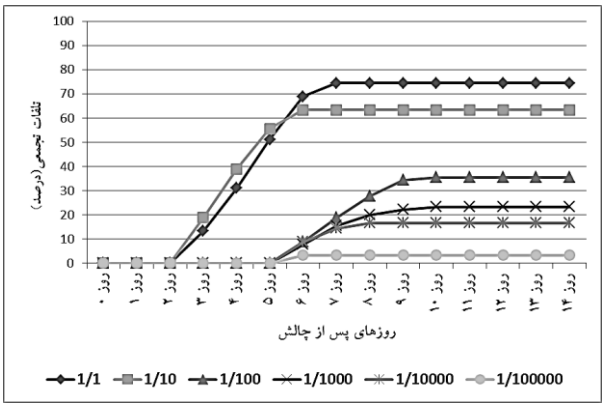
پروتئین‌های بیانی که توسط باکتری‌های بیان‌کننده VP28 و VP19 ساخته شدند با احتساب وزن پروتئین متصل شونده به مالتوز(MBP) (۴۲ کیلودالتون) به‌ترتیب حدود۶۱/۳۶ و ۵۵/۴۲ کیلودالتون‌بودند.



شکل۴: SDS- PAGE القای بیان پروتئین VP28و VP19در باکتری اشریشیاکلی سویهTG1

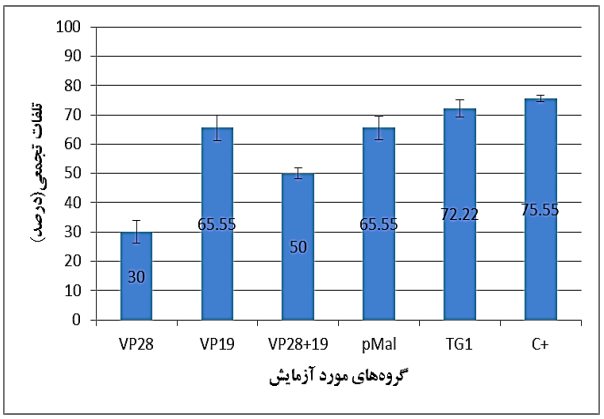
ستون۱: باکتری فاقد پلاسمید، ستون۲: باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب قبل از بیان، ستون ۳: باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب بعد از بیان، ستون ۴: کلون مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب(VP28) بعد از بیان، ستون ۵: کلون مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب(VP19) بعد از بیان، ستون ۶: مارکر پروتئین (فرمنتاس، آمریکا)

در بررسی تعیین توالی پلاسمیدهای حاوی ژن هیچ‌گونه جهش و حذفی مشاهده نشد. برای تعیین میزان ویروس مورد نیاز چالش مشخص گردید که رقت ۱/۱ (همولنف‌رقیق‌نشده) با تلفات ۷۵ درصدی بایستی در آزمایش چالش مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۵).

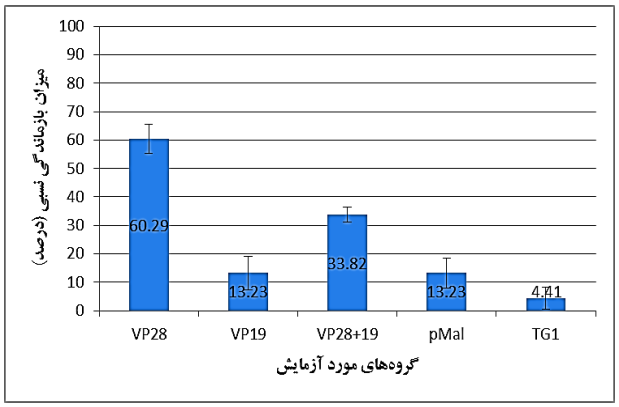


شکل ۵: نمودار مقایسه تلفات تجمعی رقت‌های متفاوت ویروس

در بررسی ایمنی‌زایی، تلفات میگوها از روز دوم پس از مواجهه در گروه‌های مختلف آغاز و به‌مدت ۴ تا ۶ روز در تکرارهای مختلف ادامه یافت. میگوها تا ۱۴ روز پس از مواجهه نگه‌داری شده و تلفات ثبت گردید. در پایان روز ۱۴ پس از مواجهه مشخص گردید که کم‌ترین درصد تلفات در گروه‌های مختلف مربوط به گروه VP28 برابر ۳/۸۴±۳۰٪ و بالاترین درصد تلفات مربوط به گروه TG1 برابر ۲/۹۳±۷۲/۲۲٪ بود هم‌چنین بالاترین و کم‌ترین میزان بازماندگی نسبی به‌ترتیب متعلق به گروه‌های VP28 (۵/۰۹±۶۰/۲۹٪) و TG1 (۲/۹۴±۴/۴۱٪) بود (شکل‌های ۶ و ۷).

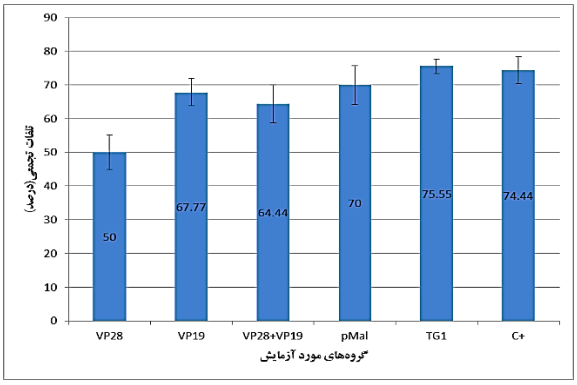


شکل ۶: نمودار مقایسه درصد تلفات تجمعی گروه‌های مورد آزمایش در مواجهه اول

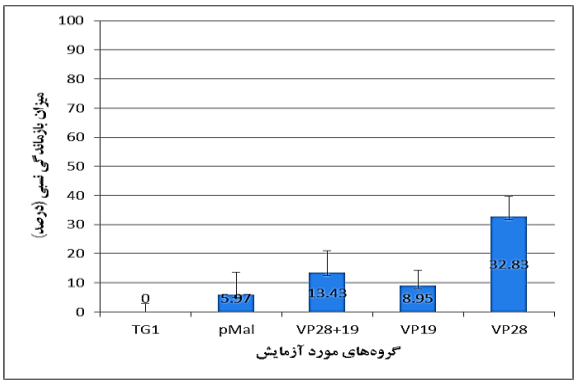


شکل ۷: نمودار مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مورد آزمایش در مواجهه اول

در روز ۲۱ پس از اتمام تغذیه میگوها با پلت‌های نوترکیب نیز تلفات میگوها از روز دوم پس از مواجهه در گروه‌های مختلف آغاز و به‌مدت ۴ تا ۶ روز در تکرارهای مختلف ادامه یافت. در پایان روز ۱۴ پس از مواجهه مشخص گردید که کم‌ترین درصد تلفات در این مرحله در گروه‌های مختلف مربوط به گروه VP28 برابر ۵/۰۹±۵۰٪ و بالاترین درصدمربوط به گروه TG1 برابر ۲/۲۲±۷۵/۵۵٪ بود، هم‌چنین بالاترین و کم‌ترین میزان بازماندگی نسبی به‌ترتیب متعلق به گروه‌های VP28 (۶/۸۳±۳۲/۸۳٪) و TG1 (۲/۹۸±۰/۰۰٪) بود (شکل‌های ۸ و ۹).



شکل ۸: نمودار مقایسه درصد تلفات تجمعی گروه‌های مورد آزمایش در مواجهه دوم



شکل ۹: نمودار مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مورد آزمایش در مواجهه دوم

بحث

در این مطالعه اثر پروتئین‌های ویروسی در ایجاد پاسخ ایمنی منتهی به محافظت در برابر ویروس لکه سفید در میگوهای سفید غربی مورد آزمایش قرار گرفت. در این پژوهش پروتئین‌های نوترکیب VP28 و VP19 در سیستم بیانی پروکاریوتی pMal-c2X و باکتری *اشریشیا کلی* سویه TG1 بیان گردید. در آزمایش مواجهه‌سازی اول گروهی از میگوها که پروتئین نوترکیب VP28 را دریافت کرده بودند بالاترین میزان بازماندگی نسبی را در مقایسه با گروه‌های دیگر نشان دادند. در مواجهه‌سازی دوم باز هم این گروه دارای بالاترین میزان بازماندگی نسبی در میان گروه‌های مورد آزمایش بود ولی این میزان در مقایسه با آزمایش اول کاهش یافته بود. کاهش میزان بازماندگی نسبی در گروه باکتری بدون پلاسمید نیز نشان‌دهنده عدم تحریک سیستم ایمنی میگوها با سلول باکتری استفاده شده در این آزمایش بوده است. از اواخر سال ۲۰۰۷ شواهدی به‌دست آمد که فرضیه دارا بودن نوعی سیستم ایمنی اکتسابی در بی‌مهرگان را تقویت می‌کرد (Dehghan و همکاران، ۲۰۱۱). درخصوص سخت‌پوستان ازجمله 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 مؤثر باشد. اخیراً محققین نشان داده‌اند که با استفاده از پروتئین‌های غشایی ویروس بیماری لکه سفید می‌توان پاسخ ایمنی و محافظت خوبی را در برابر این بیماری در میگوها ایجاد نمود (Dehghan و همکاران، ۲۰۱۱؛ Houshmand، ۲۰۱۴). ایمنی ضدویروس لکه سفید، حضور فعالیت خنثی‌سازی ویروس در پلاسمای میگوهای آلوده به ویروس از ۲۰ روز تا ۲ ماه پس از عفونت رانشان داده است. این نتایج سبب شده است که محققین به فرضیه القاء پاسخ ضدویروس و واکسیناسیون بر علیه آن توجه بیش‌تری داشته باشند (Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴a).

چندین مطالعه، تنظیم ایمنی سلولی و خونی میگوها را در پاسخ به تجویز دیواره سلول‌های باکتری و مخمر و یا کل باکترین نشان داده‌اند که راهبردی شبیه واکسیناسیون در حیوانات عالی‌تر محسوب می‌شود (Alabi و همکاران، ۲۰۱۶؛ Devaraja و همکاران، ۱۹۹۸؛ Kou و همکاران، ۱۹۹۸). در مطالعه دیگری در میگوی ژاپنی نشان داده شد که پلاسمای میگوهای زنده مانده از بیماری لکه سفید قادر به خنثی کردن ویروس از ۲۰ روز تا ۲ ماه پس از عفونت می‌باشند (Wu و همکاران، ۲۰۰۲). به‌طور مشابه، مطالعات هرچند محدود، فعال شدن سیستم ایمنی بدن، شامل پاسخ‌های سلولی و خونی را در عفونت‌های تجربی با ویروس لکه سفید نشان داده‌اند. آزمایشات تجربی با میگوی ژاپنی حضور یک پاسخ شبه ایمنی را در میگوهای بازمانده از بیماری لکه سفید به‌صورت طبیعی یا تجربی که مجدداً با ویروس لکه سفید مورد چالش قرار گرفتند نشان داد که درصد بازماندگی در مقایسه با میگوهای سالم و غیربیمار بسیار بالاتر بود (Rojtinnakorn و همکاران، ۲۰۰۲؛ Roux و همکاران، ۲۰۰۲). در حالت طبیعی میگوها هم از روش خوراکی و هم از طریق آب آلوده به بیماری مبتلا می‌شوند و به‌نظر می‌رسد که آبشش‌ها درگاه ورود ویروس به بدن میگوها باشند. هم‌چنین در آزمایش مواجهه نیز از روش غوطه‌وری استفاده گردید تا حالتی شبیه نحوه آلودگی طبیعی تداعی گردد. اگرچه شواهد حکایت از افزایش میزان بازماندگی میگوها در برابر ویروس لکه سفید دارند اما توانایی حفاظت پروتئین‌های نوترکیب متغیر بوده و به‌نظر می‌رسد وابسته به‌میزان پروتئین دریافتی توسط میگوها باشد (Caipang و همکاران، ۲۰۰۸). یک احتمال که در پژوهش‌های متعدد به آن اشاره‌شده آن‌است که پروتئین‌های نوترکیب سیستم ایمنی میگو را تحریک می‌کنند و یا به اصطلاح شبیه یک واکسن عمل می‌نماید (Bright Singh و همکاران، ۲۰۰۵؛ Caipang و همکاران، ۲۰۰۸؛ Du و همکاران، ۲۰۰۶؛ Jha و همکاران،

۲۰۰۶a؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۷؛ Mavichak و همکاران، ۲۰۰۹؛ Rout و همکاران، ۲۰۰۷؛ Vaseeharan و همکاران، ۲۰۰۶؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴a؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴b؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۶). پروتئین‌های نوترکیب ویروس لکه سفید تاکنون در سیستم‌های بیانی مختلفی از قبیل باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* (*E. coli*)، باکتری گرم مثبت، سلول‌های حشرات، مخمر و کرم ابریشم بیان شده است (Caipang و همکاران، ۲۰۰۸؛ Du و همکاران، ۲۰۰۶؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۷؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۶a؛ Mavichak و همکاران، ۲۰۰۹؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴a,b؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۶؛ Xu و همکاران، ۲۰۰۶).

Witteveldt و همکاران (۲۰۰۴ b)، امکان استفاده خوراکی از پروتئین‌های نوترکیب ویروس لکه سفید را به‌عنوان واکسن مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق پروتئین‌های VP_{19} و VP_{28} به‌طور جداگانه در *E. coli* بیان شدند. متعاقباً باکتری‌های مولد پروتئین‌ها پس از غیرفعال شدن وارد پلت‌های غذایی میگوها گشته و در تغذیه میگوها مورد استفاده قرار گرفتند. چالش میگوهای واکسینه شده به‌روش ذکر شده (از طریق خوراکی) نشان داد که مصرف پروتئین VP_{28} از طریق خوراکی موجب افزایش مقاومت میگوها در برابر چالش با ویروس می‌شود. این مطالعه هم‌چنین نشان داد که محافظت ایجاد شده در میگوها تا ۳ هفته دوام داشت.

Yi M و همکاران (۲۰۱۲)، از باکتری حاوی پلاسمید بیان‌کننده پروتئین VP28 به‌روش خوراکی استفاده نموده و توصیه کردند که روش خوراکی به‌دلیل کپی‌برداری از ویروس طبیعی روش درمانی ساده‌تری بر علیه بیماری لکه سفید در آبزی‌پروری می‌باشد. براساس نظر Chen و همکاران (۲۰۰۲a,b)، ویروس لکه سفید ابتدا در روده جایگزین شده و تکثیر می‌یابد سپس به آبشش منتقل می‌شود. هم‌چنین در این تحقیق اعلام شد که پروتئین VP28 احتمالاً از طریق رقابت با ویروس در چسبیدن به سلول میزبان سبب محافظت میگو در برابر بیماری می‌باشد.

براساس نتایج تحقیقات در این زمینه به‌نظر می‌رسد ژن کدکننده پروتئین VP28 ویروس لکه سفید 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 لکه سفید بر پایه PCR یا آنتی‌بادی و نیز تولید واکسن‌های نوترکیب به‌منظور تحریک سیستم ایمنی میگوها استفاده نمود. به‌نظر می‌رسد درک بهتر از پروتئین‌های ساختاری ویروس لکه سفید و جایابی آن‌ها در ویریون، نحوه سرهم‌شدن یا مونتاژ ویروس و راه عفونت آن و کشف داروهای ضدویروسی را روشن‌تر خواهد ساخت.

به‌عنوان یک نتیجه کلی می‌توان اشاره نمود که با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق و نیز نتایج Houshmand (۲۰۱۴) پروتئین نوترکیب VP28 به هر شکلی در اختیار میگوها قرار گیرد قابلیت ایجاد محافظت را در برابر ویروس لکه سفید خواهد داشت درحالی‌که در این تحقیق و نیز مطالعات دیگر مشخص شد که پروتئین نوترکیب VP19 قابلیت محافظت را نخواهد داشت. هم‌چنین میزان بازماندگی ارتباط مستقیم با مدت زمان در اختیار داشتن پروتئین نوترکیب دارد. این مشاهدات احتمال حضور پاسخ ایمنی خاطره‌ای را در میگوها نشان دادند تا مرزهای جدیدی از تحقیقات به سمت استفاده از واکسن‌ها برای محافظت در برابر بیماری لکه سفید گشوده شود. این راهبرد در صورت موفقیت، فرصت بزرگی را برای مقابله با ویروس لکه سفید فراهم کرده و صنعت پرورش میگو را پایدار خواهد نمود. در این تحقیق نیز از روش خوراکی به‌منظور ایمن‌سازی میگوها در برابر ویروس لکه‌سفید استفاده شدزیرا تنها راه عملی و کاربردی ایمن‌سازی در میگو محسوب می‌گردد.

منابع

۱. **Alabi, A.O.; Jones, D.A. and Latchford, J.W., 1999.** The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. Aquaculture. Vol. 178, pp: 1-11.

۲. **Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingstone, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K., 1992.** Short Protocols in Molecular Biology.2nd edition, John Wiley and sons. New York. pp: A1-15.

۳. **Bright Singh, I.S.; Manjusha, M.; Pai, S.S. and Philip, R., 2005.** *Fenneropenaeus indicus* is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 66, pp: 265-270.

۴. **Caipang, C.M.A.; Verjan, N.; Ooi, E.L.; Kondo, H.; Hirono, I.; Aoki, T.; Kiyono, H. and Yuki, Y., 2008.** Enhanced survival of shrimp, *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* from white spot syndrome disease after oral administration of recombinant VP28 expressed in *Brevibacillus brevis*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 25, pp: 315-320.

۵. **Chen, L.L.; Leu, J.H.; Huang, C.J.; Chou, C.M.; Chen, S.M.; Wang, C.H.; Lo, C.F. and Kou, G.H., 2002a.** Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. Virology. Vol. 293, pp: 44-53.

۶. **Chen, L.L.; Wang, H.C.; Huang, C.J.; Peng, S.E.; Chen, Y.G.; Lin, S.J.; Chen, W.Y.; Dai, C.F.; Yu, H.T. and Wang, C.H., 2002b.** Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. Virology. Vol. 301, pp: 136-147.

۷. **Citarasu, T.; Sivaram, V.; Immanuel, G.; Rout, N. and Murugan, V., 2006.** Influence of selected Indian immunestimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 21, pp: 372-384.

۸. **Dehghan, M.; Jafariyan, H.; HabibiRezai, 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 J of Fish and Marine Sciences. Vol. 3, No. 6, pp: 523-528.

confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. Vaccine. Vol. 25, pp: 2778-2786.

۲۶. **Roux, M.M.; Pain, A.; Klimpel, K.R. and Dhar, A.K., 2002.** The lipopolysaccharide and β-1, 3 glucan binding protein gene is up regulated in white spot virus infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). Journal of Virology. Vol. 76, pp: 7140-7149.

۲۷. **Van de Braak, C.B.T.; Botterblom, M.H.A.; Huisman, E.A.; Rombout, J.H.W.M. and Van der Knaap, W.P.W., 2002.** Preliminary study on the haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 51, pp: 149-155.

۲۸. **Vaseeharan, B.; Anand, T.P.; Murugan, T. and Chen, J.C., 2006.** Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. Letters of Applied Microbiology. Vol. 43, pp: 137-142.

۲۹. **Walker, P.J. and Mohan, C.V., 2009.** Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. Review in Aquaculture. Vol. 1, pp: 125-154.

۳۰. **Wang, C.H.; Lo, C.F.; Leu, J.H.; Chou, C.M.; Yeh, P.Y.; Chou, H.Y.; Tung, M.C.; Chang, C.F.; Su, M.S. and Kou, G.H., 1995.** Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 23, pp: 239-242.

۳۱. **Witteveldt, J., 2006.** On the vaccination of shrimp against white spot syndrome virus. Thesis Wageningen University. ISBN: 90-8504-331-X

۳۲. **Witteveldt, J.; Cifuentes, C.C.; Vlak, J.M. and Van Hulten, M.C., 2004a.** Protection of Penaeusmonodon against white spot syndrome virus by oral vaccination. Journal of Virology. Vol. 78, pp: 2057-2061.

۳۳. **Witteveldt, J.; Vlak, J.M. and Van Hulten, M.C., 2004b.** Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 16, pp: 571-579.

۳۴. **Witteveldt, J.; Vlak, J.M. and Van Hulten, M.C., 2006.** Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 70, pp: 167-170.

۳۵. **Wu, W.; Wang, L. and Zhang, X., 2005.** Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. Virology. Vol. 332, pp: 578-583.

۳۶. **Wu, J.L.; Nishioka, T.; Mori, K.; Nishizawa, T. and Muroga, K., 2002.** A timecourse study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 13, pp: 391-403.

۳۷. **Xu, Z.R.; Du, H.H.; Xu, Y.X.; Sun, J.Y. and Shen, J., 2006.** Crayfish *Procambarus clarkii* protected against white spot syndrome virus by oral administration of viral proteins expressed in silkworms. Aquaculture. Vol. 253, pp: 179-183.

۳۸. **Yi, G.; Wang, Z.; Qi, Y.; Yao, L.; Qian, J. and Hu, L., 2004.** VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 37, pp: 726-734.

۳۹. **Yi, M.; Jiang Feng, L.; Zhang, X.W.; Wang, X.W.; Zhao, X.F. and Wang, J.X., 2012.** A vector that expresses VP28 of WSSV can protect red swamp crayfish from white spot disease. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 36, pp: 442-449.

۴۰. **Zhu, Y.; Ding, Q. and Yang, F., 2007.** Characterization of a homologous-region-binding protein from white spot syndrome virus by phage display. Virus Research. Vol. 125, pp: 145-152.

۹. **Devaraja, T.N.; Otta, S.K.; Shubha, G.; Karunasagar, I.; Tauro, P. and Karunasagar, I., 1998.** Immunostimulation of shrimp through oral administration of Vibrio bacterin and yeast glucan in: Advances in shrimp biotechnology. Flegel, T. W., (Ed), National centre for genetic engineering and Biotechnology, Bangkok. pp: 167-170.

۱۰. **Du, H.H.; Xu, Z.R.; Wu, X.F.; Li, W.F. and Dai, W., 2006.** Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus. Aquaculture. Vol. 260, pp: 39-43.

۱۱. **Durand, S.; Lightner, D.V.; Nunan, L.M.; Redman, R.M.; Mari, J.and Bonami, J.R., 1996.** Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 27, pp: 59-66.

۱۲. **Flegel, T.W. and Alday-Sanz, V., 1998.** The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 14, pp: 269-273.

۱۳. **Houshmand, H., 2014.** Protection of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against white spot disease virus using oral recombinant bio encapsulated VP28 protein, a thesis Submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree PhD in Aquatic Animals Health, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran., No: 9358959 (in Persian).

۱۴. **Inouye, K.; Miwa, S.; Oseko, N.; Nakano, H.; Kimura, T. and Momoyama, K., 1994.** Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathology. Vol. 29, pp: 149-158.

۱۵. **Jha, R.K.; Xu, Z.R. and Pandey, A., 2006.** Protection of *Procambarus clarkia* against white spot syndrome virus using recombinant subunit injection vaccine expressed in Pichapastoris. Fisheries Science. Vol. 72, pp: 1011-1019.

۱۶. **Jha, R.K.; Xu, Z.R.; Bai, S.J.; Sun, J.Y.; Li, W.F. and Shen, J., 2007.** Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed in Pichiapastoris. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 224, pp: 295-307.

۱۷. **Kou, G.H.; Peng, S.E.; Chiu, Y.L. and Lo, C.F., 1998.** Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In: Advances in Shrimp Biotechnology (ed. by T.W. Flegel), pp: 267-271. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

۱۸. **Lightner, D.V., 1996.** A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

۱۹. **Lightner, D.V., 2003.** Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. In: Biosecurity in aquaculture production systems: Exclusion of pathogens and other undesirables (C.S. Lee & P.J. O'Bryen, eds.). The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. pp: 81-116.

۲۰. **Loker, E.S.; Adema, C.M.; Zhang, S.M. and Kepler, T.B., 2004.** Invertebrate immune systems not homogeneous, not simple, not well understood. Immunology Review. Vol. 198, pp: :10-24.

۲۱. **Mavichak, R.; Kondo, H.; Hirono, I.; Aoki, T.; Kiyono, H. and Yuki, Y., 2009.** Protection of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* against white spot virus following administration of N-terminus truncated recombinant VP28 protein expressed in Gram-positive bacteria, *Brevibacillus choshinensis*., Aquaculture Science. Vol. 57, pp: 83-90.

۲۲. **Musthaq, S.S.; Sudhakaran, R.; Ahmed, V.P.I.; Balasubramanian, G. and SahulHameed, A.S., 2006.** Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. Aquaculture. Vol. 256, pp: 34-41.

۲۳. **OIE (World Organization for Animal Health, formerly Office International des Epizooties). 2003.** Manual of diagnostic tests for aquatic animals, 4th ed. OIE, Paris.

۲۴. **Rojtinnakorn, J.; Hirono, I.; Itami, T.; Takahashi, Y. and Aoki, T., 2002.** Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 13, pp: 69-83.

۲۵. **Rout, N.; Kumar, S.; Jaganmohan, S. and Murugan, V., 2007.** DNA vaccines encoding viral envelope proteins