تولید آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد پروتئین نوکلئوکپسید ویروس برونشیت عفونی ماکیان (IBV)

بهاره رامش[۱*]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۲]، مسعود قربانپور[۲] و مریم مهرآقا[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۷

چکیده

ویروس برونشیت عفونی (IBV) طیور یکی از عوامل بیماری‌زای ویروسی بسیار مهم است که دارای چندین سروتیپ می‌باشد. کنترل مؤثر عفونت‌های ناشی از این ویروس از طریق واکسیناسیون و تشخیص سریع بیماری قابل انجام است. پروتئین نوکلئوکپسید IBV (N) یکی از پروتئین‌های ساختمانی حفاظت شده این ویروس است که برای طراحی کیت‌های تشخیصی و تولید آنتی‌بادی منوکلونال مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه‌ی حاضر پروتئین N ویروس برونشیت عفونی طیور سویه‌ی واکسن H120 در باکتری *Escherichia coli* بیان و سپس خالص گردید تا به عنوان آنتی‌ژن برای تولید آنتی‌بادی منوکلونال مورد استفاده قرار گیرد. ۲ آنتی‌بادی منوکلونال (1F9 و 6C3) که پروتئین N نوترکیب را شناسایی می‌کردند تولید و واکنش آن‌ها با پروتئین طبیعی ویروس در آزمایش‌های وسترن بلات و ایمونودات بررسی گردید. هر دو آنتی‌بادی قادر به شناسایی پروتئین N در مایع آلانتوئیک تخم مرغ تلقیح شده با IBV در آزمایش وسترن بلات بودند اما در آزمایش ایمونودات تنها آنتی‌بادی 1F9 مثبت بود. آنتی‌بادی 1F9 همچنین قادر به شناسایی سویه‌های 4/91 و IBV QX در آزمایش ایمونودات بود. به نظر می‌رسد این آنتی‌بادی منوکلونال دارای کاربرد تشخیصی باشد.

کلمات کلیدی: ویروس برونشیت عفونی طیور، پروتئین نوکلئوکپسید، بیان پروتئین، آنتی‌بادی منوکلونال

مقدمه

بیماری برونشیت عفونی یک بیماری ویروسی تنفسی حاد و فوق‌العاده واگیر در ماکیان، با گسترش جهانی است که خسارت‌های بسیاری را بر صنعت طیور تحمیل می‌کند. دلیل عمده‌ی اهمیت اقتصادی این بیماری، کاهش وزن، افزایش احتمال بروز عفونت‌های ثانویه و همچنین کاهش میزان و کیفیت تولید تخم‌مرغ است، به گونه‌ای که خسارات اقتصادی ناشی از کاهش تولید توسط این ویروس خیلی مهم‌تر از تلفات این بیماری است. تلفات اغلب در سنین پایین (۶-۲ هفتگی) مشاهده می‌شود و مرگ در سنین بالاتر بیش‌تر در اثر عفونت‌های ثانویه باکتریایی مجاری تنفسی رخ می‌دهد. همچنین، برخی سویه‌های این ویروس باعث ایجاد ضایعات شدید کلیوی می‌شوند که می‌توانند تلفات بالای ۳۰ درصد ایجاد کنند. ماهیت فوق‌العاده واگیر بیماری برونشیت عفونی و وجود سروتیپ‌های مختلف ویروس عامل این بیماری باعث پیچیده شدن فرآیند پیش‌گیری و کنترل آن شده است (Cavanagh and Gelb 2008, Cavanagh and Naqi 1997). ویروس عامل برونشیت عفونی (Infectious Bronchitis Virus; IBV) متعلق به جنس گاما کروناویروس، از خانواده‌ی کروناویریده است. ژنوم آن شامل یک قطعه RNA تک‌رشته‌ای مثبت با طول حدود ۲۷/۵ کیلو باز است که ۵ پروتئین اصلی ویروس را کد

[۱*] دانش‌آموخته‌ی دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: dvm.ramesh@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

می‌کند. این پروتئین‌ها شامل چهار پروتئین ساختمانی ماتریکس (M)، نوکلئوکپسید (N)، اسپایک (S) و غشایی (E) و آنزیم RNA پلی‌مراز (pol) به عنوان یک پروتئین غیرساختمانی می‌باشند (Jackwood et al. 2012). پروتئین نوکلئوکپسید یک فسفوپروتئین متشکل از ۴۰۹ اسیدآمینه است که در میان سویه‌های IBV به خوبی حفظ شده است (Williams et al. 1992). بررسی توالی پروتئین N از ۲۷ سویه مختلف IBV از آمریکا، هلند، عربستان سعودی و ژاپن نشان داد که این ویروس‌ها بیش از ۹۴ درصد تشابه در سطح اسید آمینه‌های پروتئین N داشتند (Zwaagstra et al. 1992).

تا کنون بیش از ۵۰ سروتیپ از این ویروس در جهان شناخته شده است و حتی بین جدایه‌های یک سروتیپ تا حدی اختلاف آنتی‌ژنی مشاهده می‌شود (Lee et al. 2003) که به دلیل بروز موتاسیون و نوترکیبی در ژنوم بزرگ این ویروس است. تشخیص عفونت‌های ناشی از IBV بر مبنای علائم بالینی، جداسازی ویروس، جستجوی ژنوم ویروس با استفاده از RT-PCR، بررسی حضور پادتن‌های اختصاصی ضد ویروس و شناسایی آنتی‌ژن‌های ویروسی انجام می‌گردد (Ignjatovic and Sapats 2000). معمولاً برای بررسی مستقیم آنتی‌ژن‌های ویروس در بافت‌ها، از روش‌هایی بر پایه‌ی آنتی‌بادی مانند ایمونوفلورسانس و ایمونوپراکسیداز استفاده می‌شود که به دلیل واکنش‌های غیراختصاصی معمولاً تفسیر این آزمون‌ها دشوار است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد IBV به ویژه آنتی‌بادی ضد پروتئین نوکلئوکپسید می‌توانند در امر تشخیص بسیار مفید واقع گردند. پروتئین نوکلئوکپسید در میان سویه‌های مختلف IBV فوق‌العاده حفاظت شده و از سوی دیگر بسیار ایمنی‌زا است. بر این اساس، این پروتئین می‌تواند به عنوان یک منبع آنتی‌ژنی معتبر در طراحی آزمایش الایزای غیرمستقیم استفاده شود. همچنین به منظور طراحی الایزای رقابتی با هدف ردیابی آنتی‌بادی ضد سروتیپ‌های مختلف IBV و ردیابی آنتی‌ژن این ویروس در نمونه‌های بالینی می‌توان از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پروتئین N استفاده نمود (Chen et al. 2003, Wainright et al. 1989). بنابراین با توجه به اهمیت پروتئین نوکلئوکپسید و آنتی‌بادی ضد آن در امر تشخیص، هدف از این مطالعه، تهیه و ارزیابی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد پروتئین IBV N می‌باشد تا در آینده بتوان از آن‌ها برای طراحی و ساخت کیت‌های تشخیص عفونت‌های ناشی از این ویروس استفاده شود.

مواد و روش کار

تولید پروتئین نوکلئوکپسید نوترکیب

یک کلونی باکتری *Escherichia coli*، سویه‌ی Roseta که حاوی پلاسمید pMAL-c2x دارای ژن پروتئین نوکلئوکپسید IBV با طول ۱۲۲۷ زوج باز بود و قبلاً در دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شده بود (منتشر نشده)، به صورت شبانه در محیط LB مایع حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین کشت داده شد. روز بعد، مقداری از این کشت شبانه به نسبت ۱:۱۰۰ وارد محیط LB مایع حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین و ۰/۲ درصد گلوکز گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد تا کدورت محیط در طول موج ۶۰۰ به ۰/۵ رسید. برای القاء بیان پروتئین به کشت باکتری IPTG به میزان ۱ میلی‌مولار اضافه شد و کشت باکتری در حضور IPTG تا ۴ ساعت ادامه یافت. در ادامه پروتئین نوترکیب که به صورت فیوژن با پروتئین متصل شونده به مالتوز (Maltose binding protein; MBP) تولید شده بود با استفاده از ستون کروماتوگرافی حاوی رزین آمیلوز خالص شد و غلظت آن با روش برادفورد تعیین گردید (Bradford 1976, Harlow et al. 1988).

تولید آنتی‌بادی منوکلونال ضد پروتئین فیوژن MBP – نوکلئوکپسید (MBP-N)

سه سر موش ماده‌ی نژاد Balb/c با سن ۶ هفته، هر یک ۳ بار در روزهای صفر، ۱۴ و ۳۵ با ۵۰ میکروگرم از پروتئین MBP-N خالص شده که به نسبت حجمی یکسان

با ادجوانت فروند مخلوط شده بود، از طریق داخل صفاقی تزریق شدند. در تزریق اول از ادجوانت فروند کامل و در دو تزریق بعدی از ادجوانت فروند غیرکامل استفاده شد. یکی از این حیوانات که در روز ۴۵ دارای بالاترین عیار آنتی‌بادی ضد پروتئین MBP-N در آزمایش الایزا بود برای تولید آنتی‌بادی منوکلونال انتخاب شد. برداشت طحال و استحصال لنفوسیت‌های آن با روش مرسوم (Ausubel et al. 1992) انجام شد و سلول‌ها مورد شمارش قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد 10^8 عدد از سلول‌های طحال با 10^7 عدد از سلول‌های میلومای موشی SP2/0 مخلوط شدند و ادغام سلولی با استفاده از ۱ میلی-لیتر پلی‌اتیلن‌گلیکول 1500 ۵۰ درصد (Roche، آلمان) انجام شد. سلول‌های ادغام شده در محیط RPMI (ایده زیست، ایران) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Gibco) و HAT (Sigma، آمریکا) شامل هیپوگزانتین (100 µM)، آمینوپترین (0.4 µM) و تیمیدین (16 µM) مخلوط و سپس در چندین میکروپلیت ۹۶ حفره‌ایی دارای سلول-های تغذیه دهنده (10^4 سلول در هر حفره) توزیع شدند. سلول‌های تغذیه دهنده با روش‌های مرسوم از طریق شستشوی حفره‌ی صفاق چند سر موش غیر ایمن تهیه شدند. پلیت‌ها به مدت ۵ روز در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد واجد ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. در روز پنجم و سپس به فاصله‌ی هر ۲ روز ۱۰۰µl از محیط کشت داخل هر حفره برداشت و به جای آن ۱۰۰µl محیط کشت جدید دارای HAT افزوده شد. پس از گذشت حدود ۲ هفته محیط کشت حاوی HT (Sigma، آمریکا) شامل هیپوگزانتین (100 µM) و تیمیدین (16 µM) جایگزین محیط دارای HAT گردید. تعویض محیط تا زمانی که سلول‌های هیبریدوما ۱۰ تا ۵۰ درصد سطح حفره را بپوشانند ادامه یافت. هیبریدوماهای رشد یافته از نظر ترشح آنتی‌بادی ضد پروتئین N در محیط کشت با روش الیزا غربالگری شدند. هیبریدوماهای مثبت شده در آزمایش غرباگری هر یک ۳ بار مورد همسانه-سازی قرار گرفتند تا از منوکلونال بودن جمعیت سلولی هر هیبریدوما اطمینان حاصل گردد (Ausubel et al. 1992).

آزمایش الیزا

در این آزمایش، ابتدا پروتئین MBP-N نوترکیب با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر پوشاننده (کربنات سدیم ۰/۰۱۶ مولار و بی‌کربنات سدیم ۰/۰۳۴ مولار pH=۹/۶) رقیق شد و به میزان ۵۰ میکرولیتر در حفره در حفرات یک پلیت الیزا (کاریزمهر، ایران) ریخته شد. سپس پلیت به مدت ۱۵ ساعت در یخچال قرار داده شد. پس از سه مرتبه شستشو با بافر PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (PBS-T)، برای بلوک کردن حفرات پلیت به ازای هر حفره، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول شیرخشک (Skim milk powder) ۵ درصد تهیه شده در PBS-T اضافه گردید و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. پس از این مدت، مجدداً پلیت مورد شستشو قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد سرم‌های موش‌های ایمن شده (رقت‌های ۱/۲۰۰ و ۱/۲۰۰۰ سرم در PBS-T حاوی ۲ درصد شیرخشک) و یا مایع محیط کشت سلول‌های هیبریدوما (به صورت رقیق نشده) به میزان ۵۰ میکرولیتر به هر حفره اضافه گردیدند. پس از یک ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه، پلیت سه مرتبه با PBS-T شستشو گردید. در مرحله‌ی بعد کونژوگه پراکسیداز ضد IgG موش (Goat Anti-mouse IgG proxidase) (Komabiotech، کره جنوبی) به نسبت ۱/۴۰۰۰ در PBS-T حاوی ۲ درصد شیرخشک رقیق گردید و به هر حفره به میزان ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. مجدداً پس از یک ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه، پلیت مورد شستشو قرار گرفت. سپس محلول کروموژن–سوبسترا (تترامتیل بنزیدین–H_2O_2) به میزان ۵۰ میکرولیتر به تمام حفرات اضافه شد و پلیت به مدت ده دقیقه در تاریکی در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. در نهایت واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول اسید کلریدریک ۱ مولار متوقف شد و پلیت با استفاده از

دستگاه قرائت کننده‌ی الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. هیبریدوماهای مثبت شده در این آزمایش، در یک آزمایش الیزای دیگر با استفاده از پروتئین MBP مورد بررسی قرار گرفتند تا از واکنش آنتی‌بادی منوکلونال با پروتئین N اطمینان حاصل گردد.

بررسی واکنش آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با پروتئین N طبیعی ویروس با آزمایش وسترن بلات

برای انجام آزمایش وسترن بلات، مایع آلانتوئیک تخم مرغ‌های تلقیح شده با سویه‌ی IBV H120 (موسسه رازی، ایران) و نیز مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌هایی که هیچ ویروسی به آن‌ها تلقیح نشده بود (شاهد منفی) در یک ژل پلی-اکریلآمید ۱۰ درصد در حفرات جدا الکتروفورز شده و سپس پروتئین‌ها از ژل به غشای نیتروسلولز انتقال داده شدند. برای بلوک شدن، غشای نیتروسلولز به مدت یک شب در محلول شیرخشک ۵ درصد در PBS-T در یخچال قرار داده شد. در روز بعد غشای نیتروسلولز سه مرتبه با PBS-T شستشو گردید. پس از شستشو، قطعات غشای نیتروسلولز مربوط به ویروس و مایع آلانتوئیک فاقد ویروس هر یک به صورت نوارهای باریکی برش داده شدند. سپس مایع محیط کشت هر یک از هیبریدوماهای مثبت شده در الیزا به طور جداگانه با یک نوار واجد ویروس و یک نوار فاقد ویروس به مدت ۱ ساعت و روی شیکر، مجاور گردید. بعد از اتمام این مرحله، شستشو همانند مرحله‌ی اول انجام شد و نوارها به مدت ۱ ساعت در محلول کونژوگه پراکسیداز ضد IgG موش (رقت ۱/۲۰۰۰ در PBS-T حاوی ۲ درصد شیرخشک) بر روی شیکر قرار داده شدند. پس از انجام شستشو شامل ۲ مرحله شستشو با PBS-T و یک مرحله شستشوی نهایی با PBS، نوارها در محلول ظهور قرار داده شدند. محلول ظهور از مخلوط کردن دو محلول A (حاوی ۳۰ میلی‌گرم کروموژن آلفا کلرونفتول در ۱۰ میلی‌لیتر متانول سرد) و B (حاوی ۱۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد در ۵۰ میلی‌لیتر PBS) بلافاصله قبل از مصرف تهیه گردید. نوارهای نیتروسلولز برای ظهور به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در این محلول قرار داده شده و در آخر با آب معمولی شسته شدند.

بررسی واکنش آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با پروتئین N طبیعی با آزمایش ایمونودات

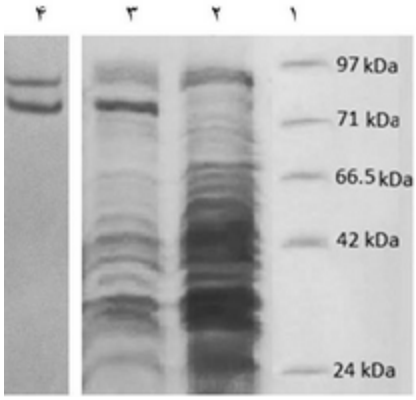
میزان ۱۰ میکرولیتر از مایعات آلانتوئیک حاوی هر یک از سویه‌های H120، 4/91 (Intervet، هلند) و QX (جدا شده از طیور بیمار در اهواز) IBV و ۱۰ میکرولیتر از مایع آلانتوئیک فاقد ویروس (شاهد منفی) روی یک قطعه غشای نیتروسلولز منتقل شدند. پس از خشک شدن لکه‌ها، برای بلوک شدن، غشای نیتروسلولز به مدت ۳ ساعت در محلول شیرخشک ۵ درصد در PBS-T قرار گرفت. با پایان یافتن مرحله‌ی بلوک کردن، سه بار شستشو (هر بار ۵ دقیقه) با PBS-T صورت گرفت. در مرحله‌ی بعد مایع محیط کشت هر یک از هیبریدوماهای مثبت شده در الیزا و وسترن بلات به طور جداگانه با یک قطعه غشای نیتروسلولز دارای هر چهار لکه (۳ لکه واجد ویروس و یک لکه فاقد ویروس) به مدت ۱ ساعت و روی شیکر، مجاور گردید. بعد از اتمام این مرحله سایر مراحل آزمایش مانند وسترن بلات انجام شد با این تفاوت که در این آزمایش در مرحله‌ی ظهور از کروموژن دی-آمینوبنزیدین استفاده گردید.

نتایج

بررسی بیان پروتئین نوکلئوکپسید

همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص شده است، باکتری در معرض IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG، حاوی پروتئینی جدید در محدوده‌ی بین ۷۱ تا ۹۷ کیلودالتون بود، که با وزن مولکولی قابل انتظار (۸۷/۵ کیلو دالتون) برای پروتئین بیان شده (با احتساب ۴۵ کیلودالتون برای پروتئین نوکلئوکپسید و ۴۲/۵ کیلودالتون برای MBP) هم‌خوانی دارد. برای خالص‌سازی پروتئین N نوترکیب از رزین آمیلوز استفاده شد. آمیلوز شکل

متفاوتی از مالتوز است که می‌تواند پروتئین MBP را به خود جذب کند. شکل ۱ در ستون ۴ پروتئین نوترکیب خالص‌سازی شده با استفاده از رزین آمیلوز را نشان می‌دهد. پس از خالص‌سازی و انجام الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌امید پروتئین نوترکیب خالص‌سازی شده به صورت دو باند پروتئینی نزدیک به یکدیگر با وزن‌های ملکولی حدود ۸۷ و ۸۰ کیلودالتون مشاهده گردید.



شکل ۱: بررسی بیان پروتئین نوترکیب MBP-N و خالص‌سازی آن با SDS-PAGE

ستون‌های ۱ تا ۴ به ترتیب نشان‌گر مارکر پروتئینی، باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب قبل از افزودن IPTG، باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب پس از افزودن IPTG و پروتئین خالص شده می‌باشند.

ارزیابی موش‌های ایمن شده با پروتئین N نوترکیب

پس از خون‌گیری از موش‌ها در روزهای صفر و ۴۵، نمونه‌های سرمی از نظر میزان آنتی‌بادی ضد پروتئین نوترکیب با آزمایش الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است. دانسیته‌ی نوری (OD) سرم هر ۳ موش در روز صفر در حد دانسیته‌ی نوری بافر رقیق کننده‌ی سرم (به عنوان شاهد منفی) بود و این حیوانات فاقد آنتی‌بادی ضد پروتئین نوترکیب بودند اما در روز ۴۵ دانسیته‌ی نوری سرم موش‌های تلقیح شده در رقت‌های ۱/۲۰۰ و ۱/۲۰۰۰ به شکل قابل توجه افزایش یافته بود. بنابراین در هر سه موش تلقیح شده پاسخ ایمنی مطلوبی در برابر پروتئین نوکلئوکپسید برانگیخته شده بود. سرم موش شماره یک در مقایسه با دو موش دیگر دارای دانسیته‌ی نوری نسبتاً بالاتری بود و در نتیجه این حیوان برای تولید آنتی‌بادی منوکلونال انتخاب گردید.

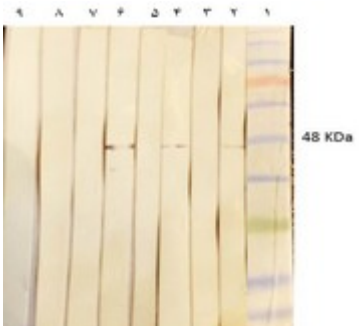
جدول ۱: دانسیته‌ی نوری (OD) سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین نوترکیب MBP-N در آزمایش الیزا

نمونه‌های سرمی	OD در روز صفر (رقت ۱/۲۰۰)	OD در روز ۴۵ (رقت ۱/۲۰۰)	OD در روز ۴۵ (رقت ۱/۲۰۰۰)
موش ۱	۰/۰۸	۲/۱۶	۱/۸۶
موش ۲	۰/۰۹	۱/۸۱	۱/۶۷
موش ۳	۰/۰۷	۱/۷۳	۱/۵۵

تهیه‌ی سلول‌های هیبریدوما و ارزیابی آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده

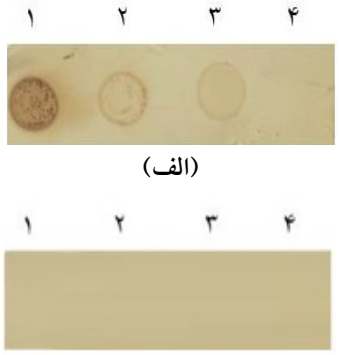
پس از برداشت طحال موش ایمن شده با پروتئین MBP-N و ادغام سلول‌های آن با سلول‌های میلوما با استفاده از PEG، از مجموع حفرات ۵ پلیت ۹۶ حفره‌ایی کشت سلولی که برای کشت سلول‌های ادغام یافته مورد استفاده قرار گرفتند رشد کلون‌های هیبریدوما در ۱۷۲ حفره مشاهده گردید. هنگامی که ۱۰ تا ۵۰ درصد سطح هر حفره با سلول‌های هیبریدوما پوشیده شد مایع رویی سلول‌ها از نظر وجود آنتی‌بادی ضد پروتئین N با آزمایش الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. هیبریدوماهایی که مایع رویی آن‌ها با پروتئین MBP-N واکنش مثبت و با پروتئین MBP واکنش منفی داشت به عنوان هیبریدومای تولید‌کننده‌ی آنتی‌بادی ضد پروتئین N و هیبریدوماهایی که

مایع رویی آن‌ها با هر دو پروتئین واکنش داشت به عنوان هیبریدومای تولید کننده‌ی آنتی‌بادی ضد پروتئین MBP محسوب شدند. بر این اساس از میان تمام حفرات دارای هیبریدوما وجود آنتی‌بادی ضد پروتئین N در دو حفره‌ی 1F9 و 6C3 نشان داده شد. پس از ۳ بار همسانه‌سازی، آنتی‌بادی منوکلونال تولید شده توسط این هیبریدوماها از نظر واکنش با پروتئین N طبیعی با آزمایش وسترن‌بلات مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این آزمایش (شکل ۲) هر دو آنتی‌بادی منوکلونال تولید شده پروتئینی به وزن حدود ۴۵ کیلودالتون را در مایع آلانتوئیک واجد ویروس برونشیت عفونی شناسایی نمودند، اما فاقد هر گونه واکنشی با مایع آلانتوئیک شاهد منفی بودند. در ادامه واکنش آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده با سویه‌های H120، 4/91 و IBV QX با آزمایش ایمونودات بررسی گردید. نتایج نشان داد از میان دو آنتی‌بادی منوکلونال تولید شده، منوکلونال 1F9 در این آزمایش دارای واکنش مثبت و قادر به شناسایی هر سه ویروس بود اما آنتی‌بادی منوکلونال 6C3 فاقد واکنش مثبت در این آزمایش بود (شکل ۳).



شکل ۲: نتایج آزمایش وسترن بلات.

ستون ۱ مارکر وزن ملکولی، ستون‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ به ترتیب نشان‌گر واکنش آنتی‌بادی‌های منوکلونال 1F9 و 6C3، سرم پلی‌کلونال موش ایمن شده و محیط کشت (کنترل منفی) با مایع آلانتوئیک حاوی IBV و ستون‌های ۳، ۵، ۷ و ۹ به ترتیب نشان‌گر واکنش آنتی‌بادی‌های منوکلونال 1F9 و 6C3، سرم پلی‌کلونال موش ایمن شده و محیط کشت (کنترل منفی) با مایع آلانتوئیک شاهد منفی می‌باشند.



شکل ۳: نتایج آزمایش ایمونودات.

واکنش آنتی‌بادی‌های منوکلونال 1F9 (الف) و 6C3 (ب) با مایعات آلانتوئیک حاوی ویروس‌های H120 (۱)، 4/91 (۲) و QX (۳) و با مایع آلانتوئیک شاهد منفی (۴).

بحث

تا کنون مطالعات مختلفی با هدف تولید آنتی‌بادی‌های موکلونال اختصاصی پروتئین‌های S (بخش S_1) و N ویروس برونشیت عفونی طیور انجام شده است. با توجه به تفاوت‌های آنتی‌ژنی پروتئین S_1 در میان سروتیپ‌های مختلف این ویروس، آنتی‌بادی‌های اختصاصی پروتئین S_1 بیش‌تر برای شناسایی و متمایز کردن جدایه‌های این ویروس از یکدیگر کاربرد دارند. برای مثال در تحقیق انجام شده توسط Karaca و همکاران در سال ۱۹۹۲ این محققین موفق به ساخت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد پروتئین S_1 ویروس برونشیت عفونی گردیده و توسط آن‌ها یک الیزای غیرمستقیم را طراحی کردند که قادر به شناسایی اختصاصی و متمایز کردن چند سروتیپ از یکدیگر بود. همچنین Karaca و Naqi در سال ۱۹۹۳ با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، اقدام به طراحی یک آزمایش الیزای مهاری برای ردیابی آنتی‌بادی‌های اختصاصی سروتیپ نمودند. بر خلاف پروتئین S_1، پروتئین N در میان سروتیپ‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی تا حد بسیار زیادی محافظت شده است به طوری که این پروتئین به عنوان آنتی‌ژن انتخابی به منظور طراحی آزمایش الیزای غیر مستقیم برای استفاده در

روند پایش و تشخیص سرولوژیک عفونت‌های ناشی از این ویروس مورد توجه قرار گرفته است. Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۵ پس از همسانه‌سازی و بیان ژن N IBV در باکتری *Escherichia coli* از محصول تولیدی به منظور طراحی الایزای غیرمستقیم استفاده کردند. مقایسه-ی الیزای طراحی شده با یک کیت تجاری حاکی از این بود که ۹۵/۷ درصد تشابه، در تشخیص موارد مثبت وجود داشته است. Xin-Well و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعه‌ی مشابهی را با استفاده از پروتئین N انجام دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که الیزای طراحی شده با پروتئین N در مقایسه با کیت تجاری دارای حساسیت و ویژگی بالاتری بود. Lugavskaya و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز پس از همسانه‌سازی و بیان ۲ توالی از ژن N در *Escherichia coli*، با استفاده از محصولات پروتئینی الیزایی را طراحی نمودند که در مقایسه با الایزای سنتی از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار بوده است. در ایران Haqshenas و همکاران در سال ۲۰۰۴ پروتئین N ویروس سویه‌ی واکسن H120 را در *Escherichia coli* بیان نمودند. متعاقباً Haqshenas در سال ۲۰۱۳ نشان داد که الیزای طراحی شده با پروتئین تولیدی از نظر تفکیک سرم‌های مثبت و منفی بسیار مشابه کیت تجاری آیدکس می‌باشد. با توجه به میزان بالای حفاظت پروتئین N در میان سویه‌های مختلف IBV، آنتی‌بادی‌های منوکلونال اختصاصی این پروتئین بالقوه از قابلیت بالایی برای شناسایی تمام سویه‌های ویروس و یا استفاده در الیزای رقابتی برخوردار می‌باشند. بر این اساس، محققینی نیز سعی در تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد این پروتئین نموده‌اند. در این رابطه Wainright و همکاران در سال ۱۹۸۹ موفق به تولید ۲ آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پروتئین N ویروس برونشیت عفونی گردیدند. در بررسی واکنش این آنتی‌بادی‌ها با آزمایش‌های ایمونوپراکسیداز غیرمستقیم، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و ایمونودات مشخص گردید که یکی از این آنتی‌بادی‌ها قادر به شناسایی تمام سویه‌های ویروس برونشیت عفونی شامل ۸ سویه غیرمشابه و ۱۸ جدایه از موارد بیماری بود. Souza و همکاران در سال ۲۰۰۱ با تولید یک آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پروتئین N و یک آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پروتئین S_2 ویروس برونشیت عفونی نشان دادند که آنتی‌بادی ضد پروتئین N اکثر سویه‌های ویروس برونشیت عفونی را شناسایی نمود اما آنتی‌بادی ضد S_2 قادر به شناسایی تمام سویه‌ها بود. در یکی از مطالعات جدیدتر توسط Han و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که دو آنتی‌بادی مونوکلونال تولید شده ضد پروتئین N هر یک قادر به شناسایی یک توالی اختصاصی از پروتئین N می‌باشند که در میان سویه‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی کاملاً حفاظت‌شده می‌باشند، بنابراین عنوان گردید که می‌توان از این آنتی‌بادی‌ها در توسعه‌ی روش‌های تشخیص عفونت ویروس برونشیت عفونی استفاده نمود. از مجموع این مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین N دارای اپی‌توپ‌های حفاظت شده و نیز اپی‌توپ (های) غیر حفاظت شده می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار در ایران با هدف تولید آنتی‌بادی-های منوکلونال اختصاصی پروتئین N صورت پذیرفت. به این منظور برای دستیابی به آنتی‌ژن مورد نیاز، ژن پروتئین N سویه‌ی IBV H120 که قبلاً با استفاده از پلاسمید بیانی پروکاریوتی pMAL-c2X در *Escherichia coli* کلون شده بود بیان و پروتئین فیوژن نوترکیب حاصله با ستون کروماتوگرافی رزین آمیلوز خالص گردید. پس از خالص‌سازی و انجام الکتروفورز در ژل پلی‌اکریلامید، پروتئین نوترکیب خالص‌سازی شده به صورت دو باند پروتئینی نزدیک به یکدیگر در بین محدوده‌ی وزن‌های ملکولی ۷۱ و ۹۷ کیلو دالتون مشاهده گردید. بیان پروتئین N به صورت دو باند نزدیک به یکدیگر پیش از این توسط Haqshenas و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Zhou و همکاران در سال ۱۹۹۶ نیز گزارش شده است و به پروتئولیز یا خاتمه زودرس ترجمه نسبت داده شده است. پس از ایمن‌سازی موش‌ها و تولید سلول‌های هیبریدوما، دو هیبریدوما که آنتی‌بادی‌های

منوکلونال (1F9 و 6C3) تولیدی آن‌ها با پروتئین نوترکیب MBP-N دارای واکنش مثبت و با پروتئین MBP دارای واکنش منفی بودند شناسایی گردید. متعاقباً اختصاصی بودن واکنش آنتی‌بادی‌های منوکلونال برای پروتئین N با آزمایش وسترن بلات تأیید شد، زیرا در این آزمایش هر دو آنتی‌بادی پروتئینی را در مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های تلقیح شده با ویروس برونشیت عفونی شناسایی نمودند که وزن آن با وزن قابل انتظار برای پروتئین N (حدود ۴۵ کیلودالتون) همخوانی دارد. آنتی‌بادی‌های منوکلونال که با استفاده از پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در *Escherichia coli* تهیه گردند ممکن است علیرغم واکنش با پروتئین طبیعی در آزمایش وسترن بلات (در وضعیت دناتوره شده)، قادر به شناسایی پروتئین طبیعی در وضعیت غیر دناتوره نباشند. علت این مسئله این است که اپی‌توپ مورد نظر در پروتئین طبیعی به صورت پنهان است و در معرض محیط قرار ندارد اما پس از دناتوره شدن به صورت سطحی و در دسترس نمایان می‌شود. لذا برای پی بردن به وضعیت اپی‌توپ آنتی‌بادی‌های تولید شده آزمایش ایمونودات انجام شد. در این آزمایش آنتی-بادی 1F9 با مایع آلانتوئیک حاوی ویروس واکنش مثبت نشان داد اما واکنش آنتی‌بادی 6C3 منفی بود. این نتیجه ضمن اثبات در دسترس بودن اپی‌توپ آنتی‌بادی 1F9 بیان‌گر متفاوت بودن اپی‌توپ‌های مورد شناسایی توسط دو آنتی‌بادی می‌باشد. در این آزمایش همزمان واکنش آنتی‌بادی‌ها با دو سروتیپ دیگر IBV (4/91 و QX) نیز بررسی شد. آنتی‌بادی 1F9 اگرچه با شدت کم‌تر اما قادر به شناسایی دو سروتیپ دیگر نیز بود. بنابراین به نظر می‌رسد اپی‌توپ مورد شناسایی توسط این آنتی‌بادی در سروتیپ‌های دیگر IBV حفاظت شده باشد اما پی بردن به این مسئله نیازمند انجام آزمایش با سایر سروتیپ‌های ویروس می‌باشد. به طور کلی مطالعه‌ی حاضر به عنوان اولین مطالعه در ایران برای تولید آنتی‌بادی منوکلونال ضد IBV منجر به تولید ۲ آنتی‌بادی ضد پروتئین N گردید که یکی از آن‌ها بالقوه دارای قابلیت استفاده در آزمایش‌های تشخیصی می‌باشد. در ادامه این تحقیق تلاش می‌گردد ضمن بررسی واکنش این آنتی‌بادی با سایر سروتیپ‌های IBV، کاربرد تشخیصی این آنتی‌بادی به ویژه در عفونت-های پیچیده در دستگاه تنفسی طیور مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل فراهم کردن امکان انجام این پژوهش تشکر می‌گردد.

منابع

Ausubel, F.M; Brent, R.; Kingston, R.E; Moore, D.D; Seidman, J.G; Smith, J.A. and Struhl, K. (1992). Short protocols in molecular biology, 2st ed., Greene Publishing Associates and John Willey & Sons, United States; Pp: 11.22-11.29.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Cavanagh, D. and Naqi, S.A. (1997). Infectious bronchitis. In: Calnek, BW. Barnes, HJ. Beard, CW. Reid, WM. Yoder, HW. (Eds). Disease of poultry, 10th ed. Iowa State University Press, Ames; Pp: 511-526.

Cavanagh, D. and Gelb, J.J. (2008). Infectious Bronchitis. In: Diseases of Poultry, Twelfth Edition. Saif, YM. Fadly AM. Glisson, JR. McDougald, L.R. Nolan, LK. And Swayne, DE. (Eds). Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA; Pp: 117-135.

Chen, H.; Coote, B.; Atree, S. and Hiscox, J.A. (2003). Evaluation of a nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. Avian Pathology; 35: 519-526.

Han, Z.; Zhao, F.; Shao, Y.; Liu, X.; Kong, X.; Song, Y. and Liu, S. (2013). Fine level epitope mapping and conservation analysis of two novel linear B-cell epitopes of the avian infectious bronchitis coronavirus nucleocapsid protein. Virus Res; 171:54-64.

Haqshenas, G.; Akrami, H. and Shayegh, M. (2004). Molecular Cloning and Expression of Nucleocapsid Gene of Chicken Infectious Bronchitis Virus Strain Massachusetts H120. Journal of sciences, Islamic Republic of Iran; 15(3): 211-218.

Haqshenas, G. (2013). Establishment of an in-house, recombinant nucleocapsid protein-based enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of chicken infectious bronchitis. African Journal of Microbiology Research; 7(14): 1296-1300.

Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, United States of America, Pp: 139-239.

Ignjatovic, J. and Sapats, S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. Reveiw scientifique et technique (International office of Epizootics); 19 (2):493-508.

Jackwood, M.W; Hall, D. and Handel, A. (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. Infection Genetics and Evolution; 12(6): 1305-1311.

Karaca, K.; Naqi, S. and Gelb, J. (1992). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Three Infectious Bronchitis Virus Serotypes. Avian Disease. 36: 903-915.

Karaca, K. and Naqi, S. (1993). A monoclonal antibody blocking ELISA to detect serotype-specific infectious bronchitis virus. Veterinary Microbiology; 34: 249-257.

Lee, C.W.; Hilt, D.A. and Jackwood, M.W. (2003). Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; 15: 344-348.

Lugovskaya, N.N.; Scherbakov, A.N.; Yakovleva, A.S.; Tsyvanyuk, M.A.; Mudrak, N.S. and Drygin, V.V. et al. (2006). Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus by a recombinant nucleocapsid protein-based anzyme-linked immunosorbent assay. Journal Virology Methods; 135: 292-296.

Souza, C.M.; Rocha, F.R.T.; Martins, N.R.S.; Resende, J.S.; Jorge, M.A. and Rampinelli, A.P. (2001). Production of monoclonal antibodies against conserved components of infectious bronchitis virus. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia; 53: 523-530.

Wainright, P.; Villegas, P.; Brugh, M. and Lukert, P. (1989). Characterization of infectious bronchitis virus using monoclonal antibodies. Avian Disease; 33: 482-490.

Wang, X.W.; Hao, C.L.; He, H.X.; Wang, Z.L. and Wang, C.Q. (2009). Soluble expression of NP gene of infectious bronchitis virus in *Escherichia coli* BL21 and development of ELISA on the basis of the expressed product. Chinese Journal of veterinary Science; 29: 700-704.

Williams, A.K.; Wang, L.; Sneed, L.W. and Collisson, E.W. (1992). Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses.Virus Research, 25: 213-222.

Zhang, D.Y; Zhou, J.Y; Fang, J.; Hu, J.Q.; Wu, J.X. and Mu, A.X. (2005). An ELISA for antibodies to infectious bronchitis virus based on nucleocapsid protein produce in *Escherichia coli*. Veterinary Medicine-Czech; 8: 336-344.

Zhou, M.; Williams, A.K.; Chung, S.I.; Wang, L. and Collisson, E.W. (1996). The infectious bronchitis virus nucleocapsid protein binds RNA sequences in the 3' terminus of the genome. Virology; 217: 191-199.

Zwaagstra, K.A.; van der Zeijst, B.A. and Kusters, J.G. (1992). Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. Journal of Clinical Microbiology, 30: 79-84.

Production of monoclonal antibody against the nucleocapsid (N) protein of infectious bronchitis virus (IBV)

Ramesh, B.[1]; Seyfi Abad Shapouri, M.R.[2]; Ghorbanpoor, M.[2] and Mehragha, M.[3]

Received: 16.07.2015 Accepted: 08.11.2015

Abstract

Infectious bronchitis virus (IBV) is an important viral pathogen of chickens with several serotypes. Efficient control of the infections caused by IBV relay on the vaccination and rapid diagnosis of infections. The nucleocapsid (N) protein of the virus is a conserved structural protein, considered as a candidate antigen for developing diagnostic kits and production of monoclonal antibodies. In the present study the N protein of infectious bronchitis virus, H120 vaccine strain was expressed in *Escherichia coli* in order to be used as antigen for the production of monoclonal antibodies. Two monoclonal antibodies (1F9 and 6C3) reactive against the recombinant N protein were produced and tested for their reaction with the native viral N protein by Western blotting and immunodot. Both antibodies recognized the N protein in Western blotting but only 1F9 antibody was positive in immunodot. 1F9 antibody also reacted with 4/91 and QX stains of IBV. It appears this monoclonal antibody possess the diagnostic application.

Key words: Infectious bronchitis virus, Nucleocapsid protein, Protein expression, Monoclonal antibody

1- DVSc Graduated of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Ramesh, B., E-mail: dvm.ramesh@yahoo.com