

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور

عنوان:

**ایمن سازی میگوهای پرورشی در برابر
بیماری لکه سفید با استفاده از پروتئین های
و ترکیب تولیدی و مطالعه آن در شرایط آزمایشگاهی**

مجری:

حسین هوشمند

شماره ثبت

۴۶۱۱۴

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور

عنوان پروژه : ایمن سازی میگوهای پرورشی در برابر بیماری لکه سفید با استفاده از پروتئین های
نو ترکیب تولیدی و مطالعه آن در شرایط آزمایشگاهی
شماره مصوب پروژه : ۸۹۰۴۴-۱۲-۷۴-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : حسین هوشمند
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : حسین هوشمند
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : مینا آهنگرزاده، سیدرضا سیدمرتضایی، محمد افشارنسب، لفته محسنی
نژاد، جمال سلیمانی - مسعود رضا صیفی آباد شاپوری- شکوفه شمسی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : محمدرضا مهرابی
محل اجرا: استان خوزستان
تاریخ شروع : ۸۹/۴/۱
مدت اجرا : ۳ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۴
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر
مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه: ایمن سازی میگوهای پرورشی در برابر بیماری لکه سفید با استفاده از پروتئین های نو ترکیب تولیدی و مطالعه آن در شرایط آزمایشگاهی

کد مصوب: ۲-۷۴-۱۲-۸۹۰۴۴

شماره ثبت (فروست): ۴۶۱۱۴ تاریخ: ۱۳۹۳/۸/۷

با مسئولیت اجرایی جناب آقای حسین هوشمند دارای مدرک تحصیلی
دکتری در رشته بهداشت آبزیان می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری های آبزیان در

تاریخ ۹۳/۷/۶ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت رئیس بخش بهداشت و بیماری های آبزیان در پژوهشکده آبی

پروری جنوب کشور مشغول بوده است.

صفحه	عنوان	« فهرست مندرجات »
۱	چکیده	۱
۲	۱- مقدمه	۲
۴	۱-۱- بیماری‌های ویروسی	۴
۴	۱-۲- مورفولوژی ویروس لکه سفید	۴
۵	۱-۳- پروتئین‌های ساختاری	۵
۶	۱-۴- ژنوم و طبقه بندی ویروس	۶
۶	۱-۵- مورفوژنز	۶
۷	۱-۶- علائم بالینی و آسیب شناسی	۷
۸	۱-۷- بیماری‌زایی	۸
۹	۱-۸- میزبانان ویروس	۹
۱۱	۱-۹- همه گیری‌های طبیعی	۱۱
۱۱	۱-۱۰- انتقال ویروس	۱۱
۱۱	۱-۱۱- ایمنی ضدویروسی	۱۱
۱۳	۱-۱۲- کنترل ویروس لکه سفید	۱۳
۱۶	۲- مواد و روش‌ها	۱۶
۱۶	۲-۱- نمونه گیری و استخراج DNA	۱۶
۱۶	۲-۲- استخراج DNA	۱۶
۱۶	۲-۳- پرایمر	۱۶
۱۷	۲-۴- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز	۱۷
۱۸	۲-۵- تکثیر و خالص سازی وکتور	۱۸
۲۰	۲-۶- استخراج پلاسمید با استفاده از کیت	۲۰
۲۰	۲-۷- مراحل کلونینگ	۲۰
۲۴	۲-۸- بررسی بیان پروتئین‌های VP19 و VP28	۲۴
۲۷	۲-۹- تعیین توالی ژن کلون شده	۲۷
۲۷	۲-۱۰- تهیه غذای حاوی باکتری بیان کننده پروتئین‌های VP19 و VP28	۲۷
۲۸	۲-۱۱- ایجاد ایمنی در پست لاروهای میگو	۲۸
۲۹	۲-۱۲- آزمایش چالش	۲۹

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه
۲-۱۳- روش آسیب شناسی.....		۳۰
۲-۱۴- آنالیز آماری.....		۳۲
۳-نتایج.....		۳۳
۳-۱- تشخیص ویروس لکه سفید در بافت میگوی سفید غربی.....		۳۳
۳-۲- استخراج توالی ژن پروتئین VP28 و VP19 ویروس لکه سفید از بانک ژن و طراحی پرایمر ۳۳		۳۳
۳-۳- نتایج PCR برای تکثیر ژن های سازنده VP19 و VP28.....		۳۴
۳-۴- تکثیر و خالص سازی وکتور.....		۳۴
۳-۵- هضم آنزیمی ژن و وکتور.....		۳۴
۳-۶- ورود ژن های VP28 و VP19 به داخل وکتور و تأیید صحت آن.....		۳۵
۳-۷- بررسی بیان پروتئین های سازنده VP28 و VP19.....		۳۵
۳-۸- تعیین توالی ژن های وارد شده به پلاسمید.....		۳۶
۳-۹- تعیین تیترو ویروس مورد نیاز برای چالش.....		۴۱
۳-۱۰- بررسی ایمن سازی میگوهای سفید غربی.....		۴۱
۳-۱۱- بررسی گسترش مرطوب و هیستوپاتولوژی آزمایش مواجهه.....		۴۶
۴- بحث و نتیجه گیری.....		۴۸
۵-پیشنهادها.....		۵۴
منابع.....		۵۶
پیوست.....		۶۶
چکیده انگلیسی.....		۷۱

چکیده

بروز بیماری‌های میگو بالاخص بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده فعالیت‌های تکثیر و پرورش میگو در جهان می‌باشد. بیماری ویروسی لکه سفید یکی از مهلک‌ترین این بیماری‌ها است که موجب تلفات سنگینی در کلیه میگوهای خانواده پنائیده می‌شود. در ایران طی سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ در استان خوزستان و سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر اغلب استخرها و مزارع آلوده به بیماری لکه سفید شده و کل صنعت پرورش میگو با خطر تعطیلی مواجه گردید. با توجه به آنکه پروتئین‌های سطحی ویروس در مراحل اولیه برخورد ویروس با سلول‌های میزبان (مراحل شناسایی سلول و نفوذ در آن) از نقش بسیار مهمی برخوردارند، معمولاً این پروتئین‌ها بعنوان کاندیدی برای ساخت واکسن‌های Subunit یا Recombinant محسوب می‌شوند. از سوی دیگر این پروتئین‌ها می‌توانند بعنوان آنتی ژن‌های مهم ویروس در تهیه آنتی بادی ویژه ویروس و تهیه کیت‌های تشخیصی مورد استفاده قرار گیرند، در مطالعات متعدد استفاده از این پروتئین‌ها بصورت تزریقی و یا در غالب واکسن خوراکی نتایج امیدوارکننده‌ای را نشان داده است. این مطالعه به منظور دستیابی به این پروتئین‌ها جهت انجام ایمن سازی میگو و انامی طراحی گردید. برای دستیابی به ژنوم ویروس لکه سفید از میگوهای بیمار و دارای علائم بالینی مزارع پرورش میگوی چوئیده آبادان نمونه برداری و استخراج DNA صورت گرفت. پرایمرهای اختصاصی ژن‌های کد کننده پروتئین VP28 و VP19 انتخاب شدند و پس از تکثیر و خالص سازی در باکتری TG1 کلون شدند. بیان پروتئین بررسی و پلیت‌های تجاری توسط باکتری حاوی پروتئین نوترکیب غیر فعال شده پوشانده شد. سپس پست لاروهای مرحله ۳۰ میگوی سفید غربی به مدت ۷ روز با پلیت‌های نوترکیب تغذیه شدند و دو بار در روزهای ۹ و ۲۳ پس از شروع تغذیه با پلیت‌های نوترکیب با ویروس لکه سفید چالش شدند. نتایج آزمایش مواجهه اول (پایان روز هفتم پس از تغذیه میگوها با پلیت نوترکیب) نشان داد که در پایان روز ۱۴ پس از مواجهه کمترین درصد تلفات در گروه‌های مختلف مربوط به گروه VP28 برابر $3/84 \pm 3/0\%$ و بالاترین درصد مربوط به گروه TG1 برابر $72/22 \pm 2/93\%$ بود همچنین بالاترین و کمترین میزان بازماندگی نسبی به ترتیب متعلق به گروه‌های VP28 ($5/09 \pm 60/29\%$) و TG1 ($2/94 \pm 4/41\%$) بود. در مقایسه درصد تلفات و میزان بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف مشخص گردید که بین گروه VP28 با سایر گروه‌ها و همچنین گروه VP28+19 با سایر گروه‌ها اختلاف معنی داری وجود دارد در حالی که بین گروه‌های VP19، TG1 و pMal اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P < 0.05$).

در آزمایش مواجهه دوم (۲۱ روز پس از اتمام تغذیه با پلیت نوترکیب) مشخص گردید که کمترین درصد تلفات در این مرحله نیز در گروه‌های مختلف مربوط به گروه VP28 برابر $5/09 \pm 5/0\%$ و بالاترین درصد مربوط به گروه TG1 برابر $75/55 \pm 2/22\%$ بود همچنین بالاترین و کمترین میزان بازماندگی نسبی به ترتیب متعلق به گروه‌های VP28 ($6/83 \pm 32/83\%$) و TG1 ($2/98 \pm 0/00\%$) بود. به عنوان یک نتیجه کلی می‌توان اشاره نمود که پروتئین نوترکیب VP28 به هر شکلی در اختیار میگوها قرار گیرد قابلیت ایجاد محافظت در برابر ویروس لکه سفید را دارد و برعکس پروتئین نوترکیب VP19 دارای این قابلیت در این تحقیق نبود. همچنین میزان بازماندگی ارتباط مستقیم با مدت زمان حضور پروتئین نوترکیب در جیره غذایی دارد.

ویروس لکه سفید عامل مسبب بیماری با انتشار جهانی همراه با تلفات بالا در میگوهای پرورشی است (Inouye و همکاران، ۱۹۹۳). این ویروس باعث تلفاتی تا ۱۰٪ در بین ۱۰ روز بروز بیماری در مزارع پرورش میگو شده و خسارات عظیمی را به صنعت پرورش میگو وارد کرد (Lightner، ۱۹۹۶). خسارات اقتصادی وارد شده در آسیا تقریباً ۴-۶ میلیارد دلار و بیش از یک میلیارد دلار در آمریکای سال‌های ۱۹۹۲ تا ۲۰۰۱ برآورد شد (Lightner، ۲۰۰۳) و در حال حاضر این بیماری گسترده‌تری دارد (Rout و همکاران، ۲۰۰۷). راهبردهای مرسوم کنترل بیماری از قبیل بهبود شرایط محیطی، ذخیره‌سازی پست لاروهای عاری از بیماری و افزایش مقاومت به بیماری با استفاده از محرک‌های ایمنی خوراکی در عفونت‌های لکه سفید به کار گرفته شده است (Lightner، ۲۰۰۳؛ Citarasu و همکاران، ۲۰۰۶). اگرچه که واگیری خیلی بالای ویروس و محدوده گسترده میزبانی آن شامل بسیاری از سخت پوستان، کنترل انتقال و پیشگیری از بیماری را مشکل ساخته است (Lo و همکاران، ۱۹۹۶؛ Flegel، ۱۹۹۷؛ Chang و همکاران، ۱۹۹۸). با توجه به اهمیت اقتصادی و اجتماعی جهانی پرورش میگو، توسعه اقدامات کنترلی جدید در برابر وقوع بیماری لکه سفید به امری اجتناب ناپذیر بدل گشته است. واکسیناسیون می‌تواند یکی از راهبردهای بالقوه برای غلبه بر بیماری‌های ویروسی باشد. مفهوم واکسیناسیون میگو به شدت توسط مطالعات اخیر که در آن‌ها محافظت در برابر بیماری‌های ویروسی شرح داده شده است پشتیبانی می‌شود (Namikoshi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۶؛ Li و همکاران، ۲۰۰۵). این گزارشات نشان می‌دهد که بر خلاف تصور گذشته که بی‌مهرگان به طور کامل به سیستم ایمنی ذاتی متکی هستند برخی از جنبه‌های ایمنی خاص مانند، توانایی القاکنندگی (به نظر می‌رسد در بعضی از موارد) و پاسخ ایمنی ویژه و محافظت در میگوی موندون می‌تواند با استفاده از پروتئین‌های ویروسی نو ترکیب تحریک شود (Loker و همکاران، ۲۰۰۴؛ Kurtz و همکاران، ۲۰۰۳). با این حال محافظت ایجاد شده به وسیله این واکنش‌های نو ترکیب کوتاه اثر بوده است، بنابراین بیان طولانی مدت آنتی‌ژن از طریق ایمن سازی ژنتیکی می‌تواند راهبرد مفیدی در برابر بیماری‌های ویروسی باشد (Rout و همکاران، ۲۰۰۷). واکسیناسیون با استفاده از پلاسمیدهای حامل ژن‌های تحت کنترل پیش‌ران (CMV (Promotor) ایجاد مصونیت در برابر بسیاری از عوامل بیماری‌زا در حیوانات پرورشی نموده است (van Druenen و همکاران، ۲۰۰۰). به همین نحو مطالعات بر روی ماهیان نشان داد که DNA واکنش‌ها می‌توانند ایمنی محافظتی در برابر ویروس‌های رابدوویروس آزادماهیان (salmonid rhabdoviruses)، ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده (viral haemorrhagic septicemia virus)، ویروس نکروز عفونی بافت خون‌ساز (infectious hematopoietic necrosis virus) و ویروس نکروز عفونی پانکراس (pancreatic necrosis virus) ایجاد نمایند (Takano و همکاران، ۲۰۰۴؛ Lorenzen و همکاران، ۲۰۰۱؛ Boudinot و همکاران، ۱۹۹۸؛ Anderson و همکاران، ۱۹۹۶؛ Mikalsen و همکاران، ۲۰۰۴؛ Sulaiman و همکاران، ۱۹۹۹). ویژگی‌های مطلوب DNA واکنش‌ها مانند تحریک ایمنی ذاتی و اکتسابی بدون بروز عوارض جانبی، پایداری و

سهولت تولید و خالص سازی، آن‌ها را برای کاربردهای گسترده ایده‌آل ساخته است. با این حال قبل از استفاده تجاری، بایستی پیشامدهای ایمنی‌شناسی و آسیب‌شناسی مرتبط با استفاده از DNA پلاسمیدهای باکتریایی در دام‌ها و مصرف‌کنندگان برای جلوگیری از عوارض جانبی نامطلوب یا پیش‌بینی نشده DNA واکسن‌ها (در صورت وجود) مد نظر قرار گیرد (van Drunen و همکاران، ۲۰۰۰). بیان ژن برون‌زاد بتا‌گالاکتوزید از در بافت‌های میگو به دنبال تزریق داخل عضلانی پروموتور CMV بر پایه ساختار DNA پلاسمید قبلاً نشان داده شده است (Sulaiman و همکاران، ۱۹۹۹). این نظر محققین را به احتمال واکسیناسیون میگو با DNA پلاسمید رمز گذاری کننده ژن‌های ویروسی تشویق کرد.

در سال ۱۹۹۲ یک ویروس جدید در مزارع پرورش میگو در شمال تایوان بروز کرد که سبب بیماری و تلفات عظیمی شد (Chou و همکاران، ۱۹۹۵). در اواخر سال ۱۹۹۳ اولین بار عامل ویروسی بیماری از بیماری در ژاپن جداسازی شد (Inouye و همکاران، ۱۹۹۴). در خلال چندین سال این گونه بیماری زای جدید در کشورهای مختلف دارای پرورش میگو منتشر گردید (Flegel، ۱۹۹۷ و Anonymous، ۲۰۰۳). در ابتدا تصور می‌شد که عوامل ویروسی مختلفی همزمان در نواحی متفاوت بروز کرده و به هر بیماری یک نام خاص دادند: باکیلوویروس نکروز دهنده بافت خونساز و زیرجلدی (Durand و همکاران، ۱۹۹۶)، سومین باکیلوویروس غیر محدود میگوی موندون (Wang و همکاران، ۱۹۹۵ و Karunasa gar و همکاران، ۱۹۹۷)، ویروس میله ای شکل هسته میگوی ژاپنی (Inouye و همکاران ۱۹۹۴ و ۱۹۹۶)، DNA ویروس میله ای شکل پنائیده (Venegas و همکاران، ۲۰۰۰)، باکیلوویروس اکتودرمی و مزودرمی سیستماتیک (Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵؛ Sahul-Hameed و همکاران، ۱۹۹۸) یا باکیلوویروس لکه سفید (Chou و همکاران، ۱۹۹۶؛ Lightner، ۱۹۹۵).

بعدها مشخص شد که یک عامل ویروسی مسئول این گزارشات است و سرانجام بر اساس یک موافقت غیر رسمی ویروس با نام ویروس سندرم لکه سفید نامگذاری شد. این عامل بیماری را هم اکنون به عنوان یک عامل مهم بیماری زای میگو در سراسر جهان شناخته می‌شود. گزارشات مربوط به تلفات مزارع میگو در جدول آمده است.

جدول ۱-۱ - کشورها و تاریخ وقوع بیماری لکه سفید

Year first reported	Country	Reference
1992	Taiwan	Chou <i>et al.</i> 1995
1993	China, Japan, Korea	Zhan <i>et al.</i> 1998; Inouye <i>et al.</i> 1994; Park <i>et al.</i> 1998
1994	Thailand, India, Bangladesh	Lo <i>et al.</i> 1996a; Karunasagar <i>et al.</i> 1997; Mazid & Banu 2002
1995	USA	Lightner 1996; Wang <i>et al.</i> 1999a
1996	Indonesia, Malaysia, Sri Lanka	Durand <i>et al.</i> 1996; Kasornchandra <i>et al.</i> 1998; Rajan <i>et al.</i> 2000
1997	Vietnam	Bondad-Reantaso <i>et al.</i> 2001
1998	Peru	Rosenberry 2001
1999	Philippines, Ecuador, Colombia, Panamá, Honduras, Nicaragua, Guatemala, Belize	Magbanua <i>et al.</i> 2000; Bondad-Reantaso <i>et al.</i> 2001; Hossain <i>et al.</i> 2001; Wu <i>et al.</i> 2001
1999-2000	México	Bondad-Reantaso <i>et al.</i> 2001
2002	France, Iran	Dieu <i>et al.</i> 2004; Marks 2005
2005	Brazil	APHIS-USDA 2005

در چین خسارات تولید ۸۰٪ میگوی پرورشی مربوط به بیماری لکه سفید بود (Zhan و همکاران، ۱۹۹۸) و در اکوادور اثر ویروس لکه سفید بر مزارع پرورش میگو فاجعه آمیز بود (FAO، ۲۰۰۶). گسترش ویروس لکه سفید به دیگر کشورهای پرورش دهنده میگو توسعه آبی پروری میگو را تهدید می کند (Claydon و همکاران، ۲۰۰۴).

۱-۱ - بیماری‌های ویروسی

پرورش میگو در سطح وسیع همراه با مدیریت ضعیف به سرعت منجر به آلودگی شدید در استخرهای میگو شد و در نتیجه محیط مناسبی برای گسترش بیماری‌های باکتریایی و ویروسی فراهم گردید. از بیش از ۲۰ نوع ویروس شناخته شده‌ی عامل بیماری در میگو که سبب کاهش تولید می شوند ویروس لکه سفید مهم‌ترین آن‌ها و به دنبال آن ویروس عامل بیماری تور (OIE، ۲۰۰۳a). ویروس لکه سفید سبب تلفاتی تا ۱۰۰٪ بین ۷ تا ۱۰ روز در مزارع متراکم میگو می‌شود و در نتیجه سبب وارد کردن زیان‌های اقتصادی بزرگی به صنعت پرورش میگو می‌شود (Lightner، ۱۹۹۶). به دلیل حساسیت بالای میگوی ببری غول پیکر به بیماری لکه سفید و سرزرد در جنوب شرق آسیا میگوی سفید هندی یا چینی جایگزین شد (Briggs و همکاران، ۲۰۰۴؛ FAO، ۲۰۰۶؛ Rosenberry، ۲۰۰۴). ویروس لکه سفید بسیار کشنده و مرتبط با استرس می‌باشد و معمولاً همراه با ویبروزیس دیده می‌شود که در اثر باکتری جنس ویبریو بروز می‌کند (Phuoc و همکاران، ۲۰۰۹).

۱-۲ - مورفولوژی ویروس لکه سفید

ویروس لکه سفید یک ویروس غشاءدار غیراکوله باسیلی شکل است (Chou و همکاران، ۱۹۹۵؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۵؛ Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵). ویریون‌های غشاءدار سالم محدوده ای بین ۲۱۰-۳۸۰ نانومتر در طول و ۱۶۷-۷۰ نانومتر پهنا دارند (Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Flegel و AldaySanz، ۱۹۹۸؛ Par k و همکاران، ۱۹۹۹). یک زائده دم مانند در یک انتهای ویریون ویروس برخی اوقات در میکروگراف‌های الکترونی نگاتیو دیده می‌شود (Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵؛ Durand و همکاران، ۱۹۹۶). غشاء ویروسی ۶-۷ نانومتر ضخامت داشته و دارای ساختاری لیبیدی ۳ لایه است که ۲ لایه شفاف الکترونی با یک لایه مات الکترونی جدا شده است (Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵؛ Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Nadala و همکاران، ۱۹۹۸). نوکلئوکپسید درون غشاء قرار گرفته و یک ساختار حلقوی متراکم شامل زیرواحدهای پروتئینی کروی با قطر ۱۰ نانومتری در ۱۴-۱۵ ردیف عمودی مرتب شده است که در هر ۲۲ نانومتر در محور طولی قرار گرفته است که ظاهری شبیه تخم مرغ شکسته داده است (Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Nadala و همکاران، ۱۹۹۸). زمانی که نوکلئوکپسید از غشاء آزاد می‌شود طول آن افزایش می‌یابد که نشان دهنده بسته بندی محکم آن داخل ویریون است. اندازه نوکلئوکپسید از یک جدایه تا جدایه دیگر متغیر می‌باشد و محدوده

ای بین ۴۲۰-۱۸۰ نانومتر طول و ۸۵-۵۴ نانومتر پهنا با ۶ نانومتر ضخامت دیواره خارجی دارد (Kasornchandra و همکاران، ۱۹۹۸؛ Rajendran و همکاران، ۱۹۹۹؛ SahulHameed و همکاران، ۱۹۹۸).

۳-۱- پروتئین های ساختاری

بیش از ۴۰ پروتئین ویروس لکه سفید شناسایی شده است (جدول شماره ۲) برخی پروتئین های غیر ساختاری شاید در ارتباط با تنظیم رونوشت برداری (VP9)، تکثیر ویروس (WSV021) و یا تنظیم رونویسی DNA (WSV477) است (Han و همکاران، ۲۰۰۷؛ Liu و همکاران، ۲۰۰۶؛ Zhu و همکاران، ۲۰۰۷). حداقل ۳۸ پروتئین ساختاری در ویرون ویروس جانمایی شده است. از این پروتئین ها ۲۱ پروتئین در غشاء، ۱۰ پروتئین در نوکلئوکپسید و ۵ پروتئین در پوشش (یک ساختار مابین غشاء و نوکلئوکپسید) وجود دارد. حدس زده می شود که پروتئین های غشاء VP31، VP110 و VP281 و پروتئین پوشش VP36A و پروتئین های نوکلئوکپسید VP664 و VP136A در ورود ویروس به سلول میزبان نقش داشته باشند (Huang و همکاران، ۲۰۰۲a؛ Leu و همکاران، ۲۰۰۵؛ Li و همکاران، ۲۰۰۵a؛ Tsai و همکاران، ۲۰۰۴؛ Xie و همکاران، ۲۰۰۶). دیگر پروتئین ها شامل VP28، VP39B، VP41A، VP41B، VP124، VP150، VP68، VP51B، VP51A، VP281، VP187 و VP292 و پروتئین شبه کلاژن در غشاء جای دارند (Huang و همکاران، ۲۰۰۲a؛ Li و همکاران، ۲۰۰۴؛ Li و همکاران، ۲۰۰۶a؛ van Hulst و همکاران، ۲۰۰۱a؛ van Hulst و همکاران، ۲۰۰۱b؛ van Hulst و همکاران، ۲۰۰۲؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۵؛ Xie و همکاران، ۲۰۰۶؛ Zhang و همکاران، ۲۰۰۴؛ Zhu و همکاران، ۲۰۰۵؛ Zhu و همکاران، ۲۰۰۶). در همین حال پروتئین های VP35، VP466، VP15، VP51 و VP76 درون نوکلئوکپسید قرار گرفته اند و شاید عملکردهای متفاوتی داشته باشند (Chen و همکاران، ۲۰۰۲a؛ Huang و همکاران، ۲۰۰۲b؛ van Hulst و همکاران، ۲۰۰۱a؛ van Hulst و همکاران، ۲۰۰۲؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۶؛ Xiao و همکاران، ۲۰۰۶؛ Yang و همکاران، ۲۰۰۱). بررسی های خنثی سازی در شرایط *In vivo* با استفاده از آنتی بادی ها در برابر پروتئین های ساختاری متفاوت تأخیر معنی داری را در تلفات میگو نشان داد که مشخص کننده آن است که پروتئین هایی مثل VP28 و حتی VP24 ممکن است نقش مهمی در نفوذ ویروس داشته باشند (van Hulst و همکاران، ۲۰۰۱b؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۵؛ Yi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Xie و همکاران، ۲۰۰۶).

در میگوی چینی RNA دو رشته ای بلند مطابق با VP28 و VP281، پروتئین کیناز و RNA دورشته ای غیر مرتبط از پروتئین فلورسنت سبز سبب بازماندگی بالاتری در چالش میگوها با ویروس شده است. بالاترین بازماندگی در میگوهایی که RNA دورشته ای از VP28 و پروتئین کیناز K دریافت کرده بودند مشاهده شد (Kim و همکاران، ۲۰۰۷). مهار کامل بیماری لکه سفید در میگو با ۳ تزریق پیاپی از RNA کوتاه مزاحم در برابر VP28 در میگوی ژاپنی بدست آمد (Xu و همکاران، ۲۰۰۷).

۴-۱- ژنوم و طبقه بندی ویروس

ژنوم ویروس حلقوی با یک مولکول DNA دورشته ای است. اندازه ژنوم بسته به جدایه متغیر است (جدایه تایلند: ۲۹۳ کیلوگفت باز، جدایه چین: ۳۰۵ کیلوگفت باز و جدایه تایوان: ۳۰۷ کیلوگفت باز) (Chen و همکاران، ۲۰۰۲b؛ van Hulten و همکاران، ۲۰۰۱a؛ Yang و همکاران، ۲۰۰۱). این ژنوم ویروسی یکی از بزرگترین ژنوم‌های ویروسی است که تا به حال تعیین توالی شده است. بررسی توالی ویروس نشان داد که ژنوم ویروس دارای ۵۳۱ تا ۶۸۴ رمزگردان (ORFs) می‌باشد که با کدون شروع ATG می‌باشد. از این تعداد رمزگردان، ۱۸۱ تا ۱۸۴ رمزگردان احتمالاً پروتئین‌های عملکردی را رمزگذاری می‌کنند که اندازه‌ای بین ۵۱ تا ۶۰۷۷ اسید آمینه را دارا می‌باشند (van Hulten و همکاران، ۲۰۰۱b؛ Yang و همکاران، ۲۰۰۱).

۵-۱- مورفوژنز

مراحل مختلف مورفوژنز ویروس شناخته شده است و به طور مستقیم به توسعه ضایعات سلولی مرتبط است (Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Tsai و همکاران، ۲۰۰۶؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۹a).

مرحله ۱: مرحله اولیه عفونت سلول. سلول‌های عفونی هسته‌هایی با علامت هیپرتروفی خفیف را نشان می‌دهند. نوکلئوزوم‌های ویروسی قبل از تشکیل ذرات ویروسی ظاهر می‌شوند. پروتئین‌های ویروسی ساخته شده و در قطعات فیبریلار سازمان می‌یابند. در سیتوپلاسم شبکه اندوپلاسمی متسع شده و حاوی ریبوزوم‌های آزاد فراوانی است.

مرحله ۲: در هسته مواد فیبریلار باعث تشکیل غشاهای حلقوی می‌شوند که به زودی با مواد هسته‌ای ویروس پر می‌شوند و این شروع مراحل موتاژ و سرهم شدن ویروس است. در این مرحله گنجیدگی‌های نوع Cowdry-A ظاهر می‌شوند که به صورت یک ناحیه مات بین بافت ویروس و کروماتین متراکم به حاشیه رانده شده دیده می‌شود. هسته سلول در این مرحله هیپرتروفیک و گرد می‌شود.

مرحله ۳: در هسته سلول آلوده، نوکلئوکپسیدها ظاهر می‌شوند و تراکم پایینی دارند و به تدریج از یک انتها به سمت دیگر رشد می‌کنند. گنجیدگی‌های درون سلولی مرکزی پدیدار شده کوچکتر از مرحله دوم هستند و به دلیل وجود ذرات ویروسی فراوان بسیار متراکم‌تر می‌باشند. زمانی که کروماتین به حاشیه رانده شده ناپدید شد، غشاء هسته سلول ترکیده و ناحیه شفاف با سیتوپلاسم با یکدیگر جوش می‌خورند. بیشتر اندامک‌های غیرطبیعی از هم پاشیده یا تشکیل ساختارهای غشایی را می‌دهند.

مرحله ۴: در هسته، نوکلئوکپسیدها کامل شده‌اند. هر نوکلئوکپسید یک انتهای گرد و یک انتهای مربع شکل دارد. نوکلئوکپسیدها به طور کامل با غشاء پوشانده می‌شوند.

مرحله ۵: ذرات ویروسی شکل بیضی به خود می گیرند و بیرون زدگی دم شکل حاصل از غشاء مشاهده می شود. مواد داخلی زائده دم مانند از نوکلئوکپسید مجزا هستند. سپس نوکلئوکپسیدها کوتاه تر، ضخیم تر و متراکم تر می شوند.

مرحله ۶: مرحله آخر مورفوژنز. ویریون های بالغ بیضی شکل با غشاء صاف احاطه می شوند. برخی اوقات سرهم شدن نوکلئوکپسیدها به طور کامل جدای از غشاء صورت گرفته و در نهایت با غشاء پوشانده می شوند. در این مرحله سلول های آلوده شدیداً آسیب دیده و می ترکند. فضاهای خالی به دلیل سلول های متلاشی شده در بافت قابل مشاهده است.

۶-۱- علایم بالینی و آسیب شناسی

در شرایط پرورشی، بسیاری از گونه های پنائیده آسیایی و آمریکایی آلوده به ویروس نقاط سفید واضحی با قطر ۰/۵ تا ۳ میلی متر را در اسکلت خارجی نشان می دهند (Kasornchandra و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۶a؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۱). مکانیسم واقعی تشکیل لکه های سفید ناشناخته است. ممکن است که عفونت لکه سفید سبب نقص عملکردی تگومنت شود که در نتیجه تجمع نمک های کلسیم در کوتیکول رخ می دهد و لکه های سفید ظاهر می شوند (Wang و همکاران، ۱۹۹۹a). علایم دیگر شامل قرمزی بدن و ضمائم به دلیل گسترش کروماتوفورها (Lightner و همکاران، ۱۹۹۸؛ Nadala و همکاران، ۱۹۹۸)، کاهش غذا خوردن (Chou و همکاران، ۱۹۹۵؛ Durand و همکاران، ۱۹۹۶؛ Flegel، ۱۹۹۷)، کاهش تمیز کردن آبشش ها و پاسخ به محرک ها (Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵)، کوتیکول نرم (Lo و همکاران، ۱۹۹۶b)، تورم زوائد برانشیواستگال به دلیل تجمع مایع (Otta و همکاران، ۱۹۹۹)، تورم و بی رنگ شدن هیاتوپانکراس (Sahul-Hameed و همکاران، ۱۹۹۸) و همولنف رقیق و تأخیر در لخته شدن می باشد (Kiatpathomchai و همکاران، ۲۰۰۱؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۰).

در سطح مزارع، میگوهای بیمار کناره استخرها تجمع کرده و ۲-۱ روز قبل از تلفات علایم بیماری را نشان می دهند (Kou و همکاران، ۱۹۹۸). تلفات تجمعی ممکن است ظرف مدت ۱۰ روز به ۱۰۰ درصد برسد (Karunasagar و همکاران، ۱۹۹۷؛ Lotz و Soto، ۲۰۰۲). در استخرهای پرورشی، میگوهای جوان در هر سن و اندازه ای به بیماری حساس هستند اما تلفات سنگین ۲-۱ ماه پس از ذخیره سازی بروز می کند (Kasornchandra و همکاران، ۱۹۹۸). در هیستوپاتولوژی عفونت لکه سفید با سلول هایی با هسته های هیپرتروفی شده مشخص می شوند و گنجیدگی هایی داخل هسته ای و کروماتین به حاشیه رانده شده دیده می شود (Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۰). این گنجیدگی های داخل هسته ای به طور محسوسی مشخص بوده و بزرگتر از گنجیدگی های پدید آمده در بیماری IHHNV هستند (Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵). هسته های آلوده بازوفیلی و متسع می شوند (Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Durand و همکاران، ۱۹۹۶؛ Flegel، ۱۹۹۷؛

Lo و همکاران، ۱۹۹۶b؛ Otta و همکاران، ۱۹۹۹؛ Takahashi و همکاران، ۲۰۰۰؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۸a). ممکن است در مراحل پایانی عفونت شکسته شدن هسته و پارگی سلول رخ بدهد که منجر به تشکیل نقاط نکرزهای می شود که مشخصه آن واکوئله شدن بافت است (Karunasagaret و همکاران، ۱۹۹۷؛ Kasornchandra و همکاران، ۱۹۹۸؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۹a).

۷-۱- بیماری زایی

روش های تجربی تلقیح ویروس لکه سفید که راه های طبیعی ورود ویروس را شبیه سازی می کند توسعه یافته است. روش های تلقیح شامل: انتقال از طریق آب، به واسطه غوطه وری میگوها در آب حاوی سوسپانسیون ویروسی (Chou و همکاران، ۱۹۹۸؛ Supamattaya و همکاران، ۱۹۹۸) و تغذیه با بافت های آلوده به ویروس برای یک مرتبه در روز به مدت تا ۷ روز می باشد (Chang و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lightner و همکاران، ۱۹۹۸؛ Rajan و همکاران، ۲۰۰۰؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۸b).

روش دوم بیشتر مورد توجه می باشد زیرا مهم ترین روش انتقال ویروس در شرایط طبیعی پرورش می باشد (Chou و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lotz و Soto، ۲۰۰۲؛ PramodKiran و همکاران، ۲۰۰۲؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۱).

راه های ورود ویروس لکه سفید به بدن میگو به طور مشخص شناسایی نشده است. بر اساس اطلاعات به دست آمده از آزمایشات خوراکی، مکان های اولیه تکثیر ویروس در میگوهای جوان ببری سیاه سلول های اپی تلیال زیر کوتیکولی معده و سلول های آبشش، تگومنت و بافت همبند هپاتوپانکراس می باشد (Chang و همکاران، ۱۹۹۶). در مطالعه دیگری در میگوی ژاپنی نشان داده شد که سلول های روده میانی ممکن است مکان انتقال ویروس های تکثیر شده باشد که از غشاء پایه عبور می کنند (Di Leonardo و همکاران، ۲۰۰۵). در میگوی ببری سیاه چالش با ویروس به روش غوطه وری نشان داد که مهاجرت هموسیت ها به سمت آبشش و روده میانی باعث منفی شدن این بافت ها از ویروس در مراحل پایانی عفونت می شود (۷۲-۴۸ ساعت پس از تلقیح ویروس). بسیاری از سلول های آبشش و تعداد کمی از سلول های اپی تلیوم روده میانی از لحاظ آلودگی به ویروس مثبت هستند. مطالعات با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در مراحل اولیه عفونت (۸ ساعت پس از تلقیح ویروس) VP28 در سلول های اپی تلیال روده میانی مشاهده گردید که نشانه لیز شدن ذرات ویروسی می باشد. هسته های حاوی VP28 هرگز در اپی تلیال روده میانی مشاهده نمی شوند (Arts و همکاران، ۲۰۰۷).

در یک مطالعه چالش به روش خوراکی نشان داد که بافت های اولیه تکثیر ویروس سلول های اپی تلیال روده قدامی، سلول های آبشش ها و در میزان بالای ویروس (SID50 ۱۰۰۰۰)، سلول های غدد آنتنی نیز هستند (Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۷).

مکانیسم انتشار ویروس از بافت های اولیه به سایر بافت ها قابل بحث است. در بعضی پژوهش ها هموسیت های خرچنگ دراز آب شیرین به عنوان منتقل کننده ویروس در بدن شناخته شده اند (Di Leonardo و همکاران،

Wang و همکاران، ۲۰۰۵). در مطالعات دیگری هموسیت‌های در گردش در میگوی آب شیرین و میگو به عفونت لکه سفید مقاوم بودند (Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۷؛ Shi و همکاران، ۲۰۰۵؛ van DeBraak و همکاران، ۲۰۰۲)، بنابراین احتمالاً ویروس لکه سفید از طریق همولنف در گردش به صورت سلول‌های آزاد به اندام‌های هدف می‌رسد و ممکن است که این مکانیسم‌ها وابستگی میزبانی داشته باشند (Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۷).

سلول‌های اندام‌های هدف ویروس لکه سفید عبارتند از اندام‌های با منشاء اکتودرم و مزودرم که شامل: اپی‌درم، آبشش‌ها، روده قدامی، روده خلفی، غدد آنتنی، ارگان لنفوئیدی، عضلات، پایه چشم، قلب، گنادها، سلول‌های بافت خونساز و سلول‌های مرتبط با بافت عصبی می‌باشند (Chang و همکاران، ۱۹۹۶ و ۱۹۹۸؛ Durand و همکاران، ۱۹۹۶؛ Kou و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۷؛ Rajendran و همکاران، ۱۹۹۹؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۹b؛ Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵). سلول‌های اپی‌تلیال اندام‌های آندودرومی از قبیل هپاتوپانکراس، سکوم قدامی و خلفی روده میانی و مجرای روده میانی به ویروس لکه سفید مقاوم هستند (Sahul-Hameed و همکاران، ۱۹۹۸). در مراحل پایانی عفونت سلول‌های اپی‌تلیوم معده، آبشش‌ها و پوسته به شدت آسیب می‌بینند که این حالت ممکن است به نقص عملکردی چندین اندام منجر شده و در نهایت سبب مرگ شود (Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۹a).

مولکول‌هایی با عملکرد مهم بیولوژیکی که در پاسخ به عفونت ویروس لکه سفید متغیرند عبارتند از آن‌هایی که در تولید انرژی، سنتز اسید نوکلئیک، هموستاز کلسیم و یا ارتباطات سلولی دخیل هستند. بسیاری از این قبیل مولکول‌ها ممکن است به عنوان نشانگرهای بیولوژیکی مفید باشند و احتمالاً برای تعیین اندام‌های هدف و کنترل تکثیر ویروس مناسب باشند (Wang و همکاران، ۲۰۰۷).

۸-۱- میزبانان ویروس

ویروس لکه سفید طیف وسیعی از میزبانان را در بین سخت پوستان ده پا دارا می‌باشد. حداقل ۱۸ گونه میگوی وحشی و پرورشی از خانواده پنائیده، ۸ گونه کاریدین (caridean)، ۷ گونه لابستر، ۷ گونه از خرچنگ درار آب شیرین و ۳۸ گونه خرچنگ پهن یافت شده‌اند که به ویروس لکه سفید آلوده بوده‌اند (Chou و همکاران، ۱۹۹۸؛ Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Lightner و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۶b؛ Sahul-Hameed و همکاران، ۲۰۰۳). علاوه بر این ویروس لکه سفید در ۶ گونه سخت پوست غیر ده پا نیز شناسایی شده است (Hossain و همکاران، ۲۰۰۱؛ Supamattaya و همکاران، ۱۹۹۸) مثل فلش کرم‌های شکارچی (Chaetognata predatory worms)، روتیفرها، کرم‌های پرتار (polychaete worms) و بعضی از لاروهای حشرات آبی. بعضی از گونه‌های وحشی مثل کرم‌های پرتار را شاید بتوان به عنوان ناقل مکانیکی به حساب آورد فقط در آزمایش PCR مثبت بوده‌اند (Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۸). ویروس لکه سفید همچنین می‌تواند از شکل اینستار (instar)

آرتمیا به فرم تولیدمثل کننده کیست آرتمیا منتقل شود، اما در طول تفریخ در مرحله ناپلی غیر قابل تشخیص است (Li و همکاران، ۲۰۰۳).

۹-۱- همه گیری‌های طبیعی

رشد سریع صنعت آبی‌پروری میگوهای پنائیده همراه با افزایش جابجایی میگوهای زنده و مرده آلوده در سطح بین‌المللی به گسترش سریع ویروس کمک کرده و توسعه آبی‌پروری میگو در سطح جهان را مورد تهدید قرار داده است (Durand و همکاران، ۲۰۰۰). امکان انتقال افقی ویروس از طریق هم جنس خواری و مسیرهای انتقال آب دلیلی بر گسترش سریع ویروس در جمعیت میگوها به شمار می‌رود (Wu و همکاران، ۲۰۰۱). همه گیری‌هایی از بیماری در آسیا بعد از اولین کشف بیماری در تایوان در سال ۱۹۹۲ بروز کرد (Chou و همکاران، ۱۹۹۵؛ Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۸). در سال ۱۹۹۳ بیماری لکه سفید باعث سبب تلفات زیادی در میگوهای پنائیده در ژاپن و کره شد و این سویه از ویروس حدس زده می‌شود که از همان منشاء جدایه‌های تایوانی، تایلندی و چینی باشد (Inouye و همکاران، ۱۹۹۴؛ Moon و همکاران، ۲۰۰۳). ویروس لکه سفید در میگوهای مونودون پرورشی در سال ۱۹۹۴ در مالزی شناسایی شد (Wang و همکاران، ۱۹۹۹b). ویروس در سال ۱۹۹۵ در تگزاس آمریکا نیز گزارش شد (Rosenberry، ۱۹۹۶). از سال ۱۹۹۹ ویروس همچنین سبب تلفات در میگوهای سفید غربی پرورشی در اکوادور (Rodriguez و همکاران، ۲۰۰۳) مکزیک (Galaviz-Silva و همکاران، ۲۰۰۴) شد که باعث خسارات جدی به صنعت پرورش میگو هم در مرکز و هم در جنوب قاره آمریکا شد (Global Aquaculture Alliance، ۱۹۹۹b). واردات میگوهای منجمد از آسیا احتمالاً منشاء انتشار ویروس لکه سفید به قاره آمریکا بود (Lightner و همکاران، ۱۹۹۷).

گمان می‌رود که ویروس لکه سفید به مزارع پرورش میگو در استرالیا و اسپانیا در سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۱ به واسطه معرفی میگوهای آلوده فریز شده که به عنوان غذای تازه برای مولدین استفاده می‌شدند رسیده باشد (OIE، ۲۰۰۳a). ویروس همچنین سبب بیماری میگوها در فرانسه و ایران در سال ۲۰۰۲ شد (Rosenberry، ۲۰۰۲). این ویروس در جمعیت‌های خرچنگ آب اطلس (Atlantic blue crab) نیز گزارش شده است (Chang و همکاران، ۲۰۰۱).

بیماری لکه سفید به عنوان یک بیماری قابل گزارش توسط OIE معرفی شده و آزمایشات تشخیصی برای شناسایی ویروس در دسترس می‌باشد (OIE، ۲۰۰۳a). LO و همکاران (۱۹۹۶a) اولین بار آزمایش تشخیص ویروس لکه سفید را بر پایه تکثیر توالی خاصی از نوکلئوتید ویروس (PCR) انجام دادند.

۱-۱۰- انتقال ویروس

ویروس لکه سفید می‌تواند به صورت افقی و عمودی بین میگوها منتقل شود (Soto و Lotz، ۲۰۰۲؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۱) و در دیگر گونه‌های سخت پوستان وحشی و پرورشی و موجودات آبی از قبیل خرچنگ دراز آب شیرین، خرچنگ‌های پهن، کوبه‌پودها و ... بسته به میزان سطوح متفاوتی از تلفات را ایجاد می‌کند (Jesus و همکاران، ۲۰۰۷). عفونت میگو با ویروس لکه سفید به دلایل متعددی بروز می‌کند که عبارتند از انتقال سریع ویروس در سیستم‌های پرورش، میگوهای آلوده، آب و هم‌جنس‌خواری میگوهای بی‌حال (Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۱). اما مولدین آلوده و پست لاروهای آلوده نیز منبع عمده عفونت برای میگوهای یک مزرعه به حساب می‌آیند. منابع بالقوه برای انتقال ویروس فعالیت‌های انسانی، مهاجرت پرندگان دریایی دیگر حیوانات، محصولات غذایی منجمد آلوده، رسوبات آلوده استخرها، وسایل و ابزار آلوده آبی‌پروری و میگوهای آلوده درمان نشده می‌باشند (Lightner و همکاران، ۱۹۹۷).

۱-۱۱- ایمنی ضد ویروسی

در سخت پوستان فقط ایمنی ذاتی بدون حافظه سرم شناسی وجود دارد (Lee و Söderhäll، ۲۰۰۲). ایمنی ذاتی شامل سدهای فیزیکی، پاسخ سلولی و خونی است. کوتیکول سفت و مومی شکل در سخت پوستان به عنوان یک سد مکانیکی در برابر حمله عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند (Brey و همکاران، ۱۹۹۳؛ Lee و Söderhäll، ۲۰۰۲). فاکتورهای خونی به طور عمده از هموسیت‌ها منشأ می‌گیرند و در طی پاسخ ایمنی آزاد می‌شوند. موادی که در طی پاسخ ایمنی خونی (humoral) آزاد می‌شوند شامل: لک‌تین‌ها، آنزیم‌های دفاعی (فنل اکسیداز)، لیوپروتئین‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی، پروتئین متصل شونده به بتا ۱،۳ گلوکان، پروتئین متصل شونده به لیپوپلی ساکارید (LPS)، پروتئین متصل شونده به پپتیدوگلیکان و میانجی‌های اکسیژن فعال هستند. هموسیت‌ها در ایجاد لخته، شناسایی ذرات خارجی، فاگوسیتوز، ملانیزه کردن، کپسوله کردن، کشندگی سلولی و ارتباطات سلول به سلول نقش دارند (Lee و Söderhäll، ۲۰۰۲؛ Newman و Bullis، ۲۰۰۱). بیشترین پاسخ‌های سلولی و خونی مطالعه شده در برابر عفونت‌های باکتریایی، قارچی و انگلی هستند. مطالعات اخیر شواهدی از ایمنی ضد ویروسی در میگوها را مشخص کرده است که مشتمل بر وجود گیرنده‌های شبه Toll (TLR)، تداخل RNA (RNA)، مواد ضد ویروسی در بافت‌ها و ژن‌های ایمنی می‌باشد. TLR در پستانداران به عنوان فعال‌کننده سلول‌های ایمنی فعالیت می‌کند، همچنین علامت‌دهی داخل سلولی بر علیه عفونت، شناسایی لیپوپلی ساکارید، پپتیدوگلیکان و لیوپروتئین‌ها را داشته و در ایمنی ضد ویروسی نیز دخیل می‌باشد (Barton، ۲۰۰۷؛ Schröder و Bowie، ۲۰۰۵). TLR در میگوی سفید غربی و میگوی ببری غول پیکر (*P.monodon*) شناسایی شده است (Arts و همکاران، ۲۰۰۷؛ Yang و همکاران، ۲۰۰۷). نقش TLR در میگوها در برابر عفونت ویروسی همچنان در حال بررسی است. ژن‌های کننده برای تداخل RNA (RNA) در میگوی سفید غربی یافت شده است (Robalino و همکاران، ۲۰۰۷).

تزریق RNA دورشته‌ای (dsRNA) در میگوی سفید غربی ایمنی ضد ویروسی را القاء می‌کند (Robalino و همکاران، ۲۰۰۴).

همچنین در میگوی چینی (*P. chinensis*) RNAهای کوتاه تداخل کننده (SiRNA) مرتبط با پروتئین‌های ویروسی VP15 یا VP28 در کاهش تلفات در میگوی ببری سیاه و میگوی ژاپنی (*P. japonicus*) مؤثر بوده است (Kim و همکاران، ۲۰۰۷؛ Westenberg و همکاران، ۲۰۰۵؛ Xu و همکاران، ۲۰۰۷).

Xu و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که به وسیله چندین تزریق از RNA کوتاه تداخل کننده پروتئین ویروسی VP28 از رونوشت برداری و تکثیر ویروس لکه سفید جلوگیری می‌شود. ژن ضد ویروس PmAV از میگوی ببری سیاه آلوده به ویروس لکه سفید کلون شد. PmAV از روز دوم پس از آلودگی با میزان بالای ویروس در هپاتوپانکراس بیان می‌شود. این ژن در شرایط *In vitro* در برابر اثر سیتوپاتیک (CPE) ایریدوویروس هامور سنگاپور (SGIV) مؤثر بود (Luo و همکاران، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۷).

یک ژن دیگر به نام فاکتور ضد پلی ساکارید (Antipolysaccharide factor) در خرچنگ دراز آب شیرین گونه *Pacifastacus leniusculus* پس از تزریق با ویروس غیر فعال شده با اشعه ماوراء بنفش مشاهده شد. این فاکتور سبب تکثیر کمتر ویروس و افزایش تلفات آهسته تر در مقایسه با آن‌هایی که فقط ویروس دریافت کرده بودند شد (Liu, H. و همکاران، ۲۰۰۶).

۲۲ ژن ضد ویروس که پروتئین‌هایی مثل پروتئین شبه اینترفرون (Interferon like protein) و پروتئین شبه اولیگوسنتتاز (oligo synthetase like protein) را کد می‌کنند در هموسیت میگوهای ژاپنی بازمانده از شیوع بیماری لکه سفید یافت شده است (He و همکاران، ۲۰۰۵). دو پروتئین از هموسیاینین میگوی ببری سیاه آلوده به ویروس لکه سفید جدا شد. این پروتئین‌ها در شرایط *In vitro* از تکثیر ویروس‌های ایریدوویروس هامور سنگاپور، ویروس قورباغه ۳ (FV3)، ویروس لنفوسیتیس (LDV)، رئوویروس تردفین (ThRV)، بیرناویروس ماهی آنجل (ABV) و ویروس نکروز عفونی پانکراس (IPN) جلوگیری کردند (Zhang و همکاران، ۲۰۰۴). مواد ضد ویروس در بافت‌های استخراج شده از میگوی سفید شمالی (*P. stiferus*) خرچنگ آبی آتلانتیک (*Callinectes sapidus*) و خرچنگ قرمز مرداب (*Procambarus clarkii*) یافت شده است. این مواد در برابر ویروس واکسین (Vaccina virus)، ویروس فلج اطفال (*poliovirus*)، ویروس منگو (*mengovirus*)، ویروس *Sindbis*، ویروس *Banji* و ویروس تورم دهان و زیکولی (vesicular stomatitis virus) در شرایط *In vitro* مؤثر بوده اند (Pan و همکاران، ۲۰۰۰).

Gross و همکاران در سال ۲۰۰۱ ژن‌های ایمنی را در هموسیت‌ها و هپاتوپانکراس میگوی سفید غربی و میگوی سفید شمالی مبتلا به بیماری لکه سفید گزارش کردند.

پروتئین‌های شوک حرارتی ۹۰ و ۷۰ (Heat shock protein: HSP90, HSP70)، سینتاز ترهالوز-فسفات (TPS) و یوبیکوئیتین سی (ubiquitin C) در میگوی چینی مبتلا به لکه سفید افزایش می‌یابد (Wang و همکاران، ۲۰۰۶).

سطوحی از دیگر فاکتورهای ایمنی از قبیل فنل اکسیداز، لیزوزیم، همولیزین و هماگلوتینین در میگوهای بازمانده از وقوع بیماری بالاتر بوده است (He و همکاران، ۲۰۰۵).

Venegas و همکاران (۲۰۰۰) یک پاسخ شبه ایمنی (quasi immune response) و همچنین حضور یک مولکول خنثی کننده ویروس لکه سفید را در پلاسمای میگوی ژاپنی زنده مانده از بروز طبیعی بیماری لکه سفید گزارش کردند.

لاروهایی که از مولدین ببری سیاه تزریق شده با بتا ۱،۳ و ۱،۶ گلوکان تولید شده بودند بازماندگی بهتری را در برابر چالش با ویروس لکه سفید در مقایسه با گروه شاهد که فقط سالیین دریافت کرده بودن نشان دادند. پس از این آزمایش محققین فرضیه انتقال ایمنی از مولدین به پست لاروها را مطرح نمودند (Song و Huang، ۱۹۹۹). Roux و همکاران (۲۰۰۲) اعلام کردند که در میگوهای سفید شمالی آلوده به ویروس لکه سفید ژن های مرتبط با پروتئین های متصل شونده به لیپوپلی ساکارید و بتا ۱،۳ گلوکان افزایش (upregulated) می یابند. این تحقیق پاسخ عمومی دفاعی سخت پوستان در برابر انواع مختلفی از عوامل بیماری زا (ویروس، باکتری و قارچ) را نمایان ساخت.

بروز بیماری در میگوها به دلیل ویروس های مثل IHNV، YHV، TSV و WSSV با تلفات شدید ابتدایی شروع شده به دنبال آن عفونت مزمن در بازمانده ها بروز می کند. پدیده باقیماندن عفونت را تطابق ویروسی (viral accommodation) می نامند. سازوکار عفونت پایدار در میگو ناشناخته است. ذرات ناقص ویروسی یا اثر بر آپوپتوز ویروسی را می توان در این سازوکار دخیل دانست (Flegel، ۲۰۰۷). سلول های آپوپتوتیک را در عفونت های طبیعی و تجربی با ویروس لکه سفید گزارش کرده اند (Sahtout و همکاران، ۲۰۰۱؛ Sahul Hameed و همکاران، ۲۰۰۶؛ Wongprasert و همکاران، ۲۰۰۳). در طول بررسی عفونت لکه سفید افزایش سلول های آپوپتوتیک مشاهده شد اما هنوز مشخص نیست که آیا آپوپتوز مرحله ای منتهی به مرگ می شود یا محافظت در برابر ویروس (Wongprasert و همکاران، ۲۰۰۳).

۱۲-۱- کنترل ویروس لکه سفید

زیان های اقتصادی ناشی از ویروس لکه سفید در صنعت آبرزی پروری محققان را مجبور به توسعه استراتژی هایی برای کنترل یا مدیریت عفونت لکه سفید و بروز بیماری نموده است. مطالعات متعددی بر روی کنترل ویروس لکه سفید انجام شده است و اقدامات کنترلی، برخی اثربخشی ها را بر علیه ویروس لکه سفید در شرایط آزمایشی نشان داده است. درمان با مواد شیمیایی از طریق استریلیتی و الکتروشیمی آب، با استفاده مداوم، پیشگیری مؤثری را در برابر ویروس لکه سفید در میگو نشان داده است (Park و همکاران، ۲۰۰۴). میتیلین که یک پپتید ضد میکروبی است و در هموسیت های صدف ها به وفور یافت می شود می تواند از تکثیر DNA ویروس جلوگیری نماید (Dupuy و همکاران، ۲۰۰۴).

علاوه بر این استفاده از بتا ۳ و گلوکان در غذای میگوی موندون بهبود قابل توجهی را در ایمنی و بقاء پس از چالش با ویروس لکه سفید نشان داده است (Chang و همکاران، ۲۰۰۳). پتیدهای استحصالی از برخی ژنهای ضدویروسی در میگوی موندون می توانی به صورت اختصاصی به ویروس لکه سفید متصل شده و عفونت ویروسی را بلوکه نمایند (Luo و همکاران، ۲۰۰۳؛ Yi و همکاران، ۲۰۰۳).

تعدیل عوامل محیطی نیز به عنوان روشی برای کنترل بیماری لکه سفید پیشنهاد شده است اگرچه که اثر اقدامات مختلف تا حدی با هم متفاوت هستند. درجه حرارت پائین آب (۲۱-۱۲ درجه سانتی گراد) بیماری زایی ویروس لکه سفید را کاهش داده و تلفات را در خرچنگ دراز آب شیرین و میگو مهار می کند (Dupuy و همکاران، ۲۰۰۴؛ Jiravanichpaisal و همکاران، ۲۰۰۴).

همچنین هیپرترمی میزان بقاء میگوهای بیمار را افزایش می دهد که احتمالاً از طریق تسهیل آپوپتوزیس در میگوهای سفید غربی آلوده به ویروس می باشد (Granja و همکاران، ۲۰۰۳). کاهش تلفات در میگوهای جوان سفید غربی در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد مشاهده شد اما فقط در مراحل اولیه عفونت این حالت بروز می کند (Rahman و همکاران، ۲۰۰۶). اگرچه در بی مهرگان در مقایسه با مهره داران پاسخ ایمنی اکتسابی واقعی وجود ندارد، نشان داده شده است که چندین فرآورده قادر به تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی بی مهرگان در آزمایشات بوده اند. استفاده از باکتری های پروبیوتیک (Balcázar و همکاران، ۲۰۰۷؛ Balcázar و Rojas-Luna، ۲۰۰۷؛ Li و همکاران، ۲۰۰۷؛ Mathieu و همکاران، ۲۰۰۸؛ Solano و Soto، ۲۰۰۶) بر پایه اصول حذف رقابتی و استفاده از محرک های سیستم ایمنی دو روش پیشگیری طی چندین سال اخیر بوده اند (Chotigeat و همکاران، ۲۰۰۴). سویه های پروبیوتیک جدا شده از آب استخرهای پرورش میگو و روده گونه های مختلف میگوی پنائیده به صورت قابل توجهی افزایش مقاومت و تحمل را در برابر ویروس لکه سفید نشان داده اند (Jiqui و همکاران، ۲۰۰۹).

واکسیناسیون نیز به عنوان یکی از روش های کنترلی بیماری لکه سفید پیشنهاد شده است (Johnson و همکاران، ۲۰۰۸). نشان داده شده است که احتمالاً یک عامل خنثی کننده همورال در میگوهای در حال بهبودی پس از چالش با ویروس لکه سفید وجود دارد که به شکل بالقوه ای می تواند به عنوان یک روش درمانی بر علیه ویروس لکه سفید توسعه یابد (Venegas و همکاران، ۲۰۰۰؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۲). تطابق با ویروس در سطوح پائین به علت فراهم شدن حافظه ی خاص از عفونت قبلی به عنوان توضیحی برای این محافظت ارائه شده است (Flegel، ۲۰۰۷). با این حال شواهد مولکولی این فرضیه دست نیافتنی باقی مانده است. تزریق داخل عضلانی (Namikoshi و همکاران، ۲۰۰۴) یا خوراکی (Singh و همکاران، ۲۰۰۵) از ویروس غیرفعال شده با فرمالین محافظت خوب اما کوتاهی را در برابر ویروس لکه سفید برای مدت تا ۱۰ روز پس از واکسیناسیون نشان داد. پروتئین های نو ترکیب بیان شده غشاء که به عنوان واکسن های زیرواحد (Subunit) مورد استفاده قرار گرفتند، افزایش تحمل و حفاظت نسبی در برابر ویروس لکه سفید را در یک گونه خرچنگ دراز آب شیرین و گونه های مختلفی از میگو نشان

دادند. این حفاظت هم از راه پروتئین‌های خالص شده و هم از طریق پروتئین بیان شده در باکتری‌های غیر فعال (تجویز شده به روش‌های خوراکی، تزریقی یا غوطه وری) حاصل شده است اما فقط تا ۱۴ روز پس از واکسیناسیون این حفاظت باقی مانده است (Du و همکاران، ۲۰۰۶؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۷؛ Rout و همکاران، ۲۰۰۷؛ Vaseeharan و همکاران، ۲۰۰۶؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴ و Xu و همکاران، ۲۰۰۶).

بیان پروتئین غشاء ویروس VP28 در سیستم بیانی پروکاریوتی محافظتی را در خرچنگ دراز آب شیرین در برابر ویروس لکه سفید نشان داده است. به طور قابل ملاحظه‌ای پروتئین بیان شده در سیستم یوکاریوتی محافظت بهتری را در مقایسه با محصول بیانی باکتریایی داشته است (Du و همکاران، ۲۰۰۶). این ممکن است راندمان تاخوردگی صحیح و یا اصلاحات پس از ترجمه این پروتئین را منعکس نماید که دارای چندین مکان مورد قبول برای گلیکوزیلاسیون و فسفوریلاسیون است وقتی که در یک سیستم یوکاریوتی بیان می‌شود. نشان داده شده است که DNA واکسن‌ها (DNA Vaccines) (مشمول بر DNA نوترکیب پلاسمیدها که پروتئین‌های غشایی VP28 یا VP281 را تحت کنترل پروموتور CMV بیان می‌کند) میگوی مونودون را در برابر ویروس لکه سفید تا ۵۰ روز پس از واکسیناسیون محافظت می‌کنند. اما پاسخ محافظتی با پروتئین‌های نوکلئوکپسیدی VP15 و VP35 حاصل نمی‌شود (Rout و همکاران، ۲۰۰۷). با این شواهد حدس زده می‌شود که مکانیسم محافظتی، نیاز به حضور مستمر پروتئین‌های خاص سطحی ویروس برای شناسایی ذرات ویروسی در طول ورود به سلول دارد. در نتیجه درک بهتری از مکانیسم‌های حفاظتی برای توسعه راهبرد عملی واکسیناسیون ضروری است (Johnson و همکاران، ۲۰۰۸).

۲- مواد و روش ها

۲-۱- نمونه گیری و استخراج DNA

به منظور دستیابی به ویروس لکه سفید طی بازدید از مزارع پرورش میگوی استان خوزستان در منطقه چوئبده آبادان (خرداد تا مهرماه ۱۳۹۰) میگوهای بیمار و دارای علائم بالینی از سطح مزارع پرورش میگوی چوئبده آبادان انتخاب گردیدند، پای شنا، نیمی از آبشش ها و قسمتی از عضله میگو به منظور بررسی آلودگی به ویروس لکه سفید در الکل ۹۶ درجه نگهداری شد و باقیمانده بافت میگو، پس از تأیید آلودگی، به عنوان منبع ویروس در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲-۲- استخراج DNA

مقداری از نمونه (آبشش و پای شنا) درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شده، ۰/۶ میلی لیتر از محلول دی تب (DTAB) (ژن ریچ، تایوان) به آن اضافه شد. توسط گریندرهای یک بار مصرف نمونه درون آن خرد گردیده، در حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. پس از خارج نمودن میکروتیوب از حمام آب گرم به طور مختصر مجدداً همزنی انجام شده، ۰/۷ میلی لیتر کلروفرم به آن اضافه گردیده به مدت ۲۰ ثانیه مخلوط شده و بعد از آن ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی آن به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شده، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سی تب (CTAB) (ژن ریچ، تایوان) و ۹۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به آن افزوده شد. میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از آن اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسد. به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. با دقت مایع بیرون ریخته شده و با ۱۵۰ میکرولیتر ماده حلال (Dissolve solution) (ژن ریچ، تایوان) پلت ایجاد شده در ته میکروتیوب دوباره حل گردیده، به مدت ۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از آن تا رسیدن به دمای اتاق، خنک شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، محلول شفاف به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شده، به میزان ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ به آن اضافه گردید. بعد از همزنی مختصر، سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، شستن پلت با اتانول ۷۰٪ به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر انجام شد و در آخر محلول فوقانی خارج شد و پلت موجود در کف میکروتیوب در دمای اتاق خشک شد. در پایان ۵۰ میکرولیتر آب DEPC به میکروتیوب افزوده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

۲-۳- پرایمر

پرایمرهای اختصاصی ژنهای کد کننده پروتئین VP28 و VP19 بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط Jeroen Witteveldt (۲۰۰۶) انتخاب گردید و به منظور انجام کلونینگ در انتهای ۵' این پرایمرها مکان برش آنزیمهای محدودگر Sall و HindIII نیز قرار داده شد.

۴-۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

تکثیر ژن‌های VP28 و VP19 بوسیله PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر ژنوم الگو، ۰/۴ میکرولیتر (۲/۵ واحد در میکرولیتر) آنزیم Pfu، ۵ میکرولیتر بافر آنزیم Pfu، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر پرایمر و ۳۸/۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل انجام شد (جدول ۳-۳).

جدول ۲-۱- مواد و مقادیر استفاده شده در برنامه تکثیر ژن‌های VP28 و VP19

۲ μl	DNA
۵ μl	Pfu بافر آنزیم
۱/۵ μl	کلرید منیزیم (۵۰ mM)
۱ μl	dNTP mixes (10 mM)
۱ μl	پرایمر F (۲۰ pmol/μl)
۱ μl	پرایمر R (۲۰ pmol/μl)
U/ μl) ۲/۵ μl (۰/۴	Pfu آنزیم
۳۸/۱ μl	آب دو بار تقطیر (ddH ₂ O)
۵۰ μl	حجم نهایی

۱-۴-۲- برنامه حرارتی PCR

واکنش PCR با برنامه دمایی دناتوره شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۸ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه بود. در پایان یک مرحله دمایی ۷۲ درجه نیز به مدت ۷ دقیقه اجرا گردید. این برنامه در جدول ۳-۴ نشان داده شده است.

جدول ۲-۲- برنامه حرارتی PCR ژن‌های VP28 و VP19

سیکل‌ها	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل‌ها
سیکل اول: دناتوره شدن ابتدایی	۹۵°C	۲'	۱
سیکل دوم دنا توره شدن اتصال پرایمرها ستتر	۹۴°C	۴۵"	۳۵
	۴۸°C	۱'	
	۷۲°C	۲'	
سیکل سوم: ستتر نهایی	۷۲°C	۷'	۱

۲-۴-۲- بررسی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز

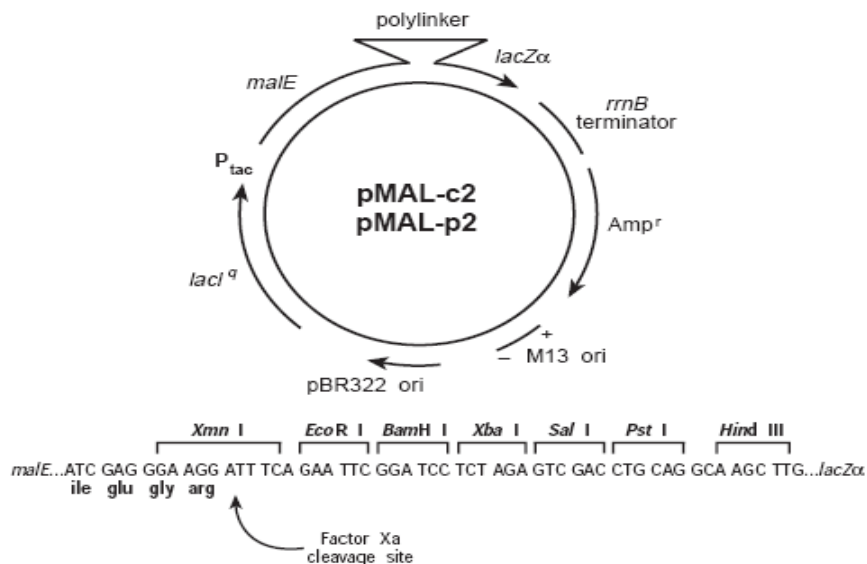
مقدار ۰/۸ گرم از پودر آگارز وزن شده و در ۸۰ میلی لیتر بافر TAE (1X) در یک ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حل و جوشانده شد. پس از رسیدن دمای ژل به حدود ۵۰ درجه سانتیگراد، مقدار ۲/۸۳ میکرولیتر از رنگ Safe Stain به محلول اضافه و سپس ژل در قالب مخصوص از پیش آماده شده ریخته شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲). پس از تهیه ژل آگارز، ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و درون ژل بارگذاری گردید. همچنین جهت اطمینان از صحت طول قطعه تکثیر شده از نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی استفاده گردید. پس از پایان الکتروفورز جهت مشاهده باندهای تفکیک شده، ژل در دستگاه ترانس لومیناتور (Transilluminator) قرار داده شد و با تابش نور فرابنفش (UV) بر روی ژل، باند DNA تکثیر یافته از نظر صحت طول مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۴-۳- خالص سازی محصول PCR

برای خالص سازی محصول PCR برای انجام آزمایشات بعدی (هضم آنزیمی و کلونینگ) از ژل آگارز یک درصد و کیت استخراج از روی ژل شرکت بایونیر (Gel Purification Kit® AccuPrep) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید و محصول در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۲-۵- تکثیر و خالص سازی وکتور

در این تحقیق به منظور کلونینگ و بیان ژنهای VP28 و VP19 از وکتور بیانی پروکاریوتی pMal-c2X، محصول شرکت نیوانگلند بیولاب (New England Biolabs) استفاده شد (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲- نقشه پلاسمید pMal-c2X و خصوصیات آن

- به منظور تکثیر و ازدیاد وکتور pMAL-c2X، این وکتور بوسیله ترانسفورماسیون و با استفاده از روش شوک حرارتی و به کمک کلرید کلسیم به باکتری انتقال داده شد. ترانسفورماسیون طی مراحل زیر انجام شد.
- ابتدا باکتری *E. Coli* سویه TG1 در محیط LB مایع به صورت شبانه در دمای 37°C با شیک متوسط کشت داده شد.
 - کشت شبانه باکتری به نسبت ۱/۱۰۰ به محیط LB مایع تازه اضافه گردید و در دمای 37°C با شیک متوسط انکوبه شد تا OD₆₀₀ آن به ۰/۶-۰/۴ رسید.
 - به منظور تهیه رسوب از باکتری با تراکم مورد نظر، ۱/۵ میلی لیتر از کشت مایع حاوی باکتری درون میکروتیوب ریخته شد و با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید و محلول رویی کاملاً تخلیه و دور ریخته شد.
 - به رسوب حاصل ۳۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد اضافه گردید. بعد از پی پت کردن و به دست آمدن یک سوسپانسیون یکنواخت به مدت ۳۰ دقیقه بر روی رک یخ در یخچال قرار داده شد.
 - سپس میکروتیوب با دور سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید.
 - محلول رویی کاملاً تخلیه و دور ریخته شد.
 - در این مرحله به رسوب حاصل ۲۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد اضافه گردید و بعد از پی پت کردن و ایجاد یک سوسپانسیون یکنواخت به مدت ۳۰ دقیقه بر روی رک یخ در یخچال قرار داده شد.
 - مجدداً میکروتیوب با دور سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید.
 - محلول رویی کاملاً تخلیه و دور ریخته شد.
 - به رسوب موجود در میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد اضافه شد و به مدت ۷ دقیقه بر روی رک یخ در یخچال قرار داده شد. در این مرحله باکتری‌ها مستعد دریافت پلاسمید هستند.
 - پس از مدت زمان ۷ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های پذیرا (Competent) به آهستگی به ۱ میکرولیتر پلاسمید بر روی یخ افزوده شد و به آرامی پی پت کرده تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید.
 - میکروتیوب حاوی باکتری‌های پذیرا و پلاسمید به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد (دمای یخچال) روی رک یخ قرار داده شد.
 - میکروتیوب به مدت ۹۰ ثانیه به بن ماری با دمای ۴۲ درجه سانتی گراد منتقل شد.
 - بلافاصله پس از مدت زمان ۹۰ ثانیه سوسپانسیون به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد و در نهایت به میکروتیوب حاوی باکتری و پلاسمید ۹۰۰ میکرولیتر محیط LB بدون آمپی سیلین اضافه گردید تا به حجم

یک میلی‌لیتر برسد. میکروتیوب حاوی باکتری و پلاسمید به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با شیک متوسط انکوبه گردید.

- در پایان یک ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق بر روی محیط LB جامد حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی‌سیلین در هر میلی‌لیتر محیط منتقل و به صورت کشت سفره‌ای گسترش تهیه و ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد.

- باقیمانده سوسپانسیون با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده، ۸۰۰ میکرولیتر از مایع رویی تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر باقیمانده نیز بر روی محیط جامد حاوی آمپی‌سیلین به صورت سفره‌ای کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت گرمخانه گذاری شد.

- از تعداد کل کلونی‌های پدیدار شده تعداد ۲۰ کلونی برای اطمینان از حضور و کتور انتخاب و در محیط LB جامد آمپی‌سیلین دار به صورت خطی کشت داده شدند.

۶-۲- استخراج پلاسمید با استفاده از کیت

یکی از کلونی‌های کشت داده شده انتخاب و برای استخراج پلاسمید با کیت استفاده گردید. در این تحقیق از کیت استخراج پلاسمید شرکت ویوانتیس (مالزی) استفاده شد.

۷-۲- مراحل کلونینگ

۱-۷-۲- هضم آنزیمی

برای انجام کلونینگ یعنی وارد کردن ژن‌های VP28 و VP19 به وکتور pMal-c2X، لازم بود که وکتور به فرم خطی تبدیل شود. این عمل باید به گونه‌ای صورت می‌گرفت که وکتور و ژن‌های مورد نظر دارای انتها‌های مکمل بوده و به راحتی به هم متصل شوند. به همین جهت بر روی هر دو محصول (وکتور و ژن‌ها) عمل هضم آنزیمی صورت گرفت. برای هضم آنزیمی ژن‌های VP28 و VP19 و وکتور با توجه به طراحی پرایمر، از آنزیم‌های محدود کننده *Sal I* و *Hind III* استفاده شد. به این منظور در واکنش‌های هضم تکی پلاسمید و در واکنش‌های هضم مضاعف ژن‌های VP28 و VP19 هضم شدند. واکنش هضم با استفاده از ترکیبات ذکر شده در جدول‌های ۲-۳ و ۲-۴ و در حجم ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت.

جدول ۲-۳- ترکیبات واکنش هضم مضاعف ژن VP28

مقدار (میکرولیتر)	اجزاء
۷	محصول PCR خالص VP28
۴	بافر (2X) Tango
۱ (۱۰ واحد)	آنزیم Sal I
۱ (۱۰ واحد)	آنزیم Hind III
۷	آب DEPC
۲۰	حجم نهایی

جدول ۲-۴- ترکیبات واکنش هضم مضاعف ژن VP19

مقدار (میکرولیتر)	اجزاء
۷	محصول PCR خالص VP19
۴	بافر (2X) Tango
۱ (۱۰ واحد)	آنزیم Sal I
۱ (۱۰ واحد)	آنزیم Hind III
۷	آب DEPC
۲۰	حجم نهایی

به مخلوط‌های فوق ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی اضافه شده به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس برای غیرفعال شدن آنزیم‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از هضم، کارآیی واکنش با الکتروفورز ۱ میکرولیتر از ژن هضم شده مورد تأیید قرار گرفت (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).
به منظور هضم پلاسمید از روش هضم تکی از ترکیب زیر استفاده گردید:

جدول ۲-۵- ترکیبات واکنش هضم پلاسمید با آنزیم Sal I

مقدار (میکرولیتر)	اجزاء
۱۰	پلاسمید خالص
۲	بافر (10X) B4
۱ (۱۰ واحد)	آنزیم Sal I
۷	آب DEPC
۲۰	حجم نهایی

به مخلوط فوق ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی اضافه شده به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سپس برای غیرفعال شدن آنزیم ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. کارایی واکنش با الکتروفورز ۱ میکرولیتر از پلاسمید هضم شده مورد تأیید قرار گرفت. در مرحله بعد پلاسمید هضم شده با استفاده از کیت خالص سازی شرکت بایونیر خالص شد و برای هضم با آنزیم *Hind III* استفاده شد. واکنش هضم با این آنزیم نیز طبق جدول ۲-۶ انجام شد.

جدول ۲-۶- ترکیبات واکنش هضم پلاسمید با آنزیم *Hind III*

مقدار (میکرولیتر)	اجزاء
۱۰	پلاسمید هضم شده با آنزیم Sal I و خالص شده
۲	بافر (10X) B2
۱ (۱۰ واحد)	آنزیم <i>Hind III</i>
۷	آب DEPC
۲۰	حجم نهایی

به مخلوط فوق ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی اضافه شده به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سپس برای غیرفعال شدن آنزیم ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

۲-۷-۲- اتصال (Ligation)

برای اتصال محصول PCR و پلاسمید به یکدیگر، هر دو محصول هضم شده (محصول PCR و پلاسمید) با استفاده از کیت خالص سازی شرکت بایونیر، خالص شدند. میزان DNA و پلاسمید هضمی تخمین زده شدند و اتصال با استفاده از آنزیم لیگاز T4 به مدت ۷۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد و سپس یک شب در ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت. پس از سپری شدن زمان فوق برای غیرفعال کردن آنزیم از دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲). سپس محصول اتصال با فرض تشکیل پلاسمیدهای حلقوی حاوی ژن های VP28 و VP19 برای ترانسفورمسیون بکار رفت.

جدول ۲-۷- ترکیبات واکنش اتصال ژن VP28 و پلاسمید pMal-c2X

مقدار (میکرولیتر)	اجزاء
۱/۵	محصول CR خالص (VP28)
۱۱	پلاسمید خالص
۱ (۵ واحد)	آنزیم T4 ligase
۱/۵	بافر Ligase
۱۵	حجم نهایی
۲۰	روغن معدنی

جدول ۲-۸- ترکیبات واکنش اتصال ژن VP19 و پلاسمید pMal-c2X

مقدار (میکرولیتر)	اجزاء
۱/۵	محصول PCR خالص (VP19)
۱۱	پلاسمید خالص
۱ (۵ واحد)	آنزیم T4 ligase
۱/۵	بافر Ligase
۱۵	حجم نهایی
۲۰	روغن معدنی

۳-۷-۲- ترانسفورماسیون

ترانسفورماسیون طبق روشی که قبلاً شرح داده شده انجام گرفت. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال استفاده گردید.

۴-۷-۲- غربالگری کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون

پس از انجام ترانسفورماسیون، ۱۰ عدد از کلونی‌های ترانسفورم شده با پلاسمید حاوی هر کدام از ژن‌های VP28 و VP19 که بر روی محیط حاوی آمپی‌سیلین رشد کرده بودند، انتخاب شده و به صورت خطی در دو پلیت جداگانه کشت داده شدند. برای بررسی حضور پلاسمید حاوی ژن‌های VP28 و VP19 در این کلونی‌ها، از دو روش غربالگری شامل PCR و بررسی بیان پروتئین استفاده گردید.

– غربالگری کلون ها با روش PCR

در ابتدا کلونی ها در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک به روش ۴ قسمتی برای مدت یک شب کشت شدند. روز بعد یک کلونی کوچک به همراه ۲۴ میکرولیتر آب مقطر درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن میکروتیوب با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید. در نهایت ۱ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان الگو برای انجام PCR و تکثیر ژن های VP19 و VP28 در حجم ۵۰ میکرولیتر به کار رفت.

جدول ۲-۹- مواد و مقادیر استفاده برای تکثیر ژن های VP19 و VP28

۱ μ l	DNA
۵ μ	بافر PCR (10 X)
۱/۵ μ l	کلرید منیزیم (۵۰ mM)
۱ μ l	dNTP mixes (10 mM)
۱ μ l	پرایمر F (۲۰ pmol/ μ l)
۱ μ l	پرایمر R (۲۰ pmol/ μ)
۰/۵ μ l (۲/۵ U)	آنزیم Taq DNA Polymerase
۳۹ μ l	آب دو بار تقطیر (ddH ₂ O)
۵۰ μ l	حجم نهایی

برنامه دمایی برای انجام PCR مشابه با برنامه مورد استفاده برای تکثیر ژن های VP19 و VP28 بود (جدول ۲-۲).

۲-۸- بررسی بیان پروتئین های VP19 و VP28**۱-۲-۸-۱- القاء بیان پروتئین با IPTG**

پس از غربالگری کلون های باکتریایی TG1 و تأیید وجود پلاسمیدهای حاوی ژن های VP19 و VP28 به منظور بررسی بیان پروتئین های نو ترکیب VP19 و VP28، ۳ کلونی از هر ژن انتخاب شد. بدین منظور از این کلونی ها به صورت شبانه در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. روز بعد، کشت شبانه باکتری به نسبت ۱/۱۰۰ به محیط LB مایع که حاوی آمپی سیلین و گلوکز (۰/۲ درصد) بود اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با چرخش متوسط انکوبه شد تا در OD₆₀₀ کدورت آن به حدود ۰/۵ رسید. بعد از رسیدن OD مورد نظر، قبل از افزودن IPTG ۱ میلی لیتر از محیط به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی به دقت تخلیه گردید و پلیت حاصل در دمای ۲۰-

نگهداری شد. برای القاء بیان پروتئین به ۲ میلی لیتر باقیمانده از کشت باکتریایی حاوی ژن های VP19 و VP28، به میزان ۳ میکرولیتر از محلول ذخیره ۰/۱ مولار IPTG به ازای هر میلی لیتر از محیط کشت اضافه شد. کشت باکتری در حضور IPTG برای بیان VP19 و VP28، تا ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ادامه یافت. پس از اتمام مدت انکوباسیون ۲ نمونه تهیه شد به یک میکروتیوب ۰/۵ میلی لیتر و به میکروتیوب دیگری ۱/۵ میلی لیتر باقیمانده منتقل و با سرعت مشابه ذکر شده سانتریفیوژ گردید. همزمان به عنوان 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 نمونه ها در آزمایش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۸-۲ SDS-PAGE

- آماده سازی قالب

قالب مورد استفاده جهت پیچ (PAGE)، از دو صفحه شیشه ای تشکیل می گردد که پس از شست و شوی کامل و چربی زدایی با اتانل، بر روی هم قرار گرفته و در حاشیه آن ها فضا سازها قرار داده می شدند. به این ترتیب بین دو صفحه شیشه ای، فضایی بوجود می آمد که در این فضا ژل پلی اکریل آمید ریخته می شد. قبل از تهیه ژل و ریختن آن در قالب، ابتدا دو طرف قالب توسط گیره هایی ثابت شده و جهت بستن پایین قالب و جلوگیری از نشست ژل به خارج، ژل آگار ۱ درصد تهیه می گردید و با استفاده از پیست پاستور، ژل آگار ذوب شده به آهستگی در قالب ریخته می شد به طوری که طول آن در حدود ۵ میلی متر باشد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

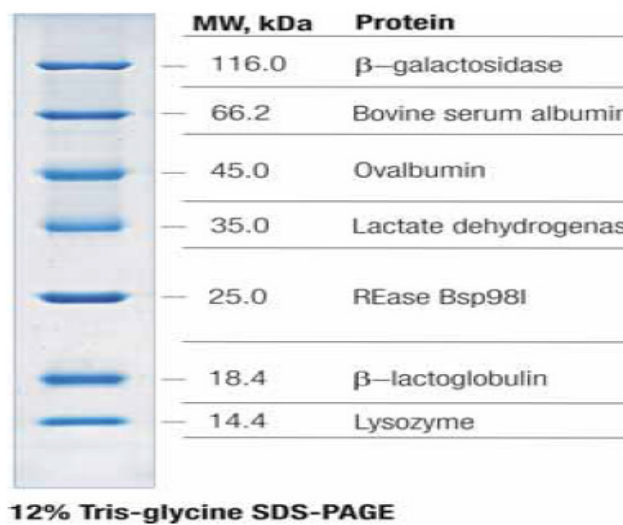
- تهیه ژل پلی اکریل آمید

در این بررسی از ژل ۱۰ درصد جهت تفکیک باندهای پروتئینی استفاده شد. جهت تهیه این ژل، مقادیر مورد نیاز از مواد لازم، طبق جدول ۳-۱ با یکدیگر مخلوط شدند. مقدار ۲/۳ از ارتفاع قالب به ژل جدا کننده اختصاص داده شده و یک سوم باقی مانده از قالب جهت ریختن ژل متراکم کننده مورد استفاده قرار گرفت. پس از ریختن ژل جدا کننده در داخل قالب، جهت جلوگیری از رسیدن اکسیژن به سطح ژل، با استفاده از سمپلر مقدار ۱ میلی لیتر آب مقطر به آهستگی بر روی سطح ژل ریخته شده و قالب ژل به صورت عمودی و بی حرکت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا آکریل آمید پلیمریزه گردد. سپس با برگرداندن قالب، آب افزوده شده تخلیه و داخل قالب کاملاً خشک گردید. سپس اقدام به تهیه ژل متراکم کننده ۴ درصد گردید (جدول ۳-۲). بدین منظور پس از قرار دادن شانه در بین دو شیشه، ژل متراکم کننده به سرعت در قالب ریخته شد و قالب به صورت عمودی و بی حرکت در آزمایشگاه قرار داده شد تا ژل پلی اکریل آمید پلیمریزه گردد. ژل پلی اکریل آمید زنجیره های پلیمریزه شده از آکریل آمید هستند که بوسیله بیس آکریل آمید به هم متصل می شوند. تمد با کاتالیز تشکیل رادیکال های آزاد از آمونیوم پرسولفات، پلیمریزه شدن آکریل آمید و بیس

آکريل آميد را تسريع مي کند. آمونيووم پرسولفات نيز با اکسيژن موجود در مخلوط ترکيب شده و اثر بازدارندگي اکسيژن بر پليمريزه شدن را خنثي مي کند (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

- آماده سازی نمونه ها و مارکر وزن مولکولی

نمونه باکتری قبل از افزودن IPTG با ۵۰ میکرولیتر و نمونه ۰/۵ میلی لیتری بعد از افزودن IPTG با ۱۰۰ میکرولیتر از بافر نمونه (Sample buffer) مخلوط شدند. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفتند. پس از آن با سرعت ۱۳۰۰۰ دور دقیقه به مدت کوتاهی سانتریفیوژ شدند. مارکر وزنی مولکولی مورد استفاده در این مطالعه، از ۷ باند پروتئینی در محدوده ۱۴/۴ کیلو دالتون تا ۱۱۶ کیلو دالتون تشکیل شده بود (شکل ۲-۲).



شکل ۲-۲- وزن مولکولی پروتئین های موجود در مارکر وزنی مولکولی به همراه الگوی الکتروفوریک آن ها

- آماده سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری نمونه ها

تانک مورد استفاده در SDS-PAGE از نوع عمودی بود که دارای دو مخزن جهت ریختن بافر حرکت دهنده (Running buffer) است. ابتدا فضا سازی که در حاشیه پائینی ژل قرار داده شده بود و همچنین شانه از قالب جدا شدند. سپس گیره ها به طور موقت باز شده، قالب حاوی ژل به تانک الکتروفورز اتصال داده شد و از دو طرف توسط گیره به دستگاه محکم گردید. برای بارگذاری نمونه ها در داخل چاهک ها، ۲۵ میکرولیتر از نمونه ها با استفاده از سمپلر به آهستگی در داخل چاهک ها تخلیه گردید. در داخل مخزن بالا و پایین، بافر حرکت دهنده ریخته شد. سپس الکتروود بالایی تانک به قطب منفی و الکتروود پائینی به قطب مثبت منبع برق مستقیم وصل شده و میزان شدت جریان بر روی ۱۰۰ ولت تنظیم گردید.

با این شدت جریان، الکتروفورز در زمانی بین ۳ تا ۴ ساعت انجام شد. با ردگیری مسیر حرکت رنگ بروموفنل بلو در ژل، نحوه الکتروفورز و سرعت آن بررسی شد. زمانی که رنگ بروموفنل بلو به پائین ترین سطح خود در ژل رسید، عمل الکتروفورز خاتمه داده شد. قالب ژل از تانک جدا شد و با اهرم کردن فضاها بین دو صفحه شیشه‌ای و فشار مختصر، دو صفحه از یکدیگر جدا شدند. به آهستگی ژل الکتروفورز شده از سطح شیشه جدا شد و برای رنگ آمیزی با رنگ آبی کوماسی به کار رفت (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۹-۲- رنگ آمیزی پروتئین های الکتروفورز شده با آبی کوماسی

در این رنگ آمیزی پس از اتمام الکتروفورز، ژل جدا کننده به آرامی از میان شیشه‌ها خارج و در محلول رنگ آبی کوماسی قرار داده و با سرعت متوسط شیک شد. پس از ۱ ساعت رنگ آمیزی، محلول رنگ تخلیه شد و به جای آن محلول رنگبر اضافه شد. رنگبری ژل تا هنگامی ادامه یافت که زمینه ژل روشن شده و باندهای پروتئینی به وضوح مشاهده شدند (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۹-۲- تعیین توالی ژن کلون شده

پس از غربالگری کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون، 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 شده و پلاسمید آن‌ها با کیت، استخراج شد. سپس پلاسمیدها خالص شده و جهت تعیین توالی ژن‌های VP28 و VP19 به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند تا با استفاده از پرایمرهای ویژه پلاسمید (پرایمرهای M13F-20 و MalE) از دو جهت تعیین توالی گردند.

۱۰-۲- تهیه غذای حاوی باکتری بیان کننده پروتئین‌های VP28 و VP19

۱-۱۰-۲- تعیین تراکم باکتری

پس از تأیید بیان پروتئین از کشت باکتری با $OD_{600}=1$ رقت‌های متوالی به نسبت ۱/۱۰ تهیه و از هر رقت در ۳ پلیت LB جامد حاوی آمپی سیلین به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به روش سفره‌ای کشت داده شد و تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر از کشت مایع با $OD_{600}=1$ بدست آمد.

۲-۱۰-۲- غیرفعال کردن باکتری

به این منظور به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری با $OD_{600}=1$ میزان ۰/۵ میلی‌لیتر فرمالین ۳۷٪ اضافه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و سپس به یخچال منتقل گردید. پس از گذشت ۱۶

ساعت برای بررسی غیرفعال شدن باکتری از نمونه‌ها به نسبت ۱/۱۰۰ در لوله های حاوی محیط LB مایع کشت شبانه تهیه شد.

۳-۱۰-۲- مخلوط نمودن پلیت غذا با باکتری غیر فعال

پس از غیر فعال نمودن باکتری و اطمینان از عدم رشد باکتری سوسپانسیون باکتری‌های غیرفعال ۳ بار به وسیله PBS شستشو گردید و در پایان دوباره به حجم اولیه رسانده شد. برای تولید غذای حاوی پروتئین مورد نظر هر گرم از پلیت های تجاری (شرکت هووراش) با 10^8 باکتری غیرفعال شده پوشانده شد. به این صورت که پس از مخلوط نمودن سوسپانسیون باکتری و پلیت های غذا به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ نگهداری شد تا باکتری‌ها جذب پلیت شوند سپس به منظور جلوگیری از هم پاشیدگی پلیت‌ها در پایان با اسپری کردن روغن مایع پلیت‌های حاوی باکتری بیان کننده پروتئین مورد نظر تهیه گردید.

۱۱-۲- ایجاد ایمنی در پست لاروهای میگو

در این مرحله تعداد ۴۲۰ میگوی سفید غربی مرحله ۳۰ (PL30) نگهداری شده در پژوهشکده که در مرحله ۵ از یکی از مراکز تکثیر واقع در چوئبداه آبادان (مرکز تکثیر تولید میگوی اهواز) خریداری گردیده بود در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. قبل از انجام تیمار بندی پست لاروها از نظر آلودگی به ویروس لکه سفید توسط کیت تشخیص ویروس Iq2000 (ژن ریچ، تایوان) بررسی شدند سپس به ۶ گروه تقسیم شدند. پست لاروها با تراکم ۲۰ قطعه در هر لیتر آب دریای فیلتر و استریل با شوری ۲۵ قسمت در هزار با هوادهی مناسب قرار گرفتند و روزانه و به مدت ۷ روز طبق جدول ۲-۱۰ مورد تغذیه قرار گرفتند:

جدول ۲-۱۰- تیمارها و نوع غذای مورد استفاده در هر تیمار

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

۱۲-۲- آزمایش چالش

۱-۱۲-۲- تعیین تیترو ویروس لکه سفید

برای تعیین میزان ویروس مورد نیاز یک چالش مطلوب با تقریباً ۷۵٪ تلفات، از همولنف لایستر آلوده به ویروس لکه سفید ($10^{5.4}$ LD₅₀/ml) رقت‌های مختلف ۱:۱۰ تهیه شد. پست لاروهای مرحله ۳۰ (PL30) در رقت‌های متفاوت تهیه شده از همولنف آلوده به ویروس به مدت ۷ ساعت به صورت غوطه‌ور قرار گرفتند. پس از این مدت زمان میگوها از آب حاوی ویروس لکه سفید خارج شده و با آب شستشو شدند و در آکواریوم غیر آلوده جداگانه‌ای نگهداری شدند. دو بار در طول شبانه روز تلفات ثبت گردیده و میگوهای تلف شده به روش پاتولوژی مورد آزمایش قرار گرفتند. در آخر پایین‌ترین رقتی از همولنف آلوده به ویروس که سبب تلفات حداقل ۷۵ درصدی شده بود به عنوان میزان لازم در آزمایشات چالش مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۱۲-۲- تیمار بندی آزمایش چالش

در پایان روز هفتم پس از تغذیه، پست لاروها طبق جدول ۲-۱۱ تیمار بندی شده، در تیمارهای ۱ تا ۶ در آزمایش اول ۲ روز پس از اتمام تغذیه با پلیت‌ها و در آزمایش دوم تیمارها، ۲۱ روز پس از اتمام تغذیه با پلیت‌ها با ویروس لکه سفید به مدت ۷ ساعت مورد چالش قرار گرفتند، در تیمار ۷ پست لاروها با ویروس مواجه نشدند. علائم بالینی و تلفات در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۲، ۴۸، ۵۴، ۶۰، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت و تا ۱۴ روز پس از چالش بررسی و ثبت گردید.

جدول ۲-۱۱- تیمار بندی پست لاروهای مورد آزمایش

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

پس از اتمام تغذیه با پلیت‌های حاوی باکتری میگوها بر اساس منابع موجود و بر اساس توده زنده با پلیت تجاری (سایزهای مختلف پلیت، شرکت هووراش، بوشهر) با برنامه غذایی منظم تغذیه شدند. پس از هر بار چالش میگوهای مورد آزمایش تا ۱۴ روز پس از آزمایش نگهداری شده و تلفات در این مدت ثبت گردید.

تلفات میگوها پس از ثبت به منظور 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 بودن نیز گسترش مرطوب از کاراپاس تهیه شد.

۱۳-۲- روش آسیب شناسی

۱-۱۳-۲- ثابت کردن

میگوهای تلف شده با مقدار کافی محلول ثابت کننده دیویدسون (به طور تقریبی حداقل حدود ۱۰ برابر از حجم محلول ثابت کننده برای هر نمونه) در ظروف جداگانه نگهداری شد. پس از مدت زمان ۴۸ ساعت، نمونه‌ها به الکل اتیلیک ۵۰٪ منتقل گردید (Lightner, ۱۹۹۶).

۲-۱۳-۲- آماده سازی بافت و قالب گیری

میگوهای نگهداری شده از الکل اتیلیک ۵۰٪ خارج شده، بر روی سطح برش قرار گرفتند. با استفاده از اسکالپل برش‌های لازم بر روی میگوها اعمال شد و قطعات بافتی با ابعاد کمتر از ۸ میلی‌متر ضخامت تهیه شد (Lightner, ۱۹۹۶).

سپس قطعات بافتی میگوها به ترتیب در محلول‌های زیر قرار گرفته و آماده سازی شدند:

- | | | |
|----|-----------------------------------|----------------|
| ۱- | الکل اتیلیک ۷۰٪ در ۲ ظرف جداگانه | هر کدام ۱ ساعت |
| ۲- | الکل اتیلیک ۸۰٪ در ۲ ظرف جداگانه | هر کدام ۱ ساعت |
| ۳- | الکل اتیلیک ۹۵٪ در ۲ ظرف جداگانه | هر کدام ۱ ساعت |
| ۴- | الکل اتیلیک ۱۰۰٪ در ۲ ظرف جداگانه | هر کدام ۱ ساعت |
| ۵- | گزیلول در ۲ ظرف جداگانه | هر کدام ۱ ساعت |
| ۶- | پارافین در ۲ ظرف جداگانه | هر کدام ۱ ساعت |

در پایان مرحله آماده سازی بافت‌های مورد نظر از سطح برش در کف قالب قرار گرفته و قالب با پارافین مخصوص قالب‌گیری پر شده، مشخصات هر قالب بر روی آن نوشته شد و تا زمان مقطع‌گیری در یخچال نگهداری می‌شد (Lightner, ۱۹۹۶).

۳-۱۳-۲- مقطع گیری

توسط یک دستگاه میکروتوم دوار (شاندون، آمریکا) قالب‌ها از سطح برش مورد نظر با ضخامت ۵ تا ۶ میکرون برش داده شد. برش‌ها ابتدا در یک ظرف حاوی الکل ۵۰٪ قرار گرفته، پس از باز شدن، برش به حمام آب منتقل شده سپس بر روی لام قرار گرفت.

۴-۱۳-۲- رنگ آمیزی

ابتدا برش‌های پارافینی به منظور جداسازی پارافین از برش‌های تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آب شدن پارافین، مقاطع آنگیری شده و به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و فلوکسین / ائوزین به شرح زیر رنگ آمیزی شدند:

- ۱- گزیلول ۵ دقیقه
- ۲- گزیلول ۵ دقیقه
- ۳- الکل اتیلیک ۱۰۰٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۴- الکل اتیلیک ۱۰۰٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۵- الکل اتیلیک ۹۵٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۶- الکل اتیلیک ۹۵٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۷- الکل اتیلیک ۸۰٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۸- الکل اتیلیک ۸۰٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۹- الکل اتیلیک ۵۰٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۱۰- آب مقطر ۶ بار شستشو
- ۱۱- هماتوکسیلین ۱۰ دقیقه
- ۱۲- آب شیر (لوله کشی) ۶ دقیقه
- ۱۳- فلوکسین / ائوزین ۲ دقیقه
- ۱۴- الکل اتیلیک ۹۵٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۱۵- الکل اتیلیک ۹۵٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۱۶- الکل اتیلیک ۱۰۰٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۱۷- الکل اتیلیک ۱۰۰٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۱۸- گزیلول ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۱۹- گزیلول ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۲۰- گزیلول ۱۰ مرتبه غوطه‌وری
- ۲۱- گزیلول ۱۰ مرتبه غوطه‌وری

پس از طی شدن مراحل رنگ آمیزی رنگ‌های اضافه از روی لام پاک شده و توسط چسب انتلان یک لامل بر روی بافت رنگ شده چسبانده شد (Lightner, ۱۹۹۶).

۱۴-۲- آنالیز آماری

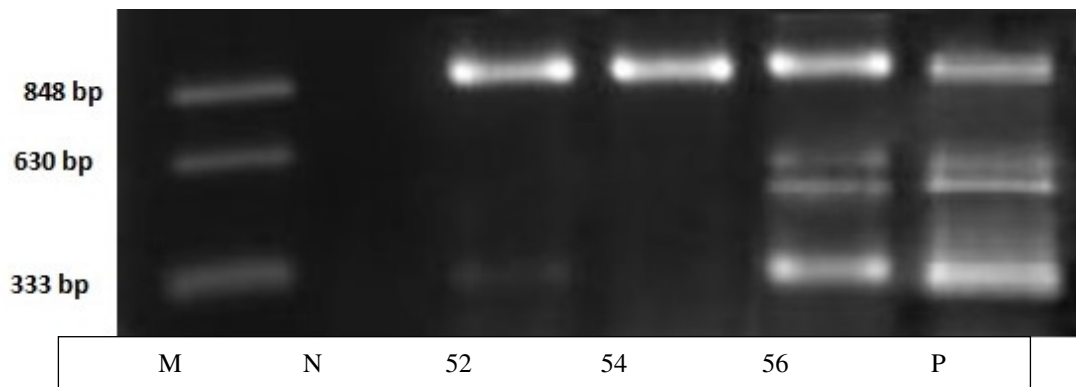
در پایان آزمایش چالش میزان بازماندگی نسبی از رابطه زیر محاسبه شده و توصیف آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ صورت گرفت. همچنین مقایسه تفاوت بین گروه‌های مختلف مورد آزمایش با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 صورت پذیرفت.

{ $100 \times$ (تلفات گروه شاهد / تلفات گروه‌های واکسیناسیون) - ۱}

۳-نتایج

۳-۱- تشخیص ویروس لکه سفید در بافت میگوی سفید غربی

پس از انجام نمونه برداری از مزارع پرورش میگوی چوئیده آبادان (استان خوزستان) نمونه‌ای که بر اساس دستورالعمل کیت Iq2000 دارای حدت بالا (Severe) بود به عنوان جدایه ایرانی ویروس لکه سفید با نام IRI-KHZ/904 به عنوان الگو در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳-۱).



M: مارکر (۳۳۳ bp، ۶۳۰ bp، ۸۴۸ bp)، N: نمونه کنترل منفی، 52: نمونه مثبت خیلی خفیف، 54: نمونه میگوی منفی، 56: نمونه مثبت خیلی شدید، P: کنترل مثبت

۳-۲- استخراج توالی ژن پروتئین VP28 و VP19 ویروس لکه سفید از بانک ژن و طراحی پرایمر

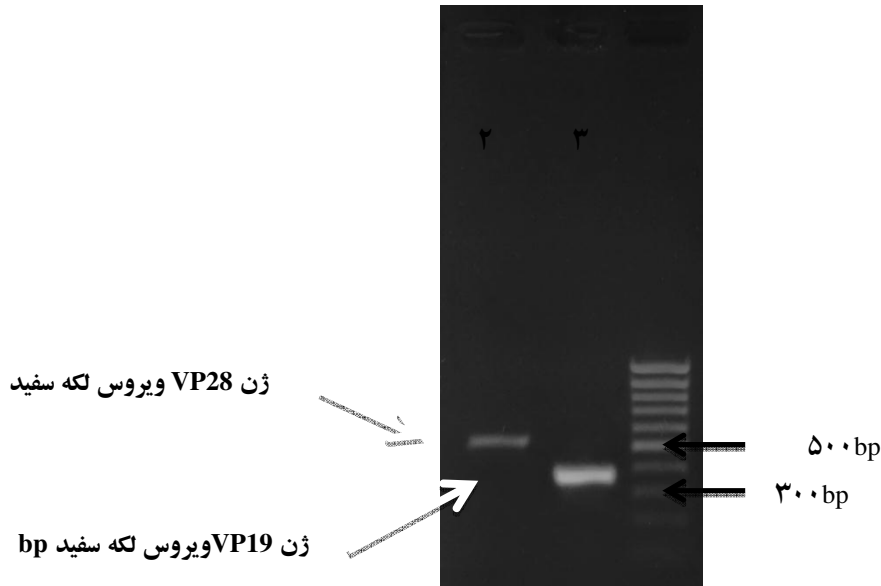
پرایمرهای اختصاصی ژن کد کننده پروتئین VP28 و VP19 بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط Jeroen Witteveldt در سال ۲۰۰۶، انتخاب گردیدند. با توجه به توالی ژن و نقشه وکتور pMal-c2X، در انتهای ۵' این پرایمرها مکان برش آنزیم‌های محدودگر Sal I و Hind III نیز قرارداده شد تا امکان کلونینگ محصول PCR و بیان پروتئین VP28 فراهم گردد. توالی نوکلئوتیدی این پرایمرها در جدول ۳-۱ نشان داده شده است.

جدول ۳-۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در PCR

VP28 F 5'	GCCG <u>TCGACC</u> CACAACACTGTGACCA (Sal I)
VP28 R 5'	GCGA <u>AAGCTT</u> ACTCGGTCTCAGTGCCAGA (Hind III)
VP19 F 5'	GCCG <u>TCGAC</u> ATGGCCACCACGACTAA (Sal I)
VP19 R 5'	GCGA <u>AAGCTT</u> ACTGCCTCCTCTTGGGGTA (Hind III)

۳-۳- نتایج PCR برای تکثیر ژن‌های سازنده VP19 و VP28

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. محصول ژن‌های تکثیر یافته در ژل آگاروز ۱/۵٪ حاوی رنگ Safe Stain (شرکت سیناژن ایران)، در کنار یک نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی (شرکت فرمنتاس، لیتوانی) الکتروفورز شد و بوسیله نور ماوراء بنفش مشاهده گردید که با نتایج قابل انتظار همخوانی داشت (شکل ۳-۲).



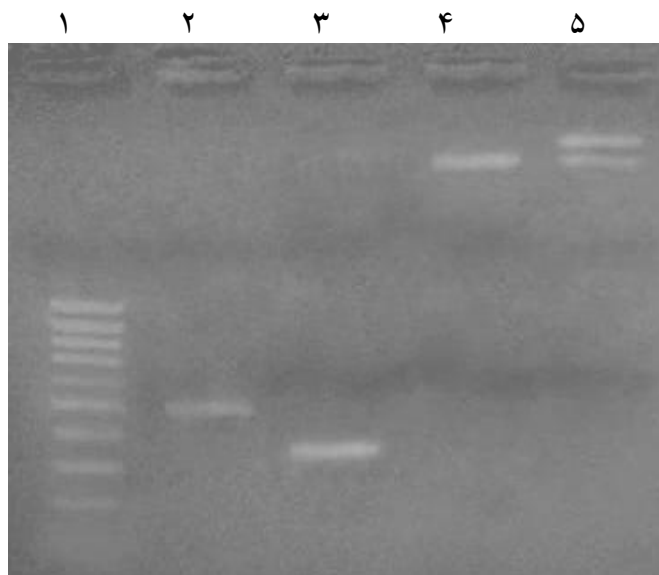
شکل ۳-۲- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های VP19 و VP28 ویروس لکه سفید جدایه IRI-KHZ/904
 ۱: محصول PCR ژن VP28 ۲: محصول PCR ژن VP19 ۳: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

۳-۴- تکثیر و خالص‌سازی وکتور

به منظور تکثیر و خالص‌سازی پلاسمید pMal-c2X، وکتور ابتدا از طریق ترانسفورماسیون به باکتری اشریشیا کلی سویه TG1 منتقل شد. سپس برای تأیید حضور وکتور در کلونی‌های بدست آمده، ابتدا به روش Miniprep استخراج پلاسمید صورت گرفت و پس از تأیید حضور وکتور، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت صورت گرفت و ۳ میکرولیتر از پلاسمید استخراج شده بر روی ژل آگارز برده شد.

۳-۵- هضم آنزیمی ژن و وکتور

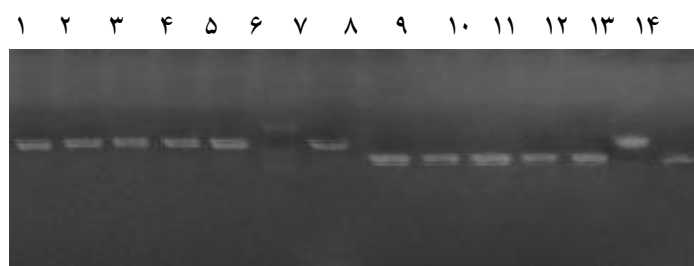
پس از خالص‌سازی ژن‌های VP19، VP28 و استخراج پلاسمید pMal-c2X توسط کیت، ژن‌ها و وکتور توسط آنزیم‌های محدود کننده *Sal I* و *Hind III* به صورت جداگانه هضم شدند. برای تأیید عمل هضم، مقداری از وکتور هضم شده بر روی ژل آگارز برده شد. پس از تأیید عمل هضم، ژن‌ها و وکتور توسط کیت خالص‌سازی شدند (شکل ۳-۳).



شکل ۳-۳- پلاسمید pMal-c2X هضم و خالص شده و پلاسمید هضم نشده
ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: محصول PCR ژن VP28، ستون ۳: محصول PCR ژن VP19
ستون ۴: پلاسمید خالص هضم شده، ستون ۵: پلاسمید خالص هضم نشده.

۳-۶- ورود ژن‌های VP19 و VP28 به داخل وکتور و تأیید صحت آن

پس از هضم آنزیمی و کتور و محصول PCR تکثیر یافته، ژن‌های VP19 و VP28 توسط عمل اتصال وارد وکتور pMal-c2X شدند و پس از ترانسفورماسیون، کلونی‌های ایجاد شده بر روی LB جامد آمپی‌سیلین دار، از لحاظ دارا بودن وکتور حاوی ژن به وسیله PCR مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳-۴).



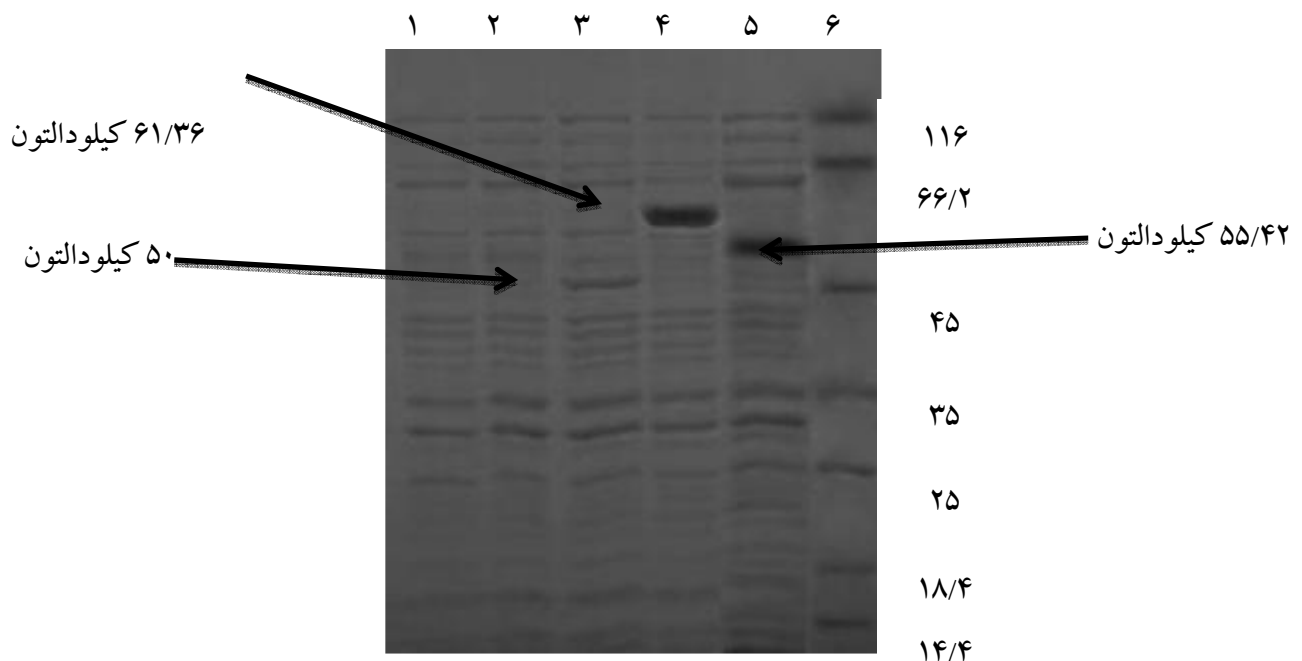
شکل ۳-۴- الکتروفورز محصول پی سی آر بر روی پلاسمید های نو ترکیب موجود
در کلونی های باکتری TG1

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

۳-۷- بررسی بیان پروتئین‌های سازنده VP19 و VP28

پس از اطمینان از کلونینگ موفق ژن‌های سازنده VP19 و VP28 در پلاسمید pMal-c2X، تعدادی از کلونی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب در یک لوله‌های آزمایش حاوی LB مایع آمپی‌سیلین دار بصورت شبانه کشت داده

شدند. روز بعد این کشت‌های شبانه به نسبت ۱ درصد در یک کشت جدید وارد شدند و پس از گذشت ۳ ساعت و رسیدن به $(OD_{600} = 0.5)$ به آنها IPTG به نسبت ۰/۳ میلی‌مولار اضافه شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در حضور IPTG وجود پروتئین بیان شده در این باکتری‌ها با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد. نتایج این بررسی بر روی دو عدد از کلونی‌های مورد آزمایش که مثبت تشخیص داده شد در شکل ۳-۵ نشان داده شده است. همانگونه که در شکل مشخص شده است، با توجه به استاندارد پروتئینی مورد استفاده، باکتری مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG دارای پروتئینی با وزن مولکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی می‌باشد. پروتئین بیانی توسط باکتری بیان کننده VP28 با احتساب وزن ۱۹/۳۶ کیلودالتون برای VP28 و ۴۲ کیلودالتون برای پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP) که پلاسمید می‌سازد باید دارای وزنی حدود ۶۱/۳۶ کیلودالتون باشد و همچنین پروتئین بیانی توسط باکتری بیان کننده VP19 با احتساب وزن ۱۳/۴۲ کیلودالتون برای VP19 و ۴۲ کیلودالتون برای MBP باید دارای وزنی حدود ۵۵/۴۲ کیلودالتون باشد.

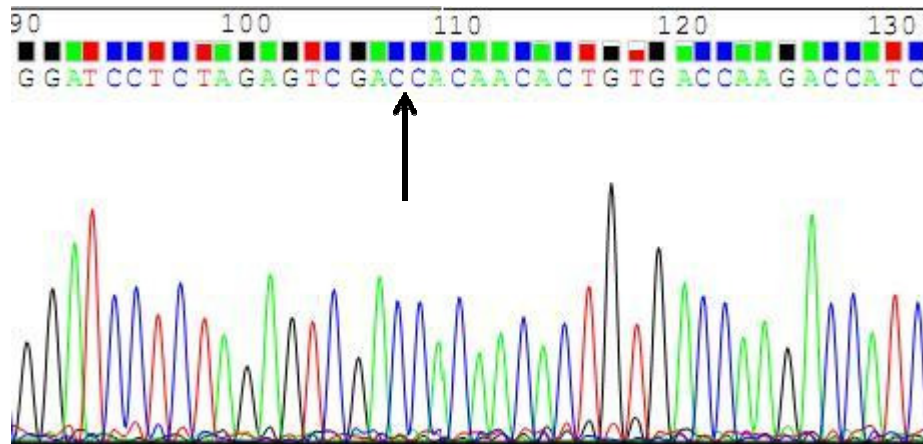


شکل ۳-۵ - SDS - PAGE القای بیان پروتئین VP28 و VP19 در باکتری اشریشیا کلی سویه TG1
 ستون ۱: باکتری فاقد پلاسمید، ستون ۲: باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب قبل از بیان، ستون ۳: باکتری حاوی پلاسمید غیر نوترکیب بعد از بیان، ستون ۴: کلون مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب (VP28) بعد از بیان، ستون ۵: کلون مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب (VP19) بعد از بیان ، ستون ۶: مارکر پروتئین

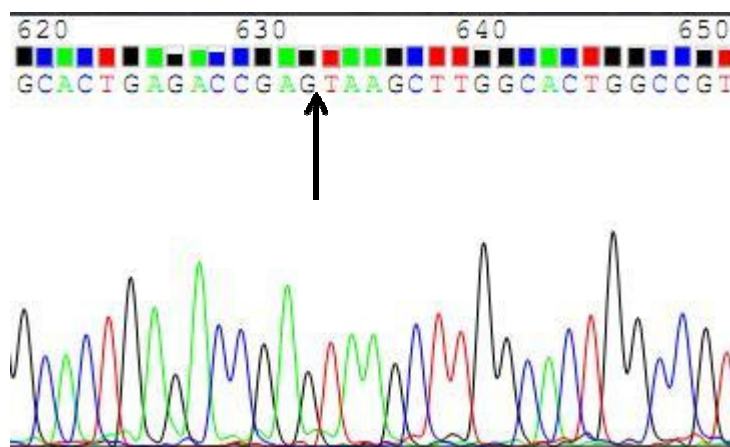
۳-۸- تعیین توالی ژن‌های وارد شده به پلاسمید

شش کلونی که در آزمایش PCR حاوی ژن بوده و در بررسی بیان نیز پروتئین با وزن مولکولی مورد انتظار را بیان نموده بودند (از هر ژن ۳ کلونی)، انتخاب شده و پلاسمید آن‌ها پس از خالص سازی تعیین توالی گردید که

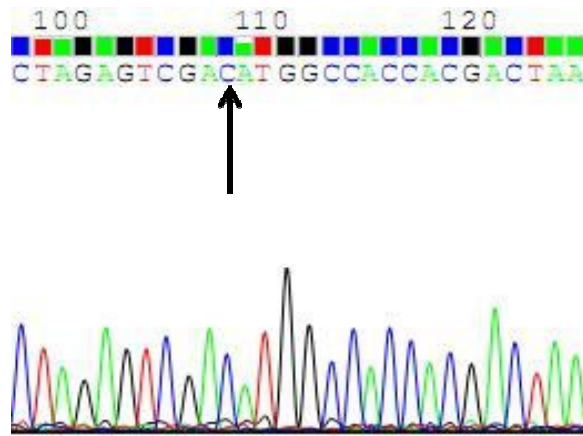
در بررسی تعیین توالی پلاسمید حاوی ژن هیچ گونه جهش و حذفی صورت نگرفته بود (شکل ۳-۶، ۳-۷، ۳-۸ و ۳-۹). توالی های بدست آمده با عنوان توالی ژن های VP28 و VP19 یک جدایه ایرانی ویروس لکه سفید (IRI-904/KHZ) و با شماره دسترسی های AB855742 و AB974691 در بانک ژن ثبت گردید (شکل ۳-۱۰ و ۳-۱۱).



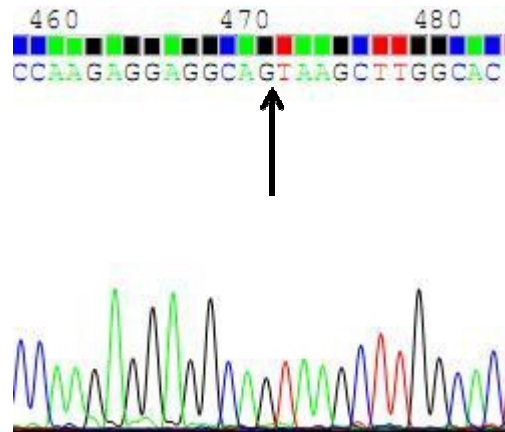
شکل ۳-۶- کروماتوگرام ابتدای ژن VP28، محل برش آنزیم *Sal I* و اتصال به پلاسمید



شکل ۳-۷- کروماتوگرام انتهای توالی ژن VP28، محل برش آنزیم *Hind III* و اتصال به پلاسمید



شکل ۳-۸- کروماتوگرام ابتدای ژن VP19، محل برش آنزیم Sal I و اتصال به پلاسمید



شکل ۳-۹- کروماتوگرام انتهای توالی ژن VP19، محل برش آنزیم Hind III و اتصال به پلاسمید

Shrimp white spot syndrome virus VP19 gene for structural protein VP19, complete cds, strain: IRI-KHZ/904

GenBank: AB974691.1

LOCUS AB974691 366 bp DNA linear VRL 18-JUL-2014
 DEFINITION Shrimp white spot syndrome virus VP19 gene for structural protein
 VP19, complete cds.
 ACCESSION AB974691
 VERSION AB974691.1 GI:666669593
 KEYWORDS .
 SOURCE Shrimp white spot syndrome virus
 ORGANISM *Shrimp white spot syndrome virus*
 Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Nimaviridae; Whispovirus.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Houshmand,H., Seyfiabadshapouri,M.R., Ahangarzadeh,M.,
 Seyedmortezaei,S.R. and Daghari,M.
 TITLE Shrimp White Spot Syndrome Virus IRI-KHZ/904 VP19 gene, Cds
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 366)
 AUTHORS Houshmand,H., Seyfiabadshapouri,M.R., Ahangarzadeh,M.,
 Seyedmortezaei,S.R. and Daghari,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (16-JUL-2014) Contact:Hossein Houshmand South Iran
 Aquaculture Research Center, Aquatic Animals Health and
 Diseases;
 Pasdaran blv. near oxin hotel ghadir Post, Ahvaz, Khuzestan
 61645866, Iran URL :http://Siarc.ifro.ir
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..366
 /organism="Shrimp white spot syndrome virus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="IRI-KHZ/904"
 /host="Litopenaeus vannamei"
 /db_xref="taxon:92652"
 /country="Iran:Choebdeh, shrimp farms"
 /collection_date="2011"
 gene 1..366
 /gene="VP19"
 CDS 1..366
 /gene="VP19"
 /codon_start=1
 /product="structural protein VP19"
 /protein_id="BAP16759.1"
 /db_xref="GI:666669594"
 /translation="MATTTNLPFGRTGAQAAGPSYTMEDLEGSMSMARMLFLIVA
 ISIGILVLAVMNVWMPKKKSDSDTKDITDDDDDTANDNDEDEKYNRTRDMMLLAG
 SALLFLVSAATVFMSYPKRRQ"

ORIGIN
 1 atggccacca cgactaacac tcttccttcc gccaggaccg gagcccaggc cgtctggccct
 61 tcttacacca tggaagatct tgaaggctcc atgtctatgg ctgcgatggg tctctttttg
 121 atcgttgcta tctcaattgg tatcctcgtc ctggccgtca tgaatgtatg gatgggacca
 181 aagaaggaca gcgattctga cactgataag gacaccgatg atgatgacga cactgccaac
 241 gataacgatg atgaggacaa atataagaac aggaccaggg atatgatgct tctggctggg
 301 tccgctcttc tgttcctcgt ttccgccgcc accgttttta tgtcttacc caagaggagg
 361 cagtaa
 //

شکل ۳-۱۰- توالی نوکلئوتیدی ژن سازنده پروتئین VP19 ویروس لکه سفید جدایه ایرانی ثبت شده در بانک ژن با شماره دسترسی AB974691

Shrimp white spot syndrome virus gene for structural protein VP28, partial cds, strain: IRI-KHZ/904

GenBank: AB855742.1

LOCUS AB855742 528 bp DNA linear VRL 01-OCT-2013

DEFINITION Shrimp white spot syndrome virus gene for structural protein VP28,partial cds, strain: IRI-KHZ/904.

ACCESSION AB855742
 VERSION AB855742.1 GI:548923015
 KEYWORDS .
 SOURCE Shrimp white spot syndrome virus
 ORGANISM Shrimp white spot syndrome virus
 Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Nimaviridae; Whispovirus.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Houshmand,H., Peyghan,R., Seyfi,M.R., Ghafleh,M.J., Afsharnasab,M.
 and Daghari,M.
 TITLE Shrimp White Spot Syndrome Virus IRI-KHZ/904 VP28 gene, Partial
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 528)
 AUTHORS Houshmand,H.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-SEP-2013) Contact:Hossein Houshmand Shahid Chamran
 University, Aquatic Animals Health of Veterinary Faculty; Golestan,
 Ahvaz, Khuzestan 6135783151, Iran URL :http://veterinary.scu.ac.ir/ Phone :98-6113921761 Fax :98-6113921758

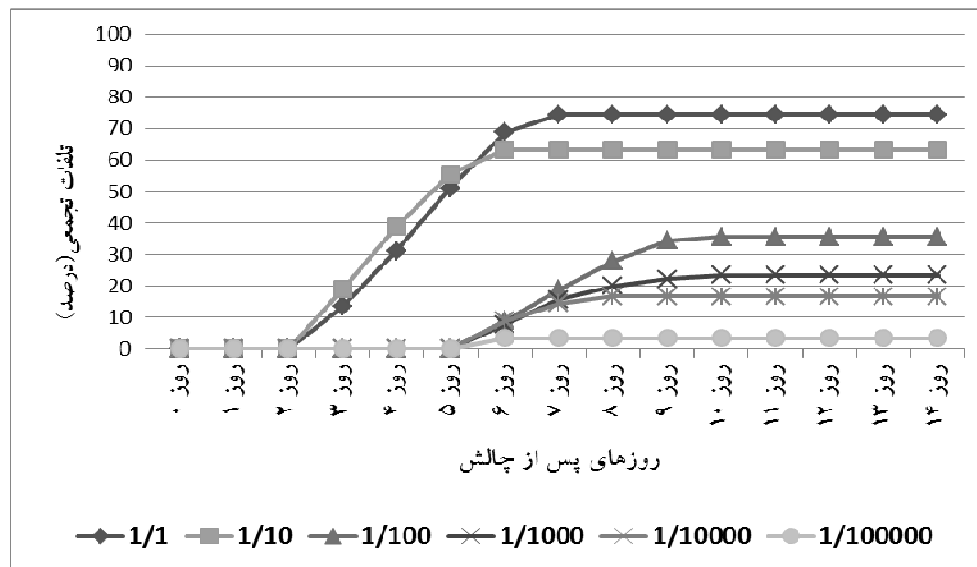
FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..528
 /organism="Shrimp white spot syndrome virus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="IRI-KHZ/904"
 /host="Litopenaeus vannamei"
 /db_xref="taxon:92652"
 /country="Iran: Khuzestan"
 CDS
 <1..528
 /codon_start=1
 /product="structural protein VP28"
 /protein_id="BAN91147.1"
 /db_xref="GI:548923016"
 /translation="HNTVTKTIETHTDNIETMMDENLRIPVTAEVGSGYFKMTDVSF
 DSDTLGKIKIRNGKSDAQMKKEEDADLVITPVEGRALEVTVGQNLTFEGTFKVVNNTS
 RKINITGMQMPKINPSKAFVGSNTSSFTPVSIDEDVGTFCVGTTFGAPIAATAG
 GNLFDMYVHVHTYSGTETE"

ORIGIN
 1 cacaacactg tgaccaagac catcgaaacc cacacagaca atatcgagac aacatggat
 61 gaaaacctcc gcattcctgt gactgctgag gttggatcag gctacttcaa gatgactgat
 121 gtgtcctttg acagcgacac cttgggcaaa atcaagatcc gcaatggaaa gtctgatgca
 181 cagatgaagg aagaagatgc ggatcttgtc atcactcccg tggagggccg agcactcgaa
 241 gtgactgtgg ggcagaatct cacctttgag ggaacattca aggtgtggaa caacacatca
 301 agaaagatca acatcactgg tatgcagatg gtgccaaga ttaaccatc aaaggccttt
 361 gtcggtagct ccaacacctc ctcttcacc cccgtctcta ttgatgagga tgaagttggc
 421 acctttgtgt gtggtaccac ctttggcgca ccaattgcag ctaccgccg tggaaatctt
 481 ttcgacatgt acgtgcacgt cacctactct ggcactgaga ccgagtaa
 //

شکل ۳-۱۱- توالی نوکلئوتیدی ژن سازنده پروتئین VP28 ویروس لکه سفید جدایه ایرانی ثبت شده در بانک ژن با شماره دسترسی AB855742

۹-۳- تعیین تیترو ویروس مورد نیاز برای چالش

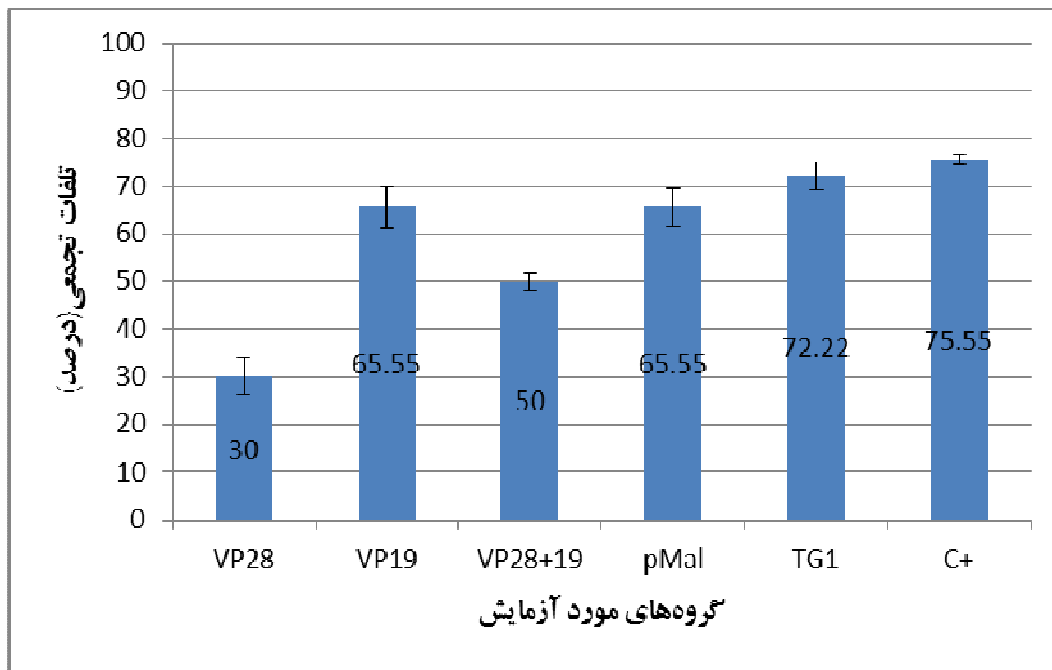
برای تعیین میزان ویروس مورد نیاز یک چالش مطلوب با تقریباً ۷۵٪ تلفات، از همولنف لابلستر آلوده به ویروس لکه سفید ($10^{5.4}$ LD₅₀/ml) رقت‌های مختلف ۱/۱۰ تهیه شد. پست لاروهای ۳۰ (PL30) در رقت‌های متفاوت تهیه شده از همولنف آلوده به ویروس به مدت ۷ ساعت به صورت غوطه‌ور قرار گرفتند. پست لاروها به مدت ۱۴ روز نگهداری شده و تلفات ثبت گردید. پس از این مدت مشخص گردید که رقت ۱/۱ (همولنف رقیق نشده) با تلفات ۷۵ درصدی بایستی در آزمایش چالش مورد استفاده قرار گیرد (نمودار ۳-۱).



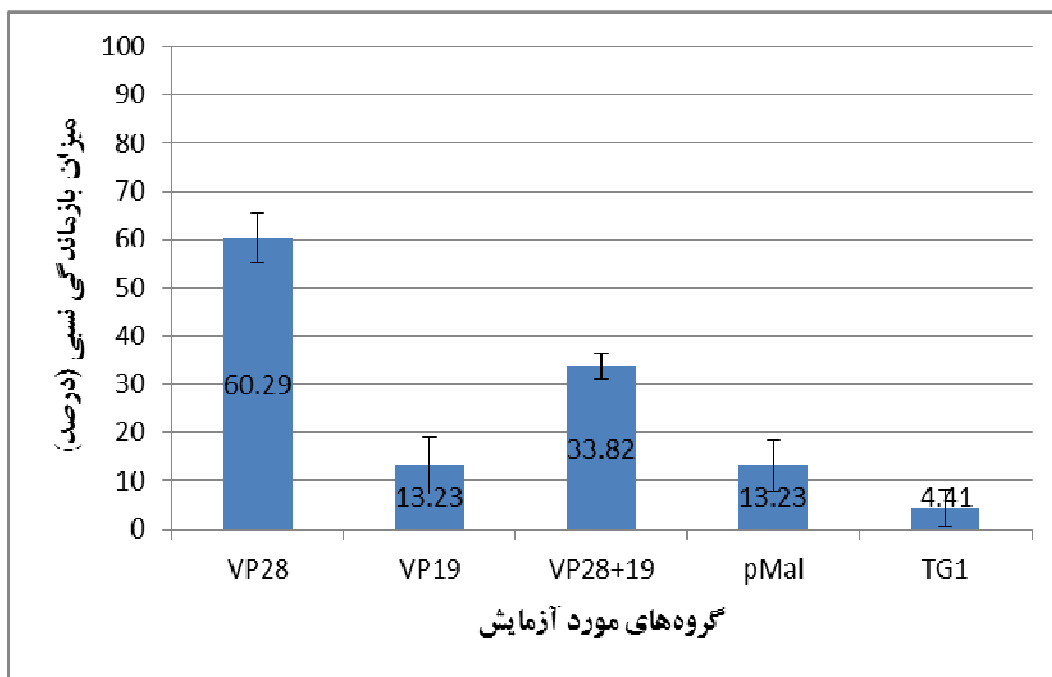
نمودار ۳-۱- مقایسه تلفات تجمعی رقت‌های متفاوت ویروس

۱۰-۳- بررسی ایمن سازی میگوهای سفید غربی

دو روز پس از اتمام تغذیه میگوها با پلیت‌های نوترکیب میگوها با میزان ۱ میلی‌لیتر در ۱ لیتر آب از دوز مناسب ویروس برای مدت ۷ ساعت غوطه‌ور شده سپس به آکواریوم‌های تمیز منتقل شدند. تلفات میگوها از روز دوم پس از مواجهه در گروه‌های مختلف آغاز و به مدت 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 $30 \pm 3/84$ ٪ و بالاترین درصد مربوط به گروه TG1 برابر $72/22 \pm 2/93$ ٪ بود همچنین بالاترین و کمترین میزان بازماندگی نسبی به ترتیب متعلق به گروه‌های VP28 ($60/29 \pm 5/09$ ٪) و TG1 ($4/41 \pm 2/94$ ٪) بود (نمودار ۳-۲ و ۳-۳).

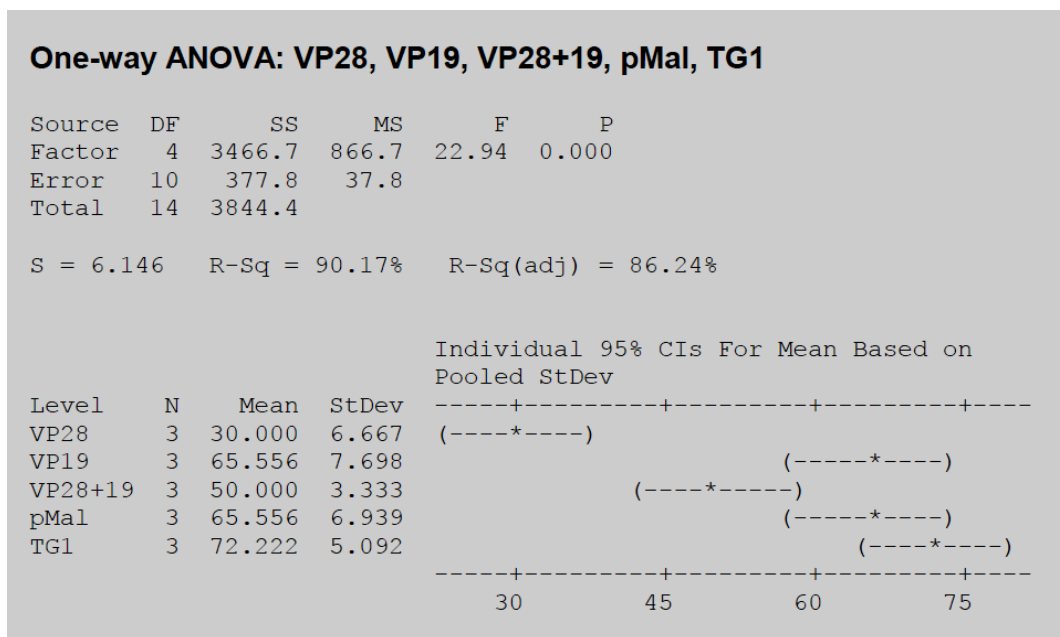


نمودار ۲-۳- مقایسه درصد تلفات تجمعی گروه‌های مورد آزمایش در مواجهه اول



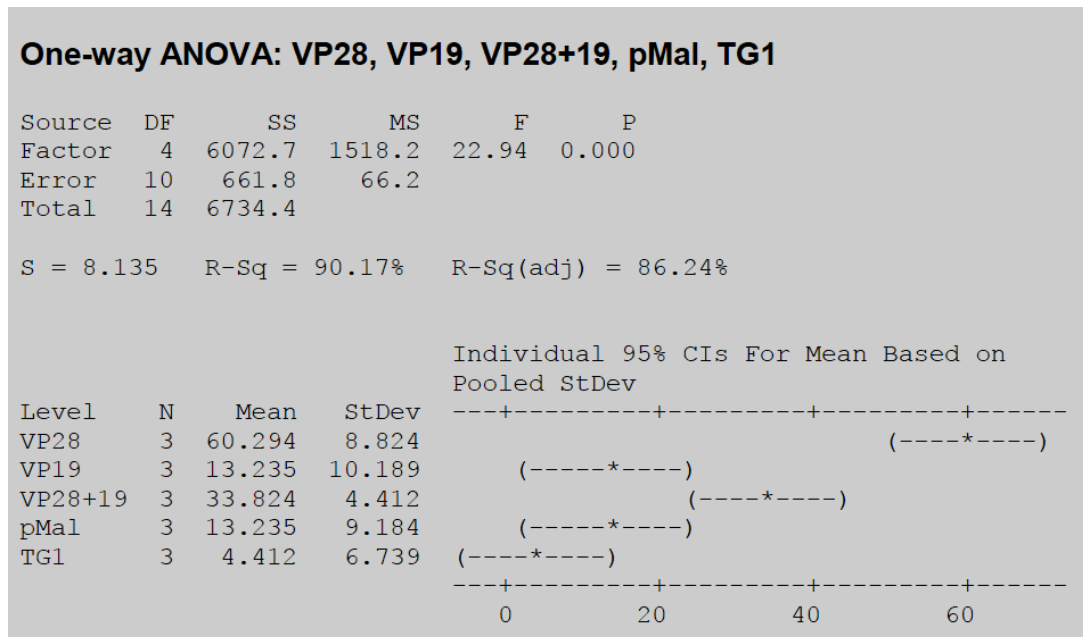
نمودار ۳-۳- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مورد آزمایش در مواجهه اول

در مقایسه درصد تلفات گروه‌های مختلف مشخص گردید که بین گروه VP28 با سایر گروه‌ها و همچنین گروه VP28+19 با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد در حالی که بین گروه‌های VP19، TG1 و pMal اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P < 0.05$) (شکل ۳-۱۲).



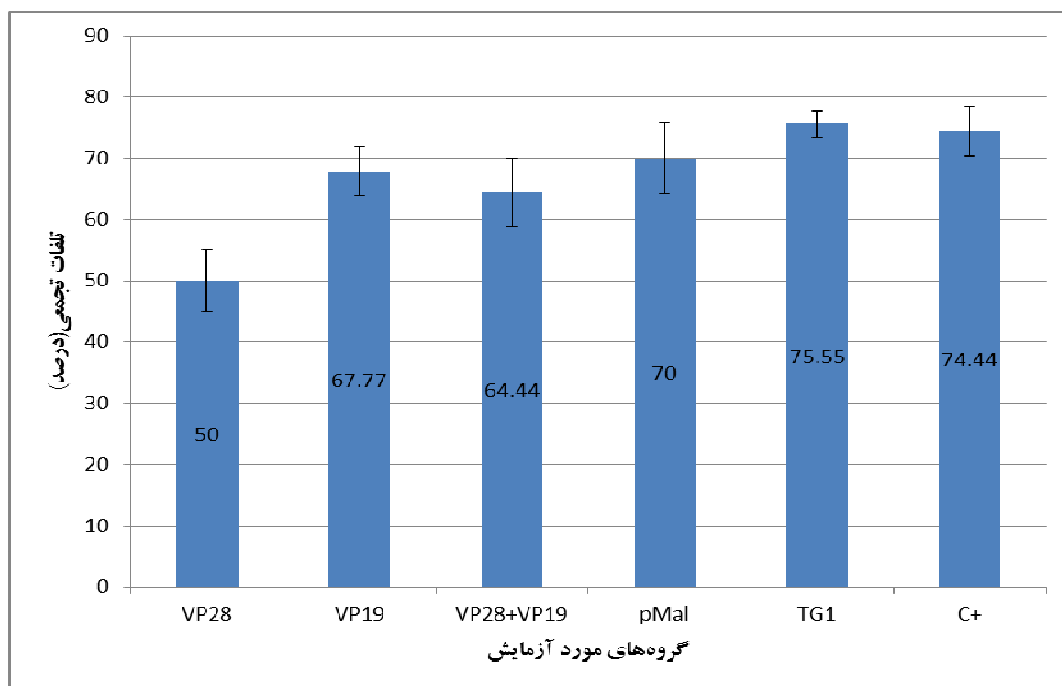
شکل ۳-۱۲- مقایسه درصد تلفات بین گروه های مختلف

در مقایسه میزان بازماندگی نسبی گروه های مختلف نیز بین گروه VP28 با سایر گروه ها و همچنین گروه VP28+19 با سایر گروه ها اختلاف معنی داری وجود داشت در حالی که بین گروه های VP19، TG1 و pMal اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P < 0.05$) (شکل ۳-۱۳).

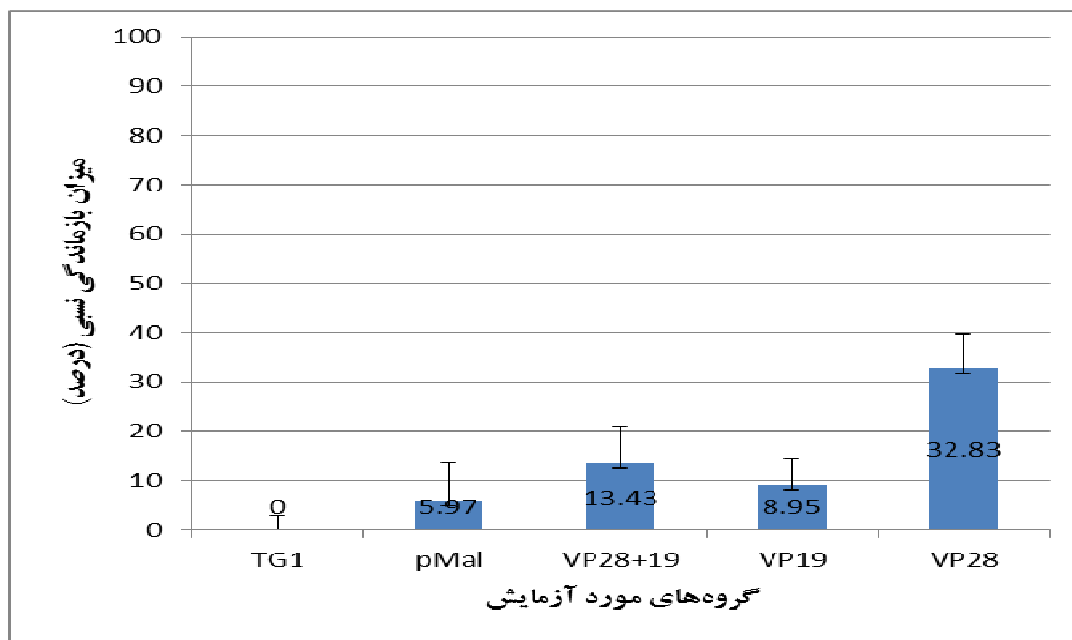


شکل ۳-۱۳- مقایسه میزان بازماندگی نسبی بین گروه های مختلف

در روز ۲۱ پس از اتمام تغذیه میگوها با پلیت های نو ترکیب مجدداً میگوها با میزان ۱ میلی لیتر در ۱ لیتر آب از دوز مناسب ویروس برای مدت ۷ ساعت غوطه ور شده سپس به آکواریوم های تمیز منتقل شدند. تلفات میگوها در این مواجهه نیز از روز دوم پس از مواجهه در گروه های مختلف آغاز و به مدت 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 این مرحله در گروه های مختلف مربوط به گروه VP28 برابر $50/09 \pm 5/50\%$ و بالاترین درصد مربوط به گروه TG1 برابر $75/55 \pm 2/22\%$ بود همچنین بالاترین و کمترین میزان بازماندگی نسبی به ترتیب متعلق به گروه های VP28 ($32/83 \pm 6/83\%$) و TG1 ($0/100 \pm 2/98\%$) بود (نمودار ۳-۴ و ۳-۵).

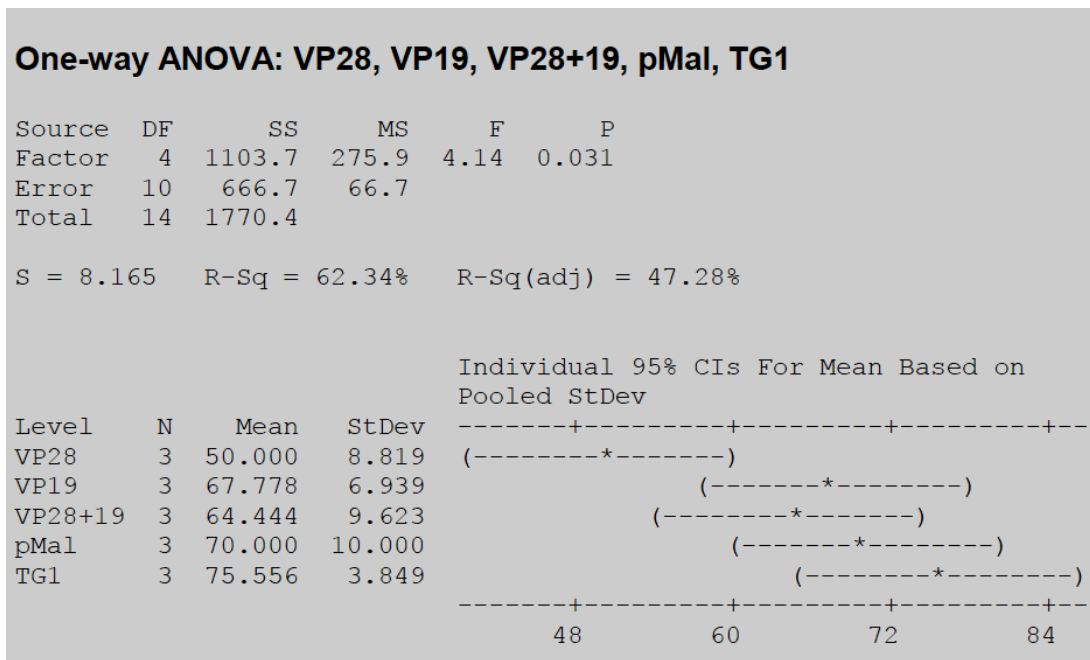


نمودار ۳-۴- مقایسه درصد تلفات تجمعی گروه های مورد آزمایش در مواجهه دوم



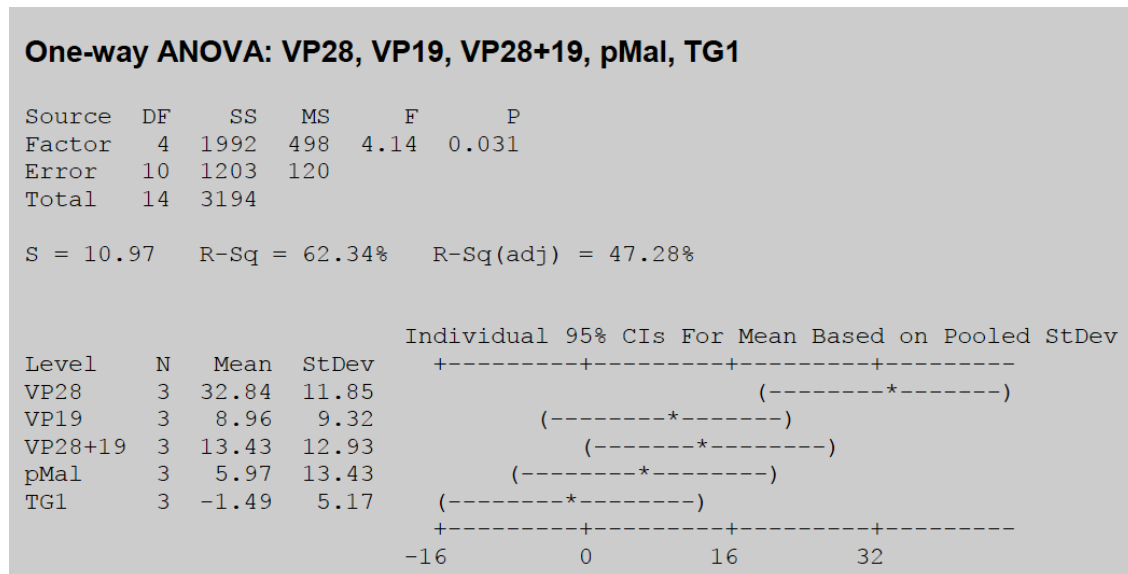
نمودار ۳-۵- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مورد آزمایش در مواجهه دوم

در این مواجهه نیز با مقایسه درصد تلفات گروه‌های مختلف مشخص گردید که بین گروه VP28 با سایر گروه‌ها اختلاف معنی داری وجود دارد در حالی که بین گروه‌های TG1، VP19، pMal و VP28+19 اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P < 0.05$) (شکل ۳-۱۴).



شکل ۳-۱۴ - مقایسه درصد تلفات بین گروه‌های مختلف

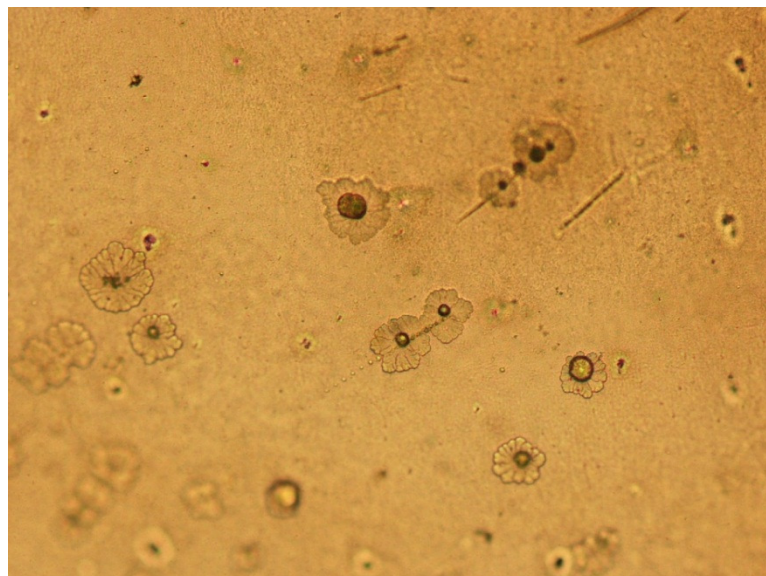
در مقایسه میزان بازماندگی نسبی گروه های مختلف نیز بین گروه VP28 با سایر گروه ها اختلاف معنی داری وجود داشت. در این مرحله بین گروه های VP19، TG1، pMal و VP28+19 اختلاف معنی داری وجود نداشت (شکل ۳-۱۵). ($P < 0.05$)



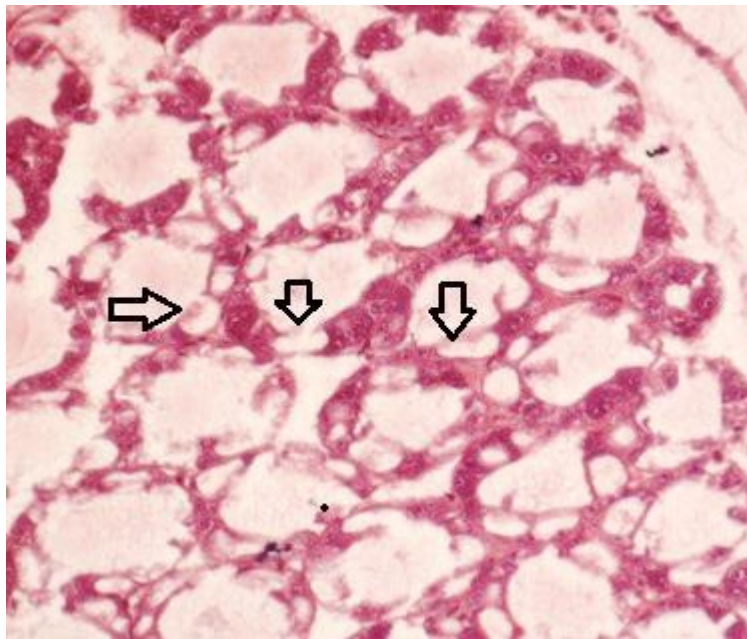
شکل ۳-۱۵- مقایسه میزان بازماندگی نسبی بین گروه های مختلف

۳-۱۱- بررسی گسترش مرطوب و هیستوپاتولوژی آزمایش مواجهه

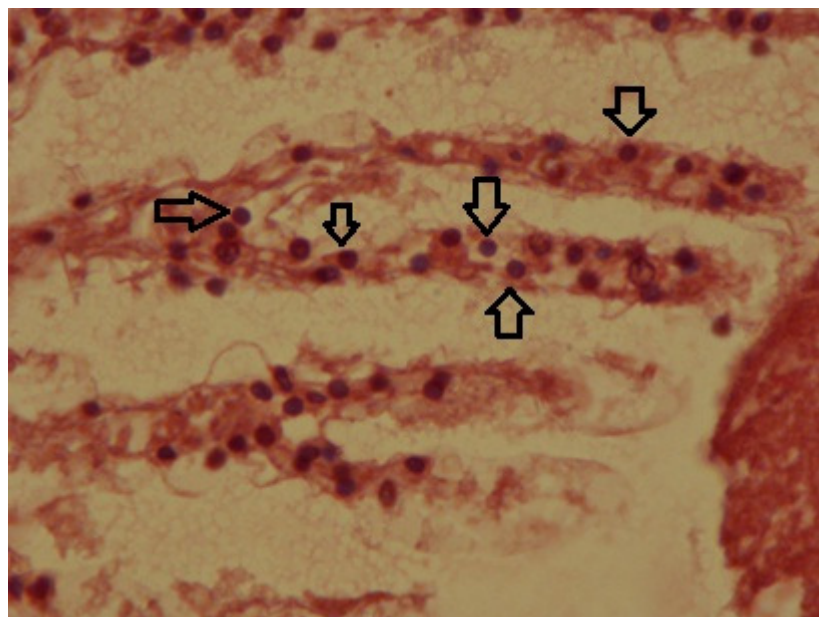
پس از نمونه برداری بافتی، تهیه گسترش مرطوب، برش و رنگ آمیزی مقاطع، ضایعات اختصاصی ویروس در اندام های مختلف میگوها مشاهده گردید (شکل ۳-۱۶، ۳-۱۷، ۳-۱۸).



شکل ۳-۱۶- وجود لکه های سفید روی کاراپاس میگوها پس از مواجهه با ویروس لکه سفید گسترش مرطوب از کاراپاس) (بزرگنمایی X200)



شکل ۳-۱۷- واکنش سلول های هیپاتوپانکراس در میگوها پس از مواجهه با ویروس لکه سفید (هماتوکسیلین، ائوزین/فلوکسین) (بزرگنمایی X۴۰۰)



شکل ۳-۱۸- مراحل مختلف آلودگی هسته سلول های آبشش (پیکان ها) در میگوها پس از مواجهه با ویروس لکه سفید (هماتوکسیلین، ائوزین/فلوکسین) (بزرگنمایی X۴۰۰)

۴- بحث و نتیجه گیری

ویروس لکه سفید به تمام کشورهای پرورش دهنده میگو گسترش یافته و به عنوان یک عامل بیماری‌زای جدی برای سخت‌پوستان شناخته شده است (Walker و همکاران، ۲۰۰۹؛ Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۸؛ Chang و همکاران، ۱۹۹۹؛ Seiffert و همکاران، ۲۰۰۶).

بروز بیماری‌های میگو بالاخص بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده فعالیت‌های تکثیر و پرورش میگو در جهان می‌باشد. بیماری ویروسی لکه سفید یکی از مهلک‌ترین این بیماری‌ها است که موجب تلفات سنگینی در کلیه میگوهای خانواده پنائیده می‌شود. در ایران طی سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ در استان خوزستان و سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر اغلب استخرها و مزارع آلوده به بیماری لکه سفید شده و کل صنعت پرورش میگو با خطر تعطیلی مواجه و حدود ۱۰ میلیارد تومان خسارت به پرورش دهندگان وارد گردید (افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۸؛ آمار نامه شیلات ایران ۱۳۸۴).

از اواخر سال ۲۰۰۷ شواهدی به دست آمد که فرضیه دارا بودن نوعی سیستم ایمنی اکتسابی در بی‌مهرگان را تقویت می‌کرد. 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 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؛ هوشمند، ۱۳۹۳). در این مطالعه نیز اثر پروتئین‌های ویروسی در ایجاد پاسخ ایمنی منتهی به محافظت در برابر ویروس لکه سفید در میگوهای سفید غربی مورد آزمایش قرار گرفتند.

واکسیناسیون مؤثر میگوهای ببری سیاه و ژاپنی با استفاده از ویبریوی غیرفعال شده نیز توسط برخی از محققین گزارش شده است (Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴).

ایمنی ضد ویروس لکه سفید، حضور فعالیت خنثی سازی ویروس در پلاسمای میگوهای آلوده به ویروس از ۲۰ روز تا ۲ ماه پس از عفونت را نشان داده است. این نتایج سبب شده است که محققین به فرضیه القاء پاسخ ضد ویروس و واکسیناسیون بر علیه آن توجه بیشتری داشته باشند (Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴).

سیستم ایمنی ذاتی میگو شامل ایمنی سلولی و خونی به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است. اجزاء ایمنی سلولی عبارتند از هموسیت‌ها که در کپسوله کردن، بیگانه‌خواری، ملانیزه کردن، سمیت (کشندگی) سلولی، ارتباطات سلول به سلول، ایجاد لخته و فعالیت سیستم پروفنل اکسیداز دخالت دارند (Soderhall، ۱۹۹۹). مجموعه‌ای از عوامل خونی شامل آنزیم‌های دفاعی، لکتین‌ها، میانجی‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و تعدادی از پپتیدهای ضد میکروبی شناسایی شده‌اند (Destoumieux و همکاران، ۲۰۰۰؛ Kimbrell و Beutler، ۲۰۰۱؛ Lee و Soderhall، ۲۰۰۲ و Soderhall، ۱۹۹۹).

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، ۱۹۹۹؛ Devaraja و همکاران، ۱۹۹۸؛ Itami و همکاران، ۱۹۸۹؛ Kou و همکاران، ۱۹۸۹؛ Song و Hsieh، ۱۹۹۴ و Teunissen، ۱۹۹۸).

Keith و همکاران (۱۹۹۲)، گزارش دادند که خرچنگ دریایی آمریکا با باکتری غیرفعال شده آئروکوکوس ویریدانس وارسته هوماری واکسینه شد و ۶ روز پس از واکسیناسیون مقاومت در برابر باکتری مشاهده گردید و این مقاومت تا ۹۳ روز ادامه داشت.

در مطالعه‌ی 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).

Kurtz و Franz (۲۰۰۳)، نشان دادند که کوبه پود ماکروسیکلوپس آلییدوس پاسخ ایمنی کارآمدتری را پس از برخورد قبلی با یک انگل که از لحاظ آنتی‌ژنی مشابه بود داشت.

به طور 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 به صورت طبیعی یا تجربی که مجدداً با ویروس لکه سفید مورد چالش قرار گرفتند نشان داد که درصد بازماندگی در مقایسه با میگوهای سالم و غیر بیمار بسیار بالاتر بود (Pan و همکاران، ۲۰۰۰؛ Rojtiinnakorn و همکاران، ۲۰۰۲؛ Roux و همکاران، ۲۰۰۲ و Venegas و همکاران، ۲۰۰۰).

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 به منظور ایمن سازی میگوها در برابر ویروس لکه سفید استفاده شد زیرا تنها راه عملی و کاربردی ایمن سازی در میگو محسوب می‌گردد.

در حالت طبیعی میگوها هم از روش خوراکی و هم از طریق آب آلوده به بیماری مبتلا می‌شوند و به نظر می‌رسد که آبشش‌ها درگاه ورود ویروس به بدن میگوها باشند. همچنین در آزمایش مواجهه نیز از روش غوطه وری استفاده گردید تا حالتی شبیه نحوه آلودگی طبیعی تداعی گردد.

بیش از ۵۰ پروتئین ساختاری و یک پروتئین غیر ساختاری VP9 در ویروس لکه سفید شناسایی شده است (Liu Y. و همکاران، ۲۰۰۶). این پروتئین‌ها را براساس وزن تخمینی آن‌ها در آزمایشات SDS-PAGE یا بر اساس تعداد اسید آمینه پروتئین‌ها نامگذاری کرده‌اند.

در آزمایشات خنثی سازی مشخص شد که پروتئین‌های غشاء (VP24، VP28، VP31، VP36B، VP68، VP76، VP281 و VP466) در مراحل اولیه تکثیر ویروس لکه سفید نقش دارند (Huang و همکاران، ۲۰۰۵؛ He و همکاران، ۲۰۰۵؛ Li، L. و همکاران، ۲۰۰۶؛ Li، L.J. و همکاران، ۲۰۰۵؛ van Hulten و همکاران، ۲۰۰۱b؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۵؛ Yang و Xie، ۲۰۰۶).

پروتئین VP28 در اتصال و نفوذ ویروس به سلول‌ها (Yi و همکاران، ۲۰۰۴) و عفونت عمومی دخالت دارد همچنین VP19 نیز ممکن است در عفونت عمومی به تنهایی و یا در ترکیب با VP28 دخالت داشته باشد (van Hulten و همکاران، ۲۰۰۱b؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات نشان داده است که پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های VP28 و VP19 و آنتی بادی تولیدی بر علیه این پروتئین‌ها در تشخیص جدایه‌های متفاوت این ویروس مناسب بوده است (Musthaq و همکاران، ۲۰۰۶؛ Poulos و همکاران، ۲۰۰۱).

به نظر می‌رسد پروتئین VP28 موجب اتصال ویروس به سلول‌های میگو شده و نقش مهمی را نیز در نفوذ ویروس به درون سلول میزبان ایفا می‌کند. همچنین مشخص شده است که آنتی‌بادی‌های تولید شده بر ضد این پروتئین می‌توانند ویروس را خنثی کرده و عفونت ویروسی را مهار نمایند (Yi، و همکاران، ۲۰۰۴). با این پیش زمینه، مطالعه حاضر به منظور بررسی پتانسیل‌های ایمنی‌زایی پروتئین‌های VP28 و VP19 غشاء ویروس لکه سفید انجام شده و اثر بخشی آن به عنوان یک راه محافظت میگوی سفید غربی در برابر بیماری لکه سفید مورد بررسی قرار گرفت.

اگرچه شواهد حکایت از افزایش میزان بازماندگی میگوها در برابر ویروس لکه سفید دارند اما توانایی حفاظت پروتئین‌های نو ترکیب متغیر بوده و به نظر می‌رسد وابسته به میزان پروتئین دریافتی توسط میگوها باشد (Caipang و همکاران، ۲۰۰۸ و Jha و همکاران، ۲۰۰۶b).

یک احتمال که در پژوهش‌های متعدد به آن اشاره شده آن است که پروتئین‌های نو ترکیب سیستم ایمنی میگو را تحریک می‌کنند و یا به اصطلاح شبیه یک واکسن عمل می‌نماید (Bright Singh و همکاران، ۲۰۰۵؛ Caipang و همکاران، ۲۰۰۸؛ Chang و همکاران، ۲۰۰۳؛ Du و همکاران، ۲۰۰۶؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۶a؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۶b؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۷؛ Mavichak و همکاران، ۲۰۰۹؛ Rout و همکاران، ۲۰۰۷؛ Song و همکاران، ۱۹۹۷؛ Takahashi و همکاران، ۲۰۰۰؛ Vaseeharan و همکاران، ۲۰۰۶؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴a؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴b).

پروتئین‌های نو ترکیب ویروس لکه سفید تا کنون 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؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۶b؛ Mavichak و همکاران، ۲۰۰۹؛ Namikoshi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴a,b؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۶؛ Xu و همکاران، ۲۰۰۶).

در این پژوهش پروتئین های نوترکیب VP28 و VP19 در سیستم بیانی پروکاریوتی pMal-c2X و باکتری اشیریشیا کلی سویه TG1 بیان گردید.

نتایج آزمایش مواجهه اول (پایان روز هفتم پس از تغذیه میگوها با پلیت نوترکیب) نشان داد که در پایان روز ۱۴ پس از مواجهه کمترین درصد تلفات در گروه های مختلف مربوط به گروه VP28 برابر $3/84 \pm 30\%$ و بالاترین درصد مربوط به گروه TG1 برابر $2/93 \pm 72/22\%$ بود همچنین بالاترین و کمترین میزان بازماندگی نسبی به ترتیب متعلق به گروه های VP28 ($5/09 \pm 60/29\%$) و TG1 ($2/94 \pm 4/41\%$) بود

در مقایسه درصد تلفات گروه های مختلف مشخص گردید که بین گروه VP28 با سایر گروه ها و همچنین گروه VP28+19 با سایر گروه ها اختلاف معنی داری وجود دارد در حالی که بین گروه های VP19، TG1 و pMal اختلاف معنی داری وجود نداشت همچنین در میزان بازماندگی نسبی گروه های مختلف نیز بین گروه VP28 با سایر گروه ها و همچنین گروه VP28+19 با سایر گروه ها اختلاف معنی داری وجود داشت در حالی که بین گروه های VP19، TG1 و pMal اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P < 0.05$).

در آزمایش مواجهه دوم (۲۱ روز پس از اتمام تغذیه با پلیت نوترکیب) مشخص گردید که کمترین درصد تلفات در این مرحله نیز در گروه های مختلف مربوط به گروه VP28 برابر $5/09 \pm 50\%$ و بالاترین درصد مربوط به گروه TG1 برابر $2/22 \pm 75/55\%$ بود همچنین بالاترین و کمترین میزان بازماندگی نسبی به ترتیب متعلق به گروه های VP28 ($6/83 \pm 32/83\%$) و TG1 ($2/98 \pm 0/00\%$) بود.

در این مواجهه هم با مقایسه درصد تلفات گروه های مختلف مشخص گردید که بین گروه VP28 با سایر گروه ها اختلاف معنی داری وجود دارد در حالی که بین گروه های VP19، TG1، pMal و VP28+19 اختلاف معنی داری وجود نداشت و در مقایسه میزان بازماندگی نسبی گروه های مختلف نیز بین گروه VP28 با سایر گروه ها اختلاف معنی داری وجود داشت. در این مرحله بین گروه های VP19، TG1، pMal و VP28+19 اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P < 0.05$).

در آزمایش مواجهه سازی اول گروهی از میگوها که پروتئین نوترکیب VP28 را دریافت کرده بودند بالاترین میزان بازماندگی نسبی را در مقایسه با گروه های دیگر نشان دادند در مواجهه سازی دوم باز هم این گروه دارای بالاترین میزان بازماندگی نسبی در میان گروه های مورد آزمایش بود ولی این میزان در مقایسه با آزمایش اول کاهش یافته بود. در گروه های دیگر به استثنای گروه VP19 میزان بازماندگی در مواجهه دوم نسبت به مواجهه اول نیز این سیر نزولی مشاهده گردید به طوری که در گروهی که از باکتری بدون پلاسמיד تغذیه کرده بود تقریباً هیچ گونه محافظتی در برابر بیماری مشاهده نشد. اختلاف در بازماندگی نشان داد که پروتئین نوترکیب VP28 در ایجاد محافظت میگوها در برابر بیماری لکه سفید مؤثر بوده است.

اعتقاد عمومی بر این است که باکتری غیر فعال سبب تحریک سیستم ایمنی عمومی میگو می شود و حضور باکتری در واکسن نوترکیب شاید به خودی خود اثر مثبتی بر بازماندگی میگوها در آزمایش های مواجهه داشته

باشد. در حالی که کاهش میزان بازماندگی نسبی در گروه باکتری بدون پلاسمید نشان‌دهنده عدم تحرک سیستم ایمنی میگوها با سلول باکتری در این آزمایش بوده است.

Witteveldt و همکاران در سال ۲۰۰۴a نشان دادند که میگوهایی که با پروتئین های WSSV واکسینه شده بودند بازماندگی بالاتری نسبت به میگوهای واکسینه نشده داشتند. این محققین همچنین نشان دادند که سیستم ایمنی میگو قادر به شناسایی پروتئین های ساختاری ویروس لکه سفید می باشد و لذا امکان استفاده از راهکار واکسیناسیون را مطرح نمودند.

Witteveldt و همکاران، در سال ۲۰۰۴ b امکان استفاده خوراکی از پروتئین های نو ترکیب ویروس لکه سفید را بعنوان واکسن مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق پروتئین های VP₂₈ و VP₁₉ بطور جداگانه در *E.coli* بیان شدند. متعاقباً باکتری های مولد پروتئین ها پس از غیر فعال شدن وارد پلت های غذایی میگوها گشته و در تغذیه میگوها مورد استفاده قرار گرفتند. چالش میگوهای واکسینه شده به روش ذکر شده (از طریق خوراکی) نشان داد که مصرف پروتئین VP₂₈ از طریق خوراکی موجب افزایش مقاومت میگوها نسبت به چالش با ویروس می شود. این مطالعه همچنین نشان داد که محافظت ایجاد شده در میگوها تا ۳ هفته بطول دوام داشت.

بر اساس نتایج Witteveldt و همکاران ضمن ارزان بر شمردن و قابلیت تجاری شدن این راهکار، حضور باکتری در واکسن را برای ایجاد محافظت مهم و همانند یک ادجوانت در نظر گرفتند.

Yi و همکاران در سال ۲۰۰۴ ضمن اثبات نقش پروتئین VP₂₈ در اتصال به رسپتورهای سطح سلول میزبان و ایجاد عفونت سیستمیک، استفاده از آنتی بادی پلی کلونال بر علیه پروتئین VP₂₈ به منظور خنثی سازی ویروس بیماری لکه سفید را مورد مطالعه قرار دادند. این محققین بر اساس یافته های خویش اعلام نمودند که آنتی بادی های ضد VP₂₈ قادر به خنثی کردن ویروس بوده و از عفونت ویروسی جلوگیری می کنند.

Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۶ در سه آزمایش متفاوت پروتئین های نو ترکیب VP₁₉ و VP₂₈ را به صورت مخلوط در غذا، تزریق پروتئین خالص و غوطه وری در آب دارای پروتئین مورد آزمایش قرار دادند. در پایان گروه های واکسینه شده با پروتئین VP₂₈ درصد محافظت کنندگی بیشتری در مقایسه با پروتئین دیگر در برابر چالش با ویروس از خود نشان دادند و در روش های مورد استفاده روش تزریقی بهتر از دو روش دیگر اعلام شد.

Yi mu و همکاران از باکتری حاوی پلاسمید بیان کننده پروتئین VP₂₈ به روش خوراکی استفاده نموده و توصیه کردند که روش خوراکی به دلیل کپی برداری از ویروس طبیعی روش درمانی ساده تری بر علیه بیماری لکه سفید در آبی پروری می باشد. بر اساس نظر Chen و همکاران ویروس لکه سفید ابتدا در روده جایگزین شده و تکثیر می یابد سپس به آبشش منتقل می شود. 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 می باشد.

در مطالعه ای که Lin Fu و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام دادند از باکتری باسیلوس سابتلیس به عنوان ناقل پروتئین VP28 به روش خوراکی در میگوی وانامی استفاده کردند و مشاهده کردند که میگوهای تغذیه شده با پلت های پوشیده شده با باکتری نوترکیب در برابر چالش با ویروس لکه سفید ۸۳/۳٪ محافظت نشان دادند. براساس نتایج به دست آمده در مطالعه هوشمند (۱۳۹۳) و سایر تحقیقات در این زمینه به نظر می رسد ژن VP28 ویروس لکه سفید به دلیل میزان حفاظت بسیار بالا کاندید مناسبی برای بررسی های اپیدمیولوژی نمی باشد اما در مقابل می توان از این ژن و پروتئین حاصل از آن برای توسعه روش های تشخیص بیماری لکه سفید بر پایه پی سی آر یا آنتی بادی و نیز تولید واکسن های نوترکیب به منظور تحریک سیستم ایمنی میگوها استفاده نمود. به نظر می رسد درک بهتر از پروتئین های ساختاری ویروس لکه سفید و جایابی آنها در ویرون، نحوه سرهم شدن یا مونتاژ ویروس و راه عفونت آن و کشف داروهای ضد ویروسی را روشن تر خواهد ساخت. به عنوان یک نتیجه کلی می توان اشاره نمود که با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و نیز نتایج هوشمند (۱۳۹۳) پروتئین نوترکیب VP28 به هر شکلی در اختیار میگوها قرار گیرد قابلیت ایجاد محافظت را در برابر ویروس لکه سفید خواهد داشت در حالی که 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.

پیشنهادها

با توجه به نتایج حاصل شده در این پژوهش موارد زیر پیشنهاد می گردد:

- ۱- استفاده از سیستم های بیانی دیگر مثلاً استفاده از سیستم های بیانی یوکاریوتی برای تولید DNA واکسن ها به منظور بررسی تولید پروتئین نو ترکیب در بدن میگو.
- ۲- با توجه به این که ثابت بودن این قسمت از ژنوم ویروس لکه سفید در مطالعات متعددی به اثبات رسیده و در تحقیق هوشمند (۱۳۹۳) نیز این مقایسه انجام شد استفاده از این ژن در طراحی و ساخت کیت های تشخیصی توصیه می شود.
- ۳- استفاده از میگوهای با سن بالاتر به منظور بررسی پارامترهای ایمنی شناسی میگو در آزمایش های مواجهه.
- ۴- استفاده از روش های تشخیصی مثل ایمنوهیستوشیمی با به کارگیری آنتی بادی های تولیدی بر علیه پروتئین های نو ترکیب تولید شده.

تشکر و قدردانی

از رئیس و معاونین محترم پژوهشکده به دلیل حمایت از اجرای این پروژه قدردانی می گردد. از همکاران محترم بخش بهداشت و بیماری های آبزیان پژوهشکده سپاسگزاری می گردد همچنین از رئیس و همکاران محترم بخش آبی پروری که در اجرای قسمت های مواجهه همکاری لازم را با مجری به عمل آوردند سپاسگزاری می گردد.

از سرکار خانم دکتر معتمد به دلیل همکاری در قسمت مواجهه سپاسگزاری می گردد.

از سرکار خانم داغری کارشناس محترم بخش ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی به دلیل همکاری های بی دریغشان قدردانی می گردد.

منابع

- ۱- آمار نامه شیلات ایران (۱۳۸۴). میزان میگوی پرورشی در سال ۱۳۸۴. انتشارات سازمان شیلات ایران ۶۱ ص.
- ۲- افشارنسب، محمد؛ سیدمرتضایی، سیدرضا؛ آهنگرزاده، مینا؛ هوشمند، حسین؛ کر، نیازمحمد؛ جرفی، الهام؛ سبزلیزاده، سارا و محسنی نژاد، لفته، (۱۳۸۸). بررسی وضعیت بهداشت و بیماری های مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور، گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، موسسه تحقیقات شیلات ایران.
- ۳- هوشمند، حسین (۱۳۹۳). بررسی محافظت میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) در برابر ویروس بیماری لکه سفید با استفاده از تجویز خوراکی پروتئین نو ترکیب VP28 کپسوله شده زیستی. پایان نامه دکتری PhD بهداشت آبریان از دانشگاه شهید چمران اهواز، شماره ۹۳۵۸۹۵۹.
- 4- Abila, R.O. (2003). Fish trade and food security: Are they reconcilable in Lake Victoria. Rome: FAO.
- 5- Adger, W.N. (1998). Sustainability and social resilience in coastal resource use. CSERGE workingpaper GEC, 97-23.
- 6- 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, 178: 1-11.
- 7- Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J, Leong JA. (1996). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. Molecular Marine Biology and Biotechnology;5:114–22.
- 8- Anonymous (2003) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office International des Epizooties, Paris, France. APHIS-USDA (2005) Impact Worksheet White Spot Disease in Brazil. APHIS-USDA, Natural Resources Research:Fort Collins, CO Center.
- 9- Arts J.A.J., Taverne-Thiele A.J., Savelkoul H.F.J. & Rombout J.H.W.M. (2007) Hemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology 23, 164–170.
- 10- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstone, RE., Moore, DD., Seidman, JG., Smith, JA and Struhl, K. (1992). Short Protocols in Molecular Biology. 2nd edition. John Wiley and sons. New York. Pp: A1-15.
- 11- Balcázar, J.L. & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Current Microbiology 55, 409–412.
- 12- Bardhan, P. (2006). Globalization and rural poverty. World Development 34, 1393–404.
- 13- Barton, G.M., 2007. Viral recognition by toll-like receptors. Semin.Immunol. 19, 33-40. Berteau, O. and Mulloy, B., 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. Glycobiology 13, 29-40.
- 14- Brey, P.T., Lee, W., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., Francois, M., Ashida, M., 1993. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6275-6279.
- 15- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. & Phillips, M. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO, Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok. RAP Publication 2004/10, pp. 1–12.
- 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, 66:265-270.
- 16- 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 25:315-320.
- 17- Chang CF, Su MS, Chen HY, Lo CF, Kou GH, Liao IC. (1999). Effect of dietary b-1, 3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in post larval and juvenile *Penaeus monodon*. Dis Aquat Organ; 36: 163-168.

- 18- Chang P.S., Lo C.F., Wang Y.C. & Kou G.H. (1996). Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, 131–139.
- 19- Chang P.S., Chen H.C. & Wang Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture* 164, 233–242.
- 20- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y. & Liao, I.C. (2003). Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Journal of Fish and Shellfish Immunology* 15, 297-310.
- 21- Chang, Y.S., Peng, S.E., Wang, H.C., Hsu, H.C., Ho, C.H., Wang, C.H., Wang, S.Y., Lo, C.F. & Kou, G. H. (2001). Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from American coastal waters. *Marine Biotechnology* 3, 163–171.
- Chen L.L., Leu J.H., Huang C.J., Chou C.M., Chen S.M., Wang C.H., Lo C.F. & 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* 293, 44–53.
- 22- 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. & Wang C.H. (2002b). Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 301, 136–147.
- 23- Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. & Phongdara, A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 233, 23-30.
- Chou H.Y., Huang C.Y., Lo C.F. & Kou G.H. (1998). Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture* 164, 263–276.
- 24- Chou H.Y., Huang C.Y., Wang C.H., Chiang H.C. & Lo C.F. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 165–173.
- 25- Citarasu T, Sivaram V, Immanuel G, Rout N, Murugan V., (2006). Influence of selected Indian immunostimulant 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*, 21:372–84.
- 26- Claydon K., Cullen B. & Owens L. (2004) OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 62, 265–268.
- 27- Dehghan M., Jafariyan H., Habibi Rezaei M., Amoozagar M.A., 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*, 3 (6): 523-528.
- 28- Destoumieux, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M. And Bachere, E., (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*, 113: 461-469.
- 29- 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.
- 30- Di Leonardo V.A., Bonnichon V., Roch P., Parrinello N. & Bonami J.R. (2005) Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera *Marsupenaeus* and *Palaemon*. *Journal of Fish Diseases* 28, 565–569.
- 31- Du, H.H., Xu, Z.R., Wu, X.F., Li, W.F. & Dai, W. (2006). Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus. *Aquaculture* 260, 39–43.
- 32- Dupuy, J.W., Bonami, J.R. & Roch, P. (2004). A synthetic antibacterial peptide from *Mytilus galloprovincialis* reduces mortality due to white spot syndrome virus in penaeid shrimp. *Journal of Fish Diseases* 27, 57-64.
- 33- Durand S., Lightner D.V., Nunan L.M., Redman R.M., Mari J. & Bonami J.R. (1996) Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, 59–66.
- 34- Durand S., Lightner D.V., Redman R.M. & Bonami J.R. (1997) Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 205–211.

- 35- Durand, S.V., Tang, K.F.J. & Lightner, D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health* 12, 128–135.
- 36- Escobedo-Bonilla C.M., Wille M., Alday-Sanz V., Sorgeloos P., Pensaert M.B. & Nauwynck H.J. (2005) In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in SPF *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. *Diseases of Aquatic Organisms* 66, 163–170.
- 37- Escobedo-Bonilla C.M., Wille M., Alday-Sanz V., Sorgeloos P., Pensaert M.B. & Nauwynck H.J. (2007) Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in SPF *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 74, 85–94.
- 38- Escobedo-Bonilla CM, Alday-Sanz V, Wille M, Sorgeloos P, Pensaert MB, Nauwynck HJ. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*; 31(1): 1-18.
- 39- FAO (2006) Fishstat, Universal Software for Fishery Statistical Time Series, Version 2.3. FAO, Rome, Italy.
- 40- Filee, J. & Chandler, M. (2008). Convergent mechanisms of genome evolution of large and giant DNA viruses. *Research in Microbiology* 159, 325-331.
- 41- Flegel T.W. & Alday-Sanz V. (1998) The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. *Journal of Applied Ichthyology* 14, 269–273.
- 42- Flegel TW. (1997). Major viral diseases of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 13:433–42.
- 43- Flegel, T.W. (2007). Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Developmental and Comparative Immunology* 31, 217–31.
- Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, Z.J., Alcocer-Gonzalez, J.M., Rosales-Encinas, J.L. & Ibarra-Gamez, C. (2004). White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture* 242, 53–68.
- 44- Global Aquaculture Alliance (1999a). Shrimp white spot disease in Latin America an update. *Global Aquaculture Advocate* 2, 34–45.
- Global Aquaculture Alliance (1999b). Shrimp white spot virus confirmed in Central America. *Global Aquaculture Advocate* 2, 1–5.
- 45- Gómez, G.D. & Shen, M.A. (2008). Influence of probiotics on the growth and digestive enzyme activity of white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Ocean University of China (English Edition)* 7, 215–218.
- 46- Granja, C.B., Aranguren, L.F., Vidal, O.M., Aragon, L. & Salazar, M. (2003). Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? *Diseases in Aquatic Organisms* 54, 73–78.
- 47- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. comp. immunol.* 25, 565-577.
- 48- Han F. & Zhang X. (2006) Internal initiation of mRNA translation in insect cell mediated by an internal ribosome entry site (IRES) from shrimp white spot syndrome virus (WSSV). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344, 893–899.
- 49- Han F., Xu J. & Zhang X.. (2007) Characterization of an early gene (wsv477) from white spot syndrome virus (WSSV). *Virus Genes* 37, 193–198.
- 50- He, N., Qin, Q., Xu, X., (2005). Differential profile of genes expressed in hemocytes of white spot syndrome virus resistant (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research*, 66, 39-45.
- 51- Hossain, S., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. & Karunasagar, I. (2001). Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture* 198, 1–11.
- 52- Huang C., Zhang X., Lin Q., Xu X. & Hew C.L. (2002b) Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. *Journal of General Virology* 83, 2385–2392.
- 53- Huang C., Zhang X., Lin Q., Xu X., Hu Z. & Hew C.L. (2002a) Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 223–231.
- 54- Huang, C.C., Song, Y.L., (1999). Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev. Comp. Immunol.* 23, 545-552.

- 55- Huang, R., Xie, Y., Zhang, J., Shi, Z., (2005). A novel envelope protein involved in White spot syndrome virus infection. *Journal of General Virology*, 1357-61.
- 56- ICTV (2008). Template for Taxonomic Proposal to the ICTV Executive Committee to rename an existing virus name. *immunity. Nature*;425:37-8.
- 57- Inouye K, Miwa S, Oseko N, Nakano H, Kimura T, Momoyama K, et al. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology*;29:149-58.
- 58- Inouye K., Yamano K., Ikeda N., Kimura T., Nakano H., Momoyama K., Kobayashi J. & Miyajima S. (1996) The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia. *Fish Pathology* 31, 39-45.
- 59- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. And Takahashi, Y., (1989). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164: 277-288.
- 60- Jesus, G. S., Gabriel, A. & Humberto, M. (2007). White spot syndrome virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Research* 38, 1339-1354.
- 61- Jha, R.K. Xu, Z.R. and Pandey A. (2006a). Protection of *Procambarus clarkia* against white spot syndrome virus using recombinant subunit injection vaccine expressed in *Pichia pastoris*. *Fisheries Science* 72:1011-1019.
- 62- 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 *Pichia pastoris*. *Fish and Shellfish Immunology* 224:295-307.
- 63- Jha, R.K. Xu, Z.R. Shen, J. Bai, S.J. Sun, J.Y. and Li, W.F. (2006b). The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkia*. *Immunology Letters* 105:68-76.
- 64- Jiqiu, L., Beiping, T. & Kangsen, M. (2009). Dietary probiotic *Bacillus OJ* and isomal to oligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 291, 35-40.
- 65- Jiravanichpaisal, P., Soderhall, K. & Soderhall, I. (2004). Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Journal of Fish and Shellfish Immunology* 17, 265-275.
- Johnson, K., van Hulten, M.C.W. & Barnes, A.C. (2008). "Vaccination" of shrimp against viral pathogens: phenomenology and underlying mechanisms. *Vaccine* 26, 4885-4892.
- Karunasagar I., Otta S.K. & Karunasagar I. (1997) Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture* 153, 9-13.
- 66- Kasornchandra J., Boonyaratpalin S. & Itami T. (1998) Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164, 243-251.
- 67- Keith, I. R., Paterson, W. D., Airdrie, D. And Boston, L. D., (1992). Defense mechanisms of the American lobster (*Homarus americanus*): vaccination provided protection against gaffkemia infections in laboratory and field trials. *Fish and Shellfish Immunology*, 2: 109-119.
- 68- Kiatpathomchai W., Boonsaeng V., Tassanakajon A., Wongteerasupaya C., Jitrapakdee S. & Panyim S. (2001) A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 235-239.
- 69- Kim C.S., Kosuke Z., Nam Y.K., Kim S.K. & Kim K.H. (2007) Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 242-246.
- 70- Kimbrell, D. A. And Beutler, B., (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Reviews Genetics*, 2: 256-267.
- 71- Kou G.H., Peng S.E., Chiu Y.L. & 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.
- 72- Kurtz, J. And Franz, K., (2003). Innate defense: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425: 37-38.
- 73- Lee, S.Y., Söderhäll, K., (2002). Early events in crustacean innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 12, 421-437.
- 74- Leu J.H., Tsai J.M., Wang H.C., Wang A.H.J., Wang C.H., Kou G.H. & Lo C.F. (2005) The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. *Journal of Virology* 79, 140-149.

- 75- Lewis, R.R. III., Phillips, M.J., Clough, B. & Macintosh, D.J. (2003). Thematic review on coastal wetland habitats and shrimp aquaculture. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium, pp. 81.
- 76- Li H., Zhu Y., Xie X. & Yang F. (2006a) Identification of a novel envelope protein (VP187) gene from shrimp white spot syndrome virus. *Virus Research* 115, 76–84.
- 77- Li HX, Meng XL, Xu JP, Lu W, Wang J.(2005). Protection of crayfish, *Cambarus clarkii*, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein. *Journal of Fish Disease*;28:285–91.
- 78- Li L., Xie X. & Yang F. (2005a) Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31. *Virology* 340, 125–132.
- 79- Li Q., Chen Y. & Yang F. (2004) Identification of a collagen-like protein gene from white spot syndrome virus. *Archives of Virology* 149, 215–223.
- 80- Li, L., Xie, X., Yang, F., (2005). Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31. *Virology*, 340,125-32.
- 81- Li, L.J., Yuan, J.F., Cai, C.A., Gu, W.G., Shi, Z.L., (2006). Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. *Archives of Virology*, 151, 1309-1317.
- 82- Li, P., Burr, G.S., Gatlin, D.M., Hume, M.E., Patnaik, S., Castille, F.L. & Lawrence, A.L. (2007). Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *Journal of Nutrition* 137, 2763–8.
- 83- Li, Q., Zhang, J., Chen, Y. & Yang, F. (2003). White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. *Diseases in Aquatic Organisms* 57, 261–264.
- 84- Lightner D.V. (1996) *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Lightner D.V., Hasson K.W., White B.L. & Redman R.M. (1998) Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health* 10, 271–281.
- 85- 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.
- 86- Lightner, D.V., Redman, R.M., Poulos, B.T., Nunan, L.M., Mari, J.L. & Hasson, K.W. (1997). Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Scientific and Technical Review* 16, 146–160.
- 87- Liu Y., Wu J., Song J., Sivaraman J. & Hew C.L. (2006) Identification of a novel nonstructural protein, VP9, from white spot syndrome virus: its structure reveals a ferredoxin fold with specific metal binding sites. *Journal of Virology* 80, 10419–10427.
- 88- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2006. Antipolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Virol.* 80, 10365-10371.
- 89- Lo C.F., Ho C.H., Chen C.H., Liu K.F., Chiu Y.L., Yeh P.Y., Peng S.E., Hsu H.C., Liu H.C., Chang C.F., Su M.S., Wang C.H. & Kou G.H. (1997) Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms* 30, 53–72.
- 90- 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. & Kou G.H. (1996b) White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, 215–225.
- 91- Lo C.F., Leu J.H., Ho C.H., Chen C.H., Peng S.E., Chen Y.T., Chou C.M., Yeh P.Y., Huang C.J., Chou H.Y., Wang C.H. & Kou G.H. (1996a) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25, 133–141.
- 92- Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB.(2004). Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunology Review*;198:10–24.
- 93- Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K.(2001). Immunity to viral haemorrhagic Lotz J.M. & Soto A.M. (2002) Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, 199–209.

- 94- Lotz, J.M. & Soto, M.A. (2002). Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases in Aquatic Organisms* 50, 199–209.
- 95- Luo, T., Li, F., Lei, K., Xu, X., 2007. Genomic organization, promoter characterization and expression profiles of an antiviral gene PmAV from the shrimp *Penaeus monodon*. *Mol. Immunol.* 44, 1516-1523.
- 96- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z. & Xu, X. (2003). PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters* 551, 53–57.
- 97- Marks, H., Goldbach, R.W., Vlak, J.M. & van Hulten, M.C.W. (2004). Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Archives of Virology* 149, 673–697.
- 98- Marks, H., van Duijse, J.J.A., Zuidema, D., van Hulten, M.C.W. & Vlak, J.M. (2005a). Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. *Virus Research* 110, 9-20.
- 99- Marks, H., Vorst, O., van Houwelingen, A.M., van Hulten, M.C. & Vlak, J.M. (2005b). Gene-expression profiling of white spot syndrome virus in vivo. *Journal of General Virology* 86, 2081–2100.
- 100- 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* 57:83-90.
- 101- Mikalsen AB, Torgersen J, Alestrom P, Hellemann AL, Koppang EO, Rimstad E. (2004). Protection of Atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms* ;60:11–20.
- 102- Moon, C.H., Do, J.W., Cha, S.J., Yoon, W.J., Kim, S.B., Ko, M.S., Park, M.A., Kim, J.W., Sohn, S.K., Lee, J.H. & Park, J.W. (2003). Highly conserved sequences of three major virion proteins of a Korean isolate of white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases in Aquatic Organisms* 53, 11–13.
- 103- Musthaq, S.S., Sudhakaran, R., Ahmed, V.P.I., Balasubramanian, G., Sahul Hameed, 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*, 256, 34-41.
- 104- Nadala E.C.B. & Loh P.C. (1998) A comparative study of three different isolates of white spot virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 33, 231–234.
- 105- Namikoshi A, Wu JL, Yamashita T, Nishioka T, Arimoto M, Muroga K. (2004). Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*;229:25–35.
- 106- Newman, S.G., Bullis, R.A., 2001. Immune mechanisms of shrimp: form, function and practical application. In: Browdy C.L. and Jory D.E., editors. 2001. *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 226-237 pp.
- 107- OIE (World Organisation for Animal Health, formerly Office International des Epizooties) (2003). *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*, 4th edn. OIE, Paris.
- 108- Otta S.K., Shubha G., Joseph B., Chakraborty A., Karunasagar I. & Karunasagar I. (1999) Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Diseases of Aquatic Organisms* 38, 67–70.
- 109- Pan, J., Kurosky, A., Xu, B., Chopra, A.K., Coppenhaver, D.H., Singh, I.P., Baron, S., (2000). Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Antiviral Research*, 48, 39-47.
- 110- Park J.H., Lee Y.S., Lee S. & Lee Y. (1998) An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms* 34, 71–75.
- 110- Park, J.H., Seok, S.H., Cho, S.A., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Kim, H.Y., Chang, S.O. & Park, J.H. (2004). Safety and protective effect of a disinfectant (STEL water) for white spot syndrome viral infection in shrimp. *Diseases in Aquatic Organisms* 60, 253–257.
- Phuoc, L.H., Corteel, M., Thanh, N.C., Nauwynck, H., Pensaert, M., Alday-Sanz, V., Van den Broeck, W., Sorgeloos, P. & Bossier, P. (2009). Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 290, 61-68.
- 111- Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J., Lightner, D.V., (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Diseases in Aquatic Organisms*, 47, 13-23.
- 112- Pramod-Kiran R., Rajendran K., Jung S. & Oh M. (2002) Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases* 25, 201–207.
- 113- Rahman, M.M., Escobedo-Bonilla, C.M., Corteel, M., Dantas-Lima, J.J., Wille, M., Sanz, V.A., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P. & Nauwynck, H.J. (2006). Effect of high water temperature (33degrees C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 261, 842-849.

- 114- Rajan P.R., Ramasamy P., Purushothaman V. & Brennan G.P.(2000) White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *P. indicus*. *Aquaculture* 184, 31–44.
- 115- Rajendran K.V., Vijayan K.K., Santiago T.C. & Krol R.M.(1999) Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crayfish and lobsters from India. *Journal of Fish Diseases* 22,183–191.
- 116- Robalino, J., Bartlett, T.C., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W., (2007). Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 539-547.
- 117- Robalino, J., Browdy, C.L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., Warr, G.,(2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* 78, 10442-10448.
- 118- Rodriguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchan, F., de B I., Alday, V. & Calderon, J. (2003). White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Disease* 26, 439–450.
- 119- 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*, 13: 69-83.
- 120- Rosenberry, B. (1996). *World shrimp farming 1996*. Shrimp News International, San Diego, CA, USA, 164 pp.
- 121- Rosenberry, B. (2000). *World shrimp farming 2000*. Shrimp News International, San Diego, CA, USA, 324 pp.
- 122- Rosenberry, B. (2002). *World shrimp farming 2002*. Shrimp News International, San Diego, CA, USA, pp. 3–6.
- 123- Rosenberry, B. (2004). *World shrimp farming 2004*. Shrimp News International, San Diego, CA, USA, pp. 52–89.
- 124- Rout, N., Kumar, S., Jaganmohan, S. & Murugan, V. (2007). DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine* 25, 2778–86.
- 125- Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R., Dhar, A.K., (2002). The lipopolysaccharide and β -1, 3 glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*, 76, 7140-7149.
- 126- Sahtout, A.H., Hassan, M.D., Shariff, M., 2001. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.* 44, 155-159.
- 127- Sahul Hameed, A.S., Sarathi, M., Sudhakaran, R., Balasubramanian, G., Musthaq, S.S., 2006. Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus (WSSV) infected penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometric analysis. *Aquaculture* 256, 111-120.
- 128- Sahul-Hameed A.S., Anilkumar M., Raj M.L.S. & Jayaraman K. (1998) Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture* 160, 31–45.
- 129- Sahul-Hameed, A.S., Balasubramanian, G., Syed Musthaq, S. & Yoganandhan, K. (2003). Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases in Aquatic Organisms* 57, 157–161.
- 130- Schröder, M., Bowie, A.G., 2005. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander ? *Trends Immunol.* 26, 462-468.
- 131- Seiffert W, Beltrame E, Andreatta E, Maggioni D. Enfermidades, uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. *Panorama da 2006*; 97: 32-38.
- 132- Shi Z., Wang H., Zhang J., Xie Y., Li L., Chen X., Edgerton B.F. & Bonami J.R. (2005) Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases* 28, 151–156.
- 133- Singh, I.S.B., Manjusha, M., Pai, S.S. & Philip, R. (2005). Fenneropenaeus indicus is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus. *Diseases in Aquatic Organisms* 66, 265–70.
- 134- Soderhall, K., (1999). Invertebrate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 23: 263-266.
- 135- Solano, J.L.O. & Soto, J.O. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology* 23, 519–525.

- 136- Song, Y. L. And Hsieh, Y. T., (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology*, 18: 201-209.
- 137- Song, Y.L. Liu, J.J. Chan, L.C. and Sung, H.H. 1997. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Developments in Biological Standardization*. 90:413-421.
- 138- Sulaiman ZH, Ming Chan RH, Simanjuntak PM.(1999). Gene expression in black tiger prawns following intramuscular injection of β -gal plasmid. *Aquaculture International*;7:333-40.
- 139- Supamattaya K., Hoffman R.W., Boonyaratpalin S. & Kanchanaphum P. (1998) Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Diseases of Aquatic Organisms* 32,79-85.
- 140- Takahashi Y., Kondo M., Itami T., Honda T., Inagawa H., Nishizawa T., Soma G.I. & Yokomiso Y. (2000) Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea* agglomerans lipopolysaccharide (LPS). *Fish & Shellfish Immunology* 10, 555-558.
- 141- Takano T, Iwahori A, Hirono I, Aoki T.(2004). Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish and Shellfish Immunology*;17:367-74.
- 142- Teunissen, O. S. P., Faber, R., Booms, G. H. R., Latscha, T. And Boon, J. H., (1998). Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*, 164: 359-366.
- 143- Tsai J.M., Wang H.C., Leu J.H., Hsiao H.H., Wang A.H.J., Kou G.H. & Lo C.F. (2004) Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Virology* 78, 11360-11370.
- 144- Tsai J.M., Wang H.C., Leu J.H., Wang A.H.J., Zhuang Y., Walker P.J., Kou G.H. & Lo C.F. (2006) Identification of the nucleocapsid, tegument and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology* 80,3021-3029.
- 145- van De Braak C.B.T., Botterblom M.H.A., Huisman E.A., Rombout J.H.W.M. & 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* 51, 149-155.
- 146- van Drunen LHS, Gerdtts V, Loehr BI, Pontarollo R, Rankin R, Uwiera R, et al.(2000). Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals. *Advance Drug Delivery Review*;43:13-28.
- 147- van Hulten M.C.W. & Vlak J.M. (2002) Genetic evidence for a unique taxonomic position of white spot syndrome virus of shrimp: genus *Whispovirus*. In: *Diseases in Asian Aquaculture IV* (ed. by C.R. Lavilla-Pitogo & E.R. Cruz-Lacierda), pp. 25-35. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Cebu City, Philippines.
- 148- van Hulten M.C.W., Witteveltdt J., Peters S., Kloosterboer N., Tarchini R., Fiers M., Sandbrink H., Klein-Langhorst R. & Vlak J.M. (2001a) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286, 7-22.
- 149- van Hulten M.C.W., Witteveltdt J., Snippe M. & Vlak J.M. (2001b) White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 285, 228-233.
- 150- Vaseeharan, B., Anand, T.P., Murugan, T. & Chen, J.C. (2006). Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Letters of Applied Microbiology* 43, 137-42.
- 151- Venegas C.A., Nonaka L., Mushiake K., Nishizawa T. & Muroga K. (2000) Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Diseases of Aquatic Organisms* 42, 83-89.
- 152- Vlak, J.M., Bonami, J.R., Flegel, T.W., Kou, G.H., Lightner, D.V., Lo, C.F., Loh, P.C. & Walker, P.W. (2005). *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball, eds.), pp. 187-192. Elsevier, Amsterdam.
- 153- Walker, P.J. & Mohan, C.V. (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Review in Aquaculture* 1, 125-154.
- 154- 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. & Kou G.H. (1995) Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 239-242.
- 155- Wang C.S., Tsai Y.J. & Chen S.N. (1998b) Detection of white spot disease virus (WSDV) infection in shrimp using in situ hybridization. *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 170-173.

- 156- Wang H.C., Wang H.C., Leu J.H., Kou G.H., Wang A.H.J. & Lo C.F. (2007) Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 31, 672–686.
- 157- Wang Q., White B.L., Redman R.M. & Lightner D.V. (1999b) Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170, 179–194.
- 158- Wang Y.C., Lo C.F., Chang P.S. & Kou G.H. (1998a) Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164, 221–231.
- 159- Wang Y.G., Hassan M.D., Shariff M., Zamri S.M. & Chen X. (1999a) Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Diseases of Aquatic Organisms* 39, 1–11.
- 160- Wang Y.T., Liu W., Seah J.N., Lam C.S., Xiang J.H., Korzh V. & Kwang J. (2002) White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52, 249–259.
- 161- Wang, B., Li, F., Dong, B., Zhang, X., Zhang, C., Xiang, J., 2006. Discovery of the Genes in Response to White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in *Fenneropenaeus chinensis* Through cDNA Microarray. *Mar. Biotechnol.* 8, 491-500.
- 162- 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. & Kou, G.H. (1995). Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases in Aquatic Organisms* 23, 239–242.
163. Wang, Q., Nunan, L.M. & Lightner, D.V. (2000a). Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. *Diseases in Aquatic Organisms* 43, 175-181.
- 163- Wang, Q., Poulos, B.T. & Lightner, D.V. (2000b). Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. *Archives of Virology* 145, 263–274.
- 164- Wang, Q., White, B.L., Redman, R.M. & Lightner, D.V. (1999b). Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfante penaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170, 179–194.
- 165- Wang, Y.C., Lo, C.F., Chang, P.S. & Kou, G.H. (1998). Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164, 221-231.
- 166- Westenberg, M., Heinhuis, B., Zuidema, D., Vlak, J.M., (2005). siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Res.* 114, 133-139.
- 167- Witteveldt, J. Cifuentes, C. C. Vlak, J. M. and van Hulten, M. C. (2004a). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of Virology* 78:2057-2061.
- 168- 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* 16: 571-579.
- 169- 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* 70:167-170.
- 170- Wongprasert, K., Khanobdee, K., Glunukarn, S.S., Meeratana, P., Withyachumnarnkul, B., (2003). Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.* 55, 3-10.
- 171- Wongteerasupaya C., Vickers J.E., Sriurairatana S., Nash G.L., Akarajamorn A., Boonsaeng V., Panyim S., Tassanakajon A., Withyachumnarnkul B. & Flegel T.W. (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21, 69–77.
- 172- Wu C. & Yang F. (2006) Localization studies of two white spot syndrome virus structural proteins VP51 and VP76. *Virology Journal* 3, 76–83.
- 173- Wu J.L., Namikoshi A., Nishizawa T., Mushiake K., Teruya K. & Muroga K. (2001) Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 129–135.
- 174- Wu W., Wang L. & Zhang X. (2005) Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology* 332, 578–583.
- 175- 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*, 13: 391-403.

- 176- Wu, J.L., Namikoshi, A., Nishizawa, T., Mushiake, K., Teruya, K. & Muroga, K. (2001). Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases in Aquatic Organisms* 47, 129–135.
- 177- Wu, J.L., Suzuki, K., Arimoto, M., Nishizawa, T. & Muroga, K. (2002). Preparation of an inoculum of white spot syndrome virus for challenge tests in *Penaeus japonicus*. *Fish Pathology* 37, 65–69.
- 177- Xiao N., Zhang X., Dai L., Yuan L., Wang Y., Zhang M., Xu T. & Dai H. (2006) Isolation and identification of a novel WSSV nucleocapsid protein by cDNA phage display using an scFv antibody. *Journal of Virological Methods* 137, 272–279.
- 178- Xie X. & Yang F. (2006) White spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection. *Journal of General Virology* 87, 1903–1908.
- 179- Xie X., Xu L. & Yang F. (2006) Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. *Journal of Virology* 80, 10615–10623.
- 180- Xu J., Han F. & Zhang X. (2007) Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research* 73, 126–131.
- 181- Xu, Z.R., Du, H.H., Xu, Y.X., Sun, J.Y. & Shen, J. (2006). Crayfish *Procambarus clarkii* protected against white spot syndrome virus by oral administration of viral proteins expressed in silkworms. *Aquaculture* 253, 179–83.
- 182- Yang F., He J., Lin X., Li Q., Pan D., Zhang X. & Xu X. (2001) Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology* 75, 11811–11820.
- 183- Yang, L-S., Yin, Z-X., Liao, J-X., Huang, X-D., Guo, C-J., Weng, S-P., Chan, S-M., Yu, X-Q., (2007). A toll receptor in shrimp. *Mol. Immunol.* 44, 1999-2008.
- 184- Yi G., Wang Z., Qi Y., Yao L., Qian J. & 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* 37, 726–734.
- 185- Yi M., Jiang-Feng L., Zhang, X.W. Wang, X.W. Zhao, X.F., Wang, J.X., (2012). A vector that expresses VP28 of WSSV can protect red swamp crayfish from white spot disease. *Developmental and Comparative Immunology* 36:442-449.
- 186- Yi, G., Qian, J., Wang, Z. & Qi, Y. (2003). A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp. *Journal of General Virology* 84, 2545–2553.
- 187- Zhan W.B., Wang Y.H., Fryer J.L., Yu K.K., Fukuda H. & Meng Q.X. (1998) White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *Journal of Aquatic Animal Health* 10, 405–410.
- 188- Zhang X., Huang C., Tang X., Zhuang Y. & Hew C.L. (2004) Identification of structural proteins from shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 55, 229–235.
- 189- Zhu Y., Ding Q. & Yang F. (2007) Characterization of a homologous-region-binding protein from white spot syndrome virus by phage display. *Virus Research* 125, 145–152.
- 190- Zhu Y., Xie X. & Yang F. (2005) Transcription and identification of a novel envelope protein (VP124) gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virus Research* 113, 100–106.
- 191- Zhu Y.B., Li H.Y. & Yang F. (2006) Identification of an envelope protein (VP39) gene from white spot syndrome virus. *Archives of Virology* 151, 71–82.

پیوست

روش تهیه بافرها و محلول های مورد استفاده و مواد تشکیل دهنده آن ها

۱- روش تهیه محلول تثبیت کننده دیویدسون

برای ساختن یک لیتر محلول دیویدسون ۳۳۰ میلی لیتر الکل اتیلیک ۹۵٪ با ۲۲۰ میلی لیتر فرمالین (فرمالدئید ۳۷٪) و ۱۱۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط شده و ۵۳۳ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه می شود. این تثبیت کننده را می توان در دمای آزمایشگاه به مدت طولانی نگهداری نمود.

۲- روش تهیه آب مقطر RNase free

میزان ۰/۱ درصد دی اتیل پیرو کربنات (DEPC) به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تزریقی افزوده و به خوبی مخلوط گردید. سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد و در نهایت به منظور غیرفعال کردن DEPC، محلول به دست آمده اتوکلاو شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۳- تهیه بافر بارگذاری برای ژل آگارز

برای تهیه بافر بارگذاری، ۹ میلی گرم رنگ بروموفنل بلو را به ۶ میلی لیتر گلیسرین استریل افزوده و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. گلیسرین موجود در بافر بارگذاری موجب سنگینی نمونه می شود تا در ته چاهک قرار گیرد. حرکت رنگ بروموفنل بلو روی ژل، مبین حرکت نمونه می باشد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۴- روش تهیه بافر TAE

بافر TAE به صورت محلول ذخیره (غلظت ۵۰ X) تهیه شده و در دمای اتاق نگهداری و سپس با غلظت ۱ X مصرف گردید. بافر ۱X آن محلول ۱ میلی مولار EDTA، ۴۰ میلی مولار تریس و ۲۰ میلی مولار اسید استیک است. برای تهیه محلول ذخیره ۵۰ X، ۲۴۲ گرم تریس (MW=۱۲۱/۱۱۴ g/mol) با ۵۷/۱ میلی لیتر اسید استیک (MW=۶۰/۰۵ g/mol) و ۱۸/۶ گرم EDTA (MW=۳۷۲/۲۴ g/mol) مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۵- روش تهیه محیط لوریا برتانی (LB)

برای تهیه محیط LB مایع، ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر و ۱۰ گرم کلرید سدیم در آب مقطر با حجم نهایی یک لیتر جوشانده و اتوکلاو گردید. برای تهیه محیط LB جامد به میزان ۱۵ گرم در لیتر، آگار آگار به آن افزوده شد و پس از جوشاندن اتوکلاو گردید.

برای تهیه محیط LB گلوکزدار، به ازاء هر میلی لیتر محیط LB مایع، ۲۰ میکرولیتر از محلول ذخیره گلوکز اضافه شد (محلول ذخیره گلوکز با غلظت ۲ مولار تهیه شده و به وسیله فیلتر ۰/۲ میکرون پالایش گردید). برای تهیه LB جامد حاوی آمپی سیلین پس از رسیدن دمای محیط کشت اتوکلاو شده به ۵۰ درجه سانتی گراد، به ازاء هر میلی لیتر محیط، یک میکرولیتر از آمپی سیلین (با غلظت ۱۰۰ μg/μl) اضافه شد. به منظور تهیه آمپی سیلین مقدار ۱۰۰ میلی گرم از پودر آمپی سیلین در ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شده و پس از تقسیم بندی در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۶- روش تهیه محلول ۰/۱ مولار IPTG

به منظور تهیه محلول ۰/۱ مولار IPTG، ۲۸۳ میلی گرم IPTG (MW=۲۸۳g/mol) در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد و به وسیله فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی پالایش گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۷- تهیه محلول های لازم برای SDS-PAGE

۷-۱- روش تهیه محلول ۳۰ درصد اکریل آمید

توزین در این روش وزنی می باشد به این منظور به ۳۰ گرم اکریل آمید و ۰/۸ گرم بیس اکریل آمید، آب مقطر اضافه شد تا وزن نهایی آن به ۱۰۰ گرم برسد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه روی همزن قرار داده شد. این مخلوط به نور حساس است و پس از تهیه باید دور از نور و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شود. برای این منظور محلول حاصل را در ظرف تیره که دور آن نیز با فویل آلومینیوم کاملاً پوشیده شده بود نگهداری شد. (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۷-۲- روش تهیه بافر حرکت دهنده (Runing buffer) (۵x)

برای تهیه بافر حرکت دهنده، ۱۵/۱۵ گرم تریس (۰/۱۲۵ مولار)، ۷۲ گرم گلیسین (۰/۹۶ مولار) و ۵ گرم سدیم دودسیل سولفات را در مقداری آب مقطر مخلوط و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۷-۳- روش تهیه بافر نمونه (Sample buffer) ۲ X جهت SDS - PAGE

برای تهیه این بافر، ۴ میلی لیتر آب دو بار تقطیر، ۲ میلی لیتر تریس ۰/۵ مولار با pH = ۶/۸، ۱ میلی لیتر بتا مرکاپتواتانول (2 ME)، ۵ میلی گرم بروموفنول بلو، ۱ میلی لیتر گلیسرول و در آخر ۲

میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد با هم مخلوط گردید. ترتیب ریختن اجزاء مهم می باشد. مخلوط خوب ورتکس شد تا جهت استفاده آماده شود (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۴-۷- روش تهیه محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو

به منظور تهیه محلول رنگ آمیزی ۰/۱ گرم پودر کوماسی بلو، ۵۰ میلی لیتر متانول، ۱۰ میلی لیتر اسید استیک و ۴۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر با هم مخلوط شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۵-۷- روش تهیه محلول رنگ بر

به منظور تهیه محلول رنگ بر، ۳۰ میلی لیتر متانول، ۱۰ میلی لیتر اسید استیک و ۶۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر با هم مخلوط گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

۶-۷- مواد و مقادیر لازم برای ساخت ژل های جدا کننده (Separating gel) و متراکم کننده (Stacking gel) به منظور تهیه ۳۰ میلی لیتر ژل پلی آکریل آمید جدا کننده ۱۰ درصد، مواد لازم طبق جدول پ-۱ با یکدیگر مخلوط و جهت تهیه ۱۰ میلی لیتر ژل پلی آکریل آمید متراکم کننده ۴ درصد، مواد لازم طبق جدول پ-۲ با یکدیگر مخلوط گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

جدول پ-۱: مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل جدا کننده
(Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲)

مقدار (ml)	اجزاء
۱۱/۹	آب
۱۰/۰	آکریل آمید ۳۰ درصد
۷/۵	تریس یک مولار با $\text{pH} = 8.8$
۰/۳	سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد
۰/۳	آمونیم پرسولفات ۱۰ درصد
۰/۰۱۲	تمد

جدول پ-۲: مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل متراکم کننده
(Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲)

مقدار (ml)	اجزاء
۶/۸	آب
۱/۷	آکریل آمید ۳۰ درصد
۱/۲۵	تریس یک مولار با $\text{pH}=۶/۸$
۰/۱	سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد
۰/۱	آمونیم پرسولفات ۱۰ درصد
۰/۰۱	تمد

۸- روش تهیه PBS(1X)

بافر نمکی فسفات (PBS)، محلولی متشکل از ۱۳۷ میلی مولار نمک طعام، ۲/۷ میلی مولار کلرید پتاسیم، ۴/۳ میلی مولار فسفات دی سدیک و ۱/۴ میلی مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات می باشد. به منظور تهیه ی این محلول، ۸ گرم نمک طعام ($\text{MW}=۵۸/۴۴\text{g/mol}$)، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم ($\text{MW}=۷۴/۵۶\text{g/mol}$)، ۱/۴۴ گرم فسفات دی سدیک ($\text{MW}=۱۴۱/۹۶\text{g/mol}$) و ۰/۲۴ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات ($\text{MW}=۱۳۶/۰۹\text{g/mol}$)، به مقداری آب اضافه و حجم نهایی به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

Abstract

Shrimp diseases, especially viral diseases are the major limiting factors of shrimp farming activities in the world. White spot disease is one of the most pernicious viral disease that lead to serious loss in all shrimps of penaeids family. In Iran during 2002 to 2004 in Khuzestan province and in 2005 in Bushehr province, the most ponds and farms infected with white spot and the entire industry faced threat of closure. Surface proteins of virus has important role in the early stages of virus with host cell interaction, because these proteins usually enumerated as a candidate to produce a subunit and recombinant vaccines. On the other hand, these proteins can use as an important virus antigen and produce virus-specific antibodies in the preparation of diagnostic kits. In several studies proteins in the form of injection or oral vaccine has shown promising results. This study was designed in order to gain these proteins for immunization of white leg shrimp. To achieve the white spot virus genome, sampling and DNA extraction of moribund shrimps with clinical signs was done from Choebdeh farms. VP28 and VP19 protein-coding gene-specific primers were selected, and after amplification and purification were cloned in E.coli TG1. Protein expression evaluated and commercial plates were coated with inactivated bacteria containing the recombinant protein. White leg shrimp post larvae (PL30) were fed with recombinant food for 7 days then two times in 9th and 23th day after beginning of plate feeding and was challenged by white spot disease virus.

The results of the first exposure (end of the seventh day after the shrimp fed with recombinant plate) showed that the lowest mortality at day 14 after exposure in different groups belong to VP28 group with cumulative mortality percent 30 ± 3.84 and the highest percentage of the Group TG1 equal to 72.22 ± 2.93 , also The highest and lowest relative percent survival, belong to the group of VP28 ($60.29 \pm 5.09\%$) and TG1 ($4.41 \pm 2.94\%$), respectively. In terms of mortality percent and relative percent survival, VP28 and VP 28+19 has significant difference with other groups while there was no significant difference between the groups VP19, TG1 and pMal.

In the second exposure experiment (21 days after end of plate feeding) results showed that the lowest cumulative mortality in different groups belong to VP28 (50 ± 5.09) and the highest percentage was owned by Group TG1 equal to 75.55 ± 2.22 , also the highest and the lowest of relative percent survival belong to VP28 (32.86 ± 6.83) and TG1 (0.00 ± 2.98) groups respectively. Similar to the first experiment, VP28 showed significant differences in cumulative mortality and relative percentage of survival in contrast to other group.

As a general conclusion it can be noted that recombinant protein VP28 in any form that delivered to shrimp was able to protect shrimp against white spot virus. On the contrary VP19 has no this ability. The survival rate is directly related to the duration of the presence of recombinant protein in the diet.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE – South Aquaculture
Research Center

Project Title : Immunization of cultured shrimp against WSSV by use of produced recombinant vaccine(In Vitro)

Approved Number: 2-74- 12- 89044

Author: Hossein Houshmand

Project Researcher : Hossein Houshmand

Collaborator(s) : Mina Ahangarzadeh, S.Reza S.Mortezaei, Mohammad Afsharnasab, Lefteh Mohseni nejad, Jamal Soleimani , Masoudreza Seyfi Abadshapouri,Sh.Shamsi

Advisor(s): –

Supervisor: Mehrabi Masoudreza

Location of execution : Khuzestan province

Date of Beginning : 2010

Period of execution : 3 Years

Publisher : *Iranian Fisheries Science Research Institute*

Date of publishing : 2015

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE - South
Aquaculture Research Center

Project Title :
Immunization of cultured shrimp against WSSV
by use of produced recombinant vaccine(In Vitro)

Project Researcher :
Hossein Houshmand

Register NO.
46114