Archive of SID

تعیین ردیف نوکلئوتیدی و قرابت فیلوژنتیکی ژن *Tax* ویروس لوسمی گاو در ایران

حسن ممتاز[1*]، پوریا امینی[2]، بهنام عباسیان[2]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. دانش‌آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
* *نویسنده مسئول مکاتبات: hamomtaz@yahoo.com*

(دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/۲٤، پذیرش نهایی: ۸۸/۷/٦)

چکیده

ویروس لوسمی گاو (BLV) از خانواده رتروویریده، دون خانواده ارتورتروویرینه و جنس دلتارتروویروس واجد ۳ ژن ساختمانی اصلی env، pol، gag و تعدادی ژن تنظیم‌کننده همانندسازی از جمله Tax، Rex، R III و C IV می‌باشد. به منظور تعیین قرابت فیلوژنی ژن Tax ویروس BLV در نمونه‌های آلوده به این ویروس در ایران در ابتدا قطعه ۹۲۷ جفت بازی ژن Tax از چهار نمونه آلوده در سیستم PCR تکثیر و جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی سکانس گردید. نتایج حاصل از مقایسه ردیف نوکلئوتیدی تعیین شده در این مطالعه با سکانس شناخته شده ژن Tax ویروس BLV در سایر کشورها نشانگر وجود ۳/٤ تا ۷/۷ درصد تنوع ژنتیکی در این ژن بود که در این میان بیشترین قرابت با ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax در آمریکا (سکانس AY700378.1) با ۹٦/٦ درصد تشابه و بیشترین تفاوت مربوط به جدایه این ویروس در استرالیا (سکانس AY700379.1) و ژاپن (سکانس AY700381.1) با ۹۲/۳ درصد قرابت مشاهده شد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۲، ٤۸۳-٤۷۷.

کلمات کلیدی: ویروس لوسمی گاو، ژن *Tax*، قرابت فیلوژنتیکی، ایران

مقدمه

بیماری لوکوز انزئوتیک گاو در اثر ویروس لوسمی گاو (Bovine Leukemia Virus) از جنس دلتارتروویروس (Deltaretrovirus)، دون خانواده ارتورتروویرینه (Orthoretrovirinae) و خانواده رتروویریده (Retroviridae) ایجاد و به صورت رشد نئوپلاستیک لنفوسیت‌ها که اغلب اعضای بدن را درگیر می‌کند، اتفاق می‌افتد (۱، ۵ و ۱٦).

ژنوم رتروویروس‌ها دیپلوئید و هر قطعه هاپلوئیدی آن یک مولکول RNA تک رشته‌ای مثبت با اندازه ۷ تا ۱۱ کیلو باز می‌باشد. رتروویروس‌های کامل واجد سه ۳ ژن اصلی *gag* که اختصاصی گروه بوده و باعث کدشدن پروتئین‌های هسته مرکزی ویروس می‌شود، *pol* (پلی مراز) که آنزیم‌های دخیل در تکثیر ویروس یعنی آنزیم رونوشت‌برداری معکوس را کد می‌کنند و *env* (envelope) که باعث کدکردن گلیکوپروتئین‌های غشاء ویروس می‌شود و تعدادی ژن تنظیم‌کننده همانندسازی نظیر CVI، RIII، Rex و Tax هستند. این ویروس‌ها قادر به ایجاد پرووویروس از جنس DNA در سلول‌های آلوده به خود می‌باشند (۲، ۳ و ۲۲).

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین Tax دارای چندین اپی‌توپ شناسایی برای لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک است و می‌تواند پاسخ این سلول‌ها را القا کند (۲۱). به واسطه اهمیت این ژن در رتروویروس‌ها، امروزه استفاده از ژن Tax در طراحی واکسن‌های DNA به‌ویژه در عفونت‌های انسانی نظیر بیماری ناشی از HTLV-1 مورد توجه قرار گرفته است و مشخص شده که واکسیناسیون علیه عفونت ناشی از HTLV-1 با استفاده از پروتئین نوترکیب Tax می‌تواند پاسخ قوی از لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک را تحریک کند (۸ و ۲۳). لوکوز گاوی امروزه به عنوان معضل سیستم گاوداری‌های صنعتی در جهان مورد توجه بوده و هر کجای دنیا که سیستم‌های گاوداری مدرن در پرورش گاوهای شیری وجود دارد، لوکوز گاوی به عنوان یک معضل اساسی مدنظر قرار گرفته است و امروزه تلاش‌های فراوانی جهت دست‌یابی به یک روش پیشگیری مناسب انجام شده یا در حال انجام است (۱۶). در ایران تاکنون اقدامی در جهت پیشگیری از بیماری به روش واکسیناسیون و یا ساخت واکسن و طراحی روش‌های تشخیص بیماری صورت نگرفته است. همت زاده و ممتاز در سال‌های اخیر اقدام به شناسایی پروتئین‌های ویروس BLV در بافت‌های توموری شده توسط ویروس کرده و تنوع پروتئینی ویروس را مشخص نموده‌اند. در ادامه پادگن‌های دخیل در تحریک پاسخ ایمنی هومورال به روش وسترن بلات مشخص و پادگن‌های p24 و gp51 در بافت‌های مبتلا به لنفوسارکوم شناسایی و ژن‌های gag و Tax ویروس در سلول *E.coli* کلون‌سازی و بیان شده است (۶، ۷، ۱۲ و ۱۴). از آنجایی که تنوع ژنتیکی ژن Tax ویروس لوکوز گاوی در سویه‌های ایران شناسایی نشده است، لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax در نمونه‌های ایران و مقایسه ردیف نوکلئوتیدی این ژن با سایر کشورها طرح‌ریزی شده است.

مواد و روش‌کار

۱-نمونه‌ها: DNA تخلیص شده از بافی‌کوت و عقده لنفاوی تعدادی از گاوهای آلوده به لوکوز گاوی که در مطالعات قبلی از نظر سرمی و مولکولی پاسخ مثبت نشان داده بودند (۴ و ۱۲) به همراه نمونه ویروس BLV رشد کرده در کشت سلولی FLK (Fetal Lamb Kidney) (Svanova Biotech, Uppsala, Sweden) به عنوان نمونه کنترل مثبت.

۲-آزمایش PCR: جهت تکثیر ژن Tax ویروس BLV در DNA تخلیص‌شده از نمونه‌های مورد مطالعه از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ که بر اساس سکانس ژن Tax ویروس ثبت شده در بانک ژنی طراحی شد استفاده گردید:

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت آنالیز ژن Tax ویروس BLV

Primer name	Primer sequence	Size of Product (bp)	Accession number
BLV-Tax-F	5`-GCAAGTGTTGTTGGTTGGGG-3`	927	AY700378.1
BLV-Tax-R	5`- TCAAAAAAGGCGGGAGAGCC-3`		

www.SID.ir

Archive of SID

جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر قطعه ژنی Tax از دستگاه Master cycler gradient (Eppendorf Germany Co.) با حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۲ میلی‌مول Mgcl2، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۲ میکرومول از زوج پرایمرهای BLV-Tax-F و BLV-Tax-R، ۱ واحد آنزیم ۱ واحدی Tag DNA Polymerase (Roche applied science) و ۱ میکروگرم از DNA هر نمونه استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از:

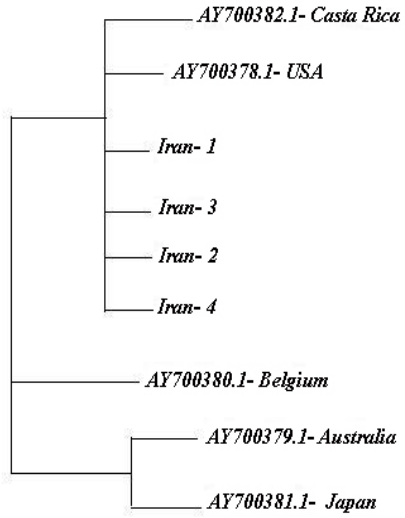
یک سیکل ۹٤ درجه ٤ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹٤ درجه ۱ دقیقه، ۵۸ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۵۰ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه ٦ دقیقه (۱۷).

۳-تعیین ردیف نوکلئوتیدی: محصول PCR مربوط به ٤ نمونه از نمونه‌های مثبت شده در آزمایش PCR جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی قطعهٔ تکثیریافته در PCR به شرکت Macrogen کره ارسال گردید.

٤-تعیین قرابت نوکلئوتیدی: نمونه‌های سکانس شده در این مطالعه با سکانس ژن Tax ویروس BLV در سایر کشورها (ثبت شده در بانک ژنی NCBI) با استفاده از نرم افزار ClustalX و Njplot مقایسه و ضمن تعیین Sequence identity matrix، درخت فیلوژنی مربوطه رسم شد.

نتایج

ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax ویروس BLV مربوط به ٤ نمونه از نمونه‌های مثبت شده در آزمایش PCR سکانس و با استفاده از نرم افزار ClustalX با ردیف نوکلئوتیدی این ژن ثبت شده در بانک ژنی (National Center for Biotechnology Information، NCBI Alignment) گردید و پس از مقایسه شباهت‌ها و تفاوت‌های ردیف نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار Njplot قرابت فیلوژنتیکی آنها ترسیم شد که درخت فیلوژنی حاصله در نگاره ۱ و میزان قرابت بین ژن Tax ویروس BLV در ایران با سایر کشورها در جدول ۲ نشان داده شده است



نگاره۱- درخت فیلوژنتیکی مربوط به ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax ویروس BLV در ایران با تعدادی از سکانس‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲- نتایج حاصل از مقایسه ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax ویروس BLV در ایران با تعدادی از سکانس‌های ثبت شده این ژن در سایر کشورها (Identity Matrix Sequence)

Seq	AY700378.1 USA	AY700381.1 Japan	AY700380.1 Belgium	AY70035201 Costa Rica	AY70037901 Australia	Iran 1	Iran 2	Iran 3	Iran 4
AY700378.1 USA	ID	۰/۹۶۷	۰/۹۶۶	۰/۹۴۹	۰/۹۴۹	۰/۹۶۶	۰/۹۶۴	۰/۹۶۳	۰/۹۶۲
AY700381.1 Japan	۰/۹۶۷	ID	۰/۹۵۷	۰/۹۴۲	۰/۹۴۲	۰/۹۲۶	۰/۹۳	۰/۹۲۳	۰/۹۲۹
AY700380.1 Belgium	۰/۹۶۶	۰/۹۵۷	ID	۰/۹۵۴	۰/۹۵	۰/۹۵۱	۰/۹۵	۰/۹۴۹	۰/۹۵۲
AY700382.1 Costa Rica	۰/۹۴۹	۰/۹۴۲	۰/۹۵۴	ID	۰/۹۳۳	۰/۹۶۲	۰/۹۶۱	۰/۹۵۹	۰/۹۶۳
AY700379.1 Australia	۰/۹۴۹	۰/۹۴۲	۰/۹۵	۰/۹۳۳	ID	۰/۹۲۵	۰/۹۲۹	۰/۹۲۳	۰/۹۲۸
Iran-1	۰/۹۶۶	۰/۹۲۶	۰/۹۵۱	۰/۹۶۲	۰/۹۲۵	ID	۰/۹۸۱	۰/۹۷۹	۰/۹۸۲
Iran-2	۰/۹۶۴	۰/۹۳	۰/۹۵	۰/۹۶۱	۰/۹۲۹	۰/۹۸۱	ID	۰/۹۸۱	۰/۹۸۶
Iran-3	۰/۹۶۳	۰/۹۲۳	۰/۹۴۹	۰/۹۵۹	۰/۹۲۳	۰/۹۷۹	۰/۹۸۴	ID	۰/۹۸۵
Iran-4	۰/۹۶۲	۰/۹۲۹	۰/۹۵۲	۰/۹۶۳	۰/۹۲۸	۰/۹۸۲	۰/۹۸۶	۰/۹۸۵	ID

بحث و نتیجه‌گیری

تشخیص و مطالعه عفونت‌های رتروویروسی از جهات مختلف می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. نتایج مطالعات زیادی که روی ویروس نقصان ایمنی انسان (HIV) انجام گرفته زمینه بسیار وسیعی را پیرامون مطالعه تنوع ژنتیکی، چگونگی تشخیص، مطالعات اپیدمیولوژیک و نهایتاً راهکارهای مناسب برای پیشگیری از عفونت‌های رتروویروسی فراهم آورده است. در بین عفونت‌های رتروویروسی دام‌ها، لوکوزانزئوتیک گاوها در صدر اهمیت قرار دارد و از همین رو است که تحقیقات بسیار گسترده‌ای در مورد روش‌های تشخیص، کنترل و پیشگیری از این بیماری با استفاده از روش‌های سرولوژیک و مولکولار بیولوژیک انجام گرفته و می‌گیرد.

به واسطه خصلت طبیعی رتروویروس‌ها که ناشی از رونوشت‌برداری معکوس از ژنوم آنهاست وقوع موتاسیون و در نتیجه تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی آنها از وفور بالایی برخوردار است و همین خصلت است که ارزش تشخیصی بسیاری از آزمون‌های آزمایشگاهی را زیر سوال می‌برد. مقالات زیادی را می‌توان یافت که به اعداد و ارقام خاصی تحت عنوان حساسیت و ویژگی در تست‌های تشخیصی اشاره نموده‌اند. تکرار همین آزمون توسط محققین دیگر معمولاً با نتایج متفاوتی همراه بوده است که علت این مسئله را می‌توان در تنوع ژنتیکی این ویروس جستجو نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

در بین ژن‌های ساختمانی ویروس BLV ژن‌های gag ، pol و env ازجمله ژن‌های نسبتاً حفاظت شده هستند که تنوع ژنی در بین آنها کمتر دیده شده و به واسطه همین خصلت طبیعی امروزه از روش‌های تشخیص بیولوژی مولکولی بر پایه PCR، کلونینگ و... با استفاده از ردیابی پرووِیروس BLV و یا ژن‌های ساختمانی مذکور طراحی شده‌اند. رتروویروس‌های پیچیده علاوه بر این ۳ ژن ساختمانی ژن‌های تنظیم‌کننده‌ای نظیر Tax وRex وRIII وCIV را نیز کد می‌کنند که در همانندسازی ویروس دخالت داشته و همین امر پایداری و قدرت بیماری‌زایی آنها را افزایش می‌دهد (۹، ۲۱ و ۲۳).

ژن Tax پروتئینی را کد می‌کند که در همانندسازی ویروس ضروری بوده و باعث تورم غدد می‌شود. از طرفی این ژن باعث تحریک همانندسازی از چند ژن سلولی از جمله ژن مولد IL-۲ می‌شود (۱۱ و ۱۵). *Tax* به‌عنوان گیرنده برای آنزیم‌های آلفا و بتا پلی‌مراز عمل می‌کند (۱۰ و ۱۸) و مطالعات جدید نشان می‌دهد که در سرطان‌زایی رتروویروس‌ها خصوصاً سرطان سلول‌های خونی نقش دارد (۲۱). پروتئین Tax دارای چندین اپی‌توپ شناسایی برای لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک است و می‌تواند پاسخ این سلول‌ها را القاء کند. به واسطه اهمیت این ژن در رتروویروس‌ها امروزه استفاده از این ژن در طراحی واکسن‌های DNA به ویژه در عفونت‌های انسانی نظیر بیماری ناشی از HTLV-1 مورد توجه قرار گرفته است و مشخص شده که واکسیناسیون علیه عفونت ناشی از HTLV-1 با استفاده از پروتئین نوترکیب Tax می‌تواند پاسخ قوی لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک را تحریک کند (۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۳).

مطالعه حاضر با هدف ردیابی ژن *Tax* ویروس BLV، تعیین ردیف نوکلئوتیدی این ژن و بررسی تنوع ژنتیکی آن انجام گرفت و همان‌گونه که در قسمت نتایج ذکر شد یکی از اهداف اصلی این بررسی یعنی ردیابی ژن *Tax* در نمونه‌های آلوده به BLV برای اولین بار در ایران به تحقق پیوست و وجود ژن مذکور با توسل به روش تعیین ردیف نوکلئوتیدی (Sequencing) قطعه مربوطه مورد تأیید قرار گرفت. تعیین ردیف نوکلئوتیدی قطعه ۹۲۷ جفت بازی تکثیر یافته در PCR در تقریبا ۹۰۰ نوکلئوتید از چهار نمونه سکانس‌شده انجام گرفت. در قسمت دیگر این تحقیق به منظور تأیید ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax و مقایسه تنوع ژنتیکی این ژن در نمونه‌های ایران با سایر ویروس‌های موجود در دنیا اقدام به مقایسه ردیف نوکلئوتیدی تعیین شده این ژن در ایران با تعدادی از سکانس‌های شناخته شده این ژن در بانک ژنی NCBI گردید. مقایسه ردیف‌های ژنی حاکی از وجود ۱/۵ تا ۲/۱ درصد تنوع در چهار نمونه سکانس‌شده در ایران و ۳/٤ تا ۷/۷ درصد تنوع بین نمونه‌های ایران با سایر کشورها بود (جدول ۱) که در این میان بیشترین قرابت مربوط به سکانس شناخته شده این ژن در آمریکا (سکانس AY 700378.1) با ۹٦/٦ درصد قرابت و بیشترین تفاوت مربوط به جدایه این ویروس در استرالیا (سکانس AY 700379.1) و ژاپن (سکانس AY 700381.1) با ۹۲/۳ درصد قرابت مشاهده شد. با استفاده از نرم افزار Clustal X و Njplot درخت فیلوژنیک ردیف‌های ژنی مقایسه شده ترسیم گردید و همان گونه که در نگاره (۱) مشاهده می‌شود، سویه‌های ایران در شاخه سکانس آمریکا قرار دارد و تفاوت معنی‌داری را با سکانس شناخته شده ژن Tax در استرالیا و ژاپن نشان می‌دهد. در مطالعه انجام شده توسط ممتاز و همکاران که به منظور تعیین قرابت ژنتیکی ژن gag ویروس BLV در ایران انجام گرفت نیز ۱ تا ۸/۷ درصد تنوع ژنتیکی در ژن gag ویروس مشاهده شد که در این میان بیشترین قرابت با سکانس‌های شناخته شده این ژن در آمریکا (سکانس‌های M 10987.1 وNC 001414.1) و بیشترین تفاوت مربوط به جدایه این ویروس در استرالیا (سکانس D 00647.1) مشاهده شد (۱۳). مشاهده تنوع نه‌چندان چشمگیر ردیف ژنتیکی ژن Tax ویروس BLV را می‌توان بر اساس گسترش جغرافیایی

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس توجیه نمود. با توجه به اینکه منشاء بسیاری از گاوهای اصیل موجود در گاوداری‌های ایران به کشورهای آمریکایی باز می‌گردد، لذا شباهت ژنتیکی حاصله در این تحقیق نیز می‌تواند موید این ادعا باشد. از طرفی، نقل و انتقال دام بین کشورهای شرق دور (ژاپن و استرالیا) با ایران سابقه تاریخی ندارد لذا استقرار سویه‌های ژاپنی و استرالیایی ویروس در شاخه دیگر درخت فیلوژنی نشانگر تفاوت بیشتر ردیف ژنی Tax این ویروس بین ایران با کشورهای مزبور می‌باشد.

فهرست منابع

۱. کارگرموخر، ر.، حسامی قاجار، م.، اهورایی، پ.، قابوسی، ب.، خدمتی، ک.، عزی، ع.، پورزاهدی، ر. و سرمست، ر. (۱۳۷۵): بررسی سرواپیدمیولوژیک بیماری لوکوز انزئوتیک گاوان (EBL) در ایران. پژوهش و سازندگی، سال ۹، جلد ۱، صفحات: ۱۶۷-۱۶٤.

۲. کیوانفر، ه و کریمی، ن. (۱۳۷٦): ویروس‌شناسی دامپزشکی (بخش بیماری‌ها). چاپ اول، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، شماره ۲۳۵۷، صفحات: ۳۳۵-۳۲٤ و ۳٤٤.

۳. کیوانفر، ه، همت‌زاده، ف. و محمودیان، ع. (۱۳۸۰): ویروس‌شناسی دامپزشکی (بیولوژی ویروس‌ها). انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ٤۳، ۵۷، ٦۱، ٦۵ و ۸۲-۸۰.

٤. ممتاز، ح. و همت زاده، ف. (۱۳۸۲): بررسی سرولوژیک آلودگی با ویروس BLV در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دانشگاه شیراز، دوره ٤، شماره ۱، صفحات: ٤٤-۳۷.

۵. نورمحمدزاده، ف. و برین، ع. (۱۳۷۰): جستجوی سرولوژیکی پادتن ضد لوکوز انزئوتیک گاوی (BLV) در گوسفند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ٤٦دوره ٤٦، شماره ۱، صفحات:۸۰-٦۹.

٦. همت زاده، ف. و ممتاز، ح. (۱۳۸۳): مطالعه الگوی الکتروفورتیک پروتئینی عصاره عقده‌های لنفاوی گاوهای لوکوزی و مقایسه آن با گاوهای به ظاهر سالم. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۹، شماره ۲، صفحات: ٤۷-٤۳.

۷. همت زاده، ف. و ممتاز، ح. (۱۳۸٦): ردیابی پادگن‌های دخیل در پاسخ ایمنی هومورال در عقده‌های لنفاوی گاوهای مبتلا به لوکوز گاوی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دانشگاه تهران، دوره ٦۲، شماره ۵، ۲۸٤-۲۸۱.

8. Boris-Lawrie, K., Altanerova, V., Altaner, C., Kucerova, L. and Temin, H.M. (1997): In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex. Journal of Virology., 71(2): 1514-1520.
9. Corcelette, S., Massé, T. and Madjar, J.J. (2000): Initiation of translation by non-AUG codons in human T-cell lymphotropic virus type I mRNA encoding both Rex and Tax regulatory proteins. Nucleic Acids Research, 28(7): 1625-1634.
10. Debacq, C., Asquith, B., Kerkhofs, P., Portetelle, D., Burny, A., Kettmann, R. and Willems, L. (2002): Increased cell proliferation, but not reduced cell death, induces lymphocytosis in bovine leukemia virus-infected sheep. Proceding National Academic Science USA, 99(15): 10048-10053.
11. McGirr, K.M. and Buehring, G.C. (2006): Tax & rex: overlapping genes of the deltaretrovirus group. Virus Genes., 32(3): 229-239.
12. Momtaz, H. (2009): Expression of bovine leukemia virus Tax protein in bacterial cell. Research Journal of Biological Science, 4(5): 542-546.
13. Momtaz, H., Hemmatzadeh, H. and Amiri, E. (2009): Cloning and phylogenetic analysis of Bovine Leukemia Virus p24 gene of Iranian isolate. Research Veterinary Science. In Press.
14. Momtaz, H., Hemmatzadeh, H. and Keyvanfar, H. (2008): Expression of bovine leukemia virus p24 protein in bacterial cell. Pakistan Journal of Biological Science, 11(20): 2433-2437.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Pyeon, D. and Splitter, G.A. (1999): Regulation of Bovine Leukemia Virus tax and pol mRNA levels by interleukin-2 and -10. Journal of Virology, 73(10): 8427-8434.
16. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. (2007): Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed., Saunders, Elsevier, pp: 1245-1248.
17. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001): Molecular cloning :a laboratory manual. 3th ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp: 874-895.
18. Tajima, S. and Aida, Y. (2000): The region between amino acids 245 and 265 of the bovine leukemia virus (BLV) Tax protein restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retrovirus enhancers. Journal of Virology, 74(23): 10939-10949.
19. Tajima, S. and Aida, Y. (2002): Mutant Tax protein from bovine leukemia virus with enhanced ability to activate the expression of c-fos. Journal of Virology, 76(5): 2557-2562.
20. Tajima, S., Takahashi, M., Takeshima, S.N., Konnai, S., Yin, S.A., Watarai, S., Tanaka, Y., Onuma, M., Okada, K. and Aida, Y. (2003): A mutant form of the Tax protein of bovine leukemia virus (BLV), with enhanced transactivation activity, increases expression and propagation of BLV in vitro but not in vivo. Journal of Virology, 77(3): 1894-1903.
21. Twizere, J.C., Kerkhofs, P., Burny, A., Portetelle, D., Kettmann, R. and Willems, L. (2000): Discordance between bovine leukemia virus Tax immortalization in vitro and oncogenicity in vivo. Journal of Virology, 74(21): 9895-902.
22. Twizere, J.C., Lefèbvre, L., Collete, D., Debacq, C., Urbain, P., Heremans, H., Jauniaux, J.C., Burny, A., Willems, L. and Kettmann, R. (2005): The homeobox protein MSX2 interacts with Tax oncoproteins and represses their transactivation activity. Journal of Biological Chemistery, 280(33): 29804-29811.
23. Usui, T., Konnai, S., Tajima, S., Watarai, S., Aida, Y., Ohashi, K. and Onuma, M. (2003): Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. Journal Veterinary Medical Science, 65(11): 1201-1205.

www.SID.ir