

کلونینگ و تعیین توالی قطعات HR1 و HR2 ژن F پروتئین ویروس بیماری نیوکاسل از ایزوله NR43 ایران

نویسندگان: روشنگر طهماسیان^۱، دکتر مهدی فروزنده^{۲*}، دکتر رسول مدنی^۳، مجید اسماعیل زاده^۴ و محمدرضا دهقانی^۱

۱. کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
 ۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
 ۳. دانشیار بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
 ۴. کارشناس ارشد دامپروری بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
- * نویسنده مسئول: Email: FOROZ@modares.ac.ir

چکیده

هدف: ویروس ND عامل بیماری نیوکاسل در ماکیان، که باعث خسارت‌های اقتصادی فراوان در صنعت مرغداری شده، جزء پارامیکسو ویروس‌ها محسوب می‌گردد. پروتئین ادغام (F) که عامل اصلی بیماری‌زایی پارامیکسو ویروس‌ها است دارای دومین‌های HR1، HR2 و فیوژن‌پپتید است که نقشی بااهمیت در مکانیسم اتصال ویروس به سلول دارد. به طوری که جهش در این مناطق و پپتیدهای حاصل از آن قادر به ممانعت از اتصال ویروس به سلول میزبان است. در این پژوهش، یکی از ایزوله‌های بومی ویروس بیماری نیوکاسل (NR43) را انتخاب کرده، توالی قسمتی از ژنوم این ویروس با تأکید بر دومین‌های مهم، به عنوان یک مدل پارامیکسو ویروسی مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: پس از استخراج RNA ویروس، با استفاده از RT-PCR، ژن پروتئین F را به صورت دو قطعه حدود ۸۰۰ جفت بازی (قطعه A: ۸۲۰-۱۰، قطعه B: ۱۶۳۶-۸۱۰) تکثیر و در T-vector کلون کردیم و سپس تعیین توالی گردید.

نتایج و بحث: ترادف با دیگر توالی‌های ویروس نیوکاسل در نرم افزار Blast بیش‌ترین تشابه را ابتدا با ویروس روسی (Vol 95) و در درجه دوم با ویروس‌های چینی نشان می‌دهد. توالی Cleavage این ویروس "RRQRR" است. که اشاره به ولوژن بودن این ویروس می‌دارد. مقایسه ناحیه HR1 ایزوله NR43 با دیگر ویروس‌های بیماری نیوکاسل ولوژن موجود در بانک ژن، جهش جدیدی در اسید آمینه شماره ۸۲ را نشان می‌داد (لوسین به فنیل آلانین). بررسی قطعه B که شامل دومین HR2 می‌شود Conservatory بالایی با دیگر ویروس‌های نیوکاسل نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: فیوژن پروتئین، NDV، NR43، HR

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال سیزدهم - شماره ۶۲
اردیبهشت ۱۳۸۵

تاریخ وصول: ۸۳/۱۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۸۴/۷/۱۸

مقدمه

محسوب شده، زیان‌های اقتصادی فراوانی را باعث می‌گردد [۱]. این ویروس که جزء خانواده پارامیکسو ویروس‌ها است یک RNA ویروس با قطبیت منفی بوده، ژنوم آن حدوداً شامل ۱۵۱۸۶ جفت باز، و کدکننده

ویروس بیماری نیوکاسل که باعث بیماری نیوکاسل می‌شود یک عامل بیماری‌زای مسری در طیور است. این ویروس از مهم‌ترین پاتوژن‌ها در صنعت مرغداری

مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه ویروس و استخراج RNA

ویروس نیوکاسل از بخش تشخیص بیماری‌های طیور مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به صورت هدیه تهیه گردید. جهت کشت این ویروس، بافت آلوده به ویروس ND جدا شده از طیور مبتلا را پس از سلايه کردن، بر روی تخم مرغ SFP کشت داده، تکثیر می‌کنند. ویروس موردنظر (NR43) متوسط زمان مرگ کم‌تر از ۴۰ ساعت داشت. این ویروس (با تیترا هماگلوتیناسیون پاساژ دوم و سوم ویروس ۱:۲۵۶) در ۳۰۰rpm به مدت یکساعت سانتیفریژ شد و به رسوب آن ۱۰۰ میکرولیتر PBS اضافه گردید. در مرحله بعد به این مجموعه ۱ میلی‌لیتر RNX (cinnagen.co) افزوده شد. پس از مخلوط و انکوبه کردن در حرارت اتاق به مدت ۵ دقیقه، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و این مخلوط به مدت ۳-۱ دقیقه در حرارت اتاق انکوبه شد. سپس در ۱۲۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتیفریژ و به محلول رویی، حجم مساوی ایزوپروپانول اضافه گردید. آنگاه روی یخ به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و پس از سانتیفریژ شدن، با استفاده از اتانول ۷۵ درصد رسوب شستشو گردید و بعد از خشک شدن رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب فاقد RNA (DEPC water) حل شد.

۲-۲- انجام آزمایش RT-PCR

طراحی پرایمر براساس ترادف توالی‌های ژن از ویروس نیوکاسل موجود در بانک ژن براساس حفظ‌شده‌ترین (conserve) مناطق در نرم‌افزار اولیگو صورت گرفت. پرایمرها برای دو قطعه تقریباً ۸۰۰pb (قطعه اول (A) از نوکلئوتید (۱۰-۸۲۰) و قطعه دوم (B) از نوکلئوتید (۱۶۳۶-۸۱۰) طراحی گردید.

قطعه A:

5' CAT CTT CTA CCA GGA TCC A 3' پرایمر

بالادست

3' CCA AGA GTT GAG TCT GTG AGT 5' پرایمر

پایین دست

شش پروتئین (HN-F-M-P-NP-L) است [۲]. دو پروتئین F (فیوژن) و HN (هماگلوتینین نورآمینیداز) که در سطح سلول قرار می‌گیرند نقش مهمی در بیماری‌زایی ویروس به عهده دارند؛ بدین صورت که پروتئین HN باعث اتصال ویروس به سطح سلول میزبان می‌شود، در صورتی که پروتئین F باعث ورود ویروس به داخل سلول میزبان می‌گردد [۳ و ۴]. پروتئین F به صورت پیش‌ساز F0 ساخته می‌شود که در غشای گلژی توسط آنزیم فورین در منطقه برش (Cleavage site) شکسته شده، دو پلی‌پپتید F1 و F2 از آن حاصل می‌شوند که به وسیله باندهای دی‌سولفیدی به هم متصل هستند [۵]. طول ژن این پروتئین تقریباً ۱۷۰۰ جفت باز و کدکننده ۵۵۳ اسیدآمینو است [۶]. اساس بیماری‌زایی این ویروس به منطقه Cleavage site بستگی دارد. براساس وجود اسیدآمینوهای بازی در این منطقه، ویروس به سه گروه لتوژن (غیربیماری‌زا)، مزوژن و ولوژن (بیماری‌زا) طبقه‌بندی می‌گردد [۷]. علاوه بر منطقه Cleavage site، ویروس دارای تعدادی دومین درگیر در فعالیت فیوژن است. این دومین‌ها شامل فیوژن پپتید و دو منطقه Heptad repeat (HR1، HR2) است که دو آلفاهلیکس آمفی‌پاتیک را تشکیل می‌دهند [۸ و ۹]. این مناطق نه تنها در پارامیکسوویروس‌ها، بلکه در تمام ویروس‌هایی که از طریق فیوژن وارد سلول می‌شوند، وجود دارند [۱۰، ۱۱ و ۱۲]. جهش‌ها و پپتیدهای حاصل از این مناطق قادر به بلوکه کردن فعالیت فیوژن هستند [۱۳، ۱۴ و ۱۵]. بررسی توالی فیوژن پروتئین ویروس بیماری نیوکاسل با تأکید بر این مناطق در ایزوله بومی کشور می‌تواند راهگشای تحقیقات بعدی در طراحی واکسن نو ترکیب، تشخیص‌های مولکولی با توجه به ایزوله بومی کشور بوده، همچنین به عنوان یک مدل در جهت مطالعات و تحقیقات بعدی بر روی این پپتیدها و بررسی تأثیر آن‌ها بر روی فعالیت فیوژن به منظور طراحی داروهای ضدویروسی مورد استفاده قرار گیرد.

قطعه B:

3'- GAC TCA CAG ACT CAA CTC TTG G 5' پرایمر

بالادست

3'- TTT GTA GTG GCT CTC ATC TG 5' پرایمر

پایین دست

برای تکثیر این مناطق از روش RT-PCR تک مرحله‌ای استفاده شد. آنزیم مورد استفاده در این سیستم مخلوطی از آنزیم‌های AMV ترانس کریپتاز معکوس (AMV Reverse transcriptase) و high expand (آلمان، Roche) که مخلوطی از دو آنزیم (Taq, Pwo) است. طبق این روش برای سنتز هر قطعه بدین شکل عمل شد که هر دو پرایمر مربوط به یک قطعه، همزمان به واکنش اضافه گردید. در مرحله اول، پرایمر پایین دست جهت نسخه‌برداری معکوس اضافه شد و در مرحله بعد cDNA ساخته شده توسط هر دو پرایمر تکثیر گردید. برای انجام هر یک از واکنش‌های RT-PCR دو میکرولوله برداشته شد. در میکرولوله شماره یک مواد زیر را وارد کردیم:

۲µl DTT، ۴µl dNTP (۲mM)، ۱/۵µl (mM)

۲۵MgCl₂، پرایمر بالادست (۱۰pmol/ µl) به مقدار ۱µl،

۱µl پرایمر پایین دست (۱۰pmol/ µl)، RNA تخلیص

شده: ۵µl، ۱۰/۵µl آب دیونیزه دو بار تقطیر عاری از

نوکلئاز، حجم نهایی میکروتیوب شماره یک: ۲۵µl.

در میکرولوله شماره ۲ مواد زیر را وارد کردیم:

بافر RT-PCR: ۱۰µl، آنزیم AMV ترانس کریپتاز

معکوس، آب بدون یون دوبار تقطیر عاری از نوکلئاز:

۱۴µl، حجم نهایی میکرولوله شماره ۲: ۲۵µl.

هر دو میکرولوله را به مدت ۳ دقیقه در دستگاه

در درجه حرارت ۶۸°C قرار داده، سپس محتوای

میکروتیوب شماره ۲ را به میکروتیوب شماره یک

اضافه و کاملاً مخلوط کردیم. هر یک از

میکروتیوب‌های مربوط به قطعات A و B به مدت ۳۰

دقیقه در دمای ۵۰°C قرار داده شد تا واکنش RT انجام

گردید و cDNA تشکیل شد. در ادامه، سیکل‌های PCR

بدین صورت طراحی شدند: ۲min: ۹۴°C (الف)، ۱۰sec:

۹۴°C (ب)، ۳۰sec: ۵۱°C (ج)، ۱min: ۶۸°C (د)، از «ب»

تا «د» ۱۰ سیکل، ۱۰sec: ۹۴°C (ه)، ۳۰sec: ۵۱°C (و)،

۳۰sec: ۶۸°C (ز)، از «ه» تا «ز» ۲۵ سیکل.

۲-۳- کلونینگ قطعات cDNA

بدین منظور، ابتدا عمل الحاق به ترتیب زیر صورت گرفت:

وکتور pTZ57R/T (Fermentas): ۳µl، بافر الحاق

۱۰X: ۳µl، محصول PCR تخلیص شده: ۳µl، محلول

PEG ۴۰۰۰: ۳ml، آب دیونیزه: ۲۹µl، T₄DNA لیگاز: ۱µl.

مجموعه فوق به مدت یک ساعت در دمای ۲۲°C انکوبه

شد. جهت عمل تراریخت (ترانس فورماسیون) باکتری

E.coli DH5α را با استفاده از کلسیم کلراید ۵۰

میلی مولار (Russel D.) آماده و سپس وکتورهای insert

را با استفاده از شوک حرارتی (۳۷°C به مدت ۵ دقیقه)

وارد سلول‌های Competent کردیم [۱۶]. این سلول‌ها را

پس از رشد در دمای ۳۷°C به مدت یک ساعت در

محیط LB مایع، وارد پلیت‌های LB agar حاوی ۴۰

میکرولیتر IPTG ۰/۱M، ۴۰ میکرولیتر Xgal کردیم.

کلون‌های سفید که مشخص کننده وکتورهای حامل ژن

بودند انتخاب شدند و سپس تخلیص پلاسמיד به روش

لیز قلیایی (Russel D.) صورت گرفت [۱۶]. سپس برای

تأیید بیش تر که وکتورها حاوی قطعات A، B مورد نظر

هستند، آنزیم‌های Pst I و EcoRI برای برش جایگاه‌های

موجود در MCS مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۲).

نتایج

در مرحله اول با استفاده از پرایمر پایین دست cDNA

سنتز شد. به علت این که هر دو مرحله سنتز و تکثیر در

یک مرحله صورت می‌گیرد پرایمرها در یک زمان به

میکروتیوب افزوده شدند. اندازه قطعات حاصل بعد از

تکثیر با استفاده از نشانگر اندازه شماره ۹ شرکت

«روش» (Roche) بر روی ژل آگارز ۱ درصد تأیید شد

(شکل ۱).

هضم آنزیمی با انتخاب آنزیم‌های PstI و EcoRI

تنهایی باعث خطی شدن وکتور می‌شود، اما استفاده از

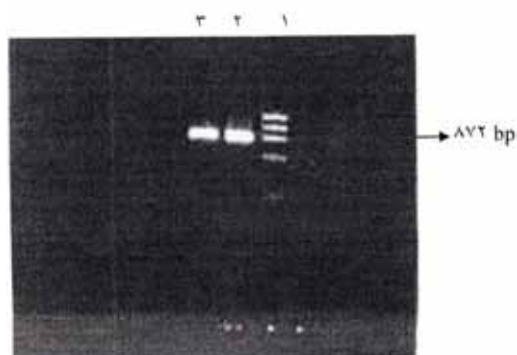
هر دو آنزیم با هم باعث آزاد شدن قطعه ژن وارد شده می‌گردد. شکل ۲ تأیید هضم آنزیمی پلاسمید حاوی قطعه A با استفاده از آنزیم‌های PstI و EcoRI بر روی ژل الکتروفورز ۰/۸ درصد است. ستون ۱ هضم آنزیمی پلاسمید با استفاده از آنزیم‌های فوق است که باعث خروج قطعه ژن وارد شده (۸۰۰bp) گردیده و در مقایسه با ستون ۳ (نشانگر اندازه) این قطعه بین باندهای ۵۱۷bp و ۱۰۰۰bp قرار گرفته و در ستون شماره ۴ نیز پلاسمید با استفاده از آنزیم EcoRI خطی شده است. بعد از این که با استفاده از آنزیم‌های محدودگر cDNAهای کلون شده تأیید شدند، ترادف نوکلئوتیدی آن تعیین توالی گردید که شماره دستیابی قطعات A و B به ترتیب عبارتند از: AY342002 و AF548623.

در تعیین توالی قطعه A یک قطعه ۷۹۱ از ویروس ایزوله NR43 تعیین توالی شد (شکل ۴). توالی اسیدآمینهای متناسب با این توالی نوکلئوتیدی ۲۰۷ اسیدآمینهای است که ترجمه آن از نوکلئوتید (ATG) ۱۷۱ صورت گرفت. ۶۲۰ نوکلئوتید از توالی ترجمه شده شامل دومین‌های Cleavage site، فیوژن پپتید و HR1 است که به ترتیب توالی اسیدآمینهای این دومین‌ها ۴۸-۴۲، ۶۸-۴۴، ۱۳۰-۶۹ است. بررسی‌های انجام شده بر روی این توالی، اسیدآمین شماره ۸۲ (منطقه HR1) از این ویروس لوسین است، در صورتی که در ایزوله‌های دیگر ویروس نیوکاسل فنیل‌آلانین است.

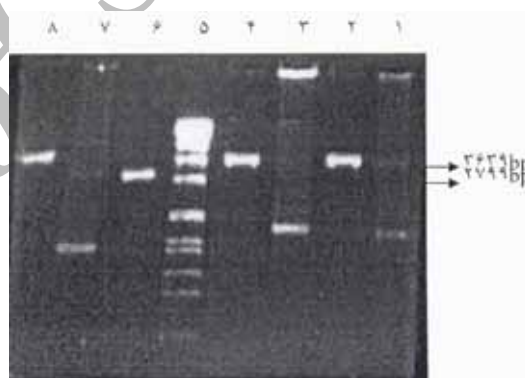
برای قطعه B، ۷۰۷ نوکلئوتید به‌طور صحیح تعیین توالی گردید (شکل ۵) که معادل ۳۰ اسیدآمین است. ترجمه آن از (ATG) شماره ۱۸ صورت گرفته و ۶۹۱ نوکلئوتید آن ترجمه شده که شامل منطقه HR2، از اسیدآمین ۲۰۱-۱۵۲ است.

بحث

فیوژن پروتئین عامل اصلی اتصال غشای ویروس و ورود ویروس به داخل سلول در دسته بزرگی از ویروس‌ها، از جمله پارامیکسویروس‌ها محسوب می‌شود. نیوکاسل که جزء این خانواده طبقه‌بندی



شکل ۱ تأیید اندازه قطعات PCR با استفاده از نشانگر شماره ۹ شرکت «روش» بر روی ژل آگارز ۱ درصد
۱: نشانگر شماره ۹: ۲۹: قطعه B: ۳۷۰bp: ۳: قطعه A: ۷۹۱bp



شکل ۲ هضم آنزیمی پلاسمید A و B با استفاده از آنزیم PstI بر روی ژل الکتروفورز ۰/۸ درصد

۱. پلاسمید تخلیص شده حاوی قطعه خارجی قطعه A
۲. هضم آنزیمی پلاسمید A با استفاده از آنزیم PstI (۳۶۸۶bp: خطی شده)
۳. پلاسمید تخلیص شده حاوی قطعه خارجی قطعه B
۴. هضم آنزیمی پلاسمید B با استفاده از آنزیم PstI (۳۶۸۶bp: خطی شده)
۵. نشانگر شماره ۷ شرکت «روچ»
۶. هضم آنزیمی کنترل پلاسمید بدون قطعه خارجی با آنزیم PstI (۲۸۸۶bp: خطی شده)
۷. کنترل پلاسمید بدون قطعه خارجی
۸. هضم آنزیمی کنترل پلاسمید با قطعه خارجی با آنزیم PstI (۳۶۸۶bp: خطی شده)

در این سیستم سنتز و تکثیر cDNA در یک تیوب صورت می‌گیرد و در نتیجه، میزان آلودگی در این سیستم به حداقل می‌رسد. در این سیستم از مخلوط آنزیمی شامل AMV ترانس کریپتاز معکوس استفاده می‌گردد. آنزیم‌های اکسپند خود شامل آنزیم‌های Taq و Pwo که به ترتیب قادر به ایجاد انتهای پلی A و خاصیت تصحیح بعد از اشتباهند.

سپس ارزیابی و مقایسه قطعات مذکور و همچنین توالی اسید آمینه‌ای متناسب با آن با استفاده از برنامه‌های کامپیوتری کلاستال با سایر توالی‌های ویروس نیوکاسل انجام گردید (شکل ۳). نتایج حاصل از بررسی‌های کامپیوتری این بود که ویروس NR43 با توجه به داشتن توالی محل برش به صورت RRQRR در قطعه A آن، به ویروس‌های ولوژن شباهت زیادی دارد. از جمله ویروس‌های ND ولوژن مورد بررسی ویروس‌های زیر هستند:

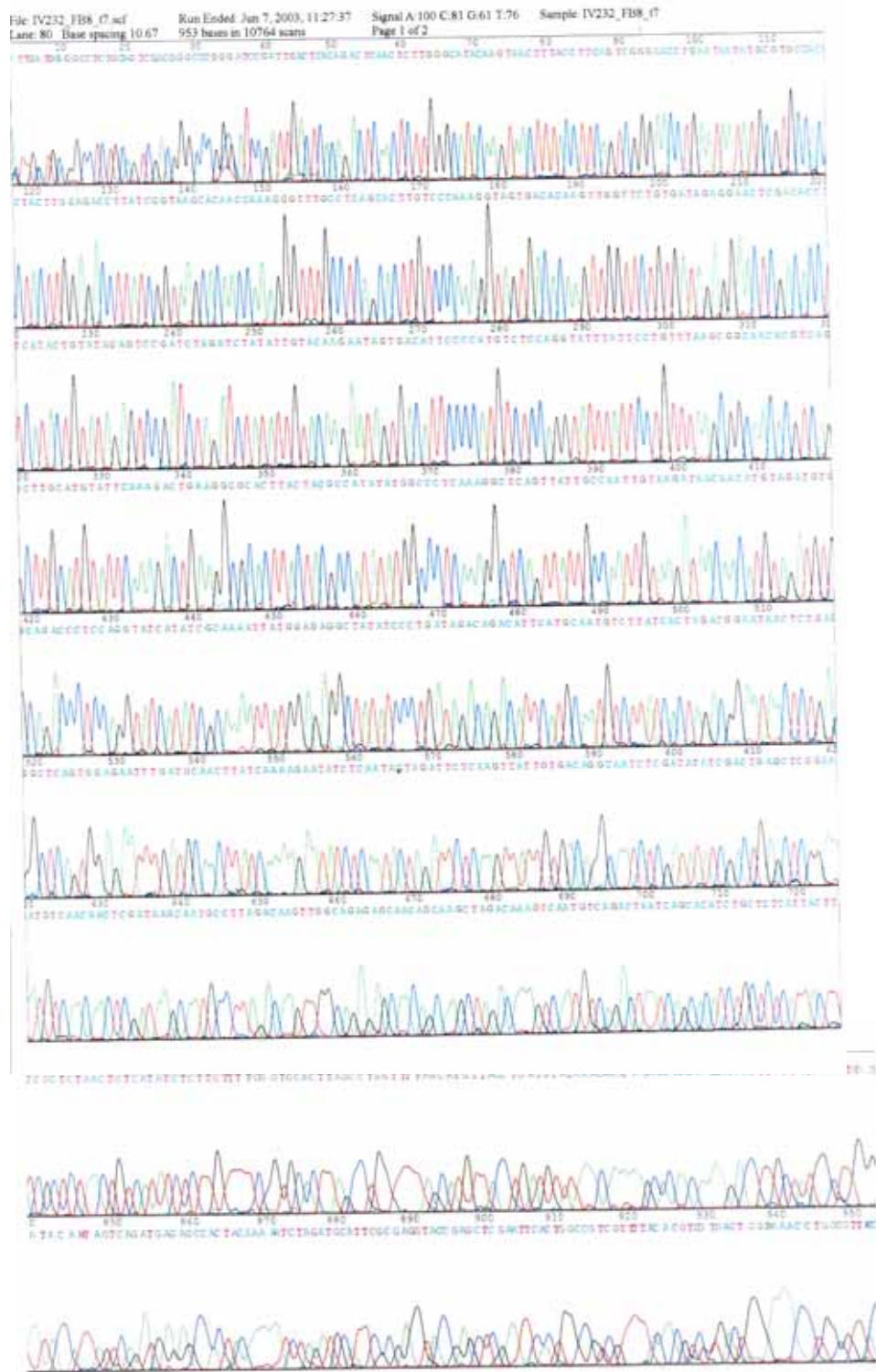
توالی اسید آمینه‌ای HR2 مربوط به قطعه B ویروس NR43 نیز با نرم‌افزار Clustal مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد از نظر توالی به ویروس‌های چینی از قبیل:

می‌گردد یک عامل بیماری‌زای مسری در طیور بوده، زیان‌های اقتصادی فراوانی را در صنعت مرغداری سبب می‌گردد. از طرفی، این ویروس تحریک‌کننده سیستم ایمنی و فعالیت آنتی‌تومور است و ظرفیت آن برای فعال‌سازی فعالیت ضدتوموری در ماکروفاژها به صورت در زیره و در شیشه (invivo, invitro) تحقیق شده است [۱۷ و ۱۸]. با توجه به اهمیت این پروتئین در بیماری‌زایی ویروس، بررسی‌های مولکولی بیش‌تر بر روی این پروتئین برای ارائه راهکارهای مناسب ضرورت دارد. در این رابطه ویروس NR43 که در سال ۱۳۷۷ از استان قم جدا گردیده، و با متوسط زمان مرگ (Mean Dead Time) کم‌تر از ۴۰ ساعت در رده ویروس‌های ولوژنیک طبقه‌بندی می‌گردد انتخاب شد. چون در این تحقیق کلونینگ به روش TA-Cloning انجام گرفت، استفاده از آنزیمی که قادر به ایجاد انتهای پلی A در انتهای محصول باشد، ضروری بود. از طرفی، چون محصول کلونینگ تعیین توالی می‌گردد باید از آنزیمی استفاده شود که دارای خاصیت تصحیح بعد از اشتباه (Proofreading) باشد. با توجه به این شرایط استفاده از سیستم RT-PCR تک‌مرحله‌ای مناسب است.

Alignment Report of VELO.MEG, using Clustal method with PAM250 residue weight table.
Saturday, August 09, 2003 4:56 PM

	10	20	30	40	Majority
1	SSGRRQRRFIGAV	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	NR43A.PRO
1	SSGRRQRRFIGAV	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	MK13A.PRO
1	SSGRRQRRFIGAV	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	VOL95.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	T53.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	POK70.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	PHEASENT.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	PF1114.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	MIY51.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	JS7.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	JS1.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	HER33.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	GRO2N47.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	F48E9.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	F48E9-1.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	EDIT.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	BJ3.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	SIMF64.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	TEXAS.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	DB3.PRO
1	SSGRRQRRFIGAI	IIGSV	ALGVATAAQITAA	ALI QANQNA	JL2.PRO

شکل ۳ مقایسه قطعات A و B با سایر توالی‌های ویروسی نیوکاسل با استفاده از روش کلاستال



شکل ۵ الکتروفورگرام توالی قطعه B

3. Henandez L.D, Hoffman L.R, Wolfsberg T.G, white J.M. *Virus- cell and cell- cell fusion*. Annual Rev.1996.12.627-661.
4. Stone- Hulslander. J, Morrissio. T.G. *Detection of an Interaction between the HN and F proteins Newcastle disease virus- Infected cells*. Journal of virology. 1997: 11: 6287-6295.
5. Sergel T, Mc Quain C, Morrison T. *Mutations in the fusion peptide and Heptad repeat regions of the Newcastle disease virus fusion protein Block fusion*. Journal of virology. 1994: 5:7654- 7658.
6. Taylor J, Edbauer V, Rey- senelong. A, Bouquet JP, Norton E Goebel S, Desmettre T, paolett, E, *Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens*. J virol. 1990: 64:4: 1441- 500.
7. ToyaDa T, Sakaguchi T,Lmai K, Inocencio NM, Gotoh B, Hamaguchi M, Nagai y. *Structural Comparison of the cleavage- Activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus*. Vilogy. 1987: 158:242- 247.
8. Lambert D.M, Barney. S, Lambert. A.L, Guthrie.K,Medinas. R, Davis. D.E, Bucy. T, Erickson. J. Merutka.G, pelteway. S.R. *Peptids from conserved regions of paramyxovirus fusion proteins are potent inhibitors of viral fusion*. Proc. Natl. Acad. ScL1996: 93: 2186-2191.
9. Lamb RA. *Paramyxiurs fusion: A Hypothesis for changes*. Virology. 1993: 197: 1-11.
10. Yu, M.wang, E. Uu, y. Cao, D. Jin, N. zhang, C.Bartlam, M. Rao, Z. Tein, P.Gao, G, *six helix bundle assembly and characterization of heptad repeat regions from F protein of Newcastle disease virus*. Journal of General virology. 2002: 83: 623- 629.
11. Den g.R, Wang, 2, Mirza. A.M, IORio. R.M, *localization of a domain on the paramyxovirus attachments protein required for the promotion of cellular fusion by its Homologous fusion protein spike*. virology 1995: 209: 457- 469.
12. Rapaport. D, Ovadia. M, Shai.y, *A synthetic peptide corresponding to a conserved heptad repeat domain is a potent inhibitor of sendai virus- cell fusion an emerging similarity with functional domains of other viruses*. The EMBO journal. 1995: 14.22: 5524-5534.
13. Sergel, T. Mc Gginnes, L. Morrison, T. *Mutations in fusion peptide and Adjacent Heptad repeat inhibited folding or activity of the Newcastle disease virus fusion protein*. Journal of virology. 2001: 7934-7943.
14. Young, J. Li, D. Abramowitz, M. Morrison, T. *Interaction of peptides with sequences from the Newcastle disease virus fusion protein heptad repeat regions*. Journal of virology. 1999: 73: 5945- 5956.
15. Young, J-K, Hichs, R.P, Wright, G.E, Morrison, T.g; *analysis of a peptide inhibitor of paramyxovirus (NDV) fusion using biological Assays, NMR and Molecular Modeling*. Virology. 1997: 238.291.
16. Sambrook J. Fritsch E.F. and Maniatis I. *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd ed., newyork, cold spring harbor laboratory press, 2001: p.1.32-1.41
17. Sin Kovics, J. Horvath, J. *Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains*. Journal of clinical virology 2000: 16: 1-15.

۱۸. واسجی، ن- مطالعه تیتراژ آنتی بادی ضد ویروس نیوکاسل در کارکنان مرغداری های حومه شهرستان کرج، کارکنان بخش واکسن سازی مؤسسه رازی و افراد عادی با روش های HI، الیزا، ۱۳۷۷، پایان نامه کارشناسی ارشد ویروس شناسی پزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی.

AFF2240, ch2000, ch98-c, ch98-3, JS9, L2NDV H, TW2000, wawer, ypn & Zgi شابهت زیادی دارد.

در بررسی مقایسه ای توالی نوکلئوتیدی این ویروس با توالی موجود در بانک ژن و استفاده از برنامه بلاست (Blast) بیشترین شباهت با یک سویه روسی به نام Vol95 به دست آمد. ویروس های چینی و آسیای جنوب شرقی در درجه دوم اهمیت قرار می گیرند.

توالی اسید آمینه ای منطقه محل برش در این ویروس، پتاپیتید (آرژینین، آرژینین، گلوآمین، آرژینین، آرژینین) است که مؤید ولوژنیک بودن ویروس است. با توجه به تعیین توالی ردیف انجام شده به نظر می رسد پرایمرهای فوق همراه با تعیین توالی ردیف انجام شده می توانند به عنوان یک روش سریع در جهت تعیین پاتوتیپ (pathotyping) مورد استفاده قرار گیرند.

همچنین در بررسی های انجام شده، اسید آمینه شماره ۸۲ (منطقه HR1) از قطعه A در ویروس NR43 لوسین است در صورتی که در دیگر ایزوله های ویروس نیوکاسل فنیل آلانین است که با توجه به خصوصیات بیولوژیک سویه قابل بررسی است. بررسی قطعه B که شامل دومین HR2 می شود شباهت (Conservivity) با دیگر ویروس های نیوکاسل نشان می دهد. بررسی توالی نوکلئوتیدی فیوژن پروتئین ویروس نیوکاسل می تواند راهگشای تحقیقات بعدی در جهت طراحی واکسن نو ترکیب، تشخیص های مولکولی با توجه به ایزوله بومی کشور، و فعالیت آنتی تومور ویروس بوده، همچنین به عنوان یک مدل در مطالعات و تحقیقات بعدی بر روی خصوصیات بیولوژیک، به منظور طراحی داروهای ضد ویروسی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Seal, B, King, D, Bennelt. J, *Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct Nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis*. J clin Microbiology. 1995: 10: 2624-2630.
2. Wang L. F., Eaton B. T. *Emerging paramyxovirus, the infectious disease review-microbes of man, animals, and environment*, springer semin immunopathol 2001: 3, 52-69.