Archive of SID

تعیین ردیف نوکلئوتیدی و قرابت فیلوژنتیکی ژن E_2 ویروس BVD در ایران

حسن ممتاز*[۱]، بهنام عباسیان[۲]، علی‌رضا عمرانی فرد[۲]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

* - **نویسنده مسئول :** *Email: hamomtaz@yahoo.com*

خلاصه

ویروس اسهال ویروسی گاوان- بیماری مخاطی(BVD-MD) ویروسی از خانواده فلاوی ویریده و جنس پستی ویروس است که واجد سه گلیکوپروتئین غشایی (E_2(gp53), E_1(gp25), E_0(gp48) می‌باشد. به منظور تعیین قرابت ژنتیکی ژن E_2 ویروسBVD در ایران و مقایسه آن با سایر کشورها، در ابتدا قطعه ۶۹۹ جفت بازی مربوط به این ژن از ۵ نمونه ویروس جدا شده از بافی کوت گاوهای مبتلا به عفونت پایدار پستی ویروسی، در سیستم RT-PCR تکثیر داده شد. محصول PCR مربوط به این نمونه‌ها جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی سکانس گردید. نتایج حاصل از مقایسه ردیف نوکلئوتیدی تعیین شده در این مطالعه با سکانس شناخته شده ژن E_2 پستی ویروس در سایر کشورها نشانگر وجود ۰/۶ تا ۲۹/۹ درصد تنوع ژنتیکی در این ژن بود که در این میان بیشترین قرابت با ردیف نوکلئوتیدی ژن E_2 در بلژیک (سکانس AJ715396) و بیشترین تفاوت با ردیف نوکلئوتیدی شناخته شده این ژن در ژاپن سکانس B038020) مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: پستی ویروس گاو، ژن E_2، قرابت ژنتیکی، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویروس اسهال ویروسی گاوان- بیماری مخاطی (BVD-MD) ویروسی از جنس پستی ویروس و خانواده فلاوی ویریده است که به عنوان یکی از مهم-ترین ویروس‌های بیماری‌زا در نشخوارکنندگان محسوب می شود.پستی ویروس‌ها دارای یک ملکول RNA خطی تک رشته‌ای مثبت به اندازه ۱۲/۵ کیلو باز بوده که ژنوم آن‌ها ۱۲ عدد پروتئین را کد می‌کند. از میان این پروتئین‌ها ۴ پروتئین ساختمانی شامل پروتئین c مربوط به کپسید ویروس وسه گلیکو پروتئین غشایی به نام E_2(gp53), E_0(gp48), E_1(gp25) و ۸ پروتئین ساختمانی که شامل NS23(P125) که به ۲ پروتئین NS2(P54) و NS3(P80) تجزیه می‌شود NS5B(P75)، NS5A(P58)، NS4B (P33k)، NS4A(P10) و ۳ پروتئین آنزیمی P10,P15 ,P51 می‌باشد (۳، ۵، ۶ و۸).

از میان این پروتئین‌ها گلیکوپروتئین E_2(gp53) به عنوان اصلی‌ترین پادگن غشایی ویروس محسوب شده و نقش اساسی در خنثی‌سازی ویروس توسط پادتن‌های ضد خود را دارد (۳).

آلودگی گاو آبستن با ویروس BVD قبل از نیمه دوم آبستنی و بعد از لانه گزینی جنینی (در سن ۹۰-۱۲۵ روزگی آبستنی) با سویه‌های غیرسایتوپاتیک ویروس منجر به تولید گوساله های مبتلا به عفونت پایدار (گوساله‌هایPI) می‌گردد. این گوساله‌ها ویروس را در تمام بافت‌های بدن داشته اما هیچ گونه پاسخ پادتنی علیه ویروس نشان نمی‌دهند و بعد از تولد با دفع ویروس از مهم‌ترین عوامل انتشار ویروس در گاو داری محسوب می‌شوند (۲و۹).

در این مطالعه علاوه بر ردیابی ژن E_2 ویروس BVD در بافی کوت این گوساله‌ها و تعیین ردیف نوکلئوتیدی این ژن در ایران قرابت ژنتیکی ژن E_2 در نمونه‌های پستی ویروس گاوی در ایران با سایر کشورها مقایسه شده است.

مواد و روش کار

۱- نمونه‌ها: تعداد ۵ نمونه ویروس BVD جدا شده از کشت بافی کوت گاوهای مبتلا به عفونت پایدار پستی ویروسی (گاوهای PI) در کشت سلولی MD-BK به همراه سویه استاندارد ویروس BVD (سویه NADL) به عنوان نمونه کنترل مثبت انتخاب گردید.

۲- استخراج RNA : جهت استخراج RNA از سلول آلوده به ویروس BVD از کیت Tripure ساخت شرکت Roche applied science طبق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده استفاده شد.

۳- ساخت cDNA : جهت ساخت cDNA از نمونه‌های RNA استخراج شده از دستورالعمل ارائه شده توسط Vilcek و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد (۱۴). در مرحله اول ۵ میکرولیترDEPC-Water به همراه۱ میکرولیترRandom Hexamer و۲میکرولیتر ازRNA مربوط به هر نمونه در یک لوله استریل مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه انکوبه گردید.پس از ۵ دقیقه سرد کردن لوله روی یخ به مخلوط فوق ۵ میکرولیتر M-Mulv RT buffer ۲/۵X میکرولیتر dNTP 10 mM و ۱ میکرولیتر آنزیم M-Mulv RT اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد.

۴- آزمایش PCR : جهت تکثیر قطعه ژنی کدکننده گلیکوپروتئین E_2 ویروس BVD از زوج پرایمرهای معرفی شده توسط Tajima و همکاران (۲۰۰۱) که در جدول ۱ نشان داده شده‌اند استفاده شد (۱۳):

جدول ۱. ردیف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن E2 ویروس BVD

Primer Name	*Primer Sequence*	*Size of Product (bp)*
E_2 – F	5' – ACTTTGAATTTGGACTTTGCC– 3'	699
E_2 – R	5' – TCCAGGTCAAACCAATATTG – 3'	

جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر قطعه ژنی موردنظر از دستگاه Master Cycler gradient (Eppendorf)با حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر

www.SID.ir

Archive of SID

PCR buffer 10X ، ۱ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱۵۰ میکرومول dNTP، ۱۰۰ پیکومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر از cDNA مربوط به هر نمونه استفاده شد.

برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل۹۴ درجه ۳ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۵ درجه ۴۵ ثانیه،۵۰ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۳ دقیقه.

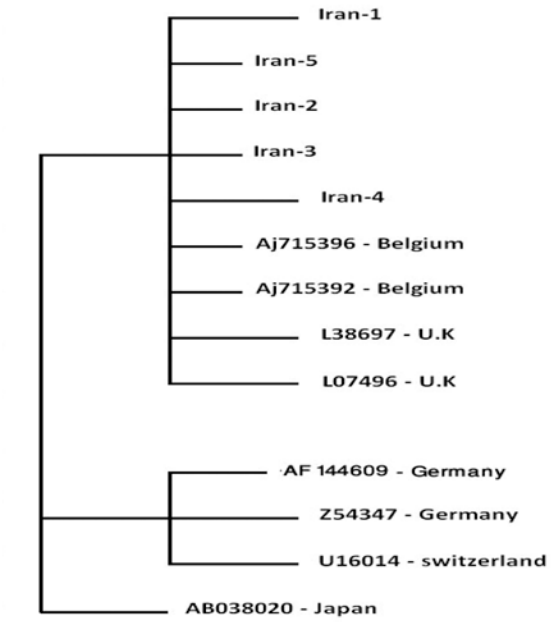
جهت تائید وجود قطعه تکثیر یافته،۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱ درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز گردید.

۵- تعیین ردیف نوکلئوتیدی: محصول PCR مربوط به ۵ نمونه از نمونه های مثبت شده در آزمایش PCR جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی ژن تکثیر یافته به شرکت Macrogen کره ارسال و به روش Sanger sequencing method سکانس گردید.

۶-تعیین‌قرابت‌نوکلئوتیدی:ردیف نوکلئوتیدی ژن E_2 تعیین شده در این مطالعه با سکانس شناخته شده این ژن در سایر کشورها (ثبت شده در بانک ژنی NCBI) با استفاده از نرم افزار Clustal X و Njplot مقایسه و ضمن تعیین Sequence Identity Matrix درخت فیلوژنی مربوطه رسم گردید.

نتایج

ردیف نوکلئوتیدی ژن E_2 پستی ویروس گاوی مربوط به ۵ نمونه مثبت شده در آزمایش RT-PCR سکانس و با استفاده از نرم افزار Clustal X با ردیف نوکلئوتیدی این ژن ثبت شده در بانک ژنی (NCBI)، alignment گردید. پس از مقایسه شباهت‌ها و تفاوت‌های ردیف نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار Njplot قرابت فیلوژنی آن‌ها ترسیم شد که درخت فیلوژنی حاصله در شکل ۱ و میزان قرابت این ژن در نمونه‌های ایران با سایر کشورها در جدول۲ نشان داده شده است:



شکل۱-درخت فیلوژنی مربوط به آنالیز ردیف نوکلئوتیدی ژن E_2 ویروس BVD در ایران با تعدادی از سکانس‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی

بحث

از میان پروتئین‌های کد شده توسط پستی ویروس، گلیکوپروتئینE_2 (gp53) به عنوان اصلی‌ترین پادگن غشایی ویروس محسوب شده و نقش اصلی در خنثی‌سازی ویروس توسط پادتن را دارد و امروزه بیشتر روش‌های تشخیص بیولوژی مولکولی بر پایه PCR، کلونینگ و... بر پایه ردیابی این ژن طراحی شده‌است وبا کلون‌سازی‌ژن‌کدکننده این گلیکوپروتئین در سلول‌هایDrosophila melanogaster موفق به تهیه کیت تشخص برای این ویروس شده اند. طوری که در آزمایش ۱۸۳ نمونه سرم گاو مورد مطالعه در یک بررسی حساسیت و ویژگی تست الایزا بر پایه ردیابی پادتن‌های ضد E_2 به ترتیب معادل ۱۰۰ و ۹۸ درصد تعیین شده است (۷).

در مطالعات ژنتیکی جهت تعیین ارتباط فیلوژنی بین پستی ویروس‌های مختلف از ژن E_2 و ناحیه UTR-5' ویروس استفاده می‌شود و امروزه ردیف نوکلئوتیدی این ژن ها خصوصاً ژن E_2 و نیز ردیف آمینواسیدی پروتئین کد شده توسط این ژن در تعداد زیادی از کشورها شناخته شده است (۴، ۱۱و۱۴).

در مطالعه انجام شده روی پستی ویروس‌های جدا شده از گوسفند مشخص گردید که ژنوم پستی

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس گوسفندی BD31 با ۳۳۵۸ نوکلئوتید کمتر از ۷۱ درصد قرابت با سایر پستی ویروس‌های نشخوارکنندگان دارد و به عنوان اولین پستی ویروس گوسفندی جدا شده در امریکای شمالی است که در زمره تحت گروه ۲ ویـروس BVD (BVDV-II) محسوب می‌شود (۱۱).

در مطالعه انجام شده در ژاپن روی ۷۳ سویه پستی ویروس جدا شده از نشخوارکنندگان و خوک مشخص گردید که سویه‌های وابسته به خوک به دو زیر گروه اصلی CSFV-1 و CSFV-2 تقسیم می‌شوند اما تعدادی از سویه ها نظیر کاناگاوا ۷۴، اوکیناوا ۸۶ و Thi CBR۹۳ از سایر سویه ها متفاوت بوده و به زیر گروه ۳ (CSFV-3) تعلق دارند. سویه های وابسته به نشخوارکنندگان نیز به دو زیر گروه BVDV-1 با دو تحت گروه BVDV-1a و BVDV-1b و زیر گروه BVD-II که عمدتاً شامل سویه‌های گوسفندی تقسیم می‌شوند (۱۵).

در مطالعه‌ای در تایوان با آنالیز ردیف نوکلئوتیدی ژن E_2 ویروس تب کلاسیک خوک (CSFV) ۳ جمعیت ویروسی مشخص تشخیص داده شد که حدود ۹۴/۸ درصد قرابت در بین این ۳ جمعیت مشاهده گردید (۱۰).

در مطالعه انجام شده در کلمبیا، ردیف نوکلئوتیدی ناحیه E_2 و UTR-5' ویروس CSFV آنالیز گردید. با تحلیل داده‌ها مشخص گردید که سویه های CSFV به دو زیر گروه ۱ و ۱/۱ تقسیم می شوند که گروه دوم خود حاصل تداوم تغییرات ژنتیکی در گروه اول می‌باشد (۱۲).

در یک مطالعه جهت تعیین منابع ظهور ویروس تب کلاسیک خوک در لائوس طی سال های ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹ ژن E_2 در ۲۱ سویه ویروس جدا شده مورد تجزیه و تحلیل ژنتیکی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمام سویه‌های جدا شده در این منطقه متعلق به گروه CSFV-2 بوده و به دو زیر گروه ۲/۱ و ۲/۲ تقسیم می‌شوند (۱).

مطالعات مولکولی زیادی روی پستی ویروس‌ها در ایران انجام نگرفته است. مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران با هدف ردیابی ژن کدکننده گلیکوپروتئین gp53 در بافی کوت گاوهای مبتلا به عفونت پایدار پستی ویروسی، تعیین ردیف نوکلئوتیدی این ژن و مقایسه آن با سایر کشورها انجام گرفته است. بدین منظور قطعه ۶۹۹ جفت بازی تکثیر یافته در آزمایش RT-PCR از ۵ نمونه مثبت شده در این تست پس از خالص سازی و تعیین ردیف نوکلئوتیدی با سکانس شناخته شده ژن E_2 پستی ویروس در سایر کشورها ثبت شده در بانک ژنی مقایسه گردید. نتایج حاصل از alignment سکانس‌های تعیین شده در این مطالعه با سایر کشورها نشانگر وجود ۰/۶ تا ۲۹/۹ درصد تنوع در این ژن بود که در این میان بیشتر قرابت ژنتیکی مربوط به سکانس ژن E_2 در ایران با سکانس شناخته شده این ژن در بلژیک (سکانس AJ715396) با ۹۹/۴ درصد قرابت و بیشترین تفاوت مربوط به سویه این ویروس در ایران با سکانس ثبت شده این ژن در ژاپن (سکانس AB038020) با ۷۰/۱ درصد قرابت تعیین شد (جدول ۱).

در ۵ نمونه سکانس شده در ایران نیز ۶/۴ تا ۹/۳ درصد تنوع ژنتیکی در ژن E_2 مشاهده شد. با استفاده از نرم‌افزار Njplot, Clustal X درخت فیلوژنی سکانس‌های مقایسه شده ترسیم گردید که همان گونه که در شکل (۱) مشاهده می شود سکانس‌های مورد مطالعه در سه خوشه مجزا قرار گرفته و در این میان نمونه های سکانس شده در ایران در شاخه سکانس ژن E_2 در بلژیک و انگلیس قرار گرفته و تفاوت معنی داری را با سویه های جدا شده این ویروس در ژاپن نشان می‌دهند. هر چند که بر پایه نتایج حاصل از این تحقیق نمی‌توان زیر گروه‌های ویروس BVD را در ایران تعیین نمود ولی وجود تنوع ژنتیکی حاصله را براساس گسترش جغرافیایی ویروس می توان تا حدی توجیه کرد. با توجه به این که نقل و انتقال دام و فرآورده‌های بیولوژیک دامی بین کشورهای آسیایی و ایران سابقه تاریخی ندارد لذا استقرار سویه‌های ژاپنی در شاخه‌ای مجزا از سویه‌های ایران در درخت فیلوژنی می‌تواند نشانگر وجود تفاوت بیشتر ردیف ژنی این ویروس بین ایران با ژاپن باشد. نکته دیگر این که

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه تنوع ژنتیکی ویروس در این مطالعه تنها بر پایه ژن E_2 صورت گرفته که در مطالعات بعدی با آنالیز کامل نواحی دیگر پستی ویروس‌های گاو و گوسفند از جمله ناحیه 'UTR-5 می‌توان با اطمینان بیشتری روی منشاء ورود بیماری به کشور اظهارنظر نمود.

جدول۲: نتایج حاصل از مقایسه ردیف نوکلئوتیدی ژن E_2 ویروس BVD در ایران با تعدادی از سکانس‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی (Sequence Identity Matrix)

	Iran-5	*Iran-2*	*Iran-3*	*Iran-4*	*Iran-1*	*AJ715396 Belgium*	*AJ715392 Belgium*	*L38697 UK*	*L07496 UK*	*U16014 Switzerland*	*AF144609 Germany*	*Z54347 Germany*	*AB038020 Japan*
Iran-5	ID	0.936	0.928	0.914	0.908	0.994	0.991	0.989	0.908	0.846	0.852	0.858	0.712
Iran-2	0.936	ID	0.912	0.916	0.921	0.991	0.990	0.990	0.928	0.836	0.843	0.846	0.708
Iran-3	0.928	0.912	ID	0.907	0.923	0.989	0.987	0.989	0.921	0.842	0.836	0.842	0.736
Iran-4	0.914	0.916	0.907	ID	0.911	0.990	0.985	0.986	0.931	0.847	0.862	0.858	0.702
Iran-1	0.908	0.921	0.923	0.911	ID	0.988	0.984	0.986	0.904	0.828	0.823	0.821	0.701
AJ715396 Belgium	0.994	0.991	0.989	0.990	0.988	ID	0.989	0.991	0.986	0.846	0.846	0.838	0.721
AJ715392 Belgium	0.991	0.990	0.987	0.985	0.984	0.989	ID	0.990	0.987	0.856	0.858	0.828	0.736
L38697 UK	0.989	0.990	0.989	0.986	0.986	0.991	0.990	ID	0.991	0.862	0.871	0.876	0.731
L07496 UK	0.908	0.928	0.921	0.931	0.904	0.986	0.987	0.991	ID	0.842	0.846	0.836	0.703
U16014 Switzerland	0.846	0.936	0.842	0.847	0.828	0.846	0.856	0.862	0.842	ID	0.946	0.958	0.701
AF144609 Germany	0.852	0.843	0.836	0.862	0.823	0.846	0.858	0.871	0.846	0.946	ID	0.982	0.691
Z54347 Germani	0.858	0.846	0.842	0.858	0.821	0.838	0.828	0.876	0.836	0.958	0.982	ID	0.699
AB038020 Japan	0.712	0.708	0.736	0.702	0.701	0.721	0.736	0.731	0.703	0.701	0.691	0.699	ID

منابع

1. Blacksell, S.D., Khounsy, S., Boyle, D.B., Greiser-Wilke, I., Gleeson, L.J., Westbury, H.A. and Mackenzie, J.S., 2004. Phylogenetic analysis of the E2 gene of classical swine fever viruses from Lao PDR. Virus Research 104(1), 87-92.
2. Bruschke, C.J., Haghparast, A., Hoek, A., Rutten, V.P., Wentink, G.H., van Rijn, P.A. van Oirschot, J.T., 1998. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. Veterinary Immunology and Immunopathology 62(1), 37-50.
3. Collett, M.S., 1992. Molecular genetics of pestiviruses. Comparative Immunology, Microbiology and Infectetious Diseases 15(3), 145-54.
4. Flores, E.F., Ridpath, J.F., Weiblen, R., Vogel, F.S., Gil, L.H, 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. Virus Research 87(1), 51-60.
5. Giangaspero, M., Harasawa, R., 1999. Ovine pestiviruses: their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. Veterinary Microbiology 70(1-2), 33-9.
6. Hamers, C., Dehan, P., Couvreur, B., Letellier, C., Kerkhofs, P., Pastoret, pp, 2001. Diversity among bovine pestiviruses. Veterinary Journal 161(2), 112-22.
7. Marzocca, M.P., Seki, C., Giambiagi, S.M., Robiolo, B., Schauer, R., Dus Santos, M.J., Scodeller, E.A., La Torre, J.L., Wigdorovitz, A., Grigera, P.R., 2007. Truncated E2 of bovine viral diarrhea virus (BVDV) expressed in Drosophila melanogaster cells: a candidate antigen for a BVDV ELISA. Journal of Virological Methods 144(1-2), 49-56.
8. Murphy, F.A., Gibbs, E.P., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J.,1999. Veterinary virology. 3th edition, Academic Press, SanDiego, pp. 441-449.
9. Nettleton, P.F., Entrican, G., 1995. Ruminant pestiviruses. The Brithish Veterinary Journal 151(6), 615-642.
10. Pan, C.H., Jong, M.H., Huang, T.S., Liu, H.F., Lin, S.Y., Lai, S.S., 2005. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus in Taiwan. Archive of Virology 150(6), 1101-19.
11. Paton, D.J., Carlsson, U., Lowings, J.P., Sands, J.J., Vilcek, S., Alenius, S. 1995. Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. Veterinary Microbiology 43(4), 283-94.
12. Sabogal, Z.Y., Mogollón, J.D., Rincón, M.A., Clavijo, A., 2006. Phylogenetic analysis of recent isolates of classical swine fever virus from Colombia. Virus Research 115(1), 99-103

www.SID.ir

Archive of SID

13. Tajima, M., Frey, H.R., Yamato, O., Maede, Y., Moennig, V., Scholz, H., Greiser-Wilke, I., 2001. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, Germany. Virus Research 76(1), 31-42.
14. Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J., 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Archive of Virology 136(3-4), 309-23.
15. Yamamoto, T., Kozasa, T., Aoki, H., Sekiguchi, H., Morino, S., Nakamura, S., 2008. Genomic analyses of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. Veterinary Microbiology 127 (3-4), 386-91.

www.SID.ir