ایجاد پلاک توسط سویه V_4 ویروس عامل بیماری نیوکاسل بر روی کشت سلولی و بررسی مولکولی با روش واکنش زنجیره پلیمراز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

ساناز سبحانی[۱]، محمدجواد مهربانپور[۲*]

چکیده

امروزه در بسیاری از کشورهای دنیا واکسن کلون شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. جهت کلون کردن یک ویروس، یکی از راه‌ها رشد ویروس بر روی کشت سلول و جدا کردن پلاک‌های مجزا و متفاوت و بررسی آنها از لحاظ مورفولوژی و ژنتیکی است.

دراین تحقیق، ابتدا سلول‌های Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) بصورت تک لایه و بطور استاندارد کشت داده شد. رقت های مختلف ویروس به سلول‌های تک لایه MDCK همراه با ترپسین، آگار و سولفات منیزیوم اضافه شد. ویروس توانست بر روی سلول‌های فوق تکثیر و ایجاد اثر سایتوپاتیک (CPE) و پلاک نماید. در رقت 10^{-6} تعداد ٦ پلاک که از لحاظ شکل و اندازه تفاوت داشتند برداشته شدند و جهت تکثیر به تخم‌مرغ جنین دار ۱۱-۹ روزه تلقیح گردید. بعد از ٤٨ ساعت مایع آلانتوئیک هر تخم‌مرغ حاوی پلاک برداشت ونسبت به جداسازی RNA هر پلاک اقدام گردید. منطقه شکست (Cleavage site) پروتئین ادغامی (Fusion) با تست RT-PCR انجام شد و محصول PCR خالص‌سازی وسکانس گردید. سکانس نوکلئوتیدها و آمینواسیدها برای هر پلاک با سوش های ثبت شده در بانک ژنی مقایسه شد. سکانس نوکلئوتیدهای تمامی پلاک‌های بدست آمده، ۹۷ تا ۹۹٪ همخوانی با ویروس V_4در بانک ژنی را تایید نمود. هدف از این پژوهش ایجاد پلاک از سوش V_4 ویروس نیوکاسل بر روی سلول‌های MDCK جهت ایجاد پلاک‌های مجزا و در نهایت بررسی مولکولی پلاک‌های ایجاد شده می‌باشد.

واژگان کلیدی: *ویروس نیوکاسل، واکنش زنجیره پلیمراز نسخه‌برداری معکوس، کشت سلولی*

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹٤/٤/۱۰

مقدمه

یکی از راه‌هایی که جهت شناسایی کلون‌های ویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرد کشت ویروس برروی سلول‌های مختلف می‌باشد که امروزه بطور وسیع بکار برده می‌شود. در خصوص ویروس نیوکاسل انواع مختلف سلول‌ها مخصوصا با منشا طیور و رده سلولی پستانداران جهت کشت و تکثیر ویروس مورد بررسی قرار گرفته است. از آنجا که بعضی ویروس‌ها به علت دیر رشد بودن قادر نیستند به راحتی بر روی بسیاری از رده‌های سلولی اولیه یا ثانویه رشد و تکثیر نمایند، لذا لازم است این ویروس‌ها بر روی کشت‌های سلولی سازگار شده و آنزیم‌های لازم در اختیار ویروس قرار گیرد (٦ و ۳، ۱). در تحقیقات Madhan Mohan درسال ۲۰۰۵ ویروس‌های سویه وحشی بر روی سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه کشت داده شد و تغییرات آنها در طی ۵۰ بار پاساژ مورد بررسی قرار گرفت (۱۵). از طرفی Barahona و Hanson گزارش کردند که جهت ایجاد پلاک توسط سویه‌های لنتوژنیک ویروس بیماری نیوکاسل بر روی سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه (Chicken embryo fibroblast) و Vero نیاز به تریپسین و منیزیوم می‌باشد(۸). توانایی ویروس بیماری نیو کاسل جهت ایجاد پلاک در کشت‌های سلولی بستگی به بیماریزایی این ویروس دارد(۷). تکثیر ویروس های بیماریزا (ولوژنیک) در کشت سلول، معمولا با انهدام سلول‌ها همراه است. اگر چه سویه‌های غیر بیماری‌زای (لنتوژنیک) ویروس نیوکاسل در بسیاری از رده‌های سلولی یا کشت‌های اولیه سلولی قادر به تکثیر و ایجاد پلاک نیستند (۱۰و۷). سویه های ولوژنیک و مزوژنیک ویروس عامل بیماری نیوکاسل می‌توانند بدون تریپسین در کشت سلولی رشد کرده و پلاک ایجاد نمایند. در

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران

*۲- موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش ویروس‌شناسی، شیراز، ایران. (mehrabanpourj@yahoo.com)

Archive of SID

www.SID.ir

صورتیکه سویه‌های لنتوژن در محیط‌های کشت سول جهت انتشار و تکثیر و ایجاد پلاک نیاز به پروتئازهایی از جمله تریپسین و منیزیم دارند که در واقع این مسئله به ویژگی مولکولی و توالی اسید آمینه در منطقه شکستگی (cleavage site) پروتئین ادغامی (Fusion) ویروس مرتبط می‌شود (۱۳و۹). شکل و اندازه پلاک‌های ایجاد شده توسط سوش‌های متفاوت نیوکاسل نیز مستقیما با بیماری‌زایی آنها ارتباط دارد (۱۱و٦). سلول فیروبلاست جنین جوجه از جمله سلول‌هایی است که می‌تواند جهت سازگار کردن ویروس‌ها، تکثیر و انتشار ویروس عامل بیماری نیوکاسل مورد استفاده قرار گیرد اما از سلول‌های MDCK، جهت تکثیرویروس نیزاستفاده می‌گردد(٤و۲). در سال ۱۹۹۱ از RT-PCR جهت شناسایی ویروس نیوکاسل استفاده گردید پس از آن در سال‌های بعد استفاده از RT-PCR جهت تشخیص نیو کاسل توسط محققین صورت گرفت و از پرایمرهایی با اندازه‌های مختلف استفاده گردید بیشتر محققین ژن F را که منطقه شکست را در بر می‌گیرد مورد بررسی قرار دادند (۱۲) و از پرایمری که تقریبا ۹۰٪ طول ژن F را دربر می‌گرفت استفاده نمودند.

هدف از این تحقیق ایجاد پلاک توسط سوش اولیه واکسن کشته شده نیوکاسل بر روی سلول‌های MDCK بمنظور بررسی مولکولی پلاک‌های بدست آمده و یافتن تفاوت‌های احتمالی و مقایسه اطلاعات مولکولی بدست آمده با دیگر سویه‌های ویروس نیوکاسل ثبت شده در بانک ژنی و در نهایت یافتن مناسبترین پلاک به منظور دستیابی به واکسن‌های کلون شده در مطالعات بعدی می‌باشد.

مواد و روش کار

ویروس: سوش اولیه ویروس به صورت لیوفیلیزه از بخش تولیدواکسن‌های طیورموسسه رازی شیراز تهیه گردید سپس با ۲ سی‌سی PBS استریل مخلوط گردید پس از آن اقدام به تکثیرسوش موردنظر در تخم‌مرغ جنین دار ۱۱-۹ روزه گردید وتا زمان استفاده در فریزر۲۰ -درجه سانتیگراد نگهداری شد.

تعیین تیتر عفونت‌زایی ویروس

جهت محاسبه EID_{50} (Embryonic Infective Dose 50) بر اساس دستورالعمل (Office International des Epizooties) OIE با استفاده از روش رید و مانچ محاسبه انجام و بر اساس این روش درصد تخم‌مرغ‌های آلوده شده محاسبه گردید(۵).

سلول: سلول MDCK به صورت استاندارد در پلیت مخصوص کشت سلولی ٦ خانه تکثیرداده شدند و در گرمخانه با شرایط ۵٪ Co_2 و دمای ۳۷ درجه‌سانتیگراد قرارداده شد پس از اینکه سلول‌ها کاملا به صورت تک‌لایه در آمدند جهت تلقیح ویروس بکار گرفته شد(۸).

محیط کشت سلول: محیط اختصاصی DMEM شرکت سیگما (D5523) براساس دستورالعمل شرکت سازنده تهیه گردید و با سرم جنین گاو(Fetal calf serum) غیرفعال شده به میزان ۵٪ غنی شد، پنی سیلین G(Sigma) به میزان ۱۰۰ واحد، جنتامایسین (Gibco) به میزان ۲ میلی‌گرم در هر سی‌سی، بی‌کربنات سدیم به میزان ۲٪، تریپسین به میزان ۲/۵ میکروگرم در هر سی‌سی اضافه شد و pH نهایی برابر۷/٤ تنظیم گردید.

محیط کشت سلولی همراه با آگار

محیط کشت اختصاصی DMEM(Sigma)، آگارز ۰/۰۷٪ (Gibco)، تریپسین۵ /۲میکروگرم بازاء هر سی‌سی، بیکربنات سدیم (Sigma) ۰/۰۲٪، جنتا مایسین۲ میلی گرم در هر سی‌سی و سولفات منیزیوم مخصوص کشت سلولی (Sigma) ۰/۰۳ مولار تهیه گردید. نوترال رد (Gibco) با غلظت ۱:۱۰۰۰۰ نیز تهیه گردید.

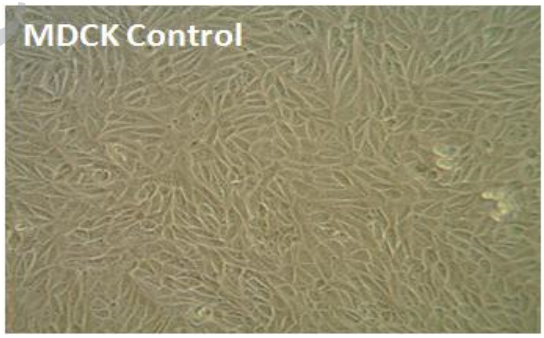
ایجاد پلاک

بعد از ٤۸ ساعت که سلول‌های MDCK به صورت تک‌لایه در آمدند و در زیر میکروسکوپ معکوس کاملا از نظر تک لایه بودن مورد تأیید قرار گرفتند (نگاره۱) رقت‌های مختلفی از ویروس (10^{-1} تا 10^{-10}) که قبلا تهیه شده بود به میزان ۲۰۰

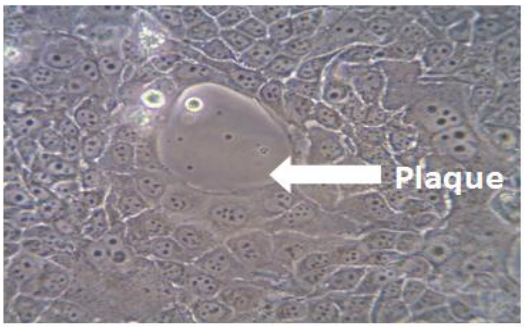
Archive of SID

www.SID.ir

لاندا بر روی هر حفره حاوی سلول‌های تک لایه تلقیح و به مدت نیم ساعت در انکوباتور با شرایط ۵٪ Co_2، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت ۸۵٪ قرار داده شد و هر ده دقیقه شیک گردید. سپس محیط کشت سلول تهیه شده همراه با آگاراضافه گردید و در انکوباتور co_2 دار با رطوبت ۸۵٪ نگهداری شد (۸ و ۵). بطور مرتب (هر ۱۲ ساعت) پلیت‌ها در زیر میکروسکوپ از لحاظ وجود تغییرات سلولی، ایجاد پلاک، اندازه پلاک و شکل پلاک مورد بررسی قرار گرفتند. در سلول‌های MDCK، ٤٨ ساعت بعد از تلقیح ویروس تغییرات سلولی مشاهده گردید و ۵۰ تا ٦٠ ساعت بعد از تلقیح ویروس، سلول‌ها مجددا از نظر ایجاد پلاک مورد بررسی قرار گرفتند. بهترین پلاک بدست آمده در رقت 10^{-6} بود که تعداد ٦ پلاک مجزا که از لحاظ شکل و اندازه بایکدیگر تفاوت داشتند توسط سرنگ انسولین به روش استریل و در زیر هود ازمایشگاه بر داشت گردید.(نگاره۲)



نگاره ۱- سلول‌های طبیعی از MDCK



نگاره ۲- پلاک ایجاد شده بر روی سلول‌های MDCK پس از ۸۰ ساعت

برداشت پلاک‌ها از چاهک‌ها

پس از مشاهده پلاک‌ها در زیر میکروسکوپ اقدام به برداشت پلاک از چاهکی که واضح ترین پلاک‌ها در آن وجود داشت گردید. پلاک‌های برداشت شده بطور مجزا هر کدام در ۱۰۰ میکرولیتر PBS/BSA استریل حل شدند و هر پلاک جداگانه به تخم‌مرغ‌های ۹ روزه تلقیح و پس از ٤٨ ساعت نگهداری در انکوباتور، اقدام به برداشت مایع آلانتوئیک گردید سپس به منظور حصول از تکثیر ویروس و وجود پلاک‌ها اقدام به انجام تست هم‌آگلوتیناسیون (Hemagglutination test) گردید، پس از آن تمام مراحل ایجاد پلاک بر روی سلول‌های MDCK مجددا برای هر پلاک تا ۳ بار انجام گرفت.

استخراج RNA: جهت جداسازی RNA ویروس نیوکاسل از مایع آلانتوئیک از کیت (High pure viral nucleic acid kit) شرکت Roush آلمان استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نسخه‌برداری معکوس-(RT-PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز بصورت یک مرحله و همزمان با استفاده از یک جفت پرایمر بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. در این بررسی از کیت RT-PCR و آنزیم‌های مربوط به همان شرکت استفاده گردید. از یک جفت پرایمر با مشخصات ذیل که محصول آن bp ۱۳٤۹ می‌باشد استفاده گردید.(جدول ۱)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ـ ردیف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن F ویروس نیوکاسل

مرجع	توالی (۵ به ۳)	اندازه محصول (bp)	نام پرایمر
15	5′ TCA CTC TAT CCG TAG GAT ACA AGA GTC TG3′	1349	NDV (F gene)-F
15	5′ GAT CTA GGG TAT TAT TCC CAA GCC A 3′	1349	NDV (F gene)-R

قطعه

۱۳٤۹bp دربرگیرنده نوکلئوتیدهای ناحیه شکست پروتئین F میباشند. نمونه‌ها با توجه به برنامه دمایی مورد استفاده جهت انجام RT_PCR تنظیم و در دستگاه PCR قرار داده شدند. برنامه دمایی مورد استفاده جهت انجام RT-PCR شامل ۵۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه، ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، ۹٤، ۵۵ و ٦۸ درجه سانتیگراد هر یک به مدت یک دقیقه با ٤۰ بار تکرار و سپس ٦۸ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

سپس جهت مشاهده اندازه محصول PCR از ژل ۱٪ آگارز در رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید استفاده و قسمت تکثیر شده بر روی ژل آگارز جاری گردید، و در نهایت توسط دستگاه الکتروفورز و ژل داک، باندهای تفکیک شده با مارکر مقایسه و تائید شدند.

پلاک‌ها همچنین از لحاظ شکل و اندازه مقایسه و تفاوت‌های احتمالی بررسی و در نهایت این پلاک‌ها از لحاظ ملکولی با یکدیگر مقایسه گردیدند.

خالص‌سازی محصول RT-PCR

محصول بدست آمده RT-PCR پس از تأیید با استفاده از کیت خالص سازی محصولPCR شرکت Roush آلمان با روش TAX غلظت X ۱ خالص‌سازی شد. قرابت آنها در سویه های موجود در بانک ژنی مقایسه و تفاوت آنها از لحاظ ملکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین توالی

نمونه‌های خشک شده همراه با پرایمرهای مربوط به شرکت MWG-Biotech آلمان (توسط شرکت فرایند دانش) ارسال و با روش Comfort read تعیین توالی نوکلئوتیدی شدند. آنالیز نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه توسط نرم‌افزار Seqscap 2.5 انجام گردید و حذف بخش‌های پیشین و پسین اضافی و تطبیق قسمت‌های مشابه صورت گرفت. در باند ژن، آزمون BLAST انجام شد و ویروس نیوکاسل بودن نمونه‌ها مورد تایید قرار گرفت، توالی نوکلئوتیدهای ژن F پروتئین به اسید آمینه تبدیل گردید و شماره‌گذاری اسیدهای آمینه انجام گرفت و تفاوت نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه مربوط به هر نمونه با یکدیگر بررسی و مقایسه گردید. درصد تشابه نمونه‌ها با دیگر ویروس‌های نیوکاسل ثبت شده در دنیا از طریق بانک ژنی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج بدست آمده از مشاهده روزانه پلیت‌های کشت سلولی حاوی سلول‌های MDCK تلقیح شده با سوش V_4 ویروس عامل بیماری نیوکاسل نشان داد که در ۷۲ ساعت اول بعد از تلقیح هیچگونه تغییری در سلول‌هایMDCK مشاهده نگردیده و در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی که ویروسی به آنها تلقیح نشده بود از نظر ظاهری در زیر میکروسکوپ تفاوتی مشاهده نگردید و کلیه گروها به صورت سلول تک لایه مشاهده گردیدند، اما بعد از ۷۲ ساعت سلول‌ها شروع به تغییر کردند و کم کم حالت گرد شدن در آنها پدیدار گردید در حالی که ۸۰ ساعت بعد از تلقیح سلول‌های آلوده شده با ویروس حالت گرانوله شدن در سیتوپلاسم آنها مشاهده گردید و حالت گرد شدن در سلول‌ها به چشم می خورد و میکروپلاک‌ها در آنها مشاهده گردید در حالی که در

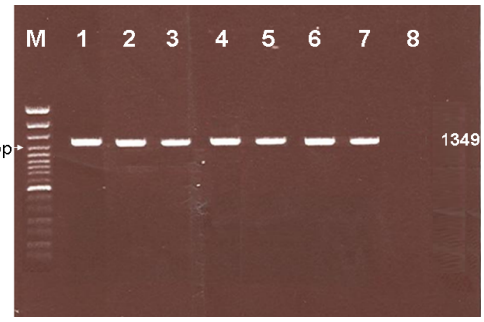
Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌های گروه کنترل تغییری مشاهده نگردید(نگاره ۱و۲). در تلقیح رقتهای مختلف (10^{-1} تا 10^{-10}) از ویروس سوش V_4 به سلول‌های MDCK تنها در رقت 10^{-6} تعداد ٦ پلاک واضح و مجزا بدست آمد. در رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-5} ۱۰ پلاک‌های واضح و قابل شمارشی مشاهده نگردید. پلاک‌های بدست آمده در رقت 10^{-6} از نظر شکل و اندازه با یکدیگر متفاوت بودند.

نتایج انجام PCR

نتایج PCR حاصل از تمام ٦ پلاک جدا شده از کشت سلولی بر روی سلول‌های MDCK نشان دهنده باند ۱۳٤۹bp بود که در کنار نمونه مثبت (سوش واکسن غیر فعال نیوکاسل رازی) مورد تایید قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی نمونه‌ها وهمچنین کنترل مثبت باند واضح ومشخصی ایجاد نمودند که با توجه به مارکر بین باند ۱۳۰۰bp و ۱٤۰۰bp مارکر می‌باشد و در نتیجه باند ۱۳٤۹bp جهت نمونه‌ها و کنترل مثبت تایید گردید(نگاره۳).



نگاره ۳ـ الکتروفورز ژل آگاروز محصول RT-PCR ویروس‌های مورد مطالعه با اندازه ۱۳٤۹pb همراه با مارکر ۱۰۰bp. ستون ۱ تا ٦ نمونه‌های ویروس، ستون ۷ کنترل مثبت (سوش واکسن غیر فعال نیوکاسل رازی) و ستون ۸ کنترل منفی.

با استفاده از برنامه BLAST سکانس نوکلئوتیدهای تمامی ٦ پلاک بدست آمده مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و ۹۷ تا ۹۹٪ شباهت با سوش V_4 موجود در بانک ژنی به شماره EF464163.1 مورد تایید قرار گرفت و بدین ترتیب مشخص گردید که این ویروس جز ویروس‌های لنتوژن بوده و کلیه پلاک های بدست آمده با ویروس‌های نیوکاسل نقاط مختلف جهان که در بانک ژنی ثبت شده شباهت داشتند. نتایج آنالیز سکانس اسید آمینه نشان داد که در منطقه شکستگی اسید آمینه ۱۱۱-۱۱۷ هیچگونه تغییری مشاهده نگردید و سکانس اسید آمینه تأیید کرد که تمامی پلاک ها متعلق به ویروس‌های لنتوژنیک ویروس نیوکاسل بود و ردیف اسید آمینه بصورت ^{111}G-G-R-G-G-R-L^{117} بود.

بحث

کشت سلولی یکی از بهترین روشها جهت سازگار کردن، تکثیر و انتشار ویروس‌هاست. ایجاد پلاک توسط سویه های مختلف ویروس نیوکاسل ارتباط مستقیم با بیماریزایی ویروس دارد (۱۱و۷). اگر چه سویه های غیربیماریزا (لنتوژنیک) براحتی ایجاد پلاک نمی کنند و جهت ایجاد پلاک احتیاج به شرایط خاصی از جمله حضور تریپسین دارند ولی سویه های بیماریزای ولوژنیک براحتی ایجاد پلاک می کنند(۳). در تحقیقات Madhan Mohan درسال ۲۰۰۵ ویروس‌های سویه وحشی بر روی سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه کشت داده شد و تغییرات آنها در طی ۵۰ بار پاساژ مورد بررسی قرار گرفت، قطر پلاک ها بر روی سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه ۲-٤ میلیمتر گزارش گردید(۱۵). kant در سال ۱۹۹۷ سویه های بیماری زا وغیر بیماری زا را بوسیله روش مولکولی RT-PCR مورد بررسی قرار داد و توانست با این روش این سویه ها را از یکدیگر تفکیک نماید(۱۲). براساس گزارش Kournikakis سلول‌های MDBK به علت اینکه به تریپسین حساس هستند جهت کشت سلولی ویروس‌های نیوکاسل با تریپسین مناسب نیستند لیکن توانستند با سلول‌هایی که از حساسیت کمتری به تریپسین بر خوردارند پلاک ایجاد نمایند(۱٤). محققین بسیاری اندازه پلاک تشکیل شده توسط سوش‌های مختلف

Archive of SID

www.SID.ir

ویروس بیماری نیوکاسل را مرتبط با بیماری‌زایی آنها می‌دانند و گفته اند که سوش‌های بیماریزا پلاک‌های بزرگتری نسبت به سوشهای غیر بیماری زا ایجاد می‌کنند بطوریکه سوش‌های غیر بیماری زای ویروس نیوکاسل خیلی کم یا اصلا" پلاک تولید نمیکنند مگر آنکه شرایط خاصی مهیا گردد که بطور مشخص اضافه کردن تریپسین در محیط کشت است(۱). در این تحقیق پلاک‌های ایجاد شده توسط ویروس در ۸۰ ساعت پس از تلقیح ویروس سازگار شده به سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه به‌وضوح مشاهده گردیدند، این در حالی است که Kournikakis و همکاران اعلام کردند که ٤٨ ساعت پس از تلقیح ویروس های کم بیماریزا به سلول‌های LLC-MK2 پلاک‌ها بطور مشخص مشاهده شدند(١٤) . در عین حال ماکزیمم عیار ویروس را ۳ روز پس از تلقیح گزارش کردند.(١٤). در واقع تفاوت در شکل و اندازه پلاک‌های ایجاد شده در نتیجه حضور ویروس را می‌توان به نوع سلول مورد استفاده در کشت سلولی و همینطور نوع سویه ویروس مورد استفاده مرتبط دانست که اینها در زمان ایجاد پلاک نیز نقش دارند. براساس مطالعات بارهونا مدت زمان نگهداری سلول‌های کشت سلولی هم می‌تواند در اندازه پلاک‌ها تأثیر داشته باشد، میزان تریپسین و مدت زمان حضور ویروس بر روی سلول‌های کشت سلولی هم در این خصوص بی تأثیر نخواهد بود (۸). در مطالعات Kournikakis مشخص گردید که میزان تریپسین جهت ایجاد پلاک ضروری است، بطوریکه میزان ۵ میکروگرم بر میلی لیتر تریپسین در محیط کشت باعث از هم پاشیدگی سلول‌ها میگردد و میزان ۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر تریپسین بر اساس مطالعات محققان جهت ایجاد پلاک توسط ویروس‌های نیوکاسل مناسب میباشد (١٤). ویروس‌های ولوژن در محل شکستگی پروتئین F در موقعییت ۱۱۲به ۱۱۳و۱۱۵ به۱۱٦دو زوج اسید امینه بازی لیزین و یا آرژنین و اسید آمینه فنیل آلانین در موقعیت ۱۱۷ قرار دارد(٦). وجود این اسید آمینه بازی در ویروس‌های ولوژنیک باعث میشود پروتئازهای میزبان که در بسیاری ازبافتهای بدن یافت میشوند F0 تبدیل به دو زیر واحد گردد. بنابر این در کشتهای سلولی جهت تکثیر و رشد به آنزیمهای شبه تریپسین نیاز ندارند (۵). نتایج بررسی مولکولی بدست آمده در این مطالعه از هر کلون، بطور مجزا نشان داد که تفاوتهایی در سکانس ژنی و ردیف نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه، وجود دارد اما با وجود تفاوتهای مشاهده شده در ردیف اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدی، مشاهده گردید که ردیف اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدی تمامی کلون‌ها در منطقه پروتئین F با ویروس ٤٦٤١٦٣.١ EF شباهت دارند و این نشان دهنده این است که ویروس واکسن یقیناً جزء لنتوژن ها بوده و در نتیجه استفاده متمادی از سوش اولیه جهشی که منجر به تغییر در منطقه شکستگی پروتئین F گردد بوجود نیامده است. در تمامی ٦ کلون مورد بررسی اسید های آمینه در منطقه شکننده پروتئین F بصورت G-G-R-G-G-R-۱۱۷ L ۱۱۱ بدست آمد.

در این تحقیق هدف اصلی در مرحله اول تهیه پلاک و یا ایجاد آن توسط ویروس سوش واکسن بوده و در مرحله بعد بررسی این پلاک ها ازنظرظاهری و مولکولی بود، براساس نتایج بدست آمده از این تحقیق می توان از پلاک های ایجاد شده توسط سوش واکسینال ویروس V4 نیوکاسل به منظور تولید واکسن کلون شده استفاده کرد. از طرفی در این تحقیق نشان داده شد که گرچه نتایج مولکولی بدست آمده از هر پلاک نشان دهنده تفاوتهای جزئی در نوکلئوتیدها می-باشد لیکن ردیف اسیدهای آمینه در منطقه شکست در تمامی پلاک ها بیانگر عدم تغییر در این منطقه علیرغم پاساژهای صورت گرفته جهت تکثیر سوش ویروس به منظور تولید واکسن می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع

1- Alexander, K., Pinhans, F. (1969): Cell fusion various strains of Newcastle disease virus and their virulance. J. Virol. 3(5): 539-540

2- Alexander, D.J.,Wilson, G.W., Russell, P.H., Lister, S.A., Parsons,G. (1985): Newcastle disease outbreaks fowl in Great Britain during (1984). Vet. Rec. 117(17):429-434.

3- Alexander, D. J. (1989): Newcastle disease, In: A Laboratory Manual for Isolation and Identification of Avian Pathogens. 3nd edition (ed. Swayne DE). International Book Distribution Co. USA; 114-120.

4- Alexander, D.J. (1995): The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. J. Comp. Pathol. 112(2):105-126.

5- Ahmed, T., Hossain, K.H., Billah, M.M., Islam, M.E. (2004): Adaptation Newcastle disease virus (NDV) on Vero cell line. Int. J. Poult. Sci. 3(2):153-156.

6- Ansnth, R., Kirubaharan, J.John., Priyadarhini, M.L.M., Albert, A. (2008): Isolation of Newcastle disease viruses of high virulence in unvaccinated healthy village chickens in south India. Int. J. Poult. Sci.7(4):368-373

7- Balkovetz, D.F. (1998): Hepatocyte growth factor and Madian-Darby canine kideney cells: in vitro models of epithelial cell movement and morphogenesis. Microsc. Res. Tech. 43(5):456-630.

8- Barhona, H.H., Hanson, R.P. (1986): Plaque enhancement of Newcastle disease virus (lentogenic strain) by magnesium and diethlaminoethyle dextran . Avian. Dis. 12(1): 151-158.

9- Cross, G.M. (1988): Newcastle disease vaccine production. In: Newcastle Disease, (ed. Alexander DJ). Kluwer Academic Publishers, Massachusetts; 333-346

10- Hemmatzadeh, F., Nayeri, B., Tofighi, E.R.(2006): Antigenic difference in Newcastle viruses isolated in Iran. Int. J. Pout. Sci. 5(5):408-410.

11- Jayawardana, G.W., De Alwis, M.C., Bandara, D. (1990): Oral vaccination of chickens against Newcastle disease with V4 vaccine delivered on processed rice grains. Aust. Vet. J. 67: 364-366.

12- Kant, A., Koch,G., Roozelaar, D.J., Balk,F. (1997): Differentiation of virulent and non-virulent strain of Newcastle disease virus within 24 hours polymerase chain reaction. Avian. pathol. 26(4): 837-849.

13- Knipe, D.M, Howley, P.M. (2001): Fields Virology 4th edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, P: 1305-1309.

14- Kournikakis, B. Fildes, J. (1988): Titration of avirulent Newcastle disease virus by the plaque assay method. J. Virol. Method. 20(4):285-293.

15- Mohan, M. Sohini, D., Kumanan, K. (2005): Molecular changes of the fusion protein gene of chicken embryo fibroblast–Adapted velogenic Newcastle disease virus: effect on its pathogenicity. Avian Dis. 49(1): 56-62.

Archive of SID

www.SID.ir